



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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Το γενετικό απόθεμα του μπακαλιάρου *Merluccius
merluccius* στη Μεσόγειο θάλασσα»**

Σιώμου Αναστασία

Βόλος 2024

«Το γενετικό απόθεμα του μπακαλιάρου *Merluccius merluccius* στη
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 Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

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

Αφιερώνεται στον σύντροφο μου

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στη συγγραφή και ολοκλήρωση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας. Αρχικά ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Γεώργιο Γκάφα για την συνεργασία και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της συγγραφής της εργασίας μου. Επίσης, ευχαριστώ την κύρια Ιωάννα Σαραντοπούλου για την προφορά και την βοήθεια της στο εργαστηριακού μέρους του πειράματος. Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την συμβολή και την υποστήριξη τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γενετική σύσταση του μπακαλιάρου, γνωστού ως *Merluccius merluccius*, στη Μεσόγειο Θάλασσα διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διαχείριση της αλιείας και στις προσπάθειες διατήρησης. Η παρούσα μελέτη διερευνά τη γενετική σύνθεση αυτού του οικονομικά σημαντικού είδους, διερευνώντας το εξελικτικό υπόβαθρο, την ταξινόμηση, την κατανομή και την εκμετάλλευσή του στην περιοχή της Μεσογείου. Η μελέτη παρουσιάζει την ποικιλομορφία των Gadiformes, προσφέροντας πληροφορίες για την εξελικτική τους ιστορία και την ταξινόμηση των οικογενειών Gadiformes στην περιοχή της Μεσογείου. Με επίκεντρο τον *Merluccius merluccius*, η μελέτη σκιαγραφεί την ταξινόμηση, τα πρότυπα κατανομής και την πληθυσμιακή γενετική του. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με δίχτυα από ψαράδες στον Παγασητικό κόλπο. Γενετικό υλικό απομονώθηκε από τον ιστό 21 ιχθύων που αλιεύτηκαν. Τμήμα μιτοχονδριακού DNA που κωδικοποιεί την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI), ενισχύθηκε με PCR και ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση. Η αλληλούχιση των δειγμάτων μέσω του προγράμματος Blast, της βάσης δεδομένων αλληλουχιών GenBank έδειξε 17 αλληλουχίες να αντιστοιχούν σε άτομα του είδους. Μέσω του NCBI, έγινε ανάκτηση 14 ακόμη αλληλουχιών γονιδίου COI του είδους από περιοχές της Ισπανίας, για τη σύγκριση και συσχέτιση με τα υπόλοιπα δείγματα. Η επεξεργασία των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα Aliview, Fabox και Arlequin. Για τη σύγκριση των πληθυσμών υπολογίστηκαν οι δείκτες Fst, Tajima's D και έγινε ανάλυση της μοριακής διακύμανσης AMOVA. Η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των εν λόγω περιοχών βρέθηκε στατιστικά μη σημαντική. Ωστόσο παρατηρήθηκε μεγάλη ποικιλομορφία ενδοπληθυσμιακά στις θάλασσες της Ισπανίας. Τα γεγονότα αυτά μπορεί να αποδίδονται σε ανθρώπινη δραστηριότητα, γεωγραφική απομόνωση και παύση γενετικής ροής. Είναι πιθανό η επανάληψη αυτής της μελέτης στο μέλλον με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων να αποκαλύψει σημαντικά συμπεράσματα για τους ιχθυοπληθυσμούς αυτούς.

Λέξεις κλειδιά: *Merluccius merluccius*, πληθυσμιακή γενετική, γονίδιο COI, γενετική διαφοροποίηση, θάλασσες Ελλάδας και Ισπανίας.

Περιεχόμενα

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Βιοποικιλότητα των Γαδόμορφων	8
1.2 Οικογένειες Gadiformes στη Μεσόγειο Θάλασσα.....	12
1.3 Πληθυσμιακές μελέτες στην περιοχή της Μεσογείου	13
1.4 Το είδος <i>Merluccius merluccius</i>	15
1.5 Γονίδιο COI σε πληθυσμιακές μελέτες.....	18
1.6 Υποθέσεις έρευνας.....	20
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
2.1 Περιοχή δειγματοληψίας	22
2.2 Εξαγωγή γενετικού υλικού	23
2.3 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης.....	25
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	27
2.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	28
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
4.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων	35
4.2 Ποικιλομορφία των πληθυσμών	37
4.3 Έλλειψη γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών	39
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	43
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47
ABSTRACT	63

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοποικιλότητα των Γαδόμορφων

Τα gadiformes, επιστημονικά γνωστά ως Gadiformes, είναι μια ταξινομική τάξη ψαριών, που μερικές φορές αναφέρεται ως Anacanthini. Τα είδη αυτά περιλαμβάνουν μια ποικιλία οργανισμών που χρησιμεύουν ως τροφή για τον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων εκείνων όπως ο μπακαλιάρος που συλλαμβάνονται σε σημαντικούς αριθμούς. Τα ψάρια αυτά απαντώνται κυρίως σε θαλάσσια περιβάλλοντα και κατοικούν σε ωκεανούς σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο, απαντώνται συχνότερα σε εύκρατες ή ψυχρότερες θάλασσες, ενώ μόνο λίγα τροπικά είδη κατοικούν σε σημαντικά βάθη. Αρκετά είδη κατοικούν σε υφάλμυρες εκβολές ποταμών. Μόνο η *Lotta lotta* και τα δύο είδη του γένους *Microgadus* έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε γλυκό νερό (Nelson, 2006). Η τάξη Gadiformes αποτελείται από περισσότερα από 500 ζώντα είδη, τα οποία απαντούν σε όλους τους ωκεανούς, από τα πολικά έως τα τροπικά ύδατα, και απαντώνται σε ενδιαίτηματα βαθιάς θάλασσας, νεριτικών, εκβολών και γλυκού νερού. Τα Gadiformes είναι σχετικά κοινά ως απολιθώματα. Ειδικότερα, το αρχείο που βασίζεται σε ωτόλιθους είναι πολύ πλούσιο, κυρίως χάρη στις προσπάθειες λίγων παλαιοντολόγων που πραγματοποίησαν εκτεταμένες εξερευνήσεις των τριτογενών θαλάσσιων αποθέσεων της λεκάνης της Βόρειας Θάλασσας, μιας περιοχής που ιστορικά χαρακτηρίζεται από άφθονους και αρκετά διαφοροποιημένους πληθυσμούς γαδόμορφων. Παρόλο που τα πρώτα βήματα της εξελικτικής ιστορίας αυτής της ομάδας παραμένουν ασαφή, έχει υποθεθεί μια κρητιδική προέλευση με βάση τις σχέσεις των αδελφών ομάδων τους (Nolf and Steurbaut, 1989).

Παρά τη μεγάλη εμπορική και οικολογική σημασία και τη μακρά ιστορία ταξινομικών μελετών, η γνώση της συστηματικής των Gadiformes δεν είναι ακόμη καθόλου σαφής. Οι περισσότερες διαθέσιμες πληροφορίες προέρχονται από εμπορικά σημαντικά είδη και βασίζονται σε μορφολογικά δεδομένα. Επί του παρόντος, διάφοροι συγγραφείς αναγνωρίζουν από 11 έως 14 οικογένειες, περίπου 75 γένη και περισσότερα από 500 είδη στην ομάδα.

Τα Gadiformes τυπικά περιλαμβάνονται στην υπεραρχαιολογική ταξινομική ομάδα Paracanthopterygii. Ωστόσο, το ποια άλλα taxa θα πρέπει να συμπεριληφθούν σε αυτή την

ομάδα παραμένει αδιευκρίνιστο, ενώ τα μορφολογικά και μοριακά δεδομένα δεν συμφωνούν ως προς την ακριβή ταυτότητα του πλησιέστερου συγγενή των Gadiformes. Στην πραγματικότητα, μια μακροχρόνια διαμάχη σχετικά με την ένταξη και τις συσχετίσεις των παρακανθόπττερων αναζωπυρώθηκε λόγω των πρόσφατων αναλύσεων των αλληλουχιών ολόκληρου του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, οι οποίες αναγνώρισαν τα ζειόζωα (τάξη Zeiformes, υποτάξη Zeioidei) ως την αδελφή ομάδα των Gadiformes. Σύμφωνα με τα μιτογονιδιωματικά δεδομένα, η ονομασία «*Paracanthopterygii*» θα πρέπει να διατηρηθεί για μια κλάση που περιλαμβάνει τα Gadiformes, Zeioidei, Percopsiformes και Polymixiiformes (Miya et al., 2005).

Μέχρι σήμερα δεν έχει δημοσιευθεί καμία ολοκληρωμένη μοριακή φυλογένεση για τα Gadiformes. Λίγες μελέτες που χρησιμοποίησαν αλληλουχίες μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) επικεντρώθηκαν κυρίως στις σχέσεις ειδών είτε εντός των Gadinae είτε εντός των Merlucciidae. Οι Teletchea et al. (2006) δημοσίευσαν μια φυλογένεση της οικογένειας Gadidae με βάση 30 μορφολογικούς χαρακτήρες και δύο μιτοχονδριακά γονίδια: το πλήρες κυτόχρωμα b και τη μερική κυτοχρωμική οξειδάση I (1530 bp). Η μελέτη τους περιελάμβανε 19 από τα 22 γένη που παραδοσιακά περιλαμβάνονται στην ομάδα. Με βάση τα αποτελέσματά τους, πρότειναν μια νέα προσωρινή ταξινόμηση των γαδοειδών. Οι von der Heyden και Matthee (2008) πρόσθεσαν 6 νέες αλληλουχίες στο σύνολο δεδομένων των Teletchea et al. (2006), οι οποίες αντιπροσωπεύουν άλλα 3 γαδοειδή γένη: *Lyconus* (2 είδη.), *Macruronus* (2 είδη.) και *Steindachneria* (1 είδος.), καθώς και δύο είδη *Merluccius*. Τα αποτελέσματά τους δείχνουν πειστικά ότι τα *Steindachneridae* αποτελούν μονοφυλετική ομάδα και ότι τα *Lyconus*, *Macruronus* και *Merluccius* δεν αποτελούν μονοφυλετική ομάδα, προτείνοντας έτσι την αναβίωση της οικογένειας Lyconidae.

Οι μοριακές συστηματικές μελέτες των Merlucciidae έχουν βασιστεί σε αλληλουχικά δεδομένα, σε αλληλουχίες mtDNA (Quinteiro et al., 2000) ή και στα δύο (Grant and Leslie, 2001). Οι μελέτες αυτές προσδιόρισαν δύο καλά υποστηριζόμενες κλάσεις εντός των Merlucciidae: τα είδη του Παλαιού Κόσμου (Ευρώπη συν Αφρική) και τα είδη του Νέου Κόσμου (Δυτικός Ατλαντικός και ανατολικός Ειρηνικός), αποκαλύπτοντας ένα ισχυρό ζωογεωγραφικό πρότυπο.

Υπάρχει, ωστόσο, μια γενική συμφωνία μεταξύ των πρόσφατων μοριακών μελετών για μια γενεαλογική γραμμή που περιλαμβάνει τα Zeiformes, Stylephoriformes και Gadiformes. Μεταξύ αυτών των τάξεων, οι Gadiformes είναι οι πιο πλούσιες σε είδη και πιο σύνθετες φυλογενετικά. Η επίλυση των σχέσεων μεταξύ των Gadiformes, επομένως, είναι κρίσιμη για

την καλύτερη κατανόηση των σχέσεων και της εξέλιξης των παρακανθόπττερων και άλλων πρώιμα αποκλινόντων ακανθόμορφων ψαριών. Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες επίλυσης των σχέσεων των Gadiformes με βάση κυρίως μορφολογικά δεδομένα (Markle 1989- Nolf and Steurbaut 1989).

Οι μελέτες αυτές παρήγαγαν σε μεγάλο βαθμό αντικρουόμενα αποτελέσματα, χωρίς να υπάρχει συναίνεση όσον αφορά τη φυλογένεση και την ταξινόμηση της ομάδας. Ο Endo (2002) δημοσίευσε την πιο πρόσφατη και εκτεταμένη ανάλυση της φυλογένεσης και ταξινόμησης των Gadiformes με βάση τη μορφολογία). Αρκετές γενετικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις συστηματικές σχέσεις των υποομάδων (δηλ. οικογενειών ή στις φυλογενετικές συγγένειες συγκεκριμένων taxa) των Gadiformes (Teletchea et al. 2006).

Οι Malstrøm et al. (2016) ανέλυσαν 567 εξόνια που αντιπροσωπεύουν 111 γονίδια (71.418 bp) για 27 είδη Gadiform από επτά οικογένειες. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι τα Gadiformes έχασαν το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας II περίπου 105Ma. Οι Hughes κ.ά. (2018) εξόρυξαν δεδομένα από τους Malstrøm και συν. (2016) για να συγκεντρώσουν 1.105 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για 11 οικογένειες, αλλά δεν προέκυψε συναίνεση σχετικά με τις σχέσεις μεταξύ αυτών των οικογενειών από διάφορες αναλύσεις. Από αυτές τις προηγούμενες μελέτες προέκυψε μικρή έως μηδενική συναίνεση σχετικά με τις σχέσεις των Gadiformes σε επίπεδο οικογένειας (Hughes et al. 2018).

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη μονοφυΐα των Gadiformes και χωρίζουν τα Gadiformes σε 12 οικογένειες σε τρεις υποτάξεις, δηλαδή τις Muraenolepidoidei, Macrouridae και Gadoidei, αλλά η τοποθέτηση των Muraenolepididae ως αδελφής ομάδας με όλα τα άλλα Gadiformes υποστηρίζεται ασθενώς. Οι Betancur-R και συν. (2013) κατασκεύασαν μια νέα έκδοση της φυλογενετικής ταξινόμησης των οστεϊδών ψαριών που καλύπτει σχεδόν 2000 είδη με βάση το γονιδίωμα mtDNA και 20 πυρηνικά γονίδια. Οι Betancur-R et al., (2013) δείχνουν ότι η οικογένεια Merlucciidae και όχι η οικογένεια Muraenolepididae είναι ο βασικός κλάδος στη φυλογένεση των Gadiformes. Η τοποθέτηση της Muraenolepididae ως αδελφής ομάδας με όλα τα άλλα Gadiformes δεν υποστηρίζεται, απορρίπτοντας έτσι την εγκυρότητα της υποτάξης Muraenolepidoidei. Επιπλέον, η οικογένεια Lotidae δεν αναγνωρίζεται πλέον επειδή δεν είναι μονοφυλετική, και τρία γένη (δηλ. *Brosme*, *Lota* και *Molva*) που ανήκαν προηγουμένως στα Lotidae περιλαμβάνονται τώρα στα Gadidae.

Οι Hubbs & Schultz (1941) έθεσαν για πρώτη φορά την ιδέα τριών υποειδών του *L. lota*, δηλαδή του *L. lota leptura*, του *L. lota lota lota* και του *L. lota maculosa*. Ο Pivnicka (1970) πραγματοποίησε πρόσθετες μορφολογικές αναλύσεις σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς κολιός

και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν δύο διακριτές μορφές κολιός, δηλαδή η *L. lota lota* και η *L. lota maculosa*. Μια μοριακή έρευνα του πολυμορφισμού του κυτοχρώματος b που διεξήχθη σε 41 πληθυσμούς προσπάθησε να λύσει τη σύγχυση. Τα αποτελέσματα του κυτοχρώματος b συμφωνούν με τα ιστορικά περιγραφέντα υποείδη, *L. lota lota lota* και *L. lota maculosa* (Van Houdt, 2003).

Ωστόσο, οι Fang et al, (2013) ανέφεραν ένα νέο υποείδος του *L. lota* από τον ποταμό Amur της Κίνας, υποδεικνύοντας τουλάχιστον τρία υποείδη του *L. lota*. Τα απολιθωμένα στοιχεία δείχνουν ότι το γένος κατοικεί ήδη σε ευρωπαϊκά ποτάμια στις αρχές του Πλειόκαινου, γεγονός που υποδηλώνει ότι το γένος αυτό έχει ηλικία τουλάχιστον 5 Myr. Ωστόσο, η μοριακή έρευνα του κυτοχρώματος b αποκαλύπτει ότι η σημερινή γενετική παραλλαγή είναι ηλικίας μόλις 1 Myr. Θα πρέπει να αποκαλυφθεί το χρονικό πλαίσιο αυτού του μοναδικού είδους γαδοειδών του γλυκού νερού. Δεδομένου ότι τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα αντιπροσωπεύουν έναν μόνο τόπο και ότι τα δέντρα που βασίζονται στα μιτοχόνδρια είναι ενίοτε ανακριβή λόγω της εσωστρέφειας, του κορεσμού ή της επιλογής, οι φυλογενετικές αναλύσεις που βασίζονται σε πολλαπλούς πυρηνικούς τόπους είναι επιθυμητές για τη διαλεύκανση της εξελικτικής ιστορίας (Omeland, 2003). Μια υπόσχεση της νέας εποχής της φυλογενωμικής είναι ότι ο αυξανόμενος αριθμός γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων ολόκληρων γονιδιωμάτων, μπορεί να επιλύσει ικανοποιητικά τις συγκρούσεις μεταξύ μελετών λίγων γονιδίων και να βελτιώσει την ευρωστία και την αξιοπιστία της μοριακής φυλογένεσης.

Συνοπτικά η γεωγραφική κατανομή των γαδόμορφων είναι εκτενής και ποικιλόμορφη. Στον Βόρειο Ατλαντικό Ωκεανό εμφανίζεται υψηλή πυκνότητα γαδόμορφων. Ειδικά οι γαδόμορφοι του γένους *Gadus* είναι διαδεδομένοι στην περιοχή, με το *Gadus morhua* (Κόκκινος γάδος) να είναι χαρακτηριστικό είδος. Στο Νότιο Ατλαντικό Ωκεανό εμφανίζονται λιγότερο συχνά, αλλά υπάρχουν είδη όπως ο *Merluccius capensis*. Ο Ειρηνικός Ωκεανός περιλαμβάνει αρκετά είδη, με σημαντική ποικιλία γαδόμορφων τόσο σε ψυχρές όσο και σε τροπικές περιοχές. Στον Ινδικό Ωκεανό εμφανίζονται λιγότερα είδη συγκριτικά με τον Ατλαντικό και τον Ειρηνικό, αλλά υπάρχουν κάποιες οικογένειες όπως η Macrouridae. Τέλος στην Μεσόγειο Θάλασσα ο Ευρωπαϊκός μπακαλιάρος (*Merluccius merluccius*) είναι κυρίαρχο είδος. Άλλα είδη γαδόμορφων απαντώνται σε διάφορες περιοχές της Μεσογείου με περιορισμένη κατανομή και πυκνότητα.

Σήμερα, οι ακόλουθες 10 οικογένειες είναι γενικά αποδεκτές στη σειρά των γαδόμορφων:

- Βρεγμακερωτίδες (Bregmacerotidae),
- Ευκλιχθυΐδες (Euclichthyidae),
- Γαδίδες (Gadidae),
- Λοτίδες (Lotidae),
- Μακρουρίδες (Macrouridae),
- Μελανονίδες (Melanonidae),
- Μερλουκίδες (Merlucciidae),
- Μορίδες (Moridae)
- Μυραινολεπιδίδες (Muraenolepididae),
- Φυκίδες (Phycidae)

1.2 Οικογένειες Gadiformes στη Μεσόγειο Θάλασσα

Η οικογένειες Gadidae και Macrouridae είναι οι πιο κοινές και σημαντικές οικογένειες των Gadiformes στη Μεσόγειο Θάλασσα. Περιλαμβάνει το γένος *Merluccius*, με τον *Merluccius merluccius* (Ευρωπαϊκός μπακαλιάρος) να είναι το πιο χαρακτηριστικό είδος της οικογένειας Merlucciidae, που απαντάται στη Μεσόγειο. Η κατανομή του εκτείνεται σε όλη τη Μεσόγειο Θάλασσα, αλλά η πυκνότητα του μπορεί να ποικίλλει μεταξύ των περιοχών. Γενικά η Δυτική Μεσόγειος φιλοξενεί σημαντική ποικιλία γαδόμορφων. Τα σημαντικότερα είδη που

απαντώνται στην περιοχή αυτή είναι τα: *Trisopterus luscus* (L.), *Pollachius pollachius* (L.), *Trisopterus minutus* (L.), *Micromesistius poutassou* (Risso, 1826), *Molva dypterygia* (Pennant, 1784) και *Phycis phycis* (L.). Στην Ανατολική Μεσόγειο η ποικιλία και η πυκνότητα των γαδόμορφων είναι γενικά μικρότερη συγκριτικά με τη Δυτική. Ενδεικτικά κάποια είδη που αναφέρονται είναι τα *Merlangius merlangus* (L.), *Phycis phycis* (L.) και *Pollachius pollachius* (L.) (Νεοφύτου 2015).

1.3 Πληθυσμιακές μελέτες στην περιοχή της Μεσογείου

Η οικογένεια Bregmacerotidae αποτελείται από ένα μόνο γένος και 12 επίσημα αναγνωρισμένα είδη. Τα είδη αυτά απαντώνται σε τροπικούς και υποτροπικούς ωκεανούς και θάλασσες (Froese & Pauly 2010). Ο γάδος Antenna, επιστημονικά γνωστός ως *Bregmaceros atlanticus* (Goode & Bean 1886), διαμένει συνήθως σε αμμώδεις ή λασπώδεις περιοχές που βρίσκονται σε βάθη άνω των 1000 μέτρων. Ο *B. atlanticus* αναφέρθηκε αρχικά στα Στενά της Σικελίας στη δυτική Μεσόγειο Θάλασσα. Ωστόσο, οι Torii et al. (2003) πρότειναν ότι η καταγραφή αυτή ήταν αμφισβητήσιμη. Σε μεταγενέστερη μελέτη, οι Yilmaz et al. (2004) ανακάλυψαν δύο δείγματα του *B. atlanticus* στα στομαχικά περιεχόμενα του *Saurida undosquamis*. Τα δείγματα αυτά είχαν συλληφθεί στον κόλπο της Αττάλειας, που βρίσκεται στην ανατολική Μεσόγειο Θάλασσα. Οι Goren & Galil (2006) πραγματοποίησαν τη μελέτη τους με βάση τέσσερα δείγματα που εντοπίστηκαν κατά μήκος των ακτών του Ισραήλ. Οι Filiz et al. (2007) ανέφεραν μια νέα καταγραφή του στομαχικού περιεχομένου του *Trachurus trachurus* από τον κόλπο Kuşadası, στο Αιγαίο Πέλαγος. Κοντά στην έρευνα αυτή, συνολικά πέντε άτομα του *B. atlanticus* ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά με τη χρήση γρι-γρι κοντά στις μεσογειακές ακτές της Τουρκίας. Το *Bregmaceros atlanticus* απαντάται κυρίως σε περιτροπικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένων του Ανατολικού Ατλαντικού (Νότια Αφρική), του Δυτικού Ατλαντικού (Νιου Τζέρσεϊ, ΗΠΑ και Κόλπος του Μεξικού έως Γκουιάνας) και του Ινδο-Ειρηνικού (Νότια Αφρική, κανάλι της Μοζαμβίκης και νότια Ιαπωνία). Είναι πιθανό ότι το *B. atlanticus* εισήλθε στη Μεσόγειο Θάλασσα από τον Ατλαντικό Ωκεανό μέσω του στενού του Γιβραλτάρ και εγκαταστάθηκε στη Λεβαντίνη Θάλασσα, η οποία έχει υποτροπικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, οι Goren & Galil (2006) υποστήριξαν ότι το *B. atlanticus* απελευθερώθηκε στις τουρκικές μεσογειακές ακτές (Αιγαίο Πέλαγος) με τη χρήση έρματος. Η παρουσία και το γεωγραφικό εύρος του είδους αυτού, όπως προκύπτει από τη μελέτη των

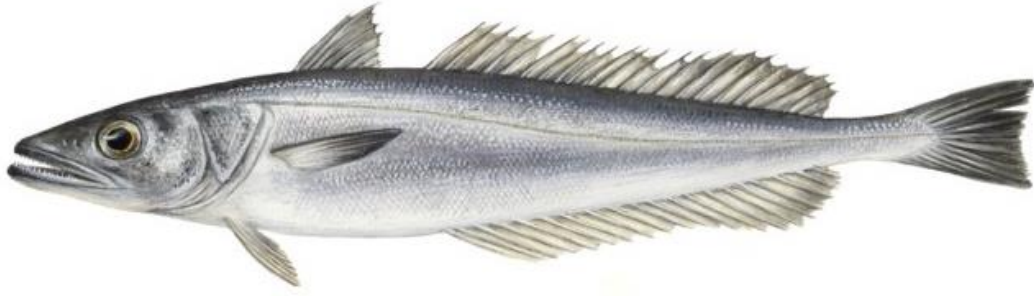
Goren & Galil (2006), υποδηλώνουν ότι εισέρχεται στη Μεσόγειο Θάλασσα μέσω μετανάστευσης, προερχόμενο από τα στενά της Σικελίας, το Αιγαίο Πέλαγος, τις ακτές του Ισραήλ και τη βορειοανατολική Μεσόγειο Θάλασσα.

Το 2020 από τους Asli Şalcioğlu et al. ερευνήθηκαν η ταξινομική ανάλυση και η φυλογενετική σχέση δύο υποτιθέμενων υποειδών του *Merlangius merlangus*, δηλαδή του *M. m. euxinus* και *M. m. merlangus*. Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση του Τουρκικού Συστήματος Στενών στην εξελικτική ιστορία και τη γενετική δομή του *M. merlangus*. Αναλυθήκαν γονίδια της υπομονάδας I της οξειδάσης του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος c και του κυτοχρώματος b και το γονίδιο που ενεργοποιεί τον πυρηνικό ανασυνδυασμό. Τα αποτελέσματά δεν υποδεικνύουν σαφή διάκριση μεταξύ των δύο υποτιθέμενων υποειδών, η οποία αποδίδεται στη χαμηλή ανάλυση του γονιδίου που ενεργοποιεί τον ανασυνδυασμό ή/και στην παρουσία πιθανής γονιδιακής ροής μεταξύ των δύο υποειδών. Το χρονικό μοτίβο απόκλισης μεταξύ των δύο υποειδών σχετίζεται με το Τελευταίο Μέγιστο Παγετώνων (219 Kya), ενώ η επέκταση κάθε κύριας τοποθεσίας δειγματοληψίας σημειώθηκε μετά την πλημμύρα της Μαύρης Θάλασσας από αλμυρό νερό από τη Μεσόγειο (5 Kya), μετά από περίοδο σταθερότητας. Επιπλέον, παρατηρούνται σημαντικές γενετικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων του Βορείου Αιγαίου και των συλλογών από το Σύστημα των Τουρκικών Στενών και της Μαύρης Θάλασσας, μαζί με κάποια σημαντική δομή μεταξύ των τοποθεσιών δειγματοληψίας που βρίσκονται στο Τουρκικό Σύστημα Στενών και στη Μαύρη Θάλασσα. Η χαμηλότερη γενετική μεταβλητότητα του *M. merlangus* της ανατολικής Μεσογείου σε σύγκριση με αυτά του Ατλαντικού μπορεί να οφείλεται σε πιθανή συμφόρηση πληθυσμού πριν από την τελευταία περίοδο των παγετώνων, μια τάση που απαντάται συνήθως σε αυτά τα νερά. Χαμηλά επίπεδα ποικιλομορφίας στην περιοχή σε σύγκριση με εκείνα του Ατλαντικού παρατηρήθηκαν επίσης σε άλλα είδη ψαριών, όπως το *Spratus sprattus* και το *Raja clavata* στη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα (Chevelot et al., 2006). Επιπλέον, η χαμηλή γενετική μεταβλητότητα του ανατολικού *Scophthalmus maximus* σε σύγκριση με το δυτικό απόθεμα, αποδόθηκε σε ένα πληθυσμιακό σημείο συμφόρησης (Suziki 2004). Ομοίως, η χαμηλότερη γενετική μεταβλητότητα του *M. merlangus* της ανατολικής Μεσογείου θα μπορούσε να αποδοθεί σε ένα πιθανό σημείο συμφόρησης του πληθυσμού πριν από την τελευταία περίοδο των παγετώνων ή/και τις διαφορές στα πρότυπα επέκτασης του πληθυσμού μεταξύ του Ατλαντικού και των αποθεμάτων της Ανατολικής Μεσογείου/Μαύρης Θάλασσας.

Το 2003 από τους Mattiangeli, Valeria et al., εννέα αλλόζυμα και δύο μικροδορυφορικοί τόποι χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση του δυναμικού γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ

τριών δειγμάτων μεσογειακού φτωχού μπακαλιάρου (*Trisopterus minutus capelanus*), από τον Κόλπο του Λέοντα, το Αρχιπέλαγος της Τοσκάνης και το Αιγαίο Πέλαγος. Και οι δύο τύποι δεικτών έδειξαν σταθερά αποτελέσματα, με τιμές F_{ST} 0,0262 και 0,0296 ($P < 0,0015$, μετά από διόρθωση Bonferroni για πολλαπλές δοκιμές) για αλλόζυμα και μικροδορυφόρους, αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκαν και δοκιμές ετερογένειας συχνότητας αλληλόμορφων μεταξύ ζευγών. Τα δείγματα έδειξαν σαφή διαχωρισμό μεταξύ των δύο δειγμάτων της δυτικής Μεσογείου (Κόλπος του Λέοντα, Αρχιπέλαγος της Τοσκάνης) και το ανατολικό (Αιγαίο Πέλαγος). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τουλάχιστον δύο αναπαραγωγικά απομονωμένοι πληθυσμοί φτωχού μπακαλιάρου εμφανίζονται στη Μεσόγειο.

1.4 Το είδος *Merluccius merluccius*



Εικόνα 1. *Merluccius merluccius* (FAO)

Το είδος αυτό έχει μελετηθεί εκτενώς, αλλά εξακολουθεί να υπάρχει κάποια αβεβαιότητα τόσο όσον αφορά τη δομή του πληθυσμού όσο και την κατάσταση των αποθεμάτων. Πράγματι, πρόσφατες μοριακές μελέτες έδειξαν ότι το χωρικό πρότυπο των πληθυσμών του μπακαλιάρου είναι πιο πολύπλοκο από ό,τι πιστεύαμε προηγουμένως, με πιθανό ρόλο οικολογικών και ωκεανογραφικών παραγόντων στη διαχρονική διακύμανση της γενετικής σύνθεσης του πληθυσμού στον Βискаϊκό Κόλπο (Lundy et al., 2000). Επιπλέον, τα αποθέματα μπακαλιάρου θεωρούνται γενικά υπερεκμεταλλευμένα, αλλά υπάρχουν σημαντικές αμφιβολίες για τη Μεσόγειο Θάλασσα, όπου η στρατολόγηση φαίνεται να προέρχεται από μεγάλα δείγματα από καταφύγια στα βαθύτερα ρήγματα (Abella et al. 1997). Ως εκ τούτου, ελήφθησαν 15 πληθυσμιακά δείγματα ευρωπαϊκού μπακαλιάρου από όλη την περιοχή εξάπλωσης του είδους (11 από τα οποία προέρχονταν από τη λιγότερο μελετημένη Μεσόγειο Θάλασσα) και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πολλαπλών αλλοζύμων.

Η γενετική ποικιλομορφία του είδους συγκρίθηκε στη συνέχεια με σχετικά περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά, όπως η αλατότητα και η θερμοκρασία, για να εκτιμηθεί ο ρόλος τους στη γενετική δομή των πληθυσμών. Συγκρίθηκαν επίσης τα επίπεδα γενετικής παραλλακτικότητας ανά θαλάσσια λεκάνη για την περαιτέρω αξιολόγηση των αποθεμάτων μπακαλιάρου (Cimmaruta et al., 2005). Οι επιδράσεις της επιλογής και της ιστορίας των πληθυσμών μπορεί να μην είναι πάντα αντίθετες, αλλά αντίθετα να αλληλεπιδρούν για να διαμορφώσουν τη γενετική σύνθεση των πληθυσμών. Μια σχετική μελέτη περίπτωσης αφορά τον γάδο του Ατλαντικού *Gadus morhua* στη βόρεια Νορβηγία. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των παράκτιων και των αρκτικών πληθυσμών. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στον πρόσφατο

διαχωρισμό των δύο πληθυσμιακών ομάδων, ο οποίος επιταχύνθηκε περαιτέρω από τα γρήγορα αποτελέσματα της διαφοροποιούσας επιλογής (Pogson & Fevolden 2003). Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στη γενετική σύνθεση του ευρωπαϊκού μπακαλιάρου (*Merluccius merluccius*) σε ολόκληρη την κατανομή του. Ο ευρωπαϊκός μπακαλιάρος κατέχει σημαντική σημασία στην κατηγορία των βενθοπελαγικών ειδών στην αλιεία της δυτικής ευρωπαϊκής υφαλοκρηπίδας. Θεωρείται επίσης βασικό είδος στη Μεσόγειο Θάλασσα (Oliver & Massutí 1995).

Για το λόγο αυτό, έχει διεξαχθεί διεξοδική έρευνα για το θέμα αυτό. Ωστόσο, εξακολουθεί να υπάρχει κάποια ασάφεια όσον αφορά τόσο τη δομή του πληθυσμού όσο και την κατάσταση των αποθεμάτων. Πρόσφατες μοριακές έρευνες αποκάλυψαν ότι η κατανομή των πληθυσμών του μπακαλιάρου είναι πιο περίπλοκη από ό,τι πιστεύαμε προηγουμένως. Οικολογικοί και ωκεανογραφικοί παράγοντες ενδέχεται να παίζουν ρόλο στις διαχρονικές μεταβολές της γενετικής σύνθεσης των πληθυσμών του μπακαλιάρου στον Βискаϊκό Κόλπο (Lundy et al. 1999, 2000). Επιπλέον, οι πληθυσμοί του μπακαλιάρου θεωρούνται συνήθως ως υπερεκμεταλλευόμενοι. Ωστόσο, υπάρχει κάποια αβεβαιότητα όσον αφορά τη Μεσόγειο Θάλασσα, καθώς τα στοιχεία δείχνουν ότι η στρατολόγηση γίνεται κυρίως από μεγαλύτερα αποθέματα που βρίσκονται σε καταφύγια στα βαθύτερα ρήγματα (Abella et al. 1997).

Η μελέτη που διεξήχθη από τους Cimaruta et al. (2005) εξέτασε τη γενετική σύνθεση του ευρωπαϊκού μπακαλιάρου σε ολόκληρη την κατανομή του, με ιδιαίτερη έμφαση στην υποβαθμισμένη Μεσόγειο Θάλασσα. Αν και το είδος αυτό έχει ήδη ερευνηθεί εκτενώς λόγω της οικονομικής του σημασίας στην αλιευτική βιομηχανία, η έρευνα αυτή απέδωσε αξιολογικά νέα ευρήματα.

Οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί του μπακαλιάρου έχουν υποστεί γενετική διαφοροποίηση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διακριτών ομάδων της Μεσογείου και του Ατλαντικού. Ο διαχωρισμός που παρατηρείται είναι αποτέλεσμα του προτύπου συχνότητας των αλληλομόρφων σε συγκεκριμένους τόπους, οι οποίοι παρουσιάζουν είτε σταδιακή μεταβολή της συχνότητας κατά μήκος μιας γεωγραφικής κλίσης (Gardh και Gri2) είτε διακριτή απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων από τις περιοχές του Ατλαντικού και της Μεσογείου (Gda και Mpi). Τα στατιστικά στοιχεία υποδηλώνουν ότι ο Ατλαντικός Ωκεανός και η Μεσόγειος Θάλασσα διαθέτουν διακριτούς πληθυσμούς μπακαλιάρου, με περιορισμένη γονιδιακή ροή μεταξύ τους, όπως φαίνεται από τις τιμές της παραμέτρου Nm. Προηγούμενες έρευνες έχουν παρατηρήσει την ύπαρξη δύο διαφορετικών πληθυσμών του *Merluccius merluccius*, ο ένας κατοικεί στη βορειοανατολική περιοχή του Ατλαντικού (από τη Μαυριτανία έως τη

Σκανδιναβία και την Ισλανδία) και ο άλλος στη Μεσόγειο Θάλασσα. Η διαπίστωση αυτή έχει τεκμηριωθεί σε πολλές μελέτες, συμπεριλαμβανομένης της εργασίας των Lundy et al. το 2000. Επιπλέον, μια μεταγενέστερη έρευνα που διεξήχθη στα ίδια δείγματα και χρησιμοποίησε παράσιτα νηματωδών ανισοφάγων ως βιολογικούς δείκτες, παρείχε στοιχεία για την ύπαρξη διακριτών αποθεμάτων τόσο στα ύδατα του Ατλαντικού όσο και της Μεσογείου (Mattiucci et al. 2004). Για τον ευρωπαϊκό μπακαλιάρο, τα δείγματα που έχουν μικρότερη γενετική παραλλακτικότητα είναι αυτά που θεωρούνται υπερεκμεταλλευμένα. Ωστόσο, υπάρχει αβεβαιότητα όσον αφορά τον γενετικά πιο μεταβλητό μεσογειακό πληθυσμό. Αυτός ο πληθυσμός φαίνεται να έχει σταθερή πρόσληψη λόγω της παρουσίας μεγάλων δειγμάτων που ζουν στις βαθύτερες χαράδρες (Abella et al. 2005). Η μεθοδολογία δειγματοληψίας που χρησιμοποιήθηκε στην έρευνα που διεξήγαγαν οι Levi et al. (2004) περιελάμβανε τη χρήση στρωματοποιημένης τυχαίας δειγματοληψίας στο Στενό της Σικελίας. Η μέθοδος αυτή βασίστηκε στη διαίρεση του πληθυσμού σε πέντε διακριτά στρώματα βάθους, με μέγιστο βάθος 800 μέτρα. Δεν βρέθηκαν διακριτοί υποπληθυσμοί με βάση τις παρατηρούμενες διακυμάνσεις στις αλληλικές συχνότητες. Ο Tudela (1999) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι, αν και υπάρχει φαινοτυπική διαφοροποίηση στη μορφολογική παραλλακτικότητα του γενετικά ομοιογενούς πληθυσμού στη βορειοδυτική Μεσόγειο, αυτό δεν οδηγεί σε σημαντικές διαφορές στις βιολογικές παραμέτρους (όπως η ανάπτυξη και η γονιμότητα) που είναι σημαντικές για τη μοντελοποίηση της δυναμικής των πληθυσμών. Ωστόσο, τα επακόλουθα ευρήματα της παρούσας μελέτης αποκάλυψαν διαφορές στις τάσεις ανάπτυξης των θηλυκών μεταξύ της περιοχής της Σικελίας και της Τυνησίας του Στενού. Τα αποτελέσματα αυτά ενδέχεται να καταδεικνύουν ότι η παρατηρούμενη μεταβλητότητα επηρεάζεται κυρίως από παράγοντες που σχετίζονται με ένα μικρότερο εύρος χώρου και χρόνου, παρά από χαρακτηριστικά που επηρεάζουν συγκεκριμένες τοποθεσίες.

1.5 Γονίδιο COI σε πληθυσμιακές μελέτες

Οι μέθοδοι με βάση το DNA αποδείχθηκαν κατάλληλες εναλλακτικές λύσεις για τις κλασικές μεθόδους με βάση τις πρωτεΐνες και έγιναν οι μέθοδοι προτίμησης για την ανάλυση ενός ευρέος φάσματος προϊόντων θαλασσινών. Ειδική για το είδος αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), πολλαπλή PCR, PCR ακολουθούμενη από ανάλυση πολυμορφισμών μήκους θραυσμάτων περιορισμού (PCR-RFLP), αλληλουχία νουκλεοτιδίων και μονόκλωνος διαμορφωτικός πολυμορφισμός (PCR-SSCP), που στοχεύουν κυρίως σε μιτοχονδριακούς (mt) δείκτες DNA, είναι μερικά παραδείγματα μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί για την ταυτοποίηση και τη διάκριση ειδών ψαριών, όπως τα πλατύψαρα, τα γκαδοειδή, τα σκομβροειδή, τα σολομοειδή και τα περκοειδή (Mafra et al., 2008, Rasmussen and Morrissey, 2009). Πιο πρόσφατα, οι μέθοδοι PCR πραγματικού χρόνου έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ταυτοποίηση ειδών ψαριών σε τρόφιμα λόγω των πλεονεκτημάτων της υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας, σε συνδυασμό με την απλότητα και την ταχύτητα (Hird et al., 2012, Sánchez et al., 2013, Taboada et al., 2017). Μια άλλη πρόσφατη προσέγγιση που εφαρμόζεται στη διάκριση ειδών ψαριών βασίζεται στη γραμμωτή κωδικοποίηση DNA, για την οποία το γονίδιο της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης c (COI) είναι ο στόχος που χρησιμοποιείται συχνότερα (Armani et al., 2015, Fernandes et al., 2017, Ferrito et al., 2016). Η γραμμωτή κωδικοποίηση του DNA βασίζεται στη διακύμανση της αλληλουχίας εντός μιας σύντομης και τυποποιημένης περιοχής του γονιδιώματος, η οποία ορίζεται ως «γραμμωτός κώδικας», για να καταστεί δυνατή η ταυτοποίηση των ειδών. Συγκεκριμένα, τμήματα COI των ~650 ζευγών βάσεων έχουν αποδειχθεί ότι μπορούν να διακρίνουν αξιόπιστα ζωικά είδη, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών (Carvalho et al., 2017, Pappalardo et al., 2015). Η χρήση ακόμη μικρότερων γραμμωτών κωδικών DNA (μίνι γραμμωτοί κωδικοί) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και συνιστάται περαιτέρω κατά την ανάλυση εξαιρετικά επεξεργασμένων τροφίμων που περιέχουν αποικοδομημένο DNA (Fernandes et al., 2017, Villa et al., 2016). Εκτός αυτού, οι μίνι-barcodes μπορούν να συνδυαστούν με την ανάλυση τήξης υψηλής ανάλυσης (HRM), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα οικονομικά αποδοτικό, ειδικό και υψηλής απόδοσης εργαλείο για τη διάκριση θραυσμάτων με μικρές νουκλεοτιδικές διαφορές, αποφεύγοντας έτσι την ανάγκη αλληλούχισης (Villa et al., 2016, Xanthopoulou et al., 2016). Ωστόσο, μόνο λίγες μελέτες αναφέρουν την προσέγγιση της μίνι-κωδικοποίησης σε συνδυασμό με την ανάλυση HRM για τη διαφοροποίηση ειδών ψαριών (Fernandes et al., 2017).

Παραδοσιακές μέθοδοι ταυτοποίησης των ειδών έχουν συμπληρωθεί με τη χρήση μοριακών δεικτών. Μια δημοφιλής τέτοια προσέγγιση αποτελεί το DNA barcoding, που χαρακτηρίζεται ως απλή, γρήγορη και προσιτή μέθοδος μοριακής ταυτοποίησης ειδών. Η μέθοδος στηρίζεται

στην αλληλουχία ενός τμήματος του γονιδίου COI του mtDNA, για τον διαχωρισμό των ειδών και την αντιστοίχιση των ατόμων σε είδη (Cywinska et. al., 2003). Το COI είναι γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνες και επομένως εμφανίζει ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, δεν περιλαμβάνει κωδικόνια λήξης και ιντρόνια στην ευθυγράμμιση, που διαταράσσουν τη μετάφραση της αλληλουχίας DNA σε αμινοξέα. Η ταυτοποίηση πραγματοποιείται μέσω αλληλουχιών 650 ζευγών βάσεων (bp) (Park et al. 2010). Αποκαλύπτει κρυπτογραφημένη ποικιλομορφία, ταυτοποιώντας δείγματα, όταν τα χαρακτηριστικά τους έχουν προσδώσει εσφαλμένη ταξινόμηση, λόγω της μορφολογικής τους ομοιότητας (Cywinska et al. 2003).

1.6 Υποθέσεις έρευνας

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η πληθυσμιακή γενετική ανάλυση του είδους *Merluccius merluccius* βάσει του μιτοχondριακού γονιδίου COI και ο έλεγχος της διαφοροποίησης των πληθυσμών μεταξύ Ελλάδας και Ισπανίας. Η κατανόηση της γενετικής δομής των αποθεμάτων του μπακαλιάρου (*Merluccius merluccius*) στη Μεσόγειο Θάλασσα είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματική διαχείριση και διατήρηση αυτού του οικονομικά σημαντικού είδους. Προτείνονται οι ακόλουθες υποθέσεις για τη διερεύνηση της γενετικής παραλλακτικότητας, της διαφοροποίησης των αποθεμάτων και των επιπτώσεων των περιβαλλοντικών και ανθρωπογενών παραγόντων στους πληθυσμούς του μερλούκιου στην περιοχή. Υποτίθεται ότι οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και της αλατότητας στη Μεσόγειο θα συσχετίζονται με τη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών του μπακαλιάρου. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι περιβαλλοντικές διαβαθμίσεις μπορούν να επηρεάσουν τη δυναμική των πληθυσμών και τη γενετική ποικιλομορφία στα θαλάσσια είδη (Reiss et al., 2009). Ως εκ τούτου, αναλύοντας γενετικούς δείκτες σε διαφορετικά ενδιαιτήματα, αναμένουμε να εντοπίσουμε διακριτούς γενετικούς πληθυσμούς που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Στη Μεσόγειο Θάλασσα υπάρχουν διακριτά γενετικά αποθέματα του *Merluccius merluccius*, τα οποία διαμορφώθηκαν από ιστορικά βιογεωγραφικά γεγονότα. Οι ιστορικές μετατοπίσεις στα επίπεδα της θάλασσας και η συνδεσιμότητα κατά τη διάρκεια των παγετωδών περιόδων έχουν πιθανώς επηρεάσει τη γενετική δομή των θαλάσσιων πληθυσμών (Cimmaruta et al.,

2005). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζει ότι περιοχές με ιστορική απομόνωση μπορεί να παρουσιάζουν μεγαλύτερη γενετική απόκλιση. Μοριακές τεχνικές, όπως η αλληλουχία μιτοχονδριακού DNA και η μικροδορυφορική ανάλυση, έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της γενετικής διακριτότητας μεταξύ πληθυσμών από διάφορες περιοχές της Μεσογείου. Η υπεραλίευση έχει οδηγήσει σε σημαντική μείωση της γενετικής ποικιλότητας του *Merluccius merluccius* στη Μεσόγειο. Υποθέτουμε ότι η συνεχιζόμενη αλιευτική πίεση έχει μειώσει το πραγματικό μέγεθος του πληθυσμού, με αποτέλεσμα τη μείωση του αλληλικού πλούτου και της ετεροζυγωτίας. Έρευνες δείχνουν ότι η υπερεκμετάλλευση μπορεί να διαβρώσει τη γενετική ποικιλομορφία, μειώνοντας την ανθεκτικότητα των πληθυσμών στις περιβαλλοντικές αλλαγές (Lo Brutto et al., 2004). Η υπόθεση αυτή μπορεί να αξιολογηθεί με τη σύγκριση των σύγχρονων γενετικών δεδομένων με τα ιστορικά αρχεία, για να εκτιμηθούν οι μεταβολές της γενετικής ποικιλότητας με την πάροδο του χρόνου. Η γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών *Merluccius merluccius* στη Μεσόγειο περιορίζεται από γεωγραφικά και ωκεανογραφικά εμπόδια. Η υπόθεση υποστηρίζει ότι η πολύπλοκη τοπογραφία και τα ωκεανογραφικά χαρακτηριστικά της Μεσογείου εμποδίζουν τη διασπορά των προνυμφών και τη μετανάστευση των ενηλίκων, οδηγώντας σε απομονωμένους πληθυσμούς. Τα περιβαλλοντικά εμπόδια, όπως τα Στενά του Γιβραλτάρ και τα ποικίλα ρεύματα, μπορεί να συμβάλλουν σε αυτή τη γενετική απομόνωση (Pita et al., 2016). Χρησιμοποιώντας γενετικές προσεγγίσεις τοπίου, μπορούμε να αξιολογήσουμε τα πρότυπα γονιδιακής ροής και απομόνωσης μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών. Θα ήταν εύλογο να υπάρχει γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών της Ανατολικής και της Δυτικής Μεσογείου του *Merluccius merluccius*. Με βάση προηγούμενες μελέτες, προτείνεται ότι η γενετική ανάλυση θα αποκαλύψει διακριτές γενετικές υπογραφές που διαχωρίζουν τους πληθυσμούς στις δύο αυτές περιοχές, πιθανότατα λόγω διαφορετικών περιβαλλοντικών πιέσεων και ιστορικής συνδεσιμότητας (Murua, 2010). Υπάρχει τοπική προσαρμογή στους πληθυσμούς του *Merluccius merluccius* ως απάντηση σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες στη Μεσόγειο. Η υπόθεση αυτή προτείνει ότι οι επιλεκτικές πιέσεις από τα τοπικά ενδιαίτηματα έχουν οδηγήσει σε προσαρμοστικές γενετικές παραλλαγές μεταξύ των πληθυσμών του μπακαλιάρου. Η τοπική προσαρμογή έχει τεκμηριωθεί σε διάφορα θαλάσσια είδη, επηρεάζοντας την επιβίωση και την αναπαραγωγική τους επιτυχία. Οι γονιδιωματικές αναλύσεις που στοχεύουν σε γονίδια που σχετίζονται με την περιβαλλοντική προσαρμοστικότητα θα βοηθήσουν στον εντοπισμό πιθανών προσαρμοστικών χαρακτηριστικών σε απόκριση στις τοπικές συνθήκες (García-Fernández, 2021).

Η παρούσα μελέτη αναλύει τη γενετική σύνθεση των πληθυσμών του *M. merluccius* στη Δυτική και Ανατολική Μεσόγειο. Συγκεκριμένα εξετάζουμε τη δομή αυτών των πληθυσμών, τα πρότυπα γονιδιακής ροής και τις διαχρονικές διακυμάνσεις του μεγέθους των πληθυσμών. Στόχος μας είναι να εξετάσουμε την υπάρχουσα βιβλιογραφία και τις πρόσφατες εξελίξεις στις γενετικές μεθοδολογίες για να κατανοήσουμε την περίπλοκη γενετική αρχιτεκτονική αυτού του είδους και τις επιπτώσεις της στη βιώσιμη διαχείριση της αλιείας. Επιπλέον, υπογραμμίζουμε τη σημασία της συμπερίληψης γενετικών δεδομένων μαζί με οικολογικές μεταβλητές για τη διευκρίνιση των μηχανισμών που επηρεάζουν τη δυναμική των πληθυσμών και για την ενημέρωση των τεχνικών προσαρμοστικής διαχείρισης υπό το πρίσμα των επίμονων περιβαλλοντικών αλλαγών. Η έρευνά μας επιδιώκει να ενισχύσει την κατανόηση της γενετικής αρχιτεκτονικής των αποθεμάτων του *M. merluccius* στη Μεσόγειο Θάλασσα μέσω μιας ολοκληρωμένης έρευνας της γενετικής του πληθυσμού.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Περιοχή δειγματοληψίας

Η συλλογή των ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμά έλαβε χώρα στον Παγασητικό κόλπο. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε έπειτα από παράκτια αλιεία από ψαράδες με τη χρήση διχτιού. Στη συνέχεια οι ιχθύες που συλλέχθηκαν (21 συγκεκριμένα), συντηρήθηκαν σε πάγο, εξασφαλίζοντας έτσι την ευζωία κατά τη θανάτωση και μεταφέρθηκαν με ασφάλεια στο εργαστήριο του τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με σκοπό την διεξαγωγή του πειράματος, το οποίο περιλαμβάνει την εξαγωγή του γενετικού υλικού και τις ενέργειες που ήταν απαραίτητες για την συγκέντρωση των συμπερασμάτων. Σε όλη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, ακολουθήθηκαν οι κανόνες υγιεινής του εργαστηρίου και τηρήθηκαν τα κατάλληλα πρωτόκολλα. Ο χειρισμός των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τις τοπικές κατευθυντήριες γραμμές για τη μεταχείριση των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς

(σύμφωνα με την Επίσημη Εφημερίδα της Ελληνικής Κυβέρνησης αριθ. 106/30 του Απρίλη 2013).

2.2 Εξαγωγή γενετικού υλικού

Υλικά και μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο: λαβίδα, νυστέρι, τρυβλίο Petri, Eppendorf 1,5mL, πιπέτες 2-20μL, 20-200μL, 100-1000μL, υδατόλουτρο, φυγόκεντρος (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Germany), θερμοκυκλοποιητής, θάλαμος αποστείρωσης υπεριώδους ακτινοβολίας, φούρνος μικροκυμάτων, ποτήρι ζέσεως, ζυγός ακριβείας, ογκομετρικές φιάλες.

Η απομόνωση ποσότητας σάρκας από την περιοχή του ουραίου ή πλευρικού πτερυγίου, για την εξαγωγή γενετικού υλικού, πραγματοποιήθηκε μετά την αφαίρεση λεπιών με αποστειρωμένο νυστέρι. Ο ιστός έπειτα τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο Eppendorf (Biologix, BMT-15N) και παρέμεινε σε αλκοόλη 90% στην κατάψυξη μέχρι την εξαγωγή DNA.

Το πρωτόκολλο Invitrogen by thermo Fisher Scientific, που ακολουθήθηκε για τα 21 δείγματα αποτελείται από τα στάδια:

-Προετοιμασία υδατόλουτρου στους 60 βαθμούς

- Τοποθέτηση τμήματος ιστού 0,01g σε αποστειρωμένο Eppendorf χωρητικότητας

1.5mL με βοήθεια λαβίδας και νυστεριού.

- Προσθήκη 200μL lysis buffer (0,4M NaCl, 10mM Tris-HCL, 2mM EDTA με pH 8). Το lysis

buffer 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.

- Προσθήκη 80μL 10% SDS -απορρυπαντικό που βοηθάει στη λύση των κυττάρων κατά την εξαγωγή DNA

- Προσθήκη 8μL πρωτεΐνάσης K (συγκέντρωσης 20mg/mL) που μετουσιώνει τις πρωτεΐνες.

Ακολουθεί ελαφρά ανάδευση με vortex.

- Τα δείγματα τοποθετούνται για επώαση στο υδατόλουτρο για 1-1.5 ώρα ώστε να αποικοδομηθούν οι πρωτεΐνες των κυττάρων και να απελευθερωθεί το DNA.

- Ανάδευση με vortex

- Φυγοκέντριση σε ταχύτητα 14.000 στροφές για 3 λεπτά

- Αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και τοποθέτηση σε νέο Eppendorf

χωρητικότητας 1,5mL

- Προσθήκη στο διάλυμα 20μL Rnase και 200μL Ly buffer

-Προσθήκη 200 μL καθαρής αιθανόλης

-Τοποθέτηση του μείγματος σε column tubes

- Ανάδευση με vortex

- Φυγοκέντριση σε ταχύτητα 10.000 στροφές για 1 λεπτό

-Μεταφορά σε καινούριο tube

- Προσθήκη 500μL Wb1 και φυγοκέντριση σε ταχύτητα 10.000 στροφές για 1 λεπτό

-Προσθήκη 500μL Wb2 και φυγοκέντριση σε ταχύτητα 14.000 στροφές για 3 λεπτά

-Μεταφρά σε νέο Eppendorf

-Προσθήκη 25-50μL elution buffer

-Αναμονή για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

- Φυγοκέντρωση σε ταχύτητα 14.000 στροφές για 3 λεπτά

Η αποτελεσματικότητα της εξαγωγής DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση όλων των δειγμάτων σε πήκτωμα αгарόζης 0,8% w/v σε TBE, παρατήρηση σε υπεριώδες φως(UV) και φωτογράφιση του πηκτώματος. Ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τα προϊόντα της PCR με πήκτωμα αгарόζης 1,2% w/v σε TBE.

2.3 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Για την εκκίνηση της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης, αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα.

- Σε θερμοανθεκτική κωνική φιάλη τοποθετείται 0,8g σκόνης αгарόζης σε 100mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1x (10,8g Tris-HCl, 5,5g Boric acid, 4 ml EDTA 0,5M pH 8) και διαλύεται στο φούρνο μικροκυμάτων (KENWOOD microwave) για 3 λεπτά στους 90oC μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Έπειτα τοποθετείται κάτω από τρεχούμενο νερό ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία του.

- Όταν η θερμοκρασία του μειωθεί στους 50oC προστίθενται 3μL αιθυλοβρωμίδιο

(EtBr). Το EtBr έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA και να φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως, ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες γενετικού υλικού στην πηκτή της αγαρόζης.

- Τοποθετείται στους 4 βαθμούς έως ότου πήξει

- Η πηκτή αγαρόζης τοποθετείται στο εκμαγείο με προσοχή ώστε να μην σχηματιστούν φυσαλίδες και προστίθεται χτένα ώστε να δημιουργηθούν οι οπές, τα «πηγάδια» που θα δεχθούν αργότερα τα δείγματα DNA.

- Όταν σταθεροποιηθεί η πηκτή, η χτένα αφαιρείται με προσοχή και το εκμαγείο τοποθετείται μέσα στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης. Ρυθμιστικό διάλυμα TBE προστίθεται μέχρι να καλυφθεί μόλις το πήκτωμα.

Σε κάθε πηγάδι φορτώθηκε με πιπέτα (με την τεχνική by pipetting) ποσότητα 5μL DNA δείγματος αναμιγμένη με 2 μL διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) χρωστικής Blue-bromophenol (Invitrogen). Στο πρώτο πηγάδι φορτώθηκε ποσότητα 1 μL μάρτυρα (DNA Ladder) μοριακού βάρους 1Kb και 2 μL διαλύματος φόρτωσης.

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. Ο μάρτυρας στο πρώτο πηγάδι, υπό υπεριώδες φως δίνει συγκεκριμένες γνωστές ζώνες, και η σύγκρισή του με τα δείγματα προσφέρει τον κατά προσέγγιση υπολογισμό των μηκών των ζωνών των δειγμάτων. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ομοιόμορφο πεδίο τάσης (90 volt) από το τροφοδοτικό (CONSORT E143) στη συσκευή (SCIE-PLAS) 30 λεπτά, μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα TBE σταθερού pH 8. Ακολούθησε παρατήρησή της πηκτής κάτω από υπεριώδες φως και φωτογράφιση από την συσκευή DNR, MiniBisBio Imaging Systems.

2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η διαδικασία της PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (BIOER Life Touch) για την ενίσχυση τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου COI. Το πρωτόκολλο PCR που εφαρμόστηκε αποτελείται από 30 κύκλους αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης με 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 του 2ου, 3ου, 4ου σταδίου για 30 κύκλους
- 6) 72°C για 10 λεπτά (τελική επιμήκυνση)
- 7) 10°C έως την αφαίρεση των δειγμάτων από την PCR

Η τεχνική της Gradient PCR εφαρμόστηκε στα δείγματα, με θερμοκρασίες 48-58°C, για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών. Αναλυτικά οι θερμοκρασίες ήταν: 48°C, 48,2°C, 48,6°C, 49,5°C, 50,6°C, 52°C, 53,7°C, 55,1°C, 56,2°C, 57,2°C, 57,7°C, 58°C. 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. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για την κατασκευή του mastermix της PCR που απεικονίζονται παρακάτω προστέθηκαν σε ένα Eppendorf 1,5mL πολλαπλασιασμένες επί τον αριθμό των 18 δειγμάτων - 17 δείγματα DNA και 1 τυφλό (negative control).

2.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα προγράμματα με τα οποία έγινε επεξεργασία των αλληλουχιών στα άτομα του είδους με σκοπό την διεξαγωγή των απαραίτητων συμπερασμάτων ήταν τα: Aliview, Fabox, Arlequin και Excel. Απαραίτητη ενέργεια πριν από την ανάλυση ήταν να πιστοποιηθεί η εγκυρότητα των αλληλουχιών. Το σύστημα Blast, της βάσης δεδομένων GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (NCBI) αναγνώρισε τις αλληλουχίες *M. merluccius*. Μέσω του συστήματος NCBI, και αφού πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα στη βάση δεδομένων του γονιδίου COI, έγινε ανάκτηση 14 ακόμη αλληλουχιών του είδους από την Ισπανία με σκοπό την σύγκριση και συσχέτιση με τον αρχικό αριθμό δειγμάτων που συγκεντρώσαμε.

Με τη χρήση του προγράμματος Aliview (v.1.28) (Larsson 2014) έγινε συστοιχία των αλληλουχιών της ανάλυσης PCR και μετά από επεξεργασία αφαιρέθηκαν περιοχές νουκλεοτιδίων των αλληλουχιών, στις οποίες εμφανίστηκε μεγαλύτερη ασυμβατότητα, με σκοπό την βελτίωση της στοίχισης και την ευκολότερη ανάγνωση.

Το πρόγραμμα Fabox είναι ένα λογισμικό που χρησιμοποιείται για τη διαχείριση, την ανάλυση και τη διερεύνηση των δεδομένων βιοπληροφορικής, ειδικά για τη μελέτη αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών. Είναι ένα εύχρηστο εργαλείο που μπορεί να εκτελέσει πολλαπλές εργασίες, όπως οι γενετικές στατιστικές αναλύσεις, συμπεριλαμβανομένων των

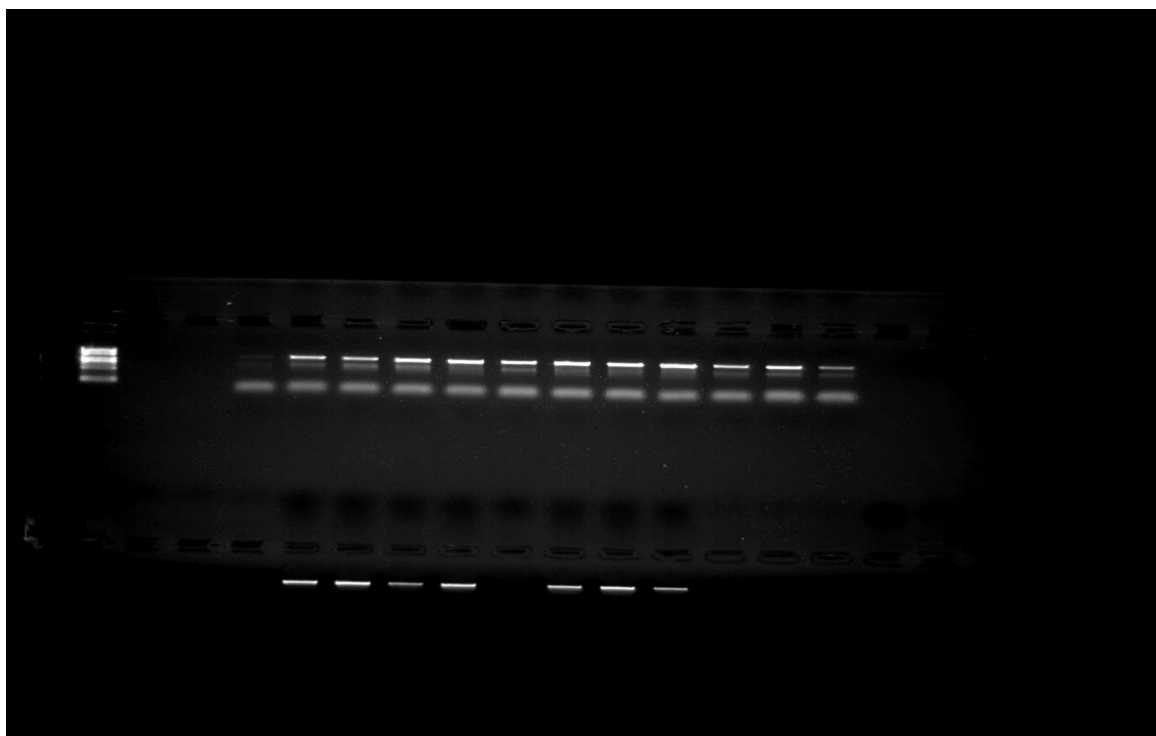
δοκιμών ουδετερότητας όπως το Tajima's D και το F_{ST} , καθώς και άλλες αναλύσεις που αφορούν γενετική διαφοροποίηση ή επιλογή. Με το πρόγραμμα *fabox* μπόρεσαν να πραγματοποιηθούν οι στατιστικές αναλύσεις που αφορούν τη σύγκριση των ειδών στις περιοχές που αναφέρθηκαν. Το πρόγραμμα αυτό αποτελεί ηλεκτρονική εργαλειοθήκη χειρισμού DNA, με τη χρήση του οποίου έγινε προσδιορισμός κοινών απλότυπων των πληθυσμών.

Το πρόγραμμα *Arlequin* (v.3.5.2.2) (Excoffier & Lischer 2010) είναι ένα ισχυρό λογισμικό για τη γενετική ανάλυση πληθυσμών και την εκτέλεση πληθυσμιακών γενετικών στατιστικών. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση της γενετικής ποικιλότητας, διαφοροποίησης πληθυσμών και τη διενέργεια στατιστικών δοκιμών ουδετερότητας. Ο στόχος του *Arlequin* είναι να παρέχει ένα αρκετά μεγάλο σύνολο βασικών μεθόδων και στατιστικών δοκιμών, προκειμένου να εξάγει πληροφορίες για γενετικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά μιας συλλογής δειγμάτων πληθυσμού. Η γραφική διεπαφή έχει σχεδιαστεί για να επιτρέπει στους χρήστες να επιλέγουν γρήγορα τις διαφορετικές αναλύσεις που θέλουν να πραγματοποιήσουν στα δεδομένα τους. Οι στατιστικές δοκιμές που εφαρμόζονται στο *Arlequin* έχουν επιλεγεί έτσι ώστε να ελαχιστοποιούν τις κρυφές υποθέσεις και να είναι όσο το δυνατόν πιο ισχυρές. Έτσι, συχνά παίρνουν τη μορφή είτε δοκιμών μετάθεσης, είτε ακριβών δοκιμών, με ορισμένες εξαιρέσεις. Μέσω του προγράμματος προσφέρονται δυνατότητες υπολογισμού της διακύμανσης μεταξύ πληθυσμών (F_{ST}), και της τιμής σημαντικότητας (*p-value*) της. Η ανά ζεύγη F_{ST} με τιμές από 0-1 μετρά τη δομή του πληθυσμού και παρέχει πληροφορίες εάν είναι γενετικά διακριτή μεταξύ των δυο ερευνώμενων πληθυσμών. Το *p-value* δείχνει τη στατιστική σημασία των αποτελεσμάτων (Reynolds et al. 1983). Το πρόγραμμα ομαδοποίησε τους υπό μελέτη πληθυσμούς τους οποίους παραθέσαμε, σε Ελλάδα και Ισπανία εφόσον είχαν υποστεί επεξεργασία. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος Tajima's D, με σκοπό τη διάκριση μεταξύ των απλότυπων DNA, και την εκτίμηση των αποκλίσεων από την ουδετερότητα (φυσική επιλογή, πληθυσμιακές αλλαγές).

Τέλος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft Excel προκειμένου να δημιουργηθούν τα κυκλικά γραφήματα που περιλαμβάνουν τους απλότυπους των αντίστοιχων περιοχών και στη συνέχεια να τοποθετηθούν στον χάρτη της Μεσογείου.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά την απομόνωση γενετικού υλικού του *Merluccius merluccius*, μέσω της τεχνική Gradient PCR που εφαρμόστηκε στα δείγματα, βρέθηκε η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού του εκκινητή COI 50,6°C, η οποία χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία PCR. Τα αντίστοιχα πηκτώματα ηλεκτροφόρησης παρατηρήθηκαν υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Στην Εικόνα 2, διακρίνονται τα 19 δείγματα DNA, ενισχυμένα μέσω PCR, το τυφλό δείγμα (Negative Control) και οι μάρτυρες 100 bp.



Εικόνα 2. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης διαδικασίας PCR.

Με τη βοήθεια του συστήματος Blast έγινε η αναγνώριση των 17 αλληλουχιών του *Merluccius*, οι οποίες προέκυψαν έπειτα από την απομόνωση του DNA στο εργαστήριο και έτσι πιστοποιήθηκε η εγκυρότητά τους. Στη συνέχεια, μετά από αναζήτηση έγινε ανάκτηση 14 αλληλουχιών του είδους από την Ισπανία, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για να πραγματοποιηθεί η σύγκριση. Από την επεξεργασία του προγράμματος Ali View, σύμφωνα με τα δεδομένα που τοποθετήθηκαν, και ύστερα από περεταίρω επεξεργασία για την καλύτερη δυνατή ανάγνωση, προέκυψαν αλληλουχίες μεγέθους 553 γενετικών θέσεων. Στο πρόγραμμα Fabox προσδιορίστηκαν οι κοινοί απλότυποι των πληθυσμών, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τις παρακάτω στατιστικές αναλύσεις. Σε αυτό το σημείο τονίζεται ότι ο αριθμός των δειγμάτων τόσο της Ελλάδας όσο και της Ισπανίας ήταν αρκετός, ώστε να θεωρηθεί πως τα αποτελέσματα από τις στατιστικές αναλύσεις ήταν έγκυρα. Μέσω του προγράμματος Fabox και έπειτα από την εισαγωγή των δεδομένων, προέκυψαν οι πίνακες

στους οποίους γίνεται αναφορά των συχνοτήτων που παρουσιάζονται οι διαφορετικοί απλότυποι στους εν λόγω πληθυσμούς.

Πίνακας 1. Συχνότητες και αναφορά απλοτύπων

	Greece	Spain	frequency Gr	frequency Sp
seq1	6	2	35%	18%
seq2	1	0	6%	0
seq3	0	1	0	9%
seq4	0	1	0	9%
seq5	0	1	0	9%
seq6	0	1	0	9%
seq7	5	1	29%	9%
seq8	5	4	29%	36%
seq9	0	1	0	9%
seq10	0	1	0	9%
seq11	0	1	0	9%

Πίνακας 2. Αναφορά πληθυσμού σε μορφή html

	population	haplotype
Greece	17	4
Spain	11	10
total	31	14

Στην συνέχεια αποδόθηκαν οι παρακάτω πίνακες AMOVA και Tajima's D οι οποίοι προέκυψαν από τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας του προγράμματος Arlequin. Επιπλέον υπολογίστηκε και ο αριθμός F_{ST} μεταξύ των πληθυσμών, η τιμή του οποίου είναι -0.028 και η τιμή p -value η οποία είναι 0.662. Η αρνητική τιμή του F_{ST} υποδηλώνει ομοιογένεια μεταξύ των δειγμάτων. Το p -value υποδηλώνει την ύπαρξη ή όχι στατιστικώς σημαντικής διαφοράς. Στη προκειμένη περίπτωση το p -value υπολογίστηκε 0.662, τιμή η οποία είναι μεγαλύτερη από 0.05, άρα στατιστικά μη σημαντική.

Σε δεύτερο χρόνο το πρόγραμμα Arlequin πραγματοποίησε ανάλυση μοριακής παραλλακτικότητας (AMOVA) μεταξύ των ομάδων και ενδοπληθυσμιακά. Οι αρνητικές τιμές θεωρούνται άκυρες και δεν λαμβάνονται υπόψη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαίνεται ότι συνολική γενετική ποικιλότητα (102.82%) οφείλεται σε διάφορες που παρατηρούνται μόνο ενδοπληθυσμιακά, χωρίς στατιστικά σημαντικό p -value.

Πίνακας 3. Ανάλυση Μοριακής Διακύμανσης AMOVA

Διακύμανση	Βαθμοί ελευθερίας	Άθροισμα τετραγώνων	Συνιστώσες διακύμανσης	% Διακύμανσης	p-value 0.662
Μεταξύ των πληθυσμών	1	0.451	-0.02120 Va	-2.81	
Ενδοπληθυσμιακά	29	22.517	0.77644 Vb	102.81	
Σύνολο	30	22.968	0.75524		

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η ανάλυση Tajima's D η οποία συγκρίνει δυο μέτρα γενετικής ποικιλότητας σε ένα δείγμα πληθυσμού (την ποικιλότητα σε ζεύγη βάσεων και τον αριθμό πολυμορφικών θέσεων) και διαχωρίζει τους απλότυπους που εξελίσσονται τυχαία με

αυτούς που εξελίσσονται υπό μη τυχαία διαδικασία. Για τον έλεγχο αυτό απαιτούνται αλληλουχίες τουλάχιστον 3 ατόμων ανά δείγμα πληθυσμού. Για τα δείγματα της Ελλάδας η τιμή βρέθηκε 0,59411, με μη σημαντικό p-value (0,7516). Όσο αναφορά την Ισπανία, η αρνητική τιμή -1,49968 είναι πιθανό να υποδεικνύει δημογραφικές αλλαγές, με οριακά μη σημαντικό p-value (0,0562).

Πίνακας 4. Ανάλυση Tajima's D

Στατιστικά	Ελλάδα	Ισπανία	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
Μέγεθος δείγματος	17	14	15.50000	2.12132
S	3	11	7.00000	5.65685
Pi	1,07353	2,14286	1.60819	0.75613
Tajima's D	0,59411	-1,49968	-0.45278	1.48053
Tajima's D p-value	0,7516	0,0562	0.40390	1.48053

Τέλος με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel ταξινομήθηκαν οι απλότυποι σε έναν χάρτη όπου διακρίνονται οι τοποθεσίες και οι απλοτυποι, που αντιστοιχούν στις δυο υπό μελέτη περιοχές, ομαδοποιημένοι. Τα διαφορετικά χρώματα συμβολίζουν και διαφορετικούς απλότυπους. Πιο συγκεκριμένα στην Ελλάδα εμφανίζονται 4 διαφορετικοί απλότυποι σε 17 δείγματα πληθυσμού. Στην Ισπανία φαίνονται 10 διαφορετικοί απλοτυποι σε 11 δείγματα πληθυσμού.



Εικόνα 3. Χάρτης Μεσογείου

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Παρακάτω ακολουθεί η ανάλυση και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας, τα οποία φαίνεται να είναι ως ένα βαθμό αναμενόμενα. Ξεκινώντας από τον σχολιασμό της στατιστικής ανάλυσης του προγράμματος Arlequin, παραπάνω φαίνονται ο δείκτης F_{ST} και το p -value του. Ο δείκτης F_{ST} παίρνει τιμές από 0 έως 1, όπου: $F_{ST} = 0$ υποδηλώνει απουσία γενετικής διαφοροποίησης και $F_{ST} = 1$ υποδηλώνει πλήρη γενετική διαφοροποίηση (οι πληθυσμοί δεν ανταλλάσσουν γονίδια). Ανάλογα με το επίπεδο διαφοροποίησης οι ενδιάμεσες τιμές υποδεικνύουν μερική διαφοροποίηση. Μια τιμή μεγαλύτερη από 0,15 μπορεί να θεωρηθεί σημαντική για τη διαφοροποίηση των πληθυσμών (Frankham et al.,

2002). Ο δείκτης F_{ST} μετρά τη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών με βάση τη συχνότητα των αλληλόμορφων γονιδίων. Συνήθως χρησιμοποιείται για να εκτιμήσει την επίδραση της απομόνωσης, της μετανάστευσης ή άλλων εξελικτικών δυνάμεων που μπορεί να έχουν διαφοροποιήσει τους πληθυσμούς. Το p -value δείχνει αν η διαφοροποίηση που εκτιμάται από το F_{ST} είναι στατιστικά σημαντική. Αρνητικές τιμές F_{ST} λαμβάνονται περιστασιακά. Ορισμένοι συγγραφείς δεν αναφέρουν τέτοιες τιμές. Ωστόσο, για παράδειγμα οι Wilkinson et al. (2011) υποστήριξε ότι ο εκτιμητής F_{ST} από τους Weir & Cockerham (1984), μπορεί να πάρει αρνητικές τιμές εάν τα αλληλόμορφα, που έχουν σχεδιαστεί τυχαία μέσα από έναν πληθυσμό, είναι λιγότερο παρόμοια μεταξύ τους από αυτά που προέρχονται από διαφορετικούς πληθυσμούς. Συνεπώς μια αρνητική τιμή μπορεί να εμφανιστεί σε ορισμένες περιπτώσεις αλλά δεν έχει βιολογική σημασία. Οι υπολογισμοί μπορούν να δώσουν αρνητικές τιμές λόγω των στατιστικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται ή μικρών πληθυσμιακών μεγεθών. Στη πράξη αυτό σημαίνει πως οι πληθυσμοί είτε είναι σχεδόν γενετικά ταυτόσημοι, είτε ότι παρουσιάζεται υπερβολική ομοιογένεια. Το p -value(0.662) επιβεβαιώνει πως δεν υπάρχει διαφοροποίηση, καθώς η τιμή του είναι μεγαλύτερη από 0,05 και επομένως στατιστικά μη σημαντική (McLeod 2019).

Προχωρώντας στην ανάλυση AMOVA (Πίνακας 2) φαίνεται ότι το συνολικό ποσοστό εντοπίζεται στην ενδοπληθυσμιακή διακύμανση. Η διακύμανση μεταξύ των πληθυσμών παρουσιάζει αρνητική τιμή $V_a = -0.02120$, κάτι που σημαίνει ότι δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών και αντίθετα, μπορεί να υπάρχει υψηλή ομοιότητα ή μείωση της ποικιλομορφίας μεταξύ τους. Το ποσοστό της διακύμανσης είναι -2.81%. Η μεγαλύτερη διακύμανση παρατηρείται εντός των πληθυσμών ($V_b = 0.77644$), με το ποσοστό της διακύμανσης να είναι 102.81%, υποδηλώνοντας ότι η πλειονότητα της γενετικής διαφοροποίησης οφείλεται σε ποικιλομορφία εντός των ατόμων του ίδιου πληθυσμού. Όταν η διασπορά είναι περιορισμένη μεταξύ των πληθυσμών, οι συχνότητες των αλληλόμορφων τείνουν να αποκλίνουν ως αποτέλεσμα τυχαίων διαδικασιών ή φυσικής επιλογής (Slatkin 1985) και η μεγαλύτερη γενετική διακύμανση θα είναι μεταξύ των πληθυσμών. Όταν η διασπορά είναι ευρεία, οι συχνότητες των αλληλόμορφων τείνουν να είναι ομοιογενείς λόγω της ανάμειξης αλληλόμορφων από διαφορετικούς πληθυσμούς, και ένα σημαντικό μέρος της γενετικής ποικιλίας θα εμφανίζεται εντός των πληθυσμών. 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. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, φαινόμενα διασποράς (δηλαδή ροής γονιδίων) είναι δυνατό να εξηγήσουν την διακύμανση, καθώς οδηγούν σε μείωση γενετικής διακύμανσης διαπληθυσμιακά εντός

ομάδων και αύξηση της γενετικής διακύμανσης ενδοπληθυσμιακά (Meffe & Vrijen-hoek 1988). Οι αρνητικές συνιστώσες διακύμανσης υποδηλώνουν απουσία γενετικής δομής. Μπορεί όμως να έχουν βιολογική σημασία. Για παράδειγμα, σε οργανισμούς που διασταυρώνονται, τα γονίδια από διαφορετικούς πληθυσμούς μπορεί να σχετίζονται περισσότερο μεταξύ τους από ό,τι τα γονίδια από τον ίδιο πληθυσμό. Οι Gerlach et al. (2010) προτείνουν οι αρνητικές τιμές να λαμβάνονται ως πιθανό προειδοποιητικό σήμα ότι το μέγεθος του δείγματος μπορεί να είναι πολύ μικρό σε σύγκριση με τον αριθμό των αλληλόμορφων. Έτσι, η περαιτέρω δειγματοληψία μπορεί να εξαλείψει τις αρνητικές τιμές και να παρουσιάσει θετικές τιμές, αλλάζοντας τα πιθανά συμπεράσματα.

Τέλος η ανάλυση Tajima's D του Πίνακα 3 δίνει τιμή για την Ελλάδα 0.5941 και p-value 0.7516. Αυτό σημαίνει πως δεν υπάρχει σημαντική απόκλιση από την ουδετερότητα. Η θετική τιμή υποδηλώνει ότι μπορεί να υπάρχει εξισορροπητική επιλογή ή πρόσφατη μείωση του πληθυσμού, αλλά το p-value δείχνει ότι το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Η τιμή του Tajima's D για την Ισπανία είναι αρνητική (-1.4997, p-value 0.0562), κάτι που υποδηλώνει ότι μπορεί να υπάρχει καθαριστική επιλογή (διαδικασία κατά την οποία τα επιβλαβή αλληλόμορφα αφαιρούνται από τον πληθυσμό) ή πληθυσμιακή επέκταση. Το p-value είναι κοντά στο 0.05, κάτι που δείχνει ότι το αποτέλεσμα πλησιάζει τη στατιστική σημαντικότητα. Σε γενικές γραμμές, οι δύο πληθυσμοί παρουσιάζουν διαφορές στα αποτελέσματα, με την Ισπανία να παρουσιάζει ενδείξεις αρνητικής επιλογής ή πρόσφατης επέκτασης του πληθυσμού, σε αντίθεση με την Ελλάδα (Tajima 1989). Συνιστάται η διεξαγωγή μελλοντικών μελετών για την αξιολόγηση της γενετικής ποικιλότητας του είδους αυτού.

4.2 Ποικιλομορφία των πληθυσμών

Προχωρώντας στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων που απέδωσε το πρόγραμμα Fabox (πίνακες 1,2) παρατηρούμε διαφορές στην ποικιλομορφία και στις αναλογίες των απλοτύπων στα είδη. Φανερά στις θάλασσες της Ισπανίας εντοπίζεται μεγαλύτερη ποικιλομορφία, καθώς σε ένα σύνολο 11 ατόμων εμφανίζονται 10 διαφορετικοί απλότυποι. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως τα χαρακτηριστικά του νερού, οι εξελικτικοί παράγοντες, η γεωγραφική απομόνωση οι κλιματικές αλλαγές και η ανθρώπινη

δραστηριότητα. Η Μεσόγειος Θάλασσα βρίσκεται υπό ισχυρή ανθρώπινη πίεση λόγω της εκμετάλλευσης και των τροποποιήσεων του οικοτόπου (Coll et al., 2012) και πολλοί πληθυσμοί ψαριών μπορεί να εξαφανιστούν στο εγγύς μέλλον υπό τη συνδυασμένη επίδραση της κλιματικής αλλαγής και της υπεραλίευσης (Lejeune et al., 2010 Albouy et al., 2013). Μια άλλη πηγή διαφοροποίησης της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των ειδών είναι ο χώρος, κυρίως μέσω παραλλαγών του περιβάλλοντος και των οικοτόπων (Riginos & Liggins, 2013). Τα περισσότερα θαλάσσια ψάρια έχουν ένα πλαγκτονικό προνυμφικό στάδιο που μπορεί να μεταφερθεί με ωκεάνια ρεύματα σε μεγάλες αποστάσεις (Luiz et al., 2013), επιτρέποντας υψηλά επίπεδα γονιδιακής ροής (Cowen et al., 2000). Λόγω της απουσίας προφανών φραγμών, έχει υποθεθεί ότι υπήρχαν χαμηλά επίπεδα διαφοροποίησης στα περισσότερα θαλάσσια είδη (Ward et al., 1994). Ωστόσο, αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι θαλάσσιοι πληθυσμοί είναι πιο απομονωμένοι από ό,τι πιστευόταν προηγουμένως (Bahri-Sfar et al., 2000), επομένως η πιθανή γενετική ροή που ομογενοποιεί τη γενετική ποικιλότητα μεταξύ των υποπληθυσμών μπορεί να μην είναι τόσο ισχυρή όσο πίστευαν παλαιότερα, ιδιαίτερα σε κατακερματισμένα θαλάσσια τοπία. Η Μεσόγειος Θάλασσα είναι η αρχετυπική κατάσταση, όπου τα είδη ψαριών μπορεί να έχουν απομονωμένους υποπληθυσμούς, δεδομένης της εξαιρετικά ελικοειδούς ακτής με ορισμένες τοπικές ημίκλειστες θάλασσες (π.χ. η Αδριατική Θάλασσα). Αυτά τα τοπογραφικά χαρακτηριστικά, μαζί με την κυκλοφορία του νερού που μπορεί να δημιουργήσουν εμπόδια στη διασπορά, δυνητικά οδηγούν σε συγκεκριμένα πρότυπα δομής πληθυσμού, τα οποία μπορεί να αντικατοπτρίζονται στη χωρική κατανομή της γενετικής ποικιλότητας (Liggins et al., 2013) Επιπλέον, η χωρική κατανομή της γενετικής ποικιλότητας επηρεάζεται από πολλά σύγχρονα και ιστορικά γεγονότα όπως οι δημογραφικές επεκτάσεις και τα σημεία συμφόρησης, καθώς και οι ανθρώπινες διαταραχές (Hewitt, 2000, Banks et al., 2013). Αυτά τα γεγονότα μπορεί να έχουν τονίσει ένα μη τυχαίο χωρικό μοτίβο γενετικής ποικιλομορφίας. Στην περίπτωση της Μεσογείου, τα ιστορικά γεγονότα οδήγησαν πιθανώς σε πολλά επεισόδια δημογραφικών συστολών και επεκτάσεων, τα οποία θα περιμέναμε να είναι ανιχνεύσιμα στα σημερινά πρότυπα γενετικής ποικιλομορφίας (Huysse et al., 2004). Οι κλιματικές αλλαγές και οι διακυμάνσεις της στάθμης της θάλασσας, που συνέβησαν επανειλημμένα κατά τη διάρκεια του Πλειστόκαινου, πιστεύεται ότι επηρέασαν έντονα την κατανομή των ειδών στη Μεσόγειο Θάλασσα (Borsa et al., 1997, Huysse et al., 2004). Οι περίοδοι των παγετώνων μπορεί να ευνόησαν τη ροή γονιδίων σε είδη ψυχρού νερού προκαλώντας μια μετατόπιση προς τα νότια στη γεωγραφική κατανομή τους (Borsa et al., 1997). Εναλλακτικά, η μείωση της στάθμης της θάλασσας που σχετίζεται με περιόδους

παγετώνων μπορεί να έχει προκαλέσει μείωση στην περιοχή ενδιαιτημάτων των παράκτιων ειδών (Borsa et al., 1997Ludt & Rocha, 2015). Οι διαφορές αυτές, πιθανόν να οφείλονται στις ωκεανογραφικές επιδράσεις των διαφορετικών σημείων και την παρουσία ή όχι φυσικών φραγμών, κυρίως από ρεύματα και κυκλωνικών κινήσεων το νερού που συναντώνται στην περιοχή με αποτέλεσμα την μείωση ή την ενίσχυση της γενετικής ροής στις διάφορες περιοχές (Maggi & González-Wangüement 2015). Μια ακόμα σημαντική διαφορά, παρουσιάζεται σε μια περιοχή της Ισπανίας η οποία βρίσκεται κάτω από την επίδραση της αλιευτικής δραστηριότητας. Η αλιεία δεν έχει επηρεάσει μόνο το μέγεθος των αποθεμάτων όπως δείχνουν τα αποτελέσματα τους, αλλά και την γενετική ποικιλομορφία των πληθυσμών αυτών, κάνοντας τους πιο απομονωμένους αλλά και πιο ευάλωτους σε περιβαλλοντικές αλλαγές (Maggi González-Wangüement 2015).

4.3 Έλλειψη γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών

Σύμφωνα λοιπόν με όλα τα παραπάνω στοιχεία από τις στατιστικές αναλύσεις προκύπτει πως δεν φαίνεται να υπάρχει γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών Ελλάδας και Ισπανίας. Η Μεσόγειος Θάλασσα είναι μια μερικώς κλειστή υδάτινη μάζα που χωρίζεται από τον Ατλαντικό Ωκεανό με ένα φράγμα στο Στενό του Γιβραλτάρ. Κάτω από βάθος 200 μέτρων, η Μεσόγειος Θάλασσα παρουσιάζει υψηλό επίπεδο περιβαλλοντικής σταθερότητας όσον αφορά τη θερμοκρασία και την αλατότητα. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτού του φαινομένου είναι η αισθητή μεταβολή της αλατότητας και της θερμοκρασίας κατά μήκος της λεκάνης, με τα νερά της ανατολικής λεκάνης να είναι σημαντικά πιο αλμυρά και θερμά από εκείνα της δυτικής λεκάνης. Η κατανόηση των χωρικών και χρονικών προτύπων στην κατανομή της βενθοπελαγικής πανίδας, καθώς και των παραγόντων που την επηρεάζουν, αποτελεί σημαντικό οικολογικό πρόβλημα. Η Μεσόγειος Θάλασσα αποτελεί ιδανικό σημείο αναφοράς για τη μελέτη των χωρικών και χρονικών προτύπων της κατανομής των ειδών και

για τη διερεύνηση της επίδρασης των πιθανών παραγόντων του συστήματος (Tanhua et al. 2013) λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών της (Tanhua et al. 2013).

Γενικά η έλλειψη αυτή μπορεί να εξηγηθεί από παράγοντες όπως η περιορισμένη γενετική ροή, τα φυσικά εμπόδια όπως το Στενό του Γιβραλτάρ (παρόλο που το Στενό του Γιβραλτάρ συνδέει τη Μεσόγειο με τον Ατλαντικό Ωκεανό, λειτουργεί επίσης ως γεωγραφικό εμπόδιο που περιορίζει τη ροή γενετικού υλικού ανάμεσα στα ψάρια των δύο περιοχών) και περιβαλλοντική απομόνωση, ιστορικά γεγονότα και ανθρωπογενείς επιδράσεις (Maggi & González-Wangüement 2015). Μια ακόμα υπόθεση, αφορά την επίδραση ιστορικών παραγόντων κατά την περίοδο του Πλειστόκαινου και τις διακυμάνσεις της στάθμης της θάλασσας που απομόνωναν τους τότε πληθυσμούς (Gharbi & Said 2011). Το γεγονός αυτό διαπίστωσαν οι Fawzia & Mamoon (2019) οι οποίοι εξέτασαν τη γενετική διαφοροποίηση του γένους *Dicentrarchus*. Τον Δεκέμβριο του 2016, συνολικά 141 άγρια μεσογειακά *D. labrax* και *D. punctatus* συλλέχθηκαν τυχαία από τα εμπορικά αλιεύματα των τοποθεσιών εκφόρτωσης σε τρεις τοποθεσίες κατά μήκος της Μεσογείου Θάλασσας στην Αίγυπτο. Η αξιολόγηση της γενετικής ποικιλότητας των δειγμάτων έγινε με την χρήση μιτοχονδριακής ανάλυσης (COI). Συμπερασματικά, χαμηλή γενετική διακύμανση μεταξύ των πληθυσμών καταγράφηκε τόσο για το *D. labrax* όσο και για το *D. punctatus* στην Αίγυπτο. Η καταγεγραμμένη υπερεκμετάλλευση και των δύο ειδών στην Αίγυπτο θα μπορούσε να είναι ο λόγος για τη μειωμένη γενετική ποικιλότητα, καθώς είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους του πληθυσμού (Mehanna 2006).

Μία ακόμα σχετική ερευνά διεξήχθη από τους Tommaso Righi et al. το 2020. Συνολικά 287 ξιφίες συλλέχθηκαν από έξι περιοχές εντός των περιοχών της ανατολικής, κεντρικής και δυτικής Μεσογείου. Η έντονη και παρατεταμένη θνησιμότητα που προκαλείται από την υπερεκμετάλλευση θα μπορούσε να οδηγήσει στη φθορά της γενετικής ποικιλότητας που μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ανθεκτικότητας των ειδών στις περιβαλλοντικές αλλαγές, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εξαφάνισής τους. Ο ξιφίας είναι είδος υψηλής εμπορικής αξίας, ιδιαίτερα στη Μεσόγειο Θάλασσα, όπου πλήττεται από υψηλά επίπεδα αλιευμάτων. Ο ξιφίας της Μεσογείου αποτελείται από έναν πληθυσμό γενετικά και βιολογικά διαφορετικό από τον Ατλαντικό και ως εκ τούτου διαχειρίζεται ως ξεχωριστό απόθεμα. Η τελευταία αξιολόγηση του αποθέματος ξιφία της Μεσογείου ανέφερε ότι τα τελευταία σαράντα χρόνια ο ξιφίας της Μεσογείου υπεραλιεύεται και, μέχρι σήμερα, εξακολουθεί να υπόκειται σε υπεραλίευση. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ ενός διαθέσιμου δεδομένων μιτοχονδριακής αλληλουχίας και ενός ομόλογου τρέχοντος δείγματος για τη διερεύνηση της χρονικής γενετικής διαφοροποίησης στον πληθυσμό του ξιφία της Μεσογείου για σχεδόν

είκοσι χρόνια. Η μελέτη μας παρέχει το πρώτο άμεσο μέτρο της μειωμένης γενετικής ποικιλότητας για τον ξιφία της Μεσογείου κατά τη διάρκεια μιας σύντομης περιόδου, όπως μετράται τόσο στην άμεση απώλεια μιτοχονδριακών απλοτύπων όσο και στη μείωση της ποικιλότητας των απλοτύπων. Συζητείται η πιθανή σχέση μεταξύ των αλιευτικών δραστηριοτήτων και της απώλειας γενετικής ποικιλότητας στον πληθυσμό του ξιφία της Μεσογείου. Σε αυτή τη μελέτη, για πρώτη φορά, χρησιμοποιήθηκε μια χρονική προσέγγιση για τη μελέτη πρόσφατων αλλαγών στη μιτοχονδριακή γενετική ποικιλότητα στον απειλούμενο ξιφία της Μεσογείου. Η σύγκριση μεταξύ χρονικών δειγμάτων μας επιτρέπει να εντοπίσουμε βραχυπρόθεσμες αλλαγές που συνέβησαν τις τελευταίες δεκαετίες. Τα αποτελέσματά μας αποκάλυψαν ότι ο ξιφίας της Μεσογείου έχει υποστεί γενετική εξάντληση τα τελευταία είκοσι χρόνια.

Η μείωση της ποικιλομορφίας των απλοτύπων με μια αύξηση στην αναλογία του ίδιου απλότυπου και η απώλεια σπάνιων απλοτύπων που παρατηρούνται στον σημερινό ξιφία της Μεσογείου υποδηλώνουν ότι ο πληθυσμός έχει υποστεί δημογραφική μείωση (Allendorf, 2008). Στην πραγματικότητα, η βιομάζα του αποθέματος αναπαραγωγής (SSB) που εκτιμάται είναι μικρότερη από το 15% της μέγιστης βιώσιμης απόδοσης (BMSY).

Μερικές από αυτές τις μελέτες, χρησιμοποιώντας DNA που εξήχθη από αρχειοθετημένους ωτόλιθους ή λέπια, διαπίστωσαν απώλεια ουδέτερης γενετικής ποικιλότητας σε ορισμένα είδη ψαριών. Σημαντικές γενετικές αλλαγές ανιχνεύθηκαν επίσης χρησιμοποιώντας μικροδορυφόρο στον πληθυσμό *Gadus morhua* *Flamborough Head* σε μια περίοδο κατά την οποία ο πληθυσμός παρουσίασε μείωση του SSB που σχετίζεται με υψηλά επίπεδα εκμετάλλευσης (Hutchinson, et al. 2003). Επιπλέον, στον ευρωπαϊκό γαύρο της Αδριατικής (*Engraulis encrasicolus*) έχει εντοπιστεί σημαντική μείωση των μέσων γενετικών παραμέτρων και σχετίζεται με την κατάρρευση του αποθέματος το 1987 (Ruggeri, P., Splendiani et al. 2016). Ο αριθμός των ψαριών σε έναν πληθυσμό (μέγεθος πληθυσμού απογραφής, N) είναι συχνά πολύ μεγαλύτερος από τα ψάρια που αναπαράγονται και συμβάλλουν στη διατήρηση της γενετικής ποικιλομορφίας (το γενετικά αποτελεσματικό μέγεθος πληθυσμού, Ne). Ο Hauser (Hauser, L. et al. 2002) χρησιμοποιώντας την εκτίμηση Ne/N στο snapper πρότεινε ότι τα αποθέματα ψαριών πολλών εκατομμυρίων ατόμων ενδέχεται να κινδυνεύουν να χάσουν τη γενετική μεταβλητότητα μακροπρόθεσμα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι, παγκοσμίως, το 31% των πληθυσμών ψαριών αλιεύεται με μη βιώσιμο τρόπο, ενώ ένα επιπλέον 60% αλιεύεται πλήρως (FAO 2016), η αλιεία μπορεί να έχει ήδη προκαλέσει σημαντική απώλεια της συνολικής βιοποικιλότητας. Το 2010 οι Angeletti et al. εξέτασαν τη γενετική ποικιλομορφία του *Aphanius fasciatus* που παραλληλίζεται με τις περιβαλλοντικές αλλαγές

του ενδιαιτήματος των αλατότητας. Ο βιότοπος, που βρίσκεται στην Τυρρηνική ακτή της κεντρικής Ιταλίας, έχει υποστεί δραματικές αλλαγές τα τελευταία 10 χρόνια. Μετά τον τερματισμό της παραγωγής αλατιού το 1997, η τοποθεσία εγκαταλείφθηκε μέχρι το 2002, με συνέπεια την υποβάθμιση της ποιότητας των οικοτόπων και την ακαμψία των περιβαλλοντικών συνθηκών. Από το 2003 έως το 2006 πραγματοποιήθηκε οικολογική αποκατάσταση του χώρου, επαναφέροντας την κυκλοφορία του νερού στην προηγούμενη ισορροπία. Η γενετική παραλλαγή στο *Aphanius fasciatus* παρακολουθήθηκε με χρήση αλλοζύμων από το 1998. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γενετική μεταβλητότητα του είδους μειώθηκε σημαντικά με την πάροδο του χρόνου. Ένας μεγάλος αριθμός σπάνιων αλληλόμορφων χάθηκε, και τόσο η ετεροζυγωτία όσο και ο πλούτος των αλληλόμορφων μειώθηκαν σημαντικά. Τα πιο πρόσφατα δείγματα, που ελήφθησαν μετά την οικολογική αποκατάσταση, έδειξαν ότι μέχρι σήμερα η γενετική διάβρωση των γονιδίων *A. fasciatus* έχει επιβραδυνθεί, καθώς δεν έχουν εντοπιστεί σημαντικές διαφορές για καμία παράμετρο γενετικής μεταβλητότητας. Όσον αφορά τους μηχανισμούς που οδηγούν στην εξαθλίωση της γενετικής μεταβλητότητας, η έντονη απώλεια σπάνιων αλληλόμορφων υποδηλώνει έναν ρόλο γενετικής μετατόπισης, η οποία συμφωνεί με τη διακύμανση του πραγματικού μεγέθους πληθυσμού που καταγράφηκε κατά την περίοδο της μελέτης, και με τη χαμηλή γονιδιακή ροή που είναι χαρακτηριστική για αυτό το είδος. Τα χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής που αναφέρθηκαν για αυτό το είδος υποδηλώνουν ότι μόλις χαθεί η γενετική ποικιλομορφία, σπάνια μπορεί να αποκατασταθεί μέσω της μετανάστευσης από πληθυσμούς υψηλής μεταβλητότητας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

>GR_4|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAGGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATCACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_8|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAGGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTAGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATCACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_18|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAGGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC

CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTATCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATCACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_16|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAAGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTATCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATCACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_5|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAAGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTATCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATCACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_20|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAAGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTATCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATCACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_10|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAAGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTATCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATCACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_15|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAAGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATCACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_2|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAAAGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_14|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAAAGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_6|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAAAGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_13|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAAAGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_7|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAGGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_11|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAGGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATACAATACTACTAACCAGCCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATCACAACTACTAACC GACCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_9|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAGGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATAACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATCACAACTACTAACC GACCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_12|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAGGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATAACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATCACAACTACTAACC GACCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

>GR_19|U|GREECE

CAGGCGCACTCCTGGGCGACGATCAAATTTATAACGTGATCGTCACGGCACACGCCTTCGTAATA
ATCTTCTTTATAGTAATACCACTAATAATTGGAGGCTTCGGAACTGACTCGTCCCCCTAATGAT
CGGAGCCCCCGACATGGCCTTCCCCCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTCCTCCCTCCATCGT
TCCTGCTCCTCCTAGCATCTTCCGGGGTGGAGGCCGGGGCCGGGACAGGCTGAACGGTCTATCCC
CCTCTTGCAAGTAATCTTGCCACGCTGGCGCTTCCGTTGACCTCACCATTTTCTCCCTCCACCT
AGCAGGCGTTTCATCAATTCTGGGAGCAATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATAAAACCCC
CTGCCATTTACAATAACCAAACACCCCTCTTTGTTTGATCCGTCCTTATTACAGCCGTACTCCTC
CTGCTGTCCCTGCCCGTCCTAGCCGCCGGCATCACAACTACTAACC GACCGAAACCTCAACAC
CTCTTTCTTTGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCC

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Abecasis, A. R. C., Canha, A., Reis, D., Pinho, M. R., & Gil-Pereira, J. (2009). Age and growth of the forkbeard *Phycis phycis* (Gadidae) from the Azorean archipelago, North Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89(3), 629–633.
<https://doi.org/10.1017/S0025315409002598>
- Abella, A. J., Caddy, J. F., & Serena, F. (1997). Do natural mortality and availability decline with age? An alternative yield paradigm for juvenile fisheries, illustrated by the hake *Merluccius merluccius* fishery in the Mediterranean. *Aquatic Living Resources*, 10(5), 257–269.
<https://doi.org/10.1051/alr:1997029>
- Abella, A., Serena, F., & Ria, M. (2005). Distributional response to variations in abundance over spatial and temporal scales for juveniles of European hake (*Merluccius merluccius*) in the Western Mediterranean Sea. *Fisheries Research*, 71(3), 295–310. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2004.08.036>
- Abella, A., Serena, F., & Ria, M. (2005). Distributional response to variations in abundance over spatial and temporal scales for juveniles of European hake (*Merluccius merluccius*) in the Western Mediterranean Sea. *Fisheries Research*, 71(3), 295–310. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2004.08.036>
- Abella, J. A., Bailey, N., Bertignac, M., Casey, J., Daures, F., Natale, A. D., Dobby, H., Doring, R., Figueiredo, I., Kraak, S., Gascuel, D. D., Graham, N., Gustavsson, T. K.-E., Hatcher, A., Kirkegaard, E., Kuikka, S., Malvarosa, L., Martin, P., Parkes, G., & Sabatella, E. (2010). 34th Plenary meeting of the Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (PLEN-10-02).

- Institut-Agro-Rennes-Angers.hal.science*, non paginé. <https://institut-agro-rennes-angers.hal.science/hal-00729423/>
- Adams A. (1864). Goode, T.H. Bean (Eds.), *Manual Nat. Hist.*, 1895.
- Al-Absawy, M. A. El-G. (2010). The reproductive biology and the histological and ultrastructural characteristics in ovaries of the female gadidae fish *Merluccius merluccius* from the Egyptian Mediterranean water. *African Journal of Biotechnology*, 9(17), 2544–2559.
<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/79741>
- Albouy, C., Ben Rais Lasram, F., Velez, L., Guilhaumon, F., Meynard, C.M., Boyer, S., Benestan, L., Mouquet, N., Douzery, E.J.P., Aznard, R., Troussellier, M., Somot, S., Leprieur, F., Le Loch, F. & Mouillot, D.(2015) FishMed: traits, phylogeny, current and projected species distribution of Mediterranean fishes and environmental data. *Ecology*, 8, 2312–2313.
- Aldebert, Y., & Recasens, L. (1996). Comparison of methods for stock assessment of European hake *Merluccius merluccius* in the Gulf of Lions (Northwestern Mediterranean). *Aquatic Living Resources*, 9(1), 13–22.
<https://doi.org/10.1051/alr:1996003>
- Allendorf, F.W.; England, P.R.; Luikart, G.; Ritchie, P.A.; Ryman, N.(2008) Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends Ecol. Evol.*, 23, 327–337
- Ali, Fawzia S., Ahmed Mamoon. (2019). "Population genetic studies of genus *Dicentrarchus* reveal loss of genetic diversity in Egyptian waters."
- Anderson, J. T., & Dalley, E. L. (2000). Interannual differences in hatching times and growth rates of pelagic juvenile cod in Newfoundland waters. *Fisheries Research*, 46(1-3), 227–238. [https://doi.org/10.1016/s0165-7836\(00\)00148-x](https://doi.org/10.1016/s0165-7836(00)00148-x)
- Antelo, M., Rodríguez, D., & Villasante, S. (2012). The Spanish fishing fleet and the economic value of Southern stock of European hake fishery (*Merluccius merluccius*). *Ocean & Coastal Management*, 70, 59–67.
<https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2012.08.003>
- Arambourg, C. (1927). Les poissons fossiles d'Oran (Vol. 1). Bastide-Jourdan.
- Arambourg, C. (1929). *Argyropelecus logearti*, un nouveau Poisson bathypélagique du Sahélien. *Bulletin de la Société géologique de France*, 29, 11-15.
- Armani, A., Guardone, L., La Castellana, R., Gianfaldoni, D., Guidi, A., & Castiglione, L. (2015). DNA barcoding reveals commercial and health issues in ethnic seafood sold on the Italian market. *Food Control*, 55, 206–214.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.030>
- AVISE, J. C. (1998). The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7(4), 371–379. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00391.x>
- Baciu, D. S., Bannikov, A. F., & Tyler, J. C. (2005). Revision of the fossil fishes of the family Zeidae (Zeiformes). *Bolletino del Museo Civico di Storia Naturale di Verona*, 29, 95-128.
- Baer, C. F. (1999). Among-Locus Variation in Fst: Fish, Allozymes and the Lewontin-Krakauer Test Revisited. *Genetics*, 152(2), 653–659.
<https://doi.org/10.1093/genetics/152.2.653>

- Bahri-Sfar, L., Lemaire, C., Ben Hassine, O.K. & Bonhomme, F. (2000) Fragmentation of sea bass populations in the western and eastern Mediterranean as revealed by microsatellite polymorphism. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267, 929–935.
- Banister, K. E. (1970). The anatomy and taxonomy of *Indostomus paradoxus* Prashad & Mukerji. *British Museum (Natural History)*.
- Bañón, R., Villegas-Ríos, D., Serrano, A., Mucientes, G., & Arronte, J. C. (2010). Marine fishes from Galicia (NW Spain): an updated checklist. *Csic.es*. <https://doi.org/1175-5326>
- Banks, S.C., Cary, G.J., Smith, A.L., Davies, I.D., Driscoll, D.A., Gill, A.M., Lindenmayer, D.B. & Peakall, R. (2013) How does ecological disturbance influence genetic diversity? *Trends in Ecology and Evolution*, 28, 670–679.
- Bartoli, P., & Gibson, D. I. (2001). *Metadena phoceae* n. sp. (Digenea: Cryptogonimidae), a rectal parasite of the shore rockling *Gaidropsarus mediterraneus* (Teleostei: Lotidae) in the western Mediterranean. *Systematic Parasitology*, 50(1), 53–62. <https://doi.org/10.1023/a:1011861023138>
- Betancur-R., R., Broughton, R. E., Wiley, E. O., Carpenter, K., López, J. A., Li, C., Holcroft, N. I., Arcila, D., Sanciangco, M., Cureton II, J. C., Zhang, F., Buser, T., Campbell, M. A., Ballesteros, J. A., Roa-Varon, A., Willis, S., Borden, W. C., Rowley, T., Reneau, P. C., & Hough, D. J. (2013). The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. *PLoS Currents*. <https://doi.org/10.1371/currents.tol.53ba26640df0ccaee75bb165c8c26288>
- BILECENOGLU, M., Kunt, K. B., & TASKAVAK, E. (2002). First record of *Mora moro* (Risso, 1810)(Pisces, Moridae) from the eastern Mediterranean Sea. *Israel Journal of Zoology*, 48(3), 243-244.
- Borsa, P., Blanquer, A., & Berrebi, P. (1997). Genetic structure of the flounders *Platichthys flesus* and *P. stellatus* at different geographic scales. *Marine Biology*, 129(2), 233–246. <https://doi.org/10.1007/s002270050164>
- Bouaziz, A., Djabali, F., & Maurin, C. (1990). Régime alimentaire du merlu (*Merluccius merluccius*, L., 1758) en baie de Bou Ismaïl. *Rapp. Comm. int. Mer Médit*, 32(1), 273.
- Cardinale, M., Damalas, D., & Osio, G. C. (Eds.). (2015). Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF): Mediterranean Assessments Part 2 (STECF-15-06). Publications Office.
- Cardinale, M., Osio, G. C., & Scarcella, G. (2017). Mediterranean Sea: A Failure of the European Fisheries Management System. *Frontiers in Marine Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00072>
- Carnevale, G. (2007). *New gadiform fishes (Teleostei, Gadiformes) from the Miocene of Algeria*. 47(2), 95–111. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2006.12.003>
- Carnevale, G., & Pietsch, T. W. (2006). Filling the gap: a fossil frogfish, genus *Antennarius* (Teleostei, Lophiiformes, Antennariidae), from the Miocene of Algeria. *Journal of Zoology*, 270(3), 448–457. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2006.00163.x>

- Carpentieri, P., Colloca, F., Cardinale, M., Belluscio, A., & Ardizzone, G. D. (2005). Feeding habits of European hake (*Merluccius merluccius*) in the central Mediterranean Sea. *Fishery Bulletin*, 103(2), 411–416.
<https://aquadocs.org/handle/1834/26234>
- Carvalho, D. C., Guedes, D., da Gloria Trindade, M., Coelho, R. M. S., & de Lima Araujo, P. H. (2017). Nationwide Brazilian governmental forensic programme reveals seafood mislabelling trends and rates using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 191, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.02.021>
- Casey, J., & Pereiro, J. (1995). European hake (*M. merluccius*) in the North-east Atlantic. *Springer EBooks*, 125–147. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1300-7_5
- Castro, J., Marín, M., Pierce, G. J., & Punzón, A. (2011). Identification of métiers of the Spanish set-longline fleet operating in non-Spanish European waters. *Fisheries Research*, 107(1-3), 100–111.
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2010.10.013>
- CIMMARUTA, R., BONDANELLI, P., & NASCETTI, G. (2005). Genetic structure and environmental heterogeneity in the European hake (*Merluccius merluccius*). *Molecular Ecology*, 14(8), 2577–2591.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2005.02595.x>
- Cimmaruta, R., BONDANELLI, P., & NASCETTI, G. (2005). Genetic structure and environmental heterogeneity in the European hake (*Merluccius merluccius*). *Molecular Ecology*, 14(8), 2577–2591. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2005.02595.x>
- Cimmaruta, R., Nascetti, G., & Bullini, L. (1996). Primi dati sulla struttura genetica di alcune specie di grandi pelagici nel Mediterraneo. *Biol. Mar. Medit*, 3, 400–406.
- Cohen, D. M., Inada, T., Iwamoto, T., & Scialabba, N. (1999). FAO species catalogue. FAO Fisheries Synopsis, 18(125).
- Coll, M., Piroddi, C., Albouy, C., Ben Rais Lasram, F., Cheung, W.W.L., Christensen, V., Karpouzi, V.S., Guilhaumon, F., Mouillot, D., Paleczny, M., Palomares, M.L., Steenbeek, J., Trujillo, P., Watson, R. & Pauly, D. (2012) The Mediterranean Sea under siege: spatial overlap between marine biodiversity, cumulative threats and marine reserves. *Global Ecology and Biogeography*, 21, 465–480.
- Conover, D. O., Clarke, L. M., Munch, S. B., & Wagner, G. N. (2006). Spatial and temporal scales of adaptive divergence in marine fishes and the implications for conservation. *Journal of Fish Biology*, 69(sc), 21–47.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01274.x>
- Costas Papaconstantinou, & Stergiou, K. I. (1995). Biology and fisheries of eastern Mediterranean hake (*M. merluccius*). *Springer EBooks*, 149–180.
https://doi.org/10.1007/978-94-011-1300-7_6
- Cowen, R.K., Lwiza, K.M.M., Sponaugle, S., Paris, C.B. & Olson, D.B. (2000) Connectivity of marine populations: open or closed? *Science*, 287, 857–859.
- Dario Angeletti, Roberta Cimmaruta, Giuseppe Nascetti(2010) « Genetic diversity of the killifish *Aphanius fasciatus* paralleling the environmental changes of Tarquinia salterns habitat»
- Dalongeville, Alicia, Marco Andreollo, David Mouillot, Camille Albouy, Stéphanie Manel. (2015). "Ecological traits shape genetic diversity patterns across the Mediterranean Sea: a quantitative review on fishes."
<https://doi.org/10.1111/jbi.12669>. Citations: 22. Editor: Michelle Gaither.

- Domínguez-Petit, R., Saborido-Rey, F., & Medina, I. (2010). Changes of proximate composition, energy storage and condition of European hake (*Merluccius merluccius*, L. 1758) through the spawning season. *Fisheries Research*, 104(1-3), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2009.05.016>
- Druon, J.-N., Fiorentino, F., Murenu, M., Knittweis, L., Colloca, F., Osio, C., Mérigot, B., Garofalo, G., Mannini, A., Jadaud, A., Sbrana, M., Scarcella, G., Tserpes, G., Peristeraki, P., Carlucci, R., & Heikkonen, J. (2015). Modelling of European hake nurseries in the Mediterranean Sea: An ecological niche approach. *Progress in Oceanography*, 130, 188–204. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2014.11.005>
- Einarsson, Á., & Óladóttir, Á. D. (2020). *Fisheries and Aquaculture: The Food Security of the Future*. Academic Press.
- Ekerhovd, N.-A., & Steinshamn, S. I. (2016). Economic Benefits of Multi-Species Management: The Pelagic Fisheries in the Northeast Atlantic. *Marine Resource Economics*, 31(2), 193–210. <https://doi.org/10.1086/685383>
- Endo, H. (2002). Phylogeny of the order gadiformes (Teleostei, Paracanthopterygii). *Memoirs of the graduate school of fisheries sciences, Hokkaido University*, 49(2), 75-149.
- Eschmeyer, W. N., & Fong, J. D. (2017). *Catalog of Fishes, Species by Family/Subfamily*. Electronic Version.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Fang, H., Zhang, J., Song, N., Qian, L., & Gao, T. (2013). Population genetic structure and geographical differentiation of burbot (*Lota lota*) in China. *Russian Journal of Genetics*, 49(10), 1047–1056. <https://doi.org/10.1134/s102279541307003x>
- FAO. (2009). GFCM Resolution RES-GFCM/33/2009/2 Establishment of Geographical Sub-Areas in the GFCM area amending the resolution GFCM/31/2007/2. FAO General Fisheries Commission for the Mediterranean. Report of the thirty-third session, (33).
- FAO. (2016). *The state of world fisheries and aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all*. Policycommons.net; Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://policycommons.net/artifacts/8944352/the-state-of-world-fisheries-and-aquaculture/9782320/>
- Fernandes, T. J. R., Costa, J., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2017). DNA barcoding coupled to HRM analysis as a new and simple tool for the authentication of Gadidae fish species. *Food Chemistry*, 230, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.015>
- Ferreri, R., Basilone, G., D’Elia, M., Traina, A., Saborido-Rey, F., & Mazzola, S. (2009). Validation of macroscopic maturity stages according to microscopic histological examination for European anchovy. *Marine Ecology*, 30, 181–187. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2009.00312.x>
- Ferrer-Maza, D., Lloret, J., Munoz, M., Faliex, E., Vila, S., & Sasal, P. (2014). Parasitism, condition and reproduction of the European hake (*Merluccius*

- merluccius) in the northwestern Mediterranean Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 71(5), 1088-1099.
- Ferrer-Maza, D., Lloret, J., Muñoz, M., Faliex, E., Vila, S., & Sasal, P. (2014). Parasitism, condition and reproduction of the European hake (*Merluccius merluccius*) in the northwestern Mediterranean Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 71(5), 1088–1099. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fst217>
- Ferrito, V., Bertolino, V., & Pappalardo, A. M. (2016). White fish authentication by COIBar-RFLP: Toward a common strategy for the rapid identification of species in convenience seafood. *Food Control*, 70, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.026>
- Filiz, H., Akçınar, S. C., Ulutürk, E., Bayhan, B., Taşkavak, E., Sever, T. M., & Bilge, G. (2007). New records of *Bregmaceros atlanticus* (Bregmacerotidae), *Echiodon dentatus* (Carapidae), and *Nemichthys scolopaceus* (Nemichthyidae) from the Aegean Sea. *Acta Ichthyologica et piscatoria*, 37(2), 107-112.
- FishStat Plus (2000). Universal software for fishery statistical time series. Aquaculture.
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Froese, R., & Pauly, D. (2010). Fishbase (www Database) World Wide Web electronic publication. URL: <http://www.fishbase.org>.(accessed on May 2010).
- Funk, D. J., & Omland, K. E. (2003). Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 397–423. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421>
- García-Fernández, C. (2021). Ecology of recruitment in European hake: interaction between maternal effects, environment and fisheries. *Csic.es*. <http://hdl.handle.net/10261/261256>
- Gerlach G., Jueterbock A., Kraemer P., Deppermann J., Harmand P. (2010) Calculations of population differentiation based on GST and D: forget GST but not all of statistics! *Molecular Ecology*. 19(18):3845–3852
- Gill, T. (1884). On the anacanthine fishes. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 167-183.
- GJ, Howes. (1989). Phylogenetic relationships of macrouroid and gadoid fishes based on cranial myology and arthrology. *Papers on the Systematics of Gadiform Fishes*.
- Goode, G. B. (1895). *Oceanic Ichthyology: A Treatise on the Deep-sea and Pelagic Fishes of the World, Based Chiefly Upon the Collections Made by the Steamers Blake, Albatross, and Fish Hawk in the Northwestern Atlantic, with an Atlas Containing 417 Figures (Vol. 1)*. US Government Printing Office.
- Goren, M., & Galil, B. S. (2008). Additional records of *Bregmaceros atlanticus* in the eastern Mediterranean—an invasion through the Suez Canal or in ballast water? *Marine Biodiversity Records*, 1. <https://doi.org/10.1017/s1755267206004593>

- Grant, W. S., & Leslie, R. W. (2001). Inter-ocean dispersal is an important mechanism in the zoogeography of hakes (Pisces: Merluccius spp.). *Journal of Biogeography*, 28(6), 699–721. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2001.00585.x>
- Greenwood, P. H., Rosen, D. E., Weitzman, S. H., & Myers, G. S. (1966). Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bulletin of the AMNH*; v. 131, article 4.
- Hauser, L.; Adcock, G.J.; Smith, P.J.; Ramírez, J.H.B.; Carvalho, G.R.(2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 99, 11742–11747
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hewitt, G. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907–913.
- Hidalgo, M., Enric Massutí, Moranta, J., Joan Enric Cartes, Lloret, J., Oliver, P., & Morales-Nin, B. (2008). *Seasonal and short spatial patterns in European hake (Merluccius merluccius L.) recruitment process at the Balearic Islands (western Mediterranean): The role of environment on distribution and condition*. 71(3-4), 367–384. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2007.03.005>
- Hilbish, T. J. (1996). Population genetics of marine species: the interaction of natural selection and historically differentiated populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200(1-2), 67–83. [https://doi.org/10.1016/s0022-0981\(96\)02645-7](https://doi.org/10.1016/s0022-0981(96)02645-7)
- Hird, H. J., Chisholm, J., Kaye, J., Colyer, A., Hold, G., Conyers, C. M., Núñez, J. I., & Macarthur, R. (2011). Development of real-time PCR assays for the detection of Atlantic cod (*Gadus morhua*), Atlantic salmon (*Salmo salar*) and European plaice (*Pleuronectes platessa*) in complex food samples. *European Food Research and Technology*, 234(1), 127–136. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1596-4>
- Hubbs, C. L., & Schultz, L. P. (1941). Contribution to the ichthyology of Alaska, with descriptions of two new fishes. *Deepblue.lib.umich.edu*. <http://hdl.handle.net/2027.42/56870>
- Hughes, L. C., Ortí, G., Huang, Y., Sun, Y., Baldwin, C. C., Thompson, A. W., Arcila, D., Betancur-R., R., Li, C., Becker, L., Bellora, N., Zhao, X., Li, X., Wang, M., Fang, C., Xie, B., Zhou, Z., Huang, H., Chen, S., & Venkatesh, B. (2018). Comprehensive phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) based on transcriptomic and genomic data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(24), 6249–6254. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719358115>
- Hutchinson, W.F.; Oosterhout, C.; Rogers, S.I.; Carvalho, G.R. (2003) Temporal analysis of archived samples indicates marked genetic changes in declining North Sea cod (*Gadus morhua*). *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, 270, 2125–2132.
- Huyse, T., Van Houdt, J. & Volckaert, F.A.M. (2004) Paleoclimatic history and vicariant speciation in the “sand goby” group (Gobiidae, Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 324–336.

- ICES (International Council for the Exploration of the Sea). (2007). Report of the workshop on sexual maturity sampling (WKMAT). Copenhagen: ICES.
- ICES, C. (2009). Report of the Working Group on the Assessment of Southern Shelf Stocks of Hake, Monk and Megrim. ICES CM.
- Imsiridou, A., & Triantaphyllidis, C. (2001). *Merluccius merluccius* (Gadidae) populations. *Biologia, Bratislava*, 56(5), 545-547.
- Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S. Y. W., Faircloth, B. C., Nabholz, B., Howard, J. T., Suh, A., Weber, C. C., da Fonseca, R. R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., & Ganapathy, G. (2014). Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346(6215), 1320–1331. <https://doi.org/10.1126/science.1253451>
- Karel Pivnička. (1970). Morphological Variation in the Burbot (*Lota lota*) and Recognition of the Subspecies: A Review. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 27(10), 1757–1765. <https://doi.org/10.1139/f70-196>
- KATSANEVAKIS, S., MARAVELIAS, C. D., & VASSILOPOULOU, V. (2010). Otter trawls in Greece: Landing profiles and potential mutiers. *Mediterranean Marine Science*, 11(1), 43. <https://doi.org/10.12681/mms.90>
- Korta, M., García, D., Santurtún, M., Goikoetxea, N., Andonegi, E., Murua, H., ... & Murillas, A. (2015). European hake (*Merluccius merluccius*) in the Northeast Atlantic Ocean. Hakes: biology and exploitation, 1-37.
- Larsson A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics*30(22): 3276-3278.
- Launey, S. (2002). Geographic Structure in the European Flat Oyster (*Ostrea edulis* L.) as Revealed by Microsatellite Polymorphism. *Journal of Heredity*, 93(5), 331–351. <https://doi.org/10.1093/jhered/93.5.331>
- Lejeusne, C., Chevaldonné, P., Pergent-Martini, C., Boudouresque, C.F. & Pérez, T. (2010) Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *Trends in Ecology and Evolution*, 25, 250–260
- Levi, D., Cannizzaro, L., Garofalo, G., Andreoli, M. G., Norrito, G., & Rizzo, P. (1994). An essay on hake gerontocracy, ie what to do with the elderly members of a populations. Estado actual de los conoeimientos de las poblaciones de merluza que habitan la plataforma continental atlántica y mediterranea de la Union Europea con especial atencion a la Peninsula Ibérica'. (Eds A. Gonzáles-Garcés and FJ Pereiro.) pp, 125-153.
- Levi, D., Patti, B., Rizzo, P., Lo Brutto, S., Parrinello, N., & Arculeo, M. (2004). 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), 165–170. <https://doi.org/10.1080/11250000409356568>
- Lidia Orsi Relini, Costas Papaconstantinou, Stjepan Jukic-Peladic, Arnauld Souplet, Gil, L., Corrado Piccinetti, Kavadas, S., & Rossi, M. (2002). 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), 21–21. <https://doi.org/10.3989/scimar.2002.66s221>
- Lidia Orsi Relini, Costas Papaconstantinou, Stjepan Jukic-Peladic, Arnauld Souplet, Gil, L., Corrado Piccinetti, Kavadas, S., & Rossi, M. (2002). 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), 21–21. <https://doi.org/10.3989/scimar.2002.66s221>
- Lleonart, J., & Maynou, F. (2003). Fish stock assessments in the Mediterranean: state of the art. *Scientia Marina*, 67(S1), 37–49.
- Lo Brutto, S., Arculeo, M., & Parrinello, N. (2004). Congruence in genetic markers used to describe Mediterranean and Atlantic populations of European hake (*Merluccius merluccius* L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 20(2), 81–86. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2003.00514.x>
- Lo Brutto, S., Arculeo, M., & Parrinello, N. (2004). Congruence in genetic markers used to describe Mediterranean and Atlantic populations of European hake (*Merluccius merluccius* L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 20(2), 81–86. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2003.00514.x>
- Ludt, W.B. & Rocha, L.A. (2015) Shifting seas: the impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. *Journal of Biogeography*, 42, 25–38.
- Luiz, O.J., Allen, A.P., Robertson, D.R., Floeter, S.R., Kulbicki, M., Vigliola, L., Becheler, R. & Madin, J.S. (2013) Adult and larval traits as determinants of geographic range size among tropical reef fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110, 16498–16502.
- Lundy, C. J., Moran, P., Rico, C., Milner, R. S., & Hewitt, G. M. (1999). *Macrogeographical population differentiation in oceanic environments: a case study of European hake (Merluccius merluccius), a commercially important fish*. 8(11), 1889–1898. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00789.x>
- Lundy, C. J., Rico, C., & Hewitt, G. M. (2000). Temporal and spatial genetic variation in spawning grounds of European hake (*Merluccius merluccius*) in the Bay of Biscay. *Molecular Ecology*, 9(12), 2067–2079. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01120.x>
- Lundy, C. J., Rico, C., & Hewitt, G. M. (2000). Temporal and spatial genetic variation in spawning grounds of European hake (*Merluccius merluccius*) in the Bay of Biscay. *Molecular Ecology*, 9(12), 2067–2079. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01120.x>
- Malmstrøm, M., Matschiner, M., Tørresen, O. K., Star, B., Snipen, L. G., Hansen, T. F., Baalsrud, H. T., Nederbragt, A. J., Hanel, R., Salzburger, W., Stenseth, N. C., Jakobsen, K. S., & Jentoft, S. (2016). Evolution of the immune system influences speciation rates in teleost fishes. *Nature Genetics*, 48(10), 1204–1210. <https://doi.org/10.1038/ng.3645>
- Manzella, R., Tom Sawyer Hopkins, Minnett, P. J., & Elvio Nacini. (1990). *Atlantic water in the strait of Sicily*. 95(C2), 1569–1569. <https://doi.org/10.1029/jc095ic02p01569>
- Markle, D. F. (1989). Aspects of character homology and phylogeny of the Gadiformes. *Papers on the systematics of gadiform fishes*, 32, 59–88.
- Mathews, C. P. (1985). Meristic studies of the Gulf of California species of *Merluccius*, with a description of a new species. *Journal of natural history*, 19(4), 697–718.

- Mattiucci, S., Abaunza, P., Ramadori, L., & Nascetti, G. (2004). Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *Journal of Fish Biology*, 65(2), 495–510. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00465.x>
- Mattiangeli, Valeria, Anthony W. Ryan, Paul Galvin, Jarle Mork, Thomas F. Cross. (2003). "Eastern and Western Poor Cod (*Trisopterus minutus capelanus*) Populations in the Mediterranean Sea: Evidence from Allozyme and Minisatellite Loci."
- Maynou, F. (2003). Seasonal and spatial variability of hake (*Merluccius merluccius* L.) recruitment in the NW Mediterranean. *Fisheries Research*, 60(1), 65–78. [https://doi.org/10.1016/s0165-7836\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/s0165-7836(02)00062-0)
- Maynou, F. (2003). Seasonal and spatial variability of hake (*Merluccius merluccius* L.) recruitment in the NW Mediterranean. *Fisheries Research*, 60(1), 65–78. [https://doi.org/10.1016/s0165-7836\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/s0165-7836(02)00062-0)
- Maynou, F. (2003). Seasonal and spatial variability of hake (*Merluccius merluccius* L.) recruitment in the NW Mediterranean. *Fisheries Research*, 60(1), 65–78. [https://doi.org/10.1016/s0165-7836\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/s0165-7836(02)00062-0)
- McLeod S.A. (2019) What a p-value tells you about statistical significance. <https://www.simplypsychology.org/p-value.html>. (accessed 10-08-2022).
- Mehanna S.F.(2006) Fisheries regulations based on yield per recruit analysis for the spotted seabass *Dicentrarchus punctatus* (Moronidae) at Bardawil lagoon, Mediterranean coast of Sinai, Egypt
- Mehault, S., Domínguez-Petit, R., Cerviño, S., & Saborido-Rey, F. (2010). Variability in total egg production and implications for management of the southern stock of European hake. *Fisheries Research*, 104(1-3), 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2010.03.019>
- Mellon-Duval, C., De Pontual, H., Métral, L., & Quemener, L. (2010). Growth of European hake (*Merluccius merluccius*) in the Gulf of Lions based on conventional tagging. *ICES Journal of Marine Science*, 67(1), 62-70.
- Mellon-Duval, C., Harmelin-Vivien, M., Métral, L., Loizeau, V., Mortreux, S., Roos, D., & Fromentin, J. M. (2017). Trophic ecology of the European hake in the Gulf of Lions, northwestern Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 81(1), 7-18.
- Mellon-Duval, C., Harmelin-Vivien, M., Métral, L., Loizeau, V., Mortreux, S., Roos, D., & Fromentin, J. M. (2017). Trophic ecology of the European hake in the Gulf of Lions, northwestern Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 81(1), 7. <https://doi.org/10.3989/scimar.04356.01a>
- Meffe G.K., Vrijenhoek R.C. (1988) Conservation genetics in the management of desert fishes. *Conservation Biology* 2: 157–169.
- Milano, I., Babbucci, M., Cariani, A., Atanassova, M., Bekkevold, D., Carvalho, G. R., Espiñeira, M., Fiorentino, F., Garofalo, G., Geffen, A. J., Hansen, Jakob. H., Helyar, S. J., Nielsen, E. E., Ogden, R., Patarnello, T., Stagioni, M., Tinti, F., & Bargelloni, L. (2013). Outlier SNP markers reveal fine-scale genetic structuring across European hake populations (*Merluccius merluccius*). *Molecular Ecology*, 23(1), 118–135. <https://doi.org/10.1111/mec.12568>
- MIYA, M., SATOH, T. P., & NISHIDA, M. (2005). The phylogenetic position of toadfishes (order Batrachoidiformes) in the higher ray-finned fish as inferred from partitioned Bayesian analysis of 102 whole mitochondrial genome sequences. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85(3), 289–306. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00483.x>

- M. Chevelot, G. Hoaraou, A.D. Rijnsdorp, W.T. Stam, J.L. Olsen (2006) Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., Rajidae)
- Morales-Nin, B., & Aldebert, Y. (1997). Growth of juvenile *Merluccius merluccius* in the Gulf of Lions (NW Mediterranean) based on otolith microstructure and length-frequency analysis. *Fisheries Research*, 30(1-2), 77–85. [https://doi.org/10.1016/s0165-7836\(96\)00553-x](https://doi.org/10.1016/s0165-7836(96)00553-x)
- Morales-Nin, B., Pérez-Mayol, S., MacKenzie, K., Catalán, I. A., Palmer, M., Kersaudy, T., & Mahé, K. (2022). European hake (*Merluccius merluccius*) stock structure in the Mediterranean as assessed by otolith shape and microchemistry. *Fisheries Research*, 254, 106419.
- Murray, A. M., & Wilson, M. V. (1999). Contributions of fossils to the phylogenetic relationships of the percopsiform fishes (Teleostei: Paracanthopterygii): order restored. *Mesozoic fishes*, 2, 397–411.
- Murua, H. (2010). The Biology and Fisheries of European Hake, *Merluccius merluccius*, in the North-East Atlantic. *Advances in Marine Biology*, 97–154. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381015-1.00002-2>
- Murua, H. (2010). The biology and fisheries of European hake, *Merluccius merluccius*, in the north-east Atlantic. *Advances in marine biology*, 58, 97–154.
- Murua, H. (2010). The Biology and Fisheries of European Hake, *Merluccius merluccius*, in the North-East Atlantic. *Advances in Marine Biology*, 97–154. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381015-1.00002-2>
- Murua, H., & Motos, L. (2006). Reproductive strategy and spawning activity of the European hake *Merluccius merluccius* (L.) in the Bay of Biscay. *Journal of Fish Biology*, 69(5), 1288–1303. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01169.x>
- Murua, H., Kraus, G., Saborido-Rey, F., Witthames, P. R., Thorsen, A., & Junquera, S. (2024). Procedures to estimate fecundity of marine fish species in relation to their reproductive strategy. *Csic.es*. <https://doi.org/0250-6408>
- Naciri, M. (1999). Genetic study of the Atlantic/Mediterranean transition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Heredity*, 90(6), 591–596. <https://doi.org/10.1093/jhered/90.6.591>
- Nations, F. and A. O. of the U. (2005). Management Techniques for Elasmobranch Fisheries. In *Google Books*. Food & Agriculture Org. https://books.google.com/books?hl=el&lr=&id=KT0jXz2AyIsC&oi=fnd&pg=PA201&dq=Fishery+independent+sampling:+survey+techniques+and+data+analyses.+Management+techniques+for+elasmobranch+fisheries&ots=6Xm9wSzjIA&sig=DK-GybIuE-GYZfMuSlKK_ny-WMc
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. H. (2016). *Fishes of the World*. In *Google Books*. John Wiley & Sons. https://books.google.com/books?hl=el&lr=&id=E-MLDAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT43&ots=uWg5HJw0nT&sig=fO_6YATrHeGvVAsUdXPYbSIkA6A
- N. Suzuki, M. Nishida, K. Yoseda, C. Üstündağ, T. Şahin, K. Amaoka (2004) Phylogeographic relationships within the Mediterranean turbot inferred by mitochondrial DNA haplotype variation

- Nolf, D., & Steurbaut, E. (1989). Evidence from otoliths for establishing relationships within gadiforms.
- Nolf, D., & Steurbaut, E. (1989). Importance and restriction of the otolith-based fossil record of gadiform and ophidiiform fishes.
- Olivar, M. (2003). Spatial and temporal distribution and abundance of European hake, *Merluccius merluccius*, eggs and larvae in the Catalan coast (NW Mediterranean). *Fisheries Research*, 60(2-3), 321–331.
[https://doi.org/10.1016/s0165-7836\(02\)00139-x](https://doi.org/10.1016/s0165-7836(02)00139-x)
- Oliver, P., & Enric Massutí. (1995). Biology and fisheries of western Mediterranean hake (*M. merluccius*). *Springer EBooks*, 181–202.
https://doi.org/10.1007/978-94-011-1300-7_7
- Pappalardo, A. M., & Ferrito, V. (2015). DNA barcoding species identification unveils mislabeling of processed flatfish products in southern Italy markets. *Fisheries Research*, 164, 153–158.
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2014.11.004>
- Park, D.-S., Suh, S.-J., Oh, H.-W., & Hebert, P. D. (2010). Recovery of the mitochondrial COI barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-423>
- Patterson, C. (1989). The Paracanthopterygii revisited: order and disorder. Papers on the systematics of gadiform fishes.
- Philips, A. E. (2012). Feeding behavior of the European hake *Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758 (Family: Gadidae) from Egyptian Mediterranean waters off Alexandria. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 38(1), 39–44.
<https://doi.org/10.1016/j.ejar.2012.09.002>
- Pita, A., Leal, A., Santafé-Muñoz, A., Piñeiro, C., & Presa, P. (2016). Genetic inference of demographic connectivity in the Atlantic European hake metapopulation (*Merluccius merluccius*) over a spatio-temporal framework. *Fisheries Research*, 179, 291–301.
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.03.017>
- Pitcher, T. J., & Jürgen Alheit. (1995). What makes a hake? A review of the critical biological features that sustain global hake fisheries. *Springer EBooks*, 1–14.
https://doi.org/10.1007/978-94-011-1300-7_1
- Pitcher, T. J., & Jürgen Alheit. (1995). What makes a hake? A review of the critical biological features that sustain global hake fisheries. *Springer EBooks*, 1–14.
https://doi.org/10.1007/978-94-011-1300-7_1
- Pogson, G. H., & Fevolden, S.-E. (2002). Natural selection and the genetic differentiation of coastal and Arctic populations of the Atlantic cod in northern Norway: a test involving nucleotide sequence variation at the pantophysin (PanI) locus. *Molecular Ecology*, 12(1), 63–74. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.01713.x>
- Quesada, H., Zapata, C., & Alvarez, G. (1995). A multilocus allozyme discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: the interaction of ecological and life-history factors. *Marine Ecology Progress Series*, 116(1/3), 99–115.
<https://www.jstor.org/stable/44634998>
- Quinteiro, J., Vidal, R., & Rey-Méndez, M. (2000). Phylogeny and biogeographic history of hake (genus *Merluccius*), inferred from mitochondrial DNA

- control-region sequences. *Marine Biology*, 136(1), 163–174.
<https://doi.org/10.1007/s002270050019>
- R. Gurbet, O. Akyol, & E. Yalçın. (2012). Exploitation and mortality rates of European hake (*Merluccius merluccius*) in the Aegean Sea (Izmir Bay, Turkey). *Journal of Applied Ichthyology*, 29(3), 569–572.
<https://doi.org/10.1111/jai.12082>
- Rasmussen, R. S., & Morrissey, M. T. (2008). DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(3), 280–295.
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00046.x>
- Raziye Yılmaz, Murat Bilecenoğlu, & Belgin Hoşsucu. (2004). First record of the Antenna Codlet, *Bregmaceros atlanticus* Goode & Bean, 1886 (Osteichthyes: Bregmacerotidae), from the eastern Mediterranean Sea. *Zoology in the Middle East*, 31(1), 111–112. <https://doi.org/10.1080/09397140.2004.10638031>
- R. CIMMARUTA, P. BONDANELLI, G. NASCETTI (2005) Genetic structure and environmental heterogeneity in the European hake (*Merluccius merluccius*)
- Reiss, H., Hoarau, G., Dickey-Collas, M., & Wolff, W. J. (2009). Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. *Fish and Fisheries*, 10(4), 361–395.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2008.00324.x>
- 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.
- RIGINOS, C., & CUNNINGHAM, C. W. (2004). INVITED REVIEW: Local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* × *Mytilus trossulus*) hybrid zones. *Molecular Ecology*, 14(2), 381–400.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2004.02379.x>
- Righi, Tommaso, Andrea Splendiani, Tatiana Fioravanti, Elia Casoni, Giorgia Gioacchini, Olina Carnevali, Vincenzo Caputo Barucchi. (2020). "Loss of Mitochondrial Genetic Diversity in Overexploited Mediterranean Swordfish (*Xiphias gladius*, 1759) Population."
- Riginos, C. & Liggins, L. (2013) Seascape genetics: populations, individuals, and genes marooned and adrift. *Geography Compass*, 7, 197–216.
- Roa-Varón, A., & Ortí, G. (2009). Phylogenetic relationships among families of Gadiformes (Teleostei, Paracanthopterygii) based on nuclear and mitochondrial data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(3), 688–704.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.03.020>
- Roldán, M. I., García-Marín, J. L., Utter, F. M., & Pla, C. (1998). Population genetic structure of European hake, *Merluccius merluccius*. *Heredity*, 81(3), 327–334.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00383.x>
- Rosen, D. E., & Patterson, C. (1969). The structure and relationships of the paracanthopterygian fishes.
- Ruggeri, P.; Splendiani, A.; Di Muri, C.; Fioravanti, T.; Santojanni, A.; Leonori, I.; De Felice, A.; Biagiotti, I.; Carpi, P.; Arneri, E. (2016) Coupling demographic and genetic variability from archived collections of European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *PLoS ONE*, 11, e015150

- Russello, M. A., Kirk, S. L., Frazer, K. K., & Askey, P. J. (2011). Detection of outlier loci and their utility for fisheries management. *Evolutionary Applications*, 5(1), 39–52. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00206.x>
- Saavedra, C., Zapata, C., & Alvarez, G. (1995). Geographical patterns of variability at allozyme loci in the European oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 122(1), 95–104. <https://doi.org/10.1007/bf00349282>
- Şalcıoğlu, Asli, Chrysoula Gubili, Grigorios Krey, Adem Yavuz Sönmez, Raşit Bilgin. (2020). "Phylogeography and population dynamics of the Eastern Mediterranean whiting (*Merlangius merlangus*) from the Black Sea, the Turkish Straits System, and the North Aegean Sea."
- Sánchez, A., Vázquez, J. A., Quinteiro, J., & Sotelo, C. G. (2013). Modeling Real-Time PCR Kinetics: Richards Reparametrized Equation for Quantitative Estimation of European Hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(14), 3488–3493. <https://doi.org/10.1021/jf400136j>
- Sartor, P., Sbrana, M., Belcari, P., De Ranieri, S., & Viva, C. (2007). Comparison of the catches of European hake (*Merluccius merluccius*, L. 1758) taken with experimental gillnets of different mesh sizes in the northern Tyrrhenian Sea (western Mediterranean). *Scientia Marina*, 71(1), 47–56. <https://doi.org/10.3989/scimar.2007.71n147>
- Sion, L., Zupa, W., Calculli, C., Garofalo, G., Hidalgo, M., Jadaud, A., Lefkaditou, E., Ligas, A., Peristeraki, P., Bitetto, I., Capezzuto, F., Carlucci, R., Esteban, A., Follesa, C., Guijarro, B., Ikica, Z., Isajlovic, I., Lembo, G., Manfredi, C., & Pérez, J. L. (2020). Spatial distribution pattern of European hake, *Merluccius merluccius* (Pisces: Merlucciidae), in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 83(S1), 21. <https://doi.org/10.3989/scimar.04988.12a>
- Sion, L., Zupa, W., Calculli, C., Garofalo, G., Hidalgo, M., Jadaud, A., Lefkaditou, E., Ligas, A., Peristeraki, P., Bitetto, I., Capezzuto, F., Carlucci, R., Esteban, A., Follesa, C., Guijarro, B., Ikica, Z., Isajlovic, I., Lembo, G., Manfredi, C., & Pérez, J. L. (2020). Spatial distribution pattern of European hake, *Merluccius merluccius* (Pisces: Merlucciidae), in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 83(S1), 21. <https://doi.org/10.3989/scimar.04988.12a>
- S. Mattiucci, P. Abaunza, L. Ramadori, G. Nascetti (2004) Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00465.x>
- Smaragdov, Michael G.. (2018). "Assessing the genetic differentiation of Holstein cattle herds in the Leningrad region using Fst statistics."
- Soykan, O., İLK YAZ, A. T., METİN, G., & Kinacigil, H. T. (2010). Growth and reproduction of blotched picarel (*Spicara maena* Linnaeus, 1758) in the central Aegean Sea, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 34(4), 453-459.
- Slatkin M. (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 393–430.
- Stergiou, K. I., Machias, A., Somarakis, S., & Kapantagakis, A. (2003). Can we define target species in Mediterranean trawl fisheries? *Fisheries Research*, 59(3), 431–435. [https://doi.org/10.1016/s0165-7836\(02\)00016-4](https://doi.org/10.1016/s0165-7836(02)00016-4)

- Taboada, L., Sánchez, A., & Sotelo, C. G. (2017). A new real-time PCR method for rapid and specific detection of ling (*Molva molva*). *Food Chemistry*, 228, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.117>
- Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123(3):585–595. doi:10.1093/genetics/123.3.585.
- Tanhua, T., Hainbucher, D., Schroeder, K., Cardin, V., Álvarez, M., & Civitarese, G. (2013). The Mediterranean Sea system: a review and an introduction to the special issue. *Ocean Science*, 9(5), 789–803. <https://doi.org/10.5194/os-9-789-2013>
- Teletchea, F., Laudet, V., & Hänni, C. (2006). Phylogeny of the Gadidae (sensu Svetovidov, 1948) based on their morphology and two mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(1), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.09.001>
- Torii, A., Harold, A. S., Ozawa, T., & Yukio Iwatsuki. (2003). Redescription of *Bregmaceros maclellandi* Thompson, 1840 (Gadiformes: Bregmacerotidae). *Ichthyological Research*, 50(2), 129–139. <https://doi.org/10.1007/s10228-002-0148-0>
- Tudela, S. (1999). Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Fisheries Research*, 42(3), 229–243. [https://doi.org/10.1016/s0165-7836\(99\)00052-1](https://doi.org/10.1016/s0165-7836(99)00052-1)
- Turan, C., Yağlıoğlu, D., Gürlek, M., & Ergüden, D. (2011). A New Record of Antenna codlet *Bregmaceros atlanticus* Goode and Bean, 1886 (Bregmacerotidae: Gadiformes) from the Northeastern Mediterranean Coast of Turkey. *Journal of Black Sea / Mediterranean Environment*, 17(2), 186–192. <https://dergipark.org.tr/en/pub/jbme/issue/9839/121845>
- Uzer, U., Öztürk, B., & Yıldız, T. (2019). 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), 109–117.
- uzer, uğur, ÖZTÜRK, B., & YILDIZ, T. (2019). 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), 109–117. <https://doi.org/10.3750/aiep/02465>
- Van Houdt, J. (2003). Phylogenetic relationships among Palearctic and Nearctic burbot (*Lota lota*): Pleistocene extinctions and recolonization. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 599–612. [https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(03\)00133-7](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(03)00133-7)
- von der Heyden, S., & Matthee, C. A. (2008). Towards resolving familial relationships within the Gadiformes, and the resurrection of the Lyconidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(2), 764–769.
- Ward, R.D., Woodward, M. & Skibinski, D.O.F. (1994) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, 44, 213–232.

- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- Wilkinson, S., Wiener, P., Archibald, A.L., Law, A., Schnabel, R.D., McKay, S.D., Taylor, J.F. & Ogden, R. (2011). Evaluation of approaches for identifying population informative markers from high density SNP chips. *BMC Genetics* 12:45. <https://doi.org/10.1186/14712156-12-45>
- Woillez, M., Poulard, J.-C. ., Rivoirard, J., Petitgas, P., & Bez, N. (2007). 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), 537–550. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsm025>
- Xanthopoulou, A., Ganopoulos, I., Kalivas, A., Osathanunkul, M., Chatzopoulou, P., Tsiftaris, A., & Madesis, P. (2016). Multiplex HRM analysis as a tool for rapid molecular authentication of nine herbal teas. *Food Control*, 60, 113–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.021>
- Yalcin, E., & Gurbet, R. (2016). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16(1). https://doi.org/10.4194/1303-2712-v16_1_01

Ελληνική βιβλιογραφία

- Οδυσσέας Παναγιώτης Τζωρτζάτος (2020) «Γενετική παραλλακτικότητα πληθυσμών του εμπορικού είδους *Holothuria*» Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία
- Παναγιώτα Πετρούδη Σπανού Δέσποινα-Σελίνα (2022) «Το γενετικό απόθεμα του *Squalius orpheus* του Νέστου ποταμού» Προπτυχιακή διπλωματική εργασία
- Χρίστος Ν. Νεοφύτου (2015) «Βιολογία ιχθύων και θαλάσσιων θηλαστικών» 337-349

ABSTRACT

The genetic makeup of cod, known as *Merluccius merluccius*, in the Mediterranean Sea plays a critical role in fisheries management and conservation efforts. The present study investigates the genetic composition of this economically important species, investigating its evolutionary background, taxonomy, distribution and exploitation in the Mediterranean region. The study presents the diversity of Gadiformes, offering information on their evolutionary history and the classification of Gadiformes families in the Mediterranean region. Focusing on *Merluccius merluccius*, the study outlines its taxonomy, distribution patterns and population genetics. Sampling was carried out with nets by fishermen in Pagasitikos gulf. Genetic material was isolated from the tissue of 20 fish that were caught. A fragment of mitochondrial DNA encoding subunit I of cytochrome oxidase (COI) was amplified by PCR and checked by electrophoresis. Sequencing of the samples through the Blast program of the GenBank sequence database showed 17 sequences corresponding to individuals of the species. Through NCBI, 14 more COI gene sequences of the species were retrieved from regions of Spain, for comparison and correlation with the remaining samples. Sequences were processed with Aliview, Fabox and Arlequin programs. To compare populations, F_{ST} indices, Tajima's D and AMOVA analysis of molecular variance were calculated. The genetic differentiation between these regions was found to be statistically insignificant. However, great intra-population diversity was observed in the Spanish seas. These events can be attributed to human activity, geographic isolation and cessation of genetic flow. It is possible that repeating this study in the future with a

larger number of samples will reveal important conclusions about these fish populations.

Key words: *Merluccius merluccius*, population genetics, COI gene, genetic differentiation, Greek and Spanish seas.