



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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ
CRASSICAUDA ANTHONYI ΑΠΟ ZIPHIUS CAVIROSTRIS ΣΤΗ ΒΟΥΛΙΑΓΜΕΝΗ»**

ΜΟΣΧΕΤΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑ ΒΗΣΣΑΡΙΑ

ΒΟΛΟΣ 2025

**«ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ
CRASSICAUDA ANTHONYI ΑΠΟ ZIPHIUS CAVIROSTRIS ΣΤΗ ΒΟΥΛΙΑΓΜΕΝΗ»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. ΓΚΑΦΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (Ph.D.), ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΧΘΥΑΠΟΘΕΜΑΤΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ.**

2. ΒΑΦΕΙΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (Ph.D.), ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΕΝΘΙΚΩΝ ΑΣΠΟΝΔΥΛΩΝ ΚΑΙ ΑΜΕΣΗ – ΕΜΜΕΣΗ ΧΡΗΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ. ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, **ΜΕΛΟΣ.**

3.ΕΞΑΔΑΚΤΥΛΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (Ph.D.), ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΖΩΪΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, **ΜΕΛΟΣ**

ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΜΟΥ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΘΑ ΗΘΕΛΑ ΝΑ ΕΚΦΡΑΣΩ ΤΙΣ ΕΙΛΙΚΡΙΝΕΙΣ ΜΟΥ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ ΣΕ ΟΛΟΥΣ ΟΣΟΥΣ ΣΥΝΕΒΑΛΑΝ ΣΤΟ ΝΑ ΦΕΡΩ ΣΕ ΠΕΡΑΣ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ. ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΘΑ ΗΘΕΛΑ ΝΑ ΕΥΧΑΡΙΣΤΗΣΩ ΤΟΝ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΑΥΤΗΣ, Κ. ΓΚΑΦΑ ΓΕΩΡΓΙΟ, ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΛΥΤΙΜΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΙ ΤΗ ΔΙΑΡΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΤΟΥ, ΤΟΣΟ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΟΣΟ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΑ ΥΠΟΛΟΙΠΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΜΟΥ, ΑΠΟΤΕΛΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟΥΣ Κ. ΒΑΦΕΙΔΗ ΔΗΜΗΤΡΙΟ ΚΑΙ Κ. ΞΕΑΔΑΚΤΥΛΟ ΑΘΑΝΑΣΙΟ, ΓΙΑ ΤΙΣ ΧΡΗΣΙΜΕΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΣ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ ΤΟΥΣ ΚΑΘ' ΟΛΑ ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΔΙΕΚΠΕΡΑΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ. ΑΚΟΜΗ, ΘΑ ΗΘΕΛΑ ΝΑ ΕΥΧΑΡΙΣΤΗΣΩ ΘΕΡΜΑ ΤΗΝ ΚΑ ΣΑΡΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΙΩΑΝΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΜΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΙΔΙΟΤΕΛΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ. ΤΕΛΟΣ, ΘΑ ΗΘΕΛΑ ΝΑ ΕΚΦΡΑΣΩ ΤΙΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΜΕΡΙΣΤΗ ΣΥΜΠΑΡΑΣΤΑΣΗ, ΒΟΗΘΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΝ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΧΗ ΚΑΘ' ΟΛΟ ΤΟ ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΜΟΥ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο τη μοριακή ταυτοποίηση του νηματώδους παρασίτου του γένους *Crassicauda* που απομονώθηκε από τους νεφρούς ενός ζιφιού (*Ziphius cavirostris*) που εκβράστηκε στη θαλάσσια περιοχή της Βουλιαγμένης. Η απομόνωση και ανάλυση του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε με χρήση του γονιδιακού δείκτη ITS2, μέσω PCR και αλληλούχισης. Η αλληλουχία των 351 bp που προέκυψε, παρουσίασε 97,16% ομοιότητα με καταχωρημένα δείγματα του είδους *Crassicauda anthonyi* στη βάση δεδομένων GenBank, επιβεβαιώνοντας τη μοριακή του ταυτοποίηση. Η φυλογενετική ανάλυση με χρήση της Μπεϋζιανής μεθόδου τοποθέτησε το δείγμα σε σαφώς διακριτό κλάδο μαζί με άλλα δείγματα *C. anthonyi*, ενισχύοντας τη φυλογενετική του διαφοροποίηση από συγγενικά είδη, όπως *Crassicauda boopis*, *Crassicauda grampicola* και *Crassicauda giliakiana*. Οι γενετικές αποστάσεις επιβεβαιώνουν τη στενή συγγένεια του δείγματος με το *C. anthonyi*.

Τα αποτελέσματα ενισχύουν την εικόνα του *C. anthonyi* ως παράσιτο με ευρεία γεωγραφική εξάπλωση και έντονη εξειδίκευση στον ζιφιό ως ξενιστή. Παρά τους περιορισμούς της μελέτης, όπως ο μικρός αριθμός δειγμάτων και η ανάλυση μιας μόνο γονιδιακής περιοχής, η εργασία αναδεικνύει τη σημασία της μοριακής παρασιτολογίας στην κατανόηση των σχέσεων παρασίτου-ξενιστή και στην εξελικτική διερεύνηση των ειδών του γένους *Crassicauda*.

Λέξεις-κλειδιά: *Crassicauda anthonyi*, *Ziphius cavirostris*, ITS2, νηματώδη, Μεσόγειος

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Η οικολογία του ζιφιού	1
1.2 Παράσιτα, βακτήρια και ιοί	4
1.2.1 Παράσιτα που προσβάλλουν τον ζιφιό	4
1.2.2 Βακτήρια που προσβάλλουν τον ζιφιό	6
1.2.3 Ιοί που προσβάλλουν τον ζιφιό	6
1.3 Σύγκριση ζιφιού Ατλαντικού και Μεσογείου.....	7
1.3.1 Παράσιτα στη Μεσόγειο	7
1.3.2 Παράσιτα στον Ατλαντικό	8
1.4 Τα είδη του <i>Crassicauda</i>, ξενιστές και κύκλος ζωής.....	8
1.4.1 <i>Crassicauda boopis</i> Baylis, 1920	8
1.4.2 <i>Crassicauda anthonyi</i> Chabaud, 1962	9
1.4.3 <i>Crassicauda giliakiana</i> Skrjabin & Andreeva, 1934.....	10
1.4.5 <i>Crassicauda grampicola</i> Johnston & Mawson, 1939.....	11
1.4.6 Κύκλος ζωής.....	11
1.5 Φυλογενετικές αναλύσεις του γένους <i>Crassicauda</i>.....	12
1.6 Στόχος εργασίας.....	13
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	14
2.1 Εξαγωγή DNA.....	14

2.1.1 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση του DNA.....	15
2.2. Ενίσχυση της περιοχής ITS2 με τη χρήση PCR.....	16
2.3 Φυλογενετική ανάλυση.....	19
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	21
4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	25
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	30
6. ABSTRACT	39

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η οικολογία του ζιφιού

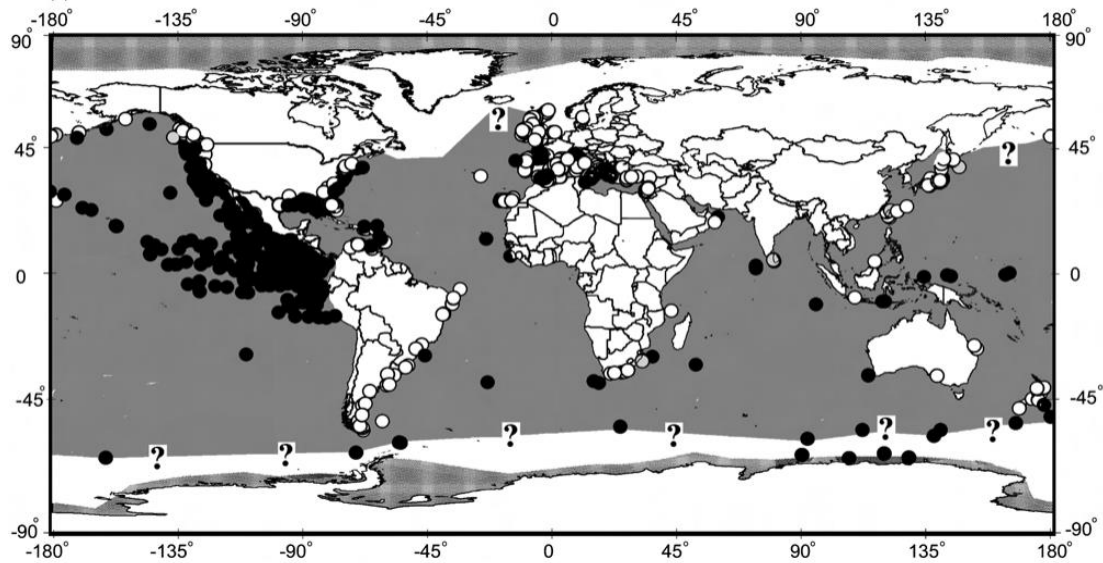
Η φάλαινα με ράμφος του Cuvier, *Ziphius cavirostris* (Εικ. 1), περιγράφηκε αρχικά από τον Cuvier το 1823 με βάση ένα μέρος κρανίου που συλλέχθηκε κοντά στην περιοχή Fos της Γαλλίας το 1804. Αρχικά ο Cuvier αναγνώρισε λανθασμένα το δείγμα ως απολίθωμα, διότι πίστευε πως ήταν “απολιθωμένο” λόγω της εξαιρετικά πυκνής οστεοποίησης του ράμφους. Αργότερα, ο Turner (1872) αναγνώρισε αυτό το είδος ως ένα υπαρκτό είδος (Allen et al., n.d.). Το γένος *Ziphius* περιλαμβάνει ένα είδος μόνο, το *Ziphius cavirostris*. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη του είδους.



Εικόνα 1: Σκίτσο του *Ziphius Cavirostris* από τον Martin Camm με μικρές τροποποιήσεις (Carwardine, 1995)

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του *Ziphius cavirostris*

Τάξη	Cetacea (Κητώδη)
Υπόταξη	Odontoceti (Οδοντοκήτη)
Υπεροικογένεια	Ziphiodea (Ζιφιοειδή)
Οικογένεια	Ziphiidae (Ζιφίδες)
Υποοικογένεια	Ziphiinae (Ζιφίνες)
Γένος	<i>Ziphius</i>
Είδος	<i>Ziphius cavirostris</i>

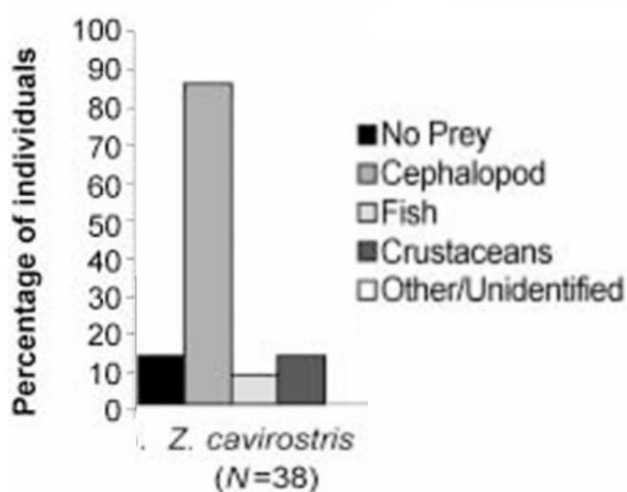


Εικόνα 2: Γεωγραφική εξάπλωση του *Ziphius Cavirostris* (MacLeod et al., 2023). Οι κυκλοι αντιπροσωπεύουν γνωστές καταγραφές θέσεων του ζιφιού. μαύροι κύκλοι-θεάσεις, λευκοί κύκλοι-εκβρασμοί, γκρι κύκλοι- άλλο/αγνώστου τύπου εγγραφές, τα «?» υποδηλώνουν πιθανές αλλά μη επιβεβαιωμένες περιοχές/ όρια εξάπλωσης

Υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με την οικολογία, τη συμπεριφορά, την πληθυσμιακή δομή και τον αριθμό των φαλαινών με ράμφος στον κόσμο. Ο ζιφιός έχει κοσμοπολίτικη κατανομή σε όλους τους ωκεανούς εκτός από τα ύδατα της Αρκτικής και της Ανταρκτικής (Moore 1963, Mitchell 1975, όπως αναφέρεται στο Santos et al., 2001). Οι πληροφορίες για το είδος είναι ελάχιστες και οι υπάρχουσες διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την κατανομή, τη βιολογία και την οικολογία του είδους προέρχονται από εκβρασμούς (Heyning 1989, Waerebeek et. al. 1972, όπως αναφέρεται στο Santos et al., 2001).

Τα κεφαλόποδα αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της διατροφής της φάλαινας Cuvier παγκοσμίως (Kovačić et al., n.d.; Santos et al., 2001). Στο πλαίσιο της μελέτης

τους για τις διατροφικές συνήθειες των φαλαινών με ράμφος, οι MacLeod, Santos και Pierce (2003) ανέλυσαν 38 άτομα του είδους *Ziphius cavirostris* που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της εξάπλωσής του. Η ανάλυση του περιεχομένου των στομάχων αποκάλυψε την παρουσία 46 διαφορετικών ειδών κεφαλόποδων, τα οποία ανήκαν σε 15 οικογένειες, καθώς και δύο είδη καρκινοειδών. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν μια ευρεία διατροφική εξειδίκευση, με έντονη προτίμηση προς τα κεφαλόποδα, στοιχείο που αντικατοπτρίζει τη σημασία του στη διατροφική οικολογία του είδους. Υπολείμματα ψαριών βρέθηκαν πολύ λίγα (Εικ. 3).



Εικόνα 3: Παρουσία διαφορετικών τύπων θηραμάτων για το είδος *Ziphius cavirostris* (MacLeod et al., 2003)

Τα αποτελέσματα διάφορων μελετών δείχνουν ότι ο *Z. cavirostris* τρέφεται κυρίως με ωκεάνια, μεσοπελαγικά ή βαθιά βενθικά ψάρια και κυρίως κεφαλόποδα. Αυτές οι διατροφικές προτιμήσεις συνάδουν με το ότι ο ζιφιός είναι ένα υπεράκτιο, βαθιά καταδυόμενο είδος (Heyning, 1989, όπως αναφέρεται στους Santos et al., 2001). Έρευνα

στην Ιαπωνία δείχνει πως τα είδη και το μέγεθος των θηραμάτων που καταναλώνει ο ζιφιός, υποδηλώνει ότι καταδύονται συνήθως σε βάθος 300-1000μ για να αναζητήσουν την τροφή τους (Ohizumi & Kishiro, 2003; Relton C. et al., 2016).

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα ανοιχτά ύδατα των Κανάριων Νήσων υποδεικνύουν πως οι φάλαινες με ράμφος του Cuvier (*Ziphius cavirostris*) εντοπίζουν τη λεία τους μέσω ηχοεντοπισμού και αναζητούν τροφή σε μεγάλα βάθη (Tyack et al., 2006). Σε αντίθεση με την προαναφερθέντα μελέτη στην Ιαπωνία, στη συγκεκριμένη έρευνα των Κανάριων Νήσων, το μέγιστο καταγεγραμμένο βάθος κατάδυσης ήταν 1888μ (Tyack et al., 2006). Οι μέσες καταδύσεις αναζήτησης τροφής έφταναν σε βάθος 1.070μ., γεγονός που καταδεικνύει τη στενή οικολογική εξάρτηση του είδους από τα βαθιά θαλάσσια οικοσυστήματα (Santos et al., 2001; Tyack et al., 2006).

Όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, το μέγιστο καταγεγραμμένο μήκος για ενήλικα άτομα (αρσενικά και θηλυκά) φτάνει τα 7 μέτρα, ενώ το μέσο μήκος ενηλίκου υπολογίζεται περίπου στα 6 μέτρα (Heyning, 1989; MASAHARU NISHIWAKI* AND NOBUO OGURO, n.d.).

1.2 Παράσιτα, βακτήρια και ιοί

1.2.1 Παράσιτα που προσβάλλουν τον ζιφιό

Τα θαλάσσια θηλαστικά προσβάλλονται από διάφορους έλμινθες, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται ακανθοκέφαλοι, κεστώδεις, νηματώδεις και διγενείς τρηματώδεις (Aznar et al., 2002). Ορισμένα από τα παράσιτα αυτά είναι ικανά να προκαλέσουν σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσουν ακόμη και στο θάνατο του ξενιστή. Σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας που εξετάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, το παράσιτο που

έχει καταγραφεί με τη μεγαλύτερη συχνότητα στον ζιφιό (*Ziphius cavirostris*) είναι το ενδοπαράσιτο του γένους *Crassicauda*, με το είδος *C. anthonyi* να αποτελεί το πλέον συχνά αναφερόμενο.

Σε μελέτη που διεξήχθη στη Βραζιλία (Febronio et al., 2021a), αναλύθηκαν τρία άτομα ζιφιού (*Ziphius cavirostris*) τα οποία εκβράστηκαν σε τρεις διαφορετικές τοποθεσίες της χώρας σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Στα δείγματα εντοπίστηκε, βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών, το νηματώδες παράσιτο του γένους *Crassicauda*. Η μοριακή ταυτοποίησή του έδειξε ότι σε δύο από τα τρία δείγματα επρόκειτο για το είδος *C. anthonyi*, παρουσιάζοντας 100% γενετική ταυτοσημία με αντίστοιχα δείγματα από την Ιταλία (GenBank: MK631888/MK631889).

Σε επόμενη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στα Κανάρια Νησιά, το νηματώδες *Crassicauda* εμφανίστηκε με την υψηλότερη συχνότητα στο *Ziphius cavirostris*, καταγράφοντας παρουσία σε ποσοστό 100%. Το είδος *C. anthonyi* ταυτοποιήθηκε και στα οκτώ δείγματα ζιφιού που εξετάστηκαν. Επιπλέον, καταγράφηκε η παρουσία του κεστώδους *Clistobothrium delphini* (ή *Phyllobothrium delphini*), σε έξι από τα οκτώ δείγματα. Το νηματώδες παράσιτο *Anisakis sp.* εντοπίστηκε σε τρία από τα οκτώ δείγματα, υποδεικνύοντας επίσης σχετική συχνότητα εμφάνισης (Suárez-González et al., 2025).

Τα νηματώδη παράσιτα *Anisakid* του γένους *Anisakis Dujardin 1845*, έχουν παγκόσμια εξάπλωση. Ο κύκλος ζωής τους είναι έμμεσος και περιλαμβάνει πολλαπλούς ξενιστές σε διαφορετικά επίπεδα της θαλάσσιας τροφικής αλυσίδας εξαρτώμενοι από το στάδιο ζωής του παράσιτου. Τα ενήλικα παράσιτα εντοπίζονται κυρίως σε κητώδη, ενώ τα καρκινοειδή λειτουργούν ως ενδιάμεσοι ξενιστές. Τα καλαμάρια και οι ιχθύες δρουν

ως δευτερογενείς ξενιστές (Cipriani et al., 2022). Συγκεκριμένα, έχουν αναφερθεί στο *Ziphius cavirostris*, τα είδη *Anisakis pegreffii*, *Anisakis physeteris* (Cipriani et al., 2022) και *Anisakis ziphidarum* (M. Fernández et al., 2004).

1.2.2 Βακτήρια που προσβάλλουν τον ζιφιό

Το *Citrobacter freundii* είναι ένα gram-αρνητικό εντεροβακτήριο, το οποίο μπορεί να προκαλέσει θανατηφόρα σηψαιμία τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα. Αν και σπάνια εντοπίζεται σε κητώδη, η παρουσία του έχει καταγραφεί σε ανήλικο άτομο ζιφιού (*Ziphius cavirostris*) στα Κανάρια Νησιά, σύμφωνα με μελέτη των A. Fernández et al. (2011).

Η αναγνώριση βακτηριακών λοιμώξεων σε ζώντα θαλάσσια θηλαστικά συχνά αποτελεί ένα απαιτητικό διαγνωστικό έργο. Η διενέργεια νεκροψίας, σε συνδυασμό με επιπλέον εργαστηριακές αναλύσεις, αποτελεί τον μόνο αξιόπιστο τρόπο προσδιορισμού της αιτίας θανάτου (Stroud & Roffe, 1979).

1.2.3 Ιοί που προσβάλλουν τον ζιφιό

Η πρώτη καταγεγραμμένη περίπτωση όπου άλφα ερπητοϊός σχετίζεται με σοβαρού βαθμού λεμφική νέκρωση σε άτομο ζιφιού (*Ziphius cavirostris*) καταγράφηκε από τους Arbelo et al. (2010) στα Κανάρια Νησιά. Συγκεκριμένα, σε θηλυκό άτομο ζιφιού που είχε εκβραστεί, ανιχνεύθηκε λοίμωξη από άλφα ερπητοϊό των κητωδών, η οποία συνοδευόταν από έντονες αλλοιώσεις στον σπλήνα και τους λεμφαδένες, οξεία νεκρωτική αγγειίτιδα και θρόμβωση.

Σε μεταγενέστερη μελέτη των Felipe-Jiménez et al. (2021) επίσης στα Κανάρια νησιά, επιβεβαιώθηκε ξανά η παρουσία του άλφα ερπητοϊού σε άτομο του είδους *Z.*

cavirostris. Παράλληλα, εξετάστηκε και η πιθανή παρουσία γάμμα ερπητοϊού, ωστόσο κανένα από τα δείγματα ζιφιού δεν βρέθηκε θετικό για το συγκεκριμένο είδος ιού.

Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία από τους Centelleghes et al., (2017a), ανιχνεύθηκε RNA του Dolphin Morbillivirus (DMV) σε δείγμα πνευμονικού ιστού ζιφιού. Ωστόσο, η παρουσία του ιού δεν συσχετίστηκε με παθολογικές αλλοιώσεις, γεγονός που υποδηλώνει ανενεργή λοίμωξη, χωρίς άμεση σύνδεση με την αιτία θανάτου του ζώου.

1.3 Σύγκριση ζιφιού Ατλαντικού και Μεσογείου

1.3.1 Παράσιτα στη Μεσόγειο

Μερικά παράσιτα προσβάλλουν τον οργανισμό του ζιφιού χωρίς να επηρεάζουν ζωτικά ή «ευαίσθητα» όργανα. Για παράδειγμα, μπορεί να εντοπίζονται στον λιπώδη ιστό, όπως το παράσιτο *C. delphini*, το οποίο περιγράφεται εκτενώς στη μελέτη των Suárez-González et al. (2024).

Επιπλέον, παρατηρείται με μεγάλη συχνότητα η παρουσία του είδους *Crassicauda* sp. και πιο συγκεκριμένα του *C. anthonyi*, ενώ και το *Anisakis* sp. καταγράφεται επίσης αρκετά συχνά. Σε πρόσφατη μελέτη από τους Cipriani et al. (2022), η οποία εστίασε στη μελέτη του παρασίτου *Anisakis* sp. στον ζιφιό (*Z. cavirostris*), τα είδη που καταγράφηκαν στις περιοχές του Ιονίου και του Αιγαίου ήταν τα *A. ziphidarum*, *A. phuseteris* και *A. pegreffii*.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που η συγκεκριμένη μελέτη περιλάμβανε δείγματα και από περιοχές του Βορειοανατολικού Ατλαντικού, δεν καταγράφηκε κανένα άτομο *Z. cavirostris* εκεί.

1.3.2 Παράσιτα στον Ατλαντικό

Στη μελέτη των Colón-Llavina et al. (2009), η οποία εστίασε στην παρουσία παρασίτων σε θαλάσσια θηλαστικά της περιοχής της Καραϊβικής, διαπιστώθηκε ότι το *C. anthonyi* εμφανίζεται με εξίσου μεγάλη συχνότητα όπως και στις περιοχές της Μεσογείου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε το παράσιτο *A. ziphidarum*, ενώ καταγράφηκαν επίσης και τα *P. delphini* και *Monorygma Grimaldi*.

Μια πιο πρόσφατη μελέτη των Febronio et al. (2021a) εστίασε συγκεκριμένα στο ζιφιό (*Z. cavirostris*). Η μελέτη ανέδειξε πως τρία άτομα ζιφιού, τα οποία βρέθηκαν σε περιοχές της Βραζιλίας, βρέθηκαν παρασιτισμένα από *C. anthonyi*, ενώ ακόμη είτε από *Anisakis sp.* ή *P. delphini*.

1.4 Τα είδη του *Crassicauda*, ξενιστές και κύκλος ζωής

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται ερευνητικές εργασίες που αναφέρονται στα διάφορα είδη του γένους *Crassicauda*, με έμφαση στα όργανα που παρασιτούν, στους ξενιστές τους, καθώς και σε ενδεχομένους συσχετισμούς με οικολογικά και ωκεανογραφικά χαρακτηριστικά των περιοχών όπου έχουν καταγραφεί.

Συγκεκριμένα, έχουν περιγραφεί αρκετά είδη του γένους, όπως τα *Crassicauda boopis*, *C. anthonyi*, *C. gilikiana*, *C. grampicola*. Κάθε ένα παρουσιάζει προτίμηση για διαφορετικά όργανα του θαλάσσιου θηλαστικού-ξενιστή, όπως τα νεφρά, τα αγγεία, ή τον ακουστικό πόρο.

1.4.1 *Crassicauda boopis* Baylis, 1920

Το *Crassicauda boopis* είναι ένα μεγάλο νηματώδες παράσιτο της οικογένειας *Tetrameridae*, με μήκος που φτάνει περίπου τα 1,5-2 μέτρα. Προνύμφες του έχουν ανιχνευθεί στα ούρα μολυσμένων ζώων, γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία ενεργού

κύκλου ζωής στο ουροποιητικό σύστημα του ξενιστή (Lambertsen, 1985; Lempereur et al., 2017a).

Από τις γνωστές λοιμώξεις που προκαλούνται από νηματώδεις του γένους *Crassicauda*, οι λοιμώξεις από *C.boopis* θεωρούνται ιδιαίτερα παθογόνες, καθώς έχει συσχετιστεί με φλεγμονώδη βλάβη και δυσλειτουργία των νεφρών. Επιπλέον, έχει εντοπιστεί και στο κυκλοφορικό σύστημα (Lambersten, 1992).

Το *C. boopis* παρατηρείται κυρίως στην πτεροφάλαινα (*Balaenoptera physalus*), στην οποία έχει καταγραφεί ως ιδιαίτερα παθογόνο (Lambertsen, 1985; Marcer et al., 2019). Παρότι υπάρχουν μεμονωμένες αναφορές σε άλλες φάλαινες (*Mysticeti*), η πτεροφάλαινα αποτελεί τον βασικό ξενιστή του είδους.

Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, το είδος *C. boopis* έχει καταγραφεί σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, με κοινό ξενιστή την πτεροφάλαινα (*B. physalus*). Συγκεκριμένα, στη μελέτη των Lempereur et al. (2017a), τεκμηριώνεται η παρουσία του παρασίτου στο Βόρειο Ατλαντικό. Επιπλέον, στη μελέτη των Marcer et al. (2019), το ίδιο είδος καταγράφηκε σε πτεροφάλαινα στις ακτές της Ιταλίας, επιβεβαιώνοντας έτσι και την παρουσία του στη Μεσόγειο.

1.4.2 *Crassicauda anthonyi* Chabaud, 1962

Παρόμοια παθογένεια με το *C. boopis*, έχει παρατηρηθεί και στο *C. anthonyi*, το οποίο συναντάται κυρίως σε ζιφιοειδή (*Cuvier's beaked whales*) (Marcer et al., 2019). Το είδος *C.anthonyi* μπορεί να προκαλέσει κοκκιωματώδη φλεγμονή στους νεφρούς, οδηγώντας σε διάφορους βαθμούς νεφρικής δυσλειτουργίας. Σε σοβαρές περιπτώσεις, οι λοιμώξεις αυτές ενδέχεται να εξελιχθούν σε χρόνια νεφρική νόσο, διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη και πολυοργανική ανεπάρκεια (Suárez-González et al., 2025).

Το *C. anthonyi* περιγράφηκε αρχικά βάσει δειγμάτων που συλλέχθηκαν από νεφρούς ζιφιοειδούς του είδους *Mesoplodon mirus* (*True's beaked whale*), στα ανοιχτά του Ατλαντικού, κοντά στις ακτές της Γαλλίας (Chabaud, 1962). Έκτοτε, έχει αναφερθεί σε ζιφιούς (*Ziphius cavirostris*) από τα Κανάρια Νησιά, την Κόστα Ρίκα, την Αυστραλία και το Πουέρτο Ρίκο, καθώς και σε πτεροφάλαινες στη Μεσόγειο θάλασσα (Febronio et al., 2021a).

Φυλογενετικές μελέτες δείχνουν ότι το *C. anthonyi* αποτελεί διακριτό είδος, συγγενικά κοντινό με το *C. giliakiana*. Τα δύο είδη παρουσιάζουν μορφολογικές ομοιότητες (Araki et al., 1994) και εντοπίζονται κυρίως στους νεφρούς οδοντοκήτων (Colón-Llavina et al., 2009; Suárez-González et al., 2025).

1.4.3 *Crassicauda giliakiana* Skrjabin & Andreeva, 1934

Όπως αναφέρθηκε, το είδος *C. giliakiana*, παρουσιάζει έντονες μορφολογικές ομοιότητες και κοινό όργανο προσβολής με το *C. anthonyi*. Το *C. giliakiana* έχει καταγραφεί σε μέλη της οικογένειας *Ziphiidae*, περιλαμβανομένων των *Mesoplodon stenjeri*, *Berardius bairdii* και *Ziphius cavirostris* (Kumagai et al., 2023), αλλά ακόμη και *Delphinapterus leucas* (Burek-Huntington et al., 2015).

Η γεωγραφική κατανομή του είδους φαίνεται να περιορίζεται στον βόρειο Ειρηνικό, καθώς οι περισσότερες καταγραφές προέρχονται από τα ύδατα της Ιαπωνίας. Η απουσία του από τη Μεσόγειο θάλασσα πιθανόν να σχετίζεται με την εξειδίκευσή του σε ξενιστές ανοικτών ωκεάνιων περιοχών, όπως το *Mesoplodon stenjeri*, είδος που απαντάται αποκλειστικά στον βόρειο Ειρηνικό (Kumagai et al., 2023).

1.4.5 *Crassicauda grampicola* Johnston & Mawson, 1939

Το *C. grampicola* είναι γνωστό ότι παρουσιάζει έντονη προτίμηση στον ξενιστή *Grampus griseus*, προσβάλλοντας κυρίως τους πτερυγοειδείς αεροφόρους σάκους (pterygoid sacs), όπου προκαλεί τοπική φλεγμονή, συμβάλλοντας έτσι πιθανώς σε εκβρασμούς (Suárez-González et al., 2024).

Επιπλέον, το παράσιτο αποικίζει ιστικές δομές του κρανίου, περιλαμβανομένων νευρικών στοιχείων, όπως το αιθουσαίο-κοχλιακό νεύρο (Suárez-González et al., 2025).

Η γεωγραφική του εξάπλωση είναι στη Μεσόγειο καθώς υπάρχουν αναφορές στα Κανάρια Νησιά, Αδριατική Θάλασσα αλλά και συχνά αναφερόμενο σε μελέτες στην Ιαπωνία (Marcer et al., 2019; Suárez-González et al., 2024).

1.4.6 Κύκλος ζωής

Όλα τα είδη του γένους *Crassicauda* φαίνεται να μοιράζονται παρόμοιο βιολογικό κύκλο. Τα ενήλικα νηματώδη εκκρίνουν τα αυγά τους μέσω της ουροποιητικής οδού του ξενιστή (Kumagai et al., 2023; Marcer et al., 2019). Τα αυγά αυτά προσλαμβάνονται από ενδιάμεσους ξενιστές, πιθανώς κεφαλόποδα, στους οποίους αναπτύσσονται οι μολυσματικές προνύμφες. Η μόλυνση των τελικών ξενιστών, που είναι τα κητώδη, πραγματοποιείται μέσω τροφικής αλυσίδας, δηλαδή κεφαλόποδα κ.α. (Díaz-Delgado et al., 2016; Marcer et al., 2019). Παρόλα αυτά, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ενδομήτριας (διαπλακουντιακής) μετάδοσης (Kot et al., 2022; Lambersten, 1992; Lempereur et al., 2017b). Επιπλέον, η μετανάστευση των προνυμφών μέσω των αιμοφόρων αγγείων μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αγγειακές βλάβες, επιβαρύνοντας περαιτέρω την υγεία των προσβεβλημένων ζώων (Díaz-Delgado et al., 2016; Febronio et al., 2021a).

Από τα είδη, μόνο τα *C. anthonyi* και *C. giliakiana* διαθέτουν σπερματοδόχους αγωγούς (Dollfus 1966, όπως αναφέρεται στους (Jabbar et al., 2015), γεγονός που καθιστά τον κύκλο ζωής τους πιο δύσκολο στην αναζήτηση.

1.5 Φυλογενετικές αναλύσεις του γένους *Crassicauda*

Μελέτες προσπαθούν να αποσαφηνίσουν τη συστηματική ταξινόμηση και την εξελικτική συγγένεια μεταξύ των ειδών του γένους. Μοριακοί δείκτες, όπως τα γονίδια COX1 και ITS2, για την ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των ειδών, χρησιμοποιήθηκαν σε πρόσφατες μελέτες. Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι η μοριακή ταυτοποίηση των ειδών αποδίδει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται για ενίσχυση τα γονίδια COX1 και ITS2 (Febronio et al., 2021a; Kumagai et al., 2023; Suárez-González et al., 2025). Στην πραγματικότητα, μόνο δύο είδη ενηλίκων *Crassicauda* έχουν ταυτοποιηθεί μοριακά σε ζιφίο παγκοσμίως βάσει των γονιδίων COX1 και ITS2: *C. giliakiana* και *C. anthonyi*.

Σε πρόσφατη μελέτη στα Κανάρια Νησιά που εστίασε στην ταυτοποίηση του *C. anthonyi*, μέσω της μοριακής ανάλυσης των γονιδιακών περιοχών COX1 και ITS2, επιτεύχθηκε σαφής φυλογενετική διαφοροποίηση του είδους από τα συγγενικά γένη *Crassicauda* (Suárez-González et al., 2025). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας επιβεβαίωσαν ότι το *C. anthonyi* συγκροτεί ένα διακριτό φυλογενετικό κλάδο. Αναλυτικότερα, βάσει του γονιδίου COX1, παρατηρείται έντονη φυλογενετική διαφοροποίηση μεταξύ του είδους *C. anthonyi* και τα υπόλοιπα είδη *Crassicauda* που αναλύθηκαν στη μελέτη εκείνη. Αντίθετα, βάσει του γονιδίου ITS2 παρατηρείται εξίσου μια διακριτή διαφοροποίηση των ειδών, με τη διαφορά όμως ότι τα είδη *C. anthonyi* και *C. giliakiana* σχηματίζουν έναν κοινό κλάδο, γεγονός που υποδηλώνει στενή φυλογενετική συγγένεια.

Σε μία ακόμη μελέτη της Μεσογείου που είχε ως στόχο τον εμπλουτισμό της γενετικής βάσης δεδομένων των ειδών του γένους *Crassicauda*, ανέδειξε πως χρησιμοποιώντας το γονίδιο ITS2 για αλληλούχιση, όλα τα δείγματα του είδους *C. grampicola* και *C. anthonyi* εμφάνισαν ταυτόσημες αλληλουχίες, κατηγοριοποιώντας επίσης ξεχωριστά σε δύο διακριτές ομάδες το *C. boopis*. Αντίθετα, βάσει του γονιδίου COX1, τα είδη *C. anthonyi* και *C. grampicola* εναλλάσσονταν σε δύο ανεξάρτητους κλάδους, οι οποίοι περιλάμβαναν ταυτόσημες αλληλουχίες. Η δημιουργία του διακριτού υποκλάδου που περιλαμβάνει αποκλειστικά το είδος *C. giliakiana*, υποδηλώνει πως και τα τρία είδη μεταξύ τους έχουν κοινή εξελικτική καταγωγή (Marcer et al., 2019).

1.6 Στόχος εργασίας

Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο την μοριακή ταυτοποίηση του παρασίτου *Crassicauda* που απομονώθηκε από τους νεφρούς ενός ζιφιού (*Ziphius cavirostris*), ύστερα από τον εκβρασμό του στη Βουλιαγμένη το 2022. Η εργασία στοχεύει στη διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών του γένους *Crassicauda*, καθώς και στην ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας τους μέσω του γονιδίου ITS2.

Βάσει των διαθέσιμων πληροφοριών και των μοριακών ενδείξεων, αναμένεται ότι το παράσιτο που θα εντοπιστεί στην παρούσα μελέτη ανήκει στο είδος *C. anthonyi*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε η παρουσία του νηματώδους παρασίτου του γένους *Crassicauda*. Ο ξενιστής ήταν ραμφοφάλαινα του είδους *Ziphius cavirostris*, η οποία ανήκει στην οικογένεια *Ziphiidae*. Το παράσιτο συλλέχθηκε από άτομο ζιφιού (*Z. cavirostris*) που βρέθηκε νεκρό το 2022 στη θαλάσσια περιοχή της Βουλιαγμένης. Το άτομο ήταν ελλιποβαρές σε σχέση με το αναμενόμενο βάρος για το μήκος και την ηλικία του. Κατά τη νεκροτομή διαπιστώθηκε ότι το στομάχι του ήταν πλήρως άδειο, γεγονός που υποδηλώνει παρατεταμένη νηστεία ή αδυναμία σίτισης.

Κατά τη διαδικασία της νεκροψίας, πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική παρατήρηση και οι νεφροί διαχωρίστηκαν σε επιμέρους τμήματα. Τα νηματώδη εντοπίστηκαν και αποσπάστηκαν από την επιφάνεια των τεμαχισμένων νεφρών. Το δείγμα του παρασίτου (*Crassicauda* sp.) διατηρήθηκε σε διάλυμα αιθανόλης 70% για περαιτέρω ανάλυση.

2.1 Εξαγωγή DNA

Για τη μοριακή ανάλυση, η απομόνωση DNA, πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό κιτ DNeasy® Blood & Tissue Kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (QIAGEN, 2016). Η διαδικασία ξεκίνησε με τον τεμαχισμό του παρασίτου *Crassicauda* σε τέσσερα τμήματα μήκους 0,4-0,6cm, προκειμένου να πραγματοποιηθούν τέσσερις ανεξάρτητες δοκιμές και να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα πειραματικού σφάλματος. Κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε 1,5ml σωληνάριο τύπου Eppendorf 180μl Buffer ATL και 20μl πρωτεϊνάση K. Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν ολονύχτια σε υδατόλουτρο μέχρι την πλήρη λύση του ιστού. Έπειτα, προστέθηκαν 200μl Buffer AL, πραγματοποιήθηκε πλήρης ανάμειξη και ακολούθησε δεύτερη επώαση στους 56°C για 10'. Προστέθηκαν

200μl αιθανόλης (96-100%) και το κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε ειδικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες, σχεδιασμένους για την απομόνωση του DNA- (DNeasy Mini spin column) χωρητικότητας 2ml. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση στις 8.000rpm για 1 λεπτό. Προστέθηκαν 500μl Buffer AW1, ακολουθούμενο από φυγοκέντρωση στις 8.000 rpm για 1 λεπτό. Οι στήλες μεταφέρθηκαν σε νέους σωλήνες συλλογής και προστέθηκαν 500μl Buffer AW2, επαναλαμβάνοντας τη φυγοκέντρωση στις 14.000rpm για 3 λεπτά. Το σωληνάριο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα συλλογής χωρητικότητας 1,5-2ml. Τέλος, για την τελική συλλογή του DNA, προστέθηκαν 200μl Buffer AE στις στήλες, οι οποίες αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C) για 1 λεπτό. Ακολούθησε τελική φυγοκέντρωση στις 8.000rpm για 1 λεπτό και το καθαρό DNA συλλέχθηκε.

2.1.1 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση του DNA

Είναι σημαντικό η επιβεβαίωση της καταλληλότητας του DNA που απομονώθηκε πριν τις περαιτέρω αναλύσεις.

ΥΛΙΚΑ

- Αγαρόζη
 - TBE 1X
 - Midori green
 - Χρωστική
 - Ladder
1. Διάλυση 0,8gr αγαρόζης σε 100mL διαλύματος ηλεκτροφόρησης (1X TBE) σε κωνική φιάλη, με θέρμανση στους 100°C.
 2. Ψύξη του διαλύματος, προσθήκη 2,5gr midori green και ανάδευση.

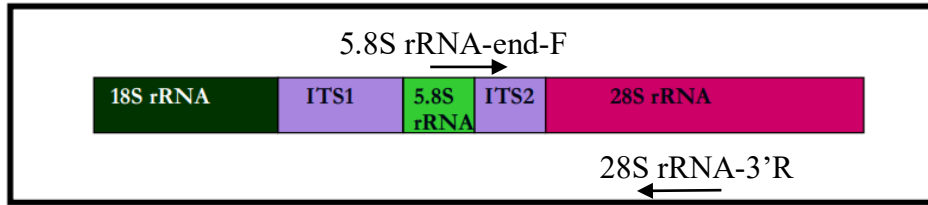
3. Τοποθέτηση του διαλύματος στα ειδικά εκμαγεία ηλεκτροφόρησης όπου τοποθετούνται και τα ειδικά χτενάκια ηλεκτροφόρησης, τα οποία θα επιτρέψουν το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης του DNA στο πήκτωμα (πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης), όταν το πήκτωμα στερεοποιηθεί.
4. Πολυμερισμός του πηκτώματος σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 λεπτά.

Το προϊόν της απομόνωσης του DNA υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, προκειμένου να αξιολογηθεί η ποσότητα και η ποιότητα του DNA (Green & Sambrook, 2012). Για την προετοιμασία του δείγματος, σε κάθε πηγαδάκι της αγαρόζης προστέθηκαν 5μL του απομονωμένου DNA και 2μL χρωστικής φόρτωσης (loading dye). Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, το DNA -λόγω του αρνητικού φορτίου- μετακινείται προς το θετικό πόλο του ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφόρηση περιλάμβανε συνολικά τέσσερα πηγαδάκια για τα δείγματα DNA και μία θέση για τον δείκτη μοριακού βάρους (DNA ladder), που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για την εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA (Εικ. 5) (Green & Sambrook, 2012).

2.2. Ενίσχυση της περιοχής ITS2 με τη χρήση PCR

Η ενίσχυση της ITS2 περιοχής του rDNA από γονιδιωματικό DNA του παρασίτου, πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Το ριβοσωμικό γονίδιο ITS2 (Internail Transcribed Spacer) δεν είναι μόνο ένας από τους πιο σημαντικούς δείκτες στη μοριακή συστηματική, αλλά χρησιμοποιείται επίσης στη γραμμωτή κωδικοποίηση ειδών και στις τεχνολογίες συστοιχιών DNA. Η έρευνα των τελευταίων 20 ετών έχει επικεντρωθεί κυρίως στην αξιοποίηση των αλληλουχιών ITS2 για τη φυλογενετική ανακατασκευή (Álvarez &

Wendel, 2003; Coleman, 2003). Έτσι, επιλέχθηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές και συγκεκριμένα: α) 5.8S rRNA-end-F και β) 28S rRNA-3'R.



Εικόνα 4: Θέσεις εκκινητών

Συγκεκριμένα, η PCR πραγματοποιήθηκε με ένα σύνολο εκκινητών (5.8S rRNA-end-F, 5'-CGTCAGGTGATTTTGTTCGC-3', 28SrRNA-3'R, 5'TCTCGCGCCAATAATTTGCT-3') που ενισχύουν την περιοχή ITS2.

Πίνακας 2: Οι θέσεις των εκκινητών, με τις αντίστοιχες βάσεις αλληλουχιών

Θέση εκκινητή Αλληλουχία

28S rRNA-3'R	TCTCGCGCCAATAATTTGCT
5.8S rRNA-end-F	CGTCAGGTGATTTTGTTCGC

Η ενίσχυση του ITS2 πραγματοποιήθηκε με PCR τελικού όγκου 20μl. Από τα 4 δείγματα της ηλεκτροφόρησης του DNA μόνο 1 είχε αρκετή ποσότητα DNA για να συνεχιστεί το πείραμα.

Πίνακας 3: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR

Αντιδραστήριο Ποσότητα ανά δείγμα

Αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό	9μl
GoTaq(G2, Promega)	8μl
Εκκινητής I (28S3'R)	1μl

<i>Εκκινητής II (5.8S-end-F)</i>	1μl
<i>DNA</i>	1μl
<i>Τελικός όγκος</i>	20μl

Η ενίσχυση του DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο gradient PCR προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης για τους εκκινητές (primers) (Dieffenbach C.W. & Dveksler G.S., 1995). Οι συνθήκες της θερμικής κλιμάκωσης περιλάμβαναν σε πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης: συνίσταντο σε αρχική θερμοκρασία 48,2°C- 51,1°C- 54,8°C- 57,9°C και 60°C, σε διαδοχικές αντιδράσεις PCR, σε 30 κύκλους.

Από το ένα ικανό δείγμα DNA που κρίθηκε κατάλληλο για ανάλυση, δημιουργήθηκαν πέντε ισομεγέθη σε μl δείγματα, καθώς και ένα επιπλέον δείγμα λειτουργώντας ως αρνητικός (τυφλός) μάρτυρας, χωρίς πρότυπο DNA, ώστε να επιβεβαιωθεί η απουσία επιμόλυνσης και η αξιοπιστία της διαδικασίας. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε διάστημα της 1 ώρας και 55 λεπτών.

2.2.1 Δημιουργία αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

ΥΛΙΚΑ

- Αγαρόζη
 - T.B.E. BUFFER 1X
 - Midori green
1. Διάλυση 1,2gr αγαρόζης σε 100ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης (1X TBE) σε κωνική φιάλη, με θέρμανση στους 100°C.
 2. Ψύξη του διαλύματος, προσθήκη 2,5gr midori green και ανάδευση.

3. Τοποθέτηση του διαλύματος στα ειδικά εκμαγεία ηλεκτροφόρησης όπου τοποθετούνται και τα ειδικά χτενάκια ηλεκτροφόρησης, τα οποία θα επιτρέψουν το σχηματισμό θέσεων των προϊόντων ενίσχυσης της PCR σε πήκτωμα (πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης), όταν το πήκτωμα στερεοποιηθεί.
4. Πολυμερισμός του πηκτώματος σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 λεπτά.

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φωτογραφήθηκε με UV συσκευή (MiniBIS, DNR Bio-Imaging System Ltd., Jerusalem, Israel) (Εικ. 6). Η αλληλουχία προσδιορίστηκε μέσω του αναλυτή DNA ABI PRISM® 3700 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) και ύστερα έγινε σύγκριση της αλληλουχίας στο BLAST (NCBI) (Altschul et al., 1990).

2.3 Φυλογενετική ανάλυση

Για τη διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων, εφαρμόστηκε η Μπεϋζιανή μέθοδος συμπερασμάτων (*Bayesian inference*) μέσω του λογισμικού *MrBayes* v. 2.01 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). Στην ανάλυση εξετάστηκαν οι πιθανοί φυλογενετικοί «χώροι», δηλαδή οι διαφορετικοί τρόποι διαμόρφωσης των δέντρων, χρησιμοποιώντας τέσσερις αλυσίδες Markov: μία «κρύα» και τρεις «θερμές» με αυξανόμενη θερμοκρασία, ρυθμισμένη στο 0,20. Για την ανάλυση των αλληλουχιών επιλέχθηκε το Γενικευμένο Μοντέλο Αντικατάστασης Νουκλεοτιδίων (GTR), το οποίο ενσωματώνει κατανομή gamma ώστε να λαμβάνεται υπόψη η ετερογένεια του ρυθμού μεταλλάξεων ανά θέση (Yang, 1994). Η διαδικασία ξεκίνησε με τη χρήση τυχαίων αρχικών δέντρων και επαναλήφθηκε για 1.000.000 γενιές, με δειγματοληψία κάθε 100 γενιές. Το burn-in ορίστηκε στο 25%, δηλαδή το αρχικό 25% των δειγμάτων εξαιρέθηκε από την τελική ανάλυση ώστε να διασφαλιστεί η σταθερότητα της εκ των υστέρων κατανομής.

Για την εκτίμηση της γενετικής απόκλισης μεταξύ των ειδών, υπολογίστηκε ο αριθμός των μεταλλάξεων ανά θέση αλληλουχίας, με εφαρμογή της διόρθωσης δύο παραμέτρων κατά Kimura (K2P) στο λογισμικό MEGA4 (Tamura et al., 2007). Η μεταβλητότητα του ρυθμού αντικατάστασης μεταξύ των θέσεων προσομοιώθηκε με κατανομή gamma.

Η φυλογενετική ανάλυση τους γένους *Crassicauda* βασίστηκε σε δεδομένα προηγούμενων μελετών και πραγματοποιήθηκε με αλληλουχίες από την περιοχή ITS2 (Πίν. 3). Οι αλληλουχίες αντλήθηκαν από το GenBank (NCBI), ενώ οι απαραίτητες πολλαπλές ευθυγραμμίσεις εκτελέστηκαν μέσω του MEGAX (Kumar et al., 2018). Τα φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν, επεξεργάστηκαν και οπτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού FigTree (v1.4.4.4) (Rambaut, 2018).

Πίνακας 4: Δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για τις φυλογενετικές αναλύσεις από το NCBI

Ταξινομική κατάταξη Αριθμοί πρόσβασης GenBank

<i>Crassicauda boopis</i>	MK631898.1- MK631897.1- MK6318-95.1- MK631896.1- MK631894.1- MK631893.1
<i>Crassicauda grampicola</i>	MK631903.1- MK631902.1- MK631901.1
<i>Crassicauda anthonyi</i>	LC700451.2- MK631889.1- MK631888.1
<i>Crassicauda giliakiana</i>	LC700447.2- LC700453.3- LC700455.3- LC700445.2- LC700448.2- LC700446.2- LC700444.2
<i>Crassicauda sp.</i>	-
<i>Cystidicola farionis</i>	AY161296.1

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

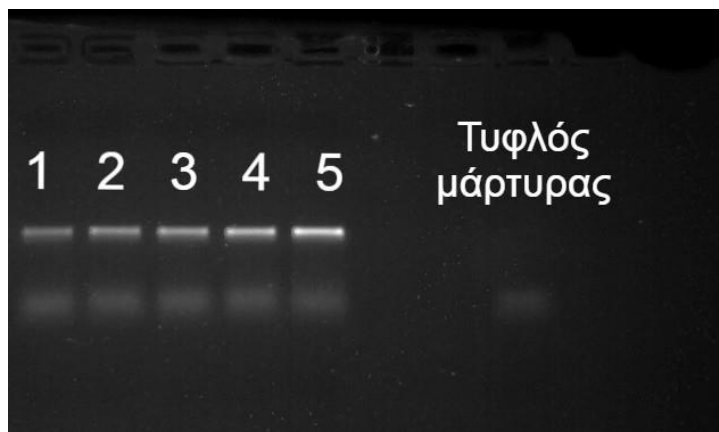
Η ηλεκτροφόρηση του DNA αποτελεί βασική μέθοδο για την εκτίμηση τόσο της ποσότητας όσο και της ποιότητας του DNA (Green & Sambrook, 2012). Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, όπου κάθε αριθμημένη θέση αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα του παρασίτου *Crassicauda sp.* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Για την εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε ο DNA ladder ως πρότυπο μοριακού βάρους.



Εικόνα 5: Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης του DNA

Στην παρακάτω εικόνα, η πρώτη ζώνη αντιστοιχεί στον τυφλό (αρνητικό) μάρτυρα, με τον οποίο επιβεβαιώνεται η απουσία επιμόλυνσης και η αξιοπιστία της

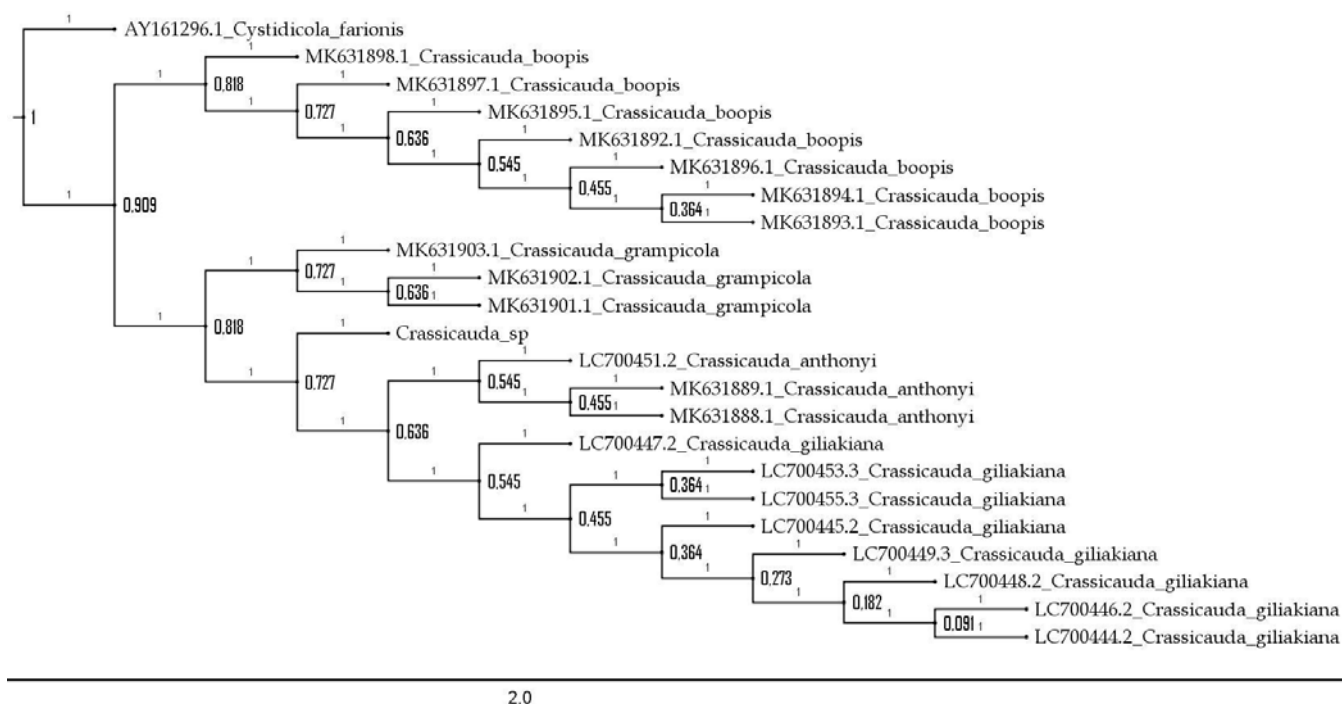
διαδικασίας . Στις υπόλοιπες λωρίδες παρατηρούνται σαφείς ζώνες DNA, γεγονός που υποδεικνύει επιτυχή ενίσχυση μέσω PCR στα περισσότερα δείγματα.



Εικόνα 6: Αποτελέσματα PCR μέσω ηλεκτροφόρησης

Η αλληλουχία του *Crassicauda sp.* είχε μήκος 351bp. Η ανάλυση BLAST μέσω του NCBI GenBank έδειξε 97,16% ομοιότητα με το είδος *Crassicauda anthonyi*. Για τη φυλογενετική ανάλυση, κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό δέντρο με τη χρήση της Μπεϋζιανής μεθόδου (Εικ. 7), βασισμένο σε είκοσι αλληλουχίες *Crassicauda*, μία αλληλουχία του εξωτερικού είδους αναφοράς *Cystidicola farionis* και την υπό μελέτη αλληλουχία του είδους *Crassicauda sp.* Οι αλληλουχίες ευθυγραμμίστηκαν μέσω του AliView, πρόγραμμα προβολής και επεξεργασίας ευθυγραμμίσεων (Larsson, 2014).

Οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ του δείγματος και των άλλων ειδών του γένους *Crassicauda sp.* παρουσιάζονται στο φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε από ανάλυση με τη Μπεϋζιανή μέθοδο των αλληλουχιών του γονιδίου. Οι τιμές στους κόμβους αντιστοιχούν στις πιθανολογήσεις της Μπεϋζιανής μεθόδου.

Πίνακας 5: Πίνακας γενετικών αποστάσεων

(A)AY161296.1_Cystidicola_farionis	(A)	(1)	(2)	(3)	(4)
(1)MK631903.1_Crassicauda_grampicola	2,373				
(2)MK631897.1_Crassicauda_boopis	2,389	0,129			
(3)Crassicauda_sp	2,395	0,135	0,151		
(4)LC700445.2_Crassicauda_giliakiana	2,342	0,082	0,098	0,073	
(5)MK631889.1_Crassicauda_anthonyi	2,354	0,094	0,110	0,047	0,032

Για την κατασκευή του πίνακα με τις γενετικές αποστάσεις, δημιουργήθηκε αρχικά ένας εκτενής πίνακας, ο οποίος περιλάμβανε όλα τα είδη που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Στη συνέχεια, για λόγους καλύτερης οπτικής κατανόησης και παρουσίασης των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε επιλογή και περικοπή των ειδών. Διατηρήθηκαν μόνο εκείνα που παρουσίαζαν τις χαμηλότερες γενετικές αποστάσεις μεταξύ τους, ώστε

να αναδειχθούν οι πιο στενές φυλογενετικές σχέσεις και να διευκολυνθεί η ερμηνεία των δεδομένων.

4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει την παρουσία του νηματώδους παρασίτου *C. anthonyi* στον ζιφιό (*Ziphius cavirostris*) που εκβράστηκε στη θαλάσσια περιοχή της Βουλιαγμένης, ενισχύοντας έτσι τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα για την ευρεία εξάπλωση και την επιλογή ξενιστή του είδους. Η χρήση της περιοχής ITS2 για την ταυτοποίηση του παρασίτου αποδείχθηκε αποτελεσματική, καθώς η αλληλουχία παρουσίασε 97,16% ομοιότητα με υπάρχουσες αλληλουχίες του *C. anthonyi* στη βάση δεδομένων GenBank. Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό με τα φυλογενετικά δεδομένα που προέκυψαν, ενισχύει σημαντικά την αξιοπιστία του ευρήματος και υποδεικνύει ότι το παράσιτο ανήκει πράγματι στο *C. anthonyi*.

Ο νεκρός ζιφιός (*Ziphius cavirostris*), ξενιστής του παρασίτου *Crassicauda anthonyi*, εντοπίστηκε στη Βουλιαγμένη. Κατά την αυτοψία, το άτομο διαπιστώθηκε ελλιποβαρές και με πλήρως άδειο στομάχι. Η κατάσταση του ξενιστή επομένως μπορεί να συνδέεται άμεσα ή έμμεσα με την παρουσία του παρασίτου. Αν και δεν αποδεικνύεται πλήρης η σχέση τους, ενισχύεται όμως η υπόθεση ότι το *Crassicauda anthonyi* ενδέχεται να συμβάλλει σε χρόνια δυσλειτουργία νεφρών, περιορισμό της φυσιολογικής κατάστασης του οργανισμού και τελικά να επέρχεται νεκρός ο οργανισμός.

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εμπορικού κιτ (QIAGEN, 2016) χρησιμοποιώντας τέσσερα ισομερή τμήματα του παρασίτου. Ωστόσο, ένα μόνο δείγμα είχε επαρκή ποσότητα και ποιότητα DNA. Τα δείγματα DNA υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης, ώστε να φωτογραφηθούν και να επιβεβαιωθεί η διαδικασία. Ο αρνητικός μάρτυρας (τυφλό δείγμα) είναι δείγμα χωρίς DNA -μόνο τα αντιδραστήρια- και αποτελεί βασικό στοιχείο πειραματικού ελέγχου για επιμόλυνση. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν έναν καθαρό τυφλό

μάρτυρα, γεγονός που αποδεικνύει την εγκυρότητα της διαδικασίας (Εικ. 5). Η ύπαρξη καθαρών ζωνών στα δείγματα αποδεικνύει επιτυχία της διαδικασίας της απομόνωσης και έτσι το καθιστά κατάλληλο για PCR..

Η ενίσχυση του DNA πραγματοποιήθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), με στόχο την ενίσχυση ITS2 περιοχής, καθώς σύμφωνα με ερευνητές τα γονίδια ITS2 και COX1 αποδίδουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα (Suárez-González et al., 2025). Από τα τέσσερα αρχικά δείγματα DNA, μόνο το ένα κρίθηκε κατάλληλο για ενίσχυση με PCR. Η PCR έγινε με τελικό όγκο 20μL. Πραγματοποιήθηκε gradient PCR και δοκιμάστηκαν πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης (48,2°C έως 60°C), ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη συνθήκη. Η εφαρμογή πέντε διαδοχικών θερμοκρασιών επέτρεψε την εύρεση της ιδανικής θερμοκρασίας συγκόλλησης των εκκινητών στο DNA, μειώνοντας πιθανές μη ειδικές ζώνες.

Τα προϊόντα της PCR φωτογραφήθηκαν ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%, με χρήση midori green για χρωματισμό και παρατηρήθηκαν υπό υπεριώδες φως (UV) (Εικ. 6). Στη λωρίδα του αρνητικού μάρτυρα δεν φάνηκε επίσης καμία ζώνη, άρα αποκλείεται η πιθανότητα επιμόλυνσης και θεωρείται αξιόπιστο το πείραμα. Στις υπόλοιπες λωρίδες παρατηρούνται έντονες ζώνες DNA, όπου δείχνουν επιτυχία την ενίσχυση της περιοχής ITS2. Το δείγμα καθίσταται πλέον κατάλληλο για αλληλούχιση και επακόλουθη φυλογενετική ανάλυση.

Η αλληλούχιση της περιοχής ITS2 απέδωσε τμήμα DNA μήκους 351bp, το οποίο υποβλήθηκε σε συγκριτική ανάλυση μέσω του BLAST (Altschul et al., 1990). Η αλληλουχία παρουσίασε 97,16% ταυτοσημία με καταχωρημένα δείγματα του είδους *C. anthonyi*, επιβεβαιώνοντας μοριακά την παρουσία του συγκεκριμένου παρασίτου στο

δείγμα που λήφθηκε από το άτομο ζιφιού (*Z. cavirostris*). Το δείγμα που βρέθηκε ταυτόσημη η αλληλουχία προερχόταν, σύμφωνα με το BLAST, από την Ισπανία. Επιπλέον, σύμφωνα με τις υπόλοιπες καταχωρημένες αλληλουχίες που ανέδειξαν υψηλό ποσοστό ταυτοσημίας και τις περιοχές που προερχόταν τα δείγματα, δείχνει πως το δείγμα σχετίζεται στενά με άλλα *C. anthonyi* δείγματα από τη Μεσόγειο και τον Ατλαντικό, ενισχύοντας τη θεωρία ευρείας εξάπλωσης του παρασίτου και την εξειδίκευσή του σε άτομα ζιφιού ως ξενιστές.

Η φυλογενετική ανάλυση του δείγματος, με χρήση της Μπεϋζιανής μεθόδου, επιβεβαίωσε με σαφήνεια την ταξινομική του τοποθέτηση εντός του είδους *C. anthonyi*. Για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιήθηκαν 4 αλυσίδες (1 κρύα, 3 θερμές), με 1.000.000 γενιές και burn-in 25%, που είναι επαρκές για σύγκλιση. Οι τιμές posterior probabilities στους κόμβους του φυλογενετικού δέντρου παρέχουν ισχυρή υποστήριξη για εξελικτικές σχέσεις (Εικ. 7). Ερμηνεύοντας το φυλογενετικό δέντρο, τα δείγματα του γένους *Crassicauda* σχηματίζουν σαφώς διακριτές ομάδες. Συγκεντρώνονται σε ξεχωριστούς κλάδους, γεγονός που υποδηλώνει γενετική συνοχή και υποστηρίζει την οριοθέτησή τους ως αυτόνομα είδη. Δεν παρατηρούνται ενδείξεις παραφυλίας ή πολυφυλίας. Το δείγμα ομαδοποιείται με άλλα *C. anthonyi* δείγματα, διακριτά από τα υπόλοιπα είδη του *Crassicauda*. Οι τιμές υποστήριξης (posterior probabilities/ bootstraps) είναι υψηλές (0,8-1,0) στους κύριους κλάδους που αντιστοιχούν σε διαφορετικά είδη, κάτι που ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων για τη διάκριση μεταξύ τους. Ωστόσο, στο εσωτερικό ορισμένων ειδών, όπως το *C. boopis*, οι τιμές είναι χαμηλές (<0,5). Αυτό δείχνει ότι η εσωτερική τοπολογία των δειγμάτων δεν είναι καλά υποστηριζόμενη, πιθανών λόγω μικρής γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών ή περιορισμένου αριθμού μοριακών χαρακτήρων που χρησιμοποιήθηκαν

στην ανάλυση. Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με το μοντέλο Kimura 2-parameter (Πίν. 4). Η απόσταση του δείγματος από τα υπόλοιπα είδη *Crassicauda* ήταν σημαντικά μεγαλύτερη, ενώ η απόσταση από το *C. anthonyi* παρέμεινε χαμηλή (0,047). Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με την επιτυχή αλληλούχιση της περιοχής ITS2, παρέχουν ισχυρή μοριακή τεκμηρίωση για την παρουσία του *C. anthonyi* στον ζιφίο που εξετάζεται σε αυτή τη μελέτη.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η γενετική απόσταση μεταξύ του δείγματος *C. anthonyi* και *C. giliakiana*, η οποία ανέρχεται μόλις σε 0,032. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πολύ στενή φυλογενετική συγγένεια μεταξύ των δύο ειδών. Αν και ταξινομούνται ως διακριτά, η μικρή γενετική τους απόσταση εγείρει το ερώτημα της εξελικτικής διαφοροποίησης. Για την πλήρη διαλεύκανση της σχέσης αυτής, απαιτείται περαιτέρω μελέτη με συνδυασμό επιπλέον μοριακών δεικτών υψηλής διακριτικής ικανότητας.

Η ανίχνευση και η ταυτοποίηση του παρασίτου *C. anthonyi*, αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην κατανόηση της σχέσης μεταξύ παρασίτου και ξενιστή σε αυτό το οικοσύστημα.

Η φυλογενετική ανάλυση της παρούσας μελέτης, συνδυαστικά με τα διαθέσιμα δεδομένα από αλληλουχίες του γένους *Crassicauda*, υποδεικνύει την ύπαρξη εξελικτικών διαφοροποιήσεων μεταξύ των ειδών, αλλά ενδεχομένως και εντός του είδους *C. anthonyi*.

Συνολικά, η συνδυαστική χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας, όπως η PCR, η αλληλούχιση ITS2 και η Μπεϋζιανή φυλογενετική ανάλυση, κατέστησαν ένα αξιόπιστο πείραμα για την ταυτοποίηση του παρασίτου *C. anthonyi* στον ζιφίο που εκβράστηκε. Η

μελέτη αναδεικνύει τη χρησιμότητα της μοριακής παρασιτολογίας όχι μόνο για διαγνωστικούς σκοπούς, αλλά και για την κατανόηση της εξελικτικής πορείας των θαλάσσιων παρασίτων.

Επιπλέον, η επιβεβαίωση της παρουσίας του *C. anthonyi* στην Ανατολική Μεσόγειο ενισχύει βιβλιογραφικά την εικόνα ενός παρασίτου με ευρεία γεωγραφική εξάπλωση και υψηλό βαθμό επιλογής στους ζιφιοειδείς ξενιστές.

Παρά τους περιορισμούς της μελέτης, όπως η χρήση ενός μόνο δείγματος και μίας μόνο γονιδιακής περιοχής (ITS2), τα ευρήματα συμβάλλουν ουσιαστικά στην κατανόηση της παρασιτικής επιβάρυνσης του *Ziphius cavirostris* στη Μεσόγειο και υπογραμμίζουν την ανάγκη για συνεχή επιτήρηση των θαλάσσιων θηλαστικών. Η ενσωμάτωση επιπλέον γενετικών περιοχών, π.χ. η COX1 και η αύξηση των αριθμών δειγμάτων θα μπορούσαν να προσφέρουν βαθύτερη κατανόηση των σχέσεων παράσιτου – ξενιστή.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Allen, B. M., Brownell, R. L., & Mead, J. G. (n.d.). *Species review of Cuvier's beaked whale, Ziphius cavirostris*.
2. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, & Lipman DJ. (1990). *BLAST: Basic local alignment search tool* [Computer software]. : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
3. Álvarez, I., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 417–434. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2)
4. Araki, J., Machida, M., & Kuramochi, T. (1994, June 22). Three Species of Crassicauda (Nematoda, Spirurida) from Cetaceans in Japanese and Adjacent Waters. *Bulletin of the National Science Museum*, 59–65.
5. Arbelo, M., Sierra, E., Esperón, F., Watanabe, T., Bellière, E., Espinosa De Los Monteros, A., & Fernández, A. (2010). Herpesvirus infection with severe lymphoid necrosis affecting a beaked whale stranded in the Canary Islands. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89, 261–264. <https://doi.org/10.3354/dao02208>
6. Aznar, F. J., Balbuena, J. A., Fernández, M., & Raga, J. A. (2002). Living Together: The Parasites of Marine Mammals. In P. G. H. Evans & J. A. Raga (Eds), *Marine Mammals* (pp. 385–423). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0529-7_11
7. Burek-Huntington, K., Dushane, J., Goertz, C., Measures, L., Romero, C., & Raverty, S. (2015). Morbidity and mortality in stranded Cook Inlet beluga whales *Delphinapterus leucas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 114(1), 45–60. <https://doi.org/10.3354/dao02839>
8. Carwardine, Mark. (1995). *Whales, dolphins, and porpoises* (1st American ed).

9. Centelleghes, C., Beffagna, G., Palmisano, G., Franzo, G., Casalone, C., Pautasso, A., Giorda, F., Di Nocera, F., Iaccarino, D., Santoro, M., Di Guardo, G., & Mazzariol, S. (2017). Dolphin Morbillivirus in a Cuvier's Beaked Whale (*Ziphius cavirostris*), Italy. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00111>
10. Chabaud, G. (1962). Description De *Crassicauda anthonyi* N. sp., Nematode parasite Renal De *Mesoplodon Mirus* True. 5, 34, 397–403.
11. Chilton, N. B. (2004). The use of nuclear ribosomal DNA markers for the identification of bursate nematodes (order Strongylida) and for the diagnosis of infections. *Animal Health Research Reviews*, 5(2), 173–187. <https://doi.org/10.1079/AHR200497>
12. Cipriani, P., Palomba, M., Giulietti, L., Marcer, F., Mazzariol, S., Santoro, M., Alburquerque, R. A., Covelo, P., López, A., Santos, M. B., Pierce, G. J., Brownlow, A., Davison, N. J., McGovern, B., Frantzis, A., Alexiadou, P., Højgaard, D. P., Mikkelsen, B., Paoletti, M., ... Mattiucci, S. (2022). Distribution and genetic diversity of *Anisakis* spp. In cetaceans from the Northeast Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. *Scientific Reports*, 12(1), 13664. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17710-1>
13. Coates, S. N., Sweeney, D. A., Falcone, E. A., Watwood, S. L., Rone, B. K., DeRuiter, S. L., Barlow, J., Dolan, K. A., Morrissey, R. P., DiMarzio, N. A., Jarvis, S. M., Andrews, R. D., & Schorr, G. S. (2024). Insights into foraging behavior from multi-day sound recording tags on goose-beaked whales (*Ziphius cavirostris*) in the Southern California Bight. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1415602. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1415602>

14. Coleman, A. W. (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, 19(7), 370–375. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00118-5)
15. Colón-Llavina, M. M., Mignucci-Giannoni, A. A., Mattiucci, S., Paoletti, M., Nascetti, G., & Williams, E. H. (2009). Additional records of metazoan parasites from Caribbean marine mammals, including genetically identified anisakid nematodes. *Parasitology Research*, 105(5), 1239. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1544-4>
16. Díaz-Delgado, J., Fernández, A., Xuriach, A., Sierra, E., Bernaldo De Quirós, Y., Mompeo, B., Pérez, L., Andrada, M., Marigo, J., Catão-Dias, J. L., Groch, K. R., Edwards, J. F., & Arbelo, M. (2016). Verminous Arteritis Due to *Crassicauda* sp. In Cuvier's Beaked Whales (*Ziphius Cavirostris*). *Veterinary Pathology*, 53(6), 1233–1240. <https://doi.org/10.1177/0300985816642228>
17. Dieffenbach C.W., & Dveksler G.S. (1995). PCR primer: A laboratory manual. In *PCR primer: A laboratory manual* /. Cold Spring Harbor Laboratory P.
18. Febronio, A. M. B., Boos, G. S., Batista, R. L. G., Amorim, D. B., Guimarães, J. P., Bianchi, M. V., Mariani, D. B., Koproski, L., Mari, C., Parente, Jociery. E. V., Sonne, L., Werneck, M. R., Marques, S. M. T., Driemeier, D., Kolesnikovas, C. K. M., Groch, K. R., Soboty, C., Verocai, G. G., Groch, K. R., & Díaz-Delgado, J. (2021a). Crassicaudiasis in three geographically and chronologically distant Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*) stranded off Brazil. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 16, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.10.010>

19. Felipe-Jiménez, I., Fernández, A., Andrada, M., Arbelo, M., Segura-Göthlin, S., Colom-Rivero, A., & Sierra, E. (2021). Contribution to Herpesvirus Surveillance in Beaked Whales Stranded in the Canary Islands. *Animals*, 11(7), 1923. <https://doi.org/10.3390/ani11071923>
20. Fernández, A., Vela, A. I., Andrada, M., Herraiz, P., Díaz-Delgado, J., Domínguez, L., & Arbelo, M. (2011). *Citrobacter freundii* Septicemia in a Stranded Newborn Cuvier's Beaked Whale (*Ziphius cavirostris*). *Journal of Wildlife Diseases*, 47(4), 1043–1046. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.4.1043>
21. Fernández, M., Aznar, F. J., Montero, F. E., Georgiev, B. B., & Raga, J. A. (2004). Gastrointestinal Helminths of Cuvier's Beaked Whales, *Ziphius cavirostris*, from the Western Mediterranean. *The Journal of Parasitology*, 90(2), 418–420. <http://www.jstor.org/stable/3286292>
22. Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed). Cold Spring Harbor laboratory press.
23. Heyning, J. E. (1989). Comparative facial anatomy of beaked whales (Ziphiidae) and a systematic revision among the families of extant Odontoceti. *Contributions in Science*, 405, 1–64. <https://doi.org/10.5962/p.226812>
24. Huelsenbeck and Ronquist. (2001). *MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny* (Version 2.01) [Bioinformatics 17:754-755].
25. Jabbar, A., Beveridge, I., & Bryant, M. S. (2015). Morphological and molecular observations on the status of *Crassicauda magna*, a parasite of the subcutaneous tissues of the pygmy sperm whale, with a re-evaluation of the systematic

- relationships of the genus *Crassicauda*. *Parasitology Research*, 114(3), 835–841.
<https://doi.org/10.1007/s00436-014-4245-6>
26. Jerdy, H., Werneck, M., Barbosa, L., Hauser-Davis, R. A., De-Oliveira-Nogueira, C. H., & Da Silveira, L. S. (2022). First report on *Phyllobothrium delphini* infection and *Crassicauda* sp. Parasitism resulting in osseous metaplasia in a Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) from the Brazilian region. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 17, 60–64.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.12.005>
27. Kot, B. C. W., Ho, H. H. N., Leung, E. K. C., Chung, T. Y. T., & Tsui, H. C. L. (2022). Characterisation of *Crassicauda fuelleborni* nematode infection in Indo-Pacific finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides*) using postmortem computed tomography. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 18, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.04.005>
28. Kovačić, I., Gomerčić, M. Đ., Gomerčić, H., Lucić, H., & Gomerčić, T. (n.d.). *Stomach contents of two Cuvier's beaked whales (Ziphius cavirostris) stranded in the Adriatic Sea.*
29. Kumagai, T., Shiozaki, A., & Tajima, Y. (2023). Molecular characterization of the parasitic nematode genus *Crassicauda*; larvae parasitic on the firefly squid and adults on beaked whales off the coast of Japan. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 20, 56–62.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.01.001>
30. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms.* [Computer software].

31. Lambersten, R. H. (1992). Crassicaudosis: A parasitic disease threatening the health and population recovery of large baleen whales: -EN- -FR- -ES-. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 11(4), 1131–1141. <https://doi.org/10.20506/rst.11.4.656>
32. Lambertsen, R. H. (1985). Taxonomy and Distribution of a Crassicauda Species (Nematoda: Spirurida) Infecting the Kidney of the Common Fin Whale (*Balaenoptera physalus* Linne, 1758). *The Journal of Parasitology*, 71(4), 485. <https://doi.org/10.2307/3281543>
33. Larsson, A. (2014). *AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets* [Computer software]. <http://ormbunkar.se/aliview/>
34. Lempereur, L., Delobelle, M., Doom, M., Haelters, J., Levy, E., Losson, B., & Jauniaux, T. (2017a). Crassicauda boopis in a fin whale (*Balaenoptera physalus*) ship-struck in the eastern North Atlantic Ocean. *Parasitology Open*, 3, e9. <https://doi.org/10.1017/pao.2017.10>
35. MacLeod, C. D., Perrin, W. F., Pitman, R., Barlow, J., Ballance, L., D'Amico, A., Gerrodette, T., Joyce, G., Mullin, K. D., Palka, D. L., & Waring, G. T. (2023). Known and inferred distributions of beaked whale species (Cetacea: Ziphiidae). *J. Cetacean Res. Manage.*, 7(3), 271–286. <https://doi.org/10.47536/jcrm.v7i3.737>
36. MacLeod, C. D., Santos, M. B., & Pierce, G. J. (2003). Review of Data on Diets of Beaked Whales: Evidence of Niche Separation and Geographic Segregation. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83(3), 651–665. <https://doi.org/10.1017/S0025315403007616h>
37. Marcer, F., Negrisolo, E., Franzo, G., Tessarin, C., Pietrobelli, M., & Marchiori, E. (2019). Morphological and molecular characterization of adults and larvae of

- Crassicauda spp. (Nematoda: Spirurida) from Mediterranean fin whales *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.06.004>
38. MASAHARU NISHIWAKI* AND NOBUO OGURO. (n.d.). *CATCH OF THE CUVIER'S BEAKED WHALES OFF JAPAN IN RECENT YEARS*.
39. Ohizumi, H., & Kishiro, T. (2003). Stomach contents of a Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) stranded on the central Pacific coast of Japan. *Aquatic Mammals*, 29(1), 99–103. <https://doi.org/10.1578/016754203101023933>
40. QIAGEN. (2016). *DNeasy® Blood & Tissue Kit* [Computer software].
41. Rambaut, A. (2018). *FigTree v1.4.4*. [Computer software]. University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
42. Relton, C., & Cockcroft, V. (n.d.). *Survey of Reproductive Data for the Beaked Whales (Ziphiidae)*.
43. Romani-Cremaschi, U., Zoppi, S., Mattioda, V., Audino, T., Marsili, L., Varello, K., Iulini, B., Marra, C., Zoccola, R., Battistini, R., Dondo, A., Garibaldi, F., Berio, E., Pautasso, A., Rosso, M., Ascheri, D., Casalone, C., Grattarola, C., & Giorda, F. (2023). *Morganella morganii* septicemia and concurrent renal crassicaudiasis in a Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) stranded in Italy. *Frontiers in Marine Science*, 9, 1058724. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1058724>
44. Santos, M. B., Pierce, G. J., Herman, J., López, A., Guerra, A., Mente, E., & Clarke, M. R. (2001). Feeding ecology of Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*): A review with new information on the diet of this species. *Journal*

- of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81(4), 687–694.
<https://doi.org/10.1017/S0025315401004386>
45. Stroud, R. K., & Roffe, T. J. (1979). CAUSES OF DEATH IN MARINE MAMMALS STRANDED ALONG THE OREGON COAST. *Journal of Wildlife Diseases*, 15(1), 91–97. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-15.1.91>
46. Suárez-González, Z., Fernández, A., Colom-Rivero, A., García-Álvarez, N., González, J. F., & Sierra, E. (2025). Morphological and molecular characterization of *Crassicauda anthonyi* in Cuvier's beaked whales from the Canary Islands. *BMC Veterinary Research*, 21(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12917-025-04585-3>
47. Suárez-González, Z., González, J. F., Arbelo, M., Sierra, E., Castro-Alonso, A., Hernández, J. N., Martín, V., Fraija-Fernández, N., & Fernández, A. (2024). Parasitic Infections in Stranded Whales and Dolphins in Canary Islands (2018–2022): An Update. *Animals*, 14(23), 3377. <https://doi.org/10.3390/ani14233377>
48. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Version 4.0) [24].
49. Tonay, A. M., Karaman, K., Dede, A., Danyer, E., Aytemiz Danyer, I., Uzun, B., Taşkaya, İ., Deval, C., Öztürk, A. A., & Bilgin, R. (2024). Genetic investigation of Cuvier's beaked whale, *Ziphius cavirostris*, along the coast of Türkiye and Northern Cyprus, based on mtDNA sequences. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 104, e14. <https://doi.org/10.1017/S0025315424000079>

50. Tyack, P. L., Johnson, M., Soto, N. A., Sturlese, A., & Madsen, P. T. (2006). Extreme diving of beaked whales. *Journal of Experimental Biology*, 209(21), 4238–4253. <https://doi.org/10.1242/jeb.02505>
51. Yang, Z. (1994). Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods. *Journal of Molecular Evolution*, 39(3), 306–314. <https://doi.org/10.1007/BF00160154>

6. ABSTRACT

This study aims at the molecular identification of the nematode parasite of the genus *Crassicauda* that was isolated from the kidneys of a Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) which stranded in the marine area of Vouliagmeni. The isolation and analysis of the genetic material was carried out using the ITS2 genetic marker, through PCR and sequencing. The resulting 351 bp sequence showed 97.16% similarity with registered samples of the species *Crassicauda anthonyi* in the GenBank database, confirming its molecular identification. The phylogenetic analysis using the Bayesian method placed the sample in a clearly distinct clade together with other *C. anthonyi* samples, reinforcing its phylogenetic differentiation from related species such as *Crassicauda boopis*, *Crassicauda grampicola*, and *Crassicauda giliakiana*. The genetic distances confirm the close relationship of the sample with *C. anthonyi*.

The results support the characterization of *C. anthonyi* as a parasite with broad geographic distribution and strong specialization in *Z. cavirostris* as its host. Despite the limitations of the study, such as the small number of samples and the analysis of only one genetic region, this work highlights the importance of molecular parasitology in understanding host-parasite relationships and in the evolutionary investigation of species within the genus *Crassicauda*.

Keywords: *Crassicauda anthonyi*, *Ziphius cavirostris*, ITS2, nematode, Mediterranean