

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“Πληθυσμιακή δομή του εδώδιμου ολοθουρίου, *Holothuria tubulosa*
(Gmelin, 1788) στο Αιγαίο Πέλαγος”**

Παλίδου Κυριακή

ΒΟΛΟΣ 2012

“Πληθυσμιακή δομή του εδώδιμου ολοθουρίου, *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788) στο Αιγαίο Πέλαγος”

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Επίκουρος Καθηγητής (Ph. D.), Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*,
- 2) **Δημήτριος Βαφείδης**, Αναπληρωτής Καθηγητής (Δρ.) , Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση - έμμεση χρησιμότητά τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*,
- 3) **Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια (M. Sc., Ph. D.), Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

*Στην οικογένεια, τους φίλους και τους καθηγητές μου
για την υποστήριξη και τη βοήθεια τους.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο για την πολύτιμη βοήθειά του/της και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ. Δημήτριο Βαφείδη και την κα. Παναγιώτα Παναγιωτάκη.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη της πληθυσμιακής δομής του εδώδιμου ολοθουρίου, *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788) στο Αιγαίο Πέλαγος βασιζόμενοι στις παραμέτρους του μήκους και του βάρους των ατόμων πέντε πληθυσμών του είδους από την περιοχή των Δωδεκανήσων (2 πληθυσμοί), του Παγασητικού Κόλπου (2 πληθυσμοί) και της Καβάλας και απομόνωση γενετικού υλικού των οργανισμών (DNA) με στόχο τη δημιουργία γενετικής βιβλιοθήκης για περαιτέρω μελέτη των πλυθησμών.

Για το σύνολο των ατόμων αλλά και για κάθε πληθυσμό χωριστά υπολογίστηκαν το εύρος των μετρήσεων (min – max), η τυπική απόκλιση (sd), η μέση τιμή (avg) και ο συντελεστής παραλλακτικότητας (CV) καθώς και η σχέση μήκους-βάρους .

Συνολικά εξετάστηκαν 81 άτομα του υπό μελέτη είδους από πέντε διαφορετικές περιοχές. Από όλα τα άτομα πήραμε μετρήσεις για το μήκος τους σε cm και για το βάρος τους σε gr. Το μέγιστο μήκος που καταγράφηκε ήταν 40,20 cm και το μέγιστο βάρος 623,25 gr Το μέγιστο μέσο μήκος παρατηρήθηκε στον πληθυσμό της Γατζέας, ενώ το γεγονός ότι τα μεγαλύτερα μέσα βάρη καταγράφηκαν στον πληθυσμό των Αλυκών οφείλεται στον αυξημένο αριθμό των εξεντερισμένων ατόμων που καταμετρήθηκαν στον πληθυσμό της Γατζέας. Το μέσο μήκος του συνόλου των ατόμων ήταν 20,84 cm ενώ το αντίστοιχο μέσο βάρος τους 210,39 gr

Κατά τη διεκπεραίωση της παρούσας Προπτυχιακής Διατριβής καθορίσαμε πρωτόκολλο απομόνωσης βασισμένη στα γνωστά πρωτόκολλα απομόνωσης DNA που χρησιμοποιούν την τεχνική φαινόλης – χλωροφορμίου ενώ για να διαπιστώσουμε την ποσότητα του DNA που υπάρχει σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήσαμε το νανόμετρο.

Με τη χρήση πιο εξελιγμένων τεχνικών μπορούμε να διαπιστώσουμε την εμφάνιση γονιδιακής ροής, δηλαδή τη μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ των πληθυσμών καθώς και να υπολογίσουμε τη γενετική απόσταση, δηλαδή το μέγεθος την ανομοιομορφίας του γενετικού υλικού των διαφορετικών αυτών πληθυσμών, καταλήγοντας έτσι σε συμπεράσματα γενικά για τη βιολογία του είδους αλλά και για τους παράγοντες διαφοροποίησης των επιμέρους πληθυσμών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Εχινόδερμα (Echinodermata).....	9
1.2 Γενικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Holothuriidae και συστηματική κατάταξη του είδους <i>Holothuria tubulosa</i>	12
1.3 Γενετικός πολυμορφισμός.....	17
1.4 Χρήση μοριακών τεχνικών και διατήρηση γενετικού υλικού.....	18
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1 Συλλογή των δειγμάτων και προετοιμασία.....	20
2.2 Απομόνωση DNA.....	23
2.3 Ανίχνευση της ποιότητας του απομονωμένου DNA.....	28
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	32
3.1 Μορφομετρική ανάλυση δεδομένων.....	32
3.2 Δεδομένα απομόνωσης DNA.....	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43
ABSTRACT.....	49
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Παρόλο που η Μεσόγειος αποτελεί μόνο το 0,8% της παγκόσμιας θαλάσσιας επιφάνειας είναι και περιοχή που χαρακτηρίζεται από έντονη αλιευτική και παράκτια δραστηριότητα. Η ποικιλία αυτή των δραστηριοτήτων προκύπτει από το ευρύ φάσμα των δομών και των εργαλείων που απαντώνται στα παράκτια της Μεσογείου καθώς και από τα 45.000 km ακτογραμμής που την περικλείουν. Τα δύο βασικά βιολογικά χαρακτηριστικά της Μεσογείου Θάλασσας είναι η πλούσια βιοποικιλότητα που τη διακρίνει η οποία έρχεται σε αντίθεση με το δεύτερο χαρακτηριστικό της που είναι τα ατροφικά νερά της (Relini, 2003).

Τα παράκτια οικοσυστήματα γενικά είναι περιοχές πλούσιες σε βιοποικιλότητα και παρέχουν πληθώρα οικονομικών ευκαιριών για τις παράκτιες κοινότητες. Αυτός είναι ένα βασικός λόγος για τον οποίο έχει δοθεί στην παράκτια ζώνη και τα είδη που φιλοξενεί ιδιαίτερη σημασία. Είναι χαρακτηριστικό ότι στην ακτή Bohol στις Φιλιππίνες ο τουρισμός και η αλιεία στην παράκτια περιοχή αντιπροσωπεύουν το 44% και 49% αντίστοιχα των συνολικών εσόδων της κοινότητας. Τα υψηλά αυτά ποσοστά όμως εκτός από τη σημαντικότητα στην εκμετάλλευση των θαλάσσιων πόρων επισημαίνουν και την αναγκαιότητα για την καλύτερη δυνατή διαχείριση και διατήρηση της παράκτιας ζώνης (Giselle et al, 2007).

Αντίστοιχα και η μελέτη των βενθικών οργανισμών συνδέεται άμεσα τόσο με την ποικιλότητα των ενδιατημάτων που απαντώνται τα προς έρευνα είδη αλλά και τις πιέσεις που δέχονται οι οικότοποι στους οποίους διαβιούν. Για να κατανοηθεί η δομή και η λειτουργία των οικοσυστημάτων αυτών απαιτούνται στοιχεία και μελέτη τόσο των ενεργητικών διαδικασιών των ειδών όπως είναι η διατροφή, η αναπαραγωγή και

η ανάπτυξη τους όσο και επαρκή ποσοτικά δεδομένα ώστε τα μοντέλα που 8^α προκύψουν να προσεγγίζουν την πραγματική λειτουργία των οικοσυστημάτων (Fedra, 1976).

1.1 Εχινόδερμα (Echinodermata)

Όλα τα Εχινόδερμα είναι θαλάσσιοι οργανισμοί. Είναι ζώα ελεύθερα ή προσκολλημένα και συναντώνται σε όλα τα βάθη και όλα και τα κλίματα (Λαζαρίδου, 1992). Τα Εχινόδερμα γενικά προτιμούν το σκληρό υπόστρωμα στο οποίο μετακινούνται με τη βοήθεια βαδιστικών ποδίσκων και ακάνθων (Lawrence, 1975).

Στο φύλο των Εχινόδεμων περιλαμβάνονται οι αχινοί, οι αστερίες, οι οφίουροι, τα κρινοειδή και τα ολοθούρια (αγγούρια της θάλασσας) (Λαζαρίδου, 1992). Υπάρχουν περίπου 7.000 είδη Εχινόδεμων τα οποία ανήκουν σε αυτές τις πέντε κλάσεις (Wray, 1999).

Στη Μεσόγειο τα Εχινόδερμα αποτελούν το 70,4% του συνολικού αριθμού των ειδών που συναντώνται. Συγκεκριμένα στη Μεσόγειο έχουν καταγραφεί δύο είδη Κρινοειδών, τριάντα τέσσερα είδη Ολοθουροειδών, είκοσι έξι είδη Αστεροειδών, είκοσι τρία είδη Οφιοουροειδών και είκοσι δύο είδη Εχινοειδών (Lawrence, 1975).

Από αυτά στην Ελλάδα συναντούμε εκατόν επτά είδη Εχινόδεμων (Pancucci, 1996)



Εικόνα 1: Το είδος *Echinaster sepositus*

Της κλάσης των Αστεροειδών

Κατά την εξέλιξη των ειδών αυτών φαίνεται ότι το πρόσθιο άκρο τους μεταμορφώθηκε οδηγώντας σε αλλαγή της συμμετρίας τους κατά 90° τοποθετώντας τελικά το πρόσθιο (στοματικό) τμήμα στα δεξιά και το οπίσθιο τμήμα (έδρα) στα αριστερά. Κατά τη διάρκεια των αλλαγών αυτών ο σκελετός των Εχινόδερμων αναπτύχθηκε για να έχει την ικανότητα να υποστηρίζει και να προστατεύει αυτά τα άμισχα ζώα (Khanna & Yadav, 2005).

Η γενική διάκριση των ειδών που περιλαμβάνονται στο φύλλο των Εχινόδερμων είναι σχετικά εύκολη κύρια λόγω των τριών ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Την παρουσία συμμετρίας, την ανάπτυξη υδροφορικών συστημάτων αλλά και την ύπαρξη του ασβεστολιθικού εξωσκελετού τους.

Το σώμα των ενήλικων ατόμων παρουσιάζει δευτερογενή ακτινοσυμμετρία και συγκεκριμένα πεντακτινωτή συμμετρία με εξαίρεση τα Ακανόνιστα Εχινόδερμα που εμφανίζουν τριτογενώς αμφίπλευρη συμμετρία αλλά και τον Ολοθουρίων που η συμμετρία τους παραμένει αμφίπλευρη όπως εμφανίζεται και στο στάδιο των προνυμφών.

Το υδροφορικό σύστημα των Εχινόδερμων αποτελείται από ένα σύστημα κλειστών σωλήνων που βρίσκεται στο εσωτερικό του σώματος τους και επικοινωνεί

με το θαλασσινό νερό μέσω της μαδρεπορικής πλάκας. Η μαδρεπορική πλάκα είναι το σημείο από το οποίο εισέρχεται το νερό της θάλασσας στο σώμα του οργανισμού. Η μαδρεπορική πλάκα είναι μια από τις νωτιαίες ασβεστικές πλάκες και ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες καθώς φέρει πολλούς και πυκνούς πόρους.

Ο ασβεστολιθικός σκελετός των Εχινόδερμων βρίσκεται κάτω από την επιδερμίδα και είναι μεσοδερμικής προέλευσης. Όπως αναφέραμε και παραπάνω αποτελείται είτε από μεμονωμένους σκληρίτες είτε από συνεχόμενα πινακίδια. Συγκεκριμένα με τη μορφή των μεμονωμένων σκληριτών εμφανίζεται στα Ολοθουριοειδή. Στα Αστεροειδή, στα Οφιουροειδή και στα Κρινοειδή τα ασβεστολιθικά πλακίδια είναι συνεχόμενα ενώ αντίστοιχα στα Εχινόειδή τα πλακίδια είναι σταθερά και ενωμένα μεταξύ τους σχηματίζοντας έτσι μια σκληρή θήκη γύρω από το σώμα του οργανισμού (Λαζαρίδου, 1992).

Η πλειοψηφία των ειδών των Εχινόδερμων είναι γονοχωριστικά και η γονιμοποίηση τους είναι εξωτερική. Η ανάπτυξη τους είναι άμεση καθώς η βλεφαριδοφόρα αμφιπλευροσυμμετρική προνύμφη μεταμορφώνεται άμεσα και αποκτά ακτινωτή συμμετρία (Λαζαρίδου, 1992). Η ασεξουαλική αναπαραγωγή και ελεύθερη διαβίωση των προνυμφών αποτελεί ένα σπάνιο φαινόμενο και έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνει σε κάποια είδη Αστεροειδών (Eaves & Palmer, 2003).

Τα Εχινόδερμα έχουν αναγνωριστεί ως καθοριστικός παράγοντας για την αφθονία και την εξάπλωση των φυτών σε αβαθή περιβάλλοντα και η σημασία τους κρίνεται καθοριστική για την δομή και την εξέλιξη των βενθικών φυτοβιοκοινωνιών (Lawrence, 1975).

Τα Εχινόδερμα είναι οργανισμοί εξαιρετικά ευαίσθητοι στις αλλαγές του περιβάλλοντος και κατά τη συλλογή τους θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με ιδιαίτερη προσοχή. Η θερμοκρασία αποτελεί καθοριστικό βιολογικό παράγοντα και η

βελτιστοποίηση της εξαρτάται από την περίοδο του έτους που έγινε η συλλογή των οργανισμών. Σε εύκρατα είδη Εχινοδέρμων έχει βρεθεί αρνητική συσχέτιση της θερμοκρασίας και της διατροφής των οργανισμών, όπως στο είδος *Strongylocentrotus droebachiensis* (Bottger et al, 2004).

Σε σειρά ερευνών έχουν απομονωθεί από είδη Εχινοδέρμων ποικιλία ενεργών βιολογικών ουσιών όπως : καρτονοειδή, γλυκολιπίδια, πορφυρίνες, δηλητήρια και άλλα. Πολλές από αυτές τις ουσίες είναι μοναδικές και απομονώνονται αποκλειστικά από είδη Εχινοδέρμων ενώ αξίζει να αναφέρουμε ότι έχει αναφερθεί και χρήση κάποιων εξ αυτών των ουσιών ως φαρμακευτικές ουσίες (Yokota, 2005). Από τις πέντε κλάσεις των Εχινοδέρμων αυτές που δέχονται τη μεγαλύτερη αλιευτική πίεση είναι οι αχινοί και τα ολοθούρια. Οι αχινοί αλιεύονται λόγω της αυξημένης ζήτησης των γονάδων τους ως ορεκτικό. Κύρια από την αγορά της Ιαπωνίας. Η εμπορική εκμετάλλευση των ολοθουρίων σχετίζεται με ένα προϊόν γνωστό ως *bêche-de-mer* το οποίο είναι ο βρασμένος και αποξηραμένος εξωσκελετός τους. Το προϊόν αυτό έχει έντονη ζήτηση κύρια στην Κίνα τόσο σαν έδεσμα όσο και για τις θεραπευτικές του ιδιότητες (Kellu, 2005).

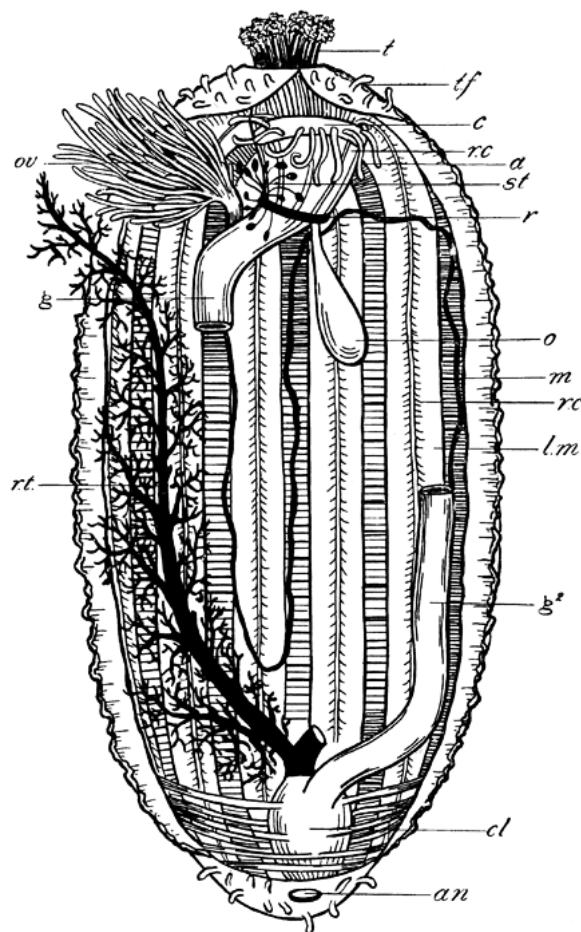
1.2 Γενικά χαρακτηριστικά της οικογένειας *Holothuriidae* και συστηματική κατάταξη του είδους *Holothuria tubulosa*



Εικόνα 2: *Holothuria tubulosa*

Η οικογένεια Holothuriidae είναι μία από τις οικογένειες θαλάσσιων αγγουριών με μεγάλο δείκτη ποικιλότητας ιδιαίτερα στα τροπικά και ρηγά νερά (O'Loughlin, 2007). Παρά την οικονομική σημασία κάποιων ειδών του γένους *Holothuria* οι παράγοντες που επηρεάζουν την οικολογία των περισσότερων ειδών δεν είναι πλήρως κατανοητή. Οι προτιμήσεις των ενδιαιτημάτων τους φαίνεται να συνδέονται με το βάθος, με το ποσοστό του οργανικού περιεχομένου του πυθμένα και με το ποσοστό χαλικιών και λεπτόκοκκων ιζημάτων στον πυθμένα. (Dissanayke & Stefenson, 2011). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε για το είδος *Parastichopus californicus* στις ακτές της Αλάσκας έδειξε ότι το είδος απαντάται τόσο σε ποικιλία πυθμένων (άμμο, βράχους, λειμώνες μακροφυκών) αλλά και σε βάθη έως 183m (Zhou & Schirley, 1996). Σύμφωνα δε με έρευνα που πραγματοποίησαν στο νησί Ischia στην Ιταλία οι Bullteel et al (1992) και με ανάλυση των μορφομετρικών χαρακτηριστικών ατόμων του είδους *Holothuria tubulosa* διαπίστωσαν ότι το βάθος και η κλίμακα μεγέθους σχετίζονται καθώς τα μικρότερα άτομα παρατηρήθηκαν στα πιο ρηγά σημεία όπως επίσης και ότι τα άτομα του είδους παρουσίαζαν καλύτερη ανάπτυξη στα σημεία όπου δεν υπάρχει έντονη αναταραχή. Η εκτεταμένη σε πολλές περιπτώσεις εκμετάλλευση ειδών της οικογένειας, όπως σε πολλές χώρες της Ασίας για μεταποίηση τους σε τοπικά εδέσματα, έχει οδηγήσει στην υπερεκμετάλλευση πληθυσμών τους (Reichenbach, 1999).

Τα Ολοθύρια ή Αγγούρια της θάλασσας έχουν επιμήκες σώμα χωρίς αγκάθια και δεν εμφανίζουν εμφανή ακτινωτή συμμετρία. Όταν ο οργανισμός ακουμπά στη μία πλευρά τότε η στοματική και αντιστοματική επιφάνεια βρίσκονται στα δύο άκρα.



Εικόνα 3: Εσωτερική δομή Ολοθουρίου

Ο ενδοσκελετός των Ολοθουρίων αποτελείται από μικροσκοπικούς ασβεστολιθικούς σκληρίτες οι οποίοι είναι διασκορπισμένοι στο σαρκώδες σώμα του. Οι πλειοψηφία των ειδών της οικογένειας των *Holothuriidae* φέρουν πέντε σειρές βαδιστικών ποδίσκων οι οποίοι εκτείνονται από το κεφάλι μέχρι και την έδρα τους. Σε κάποια ιζηματοφάγα είδη οι βαδιστικοί ποδίσκοι που υπάρχουν γύρω από το στόμα έχουν τροποποιηθεί σε διακλαδισμένους πλοκάμους που χρησιμεύουν στην πρόσληψη οργανικού υλικού από το βυθό ή για την προώθηση του ιζήματος στο στόμα. Μερικά είδη για να προσλάβουν την τροφή τους απευθείας από το νερό χώνουν ολόκληρο το σώμα τους μέσα στην άμμο ή και κρύβονται και απλώνουν τους πλοκαμούς τους (Castro & Huber, 2002). Η μεταβλητότητα και ποικιλότητα της

διαθέσιμης τροφής αποτελεί παράγοντα ελέγχου της δυναμικής των πληθυσμών όλων των βενθικών ειδών. Τα Ολοθούρια αποτελούν σημαντικό καταναλωτή και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανακύκλωση αφαίρεση θρεπτικών συστατικών από το ίζημα. Το ίζημα που καταναλώνουν αποτελείται τόσο από ανόργανες ουσίες όπως συντρίμια κελυφών και κοραλλιών όσο και από βιολογικά κατάλοιπα, μικροοργανισμούς και απεκκρίματα (Mahmoud, 2006).

Οι αμυντικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούν και οι αιφνίδιες αντιδράσεις τους όταν βρίσκονται σε κίνδυνο διαφέρουν από είδος σε είδος ενώ πολλοί από αυτούς τους μηχανισμούς είναι ιδιαίτερα καινοτόμες. Ορισμένα είδη εκκρίνουν τοξικές ουσίες ενώ κάποια άλλα είδη ελευθερώνουν κολλώδη νήματα από την έδρα για να αποτρέψουν πιθανούς θηρευτές. Μια άλλη συνηθισμένη αντίδραση κάποιων ειδών, ανάμεσα τους και το είδος *Holothuria tubulosa*, καταφεύγουν στην απότομη αποβολή του εντέρου καθώς και άλλων εσωτερικών οργάνων από το στόμα ή την έδρα. Η αντίδραση αυτή είναι γνωστή ως εξεντερισμός. Η ενέργεια αυτή πιστεύεται ότι πραγματοποιείται από το Ολοθούριο για να αποσπάει την προσοχή των θηρευτών του καθώς αν τελικά ξεφύγει αναπληρώνει το χαμένο τμήμα. (Castro & Huber, 2002).



Εικόνα 4: Εξεντερισμός Ολοθουρίου (*Holothuria tubulosa*)

Οι γονάδες των ολοθουρίων αποτελούνται από μία ομάδα ενιαίων σωληναρίων που όπως έδειξαν έρευνες για το είδος *Holothuria scabra* με τη χρήση μακροσκοπικών μελετών υπήρχε παρουσία γαμετών καθ'όλη τη διάρκεια του έτους η ποσότητα των οποίων εξαρτάται από το στάδιο ωριμότητας ενώ αυξημένη ωοτοκία παρατηρήθηκε κατά την περίοδο Σεπτέμβρη με Δεκέμβρη (Ramofafia et al, 2003). Αντίστοιχα η μελέτη της αναπαραγωγής πληθυσμού του είδους *Holothuria tubulosa* με ιστολογική και μακροσκοπική εξέταση έδωσε στοιχεία σχετικά με τα πέντε στάδια των γονάδων (στάδιο ανάκαμψης, στάδιο ανάπτυξης, στάδιο ωριμότητας, στάδιο ωοτοκίας και το στάδιο μετά-αναπαραγωγικής φάσης). Η ωοτοκία λαμβάνει χώρα τους θερινούς μήνες και κυρίως από Ιούλιο μέχρι και Σεπτέμβριο όπου η θερμοκρασία κυμαίνεται από 22°C μέχρι και 28 °C. Κατά τη φάση ηρεμίας τους μήνες Οκτώβριο με Ιανουάριο παρατηρήθηκε ότι τα άτομα δεν είχαν γονάδες (Despalatovic, 2004).

Το Ατλαντο-Μεσογειακό είδος Ολοθουρίου *Holothuria tubulosa* είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα βενθικά ασπόνδυλα της υποπαραλιακής ζώνης. Πρόκειται για ένα εδώδιμο είδος το οποίο στο Αιγαίο συγκομίζεται και χρησιμοποιείται σα δόλωμα. Στη Μεσόγειο χρησιμοποιείται τόσο σα δόλωμα αλλά και ποσότητες εξάγονται στην Ιαπωνία όπου το είδος θεωρείται γαστρονομική λιχουδιά. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης και σειρά μελετών για τη χρήση βιοδραστικών ουσιών του είδους στην καταπολέμηση φλεγμονωδών παθήσεων με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στη Μεσόγειο και στον Ατλαντικό και απαντάται σε βάθος έως και 100 m όπου και σχηματίζει συνήθως πυκνούς πληθυσμούς επιλέγοντας κύρια τα λιβάδια της Ποσειδωνίας (Kazanidhs, 2010).

Η συστηματική κατάταξη του είδους είναι η εξής :

Βασίλειο : Animalia

Φύλο : Echinodermata

Κλάση : Aspidochirotida

Οικογένεια : Holothuriidae

Γένος : *Holothuria*

Είδος : *tubulosa* (*Gmelin*) (Kazanidhs et al, 2010)

1.3 Γενετικός πολυμορφισμός

Η κληρονόμηση των γονιδίων γίνεται πάντα με βάση τους μεντελικούς κανόνες, όμως οι γονιδιακές συχνότητες που παρατηρούνται στη φύση υποδηλώνουν ότι πολλές φορές είναι και άλλοι παράγοντες που παίζουν ρόλο στη διαμόρφωσή τους που αντανακλά και την προσαρμοστικότητα του πληθυσμού. Βασικοί παράγοντες

που επηρεάζουν τις γονιδιακές συχνότητες είναι η φυσική επιλογή, η τυχαία γενετική εκτροπή, η μετανάστευση και οι μεταλλάξεις (Αλαχιώτης, 2005).

Οι μεταλλάξεις είναι η πηγή της γενετικής ποικιλότητας πάνω στην οποία δρα η φυσική επιλογή και η γενετική παρέκκλιση (εκτροπή), από την ποικιλότητα αυτή εξαρτάται η βιολογική εξέλιξη. Οι μεταλλάξεις συμβαίνουν τυχαία χωρίς να έχουν τον ίδιο βαθμό τυχαιότητας σε όλα τα μέρη του γονιδιώματος. Όλα τα γονίδια δεν μεταλλάσσονται με τον ίδιο ρυθμό, ούτε και όλες οι μεταλλάξεις είναι ισοπίθανες (Αλαχιώτης, 2007).

Οι πληθυσμοί των ψαριών έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης των μοριακών βιολόγων τα τελευταία χρόνια τόσο λόγω της υψηλής βιοποικιλότητας των οικοσυστημάτων τους όσο και λόγω των μεγάλων πληθυσμών που σχηματίζουν αλλά και της έντονης επίδρασης των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων σε αυτά τα περιβάλλοντα. Η μελέτη των πληθυσμών αυτών στοχεύει στη συλλογή στοιχείων σχετικά με τη διασπορά των άγριων πληθυσμών, τη ροή των γονιδίων, την εκτίμηση των πληθυσμών αυτών αλλά και την ανάλυση της δομής των αποθεμάτων αυτών με την ανάπτυξη των κατάλληλων τεχνικών (Carvalho & Hauser, 1998).

1.4 Χρήση μοριακών τεχνικών και διατήρηση γενετικού υλικού

Για να κατανοηθεί καλύτερα η προσαρμοστική εξέλιξη χρειάζεται πρώτα να καταγραφεί τόσο το ποιόν όσο και το ποσό της γενετικής ποικιλότητας που υπάρχει στους πληθυσμούς. Για την καταγραφή του ποσού της γενετικής ποικιλότητας είχαν αναπτυχθεί από το 1980 ακόμα μεθοδολογίες αλληλούχισης τμημάτων του DNA ύστερα από απομόνωση, θραύση με περιοριστικά ένζυμα και ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων DNA τα οποία διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Με

αυτή την διεργασία μπορούμε να εντοπίσουμε νουκλεοτιδικές διαφορές, γενετική ποικιλότητα σε περιοριστικές θέσεις μεταξύ γονιδιακών περιοχών ομόλογων χρωμοσωμάτων. Πιο ακριβής και εξελιγμένη προσέγγιση είναι η αλληλούχιση των θραυσμάτων με την αξιοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) που πολλαπλασιάζει τις ποσότητες DNA ώστε να γίνει ανάλυση του. Οι γονιδιωματικές πληροφορίες που αποκτώνται με τη μοριακή μεθοδολογία μας δίνουν συμπεράσματα για το γενότυπο, με το πώς επηρεάζεται δηλαδή ο φαινότυπος και η προσαρμοστικότητα (Αλαχιώτης, 2007).

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή των δειγμάτων και προετοιμασία

Τα δείγματα του είδους *Holothuria tubulosa* συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές του ελλαδικού χώρου. Συγκεκριμένα συλλέχθηκαν δείγματα από πέντε διαφορετικές περιοχές. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε κατά την άνοιξη του 2008 ενώ η δειγματοληψία στην περιοχή των Αλυκών στον Παγασητικό κόλπο κατά τον Οκτώβριο του ίδιου έτους. Συγκεκριμένα οι περιοχές της δειγματοληψίας ήταν:

1. Νήσος Μάραθος (Δωδεκάνησα)
2. Νήσοι Αρκοί (Δωδεκάνησα)
3. Καβάλα
4. Γατζέα (Παγασητικός κόλπος)
5. Αλυκές (Παγασητικός κόλπος)

Ενώ ο αντίστοιχος αριθμός δειγμάτων ανά δειγματοληψία δίνεται παρακάτω στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Στοιχεία δειγματοληψιών, περιοχές και αριθμός ατόμων

Περιοχές δειγματοληψιών	Αριθμός ατόμων
Μάραθος	10
Αρκοί	10
Καβάλα	17
Γατζέα	22
Αλυκές	22
Σύνολο δειγμάτων	81

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο ζωντανά σε θαλασσινό νερό. Στα δείγματα μετρήθηκε το μήκος τους σε cm με τη χρήση ιχθυόμετρου καθώς και το βάρος τους σε gr με τη χρήση ζυγού ακριβείας.

Κατόπιν αφαιρέσαμε κομμάτι του εξωσκελετού από όλο τα άτομα των πληθυσμών με τη χρήση απολυμασμένου ψαλιδιού, νυστεριού, λαβίδας και τσιμπίδας και το τοποθετήσαμε σε αποστειρωμένο μπουκαλάκι τύπου Eppendorf. Τέλος αριθμήσαμε και χωρίσαμε τα δείγματα μας ανά πληθυσμό ανά άτομο αναγράφοντας αντίστοιχο κωδικό στο καπάκι. Τα δείγματα μας τοποθετήθηκαν έπειτα σε καταψύκτη στους -24°C .

Κατόπιν έγινε στατιστική ανάλυση για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά με χρήση των εξισώσεων στο Excel 2003. Υπολογίστηκε το εύρος των μετρήσεων (min – max), η τυπική απόκλιση (sd), η μέση τιμή (avg) και ο συντελεστής παραλλακτικότητας (CV). Ο συντελεστής παραλλακτικότητας υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο : $CV\%=(sd*100)/avg$ (Zar, 1984). Εφαρμόστηκε το εκθετικό

μοντέλο $W=aL^b$ (Οικονομίδης, 2003) για να βρεθεί η συσχέτιση μεταξύ του βάρους και του μήκους των οργανισμών των πέντε πληθυσμών.



Εικόνα 5: Τοποθεσίες δειγματοληψιών

2.2 Απομόνωση DNA

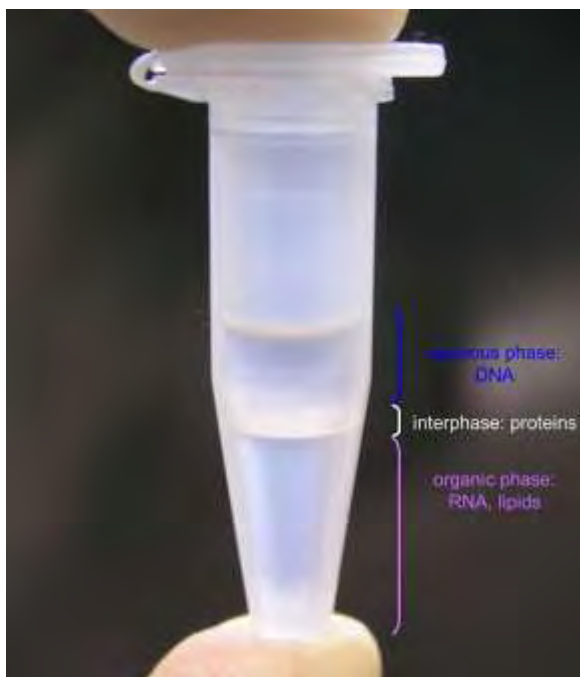
Για την απομόνωση του γονιδιοματικού DNA χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο απομόνωσης βασισμένο στην τεχνική φαινόλης/χλωροφορμίου σύμφωνα με τους Miller et al, 1988 τροποποιημένο με δοκιμές στο εργαστήριο για να έχουμε το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα

Το αρχικό πρωτόκολλο απομόνωσης περιελάμβανε το εξής βήματα:

1. Δείγμα ιστού τοποθετείται σε αποστειρωμένο Eppendorf tube.
2. Στο Eppendorf tube προστίθεται:
 - 500μl διαλύματος TNE buffer.
 - 70μl διαλύματος SDS 25%.
 - 20μl proteinase k.
3. Λυοτρίβηση του ιστού με τη χρήση εμβόλου
4. Επώαση των ιστών σε υδατόλουτρο στους 55°C για 2 ώρες.
5. Προσθήκη 300ml Phenol και 300ml διαλύματος CH₃Cl₃ και isoamyl alcohol αναλογίας 24:1.
6. Ανάδευση του διαλύματος σε rotator για 10 λεπτά σε ταχύτητα 40 κύκλων ανά λεπτό.
7. Τοποθέτηση τους στη φυγόκεντρο για 10 λεπτά σε ταχύτητα 13.000rpm σε θερμοκρασία 4 °C.
8. Προσεχτική μεταφορά του υπερκείμενο εμφανώς διαχωρισμένου μέρους σε καθαρό Eppendorf tube (Εικόνα 6).
9. Προσθήκη 400ml του διαλύματος CH₃Cl₃ isoamyl alcohol αναλογίας 24:1.
10. Επανάληψη των βημάτων 6-7-8.

11. Στο υπερκείμενο που έχουμε μεταφέρει σε καθαρό Eppendorf tube προσθέτουμε 10% του όγκου του Sodium acetate συγκέντρωσης 3M και ίσο όγκου με το υπερκείμενο 2-propanol θερμοκρασίας -20°C .
12. Τοποθετούμε τα δείγματα σε κατάψυξη σε θερμοκρασία -24°C για τουλάχιστον 30 λεπτά.
13. Τοποθετούμε τα δείγματα σε φυγόκεντρο για 10 λεπτά σε ταχύτητα 13.000rpm σε θερμοκρασία 4°C .
14. Αδειάζουμε το υπερκείμενο υγρό και ξεπλένουμε με αιθανόλη ΕΤΟΗ 70% που έχει θερμοκρασία -20°C .
15. Τοποθετούμε τα δείγματα σε φυγόκεντρο για 10 λεπτά σε ταχύτητα 13.000rpm σε θερμοκρασία 4°C .
16. Αδειάζουμε το υπερκείμενο υγρό και στεγνώνουμε σε vacuum ή σε θερμοκρασία 40°C .
17. Στα pellets DNA που είναι ευδιάκριτα στα Eppendorf tubes προσθέτουμε 50μl διαλείμματος TE και τα τοποθετούμε σε κατάψυξη -24°C .

Να σημειώσουμε επίσης ότι το σύνολο της διαδικασίας πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4°C .



Εικόνα 6: Διαχωρισμός της υπερκείμενης υδατικής φάσης DNA, είναι εμφανής η ενδιάμεση φάση που αποτελείται κύρια από πρωτεΐνες και η κατώτερη φάση (οργανική φάση) από λιπίδια και RNA

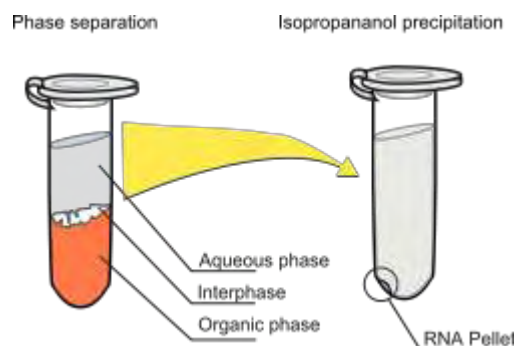
Λόγω της ιδιαίτερης σκληρότητας του δείγματος του ιστού που είχαμε προσαρμόσαμε το πρωτόκολλο της απομόνωσης με εργαστηριακές δοκιμές. Το τελικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε για την απομόνωση DNA και των 81 δειγμάτων διαμορφώθηκε τελικά ως εξής:

1. Δείγμα ιστού τοποθετείται σε αποστειρωμένο Eppendorf tube.
2. Στο Eppendorf tube προστίθεται:
 - a. 500μl διαλύματος TNE buffer.
 - b. 70μl διαλύματος SDS 25%.
3. Τοποθετούμε τα Eppendorf tubes για διάστημα 4 περίπου λεπτών εναλλάξ στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55 °C και στον καταψύκτη σε θερμοκρασία -80 °C.

4. Λυοτριβήση του ιστού με τη χρήση εμβόλου.
5. Επάωση των ιστών σε υδατόλουτρο στους 55°C για διάστημα 8 έως 10 ωρών.
6. Λυοτριβήση του ιστού με τη χρήση εμβόλου.
7. Προσθήκη στο Eppendorf tube 20μl proteinase k.
8. Επάωση των ιστών σε υδατόλουτρο στους 55°C για 1 ώρα.
9. Προσθήκη 300ml Phenol και 300ml διαλύματος CH₃Cl₃ και isoamyl alcohol αναλογίας 24:1.
10. Ανάδευση του διαλύματος σε rotator για 10 λεπτά σε ταχύτητα 40 κύκλων ανά λεπτό.
11. Τοποθέτηση τους στη φυγόκεντρο για 10 λεπτά σε ταχύτητα 13.000rpm σε θερμοκρασία 4 °C.
12. Προσεχτική μεταφορά του υπερκείμενο εμφανώς διαχωρισμένου μέρους σε καθαρό Eppendorf tube.
13. Προσθήκη 400ml του διαλύματος CH₃Cl₃ isoamyl alcohol αναλογίας 24:1.
14. Επανάληψη των βημάτων 6-7-8.
15. Στο υπερκείμενο που έχουμε μεταφέρει σε καθαρό Eppendorf tube προσθέτουμε 10% του όγκου του Sodium acetate συγκέντρωσης 3M και ίσο όγκου με το υπερκείμενο 2-propanol θερμοκρασίας -20°C.
16. Τοποθετούμε τα δείγματα σε κατάψυξη σε θερμοκρασία -24 °C για τουλάχιστον 30 λεπτά.
17. Τοποθετούμε τα δείγματα σε φυγόκεντρο για 10 λεπτά σε ταχύτητα 13.000rpm σε θερμοκρασία 4 °C.

18. Αδειάζουμε το υπερκείμενο υγρό και ξεπλένουμε με αιθανόλη ΕΤΟΗ 70% που έχει θερμοκρασία -20°C .
19. Τοποθετούμε τα δείγματα σε φυγόκεντρο για 10 λεπτά σε ταχύτητα 13.000rpm σε θερμοκρασία 4°C .
20. Αδειάζουμε το υπερκείμενο υγρό και στεγνώνουμε σε vacuum ή σε θερμοκρασία 40°C .
21. Στα pellets DNA που είναι ευδιάκριτα στα Eppendorf tubes προσθέτουμε 50μl διαλείμματος TE και τα τοποθετούμε σε κατάψυξη -24°C .

Για να διατηρήσουμε τη θερμοκρασία στους επιθυμητούς -4°C χρησιμοποιήσαμε θρυμματισμένο πάγο τον οποίο ανανεώναμε τακτικά καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση διαχωρισμού υπερκείμενης υδατικής και οργανικής φάσης και σχηματισμού DNA pellet στο κάτω μέρος του Eppendorf tube

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε για το πρωτόκολλο απομόνωσης είχαν ως εξής:

- TNE buffer: 100mM NaCl 0,1M

10mM EDTA 0,01M

10mM Tris-HCl 0,01M

το pH ρυθμίστηκε στο 8 με τη χρήση HCl.

- Διάλυμα CH₃Cl₃ και isoamyl alcohol αναλογίας 24:1.
- Διάλυμα SDS 25%.
- Διάλυμα Sodium acetate συγκέντρωσης 3M.
- Αραιωμένη αιθανόλη ETOH 70%.
- TE buffer: 100mM Tris-HCl

1mM EDTA

pH 8 ρυθμισμένο με προσθήκη HCl.

2.3 Ανίχνευση της ποιότητας του απομονωμένου DNA

Πραγματοποιήσαμε ανίχνευση της ποιότητας του απομονωμένου DNA τόσο με τη χρήση πηκτώματος αγαρόζης αλλά και με μέτρηση των ποσοτήτων αυτών σε Nanodrop spectrophotometer.

Για την ανίχνευση της ποιότητας του απομονωμένου DNA σε πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης (Invitrogen) συγκέντρωσης 2%.

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης αρχικά μετρούνταν σε ζυγό ακριβείας ποσότητα 1,2 gr στερεής αγαρόζης τα οποία προστίθενται σε κωνική φιάλη και διαλύονται με 60ml διαλύματος TBE συγκέντρωσης 1%. Η κωνική φιάλη αναδεύεται και τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων (KENWOOD microwave) για 5 λεπτά στους 90°C έως ότου να ομογενοποιηθεί το διάλυμα. Στη συνέχεια στο διάλυμα προστίθεται 2μl Βρωμιούχου Αιθιδίου (EtBr) συγκέντρωσης 1% (Scharlau).

Το μίγμα ανακαινίζεται και τοποθετείται σε τετράγωνο Plexiglas (πίατο ηλεκτροφόρησης) μήκους 10cm. Το τετράγωνο Plexiglas έχει δεξιά και αριστερά θέσεις 1cm στις οποίες τοποθετούνται 'χτενάκια' για να δημιουργηθούν οι υποδοχές (πηγάδια). Με κάθε 'χτενάκι' δημιουργούνται 14 υποδοχές όγκου 14μl. Μετά από παραμονή του σε θερμοκρασία δωματίου περίπου για 20 με 30 λεπτά το διάλυμα στερεοποιείται και προκύπτει η πηκτή.

Στη συνέχεια με πιπέτα τοποθετούνταν στις υποδοχές 2μl του απομονωμένου DNA, 1μl χρωστικής ουσίας (Blue-bromophenol, Invitrogen) και 8μl απιονισμένου νερού. Η χρήση της χρωστικής είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των προϊόντων.

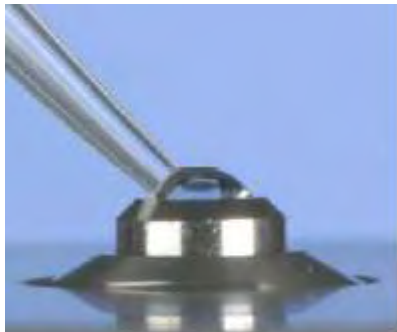


Εικόνα 8: Συσκευή ηλεκτροφόρησης

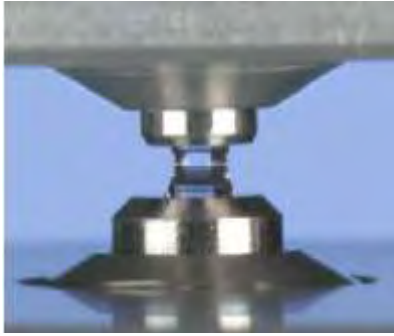
Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης ήταν TBE συγκέντρωσης 1%. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε προέκυπτε από την αραιώση διαλύματος TBE 5X το οποίο παρασκευάζεται από 53gr Tris-base, 27,5gr boric acid και 200ml EDTA συγκέντρωσης 0,5M και pH 8. Η φόρτωση των δειγμάτων γίνεται αφού η πηκτή έχει βυθιστεί μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα.

Στη συνέχεια η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με παροχή τάσης 60V με τροφοδοτικό για περίπου 30 με 45 λεπτά. Μετά το τέλος της διαδικασίας η πηκτή τοποθετούνταν σε υπεριώδη ακτινοβολία όπου παρατηρούνταν τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης για την ποιότητα του απομονωμένου DNA.

Ένας δεύτερος τρόπος που χρησιμοποιήσαμε για να ποσοτικοποιήσουμε την ποσότητα του απομονωμένου DNA ήταν με τη χρήση του Nanodrop spectrophotometer. Η συσκευή χρησιμοποιεί την τεχνολογία των οπτικών ινών και της συμφυής επιφανειακής τάσης και μπορεί να ποσοτικοποιήσει ένα ευρύ φάσμα βιομορίων με χρήση όγκου μόλις 1μl. Το σύστημα χρησιμοποιεί την επιφανειακή τάση του υγρού και συγκρατεί το σταγονίδιο του δείγματος στη θέση ανάμεσα στις δύο οπτικές επιφάνειες κατά τη διάρκεια του κύκλου μέτρησης όπως φαίνεται στις εικόνες 9 και 10.



Εικόνα 9: Τοποθέτηση δείγματος
στην κάτω επιφάνεια του
Nanodrop spectrophotometer



Εικόνα 10: Συγκράτηση σταγονιδίου του δείγματος ανάμεσα στις δύο επιφάνειες



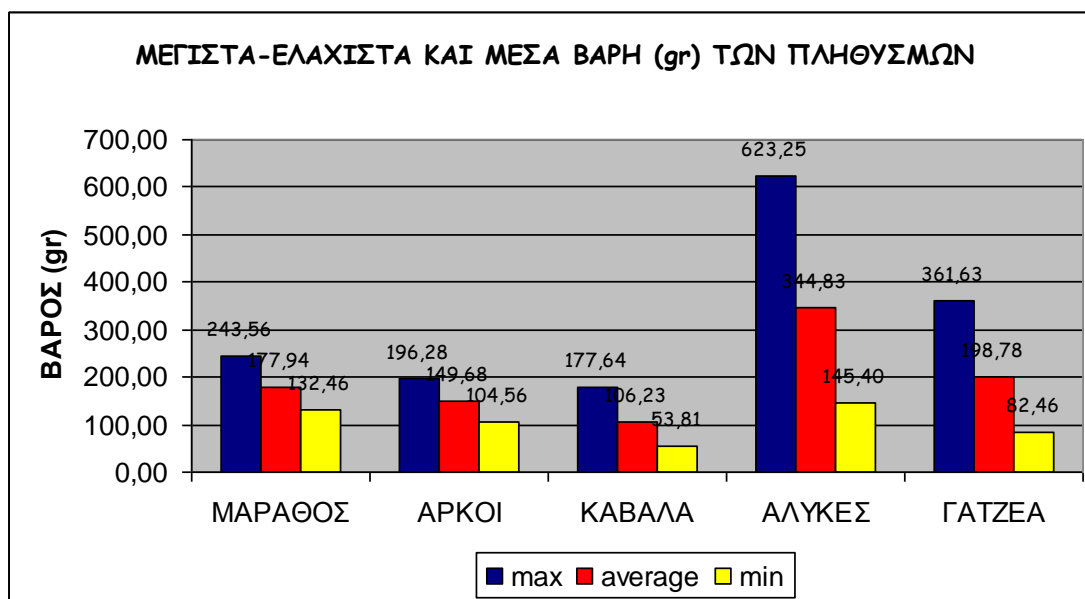
Εικόνα 11: Nanodrop spectrophotometer

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

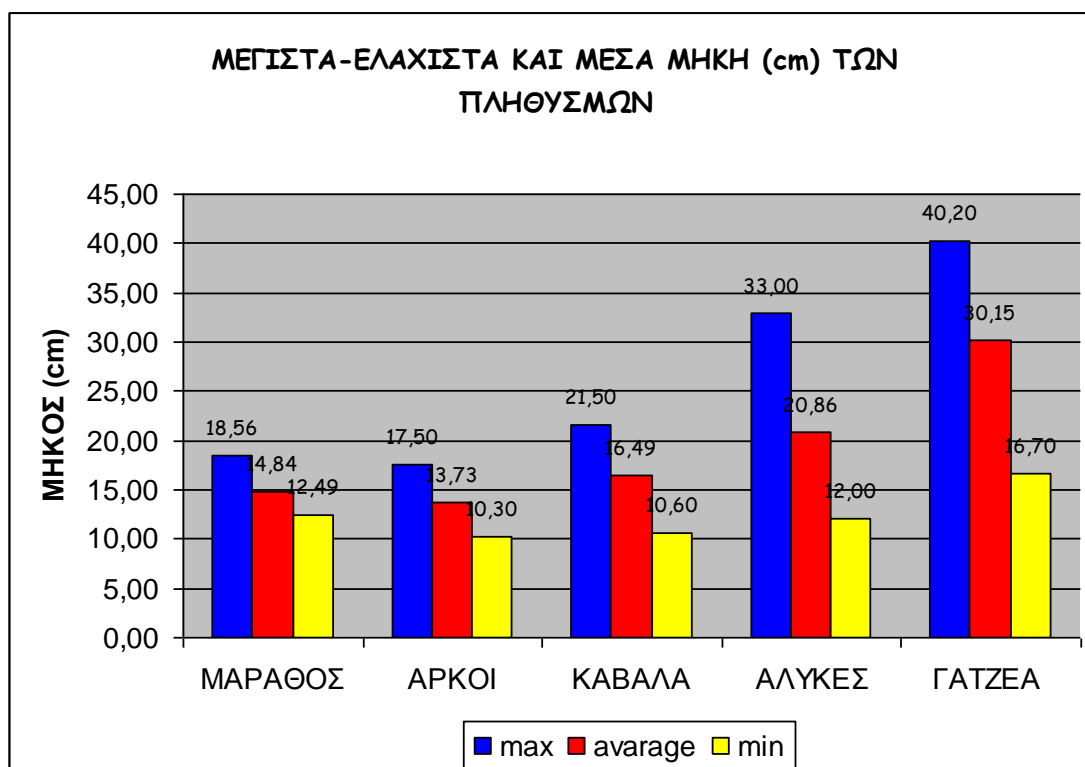
3.1 Μορφομετρική ανάλυση δεδομένων

Συνολικά εξετάστηκαν 81 άτομα του υπό μελέτη είδους από πέντε διαφορετικές περιοχές. Από όλα τα άτομα πήραμε μετρήσεις για το μήκος τους σε cm και για το βάρος τους σε gr. Πρέπει να σημειώσουμε ότι όσον αφορά το βάρος των οργανισμών υπήρχε ένα ποσοστό της τάξης του 27% του συνόλου των ατόμων (22 οργανισμοί)το οποίο αποτελούνται από οργανισμούς οι οποίοι ήταν εξεντερισμένοι κατά τη διαδικασία της μέτρησης του βάρους τους. Το γεγονός αυτό επηρεάζει τόσο τα συνολικά όσο και τα επιμέρους συμπεράσματα που προκύπτουν για τις σχέσεις μήκους βάρους των ατόμων των πληθυσμών.

Το μέγιστο μήκος που καταγράφηκε ήταν 40,20 cm και το μέγιστο βάρος 623,25 gr. Το μέγιστο μέσο μήκος παρατηρήθηκε στον πληθυσμό της Γατζέας, ενώ το γεγονός ότι τα μεγαλύτερα μέσα βάρη καταγράφηκαν στον πληθυσμό των Αλυκών οφείλεται στον αυξημένο αριθμό των εξεντερισμένων ατόμων που καταμετρήθηκαν στον πληθυσμό της Γατζέας. Το μέσο μήκος του συνόλου των ατόμων ήταν 20,84 cm ενώ το αντίστοιχο μέσο βάρος τους 210,39 gr.



Διάγραμμα 1: Γραφική απεικόνιση των μέγιστων, των ελάχιστων, και των μέσων τιμών για τις μετρήσεις του βάρους των ατόμων των πέντε πληθυσμών



Διάγραμμα 2: Γραφική απεικόνιση των μέγιστων, των ελάχιστων, και των μέσων τιμών για τις μετρήσεις του μήκους των ατόμων των πέντε πληθυσμών

Για το σύνολο των ατόμων αλλά και για κάθε πληθυσμό χωριστά υπολογίστηκαν το εύρος των μετρήσεων (min – max), η τυπική απόκλιση (sd), η μέση τιμή (avg) και ο συντελεστής παραλλακτικότητας (CV).

Πίνακας 2: Οι στατιστικές παράμετροι για το σύνολο των ατόμων και των πέντε πληθυσμών για τα μεγέθη του βάρους (gr) και του μήκους (cm) (min : ελάχιστη τιμή, max: μέγιστη τιμή, avg: η μέση τιμή και CV% : ο συντελεστής παραλλακτικότητας)

Συνολικά άτομα		
	ΜΗΚΟΣ (cm)	ΒΑΡΟΣ (gr)
Sd	7,761	129,651
Avg	20,843	210,389
Min	10,300	53,810
Max	40,200	623,250
CV%	37,237	61,624

Πίνακας 3: Οι στατιστικές παράμετροι για τα άτομα του πληθυσμού της Νήσου Μάραθου για τα μεγέθη του βάρους (gr) και του μήκους (cm). (min : ελάχιστη τιμή, max: μέγιστη τιμή, avg: η μέση τιμή και CV% :ο συντελεστής παραλλακτικότητας)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	12/5/2008	
ΠΕΡΙΟΧΗ	ΜΑΡΑΘΟΣ	
	ΜΗΚΟΣ (cm)	ΒΑΡΟΣ (gr)
sd	1,945	31,131
avg	14,836	177,940
min	12,490	132,460
max	18,560	243,560
CV%	13,107	17,495

Πίνακας 4: Οι στατιστικές παράμετροι για τα άτομα του πληθυσμού της Νήσου Αρκοί για τα μεγέθη του βάρους (gr) και του μήκους (cm). (min : ελάχιστη τιμή, max: μέγιστη τιμή, avg: η μέση τιμή και CV% :ο συντελεστής παραλλακτικότητας)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	12/5/2008	
ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΡΚΟΙ	
	ΜΗΚΟΣ (cm)	ΒΑΡΟΣ (gr)
Sd	2,372	29,549
Avg	13,730	149,678
Min	10,300	104,560
Max	17,500	196,280
CV%	17,277	19,741

Πίνακας 5: Οι στατιστικές παράμετροι για τα άτομα του πληθυσμού της Καβάλας για τα μεγέθη του βάρους (gr) και του μήκους (cm). (min : ελάχιστη τιμή, max: μέγιστη τιμή, avg: η μέση τιμή και CV% :ο συντελεστής παραλλακτικότητας)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	2/6/2008	
ΠΕΡΙΟΧΗ	ΚΑΒΑΛΑ	
	ΜΗΚΟΣ (cm)	ΒΑΡΟΣ (gr)
Sd	2,588	38,815
Avg	16,488	106,227
Min	10,600	53,810
Max	21,500	177,640
CV%	15,694	36,540

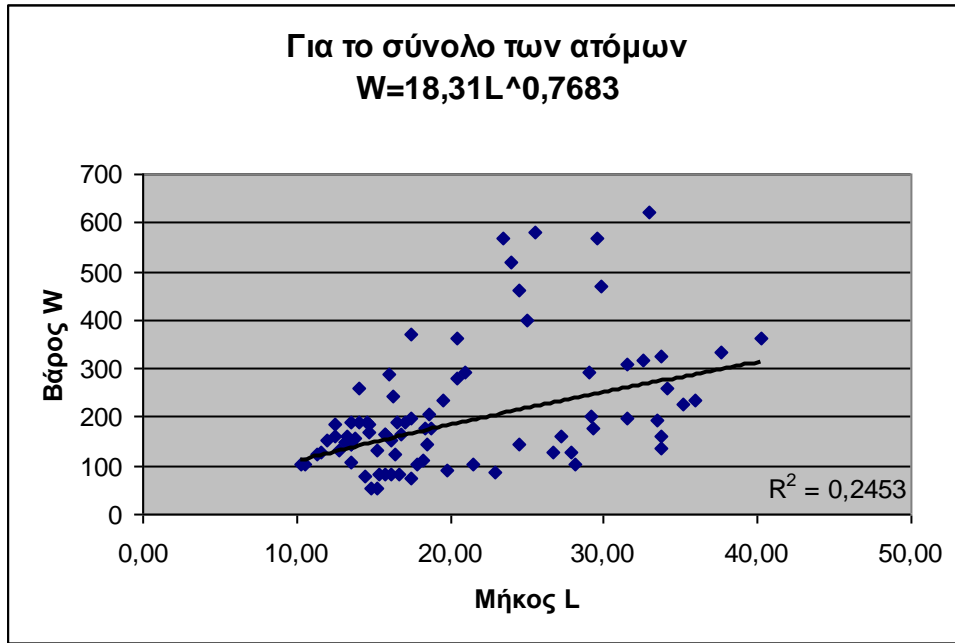
Πίνακας 6: Οι στατιστικές παράμετροι για τα άτομα του πληθυσμού των Αλυκών για τα μεγέθη του βάρους (gr) και του μήκους (cm). (min : ελάχιστη τιμή, max: μέγιστη τιμή, avg: η μέση τιμή και CV% :ο συντελεστής παραλλακτικότητας)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	13/10/2008	
ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΛΥΚΕΣ	
	ΜΗΚΟΣ (cm)	ΒΑΡΟΣ (gr)
sd	6,142	156,575
avg	20,859	344,829
min	12,000	145,400
max	33,000	623,250
CV%	29,446	45,407

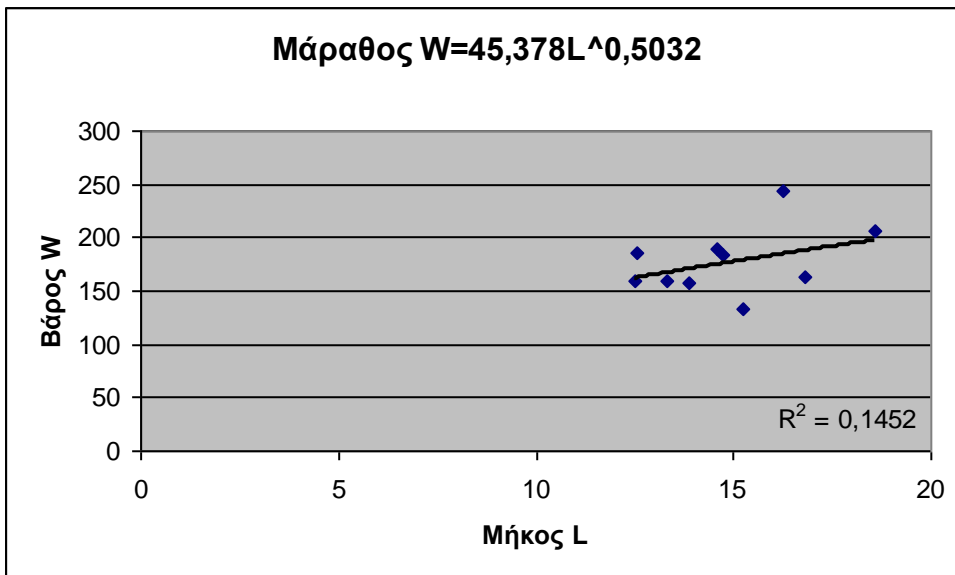
Πίνακας 7: Οι στατιστικές παράμετροι για τα άτομα του πληθυσμού της Γατζέας για τα μεγέθη του βάρους (gr) και του μήκους (cm). (min : ελάχιστη τιμή, max: μέγιστη τιμή, avg: η μέση τιμή και CV% : ο συντελεστής παραλλακτικότητας)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	20/5/2008	
ΠΕΡΙΟΧΗ	ΓΑΤΖΕΑ	
	ΜΗΚΟΣ (cm)	ΒΑΡΟΣ (gr)
sd	5,929	86,412
avg	30,155	198,785
min	16,700	82,460
max	40,200	361,630
CV%	19,660	43,470

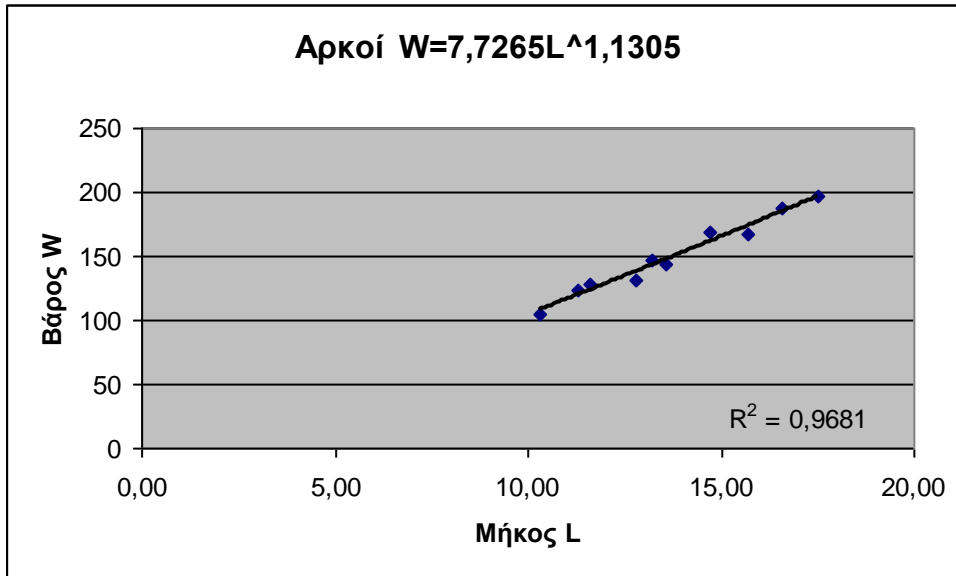
Με απλή παλινδρόμηση (Simple Regression) και εφαρμογή του μοντέλου $W = a L^b$ υπολογίστηκε η συσχέτιση του βάρους και του μήκους του συνόλου των ατόμων και των πέντε πληθυσμών αλλά και των επιμέρους πληθυσμών χωριστά. Στα Διαγράμματα 3, 4, 5, 6, 7 και 8 απεικονίζεται η σχέση του μήκους και του βάρους των ατόμων των πέντε πληθυσμών αλλά και του συνόλου των ατόμων.



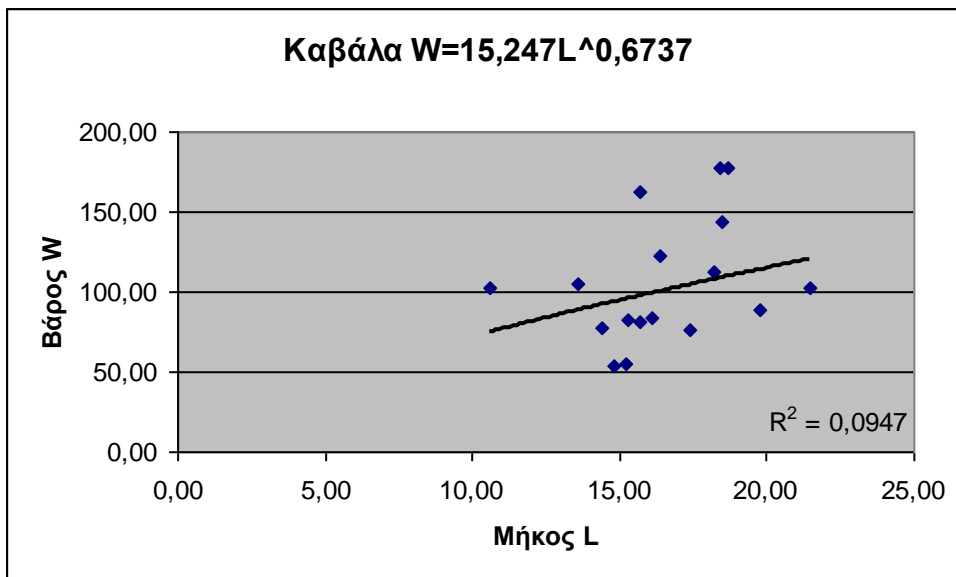
Διάγραμμα 3: Απεικόνιση της σχέσης μήκους-βάρους μεταξύ των πληθυσμών (συνολικό διάγραμμα για τα άτομα και των πέντε πληθυσμών)



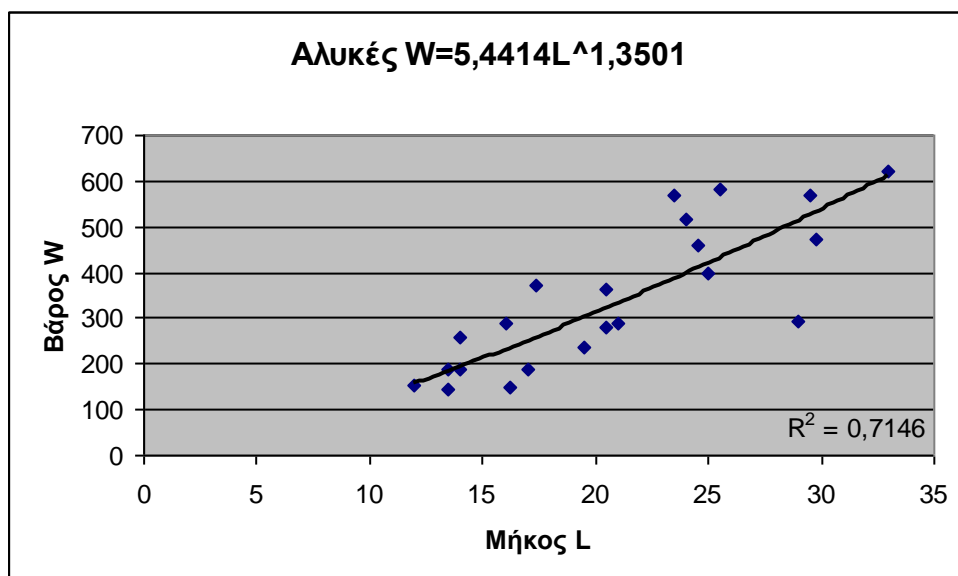
Διάγραμμα 4: Απεικόνιση της σχέσης μήκους-βάρους των ατόμων για τον πληθυσμό της Μάραθου



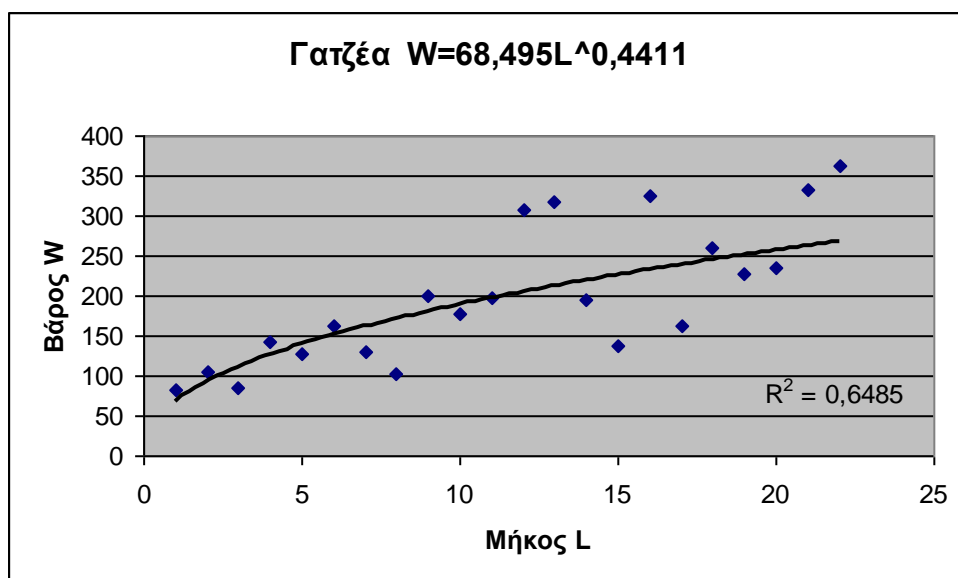
Διάγραμμα 5: Απεικόνιση της σχέσης μήκους-βάρους των ατόμων για τον πληθυσμό των Αρκών



Διάγραμμα 6: Απεικόνιση της σχέσης μήκους-βάρους των ατόμων για τον πληθυσμό της Καβάλας



Διάγραμμα 7: Απεικόνιση της σχέσης μήκους-βάρους των ατόμων για τον πληθυσμό των Αλυκών



Διάγραμμα 8: Απεικόνιση της σχέσης μήκους-βάρους των ατόμων για τον πληθυσμό της Γατζέας

Η σχέση που συνδέει το μήκος (L) και το βάρος (W) των ατόμων όλων των πληθυσμών είναι η εξής:

$$W = a L^b (1)$$

Οι τιμές των παραμέτρων της σχέσης παλινδρόμησης (a και b) υπολογίστηκαν για το σύνολο των ατόμων και των πέντε πληθυσμών αλλά και για τον κάθε πληθυσμό χωριστά.

- Για το σύνολο των ατόμων : $W = 18,3 L^{0,7683}$
- Για τον πληθυσμό της Μάραθου : $W = 45,378 L^{0,05032}$
- Για τον πληθυσμό των Αρκών : $W = 7,7265 L^{1,1305}$
- Για τον πληθυσμό της Καβάλας : $W = 15,247 L^{0,6737}$
- Για τον πληθυσμό των Αλυκών : $W = 5,4414 L^{1,3501}$
- Για τον πληθυσμό της Γατζέας : $W = 68,495 L^{0,4411}$

Πίνακας 8: Τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης b

ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΤΙΜΗ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ b
ΜΑΡΑΘΟΣ	0,5032
ΑΡΚΟΙ	1,1305
ΚΑΒΑΛΑ	0,6737
ΑΛΥΚΕΣ	1,3501
ΓΑΤΖΕΑ	0,4411
ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ	0,7683

3.2 Δεδομένα απομόνωσης DNA

Κατά τη διεκπεραίωση της παρούσας Προπτυχιακής Διατριβής καθορίσαμε πρωτόκολλο απομόνωσης βασισμένη στα γνωστά πρωτόκολλα απομόνωσης DNA που χρησιμοποιούν την τεχνική φαινόλης – χλωροφορμίου. Οι δυσκολίες που

αντιμετωπίσαμε έγκεινται στη σκληρότητα του δείγματος και στη δυσκολία λυοτρίβισης του ιστού.

Μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου απομόνωσης για να διαπιστώσουμε την ποσότητα του DNA που υπάρχει σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήσαμε το νανόμετρο. Συγκεκριμένα υπολογίσαμε και καταγράψαμε την απορρόφηση στα 260 νανόμετρα και την απορρόφηση στα 280 νανόμετρα και τη συγκέντρωση του DNA μετρημένη σε ng/ul (νανογραμμάρια ανά μικρόλιτρο).

Από τους λόγους των συγκεντρώσεων 260/280 και 260/230 παρατηρήσαμε ότι σε γενικές γραμμές τα δείγματα μας είναι καθαρά από ένζυμα, πρωτεΐνες και άλλα βιολογικά μόρια που μπορεί να επηρεάσουν την περαιτέρω χρήση του DNA των δειγμάτων για επεξεργασία με άλλες μοριακές τεχνικές (PCR).

Με τη χρήση πιο εξελιγμένων τεχνικών μπορούμε να διαπιστώσουμε την εμφάνιση γονιδιακής ροής, δηλαδή τη μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ των πληθυσμών καθώς και να υπολογίσουμε τη γενετική απόσταση, δηλαδή το μέγεθος την ανομοιομορφίας του γενετικού υλικού των διαφορετικών αυτών πληθυσμών, καταλήγοντας έτσι σε συμπεράσματα γενικά για τη βιολογία του είδους αλλά και για τους παράγοντες διαφοροποίησης των επιμέρους πληθυσμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική βιβλιογραφία

Αλαχιώτης Σ. (2005) Εισαγωγή στη γενετική, Ελληνικά Γράμματα, Β' έκδοση

Αλαχιώτης Σ. (2007) Εισαγωγή στην εξέλιξη, Α.Α.Λιβάνη

Λαζαρίδου-Δημητριάδου Μ. (1992) Γενική ζωολογία. Εκδόσεις Γιαχούδη, Θεσσαλονίκη

Οικονομίδης Ν. (2003) Μελέτη των φυσικών αποθεμάτων του αχινού *Paracentrotus lividus* L. Στον κόλπο της Καβάλας, Πρακτική άσκηση. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Βιολογίας

Ξένη βιβλιογραφία

Bottger S.A., Walker C.W., Unuma T. (2004) Care and Maintenance of adult Echinoderms. *Methods in cell biology*, vol:74, ch:2, pp17-38

Bulteel P., Jangoux M., Coulon P. (1992) Biometric, bathymetric, distribution and reproductive cycle of the holothuroid *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) from Mediterranean Sea grass beds. *Marine Ecology*, Paul Parey Scientific Publishers, Berlin & Hamburg, 13(1):53-62

Carvalho G.R., Hauser L (1998) Advances in the molecular analysis of fish population structure. *Ital. J. Zoo.*, 65, suppl: 21:33

Castro P., Huber M.E (2002) *Θαλάσσια Βιολογία*

Despalatovic M., Grubellic I., Simunovic A., Antolic B., Zuljevic A. (2004) Reproductive biology of the holothurian *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) in the Adriatic Sea. *J. Mar. Bid. Ass. U.K.*, vol:84, pp409-414

Dissanayake D.C.T., Stefansson G. (2011) Habitat preference of sea cucumbers: *Holothuria atra* and *Holothuria edulis* in the coastal waters of Sri Lanka. *Journal of Marine Biological association of United Kingdom*

Eaves A.A., Palmer A.R. (2003) Reproduction widespread cloning in echinoderm larvae. *Nature*, 425(6954):146

Fedra K., Olsher E.M., Scherubel C., Stachowitsch M., Wurzian R.s. (1976) On the ecology of a North Adriatic benthic community: Distribution, Standing Crop and Compositioin of the Macrobentos. *Marine Biology*, Springer-Verlag, vol:38, pp129-145

Gisele P., Samone T., Alan T., Tercero M.A., Diviva J., Tabara E., Gaballes C. (2007) Economic evaluation of coastal and Marine resources: Bohol Marine Triangle, Philippines. *Coastal management*, 35:319-338

Kazanidis G., Antoniadou C., Lolas A., Neofitou N., Vafidis D., Chintiroglou C., Neofitou C. (2010) Population dunamics and reproduction of *Holothuria tubulosa* (Holothuroidea:Echinodermata) in the Aegean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90(5):895-901

Kellu M.S. (2005) *Echinoderms: Their culture and bioactive compounds*. Scottish Association for Marine Science, Oban, Argyll, Scotland, *Progress in Molecular and V. Metranga (Ed.), Echinodermata*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Khanna D.R., Yadav P.R. (2005) *Biology of Echinodermata*. Discovery publishing House, India

Lawrence J.M. (1975) On the relationships between marine plants and sea urchins. *Oceanogr. Mar. Biol.*, 36:321-326

Mahmoud A.D., Ahmad H. (2006) The feeding selectivity and ecological role of shallow water holothurians in the Red sea. SPC Beche-de-mer Information Bulletin, vol:24, pp11-21

O'Loughlin P.M., Paulay G., Vandenspiegel D., Samyn Y. (2007) New Holothuria species from Australia (Echinodermata:Holothuriidae), with comments on the origin of deep and cool holothuriids. Memoirs of Museum Victoria, 64:35-52

Pancucci M.A., Sara M., Randazzo M., Piazza M., Cognetti G.(1996) Nanismo di *Paracentrotus lividus* del Golfo Amvrakikos: Analisi mediante RAPD fingerprinting. Recupero a gestiona della fascia rostiara Roma, 1996:97-105

Ramofafia C., Byrne M., Battaglene C.S. (2003) Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scarba* (Echinodermata:Hlothoroidea) in the Solomon islands. Marine Biology, 142:281-288

Reichenbach N (1999) .Ecology and fishery biology of *Holothuria fuscogiva* in the Maldives, Indian ocean (Echinodermata:Holothoroidea). Faculty publications and precentations, pp30. : http://digitalcommons.liberty.edu/bio_chem_fac_pubs/30
(Πρόσβαση: 25-07-2011)

Relini G.(2003) Fishery and Aquaculture relationship in the Mediterranean: Present and future. Mediterranean Marine Science, Genova, Italia, vol 4/2 pp125-154

Wray G.A.(1999) Echinodermata Tree of life web project:
<http://tolweb.org/Echinodermata/2497/1999.12.14> (Πρόσβαση: 14-06-2011)

Yokota Y (2005). Bioresources from Echinoderms. Progress in Molecular and Subcellular Biology, 39:251-266

Zar J.H. (1984) Biostatistical analysis. Prentice Hall Intern. Publ., New York, pp718

Zhou S., Shirley T.C. (1996) Habitat and depth distribution of the red sea cucumber *Parastichopus californicus* in the Southeast Alaska bay. Alaska Fishery Research Bulletin, 3(2):123-131

Πηγές φωτογραφιών

<http://sydney.edu.au/medicine/bosch/facilities/molecular-biology/nucleic-acid/nano-drop-spec.php> (Πρόσβαση: 18-05-2011)

http://www.medivalue.gr/product_detail.jsp%3Bjsessionid=0454477807CF5873F098DF8DD3FD3B99?prdId=SUB15&extLang (Πρόσβαση: 22-06-2011)

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Greece-satellite-map.jpg>
(Πρόσβαση: 22-06-2011)

http://etc.usf.edu/clipart/47900/47944/47944_holo_dissect.htm
(Πρόσβαση: 10-08-2011)

http://openwetware.org/wiki/Image:DNA_extraction_w_phenol_chloroform.jpg
(Πρόσβαση: 10-08-2011)

<http://tolweb.org/Echinodermata> (Πρόσβαση: 10-08-2011)

http://www.bg-rams.ac.at/Aktuelles/Seiten/D_2005_10_5_13_30_4_633/stammseite10.htm
(Πρόσβαση: 10-08-2011)

http://www.geo.tu-freiberg.de/hydro/vorl_portal/wiss_tauschen/uni/9stachel.htm
(Πρόσβαση: 10-08-2011)

ABSTRACT

Study population structure of edible trepang, *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788) in the Aegean Sea based on the parameters of length and weight of five populations of the species from the region of the Dodecanese (2 populations), of Pagasitikos Gulf (2 populations) and Kavala and isolating the genetic material of organisms (DNA) to create genetic library for further study of the resident population.

For all individuals and separately for each population by calculating the range of measurement (min - max), the standard deviation (sd), the average (avg) and the coefficient of variation (CV) and the length-weight relationship.

A total of 81 subjects in the study species from five different areas. Of all the samples we took measurements of their length in cm and their weight in gr. The maximum length recorded was 40,20 cm and maximum weight 623,25 gr. The maximum average length observed in the population of Gatzea and the fact that larger weights were recorded in the population of Alykes is due to the increased number of people counted eviscerated the population of Gatzea. The average length of all subjects was 20,84 cm and the average weight 210,39 gr.

When completing this thesis we set Undergraduate isolation protocol based on the known DNA isolation protocols using the technique of phenol - chloroform while to see the amount of DNA present in each sample we used nanometer.

By using more sophisticated techniques we can see the emergence of gene flow, ie the transfer of genetic material between populations and to estimate the genetic distance is the size of the genetic heterogeneity of these different populations, thus leading to general conclusions about the biology of the species and differentiation factors for the individual populations.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρουσίαση των μετρήσεων των μορφολογικών χαρακτηριστικών (μήκος και βάρος) των ατόμων των πέντε πληθυσμών

Πίνακας 1 : Μετρήσεις ύψους και βάρους των ατόμων από τον πληθυσμό της Μάραθου

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	12/5/2008		
ΠΕΡΙΟΧΗ	ΜΑΡΑΘΟΣ		
	ΜΗΚΟΣ (cm)	ΒΑΡΟΣ (gr)	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
M1	12,54	184,85	
M2	16,27	243,56	
M3	13,86	157,32	
M4	14,58	189,43	
M5	13,31	159,27	
M6	18,56	205,82	
M7	12,49	158,68	
M8	14,73	184,37	
M9	15,23	132,46	
M10	16,79	163,64	

Πίνακας 2 : Μετρήσεις ύψους και βάρους των ατόμων από τον πληθυσμό των Αρκών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	12/5/2008		
ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΡΚΟΙ		
	ΜΗΚΟΣ (cm)	ΒΑΡΟΣ (gr)	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
A1	10,30	104,56	
A2	14,70	168,53	
A3	13,20	147,24	
A4	17,50	196,28	
A5	11,60	127,42	
A6	11,30	123,75	
A7	13,60	144,14	
A8	12,80	130,58	
A9	15,70	166,7	
A10	16,60	187,58	

Πίνακας 3 : Μετρήσεις ύψους και βάρους των ατόμων από τον πληθυσμό της Καβάλας

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	2/6/2008		
ΠΕΡΙΟΧΗ	ΚΑΒΑΛΑ		
	ΜΗΚΟΣ (cm)	ΒΑΡΟΣ (gr)	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
K1	18,70	177,20	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
K2	15,20	55,24	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
K3	16,10	84,31	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
K4	21,50	102,35	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
K5	14,80	53,81	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
K6	16,40	122,52	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
K7	18,20	113,10	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
K8	19,80	89,30	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
K9	13,60	105,30	
K10	10,60	102,29	
K11	18,50	143,24	
K12	15,70	162,70	
K13	14,40	77,00	
K14	15,30	82,80	
K15	17,40	75,86	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
K16	18,40	177,64	
K17	15,70	81,20	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ

Πίνακας 4 : Μετρήσεις ύψους και βάρους των ατόμων από τον πληθυσμό των Αλυκών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	13/10/2008		
ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΛΥΚΕΣ		
	ΜΗΚΟΣ (cm)	ΒΑΡΟΣ (gr)	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
Π1	25	400	
Π2	17,4	370,52	
Π3	33	623,25	
Π4	23,5	570	
Π5	16,2	150,33	
Π6	24	517,45	
Π7	29,5	566,77	
Π8	29,8	471,2	
Π9	13,5	145,4	
Π10	20,5	279	
Π11	21	290,3	
Π12	16	288,36	
Π13	29	294,15	
Π14	24,5	460	
Π15	25,5	580	
Π16	20,5	362	
Π17	13,5	190,2	
Π18	14	260	

П19	19,5	236,4	
П20	14	189,53	
П21	17	189,6	
П22	12	151,77	

Πίνακας 5 : Μετρήσεις ύψους και βάρους των ατόμων από τον πληθυσμό της Γατζέας

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	20/5/2008		
ΠΕΡΙΟΧΗ	ΓΑΤΖΕΑ		
	ΜΗΚΟΣ (cm)	ΒΑΡΟΣ (gr)	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
Γ1	32,6	318,14	
Γ2	33,4	194,34	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
Γ3	24,5	143,73	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
Γ4	27,9	128,8	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
Γ5	40,2	361,63	
Γ6	29,2	200,75	
Γ7	33,7	137,03	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
Γ8	29,3	177,15	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
Γ9	37,6	332,41	
Γ10	16,7	82,46	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
Γ11	33,7	325,21	
Γ12	31,5	198,16	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
Γ13	26,7	126,92	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
Γ14	35,2	226,82	
Γ15	33,7	162,38	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
Γ16	34,1	259,21	
Γ17	28,1	103,67	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
Γ18	22,9	85,13	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ

Γ19	27,2	161,42	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
Γ20	35,9	234,25	
Γ21	17,8	104,93	ΕΞΕΝΤΕΡΙΣΜΕΝΟ
Γ22	31,5	308,72	