



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Πληθυσμιακή γενετική του είδους *Squalus acanthias* στην Μεσόγειο
Θάλασσα»**

Διβανίδης Ευάγγελος

Παπαδημητρίου Περσεφώνη

ΒΟΛΟΣ 2021

«Πληθυσμιακή γενετική του είδους *Squalus acanthias* στην Μεσόγειο Θάλασσα»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1) Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, ***Επιβλέπων.***

2) Γεώργιος Γκάφας, Επίκουρος Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυαποθεμάτων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος.***

3) Δημήτριος Βαφείδης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση - έμμεση χρησιμότητά τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος.***

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ειλικρινείς μας ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρουμε σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία.

Ιδιαίτερα θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Εξαδάκτυλο για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους Γκάφας Γεώργιος και Βαφείδης Δημήτριος, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον κ. Γκάφα για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά του, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού, καθώς επίσης την κυρία Σαραντοπούλου Ιωάννα για την αμέριστη συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τέλος, θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας στις οικογένειες μας για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μια μελέτη για την πληθυσμιακή γενετική του είδους *Squalus acanthias* στη Μεσόγειο θάλασσα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA σε 37 δείγματα από μυϊκό ιστό διάφορων ειδών Ελασμοβραγχίων, τα οποία συλλέχθηκαν από την Ανατολική Μεσόγειο και ήταν αποθηκευμένα στους -20°C . Έπειτα προχωρήσαμε σε αντιγραφή του γενετικού υλικού μέσω PCR και ακολούθησε η αλληλούχιση σε 9 από αυτά τα δείγματα. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν ότι 7 από αυτά ανήκουν στο είδος *Squalus acanthias* και έτσι αποφασίσαμε να κατευθύνουμε την εργασία μας σε μια ανάλυση της πληθυσμιακής γενετικής του είδους στη Μεσόγειο, καθώς δεν υπάρχουν άλλες παρόμοιες μελέτες για το είδος συγκεκριμένα για τη Μεσόγειο. Πραγματοποιήθηκαν στατιστικές αναλύσεις, χρησιμοποιώντας τις 7 αυτές αλληλουχίες και 66 δείγματα αλληλουχιών του είδους *Squalus acanthias*, τα οποία βρέθηκαν από ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες από την βάση δεδομένων ncbi. Οπότε χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 73 δείγματα αλληλουχιών από Δυτική Μεσόγειο και Ανατολική Μεσόγειο. Από τις 3 αναλύσεις που έγιναν δημιουργήθηκαν φυλογενετικά δέντρα. Η Ανάλυση Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbor-Joining) και Ανάλυση Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum likelihood, ML) πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα MEGA-X Molecular Evolutionary Genetics Analysis, ενώ η ανάλυση με Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία, (Bayesian inference, BI) έγινε με το πρόγραμμα MrBayesv 3.2.7. Επιπλέον έγινε Ανάλυση Μοριακής Διακύμανσης (AMOVA - Analysis of Molecular Variance). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε μέθοδος παλινδρόμησης ABC για τον υπολογισμό των ιστορικών δημογραφικών παραμέτρων των δύο πληθυσμών, με το πρόγραμμα popABC. Από την αποτύπωση των φυλογενετικών δέντρων είναι διακριτό ότι οι πληθυσμοί του είδους είναι χωρισμένοι σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομαδοποιούνται τα δείγματα από Ελλάδα, Ισπανία, Αίγυπτο και Κύπρο, ενώ στη δεύτερη τα δείγματα από Ιταλία, Κροατία και Γαλλία. Από την ανάλυση μοριακής διακύμανσης η ομαδοποίηση αυτή επιβεβαιώνεται στατιστικά, με το ποσοστό διακύμανσης (FST) μεταξύ των γκρουπ από την ίδια ανάλυση να εμφανίζεται στα 97.95%. Από τη δημογραφική ανάλυση (ABC) διαφαίνεται ότι τα εκτιμώμενα δραστικά πληθυσμιακά μεγέθη (N_e) των δύο γενετικά ομαδοποιημένων πληθυσμών διαφέρουν μεταξύ τους, με το γκρουπ των πληθυσμών της Αδριατικής να έχει μεγαλύτερη τιμή (~7934 άτομα), με τον “αρχικό” πληθυσμό να εκτιμάται στα ~1362 άτομα. Το γενετικό γκρουπ N1 έχει πολύ χαμηλό πληθυσμιακό δραστικό μέγεθος, με μόλις 113 άτομα. Αυτό μας προϋποθέτει για πιθανό bottleneck που ίσως είχε υποστεί αυτός ο πληθυσμός. Η ίδια ανάλυση δείχνει ότι τα δύο γενετικά γκρουπ διαχωρίστηκαν πριν ~35431 χρόνια. Σύμφωνα με παρεμφερείς μελέτες στα τέλη του Πλειστοκαίνου, είχαν συμβεί διαχωρισμοί σε πληθυσμούς διάφορων ειδών Ελασμοβραγχίων και έπειτα πιθανά bottleneck σε κάποιους από τους πληθυσμούς. Οι κύριοι παράγοντες για τις αλλαγές αυτές στη βιοποικιλότητα πιθανώς αποτελούν οι κλιματολογικές συνθήκες εκείνης της εποχής, όπου οι αλλαγές στους κύκλους εποχών Παγετώνων έφερναν απότομες αλλαγές στη θερμοκρασία και τη στάθμη της θάλασσας, καθώς και διαφοροποίηση των θρεπτικών ουσιών σε πολλά οικοσυστήματα, όπως και αυτό της Μεσογείου.

Λέξεις κλειδιά: *Squalus acanthias*, Ελασμοβράγχιοι, Μεσόγειος θάλασσα, πληθυσμιακή γενετική, γονίδιο COI

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Η Βιοποικιλότητα των Χονδριχθύων.....	8
1.2 Ελασμοβράγχοι στη Μεσόγειο	10
1.3 Πληθυσμιακές μελέτες στη Μεσόγειο	11
1.4 Κεντρόνι ή Ακανθίας (<i>Squalus acanthias</i>)	13
1.5 Γονίδιο COI	15
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
2.1 Απομόνωση DNA	20
2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA	21
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	22
2.4 Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων PCR.....	24
2.5 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	36
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42
6. ABSTRACT	48

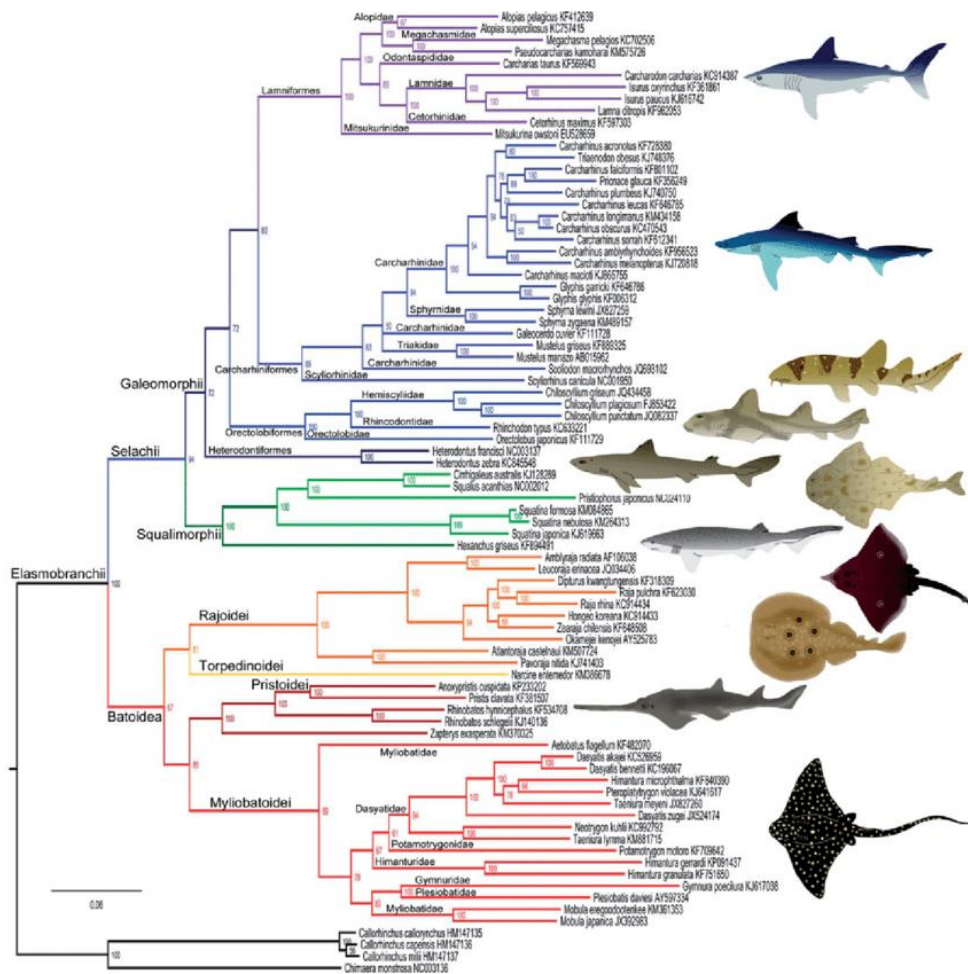
1. Εισαγωγή

1.1 Η Βιοποικιλότητα των Χονδριχθύων

Οι Χονδριχθύες είναι μια ομοταξία Σπονδυλωτών που αποτελούνται από ψάρια με χόνδρινο αντί για οστέινο σκελετό. Υπάρχουν δύο κύριες υφομοταξίες των Χονδριχθύων, οι Ολοκέφαλοι και οι Ελασμοβράγχοι. Οι τελευταίοι αποτελούνται από καρχαρίες (Σκουαλεόμορφους και Γαλεόμορφους), ραγίδες και σαλάχια και εκπροσωπούν το 96% των ειδών που έχουν καταγραφεί. Οι Ολοκέφαλοι (Χιμαιροειδή) από την άλλη αποτελούν μόλις το 4% των ειδών των Χονδριχθύων. Το κοινό γνώρισμα όλων των μελών αυτής της Ομοταξίας είναι ο χόνδρινος σκελετός. Αυτός ο σκελετός συχνά είναι εύκαμπτος αλλά ποτέ πραγματικά δεν οστεοποιείται.

Οι Χονδριχθύες πιστεύεται ότι προέκυψαν εξελικτικά από μία ομάδα αρχέγονων ιχθύων, τους Ακανθόδιους (Acanthodii). Αρχικά είχε προταθεί ότι ήταν κοντά εξελικτικά με τους Οστεϊχθύες, όμως η ανακάλυψη του *Entelognathus* (ένα Πλακόδερμο που υπήρξε πριν από 429 εκατομμύρια χρόνια) και οι πολλές παρατηρήσεις των χαρακτηριστικών των Ακανθόδιων δείχνουν ότι οι Οστεϊχθύες προέκυψαν από προγόνους σαν τους Πλακόδερμους. Κάποια χαρακτηριστικά που πρωτίτερα πιστεύαμε ότι τα εμφάνιζαν αποκλειστικά οι Ακανθόδιοι είναι παρόντα σε βασικούς Χονδριχθύες (Maisey et al. 2017). Απολιθώματα που ήταν αδιαμφισβήτητα Χονδριχθύων χρονολογούνται πριν από 395 εκατομμύρια χρόνια, κατά το μέσο Δεβόνιο. Στην αρχή του πρώιμου Δεβόνιου (419 εκατομμύρια χρόνια πριν) οι ιχθύες με γνάθους είχαν διαχωριστεί σε 3 διακριτές ομάδες : τους Πλακόδερμους που τώρα έχουν εξαφανιστεί, τους Οστεϊχθύες και τον κλάδο που περιέχει πολλά πρώιμα είδη Χονδριχθύων. Οι σύγχρονοι αντιπρόσωποι των Οστεϊχθύων εμφανίστηκαν στο τέλος του Σιλούριου ή του πρώιμου Δεβόνιου, ενώ το πρώτο είδος που εμφανίστηκε σε αφθονία, οι Κλαδοσελάχοι (*Cladoseleche*), εμφανίστηκαν στους ωκεανούς κατά το Δεβόνιο (Maisey et al. 2017).

Η Μπεϋζιανή ανάλυση μοριακών δεδομένων προτείνει ότι οι Ολοκέφαλοι και οι Ελασμοβράγχοι διαφοροποιήθηκαν κατά το Σιλούριο (421 εκατομμύρια χρόνια πριν) και ότι οι καρχαρίες και τα Βατοειδή διαχωρίστηκαν κατά το Λιθανθρακοφόρο πριν από 306 εκατομμύρια χρόνια (Maisey et al. 2017, Burrow et al. 2016).



Εικόνα 1 (Amaral et al. 2017)

Ο χόνδρινος σκελετός των Χονδριχθών αρχικά θεωρήθηκε πρωτόγono χαρακτηριστικό, αλλά δύο σειρές αποδεικτικών στοιχείων αντικρούουν αυτή τη θεωρία. Οι πρόσφατες φυλογενετικές αναλύσεις δείχνουν πως οι Ακανθόδιοι (καρχαρίες) ανήκουν στο stemgroup των Χονδριχθών (Zhu et al. 2012, Coates et al. 2017). Αυτή η εξαφανισμένη ομάδα ψαριών, εμφανίστηκε για πρώτη φορά στο απολιθωμένο ρεκόρ κατά την περίοδο των Ορδοβικών (444 εκατομμύρια χρόνια πριν, Karatajūtė-Talimaa και Predtechenskyj 1995, Brazeau και Friedman 2015), είχαν ένα επιφανειακό οστό που καλύπτει τμήματα του κεφαλιού και τα μπροστινά (θωρακικά) πτερύγια. Η πλειοψηφία των Ακανθόδιων έχουν οστείνια αγκάθια που υποστηρίζουν κάθε πτερύγιο και συχνά μια σειρά από αγκάθια μεταξύ των ζευγαριών των πτερυγίων (Janvier 1996), αν και κάποιοι Ακανθόδιοι δεν έχουν αυτά τα αγκάθια (Burrow και Young 1999). Δεύτερον, απολιθώματα καρχαριών που έχουν ανακαλυφθεί σε ενδιάμεσα στάδια εξέλιξης του χόνδρινου σκελετού, ένας τύπος οστεοποιημένου χόνδρου που είναι μοναδικός για τους Χονδριχθές δείχνουν ότι εξελίχθηκαν από έναν πρόγονο που είχε

οστέινο σκελετό (Long et al. 2015). Έτσι, οι Χονδριχθύες έχουν χάσει το χαρακτηριστικό των οστών των Οστειχθών (Actinopterygii, Rylletai. 2014) και εξελίχθηκε επιφανειακή οστεοποίηση (tesserae) του χόνδρινου σκελετού τους. Οι αρτίγονοι ελασμοβράγχοι εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες, τα Γάλεα (Galea) και τα Σκουάλεα (Squalea). Τα Σκουάλεα απαρτίζουν περίπου τα δύο τρίτα των αρτίγωνων Ελασμοβράγχων και χαρακτηρίζονται γενικότερα ως λιγότερο προηγμένα εξελικτικά από τα Γάλεα.

Οι Καρχαρίες είναι οι Ετεροδοντόμορφοι (Heterodontiformes), Ορεκτολοβόμορφοι (Orectolobiformes), Καρχαρινόμορφοι (Carcharhiniformes) και οι Λαμνόμορφοι (Lamniformes). Από αυτούς οι Ετεροδοντόμορφοι χαρακτηρίζονται ως η πιο αρχέγονη ομάδα και οι Καρχαρινόμορφοι ως η πιο πρόσφατη (Martin, 2004).

Οι Χονδριχθύες έχουν εξελιχθεί πάνω από 400 εκατομμύρια χρόνια πριν και έχουν παρουσιάσει εντυπωσιακές μορφολογικές διαφοροποιήσεις. Έχουν επιβιώσει με αξιόλογο πληθυσμό από γεγονότα μαζικής εξαφάνισης που επηρέασαν όλο το εύρος των σπονδυλωτών στο τέλος των γεωλογικών περιόδων Devonian και Permian, και παρόλο που έχουν χάσει ένα κομμάτι της επικράτειας τους, ιδιαίτερα στο Παλαιοζωικό, η οικολογική τους παρουσία είναι πολύ σημαντική ακόμη και σήμερα. Οι Χονδριχθύες αποτελούν εξαιρετικό αναπτυξιακό μοντέλο για την κατανόηση της εξέλιξης των Γναθόστομων, που διαθέτει μια σειρά από φυλογενετικά βασικούς χαρακτήρες και μακρά κύηση περιόδους *in vivo* για να επιτρέπεται αναπτυξιακός χειρισμός. Το ευρύ φάσμα οικολογικών προσαρμογών έχει καταστήσει επιτυχημένους τους χονδριχθύες στο παρελθόν, αλλά πολλά είδη απειλούνται ολοένα και περισσότερο με εξαφάνιση λόγω της αλιείας, την καταστροφή ενδιαιτημάτων και της κλιματικής αλλαγής που προκαλείται από ανθρώπινες δραστηριότητες.

1.2 Ελασμοβράγχοι στη Μεσόγειο

Έχουν καταγραφεί 1282 είδη Χονδριχθών παγκοσμίως μέχρι σήμερα και από αυτά τα 1226 είναι Ελασμοβράγχοι και 56 μόλις είναι Ολοκέφαλοι. Οι Χονδριχθύες είναι ευρέως εξαπλωμένοι σε όλα τα θαλάσσια περιβάλλοντα και μπορούν να βρεθούν κάποιες φορές σε

εσωτερικά ύδατα. Η ταξινόμηση τους όμως δεν είναι ακριβώς ξεκάθαρη και οι απόψεις για μερικά είδη δίστανται. Ιδιαίτερα ταξινομικά θέματα εμφανίζονται έντονα σε είδη της Μεσογείου, όπου δεν υπάρχει συχνά σταθερότητα στην ονοματολογία και στις αναλύσεις που γίνονται. Επίσης η βιοποικιλότητα τους παραμένει σχετικά ακαθόριστη εφόσον υπάρχουν διαφωνίες για την εμφάνιση και την αφθονία κάποιων ειδών σε διάφορες λεκάνες και υπολεκάνες. Η άφιξη αλλόχθονων ειδών διαμέσου της Διώρυγας του Σουέζ, κυρίως Ινδο – Ειρηνικής προέλευσης έχουν εμπλουτίσει τις λεκάνες της Ανατολικής Μεσογείου. Ωστόσο η έντονη αλιευτική πίεση έχει οδηγήσει πολλούς αυτόχθονους πληθυσμούς Χονδριχθύων σε εξάντληση, ακόμη και σε εξαφάνιση.

1.3 Πληθυσμιακές μελέτες στη Μεσόγειο

Οι Χονδριχθύες, που περιλαμβάνουν τα είδη ελασμοβράγχιοι (καρχαρίες και βάτη) και ολοκέφαλοι (chimaeras), είναι μια σχετικά μικρή ομάδα στη Μεσόγειο Θάλασσα (89 είδη) που παίζουν σημαντικό ρόλο στα οικοσυστήματα όπου βρίσκονται. Προς το παρόν, πολλά είδη αυτής της ομάδας βρίσκονται σε κίνδυνο λόγω των ανθρωπογενών επιπτώσεων, συμπεριλαμβανομένης της αλιευτικής δραστηριότητας. Οι ανάλυση και η μελέτη της χωρικής κατανομής αυτών των ειδών έχει μεγάλη σημασία για την κατανόηση του οικολογικού τους ρόλου και για την αποτελεσματική διαχείριση των πληθυσμών τους, ιδίως εάν επηρεάζονται από την αλιεία.

Οι χονδριχθύες είναι ψάρια με σπόνδυλους από χόνδρο (σε αντίθεση με τους οστέιχθύες), τους οποίους αποτελούν δυο υποομοταξίες, οι ελασμοβράγχιοι (καρχαρίες, σαλάχια) και οι ολοκέφαλοι (χίμαιρες), ευημερούσαν σε διάφορα οικοσυστήματα για πάνω από 400 εκατομμύρια χρόνια. Παρά την επιτυχία τους, τις τελευταίες δεκαετίες κινδυνεύουν από την αλιεία και άλλες ανθρώπινες δραστηριότητες. Οι χονδριχθύες διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στα οικοσυστήματα όπου βρίσκονται, καθώς οι πολλοί από αυτούς είναι οι ανώτεροι καταναλωτές. Ορισμένα είδη ελασμοβραγχιών αντιμετωπίζουν μεγάλη μείωση του πληθυσμού τους στις περιοχές κατανομής. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να βελτιωθεί η γνώση τους γύρω από τις περιοχές που ζουν και αναπαράγονται τα διάφορα είδη.

Ωστόσο, όχι περισσότερα από πέντε είδη βατών θα μπορούσαν να θεωρηθούν ενδημικά είδη της Μεσογείου σύμφωνα με τις πληθυσμιακές μελέτες: ο Βάτος της Μάλτας (*Leucoraja melitensis*), ο Στικτόβατος (*Raja polystigma*), Αστρόβατος (*Raja asterias*), ο Τραχύβατος (*Raja radula*) και το διαβολόψαρο (*Mobula mobular*).

Επιπλέον εκτός από τα ενδημικά είδη υπάρχουν και τα είδη-μετανάστες, όπως αυτά που διέρχονται στη μεσόγειο από τη διώρυγα του Σουέζ. Τα τέσσερα είδη χονδιχθύες τα οποία ανήκουν στη κατηγορία των λεσσεψιανών μεταναστών είναι ο *Carcharhinus altimus*, ο *Carcharhinus melanopterus*, το είδος *Himantura uarnak* και *Torpedo sinuspersici* (αν και η καταγωγή του είδους *Carcharhinus altimus* είναι αμφιλεγόμενη). Από την άλλη πλευρά, ξενικά είδη στη Μεσόγειο Θάλασσα βρέθηκαν τα ακόλουθα: *Carcharhinus falciformis*, *Pristis pristis*, *Pristis pectinata* και *Hydrolagus mirabilis*. Ιστορικά, η ποικιλότητα των χονδιχθύων ήταν μεγαλύτερη στη δυτική Μεσόγειο Θάλασσα και ιδιαίτερα στα παράκτια ύδατα των χωρών της Βόρειας Αφρικής. Καθώς η ποικιλότητα φαίνεται να είναι ελαφρώς χαμηλότερη στις βορειοδυτικές μεσογειακές χώρες.

Συνεπώς μέσα στη Μεσόγειο, η κατανομή των ελασμοβράγχιων δεν είναι ομοιογενής. Ορισμένες περιοχές θεωρούνται σημαντικοί βιότοποι για διάφορους καρχαρίες και τα σαλάκια. Ωστόσο, χρειάζεται να γίνουν περαιτέρω έρευνες σχετικά με τα κυρίαρχα ενδιαίτηματα στις περιοχές της Μεσογείου. Για παράδειγμα η Τυνησία αποτελεί το μέρος που αναπαράγεται ο λευκός καρχαρίας *C. carcharias* (κέντρο της Τυνησίας), ο *Carcharhinus plumbeus* (Nardo 1827) (Κόλπος Gabès, νότια της Τυνησίας) ακόμα και για το είδος *Glaucostegus cemiculus* (Geoffroy Saint-Hilaire 1817).

Το είδος *Hexanchus griseus* είναι επίσης ένα κοινό είδος στη Μεσόγειο. Συγκεκριμένα σε πληθυσμιακές μελέτες φάνηκε ότι είναι πιο συνηθισμένο στη δυτική λεκάνη, ενώ είναι λιγότερο συχνό στη ανατολική λεκάνη. Το *Sphyrna zygaena* ήταν το επόμενο άφθονο είδος στα νερά ανατολικά της Ιταλίας και το Ιόνιο πέλαγος.

Το είδος *Cetorhinus maximus* έδειξε ομοιογενή κατανομή κατά μήκος των ακτών της Καλαβρίας. Το οποίο είδος θεωρείται σχετικά σπάνιο αλλά σταθερού πληθυσμού είδος, όπως επίσης αναφέρεται σε πολλές περιοχές της Μεσογείου (Sims et al. 2000). Η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης του καρχαρία αυτού παρατηρείται από την άνοιξη έως το φθινόπωρο. Το είδος *Alopias vulpinus* παρουσίασε συχνότερη εμφάνιση στις ακτές του Ιονίου το οποίο συμφωνεί και με πολλές πηγές όπως των Megalofonou et al. όπου παρατήρησαν υψηλότερη εμφάνιση αυτού του είδους στην ανατολική Μεσόγειο.

Καθώς επίσης και τα είδη *Carcharias taurus*, *Carcharhinus limbatus*, *Carcharhinus obscurus* και *Sphyrna mokarran* παρουσιάζουν μια περιστασιακή εμφάνιση στα νερά της Μεσογείου. (Boero & Carli 1977, Compagno et al. 2005, Serena 2005). Επιπλέον τα είδη *Alopias superciliosus*, *Carcharhinus altimus*, *Carcharhinus brachyurus*, *Carcharhinus falciformis* και *Echinorhinus brucus* έχει μελετηθεί ότι βρίσκονται στην δυτική λεκάνη της μεσογείου (Serena 2005, Zenetos et al. 2010). Το είδος *Odontaspis ferox* έχει βρεθεί ότι κατοικεί στην Κεντροδυτική Μεσόγειο και βρίσκεται περιστασιακά στα Ιταλικά νερά της Τυρρηνικής Θάλασσας της Καλαβρίας. Το είδος *Sphinx lewinii* ήταν γνωστό ότι βρίσκεται μόνο στη δυτική Μεσόγειο στο Γιβραλτάρ και στις Βαλεαρίδες Νήσους.

1.4 Κεντρόνι ή Ακανθίας (*Squalus acanthias*)

Το γένος *Squalus* (Linnaeus 1758) είναι ένα από τα πιο ταξινομικά προβληματικά γένη καρχαριών. Το γένος *Squalus* περιλαμβάνει 25 είδη, 11 εκ των οποίων έχουν βρεθεί πρόσφατα στον Ινδο-Δυτικό Ειρηνικό (Last et al. 2007). Στη Μεσόγειο Θάλασσα, δύο είδη εμφανίζονται πιο συχνά (Bradai et al. 2004, Serena et al. 2009): το κεντρόνι *Squalus acanthias* (Linnaeus 1758) και το είδος *Squalus blainvillei* (Risso 1827). Ωστόσο, ένα τρίτο είδος έχει καταγραφεί ως *Squalus megalops* από τους Muñoz-Chápoli et al. (1984). Το *Squalus megalops* (Macleay 1881) έχει καταγραφεί σε πολλές περιοχές του ανατολικού Ατλαντικού και Ινδο-Δυτικού Ειρηνικού (Compagno 2005). Ωστόσο δεν έχουν γίνει αρκετές μελέτες για την διάκριση των ειδών που ανήκουν στο γένος.

Για παράδειγμα, έχουν περιγραφεί 20 είδη την τελευταία δεκαετία στον Ινδοειρηνικό (Last et al. 2007, Ebert et al. 2010, White & Iglesias 2011) και στο Νότιο Ατλαντικό (Viana & de Carvalho 2016, Viana et al. 2016). Αυτές οι πρόσφατες ταξινομικές μελέτες έχουν υπερδιπλασιάσει τον αριθμό των έγκυρων ειδών στο γένος και έχουν αποκαλύψει ένα σημαντικό ποσό «κρυμμένης» ποικιλομορφίας. Ως αποτέλεσμα, τα μισά είδη του *Squalus* φαίνεται να έχουν ανεπαρκή δεδομένα σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση για τη Διατήρηση της Φύσης (IUCN) και Κόκκινη λίστα απειλούμενων ειδών (IUCN 2015). Επιπλέον, η αβέβαιη ταξινομική κατάσταση πολλών ειδών του *Squalus* εμποδίζουν τη συλλογή επαρκών πληροφοριών σε επίπεδο ειδών για την ομάδα αυτή, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να ελεγχθεί σωστά ο αριθμός υψηλά αλιευόμενων ειδών. Παρόλα αυτά, υπάρχουν πολλές δυσκολίες

στην ακριβή αναγνώριση των διαφορετικών ειδών, ιδιαίτερα στις περιοχές του ανατολικού Ατλαντικού και της Μεσογείου (π.χ. Bonello et al., Marouani et al. 2011)

Ένας λόγος που συμβαίνει αυτό είναι η χρήση διαφορούμενων διαγνωστικών μεθόδων για την τη διάκριση των διαφορετικών ειδών του Ανατολικού Ατλαντικού και της Μεσογείου (μορφολογικά χαρακτηριστικά) διότι υπάρχει υψηλή μορφολογική ομοιότητα μεταξύ των ειδών. Επιπλέον πολλά είδη έχουν πολύπλοκη ταξινομική ιστορία με αποτέλεσμα την ασάφεια και την έλλειψη λεπτομερειών στις αρχικές περιγραφές. Αυτός είναι και ο λόγος που υπάρχουν αντίθετα αποτελέσματα μεταξύ πολλών ερευνών.



Εικόνα 2 : *Squalus acanthias* (πηγή: Robin Street)

Το κεντρόνι ή Ακανθίας (*Squalus acanthias*) περιγράφηκε αρχικά από τον Linnaeus (1758) στα ευρωπαϊκά ύδατα («Habitat in Oceano Europaeo») και θεωρείται ένα από τα είδη καρχαρία με τεράστια εξάπλωση, αντιτροπική κατανομή στον Βόρειο και Νότιο Ατλαντικό, και στο Βόρειο και Νότιο Ειρηνικό ωκεανό (Compagno 1984). Είναι επίσης γνωστό ότι βρίσκεται και στη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα (Compagno 1984).

Το είδος *Squalus acanthias* προβληματίζει τους ερευνητές ως προς το αν είναι μονοειδικό ή περιέχει περισσότερα από ένα είδος. Οι Myagkov & Kondyurin (1986) πρότειναν ότι ο *S. acanthias* μπορεί να περιλαμβάνει τουλάχιστον τέσσερα υποείδη. Οι Ledoux (1970) και Merret (1973) επεσήμαναν μια μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των ειδών *S. blainvillei* και *S. megalops*, σε σύγκριση με τους *S. acanthias* και *S. asper*.

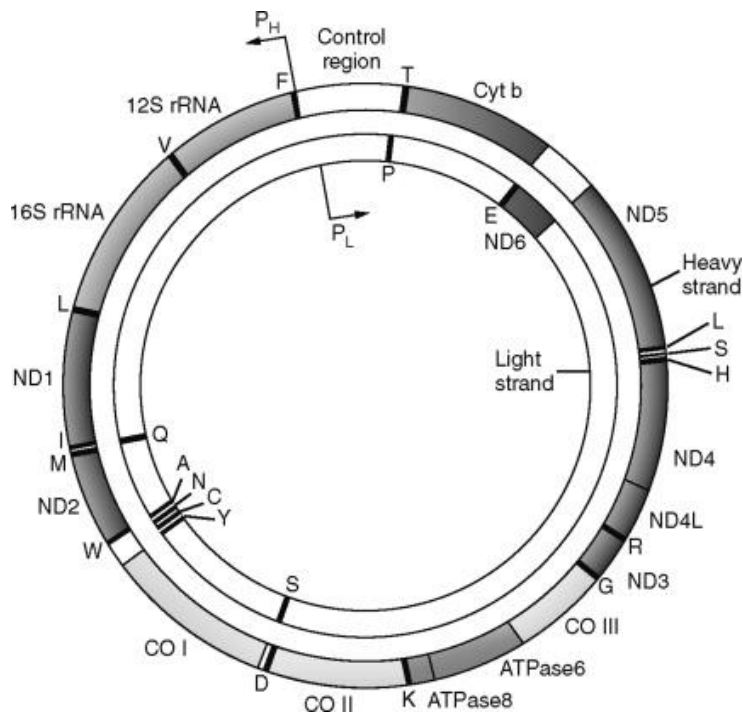
Επιπλέον, οι Bass et al. (1976) πρότειναν νέα μορφολογικά χαρακτηριστικά για τη διάκριση μεταξύ ειδών για το γένος *Squalus*, τα οποία στη συνέχεια μελετήθηκαν και βρέθηκαν αναποτελεσματικά στην αξιολόγηση του πληθυσμού του είδους. Το *Squalus acanthias* είναι

το είδος που διακρίνεται πιο εύκολα από όλα τα άλλα του ίδιου γένους. Αυτό οφείλεται στο συνδυασμό δύο διαγνωστικών χαρακτηριστικών, δηλαδή της παρουσίας ραχιαίων κηλίδων στο σώμα (αν και σε μερικά δείγματα υπάρχει πιθανότητα να λείπουν) και το σχήμα της εσωτερικής άκρης του θωρακικού πτερυγίου (Bigelow & Schroeder 1948, 1957), το οποίο είναι μοναδικό για το *S. acanthias* (εκτός από το αδελφό είδος του Βόρειου Ειρηνικού *S. suckleyi*).

Οι φυλογεωγραφικές αναλύσεις που επικεντρώθηκαν στον Ατλαντικό δείχνουν ότι οι πληθυσμοί του είδους *Squalus acanthias* κατάγονται από τον Ειρηνικό και έπειτα μετανάστευσαν στον Ατλαντικό ωκεανό μέσω των ακτών της Νότιας Αμερικής. Επιπλέον, τα διαθέσιμα δεδομένα υποστηρίζουν έντονα τον ταξινομικό διαχωρισμό του *S. acanthias* Βόρειου Ειρηνικού (Verissimo et al. 2010).

Ωστόσο στην μελέτη των Verissimo et al. αρχικά κάποιες ακολουθίες μεσογειακών δειγμάτων ταυτοποιήθηκαν ως *S. Acanthias*, παρόλο που αποδείχθηκε λανθασμένη. Αυτή η λάθος αναγνώριση αντικατοπτρίζει την μπερδεμένη ταξινομική κατάσταση του είδους. Επιπλέον σε πληθυσμιακές μελέτες για το είδος *S. Acanthias* το είδος βρέθηκε στα νερά της Μεσογείου, στις Βαlearίδες Νήσους, καθώς και γύρω από την Κρήτη, την Κύπρο και το Αιγαίο πέλαγος.

1.5 Γονίδιο COI



Εικόνα 3: Παράδειγμα γονιδιώματος μιτοχονδρίου.

Τα μιτοχόνδρια οφείλουν την προέλευση τους σε ελεύθερα προκαριωτικά κύτταρα που εισέβαλαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα και αφομοιώθηκαν. Τα οργανίδια αυτά συμβάλουν στη κυτταρική αναπνοή και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα όλων των αερόβιων ευκαρυωτικών κυττάρων (Russell P. 2009). Συχνά το γονιδίωμα των μιτοχονδρίων (mtDNA) ενός οργανισμού χρησιμοποιείται για την ταξινομική και εξελικτική μελέτη των διαφόρων οργανισμών. Το mtDNA αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την μελέτη των γενετικών σχέσεων μεταξύ πληθυσμών και ατόμων λόγω της εύκολης απομόνωσης του, την έλλειψη ανασυνδυασμού, τον μεγάλο αριθμό αντιγράφων του καθώς και τη συντήρηση της αλληλουχίας του και τους διαφορετικούς ρυθμούς εξέλιξης των διαφορετικών τμημάτων του μορίου. Για την φυλογενετική ανάλυση συχνά μελετούνται τα γονίδια που κωδικοποιούν τις τρεις υπομονάδες (COI, COII, COIII) της κυτοχρωμικής c οξειδάσης (Εικόνα 3).

Το μεταλλοένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης μεταξύ άλλων είναι σημαντικό για την αναπνευστική αλυσίδα των αερόβιων οργανισμών, αποτελεί βασικό ένζυμο για τον αναερόβιο μεταβολισμό και συμβάλει στην παραγωγή ATP. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από μια αίμη και ένα ιόν χαλκού το οποίο είναι δεσμευμένο σε τρεις ιστιδίνες (Χαραλαμπίδης 2007). Η υπομονάδα I περιέχει 2 μόρια αίμης, την cub-heme a₃ (υψηλού spin αίμη) η οποία σε συνδυασμό με το Ιον Χαλκού αποτελούν το κέντρο του ενζύμου και

μια χαμηλού spin αίμη η οποία προμηθεύει το καταλυτικό κέντρο με ηλεκτρόνια (Berg et al. 2013). Το DNA barcoding χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια για την ταυτοποίηση και τη μελέτη της συγγένειας των άγνωστων οργανισμών. Η τεχνική του DNA barcoding περιλαμβάνει την σύγκριση ενός τμήματος του μιτοχονδριακού DNA, της υπομονάδας I κυτοχρωμικής c οξειδάσης (COI) από ταξινομικά άγνωστα δείγματα με μια βιβλιοθήκη γνωστών γονοδιωμάτων.

Η χρήση του COI είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη και έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλά είδη θηλαστικών, ιχθύων (Gkafas et al. 2015) , φυτών (Kress et al 2005) , νηματόδων (Sofie Derycke et al. 2010) αλλά και σε βακτήρια και μύκητες (Lebonah et al. 2014, Wang et al. 2005).

Πλεονεκτήματα της χρήσης του γονιδίου COI

I. Υψηλό ποσοστό μετάλλαξης λόγω του περιορισμένου συστήματος επιδιόρθωσης (5-10 φορές του πυρηνικού DNA). Τα μιτοχόνδρια εισάγουν πολλές πρωτεΐνες και μεταβολίτες από το ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα. Αλλά δεν έχουν όλα τα ένζυμα επιδιόρθωσης DNA

II. Διατηρούν τη δομή του γονιδιώματος. Με την πάροδο του χρόνου, τα βακτηριακά γονιδιώματα τείνουν να ανακατεύονται με χρωμοσωμική αναστροφή, παρεμβολές, κ.λπ. Τα μιτοχονδρικά γονιδιώματα τείνουν να είναι σχετικά σταθερά μέσα σε μια ομάδα ενός είδους. Ενώ υπάρχει διαφοροποίηση μεγαλύτερη του 2% στα άτομα συγγενικών ειδών οπότε είναι εύκολο να χρησιμοποιηθούν σε φυλογενετικές αναλύσεις.

III. Η περιοχή της αλληλούχησης του COI είναι απλή χωρίς να δημιουργούνται κενά.

IV. Έλλειψη ανασυνδυασμού του γονιδίου καθώς προέρχεται μόνο από έναν «γονέα».

Διαφορετικά γονίδια, ακόμη και διαφορετικές περιοχές ενός μόνο γονιδίου, εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς. Ένα τμήμα γονιδίου που εξελίσσεται ταχέα είναι αποτελεσματικός τρόπος για να αξιολογηθεί η διαφορά μεταξύ των ατόμων ενός είδους ή μεταξύ των υποειδών.

Σκοπός της εργασίας είναι η ανάλυση πλήθυσμιακής γενετικής του *Squalus acanthias* στη Μεσόγειο Θάλασσα για την κατανόηση των παραγόντων γενετικής διαφοροποίησης και την εκτίμηση της επίδρασης κλιματικών αλλαγών στο παρελθόν στη δημογραφία του είδους.

2. Υλικά και μέθοδοι

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εργασία ήταν 73 και αποτελούνταν από μυϊκό ιστό καρχαριών, από τη Δυτική Μεσόγειο και Ανατολική Μεσόγειο. Όλα τα δείγματα ήταν αποθηκευμένα στους - 20° C μέχρι την διεξαγωγή της έρευνας. Τα δείγματα της δυτικής Μεσογείου που χρησιμοποιήθηκαν, βρέθηκαν από ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες από την βάση δεδομένων.ncbi. Ενώ τα δείγματα του Αιγαίου αναλύθηκαν από το εργαστήριο με τη παρακάτω διαδικασία.

Τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γενετικού υλικού ήταν:

- ➔ Λαβίδα
- ➔ Νυστέρι
- ➔ Τρυβλία Petri
- ➔ Eppendorf tubes (1,5 ml)
- ➔ Falcon tubes (15ml)
- ➔ Πουάρ
- ➔ Πιπέτα 2-20 μl
- ➔ Πιπέτα 20-200 μl
- ➔ Πιπέτα 100-1000 μl
- ➔ Ρύγχη (tips)

Accession numbers	Γεωγραφική προέλευση	Βιβλιογραφία
ELAME211-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME251-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME252-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME260-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME266-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME267-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME269-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME361-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME363-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME366-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME369-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME370-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME374-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME401-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME405-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME408-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME413-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME415-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME417-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
ELAME418-09	Ιταλία	Mally R et al. 2018
KX949889	Ισπανία	Verissimo A et al. 2016
KX949915	Ισπανία	Verissimo A et al. 2016
KX949890	Ισπανία	Verissimo A et al. 2016
KX949891	Ισπανία	Verissimo A et al. 2016
KX949892	Ισπανία	Verissimo A et al. 2016
KX949893	Ισπανία	Verissimo A et al. 2016
KX949894	Ισπανία	Verissimo A et al. 2016
JN641252.1	Αίγυπτος	Moftah M. et al. 2011
JN641251.1	Αίγυπτος	Moftah M. et al. 2011
JN641250.1	Αίγυπτος	Moftah M. et al. 2011
JN641249.1	Αίγυπτος	Moftah M. et al. 2011
JN641248.1	Αίγυπτος	Moftah M. et al. 2011
ELAME235-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME237-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME238-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME239-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME240-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME241-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME242-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME255-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME256-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME257-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME258-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME259-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME263-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME265-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME271-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME273-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME274-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME275-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME276-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
ELAME277-09	Κροατία	Mally R et al. 2018
KX949895	Κύπρος	Verissimo et al. 2016
KX949896	Κύπρος	Verissimo et al. 2016
KX949897	Κύπρος	Verissimo et al. 2016
KX949898	Κύπρος	Verissimo et al. 2016
KX949899	Κύπρος	Verissimo et al. 2016
KX949900	Κύπρος	Verissimo et al. 2016
KX949901	Κύπρος	Verissimo et al. 2016
KX949902	Κύπρος	Verissimo et al. 2016
KX949903	Κύπρος	Verissimo et al. 2016
KX949904	Κύπρος	Verissimo et al. 2016
KX949916	Κύπρος	Verissimo et al. 2016

2.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε ακολουθώντας τροποποιημένη μέθοδο χλωροφορμίου / ισοαμυλικής αλκοόλης (Sambrook et al. 1989).

Τα βήματα τα οποία ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Μικρό κομμάτι ιστού ($\approx 0,01$ g) τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο Eppendorf.
2. Στο Eppendorf προστέθηκαν:
 - 500 μ l TNE Buffer (10Mm Tris-HCl, 100Mm NaCl, 1Mm EDTA)
 - 80 μ l SDS περιεκτικότητας 10%
 - 10 μ l Πρωτεϊνάση K (ProteinaseK) συγκέντρωσης 20mg/ml
 - 150 μ l NaCl
 - 100 μ l Tris-HCl
3. Τα Eppendorf tubes τοποθετήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο στους 55°C - 65°C για 12 ώρες έτσι ώστε να διαλυθεί ο ιστός πλήρως και να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες.
4. Ακολούθησε λιτριβίση του ιστού με έμβολο μέσα στο παραπάνω διάλυμα.
5. Μετά την επώαση προστέθηκε διάλυμα συνολικού όγκου 600 μ l (300 μ l φαινόλη ,300 μ l χλωροφόρμιο/ ισοαμυλική αλκοόλη (24:1))
6. Τα δείγματα ανακινήθηκαν ελαφρώς για 10 λεπτά
7. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 12.000 στροφές το λεπτό (rpm) στους 20°C με σκοπό τον διαχωρισμό των φάσεων.
8. Μετά το τέλος της φυγοκέντρισης λήφθηκε προσεκτικά η υδατική ή υπερκείμενη φάση (≈ 600 μ l) και τοποθετήθηκε σε νέο Eppendorf.
9. Στο νέο Eppendorf προστίθενται εκ νέου 600 μ l χλωροφορμίου / ισοαμυλικής με αναλογία 24:1.
10. Τα δείγματα ανακινήθηκαν ελαφρώς για 10 λεπτά
11. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 12.000 στροφές το λεπτό (rpm) στους 20°C.
12. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρισης, λήφθηκε ξανά η υπερκείμενη φάση (≈ 500 μ l) και τοποθετήθηκε σε καινούργιο Eppendorf.
13. Στη συνέχεια προστέθηκαν: 1000 μ l αιθανόλης 100% (EtOH) και 15 μ l οξικού νατρίου 3M (Sodium acetate)

14. Τα Eppendorf τοποθετήθηκαν στους -20°C για 30 λεπτά.
15. Έπειτα έγινε φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 12.000 rpm στους 20°C .
16. Μετά το τέλος της φυγοκέντρισης παρατηρείται λευκό ίζημα (DNA pellet) στο κάτω μέρος του Eppendorf. Αφαιρέθηκε προσεκτικά το περιεχόμενο του Eppendorf χωρίς να φύγει η πελέτα.
17. Προστέθηκαν 200μl παγωμένης αιθανόλης 70%.
18. Έγινε ξανά φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 12.000 rpm στους 20°C .
19. Αφαιρέθηκε η υπόλοιπη αιθανόλη και τα Eppendorf τοποθετήθηκαν με ανοικτό πώμα σε κλίβανο επώασης στους 55°C έτσι ώστε να εξατμιστούν τελείως τα υπολείμματα αιθανόλης.
20. Τέλος, προστέθηκαν 50 μl TE Buffer.

2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ανίχνευση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8 % σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE buffer (Tris-base, acetic acid, EDTA) το οποίο παρασκευάστηκε με συγκέντρωση 50x και αραιώθηκε κατά 50 φορές για να χρησιμοποιηθεί έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1x. Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάστηκε με τη διάλυση 0,48 gr αγαρόζης (ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας) σε 60ml διαλύματος TAE buffer 1x. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά και θερμάνθηκε μέχρι οι νιφάδες αγαρόζης να διαλυθούν πλήρως και να ομογενοποιηθούν. Αφού η θερμοκρασία του διαλύματος μειώθηκε, προστέθηκε μικρή ποσότητα Βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium Bromide) $\approx 2,5\mu\text{l}$ (η οποία επιτρέπει τον φθορισμό του DNA όταν αυτό εκτεθεί σε ακτίνες UV) και έγινε ανακίνηση έτσι ώστε να διαλυθεί πλήρως το βρωμιούχο αιθίδιο και τοποθετήθηκε στο εκμαγείο.

Το εκμαγείο είχε προετοιμαστεί κλείνοντας τις ανοικτές πλευρές του με χαρτοταινία και τοποθετώντας τα «χτενάκια», που χρησιμεύουν ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων (πηγάδια). Η ρευστή αγαρόζη χύνεται στο εκμαγείο με προσοχή, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Αν δημιουργηθούν φυσαλίδες, φροντίζουμε να τις απομακρύνουμε με τη βοήθεια ενός tip. Ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης, το πήκτωμα σχηματίζεται σε χρονικό διάστημα 15-30 min. Αφού πήξει η αγαρόζη αφαιρούνται προσεκτικά τα «χτενάκια», για να αποφευχθεί τυχόν διάτρηση του πυθμένα των θέσεων

υποδοχής των δειγμάτων. Έπειτα το gel τοποθετήθηκε μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία συμπληρώθηκε TAE buffer μέχρι να καλυφθούν τα πηγάδια. Ο συνολικός όγκος που τοποθετείται σε κάθε πηγάδι είναι περίπου 4,5 μl : 2,5 μl DNA και 2 μl χρωστική Blue-bromophenol (Invitrogen). Η χρωστική είναι απαραίτητη στην ηλεκτροφόρηση καθώς αποτελεί έναν τρόπο σήμανσης του DNA κατά την διαδικασία του τρεξίματος μέσα στο gel και επιπλέον προσθέτει μοριακό βάρος στο DNA και έτσι το εξαναγκάζει να καθίσει μέσα στο πηγάδι. Φορτώνεται ένα δείγμα DNA σε κάθε πηγάδι αφού αναμιχθούν όλα τα συστατικά με την τεχνική bypipetting. Σε ένα επιπλέον πηγάδι φορτώνεται συνολική ποσότητα 2 μl (1 μl μάρτυρα με κομμάτια DNA μοριακού βάρους 1 Kb και 1 μl χρωστική Blue-bromophenol) . Στη συνέχεια η συσκευή συνδέεται σε παροχή τάσης 104volt για 20-30 λεπτά. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε φωτογραφική μηχανή (DNR, MiniBisBio-ImagingSystems) υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και λήφθηκε η εικόνα του πηκτώματος.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Το τελικό πρωτόκολλο PCR που εφαρμόστηκε προέκυψε μετά από πολλές δοκιμές σε διάφορες θερμοκρασίες. Στο σύνολο το πρωτόκολλο αποτελείται από 30 κύκλους ενώ τα στάδια αναλυτικά ήταν:

Πρώτη αποδιάταξη : 95°C για 15:00 λεπτά

1ο Βήμα: 95°C για 1 λεπτό

2ο Βήμα: 58°C για 30δευτερόλεπτα

3ο Βήμα: 72°C για 1 λεπτό

4ο Βήμα: Επανάληψη του 1ου, 2ου και 3ου βήματος για 29 φορές

5ο Βήμα: Τελική επιμήκυνση, 72°C για 15:00 λεπτά

6ο Βήμα: 4°C μέχρι να βγουν τα δείγματα από τον κυκλοποιητή (PCR).

Επίσης ακολουθήθηκε πρωτόκολλο Gradient PCR στο οποίο οι θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ήταν από τους 50°C μέχρι και τους 60°C.

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

1ο Βήμα: 95°C για 15 λεπτά

2ο Βήμα: 58°C για 1 λεπτό

3ο Βήμα: 50°C μέχρι 60°C 1 λεπτό

4ο Βήμα: 72°C για 1 λεπτό

5ο Βήμα: : Επανάληψη του 2ου, 3ου και 4ου βήματος για 30 φορές

6ο Βήμα: Τελική επιμήκυνση, 72°C για 15:00 λεπτά

Η κατανομή θερμοκρασίας στις θέσεις της PCR ήταν:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
50°C	50,3°C	50,9°C	51,7°C	52,8°C	54,6°C	56°C	57,4°C	58,5°C	59,3°C	59,8°C	60°C

Οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν για να τοποθετηθούν τα δείγματα ήταν:

- 50°C (Θέση 1)
- 56°C (Θέση 7)
- 57,4°C (Θέση 8)
- 58,5°C (Θέση 9)
- 59,3°C (Θέση 10)
- 60°C (Θέση 12)

Για την εύρεση του καταλληλότερου συνδυασμού έγιναν αρκετές δοκιμές στις συγκεντρώσεις και τις ποσότητες των παρακάτω υλικών. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη πραγματοποίηση της PCR και οι συγκεντρώσεις τους ήταν οι εξής:

Αντιδραστήρια:

Taq - Buffer	5 μ l	Primer Reverse	0,5 μ l
MgCl ₂	2 μ l	Taq-Polymerase	0,1 μ l
DNTP's	0,2 μ l	H ₂ O	10,7 μ l
Primer Forward	0,5 μ l		

Από το γενομικό DNA επιλέχτηκε για ενίσχυση, μετά τη δοκιμή διάφορων εκκινητών, τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI). Σε κάθε tube τοποθετήθηκε 1 μ l DNA και 19 μ l από το μίγμα των παραπάνω αντιδραστηρίων, και σε ένα tube προστέθηκαν 19 μ l μίγματος χωρίς προσθήκη DNA, για να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας για τυχόν επιμολύνσεις.

2.4 Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων PCR

Μετά το τέλος της PCR τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%, το οποίο παρασκευάζεται από 0,72 gr αγαρόζης διαλυμένα σε 60 ml TAE buffer. Η προετοιμασία του gel και της συσκευής ηλεκτροφόρησης έγινε με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε στην ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της απομόνωσης του DNA. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα που προέκυψαν από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο όγκος σε κάθε πηγάδι είναι διαφορετικός καθώς χρησιμοποιήθηκαν 8 μ l από το τελικό προϊόν της PCR και 2 μ l χρωστική Blue-bromophenol. Για την ηλεκτροφόρηση της PCR χρησιμοποιήθηκε 1 μ l ladder 100 bp και 1 μ l χρωστικής. Ένας από τους κύριους λόγους που τοποθετείται ο μάρτυρας στο πήκτωμα αγαρόζης είναι η ταυτοποίηση του μήκους των μπαντών που σχηματίζουν τα δείγματα της PCR αλλά ταυτόχρονα προϋποθέτει για τυχόν προβλήματα του πηκτώματος της αγαρόζης όπως για παράδειγμα κακή κατασκευή. Αν το πήκτωμα δεν έχει παρασκευαστεί σωστά μπορεί να εκτρέψει τις μπάντες των

δειγμάτων αλλά και του Ladder πράγμα που γίνεται αντιληπτό καθώς ο Ladder έχει προκαθορισμένο σχηματισμό επάνω στο πήκτωμα.

Αφού τοποθετηθεί το gel μέσα στο μπάνιο ηλεκτροφόρησης και φορτωθούν όλα τα δείγματα, ο μάρτυρας και ο αρνητικός δείκτης πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση με τάση στα 104 Volt. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το gel τοποθετείται σε φωτογραφική μηχανή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και λαμβάνεται η εικόνα.

2.5 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα προγράμματα τα οποία επιλέχθηκαν για την επίλυση των φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα στα άτομα του είδους *Squalus acanthias* είναι τα: MEGA-X Molecular Evolutionary Genetics Analysis και MrBayesv 3.2.7. Μέσω των συγκεκριμένων προγραμμάτων υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις με βάση το διπαραμετρικό μοντέλο Kimura-2-Parameters και τα φυλογενετικά δέντρα για το συγκεκριμένο είδος.

1) Ανάλυση Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbor-Joining)

Για κάθε πιθανό εναλλακτικό φυλογενετικό δέντρο μπορεί να υπολογιστεί το μήκος κάθε κλάδου από τις αποστάσεις μεταξύ των ταξινομικών ομάδων και στη συνέχεια να βρεθεί το άθροισμα (S) όλων των μηκών των κλάδων του δέντρου. Στη μέθοδο αυτή η τιμή S, δεν υπολογίζεται για όλες τις τοπολογίες, αλλά ο έλεγχος των τοπολογιών εντάσσεται σε έναν αρκετά πολύπλοκο αλγόριθμο, ώστε τελικά να παράγεται μόνο ένα δέντρο. Το δέντρο που παράγεται είναι άρριζο και συνήθως απαιτείται μία παραομάδα για να βρεθεί η ρίζα. Σε περίπτωση απουσίας παραομάδας, η ρίζα δίνεται ως το μέσο του μακρύτερου δρόμου που συνδέει δύο λειτουργικές ταξινομικές μονάδες στο δέντρο, θέτοντας ως προϋπόθεση τον σταθερό εξελικτικό ρυθμό.

Αναλυτικότερα, η μέθοδος Neighbor-Joining χρησιμοποιεί ως δεδομένα έναν πίνακα γενετικών αποστάσεων και δημιουργείται αρχικά ένα ακτινωτό δέντρο (startree), στο οποίο τα εσωτερικά κλαδιά έχουν μηδενικό μήκος και δεν υπάρχει καμία ομαδοποίηση ανάμεσα στις διάφορες ταξινομικές μονάδες που το απαρτίζουν (N). Συνεχίζοντας, οι κόμβοι με την μικρότερη απόσταση ενώνονται και ο υπολογισμός των αποστάσεων πραγματοποιείται ανάμεσα σε όλα τα πιθανά ζεύγη. Κάθε φορά όταν εντοπίζονται αλληλουχίες με τη μικρότερη απόσταση ενώνονται και

αντιμετωπίζονται ως μία ενιαία αλληλουχία, τότε υπολογίζεται η αριθμητική μέση απόσταση μεταξύ των αλληλουχιών αυτών (λειτουργικών ταξινομικών μονάδων), δημιουργώντας έναν νέο πίνακα αποστάσεων. Όποια αλληλουχία είναι πλησιέστερη σε απόσταση με το προηγούμενο ζεύγος, ενώνεται με τις υπόλοιπες κατά τον ίδιο τρόπο και ως εκ τούτου, διαδοχικά μειώνεται το συνολικό μήκος του δέντρου. Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται έως ότου βρεθούν όλοι οι εσωτερικοί κλάδοι και τελικά απομείνουν δύο κόμβοι που διαχωρίζονται από έναν κλάδο.

2) Ανάλυση Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum likelihood, ML)

Οι μέθοδοι ML είναι πιθανοτικές μέθοδοι που βασίζονται σε συγκεκριμένα μοντέλα εξέλιξης αλληλουχιών. Το κριτήριο ελαχιστοποίησης εδώ είναι η διαφορά των παρατηρούμενων αντικαταστάσεων με τις αναμενόμενες βάση ενός μοντέλου. Η μέθοδος δηλαδή προχωρά μέσω της σταδιακής δημιουργίας ενός δέντρου που να είναι όσο το δυνατόν πιο πιθανό με βάση το αναμενόμενο από το μοντέλο (Felsenstein 1981, Kishino and Hasegawa 1989).

3) Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία, (Bayesian inference, BI)

Η Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία (BI) είναι μια στατιστική διεργασία στην οποία ενδείξεις ή παρατηρήσεις χρησιμοποιούνται για την αναθεώρηση ή εξαγωγή νέου συμπεράσματος σχετικά με το τι είναι γνωστό υπό την προϋπόθεση ορισμένων παραμέτρων ή υποθέσεων. Πρόκειται για μια φυλογενετική μέθοδο, με βάση την οποία προϋποθέτουμε ένα μοντέλο εξέλιξης και αναζητούμε τα καλύτερα δέντρα, τα οποία συμφωνούν τόσο με το μοντέλο όσο και με τα δεδομένα.

Σε όλα σχεδόν τα φυλογενετικά προβλήματα είναι αδύνατο να εκτιμήσουμε αναλυτικά την κατανομή της εκ υστέρων πιθανότητας. Το πρόβλημα αυτό είναι ιδιαίτερα αντιληπτό στη φυλογένεση εξαιτίας του τεράστιου αριθμού των πιθανών τοπολογιών ακόμα και για μικρό αριθμό τάξεων. Το πρόγραμμα MrBayes χρησιμοποιεί περιβάλλον εντολών στο οποίο γράφονται οι εντολές ώστε να ορίσουμε στο πρόγραμμα του τι να κάνει με τα δεδομένα που του έχουμε δώσει.

Όταν εκτελέσεις τα δεδομένα σου, το πρόγραμμα αρχίζει με ένα δέντρο (είτε τυχαίο είτε ορισμένο από τον χρήστη κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης των δεδομένων), εκτιμά το δέντρο βάσει του μοντέλου που έχει ορίσει ο χρήστης, αλλάζει το δέντρο, εκτιμά το νέο δέντρο και αν το καινούριο είναι καλύτερο από το παλιό, το αποδέχεται ως το σωστό δέντρο. Αυτή η διαδικασία συνιστά μία γενεά. Κάθε μερικές γενεές (όπως ορίζεται από τον χρήστη), το πρόγραμμα καταγράφει σε ένα αρχείο το τρέχον δέντρο και τη τιμή της πιθανότητας σε ένα αρχείο. Ο χρήστης καθορίζει τον αριθμό των γενεών και τελικά το πρόγραμμα υπολογίζει ένα συναινετικό δέντρο καταγράφοντας και τα μήκη των κλάδων σε ένα ξεχωριστό αρχείο.

Η οπτικοποίηση των παραγόμενων δένδρων βάσει της μεθόδου BI πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα FigTree.

4) Arlequin

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Arlequin v 3.5.2.2. Σε αυτό το πρόγραμμα ελέγχθηκαν οι πληθυσμιακές αποκλίσεις του είδους. Αυτό έγινε με τη βοήθεια της Ανάλυσης Μοριακής Διακύμανσης (AMOVA - Analysis of Molecular Variance) η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη της μοριακής απόκλισης. Οι υπό μελέτη πληθυσμοί ομαδοποιήθηκαν σε 2 ομάδες.

1η ομάδα: περιλάμβανε τους πληθυσμούς Ελλάδα, Αίγυπτος, Κύπρος, Ισπανία

2η ομάδα: περιλάμβανε τους πληθυσμούς Κροατία, Ιταλία, Γαλλία.

Η τιμή F_{ct} υποδηλώνει το επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης εντός του πληθυσμού, ανά ζεύγη. Οι αποκλίσεις από την επιλεκτική ουδετερότητα δοκιμάστηκαν με Tajima's και F_u 's.

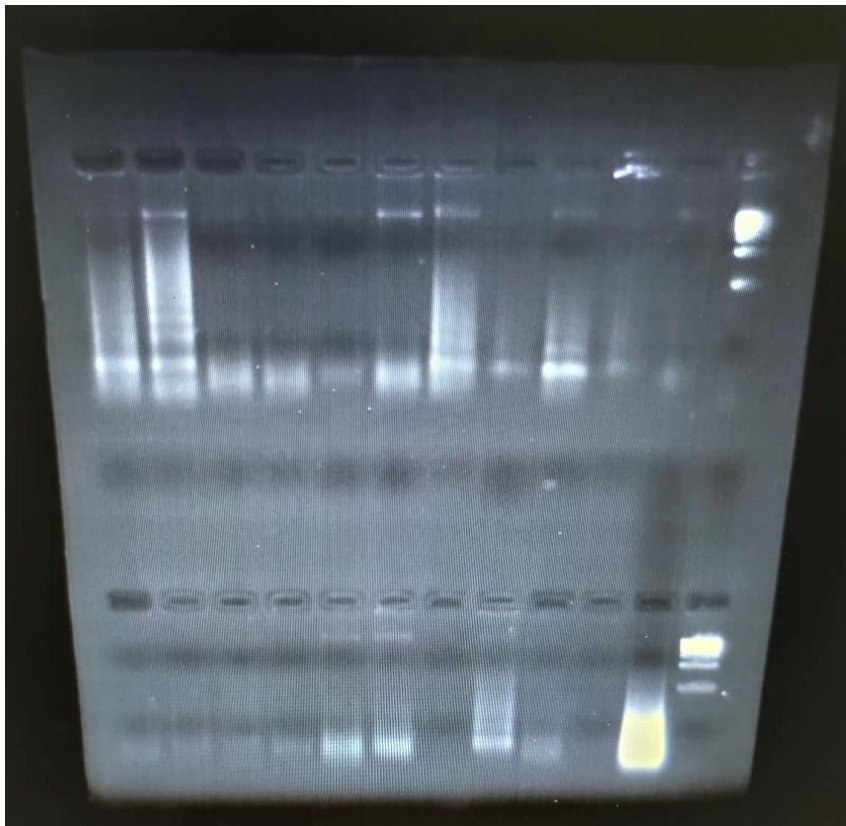
5) ABC

Χρησιμοποιήθηκε μια τυπική μέθοδος παλινδρόμησης ABC για τον υπολογισμό των ιστορικών δημογραφικών παραμέτρων των δύο πληθυσμών. Χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο «Isolation-Migration» (Nielsen και Wakeley 2001) το οποίο υποθέτει ότι δύο πληθυσμοί αποκλίνουν από έναν προγονικό πληθυσμό κάποια στιγμή στο παρελθόν και αυτοί οι πληθυσμοί ενδέχεται να είχαν συνδεθεί με τη μετανάστευση, μέχρι την

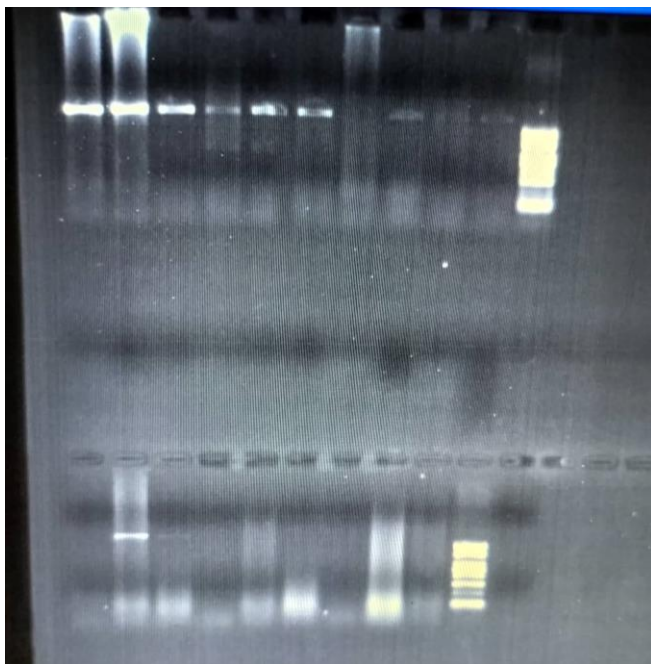
απομάκρυνση τους. Στην ανάλυση δημιουργήθηκαν 1.000.000 τιμές των συνολικών στατιστικών περιλήψεων. Αυτό έγινε με «αποδοχή» 0,001, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα 1.000 σημεία από τα οποία εκτιμήθηκαν οι παράμετροι.

Ο τρόπος της μεταγενέστερης κατανομής ως εκτίμηση σημείου των παραμέτρων υπολογίστηκε μέσω διαθέσιμων σεναρίων στο πρόγραμμα popABC (Lopes et al. 2009), μετά από προηγούμενες μελέτες των Hamilton et al. (2005) και Beaumont (2008). Επιπλέον, χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα popABC για να εκτελέσουμε τον αλγόριθμο ABC μέχρι το σημείο απόρριψης (Lopes et al. 2009). Το στάδιο της παλινδρόμησης πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια στην έκδοση 3.6.0 του πακέτου R (Ihaka and Gentleman 1996) χρησιμοποιώντας ένα σενάριο που αναπτύχθηκε από τον Beaumont. Προκειμένου να ληφθούν εκτιμήσεις της παρελθοντικής πυκνότητας στα προσαρμοσμένα δείγματα χρησιμοποιήσαμε τη συνάρτηση locfit (Loader 1996) στο R. Όλες οι εκ των προτέρων οι δημογραφικές παράμετροι ήταν ομοιόμορφα κατανεμημένες μεταξύ καθορισμένων ελάχιστων και μέγιστων τιμών. Τα μεγέθη του πληθυσμού μετρήθηκαν σε αριθμό ατόμων, τα ποσοστά μετανάστευσης μετρήθηκαν ως το ποσοστό των μεταναστών σε έναν πληθυσμό ανά γενιά και ο χρόνος απόκλισης μετρήθηκε σε χρόνια. Τα συνοπτικά στατιστικά στοιχεία επιλέχθηκαν ανάλογα με την επιτυχία τους σε προηγούμενες μελέτες ABC (Beaumont 2008). Επίσης χρησιμοποιήθηκε ο αριθμός των απλότυπων, ο αριθμός διαχωριστικών τόπων και ο μέσος αριθμός διαφορών κατά ζεύγη.

3. Αποτελέσματα



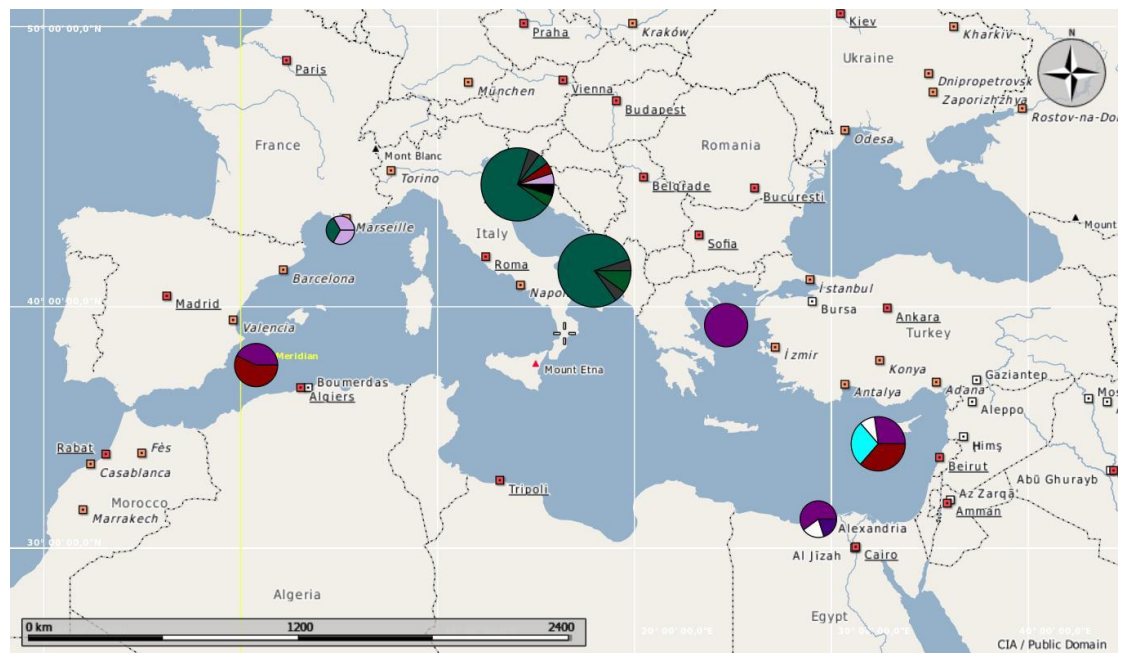
Εικόνα 3 Απομόνωση γενωμικού DNA



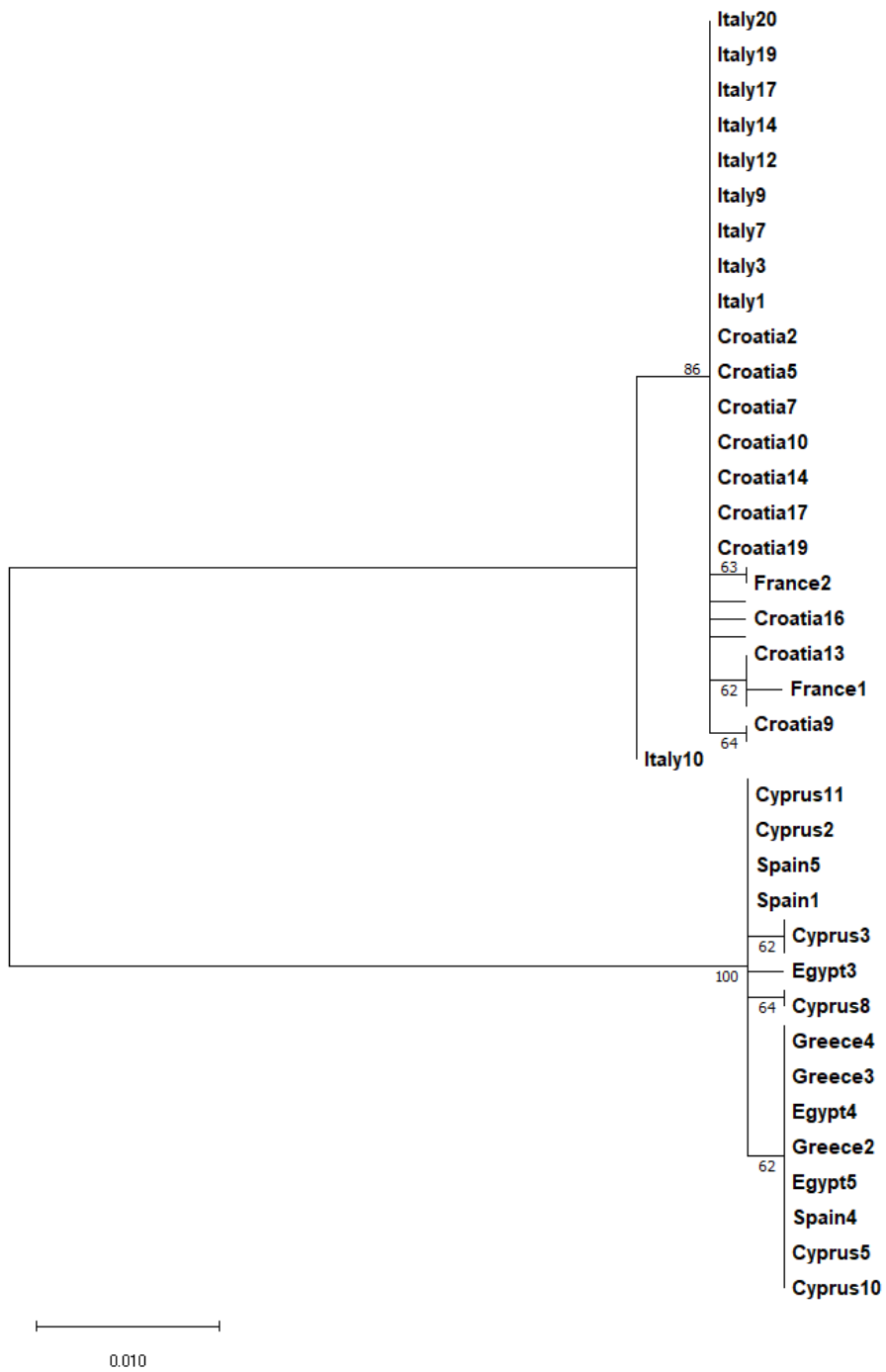
Εικόνα 4 Αποτέλεσμα της PCR



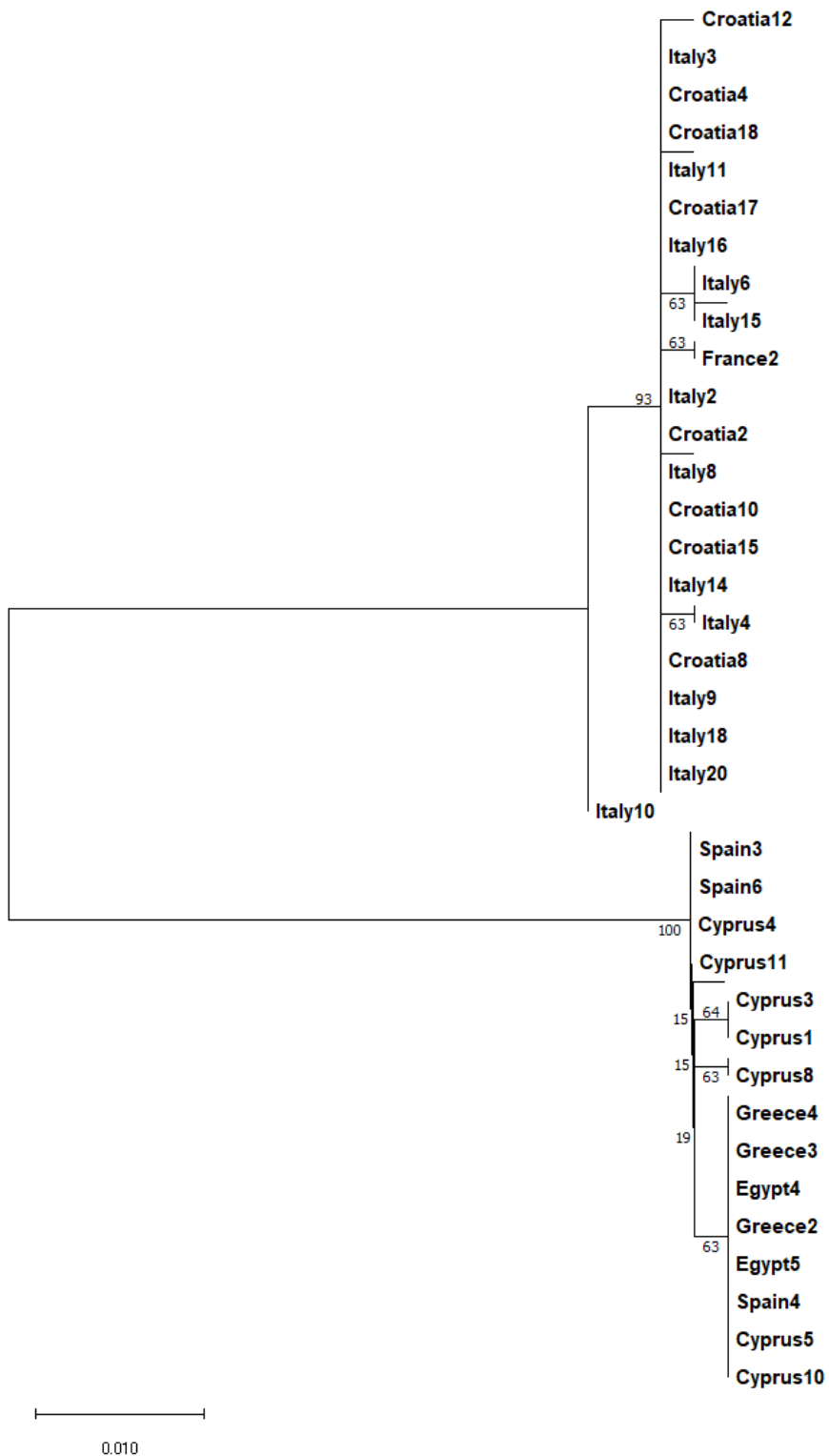
Εικόνα 4 Επανάληψη PCR



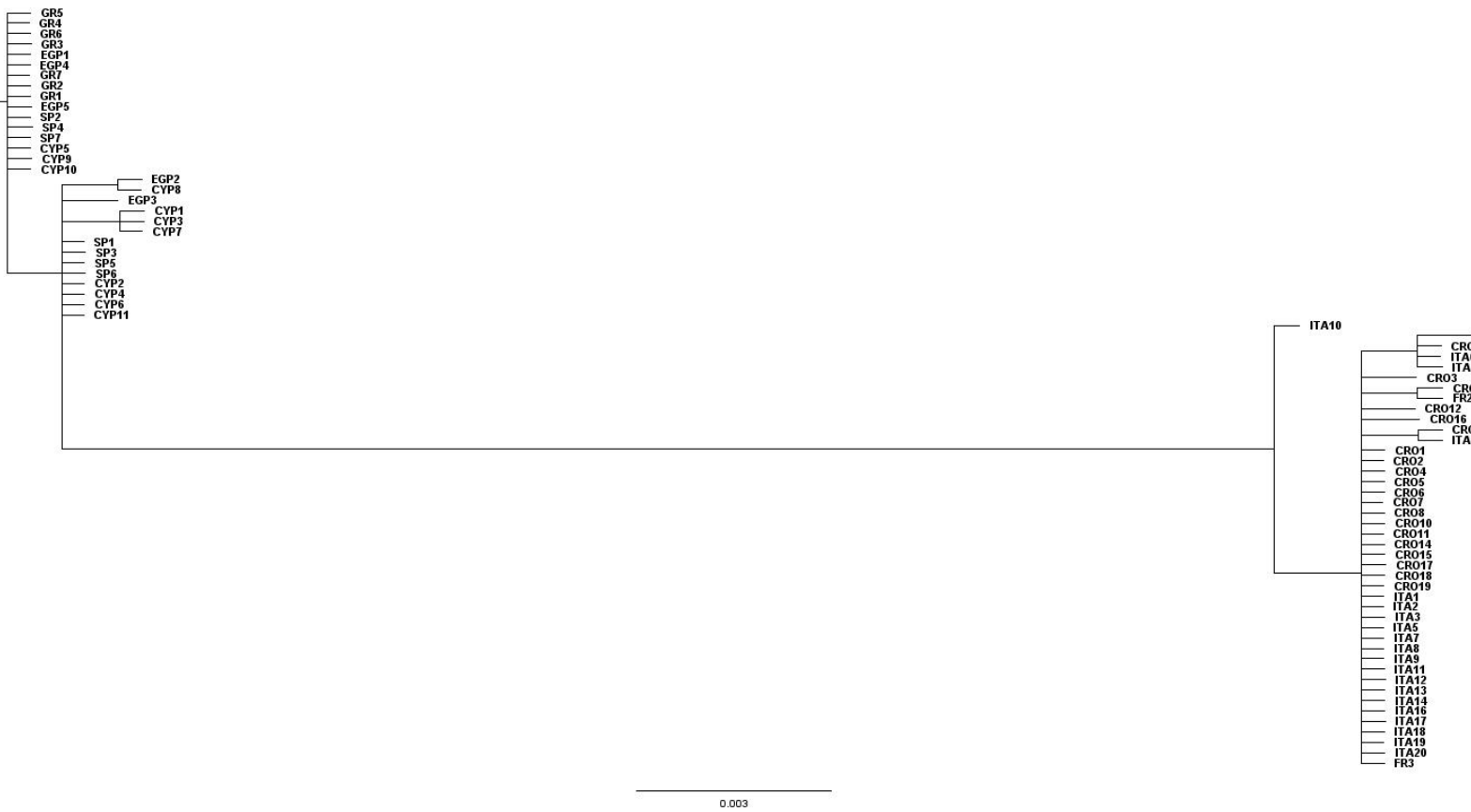
Εικόνα 5 Διανομή των δειγμάτων Squalus στη Μεσόγειο Θάλασσα



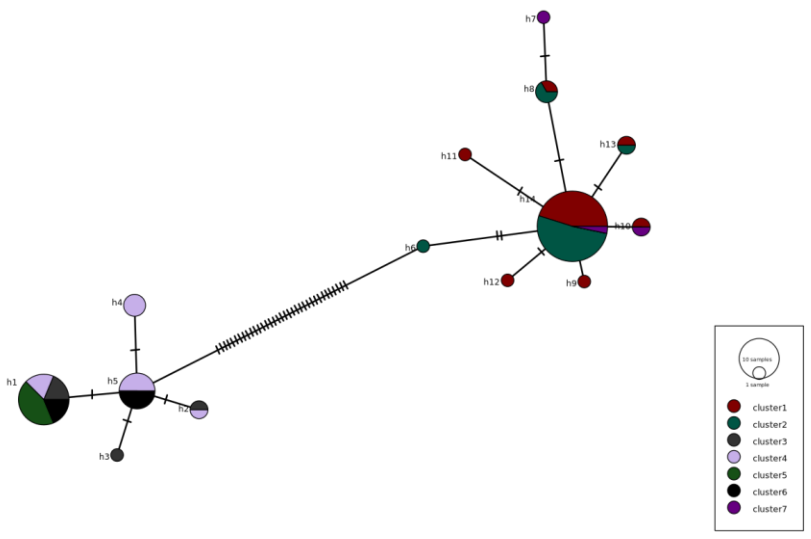
Εικόνα 6 Δενδρόγραμμα με τη μέθοδο Μέγιστης Πιθανοφάνειας



Εικόνα 8 Δενδρόγραμμα με τη μέθοδο Σύνδεσης Γειτόνων



Εικόνα 9 Δενδρόγραμμα με Μπείσειανή Ανάλυση



Εικόνα 10 Median Joining Network

Ανάλυση μοριακής διακύμανσης (AMOVA). (FST = διακύμανση μεταξύ των πληθυσμών)

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P - values
Among Groups	1	657.780	18.58297 Va	97.95	0.03128+- 0.00476 Va and FST
Among populations within groups	5	4.165	0.05403 Vb	0.28	0.00782+- 0.00280 Vb and FST
Within populations	66	22.137	0.33541 Vc	1.77	0.00000+- 0.00000 Vc and FST
Total	72	684.082	18.97241		0.03154

Fixation Indices

FSC : 0.13874

FST : 0.98232

FCT : 0.97947

Population pairwise FSTs

	Greece	Cyprus	Egypt	Spain	Croatia	Italy	France
Greece	0.00000						
Cyprus	0.44782	0.00000					
Egypt	0.20455	0.05386	0.00000				
Spain	0.50000	0.00552	-0.05293	0.00000			
Croatia	0.98813	0.98002	0.98060	0.98428	0.00000		
Italy	0.99025	0.98180	0.98287	0.98641	-0.01820	0.00000	
France	0.98708	0.96847	0.95892	0.97571	0.16137	0.20447	0.00000

Fst Values

	Greece	Cyprus	Egypt	Spain	Croatia	Italy	France
Greece	*						
Cyprus	0.00782+- 0.0008	*					
Egypt	0.15038+- 0.0032	0.22810+- 0.0041	*				
Spain	0.07524+- 0.0026	0.41501+- 0.0047	0.34125+- 0.0046	*			
Croatia	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	0.00020+- 0.0001	0.00000+- 0.0000	*		
Italy	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	0.99990+- 0.0000	*	
France	0.00000+- 0.0010	0.00307+- 0.0005	0.01643+- 0.0013	0.00762+- 0.0008	0.10593+- 0.0028	0.09989+- 0.0029	*

Significant values

Significance Level=0.0010

	Greece	Cyprus	Egypt	Spain	Croatia	Italy	France
Greece		-	-	-	+	+	-
Cyprus	-		-	-	+	+	-
Egypt	-	-		-	+	+	-
Spain	-	-	-		+	+	-
Croatia	+	+	+	+		-	-
Italy	+	+	+	+	-		-
France	-	-	-	-	-	-	

Μέσες διαφορές ανά ζεύγη πληθυσμού

	Greece	Cyprus	Egypt	Spain	Croatia	Italy	France
Greece	0.00000	1.09091	0.80000	0.57143	38.30000	38.05000	39.00000
Cyprus	0.56364	1.05455	1.27273	0.83117	37.93636	37.68636	38.63636
Egypt	0.10000	0.04545	1.40000	0.91429	38.30000	38.05000	39.00000
Spain	0.28571	0.01818	-0.07143	0.57143	37.72857	37.47857	38.42857
Croatia	38.00000	37.10909	37.30000	37.14286	0.60000	0.53500	1.23333
Italy	37.80526	36.91435	37.10526	36.94812	-0.00974	0.48947	1.18333
France	38.00000	37.10909	37.30000	37.14286	-0.06667	-0.06140	2.00000

PXY P value

	Greece	Cyprus	Egypt	Spain	Croatia	Italy	France
Greece							
Cyprus	0.03129						
Egypt	0.15040	0.17307					
Spain	0.07525	0.87416	0.34129				
Croatia	0.00000	0.00000	0.00020	0.00000			
Italy	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	1.00000		
France	0.00802	0.00307	0.01644	0.00762	0.09713	0.09149	

Corrected PXY P value

	Greece	Cyprus	Egypt	Spain	Croatia	Italy	France
Greece							
Cyprus	0.00782						
Egypt	0.15040	0.25891					
Spain	0.07525	0.33792	0.56396				
Croatia	0.00000	0.00000	0.00020	0.00000			
Italy	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	1.00000		
France	0.00802	0.00307	0.01644	0.00762	1.00000	1.00000	

Εκτιμήσεις παραμέτρων με τη μέθοδο ApproximateBayesianComputation

Parameter	Priors	Mode	Quantiles (25% - 97.5%)
NeA	10 – 10 000	1362,226	13,601 – 9211,96
Ne1	10 – 10 000	113,39	15,742 – 811,651
Ne2	10 – 10 000	7933,647	993,488 – 9856,176
t	10 – 40 000	35430,945	279,567 – 39703,789
mig1	0 – 0,05	$7,76 \times 10^{-6}$	$7,76 \times 10^{-6}$ – $4,37 \times 10^{-2}$
mig2	0 – 0,05	0,0118	0,00015 – 0,0425

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία για τη δημιουργία φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιήθηκαν τρεις τρόποι, η μέθοδος ανάλυσης Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbor-joining), η ανάλυση μέγιστης πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood) και η Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία (Bayesian inference). Για να επιτευχθούν οι προαναφερθέντες αναλύσεις ακολουθήθηκε η τεχνική του DNA barcoding, η οποία περιλαμβάνει την

σύγκριση ενός τμήματος του μιτοχονδριακού DNA, της υπομονάδας I κυτοχρωμικής c οξειδάσης (COI) από ταξινομικά άγνωστα δείγματα με μια βιβλιοθήκη ήδη γνωστών γονοδιωμάτων. Είναι γνωστό ότι διαδικασίες του μικροπληθυσμού, όπως ροή γονιδίων, που λειτουργούν εντός γεωγραφικών περιοχών είναι συχνά ελάχιστα κατανοητές, παρά το ενδεχόμενο να επηρεάσουν τη δομή των αποθεμάτων αλλά και τη βιωσιμότητα τους.

Παρόμοια μεθοδολογία ακολούθησαν πολλές μελέτες για βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων τους. Σε μελέτη των Hauser et al. συγκρίθηκαν δείγματα του είδους *Squalus acanthias* από τον Ατλαντικό / Νότιο Ειρηνικό και Βόρειο Ειρηνικό με την χρήση του neighbor-joining (με 1000 επαναλήψεις bootstrap). Τα υπάρχοντα γενετικά δεδομένα έδειχναν μια βαθιά φυλογεωγραφική διάσπαση μεταξύ του *Squalus acanthias* στον Ατλαντικό / Νότιο Ειρηνικό και Βόρειο Ειρηνικό. Τα αποτελέσματα των ερευνών έδειξαν χαμηλή ετερογένεια εντός του βορειοανατολικού Ειρηνικού (σχετικά μικρές αποστάσεις μεταξύ πληθυσμών του βορειοανατολικού Ειρηνικού), αλλά σημαντική διαφοροποίηση των πληθυσμών μεταξύ του ΒΑ Ειρηνικού και ΒΔ Ατλαντικού και Χιλής, αντίστοιχα.

Μοριακές μελέτες των Franks et al (2006) Ward και et al. (2007) έχουν βρει ισχυρή γενετική απόκλιση του *squalus acanthias* μεταξύ Βόρειου Ειρηνικού και του μη Β. Ειρηνικού σε τρεις διαφορετικές περιοχές γονιδίων mtDNA (περιοχή ελέγχου, COI και ND2) και σε πυρηνικούς μικρο-δορυφορικούς τόπους.

Πιο συγκεκριμένα στην μελέτη των Ward et al. δεκαπέντε είδη ψαριών, περιοχή COI - ταυτοποιήθηκε - από το Βόρειο (Ατλαντικό και τη Μεσόγειο) και το Νότιο (Αυστραλιανό) Ημισφαίριο. Με τη κατασκευή δέντρων με το Neighbor-joining 9 είδη έδειξαν απόκλιση μεταξύ 0 και 1% από Βορρά προς νότο (*Etmopterus pusillus*, *Prionace glauca*, *Squalus acanthias*, *Halosaurus macrochir*, *Hoplostethus atlanticus*, *Hoplostethus mediterraneus*, *Neocyttus helgae*, *Sphoeroides pachygaster*). Αυτή η απόκλιση μεταξύ των ομάδων τονίζει την έλλειψη σαφούς χωρικής διαφοροποίησης για αυτά τα είδη.

Σε έρευνα των Thornburn et al. χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση μέγιστης πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood) σε δείγματα που συλλέχθηκαν γύρω από τη Βρετανία όπου η πληθυσμιακή δομή του *Squalus acanthias* ερευνήθηκε με τη ανάλυση της περιοχής 828-bp μιτοχονδριακού DNA και επτά εστιακούς πολυμορφικούς μικροδορυφορικούς δείκτες. Η έρευνα αυτή έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με τις προυπάρχουσες μελέτες, διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων στη Κελτική Θάλασσα η οποία

υποδηλώνει την ύπαρξη υποπληθυσμών τα οποία μπορεί να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη διατήρηση της αλιείας αυτού και άλλων ειδών ελασμοβραγχίων.

Η Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με παραδοσιακές μεθόδους και έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε πλήθος αλιευτικών μελετών (Colloca et al. 2009, Pennino et al. 2014). Ο λόγος που ισχύει αυτό είναι ότι επιτρέπουν τη συμπερίληψη τόσο των παρατηρούμενων δεδομένων όσο και των παραμέτρων του μοντέλου, ως τυχαίες μεταβλητές (Banerjee et al., 2004) και παρέχουν πιο ρεαλιστικές και ακριβείς εκτιμήσεις για την «αβεβαιότητα» (Pennino et al. 2014).

Λόγω της εκθετικής ανάπτυξης βάσεων δεδομένων γονιδιώματος, τα φυλογενετικά δέντρα χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως για να εξετάσουν μια ποικιλία από εξελικτικές υποθέσεις. Υπάρχουν ακόμα και μελέτες όπου συγκρίνουν τη χρήση τεχνικών όπως για παράδειγμα των Douady et al. όπου συγκρίνει της αναλύσεις maximum likelihood και Bayesian inference με τη χρήση της περιοχής 12S-16S σε δείγματα του είδους *Squalus acanthias*. Στη μελέτη αυτή οι ερευνητές κατέληξαν ότι η Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία επεξεργάζεται τα δεδομένα πολύ ταχύτερα από τη μέθοδο Maximum likelihood ωστόσο, υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις, που συχνά οδηγούν σε δυσκολίες στην ερμηνεία των ενίοτε έντονα αντιφατικών αποτελεσμάτων.

Ρίχνοντας μια ματιά στα φυλογενετικά δέντρα Maximum Likelihood και Bayesian, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι οι πληθυσμοί του είδους στη Μεσόγειο ομαδοποιούνται σε 2 γενετικά γκρουπ. Το πρώτο γκρουπ περιλαμβάνει δείγματα από Ελλάδα-Κύπρο-Αίγυπτο-Ισπανία και το δεύτερο δείγματα από Ιταλία-Κροατία-Γαλλία. Στόχος της δημογραφικής ανάλυσης λοιπόν θα είναι ο υπολογισμός του χρόνου κατά τον οποίο οι πληθυσμοί αυτοί διαχωρίστηκαν. Από την ανάλυση μοριακής διακύμανσης η ομαδοποίηση αυτή επιβεβαιώνεται στατιστικά, με το ποσοστό διακύμανσης (FST) μεταξύ των γκρουπ από την ίδια ανάλυση να εμφανίζεται στα 97.95%.

Η ερμηνεία της παρατηρούμενης διακύμανσης στον δείκτη αφθονίας των ατόμων του είδους εξαρτάται από έναν μεγάλο αριθμό παραγόντων. Το *Squalus acanthias* είναι ένα εξαιρετικά μεταναστευτικό ψάρι (Bigelow and Schroeder 1953), η χρονική στιγμή που επιλέγουν τα ψάρια να αλλάξουν περιβάλλον και να μεταναστεύσουν

προκαλούνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία ή προτίμηση για κάποιο ενδιαίτημα κλπ. (Konstantinon 1965). Κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες, σημειώθηκε σημαντική πρόοδος για την κατανόηση των προτύπων της γενετικής κατανομής του πληθυσμού των αρκετών ειδών που ανήκουν στη υφομοταξία των ελασμοβραγχίων. Οι μελέτες των Musick et al. απέδειξαν μεγάλη ενδοειδική διαφοροποίηση σε αυτά τα είδη, η οποία σχετίζεται με την ευελιξία προσαρμογής των ελασμοβραγχίων στα διάφορα περιβάλλοντα. Παρόμοια στην έρευνα των Thornburn et al. που έγινε στο *Squalus acanthias* η τοπική γενετική διαφοροποίηση εκτιμήθηκε στο ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010) χρησιμοποιώντας τη γενετική απόσταση με βάση το ζεύγος ΦST, με 10.000 παραλλαγές, για την εκτίμηση της «σημαντικότητας».

Στη μελέτη των Castro et al. χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχες κατανομές για κάθε δείγμα για διάκριση μεταξύ των μοντέλων αύξησης του πληθυσμού, ειδικά για αυτούς που επικαλούνται την παρελθοντική εκθετική ανάπτυξη και πληθυσμιακή στάση του είδους *Rhincodon typus* (Slatkin & Hudson 1991, Rogers & Harpending 1992). Οι ερευνητές παρατήρησαν διαφορετικά αποτελέσματα στο συγκεκριμένο είδος από τους υπόλοιπους ελασμοβράγχιους (*Squalus acanthias*) καθώς βρέθηκε μικρή υποδιαίρεση πληθυσμού και έλλειψη στοιχείων για κρυφά αδελφικά είδη.

Οι Verissimo et al. εντόπισαν έντονη γενετική απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων του *Squalus acanthias* του Ειρηνικού και Ατλαντικού (FCT: 0,034 FCT: 0,477, P <0,01) καθώς και μεταξύ των δειγμάτων εντός του Ειρηνικού Ωκεανού. Επιπλέον φάνηκε ότι τα αποτελέσματα για τα δείγματα των περιοχών του Washington-Oregon και της California, ήταν σημαντικά διαφορετικά από την ομάδα των δειγμάτων του Νότιου Ειρηνικού, συμπεριλαμβανομένων και των δειγμάτων της Νέας Ζηλανδίας και Χιλής (FCT: 0,081, FCT: 0,753, P <0,001).

Οι McFarlane και King έχουν παρουσιάσει πολλές περιπτώσεις μετακινήσεων σε μεγάλες αποστάσεις του είδους *Squalus acanthias*, συμπεριλαμβανομένων και των περιοχών του Βόρειου Ειρηνικού και τον Βόρειο Ατλαντικού. Συνεπώς μπορούμε να συμπεράνουμε ότι υπάρχει μια συνεχιζόμενη ροή γονιδίων σε ολόκληρο κόσμο από τον Ατλαντικό έως και το Νότιο Ειρηνικό.

Η γενετική απόσταση θεωρείται γενικά ως σημαντικός παράγοντας ως προς τη διάκριση των ειδών. Ένα σαφές κενό στη γενετική απόσταση μεταξύ της ενδοειδικής απόκλισης δείχνει συνήθως ένα διαχωρισμό ειδών. Στην έρευνα των Ziadi-

Künzli et al. σε δείγματα του ταξινομικά προβληματικού είδους *Squalus mitsukurii* από τον Ατλαντικό ωκεανό και τη Ταϊβάν συγκρίθηκαν και φάνηκε ότι σε σύγκριση με την μελέτη των Jordan κ' Snyder δεν ταιριάζουν με το *S. mitsukurii* από την ηπειρωτική χώρα της Ιαπωνίας. Στην προαναφερθείσα εργασία έγινε παρόμοια ανάλυση των αποτελεσμάτων ως προς την ειδική απόκλιση με τη χρήση του προγράμματος PopArt.

Λίγο πιο αναλυτικά για κάθε γενετικό δείκτη χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA 7.0.26 (Kumar et al. 2018). Και ένα δίκτυο απλότυπου TCS δημιουργήθηκε με τη χρήση της μέγιστης αφθονίας στο popart (Leigh and Bryant 2015) για να απεικονίσει τις σχέσεις μεταξύ των συγγενών ειδών του *Squalus*.

Από γραφική άποψη, οι απλότυποι ταξινομήθηκαν σε ένα δίκτυο πάλι με το PopART (<http://popart.otago.ac.nz>) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Median Joining (Bandelt et al., 1999). Αρκετές μελέτες υπογράμμισαν τη συχνή εσφαλμένη ταυτοποίηση των ειδών που ανήκουν στην υποομάδα *Squalus* στην Μεσόγειο και την ασυνεπή χρήση των ονομάτων *Squalus blainville* και *Squalus megalops* ακόμη και του *Squalus acanthias* (Cariani et al. 2017, Verissimo et al. 2017). Για παράδειγμα, η αλληλουχία που διατίθεται για ένα μεσογειακό δείγμα που προσδιορίστηκε αρχικά ότι είναι ο *S. megalops* (Marouani et al., 2012) αποδείχθηκε ότι είναι *S. blainville* (Verissimo et al. 2017). Στην έρευνα των Gaitán-Espitia et al. πάρθηκαν δείγματα του είδους *Squalus acanthias* και ακολουθώντας παρόμοια μεθοδολογία εξέτασαν τις πιθανές διαφορές των ατόμων εντός του είδους. Κατασκευάστηκε ένα δίκτυο Median Joining απλότυπων με το πρόγραμμα PopART (Leigh & Bryant 2015) για την εκτίμηση των σχέσεων μεταξύ των Χιλιανών αλληλουχιών και τις αλληλουχίες αναφοράς που ελήφθησαν από την GenBank. Συνεπώς οι αναλύσεις αυτές είναι αξιόπιστες μέθοδοι για την αξιολόγηση ενδοειδικών δεδομένων και για την αποκάλυψη πολλαπλών συνδέσεων μεταξύ των απλότυπων (Mardulyn 2012).

Σε μελέτη των Bellodi et al. πάρθηκαν δείγματα των ειδών *S. blainville* και *S. megalops* από τα ύδατα της Σαρδηνίας εξετάστηκαν μορφολογικά και γενετικά, (με αλληλουχία του δείκτη mtDNA COI). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν μόνο με το είδος *S. blainville*. Ωστόσο, εξετάζοντας παρατηρήθηκε, εύρεση σποραδικά αποκλίνουσων αλληλουχιών στη Μεσόγειο (Marouani et al. 2012, Kousteni et al. 2016, Verissimo et al. 2017) όπου φαίνεται ότι διαφέρουν τα είδη *S. blainville*, *S. acanthias*, αλλά και το είδος *S. megalops* στην Αυστραλία. Επιπλέον δεν

μπορεί να αποκλειστεί και η εμφάνιση ενός τρίτου είδους στην Μεσόγειο (εκτός από τους *S. acanthias* και *S. blainville*).

Είναι φανερό ότι εξακολουθούν να παραμένουν αρκετές ταξινομικές αβεβαιότητες στην περιοχή της Μεσογείου σε σχέση με την εμφάνιση και την κατανομή των υποειδών των *S. blainville* και *S. acanthias*.

Από την ανάλυση διαφαίνεται ότι τα δύο γενετικά γκρουπ διαχωρίστηκαν πριν ~35431 χρόνια. Σύμφωνα με την μελέτη Verissimo et al. (2010) η τρέχουσα κατανομή της γενετικής ποικιλομορφίας του *Squalus acanthias* φαίνεται ότι δημιουργήθηκε από μια σειρά σημαντικών γεγονότων επέκτασης που ακολουθούνται από απόκλιση πληθυσμού σε περιοχές ακατάλληλων περιβαλλοντικών συνθηκών (π.χ. ζεστά, νερά χαμηλού γεωγραφικού πλάτους). Επίσης μια άλλη έρευνα Kousteni et al. (2016) έδειξε ότι η γενετική ομοιογένεια του *Squalus blainvillein* στη Μεσόγειο έδειξε ότι το είδος έχει πιθανώς υψηλό δυναμικό διασποράς παρόμοιο με άλλους καρχαρίες της οικογένειας *Squalidae*. Οι αναλύσεις σε αυτήν την εργασία υποδηλώνουν ένα γεγονός επέκτασης του πληθυσμού κατά τον Πλειστόκαινο, που αντιστοιχεί στη γενική άποψη ότι ένα μεγάλο μέρος της σύγχρονης φυλογεωγραφικής εικόνας των οργανισμών του βόρειου ημισφαιρίου αντικατοπτρίζει τις κλιματολογικές διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια διακλαδικών κύκλων σε εποχές παγετώνων (Hewitt 2000). Επίσης άλλες παρόμοιες μελέτες πάνω στη φυλογεωγραφία των Ελασμοβραγχιών της Μεσογείου π.χ. Chevolut et al. (2006) , Griffiths et al. (2011) παρουσιάζουν επέκταση και διαχωρισμό των γενετικών ομάδων των ειδών σε εποχές παγετώνων στα Μέσα και τα Τέλη του Πλειστόκαινου, όπως επίσης και απότομες αυξήσεις των πληθυσμών των ειδών πρώτιστα και επίσης απότομο bottleneck μετέπειτα. Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και στη δική μας μελέτη όπου το γενετικό γκρουπ N1 έχει πολύ χαμηλό πληθυσμιακό δραστικό μέγεθος, το οποίο υποδεικνύει πιθανό bottleneck.

5. Βιβλιογραφία

- Chevolot, D., Hoarau, G., Rijnsdorp, A.D., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2006. Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., Rajidae). *Molecular Ecology* 15,3693-3705
- CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Stenberg C (2005) Life history of the piked dogfish (*Squalus acanthias* L.) in Swedish waters. *Journal of the Northwest Atlantic Fisheries Sciences*, 35, 155–164. Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595
- Ebert, D.A., White, W.T., Goldman, K.J., Compagno, L.J.V., Daly–Engel, T.S., Ward, R.D., 2010. Resurrection and redescription of *Squalus suckleyi* (Girard, 1854) from the north pacific, with comments on the *Squalus acanthias* subgroup (*Squaliformes*: *Squalidae*). *Zootaxa* 2612, 22.
- Gkafas, G.A., Megalofonou, P., Batzakas, G., Apostolidis, A.P., Exadactylos, A., 2015. Molecular phylogenetic convergence within Elasmobranchii revealed by cytochromeoxidase subunits. *Biochemical Systematics and Ecology*,61, 510-515.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907–913
- Iglesias, S.P., Lecointre, G., Sellos, D.Y., 2005. Extensive paraphylies within sharks of the order *Carcharhiniformes* inferred from nuclear and mitochondrial
- Jennings, S., & Kaiser, M. J. (1998). The effects of fishing on marine ecosystems. *Advances in Marine Biology*, 34, 201–212.
- Johnson, D., Ardon, J., Billett, D., Hooper, T., Mullier, T., Chaniotis, P., ... Corcoran, E. (2014). When is a marine protected area network ecologically coherent? A case study from the North-east Atlantic. *Aquatic Conservation*, 24, 44–58.
- Johnson, P. L. F., & Slatkin, M. (2006). Inference of population genetic parameters in metagenomics: A clean look at messy data. *Genome Research*, 16, 1320–1327.
- Jorgensen, S. J., Reeb, C. A., Chapple, T. K., Anderson, S., Perle, C., Sommeran, S. R. V., & Block, B. A. (2010). Philopatry and migration of Pacific white sharks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277, 679–688.
- Joshi, J., Salar, R. K., Banerjee, P., Upasna, S., Tantia, M. S., & Vijn, R. K. (2013). Genetic variation and phylogenetic relationships of Indian buffaloes of Uttar Pradesh. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26, 1229–1236.
- Journal of the Fisheries Research Board Canada, 33, 2605–2609. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence

alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680

Kalinowski, S. T., Wagner, A. P., & Taper, M. L. (2006). ML-Relate: A computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6, 576–579.

Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T. F., Crozier, W. W., & Prodöhl, P. A. (2013). *diveRsity*: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 782–788.

Keeney, D. B., Heupel, M. R., Hueter, R. E., & Heist, E. J. (2005). Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology*, 14, 1911–1923.

Kenchington, E. (2003). The effects of fishing on species and genetic diversity. In M. Sinclair, & G. Valdimarsson (Eds.), *Responsible Fisheries in the Marine Ecosystem* (pp. 235–253). Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and Centre for Agriculture and Bioscience International (CABI).

Ketchen, K. (1972). Size at maturity, fecundity, and embryonic growth of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) in British Columbia waters. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 29, 1717–1723. Ketchen, K. S. (1986).

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*

Kinney, M. J., & Simpfendorfer, C. A. (2009). Reassessing the value of nursery areas to shark conservation and management. *Conservation Letters*, 2, 53–60.

Kitamura, T., Takemura, A., Watabe, S., Taniuchi, T., Shimizu, M., 1996. Molecular phylogeny of the sharks and rays of superorder Squalia based on mitochondrial cytochrome b gene. *Fish. Sci.* 62, 340–343.

Klimley, A. P. (1987). The determinants of sexual segregation in the scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Environmental Biology of Fishes*, 18, 27–40.

Knutsen, H., Olsen, E. M., Jorde, P. E., Espeland, S. H., André, C., & Stenseth, N. C. (2011). Are low but statistically significant levels of genetic differentiation in marine fishes ‘biologically meaningful’? A case study of coastal Atlantic cod. *Molecular Ecology*, 20, 768–783.

Larson, S., Christiansen, J., Griffing, D., Ashe, J., Lowry, D., & Andrews, K. (2010). Relatedness and polyandry of sixgill sharks, *Hexanchus griseus*, in an urban estuary. *Conservation Genetics*, 12, 679–690. Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452. Lucifora, L. O., García, V. B., Menni, R. C., & Escalante, A. H. (2006). Food habits, selectivity, and foraging modes of the school shark *Galeorhinus galeus*. *Marine Ecology Progress Series*, 315, 259–270.

- Little, A.G., Loughheed, S.C., Moyes, C.D., 2012. Evolution of mitochondrial-encoded cytochrome oxidase subunits in endothermic fish: the importance of taxon-sampling in codon-based models. *Mol. Phylogenet. Evol.* 63, 679-684.
- Lynch, M., & Ritland, K. (1999). Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, 152, 1753–1766.
- Marouani S, Chaâba R, Kadri H, Saidi B, Abderrahmen Bouain, Maltagliati F., Last P., Séret B Bradai M.N, 2012, Taxonomic research on *Squalus megalops* (Macleay, 1881) and *Squalus blainvillei* (Risso, 1827)(Chondrichthyes: Squalidae) in Tunisian waters (central Mediterranean Sea) *Scientia Marina*, 76: 97-109
- Marques da Silva, H.G. 1993. Population dynamics of spiny dogfish, *Squalus acanthias*, in the NW Atlantic. Amherst, MA. University of Massachusetts. Dissertation.
- Martin, A. P., Naylor, G. J. P., & Palumbi, S. R. (1992). Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature*, 357, 153–155.
- Maruska, K.P., Cowie, E.G. and Tricas, T.C. 1996. Periodic gonadal activity and protracted mating in elasmobranch fishes. *Journal of Experimental Zoology* 276: 219-232.
- McCann, K., Hastings, A. and Huxel, G.R. 1998. Weak trophic interactions and the balance of nature. *Nature* 395: 794-798.
- McCauley, L., Goecker, C., Parker, P., Rudolph, T., Goetz, F., & Gerlach, G. (2004). Characterization and isolation of DNA microsatellite primers in the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Molecular Ecology Notes*, 4, 494–496.
- McFarlane, G. A., & King, J. R. (2003). Migration patterns of spiny dogfish in the North Pacific Ocean – *Squalus acanthias*. *Fisheries Bulletin*, 101, 358–367. McPherson, A. A., Stephenson, R. L., & Taggart, C. T. (2003). Genetically different Atlantic herring *Clupea harengus* spawning waves. *Marine Ecology Progress Series*, 247, 303–309.
- Megalofonou, P., Damalas, D., Yannopoulos, C., 2005. Composition and abundance of pelagic shark by-catch in the eastern Mediterranean Sea. *Cybio* 29, 135-140.
- Mourier, J., Vercelloni, J., & Planes, S. (2012). Evidence of social communities in a spatially structured network of a free-ranging shark species. *Animal Behaviour*, 83, 389–401.
- Naylor, G.J.P., 1992. The phylogenetic relationships among requiem and hammerhead sharks: inferring phylogeny when thousands of equally most parsimonious trees result. *Cladistics* 8, 295-318.
- Naylor, R., Steinfeld, H., Falcon, W., Galloway, J., Smil, V., Bradford, E., Alder, J., Mooney, H., 2005. Agriculture: loosing the links between livestock and land. *Science* 310, 1621-1622.
- Newby, J., Darden, T., Bassos-Hull, K., & Shedlock, A. M. (2014). Kin structure and social organization in the spotted eagle ray, *Aetobatus narinari*, off coastal Sarasota, FL. *Environmental Biology of Fishes*, 97, 1057–1065.
- Normark, B.B., McCune, A.R., Harrison, R.G., 1991. Phylogenetic relationships of neopterygian fishes, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 8, 819-834.

- Okello, J. B. A., Nyakaana, S., Masembe, C., Siegismund, H. R., & Arctander, P. (2005). Mitochondrial DNA variation of the common hippopotamus: Evidence for a recent population expansion. *Heredity*, 95, 206–215.
- Oliveira, D., A. J. A., Ellis, J. R., & Dobby, H. (2013). Incorporating density dependence in pup production in a stock assessment of NE Atlantic spurdog *Squalus acanthias*. *ICES Journal of Marine Science*, 70, 1341–1353.
- Olsén, K. H., Petersson, E., Ragnarsson, B., Lundqvist, H., & Järvi, T. (2004). Downstream migration in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt sibling groups. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61, 328–331.
- Palsboll, P. J., Bérubé, M., & Allendorf, F. W. (2007). Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 11–16.
- Palumbi, S. R. (2003). Population Genetics, Demographic Connectivity and the Design of Marine Reserves. *Ecological Applications*, 13, 146–158
- Pardini, A. T., Jones, C. S., Noble, L. R., Kreiser, B., Malcolm, H., Bruce, B. D., ... Martin, A. P. (2001). Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature*, 412, 139–140.
- Pawson, M. G. (1995). Biogeographical identification of English Channel fish and shellfish stocks. Fisheries Research Technical Report Number 99. Lowestoft, UK: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF).
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
- Portnoy, D. S., McDowell, J. R., Heist, E. J., Musick, J. A., & Graves, J. E. (2010). World phylogeography and male-mediated gene flow in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*. *Molecular Ecology*, 19, 1994–2010.
- Pratt, H. L., & Carrier, J. C. (2001). A review of elasmobranch reproductive behavior with a case study on the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Environmental Biology of Fishes*, 60, 157–188.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Queller, D. C., & Goodnight, K. F. (1989). Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43, 258–275.
- Reiss, H., Hoarau, G., Dickey-Collas, M., & Wolff, W. J. (2009). Genetic population structure of marine fish: Mismatch between biological and fisheries management units. *Fish and Fisheries*, 10, 361–395.
- Rogers, A. R., & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 552–569.
- Rose, G. A., & Kulka, D. W. (1999). Hyperaggregation of fish and fisheries: How catch-per-unit-effort increased as the northern cod (*Gadus morhua*) declined. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 118–127.

- Rousset, F. (2008). Genepop'007: A complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecological Resources*, 8, 103–106
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, second ed., vol. I. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schultz JK, Feldheim KA, Gruber SH, Aschley MV, McGovern TM, Bowen BW (2008) Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). *Molecular Ecology*, 17, 5336–5348. Seutin G, White BN, Boag PT (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 82–90.
- Schwartz, R.S., Mueller, R.L., 2010. Branch length estimation and divergence dating: estimates of error in Bayesian and maximum likelihood frameworks.
- Shepherd T, Page F, MacDonald B (2002) Length and sexspecific associations between spiny dogfish (*Squalus acanthias*) and hydrographic variables in the Bay of Fundy and Scotian Shelf. *Fisheries Oceanography*, 11, 78–89. Simpfendorfer CA, Heupel MR (2004) Assessing habitat use and movement. In: *Biology of Sharks and Their Relatives* (eds Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR), pp 553–572.
- Shirai, S., 1992a. Phylogenetic relationships of the angel sharks, with comments on elasmobranch phylogeny (Chondrichthyes: Squatinidae). *Copeia* 2,505-518.
- Shirai, S., 1992b. *Squalean Phylogeny: a New Framework of 'Squaloid' Sharks and Related Taxa*. Hokkaido University Press, Sapporo.
- Shirai, S., 1996. Phylogenetic interrelationships of Neoselachians (Chondrichthyes: Euselachii). In: Stiassny, M.L.J., Parenti, L.R., Johnson, G.D. (Eds.), *Interrelationships of Fishes*. Academic Press, San Diego, pp. 9e34.
- Sinaeur Associates, Sunderland, pp. 407e514.
- Stelbrink, B.T., von Rintelen, T., Cliff, G., Kriwet, J., 2010. Molecular systematics and global phylogeography of angel sharks (genus *Squatina*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 54, 395-404.
- Sullivan, J.J., Market, A., Kilpatrick, C.W., 1997. Biogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* group. *Syst. Biol.* 46, 426-440.
- Swofford, D.L., 2003. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*, Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland MA.
- Swofford, D.L., Olsen, G.P., Waddell, P.J., Hillis, D.M., 1996. Phylogenetic inference. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics*.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24,1596-1599.
- Temnykh S, DeClerk G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research*, 11, 1441–1452.

- Templeman W (1944) The life-history of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) and the vitamin A values of dogfish liver oil. Newfoundland Department of Natural Resources Research Bulletin, 15, 1–102. Templeman W (1976) Transatlantic migrations of spiny dogfish (*Squalus acanthias*).
- The Spiny Dogfish (*Squalus acanthias*) in the Northeast Pacific and a History of Its Utilization. Fisheries and Oceans Canada (DFO).
- Thorburn, J., Neat, F., Bailey, D. M., Noble, L. R., & Jones, C. S. (2015). Winter residency and site association in the Critically Endangered North East Atlantic spurdog *Squalus acanthias*. *Marine Ecology Progress Series*, 526, 113–124.
- Velez-Zuazo, X., Agnarsson, I., 2011. Shark tales: a molecular species-level phylogeny of sharks (Selachimorpha, Chondrichthyes). *Mol. Phylogene t. Evol.* 58, 207-217.
- Veríssimo, A., McDowell, J.R., Graves, J.E., 2010. Global population structure of the spiny dogfish *Squalus acanthias*, a temperate shark with an antitropical distribution. *Mol. Ecol.* 19, 1651–1662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04598.x>.
- Veríssimo, A., Zaera-Perez, D., Leslie, R., Iglesias, S.P., Seret, B., Grigoriou, P., Sterioti, A., Gubili, C., Barría, C., Duffy, C., Hernandez, S., Batjakas, L.E., Griffiths, A. M., 2017. Molecular diversity and distribution of eastern Atlantic and Mediterranean dogfishes *Squalus* highlight taxonomic issues in the genus. *Zool. Scripta* 46, 414–428.
- Winchell, C.J., Martin, A.P., Mallatt, J., 2004. Phylogeny of elasmobranchs based on LSU and SSU ribosomal RNA genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 214-224.
- Yang, Z., 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J. Mol. Evol.* 39, 306-314.

6. ABSTRACT

We extracted the DNA from 37 samples of muscle tissue from various species of Elasmobranchii. The samples were collected from strandings and fisheries bycatch from the East Mediterranean Sea and were stored at -20°C. Then we proceeded on to copy the genetic material with the help PRC method and followed the sequence of 9 of these shortlisted samples. The results of the sequencing have shown that 7 of them belong to the species *Squalus acanthias* and so we decided to devote our work to an analysis of the population genetics of the species in the Mediterranean Sea, since there are no other similar studies on the species specifically in this basin. Statistical analysis was carried out using these 7 sequence and 66 sample sequence of the species *Squalus acanthias*, which was found from the already existing deposited sequence of the NCBI database. A total of 73 sequence from the Western Mediterranean and the Eastern Mediterranean was used. From the 3 analysis that was conducted, phylogenetic trees were created. Neighbor-Joining and Maximum likelihood analysis was performed with the MEGA-X Molecular Evolutionary Genetics Analysis program, while the analysis with Bayesian Inference was performed with MrBayes 3.2.7 program. In addition, Molecular Variation Analysis (AMOVA) was performed. Finally, the ABC regression method was used to calculate the historical demographic parameters of the two populations, using the popABC program.

Aim: Analysis of *Squalus acanthias* in the Mediterranean Sea to understand genetic diversity factors and to assess the effects of climate change of the past on the demography of species.

Key words: *Squalus acanthias*, Elasmobranchii, Mediterranean Sea, genetic diversity, mitochondrial gene COI