

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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Έτεροζυγωτία και αρμοστικότητα με χρήση βιοπληροφορικής  
ανάλυσης»**

**Κωνσταντίνα Δημητρίου**

**ΒΟΛΟΣ 2020**

**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES  
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC  
ENVIRONMENT**

**POSTGRADUATE MASTER'S THESIS**

**« Heterogosity Fitness Correlation using bioinformatics »**

**Konstantina Demetriou**

**VOLOS 2020**

**«Ετεροζυγωτία και αρμοστικότητα με χρήση βιοπληροφορικής ανάλυσης »**

**Τριμελής Επιτροπή:**

- 1) **Γεώργιος Γκάφας**, Επίκουρος καθηγητής, Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυοαποθεμάτων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**,
- 2) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**,
- 3) **Δημήτριος Βαφείδης**, Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπόνδυλων και άμεση- έμμεση χρηστικότητα τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**

*Στην οικογένεια μου*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Γεώργιο Γκάφα για την υπόδειξη του θέματος, για την εμπιστοσύνη, την διαρκή υποστήριξη του και τις συμβουλές κατά την διεξαγωγή του πειράματος, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, και Βαφείδη Δημήτριο για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου τους γονείς μου, Σωτήριο και Ελένη και τα αδέρφια μου, Σοφοκλή, Αντρέα και Χριστιάνα που παρά τις δυσκολίες ήταν πάντα δίπλα μου και μου συμπαραστέκονταν στην πραγματοποίηση των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο γενετικός πολυμορφισμός σε φυσικούς πληθυσμούς έχει μελετηθεί εκτενώς, έχοντας ως σκοπό τη γενετική διατήρηση και τη συσχέτιση των εξελικτικών δυνάμεων με την αρμοστικότητα και προσαρμογή. Η παρούσα έρευνα μελετάει τη συσχέτιση του γενετικού προφίλ με το παρασιτικό φορτίο σε πληθυσμούς δελφινιών. Τα δελφίνια διέφεραν σε σχέση με το παρασιτικό φορτίο. Η γενετική ποικιλομορφία αναλύεται με ddRADseq, όπου και έδειξε διακριτές συσχέτιση μεταξύ της ετεροζυγωτίας και παρασιτικού παθογόνου φορτίου στα θηλυκά άτομα. Η περίοδος εκβρασμού, δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά την ετεροζυγωτία και το παρασιτικό φορτίο. Τα αποτελέσματα επισημαίνουν τη σπουδαιότητα των γενετικών δεδομένων και πως αυτά σχετίζονται με εξελικτικά χαρακτηριστικά προκειμένου να δημιουργηθούν ιδιαίτερες πρακτικές για τη διατήρηση των θαλάσσιων θηλαστικών στη Μεσόγειο Θάλασσα.

Λέξεις κλειδιά: ετεροζυγωτία και αρμοστικότητα, ddRAD αλληλούχηση, παρασιτικά παθογόνα φορτία, δελφίνια, γενετικός πολυμορφισμός

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1	Βιοποικιλότητα, ποικιλομορφία .....	1
1.2	Βιοποικιλότητα σε σχέση με γενετικό προφίλ .....	3
1.3	Μετάλλαξη .....	6
1.4	Γενετική ροή-Μετανάστευση .....	7
1.5	Γενετική παρέκκλιση .....	9
1.6	Φυσική επιλογή.....	10
1.7	Μορφές πολυμορφισμού που διέπουν στην αρμοστικότητα .....	12
1.8	Νέες τεχνικές .....	15
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	16
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	19
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	25
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	28
5.1	Ξένη Βιβλιογραφία.....	28
5.2	Ηλεκτρονική βιβλιογραφία .....	30
5.3	Ελληνική Βιβλιογραφία .....	30
6	ABSTRACT .....	31



# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Βιοποικιλότητα, ποικιλομορφία

Η βιοποικιλότητα, αναφέρεται στην ποικιλία και τη μεταβλητότητα μεταξύ των ζωντανών οργανισμών και των οικολογικών τους συμπλεγμάτων. Η βιολογική ποικιλομορφία, παρέχει στοιχεία που οργανώνονται σε πολλά επίπεδα, μέσα σε ένα πλήρες οικοσύστημα, όπου είναι το αποτέλεσμα δισεκατομμυρίων χρόνων εξέλιξης, φυσικών διεργασιών και ανθρωπογενών επεμβάσεων.

Η βιοποικιλότητα τους αποτυπώνεται στα οικοσυστήματα, στα ενδιαιτήματα, στους πληθυσμούς, στα είδη και ακόμη και στα αλληλόμορφα γονίδια εντός είδους. Το καθένα από αυτά τα επίπεδα οργάνωσης της ζωής έχει διαφορετική σημασία, αλλά ουσιαστικά αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι ενός ενιαίου οικοσυστήματος. Η γενετική ποικιλότητα αναφέρεται στην ποικιλία του γενετικού υλικού που παρατηρείται ακόμη και μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους.

Ποικιλομορφία μεταξύ ειδών και πληθυσμών

Η ποικιλομορφία απαντάται σε όλους τους οργανισμούς, από τον πιο μικρό μέχρι τον πιο μεγάλο οργανισμό του πλανήτη. Είναι εμφανές τριγύρω μας, για παράδειγμα η ποικιλία που υπάρχει στους φυτικούς οργανισμούς για παράδειγμα οι διαφορετικοί χρωματισμοί ενός πλήθος λουλουδιών του ίδιου είδους. Παραδείγματι, ο διαφορετικός χρωματισμός και όχι μόνο στα γένη χερσαίων σαλιγκαριών *Helicigona* (Férussac, 1821) και *Camprylea* (Beck, 1837) όπου απαρτίζουν υψηλή ποικιλομορφία στην Ελλάδα, καθώς επίσης υψηλά επίπεδα ενδημισμού (Ψώνης 2012), όπου υποδηλώνει την έντονη διαφοροποίηση μεταξύ των ίδιων ειδών.

Κάποια άτομα έχουν την ικανότητα να αντέχουν ένα αυξημένο φορτίο ρύπων στο περιβάλλον τους, αλλά παρότι διαθέτουν διαφορετικά αλληλόμορφα, έχουν μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα ή ακόμη να πεθαίνουν λόγω συγκεκριμένων περιβαλλοντικών συνθηκών. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται φυσική επιλογή και οδηγεί στην απώλεια της γενετικής ποικιλότητας σε συγκεκριμένους οικότοπους. Η τεράστια ποικιλία διαφορετικών γονιδιακών συνόλων καθορίζει επίσης την ικανότητα ενός ατόμου ή την ικανότητα ενός πληθυσμού να αντέξει τις πιέσεις από οποιονδήποτε δεδομένο περιβαλλοντικό παράγοντα.

#### Αλλαγή βιοποικιλότητας μέσω γεωλογικής εποχής

Η εξέλιξη και εξαφάνιση είναι φυσικές διεργασίες για το κύκλο ζωής του πλανήτη γη, και με αυτό τον τρόπο οι πληθυσμοί των οργανισμών ανταποκρίνονται με αλλαγές του φυσικού και βιολογικού περιβάλλον τους.

Στο παρελθόν για μεγάλα χρονικά διαστήματα, οι περιβαλλοντικές αλλαγές ευθύνονταν για την διακύμανση της ποικιλομορφίας, όπου τα τελευταία 15 εκατομμύρια χρόνια, σε πολλά μέρη του κόσμου, σταδιακά η φύση των οικοσυστημάτων είχε αλλάξει με αποτέλεσμα να μην είναι τόσο ευπρόσδεκτη και εφικτή για ζωή.

Τα τελευταία 2 εκατομμύρια χρόνια, μια σύντομη περίοδο των γεωλογικών αλλαγών όπου οι παγετώνες υποχωρούσαν και επανερχόταν, άλλαζε με σταδιακό ρυθμό την εξέλιξη και την μετανάστευση των οργανισμών. Με τις φυσικές καταστροφές εξαφανίστηκαν τα περισσότερα ή ακόμη όλα τα είδη του οικοσυστήματος. Με την παγκόσμια ποικιλομορφία να έχει υποστεί κατά την διάρκεια των γεωλογικών εποχών, καθώς πρόσθεσε νέα είδη και εξαφάνισε κάποια από αυτά, Τα θαλάσσια θηλαστικά κατά την διάρκεια των τελευταίων παγετών είχαν εξελιχθεί.

Με έρευνα που πραγματοποιήθηκε από Martinez-Bakker et al. (2013), ανέφεραν πως οι φώκιες του είδους συγκεκριμένα *Pusa hispida* είχαν μια ευρέως κατανομή κατά την αλλαγή των εποχών, για παράδειγμα όταν η θάλασσα καλυπτόταν από πάγο επηρέαζε σε μεγάλο βαθμό την αναπαραγωγική επιτυχία τους. Η κλιματική υπερθέρμανση του πλανήτη έχει επηρεάσει αρκετά την Αρκτική να είναι εμφανές το λιώσιμο πάγου και τα ποσοστά τη θάλασσας να αυξάνονται. Όπου αυτό θέτει σε κίνδυνο και απειλεί το μέλλον της φώκιας *Pusa hispida*. Έγινε περαιτέρω μελέτη στη δομή και την συνδεσιμότητα του πληθυσμού καθώς να εκτιμήθηκε κατά πόσο επηρεάζονται στις περιβαλλοντικές αλλαγές, όπου έγινε μεταξύ των τριών υποείδη πληθυσμών : την αρκτική (*P. hispida hispida*), τη βαλτική (*P. hispida botnica*) και τη Saimaa (*P. hispida saimensis*). Ήταν εμφανές πως οι φώκιες *Pusa hispida* διασκορπίζονταν σε μια παν-αρκτική κλίμακα και τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά είχαν την ικανότητα να μεταναστεύσουν σε πιο μεγάλες αποστάσεις κατά την διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών, όταν η έκταση του πάγου της θάλασσας ήτανε πιο ελάχιστη. Αυτό υποδηλώνει ότι η ροή γονιδίων μεταξύ του τόπου αναπαραγωγής της Αρκτικής και μεταξύ της Βαλτικής θάλασσας ήταν πιο υψηλή, όπου αυτά τα υποείδη είναι αλληλένδετα μεταξύ τους.

## 1.2 Βιοποικιλότητα σε σχέση με γενετικό προφίλ

Μηχανισμοί που προκαλούν αυτή την ποικιλομορφία

Η ποικιλομορφία μπορεί να αποδοθεί και ως είναι μια συλλογική αντίδραση των ειδών, σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ποικιλότητα των ειδών περιλαμβάνει το σύνολο των ειδών που ζουν στη γη, όπου υπάρχουν δύο βασικοί ορισμοί της έννοιας ενός είδους.

Η γενετική ενδοειδική ποικιλομορφία παρέχεται αναπαραγωγικά, "έσωτερικούς πληθυσμούς". Ένας πληθυσμός είναι μια ομάδα ατόμων ενός είδους που ανταλλάσσουν γενετικές πληροφορίες μεταξύ τους και δίνουν γονιμότητα στους απογόνους. Οι παραλλαγές των γονιδίων είναι γνωστές ως αλληλομόρφα. Διαφορές εμφανίζονται με μεταλλάξεις, αλλαγές στο DNA που βρίσκονται στα χρωμοσώματα ενός συγκεκριμένου ατόμου.

Η μηχανισμοί που διέπουν την ποικιλομορφία είναι ειδογένεση, όπου περιγράφεται η εξελικτική διαδικασία με την οποία νέα βιολογικά είδη δημιουργούνται από ένα μοναδικό είδος. Για να δημιουργηθούν νέα είδη θα πρέπει να υπάρχουν φραγμοί στη γονιδιακή ροή. Οι φραγμοί αυτοί μπορεί να είναι φυσικοί/γεωγραφικοί, γενετικοί ή οικολογικοί/ηθολογικοί. Ονομάζονται αλλοπάτρια ειδογένεση, όπου σε αυτή την περίπτωση παρατηρούνται γεωγραφικοί φραγμοί. Η άλλη περίπτωση είναι η συμπάτρια ειδογένεση, όπου τα είδη δημιουργούνται χωρίς κάποιο φραγμό εντός συγκεκριμένου περιβάλλοντος.

Μηχανισμοί που καθορίζουν το πολυμορφισμό

Η γενετική ποικιλομορφία είναι η πρώτη ύλη για την εξελικτική αλλαγή. Ο Δαρβίνος πρότεινε την θεωρία της εξέλιξης με φυσική επιλογή, η ποσότητα και το πρότυπο της γενετικής ποικιλότητας μέσα σε πληθυσμούς, όπου τα είδη είναι αντικείμενο για έρευνα. Σε αναπαραγωγικούς πληθυσμούς, η φαινοτυπική παραλλαγή είναι συνεχής, δηλαδή οι οργανισμοί διαφέρουν ο ένας από τον άλλο στη βαθμίδα χαρακτηριστικών, σε σχήμα και

μέγεθος. Είναι εμφανές οι ξεχωριστές μορφές μεταξύ των ατόμων, χρωμάτων στα μάτια (R.S.Singh 2001).

Ο πολυμορφισμός, είναι μια ιδιαίτερη πτυχή της γενετικής ποικιλομορφίας, που σημαίνει παρουσία στους ίδιους πληθυσμούς δύο ή περισσότερων εναλλακτικών μορφών ενός ξεχωριστού φαινοτύπου. Μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε γενετικό χαρακτηριστικό, φαινοτυπικό, και σε οποιοδήποτε τμήμα κωδικοποιημένο DNA. Είναι μια ιδιαίτερη πτυχή της γενετικής ποικιλότητας, επειδή υποδηλώνει το διαχωρισμό των σχετικών κοινών παραλλαγών στους πληθυσμούς, που μετέπειτα παρουσιάζει εξελικτικούς μηχανισμούς. Ένα γονίδιο με δύο αλληλομόρφα π.χ. A και a με συχνότητες 0,95 και 0,05 σε τυχαίες πληθυσμούς ζευγαρώματος θα παράγαγε τρεις γενοτύπους σε αναλογίες AA(90,25%), Aa(9,5%) και aa(0,25%), σε συγγενείς πληθυσμούς, οι γενετικοί πολυμορφισμοί εμφανίζονται με αυξημένες συχνότητες ομόζυγων γονοτύπων και μειωμένες συχνότητες ετερόζυγων.

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε λίμνη της Νότιας Αφρικής, για παρακολούθηση εξελικτικών διαδικασιών και μηχανισμών που δημιουργούν οι πληθυσμοί για τη βιολογική ποικιλότητα. Εξετάσθηκαν οι εξελικτικές σχέσεις και τη γονιδωματική διαφοροποίηση κατά την διάρκεια ακτινοβολίας σε ψάρια του είδους *Cichild alcolapia*, όπου και παρουσίασαν φαινοτυπική διαφοροποίηση σε περιορισμένες περιοχές. Έγινε δειγματοληψία από 96 άτομα από διαφορετικά σημεία, όπου και βρέθηκαν στοιχεία γενετικής ανάμειξης μεταξύ των ειδών, όπου αυτό υποδηλώνει τυχαίο ζευγάρωμα μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού και η ακτινοβολία ήταν προσαρμοστική απόκλιση (Ford AG et al. 2015).

Οι εξελικτικές δυνάμεις που μπορούν να προκαλέσουν αλλαγή συχνότητας των αλληλομόρφων στους πληθυσμούς είναι, 1. Μετάλλαξη 2. Μετανάστευση- γενετική ροή 3. Γενετική παρέκκλιση 4. Φυσική επιλογή.

### 1.3 Μετάλλαξη

Η μετάλλαξη είναι μια κληρονομήσιμη μεταβολή στο γενετικό υλικό, που διακρίνεται σε σημειακές, δηλαδή τα μοριακά γεγονότα κατά τα οποία ένα ζεύγος νουκλεοτιδίων αντικαθιστάται από κάποιο άλλο και τις χρωματοσωματικές.

Με την ακρίβεια αντιγραφής και υψηλή ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA, μπορεί να εξηγήσει τους χαμηλούς ρυθμούς μεταλλαγών . Όμως, αν και μια μετάλλαξη είναι ένα σπάνιο γεγονός σε ένα γενετικό τόπο, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα τουλάχιστον μιας νέας μετάλλαξης σε κάθε άτομο. Σε επίπεδο «πληθυσμού», το αποτέλεσμα είναι ότι μέσα σε μια γενιά, η μετάλλαξη είναι συνηθισμένη, όλα τα άτομα έχουν τουλάχιστον έστω ένα θνησιγενές υπολειπόμενο μεταλλαγμένο γονίδιο.

Ο Dee R Denver et al. (2005), εξέτασαν με παγκόσμια πρότυπα αποκλίσεων μεταγραφής σε ένα σύνολο συσσώρευσης μετάλλαξης του είδους *Caenorhabditis elegans* για περαιτέρω πληροφορίες της εξελικτικής σημασίας κατά την μεταγραφική μεταβολή για διάκριση μεταξύ της μετάλλαξης και τη φυσικής επιλογής την εξέλιξη της γονιδιακής έκφρασης. Έγινε σύγκριση στα παρατηρούμενα μοτίβα μεταβολής στις γραμμές συσσώρευσης μετάλλαξης και φυσικών συσσωρεύσεων σε ένα ουδέτερο μοντέλο εξέλιξης μεταγραφής για να είναι αποδεικτική η εξέλιξη της μεταγραφής αλλαγής για τις εκφρασμένες αλληλουχίες *C. elegans*.

Με εργασία από τους Hopi E.Hoekstra et al. 2006, οι φυσικοί πληθυσμοί των ποντικών παρουσίασαν ένα χρωματικό μοτίβο, που εντοπίστηκε μια μεταλλαγμένη

μετάλλαξη αμινοξέων που μεταβάλλει το φορτίο της μελανοκορτίνης -1 (Mc1r) στα ποντίκια που ήταν εμφανές σε ακτές παραλίας. Η αλληλομορφή παραλλαγή στο Mc1r επεξηγεί πως ένας ποσοστό της διακύμανσης σε επτά χαρακτηριστικά χρωματισμού που καθόριζαν το χρωματικό μοτίβο. Το παράγωγο αλληλομόρφο Mc1r συναντάται σε ποντίκια του Ατλαντικού, υποδηλώνοντας πως οι διάφοροι μοριακοί μηχανισμοί ευθύνονται με την συγκλίνουσα φαινοτυπική εξέλιξη.

Η μετάλλαξη είναι μια διαδικασία που παράγει, εν μέρει περιορισμένη γενετική ποικιλομορφία στους απογόνους. Η παραγωγή μιας νέας γενετικής ποικιλομορφίας είναι απαραίτητη για στηρίζει την παρελθοντική εξέλιξη αλλά και να προβλέψει μελλοντικά ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά. Οι μεταλλάξεις είναι επιβλαβές, όμως μερικές από αυτές είναι πλεονεκτικές ενώ αρκετές θεωρούνται ουδέτερες. Οι αλλαγές σε επίπεδο νουκλετιδίου, που ευθύνονται για τις σημειακές μεταλλάξεις είναι ίδια φύσης με αυτές που δημιουργούν τις χρωμοσωματικές μεταλλάξεις.

Σύμφωνα με J.Arnold (2001), ανέφερε πως η Αυστραλία είναι μια αξιοσημείωτη περιοχή με εμφανές μεταλλάξεις μεταξύ των ειδών, δηλαδή η *Puccinia striiformis* που εισήχθη στην Αυστραλία το 1979 και μετέπειτα στην Ευρώπη, οι μεταλλάξεις είχαν οδηγήσει σε νέες παθήσεις που διαφέρουν μεταξύ τους.

#### 1.4 Γενετική ροή-Μετανάστευση

Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Great Barrier Reef, της Αυστραλία από τους Peter J.Doherty et al.(2015), σε κοπάδια που εκτείνονταν 2000 χλμ για παρακολούθηση διασποράς των λάβρων που είχαν επηρεαστεί κατά την κινητική φάση δειγματοληψίας όπου έγιναν από διαφορετικούς κοραλλιογενούς υφάλους. Τα είδη λήφθηκαν από διαφορετικούς τόπους των υφάλων, έδειξαν στατιστικές σημαντικές ετερογένειες σε πολλαπλούς τόπους. Έγινε σύγκριση γενετικής ποικιλότητας του νότιου

και του βόρειου πληθυσμού, που έδειξαν διαφοροποίηση στην γενετική ισορροπία τους. Επιπρόσθετα, η ροή των γονιδίων έδειξε τυχαίο ζευγάρισμα μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών.

Η ανταλλαγή αλληλομόρφων μεταξύ των πληθυσμών, η ροή των αλληλόμορφων γονιδίων τείνει να μειώσει τις γενετικές διαφορές τους. Σε περίπτωση που είναι αρκετά εκτενής, μπορεί να ενώσει τους δυο πληθυσμούς και να προκύψει ένας ενιαίος πληθυσμός με κοινή δεξαμενή γονιδίων. Όταν γειτονικοί πληθυσμοί ζουν σε διαφορετικά περιβάλλοντα, η μεταφορά αλληλομόρφων μέσω ροής των γονιδίων μπορεί να εμποδίσει την πλήρη προσαρμογή ενός πληθυσμού στο περιβάλλον τους.

. Η Julien Vezilier (2013) ανέφερε πως η γονιδιακή ροή ευθύνεται για τη παγκόσμια εξάπλωση ορισμένων αλληλομόρφων που καθιστούν το κουνούπι *Culex ripiens*, το κύριο φορέα ιού του Δυτικού Νείλου και της ελονοσίας, ανθεκτικό στα εντομοκτόνα. Καθένα από αυτά τα αλληλομόρφα αυτά έχει μια μοναδική γενετική υπογραφή που μαρτυρεί ότι προέκυψε μετάλλαξη σε μία ή σε λίγες γεωγραφικές θέσεις. Τα εν λόγω αλληλομόρφα αύξησαν τη συχνότητα τους στον πληθυσμό προέλευσης διότι παραείχαν αντοχή στα εντομοκτόνα. Κατόπιν μεταφέρθηκαν σε νέους πληθυσμούς, όπου και πάλι η συχνότητα τους αυξήθηκε με τη δράση της φυσικής επιλογής.

Η ροή γονιδίων, μπορεί να εισαγάγει αλληλομόρφα σε έναν πληθυσμό, όπως και οι μεταλλάξεις. Όμως ο ρυθμός της γονιδιακής ροής είναι υψηλότερος από τον ρυθμό μετάλλαξης, οπότε η επίδραση της στις συχνότητες των αλληλομόρφων είναι πιο άμεση την επίδραση των μεταλλάξεων. Επίσης, από την στιγμή που ένα νέο αλληλομόρφο εισαχθεί στον πληθυσμό, λόγω γονιδιακής ροής ή μεταλλάξεων, η φυσική επιλογή μπορεί είτε να αυξήσει τη συχνότητα του είτε να τη μειώσει.



Η φυσική επιλογή μπορεί να αντικρούσει ομογενοποιημένα γεγονότα με γενετικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών που συνδέονται με τη ροή γονίδιου. Ο J.B. Mitton (2001), ανέφερε πως τα μύδια *Mytilus edulis*, παρουσίασαν μια ασυνεχή γενετική ροή παρά την υψηλή γενετική ροή. Τα μύδια *Mytilus edulis*, ενδημικό είδος που συναντώνται στο Βόρειο Ατλαντικό και απαρτίζονται ενδιάμεσα στα βράχια. Είναι ένα είδος δίοικο, δηλαδή ένα άτομο είναι είτε αρσενικό είτε θηλυκό όπου απελευθερώνουν τους γαμέτες τους στο νερό.

### 1.5 Γενετική παρέκκλιση

Η γενετική παρέκκλιση, επηρεάζει μικρούς πληθυσμούς. Οι απρόβλεπτες μεταβολές στις συχνότητες των αλληλομόρφων μπορεί να οφείλεται σε τυχαία γεγονότα που συνδέονται με την επιβίωση και την αναπαραγωγή. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων ενδέχεται να επηρεάσουν και από τυχαία γεγονότα που ίσως συμβούν κατά την γονιμοποίηση. Εξαιτίας τέτοιων συμβάντων υπάρχει πιθανότητα δύο άτομα με διαφορετικούς γονότυπους να αφήσουν λίγους απογόνους στους οποίους να έχουν να κληροδοτήσουν γαμέτες που περιέχουν ένα από τα δύο αλληλομόρφα. Υπό ορισμένες συνθήκες, η γενετική παρέκκλιση μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο σε ένα πληθυσμό. Δύο σχετικά παραδείγματα είναι το φαινόμενο του ιδρυτή και το φαινόμενο της στενωπού.

Έρευνα από το Lynne Body (2016), που ασχολήθηκε με πληθυσμούς μυκήτων για να γίνει πιο αντιληπτή η συμπεριφορά του, κατέληξαν πως η γενετική παρέκκλιση μεταξύ αυτών των πληθυσμών εξετάζονται στο επίπεδο ατόμου, των πληθυσμών και των ειδών, αλλά υπάρχουν πολλές δυσκολίες στο καθορισμό των ατόμων τους. Το είδος είναι μια θεμελιώδης μονάδα βιολογικής ταξινόμησης, αλλά υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι προσδιορισμού ενός είδους, συμπεριλαμβανομένου των βιολογικών, μορφολογικών και

φυλογενετικών για το καθορισμό τους. Μέσα από το κύκλο ζωής και με την αναπαραγωγή προκύπτουν διασταυρώσεις. Οι παρεκκλίσεις μεταξύ και εντός των ειδών και των πληθυσμών προκαλούνται από μικροεξέλιξη, μετάλλαξη, μεταφερόμενα στοιχεία, γονιδιακή μεταφορά και επιγενετική (Lynne Body 2016).

Ο Alan R. Templeton (2019), ανέφερε πως οι πληθυσμοί είναι πεπερασμένοι σε μέγεθος δημιουργώντας γενετικές παρεκκλίσεις, τυχαίες αλλαγές στην γονιδιακή μονάδα του. Η παρέκκλιση είναι πιο ισχυρή όταν ο αριθμός των αντιγράφων ενός αλληλομόρφου είναι μικρός, αυτό ισχύει πάντα για μια μετάλλαξη. Η γενετική παρέκκλιση, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια περισσότερων νέων μεταλλάξεων, ακόμη και μη επιβλαβών μεταλλάξεων.

## 1.6 Φυσική επιλογή

Η φυσική επιλογή περιγράφεται συχνά με φράσεις όπως «αγώνας για την επιβίωση» και «επιβίωση του ισχυρότερου». Ωστόσο, οι προαναφερόμενες φράσεις μπορούν να παραπλανήσουν, εάν θεωρήσουμε ότι αναφέρονται σε άμεσο ανταγωνισμό μεταξύ ατόμων. Εάν και υπάρχουν περιπτώσεις άμεσου ανταγωνισμού, καθώς ορισμένα είδη ζώων, για παράδειγμα, μια πεταλίδα που είναι ικανότερη στη συλλογή τροφής από τα γειτονικά της άτομα μπορεί να έχει μεγαλύτερα αποθέματα ενέργειας, άρα να παράγει περισσότερα αυγά απ' ό,τι άλλα άτομα του πληθυσμού. Τα αναφερόμενα παραδείγματα δείχνουν με ποίον τρόπο μπορεί ένα προσαρμοστικό πλεονέκτημα να αυξήσει τη σχετική αρμοστικότητα, δηλαδή τη συνεισφορά ενός ατόμου στη δεξαμενή γονιδίων της επόμενης γενεάς σε σχέση με τη συνεισφορά άλλων ατόμων.

Η σχετική αρμοστικότητα ενός γονότυπου, επιδράει στη φυσική επιλογή και ασκείται σε ολόκληρο τον οργανισμό, όχι συγκεκριμένα στο γονότυπο. Δηλαδή, η επιλογή δρα άμεσα στον φαινότυπο παρά στον γονότυπο. Στον γονότυπο δρα έμμεσα, μέσω της επίδρασης τους στον φαινότυπο. Επιπλέον, η σχετική αρμοστικότητα που προδίδει κάποιο δεδομένο αλληλομόρφο εξαρτάται από ολόκληρο το γενετικό και περιβαλλοντικό πλαίσιο όπου εκφράζεται. Η συχνότητα ενός ελαφρά δυσμενούς αλληλομόρφου μπορεί να αυξηθεί αν αυτό βρίσκεται κοντά σε αλληλομόρφο ενός άλλου γενετικού τύπου που ευνοείται έντονα από τη φυσική επιλογή.

Σύμφωνα με τους David W. Onstad & Charles A. Guse (2008), όπου επικεντρώθηκαν στην αναπαραγωγή αρθροπόδων με διακριτές γενεές, όπου υποθετικά κατά την διάρκεια περιόδου της επιλογής δεν πραγματοποιήθηκαν μεταλλάξεις. Η φυσική επιλογή των πληθυσμών, συμβαίνει σε ετερογενή τοπία όπου οι διαχείρισης εφαρμόζονται σε χώρο και χρόνο. Όσο μεγαλύτερη είναι η κυριαρχία της ανθεκτικότητας ετερόζυγωτών κατά την διάρκεια όλου των σταδίων ζωής, τόσο ταχύτερη γίνεται η εξέλιξη. Με τυχαία γενετική μετατόπιση γίνεται με επιβράδυνση η εξέλιξη.

Πολλές προσαρμογές μπορούν να μην είναι εκ πρώτης όψεως τόσο εντυπωσιακές, για παράδειγμα η παραλλαγή ενός ενζύμου που του επιτρέπει να λειτουργεί καλύτερα σε ψυχρά περιβάλλοντα, όπου είναι εξίσου σημαντικό για την επιβίωση και την αναπαραγωγή.

Τέτοιους είδους προσαρμογές μπορεί να αναπτυχθούν σταδιακά με την πάροδο του χρόνου, δεδομένου ότι η φυσική επιλογή αυξάνει τις συχνότητες των αλληλομόρφων που ευνοούν την επιβίωση και την αναπαραγωγή. Καθώς αυξάνεται το ποσοστό των ατόμων που φέρουν ευνοϊκά γνωρίσματα, το είδος προσαρμόζεται καλύτερα στο περιβάλλον του, δηλαδή κάνει την εμφάνιση της προσαρμοστική εξέλιξη. Οι φυσικές

και βιολογικές παράμετροι του περιβάλλοντος ενός οργανισμού ενδέχεται να μεταβληθούν με την πάροδο του χρόνου. Κατά, συνέπεια, η προσαρμογή του μπορεί να είναι ένας «στόχος», όποτε η προσαρμοστική εξέλιξη μετατρέπεται σε μια συνεχή, δυναμική διεργασία.

Δύο από τους σημαντικούς παράγοντες-μηχανισμούς που προκαλούν εξελικτική αλλαγή στους πληθυσμούς, είναι με τη γενετική παρέκκλιση και τη γενετική ροή. Με αυτούς τους δύο μηχανισμούς-παράγοντες μπορούν να αυξήσουν τις συχνότητες των αλληλομόρφων που βελτιώνουν την προσαρμογή του οργανισμού στο περιβάλλον του. Η γενετική παρέκκλιση μπορεί να αυξήσει τη συχνότητα ενός ευνοϊκού αλληλομόρφου, αλλά είναι εξίσου πιθανό να τη μειώσει. Παρομοίως με τη γενετική ροή, μπορεί να εισάγει στον πληθυσμό αλληλομόρφα που ευνοούν την προσαρμογή, αλλά και αλληλομόρφα που δυσχεραίνουν. Ο μόνος εξελικτικός μηχανισμός που οδηγεί πάντοτε σε αυξημένη προσαρμογή είναι η φυσική επιλογή.

### 1.7 Μορφές πολυμορφισμού που διέπουν στην αρμοστικότητα

Στην βιολογία και ζωολογία η εμφάνιση δύο ή περισσότερων διαφορετικών μορφών, που διαφέρουν φαινοτυπικά μεταξύ ενός πληθυσμού, ονομάζεται πολυμορφισμός. Για να ταξινομηθούν ως τέτοια πρέπει να καταλαμβάνουν τον ίδιο βίοτοπο και να ανήκουν σε πληθυσμούς με τυχαίο ζευγάρισμα (Ford E.B. 1965).

Απλούστατα, ο πολυμορφισμός είναι όταν υπάρχουν δύο ή περισσότερες δυνατότητες ενός χαρακτηριστικού ενός γονιδίου. Για παράδειγμα, όταν υπάρχουν περισσότερα από ένα πιθανό χαρακτηριστικό όσον αφορά τον χρωματισμό της επιδερμίδας μεταξύ των πληθυσμών που μπορεί να διαφέρουν χρωματικά. Λόγω αυτού γίνονται παραλλαγές σε συγκεκριμένα γονίδια, που ονομάζεται πολυμορφισμός.

Με διάφορους μηχανισμούς επιλογής διακρίνεται ο πολυμορφισμός, για παράδειγμα με την ετεροζυγία, η θέση ετεροζυγωτίας που αρμόζει καλύτερα αντί στην ομοζοιγωτία. Υπάρχουν αρκετά γενικά παραδείγματα του πολυμορφισμού, όπως είναι ο πολυμορφισμός χρωμοσωμάτων, η εμφάνιση σεξουαλικής δυσμορφίας, οι ομάδες του ανθρωπίνου αίματος καθώς και τα μόρια MHC (Major Histocompatibility Complex) κτλ.

Το MHC είναι ένα σύνολο γονιδίων που κωδικοποιούνται οι πρωτεΐνες στην κυτταρική επιφάνεια, οι οποίες είναι απαραίτητες για το ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών, τα οποία καθορίζουν την συμβατότητα. Η κύρια λειτουργία του MHC είναι η δέσμευση με αντιγόνα που προέρχονται από παθογόνα και εμφανίζονται στην κυτταρική επιφάνεια για την αναγνώριση καταλληλότητας των κυττάρων T. Προκαλούν αλληλεπιδράσεις λευκοκυττάρων που ονομάζονται λευκά αιμοσφαίρια, τα οποία είναι κύτταρα ανοσίας, με άλλα λευκοκύτταρα ή με κύτταρα του σώματος. Το MHC, καθορίζει την ευαισθησία ενός ατόμου σε μια αυτοάνοση ασθένεια μέσω διασταυρούμενης ανοσοποίησης (Jenaway CA Jr et al. 2001).

Είναι το κατάλληλο εργαλείο για επίλυση διάφορων θεμάτων στην γενετική πληθυσμού, όπου διευκολύνει την κατανόηση της εξελικτικής ιστορίας και να αξιολογηθεί η τρέχουσα κατάσταση των πληθυσμών ή του είδους. Σε περίπτωση που μεταβληθεί το MHC, διατηρείται μέσω μηχανισμών που εξαρτώνται από παθογόνους, δηλαδή με κατευθυνόμενη επιλογή ανθεκτικό ατόμων σε ασθένειες που υπάρχουν στο περιβάλλον και επιλογή εξισορρόπησης. Αυτή η περίπτωση δίνει πλεονέκτημα σε εκείνα τα άτομα που φέρουν ασυνήθιστα ή σπάνια αλληλόμορφα γονιδίων MHC, μια άλλη περίπτωση, τα γονίδια MHC επηρεάζουν την απόδοση αναπαραγωγής των ατόμων (Tarassian KK et al. 2014).

Αρκετές μελέτες υποδηλώνουν πως η εξισορρόπηση επιλογής στο MHC είναι πιο ασθενές στα θαλάσσια θηλαστικά σε σύγκριση με τα χερσαία θηλαστικά. Με μελέτη που

πραγματοποιήθηκε από Maria Jose Villanueva et al. (2013), έγινε σύγκριση του MHC-DQB με αντίθεση δεικτών της μοριακής εξέλιξης. Οι δείκτες συγκρίθηκαν μεταξύ του DQB και του μιτοχονδριακού γονιδίου του κυτοχρώματος b (cytb). Οι δείκτες έδειξαν ότι η επιρροή της επιλογής εξισορρόπησης DQB είναι πιο μεταβλητά και πιο ασθενές για τα κητώδη.

Με μελέτη που είχε γίνει σε πληθυσμούς θαλάσσιων λιονταριών (*Zalophus wolfebaeki*), τα αποτελέσματα ανέδειξαν πως σε συγκεκριμένους τόπους υπήρξε συγγένεια του γονιδιώματος (Lenz et al. 2013). Στην μελέτη έλεγξαν με γενετική κλωνοποίηση για να δουν την επιρροή τόπου MHC DRB και διαπίστωσαν ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ της ποικιλίας DRB καθώς παρακολούθησαν όλα τα αρμοστικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η μάζα γέννησης, η επιβίωση νεογνών και η αναπαραγωγική επιτυχία των γυναικών. Σε μια άλλη περίπτωση, σε μια άλλη μελέτη κατέληξαν πως το HFC είναι σημαντικό στοιχείο που επηρεάζει ολόκληρο το γονιδίωμα (Szulkin et al. 2010).

Με την επιλογή τόπου MHC είναι ένα στοιχείο εξισορρόπησης για διατήρηση της ποικιλομορφίας, καθώς είναι σαν άμυνα κατά των παθογόνων (Bernatchez and Landry 2003). Αυτός ο παράγοντας είναι σημαντικός για τα θαλάσσια είδη, συμπεριλαμβανομένου τα κητοειδή (Eizaguirre & Lenz 2010; Vassilakos et al. 2009).

Η ποικιλομορφία σε αυτούς τους τόπους μπορεί να προωθηθεί μέσω της επιλογή αναπαραγωγής, βάση με τα στοιχεία κάποια από τα θηλυκά είδη επιλέγουν συντρόφους βασισμένα με το γονότυπο γονότυπου MHC (Schwensow & Sommer 2008; Juola & Dearbom 2012).

Αποδεικνύεται πως μέχρι σήμερα με ισχυρή συσχέτιση ετεροζυγωτίας και αρμοστικότητας, οφείλεται στην ομομικτική καταπτώση σε φυσικούς πληθυσμούς όπου έχουν έλλειψη συγγένειας. Προτάθηκε η αναφερόμενη ερμηνεία πως κάτω από μερικές περιστάσεις ετεροζυγωτίας μπορεί να επεξηγηθεί διαφορές στην αρμοστικότητα. Το HFC's με

χρήση αλληλόμορφων ερμηνεύονται πιο δυσκολία, με αποτελέσματα οι πρωτεΐνες να ήταν υπό επιλογή. Με την ανακάλυψη των μικροδορυφόρων υπήρχαν άφθονη υποθετικοί γενετικοί δείκτες, έτσι υπήρξε μια ευρέως αναδειξί του HFC, κυρίως να επιλέγει του δείκτες του εαυτού του (Hansson B.&Westerberg L. 2002).

Οι πληθυσμοί χρειάζονται την διατήρηση ποικιλίας για να μπορέσουν να ανταποκριθούν στις νέες πιέσεις όπως είναι η κλιματική αλλαγή, συμπεριλαμβανομένη η παθογόνος αλλαγή, η οποία είναι επηρεαζόμενη από την κλιματική αλλαγή. Μια σχέση μεταξύ ποικιλίας και αρμοστικότητας έχει δείξει σε μικρούς πληθυσμούς που ήταν ευαίσθητα σε παθογόνους οργανισμούς και μπορούν να προωθείται από την αναπαραγωγή και την σχετική απώλεια της ετεροζυγωτίας (Tsitrone et al. 2001).

Αυτό το γεγονός επηρεάζεται με σχέση ατόμων του πληθυσμού, όπου και υπήρξαν και αρκετές μελέτες αναφερόμενες στην συσχέτιση ετεροζυγωτία και αρμοστικότητα φυσικών πληθυσμών (HFCs David 1998, Chapman et al. 2009), καθώς αξιολογούνται οι αποτελεσματικές μετρήσεις της αναπαραγωγής για να αναγνωριστεί αυτή η συσχέτιση (Chapman et al. 2009).

## 1.8 Νέες τεχνικές

Με την εξέλιξη της τεχνολογίας όλο και περισσότεροι μέθοδοι ανακαλύπτονται, με αποτέλεσμα να βοηθάει τους επιστήμονες στην διαδικασία επεξεργασίας δεδομένων.

Σύμφωνα με μελέτη που βασίστηκε σε 10 μικροδορυφορούς για την συσχέτιση ετεροζυγωτίας και αρμοστικότητας σε φυσικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα μεγέθους ήτανε πολύ μεγάλα, ως εκ τούτου οι μικροί δείκτες δείχνουν την μικρή δύναμη που εντοπίζεται στην αναπαραγωγή. Έτσι, στην μελέτη που πραγματοποιήθηκε από Hoffman et al.(2013), έγινε χρήση αλληλούχισης με ένζυμα περιορισμού διπλής πέψης DNA (RAD), για την ακριβή εκτίμηση γενετικής ετεροζυγωτίας και της μετάλλαξης του οργανισμού.

Δηλαδή η μελέτη, αλληλούχισε πληθυσμούς γνωστής γενεαλογίας του ποντικίου (*Peromyscus polionotus*), όπου ήταν διακριτή η ισχυρή αρμονία μεταξύ με το συντελεστή αναπαραγωγής και την μέτρηση ετεροζυγωτίας σε SNPs. Μετέπειτα έγινε σε φυσικούς πληθυσμούς του είδους φώκιας λιμανιού (*Phoca vitulina*), είχε εντοπιστεί ισχυρό παράσιτο βάση σε 27 μικροδορυφόρους που ενισχύθηκαν περισσότερο με λιμανιού SNPs. Η παρατηρούμενη απόκλιση εξηγείται από την αύξηση ετεροζυγωτίας σχεδόν η πενταπλάσια (49%).

Ένας γρήγορος και οικονομικός μέσο γονοτυπίας χιλιάδων πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου κάθε οργανισμού (SNP), είναι ο προσδιορισμός αλληλουχίας που σχετίζεται με το DNA (RAD), όπου περιορίζει σημεία. Η πιο πάνω προσέγγιση συγκεντρώνει το προσδιορισμό της αλληλουχίας υψηλής απόδοσης, γύρω από περιορισμένες περιοχές ενζύμου που διανέμονται σε όλο το γονιδίωμα. Έτσι, δημιουργώντας αρκετά βαθιά τοπική κάλυψη για αξιοπιστία SNPs ως είτε ετερόζυγο ή ομόζυγο.

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Γονιδιωματικές αναλύσεις

Πραγματοποιήθηκε δημιουργία βιβλιοθήκης DNA με 84 δείγματα (συμπεριλαμβανόμενες από 7 ομάδες για κάθε 12 δείγματα), στην συνέχεια ακολουθήσε ρητά το πρωτόκολλο ddRADseq. Μετέπειτα, με την επιλογή των ενζύμων 6bp (*HindIII*) και με 4bp (*MspI*) όπου ήτανε βασισμένα σε προσομοιώσεις που επιτελείται υπολογιστή σε λογισμικού πακέτο R SimRAD. Η επιλογή μεγέθους θραύσματος ήταν 250-350 bp με εύρος μεγέθους 100 bp (επιλέχθηκε με την χρήση Sage Science PippinPrep). Η αλληλούχιση συνδυάστηκε με το τελικό ζεύγος (2X 125 bp) σε μια γραμμή Illumina HiSeq<sup>™</sup>\_2500(version 4 chemistry). Με κομμένη ανάγνωσή αλληλούχισης, όπου και διαχωρίστηκαν σε 110 bp και με την μέθοδο της πολυπλεξίας, με εντολή `process_radtags` του λογισμικού STACKS. Μετά τον ποιοτικό έλεγχο



(απαραίτητοι ήτανε η απόρριψη αλληλουχιών με λιγότερο από 1 εκατομμύριο αναγνώριση), έτσι με αυτή την απόκλιση δειγμάτων είχε ως αποτέλεσμα να διατηρηθούν μόνο 68 δείγματα από το 84, κατά μέσο όρο των ανά δείγμα ήτανε 2,8 εκατομμύρια ζεύγη. Τα αναγνωρισμένα ζευγαρωμένα δείγματα χαρτογραφήθηκαν έναντι του γονιδιώματος *Tursiops truncatus* (εντάχθηκε GCA\_001922835.1) με χρήση BWA v.0.7.12 (bwa mem-aM). Για κάθε αποτέλεσμα sam αρχείο μετατρέποταν σε μορφή bam με τη χρήση SAMTOOLS v.1.3.

Με τη χρήση εντολής VariantFiltration, τα indels και τα μη-διαλλακτικά SNPs φιλτράρονταν και στην συνέχεια, με τη χρήση εντολής VariantFiltration, τα SNPs διηθήθηκαν με βάση ποιότητα της χαρτογράφησης και με την χρήση των ακόλουθων ρυθμίσεων: - filterExpression "QD<2.0|| FS >60.0 || MQ RankSum <-12.5||ReadPosRankSum<-8.0". Τα αποτελέσματα QUAL (QD) ομαλοποιήθηκαν με βάση βάθους των αλληλόμορφων (AD) για μια διαφορετική τιμή Phred-sc p-value (FS) με την χρήση ακριβείς δοκιμής του Fisher για ανίχνευση σειράς του στοιχείου. Με την εντολή MQRankSum ορίστηκε με το αποτέλεσμα Z από το Wilcoxon, όπου δίνει αποτελέσματα αθροιστικής κατάταξης, των ιδιοτήτων χαρτογράφησης Alt συγκριτικά με το Ref. Το ReadPosRankSum, εντόπισε την θέση ανάγνωσης. Το SAMTOOLS χρησιμοποιήθηκε, για να πάρει τις αναγνώσεις σε μια καλύτερη αρμονία και διατήρηση των SNP's σε πιο γρήγορη μορφή και μετέπειτα οι γραμμές συναρμολογήθηκαν με τη χρήση GATK HaplotypeCaller.

Με τη χρήση plugin-filterAlign μέσω του TASSEL v.5.0, το αρχείο vcf ταξινομήθηκε τουλάχιστον το 80%, τα οποία SNP είχαν σημειώσει πιο μικρές συχνότητες αλληλομόρφων (MAF) στα 0,05. Οι ρυθμίσεις δημιούργησαν 83,414 SNP's. Το εργαλείο vcf, μέσω της εντολής thin (που καθορίστηκαν στα 200bp), στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τη διατήρηση ενός SNP ανά ανάγνωση, μειώνοντας τον τελικό αριθμό σε 43,018 SNP's για περαιτέρω αναλύσεις. Το λογισμικό TASSEL v.5.0, χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση Γενικού Γραμμικού Μοντέλου. Η εντολή του λογισμικού TASSEL, στο αρχείο vcf ταξινομήθηκε με τη χρήση plugin

SortGenotypeFile. Για το γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM), αναλύεται το φιλτραρισμένο αρχείο vcf και το αρχείο είχε χαρακτηριστεί (δείγματα που κατανέμονται σε διαφορετικές κατηγορίες μόλυνσης, τάξης ηλικίας και θνησιμότητα κατά την διάρκεια ενός συμβάντος *morbillivrius*) που ενώνει όλα τα χαρακτηριστικά μέσω της εντολής intersect. Για τελική ανάλυση GLM, οι μεταβολές ορίστηκαν σε 1.000, κάτω από την εντολή `-FixedEffectLMPlugin`. Η λειτουργία επιτελεί αναλύσεις συσχετισμού με τη χρήση ενός γραμμικού μοντέλου με σταθερά αποτελέσματα με ελάχιστα τετράγωνα και χρησιμοποιεί ένα γραμμικό μοντέλο σταθερών αποτελεσμάτων για να καθορίσει την συσχέτιση μεταξύ των loci-τόπων διαχωρισμού και ενός χαρακτηριστικού.

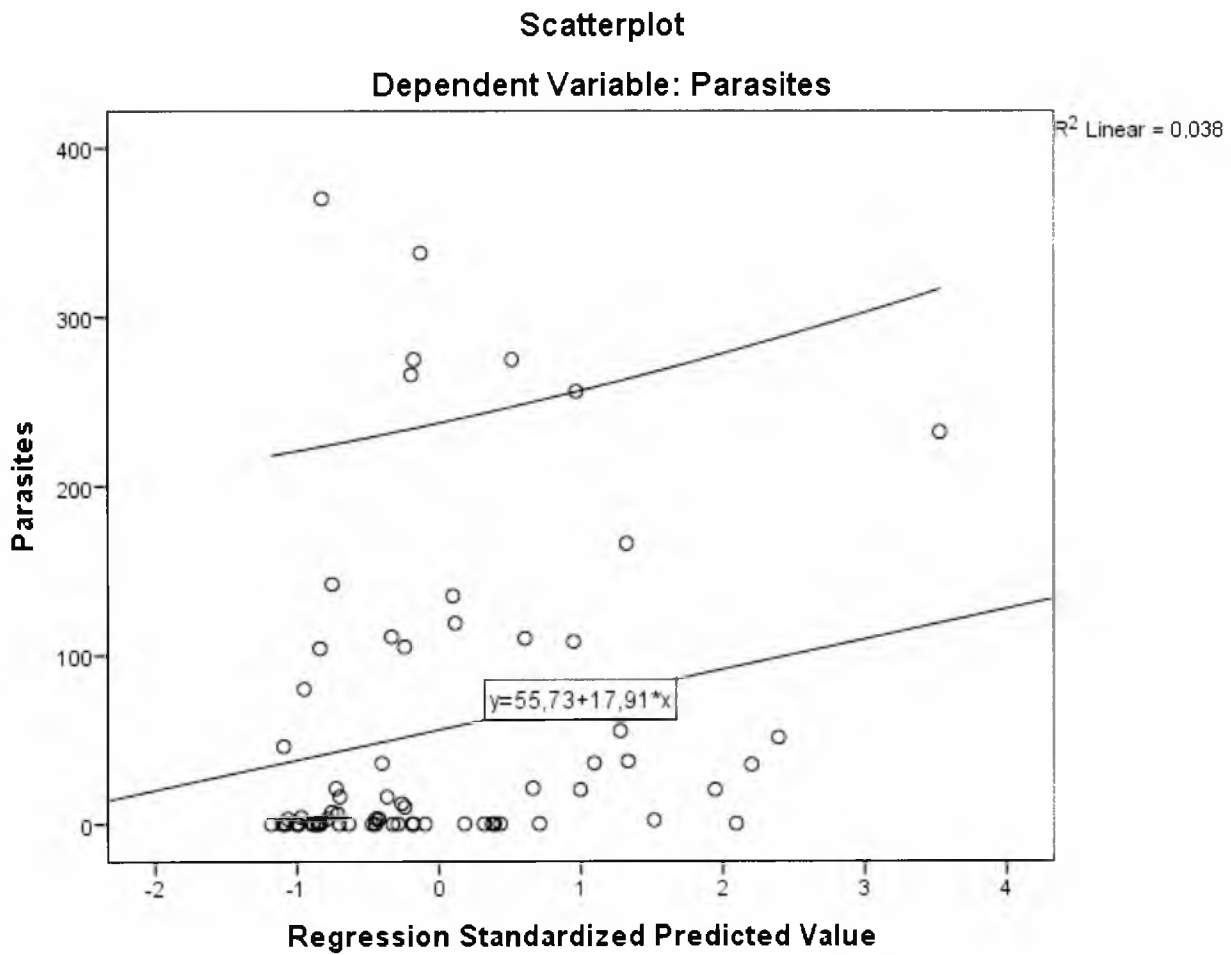
Για να τον έλεγχο της παρουσίας SNP στα χρωμοσώματα σύμφωνα με την σεξουαλική ταυτότητα τους, χρησιμοποιήθηκε Pearl script Nucmer στο πρόγραμμα MUMmer για να ευθυγραμμιστεί το αναφερόμενο γονιδίωμα Turniops με το γονιδίωμα της αγελάδας (αριθμός πρόσβασης: GCA\_002263795.2). Το πρόγραμμα βρίσκει μέγιστες ακριβείς αντιστοιχίσεις και τις ευθυγραμμίζει ώστε να ενταχθούν στα clusters σε μια ενιαία ευθυγράμμιση ζεύγους με υψηλή βαθμολογία. Το αρχείο «δέλτα» δημιουργήθηκε με αυτή την ανάλυση με χρήση σημασίας `-delta-filter`. Τα προγράμματα `show-coords` χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της εξόδου ευθυγράμμισης δέλτα που εμφανίζει συνοπτικές πληροφορίες όπως είναι η θέση, το ποσοστό ταυτότητας και το ποσοστό κάλυψης ευθυγράμμισης.

Έγινε σύγκριση φορτίων των παθογόνων ενάντια σε μερικές μετρήσεις της γονιδιωματικής ποικιλομορφίας, που προέκυψαν με χρήση του πακέτου λογισμικού R InbreedR.

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

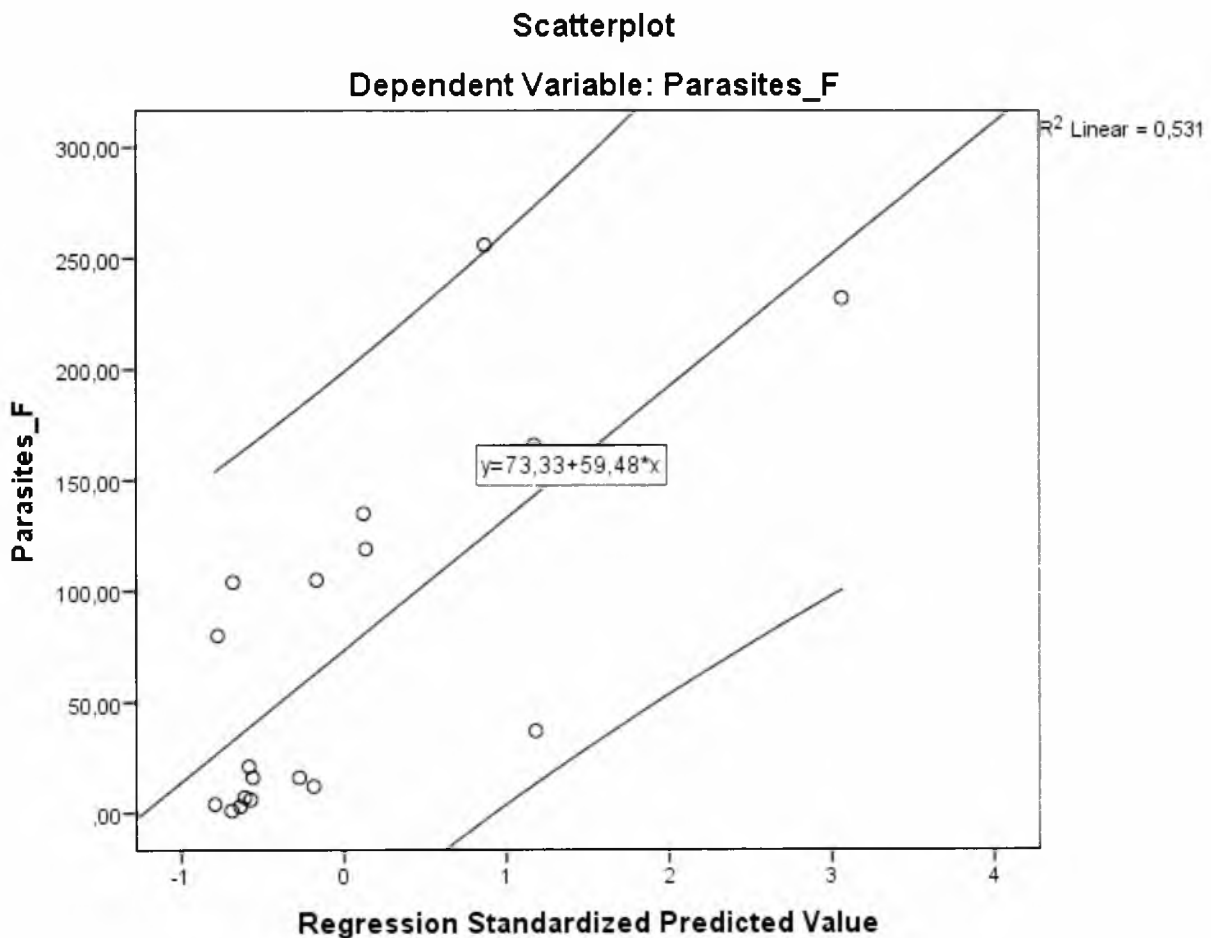
Συλλέχθηκαν και έγινε σύγκριση των παρασίτων που βρέθηκαν σε πληθυσμούς δελφινιού του είδους *Tursiops truncatus* αρχικά, έγινε συσχέτιση μεταξύ όλων των ατόμων πληθυσμού για 68 άτομα και συσχέτιση των παρασίτων ανά φύλο, 30 θηλυκά και 38 αρσενικά. Η συσχέτιση έγινε με ανάλυσή One way ANOVA , General Linear Model (GLM) και Regression, οι παράγοντες όπου εξετάστηκαν ήταν το παρασιτικό φορτίο, ετεροζυγωτία\* Morbilli \* Φύλλο.

Στο πρώτο σχήμα 3.1 με την ανάλυση Regression Standardized Predicted Value , συσχετίστηκαν όλα τα άτομα του πληθυσμού (68) μεταξύ των παρασίτων. Η συσχέτιση έδειξε πως η κατανομή των παρασίτων εντός όλου του πληθυσμού δεν ήταν και τόσο αρμοστική. Μπορούμε να παρατηρήσουμε και από την γραμμική τάση πως δεν υπάρχει κάποια ροή μεταξύ τους. Καθώς οι γραμμές υποδηλώνουν την συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ του παράσιτου και ολόκληρου του πληθυσμού.



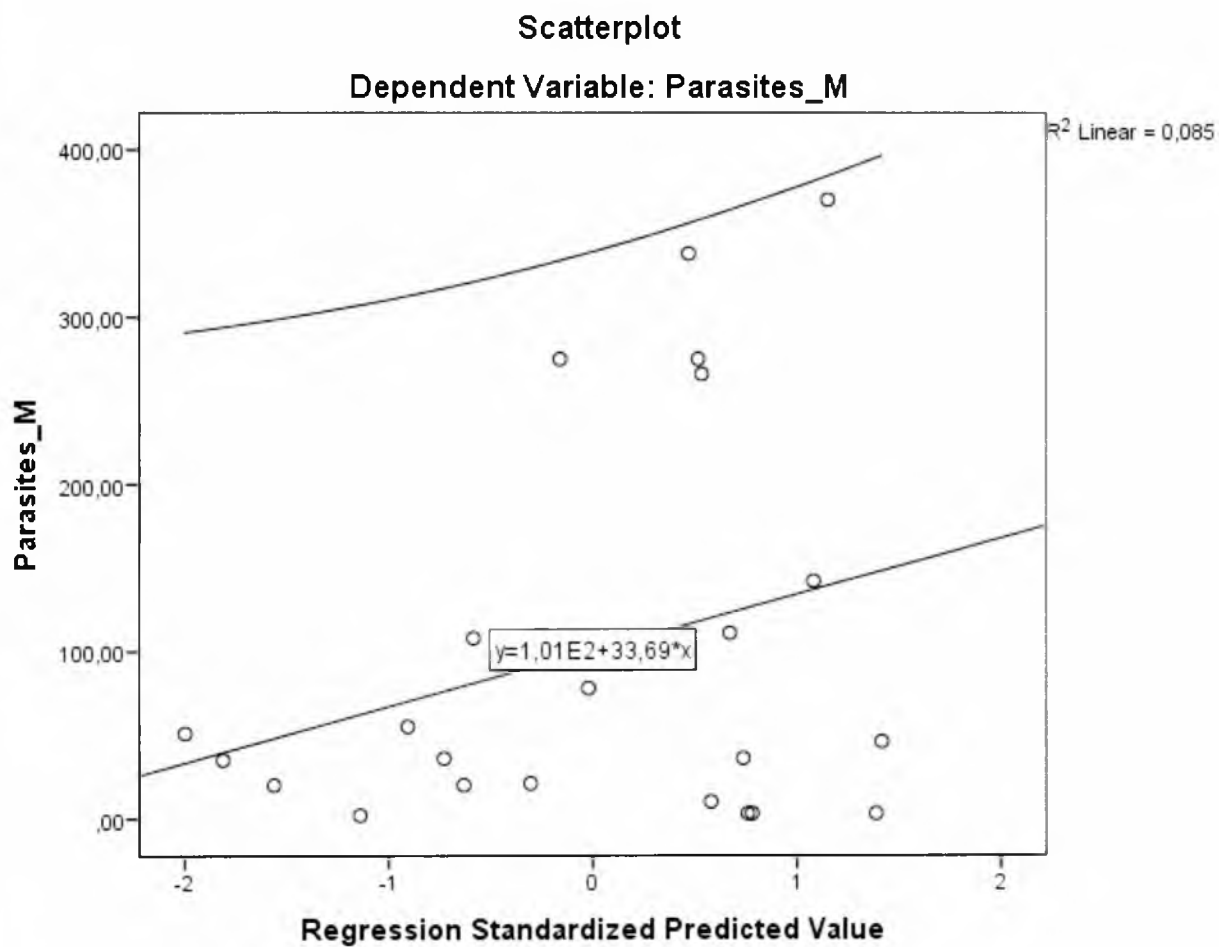
Σχήμα 3,1: Συσχέτιση παρασίτων με όλο τα άτομα πληθυσμού (68)

Στο πιο κάτω διάγραμμα 3.2 είναι εμφανές η κατανομή των παρασίτων εντός του πληθυσμού. Υποδηλώνει πως τα παράσιτα έχουν καλύτερη αρμοστικότητα στους θηλυκούς πληθυσμούς. Σύμφωνα με την γραμμική τάση του μοντέλου υπάρχει αρμονική κατανομή στο διάγραμμα καθώς και καλύτερη συνοχή των γραμμών του διαγράμματος, γεγονός που υποδηλώνει πως τα 30 θηλυκά άτομα έχουν καλύτερη συσχέτιση με τα παράσιτα.



Σχήμα 3,2: Συσχέτιση παρασίτων με τα θηλυκά άτομα (30)

Στο πιο κάτω διάγραμμα 3.3 έγινε η συσχέτιση που έγινε στα αρσενικά άτομα μεταξύ των παρασίτων δεν έδειξαν εμφανής κατανομή. Αυτό υποδηλώνει πως τα αρσενικά άτομα δεν υπάρχει κάποια σημαντική ετεροζυγωτία με τα παράσιτα. Σύμφωνα με την γραμμική ροή του μοντέλου δεν αντικατοπτρίζει μια καλή συσχέτιση μεταξύ των παρασίτων. αφότου δεν παρατηρείται κάποια κατανομή των παρασίτων.



Σχήμα 3,3: Συσχέτιση παρασίτων με τα αρσενικά άτομα (38)

Στο κάτω πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από με General Linear Model, συσχετίστηκαν όλοι οι παράγοντες και ανά μεταξύ τους, το sMLH, το Morbilli και το φύλο. Είναι εμφανές η στατιστική διακύμανση μεταξύ του sMLH \* φύλο, καθώς είναι ο μοναδικός παράγοντας που είναι αρκετά κοντά στο 0,05 που είναι και ο καθοριστικός αριθμός στατιστικής διαφοράς πρέπει να κυμαίνεται στα πιο πάνω όρια.

**Πίνακας 3.1** Συσχέτιση όλων των παραγόντων μεταξύ τους (sMLH, παράσιτα και φύλο) με General Linear Model

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	212331,881 <sup>a</sup>	21	10111,042	1,346	,199
Intercept	162852,014	1	162852,014	21,675	,000
sMLH	23673,632	3	7891,211	1,050	,380
Morbilli	29165,745	2	14582,872	1,941	,155
sex	710,717	1	710,717	,095	,760
sMLH * Morbilli	24513,343	6	4085,557	,544	,772
<b>sMLH * sex</b>	<b>98001,197</b>	<b>3</b>	<b>32667,066</b>	<b>4,348</b>	<b>,009</b>
Morbilli * sex	15704,088	2	7852,044	1,045	,360
sMLH * Morbilli * sex	19815,146	4	4953,787	,659	,623
Error	338101,283	45	7513,362		
Total	758534,000	67			
Corrected Total	550433,164	66			

Στο κάτω πίνακα 3.2 γίνεται συσχέτιση με τη μέθοδο One way Anova σε όλο το πλήθος των ατόμων 68, όπου ο καθοριστικός παράγοντας ήταν τα παράσιτα και ο παράγοντας ήταν το sMLH. Είναι εμφανές πως δεν υπάρχει κάποια στατιστική διαφορά μεταξύ του πλήθους, το  $F=2,599$  και με στατιστική διαφορά του P value είναι στα 0,112.

#### ANOVA<sup>a</sup>

**Πίνακας 3.2** Αποτελέσματα με χρήση ANOVA για τα 68 άτομα

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	21166,306	1	21166,306	2,599	,112 <sup>b</sup>
	Residual	529266,858	65	8142,567		
	Total	550433,164	66			

Στο πιο κάτω πίνακα 3.3 γίνεται συσχέτιση με τη μέθοδο One way Anova σε όλο το πλήθος των ατόμων 68, όπου ο καθοριστικός παράγοντας ήταν τα παράσιτα και το sMLH. Είναι εμφανές η στατιστική διαφορά στατιστική διαφορά μεταξύ του θηλυκού πλήθους, το  $F=18.092$  και με στατιστική διαφορά του P value είναι στα 0,001. Με τα πιο κάτω αποτελέσματα είναι ευδιάκριτη η στατιστική απόκλιση μεταξύ του sMLH και παράσιτα.

#### ANOVA<sup>a</sup>

**Σχήμα 3.3** Αποτελέσματα ANOVA για τα 30 θηλυκά άτομα

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	60136,358	1	60136,358	18,092	,001 <sup>b</sup>
	Residual	53183,642	16	3323,978		
	Total	113320,000	17			



Στο πιο κάτω πίνακα 3.4 γίνεται συσχέτιση με τη μέθοδο One way Anova σε όλο το πλήθος των ατόμων 68, όπου ο καθοριστικός παράγοντας ήταν τα παράσιτα και το sMLH. Είναι εμφανές πως δεν υπάρχει κάποια στατιστική διαφορά στατιστική διαφορά μεταξύ των αρσενικών ατόμων, το  $F=2,055$  και με στατιστική διαφορά του P value είναι στα 00,166. Με τα πιο κάτω αποτελέσματα είναι ευδιάκριτη η στατιστική απόκλιση μεταξύ του sMLH και παράσιτα.

#### ANOVA<sup>a</sup>

**Σχήμα 3.4** Αποτελέσματα ANOVA για τα 38 αρσενικά άτομα

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	26103,120	1	26103,120	2,055	,166 <sup>b</sup>
	Residual	279502,713	22	12704,669		
	Total	305605,833	23			

## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι αναλύσεις με ddRAD αλληλούχιση έδειξαν ότι η ετεροζυγωτία σε ολόκληρο το γονιδίωμα σχετίζεται σημαντικά με τη μόλυνση πνευμόνων, κυρίως στα θηλυκά άτομα. Ένα σημαντικό αποτέλεσμα κυμαίνεται μόνο στα θηλυκά άτομα. Το γεγονός που επηρεάζονται μόνο τα θηλυκά άτομα, οφείλεται σε παράγοντες του στρες όπως είναι ο τοκετός και η μητρική φροντίδα, έτσι να κάνει τα θηλυκά άτομα πιο επιρρεπές προς τα παράσιτα.

Οι πληροφορίες που γνωρίζουμε για ζωή παρασίτων δεν είναι ευρέως εκτεταμένες καθώς μπορεί να παρθούν περαιτέρω δεδομένα για το φύλο όπου παρατηρείται. Πρόκειται για παράσιτα οποιουδήποτε είδους, που έχουν υψηλά επίπεδα μόλυνσης σε νεαρά άτομα και νεογνικούς ξενιστές όπου μεταδίδεται στο γάλα ή μέσω του πλακούντα (Measures 2001). Με δημοσίευτα δεδομένα για το παράσιτο (*Skrjabinalius guevarai*), σε πληθυσμούς ζωνοδέλφινου υποδηλώνουν την άμεση μεταφορά παρασίτων στα νεογνά μέσω από το μητρικό γάλα έως και 80 παράσιτα (Aznar et al. pers. comm.). Ωστόσο, η μόλυνση σε ενήλικες υποδεικνύει τη δυνατότητα μεταφοράς παράσιτων ξενιστών.

Οι δείκτες της ετεροζυγωτίας αντικατοπτρίζουν μια γενική κατάσταση του γονιδιώματος, όπου αυτό είναι σε μια ευρεία κατάσταση. Αν δεν υπάρχει πηγή συσχέτισης μεταξύ των τόπων, το σύνολο δεικτών θα αντικατοπτρίζουν την κατάσταση των συγκεκριμένων δεικτών και δεν θα συσχετίζονται με ετεροζυγωτία σε άλλο σημείο του γονιδιώματος (Chakraborty 1981, 1987; Lynch and Walsh 1998; Slate et al. 2004).

Το HFC είναι μια διαδομένη μέθοδος για είδη οργανισμών σε φυσικούς πληθυσμούς (Mitton and Grant 1984; Zouros and Foltz 1987). Αρκετά δεδομένα υποδεικνύουν πως το HFC είναι ένα τυπικό αδύναμο σήμα, που εξηγεί πως η διακύμανση των κατάλληλων χαρακτηριστικών συνήθως είναι ελάχιστα (Britten 1996; David 1998; Coltman and Slate 2003; Chapman et al. 2009).

Αρκετές μελέτες φυσικών πληθυσμών αποκαλύπτουν σύνδεση ετεροζυγωτίας οι οποίοι μεταφέρουν ελάχιστα παράσιτα, ζούνε περισσότερο και είναι πιο ελκυστικά στο αντίθετο φύλο. Αυτά τα πρότυπα εμφανίζονται πάντα και συχνά έχουν υψηλή σημαντικότητα, αλλά συνήθως ο απολογισμός της ετεροζυγωτίας για πολύ μικρές ποσότητες παραλλαγής στη αρμοστικότητα. Ωστόσο, αρκετές μελέτες αναλύουν γύρω στα 10 loci, παριστάνοντας το πολύ μικρό κλάσμα του γονιδιώματος. Ως εκ τούτου, με την χρήση υψηλής απόδοσης αλληλουχίας DNA γίνεται υπολογισμός ετεροζυγωτίας γονιδιώματος βασισμένο

σε χιλιάδες γενετικούς τόπους ώστε να βρεθεί η αντανάκλαση της αναπαραγωγής. Συνεπάγεται ότι η μεγαλύτερη αναλογία την αρμοστικής διαφοράς μπορεί να συνδέεται με το γονότυπο (Hoffman et al. 2013).

Τα χαρακτηριστικά της αρμοστικότητας επηρεάζονται σημαντικά με τους ταχείς ρυθμούς της κλιματικής αλλαγής και με τις ανθρώπινες πιέσεις. Οι οργανισμοί έχουν εναλλασσόμενες συμπεριφορές προς το μικροβιολογικό τους προφίλ για να μπορούν να αντιμετωπίσουν τις αρνητικές επιδράσεις της κλιματικής αλλαγής (P.Gienapp et al. 2008).

Η κλιματική αλλαγή είναι εμφανές σε πολλές οικολογικές διεργασίες, όπου διάφοροι θαλάσσιοι και χερσαίοι οργανισμοί να μεταλλάσσουν τα μη γενετικά δεδομένα τους, όπως είναι εξέλιξη και τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά για καλύτερη προσαρμογή της κλιματικής αλλαγής (P.Gienapp et al. 2008).

Οι πληθυσμοί όταν βρίσκονται υπό πιέσεις της κλιματικής αλλαγής, οι πληθυσμοί ανταποκρίνονται με διάφορους τρόπους, όπως είναι η προσαρμογή των μεταβαλλόμενων συνθηκών μέσω των γενετικών αλλαγών μέσω της διαδικασίας της εξέλιξης (Houghton et al. 2001; Jones et al. 2001). Οι τρόποι αντιμετώπισης των περιβαλλοντικών αλλαγών ενδέχεται να ποικίλει ανάλογα με την χρονική στιγμή που εξετάζεται ο πληθυσμός, την ιστορία ζωής των οργανισμών και το ρυθμό της περιβαλλοντικής αλλαγής καθώς και την κατάσταση των εναλλαγμένο οικοτόπων (Holt 1990; Meyers & Bull 2002; Sultan & Spencer 2002; Davis et al. 2005; Kokko & López-Sepulcre 2006).

## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 5.1 Ξένη Βιβλιογραφία

- Barton, N. H., Briggs, D. E. G., Eisen, J. A., Goldstein, D. B. & Patel, N. H. 2007. Εξέλιξη. Επιμέλεια μετάφρασης: Ζήσης Μαμούρης. Εκδ. UTOPIA. Αθήνα.
- Charlesworth D, Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu Rev Ecol Syst* 18:237–268
- Coyne, J. A. & Orr, H. A. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- David W. Onststand & Charles A. Guse (2008) Chapter-Concepts and complexities of populations genetics Academic press pp 69-88.
- DeeR Denver et al.(2005) The transcriptional consequences of mutation and natural selection in *Caenorhabditis elegans*, *Nature Genetics* 37, 544-548
- Gienapp P, Teplitsky C., Alho JS, Mills JA, Merila J. *Molecular ecology* 2008  
Climate change and evolution : disentangling environmental and genetic reaction-  
17(1): 167-78
- Ford AG et al. (2015) High levels of Interspecific gene flow in an endemic cichlid fish adaptive radiation from extreme lake environment *Molecular Ecology*  
24(13):3421-40
- Freeman, S. & Herron, J. C. 2007. *Evolutionary analysis*. Harlow, Prentice Hall.
- Futuyma, D. J. 2009. *Evolution*. Sunderland, Mass. Basingstoke, Sinauer Associates, Palgrave.
- Hansson B, Westerberg L (2002) On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Mol Ecol* 11:2467–2474.
- Hoekstra E. et.al (2006 )A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern *Hopi* vol 313 issue 5783 pp 101-104, *Science*

- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al.(2001) Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; The Major Histocompatibility Complex and Its Functions
- J.Arnold (2001 )Genetic drift, , Encyclopedia of genetics 2001 pp832-834
- J.B.Mitton (2001 ) Gene Flow Encyclopedia of genetics, pp 758-790
- Losos, J. B., Baum, D. A., Futuyma, D. J., Hoekstra, D. E., Lenski, R., Moore, A. J., Peichel, C. L., Schluter, D. & Whitlock, M. (2014). The Princeton guide to evolution. Princeton University.
- María José Villanueva-Noriega Charles Scott Baker, Luis Medrano-González Immunogenetics 2013,Evolution of the MHC-DQB exon 2 in marine and terrestrial mammals, Volume 65, Issue 1, pp 47–61
- P.Ginapp, C. Teplitsky J.S. Alho J.A.Mills and J. Merila (2013), Climate change and evolution: disentangling environmentally and genetic responses, Molecular Ecology 17 (1): pp167-178
- Peter J. Doherty et al. (1995) Gene flow and larval duration in seven species of fish from Great Barrier Reef Ecology 76(8) pp2373-2391
- Ridley, M. (2004). Evolution, Malden, MA, Oxford, Blackwell Science.
- R.S. Singh (2001 )Polymorphism, , Encyclopedia of Genetics 2001, pp1507-1509
- Szulkin M, Bierne N. and David P. (2010) Heterozygosity –fitness correlations: A time for reappraisal Evolution 64: 1 202-1217
- Tarasian KK, Sorokin PA, Kholodova MV, Rozhnov VV. Zh Obshch Biol. 2014 [Major histocompatibility complex (MHC) in mammals' and its importance for studies of rare species (with Felidae family as an example). Jul-Aug 75(4):302-14.

## 5.2 Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

- Baird NA, et al. (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. PLoS ONE 3:e3376.  
Επίσκεψη ιστοσελίδας: 31/08/2019
- Julien Vezilier et al (2013)The impact of insecticide resistance on *Culex pipiens* immunity,. Evolutionary Applications pp 497-509  
Επίσκεψη ιστοσελίδας: 15/09/2019

## 5.3 Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ψώνης Νικόλαος . (2012) Μοριακή Φυλογένεση και Φυλογεωγραφία των δύο "στενά συγγενικών" γενών *Helocigona* & *Campylea* (Γαστερόποδα: Πνευμονοφόρα) στην Ελλάδα

## 6 ABSTRACT

Genetic diversity in natural populations has been extensively studied, with the aim of genetic conservation and the correlation of evolutionary forces with harmony and adaptation. The present study investigates the relationship between genetic profile and parasitic load in dolphin populations. Dolphins differed in parasitic load. Genetic diversity is analyzed by ddRADseq, which shows a distinct correlation between heterozygosity and parasitic pathogenic load in female individuals. The boiling period showed no statistically significant differences in heterozygosity and parasitic load. The results highlight the importance of genetic data and how they relate to evolutionary characteristics in order to create specific practices for the conservation of marine mammals in the Mediterranean.

Keywords: heterozygosity and fitness correlations, ddRADsequencing, parasitic pathogens, dolphins, genetic polymorphism