

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΗΜΑΤΩΔΟΥΣ ΣΤΟ ΣΤΟΜΑΧΟ
ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΦΩΚΙΑΣ (*Monachus monachus*)»**

Ευσταθία Κοϊτσάνου

ΒΟΛΟΣ 2021

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

POSTGRADUATE MASTER'S THESIS

**«MOLECULAR IDENTIFICATION OF A PARASITIC
NEMATODE FOUND IN THE STOMACH OF A
MEDITERRANEAN MONK SEAL (*Monachus monachus*)»**

Efstathia Koitsanou

VOLOS 2021

**«ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΗΜΑΤΩΔΟΥΣ ΣΤΟ ΣΤΟΜΑΧΟ ΤΗΣ
ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΦΩΚΙΑΣ *Monachus monachus*»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1) Γκάφας Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής (Ph.D.), Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυοαποθεμάτων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επιβλέπων,

2) Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Καθηγητής (Ph.D.), Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας **Μέλος,**

3) Αναστασία Κομνηνού, Καθηγήτρια (Ph.D.), Χειρουργική-Συγκριτική Οφθαλμολογία-Ιατρική Εξωτικών και Άγριων Ζώων., Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, **Μέλος.**

Θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα εργασία στην οικογένειά 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/ουσα της εργασίας αυτής, κύριο Γεώργιο Γκάφα 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 μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κύριο Αθανάσιο Εξαδάκτυλο , και την κυρία Αναστασία Κομνηνού για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Ιωάννα Σαραντοπούλου για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά του/της, όσον αφορά στην προμήθεια εργαστηριακού υλικού, καθώς επίσης και για την αμέριστη συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια του πειράματος.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Μεσογειακή φώκια *Monachus monachus* ανήκει στην οικογένεια των Φωκίδων (Phocidae) και χαρακτηρίζεται ως ένα από τα πιο απειλούμενα (E/D) είδη θαλάσσιων θηλαστικών στον κόσμο. Στην Ελλάδα το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού της συναντάται στην περιοχή του Εθνικού Θαλάσσιου Πάρκου Αλοννήσου. Η μεσογειακή φώκια τρέφεται κυρίως με βενθοπελαγικούς οστεϊχθύες καθώς και κεφαλόποδα. Το γεγονός αυτό τις κάνει επιρρεπείς σε μολύνσεις από παράσιτα που ενδiciαιτούν στους οργανισμούς αυτών των ενδιάμεσων ξενιστών. Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία έχει ως στόχο να διερευνήσει την ταυτότητα και την προέλευση ενός τέτοιου παρασιτικού νηματώδους ο οποίος ανιχνεύθηκε σε μία νεκρή νεαρή φώκια *Monachus monachus* η οποία βρέθηκε στον Παγασητικό Κόλπο. Το σώμα του συγκεκριμένου ατόμου αφού βρέθηκε από ψαράδες της περιοχής μεταφέρθηκε για νεκροψία στο εργαστήριο του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος όπου και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε σε καταψύκτη. Για την εξέλιξη της έρευνας πραγματοποιήθηκε ανατομία του στομάχου με σκοπό την ανάλυση του περιεχομένου του, κατά τη διάρκεια της οποίας βρέθηκαν δύο άτομα παρασιτικών νηματώδων τα οποία και συντηρήθηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 70% ώστε να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μοριακή ανάλυση τους. Για την μοριακή ανάλυση διενεργήθηκε εξαγωγή DNA από τους ιστούς των δύο παρασίτων και στη συνέχεια PCR όπου πραγματοποιήθηκαν 35 κύκλοι και με θερμοκρασία ανόπτησης τους 50 °C. Ως μοριακός δείκτης χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial gene (CO1) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη COX1, καθώς η συγκεκριμένη περιοχή είναι αποτελεσματική για την αναγνώριση των γονιδιωμάτων ασπόνδυλων ζώων. Με την ολοκλήρωση της μοριακής ανάλυσης τα

δείγματα στάλθηκαν προς αλληλούχιση. Για την αλληλούχιση ακολουθήθηκε η διαδικασία κατά Sanger τα αποτελέμαστα της οποίας υπέδειξαν πως τα άτομα των νηματώδων που βρέθηκαν στο στομάχι της φώκιας φάνηκαν να ανήκουν στο γένος *Pseudoterranova* και συγκεκριμένα παρουσίασαν 96% ομοιότητα με το είδος *Pseudoterranova bulbosa*. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο με τη χρήση έντεκα (11) αλληλουχιών που προήλθαν από διαφορετικά είδη του που ανήκουν στο γένος *Pseudoterranova* και μίας αλληλουχίας από το είδος *Anisakis physeteris* το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως outgroup (εξωτερική ομάδα). Οι αλληλουχίες που αποκτήθηκαν στοιχήθηκαν με το εργαλείο πολλαπλής στοίχισης ClustalW μέσω του προγράμματος MEGA-X και στη συνέχεια αναλύθηκαν με την μέθοδο Bootstrap και το μοντέλο Kimura -2- parameter (K2P). Το φυλογενετικό δέντρο δημιουργήθηκε με τον αλγόριθμο Maximum Likelihood (ML) μέσω του προγράμματος MEGA-X με 10.000 επαναλήψεις. Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι να ερευνήσει την προέλευση του παρασιτικού νηματώδους που βρέθηκε στο στομάχι της *Monachus monachus* καθώς είναι σε μεγάλο βαθμό συγγενικό με το παράσιτο *Pseudoterranova bulbosa* το οποίο από την έρευνά μας φαίνεται να είναι η πρώτη φορά που συναντάται στην περιοχή της Μεσογείου και συγκεκριμένα , στο στομάχι μίας μεσογειακής φώκιας. Ο πιο κοινός ξενιστής του *Pseudoterranova bulbosa* είναι η γενειοφόρος φώκια (*Erignathus barbatus*) η οποία ενδιαιτεί στον Βόρειο Ατλαντικό ωκεανό. Κάποιες πιθανές εξηγήσεις της παρουσίας του παρασίτου στη Μεσόγειο Θάλασσα είναι αυτή της μεταφοράς του μέσω ενός μολυσμένου ενδιάμεσου ξενιστή όπως το είδος *Gadus morhua* το οποίο είναι γνωστό πως μεταναστεύει στα νερά της Μεσογείου και για το οποίο έχει καταγραφεί μόλυνση από το συγκεκριμένο παράσιτο. Η κλιματική αλλαγή μπορεί να θεωρηθεί ως ένας ακόμη παράγοντας ο οποίος επηρεάζει την κατανομή των ιχθύων και στη σύσταση του θαλάσσιου οικοσυστήματος καθώς μεταβάλλει τη βιογεωγραφία και βιοποικιλότητα των θαλάσσιων

ενδιαιτημάτων με αποτέλεσμα να οδηγήσει σε χωρικές μεταβολές των πληθυσμών ή σε αναδιάρθρωση των τροφικών πλεγμάτων. Επιπλέον Το λιώσιμο των πάγων δύναται να επιτρέψει την ευκολότερη μετανάστευση των θαλάσσιων θηλαστικών όπως οι φάλαινες μεταξύ βορειότερων και νοτιότερων περιοχών με αποτέλεσμα τα θηλαστικά αυτά να έρχονται σε επαφή με νέα είδη παρασίτων και να δρουν ως ξενιστές τους. Τέλος μία ακόμα εξήγηση μπορεί να θεωρηθεί αυτή της παράλληλης εξέλιξης καθώς μέσω του φυλογενετικού δέντρου που κατασκευάστηκε αποδείχθηκε πως το παράσιτό μας έχει ένα κοινό πρόγονο με το είδος *Anisakis physeteris* το οποίο είναι διαδεδομένο στη Μεσόγειο θάλασσα ,συμπεριφορά η οποία μπορεί να είχε ως αποτέλεσμα την προσαρμογή των ατόμων του παρασίτου σε διαφορετικές συνθήκες γεγονός που ενισχύει την διαφοροποίησή του και είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία νέων ειδών. Η αναγνώριση της γενετικής ταυτότητας όπως επίσης και της προέλευσης του παρασιτικού νηματώδους που βρέθηκε στο στομάχι της μεσογειακής φώκιας (*Monachus monachus*) μπορεί να επιφέρει σημαντικές αλλαγές στον τρόπο με τον οποίο αντιλαμβανόμαστε τις σχέσεις μεταξύ των παρασίτων και των ξενιστών τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Μεσογειακή φώκια <i>Monachus monachus</i>	1
1.2 Σχέσεις Θαλάσσιου Περιβάλλοντος και Παθογόνων.....	2
1.2.1 Ιοί.....	4
1.2.2 Βακτήρια.....	4
1.2.3 Παράσιτα	5
1.3 Παράσιτα και Θαλάσσια Θηλαστικά	7
1.3.1 Πρωτόζωα.....	7
1.3.2 Έλμινθες	8
1.4 Παράσιτα και Πτερυγιόποδα	9
1.5 Παράσιτα και η Μεσογειακή Φώκια	10
1.5.1 <i>Acanthocheilonema spirocauda</i>	10
1.5.2 <i>Anisakis pegreffii</i>	12
1.5.3 <i>Contracaecum osculatum</i>	12
1.5.4 <i>Diphyllobothrium</i> sp.....	13
1.5.5 <i>Lepidophthirus piriformis</i>	13
1.5.6 <i>Leishmania infantum</i>	14
1.6 Μοριακή ταυτοποίηση με τη χρήση μιτοχονδριακού DNA.....	14
1.7 Σκοπός και Υποθέσεις της Έρευνας.....	16
1.7.1 Σκοπός της Έρευνας	16
1.7.2 Υποθέσεις Έρευνας	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	17
2.1 Εξαγωγή DNA.....	17
2.2 Διαδικασία PCR	19
2.3 Δημιουργία Φυλογενετικού Δέντρου	19
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	21
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	25
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	31
6. ABSTRACT	41

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεσογειακή φώκια *Monachus monachus*

Η Μεσογειακή φώκια *Monachus monachus* ανήκει στην οικογένεια των Φωκίδων (Phocidae) και χαρακτηρίζεται ως ένα από τα πιο απειλούμενα (E/D) είδη θαλάσσιων θηλαστικών στον κόσμο. Ο μεγαλύτερος πληθυσμός, 300 άτομα, συναντάται στην ανατολική Μεσόγειο και συγκεκριμένα στις ακτές της Ελλάδας, της Τουρκίας και της Κιλικίας. Συγκεκριμένα στην Ελλάδα συναντάται στην ευρύτερη περιοχή του Εθνικού Θαλάσσιου Πάρκου Αλοννήσου, στο νησιωτικό σύμπλεγμα Κιμώλου – Πολυαίγου στις νοτιοδυτικές Κυκλάδες και πρόσφατα έχουν καταγραφεί πληθυσμοί στην περιοχή της Βόρειας Καρπάθου και Σαρίας στα Δωδεκάνησα και στα νησιά του Ιονίου (Ζάκυνθος – Κεφαλονιά) (Mom) . Η μεσογειακή φώκια ενδιαιτεί και στο νησιωτικό σύμπλεγμα της Μαδέρα στον Ατλαντικό ωκεανό όπως και στην ατλαντική ακτή της βορειοδυτικής Αφρικής, στη χερσόνησο Cabo Blanco της Μαυριτανίας.

Το ενδιαίτημα της Μεσογειακής φώκιας συνήθως αποτελούν απομονωμένες, σπηλιές, βραχώδεις και δυσπρόσιτες νησίδες ή ακτές με υποβρύχιες εισόδους (Perrin & Wursig, 2009).

Η μεσογειακή φώκια είναι ένα από τα μεγαλύτερα είδη πτερυγιόποδων που υπάρχουν στον κόσμο. Φτάνει σε μήκος τα 2,8 μέτρα και το βάρος της μπορεί να ξεπεράσει τα 300 κιλά. Το σχήμα του σώματός της είναι ατρακτοειδές, ώστε να διευκολύνεται η κίνησή της μέσα στο νερό στο οποίο περνάει και το μεγαλύτερο μέρος της ζωής της αναζητώντας για τροφή.

Έρευνες έχουν δείξει πως οι μεσογειακές φώκιες τρέφονται κυρίως με βενθοπελαγικούς οστεϊχθύες που ανήκουν στις οικογένειες Congridae, Gadidae, Sparidae και Scorpaenidae, κεφαλόποδα Octopodidae και Sepiidae και καρκινοειδή (Karamanlidis *et al.*, 2011; Kιραζ & Ok, 2019; Pierce *et al.*, 2011; Salman *et al.*, 2001). Η δυνατότητα κατάδυσης τους σε μεγάλα

βάθη, 200 μέτρα, διαμορφώνει καθοριστικά τις διατροφικές συνήθειες του είδους και τον καθιστά ως ευκαιριακό θηρευτή, γεγονός που του προσδίδει την ευκαιρία να τρέφεται με πολλά διαφορετικά είδη θηραμάτων.

Παρότι η Μεσογειακή φώκια διατηρεί μία ζωή μακριά από την ανθρώπινη παρουσία, οι επιπτώσεις της ανθρώπινης δραστηριότητας γίνονται όλο και περισσότερο εμφανείς στην καθημερινότητα των πληθυσμών της. Οι σημαντικότερες απειλές που αντιμετωπίζει το είδος στην ανατολική Μεσόγειο είναι ανθρώπινης προέλευσης και συμπεριλαμβάνουν τις περιπτώσεις ηθελημένης θανάτωσης ποσοστό που φτάνει το 50% των συνολικών εκβρασμών στις ελληνικές ακτές. Η τυχαία παγίδευση ατόμων του είδους σε αλιευτικά εργαλεία όπως στατικά δίκτυα που χρησιμοποιούνται ευρέως από την παράκτια αλιεία, παραμένει ένα ιδιαίτερα σοβαρό πρόβλημα στις περισσότερες περιοχές εξάπλωσης του είδους. Επιπλέον απειλές αποτελούν, η υπεραλίευση καθώς μειώνεται η διαθεσιμότητα τροφής, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει άμεσα τον ρυθμό ανάπτυξης, η καταστροφή και υποβάθμιση των βιοτόπων λόγω της ρύπανσης και της ανθρώπινης δραστηριότητας και τέλος τα φυσικά γεγονότα όπως η μόλυνση του ενδιαιτήματος από κάποιον ιό, βιοτοξίνη ή βακτήριο, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να επιφέρουν θανατηφόρα αποτελέσματα σε έναν πληθυσμό (Van De Bildt *et al.*, 2000).

1.2 Σχέσεις Θαλάσσιου Περιβάλλοντος και Παθογόνων

Οι μικροοργανισμοί είναι πανταχού παρόντες στο περιβάλλον και οι άνθρωποι όπως και τα ζώα βρίσκονται σε συνεχή έκθεση με μία μεγάλη ομάδα τους (Aw, 2019). Παρόλα αυτά μόνο ένα μικρό μέρος των μικροοργανισμών είναι ικανό να αλληλοεπιδράσει με τον ξενιστή και να προκαλέσει ασθένεια (Nih 2007). Οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να προκαλούν ασθένειες ονομάζονται παθογόνοι.

Τα παθογόνα αυτά, αφού προσβάλλουν έναν ανοσοποιητικά αδύναμο οργανισμό μπορούν να προκαλέσουν μολυσματικές ασθένειες, η φύση των οποίων εξαρτάται από το είδος του οργανισμού ξενιστή. Η διαδικασία της μόλυνσης και κατ' επέκταση της εκδήλωσης της ασθένειας περιλαμβάνει συνήθως πολλαπλασιασμό των παθογόνων στον οργανισμό του ξενιστή όπως και απέκκριση αυτών μέσω των κοπράνων, αυτό ισχύει για είδη παθογόνων που συνδέονται κυρίως με τα πεπτικό σύστημα. Άλλα παθογόνα μπορούν να μεταφερθούν μέσω της εισπνοής, διατροφής, της αναπαραγωγής και της κοινωνικής επαφής.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί μία τάση ανάδυσης και επανεμφάνισης ασθενειών οι οποίες έχουν σοβαρό αντίκτυπο στο θαλάσσιο περιβάλλον και στα θηλαστικά που διαβιούν σε αυτό. Οι ασθένειες που προκαλούνται από ιούς είναι πλέον συνήθεις και χαρακτηρίζονται από περίπλοκα παθολογικά μοτίβα τα οποία συνοδεύονται από ανοσολογικές δυσλειτουργίες στον οργανισμό (Bossart, 1993).

Η παρουσία των παθογόνων συσχετίζεται με την εμφάνιση νεοπλασίας, επιδημιών καθώς και ζωνόσων, οι οποίες επηρεάζουν άμεσα τον πληθυσμό και το οικοσύστημα που διαβιεί το εκάστοτε άτομο. Η παρατήρηση και καταγραφή αυτών των φαινομένων διευκολύνει την αναγνώριση περιβαλλοντικών κινδύνων καθώς ακολουθεί την ανθρώπινη δραστηριότητα η οποία προξενεί οικολογικές και κλιματικές αλλαγές που προάγουν την εγκαθίδρυση νέων και την επανεμφάνιση ευκαιριακών παθογόνων τα οποία επηρεάζουν τα θαλάσσια θηλαστικά (Bossart, 1993).

Τα θαλάσσια θηλαστικά επηρεάζονται από μία μεγάλη ποικιλία παθογόνων κάποια από τα οποία στοχεύουν σε συγκεκριμένους ξενιστές αναλόγως την τάξη, την οικογένεια και το είδος και άλλα που έχουν ευκαιριακό χαρακτήρα. Η συνύπαρξη των θαλάσσιων θηλαστικών με εξειδικευμένα παθογόνα λαμβάνει χώρα εδώ και χιλιάδες χρόνια με την επικράτηση μίας κάποιας ισορροπίας μεταξύ τους (Begon *et al.*, 1996).

1.2.1 Ιοί

Οι ιοί ως μολυσματικοί παράγοντες παρότι δεν έχουν βιολογικές λειτουργίες, έχουν την ικανότητα όταν δεν βρίσκονται στο σώμα ενός ξενιστή, να επιβιώνουν στο περιβάλλον παραμένοντας μολυσματικοί και να προσβάλλουν έναν εξασθενημένο οργανισμό. Ένα παράδειγμα της λειτουργίας τους είναι οι πολλές εξάρσεις ασθενειών που προκαλούνται από εντερικούς ιούς που δρουν στο νερό και παρατηρούνται τα τελευταία χρόνια παγκοσμίως (Ligon & Bartram 2016). Επιπροσθέτως χαρακτηρίζονται από γενετική ποικιλομορφία και έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται στις εναλλασσόμενες καταστάσεις που κυριαρχούν στο σώμα του ξενιστή αλλά και στο περιβάλλον (Hulo *et al.*, 2010). Η ανθρώπινη δραστηριότητα και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία και η γεωγραφική θέση επηρεάζουν καθολικά την ύπαρξη τους (Memarzadeh, 2011).

1.2.2 Βακτήρια

Τα παθογόνα βακτήρια αποτελούν μία μικρή ομάδα σε σχέση με τα υπόλοιπα που διαβιούν στο περιβάλλον (Aw, 2019). Οι μηχανισμοί επιβίωσής τους είναι περίπλοκοι αφού ακόμα και τα βακτήρια που ανήκουν στην ίδια ταξινομική ομάδα, εμφανίζουν διαφορετικές αντιδράσεις στους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Cox, 1989, 1998). Για την επιβίωσή τους έχουν αναπτύξει τρόπους αντίστασης στους φυσικούς και χημικούς παράγοντες που συναντούν στο περιβάλλον (Yildiz, 2007) . Έχουν την ικανότητα να εισέρχονται σε μία λανθάνουσα κατάσταση (Colwell, 2000; Oliver, 2005), άλλα δημιουργούν βιο-υμένια (Costerton *et al.* 1995) και κάποια αναπτύσσουν αντοχή στα αντιβιοτικά, ύπαρξη γονιδίου ανθεκτικότητας (Resistance Gene) (Martínez, Baquero & Andersson 2007). Η ενεργή ανάπτυξη συγκεκριμένων θαλάσσιων παθογόνων πραγματοποιείται μόνο σε περιβάλλοντα που επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες ,όπως το γαστρεντερικό σύστημα των θαλάσσιων

θηλαστικών το οποίο φαίνεται να υποθάλπει μία μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών που είναι στενά συνδεδεμένα με βακτηριακά παθογόνα (MacFarlane *et al.*, 1986; Oxley *et al.*, 2002).

1.2.3 Παράσιτα

Ως παράσιτα χαρακτηρίζονται οι οργανισμοί εκείνοι που διαβιούν σε έναν ξενιστή και τρέφονται άμεσα από αυτόν ή εις βάρος του. Τα παράσιτα βασίζονται στην επιβίωση του ξενιστή τους και η μετάδοσή τους στον οργανισμό του είναι ζωτικής σημασίας γι' αυτά. Υπάρχουν τρεις κύριες κλάσεις παρασίτων που είναι ικανά να προκαλέσουν ασθένειες, τα πρωτόζωα, οι έλμινθες και τα εξωπαράσιτα (Aw, 2019). Έχουν δημιουργήσει και εξελίξει πολλά διαφορετικά μέσα ώστε να εξασφαλίσουν την διαίωσή τους στο εκάστοτε περιβάλλον. Ο κύκλος ζωής των παρασίτων μπορεί να είναι άμεσος, συμπεριλαμβάνει μόνο ένα ξενιστή ή έμμεσος μέσα από το οποίο συμπεριλαμβάνονται τουλάχιστον ένας ενδιάμεσος και ένας τελικός ξενιστής ώστε το παράσιτο να αναπτυχθεί μέχρι την πλήρη μορφή του (Bush *et al.* 1993; Lotz *et al.* 1995; Marcogliese 2002; Colwell 2005).

1.2.3.1 Πρωτόζωα ή Πρώτιστα

Τα πρωτόζωα είναι υποχρεωτικά παράσιτα και τα περισσότερα μεταδίδονται μέσω του υγρού στοιχείου και προσβάλλουν συνήθως το γαστρεντερικό σύστημα ενός οργανισμού.

Τα πιο διαδεδομένα παράσιτα που συνδέονται με ασθένειες που μεταφέρονται με το νερό είναι τα *Cryptosporidium parvum* και *Giardia lamblia*. Σχηματίζουν ανθεκτικές κύστες και κύστες οι οποίες έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν για ένα διάστημα χωρίς ξενιστή ακόμα και σε αντίξοες συνθήκες (Aw, 2019).

1.2.3.2 Μετάζωα

Οι ελμίνθες ή αλλιώς παρασιτικοί σκώληκες, είναι περίπλοκοι πολυκύτταροι οργανισμοί. Ανήκουν στο βασίλειο Animalia και περιλαμβάνουν τα κεστώδη, τα νηματώδη (ασκαρίδες) και τα τρηματώδη. Η ταξινόμηση των ελμίνθων πραγματοποιείται με βάση την εξωτερική και εσωτερική μορφολογία του αυγού, της προνύμφης, των ενήλικων σταδίων και τον συνολικό κύκλο ζωής τους (Aw, 2019). Οι περισσότεροι έχουν ένα περίπλοκο κύκλο ζωής ο οποίος επιβάλλει πως για την ανάπτυξη και επιβίωσή τους απαιτείται να προσβάλλουν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους περισσότερους από ένα ξενιστές. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι ενδιάμεσοι ξενιστές είναι συνήθως ζώα όπως καρκινοειδή, ιχθύες και αρθρόποδα ενώ οι τελικοί ξενιστές είναι κυρίως ο άνθρωπος και μεγαλύτερα ζώα (Aw, 2019). Ο κύκλος ζωής των ελμίνθων ξεκινάει από την απελευθέρωση των αυγών τους στο περιβάλλον όπου συναντώνται σε μία μη μολυσματική μορφή (αδρανή κατάσταση) μέχρι να ωριμάσουν και να είναι ικανά μέσω της κολύμβησης να προσβάλλουν τους ενδιάμεσους ξενιστές τους. Αφότου ωριμάσουν εν μέρει, μεταδίδονται από τους ενδιάμεσους ξενιστές στους τελικούς όπου και συνεχίζουν την ανάπτυξή τους.

1.2.3.3 Εξωπαράσιτα

Τα εξωπαράσιτα είναι οργανισμοί που διαβιούν στο δέρμα ενός ξενιστή από τον οποίο λαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά για την επιβίωσή τους. Τα περισσότερα εξωπαράσιτα είναι εξώθερμοι οργανισμοί, οι φυσιολογικές τους λειτουργίες εξαρτώνται άμεσα από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος στο οποίο ενδιαίτουν (Harvell et al., 2002). Στα εξωπαράσιτα συγκαταλέγονται οι ψείρες *Echinophthiriidae*, *Menoponidae* και *Philopteridae*, που

τρέφονται με το αίμα των ξενιστών τους (Durdan, 2001), οι *Amblycera* και *Ischnocera* που τρέφονται το δέρμα των ξενιστών τους (Clayton et al., 2008), καθώς και οι ψύλλοι *Ceratophyllidae*, *Pygiopsyllidae*, *Rhopalopsyllidae* (Durdan and Hinkle, 2019) τα πενταστομίδια (*Reighardiidae*) (Dabert, 2005; Poore, 2012) τα τσιμπούρια *Argasidae*, *Ixodidae* και τέλος τα ακάρεα *Halarachnidae*, *Rhinonyssidae*, *Laelapidae*, (Bell, 1996).

1.3 Παράσιτα και Θαλάσσια Θηλαστικά

Η προσβολή από παράσιτα είναι μέρος της ζωής των θαλάσσιων θηλαστικών. Τα περισσότερα από αυτά έχουν εξελιχθεί παράλληλα με τους ξενιστές τους και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν τους προκαλούν σοβαρές βλάβες. Τα παράσιτα έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα στην υγεία των θαλάσσιων θηλαστικών αν βρουν το ανοσοποιητικό τους σύστημα καταβεβλημένο. Συνήθως προκαλούν απώλεια πολύτιμων θρεπτικών από τον οργανισμό του ξενιστή και επηρεάζουν την ανάπτυξή του. Επιπλέον προσβάλλουν τη γούνα, το αναπνευστικό και το πεπτικό σύστημα προκαλώντας κατάρρευση αυτών των προστατευτικών φραγμών με αποτέλεσμα να καταστούν τους ξενιστές επιρρεπείς σε βακτηριακές και ιικές μολύνσεις. (Vos, Bossart & Michel Fournier, 2005).

1.3.1 Πρωτόζωα

Τα πρωτόζωα προσβάλλουν θαλάσσια θηλαστικά παγκοσμίως και κάποια από αυτά έχουν την δυνατότητα να ξεπερνούν τα οικολογικά φράγματα της χέρσου και του θαλάσσιου στοιχείου ενώ άλλα είναι ενδημικά μόνο του θαλάσσιου περιβάλλοντος (Perrin & Wursig, 2009). Σε αυτά ανήκουν οι παρασιτικές κυψελίδες (Apicomplexa) οι οποίες έχουν συνδεθεί με ασθένειες στο ρινοδέλφιο του Ατλαντικού, στο *Stenella longirostris*, στο *Trichechus manatus* και σε μια *Balaenoptera physalus* της Μεσογείου (Buergelt & Bonde, 1983; Inskoop

et al., 1990; Mazzariol et al. 2012), οι Εντερικές Παρασιτικές Κυψελίδες (Enteric Apicomplexa) όπως τα τρυπανοσώματα (*Trypanosoma*) που συναντώνται παγκοσμίως σε θαλάσσια θηλαστικά όπως ωταρίδες, οδοντοκίτη, μυστακοκίτη και μανάτους και προτιμούν το γαστρεντερικό σύστημα ενός ξενιστή και τα βλεφαριδοφόρα (Vos, Bossart & Fournier 2005) και οι αμοιβάδες.

1.3.2 Έλμινθες

Οι έλμινθες αποτελούν φυσική παρασιτική πανίδα των υγιών θαλάσσιων θηλαστικών και είναι πλήρως προσαρμοσμένα στα εκάστοτε χαρακτηριστικά των ξενιστών τους και του περιβάλλοντος στο οποίο διαβιούν . Πρόσφατα έχει παρατηρηθεί μία τάση ανάδυσης και επανεμφάνισης παρασίτων που αποτελούν νέα μέλη της πανίδας ενός ξενιστή (Robertson, 2019).

Τα Διγενή Τρηματώδη (Trematoda) συναντώνται σε μία ποικιλία θαλάσσιων θηλαστικών όπως τα Σειρηνοειδή, οι Ενυδρίδες, τα Πτερυγιόποδα και τα Κητώδη Προσβάλλουν πολλούς διαφορετικούς ιστούς στο σώμα ενός ξενιστή και μπορούν να προξενήσουν σοβαρή βλάβη σε αυτούς και σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν να επιφέρουν και τον θάνατο του (Fauquier et al. 2004; Bonar et al. 2007).

Τα Κεστώδη (Cestoda) τα οποία συναντώνται ως λάρβες στη στομαχική κοιλότητα, στο σπλαχνικό ή βρεγματικό περιτόναιο της εντερικής οδού όπως και στις ωοθήκες, και στο υποδερμικό λίπος των θαλάσσιων θηλαστικών (Aznar et al. 2007).

Τα Ακανθοκέφαλα (Acanthocephala) του γένους *Bolbosoma* ο κύκλος ζωής των οποίων περιλαμβάνει καρκινοειδή όπως αμφίποδα, ισόποδα, κωπήποδα και οστρακώδη και ιχθύες ως ενδιάμεσους ξενιστές (Amin, 1998).

Τα Νηματώδη (Nematoda) είναι κάποιοι από τους πιο ποικιλόμορφους, αναρίθμητους και βλαβερούς οργανισμούς (Robertson, 2019).

Οι ασκαρίδες όπως *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum*, *Phocascaris*, *Heterocheilus*, and *Paradujardinia* είναι κοινά παράσιτα των θαλάσσιων θηλαστικών και συναντώνται στα γαστρεντερικό σύστημα του εκάστοτε οργανισμού (Stroud & Roff 1979; McClelland 1980; Babin, Raga, & Duguay 1994; Abollo et al. 1998).

Τα σπειροειδή νηματώδη (Spirurida) συναντώνται στα μυστακοκήτη και τα οδοντοκήτη και προσβάλλουν κυρίως το ουρογεννητικό σύστημα, τους συνδετικούς ιστούς, τους μαστικούς αδένες και τους κρανιακούς κόλπους (Robertson, 2019).

1.4 Παράσιτα και Πτερυγίοποδα

Τα είδη παρασίτων που συναντώνται στα πτερυγίοποδα είναι πολλών ειδών και προέρχονται από διαφορετικές ταξινομικές ομάδες . Τα κυριότερα είδη πρωτόζωων που προσβάλλουν τα θαλάσσια θηλαστικά είναι το *Neospora caninum* που ανιχνεύθηκε στο είδος *Zalophus californianus* (Robertson, 2019), το *Cryptosporidium muris* που έχει ανιχνευθεί σε είδη της Αρκτικής και της Βόρειας Αμερικής (Drożdż 1987; McClelland 1993), άτομα τριχομονάδων (Luff et al. 2007). Οι έλμινθες αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες ομάδες παρασίτων και ανήκουν στην τάξη των διγενών τα οποία έχουν ανιχνευθεί σε είδη όπως *Otaria flavescens* , *Phoca hispida* και *Zalophus wolfebaeki*, (Pereira et al. 2013; Dailey, Ellin, & Paras 2005). Οι νηματώδεις και συγκεκριμένα αυτοί της οικογένειας Anisakidae και των γενών *Pseudoterranova* spp. και *Phocascaris* spp. συναντώνται σε ένα μεγάλο αριθμό ξενιστών (McClelland 2002; Kuzmina, Lyons, & Spraker 2014; Measures 2014; Sepilveda et al. 2015). Νηματώδεις της τάξης Strongylida (lungworms) αποτελούν κοινό εύρημα σε νεκροψίες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πτερυγίοποδα και πιστεύεται πως οφείλονται για

ένα μεγάλο ποσοστό θνησιμοτήτων (Colegrove, Greig, & Gulland 2005; Lehnert, Raga, and Siebert 2007; Lair, Measures, and Martineau 2016). Άτομα του γένους *Uncinaria* έχουν ανιχνευθεί σε πολλά είδη πτερυγιόποδων (Spraker et al. 2007; Lyons et al. 2011; Nadler et al. 2013; Marcus et al. 2014; Kuzmina & Kuzmin 2015).

Στα πτερυγιόποδα φαίνεται να παρασιτούν επίσης πολλά διαφορετικά είδη αρθροπόδων τα οποία ανήκουν στα γένη *Orthohalarachne spp.*, *Demodex spp.*, *Sarcoptes spp.*, και στην υποτάξη Anoplura (McIntosh and Murray 2007; Spraker & Lander 2010; Leonardi & Palma 2013).

1.5 Παράσιτα και η Μεσογειακή Φώκια

1.5.1 *Acanthocheilonema spirocauda*

Μία ενήλικη νεκρή φώκια *Monachus monachus* βρέθηκε στις 16 Μάϊου στο Νέο Μαρμαρά στην περιοχή της Χαλκιδικής. Μετά από νεκροψία ανιχνευθήκαν δύο άτομα νηματώδων του είδους *Acanthocheilonema spirocauda* για πρώτη φορά σε Μεσογειακή Φώκια (Papadopoulos et al., 2010). Παρότι το συγκεκριμένο είδος παρασίτου συναντάται σε πολλά διαφορετικά είδη πτερυγιόποδων (Haebler & Moeller, 1992). Ήταν η πρώτη φορά που ανιχνεύθηκε στο είδος *Monachus monachus*.

Οι νηματώδης βρέθηκαν στην δεξιά καρδιακή κοιλία. Με βάση τα ήδη υπάρχοντα μορφολογικά δεδομένα (Yamaguti, 1962) , οι δύο νηματώδης χαρακτηρίστηκαν ως ένας αρσενικός και ως ένας θηλυκός. Το οπίσθιο άκρο του αρσενικού κατέληγε σε τρεις σπειροειδής μαιάνδρους και μία ουρά στην μορφή δακτύλου ενώ του θηλυκού είχε τη μορφή απλού κοντού κωνικού σχήματος (Papadopoulos et al., 2010).

Το παράσιτο *Acanthocheilonema spirocauda* ή σκουλήκι της φώκιας (heartworm) είναι ένα φιλαριοειδής νηματώδης ο οποίος συνήθως ενδιαιτεί στην δεξιά κοιλία της καρδιάς και στην πνευμονική αρτηρία των πτερυγιοπόδων. Συνήθως προκαλεί θάνατο στα νεαρά άτομα αλλά σε περιπτώσεις σοβαρών μολύνσεων μπορεί να προκύψουν καρδιαγγειακά και πνευμονικά αρτηριακά τραύματα τα οποία οδηγούν σε απόφραξη των αρτηριών και σε πνευμονία (Lehnert, Raga, & Siebert 2007).

Ο κύκλος ζωής του είναι μερικώς γνωστός αλλά πιστεύεται πως χρησιμοποιεί ένα εξωπαράσιτο ως ενδιάμεσο ξενιστή, την ψείρα της φώκιας *Echinophthirius horridus*, η οποία τρέφεται με το αίμα τους. Τα νεαρά λαρβικά στάδια (μικροφιλάρια) που συναντώνται στο σώμα της φώκιας καταπίνονται από την ψείρα και αναπτύσσονται μέχρι το τρίτο στάδιο μέσα στη ψείρα και ακολούθως μεταφέρονται σε μία καινούρια φώκια κατά τη διαδικασία της διατροφής της ψείρας (Geraci et al. 1981; Lehnert et al. 2016). Μόλις εγκατασταθούν στο σώμα της φώκιας ξενιστή, το τρίτο στάδιο της λάρβας ωριμάζει και στη συνέχεια παράγει μικροφιλάρια που κυκλοφορούν στο αίμα (Lehnert et al. 2016) μέχρι να καταποθούν εκ νέου από ένα νέο εξωπαράσιτο.

Η μετάδοση των παρασίτων μεταξύ των φωκιών συμβαίνει κυρίως όταν μολυσμένες ψείρες μεταφέρονται από το ένα άτομο στο άλλο κατά τη διάρκεια της κοινωνικοποίησής τους. Επιπλέον, λόγω του γεγονότος πως εμφανίζουν χαμηλή εξειδίκευση για τους ξενιστές τους έχουν την δυνατότητα να προσβάλουν πολλά διαφορετικά είδη φωκιών και ειδικότερα τα πιο νεαρά (Measures, Gosselin, & Bergeron 1997; Lehnert et al. 2016).

1.5.2 *Anisakis pegreffii*

Ο νηματώδης *Anisakis pegreffii* ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε άτομο του είδους *Monachus monachus* το 1955. Ανιχνεύθηκε σε μία ενήλικη θηλυκή φώκια η οποία αιχμαλωτίστηκε κοντά στις ακτές της Σαρδηνίας (Campana-Rouget & Biocca, 1955).

Ο κύκλος ζωής του *Anisakis pegreffii* είναι παρόμοιος με τον υπόλοιπων νηματωδών καθώς η ανάπτυξή τους περιλαμβάνει πέντε στάδια. Το θηλυκό παράγει αυγά (πρώτο στάδιο) τα οποία συναντώνται στα κόπρανα του ξενιστή και έτσι αναπτύσσεται το πρώτο λαρβικό στάδιο. Στη συνέχεια, μετά την εκκόλασή τους οι λάρβες αποκτούν κολυμβητική ικανότητα (δεύτερο στάδιο) και έτσι είναι πιο εύκολο να καταποθούν από τους πρώτους ενδιάμεσους ξενιστές τους όπως, κυρίως τα καρκινοειδή στα οποία συνεχίζεται και η ανάπτυξή τους (τρίτο στάδιο). Τα κωπήποδα με την σειρά τους καταναλώνονται από ιχθύες και καλαμάρια, τα οποία αποτελούν και τους δεύτερους ενδιάμεσους ξενιστές τους. Παράλληλα συνεχίζουν την ανάπτυξή τους στον οργανισμό των ξενιστών αυτών (τέταρτο στάδιο). Το πέμπτο στάδιο της ωρίμανσής τους πραγματοποιείται με την κατάποση του τότε ξενιστή τους από τον τελικό ξενιστή στόχο, τα πτερυγιόποδα. Εγκαθίστανται στον οργανισμό τους και ολοκληρώνουν την ανάπτυξή τους (Kagei, 1968; Klimpel et al., 2004; Nagasawa, 1990).

1.5.3 *Contracaecum osculatum*

Το είδος *Contracaecum osculatum* συναντάται κυρίως στα πτερυγιόποδα και ανήκει στο γένος *Contracaecum* και στην τάξη Ascaridida. Είναι παράσιτο που διαβιεί στο γαστρεντερικό σύστημα και συνήθως είναι αβλαβή (Stroud and Roff 1979; McClelland 1980; Babin, Raga, and Duguay 1994; Abollo et al. 1998) και ανιχνεύθηκε πρώτη φορά στο είδος *Monachus monachus* από τους Schnapp et al., 1962.

Ο κύκλος ζωής του *Contracaecum* είναι σχετικά περίπλοκος και χρησιμοποιεί την τροφική αλυσίδα ώστε να μεταδοθεί οριζόντια. Το θηλυκό παράγει αυγά τα οποία συναντώνται στα κόπρανα του ξενιστή και έτσι αναπτύσσεται. Στη συνέχεια, μετά την εκκόλαψή τους οι λάρβες καταπίνονται από καρκινοειδή όπως κωπήποδα και αμφίποδα (McClelland 2002; Measures 2014). Με τη σειρά τους αυτοί οι ενδιάμεσοι ξενιστές καταναλώνονται από ιχθύες οι οποίοι λειτουργούν ως δευτεροί ξενιστές μέχρι οι ίδιοι να καταναλωθούν από τον τελικό ξενιστή στόχο, τα πτερυγιόποδα.

1.5.4 *Diphyllobothrium* sp.

Άτομα του γένους *Diphyllobothrium* έχουν καταγραφεί σε άτομα του είδους *M. monachus*. Τα κεστώδη ή αλλιώς ταινίες συναντώνται κυρίως στο έντερο των θαλάσσιων θηλαστικών.

Ο κύκλος ζωής τους είναι σχεδόν άγνωστος. Το μόνο που γνωρίζουμε είναι πως οι προνύμφες τους καταπίνονται από κωπήποδα, καλαμάρια και ψάρια τα οποία λειτουργούν ως ενδιάμεσοι ξενιστές (Mackiewicz, 1988).

1.5.5 *Lepidophthirus piriformis*

Ανιχνεύθηκε πρώτη φορά στο είδος *Monachus monachus* στη Μεσόγειο κοντά στις ακτές της Μαύρης Θάλασσας το 1966 από τον Blagoveshtchensky. Είναι ένα είδος θαλάσσιας ψείρας και ανήκει στο γένος *Lepeophtheirus*.

1.5.6 *Leishmania infantum*

Το πρωτόζωο *Leishmania infantum* είναι κυρίαρχο στην περιοχή της Μεσογείου και μεταδίδεται μέσω του τσιμπήματος της μύγας της άμμου (Ozbel et al., 1995; Slappendel & Ferrer, 1998). Προκαλεί την ασθένεια της Σπλαχνικής Λεισμανίασης και παράγει χαρακτηριστικούς δερματικούς και σπλαχνικούς μώλωπες με τα μακροφάγα να αποτελούν τα κύρια κύτταρα στόχους της (Grimaldi et al., 1989; Ciaramella et al., 1997; Oo zensoy et al., 1998; Slappendel and Ferrer, 1998; Koutinas et al., 1999).

Τα μολυσμένα ζώα εμφανίζουν τοπική ή γενική λεμφαδενοπάθεια, ηπατοσπληνομεγαλία, χρόνια νεφρίτιδα, κολίτιδα, επίσταξη και δερμικούς μώλωπες που αποτελούνται από δερματικές κακώσεις (μώλωπες) (αποφλοιωτική, ελκωτική, κονδυλώδη, φλυκταινώδη) όπως και αλωπεκία (Ferrer et al., 1988; Slappendel and Ferrer, 1998; Koutinas et al., 1999). Οι κυρίαρχες ιστολογικές κακώσεις είναι, υπερτροφία και υπερπλασία στα κύτταρα του μονοπύρηνου φαγοκυτταρικού συστήματος, κοκκιωματώδη φλεγμονώδη αντίδραση του σπλήνα, των λεμφαδένων, μυελού των οστών, συκωτιού και χρόνιας φλεγμονής του δέρματος (Rallis et al., 2005).

Η λεισμανίαση διαγνώστηκε με ιστολογικές και ανοσοϊστοχημικές διαδικασίες με την χρήση των μακροφάγων το οποία ήταν γεμάτα με μαστιγοφόρα όπως και των ινιβλαστών των λεμφαδένων, σπλήνα και αμυγδαλών (Toplu et al., 2007).

1.6 Μοριακή ταυτοποίηση με τη χρήση μιτοχονδριακού DNA

Η αναγνώριση των ειδών με τη χρήση μοριακής ταυτοποίησης (DNA barcoding) αποτελεί την πλέον διαδεδομένη μέθοδο ανάλυσης των γονιδιωμάτων καθώς λειτουργεί ως αναπόσπαστο εργαλείο της σύγχρονης φυλογενετικής έρευνας. Στην περίπτωση των

παρασιτικών νηματωδών, πολλές φορές η αναγνώριση του εκάστοτε είδους με συμβατικούς τρόπους μπορεί να εξαγάγει λανθασμένα αποτελέσματα καθώς τα είδη που ανήκουν στο φύλο Nematoda και στην υποοικογένεια Anisakinae παρουσιάζουν μεγάλη μορφολογική και φυλογενετική ομοιότητα, γεγονός που καθιστά την αναγνώρισή τους περίπλοκη (Hebert et al., 2003; Rodrigues et al., 2017). Η ανάπτυξη καινούριων μεθόδων μοριακής ταυτοποίησης που χαρακτηρίζονται από υψηλότερη αναλυτική δύναμη, έρχεται να δώσει λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα.

Οι Hebert et al. 2003 πρότειναν ένα νέο τρόπο μοριακής ταυτοποίησης ειδών το DNA barcoding κατά τον οποίο προτείνεται η χρήση του γονιδίου cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial gene (cox1 ή COI) ως πρότυπου μοριακού δείκτη για την ταξινόμηση των ζωικών ειδών. Η περιοχή cox1 είναι πολύ αποτελεσματική για την αναγνώριση σπονδυλωτών και ασπόνδυλων ειδών (Oba et al., 2015; Tavares & Baker, 2008; Trivedi et al., 2016).

Συγκεκριμένα η χρήση του cox1 ως μοριακού δείκτη παρουσιάζει πολλά προτερήματα σε σχέση με τους υπόλοιπους μοριακούς δείκτες, αφού , πρώτον οι καθολικοί εκκινητές του γονιδίου αυτού είναι αρκετά ισχυροί ώστε να ανακτούν 5' τέλος από ένα μεγάλο αριθμό αντιπροσώπων των περισσότερων ζωικών φύλων (Vrijenhoek, 1994; Zhang & Hewitt, 1997).

Επιπροσθέτως το γονίδιο cox1 παρουσιάζει μεγαλύτερη διακύμανση στο φυλογενετικό του σήμα σε σχέση με τα υπόλοιπα μιτοχονδριακά γονίδια. Αναλυτικότερα, τα νουκλεοτίδια της τρίτης θέσης του γονιδίου παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδεχόμενο αντικατάστασης βάσης, γεγονός που του προσδίδει ένα ρυθμό μοριακής εξέλιξης μεγαλύτερο από εκείνο του 12S ή 16S rDNA (Knowlton & Weigt, 1998).

Καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως με τη χρήση του γονιδίου cox1 η πιθανότητα απόκτησης καλύτερης φυλογενετικής πληροφορίας αυξάνεται δραματικά , αφού η εξέλιξη αυτού του γονιδίου πραγματοποιείται αρκετά γρήγορα ώστε να επιτρέπει την αναγνώριση και

τον διαχωρισμό όχι μόνο μεταξύ στενά συσχετισμένων ειδών αλλά και μεταξύ φυλογεωγραφικών ομάδων που ανήκουν στο ίδιο είδος (Cox & Hebert, 2001; Wares & Cunningham, 2001).

1.7 Σκοπός και Υποθέσεις της Έρευνας

1.7.1 Σκοπός της Έρευνας

Παρότι η Μεσογειακή φώκια *Monachus monachus* αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά είδη της ελληνικής πλευράς της Μεσογείου, καθώς είναι ένα πλέον σπάνιο και ιδιαίτερο είδος, οι έρευνες που σχετίζονται με το ευ ζην του είδους είναι περιορισμένες.

Ο σκοπός της παρούσας έρευνας είναι να εξετάσει με τη χρήση μεθόδων μοριακής ταυτοποίησης και συγκεκριμένα του γονιδίου *cox1* παρασιτικές μορφές νηματωδών που ανιχνεύθηκαν στη περιοχή του στομάχου ενός ατόμου του είδους ως προς τη φυλογενετική τους εξέλιξη και τη γεωγραφική τους προέλευσή.

1.7.2 Υποθέσεις Έρευνας

Οι υποθέσεις που γεννώνται μέσω της συγκεκριμένης έρευνας συνοψίζονται στις εξής προτάσεις.

1. Υπάρχει εξελικτική σχέση μεταξύ του παρασίτου που ανιχνεύθηκε στο σώμα της φώκιας με το γένος *Pseudoterranova* και ποια είναι αυτή.
2. Πως κατέληξε το συγκεκριμένο παράσιτο στη Μεσόγειο Θάλασσα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εξαγωγή DNA

Στις 07/07/2020 πραγματοποιήθηκε ανατομία στο στομάχι ενός νεαρού θηλυκού ατόμου Μεσογειακής φώκιας (*Monachus monachus*) με σκοπό την ανάλυση του στομαχικού περιεχομένου. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης του στομαχικού περιεχομένου βρέθηκαν δύο άτομα παρασιτικών νηματωδών (Εικ 1). Οι νηματώδεις συντηρήθηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 70% ώστε να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μοριακή ανάλυση τους. Για την μοριακή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα τα σώματα των παρασίτων.

Για την εξαγωγή του DNA από τους ιστούς των δύο παρασίτων χρησιμοποιήθηκε το EXTRACTME DNA TISSUE KIT ,της εταιρείας BLIRT S.A με αριθμό μοντέλου Cat.No.EM03,EMO4 Version: 1.2018, το οποίο είναι κατάλληλο για εξαγωγή DNA από ζωικούς ιστούς ακολουθώντας το πρότυπο πρωτόκολλο του kit. Η εξαγωγή του DNA πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για τον κάθε νηματώδη.

Βάση του Πρωτοκόλλου Εξαγωγής DNA ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα.

ΒΗΜΑ 1

- a) Τοποθετούμε το βιολογικό υλικό σε erpendorf και προσθέτουμε 375μλ TL BUFFER και κάνουμε Vortex για 20’’
 - b) Προσθέτουμε 25μλ Proteinase K και ανακατεύουμε με τη χρήση Vortex.
- Αφήνουμε τα δείγματα στο υδατόλουτρο στους 55 °C για όλη τη νύχτα μέχρι τα δείγματα να έχουν διαλυθεί πλήρως.

- c) Αφαιρούμε τα δείγματα από το υδατόλουτρο και προσθέτουμε 4μλ RNase και επωάζουμε τα δείγματα στους 37 °C για 5'.

ΒΗΜΑ 2

- a) Προσθέτουμε 400μλ TB BUFFER και Vortex 10''
Φυγόκεντρος για 2' στους 4 °C και στις 14.000 rpm
- b) Μεταφορά υπερκείμενου υγρού σε column tube ,
Φυγόκεντρος για 1' στους 4 °C και στις 14.000 rpm * Αν χρειαστεί βάζουμε τα δείγματα για δεύτερη φορά στη φυγόκεντρο ώστε να φύγουν όλα τα υγρά
- c) Μεταφέρουμε DNA PURIFICATION Column σε 2ml

ΒΗΜΑ 3

- a) Προσθέτουμε 600μλ TW1 BUFFER
Φυγόκεντρος για 30'' στους 4 °C και στις 14.000 rpm, αφαιρούμε το υγρό
- b) Προσθέτουμε 500μλ TW2 BUFFER
Φυγόκεντρος για 30'' στους 4 °C και στις 14.000 rpm,
- c) Φυγόκεντρος για 1-2' στις 14.000 rpm , αφαιρούμε το tube κρατώντας το φίλτρο το οποίο μεταφέρουμε σε νέο eppendorf

ΒΗΜΑ 4

- a) Προσθέτω 30μλ ELUTION BUFFER και προσέχω να πέσει πάνω ακριβώς στην μεμβράνη του DNA
- b) Αφήνουμε το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 2'
- c) Φυγόκεντρος για 1' στους 4 °C και στις 14.000 rpm

- d) Αφαιρούμε το φίλτρο και αποθηκεύουμε τα eppendorf με το DNA στους 4 ή -20 °C

2.2 Διαδικασία PCR

Μετά την εξαγωγή του DNA πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των δειγμάτων για τη μοριακή τους ανάλυση . Για την διαδικασία της PCR δημιουργήθηκε Master mix για τα δείγματα Π1(χ2) , Π2(χ2) και το τυφλό. Η πραγματοποίηση της PCR στοχεύει στην ενίσχυση της 5' περιοχής του γονιδίου cox1 του mtDNA (655 bp), που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη COX1 για την οποία χρησιμοποιήθηκαν γενικοί εκκινητές για ασπόνδυλους οργανισμούς : *Americanus* . Για το Master mix πάρθηκε 1μl DNA από τον κάθε νηματώδη και στη συνέχεια προστέθηκαν Buffer 25 μl, MgCl₂ 10 μl, dNTP's 1 μl, Primer 7.5 μl (forward) & 7.5 μl (reverse), Taq πολυμεράση 1 μl και νερό H₂O 43 μl το 1 μl που απομένει από το Master mix χρησιμοποιείται ως τυφλό. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την PCR βελτιστοποιήθηκε στους 35 κύκλους και με θερμοκρασία ανόπτησης τους 50 °C. Τα αποτελέσματα της PCR αναλύθηκαν με την πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης σε γέλη αгарόζης περιεκτικότητας 0,72 g agarose σε 60 ml TAE ×1 με προσθήκη βρωμιούχου αιθυδίου 8μl. Τα αποτελέσματα της PCR στάλθηκαν στη συνέχεια σε εξειδικευμένο εργαστήριο ώστε να πραγματοποιηθεί αλληλούχηση κατά μέθοδο Sanger.

2.3 Δημιουργία Φυλογενετικού Δέντρου

Οι αλληλουχίες που αποκτήθηκαν στοιχίστηκαν με το εργαλείο πολλαπλής στοίχισης ClustalW μέσω του προγράμματος MEGA-X και στη συνέχεια αναλύθηκαν με την μέθοδο Bootstrap και το μοντέλο Kimura -2- parameter (K2P). Το μοντέλο της Kimura -2-

παραμέτρου υπολογίζει τον αριθμό, των διαφορών μεταξύ δύο αλληλουχιών, δηλαδή το ποσοστό αντικατάστασης, από τον τελευταίο κοινό τους πρόγονο. Οι διάφορες αυτές καταγράφονται ως μεταβάσεις ,αντικατάσταση μίας πουρίνης από μία άλλη (A<->G και C<->T) και ως μετατροπές, αντικατάσταση μίας πυριμιδίνης από μία άλλη (A<->T και C<->Γ). Επιπλέον υπολογίζει την γενετική απόσταση μεταξύ των αλληλουχιών στοίχισης. Το φυλογενετικό δέντρο δημιουργήθηκε με τον αλγόριθμο Maximum Likelihood (ML) μέσω του προγράμματος MEGA-X με 10.000 επαναλήψεις.

Για την δημιουργία του φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιήθηκαν δέκα (10) διαφορετικές αλληλουχίες *Pseudoterranova*, *P.bulbosa*, *P. decipiens*, *P. cattani*, *P. azarasi*, *P. krabbei* όπως και μία αλληλουχία του είδους *Anisakis physeteris* ως outgroup και η αλληλουχία που προήλθε από την μοριακή ανάλυση των νηματώδων που βρέθηκαν στο στομάχι της φώκιας *Pseudoterranova* sp. CO1.



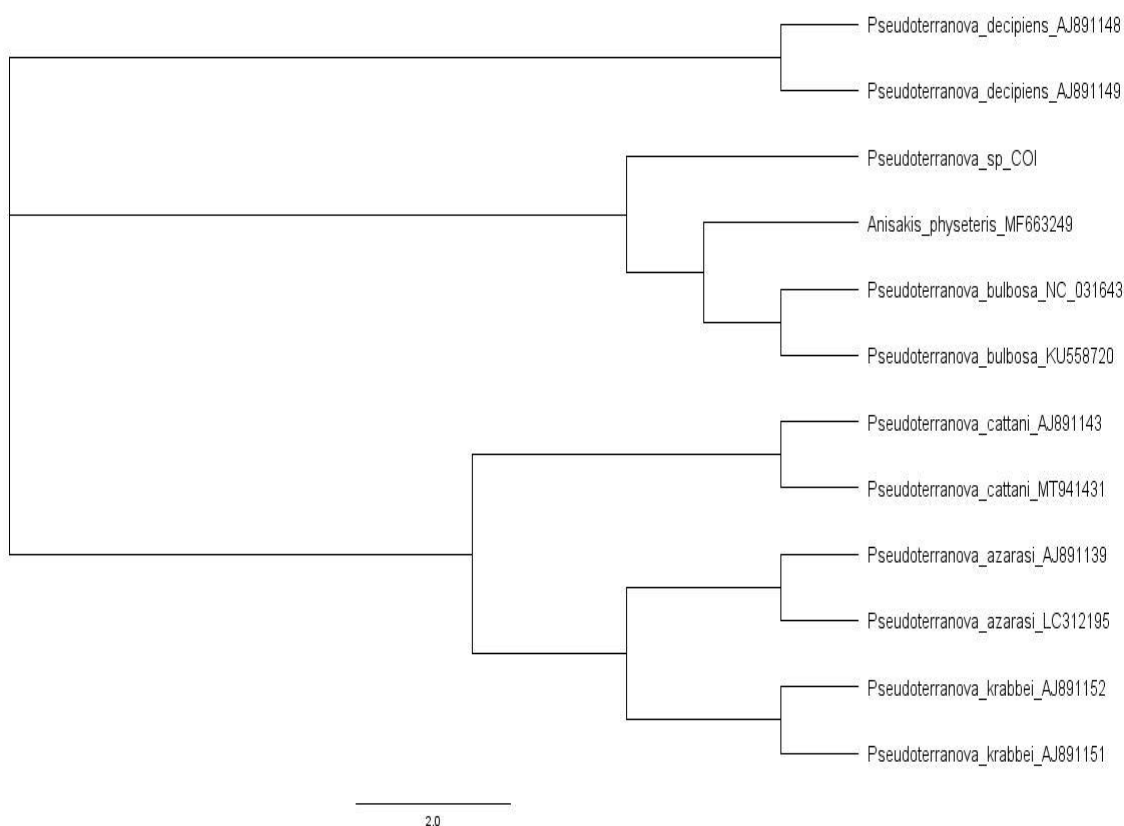
Εικόνα 1, Παρασιτικοί νηματώδεις που βρέθηκαν στο στομάχι της Μεσογειακής φώκιας (*Monachus monachus*) .

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

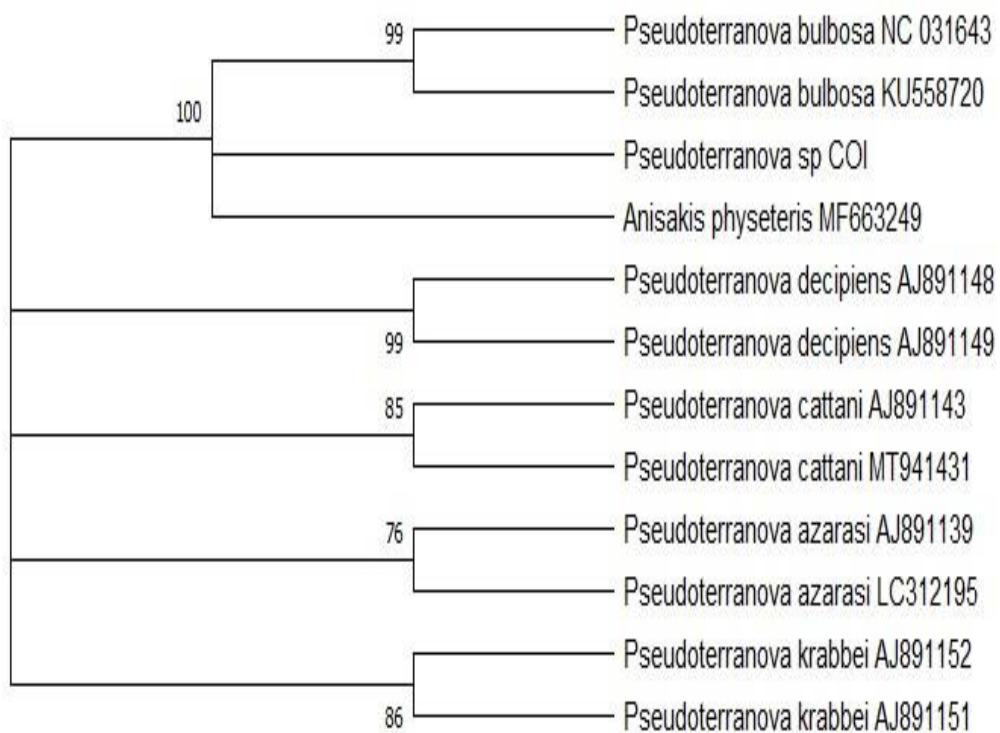
Το αποτέλεσμα της μοριακής ανάλυσης και αλληλούχισης του δείγματος των νηματωδών που προήλθε από το στομαχικό περιεχόμενο της φώκιας παρουσίασε 96% ομοιότητα με το είδος *Pseudoterranova bulbosa* το οποίο ανήκει στο γένος *Pseudoterranova*.

Οι φυλογενετικές σχέσεις που αναδείχθηκαν μέσω της μοριακής ανάλυσης για το γονίδιο *cox1* απεικονίζονται στο φυλογενετικό δέντρο (Εικ 2,3) . Η φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε υπέδειξε πως οι σχέσεις μεταξύ των ατόμων του γένους *Pseudoterranova* , που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία του φυλογενετικού δέντρου , είναι πολυφυλετικές με τιμές bootstrap όπως απεικονίζονται στην (εικόνα).

Οι γενετικές αποστάσεις που προέκυψαν από την χρήση του μοντέλου Kimura 2-parameter παρατίθενται στον πίνακα (Πιν 1.1, 1.2).



Εικόνα 2, Φυλογενετικό δέντρο



Εικόνα 3, Φυλογενετικό δέντρο όπου αναγράφονται οι τιμές BOOTSTRAP

Πίνακας 1.1 , Γενετικές αποστάσεις

	MF663249	NC_03 1643	KU558 720	AJ8911 48	AJ8911 49	AJ8911 43 23	MT941 431	AJ8911 39	LC312 195	AJ8911 52	J89115 1	Pseudoterran ova_sp_COI
A.physeteris_ MF663249												
P. bulbosa_NC_ 031643	0,1562891 15083957											
P. bulbosa_KU5 58720	0,1562891 15083957	0,0000 000000										
P.decipiens_ AJ891148	2,6817962 570	1,9942 075996	1,9942 075996									
P.decipiens_ AJ891149	2,9366174 921	2,0932 350090	2,0932 350090	0,0157 480315								
P.cattani_AJ8 91143	2,6004273 504	1,8361 111111	1,8361 111111	0,1120 002335	0,1191 314257							
P.cattani_MT 941431	2,3778883 184	1,8850 881262	1,8850 881262	0,1125 286269	0,1197 465229	0,0156 255244						
P.azarasi_AJ8 91139	3,0877221 856	2,0575 159490	2,0575 159490	0,1377 393802	0,1416 014085	0,0704 391394	0,0772 175650					

Πίνακας 1.2 Γενετικές αποστάσεις

P.azarasi_LC 312195	2,0064102 564	1,5797 872340	1,5797 872340	0,0775 236020	0,0849 685226	0,0634 771732	0,0572 344322	0,0119 047619				
P. krabbei_AJ89 1152	2,6770016 070	1,8436 922710	1,8436 922710	0,1200 955134	0,1237 934668	0,0643 195743	0,0709 803307	0,0614 399941	0,0507 118771			
P.krabbei_AJ 891151	2,6770016 070	1,7256 860654	1,7256 860654	0,1092 681723	0,1200 955134	0,0490 699933	0,0552 569348	0,0552 569348	0,0438 216796	0,0157 068063		
Pseudoterran ova_sp_COI	0,1617059 719	0,0415 351506	0,0415 351506	1,9942 075996	2,0932 350090	1,8795 508274	1,9129 339969	2,0575 159490	1,5051 020408	1,8436 922710	1,7256 860654	

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι φυλογενετικές σχέσεις που αναδείχθηκαν μέσω της δημιουργίας του φυλογενετικού δέντρου έδειξαν πως το είδος του παρασίτου που βρέθηκε στο σώμα της μεσογειακής φώκιας ανήκει στο γένος *Pseudoterranova* και φαίνεται να είναι συγγενικό με το είδος *Pseudoterranova bulbosa* με το οποίο παρουσίασε 96% ομοιότητα βάσει της αλληλούχισης που πραγματοποιήθηκε. Επιπροσθέτως παρουσιάστηκε και μία στενή συγγένεια με το είδος *Anisakis physeteris* το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως outgroup για την δημιουργία του φυλογενετικού δέντρου. Με βάση το φυλογενετικό δέντρο το *Pseudoterranova* sp. COI φαίνεται να παρουσιάζει μονοφυλετική σχέση με το είδος *Pseudoterranova bulbosa* γεγονός που υποστηρίζει και η τιμή bootstrap με ποσοστό 100%.

Το είδος *Pseudoterranova bulbosa* (Cobb, 1888) συναντάται κυρίως στον Βόρειο Ατλαντικό και Ειρηνικό Ωκεανό και στη Θάλασσα της Ιαπωνίας (Paggi et al., 1991). Η γενειοφόρος φώκια (*Erignathus barbatus*) φαίνεται να είναι το μοναδικό είδος θαλάσσιου θηλαστικού που αποτελεί τελικό ξενιστή του παρασίτου αφού δεν έχει καταγραφεί σε άλλα είδη θαλασσίων θηλαστικών. Ενδιάμεσους ξενιστές του *P. bulbosa* αποτελούν κυρίως βενθικά και βενθοπελαγικά είδη πλατύψαρων όπως αυτά των *Hippoglossoides platessoides*, *Reinhardtius hippoglossoides*, *Hippoglossus hippoglossus*, ενώ συναντάται και τα είδη *Gadus morhua* και *Myxocephalus quadricornis*, (Paggi et al., 1991, 2000; Bratney & Davidson, 1996; Mattiucci et al. 1998).

Ο κύκλος ζωής και τα χαρακτηριστικά μόλυνσης του *P. bulbosa* δεν διαφέρουν από εκείνα των υπόλοιπων ατόμων του γένους *Pseudoterranova*. Ο κύκλος ζωής των συγκεκριμένων παρασίτων χαρακτηρίζεται ως βενθικός καθώς τα πρώτα στάδια της ζωής τους

ξεκινούν από το βένθος (Palm 1999; Anderson 2000; McClelland 2002, 2005). Μερικώς γονιμοποιημένα αυγά τα οποία μεταφέρονται μέσω των κοπράνων των φωκιών στο βένθος εκκολάπτονται εμφανίζοντας λάρβες οι οποίες παραμένουν ενσωματωμένες στο κέλυφος τους μέχρι το δεύτερο στάδιο ανάπτυξης (L2) και στη συνέχεια προσκολλώνται στο υπόστρωμα. Στη συνέχεια, ξεκινά ο μολυσματικός κύκλος ανάπτυξής τους καθώς καταναλώνονται από βενθικά καρκινοειδή (αμφίποδα, κωπήποδα κλπ.) τα σώματα των οποίων λειτουργούν ως πρώτοι ενδιάμεσοι ξενιστές τους και διευκολύνουν την ανάπτυξή τους, σε αυτό το σημείο τα παράσιτα είναι έτοιμα να προσβάλλουν τους οργανισμούς των ιχθύων (Anderson 2000; McClelland 2002, 2005). Οι τελεόστεοι βενθικοί ιχθύες αποτελούν τους δεύτερους ενδιάμεσους ξενιστές των παρασίτων οι οποίοι στη συνέχεια καταναλώνονται από τους τρίτους ξενιστές οι οποίοι είναι συνήθως ιχθύες που τρέφονται με άλλους ιχθύες στα στους οργανισμούς των οποίων συναντώνται και οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί παρασίτων πριν καταναλωθούν και αυτοί με τη σειρά τους από τους τελικούς ξενιστές (Palm 1999; Anderson 2000; McClelland 2002, 2005). Στο τρίτο στάδιο (L3) της ανάπτυξής τους και αφού έχουν καταναλωθεί από τους τελικούς ξενιστές τα παράσιτα ξεφεύγουν από τα σώματα των ιχθύων και ενσωματώνονται στη βλεννογόνο του στομάχου όπου και συνεχίζουν την ανάπτυξή τους. Η γνώση σχετικά με τον κύκλο ζωής των παρασίτων διευκολύνει την έρευνα σχετικά με το πώς μεταφέρονται και μολύνουν τους διάφορους οργανισμούς που διαβιούν στο κοινό περιβάλλον με αυτά.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το *P. Bulbosa* έχει καταγραφεί μόνο σε μεγάλα βάθη των βόρειων θαλασσών οπότε η πιθανή εμφάνισή του στη θάλασσα της Μεσογείου γεννά πολλά ερωτήματα.

Μία πιθανή εξήγηση για την εμφάνιση του *P. Bulbosa* στο στομάχι της *Monachus monachus* είναι πως μεταφέρθηκε μέσω ενός μολυσμένου ενδιάμεσου ξενιστή. Συγκεκριμένα οι Morey et al. (2012) κατέγραψαν για πρώτη φορά την εμφάνιση ενός θηλυκού ατόμου *Gadus morhua* στη Μεσόγειο και συγκεκριμένα στη Μαγιόρκα. Οι Jørgensen et al. (2008) σε έρευνα που πραγματοποίησαν σχετικά με την εξέλιξη των χαρακτηριστικών μετανάστευσης του Μπακαλιάρου του Ατλαντικού (*Gadus morhua*) αναφέρουν πως το συγκεκριμένο είδος έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί μεταναστεύσεις μεγάλων αποστάσεων (1.000 km) ετησίως. Καθώς το παράσιτο *P. Bulbosa* έχει καταγραφεί στο είδος *Gadus morhua* υποθέτουμε πως άτομα του είδους έχουν μεταναστεύσει στα νερά της Μεσογείου με αποτέλεσμα να μεταφερθούν μέσω της τροφής ή των κοπράνων σε τελικούς ξενιστές όπως η φώκια της Μεσογείου. Τα υπόλοιπα είδη ιχθύων τα οποία προσβάλλει το συγκεκριμένο παράσιτο δεν έχουν βρεθεί στα νερά της Μεσογείου, παρόλα αυτά η πιθανότητα μετανάστευσής τους σε νέα περιβάλλοντα δεν είναι ασήμαντη.

Οι ιχθύες αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της ανάπτυξης των παρασίτων των πτερυγιοπόδων καθώς συμμετέχουν στην χρονική και χωρική εξάπλωση των λαρβών τους, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα επιβίωσης και κατάποσής τους από ένα τελικό ξενιστή (McClelland, 1995). Επιπλέον, οι παρασιτικοί έλμινθες που προσβάλλουν τους ιχθύες των ‘κρύων’ νερών δεν έχουν συγκεκριμένη προτίμηση στα είδη των ξενιστών τους (Holems, 1990) οπότε είναι ευκολότερο γι’ αυτούς και κατά συνέπεια και για τις λάρβες τους να εγκατασταθούν και να επιβιώσουν σε οποιονδήποτε οργανισμό. Τα περισσότερα παράσιτα από τη φύση τους εμφανίζουν εξειδίκευση μόνο στον τελικό τους ξενιστή και όχι στους ενδιάμεσους που προσβάλλουν (Alt et al., 2019).

Ένας από τους λόγους μετανάστευσης των ιχθύων σε νέα περιβάλλοντα μπορεί να θεωρηθεί αυτός της κλιματικής αλλαγής. Η αλλαγή της θερμοκρασίας των υδάτων έχει επιπτώσεις στην κατανομή των ιχθύων και στη σύσταση του θαλάσσιου οικοσυστήματος καθώς μεταβάλλει τη βιογεωγραφία και βιοποικιλότητα των θαλάσσιων ενδιαιτημάτων (Klimpel & Palm, 2011). Η δραστική αλλαγή της θερμοκρασίας των υδάτων μπορεί να οδηγήσει σε χωρικές μεταβολές των πληθυσμών ή σε αναδιάρθρωση των τροφικών πλεγμάτων, με αποτέλεσμα τα είδη ιχθύων να αναζητούν νέα ενδιαιτήματα για διατροφή και επιβίωση (Steele 1998, 2004; Hsieh et al. 2005; Jiao 2009). Το λιώσιμο των πάγων δύναται να επιτρέψει την ευκολότερη μετανάστευση των θαλάσσιων θηλαστικών όπως οι φάλαινες μεταξύ βορειότερων και νοτιότερων περιοχών με αποτέλεσμα τα θηλαστικά αυτά να έρχονται σε επαφή με νέα είδη παρασίτων και να δρουν ως ξενιστές τους (Klimpel & Palm, 2011).

Μέσω της παραπάνω υπόθεσης προσφέρεται μία επιπλέον εξήγηση για την εμφάνιση του *P. Bulbosa* στη Μεσογειακή φώκια. Είναι πολύ πιθανό το συγκεκριμένο παράσιτο να μεταφέρθηκε μέσω άλλων ειδών θαλάσσιων θηλαστικών τα οποία συμπεριφέρονται ως τυχαίοι ξενιστές και από τους οποίους μπορεί να μεταφερθεί μέσω των κοπράνων που εναποτίθενται στο βένθος. Πολλά είδη θαλασσιών θηλαστικών πραγματοποιούν μεγάλα μεταναστευτικά ταξίδια από τον βόρειο Ατλαντικό μέχρι τη Μεσόγειο όπως το είδος *Globicephala melas* (Abend & Smith, 1999). Στο ταξίδι τους αυτό κάποια από αυτά τα είδη μπορεί να προσβληθούν τυχαία μέσω της τροφής τους από το συγκεκριμένο παράσιτο με αποτέλεσμα να το μεταφέρουν στο νέο τους ενδιαιτήμα.

Με βάση την φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε και από την δημιουργία του φυλογενετικού δέντρου καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως το είδος του παρασίτου που απομονώσαμε έχει τον ίδιο κοινό πρόγονο με το είδος *Anisakis physeteris*.

Το είδος *Anisakis physeteris* συναντάται στις περιοχές του Καναδά, στον Ινδικό ωκεανό, στον βόρειο και νότιο Ατλαντικό στην Μεσόγειο και τη Νότιο Αφρική. Οι κύριοι ξενιστές του *A. physeteris* ανήκουν στις οικογένειες Kogiidae και Physeteridae το με κύριο ξενιστή το είδος *Physeter macrocephalus* (Hermosilla et al. 2018) και *Kogia breviceps* (Santos 1998). Το παράσιτο έχει επίσης καταγραφεί και στο είδος *Ziphius cavirostris* (Mattiucci et al. 2001) προτείνοντας μία κοινή διατροφική συμπεριφορά μεταξύ των δύο αυτών θηλαστικών της Μεσογείου και επιπλέον σε πτερυγιόποδα όπως το είδος *Arctocephalus pusillus* (Stewardson, Stewardson, and Fourie 1998).

Οι Farjallah et al. 2008 μέσα από έρευνα που πραγματοποίησαν κατέγραψαν πως το λαρβικό στάδιο του παρασίτου επιλέγει ως ενδιάμεσους ξενιστές ως τα είδη *Merluccius merluccius*, *Scomber scombrus*, *Phycis phycis* και *Phycis blennoides*, ενώ επιπλέον έρευνες έχουν καταγράψει πως το παράσιτο *A. physeteris* επιλέγει ως ενδιάμεσους ξενιστές βενθοπελαγικά είδη (Farjallah et al. 2008). Επιπλέον συναντάται και σε είδη κεφαλόποδων όπως το *Illex coindetii* το οποίο είναι ενδημικό της Μεσογείου και του βόρειου Ατλαντικού, το *Histioteuthis bonnellii* και το *Histioteuthis reversa* τα οποία πιάστηκαν στην κεντρική Μεσόγειο (Mattiucci et al. 2001; Palomba et al. 2021).

Το γεγονός πως το *Anisakis physeteris* είναι διαδεδομένο στην Μεσόγειο ενισχύει την υπόθεσή μας πως το παράσιτο *Pseudoterranova* sp. COI έχει κοινή και παράλληλη εξελικτική πορεία με αυτό. Ο πιθανός διαχωρισμός σε διαφορετικά είδη, η σχέση των οποίων απεικονίζεται στο φυλογενετικό δέντρο, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός πως λόγω του διαδεδομένου χαρακτήρα του, άτομα του είδους ξεκίνησαν να παρασιτούν σε ξενιστές που κατείχαν διαφορετικά χαρακτηριστικά και οι οποίοι μπορεί να διαβιούσαν σε έντονα διαφοροποιημένα ενδιαιτήματα. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά μπορεί να είχε ως αποτέλεσμα

την προσαρμογή των ατόμων του παρασίτου στις εκάστοτε συνθήκες γεγονός που ενίσχυσε την διαφοροποίησή του και είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία νέων ειδών. Η συγκεκριμένη υπόθεση μπορεί να είναι πιθανά λανθασμένη καθώς δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες σχετικά με τις σχέσεις των ειδών αυτών. Αν οι προβλέψεις μας είναι σωστές η συγκεκριμένη καταγραφή του παρασίτου είναι η πρώτη που παρατηρήθηκε στην Μεσόγειο και στο είδος *Monachus monachus*.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abend, A. G., & Smith, T. D. (1999). Review of Distribution of the Long-finned Pilot Whale (*Globicephala melas*) in the North Atlantic and Mediterranean. *Fisheries Science*, *April 1999*, 28.
<http://www.nefsc.noaa.gov/nefsc/publications/tm/tm117/tm117index.htm>
- Abollo, E, Lopez, A., Gestal, C., Benavente, P., & Pascual, S. (1998). Long-term recording of gastric ulcers in cetaceans stranded on the Galician (NW Spain) coast. *Diseases of Aquatic Organisms*, *32*(1), 71–73.
- Abollo, Elvira, Gestal, C., López, A., González, A. F., Guerra, A., & Pascual, S. (1998). Squid as trophic bridges for parasite flow within marine ecosystems: the case of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae), or when the wrong way can be right. *African Journal of Marine Science*, *20*.
- Alt, K. G., Kochmann, J., Klimpel, S., & Cunze, S. (2019). Improving species distribution models of zoonotic marine parasites. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–10.
- Amin, O. (1998). Marine Flora and Fauna of the Eastern United States. Acanthocephala. *NOAA*, 1–28.
- Anderson, R. C. (2000). *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*. Cabi.
- Aw, T. (2019). Environmental Aspects and Features of Critical Pathogen Groups. *Global Water Pathogen Project*. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.2>
- Aznar, F. J., Pérez-Ponce de León, G., & Raga, J. A. (2006). Status of *Corynosoma* (Acanthocephala: Polymorphidae) based on anatomical, ecological, and phylogenetic evidence, with the erection of *Pseudocorynosoma* n. gen. *Journal of Parasitology*, *92*(3), 548–564.
- Babin, P., Raga, J. A., & Duguy, R. (1994). Courte communication: Ulcères parasitaires gastriques chez les cétacés odontocètes échoués sur les côtes de France. *Le Point Vétérinaire: Revue d'enseignement Post-Universitaire et de Formation Permanente*, *26*(159), 77–81.
- Bell, P. J. (1996). The life history and transmission biology of *Sternostoma tracheacolum* Lawrence (Acari: Rhinonyssidae) associated with the Gouldian finch *Erythrura gouldiae*. *Experimental & Applied Acarology*, *20*(6), 323–341.
<https://doi.org/10.1007/BF00052962>
- Bonar, C. J., Boede, E. O., Hartmann, M. G., Lowenstein-Whaley, J., Mujica-Jorquera, E., Parish, S. V., Parish, J. V., Garner, M. M., & Stadler, C. K. (2007). A retrospective study of pathologic findings in the Amazon and Orinoco river

- dolphin (*Inia geoffrensis*) in captivity. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38(2), 177–191.
- Bratney, J., & Davidson, W. S. (1996). Genetic variation within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda: Ascaridoidea) from Canadian Atlantic marine fishes and seals: characterization by RFLP analysis of genomic DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(2), 333–341.
- Buergelt, C. D., & Bonde, R. K. (1983). Toxoplasmic meningoencephalitis in a West Indian manatee. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183(11), 1294–1296.
- Bush, A. O., Heard Jr., R. W., & Overstreet, R. M. (1993). Intermediate hosts as source communities. *Canadian Journal of Zoology*, 71(7), 1358–1363.
<https://doi.org/10.1139/z93-186>
- Campana-Rouget, Y., A. E. B. (1955). Une nouvelle espece d'Anisakis chez un phoque Mediterranean. *Annales de Parasitologie*, 30, 477–480.
- Ciaramella, P., Oliva, G. d, De Luna, R., Ambrosio, R., Cortese, L., Persechino, A., Gradoni, L., & Scalone, A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, 141(21), 539–543.
- Clayton, D. H., Adams, R. J., & Bush, S. E. (2008). Phthiraptera, the Chewing Lice. In *Parasitic Diseases of Wild Birds* (pp. 513–526).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780813804620.ch29>
- Colegrove, K. M., Greig, D. J., & Gulland, F. M. D. (2005). Causes of live strandings of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) and Pacific harbor seals (*Phoca vitulina*) along the central California coast, 1992–2001. *Aquatic Mammals*, 31(1), 1.
- Colwell, R. R. (2005). Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment. In *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*.
<https://doi.org/10.1007/b102184>
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). MICROBIAL BIOFILMS. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- Cox, A. J., & Hebert, P. D. N. (2001). Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*, 10(2), 371–386.
- Cox, C. S. (1989). Airborne bacteria and viruses. *Science Progress (1933-)*, 73(4 (292)), 469–499. <http://www.jstor.org/stable/43421049>
- Cox, C. S. (1998). The microbiology of air. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 339–350.
- Dabert, J. (2005). Acari (mites and ticks). *Marine Parasitology*. CSIRO Publishing, Victoria, 216–222.
- Dailey, M., Ellin, R., & Parás, A. (2005). First report of parasites from pinnipeds in the

- Galapagos Islands, Ecuador, with a description of a new species of *Philophthalmus* (Digenea: Philophthalmidae). *Journal of Parasitology*, 91(3), 614–617.
- Drózdź, J. (1987). Oocysts of six new Coccidiomorpha species from pinnipeds of King George Island (South Shetlands, Antarctica). *Acta Protozoology*, 26, 263–266.
- Durden, L. A., & Hinkle, N. C. (2019). Chapter 10 - Fleas (Siphonaptera). In G. R. Mullen & L. A. B. T.-M. and V. E. (Third E. Durden (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)* (pp. 145–169). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00010-8>
- Durden, L. A., & Timm, R. M. (2001). HOPLOPLEURA JANZENI N. SP. (PHTHIRAPTERA: ANOPLURA), A NEW SUCKING LOUSE FROM A CENTRAL AMERICAN SWIMMING MOUSE. *Journal of Parasitology*, 87(6), 1409–1413. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[1409:HJNSPA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[1409:HJNSPA]2.0.CO;2)
- Farjallah, S., Slimane, B. Ben, Busi, M., Paggi, L., Amor, N., Blel, H., Said, K., & D'Amelio, S. (2008). Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. *Parasitology Research*, 102(3), 371–379. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0771-9>
- Fauquier, D., Gulland, F., Haulena, M., & Spraker, T. (2003). Biliary adenocarcinoma in a stranded northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *Journal of Wildlife Diseases*, 39(3), 723–726.
- Ferrer, L., Rabanal, R. M., Domingo, M., Ramos, J. A., & Fondevila, D. (1988). Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Research in Veterinary Science*, 44(2), 194–196.
- Funk, D. J., & Omland, K. E. (2003). Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 397–423. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421>
- Geraci, J. R. (1981). Dietary disorders in marine mammals: synthesis and new findings [Includes fishes]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.
- Gregory D. Bossart. (1993). *Emerging Diseases in Marine Mammals: from Dolphins to Manatees-FAU Institutional Repository*. 25(97), 106–112.
- Grimaldi Jr, G., Tesh, R. B., & McMahon-Pratt, D. (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(6), 687–725.
- Haebler, R., & Moeller, R. B. (1992). Pathobiology of selected marine mammal diseases. *Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms*, 217–244.
- Harvell, C. D., Mitchell, C. E., Ward, J. R., Altizer, S., Dobson, A. P., Ostfeld, R. S., & Samuel, M. D. (2002). Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. *Science*, 296(5576), 2158 LP – 2162. <https://doi.org/10.1126/science.1063699>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*:

- Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hermosilla, C., Hirzmann, J., Silva, L. M. R., Brotons, J. M., Cerdà, M., Prenger-Berninghoff, E., Ewers, C., & Taubert, A. (2018). Occurrence of anthrozoonotic parasitic infections and faecal microbes in free-ranging sperm whales (*Physeter macrocephalus*) from the Mediterranean Sea. *Parasitology Research*, 117(8), 2531–2541. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5942-3>
- Holmes, J. C. (1990). Helminth communities in marine fishes. In *Parasite communities: patterns and processes* (pp. 101–130). Springer.
- Hsieh, C., Glaser, S. M., Lucas, A. J., & Sugihara, G. (2005). Distinguishing random environmental fluctuations from ecological catastrophes for the North Pacific Ocean. *Nature*, 435(7040), 336–340.
- Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., & Le Mercier, P. (2010). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_1), D576–D582. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq901>
- Inskip, W. 2nd, Gardiner, C. H., Harris, R. K., Dubey, J. P., & Goldston, R. T. (1990). Toxoplasmosis in Atlantic bottle-nosed dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 26(3), 377–382.
- Jiao, Y. (2009). Regime shift in marine ecosystems and implications for fisheries management, a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19(2), 177–191.
- Jørgensen, C., Dunlop, E. S., Opdal, A. F., & Fiksen, Ø. (2008). THE EVOLUTION OF SPAWNING MIGRATIONS: STATE DEPENDENCE AND FISHING-INDUCED CHANGES. *Ecology*, 89(12), 3436–3448. <https://doi.org/https://doi.org/10.1890/07-1469.1>
- Joseph G. Vos, Gregory Bossart, Michel Fournier, T. O. (2005). Toxicology of Marine Mammals. In *Aquatic Mammals* (Vol. 30, Issue 2). <https://doi.org/10.1578/am.30.2.2004.337>
- Kagei, N. (1968). Life cycle of anisakis. *Saishin Igaku. Modern Medicine*, 24(2), 389–400.
- Karamanlidis, A. A., Kallianiotis, A., Psaradellis, M., & Adamantopoulou, S. (2011). Stomach contents of a subadult Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) from the Aegean Sea. *Aquatic Mammals*, 37(3), 280–283. <https://doi.org/10.1578/AM.37.3.2011.280>
- Kıraç, C., & Ok, M. (2019). Diet of a Mediterranean monk seal *Monachus monachus* in a transitional post-weaning phase and its implications for the conservation of the species. *Endangered Species Research*, 39, 315–320. <https://doi.org/10.3354/esr00971>
- Klimpel, S., & Palm, H. W. (2011). Anisakid Nematode (Ascaridoidea) Life Cycles and Distribution: Increasing Zoonotic Potential in the Time of Climate Change? In H. Mehlhorn (Ed.), *Progress in Parasitology* (pp. 201–222). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21396-0_11

- Klimpel, S., Palm, H. W., Rückert, S., & Piatkowski, U. (2004). The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North Sea). *Parasitology Research*, *94*(1), 1–9.
- Knowlton, N., & Weigt, L. A. (1998). New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *265*(1412), 2257–2263.
- Kuzmina, T A, Lyons, E. T., & Spraker, T. R. (2014). Anisakids (Nematoda: Anisakidae) from stomachs of northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) on St. Paul Island, Alaska: parasitological and pathological analysis. *Parasitology Research*, *113*(12), 4463–4470.
- Kuzmina, Tetiana A, & Kuzmin, Y. (2015). Description of *Uncinaria lyonsi* n. sp.(Nematoda: Ancylostomatidae) from the California sea lion *Zalophus californianus* Lesson (Carnivora: Otariidae). *Systematic Parasitology*, *90*(2), 165–176.
- Lair, S., Measures, L. N., & Martineau, D. (2016). Pathologic findings and trends in mortality in the beluga (*Delphinapterus leucas*) population of the St Lawrence Estuary, Quebec, Canada, from 1983 to 2012. *Veterinary Pathology*, *53*(1), 22–36.
- Lehnert, K., Raga, J. A., & Siebert, U. (2007). Parasites in harbour seals (*Phoca vitulina*) from the German Wadden Sea between two Phocine Distemper Virus epidemics. *Helgoland Marine Research*, *61*(4), 239–245.
- Leonardi, M. S., & Palma, R. L. (2013). Review of the systematics, biology and ecology of lice from pinnipeds and river otters (Insecta: Phthiraptera: Anoplura: Echinophthiriidae). *Zootaxa*, *3630*(3), 445–466.
- Ligon, G., & Bartram, J. (2016). Literature Review of Associations among Attributes of Reported Drinking Water Disease Outbreaks. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 13, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/ijerph13060527>
- Lotz, J. M., Bush, A. O., & Font, W. F. (1995). Recruitment-Driven, Spatially Discontinuous Communities: A Null Model for Transferred Patterns in Target Communities of Intestinal Helminths. *The Journal of Parasitology*, *81*(1), 12–24. <https://doi.org/10.2307/3283999>
- Luff, J. A. (2007). Gastric Trichomonads in Stranded California Sea Lions (*Zalophus californianus*) IAAAM 2007. *38th Annual Conference of the International Association for Aquatic Animal Medicine Conference*.
- Lyons, E. T., Kuzmina, T. A., Tolliver, S. C., & Spraker, T. R. (2012). Update on the prevalence of the hookworm, *Uncinaria lucasi*, in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) on St. Paul Island, Alaska, 2011. *Parasitology Research*, *111*(3), 1397–1400.
- M. Begon, J. L. H. and C. R. T. (1996). “*Ecology: Individuals, Populations and Communities*,” *3rd Edition*. Blackwell Science Ltd.
- MacFarlane, R. D., McLaughlin, J. J., & Bullock, G. L. (1986). QUANTITATIVE

- AND QUALITATIVE STUDIES OF GUT FLORA IN STRIPED BASS FROM ESTUARINE AND COASTAL MARINE ENVIRONMENTS. *Journal of Wildlife Diseases*, 22(3), 344–348. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-22.3.344>
- Mackiewicz, J. S. (1988). Cestode transmission patterns. *The Journal of Parasitology*, 60–71.
- Marcogliese, D. J. (2002). Food webs and the transmission of parasites to marine fish. *Parasitology*, 124(7), 83–99.
- Marcus, A. D., Higgins, D. P., & Gray, R. (2014). Epidemiology of hookworm (*Uncinaria stenocephala*) infection in free-ranging Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) pups. *Parasitology Research*, 113(9), 3341–3353.
- Marcus, A. D., Higgins, D. P., Slapeta, J., & Gray, R. (2014). *Uncinaria stenocephala* sp. n. (Nematoda: Ancylostomatidae) from the endangered Australian sea lion, *Neophoca cinerea* (Carnivora: Otariidae). *Folia Parasitologica*, 61(3), 255.
- Martínez, J. L., Baquero, F., & Andersson, D. I. (2007). Predicting antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12), 958–965. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1796>
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Abollo, E., Webb, S. C., Pascual, S., Cianchi, R., & Bullini, L. (2001). Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae) s. *International Journal for Parasitology*, 31(1), 9–14.
- Mattiucci, Simonetta, Paggi, L., Nascetti, G., Ishikura, H., Kikuchi, K., Sato, N., Cianchi, R., & Bullini, L. (1998). Allozyme and morphological identification of *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). *Systematic Parasitology*, 40(2), 81–92. <https://doi.org/10.1023/A:1005914926720>
- Mazzariol, S., Marcer, F., Mignone, W., Serracca, L., Gorla, M., Marsili, L., Di Guardo, G., & Casalone, C. (2012). Dolphin Morbillivirus and *Toxoplasma gondii* coinfection in a Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *BMC Veterinary Research*, 8(1), 1–5.
- McClelland, G. (1993). *Eimeria phocae* (Apicomplexa: Eimeriidae) in harbour seals *Phoca vitulina* from Sable Island, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 17, 1.
- McClelland, G. (1995). Experimental infection of fish with larval sealworm, *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakinae), transmitted by amphipods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(S1), 140–155.
- McClelland, G. (2002). The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review. *Parasitology*, 124(7), 183.
- McClelland, G. (2005). Nematoda (roundworms). *Marine Parasitology*.
- McClelland, Gary. (1980a). *Phocanema decipiens*: growth, reproduction, and survival in seals. *Experimental Parasitology*, 49(2), 175–187.
- McClelland, Gary. (1980b). *Phocanema decipiens*: pathology in seals. *Experimental*

- Parasitology*, 49(3), 405–419.
- McIntosh, R. R., & Murray, M. D. (2007). Louse infestations of the Australian sea lion *Neophoca cinerea*. *Australian Mammalogy*, 29(1), 103–105.
- Measures, L. (2014). *Anisakiosis and pseudoterranovosis*.
- Measures, L. N., Gosselin, J.-F., & Bergeron, E. (1997). Heartworm, *Acanthocheilonema spirocauda* (Leidy, 1858), infections in Canadian phocid seals. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(4), 842–846.
- Memarzadeh, F. (2012). Literature Review of the Effect of Temperature and Humidity on Viruses. *ASHRAE Transactions*, 118(1).
- Morey, G., Morales-Nin, B., Riera, F., Grau, A., Geffen, A. J., Pérez-Mayol, S., Chang, M. Y., & Grau, A. M. (2012). Atlantic cod *Gadus morhua* in the Mediterranean: A surprising immigrant. *Marine Ecology Progress Series*, 467, 277–280. <https://doi.org/10.3354/meps09936>
- Nadler, S. A., Lyons, E. T., Pagan, C., Hyman, D., Lewis, E. E., Beckmen, K., Bell, C. M., Castinel, A., DeLong, R. L., Duignan, P. J., Farinpour, C., Huntington, K. B., Kuiken, T., Morgades, D., Naem, S., Norman, R., Parker, C., Ramos, P., Spraker, T. R., & Berón-Vera, B. (2013). Molecular systematics of pinniped hookworms (Nematoda: Uncinaria): Species delimitation, host associations and host-induced morphometric variation. *International Journal for Parasitology*, 43(14), 1119–1132. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.08.006>
- Nagasawa, K. (1990). The life cycle of *Anisakis simplex*: a review. *Intestinal Anisakiasis in Japan*, 31–40.
- National Institutes of Health. (2007). Understanding Emerging and Re-emerging Infectious Diseases. *NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US), Md*, 1–27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20370/>
- Oba, Y., Ôhira, H., Murase, Y., Moriyama, A., & Kumazawa, Y. (2015). DNA Barcoding of Japanese Click Beetles (Coleoptera, Elateridae). *PLOS ONE*, 10(1), e0116612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116612>
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*, 43(spc1), 93–100.
- Oxley, A. P. A., Shipton, W., Owens, L., & McKay, D. (2002). Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 93(2), 214–223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01673.x>
- Özbel, Y., Turgay, N., Özensoy, S., Özbilgin, A., Alkan, M. Z., Özcel, M. A., Jaffe, C. L., Schnur, L., Oskam, L., & Abranches, P. (1995). Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 89(sup1), 89–93.
- Ozensoy, S., Ozbel, Y., Turgay, N., Alkan, M. Z., Gul, K., Gilman-Sachs, A., Chang, K. P., Reed, S. G., & Ozcel, M. A. (1998). Serodiagnosis and epidemiology of

visceral leishmaniasis in Turkey. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(3), 363–369.

- Paggi, L., Nascetti, G., Cianchi, R., Orecchia, P., Mattiucci, S., D'amelio, S., Berland, B., Bratney, J., Smith, J. W., & Bullini, L. (1991). Genetic evidence for three species within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) in the North Atlantic and Norwegian and Barents Seas. *International Journal for Parasitology*, 21(2), 195–212.
- Paggi, Lia, Mattiucci, S., Gibson, D. I., Berland, B., Nascetti, G., Cianchi, R., & Bullini, L. (2000). *Pseudoterranova decipiens* species A and B (Nematoda, Ascaridoidea): nomenclatural designation, morphological diagnostic characters and genetic markers. *Systematic Parasitology*, 45(3), 185–197.
- Palm, H. W. (1999). Ecology of *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878)(Nematoda: Anisakidae) from Antarctic waters. *Parasitology Research*, 85(8), 638–646.
- Palomba, M., Mattiucci, S., Crocetta, F., Osca, D., & Santoro, M. (2021). Insights into the role of deep-sea squids of the genus *Histioteuthis* (Histioteuthidae) in the life cycle of ascaridoid parasites in the Central Mediterranean Sea waters. *Scientific Reports*, 11(1), 7135. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86248-5>
- Papadopoulos, E., Loukopoulos, P., Komnenou, A., Androukaki, E., & Karamanlidis, A. A. (2010). First report of *Acanthocheilonema spirocauda* in the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 46(2), 570–573.
- Pereira, E. M., Müller, G., Secchi, E., Pereira Jr, J., & Valente, A. L. S. (2013). Digenetic trematodes in South American sea lions from southern Brazilian waters. *The Journal of Parasitology*, 99(5), 910–913.
- Pierce, G. J., Hernandez-Milian, G., Santos, M. B., Dendrinou, P., Psaradellis, M., Tounta, E., Androukaki, E., & Edridge, A. (2011). Diet of the monk seal (*Monachus monachus*) in Greek Waters. *Aquatic Mammals*, 37(3), 284–297. <https://doi.org/10.1578/AM.37.3.2011.284>
- Poore, G. C. B. (2012). The nomenclature of the Recent Pentastomida (Crustacea), with a list of species and available names. *Systematic Parasitology*, 82(3), 211–240. <https://doi.org/10.1007/s11230-012-9363-x>
- Rallis, T., Day, M. J., Saridomichelakis, M. N., Adamama-Moraitou, K. K., Papazoglou, L., Fytianou, A., & Koutinas, A. F. (2005). Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *Journal of Comparative Pathology*, 132(2–3), 145–152.
- Rodrigues, M. S., Morelli, K. A., & Jansen, A. M. (2017a). Cytochrome c oxidase subunit 1 gene as a DNA barcode for discriminating *Trypanosoma cruzi* DTUs and closely related species. *Parasites & Vectors*, 10(1), 1–18.
- Rodrigues, M. S., Morelli, K. A., & Jansen, A. M. (2017b). Cytochrome c oxidase subunit 1 gene as a DNA barcode for discriminating *Trypanosoma cruzi* DTUs and closely related species. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2457-1>

- Ruiz, G. M., Rawlings, T. K., Dobbs, F. C., Drake, L. A., Mullady, T., Huq, A., & Colwell, R. R. (2000). Global spread of microorganisms by ships. *Nature*, 408(6808), 49–50. <https://doi.org/10.1038/35040695>
- Salman, A., Bilecenoglu, M., & Güçlüsoy, H. (2001). Stomach contents of two Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*) from the Aegean Sea, Turkey. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81(4), 719–720. <https://doi.org/10.1017/S0025315401004519>
- Santos, C. P. (1998). Occurrence of *Anisakis Pseudoterranova* sp. (Nematoda) in Pygmy Sperm Whale *Kogia breviceps* (De (Physeteridae) in Northeastern Coast of Brazil. *Journal of Helminthology*, 93(2), 187–188.
- Schnapp, B., Hellwing, S., & Ghizelea, G. (1962). Contributions to the knowledge of the Black Sea seal (*Monachus monachus*) Herm. *Travaux Du Museum d'Histoire Naturelle 'Gr. Antipa*, 3, 383–400.
- Sepúlveda, M. A., Seguel, M., Alvarado-Rybak, M., Verdugo, C., Muñoz-Zanzi, C., & Tamayo, R. (2015). Postmortem findings in four south American sea lions (*Otaria byronia*) from an urban colony in Valdivia, Chile. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(1), 279–282.
- Slappendel, R. J., Ferrer, L., & Greene, C. E. (1998). Infectious diseases of the dog and cat. *Leishmaniasis*. Philadelphia, WB Saunders Co, 450–458.
- Spraker, T. R., DeLong, R. L., Lyons, E. T., & Melin, S. R. (2007). Hookworm enteritis with bacteremia in California sea lion pups on San Miguel Island. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(2), 179–188.
- Steele, J. H. (2004). Regime shifts in the ocean: reconciling observations and theory. *Progress in Oceanography*, 60(2–4), 135–141.
- Stewardson, C. L., Stewardson, C. L., & Fourie, H. J. (1998). Endoparasites of the cape fur seal *arctocephalus pusillus pusillus* from the eastern cape coast of south africa. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 53(1), 33–51. <https://doi.org/10.1080/00359199809520372>
- Stroud, R. K., & Roffe, T. J. (1979). Causes of death in marine mammals stranded along the Oregon coast. *Journal of Wildlife Diseases*, 15(1), 91–97.
- Tavares, E. S., & Baker, A. J. (2008). Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 81. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-81>
- Toplu, N., Aydoğan, A., & Oguzoglu, T. C. (2007). Visceral Leishmaniosis and Parapoxvirus Infection in a Mediterranean Monk Seal (*Monachus monachus*). *Journal of Comparative Pathology*, 136(4), 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.02.005>
- Trivedi, S., Aloufi, A. A., Ansari, A. A., & Ghosh, S. K. (2016). Role of DNA barcoding in marine biodiversity assessment and conservation: An update. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(2), 161–171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.01.001>

- Van de Bildt, M. W. G., Martina, B. E. E., Vedder, E. J., Androukaki, E., Kotomatas, S., Komnenou, A., Sidi, B. A., Jiddou, A. B., Barham, M. E. O., & Niesters, H. G. M. (2000). Identification of morbilliviruses of probable cetacean origin in carcasses of Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*). *Veterinary Record*, *146*(24), 691–694.
- Van De Bildt, M. W. G., Martina, B. E. E., Vedder, E. J., Androukaki, E., Kotomatas, S., Komnenou, A., Sidi, B. A., Jiddou, A. B., Barham, M. E. O., Niesters, H. G. M., & Osterhaus, A. D. M. E. (2000). Identification of morbilliviruses of probable cetacean origin in carcasses of Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*). *Veterinary Record*, *146*(24), 691–694. <https://doi.org/10.1136/vr.146.24.691>
- Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, *3*(5), 294–299.
- Wares, J. P., & Cunningham, C. W. (2001). Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, *55*(12), 2455–2469.
- William F. Perrin, Bernd Wursig, J. G. M. T. (2009). *Encyclopedia of Marine Mammals*
- Yamaguti, S. (1961). Systema helminthum. Volume III. The nematodes of vertebrates. *Systema Helminthum. Volume III. The Nematodes of Vertebrates.*, 3.
- Yildiz, F. H. (2007). Processes controlling the transmission of bacterial pathogens in the environment. *Research in Microbiology*, *158*(3), 195–202.
- Zhang, D.-X., & Hewitt, G. M. (1997). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Molecular Biology*, *6*(2), 143–150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1997.tb00082.x>

6. ABSTRACT

The Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) belongs to the Phocidae family and is considered to be the most endangered marine mammal species in the world. The biggest population is found in the eastern side of the Mediterranean Sea. In Greece the species is being mainly found at the Marine National Park of Alonnisos which is a restricted area for the protection of the species. The Mediterranean monk seal is considered to be an opportunistic predator because it is able to feed on a lot of different marine species such as prey that mainly consists of benthopelagic fish and of cephalopods. The fact that its prey varies makes the Mediterranean monk seal prone to parasitic infections as the species that it feeds upon work as paratenic hosts for such parasites. The aim of the current study is to look into the identity and the origin of this particular parasitic nematode that was found in the deceased body of a young Mediterranean seal in the area inside the Pagasetic gulf. The body of the young seal was found by fishermen and brought to the laboratory of the Department of Ichthyology and Aquatic Environment, so a necropsy could be conducted. The body was preserved in a freezer from which the stomach was taken for further analysis of its contents. During the analysis of the stomach contents two individuals resembling a parasitic nematode were detected and afterwards preserved in a 70% ethanol solution. Molecular analysis was conducted for the tissues derived from the two nematodes and for PCR amplification, cycling conditions 50 °C, the cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial gene (CO1) was used as a molecular marker as it is one of the most common markers for recognising the genome of invertebrate species. With the completion of the molecular analysis the samples were sent to a laboratory for sequencing. Sequencing was carried on with the

Sanger method the results of which indicated that the nematodes that were found in the stomach contents of the seal belonged to the *Pseudoterranova* genus and presented a 96% similarity to the *Pseudoterranova bulbosa* nematode species. Eleven (11) *Pseudoterranova* sequences and one from the *Anisakis physeteris* nematodes species which was used as an outgroup were aligned using Clustal W method and were analyzed by the Maximum Likelihood method and General Time Reversible model. A bootstrap tree (10,000 replicates) was produced with the use of the Kimura -2- parameter (K2P). From the constructed phylogenetic tree a clear genetic connection between our parasitic nematode named *Pseudoterranova_sp_COI* and *Pseudoterranova bulbosa* was established which indicates the first time a parasitic nematode as such to be found in the waters of the Mediterranean sea and also in the stomach of a *Monachus monachus*. The most common host for the *Pseudoterranova bulbosa* parasite is the bearded seal which lives in the North Atlantic. Some possible explanations could be that it was transferred in the Mediterranean through an infected host such as the species *Gadus morhua* which has been found to be infected by this particular parasite. Climate change could also be considered another factor as it affects the fish distribution and the biology of the marine ecosystem for it causes change between the fish populations and alters the food webs. Also the melting of the ice could mean that species that were not able to travel south due to environmental obstacles, are now able to do so. In this manner marine mammal species that carry this type of parasite, by coming into contact with species such as the mediterranean monk seal could pass it through social interaction. Another possible explanation is that of divergent evolution. In that case the phylogenetic tree that was constructed could be of use as it was shown that *Pseudoterranova_sp_COI* and *Anisakis physeteris* have a common ancestor. It is also known that *Anisakis physeteris* is a very

common nematode species in the Mediterranean sea. Our hypothesis is that due to unforeseen reasons a divergence caused different adaptation methods and the creation of separate species. Recognising the genetic identity of the nematode species that was found in the stomach contents of the Mediterranean monk seal could lead to important new discoveries about the relationships between parasites and their hosts.