

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ
ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Πληθυσμιακή γενετική του είδους *Hippocampus hippocampus* στη
Μεσόγειο Θάλασσα»**

Μάρθα Κορδολαίμη

ΒΟΛΟΣ 2022

**«Πληθυσμιακή γενετική του είδους *Hippocampus hippocampus* στη Μεσόγειο
Θάλασσα»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1. Γεώργιος Γκάφας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυαποθεμάτων, 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, Μέλος.

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

Αφιέρωση

Στους δικούς μου ανθρώπους

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία.

Ιδιαίτερη ευχαριστία στον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. 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. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Σαραντοπούλου Ιωάννα για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, όσον αφορά το εργαστηριακό πρακτικό κομμάτι της μελέτης.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία έχει ως κεντρικό θεματικό άξονα την πληθυσμιακή γενετική του είδους *Hippocampus hippocampus* στη Μεσόγειο Θάλασσα. Το πρώτο κεφάλαιο πραγματεύεται την ποικιλότητα των ειδών του υπόκαμπου τόσο σε παγκόσμιο επίπεδο όσο και στο κομμάτι της Ανατολικής Μεσογείου που άπτεται του περιεχομένου της συγκεκριμένης μελέτης. Επιπροσθέτως, παρατίθενται με λεπτομέρεια η ιστορική εξέλιξη του είδους ανά τους αιώνες. Για την εκμείωση των πληροφοριών του είδους που μελετήθηκε επιλέχθηκε η μελέτη του μιτοχονδριακού γονιδίου μέσα από έρευνες εργαστηριακού επιπέδου. Συγκεκριμένα, έλαβε χώρα η εξαγωγή DNA, η αντιγραφή του γενετικού υλικού μέσω PCR και η αλληλούχιση σε 6 δείγματα τα οποία προέρχονταν από το Αιγαίο και το Ιόνιο Πέλαγος. Στα προαναφερθέντα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του DNA barcoding καθώς επίσης και σε δυο αλληλουχίες γονιδίων από το NCBI. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα προγράμματα που κατέδειξαν τις φυλογενετικές σχέσεις και παρέθεσαν τα απαραίτητα αποτελέσματα. Αναλυτικότερα, υπήρξε εστίαση στη μέθοδο Μέγιστης Πιθανοφάνειας που αποτέλεσε τον αρωγό κατάδειξης του φυλογενετικού δέντρου καθώς και στη στατιστική ανάλυση. Λεπτομερώς, υπολογίστηκαν ο δείκτης Tajima's D και ο δείκτης γενετικής ποικιλομορφίας FST. Από τα αποτελέσματα που δόθηκαν από το φυλογενετικό δέντρο οδηγηθήκαμε στην ύπαρξη δύο φυλογενετικών ομάδων. Η μια ομάδα περιλάμβανε τους απλότυπους που προέρχονταν από το Αιγαίο Πέλαγος και η άλλη από το Ιόνιο. Συμπερασματικά, γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχει έντονη γενετική διαφοροποίηση και ανομοιότητα ανάμεσα στους πληθυσμούς και τα άτομα που τους απαρτίζουν. Στα δείγματα που συλλέχθηκαν από το Αιγαίο Πέλαγος, η τιμή του Tajima's D ήταν μηδενική (μη στατιστικώς σημαντική) δηλώντας έλλειψη γενετικής διαφοροποίησης στους πληθυσμούς. Αντίστοιχα, στο Ιόνιο Πέλαγος η τιμή του Tajima's D ήταν ίση με -1.17500 (στατιστικώς σημαντική). Αυτό μας προϊδεάζει για πιθανό bottleneck που ενδεχόμενος είχε υποστεί αυτός ο πληθυσμός. Ο συντελεστής διαφοροποίησης Fst, καταδεικνύει την διαφοροποίηση που υφίσταται η γενετική συγκρότηση αυτών των πληθυσμών και περιορίζεται μέσα σε συγκεκριμένες τιμές. Στους υπό μελέτη πληθυσμούς, φανερώνεται αξιοσημείωτη διαφοροποίηση στις συχνότητες των αλληλόμορφων, με μεγάλο βαθμό ανομοιότητας στα άτομα των πληθυσμών. Ο υπόκαμπος στην ολότητα του, καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά της αδυναμίας στην κολύμβηση και της αραιής κατανομής. Αναλυτικότερα, η αδυναμία στη κολύμβηση οδηγεί στο να μην πραγματοποιούν ταξίδια και να εντοπίζονται στάσιμοι στον ίδιο χώρο. Το είδος αυτό διακρίνεται με βάση το μονογαμικό του μοτίβο. Αυτά είναι και τα χαρακτηριστικά που υποστηρίζουν και δικαιολογούν την γενετική τους διαφοροποίηση. Η διακύμανση στις τιμές των ωκεανογραφικών χαρακτηριστικών αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν ενίσχυσαν την άποψη της σπουδαιότητας αυτών των γεωγραφικών περιοχών με σκοπό τη διατήρηση του συγκεκριμένου είδους. Τα συλλεχθέντα δεδομένα μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για την εφαρμογή αποτελεσματικών πολιτικών διαχείρισης που μελλοντικά ενδέχεται να είναι καθοριστικές για την επιβίωση του είδους.

Λέξεις κλειδιά: *Hippocampus hippocampus*, MtDNA, πληθυσμιακή γενετική, Μεσόγειος Θάλασσα, γονίδιο COI.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Βιοποικιλότητα του γένους <i>Hippocampus</i>	7
1.2 Ιστορικά Στοιχεία Εξέλιξης.....	8
1.3 Γεωγραφική εξάπλωση.....	10
1.4 Είδη της Μεσογείου Θάλασσας	11
1.5 Πληθυσμιακές Μελέτες στην Μεσόγειο Θάλασσα.....	12
1.6 <i>Hippocampus hippocampus</i> και <i>Hippocampus guttulatus</i>	14
1.7 Γονίδιο COI.....	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.1 Εξαγωγή DNA.....	22
2.1 Ηλεκτροφόρηση DNA.....	25
2.2 Gradient PCR	26
2.3 Ηλεκτροφόρηση Αποτελεσμάτων PCR.....	27
2.4 Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων	28
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
3.1 Ηλεκτροφόρηση PCR.....	30
3.2 Κατανομή απλότυπων ανά γεωγραφική περιοχή	31
3.3 Φυλογενετικό Δέντρο.....	32
3.4 Στατιστική Ανάλυση	33
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	36
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42
6. ABSTRACT	49

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοποικιλότητα του γένους *Hippocampus*

Η απόκτηση γνώσεων σχετικά με την βιοποικιλότητα των ειδών, την οικολογία και την συμπεριφορά τους, είναι αναγκαία προκειμένου να εξασφαλιστεί η αποτελεσματικότητα της διατήρησης και διαχείρισης των πληθυσμών αυτών (Perry et al. 2005, Lavergne et al. 2010, Dawson et al. 2011). Οι ιππόκαμποι (γένος *Hippocampus*) αποτελούν παραδείγματα θαλάσσιων ειδών, των οποίων τόσο η ασυνήθιστη βιολογία, όσο και η παγκόσμια κατανομή, παρέχουν ένα ενδιαφέρον πλαίσιο για τη μελέτη των εξελικτικών υποθέσεων που σχετίζονται με το θαλάσσιο περιβάλλον.

Ο ιππόκαμπος (< ἵππος + κάμπος) ανήκει στο ομώνυμο γένος των ιχθύων της οικογένειας Syngnathidae. Η κλάση είναι αυτή των ακτινοπερυγίων. Στο παρελθόν έχουν αναφερθεί ποικίλες ατυχείς ταξινομικές κατηγοριοποιήσεις σύμφωνα με τις οποίες τα είδη αυτά ορίζονταν ως αμφίβια ή ακόμα και έντομα! Το όνομα αυτό, αποτελείται από δύο συνθετικά που προέρχονται από την αρχαία ελληνική γλώσσα: το α' συνθετικό είναι η λέξη «ἵππος» και το β' συνθετικό η λέξη «κάμπος», που σημαίνει τέρας. Το όνομα αυτό ουσιαστικά «παρουσιάζει» το συγκεκριμένο θαλάσσιο είδος, αφού το α' συνθετικό δικαιολογείται από την κατανομή του άνω μέρους του σώματός του, που θυμίζει αυτή του αλόγου και το β' συνθετικό «κάμπος», αν και ετυμολογικά προέρχεται από το ρήμα «κάμπω», η επιλογή της λέξης έγινε λόγω ενός μυθολογικού τέρατος. Η οικογένεια στην οποία ανήκουν, περιέχει ακόμα περίπου 55 είδη pipefishes, pipehorses and seadragons (Kuitert 2000).

Οι ιππόκαμποι (*Hippocampus spp.*) χαρακτηρίζονται γενικά από αραιή κατανομή και χαμηλή κινητικότητα. Οι ρυθμοί ανάπτυξής τους είναι σχετικά γρήγοροι, ωριμάζουν σε νεαρές ηλικίες και έχουν σύντομους χρόνους αναπαραγωγής (Foster 2004). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι πληθυσμοί των ιππόκαμπων μπορεί να ανακάμψουν γρήγορα από ενδεχόμενη μείωση του πληθυσμού (Curtis 2006). Ωστόσο, η αδυναμία κολύμβησης τους, το μονογαμικό μοτίβο ζευγαρώματος, οι σχετικά λίγοι απόγονοι, η πιστότητα του συντρόφου και η σύνθετη γονική φροντίδα (Foster 2004) θα μπορούσαν να αυξήσουν την ευαλωτότητά τους.

1.2 Ιστορικά Στοιχεία Εξέλιξης

Τα είδη αυτά, έχουν παγκόσμια κατανομή που κατοικούν τόσο στους εύκρατους όσο και στους τροπικούς παράκτιους οικοτόπους, και μόλις στρατολογηθούν είναι πιστοί στο χώρο (Foster & Vincent 2004). Αν και θεωρούνται αδύναμοι κολυμβητές (Smith 1963), υπάρχουν κάποια στοιχεία για εποχική μετανάστευση (Boisseau 1967, Garrick-Maidment & Jones 2004). Επίσης, η παθητική διασπορά είναι δυνατή (Teske et al. 2005, Woodall et al. 2009). Οι λίγες μελέτες για τη δομή του πληθυσμού των ιππόκαμπων έχουν δείξει ότι η δομή ορίζεται από συγκεκριμένους για τα είδη συνδυασμούς ιστορίας ζωής, οικοτόπου και γεωγραφικής περιοχής (Teske et al., 2003, Lourie et al. 2005, Sanders et al. 2008).

Εξαιτίας της έλλειψης αξιόπιστου αρχείου απολιθωμάτων ιππόκαμπου, έχουν πραγματοποιηθεί επί το πλείστον εικασίες ως προς τον χρόνο και τον τόπο προέλευσης του. Τα παλαιότερα απολιθώματα της οικογένειας της οποίας

ανήκουν, χρονολογούνται από τον Eocene (Hώκαινο) (Lutetian: 52 εκατομμύρια χρόνια πριν) (Patterson 1993). Τα πρώτα απολιθώματα βρέθηκαν στο Ρίμινι της Ιταλίας και χρονολογήθηκαν για περίπου 5 εκατομμύρια χρόνια πριν (Ανώτερο Μειόκαινο). Τα δείγματα αυτά ήταν τα πιο γνωστά και καλύτερα μελετημένα και ανήκαν στο είδος *Hippocampus guttulatus*, αν και η βιβλιογραφία αναφέρεται πιο συχνά σε αυτά με το συνώνυμο του *H. Ramulosus* (Lourie et al. 1999). Ωστόσο, η αρχαιότερη μαρτυρία προέρχεται από την Σλοβενία, όπου απολιθώματα δύο ειδών θεωρήθηκαν από την επιστημονική κοινότητα πρόγονοι των σημερινών ιππόκαμπων, ο *H. sarmaticus* και ο *H. slovenicus*, τα οποία έχουν χρονολογηθεί στα 13.000.000 χρόνια πριν από σήμερα (Μέσο Μειόκαινο) (Zalohar et al. 2009).

Ενδιαφέρον έχει μια έρευνα που έλαβε χώρα το 2003 (Teske et al. 2004), κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν μοριακά δεδομένα για μελέτη της εξελικτικής ιστορίας των ιππόκαμπων. Κατά τη διάρκεια της διερεύνησης, ήταν αποδεκτή η πρόταση ότι οι παγκόσμιες τροπικές θαλάσσιες πανίδες, μπορούν να χωριστούν σε αυτές που σχετίζονται με οικοσύστημα του Ατλαντικού Ωκεανού (συμπεριλαμβανομένης της Καραϊβικής και της Μεσογείου) και σε εκείνες που σχετίζονται με ένα του Ινδο-Ειρηνικού Ωκεανού (Rosen, 1988). Αυτό προέκυψε μετά το κλείσιμο της θαλάσσιας οδού Tethyan, ένα τεκτονικό γεγονός που προέκυψε από τη σύγκλιση των αφρικανικών και ευρασιατικών πλακών κατά το τέλος του Ολιγόκαινου και του Μειόκαινου (Oligocene and Miocene) (Rosen, 1988). Το αποτέλεσμα της, οδήγησε στην πρόταση πως τα είδη *H. hippocampus*, *H. erectus* και *H. zosterae* καθώς και το *H. guttulatus* αντιπροσωπεύουν απογόνους μιας δυτικής Τεθυανικής/ Ατλαντικής/ Καραϊβικής προέλευσης.

Το παραπάνω γεγονός βρίσκει σύμφωνη και μια άλλη έρευνα η οποία ήταν βασισμένη σε αλληλουχίες του κυτοχρώματος b, κατά την οποία ο Casey (1999) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το γένος *Hippocampus* πιθανότατα εξελίχθηκε σε οικοσύστημα του Ατλαντικού Ωκεανού. Η προέλευση αυτή, υποστηρίζεται επίσης από το γεγονός ότι τα περισσότερα είδη του στενά συγγενικού γένους *Syngnathus* σχετίζονται με τον Ατλαντικό Ωκεανό (Kuitert 2000), καθώς και από το ότι όπως προαναφέρθηκε, μέχρι σήμερα τα μόνα γνωστά απολιθώματα ιππόκαμπων έχουν βρεθεί στην Ιταλία. Αξιοσημείωτο είναι να αναφερθεί το γεγονός ότι η πλειονότητα των ειδών ιππόκαμπων, περίπου 27, βρίσκεται στην περιοχή του Ινδοδυτικού Ειρηνικού (Lourie et al., 1999).

1.3 Γεωγραφική εξάπλωση

Οι ιππόκαμποι βρίσκονται σε όλες τις τροπικές και εύκρατες περιοχές τόσο του Ατλαντικού όσο και του Ινδο-Ειρηνικού και πολλά είδη ιππόκαμπων έχουν μεγάλο γεωγραφικό εύρος (Lourie et al. 1999). Προτιμούν ρηχά νερά και προστατευμένες περιοχές όπως θαλάσσια λιβάδια, κοραλλιογενείς υφάλους ή ριζοφόρους. Επίσης, σημαντική είναι η τάση να επιλέγει σύνθετα παράκτια ενδιαιτήματα, με υψηλή πυκνότητα θαλάσσιας βλάστησης και εκτεταμένη φυτοκάλυψη, ώστε να μπορούν να συγκρατηθούν με την ουρά τους από διάφορα φυτά. Η εξάρτηση αυτή από ρηχά και προστατευμένα περιβάλλοντα, τα οποία είναι φυσικά απομονωμένα μεταξύ τους περιορίζει δυνητικά τη διασπορά τους σε ακατάλληλα ενδιαιτήματα.

Η αινιγματική φύση του γένους *Hippocampus* έχει οδηγήσει σε σημαντική σύγχυση σχετικά με την ταξινόμηση και την οικολογία τους. Η ταξινόμηση των

ειδών και η οριοθέτηση των σχετικών γεωγραφικών περιοχών τους είναι θεμελιώδους σημασίας στις οικολογικές μελέτες, αλλά παραμένει ένας τομέας συνεχούς συζήτησης (Scales H. 2010). Στο παρελθόν υπήρχε μεγάλη σύγχυση, η οποία προήλθε από τη δημιουργία πολλαπλών συνωνύμων με έως και 120 είδη να περιγράφονται στη βιβλιογραφία (Whitley & Allan 1958). Το 2004 συνέβη μια σημαντική αναθεώρηση του γένους με τη δημοσίευση η οποία αναγνώρισε 33 είδη (Lourie et al. 2004). Έκτοτε, αρκετά περισσότερα είδη έχουν ανακαλυφθεί και ονομαστεί στη βιβλιογραφία, με αποτέλεσμα να έχουν αναγνωριστεί 46 είδη μέχρι σήμερα (Kuiter 2003, Lourie & Kuiter 2008, Gomon & Kuiter 2009).

Παρόλα αυτά, στο Fishbase σήμερα περιγράφονται 62 είδη (Fishbase, 2022). Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως στην Κόκκινη Λίστα Απειλούμενων Ειδών της Διεθνούς Ένωσης Προστασίας της Φύσης / IUCN (IUCN Red List of Threatened Species) υπάρχουν μόλις 42 είδη, εκ των οποίων τα 2 είναι απειλούμενα είδη προς εξαφάνιση (*H. capensis* και *H. Whitei*) και 4 βρίσκονται κοντά σε απειλή (*H. hippocampus*, *H. guttulatus*, *H. reidi* και *H. zosterae*).

1.4 Είδη της Μεσογείου Θάλασσας

Στην Μεσόγειο απαντώνται τρία είδη ιππόκαμπων: ο *H. hippocampus* (ιππόκαμπος ο βραχύρυνγος), ο *H. guttulatus* (ιππόκαμπος ο στικτός) και ο *H. fuscus*, ο οποίος έχει μεταναστεύσει από την Ερυθρά Θάλασσα. Η πιο πρόσφατη και ολοκληρωμένη ταξινομική ανασκόπηση προτείνει ότι υπάρχουν δύο αυτόχθονα είδη ιππόκαμπου στα ευρωπαϊκά ύδατα, ο *H. guttulatus* και ο *H. hippocampus* (Lourie et al. 2016), αλλά η σημαντική ενδοειδική

παραλλακτικότητα στη μορφολογία σε αυτό το γένος (Lourie et al. 1999b, Otero-Ferrer et al. 2017) έχει οδηγήσει σε μεγάλη σύγχυση σχετικά με την ταξινόμιά τους. Ως αποτέλεσμα, η ταξινόμηση και η ονοματολογία αυτών των ειδών δεν είναι σταθερή. Τα γενετικά δεδομένα είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την αποσαφήνιση της ταξινόμησης και τη συμπλήρωση μορφολογικών δεδομένων (Padial et al. 2010).

Όσον αφορά τα ελληνικά ύδατα, μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί τα δύο πρώτα είδη. Πιο ειδικά, ο *H. hippocampus* σύμφωνα με την παγκόσμια βάση δεδομένων της FishBase (<http://www.fishbase.org>), συναντάται στη Θεσσαλονίκη, στον Θερμαϊκό Κόλπο, στον Μαραθώνα και στην Κω (FishBase 2022). Ο *H. guttulatus*, σύμφωνα πάλι με τη FishBase, συναντάται στη Θεσσαλονίκη, στον Ευβοϊκό Κόλπο, στην Κω και στον Στρυμωνικό Κόλπο (FishBase 2022).

1.5 Πληθυσμιακές Μελέτες στην Μεσόγειο Θάλασσα

Γενετικά δεδομένα από 478 δείγματα τα οποία προέρχονταν από 18 διαφορετικές τοποθεσίες σε 10 χώρες συνολικά, αποκάλυψαν την παρουσία πέντε ειδών ιππόκαμπου στα ύδατα του βορειοανατολικού Ατλαντικού, της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας: *H. algiricus*, *H. erectus*, *H. fuscus*, *H. hippocampus* και *H. guttulatus* (Woodall et al. 2017). Ένα δείγμα από τις Αζόρες αναγνωρίστηκε ως *H. erectus* χρησιμοποιώντας γενετικές τεχνικές και η επακόλουθη μορφολογική εξέταση επιβεβαίωσε ότι αυτή ήταν η πρώτη παρατηρούμενη εμφάνιση αυτού του είδους στον ανατολικό Ατλαντικό Ωκεανό (Woodall et al. 2009). Ένα άλλο είδος, το *H. fuscus*, αποτελεί παράδειγμα

λεσεπιανής μετανάστευσης και αναγνωρίστηκε από δείγματα που προέρχονταν από τη βόρεια Αίγυπτο. Το είδος αυτό, είχε προηγουμένως καταγραφεί στη νοτιοανατολική Μεσόγειο Θάλασσα (Golani & Fine 2002, Gokoglu et al. 2004) και σωζόμενοι πληθυσμοί έχουν παρατηρηθεί βόρεια μέχρι την Τουρκία (Gokoglu et al. 2004). Με διαφορά, τα δύο πιο συχνά παρατηρούμενα είδη είναι το *H. guttulatus* και το *H. hippocampus*, τα οποία είναι αυτόχθονα ευρωπαϊκά είδη (Lourie et al. 2016). Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως το *H. guttullatus* βρέθηκε σε υψηλότερες πυκνότητες σε ψυχρότερα νερά και πως σε ενδιαιτήματα που συμβίωσε με το είδος *H. hippocampus*, το πρώτο έτεινε να έχει πληθυσμούς μεγαλύτερης πυκνότητας από το δεύτερο.

Σε μια έρευνα η οποία πραγματοποίησε μια φυλογενετική μελέτη χρησιμοποιώντας το κυτόχρωμα b του μιτοχονδριακού DNA (Casey et al. 2004), έλαβε 93 δείγματα τα οποία μοιράζονταν σε 22 είδη. Τα δείγματα αυτά λήφθηκαν από τον Ατλαντικό και τον Ινδο-Ειρηνικό Ωκεανό. Από τα δείγματα της Μεσογείου, η γενετική ανάλυση έδειξε πως αυτά κατατάσσονταν στα είδη του *H. hippocampus* και στο *H. gullatus*.

Αξίζει να αναφερθεί η πρώτη γενετική μελέτη του είδους *H. hippocampus* (Woodall, Koldewey & Shaw 2011) η οποία εξέτασε το είδος *H. hippocampus* ως προς την ιστορική του εξέλιξη και την μοριακή δομή του. Για την διεξαγωγή της, συλλέχθηκαν 255 δείγματα από 21 τοποθεσίες οι οποίες κάλυψαν όλο το γεωγραφικό εύρος του είδους. Στις τοποθεσίες αυτές συμπεριλαμβάνονταν η Μεσόγειος Θάλασσα η οποία χωρίστηκε σε δυτική και ανατολική. Ως δείκτες χρησιμοποιήθηκαν δύο του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA): περιοχή ελέγχου και κυτόχρωμα b. Η μελέτη των απλότυπων οδήγησε στο συμπέρασμα πως υπήρξε επέκταση ύστερα από ένα συμβάν bottleneck. Οι μετρήσεις των F_{ST} και

η AMOVA αποκάλυψαν γενετική διαφοροποίηση, η οποία τελικά οδήγησε στην υποδιαίρεση του πληθυσμού σε τρεις γεωγραφικές περιοχές: πορθμός Μάγχης και Βισκαϊκός κόλπος, Μεσόγειος Θάλασσα, Ιβηρική Χερσόνησος και νήσοι Μακάρων, και Δυτική Αφρική. Σημαντική ήταν η διαφοροποίηση του πληθυσμού της Δυτικής Αφρικής από τον ευρωπαϊκό πληθυσμό. Σε μικρότερο βαθμό, ο πληθυσμός στη Μάγχη και τον Βισκαϊκό Κόλπο διαφοροποιήθηκε από άλλες ευρωπαϊκές περιοχές, συμπεριλαμβανομένου και της Μεσογείου Θάλασσας. Απουσία σημαντικής γενετικής διαφοροποίησης παρατηρήθηκε σε μεγάλες περιοχές όπως και στην Ανατολική Μεσόγειο Θάλασσα.

1.6 *Hippocampus hippocampus* και *Hippocampus guttulatus*

Και τα δύο είδη έχουν μεγάλο γεωγραφικό εύρος. Έτσι λοιπόν, εκτείνονται στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης και της Βόρειας Αφρικής, συμπεριλαμβανομένου του Ατλαντικού Ωκεανού, της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας (Lourie et al. 1999b, Otero-Ferrer et al. 2017).

Το εύρος του είδους *H. hippocampus* εκτείνεται σε μια περιοχή που υπόκειται σε ιστορικές και σύγχρονες διαδικασίες που ενδέχεται να επηρεάσουν τη σημερινή γενετική δομή. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας παγετωνικής περιόδου, οι βορειοανατολικές ακτές του Ατλαντικού Ωκεανού της Ευρώπης μέχρι τη βορειοδυτική Αφρική παρουσίασαν χαμηλότερες θερμοκρασίες στη θάλασσα, ενώ οι Αζόρες και η νότια Μεσόγειος Θάλασσα επηρεάστηκαν λιγότερο (Hewitt 2000), συνθήκες που μπορεί να έχουν διαταράξει την κατανομή των ειδών σε ολόκληρη την περιοχή. Τα σύγχρονα

ωκεανογραφικά χαρακτηριστικά όπως τα ωκεάνια ρεύματα, μπορούν επίσης να διαταράξουν την πληθυσμιακή δομή σε ένα είδος τόσο χαμηλής κινητικότητας.

Γενικότερα, βρίσκεται στον βορειοανατολικό Ατλαντικό, από τη βορειοδυτική Σκωτία και το νότιο τμήμα της Ολλανδίας έως τη Σενεγάλη και την Μεσόγειο Θάλασσα, καθώς και στα παράκτια νερά των Αζορών, της Μαδέρας και των Καναρίων Νήσων. Στη Βρετανία και στην Ιρλανδία η γεωγραφική τους κατανομή επηρεάζεται από τα θερμά νερά του ρεύματος του Κόλπου, τα οποία δημιουργούν συνθήκες κατάλληλες για υψηλή παραγωγή πλαγκτόν και αυτό σημαίνει ότι τόσο αυτό το είδος όσο και το *H. guttulatus* βρίσκονται κυρίως στις νότιες και δυτικές ακτές αλλά υπάρχουν μικροί πληθυσμοί και των δύο στη Βόρεια Θάλασσα.

Το είδος *H. guttulatus* απαντάται στον βορειοανατολικό Ατλαντικό Ωκεανό από τις ακτές της Βόρειας Αφρικής έως τις ακτές των νήσων Σέτλαντ, στη Βόρεια Θάλασσα και στο Ηνωμένο Βασίλειο, τη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα. Αξίζει να αναφερθεί πως τις υψηλότερες αφθονίες του, τις παρουσιάζει σε λιμνοθάλασσες (Gristina et al. 2014).

Όπως προαναφέρθηκε, οι ιπόκαμποι κατοικούν σε ρηχές παράκτιες περιοχές όπου οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες είναι συχνές. Ως απόρροια, απειλείται η ακεραιότητα των ειδών. Η μείωση των πληθυσμών τους παγκοσμίως έχει προσελκύσει την προσοχή της διεθνούς κοινότητας, με αποτέλεσμα της συμπερίληψή τους στην Κόκκινη Λίστα Απειλούμενων Ειδών της Διεθνούς Ένωσης Προστασίας της Φύσης / IUCN (Vincent & Hall 1996, World Conservation Union 2022) καθώς και στην Σύμβαση για το Διεθνές Εμπόριο των Απειλούμενων με Εξαφάνιση ειδών της άγριας πανίδας και

χλωρίδας (CITES 2022). Μάλιστα, τα δύο ευρωπαϊκά είδη *H. hippocampus* και *H. guttulatus* περιλαμβάνονται επίσης στο OSPAR, στη Σύμβαση της Βέρνης (Σύμβαση για τη διατήρηση της ευρωπαϊκής άγριας ζωής και του φυσικού περιβάλλοντος) και στη Σύμβαση της Βαρκελώνης (Σύμβαση για την προστασία της Μεσογείου Θάλασσας).

1.7 Γονίδιο COI

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια τα οποία συμβάλουν στη κυτταρική αναπνοή και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα όλων των αερόβιων ευκαρυωτικών κυττάρων. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) σχετίστηκε με τις πρώτες μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας σε επίπεδο DNA. Πρόκειται για ένα σχετικά μικρό, δίκλωνο, κυκλικό, υπερελικώμενο μόριο - με εξαίρεση το mtDNA μερικών κατώτερων οργανισμών - το οποίο περιέχει 16 έως 20 χιλιάδες ζεύγη βάσεων (Brown 1983, Moritz et al. 1987) που περιέχεται σε πολλαπλά αντίγραφα στα μιτοχόνδρια (Addison-Wesley Longman Ltd, 1978) και μπορεί να απομονωθεί ευκολότερα από το πυρηνικό DNA. Το mtDNA είναι απλοειδές και στα ζωικά κύτταρα κληρονομείται από το θηλυκό που σημαίνει ότι οι απόγονοι κληρονομούν έναν mtDNA γενότυπο. Σημαντική είναι η χρήση του για την δημιουργία φυλογενετικών δέντρων καθ' ότι δεν λαμβάνει χώρα ανασυνδυασμός κατά την αντιγραφή του, σε αντίθεση με το πυρηνικό DNA. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι στο mtDNA συσσωρεύονται πολυμορφισμοί με ταχύτερο ρυθμό από ότι στο πυρηνικό DNA. Αυτό συμβαίνει καθότι στο μιτοχονδριακό DNA υπάρχουν υψηλότεροι ρυθμοί μετάλλαξης σε σχέση με το πυρηνικό DNA, εξ' αιτίας της απουσίας διορθωτικών μηχανισμών κατά την

αντιγραφή του DNA, καθώς και λόγω του μικρότερου δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους (Liu & Cordes 2004).

Ο βασικός ρόλος του γενετικού υλικού των μιτοχονδρίων, ο οποίος παρέμεινε σταθερός σε όλους τους οργανισμούς, ήταν να κωδικοποιεί ένα περιορισμένο αριθμό RNA και πρωτεϊνών, υποστηρίζοντας τον σχηματισμό ενός λειτουργικού μιτοχονδρίου. Όμως το γονιδιακό περιεχόμενο των μιτοχονδρίων και η διάταξη των γονιδίων πάνω στο μόριο δεν παρέμειναν σταθερά. Μάλιστα, αποτελούν χαρακτηριστικά που εμφανίζουν σημαντική ετερογένεια μεταξύ των οργανισμών. Συνάγεται έτσι το συμπέρασμα πως το γονιδίωμα των μιτοχονδρίων (mtDNA) ενός οργανισμού δύναται να χρησιμοποιηθεί για την ταξινομική και εξελικτική μελέτη των διαφόρων οργανισμών. Το mtDNA λοιπόν, αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την μελέτη των γενετικών σχέσεων μεταξύ πληθυσμών και ατόμων εξαιτίας της εύκολης απομόνωσης του, της έλλειψης ανασυνδυασμού, του μεγάλου αριθμού αντιγράφων του καθώς και της συντήρησης της αλληλουχίας του και τους διαφορετικούς ρυθμούς εξέλιξης των διαφορετικών τμημάτων του μορίου. Για την φυλογενετική ανάλυση συχνά μελετώνται τα γονίδια που κωδικοποιούν τις τρεις υπομονάδες (COI,COII,COIII) της κυτοχρωμικής c οξειδάσης.

Σε ένα τυπικό μόριο ζωικού mtDNA, τα γονίδια που υπάρχουν χωρίζονται σε: 13 που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 2 που κωδικοποιούν ριβοσωμικό RNA, 22 γονίδια που κωδικοποιούν tRNA και την περιοχή ελέγχου (D-loop) που είναι μια μη κωδική περιοχή που ελέγχει την αντιγραφή του DNA και τη μεταγραφή του RNA (Avise et al 1987). Τα μιτοχονδριακά γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες, καθορίζονται από τις υπομονάδες ενζύμων που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Τα γονίδια αυτά

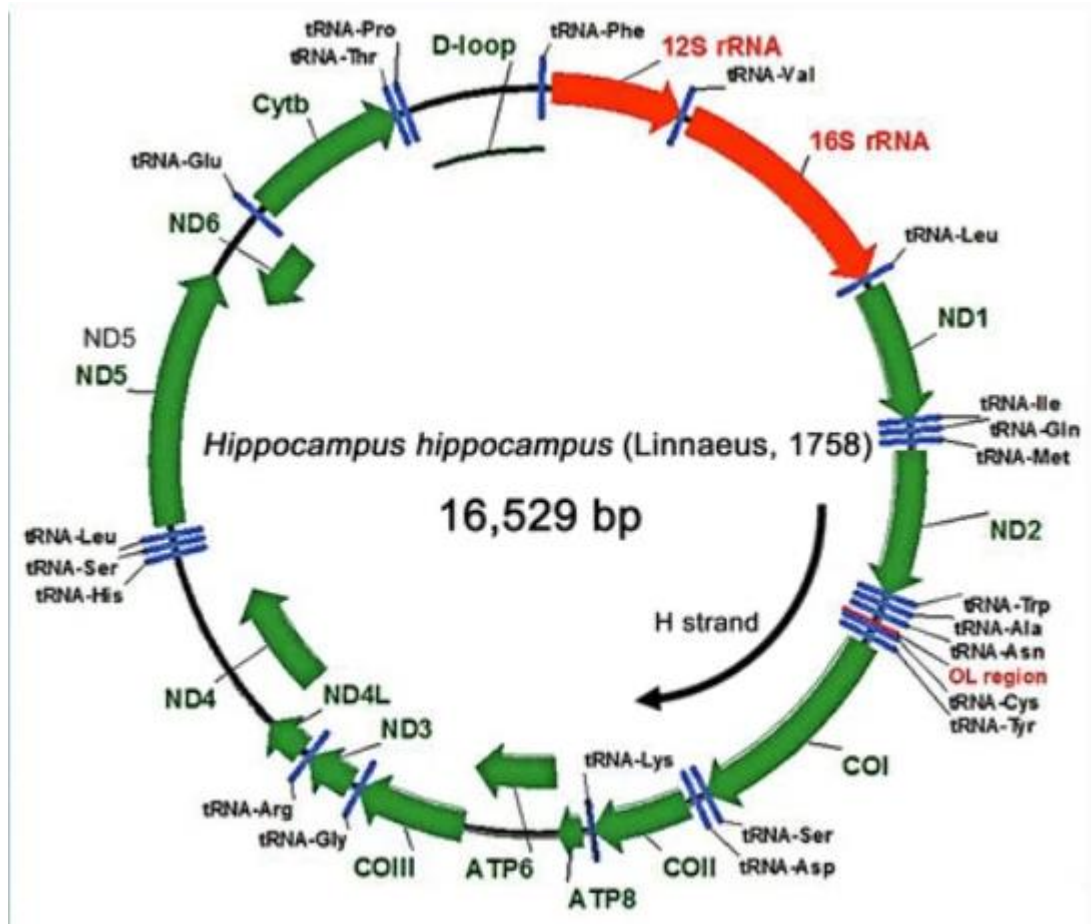
αποτελούνται από: επτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 και 6), μια υπομονάδα του κυτοχρώματος b, τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO I, II, III) και δύο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPase 6 και 8) (Moritz et al. 1987).

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

Το γονίδιο του κυτοχρώματος b (cyt b) είναι ένα από τα πιο σημαντικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες από το mtDNA και έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες μοριακής εξέλιξης και ταξινόμησης των ειδών (Farias et al. 2001, Sakai et al. 2003). Οι αλληλουχίες του μιτοχονδριακού cyt b έχουν αποδειχθεί ότι περιέχουν φυλογενετικό σήμα σε πολλά διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα σε πολυάριθμα είδη, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών (Martin et al. 1992, Cantatore et al. 1994). Σημαντική είναι επίσης η ευρεία χρήση τους ως «μοριακό ρολόι» για την εκτίμηση της χρονολογίας της ειδογένεσης σε πολλά taxa (Irwin et al. 1991, Smith et al. 1993). Οι υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορες φυλογενετικές μελέτες, καθώς αυτές οι περιοχές επαναλαμβάνονται σε σειρά πολυάριθμων αντιγράφων και οι εξελικτικές δυνάμεις δρουν σημαντικά πάνω τους (Douady et al. 2003).

Πλεονεκτήματα της χρήσης του γονιδίου COI:

- I. Ο αριθμός των αντιγράφων του mtDNA στα κύτταρα υπερβαίνει κατά πολύ τον αντίστοιχο του πυρηνικού DNA.
- II. Το mtDNA είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένο σε σύγκριση με το πυρηνικό (Hagelberg 1994).
- III. Είναι γνωστό πως το mtDNA είναι απλοειδές και κατά συνέπεια δεν ανασυνδυάζεται. Επομένως, οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται είναι καθαρά αποτέλεσμα μεταλλαγών και όχι ανασυνδυασμών (Hagelberg 1994, Birky 2001).
- IV. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το mtDNA κληρονομείται μητρικά. Άρα, υπάρχει μόνο ένας τύπος mtDNA σε κάθε άτομο. Έτσι, το μιτοχονδριακό DNA κάθε ατόμου (εξαιρέση πιθανές μεταλλαγές) είναι πανομοιότυπο με το αντίστοιχο της μητέρας του.
- V. Το mtDNA χαρακτηρίζεται από γρήγορους εξελικτικούς ρυθμούς. Μάλιστα, φαίνεται να εξελίσσεται από 5 έως και 10 φορές ταχύτερα από το πυρηνικό DNA (Wilson et al. 1985, Meyer 1993).
- VI. Η γενετική του δομή θα λέγαμε ότι είναι απλή. Επιπροσθέτως, η επεξεργασία του σε εργαστήρια θεωρείται σχετικά εύκολη. Σε αυτό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο το μικρό μέγεθος του mtDNA, το οποίο σε συνδυασμό με τη συντηρημένη οργάνωση των γονιδίων του υποδηλώνει ότι πολλά ζευγάρια γενικευμένων εκκινήτων (universal primers) δύνανται να πολλαπλασιάσουν περιοχές του mtDNA σε ένα μεγάλο εύρος σπονδυλωτών και ασπονδύλων.
- VII. Η περιοχή της αλληλούχησης του COI είναι απλή χωρίς να δημιουργούνται κενά.



Εικόνα 2.2. Δομή του μιτοχondριακού γονιδίου του *Hippocampus hippocampus*.

Σκοπός της προκειμένης εργασίας ήταν να αναλυθεί πληθυσμιακά η γενετική του είδους *H. hippocampus* στη Μεσόγειο Θάλασσα ώστε να επιτευχθεί η κατανόηση των παραγόντων γενετικής διαφοροποίησης. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, στο είδος μας υπάρχει γενετική διαφοροποίηση μεταξύ Ανατολικής και Δυτικής Μεσογείου. Επομένως, αναμένουμε ομοιογένεια στη περίπτωση μας εφόσον τα δείγματα μας προέρχονται αποκλειστικά από την Ανατολική Μεσόγειο.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εξαγωγή DNA

Για το σκοπό της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 6 άτομα. Από τα άτομα αυτά, τα πέντε προέρχονταν από το Ιόνιο Πέλαγος και συγκεκριμένα από τον Αμβρακικό κόλπο, και ένα από την Μυτιλήνη στο Αιγαίο Πέλαγος. Τα δείγματα, αφού μεταφέρθηκαν στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη και παρέμειναν στους -20°C μέχρι τη στιγμή που παραλήφθηκαν για την επεξεργασία τους.

Ως πρώτο βήμα, απαραίτητο ήταν να απομονωθεί το γενετικό υλικό, το οποίο περιλαμβάνει το γενωμικό και το μιτοχονδριακό DNA. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο DNA- Extraction Invitrogen by Thermo Fisher Scientific.

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

- Λαβίδα
- Νυστέρι
- Eppendorf tubes (1,5 ml)
- Πιπέτα 2-20 μl
- Πιπέτα 20-200 μl
- Πιπέτα 100-1000 μl
- Ρύγχη (tips)

Η εξαγωγή του DNA από τα δείγματα ιππόκαμπων, έγινε από τμήμα μυϊκού ιστού το οποίο αφαιρέθηκε από την ουρά τους με την χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας. Από το τμήμα που αφαιρέθηκε, έγινε

προσπάθεια να απομονωθεί αποκλειστικά μυϊκός ιστός χωρίς το κέλυφος, ώστε να επιτευχθεί καλύτερη λύση του κυττάρου. Αφού πάρθηκε το απόβαρο από ένα Eppendorf tube, τοποθετήθηκαν σε 5 από αυτά μυϊκός ιστός από τα αντίστοιχα δείγματα. Έπειτα, ζυγίστηκαν με την χρήση ζυγού ακριβείας. Οι μετρήσεις παραθέτονται παρακάτω:

Δείγμα	Βάρος Δείγματος (gr)	Βάρος Ιστού (gr)
1	15	0,017
2	23	0,012
3	17	0,009
4	17	0,007
5	24	0,013
6	-	-

Το κάθε δείγμα ιστού τοποθετήθηκε μεμονωμένα σε αποστειρωμένο Eppendorf. Έπειτα, προστέθηκε στο καθένα από αυτά 180 μl Digestion Buffer και 20 μl Πρωτεϊνάση K (ProteinaseK). Η δεύτερη δρα ως πρωτεάση και απενεργοποιεί τις ενδογενείς νουκλεάσες (DNAσες). Τα Eppendorf tubes τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 55°C - 65°C για overnight επώαση, έτσι ώστε να διαλυθεί ο ιστός πλήρως και να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες. Μετά το πέρας των 24 ωρών, ξεκίνησε η διαδικασία επεξεργασίας του DNA κατά την οποία:

- I. Αφαιρέθηκαν τα Eppendorf tubes από το υδατόλουτρο, και με την βοήθεια εμβόλου λειοτριβήθηκε ο ιστός.

- II. Τοποθετήθηκαν τα Eppendorf tubes για φυγοκέντριση στις 14.000 στροφές το λεπτό (rpm) για 3 λεπτά.
- III. Μετά το τέλος της φυγοκέντρισης, λήφθηκαν προσεκτικά 200 μl από τις υπερκείμενες φάσεις και τοποθετήθηκαν σε νέα Eppendorfs.
- IV. Προστέθηκαν 20 μl ενζύμου RNase A σε καθένα, και παρέμειναν στον πάγκο για 2 λεπτά.
- V. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 200 μl Lysis Buffer (διάλυμα λύσης) και 200 μl απόλυτης αλκοόλης (100%) EtOH.
- VI. Με την βοήθεια πιπέτας, το κάθε διάλυμα μεταφέρθηκε σε collection tube, και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000 στροφές για 1 λεπτό.
- VII. Σε επόμενο βήμα, προστέθηκαν 500 μl Washing Buffer 1 (Διάλυμα έκπλυσης DNA) και ξανά τοποθετήθηκαν για φυγοκέντριση στις 10.000 στροφές για 1 λεπτό.
- VIII. Αφού απορρίφθηκαν τα collection tubes και αντικαταστάθηκαν με καινούρια, προστέθηκαν 500 μl Washing Buffer 2 και φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 στροφές για 3 λεπτά.
- IX. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε Eppendorfs με καπάκι, συμπληρώθηκαν 50 μl Elution Buffer (διάλυμα εκχύλισης/έκλυσης) και αφέθηκαν στον εργαστηριακό πάγκο για 5 λεπτά.
- X. Ως τελευταίο βήμα, έλαβε χώρα ξανά φυγοκέντριση στις 14.000 στροφές για 3 λεπτά.

2.1 Ηλεκτροφόρηση DNA

Πρώτο βήμα ήταν η παρασκευή της πηκτής αγαρόζης 0,8% σε TBE Buffer. Σε ειδική κωνική φιάλη αναμείχθηκαν 0,48 gr αγαρόζης υπό μορφή σκόνης τα οποία μετρήθηκαν με ζυγό ακριβείας, με 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE (Tris-Borate-EDTA). Έπειτα, το μίγμα μεταφέρθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων, θερμάνθηκε έως ότου φτάσει στο σημείο βρασμού, οι νιφάδες αγαρόζης διαλυθούν πλήρως και ομογενοποιηθούν και γίνει διαυγές. Αφού η θερμοκρασία του διαλύματος μειώθηκε, προστέθηκε μικρή ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium Bromide) $\approx 2,5\mu\text{l}$ (η οποία επιτρέπει τον φθορισμό του DNA όταν αυτό εκτεθεί σε ακτίνες UV) και έγινε ανακίνηση έτσι ώστε να διαλυθεί πλήρως το βρωμιούχο αιθίδιο και τοποθετήθηκε στο εκμαγείο. Αφού απομακρύνθηκε από τον φούρνο, η φιάλη τοποθετήθηκε κάτω από συνεχή ροή νερού βρύσης και αναδεύονταν κυκλικά ώστε να κρυώσει το μίγμα. Στο εκμαγείο περιχύθηκε το μίγμα της αγαρόζης και απομακρύνθηκαν όλες οι φυσαλίδες που δημιουργήθηκαν. Στις ειδικές εγκοπές του πλαισίου τοποθετήθηκε «χτενάκι», το οποίο δημιούργησε τις θέσεις υποδοχής των δειγμάτων «πηγαδάκια». Μέχρι να πήξει η αγαρόζη, χρειάστηκαν περίπου 10-20 λεπτά στο ψυγείο. Αφού έπηξε, βγήκε από το ψυγείο, αφαιρέθηκε το «χτενάκι» προσεκτικά από την πηκτή ώστε να αποφευχθεί η τυχόν διάτρηση του πυθμένα των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων και με αυτό τον τρόπο σχηματίστηκαν τα επιθυμητά «πηγαδάκια».

Εν συνεχεία, η γέλη τοποθετήθηκε μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Με την τεχνική byripping αναμείχθηκαν 5 μl από κάθε δείγμα με 2 μl lading buffer² χρωστική Blue-bromophenol (Invitrogen). Η χρώση είναι απαραίτητη στην διαδικασία της ηλεκτροφόρησης διότι αποτελεί τρόπο σήμανσης του

DNA κατά την διάρκεια της διαδικασίας τρεξίματος μέσα στη γέλη αγαρόζης και επιπλέον προσθέτει μοριακό βάρος στο DNA, εξαναγκάζοντας την καθίζησή του μέσα στο πηγάδι. Στο πρώτο πηγάδι επιλέχθηκε να φορτωθεί συνολική ποσότητα 2 μl, η οποία αποτελούνταν από 1 μl μάρτυρα με κομμάτια DNA μοριακού βάρους 1 Kb και 1 μl χρωστικής Blue-bromophenol. Από τα δείγματα που είχαμε, κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό πηγαδάκι της πηκτής, με τη βοήθεια μιας μικροπιπέτας και συνολικής ποσότητας 7 μl σε κάθε πηγάδι. Κατά την έναρξη της ηλεκτροφόρησης, η συσκευή καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και συνδέθηκε σε παροχή τάσης 104 Volt για περίπου 20-30 λεπτά. Ως τελικό βήμα, το πήκτωμα εξάχθηκε από τη συσκευή και τοποθετήθηκε σε φωτογραφική μηχανή (DNR, MiniBisBio-ImagingSystems) υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) με σκοπό τη λήψη της εικόνας του.

2.2 Gradient PCR

Στην παρούσα εργασία, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο Gradient PCR στο οποίο οι θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ήταν από τους 48°C μέχρι και τους 58°C. Συγκεκριμένα, οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν για να τοποθετηθούν τα δείγματα στις θέσεις PCR ήταν:

- 48°C (θέση 1)
- 49,5°C (θέση 4)
- 53,7°C (θέση 7)
- 57,2°C (θέση 10)
- 58°C (θέση 12)

Για την πραγματοποίηση της PCR, χρησιμοποιήθηκαν μικρά Eppendorf tubes των 200 μl και πιπέτες. Από κάθε διαθέσιμο δείγμα αποσπάστηκε ποσότητα του 1 μl DNA και χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- 5 μl Go Taq Polymerase
- 1,5 μl Primer Forward (Folmer et al. 1994)
- 1,5 μl Primer Reverse
- 11 μl PCR water (ultra-pure)

Σε κάθε tube, προστέθηκε 1μl DNA από κάθε δείγμα καθώς και 19 μl μίγματος των παραπάνω αντιδραστηρίων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας ο οποίος περιείχε μόνο 19μl μίγματος αντιδραστηρίων χωρίς DNA, ώστε να ελεγχθούν τυχόν επιμολύνσεις.

2.3 Ηλεκτροφόρηση Αποτελεσμάτων PCR

Εν συνεχεία υλοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. Τα τελευταία, φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%, το οποίο παρασκευάστηκε από 0,72 gr αγαρόζης που διαλύθηκαν σε 60 ml TBE buffer. Ακολούθησε η διαδικασία ηλεκτροφόρησης, η οποία ακολούθησε την ίδια λογική που περιεγράφηκε παραπάνω και έπειτα φορτώθηκαν τα δείγματα που προέκυψαν από την PCR. Σε κάθε πηγάδι φορτώθηκε συνολικός όγκος 12 μl, εκ των οποίων τα 10 μl ήταν τελικό προϊόν PCR και 2 μl χρωστική Blue-bromophenol. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν 100 KB Ladder.

Στο πήκτωμα αγαρόζης, είναι εξαιρετικά σημαντική η ύπαρξη του μάρτυρα. Αρχικά, ταυτοποιούνται τα μήκη των μπαντών τα οποία σχηματίζουν τα δείγματα της PCR και έπειτα δύναται να προειδοποιήσει για τυχόν

προβλήματα που έχουν προκύψει στο πήκτωμα. Σε περίπτωση λανθασμένης κατασκευής του πηκτώματος, οι μπάντες των δειγμάτων καθώς και του Ladder θα εκτραπούν. Έτσι, θα γίνει εύκολα αντιληπτό το πρόβλημα καθότι ο Ladder έχει προκαθορισμένο σχηματισμό επάνω στο πήκτωμα αγαρόζης.

Σε επόμενο βήμα, η γέλη τοποθετήθηκε στο μάνιο ηλεκτροφόρησης και φορτώθηκαν όλα τα δείγματα και ο μάρτυρας. Αφού έληξε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, σειρά είχε η λήψη της εικόνας του gel. Για τον λόγο αυτό, το gel τοποθετήθηκε σε κατάλληλη φωτογραφική μηχανή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

2.4 Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την επίλυση των φυλογενετικών σχέσεων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 (Tamura, Stecher, and Kumar 2021) για την δημιουργία των φυλογενετικών δέντρων, το Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010) για τον υπολογισμό του δείκτη Tajima's D (Tajima 1989) και του δείκτη γενετικής ποικιλομορφίας F_{ST} . Με το popArt (Leigh & Bryant 2015) σχεδιάστηκαν οι πίτες οι οποίες οπτικοποίησαν την ομαδοποίηση των απλότυπων στις γεωγραφικές περιοχές.

➤ Ανάλυση Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum likelihood, ML)

Το φυλογενετικό δέντρο ουσιαστικά είναι μια αναπαράσταση η οποία συμβολίζει μια εξελικτική διαδικασία. Η πιο προφανής από άποψη στατιστικής, μέθοδος εκτίμησης που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί είναι αυτή της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Έτσι, στην παρούσα έρευνα

χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος, η οποία βασίζεται σε συγκεκριμένα μοντέλα εξέλιξης αλληλουχιών. Η πιθανοφάνεια κάθε φορά υπολογίζεται ως συνάρτηση της τοπολογίας του δέντρου και του μήκους των βραχιόνων του. Το κριτήριο ελαχιστοποίησης εδώ είναι η διαφορά των παρατηρούμενων αντικαταστάσεων από τις αναμενόμενες, με βάση ένα μοντέλο. Η μέθοδος δηλαδή προχωρά μέσω της σταδιακής δημιουργίας ενός δέντρου που να είναι όσο το δυνατόν πιο πιθανό με βάση το αναμενόμενο από το μοντέλο (Kishino and Hasegawa 1989).

➤ Arlequin

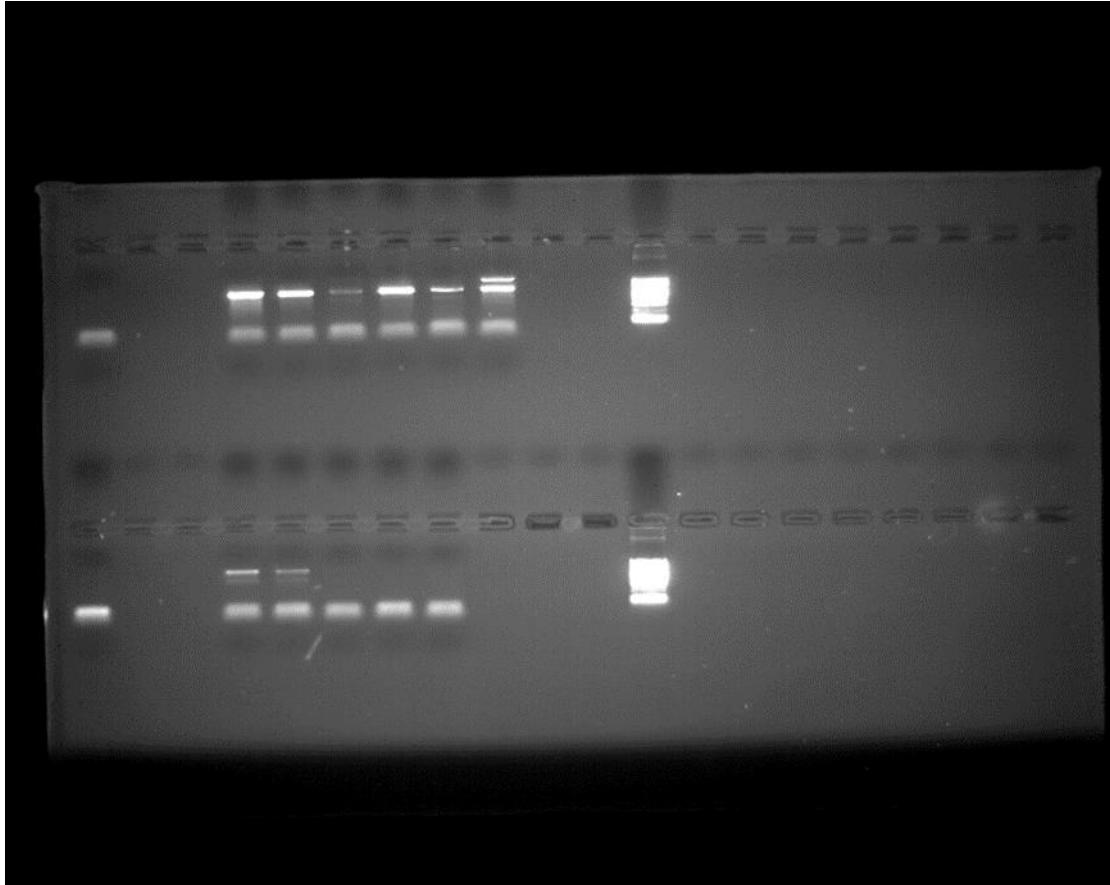
Όσο για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Arlequin v 3.5.2.2 με το οποίο ελέγχθηκαν οι πληθυσμιακές αποκλίσεις του είδους. Με το λογισμικό αυτό εκτιμήθηκαν οι εξής παράμετροι: ο δείκτης Tajima's D και ο δείκτης γενετικής ποικιλομορφίας F_{ST} .

Η τιμή F_{ST} είναι δείκτης γενετικής παραλλακτικότητας και υποδηλώνει το επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης εντός του πληθυσμού, ανά ζεύγη και ορίζεται ως η μείωση στην ετερωζυγωτία σε έναν υποπληθυσμό λόγω μη τυχαίας διασταύρωσης σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό (Gonzalez-Candelas F. & C. Palacios 1995).

Οι αποκλίσεις από την επιλεκτική ουδετερότητα δοκιμάστηκαν με Tajima's D. Ο σκοπός της εκτέλεσης του Tajima's D τεστ είναι να εντοπιστούν αλληλουχίες οι οποίες δεν είναι σύμφωνες με το μοντέλο της ουδέτερης θεωρίας της μοριακής εξέλιξης. Οι ουδέτερες υποθέσεις υπογραμμίζουν τη σημασία της μετάλλαξης, του καθαρισμού της επιλογής και της τυχαίας γενετικής παρέκλισης (Kimura, M. 1983).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

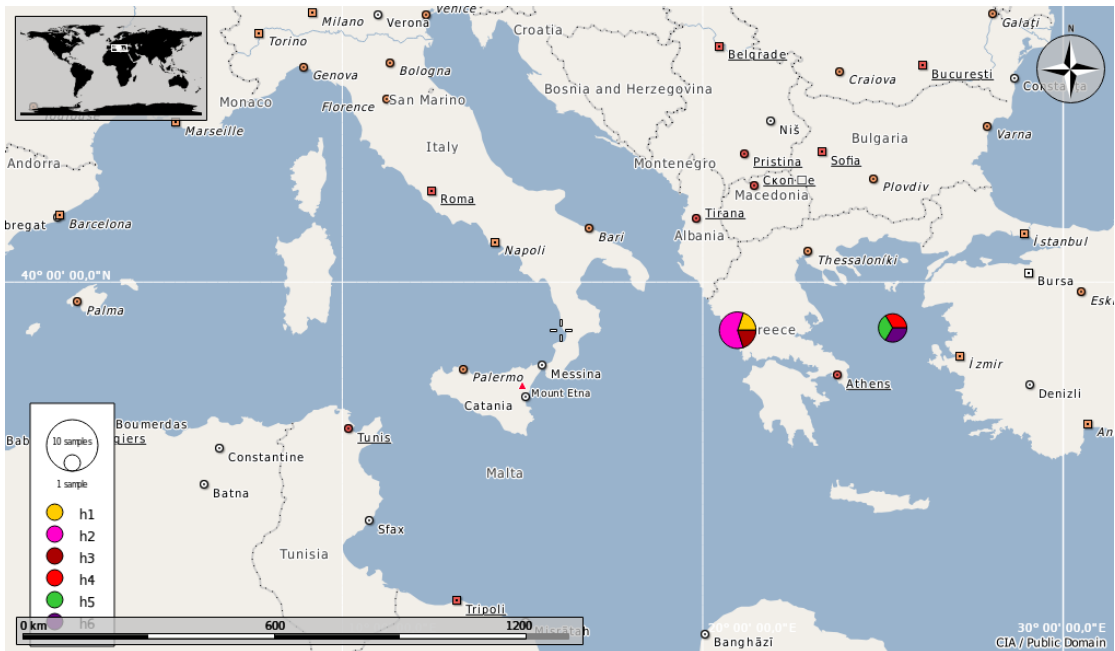
3.1 Ηλεκτροφόρηση PCR



Εικόνα 3.1. Αποτελέσματα PCR.

Στην παραπάνω φωτογραφία διαφαίνονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων της PCR. Στην πρώτη διαδρομή έχει τοποθετηθεί ο μάρτυρας, στις διαδρομές 4-9 τα προϊόντα της PCR από τα δείγματα DNA τα οποία απομονώθηκαν στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια του πειράματος, ενώ στη διαδρομή 12 βρίσκεται ο DNA Ladder με μοριακό μέγεθος 100 KB.

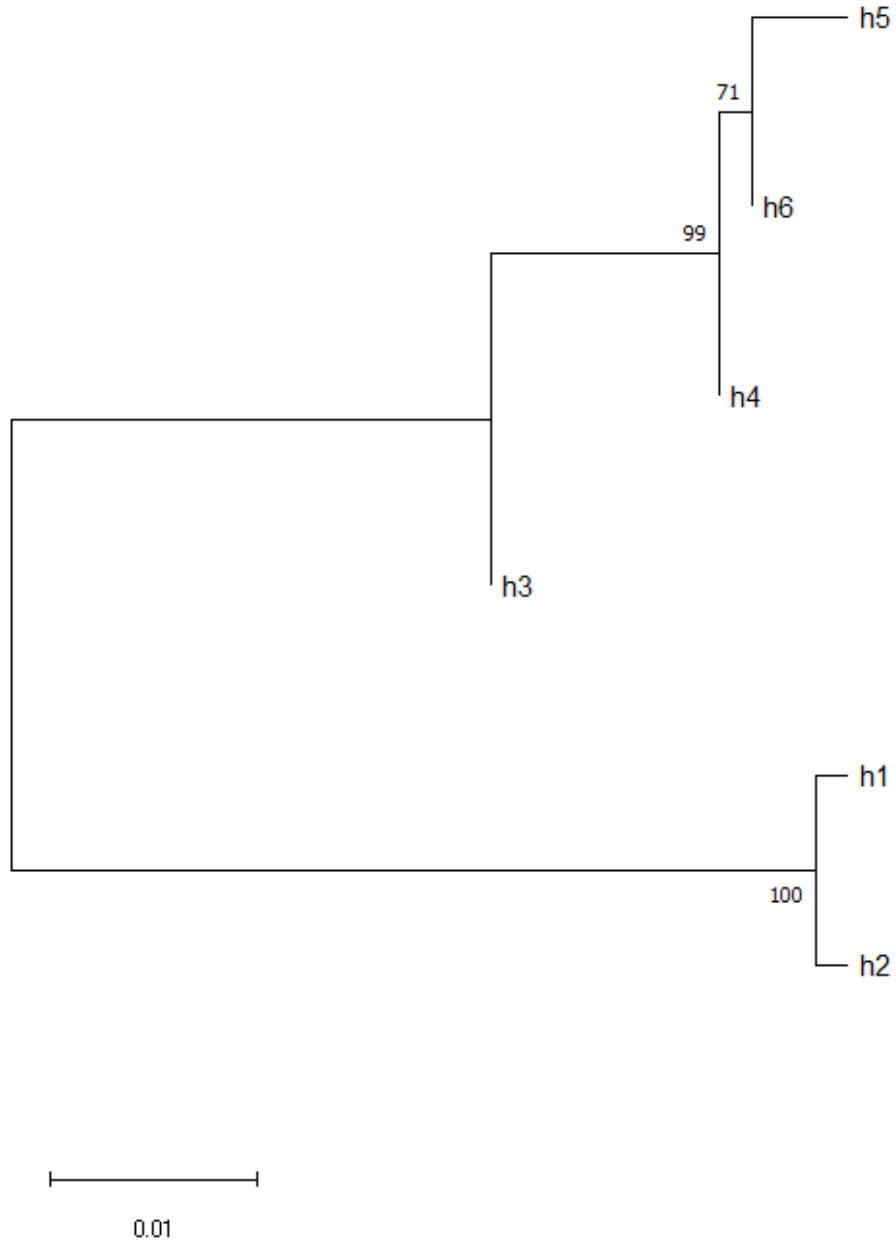
3.2 Κατανομή απλότυπων ανά γεωγραφική περιοχή



Εικόνα 3.2. Διανομή των δειγμάτων *Hippocampus hippocampus* στη Μεσόγειο Θάλασσα.

Με την χρήση του προγράμματος popART σχεδιάστηκαν πίτες, οι οποίες οπτικοποιούν την ομαδοποίηση των απλότυπων στις γεωγραφικές περιοχές από τις οποίες προέρχονται. Πιο συγκεκριμένα, οι απλότυποι h₁, h₂ και h₃ κατάγονται από το Ιόνιο Πέλαγος, ενώ οι h₄, h₅ και h₆ από το Αιγαίο Πέλαγος.

3.3 Φυλογενετικό Δέντρο



Εικόνα 3.3. Φυλογενετικό δέντρο

Τα φυλογενετικά δέντρα αναπαριστούν μια εξελικτική διαδικασία. Χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση φυλογενετικών σχέσεων η οποία προκύπτει από σύγκριση αλληλουχιών. Οι ακμές αποτελούν τις ταξινομικές

βαθμίδες που συγκρίνονται, οι κόμβοι τα χρονικά σημεία ύπαρξης κοινού προγόνου και τα μήκη των βραχιόνων συμβολίζουν τον χρόνο που έχει επέλθει.

Στο συγκεκριμένο δέντρο το οποίο δημιουργήθηκε από τη σύγκριση αλληλουχιών που είχαμε στη κατοχή μας, παρατηρούμε ότι αποτελείται από δύο κλάδους. Επομένως, έχουμε δύο μονοφυλετικές ομάδες, μια που περιέχει τα h₁-h₂ και άλλη μια που περιλαμβάνει τα h₃-h₄-h₅-h₆. Παρατηρούμε επίσης ότι τα h₁-h₂ έχουν κοινό πρόγονο καθώς επίσης και τα υπόλοιπα 4 μεταξύ τους.

3.4 Στατιστική Ανάλυση

ANALYSES AT THE INTRA-POPULATION LEVEL

1. Sample: Ionian

Tajima's test of selective neutrality: Ionian

Tajima, F. 1989a.

Tajima, F., 1996.

<i>Sample size</i>	5
<i>No. of sites with substitutions (S)</i>	40
<i>Mean No. of pairwise differences (Pi)</i>	16.20000
<i>Distance method</i>	Pairwise difference (no Gamma correction, indels not taken into account)
<i>Tajima's D</i>	-1.17500
<i>No. of simulations</i>	1000
<i>Obs. Theta(S)</i>	19.20000
<i>Mean Theta(S)</i>	19.93104
<i>S.D. Theta(S)</i>	12.25230
<i>Mean D</i>	-0.02793
<i>S.D. D</i>	0.87449
<i>P (D simul < D obs)</i>	0.04300

2. Sample: Aegean

Tajima's test of selective neutrality: Aegean

Tajima, F. 1989a.

Tajima, F., 1996.

<i>Sample size</i>	3
<i>No. of sites with substitutions (S)</i>	4
<i>Mean No. of pairwise differences (Pi)</i>	2.66667
<i>Distance method</i>	Pairwise difference (no Gamma correction, indels not taken into account)
<i>Tajima's D</i>	0.00000
<i>No. of simulations</i>	1000
<i>Obs. Theta(S)</i>	2.66667
<i>Mean Theta(S)</i>	2.69400
<i>S.D. Theta(S)</i>	2.33024
<i>Mean D</i>	0.00000
<i>S.D. D</i>	0.00000
<i>P (D simul < D obs)</i>	1.00000

Συγκεντρωτικός πίνακας στατιστικών αναλύσεων

Neutrality tests

	Statistics	Ionian	Aegean	Mean	s.d.
<i>Tajima's D test</i>					
Sample size		5	3	4.00000	1.41421
S		40	4	22.00000	25.45584
Pi		16.20000	2.66667	9.43333	9.56951
Tajima's D		-1.17500	0.00000	-0.58750	0.83085
Tajima's D p-value		0.04300	1.00000	0.52150	0.67670

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά οι στατιστικές αναλύσεις οι οποίες προέκυψαν εκτελώντας το πρόγραμμα Arlequin. Σημαντική είναι η διάκριση και ο σχολιασμός των τιμών του Tajima's D test για τις δύο μελετώμενες περιοχές. Για τα 5 δείγματα του ιονίου, η τιμή η οποία

εξάχθηκε ήταν ίση με -1.175 (p-value = 0.04300), ενώ για του Αιγαίου ίση με 0 (p-value = 1).

Comparisons of pairs of population samples

List of labels for population samples used below:

<i>Label</i>	<i>Population name</i>
1	Ionian
2	Aegean

Population pairwise F_{ST}

<i>Distance method</i>	<i>Pairwise difference</i>	
	1	2
1	0.00000	
2	0.71539	0.00000

F_{ST} P values

Number of permutations: 10100

	1	2
1	*	
2	0.01594+-0.0012	*

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, αντικείμενο της οποίας αποτέλεσε η πληθυσμιακή γενετική του ιππόκαμπου στην ανατολική Μεσόγειο Θάλασσα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του DNA barcoding. Για την επίτευξη του, χρησιμοποιήθηκε μιτοχονδριακό γονίδιο COI (της υπομονάδας I του μιτοχονδριακού γονιδίου οξειδάση του κυτοχρώματος b) από ταξινομικά άγνωστα δείγματα τα οποία λήφθηκαν στον ελλαδικό χώρο και δύο αλληλουχίες γονιδίων από την Παγκόσμια Βάση Δεδομένων NCBI τα οποία προέρχονταν από Τουρκία. Αφού απομονώθηκε γενετικό υλικό από τμήμα μυϊκού ιστού, έλαβε χώρα η ηλεκτροφόρηση του DNA και έπειτα η τεχνική της Gradient PCR στους 48°C για τα δείγματα και στους 48,2°C για τον μάρτυρα. Τα δείγματα μας περιλάμβαναν 5 αλληλουχίες από τον Αμβρακικό κόλπο, και 1 από το Αιγαίο Πέλαγος (Μυτιλήνη). Οπότε συνολικά, είχαμε στην κατοχή μας 5 άτομα από το Ιόνιο Πέλαγος και 3 από το Αιγαίο Πέλαγος.

Αρχικά, από την παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων της PCR (εικ. 3.1) προκύπτει ότι δεν υπάρχουν προβλήματα κατασκευής της αγαρόζης. Ο Ladder φαίνεται να έχει τον αναμενόμενο και σωστό σχηματισμό επάνω το πήκτωμα. Οι μπάντες των δειγμάτων δεν έχουν εκτραπεί και στις διαδρομές τους διαφαίνονται έντονα και καθαρά τα προϊόντα (χωρίς άλλες ζώνες, συνεπώς η αντίδραση έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία και το απομονωμένο DNA ήταν καλής ποιότητας).

Όλες οι αλληλουχίες από το Αιγαίο ήταν διαφορετικές μεταξύ τους. Αντιθέτως, από τη μεριά του Ιονίου είχαμε 2 ίδιες αλληλουχίες οι οποίες ήταν κοινές σε 2 άτομα, ενώ οι υπόλοιπες 3 ήταν διαφορετικές. Επομένως, συνολικά

προέκυψαν 3 απλότυποι από το Αιγαίο Πέλαγος και 3 απλότυποι από το Ιόνιο Πέλαγος.

Από το φυλογενετικό δέντρο (εικ. 3.3) προκύπτει πως τα δείγματα μας διαχωρίζονται γενετικά. Τα ποσοστά bootstrap τα οποία βρίσκονται πάνω από τους κλάδους, εκφράζουν την πιθανότητα μια φυλογενετική εκτίμηση να αντιπροσωπεύει πραγματική φυλογένεση. Επομένως, οι τιμές οι οποίες πλησιάζουν το 100% αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη πιθανότητα σωστής φυλογένεσης, ενώ οι τιμές που είναι μικρότερες από 75% συνδέονται με αδύναμη υποστήριξη του κλάδου. Στην περίπτωση μας, η τοπολογία του δέντρου φαίνεται να είναι πολύ καλή αφού τα ποσοστά βρίσκονται μεταξύ 70 και 100%.

Όπως προαναφέρθηκε, για την εξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με τη δυναμική των πληθυσμών, και πιο συγκεκριμένα για τις αποκλίσεις από την επιλεκτική ουδετερότητα, έλαβε χώρα η εκτίμηση της στατιστικής παραμέτρου Tajima's D. Για τα δείγματα από το Αιγαίο, η τιμή αυτή ισούσαν με 0 ($p\text{-value} = 1 > 0.5$), υποδηλώνοντας απουσία γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών, αλλά ήταν στατιστικώς μη σημαντικό το αποτέλεσμα. Όσον αφορά τα δείγματα από το Ιόνιο Πέλαγος, η τιμή D ήταν ίση με -1.17500 ($p\text{-value} = 0.04300 < 0.05$). Επομένως, το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό και η αρνητική του τιμή μας φανερώνει πως οι πληθυσμοί βρίσκονται σε δημογραφική εξάπλωση μετά από εξελικτική στενωπό (population bottleneck).

Ο βαθμός γενετικής διαφοροποίησης πληθυσμών αναφέρεται στη διαφοροποίηση της γενετικής τους συγκρότησης και εκφράζεται μέσω του

συντελεστή διαφοροποίησης F_{ST} . Η χρήση του αποσκοπεί στην εκτίμηση της αναλογίας της νουκλεοτιδικής ποικιλότητας μεταξύ των πληθυσμών, σε σχέση με τη συνολική. Το εύρος των τιμών που δύναται να λάβει είναι μεταξύ 0 και 1. Τιμές F_{ST} έως 0.05 υποδεικνύουν αμελητέα γενετική διαφοροποίηση. Αν ξεπερνά το 0,15 θεωρείται σημαντική για την διαφοροποίηση των πληθυσμών (Frankham et al. 2002), καθώς και τιμές μεγαλύτερες από 0.25 υποδηλώνουν πολύ σημαντική διαφοροποίηση στη γενετική συγκρότηση των πληθυσμών (Dorak 2014). Στη δική μας περίπτωση, ο συντελεστής αυτός ήταν ίσος με 0.71539 με την τιμή p-value να είναι ίση με 0.01594+-0.0012 ($p < 0.05$). Επομένως υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση στις συχνότητες των αλληλόμορφων μεταξύ των πληθυσμών και υπάρχει μεγάλος βαθμός ανομοιότητας μεταξύ των ατόμων εντός των πληθυσμών. Μάλιστα, οι συχνότητες των αλληλόμορφων σύμφωνα με τον δείκτη, είναι διαφορετικές σε ποσοστό 72%.

Αξίζει να αναφερθεί ότι παρόμοια σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ διαφόρων γεωγραφικών περιοχών έχει επίσης καταγραφεί και για άλλα είδη *ιππόκαμπων*. Συγκεκριμένα, για το είδος *H. guttulatus* στην Ευρώπη (Woodall, 2009), το είδος *H. capensis* στη Νότια Αφρική (Teske et al. 2003) και το είδος *H. ingens* στον Ανατολικό Ειρηνικό Ωκεανό (Saarman et al. 2010).

Η Μοριακή Γενετική έχει επανειλημμένα αποδειχθεί ότι είναι ένα ανεκτίμητο εργαλείο για τη μελέτη και τελικά την προστασία σπάνιων ή/και απειλούμενων ειδών (Piggott & Taylor 2003). Η παρούσα εργασία, εντόπισε σημαντική γενετική διαφοροποίηση εντός της ανατολικής Μεσογείου, και συγκεκριμένα μεταξύ των πληθυσμών του Αιγαίου και του Ιονίου Πελάγους

όσον αφορά το είδος *H. hippocampus* και το γονίδιο COI. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να έχει ποικίλες εξηγήσεις.

Τόσο τα ιστορικά δημογραφικά γεγονότα, όσο και οι σύγχρονες διαδικασίες γονιδιακής ροής έχουν επηρεάσει τα σημερινά πρότυπα γενετικής ποικιλότητας καθώς και τη φυλογεωγραφία του είδους *H. hippocampus* (Woodall et al. 2011).

Όπως προαναφέρθηκε, τα είδη του ιππόκαμπου χαρακτηρίζονται από αραιή κατανομή και θεωρούνται αδύναμοι κολυμβητές. Ως εκ τούτου, δεν πραγματοποιούν ταξίδια και παραμένουν πιστοί στον χώρο τους. Επομένως, θα μπορούσε να δικαιολογηθεί αυτή η γενετική διαφοροποίηση που εμφανίζει στις ξεχωριστές τοποθεσίες της Μεσογείου Θάλασσας, εξαιτίας της μικρής πιθανότητας διασταύρωσης διαφορετικών πληθυσμών. Εδώ αξίζει να σημειωθεί το μονογαμικό μοτίβο ζευγαρώματος που εμφανίζει καθώς και το ότι αρκούνται στη δημιουργία τοπικών πληθυσμών. Έτσι, ενισχύεται η υποστήριξη της διαφοροποίησης αυτής.

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, η πληθυσμιακή γενετική μελέτη έγινε με βάση το μιτοχονδριακό DNA και συγκεκριμένα με το γονίδιο COI. Το γεγονός της ύπαρξης διαφοροποίησης όσον αφορά το συγκεκριμένο γονίδιο, θα μπορούσε να αποδοθεί στα διαφορετικά ωκεανογραφικά χαρακτηριστικά που επικρατούν στις δύο διαφορετικές τοποθεσίες. Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια τα οποία συμβάλουν στη κυτταρική αναπνοή. Άρα, είναι πολύ πιθανόν να απαιτείται η παραγωγή διαφορετικής τριφωσφορικής αδενοσίνης για τα δύο ξεχωριστά αυτά περιβάλλοντα.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, είναι κατανοητό πως οι δύο αυτές γεωγραφικές περιοχές θα πρέπει να θεωρούνται σημαντικές μονάδες διατήρησης του συγκεκριμένου είδους. Τα δεδομένα που καταφέραμε να συλλέξουμε θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη αποτελεσματικών πολιτικών διαχείρισης που μπορεί εν συνεχεία να αποδειχθούν κρίσιμες για τη διασφάλιση της επιβίωσης του είδους.

Οι μεγάλοι αριθμοί ιππόκαμπων που δεν επιβιώνουν, δεν μπορούν εύκολα να αντικατασταθούν από νέες γεννήσεις. Έτσι, ο πληθυσμός τους συνεχώς ελαττώνεται. Η δειγματοληψία τους καθίσταται δύσκολη, καθώς μέχρι τώρα σε όλες τις ήδη υπάρχουσες μελέτες όπως και στη δική μας το μέγεθος του δείγματος ήταν μικρό. Συνεπώς, τα ευρήματα για τον υποπληθυσμό της Μεσογείου θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή, όχι μόνο λόγω του περιορισμένου μεγέθους δείγματος αλλά και εξαιτίας των έντονων διαφορών στα ωκεανογραφικά χαρακτηριστικά και την οικολογία τους.

Με βάση όλα τα προαναφερθέντα στοιχεία, η μελέτη των ιππόκαμπων είναι απαιτητική, καθώς αποτελούν ένα από τα πλέον σπάνια είδη. Η διαδικασία αυτή γίνεται ακόμη πιο σύνθετη εξαιτίας της μεγάλης γεωγραφική εξάπλωσης του είδους και των υψηλών ποσοστών θνησιμότητας που το χαρακτηρίζουν. Αυτή τη δυσκολία έρχεται να αντικρούσει και να αντιμετωπίσει η επιστήμη της γενετικής η οποία έχει εξελιχθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια και έχει δώσει την δυνατότητα στον άνθρωπο να μελετήσει κάθε οργανισμό. Συγκεκριμένα, η διεξαγωγή πληθυσμιακών γενετικών μελετών δύναται να αποτελέσει τον θεμελιώδη λίθο εφαρμογής επιτυχημένων στρατηγικών διαχείρισης. Αυτές οι μελέτες παρέχουν τις κατάλληλες απαντήσεις που καταδεικνύουν την εφαρμογή και το μέγεθος της γενετικής ποικιλότητας στους ιχθυοπληθυσμούς

που επιλέγονται προς εξέταση. Μέσα από αυτές παρουσιάζονται οι ενέργειες που πρέπει να εφαρμοστούν και τα απαραίτητα μέτρα που κρίνεται αναγκαίο να ληφθούν.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Avise J. C., Arnold J., Ball R. M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J. E., Reeb C. A. and Saunders N. C. 1987: Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol. 18, pp 489-522
- Birky C. W. 2001: The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models, *Annual Review of Genetics* 35: 125-148.
- Boisseau, J. (1967). Les r'egulations hormonales de l'incubation chez un vert'ebre male: recherches sur la reproduction de l'hippocampe. PhD Thesis, L'Universit'e de Bordeaux, France.
- Brown W. M. 1983: Evolution of animal mitochondrial DNA. Sinauer, Sunderland, Massachusetts,
- C., 1993. Chapter 36. Osteichthyes: Teleostei. In: Brenton, M.J. (Ed.), *The Fossil Record*. Chapman & Hall, London, England, pp. 1–145.
- Cantatore P, Roberti M, Pesole G, Ludovico A, Milella F et al, Evolutionary analysis of cyt.b sequences in some Perciformes: Evidence for a slower rate of evolution than in mammals, *J Mol Evol*, 39(1994) 589-597.
- Casey, S., Hall, H., Stanley, H., & Vincent, A. (2004). The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics And Evolution*, 30(2), 261-272. doi: 10.1016/j.ympev.2003.08.018
- Casey, S.P., 1999. A phylogenetic study of seahorses using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. Unpublished Ph.D. thesis, Institute of Zoology, Regents Park, London, NW1 4RY, United Kingdom.
- Chen, Meng, et al. "The complete mitochondrial genome of the short snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* Linnaeus 1758 (Syngnathiformes: Syngnathidae) and its phylogenetic implications." *Conservation Genetics Resources* 10.4 (2018): 783-787.
- CITES. (2002) Conservation of seahorses and other members of the family Syngnathidae. Twelfth Meeting of the Conference of the Parties, Santiago, Chile. Available at: <http://www.cites.org/eng/cop/12/doc/index.shtml>.
- Copyright Πανεπιστήμιο Πατρών, Ηλιόπουλος Γεώργιος, 2015. «Εξέλιξη του Έμβριου κόσμου- Παλαιοντολογία, Ενότητα 13: «Πρωτεύοντα». Έκδοση: 1.0. Πάτρα 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://eclass.upatras.gr/courses/GEO326/>

- Curtis, J. & Vincent, A. Life history of an unusual marine fish: Survival, growth and movement patterns of *Hippocampus guttulatus* Cuvier 1829. *J. Fish Biol.* 68, 707–733 (2006).
- Dawson TP, Jackson ST, House JI, Prentice IC, Mace GM (2011) Beyond predictions: biodiversity conservation in a changing climate. *Science* 332:53–58. <https://doi.org/10.1126/science.1200303>
- Derycke, Sofie, et al. "Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes." *PloS one* 5.10 (2010): e13716.
- Douady, C. J., Dosay, M., Shivji, M. S., & Stanhope, M. J. (2003). Molecular phylogenetic evidence refuting the hypothesis of Batoidea (rays and skates) as derived sharks. *Molecular phylogenetics and evolution*, 26(2), 215-221.
- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Farias I P, Orti G, Sampaio I, Schneider H & Meyer A, The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: The limits of resolution for analyzing relationship among cichlid fishes, *J Mol Evol*, 53 (2001) 89-103.
- FishBase*. Available at: <https://www.fishbase.se/search.php> (Accessed: October 13, 2022).
- Foster, S. & Vincent, A. . Life history and ecology of seahorses: Implications for conservation and management. *J. Fish Biol.* 65, 1–61 (2004).
- Foster, S. J. & Vincent, A. C. J. (2004). Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Journal of Fish Biology* 65, 1–61.
- Frankham, R., Ballou, S. E. J. D., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge university press.
- Fritzsche, R.A., 1980. Revision of the eastern Pacific Syngnathidae (Pisces: Syngnathiformes), including both recent and fossil forms. *PCAS* 42, 181–227.
- Garrick-Maidment, N. & Jones, L. (2004). *British Seahorse Survey Report*. Topsham: The Seahorse Trust.
- Gkafas, G.A., Megalofonou, P., Batzakas, G., Apostolidis, A.P., Exadactylos, A., 2015. Molecular phylogenetic convergence within Elasmobranchii revealed by cytochromeoxidase subunits. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61, 510-515.
- Gokoglu M, Bodur T, Kaya Y (2004) First records of *Hippocampus fuscus* and *Syngnathus rostellatus* (Osteichthyes: Syngnathidae) from the Anatolian coast (Mediterranean Sea). *J Mar Biol Assoc UK* 84:1093–1094. <https://doi.org/10.1017/S0025315404010513h>

- Golani D, Fine M (2002) On the occurrence of *Hippocampus fuscus* in the eastern Mediterranean. *J Fish Biol* 60:764–766. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb01700.x>
- Gomon, M.F. and Kuitert, R.H. 2009: Two new pygmy seahorses (Teleostei: Syngnathidae: Hippocampus) from the Indo-West Pacific. *Aqua, International Journal of Ichthyology* 15, 37–44.
- Gonzalez-Candelas F., & C. Palacios. 1995. “Analyzing molecular data for studies of genetic diversity”. *Molecular genetic techniques for plant genetic resources* (Report of an IPGRI Workshop -11 October 1995, Rome, Italy).
- Gristina, M., Cardone, F., Carlucci, R., Castellano, L., Passarelli, S., & Corriero, G. (2014). Abundance, distribution and habitat preference of *Hippocampus guttulatus* and *Hippocampus hippocampus* in a semi-enclosed central Mediterranean marine area. *Marine Ecology*, 36(1), 57-66. doi: 10.1111/maec.12116
- Hagelberg E. 1994: Mitochondrial DNA from Ancient Bones, Springer New York, Ancient DNA, pp 195-204, DOI 10.1007/978-1-4612-4318-2_13
- Hewitt, G. M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907–913.
- Jensen, J. L., Bohonak, A. J. & Kelley, S. T. (2005). Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6, 13.
- Irwin D M, Kocher T H & Wilson A C, Evolution of the cyt b gene of mammals, *J Mol Evol*, 32(1991)138-144.
- Kimura, M. (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge. ISBN 0-521-23109-4
- Koichiro Tamura, Glen Stecher, and Sudhir Kumar (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027
- Kress, W. John, et al. "Use of DNA barcodes to identify flowering plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.23 (2005): 8369-8374.
- Kuitert, R.H. 2003: A new pygmy seahorse (Pisces: Syngnathidae: Hippocampus) from Lord Howe Island. *Records of the Australian Museum* 55, 113–16.
- Kuitert, R.H., 2000. *Seahorses, Pipefishes and their Relatives—A Comprehensive Guide to Syngnathiformes*. TMC Publishing, Chorleywood, UK.
- Lavergne S, Mouquet N, Thuiller W, Ronce O (2010) Biodiversity and climate change: integrating evolutionary and ecological responses of species and communities. *Annu Rev Ecol Evol S* 41:321–350. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144628>

- Lebonah, D. E., et al. "DNA barcoding on bacteria: a review." *Advances in Biology* 2014 (2014).
- Lourie S, Pritchard J, Casey S, Truong S, Hall H, Vincent A (1999b) Taxonomy of Vietnam's exploited seahorses (family Syngnathidae). *Biol J Linn Soc* 66:231–256. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1999.tb01886.x>
- Lourie SA, Pollom RA, Foster SJ (2016) A global revision of the seahorses *Hippocampus* Rafinesque 1810 (Actinopterygii: Syngnathiformes): taxonomy and biogeography with recommendations for further research. *Zootaxa* 4146:1–66. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4146.1.1>
- Lourie, S. A., Green, D. M. & Vincent, A. C. J. (2005). Dispersal, habitat differences, and comparative phylogeography of Southeast Asian seahorses (Syngnathidae: *Hippocampus*). *Molecular Ecology* 14, 1073–1094.
- Lourie, S.A. and Kuitert, R.H. 2008: Three new pygmy 456 Progress in Physical Geography 34(4) seahorse species from Indonesia (Teleostei: Syngnathidae: Hippocampus). *Zootaxa* 1963, 54–68.
- Lourie, S.A., Foster, S.J., Cooper, E.W.T. and Vincent, A.C.J. 2004: A guide to the identification of seahorses. Washington, DC: University of British Columbia and World Wildlife Fund: Project Seahorse and TRAFFIC North America.
- Lourie, S.A., Vincent, A.C.J., Hall, H. J., 1999. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. Project Seahorse, London, UK.
- Lui Z.J. & Cordes J.F., (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238, 1-37
- Martin A P, Naylor G J P & Palumbi S R, Rate of mitochondrial DNA evolution is slow in shark compared to mammals, *Nature (Lond)*, 357 (1992) 153-155.
- Meyer A. 1993: Evolution of mitochondrial DNA in fishes. Pp. 1-38 in I? W. HOCHACHKA and T. P MOMMSEN, eds. *Molecular biology frontiers, biochemistry and molecular biology of fishes*. Vol. 2. Elsevier Science Publishers, Amsterdam
- Moritz C., Dowling T.E. and Brown W.M. 1987: Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 18:269-292.
- Otero-Ferrer F, Gonzalez JA, Freitas M, Araújo R, Azevedo JMN, Holt WV, Tuya F, Haroun R (2017) When natural history collections reveal secrets on data deficient threatened species: Atlantic seahorses as a case study. *Biodivers Conserv*. <https://doi.org/10.1007/s10531-017-1385-x>

- Padial JM, Miralles A, De la Riva I, Vences M (2010) The integrative future of taxonomy. *Front Zool* 7:16. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-16>
- Perry A, Low P, Ellis J, Reynolds J (2005) Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science* 308:1912–1915. <https://doi.org/10.1126/science.1111322>
- Piggott, Maxine P., and Andrea C. Taylor. "Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species." *Wildlife Research* 30.1 (2003): 1-13.
- Rosen, B.R., 1988. Progress, problems and patterns in the biogeography of reef corals and other tropical marine organisms. *Helgoländer Meeresunters.* 42, 269–301.
- Sakai T, Kikkawa Y, Tsuchiya K, Harada M, Kanoe M et al, Molecular phylogeny of Japanese rhinolophidae based on variation in the complete sequence of the mitochondrial Cytochrome-b gene, *Genes Genet Syst*, 78 (2003) 179-189.
- Saarman, N. P., Louie, K. D. & Hamilton, H. (2010). Genetic differentiation across eastern Pacific oceanographic barriers in the threatened seahorse *Hippocampus ingens*. *Conservation Genetics* **11**, 65–71.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sanders, J. G., Cribbs, J. E., Fienberg, H. G., Hulburd, G. C., Katz, L. S. & Palumbi, S. R. (2008). The tip of the tail: molecular identification of seahorses for sale in apothecary shops and curio stores in California. *Conservation Genetics* 9, 65–71.
- Scales, H. (2010). Advances in the ecology, biogeography, and conservation of seahorses (genus *Hippocampus*). *Progress In Physical Geography: Earth and Environment*, 34(4), 443-458.
- Smith M F & Patton J L, The diversification of South American murid rodents: Evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe, *Biol J Linn Soc*, 50 (1993) 149-177.
- Smith, J.L.B., 1963. Fishes of the Family Syngnathidae from the Red Sea and the Western Indian Ocean. *Ichthyological Bulletin* No. 27. Department of Ichthyology, Rhodes University, Grahamstown, South Africa.
- Tajima, F. (Nov 1989). "Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism". *Genetics*. 123 (3): 585–95. PMC 1203831. PMID 2513255.
- Teske, P. R., Cherry, M. I. & Matthee, C. A. (2003). Population genetics of the endangered Knysna seahorse, *Hippocampus capensis*. *Molecular Ecology* 12, 1703–1715.

- Teske, P. R., Hamilton, H., Palsboll, P., Choo, C. K., Gabr, H., Lourie, S. A., Santos, M., Sreepada, A., Cherry, M. I. & Matthee, C. A. (2005). Molecular evidence for longdistance colonization in an Indo-Pacific seahorse lineage. *Marine Ecology Progress Series* 286, 249-260.
- Teske, Peter R., Michael I. Cherry, and Conrad A. Matthee. "The evolutionary history of seahorses (Syngnathidae: Hippocampus): molecular data suggest a West Pacific origin and two invasions of the Atlantic Ocean." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30.2 (2004): 273-286.
- Vincent A.C.J., Hall H.J. (1996) The threatened status of marine fishes. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 360–361.
- Whitley, G. and Allan, J. 1958: The sea-horse and its relatives. Melbourne: Georgian House.
- Whittaker P A & Danks S M, *Mitochondria: Structure, function and assembly* (Addison-Wesley Longman Ltd., UK) 1978, 1-7.
- Wilson A. C., Cann R. L., Carr S. M., George M., Gyllensten U. B., Helm-Bychowski K. M., Higuchi R. G., Palumbi S. R., Prager E. M., Sage R. D. and Stoneking M., 1985: Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26: 375–400. doi: 10.1111/j.1095-8312.1985.tb02048.x
- Woodall LC, Koldewey HJ, Santos SV, Shaw PW (2009) First occurrence of the lined seahorse *Hippocampus erectus* in the eastern Atlantic Ocean. *J Fish Biol* 75:1505–1512. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02371.x>
- Woodall, L. C. (2009). Population genetics and mating systems of European seahorses *Hippocampus guttulatus* and *Hippocampus hippocampus*. PhD Thesis, Royal Holloway, University of London, U.K.
- Woodall, L., Koldewey, H., & Shaw, P. (2011). Historical and contemporary population genetic connectivity of the European short-snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* and implications for management. *Journal Of Fish Biology*, 78(6), 1738-1756.
- Woodall, L., Otero-Ferrer, F., Correia, M., Curtis, J., Garrick-Maidment, N., Shaw, P., & Koldewey, H. (2017). A synthesis of European seahorse taxonomy, population structure, and habitat use as a basis for assessment, monitoring and conservation. *Marine Biology*, 165(1). doi: 10.1007/s00227-017-3274-y
- World Conservation Union. (2002). Available at <http://www.iucnredlist.org/>

Žalohar J., Hitij T., Križnar M. In press Two new species of seahorses (Syngnathidae, *Hippocampus*) from the Middle Miocene (Sarmatian) Coprolitic Horizon in Tunjice Hills, Slovenia: the oldest fossil record of seahorses. *Ann. Paléontol.*

6. ABSTRACT

The present paper focuses on the population genetics of *Hippocampus hippocampus* in the Mediterranean Sea. The first chapter deals with the diversity of seahorse species both globally and in the part of the Eastern Mediterranean that is adjacent to the content of this particular study. In addition, the historical evolution of the species over the centuries is detailed. To elicit the information on the species studied, the mitochondrial DNA study was chosen through laboratory-level investigations. Specifically, DNA extraction, PCR replication and sequencing took place in 6 samples from the Aegean and Ionian Sea. DNA barcoding technique was used on the above-mentioned samples and also on two gene sequences from NCBI. Specific programs, that demonstrated phylogenetic relationships, were used providing the necessary results. More specifically, there has been a focus on the method of Maximum likelihood estimation, which was the helper in demonstrating the phylogenetic tree as well as in statistical analysis. In detail, Tajima's D index and the F_{ST} genetic diversity index were calculated. From the results given by the phylogenetic tree we were led to the existence of two phylogenetic groups. One group included the haplotypes from the Aegean Sea and the other from the Ionian Sea. In conclusion, it can be seen that there is strong genetic variation and dissimilarity between populations and the individuals that make them up. In the samples collected from the Aegean Sea, Tajima's D value was zero (not statistically significant) indicating a lack of genetic variation in populations. Similarly, in the Ionian Sea the value of Tajima's D was equal to -1.17500 (statistically significant). This inclines us towards a possible bottleneck that this population may have suffered. The coefficient of variation, F_{ST} , indicates the variation in the genetic make-up of these populations and is limited within specific values. In the populations under study, there is a remarkable variation in haplotype frequencies, with a high degree of heterogeneity in the individuals of the populations.

The seahorse in its entirety, determined by the characteristics of weakness in swimming and sparse distribution. In particular, the inability to swim leads to failure to go on journeys and being stationary in the same place. This species is distinguished by its monogamous pattern. These are the characteristics that support and justify their genetic differentiation. Variation in the values of oceanographic characteristics constitutes an additional factor. The results obtained reinforced the importance of these geographical areas for the conservation of this species. The data collected are able to form the basis for the implementation of effective management policies that may be crucial for the survival of the species in the future.

Key words: *Hippocampus hippocampus*, mtDNA, Mediterranean Sea, genetic diversity, mitochondrial gene COI.