

Περίληψη

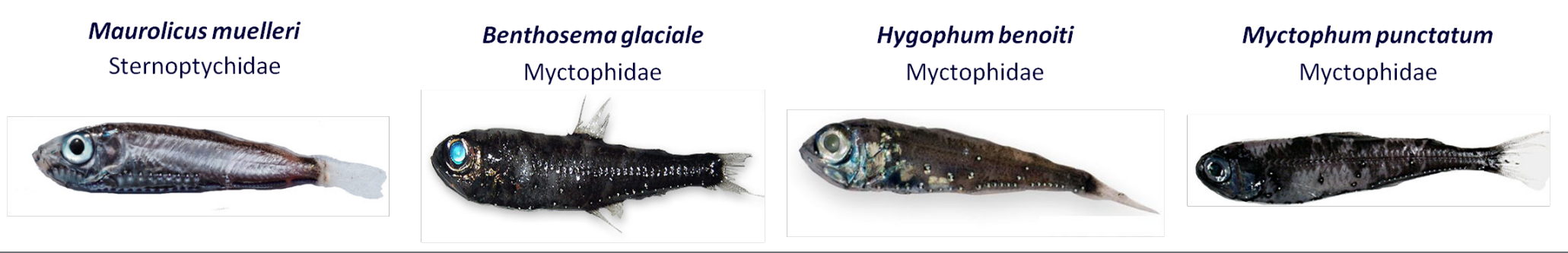
Οι μεσοπελαγικοί ιχθύες αποτελούν την πιο άφθονη ομάδα σπονδυλωτών όχι μόνο στο θαλάσσιο περιβάλλον, αλλά σε ολόκληρη τη βιόσφαιρα. Πρόκειται για είδη μικρού μεγέθους που απαντώνται στη μεσοπελαγική ζώνη, συνήθως σε βάθη 100-1000 m. Παρά το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που παρουσιάζει η βιολογία και η οικολογία τους, η ομάδα αυτή δεν έχει μελετηθεί εντατικά. Ειδικά οι έρευνες σε γενετικό επίπεδο παραμένουν ολιγάριθμες και αποσπασματικές. Στην παρούσα εργασία μελετάται η γενετική ποικιλότητα τεσσάρων ειδών μεσοπελαγικών ιχθύων (*Maurulicus muelleri* Gmelin, 1789, *Benthosema glaciale* Reinhardt, 1837, *Hygophum benoiti* Cocco, 1838, *Myctophum punctatum* Rafinesque, 1810) που συλλέχθηκαν σε περιοχές της Ελλάδας (Κορινθιακός Κόλπος, Σαρωνικός Κόλπος, Βόρειο Αιγαίο, Βόρειος Ευβοϊκός Κόλπος, Κρητικό Πέλαγος, Ιόνιο Πέλαγος). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ενίσχυση και αλληλούχιση τριών μιτοχονδριακών γονιδίων (COI, 12S, 16S), καθώς και της διαγονιδιακής περιοχής ITS2 του πυρηνικού DNA σε 265 άτομα. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας διαφορετικών πληθυσμών και της ύπαρξης γεωγραφικών προτύπων διαφοροποίησης των τεσσάρων ειδών στην Ελλάδα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και μελέτη της φυλογεωγραφίας τους με τη συνδυαστική ανάλυση των αποτεύπων της παρούσας εργασίας και των διαθέσιμων δημοσιευμένων αλληλουχιών από το σύνολο του εύρους εξάπλωσης κάθε είδους. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν την ύπαρξη κοινών αποτεύπων με υψηλή συχνότητα, αλλά και ιδιωτικών αποτεύπων με χαμηλή συχνότητα σε όλες τις περιοχές δειγματοληψίας. Στην πλειοψηφία των γενετικών τόπων βρέθηκαν ενδείξεις γενετικής διαφοροποίησης των πληθυσμών. Στον πληθυσμό του είδους *H. benoiti* του Κορινθιακού Κόλπου, βρέθηκε υψηλή γενετική διαφοροποίηση από τους πληθυσμούς του Σαρωνικού Κόλπου και του Β. Αιγαίου. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην περιορισμένη επικοινωνία του Κορινθιακού Κόλπου με την ανοιχτή θάλασσα, η οποία πιθανώς να αποτελεί φυσικό φραγμό της γονιδιακής ροής σε συνδυασμό με το ενδεχόμενο το *H. benoiti* να διαθέτει ιδιαίτερες βιολογικές προσαρμογές, οι οποίες περιορίζουν τη διασπορά του σε μεγαλύτερο βαθμό από τα υπόλοιπα είδη. Η ευρύτερη φυλογεωγραφική ανάλυση έδειξε επίσης την απουσία ξεκάθαρων γεωγραφικών προτύπων διαφοροποίησης και γενετικής δομής σε όλα τα είδη με ορισμένες εξαιρέσεις, οι οποίες χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Ωστόσο, κρίνεται απαραίτητη τόσο η ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού αλληλουχιών από το σύνολο του εύρους εξάπλωσης των τεσσάρων ειδών, όσο και η χρήση μοριακών δεικτών με υψηλότερη διακριτική ικανότητα, προκειμένου να αποσαφηνιστούν πιθανά πρότυπα διαφοροποίησης που αφορούν πρόσφατα πληθυσμιακά γεγονότα και να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Εισαγωγή

- Οι μεσοπελαγικοί ιχθύες είναι είδη μικρού μεγέθους, συνήθως 2-15 cm, τα οποία απαντώνται στη Μεσοπελαγική ζώνη, συνήθως σε βάθη 100-1000 m και αποτελούν τα πιο άφθονα σπονδυλωτά της βιόσφαιρας. Λόγω της ιδιαιτερότητας του συγκεκριμένου ενδιαιτήματος, τα μεσοπελαγικά είδη έχουν αναπτύξει προσαρμογές σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και φωτός.
- Πολλά είδη της ομάδας αυτής εκτελούν κάθετες μεταναστεύσεις, ανεβαίνοντας στα ανώτερα υδάτινα στρώματα κατά τη διάρκεια της νύχτας για να τραφούν, ενώ κατά τη διάρκεια της ημέρας παραμένουν σε μεγαλύτερα βάθη, προκειμένου να αποφύγουν τους θηρευτές τους.
- Εμπλέκονται στις ροές άνθρακα των ωκεανών και αποτελούν σημαντικό κρίκο των θαλάσσιων τροφικών πλεγμάτων, συνδέοντας τα κατώτερα τροφικά επίπεδα με τους ανώτερους θηρευτές.
- Παρά το σημαντικό οικολογικό τους ρόλο και τη μεγάλη τους αφθονία, η ομάδα αυτή έχει μελετηθεί ελάχιστα, τόσο σε επίπεδο βιολογίας και οικολογίας και ακόμα λιγότερο ως προς τη γενετική τους.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της ενδοειδικής γενετικής ποικιλότητας μεσοπελαγικών ιχθύων στις ελληνικές θάλασσες.

Εικόνα 1: Είδη μεσοπελαγικών ιχθύων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.



Υλικά και Μέθοδοι

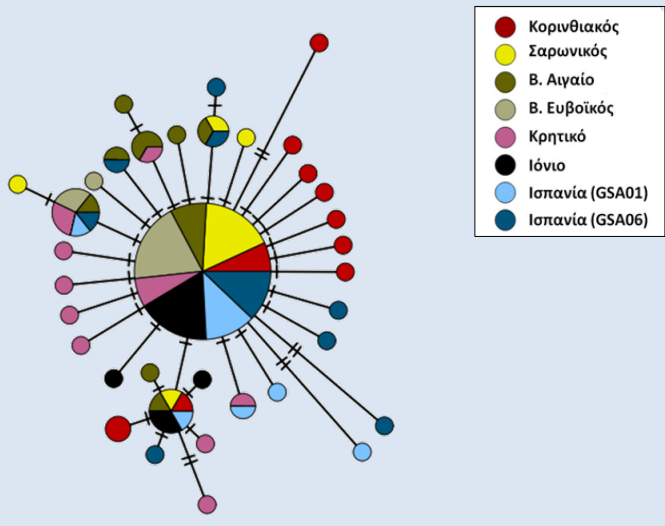
- Μελετήθηκαν 4 είδη μεσοπελαγικών ιχθύων (Εικόνα 1) από έξι θάλασσες και κόλπους της Ελλάδας, καθώς και από δύο περιοχές των μεσογειακών ακτών της Ισπανίας (Εικόνα 2).
- Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από 364 άτομα με τη χρήση άλατος (Miller, 1988).
- Ενισχύθηκαν και αλληλουχήθηκαν 4 γενετικοί τόποι (COI, 12S, 16S, ITS2) σε 14 άτομα από κάθε πληθυσμό σε όλα τα είδη (265 άτομα).
- Πραγματοποιήθηκε συνένωση των μιτοχονδριακών αλληλουχιών κάθε ατόμου και προέκυψαν σύνθετες (concatenated) αλληλουχίες, οι οποίες περιελάμβαναν τη μέγιστη γενετική πληροφορία.
- Εκτιμήθηκαν οι δείκτες ποικιλότητας Hd και π, με τη βοήθεια του προγράμματος DNAsp και κατασκευάστηκαν δίκτυα αποτεύπων διάμεσης σύνδεσης με το πρόγραμμα PopART.

Αποτελέσματα

Πίνακας 1: Δείκτες ποικιλότητας, με βάση τις σύνθετες αλληλουχίες του μιτοχονδρίου στο *M. muelleri*.

	N	H	Hd	π	Hd
Κορινθιακός	14	10	0,923	0,00118	7
Σαρωνικός	14	5	0,505	0,00047	2
Β. Αιγαίο	14	9	0,879	0,00099	3
Β. Ευβοϊκός	14	3	0,385	0,00027	1
Κρητικό	14	10	0,923	0,00120	6
Ιόνιο	14	4	0,495	0,00043	2
Ισπανία (GSA01)	12	6	0,682	0,00066	2
Ισπανία (GSA06)	15	9	0,8	0,00096	5
Σύνολο	111	36	0,722	0,00078	

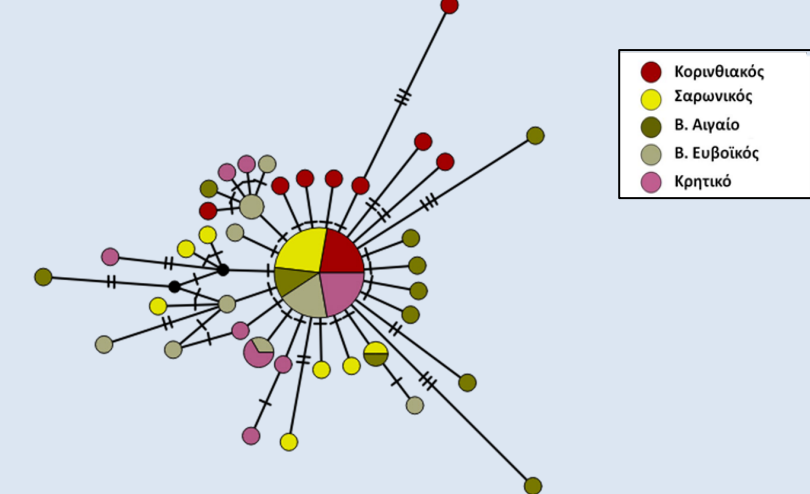
Εικόνα 3: Δίκτυο αποτεύπων με βάση τις σύνθετες αλληλουχίες του μιτοχονδρίου στο *M. muelleri*.



Πίνακας 2: Δείκτες ποικιλότητας, με βάση τις σύνθετες αλληλουχίες του μιτοχονδρίου στο *B. glaciale*.

	N	H	Hd	π	Hd
Κορινθιακός	14	9	0,835	0,00131	8
Σαρωνικός	14	8	0,769	0,00102	6
Β. Αιγαίο	14	12	0,967	0,00231	9
Β. Ευβοϊκός	14	9	0,879	0,00122	7
Κρητικό	14	8	0,824	0,00113	6
Σύνολο	69	39	0,848	0,00133	

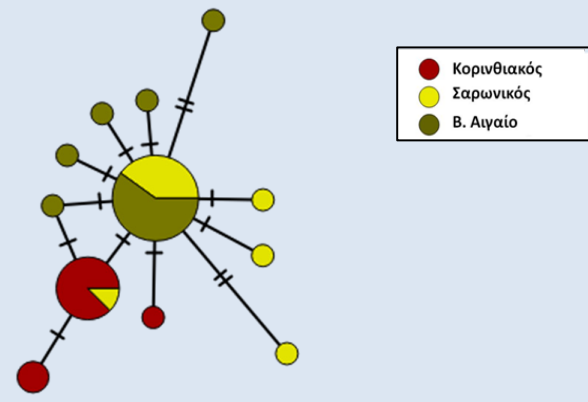
Εικόνα 4: Δίκτυο αποτεύπων με βάση τις σύνθετες αλληλουχίες του μιτοχονδρίου στο *B. glaciale*.



Πίνακας 3: Δείκτες ποικιλότητας, με βάση τις σύνθετες αλληλουχίες του μιτοχονδρίου στο *H. benoiti*.

	N	H	Hd	π	Hd
Κορινθιακός	10	3	0,511	0,00036	2
Σαρωνικός	10	5	0,533	0,00052	3
Β. Αιγαίο	14	5	0,505	0,00047	5
Σύνολο	34	12	0,761	0,00042	

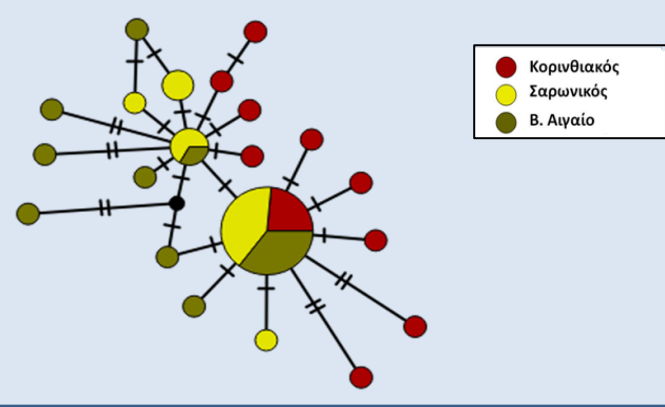
Εικόνα 5: Δίκτυο αποτεύπων με βάση τις σύνθετες αλληλουχίες του μιτοχονδρίου στο *H. benoiti*.



Πίνακας 4: Δείκτες ποικιλότητας, με βάση τις σύνθετες αλληλουχίες του μιτοχονδρίου στο *M. punctatum*.

	N	H	Hd	π	Hd
Κορινθιακός	13	10	0,923	0,00148	9
Σαρωνικός	13	5	0,705	0,00072	3
Β. Αιγαίο	14	9	0,835	0,00145	7
Σύνολο	40	21	0,821	0,00122	

Εικόνα 6: Δίκτυο αποτεύπων με βάση τις σύνθετες αλληλουχίες του μιτοχονδρίου στο *M. punctatum*.



Εικόνα 2: Χάρτης απεικόνισης των περιοχών δειγματοληψίας στην Ελλάδα και στην Ισπανία (Κορ: Κορινθιακός Κόλπος, Σαρ: Σαρωνικός Κόλπος, NAT: Β. Αιγαίο Πέλαγος, Eub: Β. Ευβοϊκός Κόλπος, Her: Κρητικό Πέλαγος, Ion: Ιόνιο Πέλαγος, GSA01- GSA06: Ισπανία).



Συζήτηση

Τα δίκτυα αποτεύπων παρουσίασαν ακτινωτή δομή, η οποία αποτελεί ένδειξη ταχείας πληθυσμιακής αύξησης μετά από ένα πρόσφατο φαινόμενο στενωπού, ενώ οι ιδιωτικοί απλότυποι υποδεικνύουν ότι οι πληθυσμοί βρίσκονται σε μια διαδικασία διαφοροποίησης (Slatkin & Hudson, 1991). Ένδειξη πρόσφατης δημογραφικής αύξησης αποτελεί και η αντίθεση στις τιμές των δεικτών ποικιλότητας (υψηλές τιμές απλοτυπικής – χαμηλές τιμές νουκλεοτιδικής ποικιλότητας) (Avice, 2000; Grant & Bowen, 1998).

Συγκρίνοντας τις τρεις κοινές περιοχές μελέτης μεταξύ των τεσσάρων ειδών (Κορινθιακός, Σαρωνικός, Β. Αιγαίο), οι πληθυσμοί του Σαρωνικού Κόλπου παρουσιάζουν γενικά μικρότερη γενετική ποικιλότητα σε σχέση με τις άλλες δύο περιοχές. Στον Κορινθιακό Κόλπο και στο Β. Αιγαίο έχουν βρεθεί υψηλές αφθονίες λαμβών μεσοπελαγικών ιχθύων, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με υψηλές αφθονίες του ζωπλαγκτού (Somarakis et al., 2011a; 2011b). Η χαμηλότερη γενετική ποικιλότητα στους πληθυσμούς του Σαρωνικού Κόλπου θα μπορούσε να οφείλεται στην ύπαρξη μικρότερων πληθυσμών.

Στα τρία είδη (*M. muelleri*, *B. glaciale*, *M. punctatum*) δε βρέθηκαν γεωγραφικά πρότυπα διαφοροποίησης, ενώ στο *H. benoiti* βρέθηκε ξεκάθαρη διαφοροποίηση του πληθυσμού του Κορινθιακού Κόλπου από τους υπόλοιπους (Σαρωνικός, Β. Αιγαίο). Η ισχυρή γενετική διαφοροποίηση που βρέθηκε στο *H. benoiti* θα μπορούσε να οφείλεται σε ιδιαίτερες βιολογικές προσαρμογές, οι οποίες περιορίζουν την παθητική διασπορά των ατόμων σε μεγαλύτερο βαθμό από τα υπόλοιπα είδη.

Η γενετική διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε στον Κορινθιακό θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει την ιδιαίτερη ιστορία του στο πρόσφατο παρελθόν (τελευταία παγετώδης περίοδος) σε συνδυασμό με τα τοπικά και υδρογραφικά χαρακτηριστικά του που ενδεχομένως να περιορίζουν τη γονιδιακή ροή με την ανοιχτή θάλασσα (Somarakis et al., 2011a; Sakellariou & Galanidou, 2016).

Συμπεράσματα

- Ενδείξεις διαφοροποίησης των πληθυσμών στις διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας.
- Οι μιτοχονδριακοί δείκτες μπορεί να μην παρέχουν ικανοποιητικές πληροφορίες για πρόσφατα πληθυσμιακά γεγονότα, ενώ η χρήση πυρηνικών δεικτών με υψηλή διακριτική ικανότητα μπορεί να συμβάλλει στην περιγραφή πρόσφατων προτύπων διαφοροποίησης.
- Πιο σαφές πρότυπο γενετικής διαφοροποίησης στον Κορινθιακό Κόλπο και στο *H. benoiti*.
- Χαμηλότερη γενετική ποικιλότητα στο Σαρωνικό Κόλπο.

Αναφορές

- Avice, J. C. (2000). Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Catul, V., Gauns, M., & Karuppasamy, P. K. (2011). A review on mesopelagic fishes belonging to family Myctophidae. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21(3), 339–354.
- Drakopoulos, P. G., & Lascaratos, A. (1998). A preliminary study on the internal tides of the gulfs of Patras and Korinthos, Greece. *Continental Shelf Research*, 18(12), 1517–1529.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (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.
- Grant, W. A. S., & Bowen, B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89(5), 415–426.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Miller, S. A., Dyles, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(1215).
- Salvanes, A. G. V., & Kristoffersen, J. B. (2001). Mesopelagic Fishes. In *Encyclopedia of Ocean Sciences*, Vol. 3, 1711–1717.
- Somarakis, S., Isari, S., & Machias, A. (2011a). Larval fish assemblages in coastal waters of central Greece: reflections of topographic and oceanographic heterogeneity. *Scientia Marina*, 75(3), 605–618.
- Somarakis, S., Ramfos, A., Pallalixis, A., & Valavanis, V. D. (2011b). Contrasting multispecies patterns in larval fish production trace inter-annual variability in oceanographic conditions over the N.E. Aegean Sea continental shelf (Eastern Mediterranean). *Hydrobiologia*, 670(1), 275–287.