



ΤΜΗΜΑ ΑΛΙΕΙΑΣ & ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ (ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ)

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΛΙΕΙΑΣ &
ΘΑΛΑΣΣΑΣ 2014 - 2020

*«Προστασία και αποκατάσταση της θαλάσσιας βιοποικιλότητας και των οικοσυστημάτων και καθεστώς
αντιστάθμισης στο πλαίσιο των βιώσιμων αλιευτικών δραστηριοτήτων – Δράση : συμμετοχή σε άλλες δράσεις
που αποσκοπούν στη διατήρηση και βελτίωση της βιοποικιλότητας και των υπηρεσιών οικοσυστήματος, όπως
η αποκατάσταση συγκεκριμένων θαλάσσιων και παράκτιων οικοτόπων για τη στήριξη βιώσιμων αλιευτικών
αποθεμάτων, συμπεριλαμβανομένης της επιστημονικής προετοιμασίας και αξιολόγησής τους –
Χωροκατακτητικά Ξένα Είδη» ΑΡΘΡΟ 40 παρ. 1 σημείο θ, Καν.(ΕΕ) 508/2014*

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΠΡΑΚΤΙΚΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΞΕΝΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΑΣΚΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΛΟΙΠΩΝ
ΕΙΔΩΝ (ΜΑΛΑΚΙΑ, ΣΠΟΓΓΟΙ) ΣΤΙΣ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΥΔΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΜΕΤΡΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΩΝ ΕΠΙΠΤΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΕΙΣΒΟΛΗΣ (MIS 5048463)

**Π2: Μοριακή ταξινόμηση και Εκτίμηση της πληθυσμιακής δομής των
Εισβολικών Ασκιδίων (Τεχνική έκθεση - Αποτελέσματα ΠΕ1.5)**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης στο πλαίσιο του
Ε.Π. Αλιείας και Θάλασσας 2014-2020



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα Ασκίδια (φύλο: Chordata, υπόφυλο: Tunicata, κλάση: Ascidiacea) αποτελούν θαλάσσιους διηθηματοφάγους οργανισμούς που περνούν όλη την ενήλική τους ζωή προσκολλόμενα σε κάποιο σταθερό υπόστρωμα. Στις ελληνικές θάλασσες έχουν καταγραφεί 75 είδη ασκιδίων (Antoniadou *et al.* 2016). Συγκεκριμένα, το 44,4% των ειδών αφορά σε εισβολικά είδη (Ατλαντικός-Μεσόγειος) και το 40,3% σε αυτόχθονα (Koukouras *et al.* 1995), ενώ παρατηρείται βαθμιαία αύξηση των καταγραφών σε εισβολικά είδη από τον Ινδικό Ωκεανό μέσω της διώρυγας του Σουέζ (Antoniadou *et al.* 2016).

Τα ασκίδια είναι γνωστά για την έντονη χωροκατακτητική τους δράση και κατατάσσονται ανάμεσα στους πιο σημαντικούς βιορυπαντές (biofoulants) (Aldred & Clare 2014). Η βιορύπανση (ή βιοσυσσώρευση) αφορά στη δυναμική διαδικασία προσκόλλησης, συσσώρευσης και ανάπτυξης στοιχείων (θαλάσσιας) χλωρίδας και πανίδας σε οποιαδήποτε φυσική ή τεχνητή επιφάνεια (Κοτρίκλα 2015). Η βιοσυσσώρευση των ασκιδίων στις ανθρωπογενείς εγκαταστάσεις (π.χ., πλωτές εξέδρες, προβλήτες υδατοκαλλιέργειας, δίχτυα κλωβών, αρμαθιές), έχει συχνά επιβλαβείς οικονομικές και οικολογικές επιπτώσεις (Fitridge *et al.* 2012). Ειδικά στις οστρακοκαλλιέργειες (π.χ., μυδοκαλλιέργειες) οι επιπτώσεις της βιοσυσσώρευσης των ασκιδίων είναι μεγαλύτερες καθώς ο ίδιος ο εκτρεφόμενος οργανισμός αποτελεί υπόστρωμα επικαθίσης των επιβιωτών (Fitridge *et al.* 2012), δημιουργώντας λειτουργικά προβλήματα στην παραγωγή. Τέλος, η αυξανόμενη αστικοποίηση των ακτογραμμών, σε συνδυασμό με αναπτυσσόμενο δίκτυο λιμένων και μαρίνων, ευνοεί και προάγει την εξάπλωση – διασπορά των χωροκατακτητικών ασκιδίων (López-Legentil *et al.* 2015), αποτελώντας ένα από τα κυριότερα μονοπάτια εισαγωγής των μη αυτόχθονων ειδών.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η μοριακή ταυτοποίηση ειδών ασκιδίων από τέσσερις διακριτές περιοχές του Ελλαδικού χώρου (Ροδόπης, Θερμαϊκού, Σαγιάδας και Αμβρακικού) όπου εδράζονται μυδοκαλλιέργειες με σκοπό τη γενετική ταξινόμηση των ατόμων και την εκτίμηση της σύστασης των περιοχών σε γένη και είδη ασκιδίων. Η μοριακή ταυτοποίηση των ατόμων ασκιδίων πραγματοποιήθηκε με βάση τμήματα των παρακάτω γονιδίων:

- γονίδιο της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (COI) το οποίο εδράζεται στο μιτοχονδριακό DNA
- γονίδιο του 18S ριβοσωμικού rRNA το οποίο εδράζεται στον πυρηνικό DNA

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης στο πλαίσιο του
Ε.Π. Αλιείας και Θάλασσας 2014-2020



ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Συνολικά, 140 άτομα ασκιδίων συλλέχθηκαν από τέσσερις γεωγραφικά διακριτές μονάδες μυδοκαλλιέργειας του Ελλαδικού χώρου: 39 από τη περιοχή της Ροδόπης, 55 από την περιοχή της Σαγιάδας, 40 από τη περιοχή του Θερμαϊκού και 6 από την περιοχή του Αμβρακικού. Για τις μοριακές αναλύσεις, δείγματα ιστού από τα συνολικά 140 άτομα τοποθετήθηκαν ατομικά σε erpendorfs μέσα σε 99,8% αιθανόλη και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C. Πριν την εξαγωγή ολικού γονιδιωματικού DNA, προηγήθηκαν βαθμιαίες ενυδατώσεις των ιστών με εμβαπτίσεις διάρκειας 5 λεπτών στα ακόλουθα διαλύματα διαβαθμισμένων συγκεντρώσεων αιθανόλης (EtOH, 99,8 %) και ρυθμιστικού διαλύματος (PBS, 1%): (1) 75% EtOH – 25% PBS, (2) 50% EtOH – 50% PBS, (3) 25% EtOH – 75% PBS, (4) 100% PBS. Για την απομόνωση του DNA, χρησιμοποιήθηκε το Kit Nucleospin® Tissue (Macherey-Nagel, Duren, Germany) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή με ορισμένες τροποποιήσεις. Ενδεικτικές ηλεκτροφορήσεις σε πήκτωμα αγαρόζης 1% πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα των απομονωμένων DNA ώστε να εκτιμηθεί η ποσότητα και συγκέντρωση του ολικού DNA.

Για την ενίσχυση τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (COI) των ασκιδίων ακολουθήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι κοινοί (universal) εκκινητές LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3') & HCO2198 (5'-TAAACTTXAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.* 1994). Κάθε αντίδραση περιείχε 1X Kara Taq ρυθμιστικό διάλυμα (1,5 mM MgCl₂), 0,2 mM dNTPs, 0,25 μM από κάθε εκκινητή, 1 U Kara Taq, ca. 20 ng από το απομονωμένο DNA κάθε ατόμου και υπερκάθαρο νερό έως τελικού όγκου αντίδρασης 20 μL. Οι συνθήκες της PCR περιλάμβαναν τα παρακάτω βήματα: αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94 °C για 3 min (initial denaturation), 37 κύκλοι αποδιάταξης του DNA στους 94 °C για 30 sec (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών στο DNA στους 48 °C για 1 min (annealing) και επιμήκυνσης του DNA μέσω της DNA πολυμεράσης στους 72 °C για 1 min (elongation) και τελική επιμήκυνση (final elongation) του DNA στους 72 °C για 10 min. Ο ποιοτικός έλεγχος της ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου COI των ατόμων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (συνθήκες ηλεκτροφόρησης: 150 V, 300 mA, 150 W, 25 min).

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της του 18S ριβοσωμικού rRNA των ασκιδίων ακολουθήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί για ασκίδια εκκινητές 18S1 (5'-CTTGGTTGATCCTGCCAG-3') & 18S4 (5'-GATTAAAGAAAACATTCTTGGC-3') (Tsagkogeorga *et al.* 2009). Κάθε αντίδραση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης στο πλαίσιο του Ε.Π. Αλιείας και Θάλασσας 2014-2020



περιείχε 1X Kara Taq ρυθμιστικό διάλυμα (2 mM MgCl₂), 0,2 mM dNTPs, 0,4 μM από κάθε εκκινητή, 1 U Kara Taq, ca. 20 ng από το απομονωμένο DNA κάθε ατόμου και υπερκάθαρο νερό έως τελικού όγκου αντίδρασης 20 μL. Οι συνθήκες της PCR περιλάμβαναν τα παρακάτω βήματα: αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94 °C για 4 min (initial denaturation), 37 κύκλοι αποδιάταξης του DNA στους 94 °C για 40 sec (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών στο DNA στους 50 °C για 40 sec (annealing) και επιμήκυνσης του DNA μέσω της DNA πολυμεράσης στους 72 °C για 1 min (elongation) και τελική επιμήκυνση (final elongation) του DNA στους 72 °C για 10 min. Ο ποιοτικός έλεγχος της ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου 18S των ατόμων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (συνθήκες ηλεκτροφόρησης: 150 V, 300 mA, 150 W, 25 min).

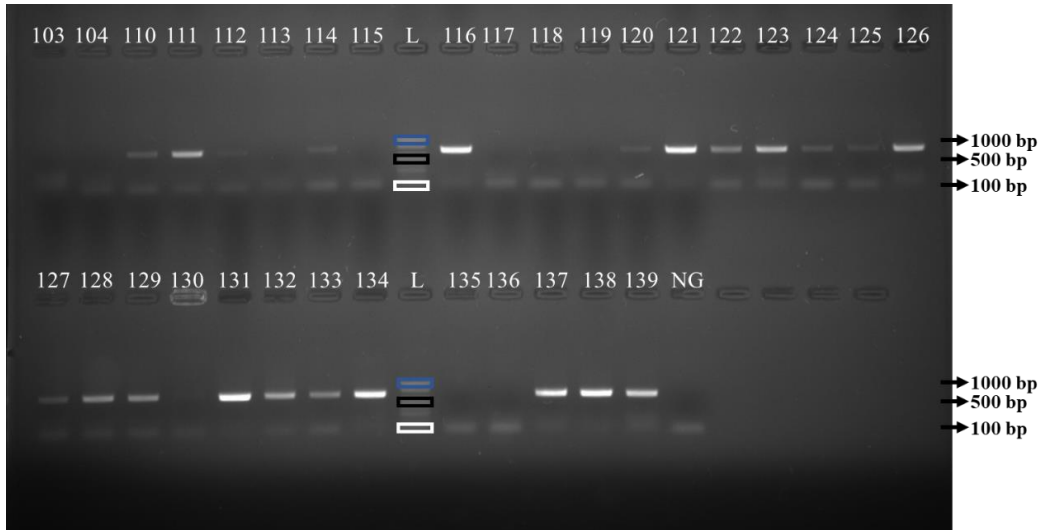
Η ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (COI) και του ριβοσωμικού rRNA 18S μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ήταν επιτυχής για την πλειονότητα των δειγμάτων ασκιδίων από τις τέσσερις περιοχές. Βάσει των ηλεκτροφορήσεων των προϊόντων της PCR, όλα τα άτομα εμφάνισαν μια ορατή ζώνη περί των 700bp για το COI (Εικόνα 1) και περί των 900bp για το 18S (Εικόνα 2).

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany) με ορισμένες τροποποιήσεις. Κατά τα διαφορετικά στάδια του καθαρισμού, η φυγοκέντρηση των ρυθμιστικών διαλυμάτων (Buffer NT1 & NT3) στις στήλες πραγματοποιήθηκε στα 11,000g για 1 λεπτό, με επιπλέον τελική φυγοκέντρηση στα 13,000 g για 1 λεπτό.

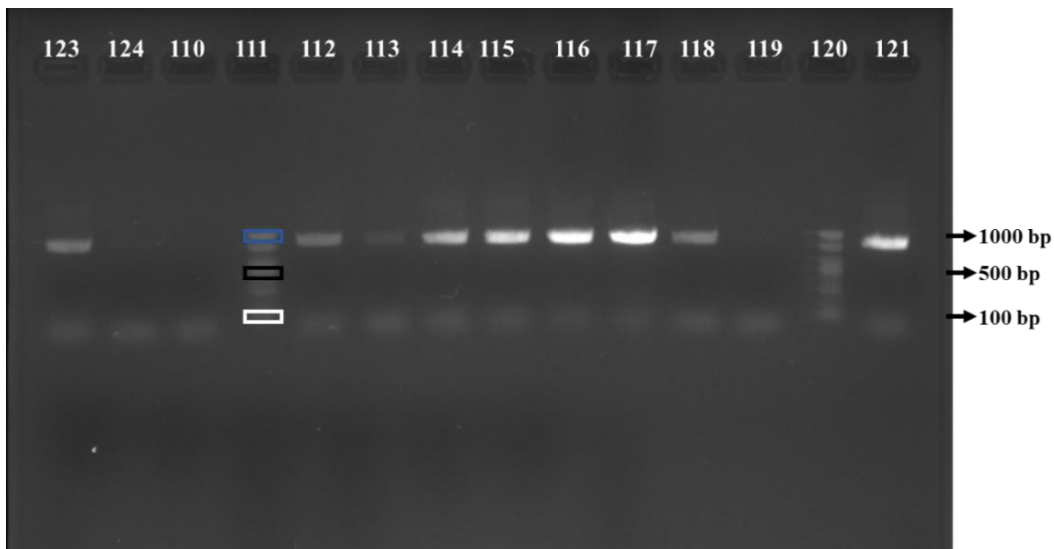
Η αλληλούχιση των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε σε Γενετικό αναλυτή AB3500 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Έπειτα από την επεξεργασία και διόρθωση των αλληλουχιών DNA για τα γονίδια COI και 18S μέσω του προγράμματος FinchTV (version 1.3.1, Geospiza, Inc.; Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>), πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των ατόμων σε επίπεδο είδους με την μέθοδο του αλγόριθμου BLAST (Altschul *et al.* 1990).

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης στο πλαίσιο του
Ε.Π. Αλιείας και Θάλασσας 2014-2020





Εικόνα 1: Ενδεικτική απεικόνιση των προϊόντων της PCR για το COI (~700 ζεύγη βάσεων, bp) 31 ατόμων ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. L: Δείκτης μοριακού βάρους με εύρος ζωνών (μέγεθος θραυσμάτων) από 100 bp έως 1000 bp, που χρησιμοποιείται για να εκτιμήσουμε το μέγεθος του προϊόντος της PCR σε ζεύγη βάσεων. Με μπλέ, μαύρο και λευκό πλαίσιο επισημαίνονται οι ζώνες των 1000bp, 500bp και 100 bp DNA του δείκτη μεγέθους, αντίστοιχα.



Εικόνα 2: Ενδεικτική απεικόνιση των προϊόντων της PCR για το 18S (~900 ζεύγη βάσεων, bp) 12 ατόμων ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. L Δείκτης μοριακού βάρους με εύρος ζωνών (μέγεθος θραυσμάτων) από 100 bp έως 1000 bp, που χρησιμοποιείται για να εκτιμήσουμε το μέγεθος του προϊόντος της PCR σε ζεύγη βάσεων. Με μπλέ, μαύρο και λευκό πλαίσιο επισημαίνονται οι ζώνες των 1000bp, 500bp και 100 bp DNA του δείκτη μεγέθους, αντίστοιχα.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης στο πλαίσιο του
Ε.Π. Αλιείας και Θάλασσας 2014-2020



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (ΠΕ1.5)

Στη παρούσα μελέτη, 126 από τα 140 συνολικά άτομα ασκιδίων ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς με βάση τα δύο γονίδια. Από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης προέκυψαν άτομα από τα είδη *Styela plicata*, *Ciona intestinalis*, *Clavelina oblonga*, *Phallusia mammillata*, *Ascidia ceratodes*, *Microcosmus squamiger*. Με βάση τον αλγόριθμο BLAST, το μέσο ποσοστό κάλυψης και ομολογίας των αλληλουχιών για το γονίδιο COI ήταν 99,0% και 98,4%, αντίστοιχα, ενώ για το γονίδιο 18S 99,7% και 99,1%, αντίστοιχα. Ο αριθμός των ατόμων ανά είδος και ανά περιοχή δειγματοληψίας αναγράφονται στον Πίνακα 1. Η επακόλουθη γενετική ταυτοποίηση των ειδών για τα παραπάνω γένη με βάση τα γονιδιακά αυτά τμήματα, θα προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες τόσο για την ποικιλότητα όσο και για τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών που προσβάλλουν τις μυδοκαλλιέργειες στις συγκεκριμένες περιοχές.

Πίνακας 1: Γενετική ταυτοποίηση ειδών ασκιδίων σε τέσσερις γεωγραφικά διακριτές μυδοκαλλιέργειες του Ελλαδικού χώρου με τη χρήση τμημάτων των γονιδίων COI και 18S.

Ταυτοποίηση είδους	αριθμός ατόμων (n)			
	Ροδόπη	Θερμαϊκός	Σαγιάδα	Αμβρακικός
<i>Styela plicata</i>	18	23	10	2
<i>Ciona intestinalis (type a or b)</i>	9	13	-	-
<i>Clavelina oblonga</i>	12	1	24	3
<i>Phallusia mammillata</i>	-	-	8	-
<i>Ascidia ceratodes</i>	-	-	1	-
<i>Microcosmus squamiger</i>	-	-	2	-
Total	39	37	45	5

ΔΙΑΧΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης παρουσιάστηκε με αναρτημένη ανακοίνωση στο 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων (Μεσολόγγι, 3-6 Νοεμβρίου 2022).

Γελαδάκης Γ., Κόμματα Β., Καμηλάρη Μ., Παπαϊωάννου Χ., Παπαδόπουλος Δ.Κ., Λάττος Α., Μιχαηλίδης Β., Θεοδώρου Ι., Γιάντσης Ι.Α., Μπαταργιάς Κ. (2022) Γενετική ταυτοποίηση ειδών Ασκιδίων σε εγκαταστάσεις μυδοκαλλιέργειας του Ελλαδικού χώρου. *Πρακτικά 18ου Πανελληνίου Συνεδρίου Ιχθυολόγων, Μεσολόγγι, 3-6 Νοεμβρίου 2022*, σελ. 436-439

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης στο πλαίσιο του
Ε.Π. Αλιείας και Θάλασσας 2014-2020



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aldred N, Clare AS (2014) Mini-review: impact and dynamics of surface fouling by solitary and compound ascidians. *Biofouling* 30 (3): 259–270.
- Altschul SF., Gish W, Miller W, Myers EW Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* (215):403-410.
- Antoniadou C, Gerovasileiou V, Bailly N (2016) Ascidiacea (Chordata: Tunicata) of Greece: an updated checklist. *Biodiversity Data Journal* 4: e9273.
- Fitridge I, Dempster T, Guenther J, de Nysc R (2012) The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling* 28 (7): 649–669.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, 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.
- Koukouras A, Voultziadou-Koukoura E, Kevrekidis T, Vafidis D (1995) Ascidian fauna of the Aegean sea with a check list of eastern Mediterranean and Black sea species. *Annl. Inst. Océanogr, Paris* 71: 19–34.
- López-Legentil S, Legentil ML, Erwin PM, Turon X (2015) Harbor networks as introduction gateways: contrasting distribution patterns of native and introduced species. *Biol. Invasions* 17: 1623–1638.
- Κοτρίκλα AM (2015) Ναυτιλία και Περιβάλλον. Ελληνικά Ακαδημαϊκά Συγγράμματα και Βοηθήματα Kallipos.
- Tsagkogeorga G, Turon X, Hopcroft RR, Tilak MK, Feldstein T, Shenkar N, Loya Y, Huchon D, Douzery EJ, Delsuc F (2009). An updated 18S rRNA phylogeny of tunicates based on mixture and secondary structure models. *BMC Evol Biol.*, 9:187.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης στο πλαίσιο του
Ε.Π. Αλιείας και Θάλασσας 2014-2020

