



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ
ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ



**Διδρυματικό Πρόγραμμα
Μεταπτυχιακών Σπουδών**



Φυλογεωγραφική μελέτη της κόκκινης γαρίδας (*Aristaeomorpha foliacea*) στη Μεσόγειο θάλασσα

Βασιλική Τερζόγλου

Ηράκλειο, Απρίλιος 2021

Μεταπτυχιακή Εργασία Ειδίκευσης



Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε το διάστημα 2020-2021 στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στην Κρήτη, στα πλαίσια του Διιδρυματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Π.Μ.Σ.), «Περιβαλλοντική Βιολογία». Επιβλέποντες της εργασίας ήταν ο Ερευνητής Α' Τσιγγενόπουλος Κωνσταντίνος (ΙΘΑΒΒΥΚ, ΕΛΚΕΘΕ), η Ερευνήτρια Γ' Μανουσάκη Τερέζα (ΙΘΑΒΒΥΚ, ΕΛΚΕΘΕ) κι ο αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Βιολογίας Λαδουκάκης Εμμανουήλ.

Αντικείμενο της εργασίας αποτέλεσε η φυλογεωγραφική μελέτη της κόκκινης γαρίδας (*Aristaeomorpha foliacea*) στη Μεσόγειο θάλασσα.

Θα ήθελα με την ευκαιρία αυτή να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, για τη δυνατότητα που μου έδωσαν να εργαστώ σε αυτό το θέμα, για το ενδιαφέρον και για τη συμπαράστασή τους. Ειδικά τον κύριο επιβλέποντα, ερευνητή Κων/νο Τσιγγενόπουλο τον ευχαριστώ πολύ για την πολύτιμη καθοδήγησή του και για την άριστη συνεργασία τόσων χρόνων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δημήτρη Τσαπάρη (ΙΘΑΒΒΥΚ, ΕΛΚΕΘΕ), για το χρόνο που αφιέρωσε να με εκπαιδεύσει στα νέα μου ερευνητικά πεδία, πάντα πρόθυμος να απαντάει σε ερωτήσεις και για εποικοδομητικές συζητήσεις.

Ευχαριστώ επίσης την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Σίλια Αντωνίου (ΙΘΑΒΒΥΚ, ΕΛΚΕΘΕ) και τον Καθηγητή του τμήματος Βιολογίας & Δ/ντή του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (ΜΦΙΚ) Νίκο Πουλακάκη, για τη βοήθεια και τη φιλοξενία στο εργαστήριό του για τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τους φίλους και συνεργάτες μου στο εργαστήριο, για την κάθε είδους βοήθεια, τις συζητήσεις και παρατηρήσεις τους. Θα αναφέρω ιδιαιτέρως τους Χρήστο Αρβανιτίδη, Ειρήνη Σλάβκα Πολόβινα, Jon Kristoffersen, συνάδελφοι αλλά και φίλοι πολύτιμοι πλέον, ήταν πάντα εκεί για να με ακούσουν, αλλά και για ψυχολογική υποστήριξη. Τελευταία, αλλά όχι λιγότερο σημαντική θα αναφέρω τη στήριξη της οικογένειάς μου, τους γονείς και τα παιδιά μου. Χωρίς τη δική τους διαχρονική ενθάρρυνση και υποστήριξη, δε θα ήταν δυνατή αυτή η μεταπτυχιακή εργασία.



Περιεχόμενα

Πρόλογος-Ευχαριστίες.....	2
Περιεχόμενα	3
Περίληψη	5
Abstract.....	7
Εισαγωγή.....	10
Οργανισμός μελέτης και Συστηματική	10
Μορφολογία	10
Εξάπλωση & οικολογία	12
Ενδιαίτημα	13
Αλιεία	14
Αναπαραγωγή	16
Μέγεθος γονιδιώματος.....	16
Φυλογεωγραφία	17
Μοριακοί δείκτες	18
Φυλογεωγραφικές μελέτες του <i>A. foliaceae</i> στη Μεσόγειο	19
Σκοπός της εργασίας.....	22
Υλικά και μέθοδοι.....	23
Δειγματοληψία.....	23
Εξαγωγή DNA από τα δείγματα-Επώαση με RNAse-Ποιοτικός, ποσοτικός έλεγχος	25
Κατασκευή βιβλιοθηκών ddRAD & αλληλούχηση.....	27
Βιοπληροφορική ανάλυση.....	31
Αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής.....	32
Μέση ετεροζυγωτία-συντελεστές εγκαθίδρυσης.....	32
Εκτίμηση πληθυσμιακής δομής.....	34
Αποτελέσματα	36
Απομόνωση DNA & ποιοτικός έλεγχος αυτών	36
Αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης (ανάλυση <i>stacks</i>).....	38
Αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής.....	43
Ενδοπληθυσμιακή γενετική ποικιλότητα.....	43



Συντελεστές εγκαθίδρυσης (Fixation indices, Fst)	45
Εκτίμηση πληθυσμιακής δομής	47
Ανάλυση DAPC.....	47
Ανάλυση Μπεϋζιανής ομαδοποίησης (Structure)	48
Ανάλυση AMOVA.....	52
Συζήτηση	55
Αποτελέσματα εργαστηριακών τεχνικών	55
Αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής.....	56
Ενδοπληθυσμιακή γενετική ποικιλότητα.....	56
Συντελεστές εγκαθίδρυσης (Fixation indices, Fst)	57
Εκτίμηση πληθυσμιακής δομής	58
Γονιδιακή ροή-Μετανάστευση	61
Παράρτημα	64
Πρωτόκολλο δειγματοληψίας	64
Πρωτόκολλο εξαγωγής DNA	64
Πρωτόκολλο κατασκευής βιβλιοθήκης ddRAD	65
Αποτελέσματα του 'χαλαρού' συνόλου δεδομένων	68
Βιβλιογραφία	75



Περίληψη

Η μεγάλη κόκκινη γαρίδα *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) είναι ένα κοσμοπολίτικο βενθοπελαγικό είδος γαρίδας το οποίο κατανέμεται μεταξύ άλλων στη Μεσόγειο, στην Καραϊβική, στη Ν. Αφρική, στην Ιαπωνία και στην Ωκεανία. Απαντάται σε βάθη από 120 έως 1300μ, με μέγιστη αφθονία στα 500 με 800μ και είναι από τα πιο σημαντικά εμπορικά είδη στη Μεσόγειο, όπου η παρουσία του εμφανίζει διαβάθμιση σε σχέση με το γεωγραφικό μήκος. Αλιεύεται συστηματικά στην κεντρική και ανατολική Μεσόγειο, ενώ στη δυτική πλευρά η αφθονία του είναι πλέον σημαντικά μειωμένη.

Η πληροφορία για τη γενετική ποικιλότητα του είδους είναι περιορισμένη. Οι διαθέσιμες γενετικές μελέτες έχουν γίνει με χρήση μικρού αριθμού α) πληθυσμών, β) σημείων δειγματοληψίας και γ) δεικτών (πυρηνικού και μιτοχονδριακού DNA) και δεν έχουν εντοπίσει πρότυπα διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών του εντός της Μεσογείου. Στα πλαίσια ενός ευρωπαϊκού προγράμματος το οποίο στοχεύει στην οριοθέτηση των ιχθυοαποθεμάτων 6 εμπορικών ειδών στη Μεσόγειο, συλλέχθηκαν 1.700 περίπου δείγματα από 32 πληθυσμούς που καλύπτουν τις περισσότερες περιοχές εξάπλωσης του *A. foliacea* στη Μεσόγειο. Ως μοριακοί δείκτες για τις αναλύσεις πληθυσμιακής γενωμικής, χρησιμοποιήθηκαν σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) που εντοπίστηκαν με τη μεθοδολογική προσέγγιση αλληλούχησης «double-digest Restriction site Associated DNA (ddRADseq)». Με τη μέθοδο αυτή κατασκευάστηκαν αρχικά βιβλιοθήκες χαμηλής αντιπροσώπευσης του γονιδιώματος με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων, που στη συνέχεια αλληλουχήθηκαν. Ο μεγάλος όγκος γενετικών δεδομένων που προέκυψαν, αναλύθηκε με λογισμικά βιοπληροφορικής για την εξαγωγή συμπερασμάτων για τις σχέσεις μεταξύ των πληθυσμών.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν έλλειψη γενετικής δομής μεταξύ των πληθυσμών του *A. foliacea* στη Μεσόγειο και δεν απέδειξαν την ύπαρξη γεωγραφικών ή ωκεανογραφικών ασυνεχειών που θα μπορούσαν να εμποδίζουν τη γονιδιακή ροή. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν χαμηλές τιμές ετεροζυγωτίας, ειδικά σε πληθυσμούς με λίγα άτομα στην ανάλυση. Οι τιμές F_{st} ανά ζεύγη πληθυσμών ήταν χαμηλές και στατιστικά μη σημαντικές ακόμη κι όταν συγχωνεύτηκαν πληθυσμοί με λίγα άτομα, ώστε να γίνει η



ανάλυση πιο στατιστικά ισχυρή. Τέλος, οι αναλύσεις που έγιναν για την εκτίμηση της πληθυσμιακής δομής (χρήση λογισμικών DAPC, STRUCTURE) έδειξαν την ύπαρξη πιθανότατα ενός ενιαίου παμμικτικού πληθυσμού για το είδος στη Μεσόγειο, ενώ η AMOVA έδειξε χαμηλή αλλά στατιστικά σημαντική τιμή $F_{CT} = 0,2\%$, όταν ομαδοποιήθηκαν οι πληθυσμοί σε 3 ομάδες που αντιστοιχούν στη Δυτική, την Κεντρική και την Ανατολική Μεσόγειο.

Τα παραπάνω αποτυπώνουν την υψηλή συνδεσιμότητα που υπάρχει μεταξύ των πληθυσμών της κόκκινης γαρίδας στη Μεσόγειο με πιθανότερη εξήγηση για αυτό, τη σημαντική ικανότητα διασποράς τόσο κατά τα προνυμφικά στάδια, όσο και κατά την ενήλικη ζωή του είδους. Τέλος, έγινε συζήτηση για τη σημασία της παραγωγής ποιοτικών συνόλων δεδομένων στα οποία να μπορούν να βασιστούν οι συγκεκριμένες αναλύσεις και τα πιθανά προβλήματα που μπορεί να ανακύψουν σε αυτές.

Λέξεις κλειδιά: *Aristaeomorpha foliacea*, Μεσόγειος, ddRADseq, SNPs, προνυμφική διασπορά



Abstract

The giant red shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) is a large-sized decapod crustacean first described in the Ligurian Sea. Together with *Aristeus antennatus* (blue and red shrimp), are the only species of the family Aristeidae found in the Mediterranean, constituting the main target species for the demersal deep-sea fishery in the Mediterranean.

The species geographic distribution is wide. It has been reported to occur in the Mediterranean, the Atlantic, the Indian Ocean, the western Pacific and South Africa. In the Mediterranean Sea, the distribution of the giant red shrimp is patchy in nature, with the highest abundances found in the central-eastern basins. *Aristaeomorpha foliacea* is a deep-water benthopelagic shrimp with a reported depth distribution of 120-1300 m, generally inhabiting muddy bottoms. The species aggregates in submarine trenches and canyons along the continental slope and peaks in abundance at 300-800 m depths. The economic importance of the giant red shrimp enhanced the scientific interest to study its populations and evaluate its stocks. Until now, however, research on the genetic diversity of the species in the Mediterranean is limited. Only a small number of studies have been published aiming at detecting the genetic structure of the species in the Mediterranean. All these studies share in common the small number of: (a) samples collected, (b) areas sampled, and (c) molecular markers used which were either microsatellites or mitochondrial/nuclear DNA sequences. According to these studies, there seems to be a lack of genetic differentiation among populations living in different locations in the Mediterranean.

The present work attempts to study the genetic structure of *A. foliacea* populations in the Mediterranean. The research approach is based on an extensive number of samples, collected in the context of the European project MED_UNITS. A Genotyping-by-Sequencing (GBS) methodology constructing reduced-representation libraries was selected to generate a set of restriction site associated DNA (RAD) fragments isolated from a given number of individuals that are barcoded and sequenced together. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers newly isolated following the double-digest restriction site associated DNA (ddRAD) sequencing were used and a high number of samples were genotyped. SNPs have nowadays become the marker of choice for a variety of molecular ecology studies, since advances in



sequencing technologies coupled with increases in computational power have resulted in a shift towards genome-scale data analysis. The main advantages of this approach are the high number of SNPs usually identified, their wide distribution in the genome, and the ability given by High Performance Computing (HPC) systems to analyze data from a large number of individuals. Also, this method does not require a fully sequenced reference genome as loci can be reconstructed *de novo* from sequencing reads.

The sampling effort resulted in 1,692 samples (tissues preserved in absolute ethanol) covering 32 geographic sub-areas (GSA), from the Balearic Islands in the W. Mediterranean to the Cypriot and Egyptian waters in the E. Mediterranean. DNA quality was in general above average and almost 75% of the samples were used for the library preparations and downstream analyses. Sequenced reads were analyzed using STACKS v.2.4 pipeline in order to quality control the reads, identify the genomic loci sequenced, genotype each individual, and conduct basic population genetics analysis.

Using all individuals genotyped, the species "catalogue" comprised approximately 2.4 million ddRAD loci but the number of (Ustacks) loci varied significantly among specimens (from 17 to 244,066) and among populations on average (1,217 to 69,625). Thus, samples with low number of stacks loci (we opted for less than 6,000) had to be filtered out and all phylogeographic analyses were run with a dataset composed of 661 samples (for 30 localities) and 734 higher quality SNPs present in at least 70% of the samples. Results point out an evident lack of genetic differentiation and are generally in agreement with previous studies conducted at smaller geographic scales and less extended sampling points in the Mediterranean Sea. In particular, observed heterozygosities (H_o) were generally low (ranging from 7.3 to 18.6%) and smaller than the expected (23.8 to 45.5%). Low H_o values were found mostly in samples with low number of specimens which seem to also have a smaller number of common polymorphic loci from the dataset of 734 SNPs.

Pairwise F_{st} values were low and not significant, ranging from -0.080 to 0.058 using an uncorrected probability threshold of 0.05, and a Benjamini-Hochberg correction. The F_{st} values were found not significant and remained low even when populations with a small number of specimens were grouped together, in order to increase the sampling size and make the analysis more powerful (-0.06263 to 0.02865). Such weak differentiation was evident both



by DAPC where all populations seemed to belong to a single cluster, and STRUCTURE analysis. Using the STRUCTURE software, the best k value selected using the EVANNO method was 2, and with most individuals assigned to both clusters (admixed). Moreover, AMOVA results for several scenarios of grouping *A. foliacea* populations did not indicate any significant genetic structure but rather a panmictic situation in the Mediterranean Sea. AMOVA showed a small $F_{CT} = 0.00196$ (0,2%) in a scenario involving 15 populations (after merging neighboring populations of low sample size) divided in 3 groups (Western, Central, Eastern Mediterranean). Slightly lower $F_{CT} = 0.00183$ was calculated when populations were merged to 20 and even less $F_{CT} = 0.00088$ when they were used as they originally defined (30 populations divided in 3 groups). All F_{CT} values were statistically significant ($P < 0.0001$). Thus, all scenarios indicated the existence of very weak but significant differentiation among proposed groups and the greatest part of the identified genetic variation was attributed to differences among individuals in the populations, and much less among groups.

Current results refer to samples from different areas throughout the Mediterranean Sea where the species occurs and point out an evident lack of genetic differentiation; this has already been reported at smaller geographic scales and less extended sampling points. The present study, conducted with a high number of nuclear DNA markers and a big number of samples/sampling areas, also revealed no distinct sub-populations and low genetic heterogeneity. This can be attributed to the high dispersal abilities of the red shrimps during both adult and larval stages. Last, we discuss the need to obtain a high-quality data set for the analysis, with no or little missing data, and the potential problems that may arise because of them.

Key words: *Aristaeomorpha foliacea*, Mediterranean, ddRADseq, SNPs, larval dispersal



Εισαγωγή

Οργανισμός μελέτης και Συστηματική

Η μεγάλη κόκκινη γαρίδα (giant red shrimp, *Aristaeomorpha foliacea*) (Εικόνα 1) είναι ένα κοσμοπολίτικο βενθοπελαγικό είδος γαρίδας. Περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τον Giuseppe Antonio Risso το 1827 στη θάλασσα της Λιγυρίας.

Ταξινομείται στην τάξη των δεκαπόδων, και στην οικογένεια των Aristeidae (Farfante, 1997) (Πίνακας 1). Μαζί με το μερικώς συμπατρικό του είδος *Aristeus antennatus* αποτελούν τους μόνους εκπροσώπους της οικογένειας αυτής στη Μεσόγειο (Cau et al., 2002).

Πίνακας 1: Η πλήρης ταξινομική κατάταξη του είδους *Aristaeomorpha foliacea*

Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Arthropoda
Υποφύλο	Crustacea
Υπερκλάση	Multicrustacea
Κλάση Class	Malacostraca
Υποκλάση	Eumalacostraca
Υπερτάξη	Eucarida
Τάξη Order	Decapoda
Υποτάξη	Dendrobranchiata
Υπεροικογένεια	Penaeoidea
Οικογένεια	Aristeidae
Γένος	<i>Aristaeomorpha</i>
Είδος	<i>Aristaeomorpha foliacea</i>

Μορφολογία

Τα χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν το είδος σε σχέση με τα πιο συγγενικά του είναι η παρουσία ηπατικής άκανθας, και 3 έως 6 «δοντιών» στο πάνω μέρος του ασπιδίου του, της μυτερής προεξοχής του κελύφους πάνω από το κεφάλι του (Dall, 2001; Tavares, 2016) (Εικόνα 2). Το είδος παρουσιάζει σεξουαλικό διμορφισμό. Τα θηλυκά και τα ανώριμα άτομα ξεχωρίζουν από τα αρσενικά, από το μήκος του ασπιδίου τους. Στα αρσενικά είναι πολύ μικρότερο, όπως και το μέγεθος του σώματος τους συνολικά. Επίσης τα άτομα του είδους

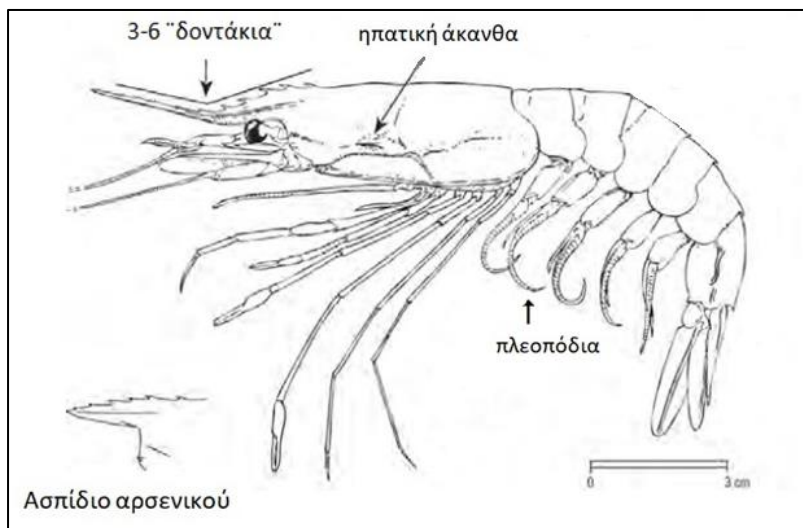


έχουν ελαφρύ εξωσκελετό και μακριά πλεοπόδια που υποδηλώνουν καλή κολυμβητική ικανότητα (Cau et al., 2002).

Το μέσο μέγεθος του κεφαλοθώρακα είναι 39-40 και 32-34mm για τα θηλυκά και τα αρσενικά αντίστοιχα (Guijarro et al., 2019) ενώ θεωρείται ότι ζουν έως 10 χρόνια με τα θηλυκά να αναπτύσσονται ταχύτερα και να ζουν περισσότερο από τα αρσενικά (Ragonese, 2018).



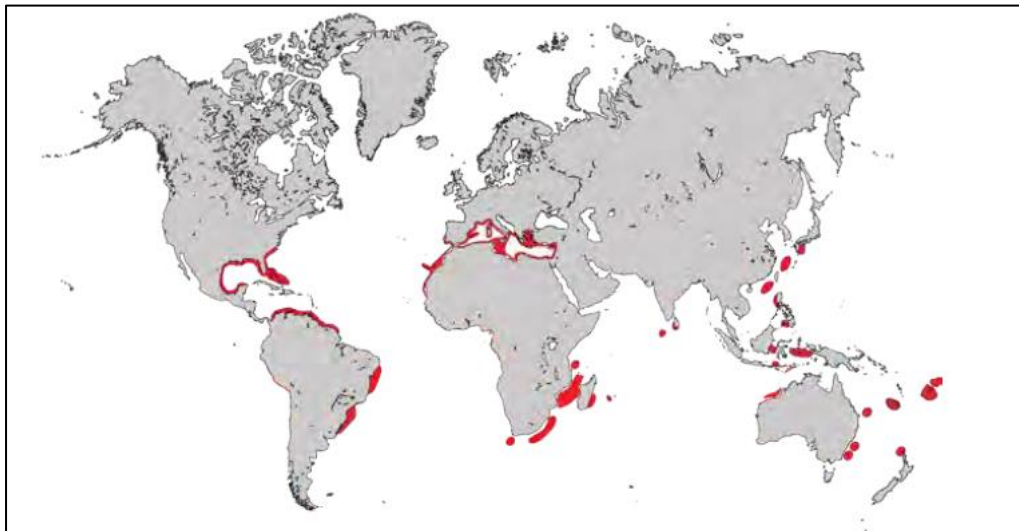
Εικόνα 1. *Aristaeomorpha foliacea* (θηλυκό) (από Tin-Yam Chan)



Εικόνα 2. *Aristaeomorpha foliacea* (Fischer_1981). Ονόματα κατά FAO: giant red shrimp (En), gambon rouge (Fr), gamba Espanola (Es). Χρώμα: κόκκινο με πιο σκούρες αποχρώσεις στην πάνω πλευρά του κεφαλοθώρακα

Εξάπλωση & οικολογία

Το είδος *Aristaeomorpha foliacea* απαντάται στη Μεσόγειο θάλασσα, τη νότια Αφρική, τον Ατλαντικό και Ινδικό ωκεανό και στον δυτικό Ειρηνικό, σε Ιαπωνία, Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, νησιά Φίτζι κ.α. (Εικόνα 3). Η κατανομή αυτή καθιστά πιθανή την καταγωγή της από την Μεσοζωική λεκάνη της Τιθύος η οποία εκτεινόταν από τη σημερινή Καραϊβική έως τον Ινδικό ωκεανό και περιλάμβανε τη Μεσόγειο θάλασσα. (Cau et al., 2002).



Εικόνα 3. Γεωγραφική κατανομή της κόκκινης γαρίδας *A. foliacea*. Δυτικός Ατλαντικός: Νότια της Μασαχουσέτης έως τη Φλόριντα, κόλπος Μεξικού, Κολομβία, Βενεζουέλα. Ανατολικός Ατλαντικός: Βισκαϊκός κόλπος έως τη Νοτιοδυτική Σαχάρα και Μεσόγειος θάλασσα (Holthuis 1980). Ινδικός- δυτικός Ειρηνικός ωκεανός: Νότιος Αφρική, Μοζαμβίκη, Μαδαγασκάρη, Μαλδίβες, Σρι Λάνκα, Ινδονησία, Φιλιππίνες, θάλασσα της Κίνας, Ιαπωνία, Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, νησιά Φίτζι και αλλού. (Dall, 2001)

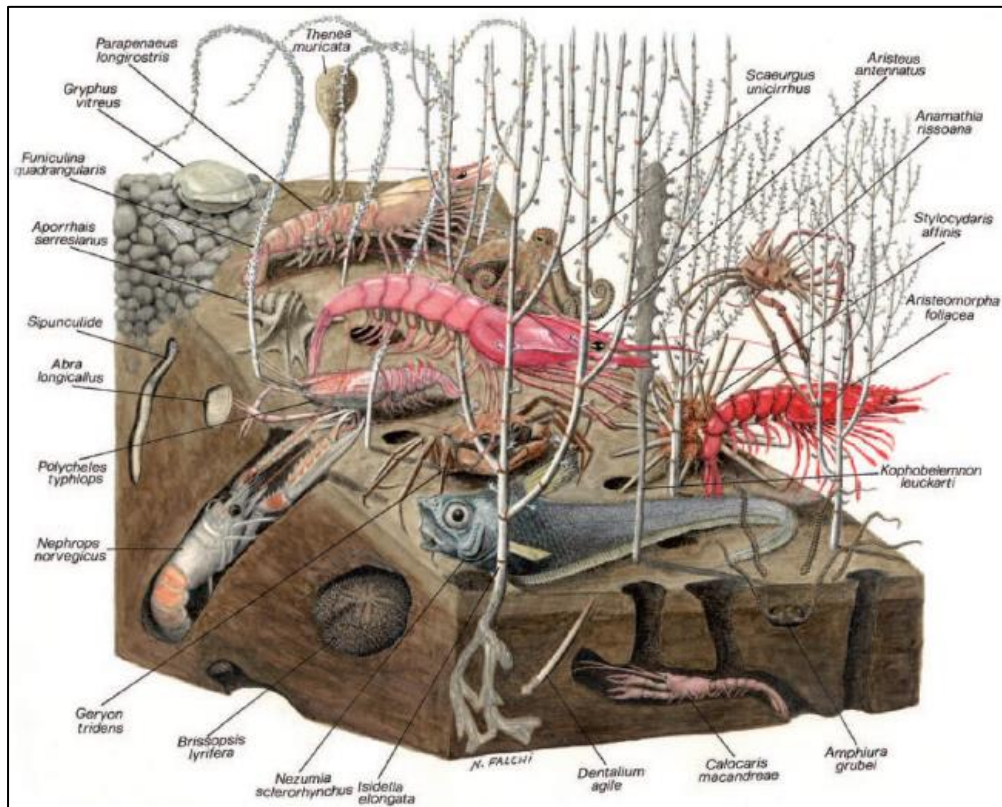
Αν και θεωρείται είδος της βαθιάς θάλασσας, εμφανίζει αρκετά ευρεία βαθυμετρική κατανομή, απαντάται σε βάθη από 60 ως 1.330 μέτρα της ηπειρωτικής κατωφέρειας (Guijarro et al., 2019) με μεγαλύτερη αφθονία σε βάθη από 400 ως 900 μέτρα (Politou et al., 2004). Στη Μεσόγειο θάλασσα, η κατανομή του εμφανίζει μωσαϊκό πρότυπο κατανομής και διαβάθμιση σε σχέση με το γεωγραφικό μήκος, με μικρή πλέον αφθονία στο δυτικό τμήμα της, ενώ αλιεύεται συστηματικά στην κεντρική και πιο πρόσφατα και στην ανατολική Μεσόγειο (Cau et al., 2002). Αυτό το πρότυπο κατανομής πιθανότατα εξηγείται από τη



διαφορετική αλιευτική πίεση που ασκείται στη δυτική σε σχέση με την ανατολική Μεσόγειο, αλλά και σε διαφορές στα ωκεανογραφικά χαρακτηριστικά, στη διαθεσιμότητα τροφής και στην επιτυχημένη στρατολόγηση (*recruitment*) νέων ατόμων (Masnadi et al., 2018; Rinelli et al., 2013).

Ενδιαίτημα

Οι (Cartes et al., 2014) αναφέρουν ως βέλτιστο ενδιαίτημα του είδους στη Μεσόγειο την Τυρρηνική θάλασσα, τα στενά της Σικελίας και το Ιόνιο, με την έννοια ότι εκεί βρέθηκε το μέγιστο της πληρότητας στομάχου, της ποικιλίας τροφής και του ηπατο-σωματικού δείκτη. Οι περιοχές αυτές έχουν και τη μεγαλύτερη πυκνότητα κόκκινων γαρίδων στη Μεσόγειο. Παλαιότερα κυριαρχούσε η άποψη ότι προτιμά να ζει σε λασπώδεις βυθούς όπου συνυπήρχε με το ασπόνδυλο κοραλλιογενές μπαμπού *Isidella elongate*. Σήμερα πιστεύεται ότι αυτό δεν ισχύει, και το είδος απαντάται σε μια ποικιλία βυθών, είτε μέσα σε υποθαλάσσια φαράγγια, είτε γύρω από υποθαλάσσια βουνά, ή σε περιοχές με κοράλλια χωρίς ιδιαίτερη προτίμηση για το *Isidella elongate* (Ragonese, 2018) (Εικόνα 4). Σε ότι αφορά τη διατροφή του, πάνω από 90 διαφορετικά είδη τροφής βρέθηκαν στο εσωτερικό του στομάχου του μαζί με φύλλα από χερσαία φυτά ή από λιβάδια ποσειδωνίας (Cartes et al., 2014; Ragonese, 2018) Επομένως θεωρείται είδος παμφάγο, καιροσκοπικό που παρουσιάζει επίσης τάσεις κανιβαλισμού και πτωματοφαγίας, ενώ δεν έχει συγκεκριμένους θηρευτές. Το πιθανότερο είναι ότι θηρεύεται από μεγαλύτερα ψάρια και καρχαρίες (Ragonese, 2018).



Εικόνα 4. Αναπαράσταση ενδιαιτήματος για την κόκκινη γαρίδα στη Μεσόγειο, από τον Falchi. (Ragonese, 2018).

Αλιεία

Η εκμετάλλευση των αποθεμάτων του είδους ξεκίνησε στη Μεσόγειο στα μισά του 20ου αιώνα (Cau et al., 2002). Σήμερα, αποτελεί ένα από τα πιο εμπορικά είδη της βαθιάς θάλασσας στη Μεσόγειο, ιδιαίτερα στη ζώνη 400 με 800μ που έχει τη μεγαλύτερη αφθονία του, περιζήτητο ειδικά στην Ιταλική αγορά. Τα αποθέματά του, με βάση τις πιο πρόσφατες εκτιμήσεις, έδειξαν μια γενικευμένη τάση υπερεκμετάλλευσης στη δυτική και κεντρική Μεσόγειο, κάνοντας φανερή τη σημασία της σωστής διαχείρισής τους (GFCM, 2017).

Στην έκθεση του 2018 του οργανισμού γεωργίας και τροφίμων των Ηνωμένων Εθνών για τη Μεσόγειο (GFCM), η κόκκινη γαρίδα συμπεριλαμβάνεται στα πιο σημαντικά είδη και η οικονομική της αξία αποτιμάται σε 50 εκατομμύρια δολάρια. Από την άποψη της ποσότητας των εκφορτώσεων, είναι το τρίτο είδος στην αλιεία με τράτα στη Μεσόγειο. (FAO, GFCM 2018). Είναι δε τόσο σημαντικό είδος που η διαχείριση της αλιείας του αποτέλεσε



αντικείμενο διαπραγματεύσεων για πολλά χρόνια μεταξύ Ελλάδας και Ιταλίας, στη συζήτηση για την υπογραφή Αποκλειστικής Οικονομικής Ζώνης (ΑΟΖ) μεταξύ των δύο χωρών, ενώ υπάρχουν και γραμματόσημα σε χώρες της μεσογείου που απεικονίζουν την κόκκινη γαρίδα (Εικόνα 5)



Εικόνα 5. Γραμματόσημα που απεικονίζουν την κόκκινη γαρίδα (Noël, 2015a)

Θωρείται είδος αρκετά ευάλωτο στην αλιευτική πίεση για δύο κυρίως λόγους: (α) Το γεγονός ότι η κατανομή και η στρατολόγησή του παρατηρούνται στα βάθη όπου φτάνει η τράτα κι όχι σε μεγαλύτερα, δείχνουν ότι η κόκκινη γαρίδα είναι αρκετά ευάλωτη στην αλιευτική πίεση. Δεν υπάρχουν δηλαδή πληθυσμοί σε μεγαλύτερα βάθη που θα μπορούσαν να δράσουν ως απόθεμα για την ανανέωσή τους, και (β) τα θηλυκά ωριμάζουν σε σχετικά μεγάλη ηλικία, μετά τον πρώτο χρόνο και επομένως υπάρχει ο κίνδυνος της αλίευσής τους, πριν προλάβουν να αναπαραχθούν.

Η αλιεία των κόκκινων γαρίδων ξεκίνησε μετά τη δεκαετία του 1920 στις ακτές της Β. Αφρικής και στη θάλασσα της Λιγουρίας, ενώ υπάρχουν αναφορές για εκφορτώσεις κόκκινων γαρίδων στις Βαlearίδες νήσους από το 1948. Αλιεύεται και σε πολλές περιοχές εκτός της Μεσογείου, όπως στα ανοιχτά της Βραζιλίας, στην Ινδία και την Αυστραλία. (Ragonese, 2018). Η αλιεία του γίνεται με συρόμενα εργαλεία κατά τη διάρκεια της μέρας, διότι τη νύχτα πραγματοποιεί κατακόρυφες μετακινήσεις στη στήλη του νερού για να τραφεί (Cartes et al., 1993; Rainer, 1992). Σε αρκετές εργασίες μελετάται παράλληλα με το συμπατρικό του είδος, τη γαλαζοκόκκινη γαρίδα *Aristeus antennatus* που συνυπάρχει στα ίδια βάθη με την κόκκινη γαρίδα αλλά εκτείνεται σε ακόμη μεγαλύτερα, και παρουσιάζει μεγαλύτερη αφθονία στη δυτική Μεσόγειο απ' ότι στην ανατολική (Cartes et al., 2011). Γενικά τα αποθέματα του *Aristaeomorpha foliacea* στην ανατολική Μεσόγειο θεωρούνται σημαντικά, απέχουν ακόμη



από την πλήρη εκμετάλλευσή τους (Kariris & Thessalou-Legaki, 2009), πιθανότατα λόγω της μικρής σχετικά αλιευτικής πίεσης που δέχονται ως τώρα.

Αναπαραγωγή

Η αναπαραγωγή του είδους γίνεται με σύζευξη, όπου το αρσενικό μεταφέρει τα σπερματοφόρα στο θηλυκό κι αυτό τα διατηρεί πάνω του μέχρι να ωριμάσουν οι γονάδες του. Ο χρόνος που μεσολαβεί από τη σύζευξη έως την ωρίμανση των γονάδων μπορεί να φτάσει τους 4 μήνες (Kariris & Thessalou-Legaki, 2009). Όπως στα περισσότερα καρκινοειδή, το ζευγάρι θεωρείται ότι συμβαίνει μεταξύ ενός ώριμου αρσενικού κι ενός ανεπτυγμένου αλλά όχι πλήρως ώριμου θηλυκού που έχει εκδυθεί (Ragonese, 2018). Η όλη αναπαραγωγική διαδικασία ξεκινά την άνοιξη και συνεχίζεται ως τις αρχές του φθινοπώρου, ενώ έχει βρεθεί ότι στο ανατολικό Ιόνιο τα άτομα ωριμάζουν νωρίτερα απ' ότι στη δυτική Μεσόγειο, πιθανόν λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας που επικρατεί εκεί (Malanotte-Rizzoli et al., 1999). Η συνολική δραστηριότητα αναπαραγωγής στην κόκκινη γαρίδα διαρκεί περισσότερο στην ανατολική μεσόγειο, σε σχέση με την κεντρική (Kariris & Thessalou-Legaki, 2009).

Η ωρίμανση των θηλυκών γίνεται μετά τον πρώτο χρόνο της ζωής τους, με τα μεγαλύτερα θηλυκά να εμφανίζουν μακρύτερη αναπαραγωγική περίοδο σε σχέση με τα μικρότερα. Τα πολύ μικρά δε, δηλαδή εκείνα με μήκος κεφαλοθώρακα μικρότερο των 30 χιλ, δε συμμετέχουν καθόλου στην αναπαραγωγή (Kariris & Thessalou-Legaki, 2009). Σε γενικές γραμμές όλα τα αρσενικά με μέγεθος κεφαλοθώρακα πάνω από 30-33χιλ είναι ώριμα, έτοιμα για αναπαραγωγή, ενώ στα θηλυκά το μέγεθος κατά το οποίο το 50% είναι ώριμο είναι τα 35-40χιλ. (Ragonese, 2018).

Μέγεθος γονιδιώματος

Οι (Deiana et al., 1998) αναφέρουν ότι το μέγεθος του γονιδιώματος της κόκκινης γαρίδας είναι περίπου 5Gbp (το απλοειδές), ενώ σε άλλη εργασία (Ragonese, 2018b) (Deiana et al.,



1993) διερευνάται το πρότυπο των χρωμοσωμάτων στο είδος κι εκτιμάται ότι αυτό είναι διπλοειδές με 74-78 χρωμοσώματα.

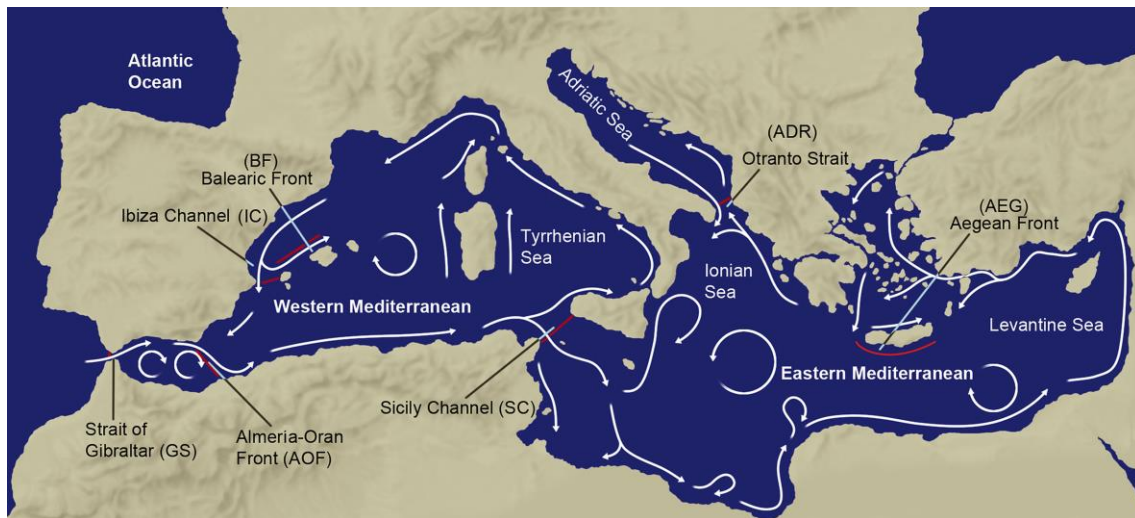
Φυλογεωγραφία

Η φυλογεωγραφία ασχολείται με τις αρχές και τις διαδικασίες που καθορίζουν τα γεωγραφικά πρότυπα των γενεαλογικών γραμμών, ειδικά εκείνων εντός του είδους, αλλά ακόμα και μεταξύ στενά συγγενικών εξελικτικά ειδών (Avice, 2000). Προσπαθεί να ερμηνεύσει τον τρόπο και το βαθμό στον οποίο διάφορες ιστορικές διαδικασίες που σχετίζονται με τη δημογραφία των πληθυσμών, έχουν αφήσει τα εξελικτικά τους αποτυπώματα στη σύγχρονη γεωγραφική κατανομή των γονιδιακών γραμμών των οργανισμών.

Οι δύο κύριοι και συχνά ανταγωνιστικοί παράγοντες που καθορίζουν ο καθένας με το δικό του τρόπο την προέλευση του χωρικού διαχωρισμού των ταξινομικών μονάδων, είναι ο βικαριανισμός και η διασπορά. Στον πρώτο, ένας πληθυσμός μπορεί να κατακερματιστεί λόγω περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως φαινόμενα ορογένεσης, σπασίματα ηπειρωτικών μαζών, ευστατικά φαινόμενα (Croizat et al., 1974; Myers & Giller, 1988), ενώ στη διασπορά μια ταξινομική μονάδα μπορεί να αποκτήσει τη σημερινή της κατανομή μέσω ενεργητικής ή παθητικής διασποράς από ένα ή περισσότερα προγονικά κέντρα προέλευσης (Briggs, 1974). Η μελέτη της φυλογεωγραφίας βασίζεται στην ανίχνευση της γενετικής ποικιλότητας με τη χρήση μοριακών δεικτών. Με βάση τη συνθήκη της βιολογικής ποικιλότητας του Ρίο (1992), η γενετική ποικιλότητα είναι το πρώτο και βασικό επίπεδο ποικιλότητας που χρήζει προστασίας και αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά γνωρίσματα κάθε πληθυσμού. Λόγω του ότι το περιβάλλον αλλάζει συνεχώς, η γενετική ποικιλότητα είναι αναγκαία και πρέπει να διατηρείται, ώστε οι πληθυσμοί να έχουν την δυνατότητα να αλλάζουν και να προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες.

Για τους θαλάσσιους οργανισμούς, η ανθρώπινη δραστηριότητα μέσω της αλιείας κυρίως στα ιστορικά χρόνια, επιδρά και διαμορφώνει τη δυναμική των πληθυσμών. Υπάρχουν όμως και άλλοι παράγοντες, όπως η θαλάσσια γεωμορφολογία και τα ωκεάνια ρεύματα που δημιουργούν γεωγραφικές και ωκεανογραφικές ασυνέχειες, οι οποίες μπορούν να

μειώσουν τη συνδεσιμότητα και να επηρεάσουν τη δομή των πληθυσμών. Στη Μεσόγειο θάλασσα, τα κυριότερα γεωγραφικά και ωκεανογραφικά φράγματα που πιθανώς να εμποδίζουν τη γονιδιακή ροή, φαίνονται στην εικόνα 6 (με κόκκινες γραμμές) και είναι τα στενά του Γιβραλτάρ, το μέτωπο μεταξύ Αλμερίας και Οράν, το στενό της Ίμπιζα, το μέτωπο των Βαλεαρίδων, τα στενά μεταξύ της Σικελίας και της Τυνησίας, το στενό του Οτράντο και το νότιο όριο του Αιγαίου, κάτω από την Κρήτη (Pascual et al., 2017).



Εικόνα 6. Κύρια γεωγραφικά & ωκεανογραφικά φράγματα στη Μεσόγειο

Μοριακοί δείκτες

Στο παρελθόν, η μελέτη των οργανισμών και των αλληλεπιδράσεων αυτών μεταξύ τους ή με το περιβάλλον τους γινόταν μέσω παρατηρήσεων και πειραμάτων πεδίου, που οδηγούσαν στη συλλογή φαινοτυπικών δεδομένων, που σχετίζονταν με την μορφολογία, τη φυσιολογία, τη βιοχημεία και την ηθολογία των οργανισμών. Ωστόσο, η χρήση των φαινοτυπικών δεδομένων υποβαθμίστηκε εξαιτίας της πλαστικότητας τους και η έρευνα στράφηκε στα γενετικά δεδομένα που επιτρέπουν την άμεση κι αντικειμενική ποσοτικοποίηση της γενετικής ποικιλότητας, τόσο μεταξύ ατόμων ενός πληθυσμού όσο και μεταξύ πληθυσμών. Οι σύγχρονοι δείκτες που χρησιμοποιούνται στη μοριακή οικολογία είναι δείκτες DNA και βασίζονται είτε στον πολυμορφισμό μεγέθους όπως τα μικροδορυφορικά, είτε στον



πολυμορφισμό θέσης (αλληλουχίας) όπως οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*).

Το SNP αναφέρεται σε διαφοροποίηση θέσης (αλληλουχίας), όπου ένα νουκλεοτίδιο (A, T, C ή G) σε ένα σημείο του γονιδιώματος διαφέρει στο άτομο (όσον αφορά στο πυρηνικό DNA) αλλά και μεταξύ των ατόμων ενός είδους ή ενός πληθυσμού. Τα περισσότερα SNPs έχουν μόνο δύο διαφορετικές καταστάσεις σε όλα τα άτομα, δηλαδή έχουν μόνο δύο αλληλόμορφα και γι' αυτό ονομάζονται δι-αλληλικά, χωρίς όμως αυτό να είναι απόλυτο.

Ο μεταλλακτικός ρυθμός των SNPs είναι της τάξης του 10^{-8} - 10^{-9} (Brumfield et al., 2003) και θεωρείται σχετικά μικρός, μικρότερος σε σχέση με άλλους δείκτες όπως τα μικροδορυφορικά. Το μειονέκτημα αυτό, όπως και η χαμηλή ποικιλομορφία τους, αντισταθμίζεται από το γεγονός ότι είναι πολύ μεγάλος ο αριθμός τους στο γονιδίωμα (κάθε 300-1000bp σε είδη όπως ο άνθρωπος, το δελφίνι, ο παπαγάλος) (Brumfield et al., 2003), καθώς και από το ότι δεν εμφανίζουν ομοπλασία όπως τα μικροδορυφορικά. Ως εκ τούτου, τα SNPs αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο γενετικό δείκτη για την αποσαφήνιση ερωτημάτων της Μοριακής Οικολογίας, για μελέτες πληθυσμιακής γενετικής, δημογραφίας, προσαρμογής κι εξέλιξης (Morin et al., 2004). Ιδιαίτερα σήμερα, που με τη χρήση τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς (*Next Generation Sequencing, NGS*) μπορούμε να καταλήξουμε σε πολύ μεγάλο αριθμό δεικτών SNPs και επομένως να έχουμε πολύ καλύτερη αντιπροσώπευση του γονιδιώματος, οι δείκτες αυτοί χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο.

Φυλογεωγραφικές μελέτες του *A. foliaceus* στη Μεσόγειο

Έως σήμερα, έχει γίνει μικρός αριθμός γενετικών μελετών του είδους στη Μεσόγειο. Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πυρηνικού ή μιτοχονδριακού DNA, είτε αλληλουχίες DNA είτε μικροδορυφορικά / δείκτες ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (M. V. Fernández et al., 2011; M. V. Fernández, Heras, Viñas, et al., 2013; M. V. Fernández, Heras, Maltagliati, et al., 2013; Marcias et al., 2010) με περιορισμένη δειγματοληψία. Οι μελέτες αυτές είχαν δείξει έλλειψη γενετικής δομής στη Μεσόγειο και συνοψίζονται στον πίνακα 1. Παραμένει όμως το ερώτημα αν αυτό είναι αληθές, ή αν οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν



κατάλληλοι, ή επαρκείς, για να δείξουν πιθανές γενετικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των πληθυσμών του είδους στη Μεσόγειο.

Πίνακας 1. Ανασκόπηση εργασιών πληθυσμιακής γενετικής στο είδος *Aristaeomorpha foliacea* στη Μεσόγειο

Εργασία	Marcias, S., F. Sacco, A. Cau & R. Cannas, 2010	Fernández, M. V., F. Maltagliati, F. G. Pannacciulli & M. I. Roldán, 2011	Fernández MV, Heras S, Maltagliati F, Roldan MI. 2013a	Fernández, M. V., S. Heras, J. Vinas, F. Maltagliati & M. I. Roldan, 2013b
Αριθμός ατόμων	115 άτομα από κεντρική Μεσόγειο. 4 πληθυσμοί από Σαρδηνία, 2 από Σικελία	295 άτομα, 6 πληθυσμοί από Δυτική, κεντρική και Ανατολική Μεσόγειο, 1 από Μοζαμβίκη	317 άτομα 6 πληθυσμοί από Μεσόγειο, 1 της Μοζαμβίκης και 1 της ΒΔ Αυστραλίας	40 άτομα, 10 από κάθε περιοχή και 4 περιοχές, ανατολική, δυτική Μεσόγειος, Μοζαμβίκη και ΒΔ Αυστραλία.
Μοριακοί δείκτες	6 μικροδο- ρυφορικοί τόποι	5 δείκτες ISSR	Αλληλουχία 685bp (COI) mtDNA	2 γονίδια πυρηνικού DNA (PEPCK, NaK) και ένα mtDNA (COI).
Αποτελέσματα				
Ετεροζυγωτία		Μέση ετεροζυγωτία $H = 0.105 \pm 0.015$		Για τα δείγματα της Μεσογείου οι τιμές ήταν μεταξύ 0.6 έως 0.7 για το PEPCK, και 1 για το NaK



Απλοτυπική ποικιλότητα			Τιμές από 0.511±0.081 έως 0.775±0.058	Τιμές από 0.644±0.152 έως 0.756±0.130
Τιμές Fst	Χαμηλές, στατιστικά μη σημαντικές	Μέγιστη τιμή 0.0373 μεταξύ πληθυσμών της κεντρικής Μεσογείου	Μέγιστη τιμή 0.382, σημαντική στατιστικά, μεταξύ πληθυσμών Ανατολικής-Δυτικής Μεσογείου	
STRUCTURE ή άλλη ανάλυση βασισμένη σε μπεϋζιανό αλγόριθμο	K=1	K=2, αλλά οι πληθυσμοί δεν διαφοροποιούνται	K=4, τα δείγματα της Μεσογείου μοιράζονται σε δύο γενετικές δεξαμενές, δυτικά υπερισχύει η μια, ενώ ανατολικά η άλλη. Η 3 ^η με δείγματα της Μοζαμβίκης, ενώ η 4 ^η της Αυστραλίας	2 κύριες γενεαλογικές γραμμές ανιχνεύτηκαν, η μια αφορά τα δείγματα της Αυστραλίας και η άλλη τα δείγματα Μεσογείου και Μοζαμβίκης, με τη γραμμή της Μεσογείου να εμφανίζεται μονοφυλετική.
AMOVA	Το 99.31% της διαφοροποίησης οφείλεται σε	>98% της διαφοροποίησης οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των ατόμων μέσα στους πληθυσμούς	Με τους πληθυσμούς της Μεσογείου	87.4% της διαφοροποίησης αποδίδεται σε διαφορές μεταξύ



	διαφορές μεταξύ των ατόμων μέσα στους πληθυσμούς		μόνο, χωρίς ομαδοποίηση, $F_{ST}=0.169$. Με τα ίδια άτομα σε δύο ομάδες, (Αν-Δ) Μεσόγειος, $F_{CT}=0.233$, αλλά η τιμή είναι στατιστικά μη σημαντική	των 4 περιοχών, Ανατολικής-Δυτικής Μεσογείου-Μοζαμβίκης-ΒΔ Αυστραλίας. Η τιμή αυτή είναι στατιστικά σημαντική
PCA	Ένας ομοιογενής πληθυσμός	—	—	—

Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα εργασία, διερευνώνται τα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας του *A. foliaceae* και η γενετική δομή των πληθυσμών του στη Μεσόγειο. Η μελέτη βασίζεται σε μια εκτεταμένη δειγματοληψία που έγινε στα πλαίσια ενός Ευρωπαϊκού προγράμματος το οποίο στοχεύει στην οριοθέτηση των ιχθυοαποθεμάτων 6 εμπορικών ειδών στη Μεσόγειο. Συλλέχθηκαν περίπου 1.700 δείγματα από 32 πληθυσμούς, από 15 GSAs (*Geographic Sub Areas*, Εικόνα 7), που καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής εξάπλωσης του είδους στη Μεσόγειο. Ως μοριακοί δείκτες για τις αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής επιλέχθηκαν οι σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) που εντοπίστηκαν με τη μεθοδολογική προσέγγιση γονοτύπησης ddRAD (*double-digest Restriction site Associated DNA*). Με τη μέθοδο αυτή, κατασκευάζονται αρχικά βιβλιοθήκες χαμηλής αντιπροσώπευσης του γονιδιώματος με τη



χρήση περιοριστικών ενζύμων και η γονοτύπηση γίνεται μέσω αλληλούχησης (*Genotype-by-sequencing*) νέας γενιάς.

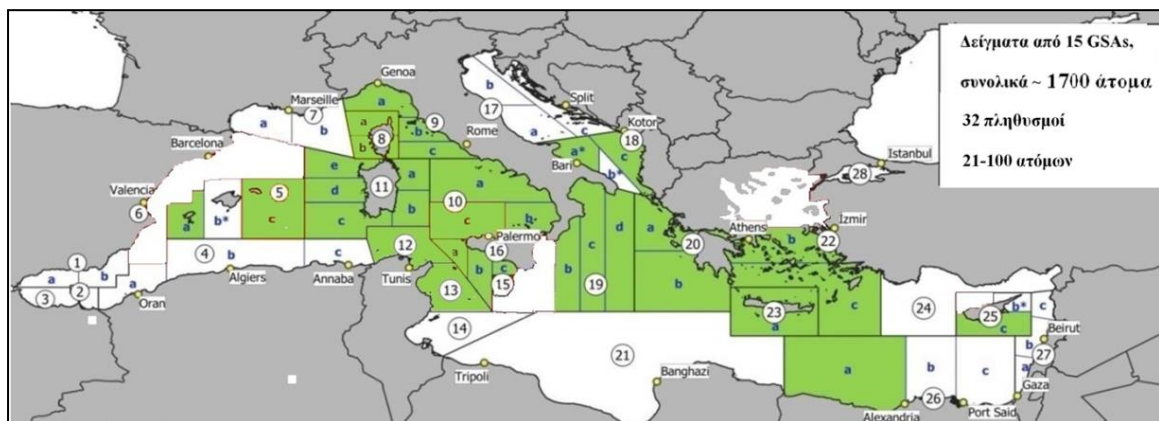
Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει τον ταυτόχρονο εντοπισμό και γονοτύπηση ενός μεγάλου αριθμού μοριακών δεικτών. Στη συνέχεια ειδικά λογισμικά βιοπληροφορικής αναλύουν τα γενετικά δεδομένα για την εξαγωγή συμπερασμάτων για τις σχέσεις μεταξύ των πληθυσμών.

Τα αποτελέσματα αναμένεται να χρησιμοποιηθούν από τους φορείς διαχείρισης αλιευμάτων με σκοπό την περιγραφή και την υιοθέτηση κατάλληλων μέτρων για τη βιώσιμη διαχείριση του είδους στη Μεσόγειο.

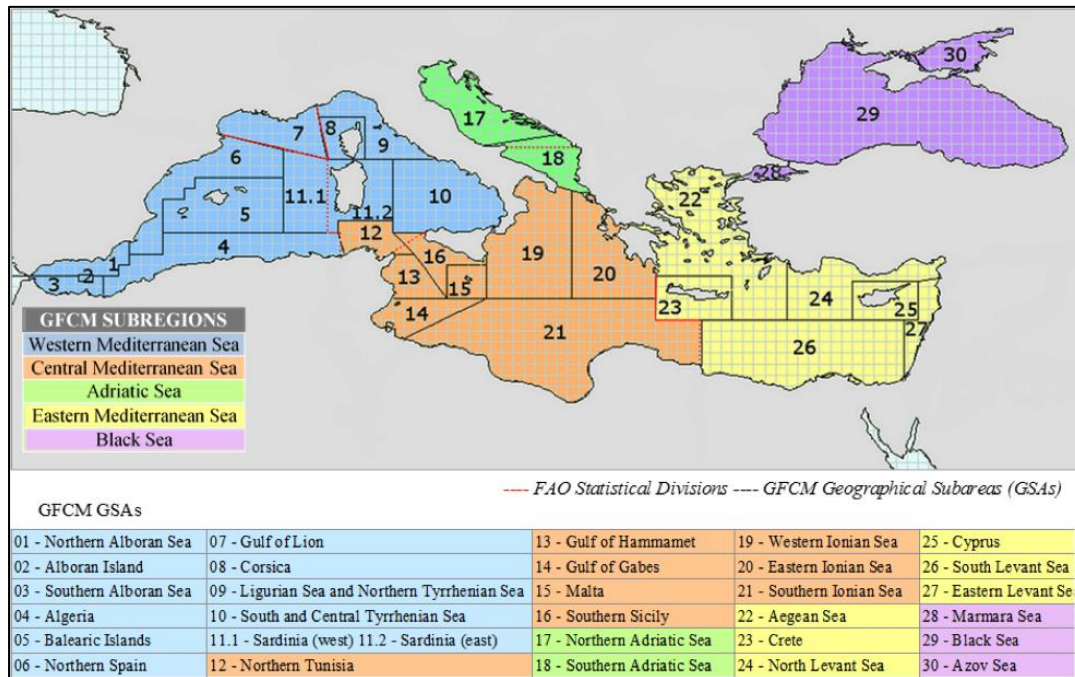
Υλικά και μέθοδοι

Δειγματοληψία

Συνολικά συλλέχθηκαν 1.692 δείγματα γαρίδας από 32 πληθυσμούς που αντιστοιχούν σε 15 GSAs (*geographic sub areas*), ώστε να καλυφθεί ένα μεγάλο μέρος της κατανομής του είδους στη Μεσόγειο. Οι περιοχές της δειγματοληψίας είναι αυτές με το πράσινο χρώμα στο χάρτη (Εικόνα 7). Η Μεσόγειος θάλασσα έχει χωριστεί σε γεωγραφικές υποπεριοχές για λόγους διαχείρισης της αλιείας των ειδών (Εικόνα 8).



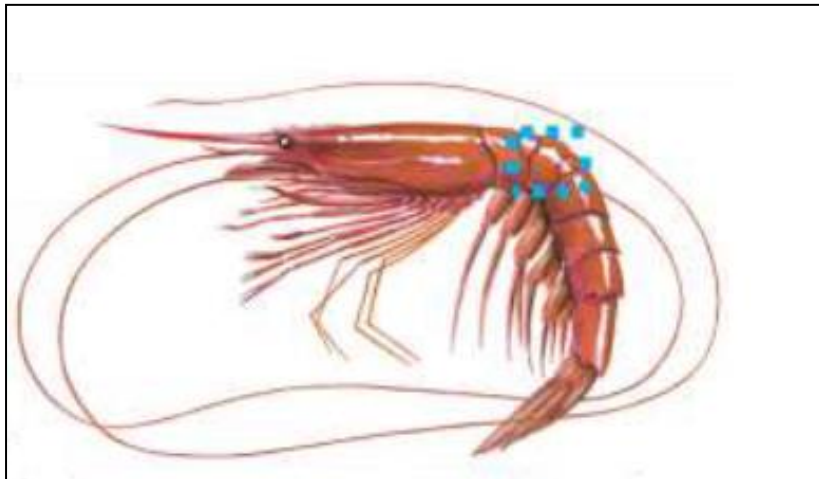
Εικόνα 7. Χάρτης δειγματοληψίας για την κόκκινη γαρίδα *Aristaeomorpha foliacea*



Εικόνα 8. GSA: Γεωγραφικές υπο-περιοχές της Μεσογείου κατά FAO-GFCM (Γενική Διεύθυνση Αλιείας για τη Μεσόγειο, Οργανισμός γεωργίας και τροφίμων, Ο.Η.Ε).

Τα δείγματα ήταν τμήματα μυϊκού ιστού (Εικόνα 9) που ελήφθησαν από φρέσκα αλιεύματα επί του σκάφους. Η συλλογή τους έγινε από συνεργάτες του προγράμματος ή από επαγγελματίες αλιείς σύμφωνα με συγκεκριμένο πρωτόκολλο (βλ. Παράρτημα) που είχε δοθεί και αφορούσε τον τρόπο συλλογής και συντήρησης των δειγμάτων μέχρι να σταλούν στο εργαστήριο.

Οι οδηγίες ήταν τα δείγματα να συλλέγονται με καθαρές κάθε φορά λεπίδες για το κόψιμο του ιστού για την αποφυγή επιμόλυνσης, και η διαδικασία να γίνεται το συντομότερο αφού αλιευθούν. Το τελευταίο αποδείχθηκε πολύ σημαντικό για την ποιότητα του εξαγόμενου DNA, μαζί με την τοποθέτηση μικρής μόνο ποσότητας ιστού σε φιαλίδιο με αιθανόλη, ώστε να υπάρχει μεγάλη αναλογία αιθανόλης-ιστού για την καλύτερη συντήρησή του.



Εικόνα 9. Το μπλε ορθογώνιο απεικονίζει το σημείο της δειγματοληψίας στο είδος *Aristaeomorpha foliacea*, αφού αφαιρέθηκε ο κεφαλοθώρακας (το καύκαλο).

Εξαγωγή DNA από τα δείγματα-Επώαση με RNase-Ποιοτικός, ποσοτικός έλεγχος

Η μεθοδολογική προσέγγιση της γονοτύπησης μέσω αλληλούχησης με την τεχνική ddRADseq που ακολουθήθηκε στην εργασία αυτή, απαιτεί την όσο το δυνατόν καλύτερης ποιότητας αρχικού DNA στα δείγματα, καθώς και πολύ καλή ποσοτικοποίηση (O'Leary et al., 2018). Σε ιδανικές συνθήκες το DNA πρέπει μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης να απεικονίζεται με ζώνες μεγάλου μοριακού βάρους (απουσία μικρού μήκους θραυσμάτων, βλ Εικόνα 10β). Είναι σημαντικό το DNA να μην είναι «κομματιασμένο» (*degraded*) ώστε τα περιοριστικά ένζυμα που δρουν στα αρχικά στάδια της μεθόδου να οδηγούν σε ανάλογου μήκους (ομόλογα) θραύσματα που θα αλληλουχηθούν και θα συγκριθούν στη συνέχεια μεταξύ τους, για να βρεθούν οι πολυμορφισμοί στην αλληλουχία τους. Η ποσοτικοποίηση είναι σημαντικό να είναι ακριβής, ώστε να υπάρχει ισόποση αντιπροσώπευση των ατόμων στις βιβλιοθήκες. Αυτό ιδανικά θα οδηγήσει σε ίσο αριθμό αλληλουχιών ανά δείγμα, στην τελική αλληλούχηση.

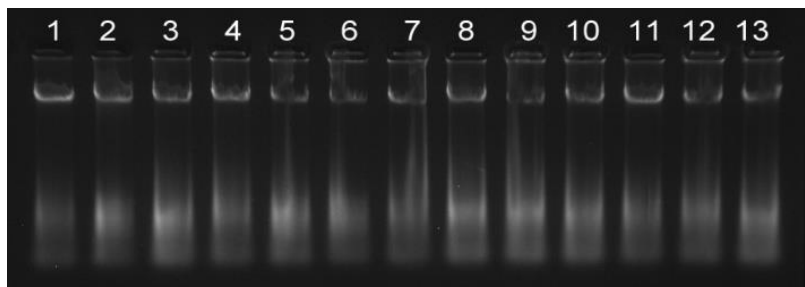
Για την απομόνωση του DNA ακολουθήθηκε τροποποιημένο πρωτόκολλο εξαγωγής με άλας, βασισμένο στην εργασία (Miller et al., 1988) (βλ. Παράρτημα).

Για τον έλεγχο της επιτυχίας απομόνωσης DNA, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ηλεκτροφορήθηκαν 3μl διαλυμένου DNA από κάθε δείγμα, σε πήκτωμα περιεκτικότητας 1%w/v όπου είχε προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) (Εικόνα 10α).

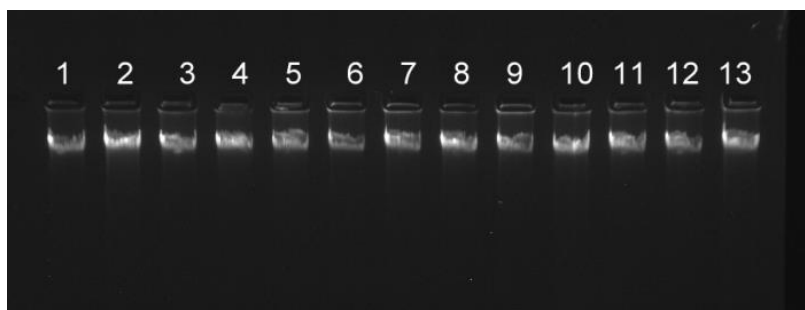


Τα δείγματα που είχαν την επιθυμητή εικόνα (το μεγαλύτερο ποσοστό του DNA να είναι μεγάλου μοριακού βάρους), επώαστηκαν με RNA-άση για να αφαιρεθεί το RNA. Αυτό έγινε γιατί ενδεχόμενη παρουσία του θα μείωνε την ακρίβεια της επακόλουθης ποσοτικοποίησης. Μεταφέρθηκαν 20μl από κάθε δείγμα DNA σε νέους σωλήνες errendorf 1.5ml, όπου προστέθηκαν 5μl ενζύμου RNase cocktail της Invitrogen (μίγμα RNase A (500U/mL) και RNase T1 (20,000U/mL)), αραιωμένου 1/10 και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 3 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1%w/v + EtBr) και απεικόνιση σε φωτογραφία της ποιότητας του DNA (Εικόνα 10β). Από τις φωτογραφίες αυτές έγινε ο ποιοτικός έλεγχος για την επιλογή των δειγμάτων που θα αποτελούσαν την κάθε βιβλιοθήκη. Τα δείγματα κατατάχθηκαν σε 3 κατηγορίες, καλής, μέτριας, και χαμηλής ποιότητας (Εικόνα 11) και τελικά χρησιμοποιήθηκαν αυτά με την καλύτερη εικόνα στην αγαρόζη, από τις δύο πρώτες κατηγορίες.

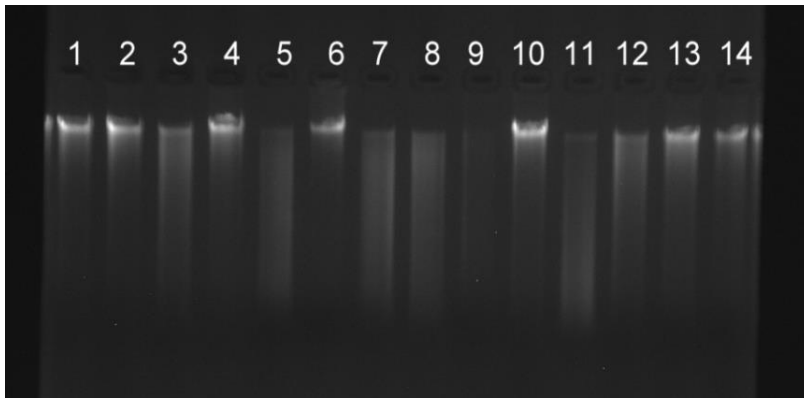
Η ποσοτικοποίηση του DNA (μετά την RNA-άση) των δειγμάτων που θα χρησιμοποιούνταν για τις βιβλιοθήκες, έγινε με ειδικό φωτόμετρο (Qubit 2.0 fluorometer, Invitrogen) και με το Qubit dsDNA BR Assay kit, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Εικόνα 10α. Έλεγχος της επιτυχίας απομόνωσης DNA



Εικόνα 10β. Τα ίδια δείγματα DNA πριν (πάνω) και μετά (κάτω) από την RNA-άση.



Εικόνα 11. Ποιοτικός έλεγχος, δείγματα DNA μετά από RNA-άση. Τα 1, 2, 4, 6, 10, θεωρήθηκαν καλής ποιότητας, τα 3, 12, 13, 14 μέτριας και τα 5, 7, 8, 9, 11 χαμηλής.

Κατασκευή βιβλιοθηκών ddRAD & αλληλούχηση

Η μέθοδος κατασκευής βιβλιοθηκών ddRAD βασίστηκε στο πρωτόκολλο που περιγράφεται στην εργασία Petersen et al. 2012, όπως τροποποιήθηκε στις εργασίες (Manousaki et al., 2016) και (Palaiokostas et al., 2015). Τα κυριότερα στάδια της εργαστηριακής διαδικασίας φαίνονται στην εικόνα 13 και είναι τα εξής:

Τα δείγματα DNA αφού ποσοτικοποιήθηκαν, αραιώθηκαν ώστε να έχουν τελική συγκέντρωση 5ng/ul και τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλάκες 96 θέσεων, το καθένα σε ποσότητα 15ng. Ακολούθησε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *SbfI* (CCTGCA/GG) & *NlaIII* (CATG/). Η επιλογή των ενζύμων έγινε με βάση α) τη διαθεσιμότητα των ανταπτόρων (adapters) στο εργαστήριο γενετικής του Ι.ΘΑ. Β.Β.ΥΚ. ώστε να είναι συμβατά με αυτούς, αλλά, και β) το προφίλ των θραυσμάτων DNA που προέκυψαν για το συγκεκριμένο είδος, μετά από δοκιμές με τα διαθέσιμα περιοριστικά ένζυμα. Στις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη ενζύμων (*SbfI-SphI*) & (*SbfI-NlaIII*).

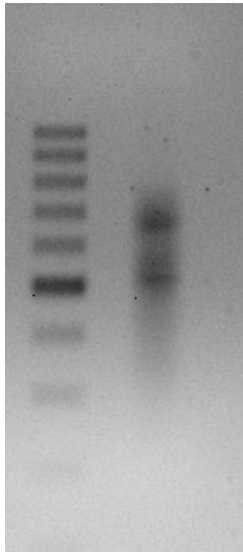
Ακολούθησε η σύνδεση των θραυσμάτων με ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων-ανταπτόρων που έχουν άκρα συμπληρωματικά προς τη μονόκλωνη αλληλουχία που αφήνουν τα περιοριστικά ένζυμα όταν κόβουν το DNA. Οι adapters περιέχουν μια μοναδική αναγνωριστική αλληλουχία (barcode) 5 ή 7 βάσεων, που θα επιτρέψει να αντιστοιχηθεί η τελική αλληλουχία με το άτομο από το οποίο προέκυψε, αλλά και την αλληλουχία που θα αναγνωρίσουν οι primers για την PCR και την αλληλούχηση (Εικόνα 14). Στη συνέχεια, έγινε ενοποίηση όλων των δειγμάτων (*pooling*) σε ένα φιαλίδιο και καθαρισμός αυτού με ειδική κολώνα (MinElute



PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Το στάδιο αυτό επιτρέπει επίσης να συμπυκνωθεί όλο το δείγμα σε μια μικρή ποσότητα του διαλύματος έκλυσης. Επόμενο στάδιο ήταν η επιλογή του μήκους των θραυσμάτων που θα αλληλουχηθούν («παράθυρο», *size selection*). Αυτό έγινε με ειδική συσκευή, το PippinPrep (Sage Science, Beverly, MA, USA). Η επιλογή ενός μέρους μόνο των θραυσμάτων για αλληλούχηση γίνεται για λόγους κόστους κυρίως, αλλά και γιατί τα πολύ μεγάλα θραύσματα στην πράξη είναι μη αξιοποιήσιμα. Τέλος, τα θραύσματα στα οποία έχουν προσδεθεί οι adapters ενισχύθηκαν μέσω PCR κι έγινε διπλός καθαρισμός του τελικού προϊόντος (με κολώνα και μαγνητικά σφαιρίδια). Η αλληλούχηση της βιβλιοθήκης έγινε σε εξωτερικό συνεργάτη σε συσκευή HiSeq4000 της Illumina (Illumina Inc., San Diego, California, USA). Η κάθε βιβλιοθήκη «φορτώθηκε» σε μια λωρίδα (*lane*) από το ειδικό κελί (*flow-cell*) του μηχανήματος και η αλληλούχηση ήταν κι από τα δύο άκρα των θραυσμάτων (*paired-end*) σε μήκος 150bp το κάθε διάβασμα (*forward & reverse reads*).

Το λεγόμενο «παράθυρο» της βιβλιοθήκης στην τεχνική ddRADseq μπορεί να διαφέρει από είδος σε είδος, ανάλογα με το μέγεθος του γονιδιώματος, αν υπάρχουν περιοχές που επαναλαμβάνονται σε αυτό, κ.α. Στην περίπτωση του *A. foliaceae* δεν υπήρχε προηγούμενη γνώση, οπότε επιλέχθηκε να γίνει μια πιλοτική βιβλιοθήκη νωρίς, πριν γίνει μαζικά η ανάλυση των δειγμάτων. Αυτό αποφασίστηκε για να δειχθεί αν η διαλογή του μήκους των θραυσμάτων που έγινε, οδηγούσε α) σε ένα ικανοποιητικό αριθμό δεικτών SNPs που θα ήταν κοινά, ιδανικά σε όλα τα άτομα, αλλά και β) λαμβάνοντας υπόψη τους συγκεκριμένους πόρους αλληλούχησης, σε αλληλουχίες με σημαντικό βαθμό εκπροσώπησης (*coverage*) στο τελικό σετ δεδομένων, ώστε να θεωρούνται αξιόπιστες.

Στην πρώτη-πιλοτική βιβλιοθήκη του *A. foliaceae* περιλήφθηκαν 288 δείγματα από 6 πληθυσμούς με βάση τη διαθεσιμότητα των δειγμάτων. Η επιλογή μεγέθους των θραυσμάτων (*size selection*) έγινε με κόψιμο από πήκτωμα αγαρόζης, κι ήταν 400 με 700bp. Τα αποτελέσματα όμως έδειξαν πολύ μεγάλο αριθμό θραυσμάτων με σχετικά μικρή αντιπροσώπευση αυτών στις τελικές αλληλουχίες (*coverage*). Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο μεγάλο γονιδίωμα του είδους (Deiana et al., 1998) αλλά και στην πιθανότητα να υπάρχουν επαναλαμβανόμενες περιοχές σε αυτό (βλ. Εικόνα 12)

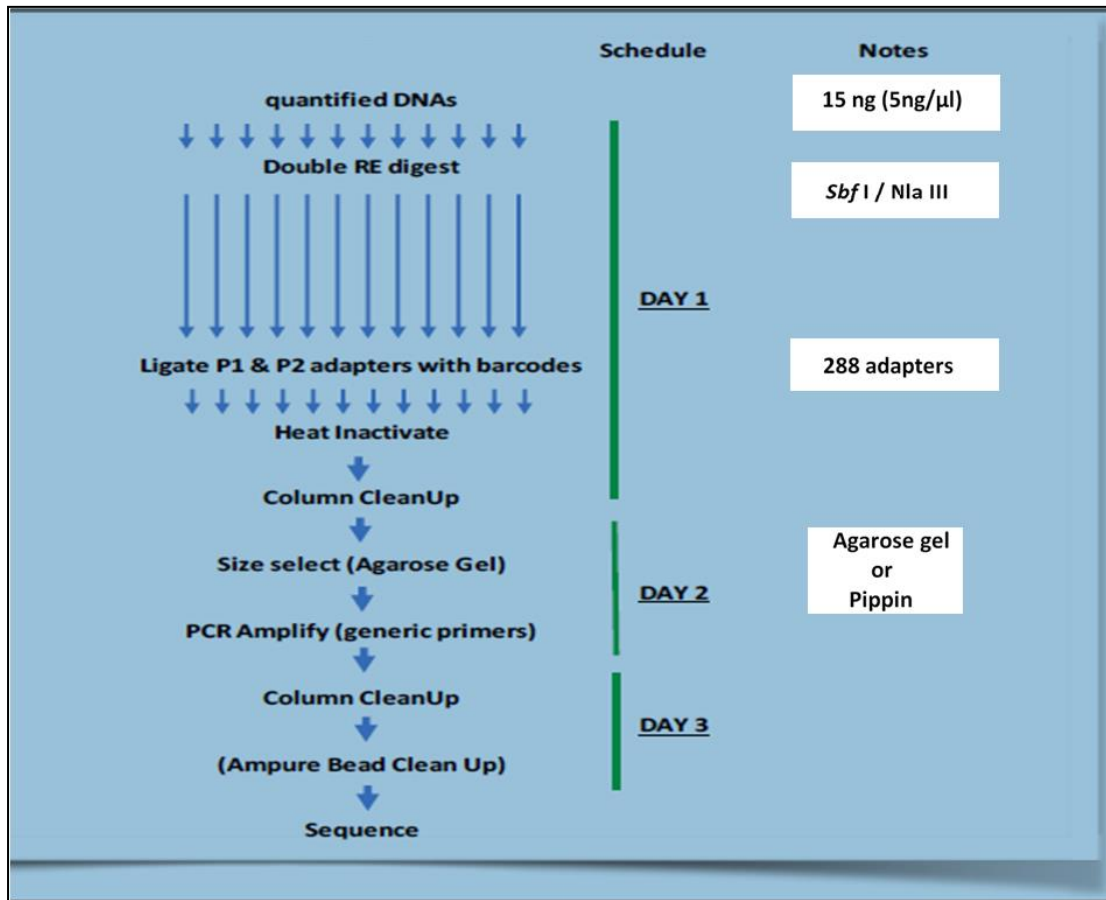


Εικόνα 12. Αποτέλεσμα της τελικής pcr για την 1^η - πιλοτική βιβλιοθήκη. Στο προϊόν αυτό έγινε διπλός καθαρισμός και στάλθηκε για αλληλούχηση.

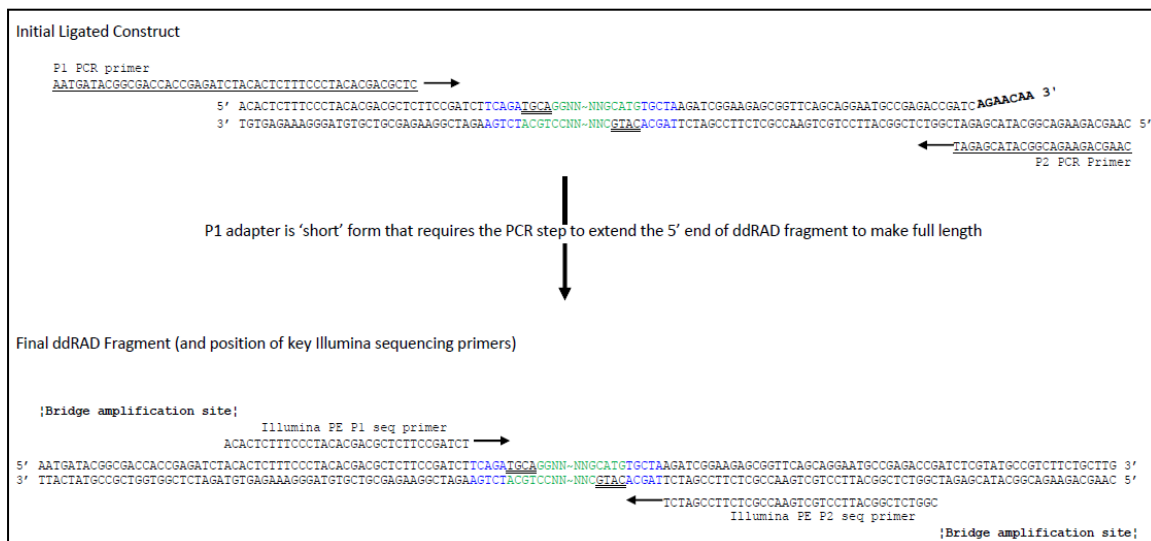
Επομένως στις επόμενες βιβλιοθήκες (2^η ως 5^η) αποφασίστηκε το «παράθυρο» να είναι μικρότερο και να αποφευχθεί όσο είναι δυνατόν να συμπεριλάβει την επαναλαμβανόμενη περιοχή στο DNA, και η πρώτη βιβλιοθήκη ετοιμάστηκε και αλληλουχήθηκε ξανά, με τις νέες προδιαγραφές.

Η τελική επιλογή μεγέθους των θραυσμάτων DNA έγινε με την ειδική συσκευή Pippin Prep (Sage Science, Beverly, MA, USA) με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επιλέχθηκαν τα μεγέθη 320-580bp.

Αναλυτικό πρωτόκολλο για την κατασκευή των βιβλιοθηκών δίνεται στο Παράρτημα.



Εικόνα 13. Τα στάδια κατασκευής της βιβλιοθήκης ddRAD για το *A. foliaceae* (για 288 άτομα)



Εικόνα 14. Απεικόνιση του τρόπου με τον οποίο συνδέονται οι adapters στα άκρα των DNA θραυσμάτων, καθώς και των θέσεων των barcodes & primers (PCR & sequencing) στους



adapters. (**blue**: barcode, **double underline**: 3' RE overhang on adapter, **green**: genomic DNA, **single underline**: PCR primers)

Βιοπληροφορική ανάλυση

Η βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων αλληλούχησης έγινε με το ειδικό λογισμικό STACKS (Catchen et al., 2011) και λόγω των μεγάλων απαιτήσεων σε υπολογιστική δύναμη, πραγματοποιήθηκε στο σύμπλεγμα υπολογιστών υψηλής απόδοσης (*High-Performance Computing*, HPC) Zorbas του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στην Κρήτη. Το πρόγραμμα αυτό βασίζεται σε ένα στατιστικό μοντέλο μέγιστης πιθανοφάνειας για να εντοπίσει πολυμορφισμούς στην αλληλουχία, ξεχωρίζοντας τους όμως από πιθανά λάθη αλληλούχησης. Χρησιμοποιεί και τις δύο αλληλουχίες που προέρχονται από το ίδιο κομμάτι του DNA (forward & reverse reads) για να δημιουργήσει έναν RAD τόπο. Στη συνέχεια οι τόποι αυτοί ομαδοποιούνται σε τύπους που ονομάζονται πλέον τόποι *stacks*, εφόσον οι αλληλουχίες τους έχουν ένα σημαντικό ποσοστό ομοιότητας που καθορίζεται από την παράμετρο $-m$ που δίνεται κατά την ανάλυση. Γίνεται καταγραφή όλων των τύπων *stacks* που εντοπίζονται σε ένα πληθυσμό σε έναν κατάλογο, και στη συνέχεια ταιριάζονται τα άτομα με τον κατάλογο αυτόν για να προσδιοριστεί ποια αλληλόμορφα υπάρχουν σε κάθε άτομο για κάθε τόπο *stacks*. Τα παραγόμενα δεδομένα εξάγονται είτε ως γονότυποι, είτε ως ένα σύνολο παρατηρούμενων απλότυπων σε ένα γενικό πληθυσμό.

Πιο αναλυτικά, αρχικά η ποιότητα των αλληλουχιών ελέγχθηκε με το FastQC 0.11.3 (Andrews, 2010) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η γραμμή εργασίας STACKS v.2.4 για επιπλέον έλεγχο της ποιότητας, για τον εντοπισμό των SNPs και τη γονοτύπηση των ατόμων, και για κάποιες βασικές αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής. Συγκεκριμένα, με το πρόγραμμα `process_radtags.pl` και με βάση τον ποιοτικό δείκτη Phred, αφαιρέθηκαν οι αλληλουχίες για τις οποίες ο μέσος όρος του δείκτη Phred (ανά 20 βάσεις) ήταν κάτω από 10, καθώς κι αυτές που περιείχαν αλληλουχίες των ανταπτόρων της Illumina. Με το ίδιο πρόγραμμα έγινε και η ανάθεση των ανεπεξέργαστων αλληλουχιών στα δείγματα με βάση την αλληλουχία των barcodes. Δεύτερον, με το πρόγραμμα `ustacks` σχηματίστηκαν de novo (χωρίς αλληλουχία αναφοράς) οι ομάδες των ίδιων αλληλουχιών (*stacks*) κάθε ατόμου, που



προέρχονται από την αλληλούχηση με τον ένα εκκινήτη (forward read). Για το πρόγραμμα αυτό, οι παράμετροι που επιλέχθηκαν ήταν $-m=3$ (ελάχιστος αριθμός ίδιων αλληλουχιών για να δημιουργηθεί ένα *stack*) και $-M=3$ (μέγιστη επιτρεπόμενη διαφορά σε νουκλεοτίδια, μεταξύ των *stacks* του ίδιου ατόμου), σύμφωνα με τις οδηγίες από το εγχειρίδιο χρήσης του λογισμικού. Στη συνέχεια, με το στοιχείο *cstacks* δημιουργήθηκε ο κατάλογος των τόπων *stacks* για όλα τα άτομα του συνόλου δεδομένων μας, με την παράμετρο $-n=3$ (μέγιστη επιτρεπόμενη διαφορά, σε νουκλεοτίδια μεταξύ των τόπων *stacks* του καταλόγου). Με το πρόγραμμα *sstacks* έγινε η αντιστοίχιση των ατόμων με τους τόπους του καταλόγου, ενώ με το *gstacks* συγκεντρώθηκε και συγχωνεύτηκε με την πρώτη αλληλουχία (forward read), και η δεύτερη (reverse read). Επίσης, εντοπίστηκαν οι θέσεις πολυμορφισμού, και γονοτυπήθηκε το κάθε άτομο για κάθε τόπο του καταλόγου. Τέλος, εκτελέστηκε το πρόγραμμα *populations* κρατώντας τους τόπους που βρέθηκαν σε τουλάχιστον 70% των ατόμων συνολικά, και που είχαν τουλάχιστον 0.05 ελάχιστη συχνότητα αλληλομόρφου (*minor allele frequency*, MAF). Από κάθε ομάδα ίδιων αλληλουχιών (τόπος *stack*) χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα SNP (τυχαία επιλεγμένο).

Με το πρόγραμμα *populations* του STACKS εξήχθησαν τα επιλεγμένα SNPs σε αρχεία κατάλληλου τύπου (vcf, genepop and structure format) και υπολογίστηκαν τα ιδιωματικά αλληλόμορφα σε όλους τους γενετικούς τόπους.

Αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής

Μέση ετεροζυγωτία-συντελεστές εγκαθίδρυσης

Η γενετική ποικιλότητα εντός των πληθυσμών εκτιμήθηκε υπολογίζοντας την μέση παρατηρούμενη (*observed heterozygosity*, H_o) και τη μέση αναμενόμενη κατά Hardy Weinberg (*expected heterozygosity*, H_e) ετεροζυγωτία για κάθε έναν από τους πληθυσμούς στο σύνολο των γενετικών τόπων, με το πακέτο στατιστικών προγραμμάτων Arlequin ver. 3.5.2.2 (Laurent Excoffier et al., 2005). Με τον όρο παρατηρούμενη ετεροζυγωτία εννοούμε το ποσοστό των ετερόζυγων ατόμων που μετράμε σε έναν πληθυσμό, ενώ ο όρος αναμενόμενη αναφέρεται στο ποσοστό των ετερόζυγων ατόμων που προκύπτει αν θεωρήσουμε ότι ισχύει η ισορροπία Hardy Weinberg. Σύμφωνα με το θεώρημα αυτό, σε έναν πληθυσμό ενός διπλοειδούς και φυλετικά αναπαραγόμενου είδους, οι γονοτυπικές και



αλληλικές συχνότητες των αυτοσωμικών γονιδίων διατηρούνται σταθερές από γενιά σε γενιά (ισορροπία Hardy-Weinberg), εφόσον ισχύουν οι εξής προϋποθέσεις: α) ο πληθυσμός έχει άπειρο μέγεθος, β) τα άτομα του πληθυσμού διασταυρώνονται τυχαία (παμμικτικός πληθυσμός) αλλά όχι μεταξύ γενεών, γ) απουσιάζει η επίδραση της μετάλλαξης και της επιλογής, και δ) δεν υπάρχει μετανάστευση ατόμων από και προς τον πληθυσμό (γονιδιακή ροή). Όταν κάποια από αυτές τις προϋποθέσεις πάψει να ισχύει-γεγονός πολύ πιθανό στους φυσικούς πληθυσμούς-οι αλληλικές συχνότητες αλλάζουν. Η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία H_o υπολογίζεται από τον λόγο αριθμός ετερόζυγων προς τον συνολικό αριθμό των ατόμων, ενώ η αναμενόμενη H_e από την εξίσωση

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right) \quad (\text{Nei, 1987})$$

για έναν τόπο με n αντίγραφα γονιδίων, k τα αλληλόμορφα και p_1, p_2, \dots, p_k οι συχνότητες των αλληλομόρφων.

Τα επίπεδα της διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών εκτιμήθηκαν από τον υπολογισμό των κατά ζεύγη (*pairwise*) τιμών F_{st} με το ίδιο πρόγραμμα (Arlequin ver. 3.5.2.2). Ο έλεγχος σημαντικότητας έγινε με 10.000 αντιμεταθέσεις (*permutations*) των αλληλομόρφων μεταξύ των ατόμων κάθε πληθυσμού και τα επίπεδα σημαντικότητας διορθώθηκαν με τη διαδικασία Benjamini-Yekutieli (Benjamini & Yekutieli, 2001). Ως κατώφλι για τα κενά στους γονότυπους (*missing data*), τέθηκε η τιμή 0.3 (30%), ενώ για τα επίπεδα σημαντικότητας, η τιμή 0.05 (5%). Παράλληλα, οι ίδιοι υπολογισμοί έγιναν αφού συγχωνεύτηκαν γειτονικοί πληθυσμοί λίγων ατόμων ώστε να αυξηθεί το πληθυσμιακό τους μέγεθος, για να διερευνηθεί αν η αύξηση αυτή θα οδηγούσε σε πιο ισχυρή στατιστικά ανάλυση.

Οι δείκτες F_{st} (*Fixation indices*, (Wright, 1965)) έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά σε μελέτες πληθυσμιακής γενετικής και βασίζονται στην πτώση της ετεροζυγωτίας που προκαλεί η υποδιαίρεση των πληθυσμών. Ο Wright εισήγαγε την έννοια του συντελεστή εγκαθίδρυσης (*fixation index*) ως το ποσοστό πτώσης της ετεροζυγωτίας από ένα ιεραρχικό επίπεδο σε ένα άλλο ανώτερο, εξαιτίας της υποδιαίρεσης των πληθυσμών. Ο δείκτης αυτός παίρνει τιμές από 0 έως 1 και υπολογίζεται από τον τύπο $F_{st} = (H_T - H_S) / H_T$, όπου H_T η ετεροζυγωτία που υπολογίζεται θεωρώντας ότι όλα τα άτομα ανήκουν σε ένα μεγάλο πληθυσμό, ενώ H_S η ετεροζυγωτία για κάθε πληθυσμό χωριστά. Ο δείκτης αυτός επίσης



εκφράζει τον λόγο (ποικιλότητα μεταξύ των πληθυσμών-ποικιλότητα εντός των πληθυσμών)/ποικιλότητα μεταξύ των πληθυσμών.

Γενικά, τιμές F_{st} μεταξύ 0 και 0.05 εκφράζουν πολύ μικρή γενετική διαφοροποίηση, ενώ για τιμές πάνω από 0.25 η διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών θεωρείται πολύ μεγάλη.

Εκτίμηση πληθυσμιακής δομής

Η ύπαρξη πληθυσμιακής δομής διερευνήθηκε με τρεις προσεγγίσεις. Η μια ήταν μέσω της ανάλυσης DAPC (διακριτική ανάλυση κύριων συνιστωσών, *Discriminant Analysis of Principal Components*) (Jombart et al., 2010), όπου χρησιμοποιήθηκε το πακέτο Adegnet (Jombart & Ahmed, 2011) της R. Η ανάλυση αυτή είναι μια μέθοδος μείωσης διαστάσεων (*dimension reduction methods*), της οποίας σκοπός είναι ο μετασχηματισμός δεδομένων από έναν χώρο πολλών διαστάσεων σε έναν χώρο λίγων διαστάσεων, κατά τρόπο ώστε η αναπαράσταση των λίγων διαστάσεων να διατηρεί τις πιο σημαντικές ιδιότητες των αρχικών δεδομένων. Η DAPC συνδυάζει την PCA (*Principal Components Analysis*, ανάλυση κύριων συνιστωσών) με την DA (*Discriminant Analysis*, διακριτική ανάλυση) για να εντοπίσει και να περιγράψει ομάδες γενετικά σχετιζόμενων ατόμων. Πρόκειται για μια πολυπαραγοντική στατιστική προσέγγιση που προσπαθεί να συνοψίσει τη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ ομάδων, ενώ παραβλέπει αυτή που υπάρχει εντός των ομάδων (Jombart et al., 2010). Αρχικά επιλέγεται ο βέλτιστος αριθμός των κύριων συνιστωσών μέσω της εντολής *optim.a.score* () και στη συνέχεια γίνεται η ανάλυση DA με τις επιλεγμένες κύριες συνιστώσες με την εντολή *dapc* (). Με την εντολή *scatter.dapc* () τα αποτελέσματα της ανάλυσης αναπαρίστανται ως ένα διάγραμμα διασποράς όπου κάθε σημείο αποτελεί ένα άτομο, ο κάθε πληθυσμός είναι χρωματισμένος διαφορετικά, κι η απόσταση μεταξύ των ατόμων εκφράζει τη γενετική απόσταση μεταξύ τους.

Στη δεύτερη προσέγγιση, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα STRUCTURE v 2.3.4 (Falush et al., 2003, 2007; Pritchard et al., 2000) ως τρόπο ελέγχου της ύπαρξης ομάδων εντός των πληθυσμών που αναλύθηκαν. Το STRUCTURE χρησιμοποιεί έναν μπεϋζιανό (κατά Bayes) αλγόριθμο ομαδοποίησης και βασίζεται σε ένα μοντέλο που θεωρεί ότι υπάρχουν K πληθυσμοί καθένας από τους οποίους χαρακτηρίζεται από τις αλληλικές συχνότητες κάθε



γενετικού τύπου. Τα άτομα ανατίθενται (πιθανολογικά) σε έναν ή περισσότερους πληθυσμούς, εάν οι γονότυποι τους δείχνουν ότι έχουν προκύψει από τη διασταύρωση ατόμων των πληθυσμών αυτών. Το πρόγραμμα προσπαθεί να εκτιμήσει τον αριθμό των προγονικών πληθυσμών μέσα από τις συχνότητες των αλληλομόρφων που έχουν οι γενετικοί τύποι, με την παραδοχή ότι αυτοί είναι σε ισορροπία, τόσο σύνδεσης όσο και κατά Hardy Weinberg. Η εκτίμηση της τιμής K αξιολογήθηκε με βάση τη μέθοδο ΔΚ (Evanno et al., 2005) όπως αυτή εφαρμόζεται από το διαδικτυακό πρόγραμμα STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2012) και η οποία επιλέγει το μοντέλο με τον μεγαλύτερο ρυθμό αλλαγής (*second order rate of change*) στην τιμή $\ln Pr(X|K)$.

Στην παρούσα μελέτη, διεξήχθησαν 10 επαναληπτικές αναλύσεις για κάθε K , ενώ το εύρος των τιμών K που εξετάστηκαν ήταν από 1 έως 10, χωρίς τη χρήση της γεωγραφικής τους καταγωγής/προέλευσης ως εκ των προτέρων πληροφορία. Κάθε τρέξιμο αποτελούταν από 1.000.000 γενιές, 100.000 εκ των οποίων απορρίφθηκαν ως *burn-in*.

Τέλος, με το πρόγραμμα Arlequin πραγματοποιήθηκε και η ανάλυση *locus-by-locus* AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*). Η ανάλυση αυτή προτάθηκε από τους (L. Excoffier et al., 1992) ως ένα εναλλακτικό πλαίσιο για αναλύσεις μοριακών δεδομένων αρκετά ευέλικτο ώστε να εφαρμόζεται σε ποικίλους μοριακούς δείκτες (αλληλουχίες DNA, μικροδορυφορικοί δείκτες, RFLPs κ.ά.) και η οποία χρησιμοποιεί τη μοριακή πληροφορία που συγκεντρώνεται σε μια πληθυσμιακή μελέτη προκειμένου να διερευνήσει τη γενετική διαφοροποίηση των υπό εξέταση πληθυσμών.

Η AMOVA έχει ως στόχο να ανακαλύψει και να περιγράψει την ιεραρχική δομή ενός συνόλου δειγμάτων, επιμερίζοντας τη συνολική παρατηρούμενη διακύμανση της ποικιλότητας σε συνιστώσες συνδιακύμανσης (*covariance components*) που οφείλονται σε διαφορές τόσο εντός όσο και ανάμεσα σε προκαθορισμένες ομαδοποιήσεις των δειγμάτων (Laurent Excoffier et al., 2005). Με τη μέθοδο αυτή έγιναν πολλές *a priori* ομαδοποιήσεις των δειγμάτων με κριτήρια γεωγραφικά, και υπολογίστηκε το ποσοστό της γενετικής ποικιλότητας που εξηγείται από διαφορές μεταξύ των ομάδων των πληθυσμών F_{CT} , μεταξύ των πληθυσμών εντός των ομάδων F_{SC} , και από τις διαφορές εντός των πληθυσμών F_{ST} . Οι τιμές των συντελεστών αυτών γενικά κυμαίνονται από μηδέν (0) που σημαίνει πρακτικά



καμία διαφοροποίηση, έως τη μονάδα (1) που είναι μια θεωρητική τιμή μέγιστης διαφοροποίησης.

Για να δειχθεί η στατιστική ισχύς των αποτελεσμάτων έγιναν 10.000 προσομοιώσεις (*permutations*). Ως κατώφλι για τα κενά στους γονότυπους (*missing data*), τέθηκε η τιμή 0.3 (30%), ενώ για τα επίπεδα σημαντικότητας, η τιμή 0.05 (5%).

Αποτελέσματα

Απομόνωση DNA & ποιοτικός έλεγχος αυτών

Συνολικά έγινε εξαγωγή DNA από 1.692 δείγματα γαρίδας. Σε αυτά, η εξαγωγή οδήγησε σε καλής ποιότητας DNA στα 639 (37,8%), στα 700 ήταν μέτρια (41,4%) και στα 353 ήταν χαμηλής ποιότητας (20,9%).

Η κατηγοριοποίηση της ποιότητας των δειγμάτων κι ο αριθμός των ατόμων από κάθε πληθυσμό που στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τις βιβλιοθήκες δίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 2. Όλες οι περιοχές εκπροσωπήθηκαν στις βιβλιοθήκες με εξαίρεση την 20b, με αριθμό ατόμων που κυμαινόταν από 21 έως 74.

Πίνακας 2. Κατηγοριοποίηση των πληθυσμών με βάση την ποιότητα του DNA-Αριθμός δειγμάτων στις βιβλιοθήκες

Πληθυσμός	Αριθμός δειγμάτων n	Ποιότητα DNA			Αριθμός δειγμάτων σε βιβλιοθήκες
		Καλή	Μέτρια	Χαμηλή	
5a	50	31	18	1	41
5c	21	19	2	0	21
8a	35	30	5	0	35
8b	43	38	4	1	41
9a	50	30	20	0	50
9b	50	41	9	0	50
9c	50	33	12	5	45
10a	50	41	9	0	41
10b	50	38	7	5	44
10c	34	17	17	0	34



11a	50	44	6	0	50
11b	50	45	4	1	49
11c	100	58	18	24	74
11d	50	47	3	0	50
11e	50	50	0	0	50
12	50	15	29	6	44
13	50	2	30	18	31
16a	46	1	32	13	33
16b	50	0	38	12	38
16c	50	17	33	0	44
18a	50	2	45	3	46
18c	50	5	15	30	20
19b	100	4	31	65	27
19c	50	0	39	11	39
19d	50	10	15	25	25
20a	86	0	78	8	42
20b	50	0	0	50	0
22b	77	15	20	42	35
22c	50	0	43	7	43
23a	50	5	44	1	49
25c	50	1	43	6	44
26a	50	0	31	19	31
Σύνολο	1692	639	700	353	1266

Τελικά χρησιμοποιήθηκαν 1.266 άτομα (75% των συνολικών ατόμων) για την κατασκευή 5 βιβλιοθηκών, σύμφωνα με τον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Περιεχόμενο σε δείγματα των πέντε βιβλιοθηκών στην κόκκινη γαρίδα

1η βιβλιοθήκη(πilotική)	2η βιβλιοθήκη	3η βιβλιοθήκη	4η βιβλιοθήκη	5η βιβλιοθήκη
288 άτομα	252 άτομα	252 άτομα	254 άτομα	220 άτομα
καλής και μέτριας ποιότητας DNA	καλής και μέτριας ποιότητας DNA	καλής και μέτριας ποιότητας DNA	καλής και μέτριας ποιότητας DNA	μέτριας ποιότητας DNA



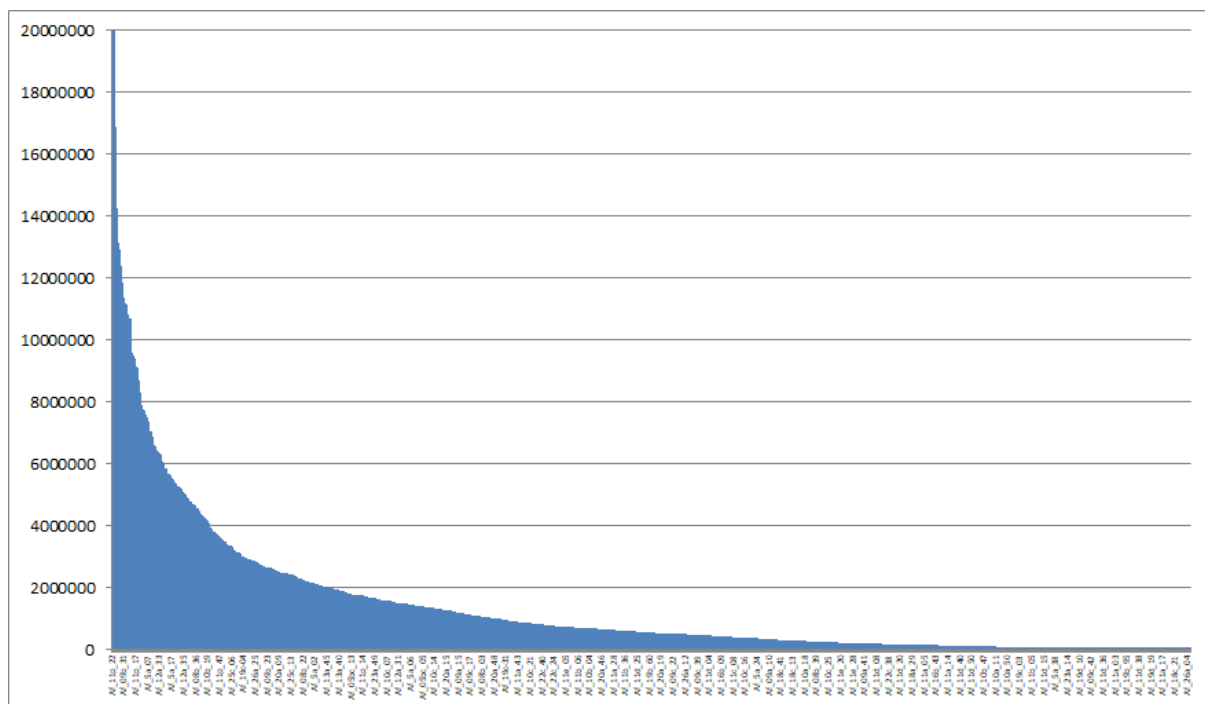
Αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης (ανάλυση *stacks*)

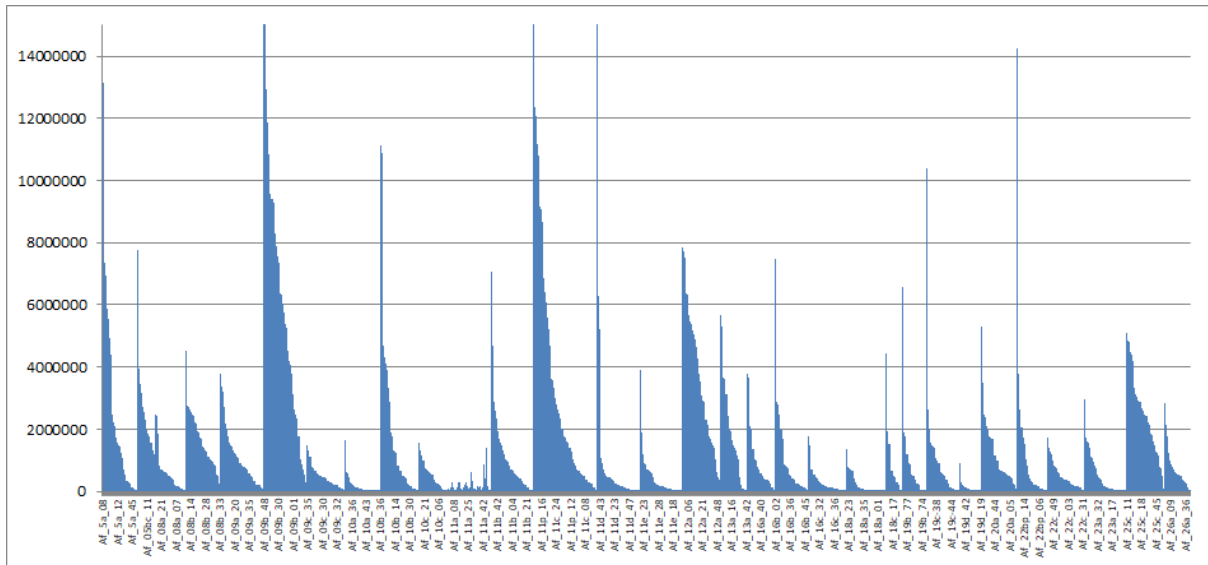
Μετά τη συγχώνευση των forward & reverse αλληλουχιών από την αλληλούχηση των πέντε βιβλιοθηκών του *A. foliaceae* σε συσκευή HiSeq4000 (Illumina), προέκυψαν 1,8 δις αλληλουχίες. Αυτές αντιστοιχούν κατά μέσο όρο σε 1,3 εκ αλληλουχίες ανά δείγμα. Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης έδειξαν σημαντική διακύμανση στον αριθμό:

(α) των αλληλουχιών, είτε μεταξύ των δειγμάτων (3.534 έως 22.716.959), είτε μεταξύ των πληθυσμών κατά μέσο όρο (125.737 στον 19d έως 5.998.558 στον 09b)

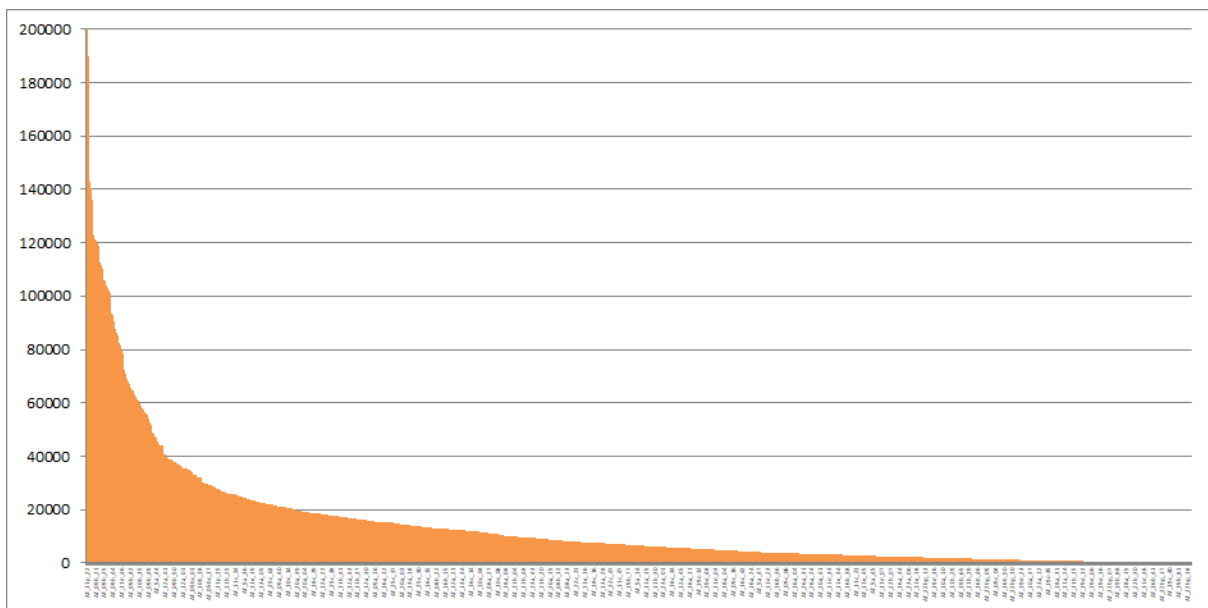
(Εικόνα 15, Πίνακας 4)

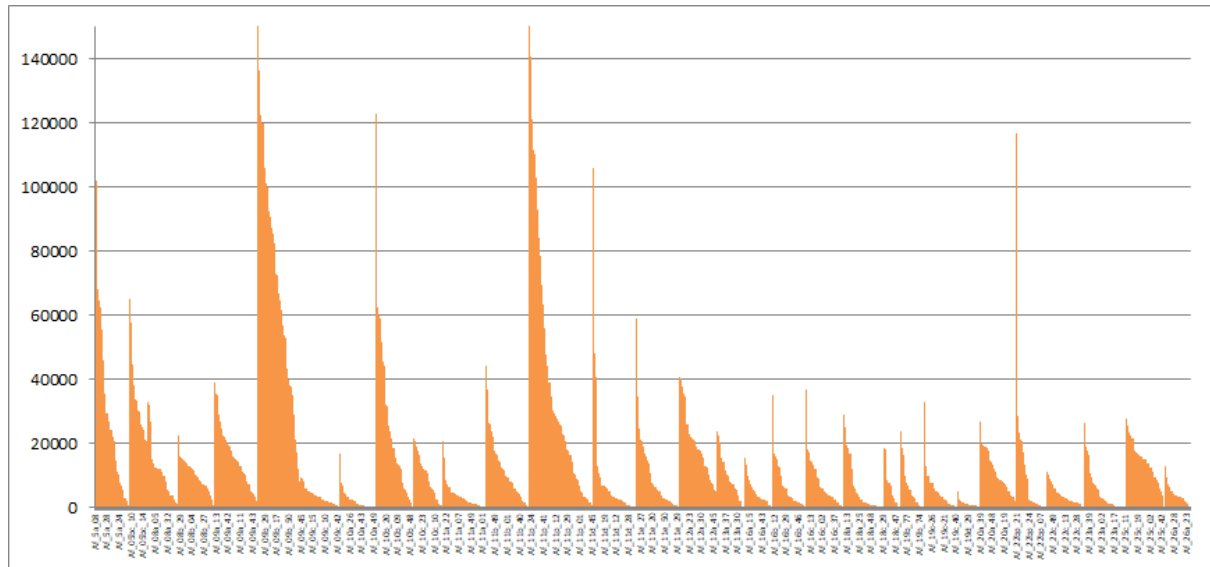
(β) των τόπων *stacks*, είτε μεταξύ των δειγμάτων (17 έως 244.066), είτε μεταξύ των πληθυσμών κατά μέσο όρο (1.217 στον 19d έως 69.625 στον 09b) (Εικόνα 16, Πίνακας 4)





Εικόνα 15. Αριθμός των αλληλουχιών για όλα τα άτομα (πάνω) & ανά πληθυσμό (κάτω)





Εικόνα 16. Αριθμός των τόπων *stacks* για όλα τα άτομα (πάνω) & ανά πληθυσμό (κάτω)

Πίνακας 4. Αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης

	Αλληλουχίες			Τόποι <i>stacks</i>		
	Μέσος όρος	Ελάχιστο	Μέγιστο	Μέσος όρος	Ελάχιστο	Μέγιστο
5a	2460520	8381	13142758	28844	233	142978
5c	2591519	152412	7765332	31109	3465	64876
8a	594208	26102	2450446	10420	888	32904
8b	1632859	73735	4540023	10068	628	22501
9a	1084658	29741	3768066	16086	757	38955
9b	5998558	118275	21479914	69625	4387	189912
9c	468567	29845	1492995	3468	231	9349
10a	159245	4827	1655406	2346	105	16779
10b	1798248	15517	11144355	26697	355	122815
10c	521505	3534	1556675	9519	17	21729
11a	166997	4162	1385946	3540	103	20533
11b	1160431	17040	7054575	11864	483	44039
11c	3620539	22626	22716959	41279	619	244066
11d	1136426	11147	18509866	9320	154	105872



11e	434053	7875	3889785	9774	95	58774
12	3506866	265847	7857872	19058	3086	40654
13	1829004	7365	5666024	9049	88	23901
16a	934134	10675	3776392	4733	81	15440
16b	981097	25377	7485678	6411	226	35201
16c	288415	5997	1772331	7644	129	36807
18a	220441	8170	1363474	5661	125	29043
18c	839557	4273	4449794	5612	116	18751
19b	788396	7829	6581946	5573	120	23787
19c	1008130	12144	10392969	4850	147	33085
19d	125737	17492	906196	1217	190	5104
20a	1206295	80580	5283353	10759	1521	26750
22b	1137759	10421	14260181	10313	67	116674
22c	495420	19846	1729640	3794	184	11307
23a	487319	6680	2967236	4965	31	26183
25c	2433762	8123	5095978	14052	51	27605
26a	723930	5462	2821372	4138	38	12911
Σύνολο	1317245	3534	22716959	12961	17	244066

Συνολικά σχηματίστηκαν 18 εκ. τόποι *stacks* (για όλα τα άτομα στις 5 βιβλιοθήκες) μετά το στάδιο *ustacks* της βιοπληροφορικής ανάλυσης, ενώ μετά το πρόγραμμα *gstacks* οι τόποι που είχαν γονοτυπηθεί για τα 1.266 άτομα ήταν 2.393.590 (με μέσο όρο κάλυψης (*coverage*) 79,5x και τυπική απόκλιση 54,6x). Παρατηρήθηκε όμως, σημαντικό ποσοστό ατόμων με μικρό αριθμό τόπων *stacks* που με τη σειρά του θα οδηγούσε σε σημαντικό ποσοστό ατόμων με ελλείψεις στους γονότυπους (*missing data*, εικόνα 17). Έτσι αποφασίστηκε να δημιουργηθούν δύο σύνολα δεδομένων αφαιρώντας άτομα από την ανάλυση: α) ένα “αυστηρό” όπου αφαιρέθηκαν όλα τα άτομα με λιγότερα από 6.000 τόπους *stacks* και β) ένα “χαλαρό”, όπου αφαιρέθηκαν όλα τα άτομα με λιγότερα από 4.000 τόπους *stacks*. Τα όρια αυτά θεωρήθηκαν ως ένας καλός συμβιβασμός που οδηγούσε από τη μια σε έναν ικανοποιητικό αριθμό κοινών για τα περισσότερα άτομα πολυμορφικών τόπων, αλλά και με



ένα αρκετά μεγάλο αριθμό ατόμων να μένουν για την ανάλυση. Στην παρούσα εργασία θα αναφερθούμε κυρίως στα αποτελέσματα που πήραμε με τη χρήση του δεύτερου (“αυστηρού”) συνόλου δεδομένων, όπου λόγω αφαίρεσης περισσότερων ατόμων με *missing data*, η ανάλυση βασίζεται σε περισσότερα SNPs, ενώ τα αποτελέσματα από το 2^ο σύνολο δεδομένων δίνονται για σύγκριση στο Παράρτημα.

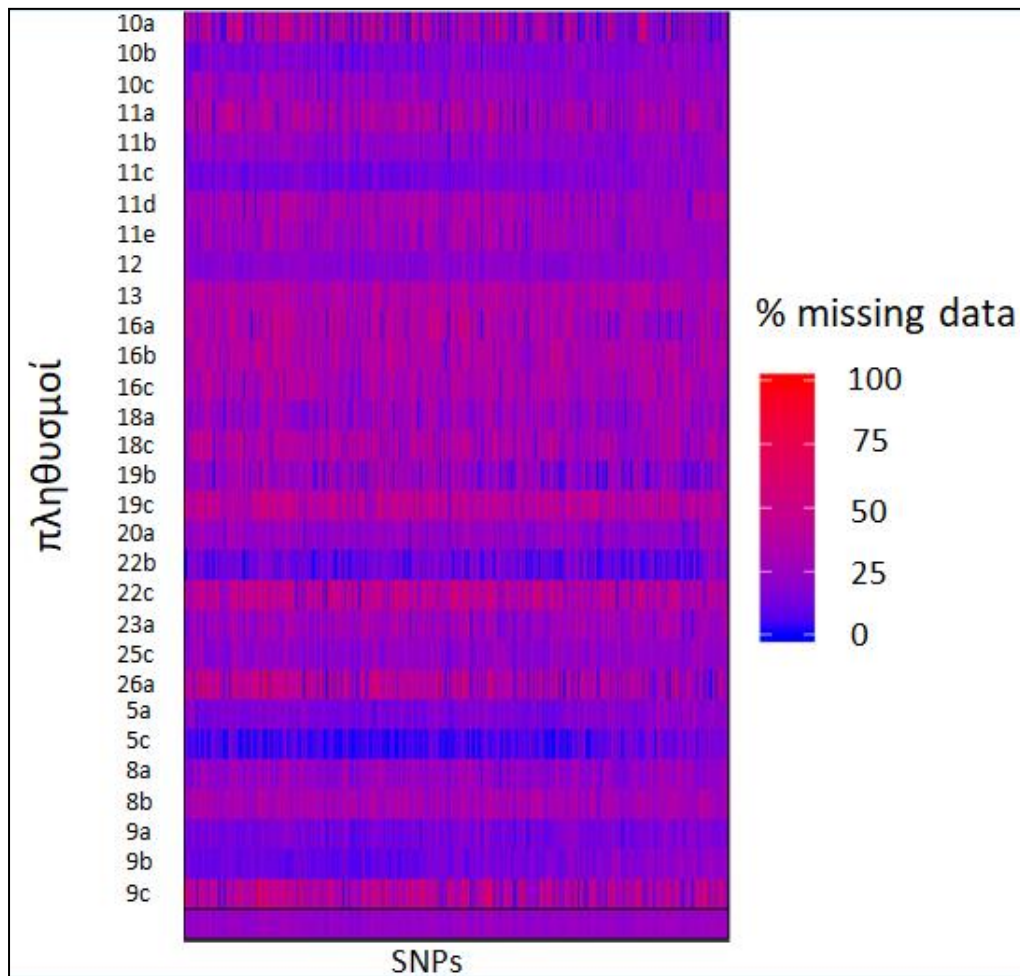
Συγκεκριμένα για το 1^ο σύνολο δεδομένων αφαιρέθηκαν 605 άτομα από την ανάλυση και έμειναν 661, και από τους αρχικούς 2.393.590 τόπους αφαιρέθηκαν 2.392.483 και έμειναν 1.107 τόποι (βλ. Πίνακα 5).

Πίνακας 5. Στατιστικά στοιχεία για τους 1.107 τόπους *stacks* (1^ο σύνολο δεδομένων)

Αριθμός τόπων με αλληλουχίες κι από τα δύο άκρα	1.107(100%)
Μέσο μέγεθος των τόπων	366,66bp (τυπικό σφάλμα 2,29bp)
Αριθμός τόπων με επικάλυψη μεταξύ των δύο αλληλουχιών	549(49,6%)
Μέσο μέγεθος των τόπων με επικάλυψη	367,52bp (τυπικό σφάλμα 2,34bp)
Μέσο μήκος επικάλυψης	26,34bp(τυπικό σφάλμα 0,31bp)

Από τους 1.107 τόπους *stacks*, οι 734 ήταν πολυμορφικοί (είχαν τουλάχιστον ένα SNP) και ήταν κοινοί σε τουλάχιστον 70% των ατόμων του τελικού σετ δεδομένων των 661 ατόμων του *A. foliacea*. Τα αποτελέσματα που ακολουθούν αφορούν επομένως αυτά τα 734 SNPs και 30 πληθυσμούς με 661 άτομα *A. foliacea* συνολικά (52% του αρχικού συνόλου των 1.266 ατόμων).

Για το 2^ο σύνολο δεδομένων αφαιρέθηκαν 495 άτομα, οπότε έμειναν 771. Η ανάλυσή τους βασίστηκε σε 443 SNPs που ήταν κοινά σε τουλάχιστον 70% των 771 ατόμων. Αποτελέσματα από την ανάλυση αυτή, δίνονται για σύγκριση στο Παράρτημα.



Εικόνα 17. Διάγραμμα που απεικονίζει τα κενά στους γονότυπους, ανά πληθυσμό.

Αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής

Ενδοπληθυσμιακή γενετική ποικιλότητα

Οι παρατηρούμενες τιμές ετεροζυγωτίας (H_o) στους πληθυσμούς που αναλύθηκαν ήταν σε γενικές γραμμές χαμηλές (από 0,07295 στον πληθυσμό 13, έως 0,18585 στον πληθυσμό 10a) και πάντως χαμηλότερες από τις αναμενόμενες (H_e) κατά Hardy Weinberg (από 0,23811 στον πληθυσμό 9b, έως 0,4554 στον 10a). Ο μέσος όρος αναμενόμενης ετεροζυγωτίας σε όλους τους πληθυσμούς εκτιμήθηκε σε 0,30272)

Πίνακας 5. Μέσος όρος παρατηρούμενης και αναμενόμενης ετεροζυγωτίας ανά δείγμα της κόκκινης γαρίδας *A. foliacea*.

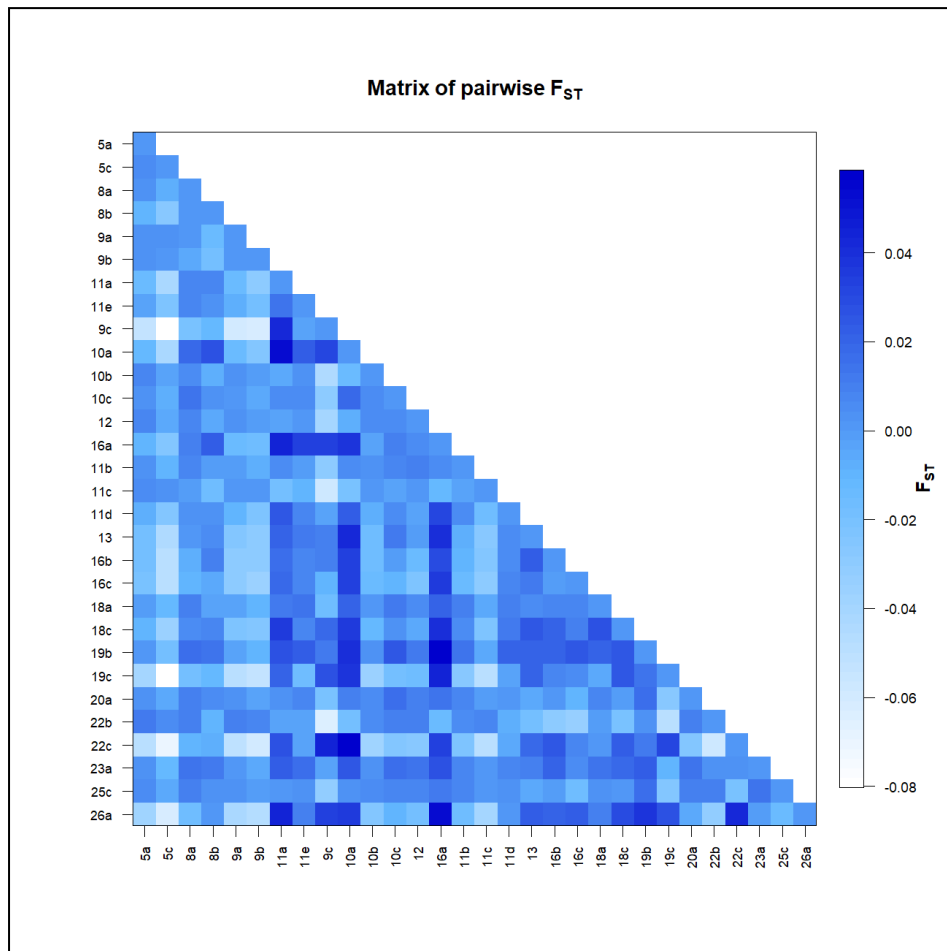


Πληθυσμός	Αριθμός δειγμάτων	Ho	He
5a	31	0,15631	0,24618
5c	20	0,182	0,25466
8a	22	0,13498	0,26987
8b	33	0,0766	0,26236
9a	41	0,14413	0,24838
9b	49	0,17377	0,23811
9c	6	0,11784	0,44607
10a	5	0,18585	0,4554
10b	33	0,15124	0,24232
10c	21	0,12555	0,26952
11a	9	0,14719	0,36034
11b	33	0,11323	0,25064
11c	59	0,15755	0,2414
11d	16	0,12795	0,29113
11e	23	0,12809	0,2569
12	40	0,11826	0,24556
13	22	0,07295	0,27986
16a	9	0,08497	0,36933
16b	16	0,09115	0,30952
16c	18	0,12582	0,27916
18a	13	0,14681	0,3019
18c	9	0,11583	0,36509
19b	9	0,14394	0,32871
19c	11	0,09138	0,35702
20a	31	0,10032	0,25969
22b	13	0,16114	0,29028
22c	9	0,09798	0,38058
23a	16	0,11989	0,28674
25c	38	0,09663	0,25289
26a	6	0,10739	0,44199



Συντελεστές εγκαθίδρυσης (Fixation indices, F_{ST})

Οι τιμές F_{ST} ανά ζεύγη πληθυσμών κυμαίνονται από -0,08036 μεταξύ των πληθυσμών μεταξύ 5c-9c έως 0,05851 μεταξύ 16a-19b. Καμιά τιμή δεν ήταν σημαντική στατιστικά, μετά από τη διόρθωση Benjamini– Hochberg.



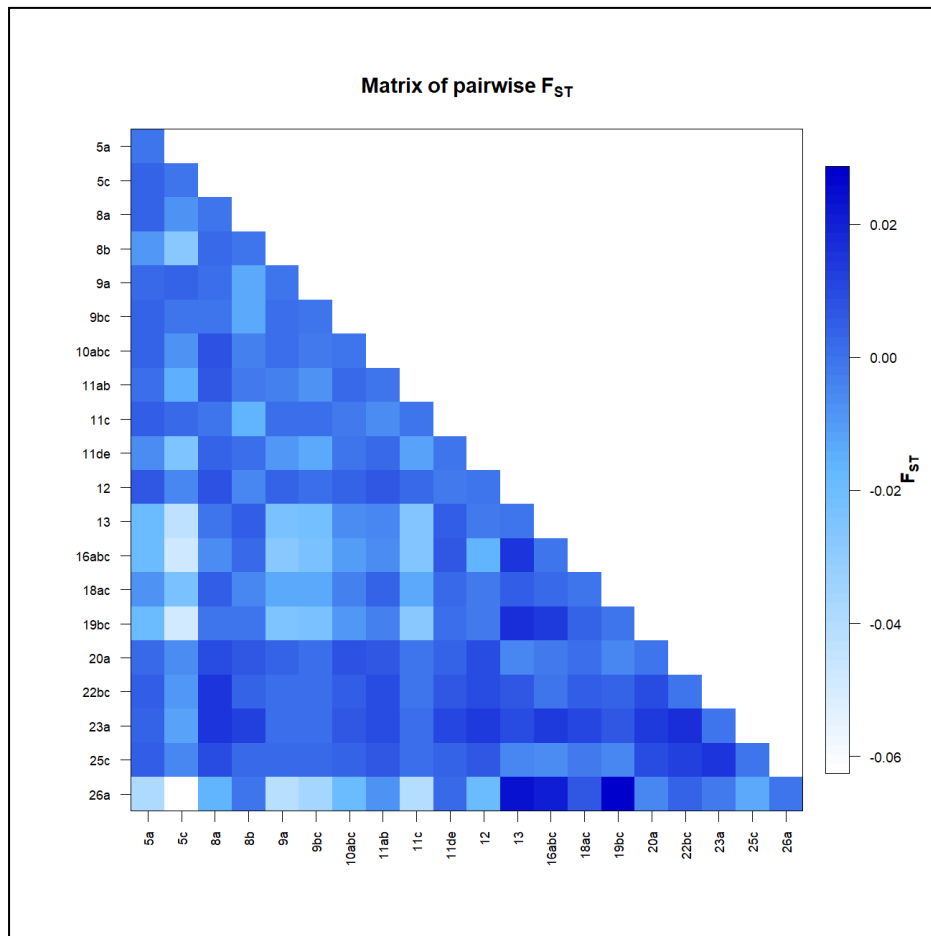
Εικόνα 18. Διάγραμμα τιμών F_{ST} (ανά ζεύγη πληθυσμών), βασισμένο σε 734 πολυμορφικά SNPs με γονότυπους σε τουλάχιστον 70% των δειγμάτων. Καμιά τιμή δεν ήταν σημαντική στατιστικά, μετά από τη διόρθωση Benjamini– Hochberg.

Εφόσον παρατηρήθηκε ότι όλες οι τιμές F_{ST} ήταν στατιστικά μη σημαντικές, αυτές υπολογίστηκαν ξανά αφού συγχωνεύτηκαν οι μικροί σε μέγεθος γειτονικοί πληθυσμοί, ώστε να γίνει ισχυρή στατιστικά η ανάλυση. Έγιναν δύο τέτοιες συγχωνεύσεις, στην πρώτη προέκυψαν 20 πληθυσμοί και στη δεύτερη 15. Οι τιμές F_{ST} ανά ζεύγη πληθυσμών μετά την πρώτη συγχώνευση πληθυσμών μικρού μεγέθους κυμαίνονται από -0,06263 (μεταξύ των πληθυσμών 5c-26a) έως 0,02865 (μεταξύ των πληθυσμών 19bc-26a). Οι τιμές F_{ST} ανά ζεύγη

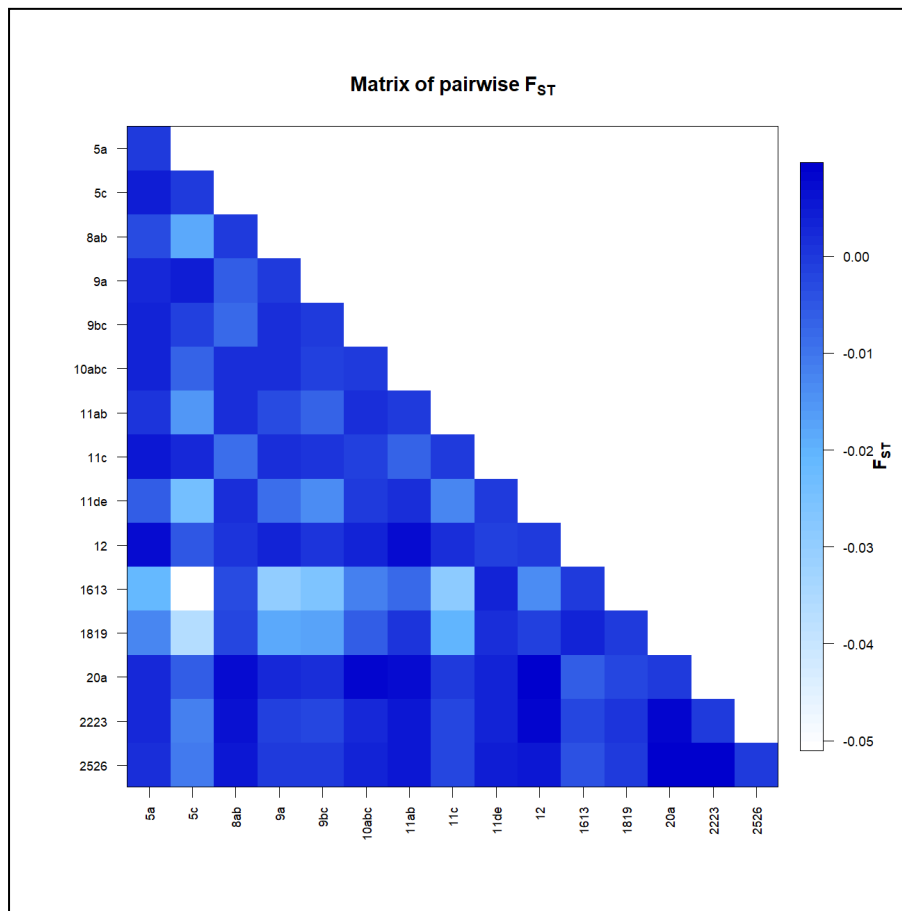


πληθυσμών μετά τη δεύτερη συγχώνευση πληθυσμών μικρού μεγέθους κυμαίνονται από -0,05107 (μεταξύ των πληθυσμών 1316-5c) έως 0,00964 (μεταξύ των πληθυσμών 2526-20a). (Ο πληθυσμός 1316 είναι αυτός που προέκυψε μετά τη συγχώνευση του 13 και των 16(a, b, c), ενώ ο 2526 προέκυψε μετά τη συγχώνευση των 25c και 26a).

Καμία τιμή δεν ήταν σημαντική στατιστικά, μετά από τη διόρθωση Benjamini– Hochberg.



Εικόνα 19. Διάγραμμα τιμών F_{ST} (ανά ζεύγη πληθυσμών), μετά την πρώτη συγχώνευση γειτονικών πληθυσμών μικρού μεγέθους (σύνολο πληθυσμών 20). Καμία τιμή δεν ήταν σημαντική στατιστικά, μετά από τη διόρθωση Benjamini– Hochberg.

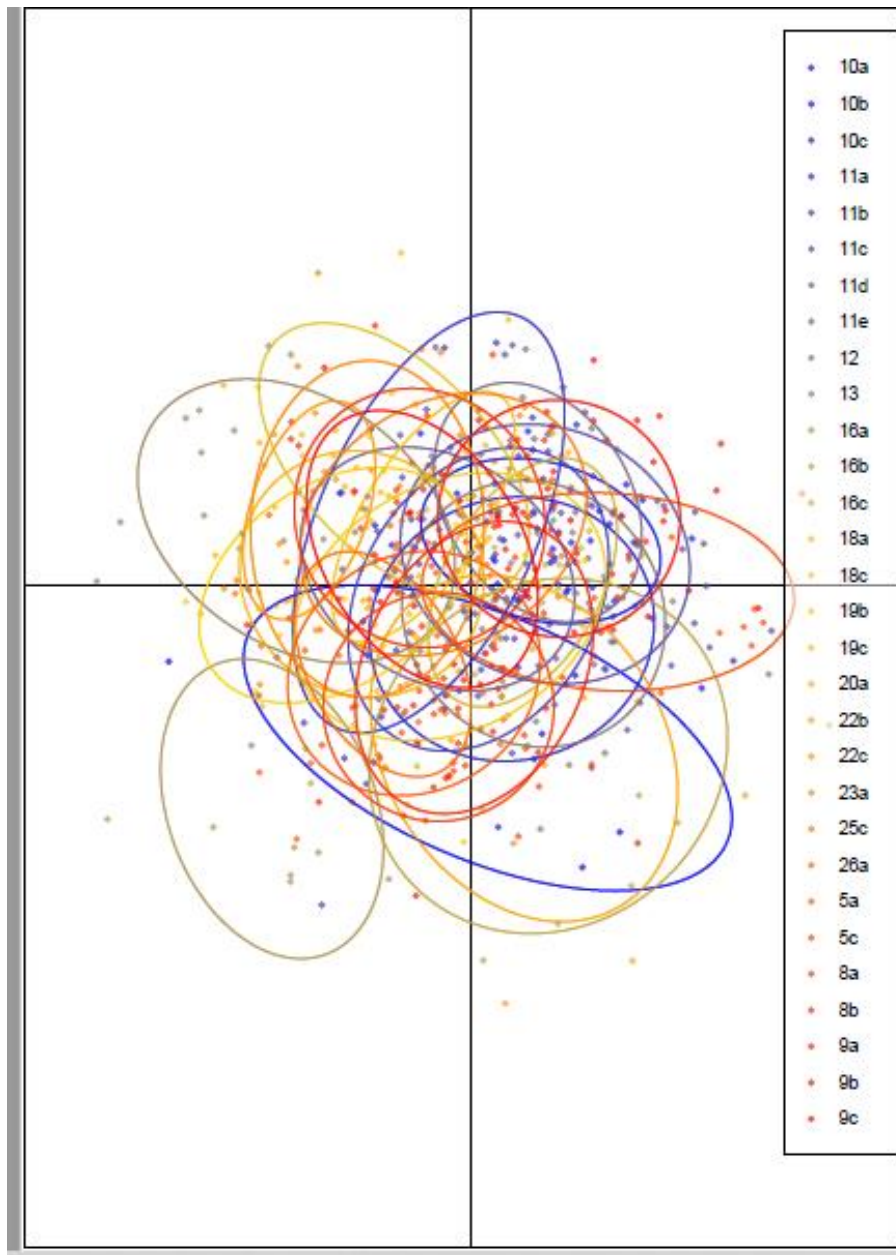


Εικόνα 20. Διάγραμμα τιμών F_{ST} (ανά ζεύγη πληθυσμών), μετά τη δεύτερη συγχώνευση γειτονικών πληθυσμών μικρού μεγέθους (σύνολο πληθυσμών 15). Καμιά τιμή δεν ήταν σημαντική στατιστικά, μετά από τη διόρθωση Benjamini– Hochberg.

Εκτίμηση πληθυσμιακής δομής

Ανάλυση DAPC

Το διάγραμμα διασποράς μετά την ανάλυση DAPC όπου η κατανομή των ατόμων σε ομάδες έγινε *a priori* με βάση τις περιοχές δειγματοληψίας, δίνεται στην εικόνα 21. Σ αυτό η ανάλυση έδειξε την ύπαρξη ενός μεγάλου παμμικτικού πληθυσμού με λίγους πληθυσμούς να ξεχωρίζουν, αλλά χωρίς την ένδειξη μιας σαφούς ομαδοποίησης σε αυτούς.



Εικόνα 21. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης DAPC

Ανάλυση Μπεϋζιανής ομαδοποίησης (Structure)

Τα αποτελέσματα ελέγχου ομαδοποίησης με το πρόγραμμα STRUCTURE παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Η επιλογή του αριθμού γενετικών ομάδων μεταξύ των υποψήφιων τιμών K , στηρίχθηκε στην εκτίμηση του ΔK (Evanno et al., 2005) και όχι χρησιμοποιώντας απλά τις τιμές μέγιστης πιθανοφάνειας $\ln P(K)$. Ενώ λοιπόν η μέγιστη τιμή πιθανοφάνειας παρατηρήθηκε για $K=8$ (-743299,52), επιλέξαμε ως πιθανότερο το ενδεχόμενο της ύπαρξης



δύο γενετικών δεξαμενών αφού σε αυτή την περίπτωση μεγιστοποιείται η τιμή του ΔK ($\Delta K(2)=28102,64315$). Η τιμή $\text{LnP}(K)$ για $K=2$ ήταν επίσης υψηλή(-758169,17) και συνοδεύταν από πολύ χαμηλή τιμή τυπικής απόκλισης. Επομένως φαίνεται να υπάρχει ένα αρκετά ισχυρό σήμα ομαδοποίησης των πληθυσμών του *A. foliaceae* για $K=2$.

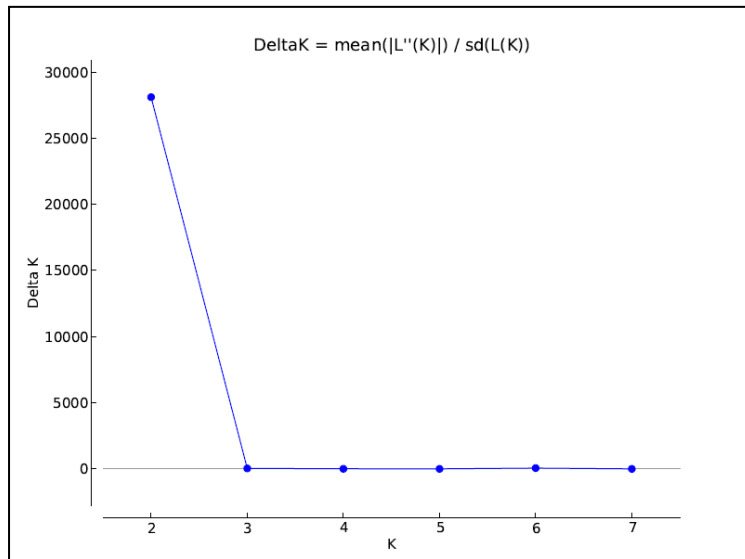
Η γραφική παράσταση της μεταβολής της τιμής ΔK , για κάθε τιμή K δίνεται στην εικόνα 22, ενώ οι τιμές των συντελεστών συμμετοχής των γενετικών δεξαμενών στο κάθε άτομο αλλά και στον κάθε πληθυσμό κατά μέσο όρο, όπως υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα για $K=2$, $K=3$ και $K=4$ παρουσιάζονται εποπτικά στην Εικόνα 23.

Πίνακας 6. Μέση τιμή πιθανοφάνειας $\text{LnP}(K)$ και ΔK για κάθε υποψήφιο αριθμό ομαδοποιήσεων K .

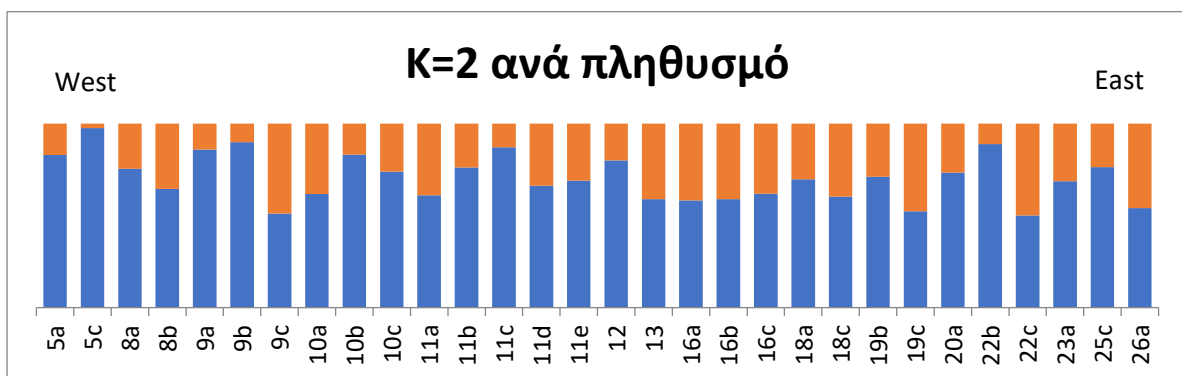
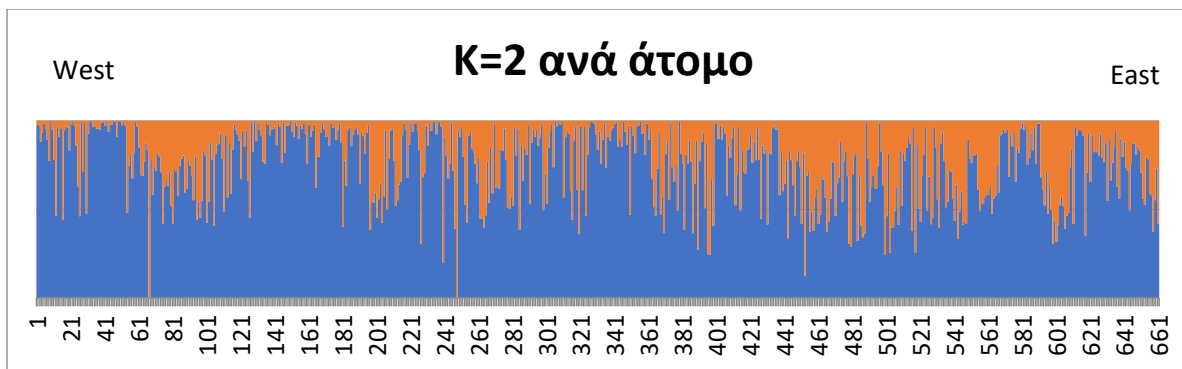
$\text{StdevLnP}(K)$: η τυπική απόκλιση της μέσης τιμής

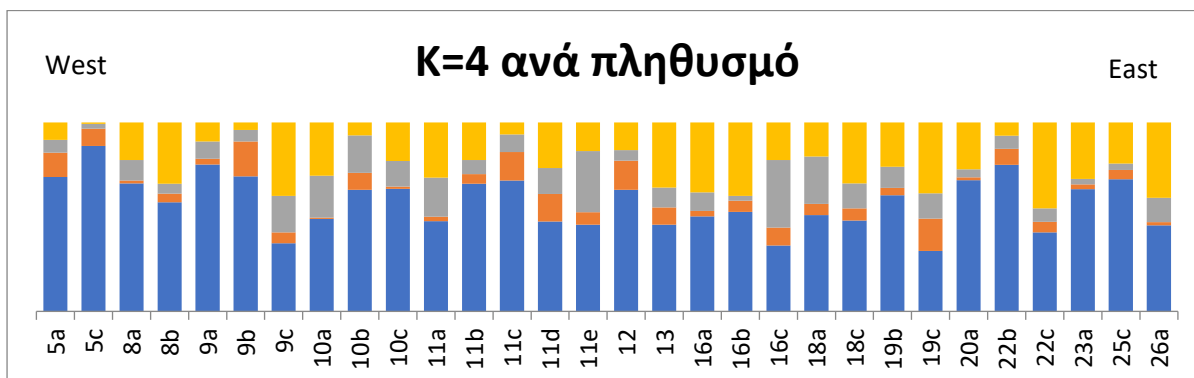
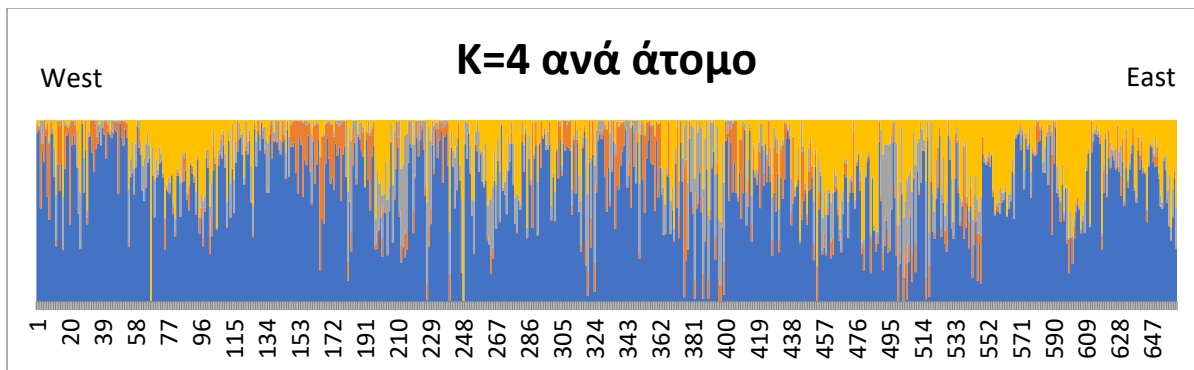
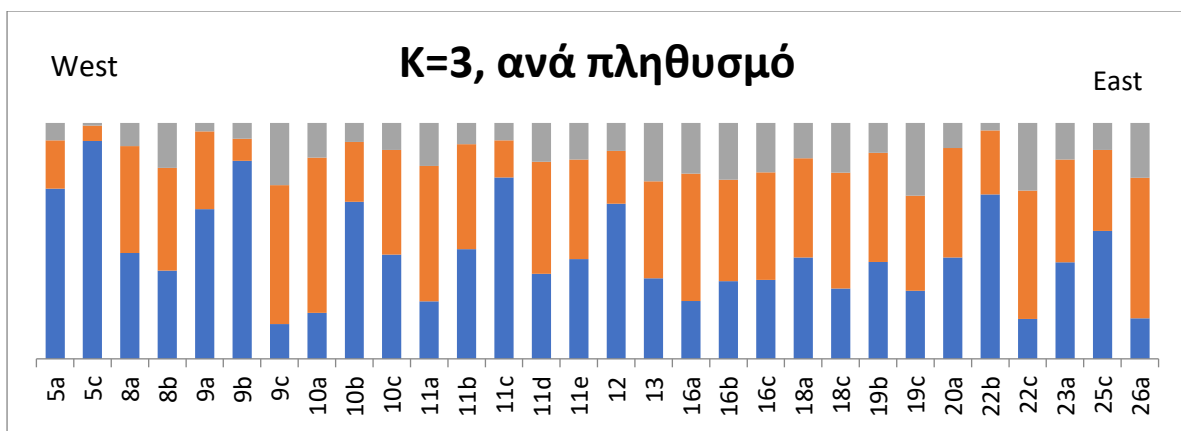
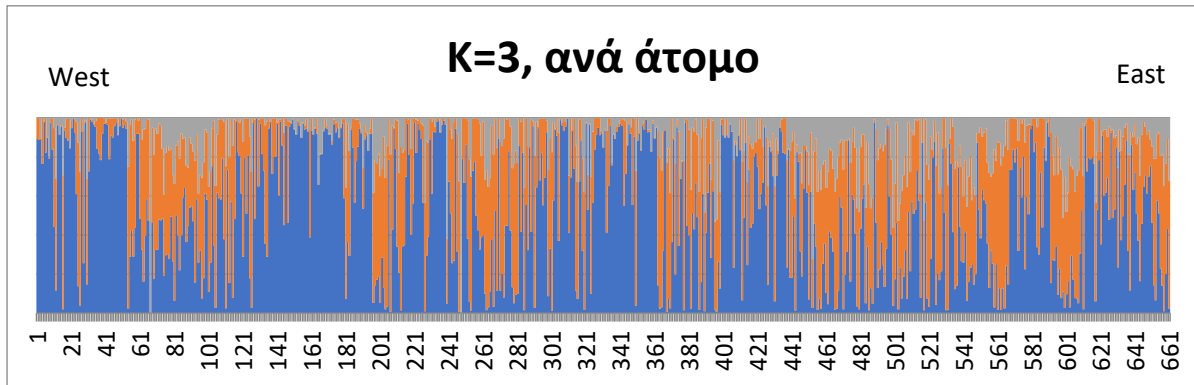
* με έντονη επισήμανση η μεγαλύτερη τιμή ΔK

K	Reps	Mean LnP(K)	StdevLnP(K)	Ln'(K)	 Ln''(K) 	Delta K
1	10	-818763.09	0.8787	NA	NA	NA
2	10	-758169.17	1.9839	60593.92	55751.47	28102.643
3	10	-753326.72	44.6988	4842.45	1781.38	39.852
4	10	-750265.65	87.0103	3061.07	628.18	7.219
5	10	-747832.76	304.7548	2432.89	479.9	1.574
6	10	-745879.77	11.3234	1952.99	721.32	63.701
7	10	-744648.1	435.6753	1231.67	116.91	0.268
8	10	-743299.52	331.8838	1348.58	NA	NA



Εικόνα 22. Γραφική παράσταση της μεταβολής της τιμής ΔΚ, για κάθε τιμή Κ







Εικόνα 23. Εκτιμώμενη πληθυσμιακή δομή με βάση το λογισμικό STRUCTURE. Για κάθε Κ δίνονται δύο διαγράμματα, ένα για τον συνολικό αριθμό ατόμων κι ένα ανά πληθυσμό, ως μέσος όρος στα άτομα του. Κάθε στήλη αποτελείται από Κ αριθμό χρωμάτων, αντιπροσωπεύοντας το ποσοστό εκτιμώμενης αντιστοίχισης του ατόμου σε κάθε μια από τις Κ ομάδες.

Ανάλυση AMOVA

Για την ανάλυση αυτή εξετάστηκαν διάφορα σενάρια ομαδοποίησης των πληθυσμών, και τα κυριότερα παρατίθενται στον πίνακα 7. Τα σενάρια όπου συγχωνεύτηκαν γειτονικοί πληθυσμοί μικρού μεγέθους έδωσαν συστηματικά μεγαλύτερες τιμές F_{CT} σε σχέση με αυτά όπου χρησιμοποιήθηκαν οι πληθυσμοί με το αρχικό τους μέγεθος. Συγκεκριμένα το 1^ο σενάριο χρησιμοποιεί όλους τους 30 πληθυσμούς ανεξάρτητους μεταξύ τους και τους ομαδοποιεί σε 3 ομάδες: Δυτική (από Βαlearίδες έως ΝΑ της Σικελίας), Κεντρική (Ιόνιο Πέλαγος) και Ανατολική Μεσόγειο (Αιγαίο - Λεβαντίνη). Στο 2^ο σενάριο, γίνεται συγχώνευση ορισμένων από αυτούς, οι πληθυσμοί καταλήγουν να είναι 20 και ομαδοποιούνται σε δύο μεγάλες ομάδες: Δυτική (από Βαlearίδες έως ΝΑ της Σικελίας) και Κεντρική- Ανατολική Μεσόγειο. Στο 3^ο σενάριο, οι ίδιοι 20 πληθυσμοί ομαδοποιούνται στις τρεις παραπάνω ομάδες. Στο 4^ο σενάριο, οι πληθυσμοί συγχωνεύονται ακόμη περισσότερο, γίνονται 15 και ομαδοποιούνται σε 3 ομάδες (όπως στο 1^ο σενάριο, Δυτική, Κεντρική, Ανατολική Μεσόγειος), και στο 5^ο σενάριο οι 15 πληθυσμοί ομαδοποιούνται σε 4 μικρότερες ομάδες (όπως στο 4^ο σενάριο, απλά ο 5c αποτελεί μια ομάδα μόνος του). Τα σενάρια έγιναν με βάση γεωγραφικά κριτήρια αλλά και αφού παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός 5c πιθανόν να διαφοροποιείται λίγο, ενώ οι συγχωνεύσεις όπως προαναφέρθηκε έγιναν για να μην υπάρχουν μικροί πληθυσμοί που πιθανά αλλοιώνουν τη συνολική εικόνα. Όλες οι τιμές F_{SC} , F_{CT} , F_{ST} ήταν στατιστικά σημαντικές (p values < 0.001).



Πίνακας 7. Αποτελέσματα από την ανάλυση ΑΜΟΝΑ

	Σενάριο 1: 30 πληθυσμοί 3 ομάδες	Σενάριο 2: 20 πληθυσμοί, 2 ομάδες	Σενάριο 3: 20 πληθυσμοί, 3 ομάδες	Σενάριο 4: 15 πληθυσμοί, 3 ομάδες	Σενάριο 5: 15 πληθυσμοί, 4 ομάδες
Ομάδα 1	Δυτική Μεσόγειος 5a,5c,8a,8b 9a,9b,9c, 10a,10b, 10c, 11a, 11b,11c, 11d,11e, 12, 13, 16a, 16b,16c	Δυτική Μεσόγειος 5a,5c,8a,8b, 9a, 9bc, 10abc, 11ab, 11c, 11de, 12, 13, 16abc	Δυτική Μεσόγειος 5a,5c,8a,8b, 9a,9bc, 10abc, 11ab, 11c, 11de, 12, 13, 16abc	Δυτική Μεσόγειος 5a, 5c, 8ab, 9a, 9bc, 10abc, 11ab, 11c, 11de, 12, 13, 16abc	Δυτική Μεσόγειος 5a, 8ab, 9a, 9bc,10abc, 11ab, 11c, 11de, 12, 13 16abc
Ομάδα 2					Μαγιόρκα 5c
Ομάδα 3	Κεντρική 18a, 18c, 19b, 19c, 20a	Κεντρική- Ανατολική 18ac, 19bc, 20a 22bc, 23a, 25c, 26a	Κεντρική 18ac, 19bc, 20a	Κεντρική 18ac, 19bc, 20a	Κεντρική 18ac, 19bc, 20a

Ομάδα 4	Ανατολική 22b, 22c, 23a, 25c, 26a		Ανατολική 22bc, 23a, 25c, 26a	Ανατολική 22bc, 23a, 25c, 26a	Ανατολική 22bc, 23a, 25c, 26a
Variation %					
Μεταξύ ομάδων	0,087	0,126	0,183	0,196	0,183



Μεταξύ Πληθυσμών εντός ομάδων	2,041	1,297	1,270	0,882	0,877
Εντός Πληθυσμών	97,871	98,577	98,545	98,923	98,940
Fixation Indices					
F _{ST}	0,02129	0,01423	0,01454	0,01077	0,01060
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
F _{SC}	0,02043	0,01298	0,01273	0,00883	0,00879
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
F _{CT}	0,00088	0,00126	0,00183	0,00196	0,00183
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001



Συζήτηση

Αποτελέσματα εργαστηριακών τεχνικών

Η απομόνωση του DNA ήταν καλής ή μέτριας ποιότητας στα περισσότερα άτομα της δειγματοληψίας (περίπου το 80%), και επομένως μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τις βιβλιοθήκες (βλ. Πίνακας 1). Από τον πίνακα αυτό, κατηγοριοποίησης των δειγμάτων με βάση την ποιότητα τους, παρατηρείται ότι για τους περισσότερους πληθυσμούς η καλή, μέτρια ή κακή ποιότητα ήταν κάτι συστηματικό και αφορούσε το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων τους, αλλά ήταν ιδιαίτερα έντονο και ανά πληθυσμό (GSA). Σε όλους τους πληθυσμούς υπήρχε τρόπον τινά ένα πρότυπο και πάνω από τα μισά τους άτομα ανήκαν σε μια μόνο κατηγορία ποιότητας, ενώ για 17 από τους 32 (το 53%αυτών), το 75% των ατόμων τους ήταν μιας κατηγορίας μόνο. Τέλος, υπήρχαν δύο πληθυσμοί (11e και 20b) όπου όλα τα (50) άτομα τους ήταν μιας κατηγορίας αποκλειστικά (καλής και κακής, αντίστοιχα). Σε σχέση με τις περιοχές δειγματοληψίας, για τα GSA 5 ως 11 το συντριπτικό ποσοστό των ατόμων (>70%) ήταν της πρώτης μόνο κατηγορίας (καλής ποιότητας), ενώ για τα GSA 13 ως 26, τα άτομα με καλή ποιότητα DNA ήταν σε ποσοστό 0-12% του συνόλου. Στο GSA 12 το ποσοστό ατόμων καλής ποιότητας DNA ήταν 30%.

Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι θα πρέπει να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο η συλλογή των ιστών για την ποιότητα του εξαγόμενου DNA. Αυτό ήταν το μόνο στάδιο που διαφοροποιούνταν ανά πληθυσμό/GSA, αφού η απομόνωση του DNA έγινε από ένα άτομο αποκλειστικά, στο ίδιο εργαστήριο και με το ίδιο πρωτόκολλο. Η συστηματικότητα των αποτελεσμάτων όσον αφορά την ποιότητα του DNA ανά πληθυσμό και ανά GSA, δείχνει πιθανόν ότι σε κάποιες περιπτώσεις δεν δόθηκε η δέουσα προσοχή κατά τη δειγματοληψία. Τα κυριότερα σημεία που θα έπρεπε να ληφθούν υπόψη σε αυτή τη διαδικασία, είναι πρώτα η δειγματοληψία των ιστών να γίνει το συντομότερο δυνατό μετά την εξαίεση των ατόμων, και στη συνέχεια ο ιστός που τοποθετείται στο αντίστοιχο φιαλίδιο να μην υπερβαίνει το 10-20% του όγκου της αιθανόλης που θα προστεθεί για να συντηρήσει τον ιστό. Το τελευταίο κριτήριο για την ακρίβεια είναι σίγουρο πως δεν τηρήθηκε στα δείγματα από τα GSA 20a, 20b (τα φιαλίδια περιείχαν μεγάλη ποσότητα ιστού), όπου και είχαμε μηδενικό ποσοστό καλής ποιότητας DNA.



Ο έλεγχος που έγινε για να φανεί αν οι πληθυσμοί με καλή ποιότητα DNA αντιστοιχούν σε αυτούς με τους πολλούς *stacks*, έδειξε ότι η συσχέτιση δεν είναι απόλυτη. Ισχύει δηλαδή ότι η κακή ποιότητα DNA κατά κύριο λόγο αντιστοιχεί σε πληθυσμούς με λίγους *stacks*, δεν ισχύει όμως το αντίθετο. Υπάρχουν αρκετοί πληθυσμοί με σχεδόν άριστη ποιότητα DNA, που όμως έδωσαν λίγους *stacks*. Ο μικρός αριθμός αλληλουχιών ή *stacks* θα μπορούσε να οφείλεται σε λανθασμένη ποσοτικοποίηση, σε πρόβλημα κατά τη σύνδεση (ligation) των ανταπτόρων, ή σε άλλο πρόβλημα κατά τη διαδικασία κατασκευής των βιβλιοθηκών που μένει να διερευνηθεί. Ο αρκετά μεγάλος αριθμός ατόμων με λίγους *stacks* ήταν πάντως η αιτία που οδήγησε στο να μειωθεί αρκετά ο αριθμός των ατόμων που μπορούσαν να αναλυθούν, χάνοντας πιθανώς κρίσιμη πληροφορία για αυτά. Είναι γενικότερα ένα πρόβλημα που συναντάται σε πολλές εργασίες που χρησιμοποιούν SNPs και που αναγκάζει συχνά τους ερευνητές να μειώσουν αρκετά το σύνολο δεδομένων τους, αφαιρώντας άτομα από την ανάλυση (O'Leary et al., 2018).

Αναλύσεις πληθυσμιακής γενετικής

Ενδοπληθυσμιακή γενετική ποικιλότητα

Η παρατηρούμενη τιμή της ετεροζυγωτίας είναι αρκετά μικρότερη από την αναμενόμενη σε όλους τους πληθυσμούς, σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις η διαφορά τους είναι πολύ μεγάλη, και φαίνεται αυτή να σχετίζεται με πληθυσμούς που έχουν λίγα άτομα και μεγάλο ποσοστό ελλείψεων σε γονότυπους (*missing data*) (Πίνακας 5). Ο μέσος όρος των τιμών παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας κυμαίνεται από 0,07295 στον πληθυσμό 13 έως 0,18585 στον πληθυσμό 10a, ενώ ο μέσος όρος των τιμών αναμενόμενης ετεροζυγωτίας κυμαίνεται από 0,23811 στον πληθυσμό 9b έως 0,4554 στον 10a. Αντίθετα σε πληθυσμούς που έχουν πολλά άτομα και αυτά έχουν μικρό ποσοστό *missing data*, αυτή η διαφορά δεν είναι έντονη. Παρόμοιες χαμηλές τιμές ετεροζυγωτίας έχουν παρατηρηθεί και στο παρελθόν σε πληθυσμούς του *A. foliaceae* (M. V. Fernández et al., 2011)(με χρήση ISSRs), σε εργασίες για άλλα καρκινοειδή, όπως το *Nephrops norvegicus* στη Μεσόγειο (Stamatis et al., 2006) με αλλοένζυμα, και γενικότερα σε εργασίες όπου χρησιμοποιήθηκαν SNPs (Sunde et al., 2020). Αντίθετα, σε μελέτες για το συγγενικό του είδος *Aristeus antennatus* στη Μεσόγειο στις



οποίες χρησιμοποιήθηκαν μικροδορυφορικοί δείκτες, οι τιμές ετεροζυγωτίας είναι σημαντικά ψηλότερες (Agulló et al., 2020; Heras et al., 2019) αλλά αυτό όπως έδειξαν οι (Sunde et al., 2020) πιθανότατα οφείλεται σε διαφορές λόγω των εγγενών χαρακτηριστικών των δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στις εργασίες αυτές (μικροδορυφορικά-SNPs), παρά σε βιολογικές διαφορές.

Συντελεστές εγκαθίδρυσης (Fixation indices, Fst)

Οι τιμές Fst οι οποίες υπολογίστηκαν ανά ζεύγη πληθυσμών (Εικόνα 18) και αποτελούν ένα μέτρο της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ τους, κυμαίνονται από -0,08036 μεταξύ των πληθυσμών 5c (Α. της Μαγιόρκα) - 9c (Τυρρηνική Θάλασσα) έως 0,05851 μεταξύ των πληθυσμών 16a (ΒΔ της Σικελίας) - 19b (Ν. Ιταλία) και είναι στατιστικά μη σημαντικές. Τέτοιας τάξης τιμή ($F_{st}=0,05$, $p<0,05$) μεταξύ δειγμάτων από παρόμοιες περιοχές (ΒΔ της Σικελίας-ΝΔ της Ιταλίας), παρατηρήθηκε και στην εργασία (M. V. Fernández, Heras, Maltagliati, et al., 2013), όπου όμως υπήρξαν και πολύ μεγαλύτερες τιμές (μέγιστη τιμή $F_{st}=0,382$, $p<0,001$ μεταξύ δειγμάτων από Αιγαίο και Ίμπιζα).

Οι αρνητικές τιμές στην ουσία δηλώνουν ότι η διαφοροποίηση που υπάρχει εντός των πληθυσμών είναι μεγαλύτερη από αυτή μεταξύ των πληθυσμών. Σε παλαιότερες γενετικές μελέτες για το *A. foliaceae* αλλά και για άλλα καρκινοειδή στη Μεσόγειο, έχουν βρεθεί επίσης χαμηλές τιμές Fst (Agulló et al., 2020; R. Cannas et al., 2012; M. V. Fernández et al., 2011; Heras et al., 2019; Marcias et al., 2010).

Σε δύο αναλύσεις μετά από συγχώνευση γειτονικών πληθυσμών μικρού μεγέθους ώστε να γίνει πιο ισχυρή στατιστικά η ανάλυση, οι αντίστοιχες τιμές Fst κυμάνθηκαν: α) για ένα σύνολο 20 πληθυσμών, από -0,06263 για το ζεύγος 5c-26a (μεταξύ Μαγιόρκα και Αιγύπτου) έως 0,02865 για το ζεύγος 19bc-26a (μεταξύ Ν. Ιταλίας και Αιγύπτου) (Εικόνα 19), και β) για ένα σύνολο 15 πληθυσμών, από -0,05107 στους πληθυσμούς 5c-1316 (μεταξύ Μαγιόρκα και Δ. της Σικελίας) έως 0,00964 στους 20a-2526 (μεταξύ Ιονίου και Λεβαντίνης) (Εικόνα 20). Η μέγιστη τιμή Fst επομένως εμφανίζεται μειωμένη μετά από κάθε συγχώνευση, ενώ η ελάχιστη (αρνητική) τιμή αφορά πάντα τον πληθυσμό 5c.



Παρατηρούμε λοιπόν ότι ο δείκτης F_{st} εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα ανίχνευσης γενετικής διαφοροποίησης όταν οι πληθυσμοί εξετάζονται ανεξάρτητα μεταξύ τους, χωρίς συγχωνεύσεις.

Οι πληθυσμοί 16a και 5c ενδεχόμενα χρειάζονται επιπλέον προσοχή. Ο πληθυσμός 5c (Α. της Μαγιόρκα) εμφανίζει τα εξής χαρακτηριστικά:

α) έχει τις περισσότερες ανά ζεύγη F_{st} τιμές του αρνητικές (24 από τις 29 αρνητικές), β) στην ανάλυση STRUCTURE έχει ένα πρότυπο αρκετά διαφορετικό από τους υπόλοιπους πληθυσμούς, με τα άτομα του να έχουν γενετική σύσταση σχεδόν αποκλειστικά από τη μια δεξαμενή ($K=2$, εικόνα 23), γ) Στην ανάλυση AMOVA έχει ενδιαφέρον η σχετικά υψηλή τιμή F_{CT} για το σενάριο 5 (Πίνακας 7), όπου ο πληθυσμός αυτός αποτελεί μια ομάδα μόνος του, ενώ είναι από αυτούς με λίγα *missing data* (Εικόνα 17).

Επιπλέον, ο πληθυσμός 16a (ΒΔ της Σικελίας) φαίνεται στο διάγραμμα διασποράς της ανάλυσης DAPC (εικόνα 21) να ξεχωρίζει από τους άλλους πληθυσμούς ενώ επίσης το 75% των ανά ζεύγη F_{st} τιμών του είναι θετικές και μάλιστα το 45% αυτών είναι μεγαλύτερες από 0,03. Είναι όμως από τους πληθυσμούς με λίγα άτομα και αρκετά *missing data* (Πίνακας 5, Εικόνα 17). Θα είχε επομένως ενδιαφέρον αν στο μέλλον είναι διαθέσιμο ένα καλύτερο σύνολο δεδομένων με ελάχιστα *missing data*, να διαπιστωθεί αν ο πληθυσμοί από τις περιοχές αυτές διαφοροποιούνται όντως γενετικά από τους υπόλοιπους.

Εκτίμηση πληθυσμιακής δομής

A. Σε ότι αφορά το διάγραμμα διασποράς της DAPC (Εικόνα 21) στο οποίο η κατανομή των ατόμων σε ομάδες έγινε *a priori* με βάση τις περιοχές δειγματοληψίας, η ανάλυση έδειξε την ύπαρξη ενός μεγάλου παμμικτικού πληθυσμού, με εξαίρεση ορισμένους πληθυσμούς που ξεχωρίζουν, όπως ο 16a για τον οποίο έγινε λόγος παραπάνω. Από δεδομένα παλαιότερων εργασιών, οι (Marcias et al., 2010) είχαν επίσης πραγματοποιήσει ανάλυση PCA, που είχε δείξει ως πιθανότερη την απουσία γενετικής δομής για το *A. foliaceae* στη Μεσόγειο.

B. Από την ανάλυση STRUCTURE και τη μέθοδο Evanno που ακολούθησε (Πίνακας 6), προκύπτει ως πιο πιθανό το σενάριο της ύπαρξης δύο γενετικών δεξαμενών στη Μεσόγειο για το *A. foliaceae*. Παρόλα αυτά, οι πληθυσμοί εμφανίζονται να έχουν παρόμοιο πρότυπο, έχοντας ποσοστά (που βέβαια ποικίλουν) και από τις δύο αυτές δεξαμενές στο γονιδίωμα



τους (Εικόνα 23). Δεν προκύπτει επομένως ένα σαφές γεωγραφικό πρότυπο γενετικής διαφοροποίησης για το είδος στη Μεσόγειο. Το εύρημα αυτό συνάδει με αυτά που έχουν αναφερθεί για το είδος σε παλαιότερες εργασίες (M. V. Fernández et al., 2011; M. V. Fernández, Heras, Viñas, et al., 2013; M. V. Fernández, Heras, Maltagliati, et al., 2013; Marcias et al., 2010) αλλά και για συγγενικά είδη στη Μεσόγειο, όπως το *Aristeus antennatus* (Aguilló et al., 2020). Ο πληθυσμός ο οποίος δείχνει να αποκλίνει από το παραπάνω πρότυπο με σχεδόν όλο το γονιδίωμά του να προέρχεται από τη μια δεξαμενή, είναι ο 5c (ανατολικά της Μαγιόρκα) για τον οποίο έγινε λόγος και παραπάνω. Μια πιθανή εξήγηση για το διαφορετικό πρότυπο που εμφανίζει ο 5c, μπορεί να δοθεί παρατηρώντας τη ροή του Βόρειου ρεύματος στην περιοχή των Βαλεαρίδων. Το ρεύμα αυτό κατευθύνεται ΝΔ κατά μήκος των ακτών της Ιβηρικής χερσονήσου, ένα μέρος του περνάει από τα στενά της Ίμπιζα προς τη θάλασσα του Άλμποραν, ενώ το μεγαλύτερο μέρος του κατευθύνεται και πάλι βόρεια, πάνω από τις Βαλεαρίδες νήσους προς τα ανατολικά, απομονώνοντας κατά κάποιον τρόπο τον πληθυσμό 5c. (Aguilló et al., 2020; V. Fernández et al., 2005).

Γ. Από την ανάλυση AMOVA (Πίνακας 7) προκύπτει ότι η μέγιστη τιμή F_{CT} είναι 0.00196 και παρατηρείται στο σενάριο 4, με τους 15 πληθυσμούς (αφού είχαν συγχωνευτεί κάποιοι από τους αρχικούς 30) και την ομαδοποίηση τους σε 3 ομάδες, Δυτική(από Βαλεαρίδες έως ΝΑ της Σικελίας), Κεντρική (Ιόνιο Πέλαγος) και Ανατολική Μεσόγειο (Αιγαίο - Λεβαντίνη). Η τιμή αυτή $F_{CT} = 0,00196$ θεωρείται πολύ χαμηλή, είναι όμως στατιστικά σημαντική. Σημαίνει ότι το ποσοστό της ποικιλότητας που εξηγείται από διαφορές μεταξύ των ομάδων είναι 0,196% (~0,2%) ενώ το ποσοστό της ποικιλότητας που εξηγείται από διαφορές μεταξύ των πληθυσμών εντός των 3 ομάδων είναι 0,882% και το υπόλοιπο 98,923% είναι το ποσοστό της ποικιλότητας που οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των ατόμων των πληθυσμών. Το όριο μεταξύ δυτικής και κεντρικής Μεσογείου καθορίστηκε στο GSA 15 κι όχι 16, καθώς είχε φανεί από προηγούμενη εργασία (M. V. Fernández, Heras, Maltagliati, et al., 2013) ότι άτομα της περιοχής Portopalo (ΝΑ της Σικελίας) ήταν πιο συγγενικά με άτομα της δυτικής, από ότι με της ανατολικής Μεσογείου. Πράγματι με το όριο στο GSA 15 η τιμή F_{CT} ήταν μεγαλύτερη από ότι με το όριο στο 16. Οι τιμές F_{SC} , F_{CT} , F_{ST} για όλα τα σενάρια που εξετάστηκαν ήταν σημαντικές στατιστικά, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το σενάριο 5 όπου ο πληθυσμός 5c



αποτελεί μια ομάδα μόνος του κι αυτό έδωσε τιμή για το F_{CT} αρκετά ψηλή, αλλά και σημαντική στατιστικά.

Ένα ακόμη συμπέρασμα που προκύπτει αν παρατηρήσει κανείς τα αποτελέσματα της AMOVA, είναι η αύξηση της τιμής F_{CT} όσο περισσότερο συγχωνεύονται οι μικροί σε μέγεθος πληθυσμοί. Φαίνεται λοιπόν ότι η δημιουργία μεγάλων πληθυσμών ακόμη και με τα ίδια *missing data*, βοηθά στη διάκριση πιθανής δομής μεταξύ των πληθυσμών ενός είδους σε μια περιοχή, αντίθετα από ότι συνέβη με τις τιμές F_{st} , όπως σχολιάστηκε παραπάνω.

Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με εκείνα παλαιότερων μελετών για το είδος στη Μεσόγειο, στις οποίες οι αντίστοιχες αναλύσεις AMOVA έδειξαν ότι το μεγαλύτερο (>98%) ποσοστό της παρατηρούμενης ποικιλότητας οφειλόταν σε διαφορές μεταξύ των ατόμων, εντός των πληθυσμών (M. V. Fernández et al., 2011; M. V. Fernández, Heras, Viñas, et al., 2013; Marcias et al., 2010). Σε μια εργασία μόνο υπολογίστηκε ότι 16,9% της ποικιλότητας αποδιδόταν σε διαφορές μεταξύ έξι πληθυσμών της Μεσογείου (Δυτική, Κεντρική και Ανατολική), αλλά όταν αυτοί χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (Ανατολική- Δυτική Μεσόγειος), η τιμή ήταν $F_{CT}=0.233$ αλλά μη σημαντική στατιστικά (p value=0.061) (M. V. Fernández, Heras, Maltagliati, et al., 2013).

Τα παραπάνω αποτυπώνουν τη συνδεσιμότητα που υπάρχει μεταξύ των πληθυσμών της κόκκινης γαρίδας στη Μεσόγειο, που προκύπτει από την έλλειψη γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ τους. Σε παρόμοια συμπεράσματα μη ύπαρξης γενετικής δομής, έχουν καταλήξει συγγραφείς που μελέτησαν το συγγενικό του είδος *Aristeus antennatus* στη Μεσόγειο (Agulló et al., 2020; Rita Cannas et al., 2012; Heras et al., 2019; Marra et al., 2015; Roldán et al., 2009) προτείνοντας την ύπαρξη ενός παμμικτικού πληθυσμού στη Μεσόγειο. Αντίθετα, οι (Jenkins et al., 2019) απέδειξαν ότι υπάρχει γενετική διαφοροποίηση μεταξύ πληθυσμών από το Αιγαίο και δυτικά της Ιταλίας για το είδος αστακού *Homarus gammarus*, ενώ μελέτη που έγινε για τη γαρίδα *Crangon crangon* σε ένα μεγάλο εύρος περιοχών (Luttikhuisen et al., 2008), έδειξε ότι πληθυσμοί από τη Δυτική Μεσόγειο και την Αδριατική είναι γενετικά διαφοροποιημένοι, προτείνοντας τα στενά της Σικελίας και το μέτωπο Αλμερίας-Οράν ή τα στενά του Γιβραλτάρ ως γεωγραφικά φράγματα στη Μεσόγειο. Παρομοίως, οι (Pérez-Losada et al., 2002) μελέτησαν το είδος *Sepia officinalis*, και βρήκαν να διαφοροποιούνται πληθυσμοί που βρίσκονται εκατέρωθεν του μετώπου Αλμερία – Οράν, ενώ στο ίδιο



συμπέρασμα κατέληξαν και οι (Reuschel et al., 2010) στη μελέτη τους για το είδος γαρίδας *Palaemon elegans* ($\Phi_{ST}=0,7$, $P<0,05$). Επίσης, μελέτη των (Deli et al., 2016) έδειξε ότι τα στενά Σικελίας Τυνησίας αποτελούν γεωγραφικό φράγμα ($F_{CT} = 0,100$, $P < 0,001$), ($\Phi_{ST}=0,56$, $P<0,05$) για το είδος καβουριού *Carcinus aestuarii*. Αντίθετα, η ύπαρξη γεωγραφικών φραγμάτων δεν αποδείχτηκε στην παρούσα μελέτη για το *Aristaeomorpha foliacea*, όπως και σε δύο προγενέστερες μελέτες για τη γαρίδα *Aristeus antennatus*. Οι (Marra et al., 2015) έδειξαν ότι τα στενά της Σικελίας δεν αποτελούν εμπόδιο για τη γονιδιακή ροή για το είδος αυτό, και το ίδιο αποδείχτηκε και στην εργασία (Heras et al., 2019), όπου μελέτησαν την επίδραση 4 πιθανών γεωγραφικών φραγμάτων εντός της Μεσογείου (μέτωπο Αλμερίας-Οράν, Βαlearίδων, στενό Ίμπιζας και στενά Σικελίας), και κανένα δεν αποδείχτηκε να εμποδίζει τη γονιδιακή ροή.

Γονιδιακή ροή-Μετανάστευση

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με αυτά αντίστοιχων εργασιών που έχουν αναφερθεί έως τώρα στη βιβλιογραφία για το είδος (Πίνακας 1) (M. V. Fernández et al., 2011; M. V. Fernández, Heras, Viñas, et al., 2013; M. V. Fernández, Heras, Maltagliati, et al., 2013; Marcias et al., 2010). Σε αυτές η πιθανότερη εξήγηση που δίνεται για την έλλειψη γενετικής διαφοροποίησης στους πληθυσμούς της γαρίδας στη Μεσόγειο, είναι η σημαντική ικανότητα διασποράς γενετικού υλικού κατά τα προνυμφικά στάδια κυρίως του είδους. Οι (Palmas et al., 2017) ασχολήθηκαν με τη μοντελοποίηση της διασποράς των προνυμφικών σταδίων του *A. foliacea* στη δυτική Μεσόγειο και έδειξαν ότι η απόσταση που μπορούν να καλύψουν οι προνύμφες πριν εγκατασταθούν και πάλι στο βυθό μπορεί να είναι πολύ μεγάλη, κυμάνθηκε από 10 έως 850 χιλ, στα 4 πιθανά σενάρια διασποράς που εξετάστηκαν. Όσον αφορά σε μελέτες για άλλα ασπόνδυλα στη Μεσόγειο, οι (Orsi Relini et al., 2013) μελέτησαν το συγγενικό του είδος *Aristeus antennatus* και το αναφέρουν ως ένας πόρος εν κινήσει (resource on the move), αναγνωρίζοντας την οικονομική του αξία αλλά και παρατηρώντας τις μετακινήσεις του. Στη μελέτη αυτή υποστηρίζεται ότι οι γαρίδες του είδους αυτού πραγματοποιούν μεγάλες μεταναστεύσεις, είτε παθητικές στα προνυμφικά τους στάδια που οφείλονται στη δράση των ρευμάτων, είτε ενεργητικές κατά τα επόμενα



στάδια της ζωής τους, οπότε επιστρέφουν στα βαθύτερα στρώματα όπου γεννήθηκαν. Στη μελέτη των (Relini et al., 2000) έγινε σήμανση 45 ατόμων του είδους *Aristeus antennatus* και ένα μήνα μετά μια από αυτές συλλέχθηκε σε απόσταση 10 ναυτικών μιλίων ΒΑ του σημείου απελευθέρωσης και σε μεγαλύτερο βάθος από αυτό, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση της ενεργητικής μετακίνησης κατά την ενήλικη ζωή. Σε άλλη εργασία σήμανσης, οι Landa και Pereda (1997) απέδειξαν ότι ακόμη και είδη που θεωρούνται αποκλειστικά βενθικά όπως το ψάρι *Lophius piscatorius*, πραγματοποιούν μη αναμενόμενες μετακινήσεις και σε ορισμένες περιπτώσεις διασχίζουν και υποτιθέμενα φράγματα μεταξύ των αποθεμάτων τους. Επίσης ο (Montgomery, 1990) μελέτησε το παράκτιο είδος γαρίδας *Penaeus plebejus* στην Αυστραλία και έδειξε ότι αρκετές από αυτές μπορούν να καλύψουν απόσταση έως 1.300χλμ, ενώ ο (Baelde, 1992) μελέτησε το βαθύβιο είδος γαρίδας *Haliporoides sibogae* στην Α. Αυστραλία παρατηρώντας τη μετακίνηση της προς το βορρά με σκοπό την ωστοκία, κατά μήκος μιας ακτής όπου το κύριο επιφανειακό ρεύμα ρέει προς το νότο. Σε ότι αφορά τις προνύμφες της γαλαζοκόκκινης γαρίδας *A. antennatus*, οι (Carbonell et al., 2010) θεωρούν ότι μόλις αυτές εκκολαφθούν, πραγματοποιούν κατακόρυφες οντογενετικές μετακινήσεις στη στήλη του νερού και παραμένουν στην επιφάνεια όπου υπάρχει μεγαλύτερη διαθεσιμότητα τροφής που τους επιτρέπει να εξελιχθούν στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια. Στη συνέχεια, τα νεαρά άτομα ξεκινούν το ταξίδι της μεταφοράς τους και πάλι στα αρχικά βαθύτερα στρώματα. Οι (M. V. Fernández et al., 2011) αναφέρουν ότι οι μετακινήσεις κατά τη διάρκεια των πελαγικών προνυμφικών σταδίων για τα δύο είδη κόκκινης γαρίδας (*A. foliaceae*, *A. antennatus*) συμβαίνουν σε ένα διάστημα τριών έως έξι εβδομάδων πριν τα νεαρά άτομα αρχίσουν να μεταφέρονται βαθύτερα. Επίσης, οι Palmas et al.(2014) προτείνουν τη μεσολάβηση 4 μηνών από τη γέννηση ως τη στρατολόγηση στα αλιευτικά πεδία των νεαρών ατόμων γαρίδας και για τα δύο είδη. Από τα παραπάνω, αλλά και από τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας συνάγεται λοιπόν ότι το *Aristaeomorpha foliaceae* είναι πιθανότατα ένα είδος με μεγάλη ικανότητα διασποράς είτε κατά τα πρώτα προνυμφικά στάδια, είτε κατά την ενήλικη ζωή του.

Συνοψίζοντας, η παρούσα εργασία έδειξε πως οι πληθυσμοί της κόκκινης γαρίδας στη Μεσόγειο εμφανίζουν ελάχιστη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ τους και φαίνεται να



αποτελούν μέρος ενός ενιαίου παμμικτικού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συνηγορούν με εκείνα άλλων παλαιότερων μελετών, βασίζονται όμως σε πολύ μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, δειγματοληπτικών περιοχών, αλλά και δεικτών σε σχέση με τις προηγούμενες εργασίες. Υπάρχουν παρόλα αυτά κάποιες ενδείξεις ότι δύο πληθυσμοί ενδεχόμενα να διαφέρουν από τους υπόλοιπους και αυτό θα μπορούσε να διερευνηθεί περισσότερο στο μέλλον. Μια πρόταση θα μπορούσε να είναι να αφαιρεθούν επιπλέον άτομα από το υπάρχον σύνολο δεδομένων για να επαναληφθούν οι αναλύσεις έχοντας λιγότερα *missing data*. Μια ακόμη θα ήταν να γίνει εκ νέου αλληλούχηση ορισμένων από τις υπάρχουσες βιβλιοθήκες, ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των αλληλουχιών των ατόμων (το *coverage* τους) και να βασιστεί η νέα ανάλυση σε περισσότερα κοινά στα άτομα SNPs. Η σύγκριση άλλωστε των αποτελεσμάτων του “χαλαρού” σετ δεδομένων (βλ. Παράρτημα) με το “αυστηρό”, έδειξε ότι μειώνοντας τον αριθμό των ατόμων με *missing data*, αυτό μπορεί να βοηθήσει να αποκαλυφθεί η γενετική δομή, εφόσον υπάρχει. (Βλ. διαγράμματα DAPC, τιμές *F_{st}*, πίνακες AMOVA στα αποτελέσματα και στο Παράρτημα).

Από την άποψη των μεθόδων που ακολουθήθηκαν, η μελέτη αυτή κατέδειξε τη σημασία της παραγωγής ποιοτικών συνόλων δεδομένων στα οποία να μπορούν να βασιστούν οι συγκεκριμένες αναλύσεις. Θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη δειγματοληψία, την απομόνωση του DNA και την ποσοτικοποίηση του, αλλά και στα μετέπειτα στάδια κατασκευής των βιβλιοθηκών. Τέλος αποδεικνύεται σημαντικό σε φυλογεωγραφικές μελέτες, να συμπεριλαμβάνονται πληθυσμοί από όλες τις περιοχές εξάπλωσης του είδους, ώστε να μπορούν να εξαχθούν ολοκληρωμένα και ασφαλή συμπεράσματα για αυτές.



Παράρτημα

Πρωτόκολλο δειγματοληψίας

1. Κόψιμο μικρού μέρους μυϊκού ιστού (0.5 cm^3) από το κάθε άτομο (Εικόνα 3).
2. Τοποθέτησή του σε ειδικούς σωλήνες χωρητικότητας 2ml, γεμάτους με αιθυλική αλκοόλη (96%, ή 100%). Ο όγκος του ιστού να μην υπερβαίνει το 20% του συνολικού όγκου της αλκοόλης.
3. Σήμανση του σωλήνα με κατάλληλο τρόπο, με κωδικό που θα περιλαμβάνει το όνομα του είδους (Af), την περιοχή από όπου αλιεύθηκε και την αρίθμησή του. Έγινε προσπάθεια να υπάρχουν δείγματα από 50 άτομα από κάθε περιοχή (GSA και υπό περιοχές αυτών) εκ των οποίων τα 25 τουλάχιστον να ήταν θηλυκά.
4. Καταγραφή όλης της διαθέσιμης πληροφορίας, είτε για την περιοχή αλίευσης (γεωγραφικές συντεταγμένες, βάθος), είτε για τα δείγματα (μήκος, φύλο, βάρος, στάδιο αναπαραγωγής/ωρίμανσης, κτλ).
5. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε ειδικά κουτιά είτε στους -20°C , είτε στη συντήρηση ($+4^\circ\text{C}$) έως να σταλούν για τις γενετικές αναλύσεις.
6. Αλλαγή της αιθυλικής αλκοόλης των δειγμάτων με νέα, 1-3 ημέρες μετά τη δειγματοληψία, για την καλύτερη συντήρηση του ιστού.

Πρωτόκολλο εξαγωγής DNA

1. Κόψιμο μικρής ποσότητας ιστού και τοποθέτηση αυτού σε ειδικά φιαλίδια χωρητικότητας 1.5ml (σωλήνες Eppendorf) για ξήρανση στους 37°C για 1 ώρα
2. Προσθήκη 700 μl διαλύματος εξαγωγής (10mM Tris, 1mM EDTA pH 8), 87μl SDS 10% και 10μl πρωτεΐνης K
3. Επώαση στους 55°C για όλη τη νύχτα
4. Ελαφριά φυγοκέντρηση και προσθήκη 210μl κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου νατρίου
5. Έντονη ανακίνηση για λίγα λεπτά
6. Φυγοκέντρηση σε 14000rpm για 30 λεπτά στους 4°C



7. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα Eppendorf (2ml)
8. Προσθήκη ίσου όγκου αιθυλικής αλκοόλης και ήπια ανάδευση
9. Επάση στους -20°C για 2-3 ώρες στους 4°C
10. Φυγοκέντρηση σε 14000rpm για 20 λεπτά
11. Αφαίρεση του υπερκείμενου
12. Προσθήκη 700μl αιθυλικής αλκοόλης 70%
13. Φυγοκέντρηση σε 14000rpm για 20 λεπτά στους 4°C
14. Αφαίρεση του υπερκείμενου
15. Ξήρανση του DNA
16. Διάλυση του DNA σε 80μl Tris 5mM pH8.5

Πρωτόκολλο κατασκευής βιβλιοθήκης ddRAD

1. Αραίωση του DNA των δειγμάτων σε τελική συγκέντρωση 5ng/μl σε ειδικές πλάκες 96 θέσεων
2. Μεταφορά 3μl από κάθε δείγμα σε νέες πλάκες 96 θέσεων
3. Επάση με δύο περιοριστικά ένζυμα (*Sbf I-Nla III*), στους 37°C για 90 λεπτά. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 3μl από το μίγμα της πέψης, που περιέχει 1x Cut Smart NEB Buffer και 0.3U από το κάθε ένζυμο.
4. Επάση στους 65°C για 25 λεπτά, για την απενεργοποίηση των περιοριστικών ενζύμων.
5. Σύνδεση των θραυσμάτων DNA με τους αντάπτορες. Αρχικά τα δείγματα αφήνονται να πάρουν θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε δείγμα 3μl από ένα μοναδικό ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων, αναμιγνύονται αυτά και επωάζονται στους 22°C για 10 λεπτά. Τέλος σε κάθε δείγμα προστίθενται ακόμη 3μl από το μίγμα της λιγάσης. Αυτό περιέχει 1x CutSmart NEB buffer, 1 mM rATP, T4 Ligase 2K ceU/μg (τελικές συγκεντρώσεις).
6. Επάση στους 22°C για 2 ώρες και 30 λεπτά.
7. Ενοποίηση όλων των δειγμάτων σε μερικούς σωλήνες Eppendorf 2 ml
8. Καθαρισμός με το MinElute PCR Purification Kit, (Qiagen, Hilden, Germany). Μια στήλη από αυτό αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Αρχικά προστίθεται ποσότητα



- διαλύματος PB ίση με 3 όγκους του συνολικού όγκου της βιβλιοθήκης, στο οποίο έχει προστεθεί από πριν ένας δείκτη για το pH, αραιωμένος 1:250. Η ανάμιξη αυτή γίνεται σε τρυβλίο petri στον πάγο. Όλη η ποσότητα από το τρυβλίο συγκεντρώνεται σε ορισμένα Eppendorf των 2ml. Εξετάζεται το χρώμα του υγρού και προστίθεται 1μl οξικού νατρίου 3M, pH 5.0. Αν το χρώμα γίνει κίτρινο και δεν αλλάξει με την προσθήκη ακόμη 1μl οξικού νατρίου, τότε θεωρείται ότι το pH είναι σωστό (<7.5)
9. Γίνονται διαδοχικές φυγοκεντρήσεις για 10 δευτερόλεπτα η κάθε μια, ώστε να περάσει όλο το υγρό που συγκεντρώθηκε στα eppendorf, από την στήλη. Σε κάθε φυγοκέντρηση φορτώνεται ποσότητα 550μl στη στήλη, ενώ η ροή που περνάει κάτω από τη στήλη πετιέται. Όλες οι φυγοκεντρήσεις γίνονται στους 25°C.
 10. Η στήλη ξεπλένεται με 700μl διαλύματος PE και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα 12700rpm, στους 25°C
 11. Η στήλη φυγοκεντρείται εκ νέου, χωρίς άλλο υγρό, και με ανοιχτό το καπάκι της.
 12. Ξήρανση της στήλης σε thermo block, στους 60°C για 5 λεπτά, με ανοιχτό το καπάκι της επίσης.
 13. Έκλυση του DNA με 45μl διαλύματος Tris 10mM, pH 8.5. Η έκλυση γίνεται δύο φορές με το ίδιο διάλυμα, ώστε να περάσει όσο γίνεται περισσότερη ποσότητα του DNA στο διάλυμα. Η ποσότητα του Tris φορτώνεται στη στήλη, επώάζεται αυτή για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα 12700rpm, στους 25°C.
 14. Ποσοτικοποίηση του DNA με Qubit 2.0 fluorometer, με το Qubit dsDNA BR Assay kit
 15. Επιλογή μεγέθους των θραυσμάτων DNA μέσω αгарόζης, ή με ειδική συσκευή (Pippin Prep, Sage Science, Beverly, MA, USA). Στην πιλοτική βιβλιοθήκη η διαλογή μεγέθους έγινε μέσω αгарόζης (Εικόνα 1), οπότε ακολούθησε καθαρισμός με κλώνα από το MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany).
 16. Ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης μετά την επιλογή μεγέθους με Qubit 2.0 fluorometer, με το Qubit dsDNA HS Assay kit.
 17. Πολλαπλασιασμός μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (pcr), των θραυσμάτων DNA που έχουν και στα δύο άκρα τους adapters. (Δοκιμή για να δειχθεί ο ελάχιστος αριθμός κύκλων που απαιτείται για την ενίσχυση των θραυσμάτων με



- την ελάχιστη ποσότητα αρχικού DNA). Στην δοκιμαστική αυτή pcr μπαίνει κι ένας θετικός μάρτυρας (από προηγούμενη βιβλιοθήκη) καθώς κι ένας αρνητικός μάρτυρας
18. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων pcr σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2%, (μαζί με 1μl από τη βιβλιοθήκη από το στάδιο 15)
 19. Αφού επιλεγεί ο ελάχιστος αριθμός κύκλων που ενισχύει ικανοποιητικά τα θραύσματα του DNA, γίνεται στη συνέχεια ο τελικός πολλαπλασιασμός μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (pcr), σε όλη την ποσότητα της βιβλιοθήκης από το στάδιο 15.
 20. Καθαρισμός του προϊόντος της τελικής pcr με το MinElute PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Germany (επανάληψη σταδίων 8-13)
 21. Επιπλέον καθαρισμός του προϊόντος pcr με ειδικά μαγνητικά σφαιρίδια (Ampure Beads) (Perkin-Elmer, UK). Το προϊόν από την έκλουση (στάδιο 20) αναμιγνύεται καλά με ίση ποσότητα AMPure Beads, μένει για 5' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια τοποθετείται σε ειδικό μαγνήτη όπου διαχωρίζεται το υπερκείμενο από τα μαγνητικά σφαιρίδια και πετιέται. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια πλένονται δύο φορές με 190 μl διαλύματος αιθανόλης 73% το οποίο απορρίπτεται επίσης και αφήνονται αυτά να ξηραθούν στους 60°C για 2'-3'. Τέλος προστίθενται 20μl διαλύματος EB της Qiagen στο erpendorf με τα σφαιρίδια, γίνεται καλή ανάμιξη αυτών και επώάζονται στους 60°C για 2'-3'. Με επανατοποθέτηση του tube στο μαγνήτη, διαχωρίζονται τα σφαιρίδια και το υγρό που περιέχει τη βιβλιοθήκη μεταφέρεται σε νέο erpendorf.
 22. Ποσοτικοποίηση της τελικής βιβλιοθήκης με Qubit 2.0 fluorometer με το Qubit dsDNA BR Assay kit
 23. Αλληλούχηση σε εξωτερικό συνεργάτη (paired-end sequencing, 150bp each). Για κάθε βιβλιοθήκη χρησιμοποιήθηκε 1 λωρίδα από το ειδικό κελί του μηχανήματος HiSeq4000, της Illumina.

Η αντίδραση pcr περιείχε τα εξής (για 1 δείγμα, x μl):

Νερό	(6.125-x) μl
Buffer NEB Q5 HS 2x	6.25 μl
Primers(10μM)	0.125 μl

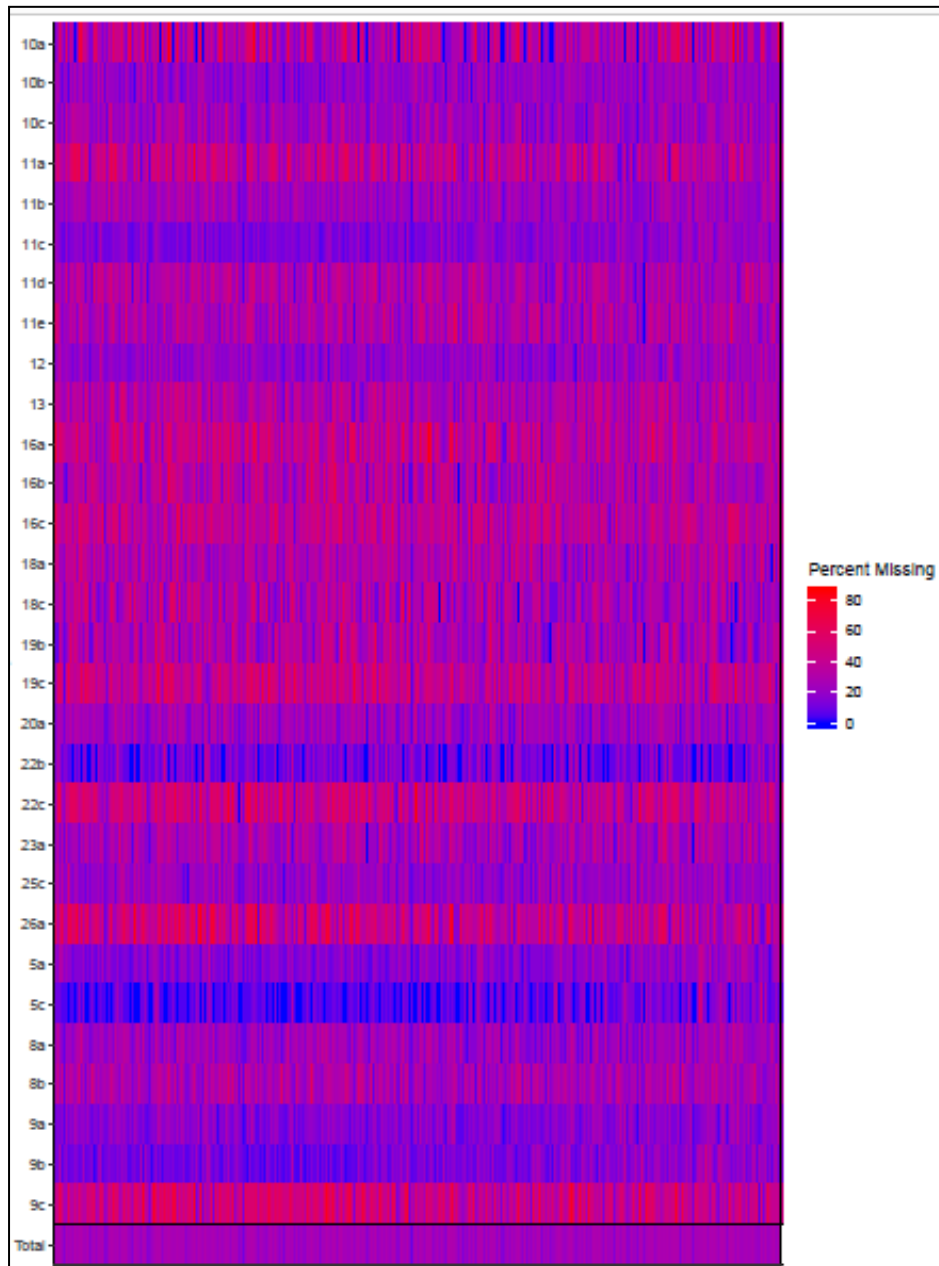


DNA	x μl
Σύνολο	12.5 μl

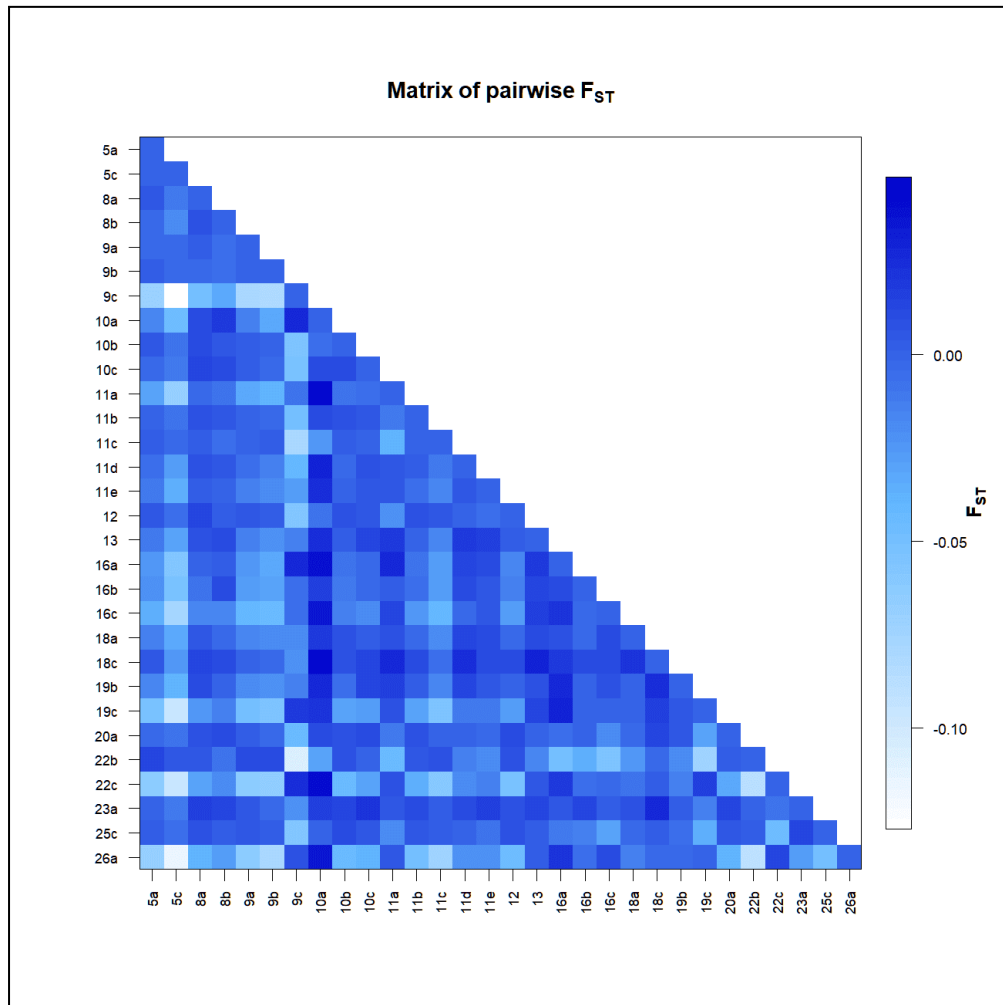
Οι συνθήκες για την pcr ήταν οι εξής:

98°C	60"	1 cycle
98°C	10"	x cycles
65°C	30"	
72°C	45"	
72°C	120"	1 cycle

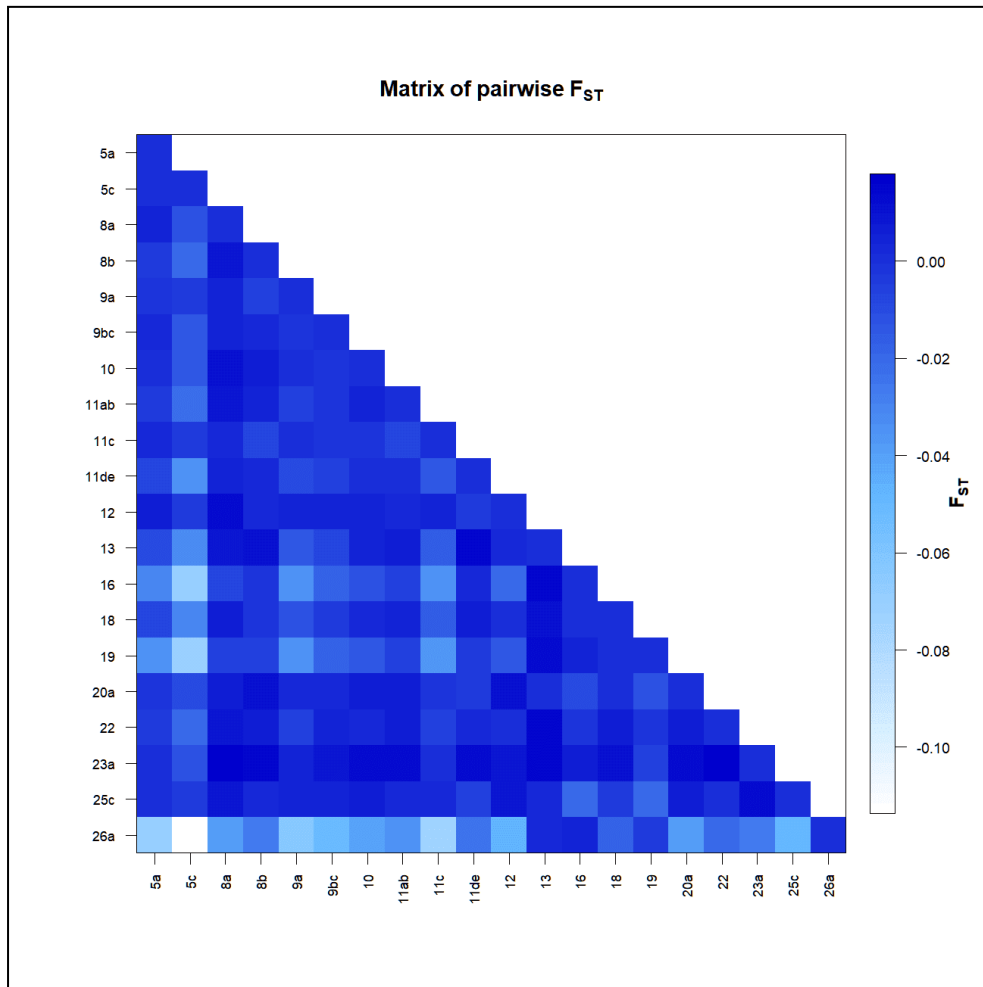
Αποτελέσματα του 'χαλαρού' συνόλου δεδομένων



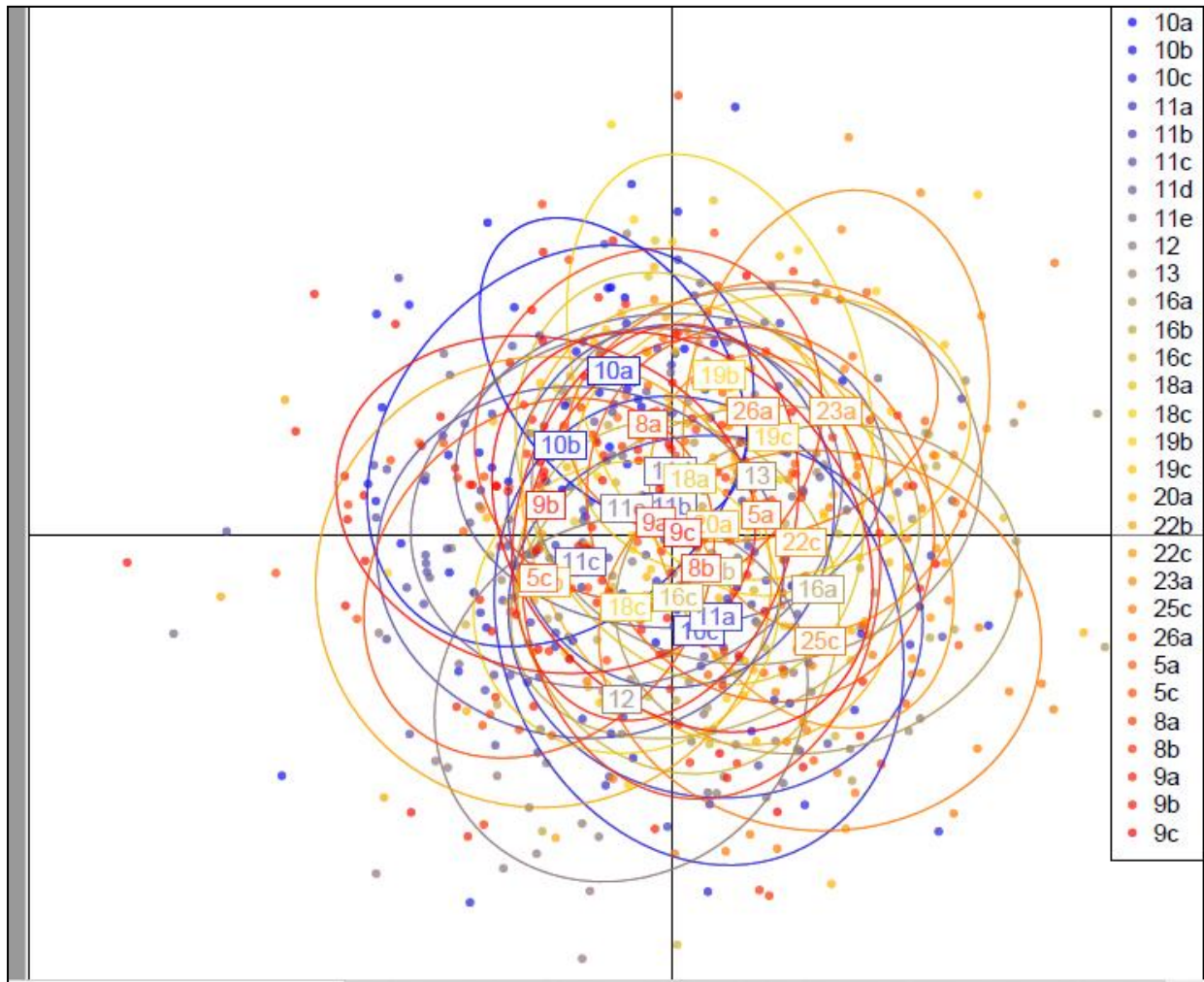
Εικόνα 24. Διάγραμμα που απεικονίζει τα κενά στους γονότυπους ανά πληθυσμό, του 'χαλαρού' συνόλου δεδομένων



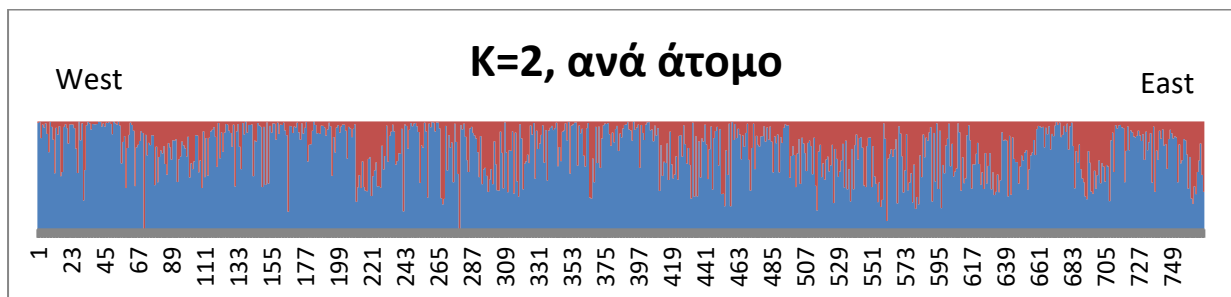
Εικόνα 25. Διάγραμμα τιμών F_{ST} (ανά ζεύγη πληθυσμών) του 'χαλαρού' συνόλου δεδομένων, βασισμένο σε 443 πολυμορφικά SNPs με γονότυπους σε τουλάχιστον 70% των δειγμάτων. Καμιά τιμή δεν ήταν σημαντική στατιστικά, μετά από τη διόρθωση Benjamini– Hochberg.

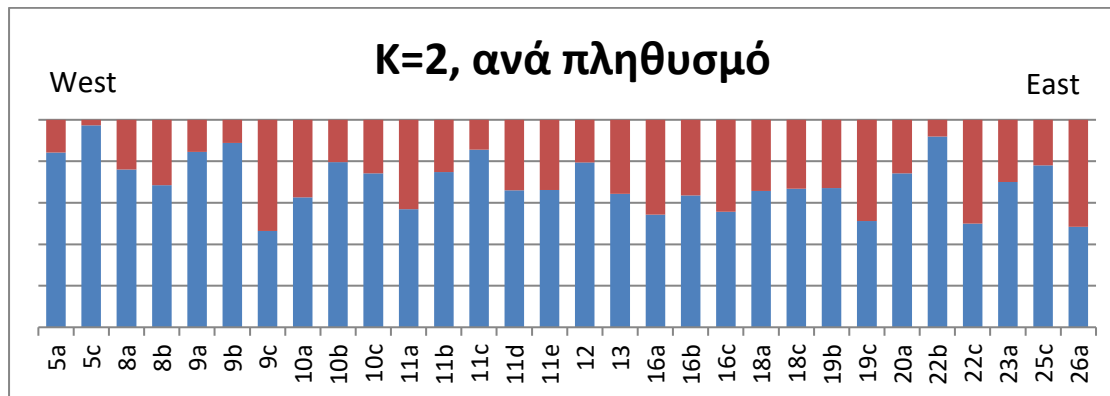


Εικόνα 26. Διάγραμμα τιμών F_{ST} (ανά ζεύγη πληθυσμών) του ‘χαλαρού’ συνόλου δεδομένων, μετά από συγχώνευση γειτονικών πληθυσμών μικρού μεγέθους (σύνολο πληθυσμών 20). Καμιά τιμή δεν ήταν σημαντική στατιστικά, μετά από τη διόρθωση Benjamini– Hochberg



Εικόνα 25. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης DAPC για το ‘χαλαρό’ σετ δεδομένων





Εικόνα 26. Εκτιμώμενη πληθυσμιακή δομή με βάση το λογισμικό STRUCTURE για το 'χαλαρό' σύνολο δεδομένων. Για κάθε K δίνονται δύο διαγράμματα, ένα για τον συνολικό αριθμό ατόμων (πάνω) κι ένα ανά πληθυσμό (κάτω), ως μέσος όρος στα άτομα του. Κάθε στήλη αποτελείται από K αριθμό χρωμάτων, αντιπροσωπεύοντας το ποσοστό εκτιμώμενης αντιστοίχισης του ατόμου σε κάθε μια από τις K ομάδες.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα από την ανάλυση AMOVA για το 'χαλαρό' σύνολο δεδομένων.

Ομάδα 1	Δυτική-Κεντρική Μεσόγειος 5a,5c, 8a, 8b, 9a, 9b,9c, 10a,10b, 10c, 11a, 11b,11c, 11d,11e, 12, 13, 16a, 16b, 16c, 18a, 18c,19b, 19c, 20a	Δυτική Μεσόγειος 5a, 5c, 8a, 8b, 9a, 9b, 9c, 10a, 10b,10c, 11a, 11b, 11c, 11d, 11e, 12	Βαlearίδες 5a,5c, 8a,8b, 9a,11c,11d, 11e
Ομάδα 2	Ανατολική 22b, 22c, 23a, 25c, 26a	Κεντρική 13,16a,16b,16c, 18a,18c,19b,19c, 20a	Σαρδηνία 9b, 9c, 10a, 10b, 10c, 11a, 11b, 12
Ομάδα 3		Ανατολική 22b,22c,23a, 25c,26a	Ιόνιο 13, 16a, 16b, 16c, 19b, 19c, 20a



Ομάδα 4			Αδριατική 18a,18c
Ομάδα 5			Αιγαίο- Λεβαντίνη 22b,22c,23a, 25c,26a
Variation %			
Μεταξύ ομάδων	0.006 (0.082)	0.082 (0.124)	0.007 (0.052)
Μεταξύ Πληθυσμών εντός ομάδων	2,041	1.680 (1.040)	1.718 (1.065)
Εντός Πληθυσμών	97,871	98.238 (98.837)	98.275 (98.883)
Fixation Indices			
F_{ST}	0.01728 (0.01167)	0.01762 (0.01163)	0.01725 (0.01116)
p-value	<0.001 (<0.001)	<0.001 (<0.001)	<0.001 (<0.001)
F_{SC}	0.01722 (0.01086)	0.01682 (0.01041)	0.01718 (0.01065)
p-value	<0.001 (<0.001)	<0.001 (0.021)	<0.001 (0.012)
F_{CT}	0.00006 (0.00082)	0.00082 (0.00124)	0.00007 (0.00052)
p-value	0.05941 (0.003)	<0.001 (<0.001)	<0.001 (0.001)



Βιβλιογραφία

- Agulló, M., Heras, S., García-Marín, J. L., Vera, M., Planella, L., & Roldán, M. I. (2020). Genetic analyses reveal temporal stability and connectivity pattern in blue and red shrimp *Aristeus antennatus* populations. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78634-2>
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data (Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom)
- Avisé. (2000). *Avisé- Phylogeography.pdf* (p. 455).
- Baelde, P. (1992). Reproductive biology of commercially exploited deep-water royal red prawns (*Haliporoides sibogae*, Solenoceridae) in south-east Australia. *Marine Biology*, *113*(3), 447–456. <https://doi.org/10.1007/BF00349170>
- Benjamini, Y., & Yekutieli, D. (2001). The Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing under Dependency on JSTOR. *The Annals of Statistics*, *29*(4), 1165–1188. <https://doi.org/10.1214/aos/1013699998>
- Briggs, J. C. (1974). Operation of Zoogeographic Barriers. *Systematic Biology*, *23*(2), 248–256. <https://doi.org/10.1093/sysbio/23.2.248>
- Brumfield, R. T., Beerli, P., Nickerson, D. A., & Edwards, S. V. (2003). The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology and Evolution*, *18*(5), 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00018-1)
- Cannas, R., Marcias, S., Sacco, F., Cau, A., & Deiana, A. M. (2012). First isolation and characterization of genomic SSR markers for the giant red shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827). *Genetics and Molecular Research : GMR*, *11*(3), 2745–2748. <https://doi.org/10.4238/2012.August.17.1>
- Cannas, Rita, Sacco, F., Follesa, M. C., Sabatini, A., Arculeo, M., Lo Brutto, S., Maggio, T., Deiana, A. M., & Cau, A. (2012). Genetic variability of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* in the Western Mediterranean Sea inferred by DNA microsatellite loci. *Marine Ecology*, *33*(3), 350–363. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2011.00504.x>
- Carbonell, A., Dos Santos, A., Alemany, F., & Vélez-Belchi, P. (2010). Larvae of the red shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata: Aristeidae) in the Balearic Sea: new



occurrences fifty years later. *Marine Biodiversity Records*, 3(May).

<https://doi.org/10.1017/s1755267210000758>

Cartes, J. E., Fanelli, E., Kaporis, K., Bayhan, Y. K., Ligas, A., López-Pérez, C., Murenu, M., Papiol, V., Rumolo, P., & Scarcella, G. (2014). Spatial variability in the trophic ecology and biology of the deep-sea shrimp *Aristaeomorpha foliacea* in the Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 87, 1–13.

<https://doi.org/10.1016/j.dsr.2014.01.006>

Cartes, J. E., Maynou, F., Abelló, P., Emelianov, M., de Sola, L. G., & Solé, M. (2011). Long-term changes in the abundance and deepening of the deep-sea shrimp *aristaeomorpha foliacea* in the balearic basin: Relationships with hydrographic changes at the levantine intermediate water. *Journal of Marine Systems*, 88(4), 516–525.

<https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2011.07.001>

Cartes, J. E., Sardá, F., Company, J. B., & Lleonart, J. (1993). Day-night migrations by deep-sea decapod crustaceans in experimental samplings in the Western Mediterranean sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 171(1), 63–73.

[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(93\)90140-J](https://doi.org/10.1016/0022-0981(93)90140-J)

Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., & Postlethwait, J. H. (2011). Stacks: Building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 1(3), 171–182. <https://doi.org/10.1534/g3.111.000240>

Cau, A. A., Carbonell, A., Follesa, M. C., Mannini, A., Norrito, G., Orsi-Relini, L., Politou, C. Y., Ragonese, S., & Rinelli, P. (2002). MEDITS-based information on the deep-water red shrimps *Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda: Aristeidae). *Scientia Marina*, 66(2 SUPPL), 103–124.

<https://doi.org/10.3989/scimar.2002.66s2103>

Croizat, L., Nelson, G., & Rosen, D. E. (1974). Centers of Origin and Related Concepts. *Systematic Biology*, 23(2), 265–287. <https://doi.org/10.1093/sysbio/23.2.265>

Dall, W. (2001). Australian species of Aristeidae and Benthescymidae (Penaeoidea: Decapoda). *Memoirs of the Queensland Museum*, 46(2), 409–442.



- Deiana A.M., M.G. Caredda, E. Coluccia, D. Cuccu, A. Milia, S. Salvadori. 1993. I cromosomi mitotici e meiotici di *Aristaeomorpha foliacea* (Crustacea Decapoda, Aristeidae). *Biol. Marina*, 1: 381-382.
- Deiana, A. M., Cau, A., Coluccia, E., Cannas, R., Milia, A., Salvadori, S., & Libertini, A. (1998). deiana1998.pdf. *Genome Size and AT-DNA Content in Thirteen Species of Decapoda*, 980–985.
- Deli, T., Chatti, N., Said, K., & Schubart, C. D. (2016). Concordant patterns of mtDNA and nuclear phylogeographic structure reveal a Pleistocene vicariant event in the green crab *Carcinus aestuarii* across the Siculo-Tunisian Strait. *Mediterranean Marine Science*, 17(2), 533–551. <https://doi.org/10.12681/mms.1562>
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479–491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>
- Excoffier, Laurent, Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1, 117693430500100. <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2003). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587. <https://doi.org/10.3410/f.1015548.197423>
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 574–578. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- Farfante, P. (1997). *Perez Farfante & Kensley - 1997 - Dendrobranchiata.pdf*.



<http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>

Fernández, V., Dietrich, D. E., Haney, R. L., & Tintoré, J. (2005). Mesoscale, seasonal and interannual variability in the Mediterranean Sea using a numerical ocean model.

Progress in Oceanography, 66(2–4), 321–340.

<https://doi.org/10.1016/j.pocean.2004.07.010>

Fernández, M. V., Heras, S., Viñas, J., Maltagliati, F., & Roldán, M. I. (2013). Multilocus Comparative Phylogeography of Two Aristeid Shrimps of High Commercial Interest (*Aristeus antennatus* and *Aristaeomorpha foliacea*) Reveals Different Responses to Past Environmental Changes. *PLoS ONE*, 8(3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059033>

Fernández, M. V., Maltagliati, F., Pannacciulli, F. G., & Roldán, M. I. (2011). Analysis of genetic variability in *Aristaeomorpha foliacea* (Crustacea, Aristeidae) using DNA-ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) markers. *Comptes Rendus - Biologies*, 334(10), 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2011.07.005>

Fernández, M. V., Heras, S., Maltagliati, F., & Roldán, M. I. (2013). Deep genetic divergence in giant red shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) across a wide distributional range. *Journal of Sea Research*, 76, 146–153.

<https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.08.004>

FAO. 2018. The State of Mediterranean and Black Sea Fisheries. General Fisheries Commission for the Mediterranean. Rome. 172 pp.

Fischer, W., G. Bianchi and W.B. Scott (eds), 1981. FAO species identification sheets for fishery purposes. Eastern Central Atlantic; fishing areas 34, 47 (in part). Canada Funds-in-Trust. Ottawa, Department of Fisheries and Oceans Canada, by arrangement with the Food and Agriculture Organization of the United Nations, vols. 1-7:pag.var.

General Fisheries Commission for the Mediterranean (GFCM). 2017. Scientific Advisory Committee on Fisheries (SAC) - Working Group on Stock Assessment of Demersal Species (WGSAD). Final report. Rome, Italy, 13-18 November 2017

Guijarro, B., Bitetto, I., D'onghia, G., Follesa, M. C., Kaporis, K., Mannini, A., Marković, O., Micallef, R., Ragonese, S., Skarvelis, K., & Cau, A. (2019). Spatial and temporal patterns in the mediterranean populations of *aristaeomorpha foliacea* and *aristeus antennatus*



- (Crustacea: Decapoda: Aristeidae) based on the MEDITS surveys. *Scientia Marina*, 83(S1), 57–70. <https://doi.org/10.3989/scimar.05012.04A>
- Heras, S., Planella, L., García-Marín, J. L., Vera, M., & Roldán, M. I. (2019). Genetic structure and population connectivity of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49958-5>
- Holthuis L (1980) Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. FAO species catalogue, Vol 1. FAO Fish Synopses 125: 1-261.
- Jenkins, T. L., Ellis, C. D., Triantafyllidis, A., & Stevens, J. R. (2019). Single nucleotide polymorphisms reveal a genetic cline across the north-east Atlantic and enable powerful population assignment in the European lobster. *Evolutionary Applications*, 12(10), 1881–1899. <https://doi.org/10.1111/eva.12849>
- Jombart, T., & Ahmed, I. (2011). adegenet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>
- Kapiris, K., & Thessalou-Legaki, M. (2009). Comparative reproduction aspects of the deep-water shrimps *Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus* (Decapoda, Aristeidae) in the Greek Ionian Sea (Eastern Mediterranean). *International Journal of Zoology*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/979512>
- Landa, J. and P. Pereda, 1997. Growth of white monkfish (*Lophius piscatorius* L.) in the northern Spanish continental shelf (ICES Divisions VIIIc and IXa). ICES C.M. 1997/CC:07
- Luttikhuisen, P. C., Campos, J., Bleijswijk, J. van, Peijnenburg, K. T. C. A., & van der Veer, H. W. (2008). Phylogeography of the common shrimp, *Crangon crangon* (L.) across its distribution range. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46(3), 1015–1030. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.11.011>
- Malanotte-Rizzoli, P., Manca, B. B., D'Alcala, M. R., Theocharis, A., Brenner, S., Budillon, G., & Ozsoy, E. (1999). The Eastern Mediterranean in the 80s and in the 90s: The big transition in the intermediate and deep circulations. *Dynamics of Atmospheres and*



- Oceans*, 29(2–4), 365–395. [https://doi.org/10.1016/S0377-0265\(99\)00011-1](https://doi.org/10.1016/S0377-0265(99)00011-1)
- Manousaki, T., Tsakogiannis, A., Taggart, J. B., Palaiokostas, C., Tsaparis, D., Lagnel, J., Chatziplis, D., Magoulas, A., Papandroulakis, N., Mylonas, C. C., & Tsigenopoulos, C. S. (2016). Exploring a nonmodel teleost genome through rad sequencing-linkage mapping in common pandora, *Pagellus erythrinus* and comparative genomic analysis. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(3), 509–519. <https://doi.org/10.1534/g3.115.023432>
- Marcias, S., Sacco, F., Cau, A., & Cannas, R. (2010). MICROSATELLITE MARKERS FOR POPULATION GENETIC STUDIES OF THE GIANT RED SHRIMP Abstract Microsatellite markers have been isolated and characterized from the giant red shrimp *Aristaeomorpha foliacea* in order to investigate on the presence of distinct stocks. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit*, 39, 2010.
- Marra, A., Mona, S., Sà, R. M., 'Onghia, G. D., & Maiorano, P. (2015). Population Genetic history of *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda) in the western and central mediterranean sea. *PLoS ONE*, 10(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117272>
- Masnadi, F., Criscoli, A., Lanteri, L., Mannini, A., Osio, G. C., Sartor, P., Sbrana, M., & Ligas, A. (2018). Effects of environmental and anthropogenic drivers on the spatial distribution of deep-sea shrimps in the Ligurian and Tyrrhenian Seas (NW Mediterranean). *Hydrobiologia*, 816(1), 165–178. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3581-4>
- Montgomery, S. S. (1990). Movements of juvenile eastern king prawns, *Penaeus plebejus*, and identification of stock along the east coast of Australia. *Fisheries Research*, 9(3), 189–208. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(05\)80001-3](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(05)80001-3)
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
- Morin, P. A., Luikart, G., & Wayne, R. K. (2004). SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(4), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.01.009>
- Myers, A. A., & Giller, P. S. (1988). Process, pattern and scale in biogeography. In *Analytical Biogeography* (pp. 3–12). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009->



1199-4_1

- Nei, M. (1987). Molecular Evolutionary Genetics. In *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. <https://doi.org/10.7312/nei-92038>
- O'Leary, S. J., Puritz, J. B., Willis, S. C., Hollenbeck, C. M., & Portnoy, D. S. (2018). These aren't the loci you'e looking for: Principles of effective SNP filtering for molecular ecologists. *Molecular Ecology*, 27(16), 3193–3206. <https://doi.org/10.1111/mec.14792>
- Orsi Relini, L., Mannini, A., & Relini, G. (2013). Updating knowledge on growth, population dynamics, and ecology of the blue and red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), on the basis of the study of its instars. *Marine Ecology*, 34(1), 90–102. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2012.00528.x>
- Palaiokostas, C., Bekaert, M., Khan, M. G. Q., Taggart, J. B., Gharbi, K., McAndrew, B. J., & Penman, D. J. (2015). A novel sex-determining QTL in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *BMC Genomics*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1383-x>
- Palmas, F., Olita, A., Addis, P., Sorgente, R., & Sabatini, A. (2017). Modelling giant red shrimp larval dispersal in the Sardinian seas: density and connectivity scenarios. *Fisheries Oceanography*, 26(3), 364–378. <https://doi.org/10.1111/fog.12199>
- PALMAS, F., ADDIS, P., CABIDDU, S., CUCCU, D., FOLLESA, M., MURA, M., OLITA, A., PESCI, P., & SABATINI, A. (2014). Distribution of spawning and nursery grounds for deep-water red shrimps in the central western Mediterranean sea. *Mediterranean Marine Science*, 16(1), 117-127. <https://doi.org/10.12681/mms.859>
- Pascual, M., Rives, B., Schunter, C., & MacPherson, E. (2017). Impact of life history traits on gene flow: A multispecies systematic review across oceanographic barriers in the Mediterranean Sea. *PLoS ONE*, 12(5), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176419>
- Pérez-Losada, M., Guerra, A., Carvalho, G. R., Sanjuan, A., & Shaw, P. W. (2002). Extensive population subdivision of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) around the Iberian Peninsula indicated by microsatellite DNA variation. *Heredity*, 89(6), 417–424. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800160>
- Politou, C. Y., Kapiris, K., Maiorano, P., Capezzuto, F., & Dokos, J. (2004). Deep-sea Mediterranean biology: The case of *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) (Crustacea:



Decapoda: Aristeidae). *Scientia Marina*, 68(SUPPL. 3), 129–139.

<https://doi.org/10.3989/scimar.2004.68s3129>

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). *Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data*. <http://www.stats.ox.ac.uk/pritch/home.html>.

Ragonese S. (2018) Regarding Mediterranean red gold. What does the bibliography say about the different life history paradigms proposed for the Mediterranean Deep-water Blue-red (Violet) and Giant-red (Red) prawn stocks? NTR-ITPP, sr91: 206 pp.

Ragonese, S. (2018b). *Synopsis of biological data on the red shrimps *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) and *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) with particular reference to the Mediterranean stocks Introduction* (Issue December).

Rainer, S. F. (1992). Diet of prawns from the continental slope of north-western Australia. *Bulletin of Marine Science*, 50(2), 258–274.

Relini, M., Maiorano, P., D'Onghia, G., Relini, L. O., Tursi, A., & Panza, M. (2000). A pilot experiment of tagging the deep shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Scientia Marina*, 64(3), 357–361. <https://doi.org/10.3989/scimar.2000.64n3357>

Reuschel, S., Cuesta, J. A., & Schubart, C. D. (2010). Marine biogeographic boundaries and human introduction along the European coast revealed by phylogeography of the prawn *Palaemon elegans*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(3), 765–775. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.03.021>

Rinelli, P., Bianchini, M. L., Casciaro, L., Giove, A., Mannini, A., Politou, C. Y., Profeta, A., Ragonese, S., & Sabatini, A. (2013). Occurrence and abundance of the deep-water red shrimps *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) and *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) in the central eastern Mediterranean Sea. *Cahiers de Biologie Marine*, 54(3), 335–347.

Roldán, M. I., Heras, S., Patellani, R., & Maltagliati, F. (2009). Analysis of genetic structure of the red shrimp *Aristeus antennatus* from the Western Mediterranean employing two mitochondrial regions. *Genetica*, 136(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s10709-008-9330-2>

Stamatis, C., Triantafyllidis, A., Moutou, K. A., & Mamuris, Z. (2006). Allozymic variation in Northeast Atlantic and Mediterranean populations of Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *ICES Journal of Marine Science*, 63(5), 875–882.



<https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2006.01.006>

Sunde, J., Yildirim, Y., Tibblin, P., & Forsman, A. (2020). Comparing the Performance of Microsatellites and RADseq in Population Genetic Studies: Analysis of Data for Pike (*Esox lucius*) and a Synthesis of Previous Studies. *Frontiers in Genetics*, 11(March), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00218>

Tavares, C. R. (2016). *Zootaxa, Taxonomy of Aristeidae (Dendrobranchiata: Penaeoidea) from the central coast ... September 2007*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.178428>

Wright, S. (1965). THE INTERPRETATION OF POPULATION STRUCTURE BY F-STATISTICS WITH SPECIAL REGARD TO SYSTEMS OF MATING. *Evolution*, 19(3), 395–420.

<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1965.tb01731.x>

The Convention on Biological Diversity of 5 June 1992 (1760 U.N.T.S. 69)