



# 18<sup>ο</sup> ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΙΧΘΥΟΛΟΓΩΝ

## ΥΔΡΟΒΙΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΟΡΟΙ: Ανάδειξη-Προστασία-Βιώσιμη ανάπτυξη

### ΘΕΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΟΤΗΤΕΣ

- Αλιεία & Θαλάσσια Οικοσυστήματα
- Εσωτερικά ύδατα & Παράκτια Ζώνη
- Υδατοκαλλιέργειες, Εμπορία  
& Μεταποίηση Αλιευτικών προϊόντων

## ΠΡΑΚΤΙΚΑ

3-6 Νοεμβρίου 2022, Μεσολόγγι

Γενετική ταυτοποίηση ειδών Ασκιδίων σε εγκαταστάσεις μυδοκαλλιέργειας του Ελλαδικού χώρου

Γεώργιος Γελαδάκης<sup>1</sup>, Βασιλική Κομματά<sup>1,2</sup>, Μαρία Καμηλάρη<sup>1</sup>, Χαρίκλεια Παπαϊωάννου<sup>1,2</sup>, Δημήτρης Κ. Παπαδόπουλος<sup>3</sup>, Αθανάσιος Λάττος<sup>3</sup>, Βασίλης Μιχαηλίδης<sup>3</sup>, Ιωάννης Θεοδώρου<sup>1</sup>, Ιωάννης Α. Γιάντσης<sup>4</sup>, Κώστας Μπαταργιάς<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Τμήμα Αλιείας και Υδατοκαλλιέργειών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Νέα Κτήρια, Μεσολόγγι – [georgiosgeladakis90@gmail.com](mailto:georgiosgeladakis90@gmail.com), [kommata@upatras.gr](mailto:kommata@upatras.gr), [mkamilari@upatras.gr](mailto:mkamilari@upatras.gr), [xpapaioannou@upatras.gr](mailto:xpapaioannou@upatras.gr), [jtheo@upatras.gr](mailto:jtheo@upatras.gr), [cbatargias@upatras.gr](mailto:cbatargias@upatras.gr)

<sup>2</sup>Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πανεπιστημιούπολη, Ρίο – [xpapaioannou@upatras.gr](mailto:xpapaioannou@upatras.gr), [kommata@upatras.gr](mailto:kommata@upatras.gr)

<sup>3</sup>Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Αριστότελειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

<sup>4</sup>Τμήμα Γεωπονίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας - [igiantsis@uowm.gr](mailto:igiantsis@uowm.gr)

**ABSTRACT**

**George Geladakis, Vasiliki Kommata, Maria Kamilari, Charikleia Papaioannou, Dimitrios K. Papadopoulos, Athanasios Lattos, Basile Michaelidis, Ioannis Theodorou, Ioannis A. Giantsis, Costas Batargias: Genetic identification of Ascidian species in mussel farm facilities of Greece**

Ascidians are marine invertebrates renowned for their invasive capacity and fouling ecology. Bioaccumulation of ascidians has been linked to economic and ecological damage to mussel farm facilities that act as excellent substrate. This work aims to the genetic identification of ascidian species from two mussel farm areas in Greece (Rhodopi and Thermaikos). The mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene, widely used for DNA barcoding, was employed for species delimitation. Preliminary results reveal three genera of aquaculture invasive tunicates (i.e., *Styela* spp., *Ciona* spp., *Clavelina* spp.).

**Keywords:** genetic assessment, biofouling, invasive species, ascidians, cryptic species

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

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

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

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η γενετική ταυτοποίηση ειδών ασκιδίων από δύο περιοχές του Ελλαδικού χώρου (Ροδόπης και Θερμαϊκού) όπου εδράζονται μυδοκαλλιέργειες, η διερεύνηση της πληθυσμιακής δομής κάθε είδους, καθώς και η μελέτη της προέλευσης και καταγωγής τους (πχ. πληθυσμοί των *Clavelina* spp. που έχουν καταγραφεί στην ελληνική

επικράτεια, αλλά αγνοείται η προέλευσή και καταγωγή τους, δίκτυο ELNAIS <https://elnais.hcmr.gr/elnais-database-2/>).

#### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα άτομα της παρούσας μελέτης συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικές μονάδες μυδοκαλλιέργειας, τα 37 από τη περιοχή της Ροδόπης και τα 17 από τη περιοχή του Θερμαϊκού. Για τις μοριακές αναλύσεις, δείγματα ιστού από 54 άτομα συνολικά, τοποθετήθηκαν ατομικά σε eppendorfs σε 99,8% αιθανόλη και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C. Πριν την εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA, προηγήθηκαν βαθμιαίες ενυδατώσεις των ιστών με εμβαπτίσεις διάρκειας 5 λεπτών στα ακόλουθα διαλύματα διαβαθμισμένων συγκεντρώσεων αιθανόλης (EtOH, 99,8 %) και ρυθμιστικού διαλύματος (PBS, 1%): (1) 75% EtOH – 25% PBS, (2) 50% EtOH – 50% PBS, (3) 25% EtOH – 75% PBS, (4) 100% PBS. Για την απομόνωση του DNA, χρησιμοποιήθηκε το Kit Nucleospin® Tissue (Macherey-Nagel, Duren, Germany) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή με ορισμένες τροποποιήσεις.

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

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany) με ορισμένες τροποποιήσεις. Η αλληλούχηση των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε σε γενετικό αναλυτή AB3500 (Applied Biosystems).

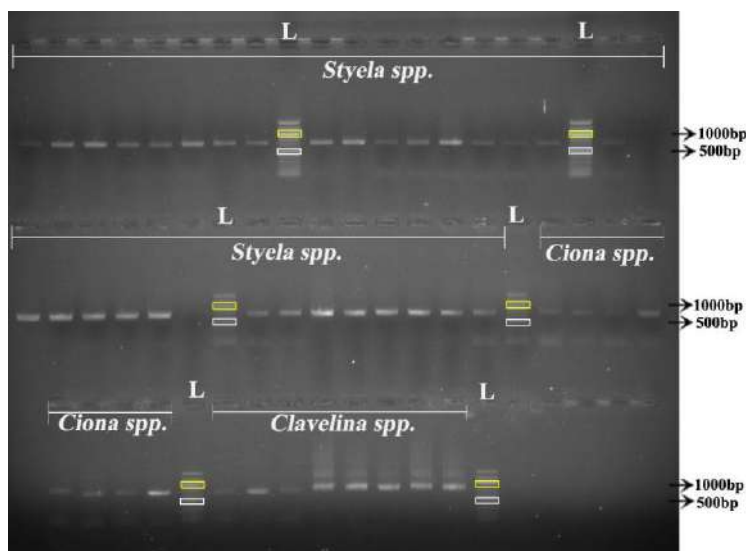
#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (COI) μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ήταν επιτυχής για το σύνολο των δειγμάτων ασκιδίων από τις δύο περιοχές. Με βάση την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, όλα τα άτομα εμφάνισαν μια ορατή ζώνη περί των 800bp (Εικόνα 1). Το μήκος του προϊόντος της PCR επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση και ήταν 650 bp. Τα πρώτα αποτελέσματα της αλληλούχησης ταυτοποιούν άτομα από τα γένη *Styela* spp., *Ciona* spp., *Clavelina* spp. (Πίνακας I, Εικόνα 1). Η μέθοδος ταυτοποίησης πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο BLAST (Altschu *et al.* 1990). Η εν εξελίξει ανάλυση της γενετικής ταυτοποίησης των ειδών για τα παραπάνω γένη με βάση το γονίδιο COI, αναμένεται να προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες τόσο για την ποικιλότητα όσο και για τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών που προσβάλουν τις οστρακοκαλλιέργειες στις συγκεκριμένες περιοχές. Επιπλέον, αναμένεται να πραγματοποιηθεί και μια πρώτη εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας εντός του γένους *Clavelina* spp. με σκοπό των προσδιορισμό της γενετικής προέλευσης πιθανών κρυπτικών ειδών.

**Πίνακας 1.** Γενετική ταυτοποίηση γενών ασκιδίων με βάση το γονίδιο COI ανά περιοχή δειγματοληψίας.

**Table 1.** Genetic identification of ascidian genera based on the COI gene by sampling area.

Περιοχή	Γένος
Ροδόπη	<i>Styela</i> spp. <i>Clavelina</i> spp.
Θερμαϊκός	<i>Styela</i> spp. <i>Ciona</i> spp.



**Εικόνα 1.** Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης σε 1% gel αγαρόζης των προϊόντων ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου COI. Το γράμμα 'L' υποδηλώνει τον δείκτη μεγέθους (100 bp DNA ladder), με εύρος ζωνών (μέγεθος θραυσμάτων) από 100 bp έως 1500 bp. Με κίτρινο και λευκό πλαίσιο επισημαίνονται οι ζώνες των 1000bp και των 500bp DNA του δείκτη μεγέθους, αντίστοιχα.

**Figure 1.** Example of COI gene PCR products electrophoresis in 1% agarose gel. The letter 'L' indicates the 100bp DNA ladder, with bands' size in the range of 100 bp to 1500 bp. The yellow box and the white box indicate the 1000bp and the 500 bp bands of the DNA ladder, respectively.

#### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία είναι μέρος του προγράμματος με τίτλο «Ανάπτυξη βέλτιστων πρακτικών ελέγχου ξενικών ειδών ασκιδίων και λοιπών ειδών (μαλάκια, σπόγγοι) στις εγκαταστάσεις των μυδοκαλλιεργειών και μετρίασμό των οικονομικών επιπτώσεων της εισβολής» υποστηριζόμενο (Κωδικός ΟΠΣ 5048463) που χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΑΣ 2014-2020» στα πλαίσια της πρόσκλησης «Προστασία και αποκατάσταση της Θαλάσσιας βιοποικιλότητας και των οικοσυστημάτων και καθεστώτα αντιστάθμισης στο πλαίσιο των βιώσιμων αλιευτικών δραστηριοτήτων -Δράση: συμμετοχή σε άλλες δράσεις που αποσκοπούν στη διατήρηση και βελτίωση της βιοποικιλότητας και των υπηρεσιών οικοσυστήματος, όπως η αποκατάσταση συγκεκριμένων Θαλάσσιων και παράκτιων οικοτόπων για τη στήριξη βιώσιμων αλιευτικών αποθεμάτων, συμπεριλαμβανομένης της επιστημονικής προετοιμασίας και αξιολόγησής τους - Χωροκατακτητικά Ξένα Είδη».

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aldred N, Clare AS (2014) Mini-review: impact and dynamics of surface fouling by solitary and compound ascidians. *Biofouling* 30 (3): 259–270.
- Altschul SF., Gish W, Miller W, Myers EW Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* (215):403-410.
- Antoniadou C, Gerovasileiou V, Bailly N (2016) Ascidiacea (Chordata: Tunicata) of Greece: an updated checklist. *Biodiversity Data Journal* 4: e9273.
- Fitridge I, Dempster T, Guenther J, de Nysc R (2012) The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling* 28 (7): 649–669.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3(5): 294-299.
- Koukouras A, Voultsiadou-Koukoura E, Kevrekidis T, Vafidis D (1995) Ascidian fauna of the Aegean sea with a check list of eastern Mediterranean and Black sea species. *Annl. Inst. Océanogr, Paris* 71: 19–34.
- López-Legentil S, Legentil ML, Erwin PM, Turon X (2015) Harbor networks as introduction gateways: contrasting distribution patterns of native and introduced species. *Biol. Invasions* 17: 1623–1638.
- Κοτρίκλα AM (2015) Ναυτιλία και Περιβάλλον. Ελληνικά Ακαδημαϊκά Συγγράμματα και Βοηθήματα Kallipos.