

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

*«Ταυτοποίηση ατόμων της οικογένειας Astacidae
με τη χρήση μοριακών δεικτών»*

*«Identification of the Astacidae family individuals
with the use of molecular markers»*

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΓΚΟΥΣΔΟΒΑΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Μούτου Αικατερίνη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Μαμούρης Ζήσης	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Σταμάτης Κωνσταντίνος	Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π) του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Η φυλογεωγραφία των караβίδων του γλυκού νερού της οικογένειας *Astacidae* εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια στην ευρωπαϊκή ήπειρο. Στην παρούσα εργασία έγινε ταυτοποίηση ατόμων της οικογένειας *Astacidae* με την χρήση μοριακών δεικτών, καθώς και φυλογενετική και φυλογεωγραφική ανάλυση των σχέσεων αυτών των ατόμων. Η ταυτοποίηση έγινε μέσω της τεχνικής του barcoding για το γονίδιο της α υπομονάδας της κυτοχρωμικής οξειδάσης (*COI*), σε 33 άτομα караβίδας προερχόμενα από ποτάμια που εντοπίζονται στον νομό Φλώρινας. Η διαδικασία περιελάμβανε την απομόνωση γενετικού υλικού από μυϊκό ιστό, ενίσχυση του γονιδίου της *COI* μέσω της τεχνικής της PCR καθώς και ανάλυση SSCP, βάση της οποίας έγινε επιλογή δειγμάτων για αλληλούχηση. Διερευνήθηκε η ομολογία των προς εξέταση αλληλουχιών μέσω της χρήσης του αλγορίθμου BLASTn στην νουκλεοτιδική βάση δεδομένων του NCBI και ταυτοποιήθηκε το είδος των προς εξέταση δειγμάτων. Κατόπιν κατάταξης των ατόμων караβίδας στο είδος *Austropotamobius torrentium*, ακολούθησε ανάλυση των φυλογενετικών και φυλογεωγραφικών σχέσεων μεταξύ ατόμων αυτού του είδους από Ελλάδα και από άλλες ευρωπαϊκές χώρες.

Abstract

The phylogeography of the Astacidae family freshwater crayfishes shows wide heterogeneity in the European continent. The present thesis identifies the species of Astacidae family individuals using molecular markers, and analyzes the phylogenetic and phylogeographic relations of these individuals. The COI barcoding gene was used for the identification of 33 crayfish individuals, derived from rivers located in the Florina County. The steps that took place during the whole process were DNA extraction from muscular tissue, amplification of the target *COI* gene using PCR, SSCP analysis and alignment of PCR products for selected specimens. The COI gene sequences from the alignment results were compared to the NCBI nucleotide database through the BLAST algorithm. The best match was the *Austropotamobius torrentium* species. Lastly, the phylogenetic and the phylogeographic relations between Greek and European *A. torrentium* were explored.

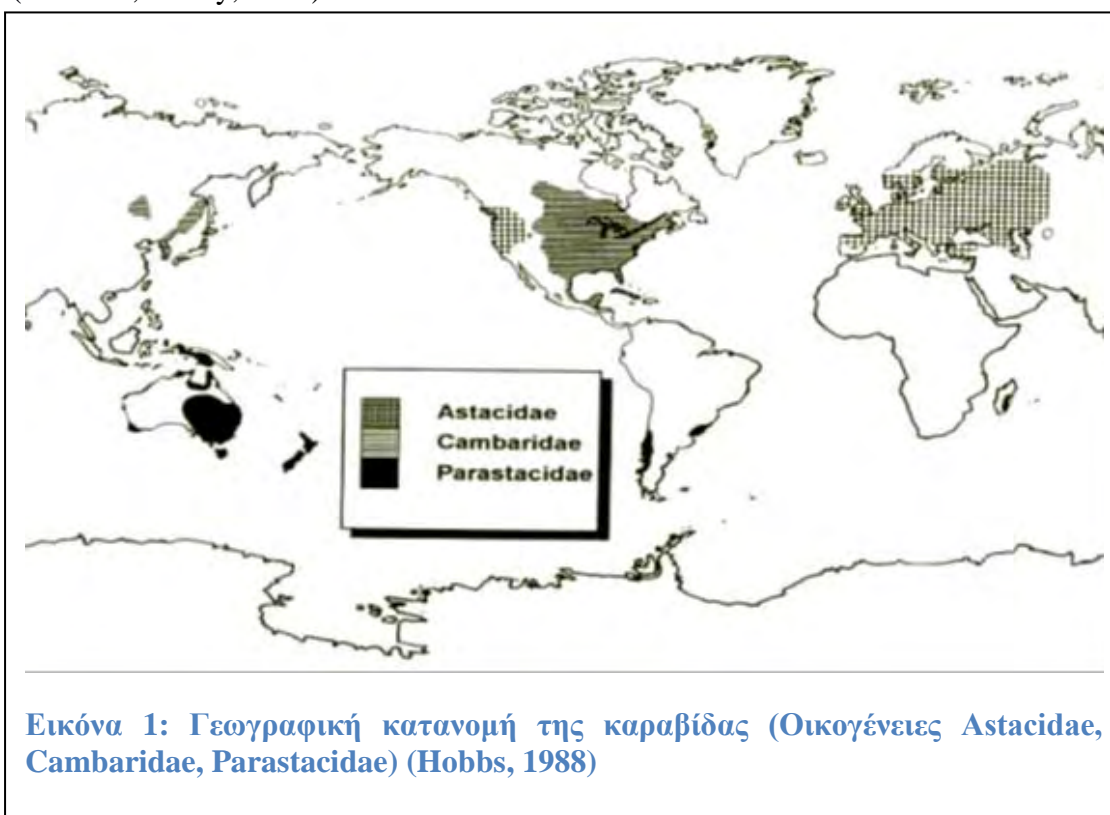
Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Γενικές πληροφορίες.....	9
1.2. Οικολογία.....	10
1.3. Μορφολογία.....	11
1.4. Αναπαραγωγή.....	12
1.5. Η οικογένεια <i>Astacidae</i>	13
1.5.1. Το γένος <i>Astacus</i>	13
1.5.2. Φυλογεωγραφία <i>Astacus</i>	14
1.5.3. Το γένος <i>Austropotamobius</i>	16
1.5.4. Φυλογεωγραφία <i>Austropotamobius</i>	18
1.6. Μοριακοί δείκτες DNA.....	20
1.6.1. DNA Barcoding.....	20
1.6.2. BLAST.....	21
1.6.3. NCBI.....	21
1.7. ΣΚΟΠΟΣ.....	22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1. Δειγματοληψία.....	24
2.2. Απομόνωση γενετικού υλικού.....	24
2.3. PCR.....	24
2.4. Ανάλυση SSCP.....	25
2.5. Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	27
2.6. Αλληλούχηση κατά Sanger.....	28
2.7. Ανάλυση δεδομένων.....	28
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
3.1. Αποτελέσματα PCR.....	29
3.2. Αποτελέσματα SSCP.....	29
3.3. Αποτελέσματα αλληλούχησης.....	30
3.4. Φυλογενετική ανάλυση.....	33
3.5. Network Analysis.....	35
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	45

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικές πληροφορίες

Οι караβίδες του γλυκού νερού εντοπίζονται παντού εκτός της Ανταρκτικής και της Ινδικής χερσονήσου και εμφανίζουν την μέγιστη ποικιλομορφία σε περιοχές της βόρειας Αμερικής και της ανατολικής Αυστραλίας (Εικόνα 1, Hobbs, 1988). Έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 600 είδη, ενώ κάθε χρόνο εντοπίζονται κατά μέσο όρο 5 με 10 καινούργια είδη. Ταξινομικά είναι οργανωμένες σε δύο υπεροικογένειες, την υπεροικογένεια των *Astacoidea* στο βόρειο ημισφαίριο και *Parastacoidea* στο νότιο ημισφαίριο. Τα *Parastacoidea* αποτελούνται από μία οικογένεια τα *Parastacidae*, η οποία αποτελείται από 15 γένη και 170 είδη. Αντίθετα τα *Astacoidea* του βόρειου ημισφαιρίου αποτελούνται από δύο οικογένειες, αυτή των *Cambaridae* με 12 γένη και 420 είδη, και αυτή των *Astacidae* με 3 γένη και 11 είδη. (Crandall, Buhay, 2008)



1.2 Οικολογία

Οι караβίδες μπορούν να εκμεταλλευτούν μεγάλο εύρος υδάτινων συστημάτων. Μπορούν να ζήσουν σε σπηλιές, σε λαγούμια, σε λίμνες και ποτάμια ή και σε χερσαίους οικότοπους όπου βρέχει συχνά και υπάρχουν μεγάλα ποσοστά υγρασίας. Η διαβίωση σε ένα περιβάλλον εξαρτάται από παράγοντες όπως θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα τροφής, η ποιότητα του νερού καθώς και η θήρευση. Σημαντικό ρόλο έχει επίσης και ο ενδοειδικός και διαειδικός ανταγωνισμός. Στην επιβίωσή τους μεγάλο ρόλο παίζει η διαθεσιμότητα των καταφυγίων που θα τις προστατεύει από πιθανούς θηρευτές. Είναι νυκτόβια είδη και εξέρχονται του καταφυγίου τους το βράδυ για την εύρεση τροφής αλλά και για αναπαραγωγή.

Είναι παμφάγοι οργανισμοί και τρέφονται με ζωικής ή φυτικής προέλευσης τροφές. Λειτουργούν ως θηρευτές και μπορούν να τρέφονται με σαλιγκάρια, σκώληκες, ψάρια και βατράχια καθώς και με άλλους οργανισμούς όπως μονοκύτταρα φύκη, βακτήρια και πρωτόζωα. Η αναζήτηση της τροφής γίνεται από το απόγευμα μέχρι το πρωί. (Holdich D.M., & Lowery, R.S., 1988)

Οι πληθυσμοί караβίδας στην Ευρώπη εμφάνισαν μεγάλη μείωση τα τελευταία χρόνια. Αυτή οφείλεται στην ανθρώπινη παρέμβαση, όπου έγινε εισαγωγή ενός ξένου είδους του *Pacifastacus leniusculus*. Το είδος αυτό ανταγωνίζεται τα ενδημικά είδη στο περιβάλλον τους με αποτέλεσμα να τα εκτοπίζει και να σημειώνονται μειώσεις στους πληθυσμούς τους. Ένας ακόμη λόγος είναι ότι η εισαγωγή του *P. leniusculus* έγινε σε συνδυασμό με τον μύκητα *Aphanomyces astaci* ο οποίος προκαλεί στις караβίδες την ασθένεια την αφανομύκωσης (πανώλη της караβίδας). Το *P. leniusculus* είναι ασυμπτωματικός φορέας της ασθένειας οπότε χωρίς να εκφράζει τα συμπτώματα μετέφερε την ασθένεια στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Η ασθένεια επηρέασε σημαντικά, είδη όπως τα *A. astacus*, *A. pallipes*, *A. torrentium* και *A. leptodactylus*. Ο μύκητας εγκυστώνεται ως κινητά ζωοσπόρια στους ιστούς του ξενιστή με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μυκητιακών υφών που εισχωρούν στον μυϊκό ιστό, τα όργανα και την νευρική χορδή, με αποτέλεσμα τον θάνατο του ξενιστή. (Diéguez-Uribeondo, 2005)

1.3 Μορφολογία

Μορφολογικά τα σώματα των караβίδων καλύπτονται από σκληρό αλλά ευέλικτο εξωσκελετό που αποτελείται από άλατα ασβεστίου. Ο οργανισμός αποτελείται από τρία κύρια τμήματα: την κεφαλή, τον θώρακα και την κοιλιά. Η κεφαλή και ο θώρακας είναι συμπτυγμένα δημιουργώντας τον κεφαλοθώρακα ενώ σε κάποια είδη διαχωρίζεται από την αυχενική “ραφή”. Το σώμα των караβίδων απαρτίζεται συνολικά από 20 μεταμερή το καθένα από τα οποία φέρει διαφοροποιημένα εξαρτήματα (βαδιστικά πόδια, πλεοπόδια, κεραιές). Τα μεταμερή με τα εξαρτήματα είναι διαφοροποιημένα ώστε να εξυπηρετούν τις βασικές ανάγκες και λειτουργίες των караβιδών όπως αυτές της, κίνησης, διατροφής, αναπαραγωγής, αναπνοής, κατασκευής καταφυγίου, άμυνας, καθαρισμού της επιφάνειας του σώματος αλλά και άλλων εξαρτημάτων, καθώς επίσης λειτουργούν και ως αισθητήρια όργανα. (Holdich D.M., & Reeve I.D, 1988). Σε πολλά είδη караβίδας όπως για παράδειγμα στο *Austropotamobius italicus*, τα αρσενικά είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα θηλυκά και διαθέτουν μεγαλύτερες δαγκάνες (Εικόνα 2). Το μεγάλο μέγεθος της δαγκάνας τα βοηθάει στον ανταγωνισμό με άλλα αρσενικά καθώς και στην διαδικασία της αναπαραγωγής για να μπορέσουν να διατηρήσουν σε συγκεκριμένη θέση το θηλυκό άτομο. (Galeotti et al., 2006)



Εικόνα 2: Θηλυκό (αριστερά) και αρσενικό άτομο (δεξιά) του είδους *A. astacus* (Galeotti et al., 2006)

1.4 Αναπαραγωγή

Οι καραβίδες είναι γονοχωριστικά είδη. Οι γονάδες του αρσενικού και του θηλυκού βρίσκονται στην ραχιαία πλευρά στον θώρακα μεταξύ της καρδιάς και του εμπρόσθιου τμήματος του οπίσθιου εντέρου. Η ωθήκη αποτελείται από δύο σάκους έναν εμπρόσθιο και έναν οπίσθιο στους οποίους βρίσκονται τα ωάρια, τα οποία εξωθούνται στην συνέχεια στην βάση του τρίτου ζεύγους πλεοποδίων κατά την διαδικασία της εξωτερικής γονιμοποίησης. (Reynolds J.D., 2002)

Το ζευγάρι ξεκινάει με τα δύο άτομα να ανταλλάσσουν μηνύματα μέσω της επαφής και της όσφρησης. Στην συνέχεια το αρσενικό πιάνει το θηλυκό από τις δαγκάνες γυρίζοντάς το σε ανάσκελη στάση και ελευθερώνει σπερματοφόρα τα οποία προσκολλώνται στην κοιλιακή περιοχή του θηλυκού. Στην συνέχεια το θηλυκό εξωθεί τα ωάρια του στην κοιλιακή περιοχή όπου θα έρθουν σε επαφή με τα σπερματοφόρα και θα συμβεί η γονιμοποίηση. Τα αυγά παραμένουν στην κοιλιά του θηλυκού μέχρι την εκκόλαψη, ο χρόνος της οποίας διαφέρει από είδος σε είδος. Οι νεογέννητες καραβίδες παραμένουν στην κοιλιακή περιοχή της μητέρας μέχρι και έναν μήνα, όπου τους παρέχει προστασία και τροφή (Galeotti et al., 2006).

1.5 Η οικογένεια *Astacidae*

Στην Ευρώπη εντοπίζονται μόνο είδη που ανήκουν στην οικογένεια *Astacidae*. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τρία γένη, αυτά των : *Astacus*, *Austropotamobius* και *Pacifastacus*. Από τα 11 είδη της οικογένειας αυτής μόνο τα 5 εντοπίζονται στην ευρωπαϊκή ήπειρο, ενώ τα υπόλοιπα εντοπίζονται στην βορειοδυτική Αμερική. Τα 5 αυτά είδη είναι τα εξής:

- *Astacus astacus* (Linnaeus 1778)
- *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz 1823)
- *Astacus pachypus* (Rathke 1837)
- *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet 1858)
- *Austropotamobius torrentium* (Schrank 1803)

Στην Ελληνική επικράτεια έχουν εντοπισθεί στο φυσικό περιβάλλον τα είδη *A. astacus*, *A. torrentium* και *A. leptodactylus*. (Rode A. & Babcock L., 2003)

1.5.1 Το γένος *Astacus*

Το γένος *Astacus* περιλαμβάνει τρία είδη, το *A. astacus*, το *A. leptodactylus* και το *A. pachypus*.

Ταξινομικά κατατάσσονται:

- Φύλο: *Arthropoda*
- Κλάση: *Malacostraca*
- Τάξη: *Decapoda*
- Οικογένεια: *Astacidae*
- Γένος: *Astacus*
- Είδος: *astacus/ leptodactylus/ pachypus*

Το *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα είδη караβίδας στην ευρωπαϊκή ήπειρο. Εντοπίζεται σε λίμνες, ποτάμια και ρυάκια σε σημεία που μπορεί να βρει καταφύγιο, όπως πέτρες, ρίζες δέντρων και γενικότερα σε σημεία με έντονη βλάστηση. Σαν είδος προτιμάει αμμώδεις περιοχές όπου μπορεί να δημιουργήσει εύκολα λαγούμια. Απαιτεί μεγάλη συγκέντρωση οξυγόνου στο υδατικό

του περιβάλλον με αποτέλεσμα να υπάρχουν μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας σε ευτροφικά περιβάλλοντα τους καλοκαιρινούς μήνες (Souty-Grosset et al., 2006).

Το IUCN (2017) Red List of Threatened Species είναι ένα πρόγραμμα το οποίο εκτιμά την κατάσταση ειδών, υποειδών και πληθυσμών σε παγκόσμιο επίπεδο, με σκοπό την διατήρηση και προστασία των απειλούμενων υπό εξαφάνιση ατόμων. Σύμφωνα με το IUCN (2017) το *A. astacus* εμφανίζει μεγάλη μείωση τον πληθυσμών του και γι' αυτό έχει καταταχθεί στην κατηγορία Vulnerable (Ευάλωτο). Η μείωση των πληθυσμών οφείλεται στην υπεραλίευση, στην ασθένεια των караβίδων από τον μύκητα *Aphanomyces astaci*, καθώς και στην εισαγωγή ξένων ειδών στο περιβάλλον του.

Το *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz 1823) αναφέρεται ως σύμπλεγμα ειδών (species complex). Εντοπίζεται σε λίμνες, ποτάμια και εκβολές ποταμών. Εμφανίζει μεγάλη ανθεκτικότητα σε αλλαγές της θερμοκρασίας και σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Το είδος αυτό εμφανίζει οικονομικό ενδιαφέρον καθώς γίνεται εκτροφή του σε υδατοκαλλιέργειες για μετέπειτα πώληση για τροφή (Holdich et al., 1997).

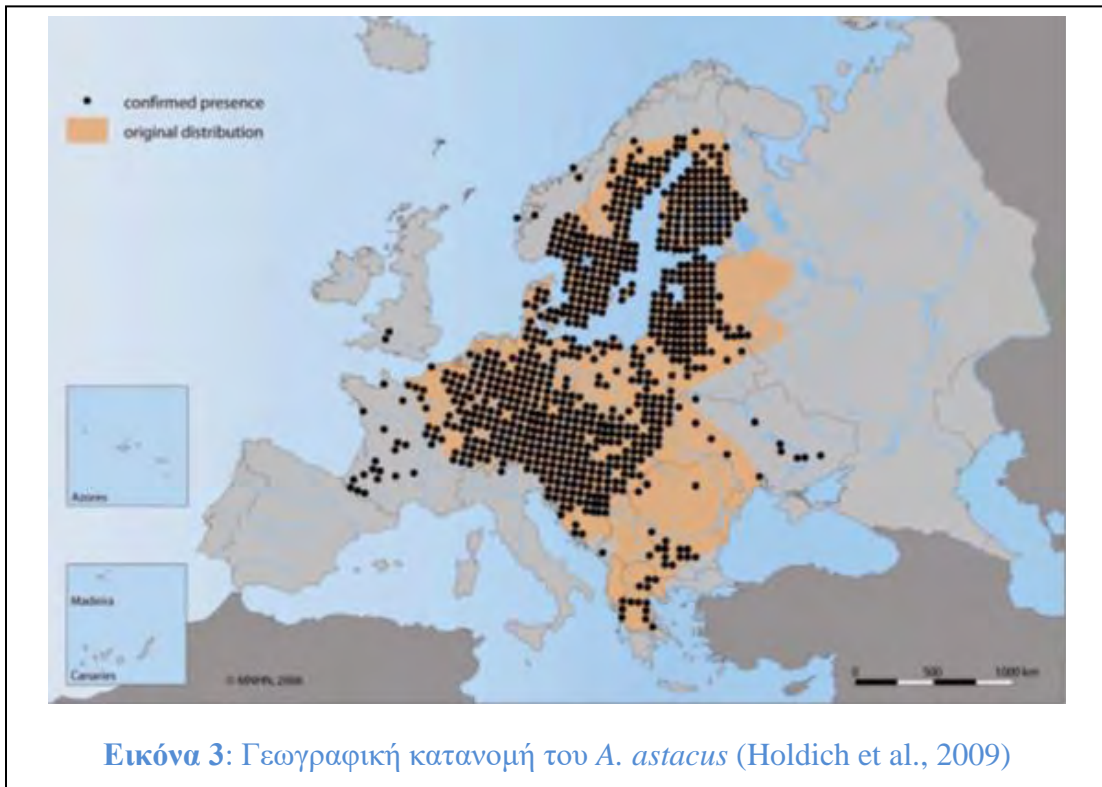
Σύμφωνα με τον IUCN (2017) το *A. leptodactylus* έχει εμφανίσει μείωση στους πληθυσμούς του σε κάποιες από τις χώρες που εντοπίζεται αλλά η πλειοψηφία του πληθυσμού φαίνεται να διατηρείται σχετικά σταθερή. Για τον λόγο αυτό κατατάσσεται στην κατηγορία Least concern.

Το *Astacus pachypus* (Rathke 1837) εντοπίζεται σε γλυκά και υφάλμυρα νερά σε εκβολές ποταμών. Είναι πολύ ευαίσθητο στις έντονες μεταβολές της θερμοκρασίας και γι' αυτό αποφεύγει μέρη με υψηλή θερμοκρασία. Προτιμάει υδατικά περιβάλλοντα με πετρώδη πυθμένα και έντονη βλάστηση (Souty-Grosset et al., 2006). Σύμφωνα με τον IUCN (2017) το *A. pachypus* κατατάσσεται στην κατηγορία Data deficient καθώς δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία για τους πληθυσμούς του στις χώρες που εντοπίζεται.

1.5.2 Φυλογεωγραφία *Astacus*

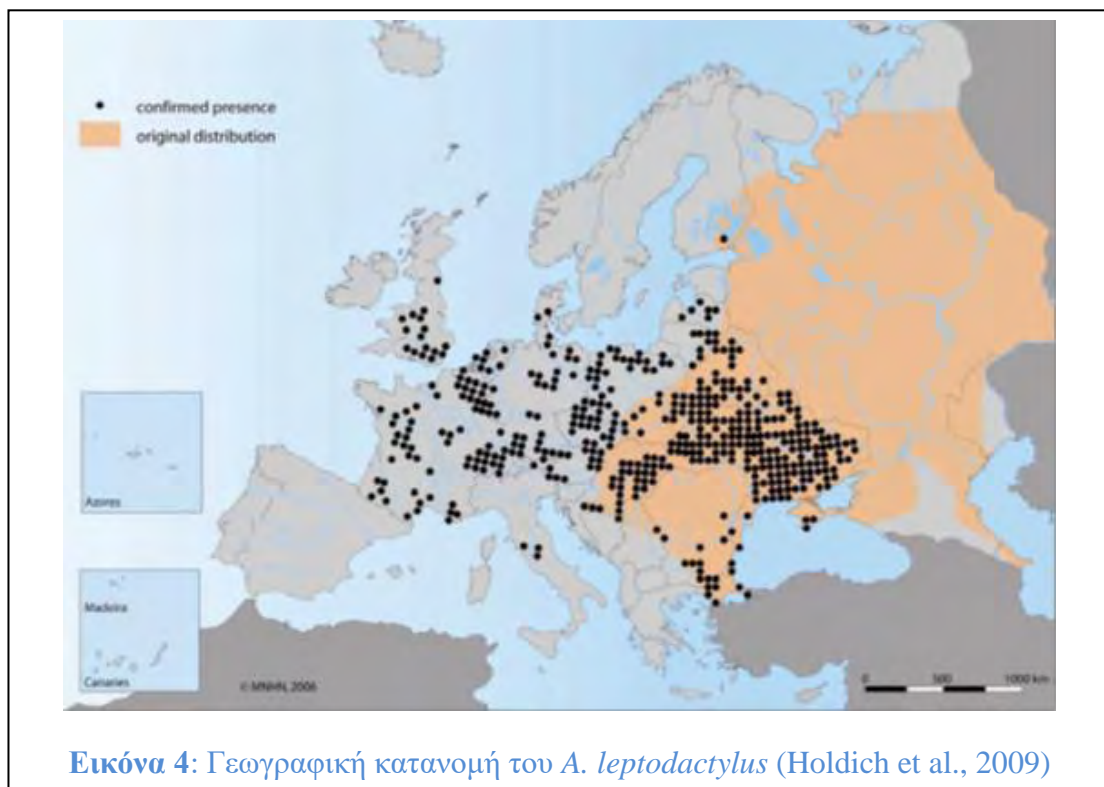
Το *A. astacus* εντοπίζεται γεωγραφικά από τη Σκανδιναβική χερσόνησο βόρεια σε όλη την επικράτεια της κεντρικής Ευρώπης και το νοτιότερο σημείο εμφάνισης του

είναι η Ελλάδα (Εικόνα 3). Επίσης έχει εισαχθεί σε πολλές χώρες όπου δεν εμφανίζονταν φυσιολογικά. (Holdich et al., 2009)



Εικόνα 3: Γεωγραφική κατανομή του *A. astacus* (Holdich et al., 2009)

Το *A. leptodactylus* εντοπίζεται γεωγραφικά σε 32 περιοχές καθόλη την επικράτεια της Ευρώπης αλλά απουσιάζει τελείως από την Σκανδιναβία και την χερσόνησο της Βαλτικής (Εικόνα 4). Εμφανίζει τα μεγαλύτερα ποσοστά πληθυσμών στην ανατολική Ευρώπη (Holdich et al., 2009).



Εικόνα 4: Γεωγραφική κατανομή του *A. leptodactylus* (Holdich et al., 2009)

Το *A. pachypus* εμφανίζεται μόνο σε μία περιοχή που συνορεύει με την βόρεια πλευρά της Μαύρης θάλασσας (Holdich et al., 2009).



Εικόνα 5: Γεωγραφική κατανομή του *A. pachypus* (πηγή IUCN)

1.5.3 Το γένος *Austropotamobius*

Το γένος *Austropotamobius* περιλαμβάνει δύο είδη, το *A. pallipes* και το *A. torrentium*. Παρόλα αυτά γίνεται λόγος για ένα ακόμα είδος το *A. italicus*, το οποίο αποτελούσε υποείδος του *A. pallipes* αλλά τα τελευταία χρόνια έχει θεωρηθεί από πολλούς ότι πρέπει να καταταχθεί ως ξεχωριστό είδος (Pedraza-Lara et al., 2010).

Ταξινομικά κατατάσσονται:

- Φύλο: *Arthropoda*
- Κλάση: *Malacostraca*
- Τάξη: *Decapoda*
- Οικογένεια: *Astacidae*
- Γένος: *Austropotamobius*.
- Είδος: *torrentium* / *pallipes*

Το *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet 1858) εντοπίζεται σε ρυάκια, κανάλια, ποταμούς και λίμνες κάτω από πέτρες και ρίζες δέντρων. Ποτέ δεν εμφάνισε οικονομικό ενδιαφέρον. Ζει για 10 περίπου χρόνια και είναι αναπαραγωγικά ενεργό στα 3 με 4 χρόνια. Τα θηλυκά μπορούν να κουβαλήσουν από 20 έως 160 αυγά. (Holdich, 2003).

Σύμφωνα με τον IUCN (2017) το *A. pallipes* κατατάσσεται στην κατηγορία Endangered (Επαπειλούμενο). Τα τελευταία 10 χρόνια οι πληθυσμοί του έχουν υποστεί μείωση της τάξης του 50-80%. Η μείωση αυτή οφείλεται στην εισαγωγή ξένων ειδών караβίδας στο περιβάλλον του και σε ασθένεια από τον μύκητα *Aphanomyces astaci*.

Το *A. pallipes* είναι γνωστό με την ονομασία white clawed crayfish WWC (ασπροπόδαρες караβίδες). Οι WWC είναι ευρύτατα κατανεμημένες σε όλη την ευρωπαϊκή ήπειρο, καλύπτοντας την περιοχή από τις Δειναρικές Άλπεις έως την Ιβηρική χερσόνησο και την Βρετανία. Τα άτομα εμφανίζουν μεγάλη γενετική και μορφολογική ετερογένεια γεγονός που εξηγεί τις πολυάριθμες αλλαγές που έχουν υποστεί στην ταξινόμησή τους τα τελευταία 50 χρόνια. Η χρήση των μορφολογικών χαρακτηριστικών καθιστούσε δύσκολη και πολλές φορές λανθασμένη την ταξινόμησή τους. Τα τελευταία χρόνια με την χρήση μοριακών τεχνικών προτάθηκε ότι πιθανώς το *A. pallipes* πρέπει να χωριστεί σε δύο διαφορετικά είδη τα *A. pallipes* και *A. italicus* (Pedraza-Lara et al., 2010).

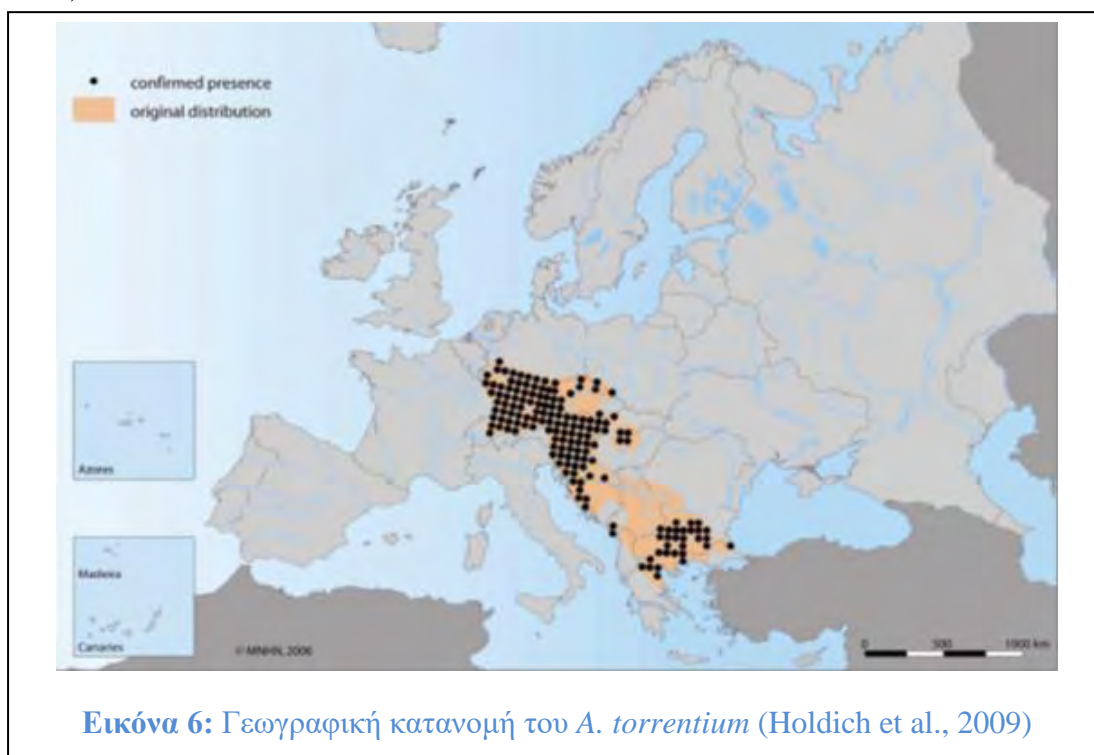
Το *Austropotamobius torrentium* (Schrank 1803) ,πετροκαραβίδα, είναι το μικρότερο σε μέγεθος είδος караβίδας, από όλα τα ενδημικά είδη караβίδας που εντοπίζονται στην Ευρώπη, και ποτέ δεν εμφάνισε οικονομικό ενδιαφέρον. Εντοπίζεται σε πηγές ποταμών και σε μικρά υδατικά συστήματα, προσαρμοσμένο σε νερά με τυρβώδη ροή και σε πετρώδη περιβάλλοντα (Huber & Schubart, 2006). Το *A. torrentium* έχει παρατηρηθεί να φτάνει σε μήκος έως και 98mm για τα αρσενικά και 93mm τα θηλυκά. Υπολογίζεται ότι είναι αναπαραγωγικά ενεργά στην ηλικία των 3 χρόνων (Streissl & Hödl, 2002). Τα θηλυκά μπορούν να κουβαλήσουν από 40 έως 70 αυγά (Laurent, 1988).

Σύμφωνα με τον IUCN (2017) το *A. torrentium* εμφανίζει μείωση των πληθυσμών του σε όλη την επικράτεια εμφάνισής του, αλλά λόγω μη επαρκών στοιχείων

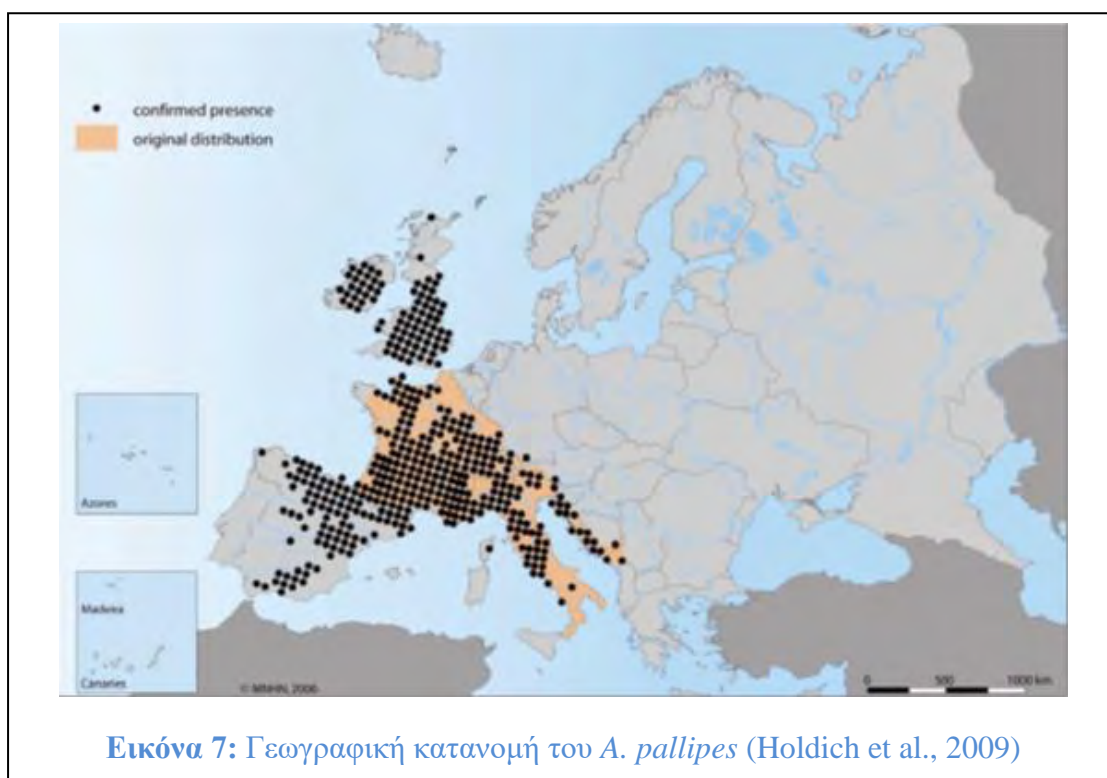
κατατάσσεται στην κατηγορία Data Deficient. Παρόλα αυτά σε συγκεκριμένες χώρες όπως η Αυστρία έχει χαρακτηριστεί ως απειλούμενο είδος (Pretzmann, 1994).

1.5.4 Φυλογεωγραφία *Austropotamobius*

Το *Austropotamobius torrentium* εντοπίζεται γεωγραφικά στην κεντρική και νότια Ευρώπη (Εικόνα 6). Συγκεκριμένα εμφανίζεται από ανατολική Γαλλία και Λουξεμβούργο, καθόλη την έκταση της νότιας Γερμανίας, βόρειας Ελβετίας, Αυστρίας έως την βορειοανατολική Ιταλία. Στην συνέχεια εντοπίζεται νοτιοανατολικά της Σλοβενίας και της Κροατίας έως τα Βαλκάνια και την βόρεια Ελλάδα, την Βουλγαρία και από εκεί μέχρι την Μαύρη θάλασσα (Huber & Schubart, 2006).



Το *Austropotamobius pallipes* εντοπίζεται γεωγραφικά σε όλη την επικράτεια της δυτικής Ευρώπης, από τα βορειοδυτικά Βαλκάνια δηλαδή Κροατία, στις Άλπεις και την Ιταλική χερσόνησο και από εκεί βόρεια σε όλη την Γαλλία και την ιβηρική χερσόνησο, έως την μεγάλη Βρετανία (Εικόνα 7 Grandjean et al., 2000). Η δυτικότερη περιοχή που έχει εντοπιστεί είναι η Πορτογαλία αν και πλέον στην χώρα αυτή θεωρείται ότι έχει εξαφανιστεί (Holdich et al., 2009). Το *A. pallipes* εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό γενετικής διαφοροποίησης στην χερσόνησο της Ίστριας, η οποία μοιράζεται στις χώρες Κροατία, Σλοβενία και Ιταλία (Trontelj et al., 2004).



Το *A. pallipes* και το *A. torrentium* μοιάζουν πάρα πολύ στην γενετική τους δομή και στους δείκτες διαφοροποίησης. Αυτό ίσως να αποτελεί ένδειξη σειράς παρόμοιων ιστορικών γεγονότων που οδήγησαν στην σημερινή κατανομή των απλότυπων στην Ευρώπη. Παρατηρείται και στα δύο είδη το ίδιο πρότυπο, δηλαδή εμφανίζουν υψηλή γενετική διαφοροποίηση στα νότια της Ευρώπης σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές και μεγάλη γενετική ομοιομορφία στα βόρεια. Τέτοια πρότυπα σχετίζονται με αποικισμούς κατά την εποχή των παγετώνων σε νότιες περιοχές και επαναποικισμούς των βόρειων περιοχών με την λήξη της εποχής των παγετώνων (Trontelj et al., 2004).

1.6 Μοριακοί δείκτες DNA

Οι μοριακοί δείκτες είναι συγκεκριμένα τμήματα του DNA που είναι αντιπροσωπευτικά για διαφορές σε επίπεδο γονιδιώματος. Οι μοριακοί δείκτες δεν είναι απαραίτητο να σχετίζονται με φαινοτυπική έκφραση.

Η χρήση των μοριακών δεικτών επιτρέπει την μελέτη και κατανόηση της γενετικής ποικιλομορφίας σε διάφορους οργανισμούς (Faheema Khan, 2015). Χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην δημιουργία γενετικών χαρτών ,στην φυλογένεση, στην ταυτοποίηση και στην ταξινόμηση των ειδών. Ως δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν γονίδια καθώς και περιοχές του DNA που εμφανίζουν διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία τους και ονομάζονται πολυμορφικές. Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες πολυμορφισμών του DNA:

1. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP): Είναι σημειακές μεταλλαγές σε ένα ζεύγος βάσεων.
2. Βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις ή μικροδορυφόροι (STR): Είναι αλληλουχίες DNA μήκους 2-6 bp που επαναλαμβάνονται διαδοχικά από λίγες έως 100 φορές.
3. Ποικίλου αριθμού διαδοχικές επαναλήψεις ή μινιδορυφόροι (VNTR): Είναι παρόμοιες με τις STR μόνο που η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία τους είναι μεγαλύτερη, το μήκος της οποίας μπορεί να κυμαίνεται από 7 έως μερικές δεκάδες ζεύγη βάσεων. (igenetics- peter j.russel)

1.6.1 DNA barcoding

Το DNA barcoding αποτελεί μία διαγνωστική τεχνική κατά την οποία μικρές αλληλουχίες DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση ειδών. Τα DNA barcodes αποτελούνται από μία συντηρημένη μικρή αλληλουχία DNA που θα πρέπει να παράγεται και να χαρακτηρίζεται εύκολα για όλα τα είδη. Η χρήση διαδικτυακής βιβλιοθήκης για barcode εξυπηρετεί ως πρότυπο κατά το οποίο θα κατατάσσεται μία αλληλουχία DNA barcode από άγνωστο δείγμα. Αυτό δίνει την δυνατότητα για ακριβή χαρακτηρισμό γνωστών ειδών καθώς και επιταχύνει την διαδικασία αναγνώρισης νέων ειδών.

Ένα από τα πιο διαδεδομένα γονίδια που χρησιμοποιούνται ως “DNA barcode” στην ταυτοποίηση ζωικών οργανισμών είναι αυτό της α υπομονάδας της κυτοχρωμικής

οξειδάσης (COI) των μιτοχονδρίων. Το γονίδιο αυτό εμφανίζει πολύ μικρή διαφοροποίηση, ως προς την αλληλουχία του, μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους, αλλά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ ατόμων από διαφορετικά είδη και αυτό το καθιστά ως ιδανικό δείκτη για την σύγκριση και την ταυτοποίηση οργανισμών (Vincent Savolainen et al., 2005).

Στην παρούσα εργασία για να επιτευχθεί η ενίσχυση του γονιδίου της COI χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές, και προς τις δύο κατευθύνσεις, οι οποίοι ήταν καθολικοί (universal). Οι κωδικοί των εκκινητών είναι οι εξής, forward ο mlCOIintF και reverse ο jgHCO2198. Σύμφωνα με το review του Matthieu Leray (2013) ο συνδυασμός των εκκινητών αυτών εμφάνισε μεγάλο ποσοστό ενίσχυσης που έφτανε το 91%, όταν εφαρμόστηκε σε δείγματα από μετάζωα. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν εκφυλισμένες περιοχές στις αλληλουχίες και των δύο εκκινητών, δε φαίνεται να εμφανίζουν μη ειδική σύνδεση. Ενίσχυσαν με 87% επιτυχία ένα σύνολο 285 δειγμάτων (250 από τα 285), ενώ από αυτά που ενισχύθηκαν το 93% εμφάνιζε καλής ποιότητας αλληλουχίες. Επίσης στα *Arthropoda* όπου ανήκουν οι καραβίδες εμφάνισε ποσοστό επιτυχίας 88% (Leray et al., 2013).

1.6.2 NCBI

Το NCBI (National Center of Biotechnology Information) αποτελεί τμήμα της Εθνικής Βιβλιοθήκης Φαρμάκων των Η.Π.Α. Το NCBI περιέχει βάσεις δεδομένων, όπως το PubMed, που αποτελεί βάση δεδομένων με ιατρική βιβλιογραφία, τη GenBank, που αποτελεί βάση δεδομένων για DNA αλληλουχίες και εργαλεία της βιοπληροφορικής όπως το BLAST.

1.6.3 BLAST

Το BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) είναι ένας αλγόριθμος που χρησιμοποιείται για σύγκριση βιολογικών αλληλουχιών όπως νουκλεοτιδικές αλληλουχίες DNA και αμινοξικές αλληλουχίες πρωτεϊνών. Το BLAST δίνει στον χρήστη την δυνατότητα να συγκρίνει μία υποβληθείσα αλληλουχία με μία βιβλιοθήκη ή βάση δεδομένων αλληλουχιών, καθώς και να αναγνωρίσει αλληλουχίες οι οποίες είναι παρόμοιες με την υποβληθείσα. (Altschul S. et al., 1990)

1.7 ΣΚΟΠΟΣ

Η φυλογεωγραφία των караβίδων του γλυκού νερού της οικογένειας *Astacidae* εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια στην ευρωπαϊκή ήπειρο. Σκοπός της εργασίας είναι η ταυτοποίηση του είδους σε άτομα караβίδων από ποτάμια που εντοπίζονται στον νομό της Φλώρινας με την χρήση μοριακών δεικτών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

Στην παρούσα εργασία παραδόθηκαν στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας συνολικά 33 δείγματα караβίδας (Εικόνα 8) προερχόμενα από ποτάμια και λίμνες που εντοπίζονται στον νομό Φλώρινας. Οι πληροφορίες για τα δείγματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: τοποθεσία, αριθμός και ημερομηνία συλλογής των δειγμάτων

Τοποθεσία		Αριθμός δειγμάτων	Ημερομηνία συλλογής
A	Βόρεια Κολχική από δυτικό ρέμα (ΣΤΑΣΗ 2)	7	17/09/2015
B	Αριστερά φράγματος Κολχικής (ΣΤΑΣΗ 1)	13	17/09/2015
Γ	Κολχική κάτω από το φράγμα	2	21/08/2016
Δ	Μεταξύ Ακρίτας και Άνω Κλεινές	11	21/08/2016



Εικόνα 8: Δείγματα караβίδων διαφορετικών μεγεθών.

2.2 Απομόνωση γενετικού υλικού

Η απομόνωση του DNA έγινε από τμήμα μυϊκού ιστού που αφαιρέθηκε από την κοιλιακή περιοχή μετά την απομάκρυνση του εξωσκελετού. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό στείρες συνθήκες για την αποφυγή επιμόλυνσης και ο ιστός τοποθετήθηκε σε φυαλίδιο Eppendorf. Η απομόνωση του DNA έγινε με χρήση του kit Nucleospin tissue, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς απομόνωσης έγινε έλεγχος των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης συγκέντρωσης 1%.

2.3 PCR

Για την ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου COI χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR. Το σετ των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: forward mlCOIintF και reverse jgHCO2198 (Leray 2013). Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Ετικέτα και αλληλουχία των εκκινητών

Ετικέτα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')
mlCOIintF	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC
jgHCO2198	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA

Για την ενίσχυση του τμήματος του COI ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια Eppendorf των 200μl, 2μl εκμαγείου DNA (προϊόν της απομόνωσης).
- 2) Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων παρασκευάστηκε ένα κοινό διάλυμα (master mix) η σύσταση του οποίου περιείχε τις ακόλουθες ποσότητες αντιδραστηρίων ανά δείγμα.

Πίνακας 3: Όγκος και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR

	Όγκος	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
DNA	2 μl		
BUFFER	5 μl	10x	1x
MgCl ₂	1 μl	25mm	2mm

dNTPs	1 μ l	10mm	0,2mm
Εκκινητής FW	1 μ l	50 pmoles	1 pmole
Εκκινητής RV	1 μ l	50 pmoles	1 pmole
Ταq πολυμεράση	0,2 μ l	5 U/ μ l	1 U
ddH ₂ O	39 μ l		
Συνολικός όγκος	50 μ l		

3) Μοιράστηκε σε κάθε Eppendorf που περιείχε δείγμα από 48 μ l του master mix. Η κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 50 μ l. Στο ένα Eppendorf δεν είχε προστεθεί δείγμα (αρνητικός μάρτυρας).

4) Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίστηκε να εκτελέσει το ακόλουθο πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου της PCR:

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 4min

A) Αποδιάταξη: 95°C για 40sec

B) Υβριδοποίηση εκκινητών: 53°C για 50sec

Γ) Επιμήκυνση: 72 °C για 50sec

Δ) Τελική επέκταση: 72 °C για 10 min.

Τα στάδια A,B,Γ εκτελέστηκαν σε 35 κυκλους.

Η απομόνωση των ενισχυμένων προϊόντων της PCR έγινε σε gel αγαρόζης συγκέντρωσης 2%.

2.4 Ανάλυση SSCP

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στον διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA, βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία, στο πήκτωμα, χαρακτηριστικών ζωνώσεων. Η αρχή της ανάλυσης βασίζεται στην δευτεροταγή δομή που λαμβάνει το DNA σε μονόκλωνη κατάσταση. Επομένως, ανάλογα με την αλληλουχία των βάσεων, το μονόκλωνο τμήμα θα λάβει και διαφορετική διαμόρφωση, η οποία θα του προσδίδει διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα. Η διαμόρφωση αυτή μπορεί να είναι αποτέλεσμα μίας και μόνο

διαφορετικής βάσης. Η ανάλυση λοιπόν αυτή είναι ιδανική για σύγκριση αλληλουχιών DNA που εμφανίζουν ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους. Ο λόγος που εφαρμόσαμε την τεχνική της SSCP ήταν για τον προσδιορισμό διαφορετικών προτύπων μεταξύ των δειγμάτων μας, τα οποία υποδεικνύουν διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία του COI που ενισχύθηκε, έτσι ώστε να επιλέξουμε αντιπροσωπευτικά δείγματα τα οποία θα αλληλοουχρηθούν.

Η όλη τεχνική περιλαμβάνει 4 στάδια:

1) Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 10%.

Τα συστατικά για την παρασκευή του πηκτώματος αναγράφονται στον Πίνακα 4. Σε ποτήρι ζέσεως υπό ανάδευση προσθέτουμε ddH₂O , acrylamide και bis-acrylamide μέχρι να γίνει ομογενοποίηση. Στην συνέχεια σταματούμε την ανάδευση και προσθέτουμε glycerol 50% και TBE 10%. Ακολουθεί διήθηση και προσθήκη ddH₂O μέχρι τον όγκο των 62,5ml. Τέλος, προσθέτουμε TEMED και APS 20% και όλο το δείγμα προστίθεται στην συσκευή για την τελική παρασκευή του πηκτώματος.

Πίνακας 4: Συστατικά και ποσότητες για την Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Συστατικά	Ποσότητες
Acrylamide	6.25 gr
Bis-Acrylamide	0.16 gr
Glycerol 50%	6.25 ml
*TBE 10X	3.2 ml
TEMED	62.5 μl
APS 20%	37.5 μl
ddH ₂ O	62.5 ml

*TBE 10X (2lt): Tris Base 121gr, Boric acid 61.7gr, EDTA (0.5M) 80ml, ddH₂O έως τα 2lt

Σε ποτήρι ζέσεως υπό ανάδευση προσθέτουμε ddH₂O , acrylamide και bis-acrylamide μέχρι να γίνει ομογενοποίηση. Στην συνέχεια σταματούμε την ανάδευση και προσθέτουμε glycerol 50% και TBE 10%. Ακολουθεί διήθηση και προσθήκη ddH₂O μέχρι τον όγκο των 62,5ml. Τέλος, προσθέτουμε TEMED και APS 20% και όλο το δείγμα προστίθεται στην συσκευή για την τελική παρασκευή του πηκτώματος.

2) Αποδιάταξη προϊόντων PCR.

Αναμειγνύονται 5μl DNA και 10μl denaturation buffer (95% formamide, 0,05% μπλε της βρομοφαινόλης, 0,05% xylene cyanol, 10mM NaOH) για 6:30 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετούνται σε πάγο.

3) Ηλεκτροφόρηση

Πραγματοποιείται για 20 ώρες στα 220V.

4) Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο.

1. Εκβαπτίζουμε το πηκτώμα σε 200 ml διαλύματος (0,5ml οξικό οξύ και 400ml ddH₂O) για 3 λεπτά.
2. Απομακρύνουμε το διάλυμα.
3. Επαναλαμβάνουμε στάδια 1 και 2.
4. Προσθέτουμε διάλυμα 1gr/lit AgNO₃ για 8 λεπτά.
5. Απομακρύνουμε το διάλυμα και ξεπλένουμε με ddH₂O δύο φορές.
6. Απομακρύνουμε το ddH₂O και προσθέτουμε διάλυμα 200ml (3gr NaOH, 0,02gr NaBH₄, 1ml φορμαλδεΐδη, συμπληρώνουμε με ddH₂O ως τα 200ml) μέχρι να γίνουν ορατές οι ζωνώσεις στο πηκτώμα.
7. Απομακρύνουμε το διάλυμα και ξεπλένουμε με ddH₂O.

2.5 Καθαρισμός προϊόντων PCR

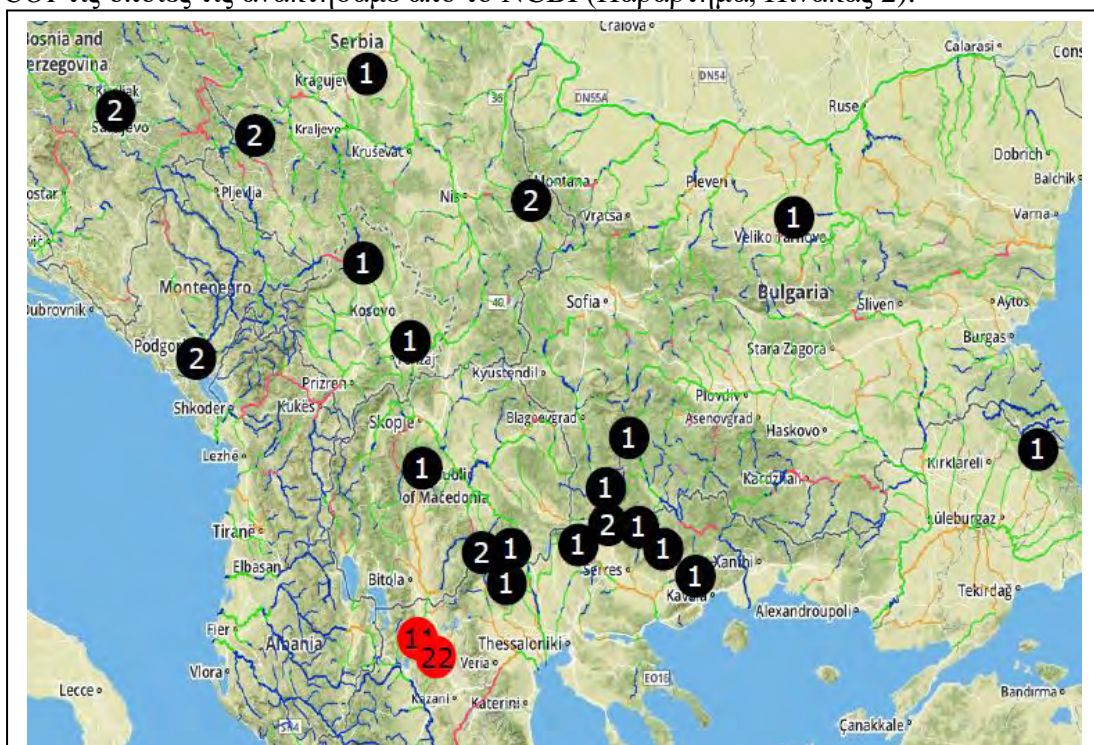
Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR έχει ως σκοπό την απομάκρυνση των ενζύμων της πολυμεράσης, του χλωριούχου μαγνήσιου και των dNTPs που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της PCR. Η απομάκρυνσή τους είναι απαραίτητη διότι εμποδίζουν την διαδικασία της αλληλούχησης. Για αυτό τον λόγο κάθε δείγμα που πρόκειται να αλληλουχηθεί υπόκειται αρχικά σε καθαρισμό. Στην παρούσα εργασία έγινε με το Kit SureClean, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την επιβεβαίωση του επιτυχούς καθαρισμού πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε gel αгарόζης 2%.

2.6 Αλληλούχηση κατά Sanger

Η αλληλούχηση έχει ως σκοπό τον προσδιορισμό μίας αλληλουχίας νουκλεϊκού οξέος. Στα δείγματά μας έγινε με μέθοδο που βασίζεται στην αλληλούχηση κατά Sanger, με σκοπό τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *COI* των δειγμάτων μας. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε και προς τις δύο κατευθύνσεις. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης έγινε με το πρόγραμμα Bioedit.

2.7 Ανάλυση δεδομένων

Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Bioedit 7.0.5 (Hall T.A., 1999) και η φυλογενετική ανάλυση με το πρόγραμμα MEGA7 (Kumar et al., 2015). Η ανάλυση δικτύου (network) έγινε με το πρόγραμμα Popart (Leigh, J.W. & Bryant D., 2015) με την μέθοδο median joining network (Bandelt H. et al., 1999). Η διερεύνηση της ομολογίας των προς εξέταση αλληλουχιών έγινε μέσω του αλγορίθμου BLASTn στην νουκλεοτιδική βάση δεδομένων του NCBI. Για την φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν και ήδη γνωστές αλληλουχίες του γονιδίου *COI* τις οποίες τις ανακτήσαμε από το NCBI (Παράρτημα, Πίνακας 2).

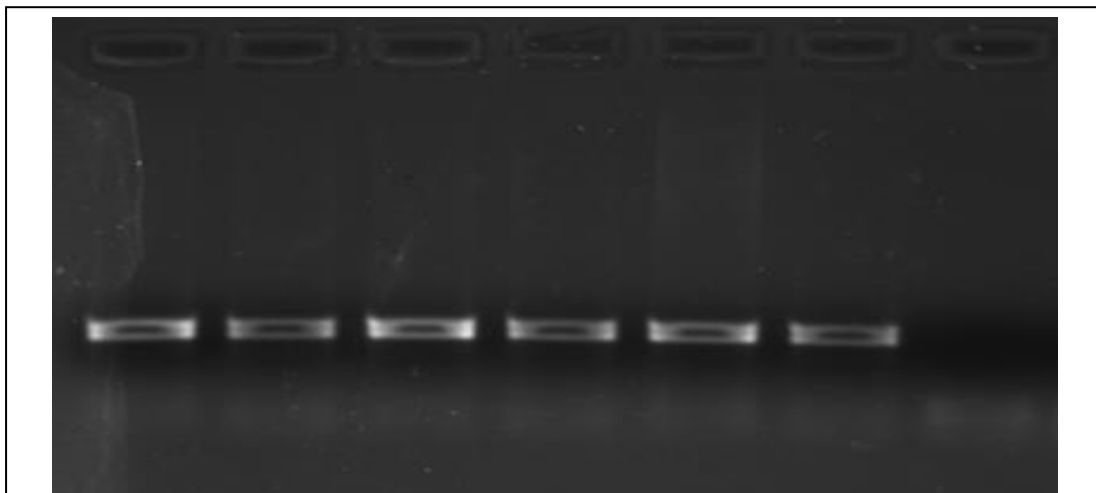


Εικόνα 9: Τοποθεσίες συλλογής βαλκανικών ατόμων *A.torrentium*. Κάθε κουκίδα αντιστοιχεί σε μία γεωγραφική περιοχή. Ο αριθμός στις κουκκίδες αντιστοιχεί στον αριθμό των ατόμων ανά περιοχή.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα PCR

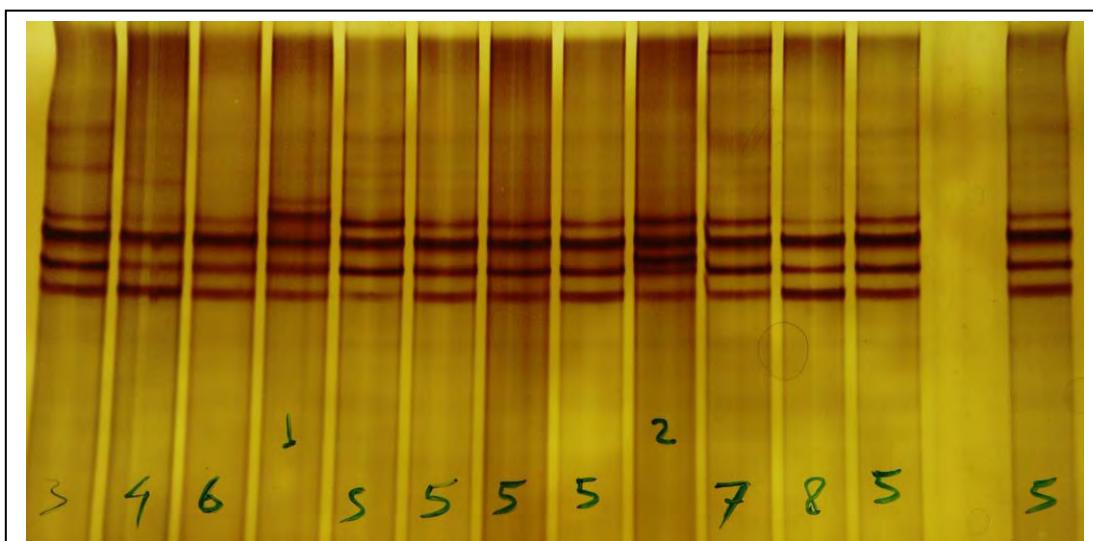
Μετά την απομόνωση του DNA ακολούθησε PCR. Τα αποτελέσματα της PCR οπτικοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης ενδεικτικά:



Εικόνα 11: Φωτογραφία gel αγαρόζης απο ηλεκτροφόρηση δειγμάτων PCR.

3.2 Αποτελέσματα SSCP

Τα αποτελέσματα της SSCP ενδεικτικά:



Εικόνα 12: Φωτογραφία από gel της τεχνικής SSCP. Στην εικόνα παρατηρούμε διαφορετικά πρότυπα ζωνώσεων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της SSCP από τα 33 δείγματα προέκυψαν 14 διαφορετικά πρότυπα ζωνώσεων (Παράρτημα, Πίνακας 1). Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκαν για αλληλούχηση 14 δείγματα αντιπροσωπευτικά των προτύπων ζωνώσεων.

3.3 Αποτελέσματα αλληλούχησης

Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από την αλληλούχηση έγινε με το πρόγραμμα Bioedit. Η αλληλουχία που ανακτήσαμε αποτελεί τμήμα του γονιδίου *COI* και είναι μήκους 252 ζευγών βάσεων (bp).

Στην συνέχεια διερευνήσαμε την ομολογία των προς εξέταση αλληλουχιών μέσω του αλγορίθμου BLASTn στην νουκλεοτιδική βάση δεδομένων του NCBI. Οι αλληλουχίες εμφάνισαν κάλυψη 99-100% και ομοιότητα 98-99% με κατατεθειμένες αλληλουχίες του είδους *A.torrentium*. (Πίνακας 4). Δύο αλληλουχίες από την περιοχή Κολχική κάτω από το φράγμα και Μεταξύ Ακρίτας και Άνω κλεινές εμφάνιζαν χαμηλή ομοιότητα 82% και 81% αντίστοιχα. Παρόλα αυτά δεν θεωρήσαμε ότι αντιστοιχούν σε άλλο είδος καθώς τα χρωματογραφήματά τους ήταν κακής ποιότητας και ασαφή.

Στις 12 αλληλουχίες παρατηρήθηκαν 2 πολυμορφικές θέσεις, στις θέσεις 418 (C-T) και 454 (T-G). Με βάση τα παραπάνω προκύπτουν τρεις διαφορετικοί απλότυποι όσον αφορά τα προς εξέταση δείγματα (Εικόνα 13). Τον απλότυπο Α όπου στην θέση 418 υπάρχει T(θυμίνη) και στην θέση 454 υπάρχει G(γουανίνη). Τον απλότυπο Β όπου στην θέση 418 υπάρχει C(κυτοσίνη) και στην θέση 454 T(θυμίνη) και τέλος τον απλότυπο C που και στις δύο θέσεις 418 και 454 έχει T(θυμίνη). Παρακάτω γίνεται ομοπαράθεση των αλληλουχιών των τριών απλοτύπων Α, Β και C με αλληλουχίες ελληνικών *A.torrentium* που ανακτήσαμε από την νουκλεοτιδική βάση δεδομένων του NCBI (Εικόνα 13).

Από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης σε συνδυασμό με αυτά της SSCP (Παράρτημα, Πίνακας 1) καταλήγουμε σε ότι, από τα 33 δείγματα συνολικά, 13 ανήκουν στον απλότυπο Α, 3 ανήκουν στον απλότυπο Β και 14 στον απλότυπο C (Πίνακας 5).

Από συγκρίσεις μεταξύ των ελληνικών αλληλουχιών που έγιναν με το πρόγραμμα MEGA7, σε σύνολο 252 bp, παρατηρήθηκαν μεταξύ του συνόλου των δειγμάτων 19 πολυμορφικές θέσεις, εκ των οποίων οι 9 είναι πληροφοριακές για την φειδωλότητα ενώ οι 10 βρίσκονται σε μεμονωμένα άτομα (Εικόνα 13). Αντίστοιχα σε σύγκριση

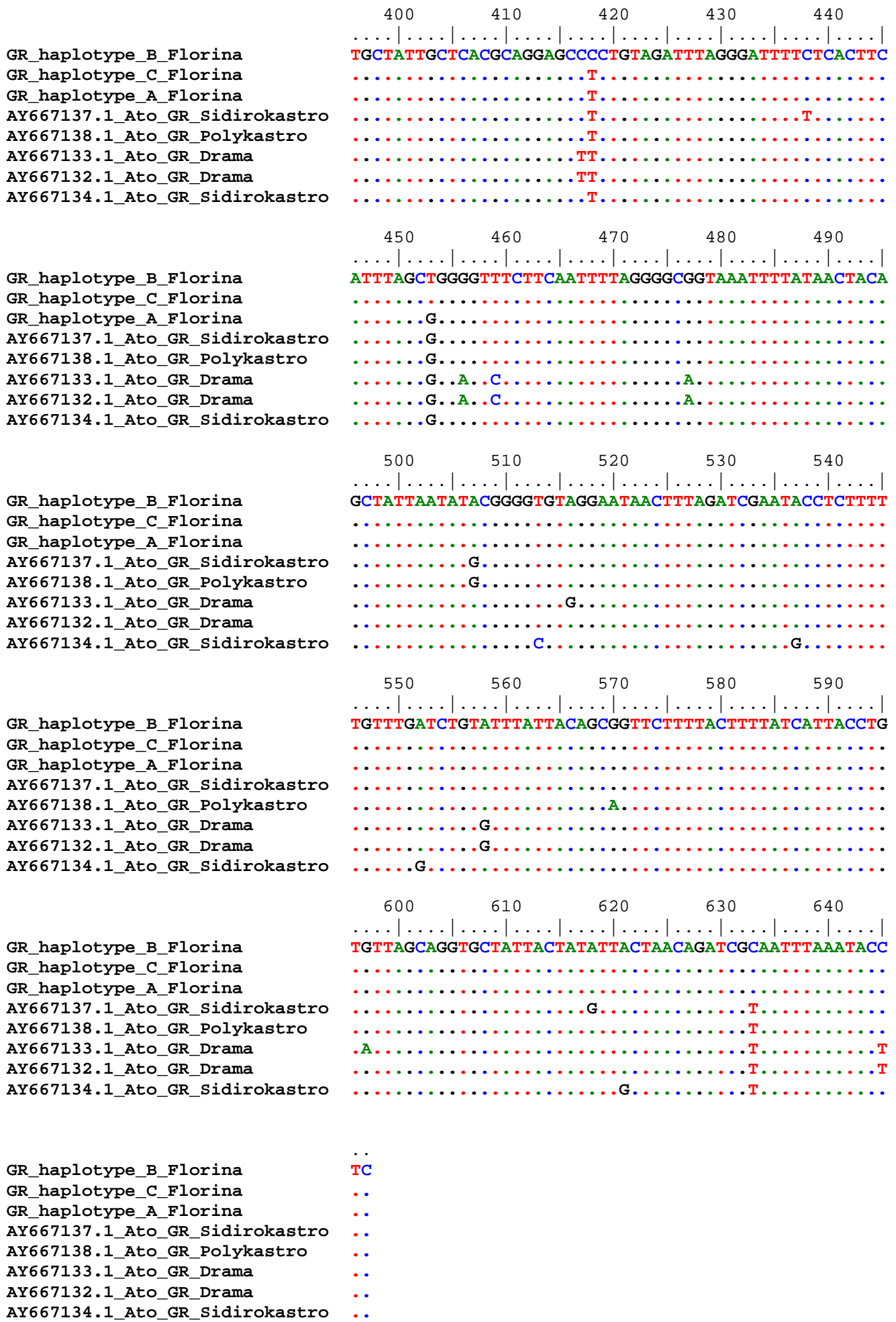
μεταξύ του συνόλου των αλληλουχιών (Παράρτημα, Πίνακας 2 και απλότυποι A,B,C) παρατηρήθηκαν 55 πολυμορφικές θέσεις εκ των οποίων οι 46 είναι πληροφοριακές για την φειδωλότητα ενώ οι 9 βρίσκονται σε μεμονωμένα άτομα.

Πίνακας 4: Τοποθεσία συλλογής, είδος και πληροφορίες σχετικά με την πρότυπη αλληλουχία.

Τοποθεσία δείγματος	Είδος	Κάλυψη	Ομοιότητα
A) Βόρεια Κολχική από δυτικό ρέμα Διχάλα (ΣΤΑΣΗ 2)	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	98%
>>	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	99%
B) Αριστερά φράγματος Κολχικής (ΣΤΑΣΗ 1)	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	99%
>>	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	98%
>>	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	99%
>>	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	99%
Γ) Κολχική κάτω από το φράγμα	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	82%
>>	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	99%
Δ) Μεταξύ Ακρίτας και Άνω κλεινές	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	98%
>>	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	99%
>>	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	99%
>>	<i>Austropotamobius torrentium</i>	99%	81%
>>	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	99%
>>	<i>Austropotamobius torrentium</i>	100%	99%

Πίνακας 5: Τοποθεσία, συνολικός αριθμός δειγμάτων ανά τοποθεσία και αριθμός δειγμάτων που αντιστοιχεί σε κάθε απλότυπο

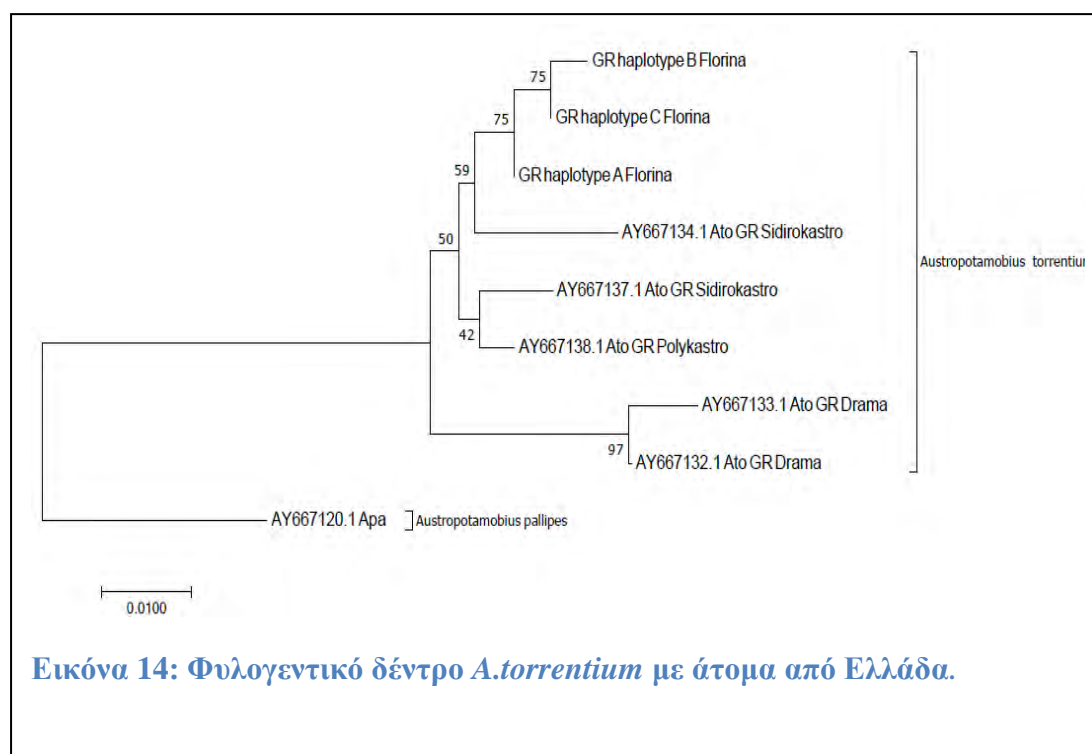
Τοποθεσία	Συνολικός Αριθμός δειγμάτων	Απλότυποι		
		Απλότυπος A	Απλότυπος B	Απλότυπος C
A	7	6	1	0
B	13	6	1	5
Γ	2	0	0	1
Δ	11	1	1	8



Εικόνα 13: Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ελληνικών *A.torrentium*

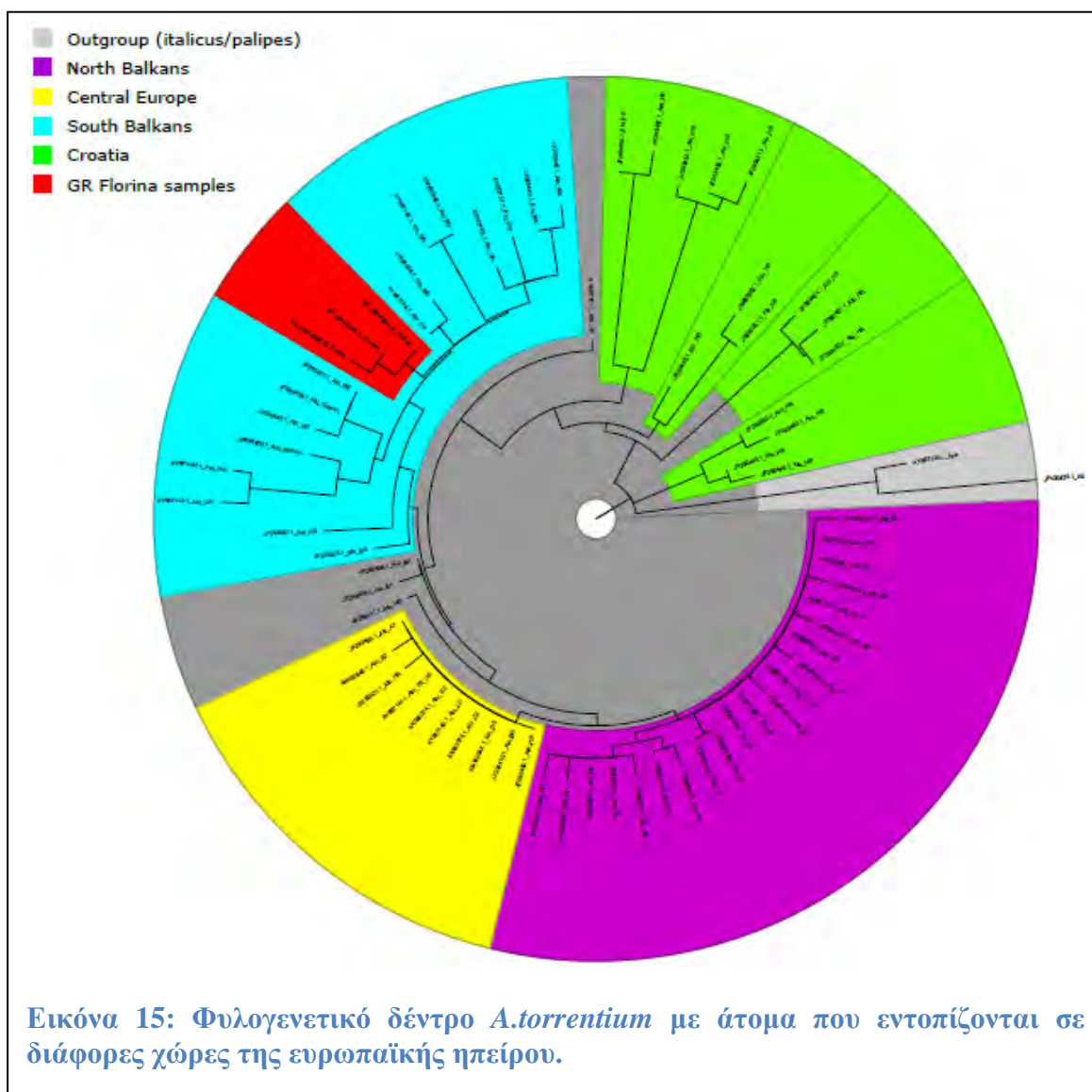
3.4 Φυλογενετική ανάλυση

Ακολούθησε η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων που δείχνουν εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των διαφόρων ατόμων. Κατασκευάσαμε δύο δέντρα. Στο πρώτο δέντρο περιέχονται οι αλληλουχίες των προς εξέταση δειγμάτων καθώς και επιπλέον κατατεθειμένες αλληλουχίες από άτομα *A. torrentium* από Ελλάδα (Εικόνα 14). Στο κάτω μέρος του δέντρου υπάρχει μία αλληλουχία από *A. pallipes* που έχει τον ρόλο της εξωομάδας στο δέντρο. Παρατηρούμε την διαφορετική ομαδοποίηση των τριών απλοτύπων σε σχέση με τα υπόλοιπα ελληνικά.



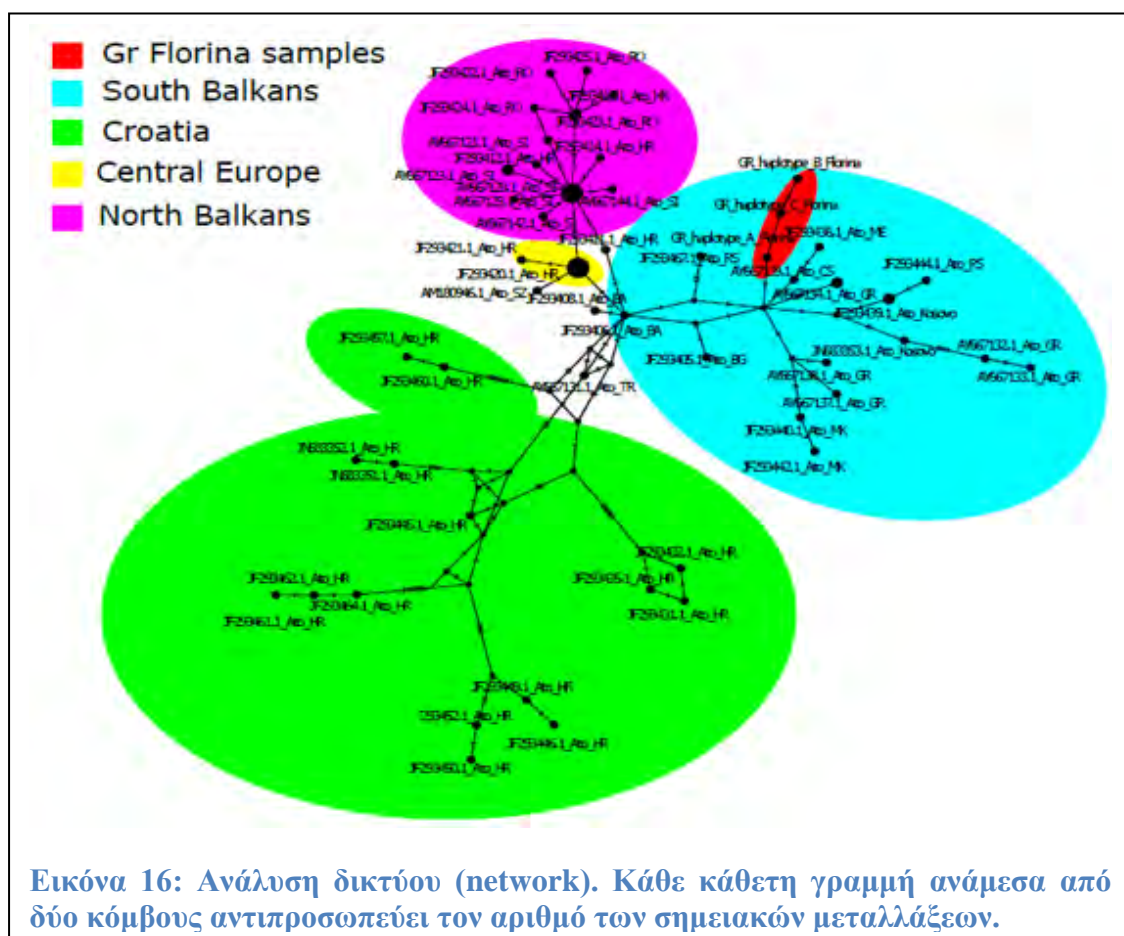
Εικόνα 14: Φυλογενετικό δέντρο *A.torrentium* με άτομα από Ελλάδα.

Στο δεύτερο δέντρο περιέχονται οι αλληλουχίες, των προς εξέταση δειγμάτων, καθώς και μοναδικές αλληλουχίες ατόμων *A.torrentium* από χώρες της ευρωπαϊκής ηπείρου (Εικόνα 15). Επίσης περιέχονται και δύο αλληλουχίες από *A.pallipes* και *A.italicus* που έχουν τον ρόλο της εξωομάδας στο δέντρο, όπως πάνω. Παρατηρούμε ότι στο δέντρο τα άτομα ομαδοποιούνται με γεωγραφικό πρότυπο. Μπορούμε να διακρίνουμε 4 διαφορετικές ομαδοποιήσεις. Η πρώτη με άτομα από Κροατία (πράσινο), η δεύτερη με άτομα από χώρες των νότιων Βαλκανίων (γαλάζιο) όπου περιέχονται τα προς εξέταση δείγματα (κόκκινο), η τρίτη με άτομα από χώρες της κεντρικής Ευρώπης (κίτρινο) και η τέταρτη με άτομα από χώρες στα βόρεια των Βαλκανίων (μωβ).



3.5 Network analysis

Τέλος εκτελέσαμε ανάλυση δικτύου χρησιμοποιώντας μοναδικές αλληλουχίες *A.torrentium* από χώρες της ευρωπαϊκής ηπείρου. Παρατηρούμε τέσσερις ξεχωριστές ομαδοποιήσεις βάση γεωγραφικού προτύπου (Εικόνα 16). Μία με άτομα από Κροατία (πράσινο), μία με άτομα από βόρεια Βαλκάνια (ροζ), μία με άτομα από κεντρική Ευρώπη (κίτρινο) και τέλος μία με άτομα από χώρες των νότιων Βαλκανίων (γαλάζιο) στα οποία περιέχονται οι τρεις απλότυποι από Φλώρινα (κόκκινο).



4. Συζήτηση

Για την ταυτοποίηση του είδους των караβίδων, εφόσον αυτή ήταν δύσκολο να γίνει μέσω παρατήρησης μορφολογικών χαρακτηριστικών, καταφύγαμε σε μοριακές μεθόδους και συγκεκριμένα αυτή του barcoding. Τα είδη που ανήκουν στην οικογένεια των *Astacidae* εμφανίζουν μορφολογικές ομοιότητες. Η διάκριση μεταξύ του *A.pallipes* και *A.torrentium* είναι δύσκολη καθώς τα δύο είδη έχουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά. Με την χρήση του barcoding μπορούμε να ταυτοποιήσουμε με ακρίβεια το είδος, καθώς και την ύπαρξη υποείδους.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε ως δείκτη για barcoding τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου *COI*. Η ενίσχυση του γονιδίου έγινε με την τεχνική της PCR με το σετ παγκόσμιων εκκινητών mlCOIintF και jgHCO2198. Σύμφωνα με τον Leray (2013) αυτό το ζεύγος εκκινητών εμφάνισε στα *Arthropoda* ποσοστό επιτυχίας 88%. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, καθώς οι εκκινητές εμφάνισαν 100% επιτυχία και επιτεύχθηκε ενίσχυση του γονιδίου και στα 33 δείγματα. Διερευνήσαμε την ομολογία των προς εξέταση αλληλουχιών μέσω του αλγόριθμου BLASTn στην νουκλεοτιδική βάση δεδομένων του NCBI. Όλα τα δείγματά μας ανήκουν στο είδος *Austropotamobius torrentium*. Τις αλληλουχίες, των δειγμάτων προς εξέταση, τις διακρίναμε σε τρεις διαφορετικούς απλότυπους που οφείλονταν σε SNPs. Όταν τις συγκρίναμε με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες *A.torrentium* από Ελλάδα παρατηρήσαμε ότι ήταν μοναδικές ως προς τις πολυμορφικές αυτές θέσεις. Επίσης όταν συγκρίναμε όλες τις αλληλουχίες συνολικά από Ελλάδα παρατηρήσαμε 19 διαφορετικούς πολυμορφισμούς SNPs μεταξύ τους.

Πρέπει να αναφέρουμε ότι το συγκεκριμένο σετ παγκόσμιων εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε είναι σχεδιασμένο έτσι, ώστε οι εκκινητές να προσδένονται σε συντηρημένες διαειδικά περιοχές, όσον αφορά τα μετάζωα, και να δίνουν ένα PCR προϊόν αρκετά πολυμορφικό διαειδικά, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει ταυτοποίηση είδους με βάση την λογική του barcoding. Παρόλα αυτά παρατηρήσαμε αρκετά μεγάλη ενδοειδική διαφοροποίηση του τμήματος *COI* 252 bp που αλληλουχήσαμε, παρατηρώντας 51 πολυμορφικές θέσεις στις 252 όταν συγκρίναμε το σύνολο των κατατεθειμένων αλληλουχιών των *A.torrentium*. Η παρατήρησή μας έρχεται σε

συμφωνία με τα ευρήματα του Trontelj (2004) όπου καταλήγουν ότι το τμήμα COI που χρησιμοποίησαν (650 bp), περιέχει ένα σχετικά υψηλό φυλογενετικό σήμα και φαίνεται ικανό να εντοπίσει διαφοροποιήσεις μεταξύ των γενεαλογιών του *A.torrentium*.

Στην συνέχεια προχωρήσαμε στην κατασκευή δύο φυλογενετικών δέντρων. Από το πρώτο φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάσαμε (Εικόνα 14) με όλα τα ελληνικά *A.torrentium* παρατηρήσαμε ότι τα άτομα της Φλώρινας τα τοποθετεί σε διαφορετικό κλάδο από τα υπόλοιπα ελληνικά. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με βάση το γεγονός ότι τα υπόλοιπα ελληνικά προέρχονται από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας (νομός Σερρών, Κιλκίς και Δράμας). Στο δεύτερο δέντρο που κατασκευάσαμε (Εικόνα 15), το οποίο περιέχει αλληλουχίες ατόμων *A.torrentium* από διάφορες χώρες της ευρωπαϊκής ηπείρου, παρατηρούμε μία ομαδοποίηση των ατόμων σε 4 ομάδες με βάση γεωγραφικό πρότυπο (Κροατία, νότια Βαλκάνια, κεντρική Ευρώπη, βόρεια Βαλκάνια). Στις ομάδες των νότιων Βαλκανίων και της Κροατίας παρατηρούμε μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των ατόμων, ενώ στις κεντρικής Ευρώπης και των Βόρειων Βαλκανίων παρατηρούμε ομοιογένεια. Αξιοσημείωτο είναι ότι στον κλάδο με τα άτομα της κεντρικής Ευρώπης, τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ομοιογένεια, περιέχονται δύο άτομα από Κροατία και ένα από Βουλγαρία. Σύμφωνα με τον χάρτη (Εικόνα 9) και τα τρία αυτά άτομα εντοπίζονται σε κοντινές περιοχές από όπου διέρχεται ο ποταμός Δούναβης. Επίσης ένα παρόμοιο γεωγραφικό πρότυπο με αυτό του φυλογενετικού δέντρου λαμβάνουμε και από την ανάλυση δικτύου (Εικόνα 16). Σε αυτό παρατηρούμε πολύ μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των ατόμων της Κροατίας ενώ αντίθετα μεγάλη ομοιογένεια μεταξύ των ατόμων από κεντρική Ευρώπη και βόρεια Βαλκάνια. Στην ομαδοποίηση των νότιων Βαλκανίων βλέπουμε μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των ελληνικών ατόμων σε σχέση με την μεταξύ τους απόσταση, με τα πιο διαφοροποιημένα να είναι αυτά της Δράμας. Ακόμη, παρατηρούμε ομαδοποίηση των ατόμων από Σέρρες και Κιλκίς με αυτά από Π.Γ.Δ.Μ. γεγονός λογικό καθώς βρίσκονται αρκετά κοντά γεωγραφικά. Ενδιαφέρον εμφανίζουν τα άτομα του Κοσσόβου τα οποία φαίνεται να βρίσκονται σε παρόμοιες αποστάσεις (network) με όλα τα ελληνικά συμπεριλαμβανομένων και αυτών της Δράμας. Επίσης άτομα από Βουλγαρία, Μαυροβούνιο και Βοσνία Ερζεγοβίνη φαίνεται βρίσκονται σε παρόμοιες αποστάσεις από τα ελληνικά.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα και σε συνδυασμό με τις τοποθεσίες των *A.torrentium* στα Βαλκάνια (Εικόνα 9) μπορούμε να κάνουμε τις εξής υποθέσεις:

- Η ομαδοποίηση ατόμων από κεντρική Ευρώπη με άτομα από Κροατία και Βουλγαρία και η μεγάλη ομοιογένεια που εμφανίζουν αυτά μεταξύ τους, φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με τον ποταμό Δούναβη. Όλα τα άτομα αυτά εντοπίζονται σε κοντινές αποστάσεις από τον Δούναβη γεγονός που σημαίνει ότι ανήκουν στην λεκάνη απορροής του ποταμού και ότι ίσως ο ποταμός παίζει καθοριστικό ρόλο στην μετακίνηση πληθυσμών σε μεγάλες αποστάσεις στην ευρωπαϊκή ήπειρο.
- Οι κοντινές αποστάσεις (network) που παρατηρούνται μεταξύ ατόμων του Κοσσόβου και Σερβίας με αυτά της Ελλάδας (Εικόνα 16) ίσως να σχετίζεται με την σύνδεση των ποταμών Morava-Vardar(Αξιός) οι οποίοι ξεκινώντας από τον Δούναβη, διασχίζουν την Σερβία και το Κόσσοβο και μέσω της Π.Γ.Δ.Μ. καταλήγουν στην Ελλάδα.
- Η ομαδοποίηση των ατόμων από Π.Γ.Δ.Μ. με αυτά του Κιλκίς και ενός από Σέρρες ίσως να εξηγείται μέσω της λεκάνης απορροής του Αξιού στην περιοχή αυτή. Επίσης η συσχέτιση μεταξύ ατόμων από Βουλγαρία και Σέρρες μπορεί να εξηγηθεί μέσω της διαδρομής του Στρυμόνα καθώς όλα τα άτομα αυτά εντοπίζονται κοντά σε περιοχές που διασχίζει. Η διαφοροποίηση που εμφανίζουν τα άτομα της Δράμας ίσως να οφείλεται στην απομόνωση των ατόμων αυτών για μεγάλη χρονική περίοδο (Trontelj et al., 2004).
- Μπορούμε να υποθέσουμε την συσχέτιση των ατόμων της Φλώρινας με αυτά που προέρχονται από Μαυροβούνιο και Βοσνία Ερζεγοβίνη καθώς ποτάμια από αυτές τις χώρες φαίνεται να καταλήγουν στις λίμνες των Πρεσπών από όπου και προέρχονται τα άτομα της Φλώρινας (Εικόνα 9).
- Από το φυλογενετικό δέντρο και την ανάλυση δικτύου (Εικόνες 15 και 16) παρατηρούμε μεγάλη διαφοροποίηση στην Κροατία και τα νότια Βαλκάνια ενώ το αντίθετο συμβαίνει στην κεντρική Ευρώπη. Αυτό ίσως να αποτελεί παράδειγμα καταφυγίων των περιοχών αυτών κατά τις παγετωνικές περιόδους και μετακίνηση πληθυσμών προς τα βόρεια με το λιώσιμο των πάγων, όπως αναφέρεται και από τον Trontelj (2004).

Ενώ τα αποτελέσματα από τα φυλλογενετικά δέντρα και την ανάλυση δικτύου μπορούν να μας δώσουν πληροφορίες για την φυλογεωγραφία του *A.torrentium*, θα ήταν επιθυμητό να έχουμε πιο πολλές πληροφορίες όσον αφορά τις περιοχές που εντοπίζονται καθώς και τις αλληλουχίες των ατόμων από τις περιοχές αυτές, ώστε να μπορούμε βγάλουμε πιο ασφαλή συμπεράσματα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403–410.
2. Bandelt H., Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 16(1):37–48
3. Crandall K. & Buhay J. 2008. Global diversity of crayfish (*Astacidae*, *Cambaridae*, and *Parastacidae—Decapoda*) in freshwater. *Hydrobiologia*. 595:295–301
4. Diéguez-Uribeondo J. 2006. The dispersion of the *Aphanomyces astaci*-carrier *Pacifastacus leniusculus* by humans represents the main cause of disappearance of the indigenous crayfish *Austropotamobius pallipes* in Navarra. *Bull. Fr. Pêche Piscic*. 380-381:1303-1312
5. Galeotti P., Rubolini D., Fea G., Ghia D., Nardi P., Gherardi F. and Fasola M. 2006. Female freshwater crayfish adjust egg and clutch size in relation to multiple male traits. *Proc. R. Soc. B*. 273:1105–1110
6. Grandjean F., Harris D. J., Souty-Grosset C., and Crandall K. A. 2000. Systematics of the european endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (*Decapoda: Astacidae*). *Journal of crustacean biology*. 20(3):522–529
7. Hall TA. 1999. “BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT”. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
8. Hobbs H.H., Jr. 1988. Crayfish distribution, adaptive radiation and evolution. In: *Freshwater Crayfish - Biology, Management and Exploitation* (D.M. Holdrich and R.S. Lowery eds.). 1-7
9. Holdich D.M. 2003. Crayfish in Europe – an overview of taxonomy, legislation, distribution, and crayfish plague outbreaks. In: Holdich D.M. and Sibley P.J. (eds.), *Management & Conservation of Crayfish*, Proceedings of a conference held in Nottingham on 7th November 2002, Environment Agency, Bristol, 15–34
10. Holdich D.M., Harioglu M.M. and Firkins I. 1997. Salinity adaptations of crayfish in British waters with particular reference to *Austropotamobius pallipes*, *Astacus leptodactylus* and *Pacifastacus leniusculus*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 44:147-154
11. Holdich D.M., & Lowery, R.S. 1988. Crayfish-an Introduction. In: *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation*, (eds D.M. Holdich &R.S. Lowery). 309-40
12. Holdich D.M., & Reeve I.D. 1988. Functional morphology and anatomy. In: *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation*, (eds D.M. Holdich &R.S. Lowery). 11-51

13. Holdich D.M., Reynolds J.D., Souty-Grosset C., Sibley P.J. 2009. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*. 11:394-395
14. IUCN 2017. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3
15. Khan F. 2015. Molecular Markers: An Excellent Tool for Genetic Analysis. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*. 6:3
16. Klobucar G.I.V., Podnar M., Jelic M., Franjevic D., Faller M., Stambuk A., Gottstein S., Simic V. and Maguire I. 2013, Role of the Dinaric Karst (western Balkans) in shaping the phylogeographic structure of the threatened crayfish *Austropotamobius torrentium*. *Freshwater Biology*. 58:1089–1105
17. Kumar S., Stecher G. and Tamura K. 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*
18. Laurent P.J., 1988. *Austropotamobius pallipes* and *A. torrentium* with observations on their interactions with other species in Europe. In: D.M. HOLDICH and R.S. LOWERY (Eds.), *Freshwater crayfish: biology, management, and exploitation*. Croom Helm, London. 341-364, 426-479
19. Leigh, JW, Bryant D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol*. 6(9):1110–1116
20. Leray M., Yang J., Meyer C., Mills S., Agudelo N., Ranwez V., Boehm J. and Machida R. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial *COI* region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology* 2013. 10:34
21. Pedraza-Lara C., Alda F., Carranza S. , Doadrio I. 2010. Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (Faxon, 1914). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57:327-342
22. Petrussek A., Pesek P., Lestina D., Martin P., Fischer D., Kozak P., Vlach P. 2017. Mitochondrial DNA provides evidence of double origin of stone crayfish *Austropotamobius torrentium* in the Elbe basin. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*. 62:77-83
23. Pretzmann, G., 1994. Rote Liste der Zehnfüßigen Krebse (*Decapoda*) und Schwebgarnelen (*Mysidacea*) Österreichs. In Gepp, J. (ed.), *Rote Listen gefährdeter Tiere Österreichs*. Bundesministerium für Gesundheit und Umweltschutz, Vienna: 279–281
24. Reynolds J.D. 2002. Growth and Reproduction. In: *Biology of Freshwater Crayfish*. (D.M. Holdich ed.). Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.152-191.
25. Rode A.L. & Babcock L.E. 2003. Phylogeny of Fossil and Extant Freshwater Crayfish and Some Closely Related Nephropid Lobsters. *Journal of Crustacean Biology*. 23:418-435
26. Russel P.J. 2009. *iGenetics: Μία Μεντελική Προσέγγιση*. Pearson Education, Inc.- Benjamin Cummings.

27. Savolainen V., Cowan R.S., Vogler A.P., Roderick G.K. and Lane R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360:1805-1811
28. Schubart C.D. & Huber M.G.J. 2006. Genetic comparisons of german populations of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Crustacea: Astacidae). *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 380-381:1019-1028
29. Souty-Grosset C., Holdich D.M., Noël P.Y., Reynolds J.D. and Haffner P. (eds.). 2006. Atlas of Crayfish in Europe, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, Patrimoines naturels. 64:187
30. Streissl F. & Hödl W. 2002. Growth, morphometrics, size at maturity, sexual dimorphism and condition index of *Austropotamobius torrentium* Schrank. *Hydrobiologia.* 477:201–208
31. Trontelj P., Machino Y., Sket B. 2005. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial *COI* gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 34:212-226

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Τοποθεσίες συλλογής δειγμάτων και πρότυπα SSCP

Αριθμός δειγμάτων	Τοποθεσία συλλογής δείγματος	Πρότυπο SSCP
1	A) Βόρεια Κολχική από δυτικό ρέμα (Διχάλα ΣΤΑΣΗ 2)	1
2	>>	1
3	>>	2
4	>>	1
5	>>	1
6	>>	1
7	>>	1
8	B) Αριστερά φράγματος Κολχικής (ΣΤΑΣΗ 1)	1
9	>>	3
10	>>	1
11	>>	1
12	>>	1
13	>>	1
14	>>	1
15	>>	3
16	>>	4
17	>>	5
18	>>	6
19	>>	6
20	>>	6
21	Γ) Κολχική κάτω από το φράγμα	9
22	>>	10
23	Δ) Μεταξύ Ακρίτας και Άνω κλεινές	12
24	>>	7
25	>>	11
26	>>	11
27	>>	11
28	>>	11
29	>>	8
30	>>	13
31	>>	14
32	>>	11
33	>>	11

Πίνακας 2: Accession Number, Τοποθεσία συλλογής και Βιβλιογραφία

Accession Number	Τοποθεσία	Βιβλιογραφία
AY667121.1 Ato SI	Baškagrpa, Tolmin, SI	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667123.1 Ato SI	Zala Creek	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667124.1 Ato SI	Bohinjska Bela, Bled, SI	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667126.1 Ato SI	Rakitna, Ljubljana, SI	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667127.1 Ato SI IT	Rakitna, Ljubljana, SI / River Iška, Ljubljana, SI / Hotenjka Creek, Logatec, SI / Jazbinški potok, Žerjav, SI / Piano di Fusine, Tarvisio, IT	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667128.1 Ato SI	Glinščica Creek, Ljubljana, SI	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667129.1 Ato SI	Zaplana, Logatec, SI	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667130.1 Ato AT IT	Zainer Bach, Arnoldstein, AT / Tributary of the Slizza, Tarvisio, IT / Schinzengraben, Pressegger See, Hermangor, AT	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667131.1 Ato TR	Velika, Demirköy, Kirklareli, TR	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667132.1	Άνω Κεφαλάρι Δράμα	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667133.1	Μάρας Πηγέ(ς) Δράμα	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667134.1	Koursovit - Καρυδοχώρι Σιδηρόκαστρο	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667135.1	Milli - Άνγκιστρο Σιδηρόκαστρο	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667136.1	Ράμνα ακριτοχώρι Σιδηρόκαστρο	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667137.1	Milli - Άνγκιστρο Σιδηρόκαστρο	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667138.1	Βατανία - Κούπα Πολύκαστρο	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667139.1 Ato ME	Rijeka-Crnojevica, Cetinje, ME	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667141.1 Ato FR DE	Schlierbach, Bliesbruck, Sarreguemines FR / Gailbach, Obergailbach, Sarreguemines FR / Freiburg im Breisgau, DE	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667142.1 Ato SI	Dovje, Jesenice, SI	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667143.1 Ato LU	Rouderbaach, Grevenmacher	(Trontelja P. et al. 2005)
AY667144.1 Ato SI	Gorenji Lazi, Ribnica, SI	(Trontelja P. et al. 2005)
AM180945.1 Ato DE	Auerberg, Algäu, DE	(Schubart C.D. & Huber M.G.J., 2006)
AM180946.1 Ato SZ	Wienerwald, eastern AT	(Schubart C.D. & Huber M.G.J., 2006)
AM180948.1 Ato BG	Sandanska Bistrica, Sandanski, BG	(Schubart C.D. & Huber M.G.J., 2006)
KX589273.1 Ato CZ	Czech Republic: Radotinsky	(Petrušek A. et al. 2017)
KX589274.1 Ato SZ	Czech Republic: Zbirozsky	(Petrušek A. et al. 2017)
KX589275.1 Ato CZ	Czech Republic: Lucni (Giant Mts.)	(Petrušek A. et al. 2017)
JF293405.1 Ato BG	Sedrac, Razlog, BG	(Klobucar et al., 2013)
JF293406.1 Ato BA	Crna rijeka, Trnovo, BA	(Klobucar et al., 2013)
JF293408.1 Ato BA	Crna rijeka, Trnovo, BA	(Klobucar et al., 2013)
JF293409.1 Ato AT	Archbach, Reutte, AT	(Klobucar et al., 2013)
JF293410.1 Ato BG	Rositsa, Rositsa, BG	(Klobucar et al., 2013)
JF293411.1 Ato HR	Dolje, Podsused, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293412.1 Ato HR	Dolje, Podsused, HR	(Klobucar et al., 2013)

JF293413.1 Ato HR	Veliki potok, Zagreb, HR / Dubravica, Pušća, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293414.1 Ato HR	Gračanski potok, Zagreb, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293416.1 Ato HR	Jarak, Stojdraga, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293419.1 Ato HR	Okićnica, Donji Gorički, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293420.1 Ato HR	Unnamed stream, Crkveni Vrhovci / Vučjak, Jagodnjak, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293421.1 Ato HR	Bukovica, Novo Selo, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293422.1 Ato RO	Cerna, Caras Severin, RO	(Klobucar et al., 2013)
JF293423.1 Ato RO		(Klobucar et al., 2013)
JF293424.1 Ato RO		(Klobucar et al., 2013)
JF293425.1 Ato RO	Cerna, Caras Severin, RO	(Klobucar et al., 2013)
JF293427.1 Ato HR	Veliki potok, Zagreb, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293431.1 Ato HR	Gramaljska Dobra, Gramalj, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293432.1 Ato HR	Unnamed stream, Leskova Draga, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293435.1 Ato HR	Unnamed source, Malinci, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293436.1 Ato ME	Rijeka Crnojevića, Cetinje, ME	(Klobucar et al., 2013)
JF293437.1 Ato RS	Grošnička reka, Kragujevac, SR	(Klobucar et al., 2013)
JF293439.1 Ato Kosovo	Unnamed stream, Rashan, Kosovo	(Klobucar et al., 2013)
JF293440.1 Ato MK	Bošava, Kožuf Mountain, MK	(Klobucar et al., 2013)
JF293442.1 Ato MK	Bošava, Kožuf Mountain, MK	(Klobucar et al., 2013)
JF293444.1 Ato RS	Unnamed stream, Zlatibor Mountain, SR	(Klobucar et al., 2013)
JF293445.1 Ato HR	Badnjevice channel, Donji Proložac, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293446.1 Ato HR	Unnamed stream, Vrelo, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293449.1 Ato HR	Unnamed stream, Drežnica / Brebornica, Krnjak / Unnamed stream, Krakar / Ratković, Donji Puškarići, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293450.1 Ato HR	Jarak, Jelenići, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293452.1 Ato HR	Jarak, Sošice / Sopotski slap, Sošice / Suvaja, Sošice, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293457.1 Ato HR		(Klobucar et al., 2013)
JF293460.1 Ato HR	Zeleni Vir, Radatovići, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293461.1 Ato HR	Unnamed stream, Čujića Krčevina / Source Jezero, Sinj, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293462.1 Ato HR	Unnamed stream, Preodac, BA	(Klobucar et al., 2013)
JF293464.1 Ato HR	Unnamed stream, Čujića Krčevina, HR	(Klobucar et al., 2013)
JF293467.1 Ato RS	Toplodolska reka, Temska, SR	(Klobucar et al., 2013)
JN683351.1 Ato HR	Maja, Glina / Slatina, Dvor / Bručina, Glina, HR	(Klobucar et al., 2013)
JN683352.1 Ato HR	Bručina, Glina, HR	(Klobucar et al., 2013)
JN683353.1 Ato Kosovo	Lunni, Zhegovc, Kosovo	(Klobucar et al., 2013)
JF293438.1 Ato MK	Unnamed stream, Jakupica Mountain, MK	(Klobucar et al., 2013)
JF293441.1 Ato MK	Unnamed stream, Kožuf Mountain, MK	(Klobucar et al., 2013)
JF293443.1 Ato RS	Toplodolska reka, Temska, SR	(Klobucar et al., 2013)
JF293407.1 Ato BA	Toplodolska reka, Temska, SR	(Klobucar et al., 2013)