



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Χονδρογιάννης Ανδρέας Δημήτριος

*Εφαρμογή μοριακών τεχνικών για την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης
επιφανειακών υδάτων*

Λάρισα-2021

*«Εφαρμογή μοριακών τεχνικών για την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης
επιφανειακών υδάτων»*

*«Application of molecular techniques for the assessment of the ecological
status of surface waters»*

*«Εφαρμογή μοριακών τεχνικών για την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης
επιφανειακών υδάτων»*

Χονδρογιάννης Ανδρέας Δημήτριος

Τριμελής επιτροπή

Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)

Κάγκαλου Ιφιγένεια, Καθηγήτρια, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης (Μέλος)

Βασιλειάδης Σωτήρης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους με την πολύτιμη βοήθεια τους συνέβαλαν στην πραγμάτωση της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Μούτου Αικατερίνη και την Καθηγήτρια κα. Κάγκαλου Ιφιγένεια που μου έδωσαν την ευκαιρία να ασχοληθώ με αυτό το ενδιαφέρον θέμα καθώς και να συνεργαστώ με τόσο αξιόλογους ανθρώπους. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω, ιδιαιτέρως, τους υποψήφιους διδάκτορες Ραφαήλ Αγγελακόπουλο και Ανδρέα Τσιπουρλιάνο για την πολύτιμη και υπεράνθρωπη βοήθεια που προσέφεραν τόσο στο θεωρητικό όσο και στο εργαστηριακό κομμάτι της Διπλωματικής Εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ, θα ήθελα να εκφράσω για τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για το απίστευτο κλίμα συνεργασίας καθώς και για τις συμβουλές και την καθοδήγηση που προσέφεραν. Ένα θερμό ευχαριστώ στην ομάδα του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης για την συνεργασία που έγινε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας και στον Διονύση Λατινόπουλο για τις γνώσεις που με ιδιαίτερη προθυμία πρόσφερε. Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω, βέβαια, την οικογένεια μου και όλους τους φίλους που με βοήθησαν και συμπαραστάθηκαν σε αυτό το μοναδικό και ξεχωριστό ταξίδι μέχρι τώρα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Πολύκαρπο Τσουλούφα, Ραφαήλ Χυτούδη, Σοφοκλή Τσαντζάλη, Θοδωρή Ντάγκα, Γιάννη Χούλη, Αλέξανδρο Καρμίρη, Μάνο Γκαβέλα, Εύα Ντούμου και στη μοναδική Στέλλα Ανδρεοπούλου που ήταν παρόν σε κάθε στιγμή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η περιοχή ενδιαφέροντος της παρούσας εργασίας είναι ο Πηνειός, ένα από τα μεγαλύτερα ποτάμια της Ελλάδας. Τα βασικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζει είναι οι πλημμύρες, οι έντονες καλοκαιρινές ξηρασίες καθώς και η επιβάρυνση των υδάτων του από αστικά και βιομηχανικά λύματα. Η οδηγία 2000/60/ΕΚ έχει ως στόχο την επίτευξη “καλής οικολογικής κατάστασης” των επιφανειακών υδάτων και την εφαρμογή ενός συστήματος συνεχούς παρακολούθησης μιας σειράς παραμέτρων συμπεριλαμβανομένης της βιοποικιλότητας των βενθικών μακροασπόνδυλων. Οι δείκτες βιοποικιλότητας, χρησιμοποιώντας τις κλασικές μεθόδους, υπολογίζονται μετά από δειγματοληψία και επίπωση, χρονοβόρα ταξινόμηση των οργανισμών που συλλέγονται. Σκοπός της εργασίας είναι η εφαρμογή μοριακών τεχνικών για την ταξινόμηση των βενθικών μακροασπόνδυλων, με στόχο τη σύγκριση μεθόδων και την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης του Πηνειού.

Η δειγματοληψία έλαβε χώρα στις 13 και 14 Απριλίου του 2021, όπου η επιλογή των σημείων σχετίζεται με τη ροή πριν, αμέσως μετά και σε μεγαλύτερη απόσταση από φραγμούς ροής. Ο πρώτος φραγμός που επιλέχθηκε είναι τεχνητός (φράγμα Γυρτώνης) ενώ ο δεύτερος φυσικός (αναβαθμίδα Ομόλιο). Για τη διαδικασία της απομόνωσης, εφαρμόστηκε πρωτόκολλο αποτελούμενο από τρία βασικά βήματα. Η απομόνωση DNA έγινε με τη χρήση τριών διαφορετικών πρωτοκόλλων, δυο μη εξειδικευμένων και ενός εξειδικευμένου για δείγματα εδάφους. Με την επιλογή του καταλληλότερου πρωτοκόλλου δημιουργήθηκε ένα συγκεντρωτικό δείγμα των τριπλότυπων απομονώσεων των δειγμάτων, όπου η αλληλούχηση έγινε στην πλατφόρμα MiSeq της Illumina και η βιοπληροφορική ανάλυση με το εργαλείο USEARCH.

Τέλος, έγινε η σύγκριση των αποτελεσμάτων της κλασικής και μοριακής μεθόδου, η σύγκριση των δυο περιοχών με βάση την μοριακή μέθοδο και ο υπολογισμός της α , β -diversity.

Λέξεις κλειδιά: βενθικά μακροασπόνδυλα, δείκτες βιοποικιλότητας, μέθοδοι ταξινόμησης, COI metabarcoding, βιοπληροφορική ανάλυση

ABSTRACT

The area of interest of this dissertation is Pinios River, one of Greece's largest rivers. Some of the more pressing issues being faced are floods, intense draughts as well as urban and industrial waste. The main purpose of framework 2000/60/EC is the achievement of "good ecological status" of surface waters and the application of a continuous surveillance system of a series of parameters, including the biodiversity of benthic macroinvertebrates. The biodiversity indices, using traditional methods, are being calculated after sampling and laboriously, time-consuming taxonomy of the organisms collected. The goal of this dissertation is to apply molecular techniques for the taxonomy of benthic macroinvertebrates, in order to compare methods and asses the ecological status of Pinios River.

Sampling took place on the 13th and 14th of April 2021, with the choice of sampling points having been based on the flow before, immediately after and at a greater distance to the flow barriers. The first barrier that was chosen is an artificial barrier (Gyrtoni Dam) while the second one is natural (Omolio Ridge). In order to achieve DNA extraction, a protocol of three basic steps was put in place. DNA was extracted by using three different protocols, two of which were non-specific and one which was specific for soil samples. After choosing the most suitable protocol, a sampling pool was created of the triplicate sample extractions, where sequencing was performed on MiSeq Illumina platform and bioinformatics analysis was performed using USEARCH.

Finally, the comparisons of the results of the classic and molecular methods, as well as the two regions based on the molecular method, took place, and the calculation of α , β -diversity.

Key words: benthic macroinvertebrates, biodiversity indices, methods of taxonomy, COI metabarcoding, bioinformatics analysis.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Πηνεϊός ποταμός.....	1
1.2 Οδηγία 2000/60/ΕΚ.....	2
1.3 Βιοποικιλότητα – Δείκτες βιοποικιλότητας.....	3
1.3.1 Επιπτώσεις των φραγμάτων και των αναβαθμίδων στην βιοποικιλότητα.....	5
1.4 Βενθικά μακροασπόνδυλα για την οικολογική εκτίμηση υδάτων.....	6
1.5 Κλασική ταξινομική και μοριακές τεχνικές.....	8
1.6 Σκοπός.....	11
2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
2.1 Δειγματοληψία.....	13
2.2 Προετοιμασία δειγμάτων	15
2.3 Απομόνωση DNA.....	15
2.4 PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)	16
2.5 Ποσοτικοποίηση DNA και ηλεκτροφόρηση.....	17
2.6 COI metabarcoding.....	18
2.7 Βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση του USEARCH.....	20
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	23
3.1 Βελτιστοποίηση και επιλογή πρωτοκόλλου απομόνωσης DNA.....	23
3.2 Απομόνωση DNA, ποιοτικός-ποσοτικός προσδιορισμός και PCR στα δείγματα υπό μελέτη.....	24
3.3 Κλασική ταξινόμηση.....	25
3.4 Μοριακή ταξινόμηση.....	26
3.5 Σύγκριση κλασικής και μοριακής μεθόδου.....	28
3.6 Παρατηρούμενα γεωγραφικά μοτίβα.....	31
3.7 Σύγκριση μεταξύ περιοχών Γυρτώνης και Ομόλιου.....	31
3.7.1 Σύγκριση σταθμών Γυρτώνης.....	33
3.7.2 Σύγκριση σταθμών Ομόλιου.....	38
3.8 α-diversity κλασικής και μοριακής μεθόδου.....	42
3.9 β-diversity κλασικής και μοριακής μεθόδου.....	44
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πηνειός ποταμός

Ο Πηνειός ποταμός ή Θεσσαλικός ποταμός αποτελεί τον κύριο αποστραγγιστικό αγωγό της υδρογραφικής λεκάνης της Θεσσαλίας. Κατά μήκος της ροής, δέχεται νερά από αρκετούς παραπόταμους με σημαντικότερους τους Πάμισο, Ενιπέα, Πορταϊκό, Σοφαδίτικο, Ληθαίο ή Τιταρήσιο (Ξηριάς). Η κύρια χρήση του ποταμού είναι η άρδευση και τροφοδοσία πόσιμου νερού στην πόλη και τις περιοχές της Λάρισας (Κάντζαρης, 2003).

Κατά το μεγαλύτερο τμήμα του, ο Πηνειός ρέει διαμέσου πεδιάδας, με ήπια ροή, η οποία δεν επιτρέπει τη διάβρωση και την εκβάθυνση της κοίτης του. Τέτοιου είδους ροή ευνοεί την πρόσχωση (aggradation, αύξηση του υψομέτρου της γης λόγω εναπόθεσης ιζήματος) (Καλινδέρης & Στεφανίδης, 2006). Οι προσχώσεις κατά την περίοδο έντονων βροχοπτώσεων προκαλούν πλημμύρες, συχνά με καταστροφικά αποτελέσματα. Εκτός από τα προβλήματα πλημμυρών (ενίοτε και ξηρασίας) που εμφανίζονται κατά περιόδους, σημαντικό είναι το πρόβλημα της ρύπανσης και της υποβάθμισης της ποιότητα των υδάτων. Συγκεκριμένα, ο Πηνειός δέχεται αστικά λύματα από την πόλη των Τρικάλων και της Λάρισας καθώς και απόβλητα από τις μόνιμες και εποχικές βιομηχανικές μονάδες (Σιμοπούλου Δ., 2015). Πρόσθετη επιβάρυνση οφείλεται στις γεωργικές δραστηριότητες του Θεσσαλικού κάμπου και στην ανεξέλεγκτη χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων.

Σύμφωνα με την οδηγία-πλαίσιο για τα ύδατα (WFD, Water Framework Directive 2000/60/EK, βλ. Κεφ. 1.2) είναι απαραίτητη η εκτίμηση των μορφολογικών, βιολογικών και χημικών παραμέτρων των υδάτων. Όλες οι προαναφερθείσες ανθρώπινες παρεμβάσεις και οι φυσικές ή τεχνητές αλλαγές της μορφολογίας του ποταμού, αποτελούν κύριο παράγοντα για την οικολογική υποβάθμιση των υδάτων του Πηνειού.

Στο επίκεντρο της παρούσας εργασίας βρίσκονται δυο περιοχές κατά μήκος του ποταμού, με στόχο την εκτίμηση της βιολογικής κατάστασης του ποταμού και κατ' επέκταση την επίδραση αυτών των χαρακτηριστικών στο σύνολο της οικολογικής υποβάθμισης. Η πρώτη περιοχή ενδιαφέροντος είναι το φράγμα

στη Γυρτώνη. Σύμφωνα με το Υ.ΠΕ.ΘΕ (Υδάτινοι Πόροι και Περιβάλλον Θεσσαλίας) ο σκοπός για τον οποίο κατασκευάστηκε το φράγμα είναι η ταμίευση νερού και η διατήρηση της στάθμης του ποταμού. Κατά μήκος του φράγματος υπάρχουν συστήματα διόδου ψαριών, αναχώματα καθώς και άλλα κατασκευαστικά έργα. Συνεχίζοντας κατά μήκος του ποταμού βρίσκεται το υδροηλεκτρικό φράγμα, με κύριο σκοπό την παροχή ηλεκτρικής ενέργειας. Τα φράγματα αποτελούν μια ιδιαίτερη περίπτωση στη μεταβολή των βιολογικών παραμέτρων του ποταμού, ιδίως όταν αυτά παραμένουν κλειστά (απομόνωση των ανάντη και κατόντη περιοχών). Η δεύτερη περιοχή ενδιαφέροντος βρίσκεται στην περιοχή του Ομόλιου, όπου και συναντώνται αναβαθμίδες. Σε αυτό το τμήμα του ποταμού παρατηρούνται έντονοι μαιανδρισμοί που χαρακτηρίζονται από ήπια ροή κι έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία προσχώσεων (Καλινδέρης & Στεφανίδης, 2006).

1.2 Οδηγία 2000/60/ΕΚ

Η οδηγία 2000/60/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23^{ης} Οκτωβρίου του 2000, που στοχεύει στη δημιουργία πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων, ορίζει ως επιφανειακά ύδατα: *«Τα εσωτερικά ύδατα, εκτός των υπόγειων υδάτων· τα μεταβατικά και τα παράκτια ύδατα, εκτός κι αν πρόκειται για τη χημική τους κατάσταση, οπότε περιλαμβάνουν και τα χωρικά ύδατα».*

Κατηγορίες επιφανειακών υδάτων (2000/60/ΕΚ):

- Ποτάμια: ρέοντα συστήματα εσωτερικών υδάτων. Η ροή κατά το πλείστον είναι πάνω από την επιφάνεια του εδάφους, αλλά για ένα μέρος της διαδρομής του μπορεί να ρέει υπογείως.
- Λίμνες: στάσιμα συστήματα εσωτερικών υδάτων.
- Μεταβατικά: σύστημα επιφανειακών υδάτων στις εκβολές ποταμών. Η σύσταση τους αλλάζει λόγω των παράκτιων υδάτων και του ρέοντος γλυκού νερού.

- Παράκτια: επιφανειακά ύδατα που βρίσκονται στην πλευρά της ξηράς μιας γραμμής της οποίας βρίσκεται σε απόσταση ενός ναυτικού μιλίου προς τη θάλασσα από το πλησιέστερο σημείο της ακτογραμμής.

Οι βασικοί στόχοι της Οδηγίας είναι:

- η διεύρυνση του πλαισίου προστασίας των υδάτων, έτσι ώστε να συμπεριλάβει όλα τα ύδατα (επιφανειακά, υπόγεια, κτλ.),
- η αποτροπή περαιτέρω υποβάθμισης και ο εμπλουτισμός όλων των υδάτινων οικοσυστημάτων,
- η προώθηση μιας ολοκληρωμένης διαχείρισης των υδατικών πόρων βασισμένη στην μακροχρόνια προστασία τους,
- η λήψη συγκεκριμένων μέτρων για έλεγχο της ρύπανσης
- ο μετριασμός των συνεπειών πλημμυρών ή ξηρασίας
- η λήψη μέτρων που θα οδηγήσουν στην επίτευξη της “καλής οικολογικής κατάστασης” για όλα τα υδάτινα συστήματα εντός προκαθορισμένου χρονικού ορίζοντα.

1.3 Βιοποικιλότητα – Δείκτες Βιοποικιλότητας

Ως βιοποικιλότητα ή βιολογική ποικιλότητα ορίζεται η ποικιλομορφία της ζωής σε όλες τις εκφάνσεις της βιολογικής οργάνωσης στη γη. Στις 5 Ιουνίου του 1992, στη διάσκεψη κορυφής των Ηνωμένων Εθνών Convention on Biological Diversity (CBD) επιτεύχθηκε μια συμφωνία ορόσημο για το τι ορίζεται ως «βιολογική ποικιλότητα» ή «βιοποικιλότητα» (Gaston & Spicer, 2008):

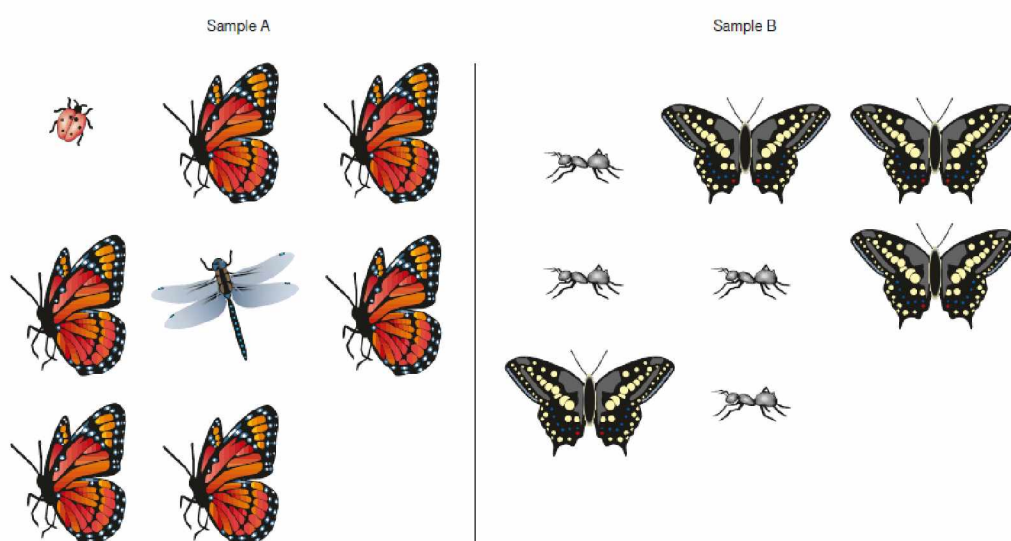
«Η ποικιλομορφία που εμφανίζεται σε όλα τα είδη των ζωντανών οργανισμών που εντοπίζονται μεταξύ των άλλων στα χερσαία, θαλάσσια και διάφορα άλλα υδάτινα οικοσυστήματα καθώς και στα οικολογικά συμπλέγματα που συγκροτούνται από τους οργανισμούς αυτούς. Ο ορισμός αυτός περιλαμβάνει την ποικιλότητα μέσα σε ένα είδος, μεταξύ διαφορετικών ειδών και μεταξύ των οικοσυστημάτων»

Η έννοια της βιοποικιλότητας περιλαμβάνει αρκετές ακόμα παραμέτρους από αυτές που εμπεριέχονται στον ορισμό της CBD. Το γεγονός αυτό, καθιστά τη μέτρησή της δύσκολη καθώς και υποκειμενική ανάλογα με τα ιδανικά και τις

αξίες του εκάστοτε ερευνητή. Οι πιο συνήθεις μέθοδοι για τη μέτρηση της βιοποικιλότητας είναι ο πλούτος των ειδών (*species richness*) και η ομοιομορφία (*evenness*), η αφθονία (*abundance*) και η σχετική αφθονία (*relative abundance*).

- **Species Richness:** Ο αριθμός των διαφορετικών ειδών που βρίσκονται μέσα σε μια οικολογική κοινότητα (Βερεσόγλου, 2010).
- **Species Evenness:** Περιγράφει τη σχετική αφθονία των διαφορετικών ειδών σε μια περιοχή (Mulder et al., 2004).
- **Species Abundance:** Ο αριθμός των ατόμων σε ένα πληθυσμό (Preston, 1948)
- **Species Relative Abundance:** Είναι η ομοιόμορφη κατανομή των ατόμων μεταξύ των ειδών σε μια οικολογική κοινότητα. Δυο περιοχές μπορεί να είναι πλούσιες σε είδη αλλά να διαφέρουν στη σχετική αφθονία.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1.1) παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ του αριθμού των διαφορετικών ειδών και της ομοιογένειας ενός πληθυσμού.



Εικόνα 1.1 Το δείγμα A μπορεί να περιγραφεί ως πιο ποικιλόμορφο σε σχέση με το δείγμα B (*species richness*). Στο δείγμα B, όμως, υπάρχουν λιγότερες πιθανότητες να επιλεγθούν τυχαία δυο άτομα που να ανήκουν στο ίδιο είδος (*evenness*) (Purvis & Hector, 2000).

Η κατανόηση του γιατί υπάρχουν τόσα πολλά ή τόσο λίγα είδη, σε όλο το εύρος της κλίμακας, από μια τοπική κοινότητα έως τη βιόσφαιρα, αποτελεί ένα από τα κύρια σημεία της οικολογίας (Loreau, 2000). Η συνολική ποικιλότητα σε μια

ορισμένη περιοχή μπορεί να μοιραστεί σε δυο κατηγορίες: την τοπική (ενδοκοινοτική), δηλαδή την α-ποικιλότητα και εκείνη μεταξύ των κοινοτήτων (δια-κοινοτική) την β-ποικιλότητα (Whittaker, 1972). Συνεπώς:

- **alpha-diversity** (*α-diversity*) είναι η ποικιλότητα μέσα σε μια δεδομένη περιοχή ή οικοσύστημα, που συνήθως εκφράζεται με τον αριθμό των ειδών στη συγκεκριμένη περιοχή.
- **beta-diversity** (*β-diversity*) είναι η σύγκριση των ειδών μεταξύ οικοσυστημάτων, η οποία συνήθως μετράτε ως η ποσότητα των ειδών που αλλάζουν στο οικοσύστημα.
- **gamma-diversity** (*γ-diversity*) είναι το σύνολο των ειδών που απαντώνται σε μια μεγάλη περιοχή.

1.3.1 Επιπτώσεις των φραγμάτων και των αναβαθμίδων στην βιοποικιλότητα

Τα φράγματα έχουν σημαντικό ρόλο στην κάλυψη των ανθρώπινων αναγκών. Χρησιμοποιούνται για την παραγωγή υδροηλεκτρικής ενέργειας, για άρδευση, για τη μείωση της μέγιστης εκροής υδάτων που δημιουργούνται από μεγάλες καταιγίδες ή έντονη τήξη του χιονιού ή για την αύξηση του βάθους του νερού σε ένα ποτάμι προκειμένου να βελτιωθεί η ναυσιπλοΐα και πληθώρα άλλων πλεονεκτημάτων. Παρά τα πολλά πλεονεκτήματα που παρέχουν τα φράγματα, αποτελούν ένα ιδιαίτερο πρόβλημα για τα οικοσυστήματα και έχουν σημαντικές επιπτώσεις στις βιολογικές, χημικές και φυσικές ιδιότητες των ποταμών (Davidson et al., 2001).

Η κατασκευή φραγμάτων μπορεί να επηρεάσει το βένθος με την αλλαγή της ροής, της θερμοκρασίας, της ποιότητας νερού, του υποστρώματος και τη διαθεσιμότητα της τροφής με κύρια επιρροή στα μακροασπόνδυλα, τα περίφυτα (βενθικά φύκη που αποτελούν βασικά θεμέλια για πολλά τροφικά πλέγματα) (Palacio, 2015) και τα μαλάκια (Chen et al., 2015). Μελέτες που επικεντρώνονται στα βενθικά μακροασπόνδυλα συμπέραναν ότι οι τοποθεσίες δειγματοληψίας αμέσως μετά τα φράγματα χαρακτηρίζονται από μικρότερη βιοποικιλότητα σε σχέση με τις ανεπηρέαστες τοποθεσίες ανάντη ή τοποθεσίες πιο απομακρυσμένες των κατάντη περιοχών, όπου οι επιπτώσεις του

φράγματος εξασθενούν (Camargo et al., 2005; Vaikasas et al., 2013). Η επίδραση στα μακροασπόνδυλα είναι ένα από τα κύρια σημεία στον τομέα της έρευνας για τις επιπτώσεις των φραγμάτων στη βιοποικιλότητα, με τις περισσότερες μελέτες να εστιάζουν στο ότι η κατασκευή φραγμάτων προκάλεσε αύξηση της βιομάζας και μείωση του πλούτου των ειδών στις κατάντη περιοχές (Hairpeng et al., 2019). Ορισμένα taxa αυξάνονται σε αφθονία καθώς μειώνεται η ροή, ενώ είδη που σχετίζονται με ταχύτερες ροές μειώνονται αισθητά (Wright, 1992). Οι επιπτώσεις της διαχείρισης των υδάτων (π.χ. φράγματα ή ρύθμιση ροής) είναι συνήθως καταστροφικές για τους περισσότερους ποταμούς μειώνοντας τη φυσική μεταβλητότητα του ποταμού (Vallania et al., 2007).

Ένα ενδιαφέρον γεωμορφολογικό χαρακτηριστικό των ποταμών αποτελούν οι αναβαθμίδες. Οι αναβαθμίδες είναι ένας μορφολογικός σχηματισμός που δημιουργείται από απότομη διακοπή μιας σχεδόν επίπεδης επιφάνειας (Βουβαλίδης, 2011). Οι ποτάμιες αναβαθμίδες αυτές που βρίσκονται ψηλότερα είναι παλαιότερες ενώ οι νεότερες βρίσκονται χαμηλότερα. Ο σχηματισμός τους όμως μπορεί να γίνει σταδιακά από τις κατάντη προς τα ανάντη περιοχές αλλά και αντίστροφα. Οι αναβαθμίδες διακρίνονται σε απόθεσης και διάβρωσης και αναπτύσσονται ως αποτέλεσμα της εναλλασσόμενης πρόσχωσης ή της σταθεροποίησης και της καταβύθισης (Vandenberghe, 2014).

1.4 Βενθικά μακροασπόνδυλα για την οικολογική εκτίμηση υδάτων

Στα βενθικά μακροασπόνδυλα ανήκουν μικρά υδρόβια ζώα καθώς και τα υδρόβια προνυμφικά στάδια εντόμων. Όσον αφορά την ανατομία τους, στερούνται σπονδυλικής στήλης, είναι ορατά χωρίς τη βοήθεια μικροσκοπίου και βρίσκονται μέσα και γύρω από υδάτινα σώματα κατά τη διάρκεια μιας περιόδου της ζωής τους. Βρίσκονται συχνά προσαρτημένα σε βράχια, βλάστηση, κορμούς ή στην άμμο του πυθμένα και τα ιζήματα (Ochieng et al., 2019).

Τα βενθικά μακροασπόνδυλα χρησιμοποιούνται συνήθως ως δείκτες της βιολογικής κατάστασης των υδάτινων σωμάτων (Andrade et al., 2020) λόγω της σχετικά μεγάλης ευαισθησίας τους σε μολυσματικούς παράγοντες (Kiffney

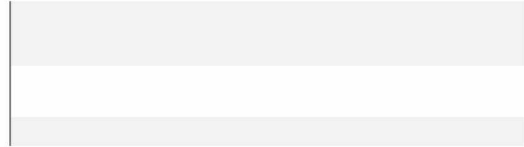
& Clements, 1994) και έχουν ποικίλες οικολογικές λειτουργίες συμμετέχοντας σε πληθώρα βιολογικών αλληλεπιδράσεων (Gerino et al., 2003). Είναι αξιόπιστοι βιολογικοί δείκτες επειδή περνούν όλο ή το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους στο νερό, συλλέγονται εύκολα και διαφέρουν ως προς την ανοχή τους στις διάφορες μορφές ρύπανσης. Είναι σχετικά εύκολο να αναγνωριστούν, συχνά ζουν για περισσότερο από ένα χρόνο και έχουν περιορισμένη κινητικότητα. Επίσης, έχουν την ικανότητα να ενσωματώνουν τις επιδράσεις των στρεσογόνων παραγόντων στους οποίους εκτίθενται, σε συνδυασμό με την πάροδο του χρόνου (Bressel et al., 2006).

Η αξιολόγηση της αφθονίας και της ποικιλότητας των βενθικών μακροασπόνδυλων σε ένα υδάτινο οικοσύστημα μας δίνει μια ένδειξη για τη βιολογική κατάσταση του. Γενικά, τα υδάτινα οικοσυστήματα υποστηρίζουν μια μεγάλη ποικιλία και υψηλό αριθμό μακροασπόνδυλων, συμπεριλαμβανομένων πολλών που έχουν ευαισθησία σε διάφορες μορφές ρύπανσης. Αντιθέτως, οικοσυστήματα που αποτελούνται μόνο από είδη ανθεκτικά στη ρύπανση ή πολύ μικρή ποικιλότητα ή αφθονία μπορεί να υποδηλώνουν ένα λιγότερο υγιές υδάτινο σώμα (Xu et al., 2013). Η βιολογική κατάσταση δείχνει την υγεία των υδάτινων οικοσυστημάτων και συνήθως, όταν αυτή είναι υγιής τότε τα φυσικοχημικά συστατικά τείνουν να είναι σε καλή κατάσταση. Ο Πίνακας 2.1 που ακολουθεί, περιγράφει συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των βενθικών μακροασπόνδυλων ως δείκτες για την αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων.

Πίνακας 1.1: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης βενθικών μακροασπόνδυλων για την αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων (Κάντζαρης, 2003)

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<ul style="list-style-type: none"> • Ευαισθησία και γρήγορη αντίδραση σε ρυπογόνους παράγοντες • Εύκολη συλλογή και αναγνώριση σε σχέση με μικροοργανισμούς και πλαγκτόν • Μειωμένη κινητικότητα • Καταγραφή ποιότητας περιβάλλοντος 	<ul style="list-style-type: none"> • Δυσκολία ποσοτικής δειγματοληψίας • Μερικά μακροασπόνδυλα μπορεί να μη συλλεχθούν λόγω εποχικότητας του κύκλου ζωής • Ποικίλοι παράγοντες για τον καθορισμό των βενθικών βιοκοινοτήτων (υπόστρωμα, ροή, διαλυμένο O₂ κ.α.)

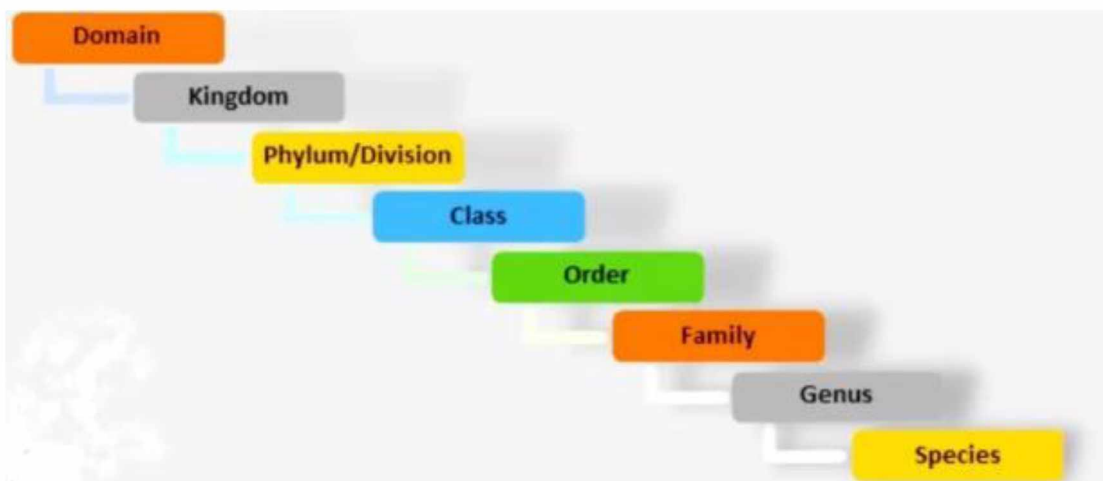
- Μεγάλη ετερογένεια
- Αναπτυγμένες μεθοδολογίες δειγματοληψίας



1.5 Κλασική ταξινόμηση και μοριακές τεχνικές

Η κλασική ταξινόμηση εξακολουθεί να είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος ταξινόμησης, αναγνώρισης και ονομασίας οργανισμών, η οποία βασίζεται στις μορφολογικές δομές (Arguelles & Martinez-Goss, 2020). Η κλασική μέθοδος αναγνώρισης των οργανισμών είναι απλή και εύκολη και έχει σχετικά μικρό κόστος, αν και είναι επιρρεπής σε υποκειμενικά λάθη.

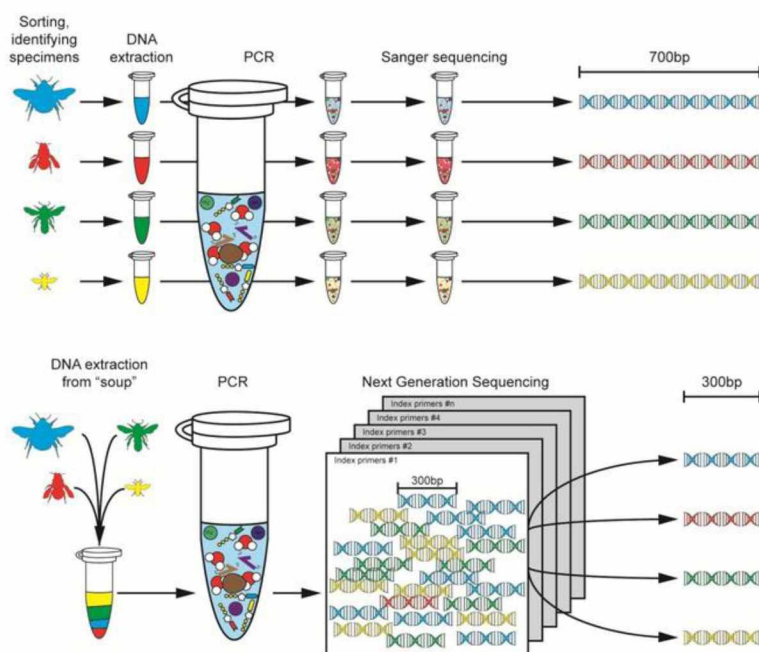
Η κλασική μέθοδος χρησιμοποιεί την ιεραρχική ταξινόμηση (Εικόνα 1.2) ως μέσο για την κατανόηση και οργάνωση της ποικιλομορφίας των οργανισμών. Μέσω αυτής της ιεραρχίας εξετάζεται ο τρόπος με τον οποίο οι οργανισμοί σχετίζονται μεταξύ τους μορφολογικά. Αυτό σημαίνει, ότι δίνει έμφαση στη μορφολογία και στη δομή των οργανισμών, με αποτέλεσμα την σύγκριση των κοινών μορφολογικών χαρακτηριστικών που έχουν οι οργανισμοί μιας ομάδας. Δηλαδή, όσο περισσότερα κοινά χαρακτηριστικά έχουν τόσο πιο κοντινή συγγένεια έχουν.



Εικόνα 1.2: Κλασικό σύστημα ταξινόμησης (Saxena, 2021)

Αντίθετα, οι μοριακές τεχνικές (DNA barcoding και DNA meta-barcoding) μπορούν να προσφέρουν μια πιο αναλυτική εικόνα στην αναγνώριση ειδών.

DNA barcoding είναι η διαδικασία αναγνώρισης ειδών χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους γενετικούς δείκτες (Melania, 2014). Το DNA metabarcoding είναι μέθοδος αναγνώρισης πολλαπλών taxa ταυτόχρονα που βρίσκονται στο ίδιο δείγμα. Η βασική διαφορά μεταξύ αυτών των προσεγγίσεων είναι ότι το metabarcoding δεν στοχεύει σε ένα συγκεκριμένο οργανισμό αλλά στο σύνολο των οργανισμών που υπάρχει σε ένα δείγμα (Εικόνα 1.3).

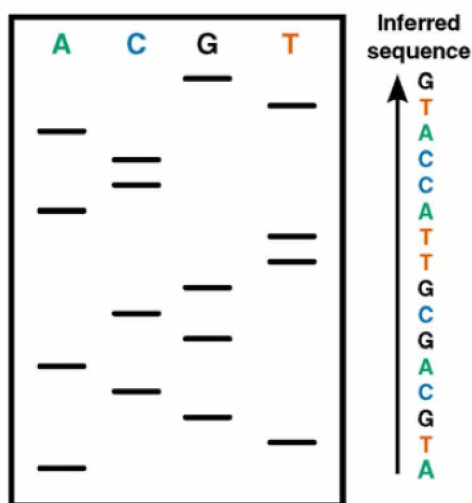


Εικόνα 1.3: Σύγκριση μεταξύ των προσεγγίσεων DNA barcoding και DNA metabarcoding (Gill, 2016)

Οι γενετικοί δείκτες είναι ένα μικρό τμήμα του γονιδιώματος (αλληλουχία-δείκτης) που παρουσιάζεται σε ένα ευρύ φάσμα ειδών. Για τα περισσότερα ζώα, αυτός ο δείκτης είναι ένα τμήμα της αλληλουχίας του μιτοχονδριακού γονιδίου *COI*. Το *COI* (cytochrome c oxidase subunit 1) είναι ένα τμήμα του μιτοχονδριακού DNA αποτελούμενο από 658 ζεύγη βάσεων και χρησιμοποιείται ως παγκόσμιος δείκτης για την ταυτοποίηση ειδών οποιασδήποτε ταξινομικής βαθμίδας (taxon) στο βασίλειο των ζώων (Pentinsaari et al., 2016). Αντίστοιχα, χρησιμοποιείται για τα βακτήρια το 16s rRNA (Gruzke et al., 2019), για τα φυτά το *rbcL* (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase gene) συνδυασμένο με το *matK* (maturase gene), ενώ για τους

μύκητες χρησιμοποιείται το *ITS* (nuclear internal transcribed spacer) του ριβοσωμικού DNA (Ratnasingham & Paul, 2007).

Οι πρωταρχικές προσπάθειες για την αλληλούχηση στόχευαν στους πιο εύκολα διαθέσιμους πληθυσμούς αποτελούμενοι εξ' ολοκλήρου από RNA είδη, όπως το μικροβιακό rRNA ή το tRNA, ή σε γονιδιώματα μονόκλωνων RNA των βακτηριοφάγων (Heather & Chain, 2016). Η σημαντική ανακάλυψη η οποία άλλαξε την πορεία της τεχνολογίας αλληλούχησης του DNA ήρθε το 1977 με την ανάπτυξη της αλληλούχησης κατά Sanger. Η τεχνική αυτή βασίζεται στα διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs) για την αντίδραση πολυμερισμού του DNA. Τα ddNTPs μόλις προσδεθούν στο πρότυπο DNA θα σταματήσουν την αλληλούχηση. Έτσι θα προκύψουν τμήματα DNA, τα οποία μπορούν τοποθετηθούν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου και να ξεκινήσει η διαδικασία αναγνώρισης της αλληλουχίας (Εικόνα 1.4). Η τεχνική αλληλούχησης κατά Sanger χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα, δεδομένου ότι η τεχνολογία έχει κάνει σημαντικά βήματα (Schuster, 2015).



Εικόνα 1.4: Αλληλούχηση κατά Sanger (Heather & Chain, 2015).

Με την πάροδο του χρόνου και την εξέλιξη της τεχνολογίας στις τεχνικές αλληλούχησης, έγινε δυνατή η αναγνώριση και ταυτοποίηση πολλών οργανισμών ταυτόχρονα (NGS, Next Generation Sequencing). Βασικό χαρακτηριστικό των τεχνικών NGS, που πήραν το προβάδισμα έναντι των τεχνικών πρώτης γενιάς, είναι αποτέλεσμα των εξελιγμένων συστημάτων ανίχνευσης και της μείωσης του χρόνου για τον προσδιορισμό των

αλληλουχιών (Guzvic, 2013). Ο όρος NGS δεν αναφέρεται σε μια μόνο τεχνική, αλλά σε μια συλλογή τεχνολογιών που αναπτύχθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες (Muzzey et al., 2015). Η πρώτη NGS που δημιουργήθηκε ήταν η πλατφόρμα 454 της Roche με μέσο όριο ανάγνωσης ζευγών βάσεων (bp) ~400 και ποσοστό σφάλματος 1%. Μια άλλη πλατφόρμα, που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο στην αλληλούχηση, είναι η Illumina με μέσο όριο ανάγνωσης ~300 bp, ποσοστό σφάλματος 0,1% και ο συνολικός αριθμός παραγόμενων αναγνώσεων να είναι μερικά εκατομμύρια (Gliberto et al., 2020). Η SOLiD, αποτελεί μια ακόμη πλατφόρμα, η οποία έχει μέσο όρο ανάγνωσης 40-70 bp και ποσοστό σφάλματος ~0,1% με συνολικό αριθμό αναγνώσεων μερικά δισεκατομμύρια bp (Solieri et al., 2013).

Σύμφωνα με τους Kchouk et al. (2017) τα βασικά χαρακτηριστικά των NGS τεχνικών αλληλούχησης είναι τα εξής:

- Η παράλληλη παραγωγή πολλών εκατομμυρίων μικρών τμημάτων νουκλεϊκού οξέος
- Η ταχύτητα της διαδικασίας αλληλούχησης
- Το κόστος (εξαρτάται από τη μέθοδο και τη στρατηγική της αλληλούχησης)
- Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης ανιχνεύονται/εντοπίζονται χωρίς ηλεκτροφόρηση (συστήματα τα οποία ψηφιοποιούν τα αποτελέσματα της μεθόδου αλληλούχησης).

1.6 Σκοπός

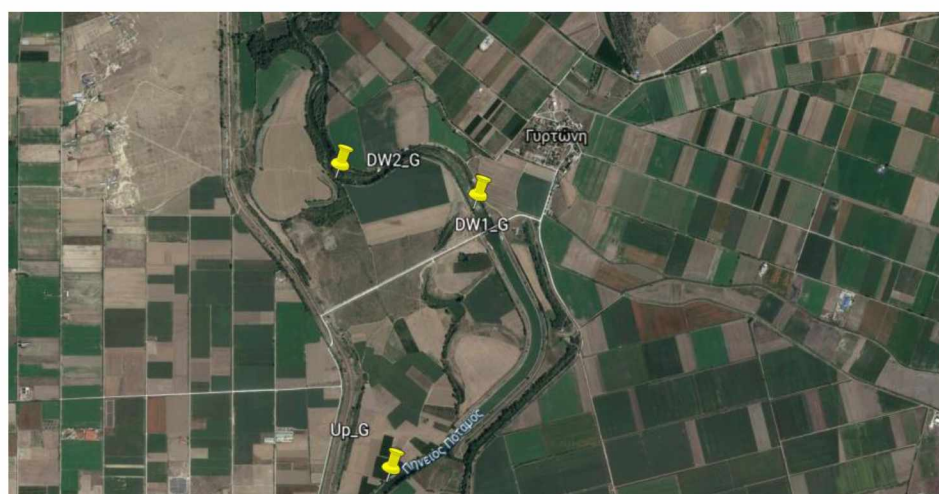
Όπως προαναφέρθηκε, η Ευρωπαϊκή Οδηγία για την επίτευξη και διατήρηση καλής οικολογικής κατάστασης όλων των επιφανειακών υδάτων απαιτεί την εφαρμογή ενός συστήματος συνεχούς παρακολούθησης μιας σειράς παραμέτρων συμπεριλαμβανομένης της βιοποικιλότητας των βενθικών μακροασπόνδυλων. Οι δείκτες βιοποικιλότητας, χρησιμοποιώντας τις κλασικές μεθόδους, υπολογίζονται μετά από δειγματοληψία και επίπονη, μακρόχρονη ταξινόμηση των οργανισμών που συλλέγονται. Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο ενός τέτοιου προγράμματος παρακολούθησης και στοχεύει στην εφαρμογή μοριακών τεχνικών για την ταξινόμηση βενθικών

μακροασπόνδυλων, με σκοπό τη σύγκριση των μεθόδων (κλασική/μοριακή) και την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης των υδάτων του Πηνειού.

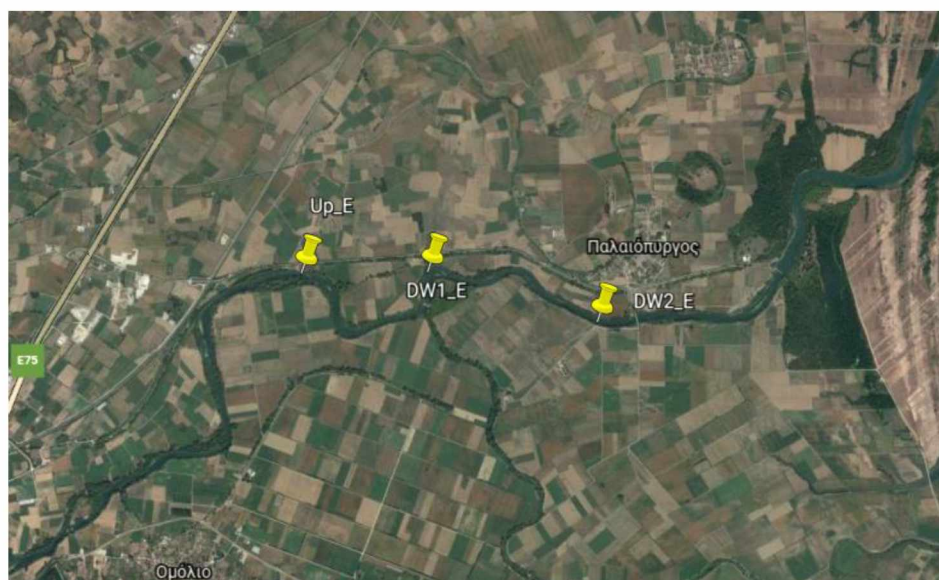
2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία έλαβε χώρα στις 13 και 14 Απριλίου του 2021. Τα δείγματα ελήφθησαν από δυο διαφορετικά σημεία του Πηνειού. Το πρώτο σημείο δειγματοληψίας εντοπίζεται στη Γυρτώνη (Εικόνα 2.1) και το δεύτερο στο Ομόλιο (Εικόνα 2.2). Από την κάθε περιοχή συλλέχθηκαν τρία δείγματα. Και στις δυο περιοχές η δειγματοληψία έγινε συλλέγοντας δυο δείγματα από την κατάντη μεριά κι ένα από την ανάντη μεριά του φράγματος.



Εικόνα 2.1: Σημείο δειγματοληψίας Γυρτώνης. Up_G: Γυρτώνη Ανάντη. DW1_G και DW2_G: Γυρτώνη 1 και 2 Κατάντη.



Εικόνα 2.2: Σημείο δειγματοληψίας Ομόλιου. Up_E: Ομόλιο Ανάντη. DW1_E & DW2_E: Ομόλιο 1 και 2 Κατάντη

Η μέθοδος που εφαρμόζεται για τη συλλογή των βενθικών μακροασπόνδυλων είναι ημιοσοτική. Ο χρόνος που απαιτείται σε κάθε σημείο δειγματοληψίας είναι τρία λεπτά λάκτισμα-σάρωση (3-minute kick/sweep) κι ένα λεπτό σάρωσης της παρόχθιας βλάστησης, εάν υπάρχει (Wright et al., 2000). Το σχήμα της απόχης είναι σε μορφή D, άνοιγμα ματιού 0,09 cm, επιφάνεια ανοίγματος 591,7 cm², βάθος 28,7 cm και κοντάρι ύψους 1,50m. Μετά τη συλλογή, το δείγμα για την μακροσκοπική ανάλυση τοποθετείται σε πλαστικό μπουκάλι και προστίθεται διάλυμα αιθανόλης 75%. Μέσα στο πλαστικό μπουκάλι τοποθετείται επίσης ριζόχαρτο στο οποίο είναι γραμμένα με μολύβι τα στοιχεία του σημείου δειγματοληψίας. Για τη μοριακή ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το 1/5 της ποσότητας που συλλέχθηκε και το οποίο αποθηκεύτηκε σε αποστειρωμένα μπουκάλια. Μετά την ολοκλήρωση της δειγματοληψίας, τα αποστειρωμένα μπουκάλια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας όπου τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια τύπου falcon και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

Σε κάθε σημείο δειγματοληψίας έγινε παράλληλα και η μέτρηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των σημείων δειγματοληψίας.

	Γυρτώνη Ανάντη	Γυρτώνη 1 Κατάντη	Γυρτώνη 2 Κατάντη	Ομόλιο Ανάντη	Ομόλιο 1 Κατάντη	Ομόλιο 2 Κατάντη
DO (mg/l)	8,07	7,98	8,04	8,46	7,8	7,68
DO (%)	81,4	80,7	81,6	86,7	77,7	77,2
pH	7,96	7,9	7,89	7,56	7,59	7,49
T (°C)	16,1	15,8	16,1	16,5	15,2	15,4
BOD ₅ (mg/l)	-	-	-	-	-	-
Compensated Con. (μS/cm)	574	578	574	601	603	600
Uncompensated Con. (μS/cm)	474,4	474,7	474,4	503,0	491,0	497,0
Salinity (ppt)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
TDS (mg/ml)	373,5	375,7	373,5	390,3	392,0	391,3

DO: διαλυμένο οξυγόνο, BOD: βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο, TDS: ολικά διαλυμένα στερεά.

2.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το υπό εξέταση δείγμα αποτελείται από ένα σύνολο αβιοτικών στοιχείων και οργανισμών λόγω της φύσης της μεθόδου δειγματοληψίας. Επίσης, η αντιπροσώπευση των οργανισμών στον συνολικό όγκο του αρχικού δείγματος δεν είναι ομοιογενής (σύνολο βιομάζας στο δείγμα, αριθμός ατόμων, μέγεθος ατόμων). Για να διασφαλιστεί η καλύτερη αντιπροσώπευση του συνόλου των οργανισμών στο δείγμα προτού προχωρήσουμε στο στάδιο της απομόνωσης DNA ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα. Αρχικά, μακρο-οργανισμοί (εύκολα αντιληπτοί με γυμνό μάτι) απομακρύνθηκαν από το δείγμα και αποθηκεύτηκαν σε σωληνάκια τύπου Eppendorf. Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε ομογενοποιητής για να γίνει όσο το δυνατόν καλύτερη ανάμειξη του δείγματος. Το βήμα αυτό είναι σημαντικό, διότι όσο καλύτερα θα ομογενοποιηθεί το δείγμα τόσο καλύτερη αντιπροσώπευση θα υπάρξει κατά τη διαδικασία της απομόνωσης DNA. Στην συνέχεια το ομογενοποίημα κονιορτοποιήθηκε με την χρήση υγρού αζώτου έτσι ώστε 1) να μειωθεί το ποσοστό υγρασίας του δείγματος, 2) να επιτευχθεί ακόμα καλύτερη αντιπροσώπευση των οργανισμών στον όγκο του δείγματος και 3) το δείγμα να είναι πιο εύχρηστο κατά τους χειρισμούς στο στάδιο της απομόνωσης DNA.

2.3 Απομόνωση DNA

Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν και εφαρμόστηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα κατά τη διαδικασία της απομόνωσης DNA, ώστε να εξασφαλιστεί η καλύτερη δυνατή ποιότητα του απομονωμένου DNA λαμβάνοντας υπόψη τις φυσικοχημικές ιδιαιτερότητες του δείγματος. Η δοκιμή των πρωτοκόλλων έγινε στο δείγμα που συλλέχθηκε από το σταθμό Ομόλιο 2 κατάνη (S5). Στο τέλος αφού προσδιορίστηκε το βέλτιστο πρωτόκολλο απομόνωσης, κάθε δείγμα απομονώθηκε εις τριπλούν για να υπάρξει καλύτερη αντιπροσώπευση.

Το πρώτο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν με τη μέθοδο χαστροπικών αλάτων (Aljanabi & Martinez, 1997). Τα βήματα του πρωτοκόλλου αυτού είναι τα εξής:

- Προσθήκη σε αποστειρωμένα σωληνάκια τύπου Eppendorf των 2 ml ομογενοποιημένου δείγματος (0.1 g, 0.1g και 0.2g)
- Προσθήκη 400 µl Salt Homogenizing Buffer (0,4 M NaCl, 10mM tris-HCl pH 8, 2mM EDTA)
- Προσθήκη 40 µl SDS 20%, 8 µl Proteinase K 20 mg/ml και vortex
- Επώαση στους 56 °C για 1 h ή overnight
- Προσθήκη 300 µl 6M NaCl και vortex
- Φυγοκέντρηση για 30 min στις 10000 στροφές
- Λήψη του υπερκείμενου, τοποθέτηση σε καινούριο σωληνάκι τύπου Eppendorf των 2 ml, προσθήκη 100% ισοπροπανόλη και vortex
- Αποθήκευση στους -20 °C για 1 h ή overnight
- Φυγοκέντρηση για 20 min στις 10000 στροφές
- Προσθήκη 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση για 3 min σε μέγιστη ταχύτητα 14000 στροφές

Το δεύτερο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε έγινε με τη χρήση του PureLink Genomic DNA extraction mini-kit (Cat no.: K1820-02, Invitrogen). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο του συγκεκριμένου kit είναι τα προτεινόμενα από τον κατασκευαστή.

Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε το DNeasy PowerSoil Pro kit (Cat no.: 47014, Qiagen) για την εξαγωγή του DNA σύμφωνα με τον κατασκευαστή.

2.4 PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

Η PCR είναι μια *in vitro* τεχνική πολλαπλασιασμού ενός ορισμένου τμήματος DNA. Η τεχνική βασίζεται στην αντιγραφή δίκλωνου DNA (genomic DNA ή cDNA) και κάθε κύκλος διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε θερμοκρασία 95°C (denaturation), τον υβριδισμό εκκινητών με το αποδιαταγμένο DNA (annealing) και την επιμήκυνση των εκκινητών, όπου δημιουργείται η συμπληρωματική αλυσίδα (extension) (Mullis et al., 1983; Kadri, 2019).

Μετά την απομόνωση DNA ξεκίνησε η διαδικασία της PCR. Για την διαδικασία της PCR χρειάστηκε ποσότητα 2 μ l δείγματος απομονωμένου DNA και προετοιμασία του Master Mix σε τελικό όγκο $V_{\text{τελ}}=25$ μ l (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2: Αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις τους που χρησιμοποιήθηκαν για το Master Mix

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις	Συγκεντρώσεις
	Αρχικές	Τελικές
Buffer 10x	10x (15 mM MgCl ₂)	1x
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM
dNTPs 10x	10 mM	1x
Forward Primer	100 pmol/ μ l	4 pmol/ μ l
Reverse Primer	100 pmol/ μ l	4 pmol/ μ l
Taq Polymerase	5 units/ μ l	1 unit

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR και ενισχύουν το γονίδιο COI, είναι οι εξής:

- fwHf2 → GGDACWGGWTGAACWGTWTAYCCHCC (Forward)
(Vamos et al., 2017)
- EPTDr2n → CAAACAAATARDGGTATTCGDTY (Reverse)
(Leese et al., 2020)

Το πρωτόκολλο της PCR περιλαμβάνει 5 min στους 95 °C για την αποδιάταξη, 30 κύκλους για 30 s στους 95 °C, 90 s στους 50 °C και 2 min στους 72 °C (Leese et al., 2020).

2.5 Ποσοτικοποίηση DNA και ηλεκτροφόρηση

Η φωτομέτρηση έγινε σε φασματοφωτόμετρο της Quawell (Q5000). Η ανάδειξη των αποτελεσμάτων για το απομονωμένο DNA έγινε σε πηκτή αγαρόζης 1%. Αρχικά, παρασκευάστηκε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1% (0,45 g αγαρόζη σε 50 ml Tris-Borate-EDTA). Στη συνέχεια θερμάνθηκε ώστε να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Έπειτα, προστέθηκαν 4 μ l χρωστικής Xpert Green και η πηκτή αγαρόζης τοποθετήθηκε στο καλούπι για να πολυμεριστεί. Αντίστοιχη

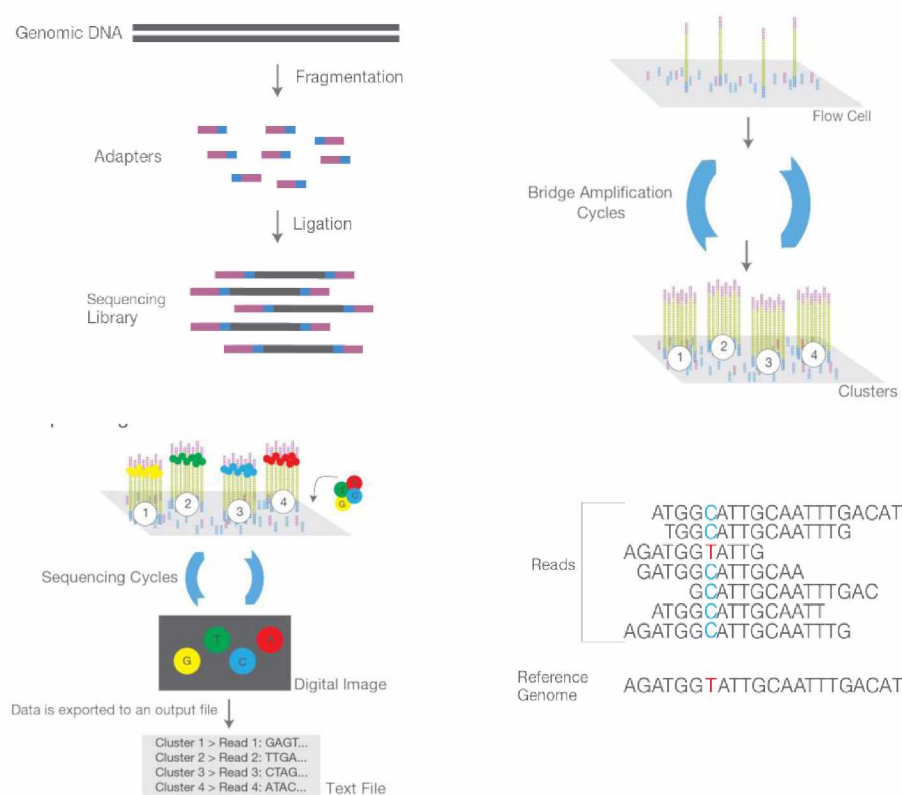
διαδικασία έγινε και για την πηκτική αгарόζης συγκέντρωσης 2% της PCR (0.9 g αгарόζη σε 50 ml Tris-Borate-EDTA).

Με το πέρας της διαδικασίας της απομόνωσης του DNA δημιουργήθηκε ένα συγκεντρωτικό δείγμα (pool) των τριπλότυπων απομονώσεων των δειγμάτων και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση.

2.6 COI metabarcoding

Η αλληλούχηση του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *COI* στα δείγματα έγινε μέσω της μεθόδου bridge amplification (Illumina Seq. Overview, 2013) στην πλατφόρμα MiSeq της Illumina, η οποία έχει τέσσερα βασικά βήματα (Illumina Inc., 2017) (Εικόνα 2.3):

- Προετοιμασία βιβλιοθηκών (Library Preparation)
- Δημιουργία κλώνων DNA (Cluster Generation)
- Αλληλούχηση (Sequencing)
- Ανάλυση δεδομένων (Data Analysis)



Εικόνα 2.3: Τα τέσσερα βασικά βήματα της Illumina NGS. Πάνω αριστερά: Προετοιμασία βιβλιοθηκών. Πάνω δεξιά: Δημιουργία συμπλέγματος. Κάτω αριστερά: Αλληλούχηση. Κάτω δεξιά: Ανάλυση δεδομένων (Illumina Inc., 2017).

Στα δείγματα εφαρμόστηκε η μέθοδος αλληλούχησης paired-end (150 bp) (Εικόνα 2.4). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την αλληλούχηση και των δυο άκρων ενός τμήματος DNA και δημιουργεί υψηλότερης ποιότητας δεδομένα.

Paired-End Reads



Εικόνα 2.4: Η paired-end επιτρέπει την αλληλούχηση και των δύο άκρων του τμήματος DNA (Illumina Inc., 2017)

2.7 Βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση του USEARCH

The image shows two screenshots of the USEARCH website. The top screenshot displays the main homepage with statistics like '15,575 papers' and '61,387 users'. A red box highlights 'UPARSE OTU clustering' in the navigation menu. The bottom screenshot shows the 'UPARSE OTU clustering' page, where a red box highlights 'Read preparation' in the 'Example pipelines with test data' section. Below this, a table titled 'Read preparation' lists various steps for OTU/denoising pipelines.

Step	Description
Understand your reads	Investigate your data, don't just copy and follow an example script!
Demultiplex	Assign reads to samples using index reads or barcodes
Merge pairs	Merge paired reads to get consensus sequences and Q scores
Strip primers	Primer-binding sequence should be removed before quality filtering
Orient	If you have reads on both strands, orient before trimming and finding uniques
Strip machine sequences	Remove machine-specific sequences e.g. TCAG for 454
Length trimming	Remove low-quality tails, make sure 3' ends align
Quality filtering	Making OTUs (but not the OTU table) needs high-quality reads
Pool samples	Reads for all samples should be combined
Dereplication	Identify unique sequences and abundances
Discard singletons	Remove low-abundance reads, which often have errors

Εικόνα 2.5: USEARCH και οι εντολές που ακολουθήθηκαν για την βιοπληροφορική ανάλυση.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο USEARCH (Εικόνα 2.5) (<https://drive5.com/usearch/>) το οποίο ενσωματώνει ένα μεγάλο σύνολο αλγορίθμων για την επεξεργασία και ανάλυση αποτελεσμάτων που προκύπτουν από αλληλούχηση νέας γενιάς. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

1. Ένωση των αναγνωσμένων αλληλουχιών (Merge paired reads)

Πραγματοποιείται η συγχώνευση των αναγνώσεων (reads) και από τις δυο κατευθύνσεις (paired-end reads) και δημιουργούνται συνεκτικές αλληλουχίες με συνεκτικές βαθμολογίες ποιότητας.

2. Φιλτράρισμα των αναγνωσμένων αλληλουχιών (Quality filtering)

Σε αυτό το στάδιο απομακρύνονται αλληλουχίες κακής ποιότητας. Στην παρούσα ανάλυση οι αλληλουχίες που απορρίφθηκαν είχαν Phred quality score < 20 και μήκος < 100 βάσεις.

3. Μετατροπή των αρχείων FASTQ σε FASTA

4. Dereplication

Αποτελεί αναγκαίο βήμα πριν την ομαδοποίηση σε Operational Taxonomic Units (OTUs). Οι αλληλουχίες πρέπει να είναι ένα σύνολο μοναδικών αλληλουχιών με τους σχολιασμούς μεγέθους (αριθμό αλληλουχιών που αντιπροσωπεύουν) στις ετικέτες.

5. Ταξινόμηση των αλληλουχιών με βάση την αφθονία και απαλοιφή των αλληλουχιών που εμφανίζονται μόνο μια φορά.

6. Δημιουργία OTUs και αφαίρεση χιμαιρικών αλληλουχιών (Generate OTUs & Remove chimeras)

Οι χιμαιρικές αλληλουχίες είναι αποτέλεσμα συνδυασμού δύο ή περισσότερων αλληλουχιών κατά το στάδιο επέκτασης της PCR.

7. Ανάθεση των OTUs σε ταξινομικές βαθμίδες.

Πραγματοποιήθηκε BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) των αλληλουχιών για κάθε ένα από τα OTUs στην βάση δεδομένων NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Η ταξινόμηση για το κάθε OTU προέκυψε από την πρώτη αλληλουχία που ανακτήθηκε από το BLAST λαμβάνοντας υπόψη το E value και το ποσοστό ομοιότητας.

8. Υπολογισμός α , β -diversity

Ο υπολογισμός της α -diversity έγινε μέσω των ειδών που παρατηρήθηκαν σε κάθε σταθμό δειγματοληψίας, ενώ η β -diversity υπολογίζοντας τις διαφορές (αποστάσεις) των σταθμών (δείκτης Jaccard).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

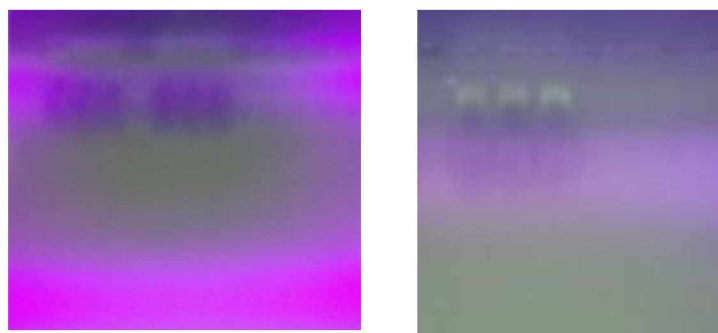
3.1 Βελτιστοποίηση και επιλογή πρωτοκόλλου απομόνωσης DNA

Για τις δοκιμές των πρωτοκόλλων απομόνωσης χρησιμοποιήθηκε το δείγμα (S5). Ο λόγος καθαρότητας και οι συγκεντρώσεις DNA αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα φωτομέτρησης από τη δοκιμή των πρωτοκόλλων χαοτροπικών αλάτων, PureLink Genomic DNA kit και DNeasy PowerSoil kit

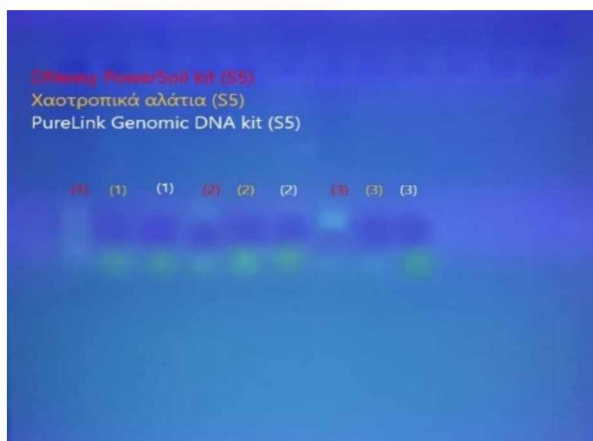
Δείγμα	Πρωτόκολλο	Δείγμα	260/280	ng/ul
(S5)	Χαοτροπικά αλάτια	S5 (1)	1,18	247,7
		S5 (2)	1,13	278,3
		S5 (3)	1,17	310,9
	Purelink Genomic DNA kit	S5 (1)	1,53	266,1
		S5 (2)	1,63	100,5
		S5 (3)	1,46	310,9
	Dneasy PowerSoil kit	S5 (1)	1,68	11,1
		S5 (2)	1,80	13,9
		S5 (3)	1,69	19,9

Στην Εικόνα 3.1 φαίνονται οι ηλεκτροφορήσεις του απομονωμένου DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.



Εικόνα 3.1: Αριστερά φαίνονται τα πρωτόκολλα χαοτροπικών αλάτων και PureLink Genomic kit. Δεξιά η απομόνωση με το πρωτόκολλο του DNeasy PowerSoil kit.

Τα πρωτόκολλα των χαοτροπικών αλάτων και το Purelink Genomic kit δεν είχαν κάποιο αποτέλεσμα, όπως φαίνεται στις παραπάνω εικόνες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το PowerSoil kit, το οποίο είναι εξειδικευμένο για δείγματα εδάφους. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR που πραγματοποιήθηκε φαίνεται στην εικόνα (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αραρόζης 2%.

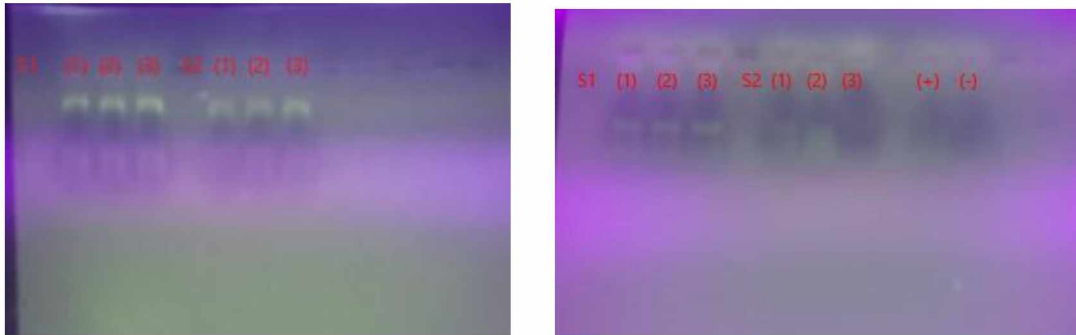
3.2 Απομόνωση DNA, ποιοτικός-ποσοτικός προσδιορισμός και PCR στα δείγματα υπό μελέτη

Για την απομόνωση του DNA επιλέχθηκε το DNeasy PowerSoil kit (Quiagen). Στον Πίνακα 3.2 αναγράφονται οι λόγοι καθαρότητας και οι συγκεντρώσεις DNA στις τριπλές απομονώσεις που έγιναν για κάθε δείγμα.

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα της φωτομέτρησης απομονωμένου DNA

Δείγμα	Δείγμα	260/280	ng/ul
(S1)	S1 (1)	1,75	184,1
	S1 (2)	1,80	147,9
	S1 (3)	1,69	169,9
(S2)	S2 (1)	1,72	39,3
	S2 (2)	1,73	39,3
	S2 (3)	1,77	42,0
(S3)	S3 (1)	1,55	14,5
	S3 (2)	1,57	20,1
	S3 (3)	1,63	17,3
(S4)	S4 (1)	1,72	61,2
	S4 (2)	1,78	47,3
	S4 (3)	1,80	51,4
(S5)	S5 (1)	1,68	11,1
	S5 (2)	1,80	13,9
	S5 (3)	1,69	19,9
(S6)	S6 (1)	1,70	69,1
	S6 (2)	1,73	76,3
	S6 (3)	1,76	69,3

Τα αποτελέσματα του PowerSoil kit σε πηκτή αραρόζης φαίνονται στην Εικόνα 3.3.



Εικόνα 3.3: Επιτυχημένη απομόνωση DNA σε πηκτή αгарόζης 1% (αριστερά) και PCR σε πηκτή αгарόζης 2% (δεξιά) στο δείγμα S1.

3.3 Κλασική ταξινόμηση

Η ταξινόμηση με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Εργαστηρίου Υδρολογίας και Υδραυλικών Έργων (Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης τους συνοψίζονται στον Πίνακα 3.3 και δόθηκαν σε εμάς ώστε να πραγματοποιηθούν οι συγκρίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων. Παρουσιάζονται τα taxa (ταξινομικές βαθμίδες) και ο αριθμός των ατόμων ανά taxa που εντοπίστηκαν σε κάθε σταθμό. Οι ταξινομικές βαθμίδες φτάνουν σε επίπεδο τάξης, υποκλάσης και οικογένειας.

Πίνακας 3.3: Taxa που βρέθηκαν σύμφωνα με την κλασική μέθοδο

Taxa	Γυρτώνη 1 κατάντη	Γυρτώνη 2 κατάντη	Γυρτώνη 3 ανάτη	Ομόλιο 1 κατάντη	Ομόλιο 2 κατάντη	Ομόλιο 3 ανάτη
<i>Aphididae</i>	0	0	1	0	4	0
<i>Asellidae</i>	0	0	4	0	0	0
<i>Atyidae</i>	0	0	0	2	3	3
<i>Baetidae</i>	2	0	0	3	0	1
<i>Branchiura sowerbyi</i>	1	0	1	0	0	0
<i>Caenidae</i>	3	0	75	0	3	7
<i>Calopterygidae</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Ceratopogonidae</i>	2	0	0	0	2	2
<i>Chironomidae</i>	78	12	67	3	10	138
<i>Chironomus plumosus</i>	10	0	0	0	0	1
<i>Collembola</i>	0	0	36	0	0	0
<i>Corixidae</i>	0	0	0	1	1	1
<i>Curculionidae</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Dytiscidae (ad)</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Ecnomidae</i>	0	1	0	0	0	0

<i>Elmidae (lv)</i>	0	0	0	0	0	2
<i>Empididae</i>	0	0	0	0	0	0
Empty shells (<i>Viviparidae</i>)	0	0	0	0	0	3
Empty shells (<i>Hydrobiidae</i>)	0	0	0	1	0	0
Empty shells (<i>Neritidae</i>)	0	0	0	0	0	3
Empty shells (<i>Valvatidae</i>)	0	0	0	1	0	1
<i>Ephemerellidae</i>	0	0	0	2	4	14
<i>Ephemeridae</i>	0	0	0	0	0	2
<i>Erpobdellidae</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Gammaridae</i>	0	0	0	8	19	22
<i>Gerridae</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Gomphidae</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Heptageniidae</i>	1	0	3	0	1	0
<i>Leptoceridae</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Neritidae</i>	0	0	0	2	0	2
<i>Oligochaeta</i>	3	14	145	37	102	76
<i>Platycnemididae</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Potamanthidae</i>	0	0	6	0	4	8
<i>Pupae</i>	1	2	11	0	0	5

3.4 Μοριακή ταξινόμηση

Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μοριακής μεθόδου, όπου αναγράφεται ο αριθμός των αναγνωσμένων αλληλουχιών. Τα taxa φτάνουν σε επίπεδο οικογένειας, γένους και είδους. Υπάρχουν περιπτώσεις, όπου παρατηρούνται χαμηλός αριθμός αλληλουχιών.

Πίνακας 3.4: Taxa που βρέθηκαν σύμφωνα με τη μοριακή μέθοδο

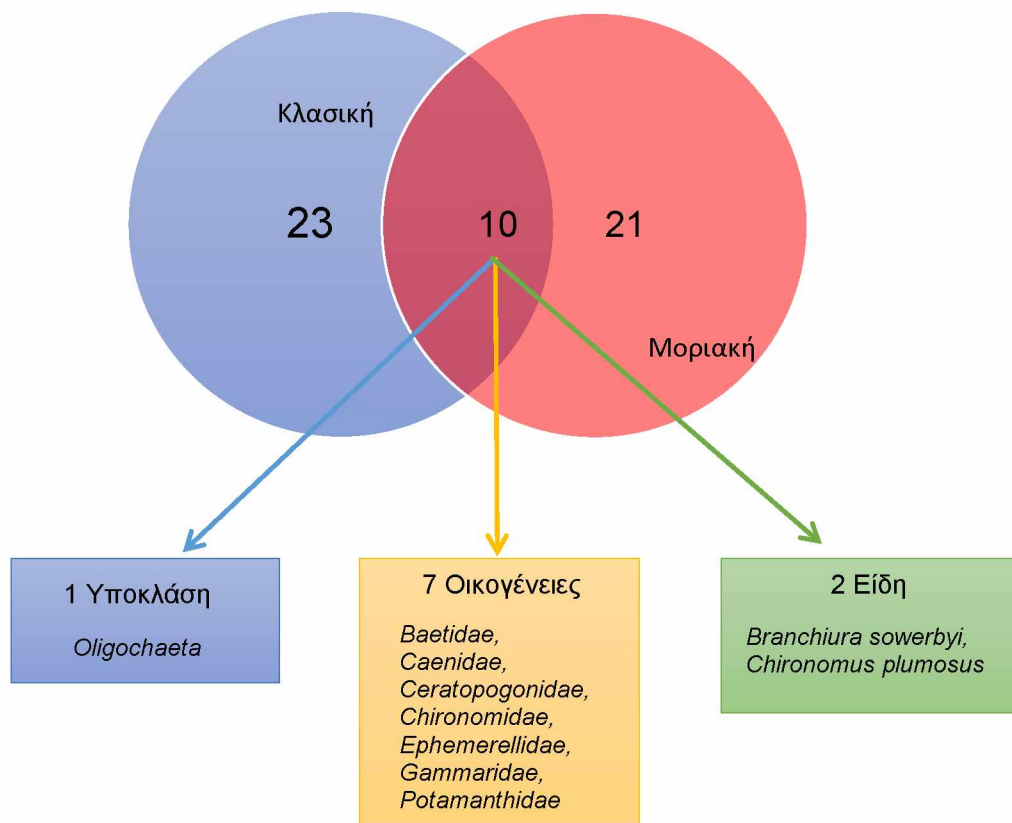
Taxa	Γυριτώνη 1 κατάντη	Γυριτώνη 2 κατάντη	Γυριτώνη 3 ανάντη	Ομόλοιο 1 κατάντη	Ομόλοιο 2 κατάντη	Ομόλοιο 3 ανάντη
<i>Agraylea multipunctata</i>	0	61	0	456	1958	357
<i>Agrilus arcuatus</i>	2	0	0	0	2	0
<i>Alotanypus venustus</i>	0	178	1059	0	0	0
<i>Anomala luculenta</i>	0	0	0	2	0	0
<i>Baetis fuscatus</i>	0	53	552	24	0	0
<i>Baetis nexus</i>	2344	0	0	0	0	0
<i>Baetis rhodani</i>	0	0	2	0	0	0
<i>Bombyliidae sp.</i>	0	12	0	1403	1404	308
<i>Bothrioneurum vej dovskyanum</i>	0	0	0	2	0	0
<i>Branchiura sowerbyi</i>	0	403	9667	603	2227	826

<i>Caenis macrura</i>	578	2	626	0	0	0
<i>Ceratopogonidae sp.</i>	0	7	51	0	0	0
<i>Chironomidae sp.</i>	572	920	1377	0	0	0
<i>Chironomus annularius</i>	305	0	0	0	0	0
<i>Chironomus bernensis</i>	3452	14	0	0	0	0
<i>Chironomus entis</i>	312	0	0	0	0	0
<i>Chironomus plumosus</i>	357	259	0	0	0	0
<i>Chironomus sp.</i>	3970	12	0	0	0	0
<i>Chironomus tentans</i>	0	2	0	0	0	0
<i>Chrysops aestuans</i>	0	0	0	0	47	13
<i>Chrysops caecutiens</i>	0	0	0	0	78	33
<i>Cricotopus sp.</i>	0	0	2	0	0	2
<i>Cladotanytarsus mancus</i>	0	0	26	12	4	8
<i>Cricotopus bicinctus</i>	0	0	46	0	48	0
<i>Cricotopus rufiventris</i>	0	2973	75	0	1230	314
<i>Cricotopus sp.</i>	28061	6869	914	2	5035	1357
<i>Cricotopus sylvestris</i>	73	10378	0	0	69	45
<i>Cricotopus triannulatus</i>	0	0	35	0	140	57
<i>Culicoides longipennis</i>	6	0	0	6	16	0
<i>Dero digitata</i>	10	14	0	0	0	0
<i>Dicrotendipes nervosus</i>	0	0	37	0	0	0
<i>Discocerina obscurella</i>	1167	0	0	0	0	0
<i>Discocerina sp.</i>	1792	0	0	0	0	0
<i>Empididae sp.</i>	0	0	129	0	0	0
<i>Ephydriidae sp</i>	0	4	151	0	0	0
<i>Gammarus roeselii</i>	0	0	0	0	6	0
<i>Hemerodromia sp</i>	0	0	6	0	0	0
<i>Ilythea spilota</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Kazimierzus phumlani</i>	0	0	0	0	2	0
<i>Limnodrilus claparedianus</i>	0	0	0	0	2	2
<i>Limnodrilus sp.</i>	0	76	0	2564	1047	258
<i>Marionina sp.</i>	0	0	0	9	18	0
<i>Metaphire acincta</i>	0	0	0	3	0	0
<i>Metaphire houlleti</i>	0	0	0	594	480	90
<i>Micronecta griseola</i>	2	11	0	14	0	0
<i>Nais bretscheri</i>	0	4	0	0	0	0
<i>Nais communis</i>	10	80	0	2	20	7
<i>Nais elinguis</i>	0	0	0	0	0	2
<i>Nais stolci</i>	0	69	13	4	2	2
<i>Nanocladius anderseni</i>	0	0	0	0	32	18
<i>Nephrotoma sp.</i>	0	468	2133	0	0	0
<i>Ochthebius dilatatus</i>	0	0	0	8	0	0
<i>Ophidonais serpentina</i>	0	0	0	74	0	0
<i>Orthoclaadiinae sp.</i>	36	0	14	0	11	18
<i>Orthoclaadius carlatus</i>	0	44	365	0	0	0
<i>Orthoclaadius rivicola</i>	0	0	40	0	0	0
<i>Orthoclaadius sp</i>	0	0	2	0	0	0

<i>Parachironomus sp</i>	0	2	0	0	0	0
<i>Parametriocnemus sp</i>	0	12	92	0	0	0
<i>Paratanytarsus dissimilis</i>	273	0	5	0	281	39
<i>Paratrachocladus rufiventris</i>	3	178	280	0	271	107
<i>Peleteria iterans</i>	0	0	4	0	0	0
<i>Phoridae sp.</i>	0	0	0	4	0	0
<i>Polypedilum cf.</i>	22	612	0	4555	0	0
<i>Polypedilum cf. pedestre</i>	9	363	0	3033	0	0
<i>Polypedilum nubeculosum</i>	294	2155	0	0	0	0
<i>Polypedilum pedestre</i>	81	5599	27	16400	0	0
<i>Polypedilum scalaenum</i>	115	2	0	66	0	0
<i>Polypedilum sp.</i>	0	0	0	0	100	10
<i>Potamanthus luteus</i>	0	734	4622	0	336	0
<i>Potamothenix alatus paravanicus</i>	0	0	0	2	2	0
<i>Procladius crassinervis</i>	1056	0	0	0	289	378
<i>Ptiolina majuscula</i>	0	9	0	1003	812	196
<i>Scatophila cribrata</i>	0	11	0	22	0	0
<i>Serratella ignita</i>	0	0	0	0	2	0
<i>Tipula oleracea</i>	0	0	0	0	217	32
<i>Trachyopella nuda</i>	0	0	0	8	26	18
<i>Tubifex sp.</i>	0	8	0	0	0	0
<i>Tubificinae sp.</i>	42	66	0	50	49	4

3.5 Σύγκριση κλασικής και μοριακής μεθόδου

Οι δυο μέθοδοι φτάνουν σε διαφορετικό επίπεδο ταξινομικής κατάταξης. Για το λόγο αυτό τα μοριακά δεδομένα παρουσιάζονται αναφορικά με την κλασική μέθοδο, η οποία φτάνει σε μικρότερη ταξινομική βαθμίδα από αυτή του είδους στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, ώστε να είναι δυνατές οι συγκρίσεις. Στο διάγραμμα 3.1 παρουσιάζονται κοινά taxa που βρέθηκαν με τις δυο μεθόδους.



Διάγραμμα 3.1: Διάγραμμα Venn για τη σύγκριση κλασικής και μοριακής μεθόδου. Σε πίνακες απεικονίζονται τα κοινά taxa των δύο μεθόδων.

Αναλύοντας το διάγραμμα Venn (Διάγραμμα 3.1), βρέθηκαν 10 κοινά taxa, 23 ήταν ειδικά στην κλασική μέθοδο και 21 βρέθηκαν μόνο στη μοριακή μέθοδο. Αναλυτικότερα, σε επίπεδο οικογένειας, βρέθηκε ότι στην οικογένεια *Chironomidae* αντιστοιχήθηκαν 32 taxa που βρέθηκαν με την μοριακή μέθοδο, στην οικογένεια *Baetidae* 3 taxa, στην οικογένεια *Ceratopogonidae* 2 taxa ενώ στις οικογένειες *Caenidae*, *Ephemerellidae*, *Gammaridae* και *Potamanthidae* από 1 taxon (Πίνακες 3.5, 3.6).

Πίνακας 3.5: Taxa που βρέθηκαν σύμφωνα με τη μοριακή τεχνική και ανήκουν στην οικογένεια των *Chironomidae*

Taxa (Κλασική μέθοδος)	Taxa (Μοριακή μέθοδος)
<i>Chironomidae</i>	<i>Alotanypus venustus</i> <i>Nanocladius anderseni</i>
	<i>Chironomidae sp.</i> <i>Orthoclaadiinae sp.</i>
	<i>Chironomus annularius</i> <i>Orthoclaadius carlatus</i>
	<i>Chironomus bernensis</i> <i>Orthoclaadius rivicola</i>
	<i>Chironomus entis</i> <i>Orthoclaadius sp</i>
	<i>Chironomus plumosus</i> <i>Parachironomus sp</i>
	<i>Chironomus sp.</i> <i>Parametriocnemus sp</i>
	<i>Chironomus tentans</i> <i>Paratanytarsus dissimilis</i>
	<i>Circotopus sp.</i> <i>Paratrachoclaadius rufiventris</i>

<i>Cricotopus bicinctus</i>	<i>Polypedilum cf.</i>
<i>Cricotopus rufiventris</i>	<i>Polypedilum cf. pedestre</i>
<i>Cricotopus sp.</i>	<i>Polypedilum nubeculosum</i>
<i>Cricotopus sylvestris</i>	<i>Polypedilum pedestre</i>
<i>Cricotopus triannulatus</i>	<i>Polypedilum scalaenum</i>
<i>Cladotanytarsus mancus</i>	<i>Polypedilum sp.</i>
<i>Dicrotendipes nervosus</i>	<i>Procladius crassinervis</i>

Πίνακας 3.6: Ταχα που βρέθηκαν σύμφωνα με τη μοριακή τεχνική και ανήκουν στην οικογένεια των Baetidae, Ceratopogonidae, Ephemerellidae, Gammaridae και Potamanthidae

Ταχα (Κλασική μέθοδος)	Ταχα (Μοριακή μέθοδος)
<i>Baetidae</i>	<i>Baetis fuscatus</i>
	<i>Baetis nexus</i>
	<i>Baetis rhodani</i>
<i>Ceratopogonidae</i>	<i>Ceratopogonidae sp.</i>
	<i>Culicoides longipennis</i>
<i>Ephemerellidae</i>	<i>Serratella ignita</i>
<i>Gammaridae</i>	<i>Gammarus roeselii</i>
<i>Potamanthidae</i>	<i>Potamanthus luteus</i>

Στην υποκλάση των *Oligochaeta* αντιστοιχήθηκαν 17 taxa (Πίνακας 3.7).

Πίνακας 3.7: Ταχα που βρέθηκαν σύμφωνα με τη μοριακή τεχνική και ανήκουν υποκλάση των *Oligochaeta*

Ταχα (Κλασική μέθοδος)	Ταχα (Μοριακή μέθοδος)
<i>Oligochaeta</i>	<i>Bothrioneurum vej dovskyanum</i> <i>Ophidonais serpentina</i>
	<i>Branchiura sowerbyi</i> <i>Potamothenix alatus paravanicus</i>
	<i>Dero digitata</i> <i>Tubifex sp.</i>
	<i>Limnodrilus claparedianus</i> <i>Tubificinae sp.</i>
	<i>Limnodrilus sp.</i> <i>Metaphire acincta</i>
	<i>Nais bretscheri</i> <i>Metaphire houlleti</i>
	<i>Nais communis</i> <i>Marionina sp.</i>
	<i>Nais elinguis</i> <i>Kazimierzus phumlani</i>
	<i>Nais stolci</i>

Τέλος, βρέθηκαν κοινά σε επίπεδο είδους τα *Branchiura sowerbyi* και *Chironomus plumosus*.

Στα μοναδικά taxa της κλασικής μεθόδου, ανήκουν και αναπτυξιακά στάδια εντόμων (*Pupae*), που σχηματίζονται μετά το προνυμφικό στάδιο και

συμπεριλαμβάνουν και το μεταμορφωμένο ενήλικο (Courtney & Cranston, 2015). Επίσης παρατηρήθηκαν άδεια κελύφη σαλιγκαριών. Παράλληλα, με την μοριακή προσέγγιση βρέθηκαν 21 taxa τα οποία δεν εντοπίστηκαν με την κλασική ταξινόμηση.

3.6 Παρατηρούμενα γεωγραφικά μοτίβα

Τα 79 taxa που βρέθηκαν από την μοριακή μέθοδο δεν εμφανίζονται όλα και με το ίδιο ποσοστό reads σε κάθε σημείο δειγματοληψίας. Αντ' αυτού παρατηρήθηκαν ορισμένα μοτίβα τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.8).

Πίνακας 3.8: Παρατηρούμενα μοτίβα των Taxa της μοριακής μεθόδου

Μοτίβα	Γυρτώνη	Ομόλιο
Μικρό ποσοστό reads (από 3 και κάτω)	7	12
Taxa που εμφανίζονται σε ένα σημείο	16	14
Taxa που εμφανίζονται μόνο στο ανάντη	8	0
Taxa που εμφανίζονται μόνο στα κατάντη	10	2
Taxa που εμφανίζονται στο ανάντη και στο κατάντη 2	12	14
Taxa που εμφανίζονται στο ανάντη και στο κατάντη 1	3	0
Taxa που εμφανίζονται και στα τρία σημεία	3	8

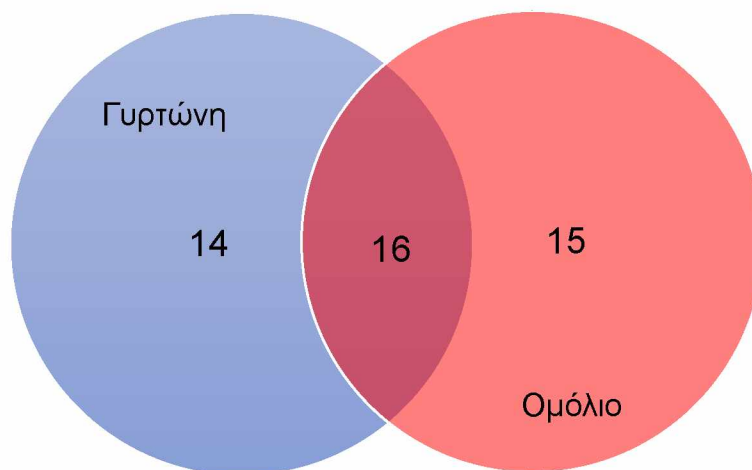
3.7 Σύγκριση μεταξύ περιοχών Γυρτώνης και Ομόλιου

Η σύγκριση μεταξύ των περιοχών έγινε στο ταξινομικό επίπεδο του γένους. Για τη σύγκριση τους δημιουργήθηκε πίνακας γενών (Πίνακας 3.9) και στη συνέχεια διάγραμμα Venn για την ανάδειξη των κοινών και μοναδικών γενών που βρέθηκαν σε κάθε περιοχή.

Πίνακας 3.9: Taxa στο ιεραρχικό επίπεδο γένους που βρέθηκαν στις δυο περιοχές

Γυρτώνη		Ομόλιο	
<i>Agraylea</i>	<i>Micronecta</i>	<i>Agraylea</i>	<i>Nais</i>
<i>Agrilus</i>	<i>Nais</i>	<i>Agrilus</i>	<i>Nanocladius</i>

<i>Alotanypus</i>	<i>Nephrotoma</i>	<i>Anomala</i>	<i>Ochthebius</i>
<i>Baetis</i>	<i>Orthocladius</i>	<i>Baetis</i>	<i>Ophidonais</i>
<i>Branchiura</i>	<i>Parachironomus</i>	<i>Bothrioneurum</i>	<i>Paratanytarsus</i>
<i>Caenis</i>	<i>Parametrioctenemus</i>	<i>Branchiura</i>	<i>Paratrachocladius</i>
<i>Chironomus</i>	<i>Paratanytarsus</i>	<i>Chrysops</i>	<i>Polypedilum</i>
<i>Cladotanytarsus</i>	<i>Paratrachocladius</i>	<i>Cladotanytarsus</i>	<i>Potamanthus</i>
<i>Cricotopus</i>	<i>Peleteria</i>	<i>Cricotopus</i>	<i>Potamothenix</i>
<i>Dero</i>	<i>Polypedilum</i>	<i>Culicoides</i>	<i>Procladius</i>
<i>Dicrotendipes</i>	<i>Potamanthus</i>	<i>Gammarus</i>	<i>Ptiolina</i>
<i>Discocerina</i>	<i>Procladius</i>	<i>Kazimierzus</i>	<i>Scatophila</i>
<i>Hemerodromia</i>	<i>Ptiolina</i>	<i>Limnodrilus</i>	<i>Serratella</i>
<i>Ilythea</i>	<i>Scatophila</i>	<i>Marionina</i>	<i>Tipula</i>
<i>Limnodrilus</i>	<i>Tubifex</i>	<i>Metaphire</i>	<i>Trachypella</i>
		<i>Micronecta</i>	



Διάγραμμα 3.2: Κοινά και διαφορετικά γένη που εντοπίστηκαν ανάμεσα στις δυο περιοχές. Η ενδιάμεση περιοχή εμφανίζει τον αριθμό των κοινών γενών που βρέθηκαν.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα Venn (Διάγραμμα 3.2) 16 γένη ήταν κοινά και στις δυο περιοχές (*Limnodrilus*, *Scatophila*, *Micronecta*, *Paratrachocladius*, *Nais*, *Potamanthus*, *Agrilus*, *Agraylea*, *Baetis*, *Polypedilum*, *Branchiura*, *Procladius*, *Cladotanytarsus*, *Paratanytarsus*, *Ptiolina*, *Cricotopus*), 14 γένη βρέθηκαν στη Γυρτώνη και όχι στο Ομόλιο (*Peleteria*, *Caenis*, *Parachironomus*, *Alotanypus*, *Ilythea*, *Dero*, *Parametrioctenemus*, *Chironomus*, *Dicrotendipes*, *Discocerina*, *Hemerodromia*, *Tubifex*, *Nephrotoma*, *Orthocladius*) Αντίστοιχα, 15 γένη βρέθηκαν στο Ομόλιο και όχι στη Γυρτώνη (*Culicoides*, *Potamothenix*, *Chrysops*, *Metaphire*, *Tipula*, *Bothrioneurum*,

Anomala, Nanocladius, Serratella, Trachyopella, Marionina, Ophidonais, Gammarus, Kazimierzus, Ochthebius).

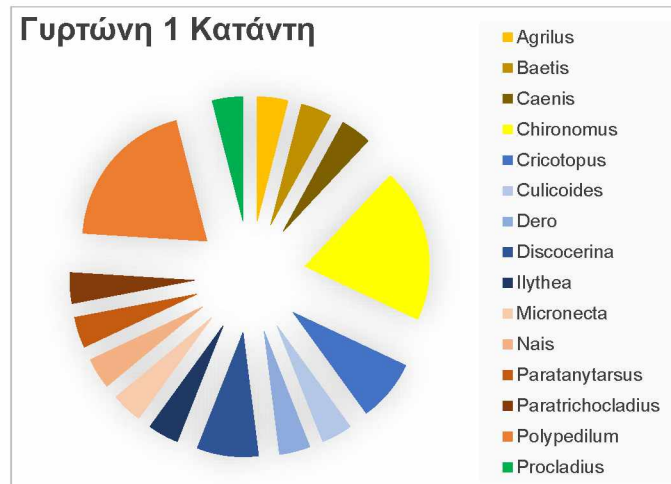
3.7.1 Σύγκριση σταθμών Γυρτώνης

Στον σταθμό Γυρτώνη 1 κατάντη βρέθηκαν 15 γένη, στον σταθμό Γυρτώνη 2 κατάντη 21 γένη και στον σταθμό Γυρτώνη 3 ανάντη 17 γένη, με τον αριθμό των ειδών που βρέθηκαν σε κάθε γένος, όπως αναγράφονται στον Πίνακα 3.10.

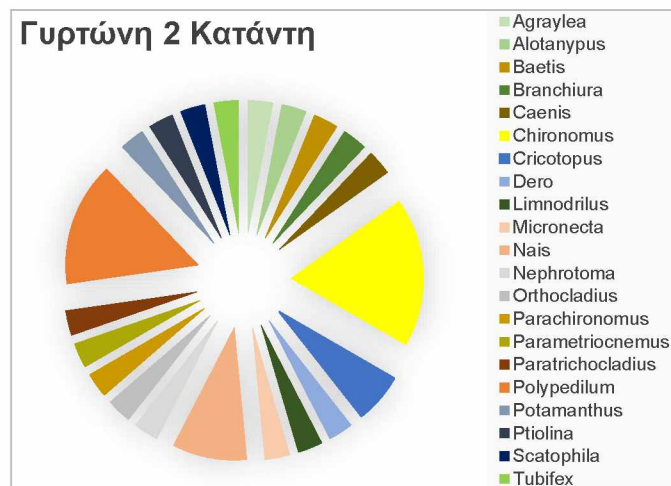
Πίνακας 3.10: Γένη που βρέθηκαν σε κάθε σταθμό της Γυρτώνης με τον αριθμό των ειδών που βρέθηκαν στο συγκεκριμένο γένος

Γυρτώνη 1 κατάντη	Αριθμός ειδών	Γυρτώνη 2 κατάντη	Αριθμός ειδών	Γυρτώνη 3 ανάντη	Αριθμός ειδών
<i>Agrilus</i>	1	<i>Agraylea</i>	1	<i>Alotanypus</i>	1
<i>Baetis</i>	1	<i>Alotanypus</i>	1	<i>Baetis</i>	2
<i>Caenis</i>	1	<i>Baetis</i>	1	<i>Branchiura</i>	1
<i>Chironomus</i>	5	<i>Branchiura</i>	1	<i>Caenis</i>	1
<i>Cricotopus</i>	2	<i>Caenis</i>	1	<i>Cladotanytarsus</i>	1
<i>Culicoides</i>	1	<i>Chironomus</i>	6	<i>Cricotopus</i>	5
<i>Dero</i>	1	<i>Cricotopus</i>	2	<i>Dicrotendipes</i>	1
<i>Discocerina</i>	2	<i>Dero</i>	1	<i>Hemerodromia</i>	1
<i>Ilythea</i>	1	<i>Limnodrilus</i>	1	<i>Nais</i>	1
<i>Micronecta</i>	1	<i>Micronecta</i>	1	<i>Nephrotoma</i>	1
<i>Nais</i>	1	<i>Nais</i>	3	<i>Orthocladius</i>	3
<i>Paratanytarsus</i>	1	<i>Nephrotoma</i>	1	<i>Parametriocnemus</i>	1
<i>Paratrachocladius</i>	1	<i>Orthocladius</i>	1	<i>Paratanytarsus</i>	1
<i>Polypedilum</i>	5	<i>Parachironomus</i>	1	<i>Paratrachocladius</i>	1
<i>Procladius</i>	1	<i>Parametriocnemus</i>	1	<i>Peleteria</i>	1
		<i>Paratrachocladius</i>	1	<i>Polypedilum</i>	1
		<i>Polypedilum</i>	5	<i>Potamanthus</i>	1
		<i>Potamanthus</i>	1		
		<i>Ptiolina</i>	1		
		<i>Scatophila</i>	1		
		<i>Tubifex</i>	1		

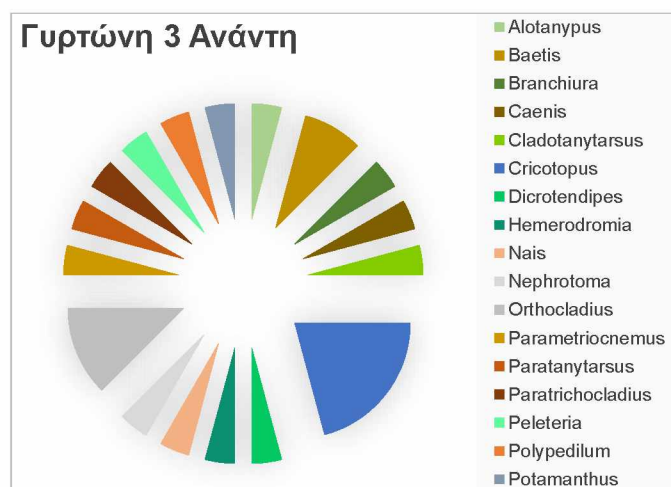
Δημιουργήθηκαν γραφήματα πίτες σύμφωνα με τον πίνακα 3.10 (Γραφήματα 3.1, 3.2, 3.3), όπου σε κάθε γένος αντιστοιχεί κι ένα χρώμα. Για τη σύγκριση των σταθμών της Γυρτώνης δημιουργήθηκε διάγραμμα Venn (Διάγραμμα 3.3).



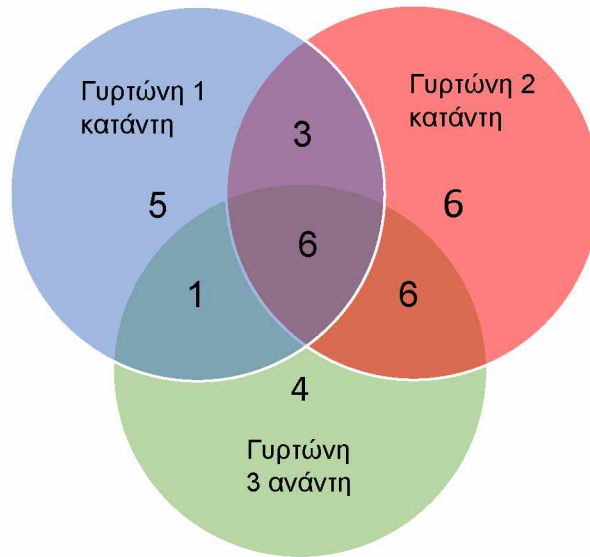
Γράφημα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση σε μορφή γραφήματος πίτας των γενών στο σταθμό Γυρτώνη 1 κατάντη.



Γράφημα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση σε μορφή γραφήματος πίτας των γενών στο σταθμό Γυρτώνη 2 κατάντη.



Γράφημα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση σε μορφή γραφήματος πίτας των γενών στο σταθμό Γυρτώνη 3 ανάντη.



Διάγραμμα 3.3: Σύγκριση των σταθμών Γυρτώνης σε επίπεδο γένους.

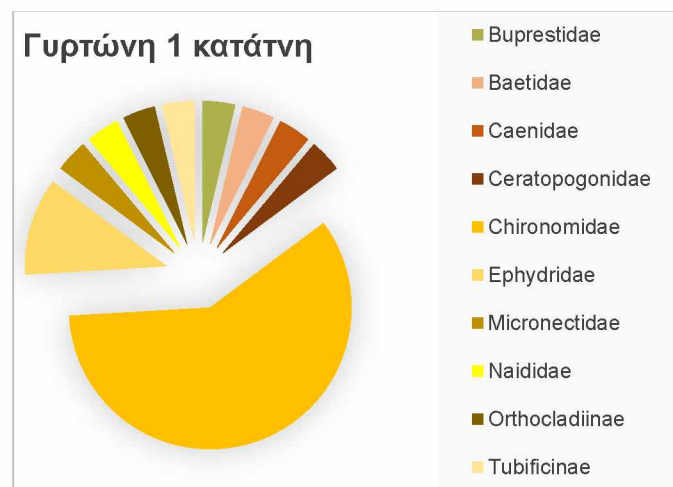
Αναλυτικότερα για το διάγραμμα Venn (Διάγραμμα 3.3), τα γένη *Cricotopus*, *Caenis*, *Paratrichocladius*, *Nais*, *Baetis* και *Polypedilum* είναι κοινά και για τους τρεις σταθμούς. Τα γένη *Micronecta*, *Dero* και *Chironomus* είναι κοινά μεταξύ των σταθμών Γυρτώνη 1 και 2 κατάντη. Το γένος *Paratanytarsus* είναι κοινό στους σταθμούς Γυρτώνη 1 κατάντη και Γυρτώνη 3 ανάντη. Τα γένη *Branchiura*, *Potamanthus*, *Nephrotoma*, *Alotanypus*, *Orthocladius* και *Parametriocnemus* είναι κοινά στους σταθμούς Γυρτώνη 2 κατάντη και Γυρτώνη 3 ανάντη. Τα γένη που βρέθηκαν στο σταθμό Γυρτώνη 1 κατάντη αλλά όχι στους άλλους δυο είναι τα *Culicoides*, *Discocerina*, *Procladius*, *Agrilus* και *Ilythea*. Αντίστοιχα για το σταθμό Γυρτώνη 2 κατάντη τα γένη *Limnodrilus*, *Scatophila*, *Ptiolina*, *Tubifex*, *Parachironomus* και *Agraylea* ενώ για τον σταθμό Γυρτώνη 3 ανάντη τα *Dicrotendipes*, *Peleteria*, *Cladotanytarsus* και *Hemerodromia*.

Αντίστοιχη διαδικασία έγινε και στο επίπεδο οικογένειας.

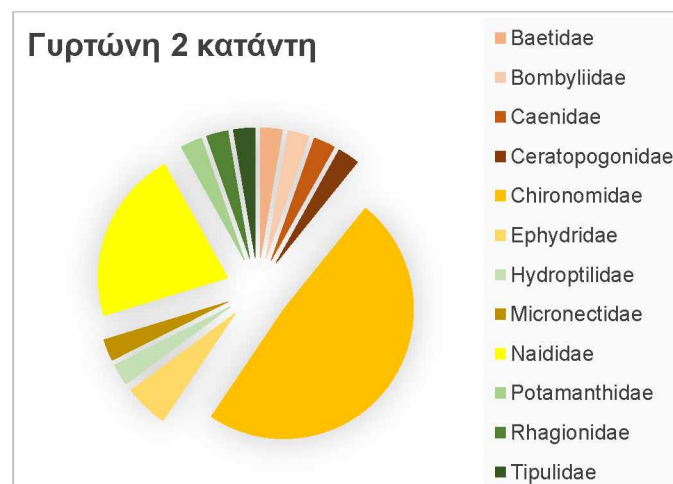
Πίνακας 3.11: Οικογένειες που βρέθηκαν σε κάθε σταθμό της Γυρτώνης με τον αριθμό των taxa της κάθε οικογένειας.

Γυρτώνη 1 κατάντη	Αριθμός taxa	Γυρτώνη 2 κατάντη	Αριθμός taxa	Γυρτώνη 3 ανάντη	Αριθμός taxa
<i>Buprestidae</i>	1	<i>Baetidae</i>	1	<i>Baetidae</i>	2
<i>Baetidae</i>	1	<i>Bombyliidae</i>	1	<i>Caenidae</i>	1
<i>Caenidae</i>	1	<i>Caenidae</i>	1	<i>Ceratopogonidae</i>	1

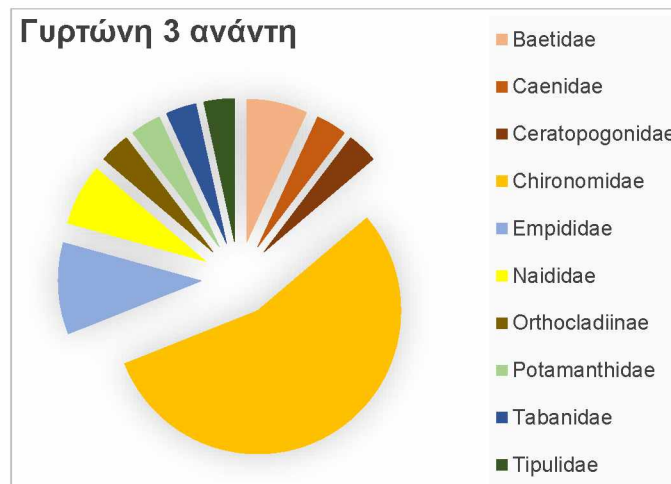
<i>Ceratopogonidae</i>	1	<i>Ceratopogonidae</i>	1	<i>Chironomidae</i>	16
<i>Chironomidae</i>	16	<i>Chironomidae</i>	18	<i>Empididae</i>	3
<i>Ephydriidae</i>	3	<i>Ephydriidae</i>	2	<i>Naididae</i>	2
<i>Micronectidae</i>	1	<i>Hydroptilidae</i>	1	<i>Orthoclaadiinae</i>	1
<i>Naididae</i>	1	<i>Micronectidae</i>	1	<i>Potamanthidae</i>	1
<i>Orthoclaadiinae</i>	1	<i>Naididae</i>	8	<i>Tabanidae</i>	1
<i>Tubificinae</i>	1	<i>Potamanthidae</i>	1	<i>Tipulidae</i>	1
		<i>Rhagionidae</i>	1		
		<i>Tipulidae</i>	1		



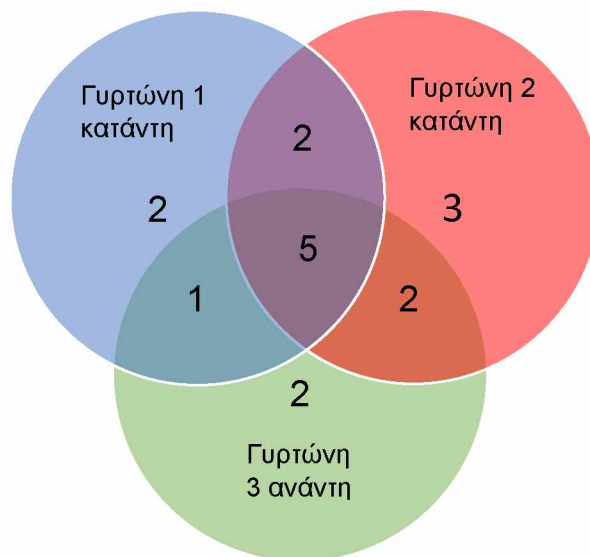
Γράφημα 3.4: Σχηματική αναπαράσταση σε μορφή γραφήματος πίτας των οικογενειών στο σταθμό Γυρτώνη 1 κατάντη.



Γράφημα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση σε μορφή γραφήματος πίτας των οικογενειών στο σταθμό Γυρτώνη 2 κατάντη.



Γράφημα 3.6: Σχηματική αναπαράσταση σε μορφή γραφήματος πίτας των οικογενειών στο σταθμό Γυρτώνη 3 ανάντη.



Διάγραμμα 3.4: Σύγκριση των σταθμών Γυρτώνης σε επίπεδο οικογένειας.

Αναλυτικότερα για το διάγραμμα Venn (Διάγραμμα 3.4), οι οικογένειες που βρέθηκαν και στους τρεις σταθμούς είναι οι *Caenidae*, *Naididae*, *Baetidae*, *Ceratopogonidae* και *Chironomidae*. Μεταξύ των σταθμών Γυρτώνη 1 και 2 κατάντη κοινές οικογένειες είναι οι *Micronectidae* και *Ephydriidae*. Για τους σταθμούς Γυρτώνη 1 κατάντη και Γυρτώνη 3 ανάντη μοναδική κοινή οικογένεια είναι η *Orthoclaadiinae*. Για τους σταθμούς Γυρτώνη 2 κατάντη και Γυρτώνη 3 ανάντη οι οικογένειες *Potamanthidae* και *Tipulidae*. Οι οικογένειες *Buprestidae* και *Tubificinae* συναντώνται μόνο στο σταθμό Γυρτώνη 1 κατάντη, οι

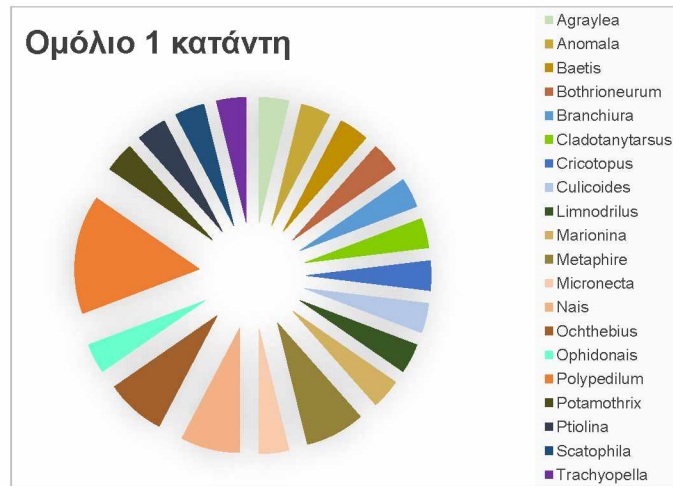
Rhagionidae Hydroptilidae και *Bombyliidae* μόνο στο σταθμό Γυρτώνη 2 κατάντη ενώ οι *Tabanidae* και *Empididae* μόνο στο σταθμό Γυρτώνη 3 ανάντη.

3.7.2 Σύγκριση σταθμών Ομόλιου

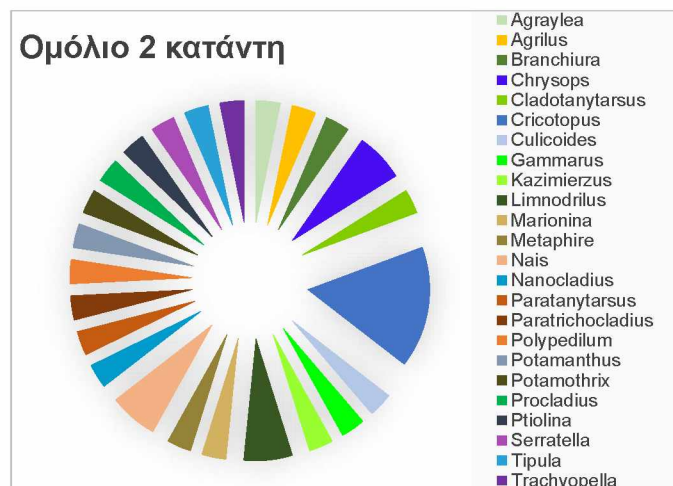
Στον σταθμό Ομόλιο 1 κατάντη βρέθηκαν 20 γένη, στον σταθμό Ομόλιο 2 κατάντη 24 γένη και στον σταθμό Ομόλιο 3 ανάντη 16 γένη, με τον αριθμό των ειδών που βρέθηκαν σε κάθε γένος, όπως αναγράφονται στον Πίνακα 3.12.

Πίνακας 3.12: Γένη που βρέθηκαν σε κάθε σταθμό του Ομόλιου με τον αριθμό των ειδών που βρέθηκαν στο συγκεκριμένο γένος.

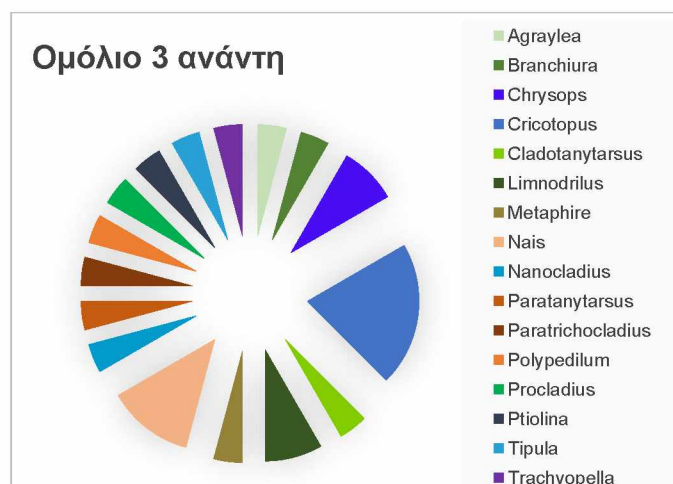
Ομόλιο 1 κατάντη	Αριθμός ειδών	Ομόλιο 2 κατάντη	Αριθμός ειδών	Ομόλιο 3 ανάντη	Αριθμός ειδών
<i>Agraylea</i>	1	<i>Agraylea</i>	1	<i>Agraylea</i>	1
<i>Anomala</i>	1	<i>Agrilus</i>	1	<i>Branchiura</i>	1
<i>Baetis</i>	1	<i>Branchiura</i>	1	<i>Chrysops</i>	2
<i>Bothrioneurum</i>	1	<i>Chrysops</i>	2	<i>Cricotopus</i>	5
<i>Branchiura</i>	1	<i>Cladotanytarsus</i>	1	<i>Cladotanytarsus</i>	1
<i>Cladotanytarsus</i>	1	<i>Cricotopus</i>	5	<i>Limnodrilus</i>	2
<i>Cricotopus</i>	1	<i>Culicoides</i>	1	<i>Metaphire</i>	1
<i>Culicoides</i>	1	<i>Gammarus</i>	1	<i>Nais</i>	3
<i>Limnodrilus</i>	1	<i>Kazimierzus</i>	1	<i>Nanocladius</i>	1
<i>Marionina</i>	1	<i>Limnodrilus</i>	2	<i>Paratanytarsus</i>	1
<i>Metaphire</i>	2	<i>Marionina</i>	1	<i>Paratrachocladus</i>	1
<i>Micronecta</i>	1	<i>Metaphire</i>	1	<i>Polypedilum</i>	1
<i>Nais</i>	2	<i>Nais</i>	2	<i>Procladius</i>	1
<i>Ochthebius</i>	2	<i>Nanocladius</i>	1	<i>Ptiolina</i>	1
<i>Ophidonais</i>	1	<i>Paratanytarsus</i>	1	<i>Tipula</i>	1
<i>Polypedilum</i>	4	<i>Paratrachocladus</i>	1	<i>Trachyopella</i>	1
<i>Potamothrix</i>	1	<i>Polypedilum</i>	1		
<i>Ptiolina</i>	1	<i>Potamanthus</i>	1		
<i>Scatophila</i>	1	<i>Potamothrix</i>	1		
<i>Trachyopella</i>	1	<i>Procladius</i>	1		
		<i>Ptiolina</i>	1		
		<i>Serratella</i>	1		
		<i>Tipula</i>	1		
		<i>Trachyopella</i>	1		



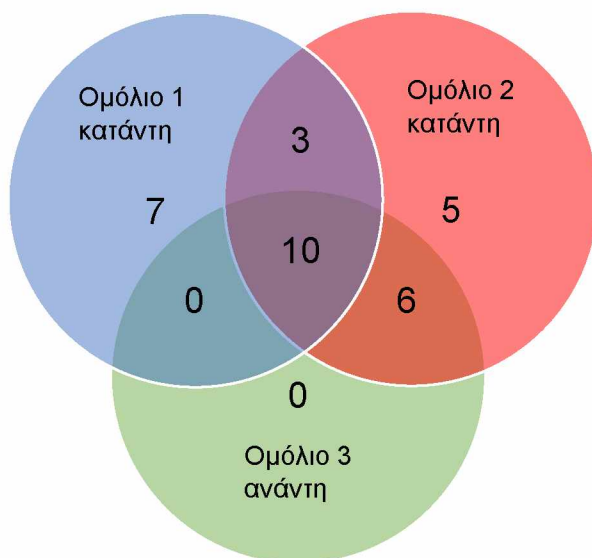
Γράφημα 3.7: Σχηματική αναπαράσταση σε μορφή γραφήματος πίτας των γενών στο σταθμό Ομόλιο 1 κατάντη.



Γράφημα 3.8: Σχηματική αναπαράσταση σε μορφή γραφήματος πίτας των γενών στο σταθμό Ομόλιο 2 κατάντη.



Γράφημα 3.9: Σχηματική αναπαράσταση σε μορφή γραφήματος πίτας των γενών στο σταθμό Ομόλιο 3 ανάντη.

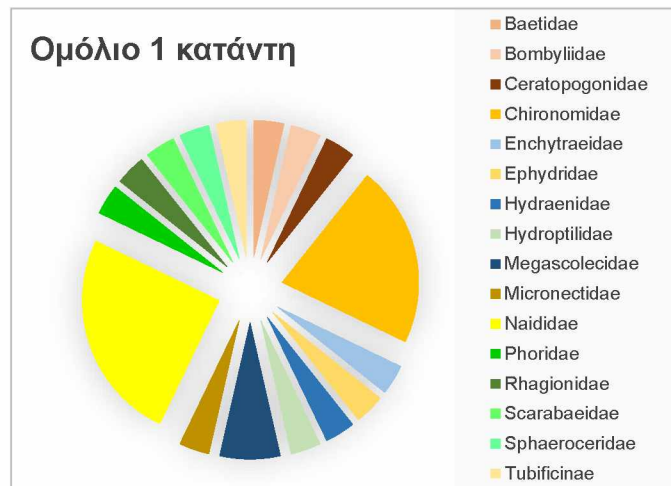


Διάγραμμα 3.5: Σύγκριση των σταθμών Ομόλιου σε επίπεδο γένους με διάγραμμα Venn.

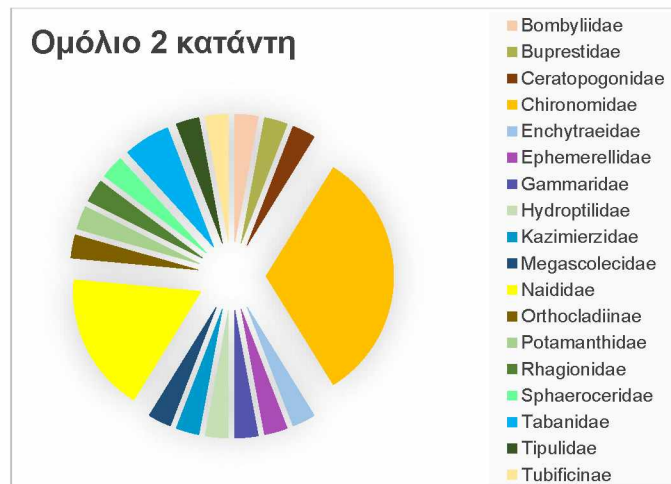
Στη συνέχεια ακολουθεί η σύγκριση των σταθμών σε επίπεδο οικογένειας (Πίνακας 3.13).

Πίνακας 3.13: Οικογένειες που βρέθηκαν σε κάθε σταθμό του Ομόλιου με τον αριθμό των taxa της κάθε οικογένειας.

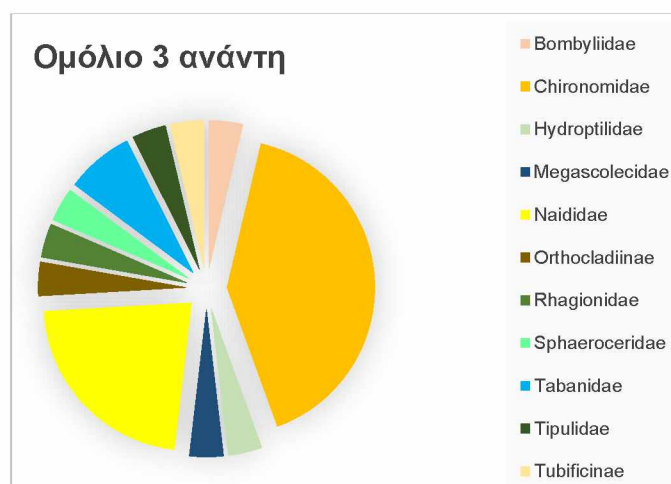
Ομόλιο 1 κατάντη	Αριθμός taxa	Ομόλιο 2 κατάντη	Αριθμός taxa	Ομόλιο 3 ανάντη	Αριθμός taxa
<i>Baetidae</i>	1	<i>Bombyliidae</i>	1	<i>Bombyliidae</i>	1
<i>Bombyliidae</i>	1	<i>Buprestidae</i>	1	<i>Chironomidae</i>	11
<i>Ceratopogonidae</i>	1	<i>Ceratopogonidae</i>	1	<i>Hydroptilidae</i>	1
<i>Chironomidae</i>	6	<i>Chironomidae</i>	11	<i>Megascolecidae</i>	1
<i>Enchytraeidae</i>	1	<i>Enchytraeidae</i>	1	<i>Naididae</i>	6
<i>Ephydriidae</i>	1	<i>Ephemerellidae</i>	1	<i>Orthoclaadiinae</i>	1
<i>Hydraenidae</i>	1	<i>Gammaridae</i>	1	<i>Rhagionidae</i>	1
<i>Hydroptilidae</i>	1	<i>Hydroptilidae</i>	1	<i>Sphaeroceridae</i>	1
<i>Megascolecidae</i>	2	<i>Kazimierzidae</i>	1	<i>Tabanidae</i>	2
<i>Micronectidae</i>	1	<i>Megascolecidae</i>	1	<i>Tipulidae</i>	1
<i>Naididae</i>	7	<i>Naididae</i>	6	<i>Tubificinae</i>	1
<i>Phoridae</i>	1	<i>Orthoclaadiinae</i>	1		
<i>Rhagionidae</i>	1	<i>Potamanthidae</i>	1		
<i>Scarabaeidae</i>	1	<i>Rhagionidae</i>	1		
<i>Sphaeroceridae</i>	1	<i>Sphaeroceridae</i>	1		
<i>Tubificinae</i>	1	<i>Tabanidae</i>	2		
		<i>Tipulidae</i>	1		
		<i>Tubificinae</i>	1		



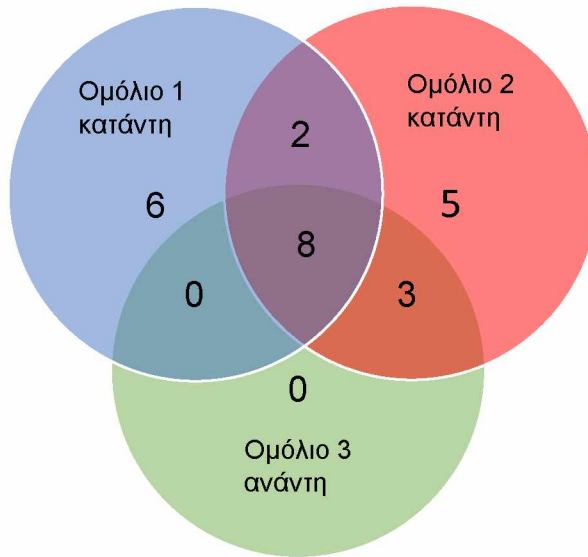
Γράφημα 3.10: Σχηματική αναπαράσταση σε μορφή γραφήματος πίτας των οικογενειών στο σταθμό Ομόλιο 1 κατάντη.



Γράφημα 3.11: Σχηματική αναπαράσταση σε μορφή γραφήματος πίτας των οικογενειών στο σταθμό Ομόλιο 2 κατάντη.



Γράφημα 3.12: Σχηματική αναπαράσταση σε μορφή γραφήματος πίτας των οικογενειών στο σταθμό Ομόλιο 3 ανάντη.



Διάγραμμα 3.6: Σύγκριση σταθμών Ομόλιου σε επίπεδο οικογένειας.

Αναλυτικότερα για το διάγραμμα Venn (Διάγραμμα 3.6), κοινές οικογένειες μεταξύ των σημείων βρέθηκαν οι *Naididae*, *Sphaeroceridae*, *Chironomidae*, *Rhagionidae*, *Hydroptilidae*, *Bombyliidae*, *Megascolecidae* και *Tubificinae*. Μεταξύ των σταθμών Ομόλιο 1 και 2 κατάντη κοινές οικογένειες είναι οι *Ceratorogonidae* και *Enchytraeidae*. Στους σταθμούς Ομόλιο 2 κατάντη και Ομόλιο 3 ανάντη κοινές οικογένειες είναι οι *Tabanidae*, *Orthoclaadiinae* και *Tipulidae*. Μόνο στο σταθμό Ομόλιο 1 κατάντη βρέθηκαν οι *Scarabaeidae*, *Hydraenidae*, *Phoridae*, *Micronectidae*, *Baetidae* και *Ephydridae*. Μόνο στο σταθμό Ομόλιο 2 κατάντη βρέθηκαν οι *Kazimierzidae*, *Ephemerellidae*, *Potamanthidae*, *Gammaridae* και *Buprestidae*.

3.8 α-diversity κλασικής και μοριακής μεθόδου

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 3.14, Πίνακας 3.15) παρουσιάζονται οι τιμές της α-diversity που βρέθηκαν για κάθε σταθμό για την κάθε μέθοδο ξεχωριστά σε επίπεδο υποκλάσης.

Πίνακας 3.14: α -diversity της κλασικής μεθόδου σε επίπεδο υποκλάσης

Σταθμός	richness
Γυρτώνη 1 κατάντη	2,00
Γυρτώνη 2 κατάντη	2,00
Γυρτώνη 3 ανάντη	3,00
Ομόλιο 1 κατάντη	6,00
Ομόλιο 2 κατάντη	3,00
Ομόλιο 3 ανάντη	7,00

Πίνακας 3.15: α -diversity της μοριακής μεθόδου σε επίπεδο υποκλάσης

Σταθμός	richness
Γυρτώνη 1 κατάντη	2,00
Γυρτώνη 2 κατάντη	2,00
Γυρτώνη 3 ανάντη	2,00
Ομόλιο 1 κατάντη	2,00
Ομόλιο 2 κατάντη	3,00
Ομόλιο 3 ανάντη	2,00

Ο πίνακας που ακολουθεί (Πίνακας 3.16) αναγράφει την α -diversity της μοριακής μεθόδου στο επίπεδο γένους-είδους.

Πίνακας 3.16 α -diversity της μοριακής μεθόδου σε επίπεδο γένους-είδους

Σταθμός	richness
Γυρτώνη 1 κατάντη	28,0
Γυρτώνη 2 κατάντη	37,0
Γυρτώνη 3 ανάντη	28,0
Ομόλιο 1 κατάντη	29,0
Ομόλιο 2 κατάντη	34,0
Ομόλιο 3 ανάντη	27,0

3.9 β-diversity κλασικής και μοριακής μεθόδου

Στον Πίνακα 3.17 και Πίνακα 3.18 αναγράφονται οι τιμές της b-diversity των δυο μεθόδων σε επίπεδο υποκλάσης, ενώ στον Πίνακα 3.19 η β-diversity της μοριακής μεθόδου σε επίπεδο γένους-είδους.

Πίνακας 3.17: β-diversity της κλασικής μεθόδου σε επίπεδο υποκλάσης

	Γυρτώνη 1 κατάντη	Γυρτώνη 2 κατάντη	Γυρτώνη 3 ανάντη	Ομόλιο 1 κατάντη	Ομόλιο 2 κατάντη	Ομόλιο 3 ανάντη
Γυρτώνη 1 κατάντη	0	0,836	0,669	0,912	0,832	0,655
Γυρτώνη 2 κατάντη	0,836	0	0,907	0,646	0,822	0,903
Γυρτώνη 3 ανάντη	0,669	0,907	0	0,840	0,566	0,356
Ομόλιο 1 κατάντη	0,912	0,646	0,840	0	0,652	0,793
Ομόλιο 2 κατάντη	0,832	0,822	0,566	0,652	0	0,585
Ομόλιο 3 ανάντη	0,655	0,903	0,356	0,793	0,585	0

Πίνακας 3.17: β-diversity της μοριακής μεθόδου σε επίπεδο υποκλάσης, .

	Γυρτώνη 1 κατάντη	Γυρτώνη 2 κατάντη	Γυρτώνη 3 ανάντη	Ομόλιο 1 κατάντη	Ομόλιο 2 κατάντη	Ομόλιο 3 ανάντη
Γυρτώνη 1 κατάντη	0	0,298	0,767	0,445	0,744	0,927
Γυρτώνη 2 κατάντη	0,298	0	0,678	0,226	0,633	0,878
Γυρτώνη 3 ανάντη	0,767	0,678	0	0,548	0,273	0,799
Ομόλιο 1 κατάντη	0,445	0,226	0,548	0	0,474	0,854
Ομόλιο 2 κατάντη	0,744	0,633	0,273	0,474	0	0,723
Ομόλιο 3 ανάντη	0,927	0,878	0,799	0,854	0,723	0

Πίνακας 3.19: β-diversity της μοριακής μεθόδου σε επίπεδο γένους-είδους..

	Γυρτώνη 1 κατάντη	Γυρτώνη 2 κατάντη	Γυρτώνη 3 ανάντη	Ομόλιο 1 κατάντη	Ομόλιο 2 κατάντη	Ομόλιο 3 ανάντη
Γυρτώνη 1 κατάντη	0	0,881	0,997	0,968	0,897	0,961
Γυρτώνη 2 κατάντη	0,881	0	0,871	0,921	0,820	0,931
Γυρτώνη 3 ανάντη	0,997	0,871	0	0,987	0,885	0,945
Ομόλιο 1 κατάντη	0,968	0,921	0,987	0	0,887	0,920
Ομόλιο 2 κατάντη	0,897	0,820	0,885	0,887	0	0,731
Ομόλιο 3 ανάντη	0,961	0,931	0,945	0,920	0,731	0

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ζήτηση για την ταξινόμηση οργανισμών ολοένα και αυξάνεται καθώς μπαίνουμε πιο βαθιά στον 21^ο αιώνα (Goodfray, 2004). Η κλασική ταξινομική είναι μια μέθοδος αναγνώρισης, περιγραφής και ονοματολογίας ειδών (ή άλλων taxa). Βασίζεται σε επίπονες και χρονοβόρες διαδικασίες αναγνώρισης και ταυτοποίησης των ταξινομικών ομάδων από εξειδικευμένους ερευνητές (Kotou & Gololobova, 2016). Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μια κρίση, η οποία χαρακτηρίζεται κυρίως από έλλειψη εξειδικευμένων ερευνητών για πολλές ταξινομικές ομάδες και περιοχές σε συνδυασμό με την ανεπαρκή χρηματοδότηση (Pires & Marinoni, 2010). Αυτοί οι λόγοι δημιούργησαν την ανάγκη για την εύρεση εναλλακτικών και συμπληρωματικών προσεγγίσεων. Οι μοριακές τεχνικές αποτελούν μια τέτοια προσέγγιση και λύση στην υπάρχουσα κρίση που παρατηρείται. Μπορούν να δώσουν περισσότερες και πιο εξειδικευμένες πληροφορίες για την περιγραφή των taxa, χρησιμοποιώντας γενετικούς δείκτες.

Από τις δυο περιοχές δειγματοληψίας συλλέχθηκε δείγμα ιζήματος, το οποίο παρουσιάζει ιδιαιτερότητες λόγω της μεγάλης ετερογένειας στο σύνολο των βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στο στάδιο ομογενοποίησης του δείγματος, με σημαντικότερα να αποτελούν τα βήματα όπου έγινε η χρήση ομογενοποιητή και η κονιορτοποίηση. Παρόμοιες διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες μελέτες, με τη διαφορά ότι οι Wangenstein et al. (2018) και Emilson et al. (2017) χρησιμοποίησαν μόνο ομογενοποιητή ενώ οι Bista et al. (2018) μόνο κονιορτοποιητή, ενώ δεν έγινε χρήση υγρού αζώτου στην κονιορτοποίηση. Ο συνδυασμός των παραπάνω βημάτων που έγινε στα πλαίσια αυτής της εργασίας αύξησε σημαντικά τις συγκεντρώσεις του απομονωμένου DNA, ιδίως για τα μη εξειδικευμένα πρωτόκολλα απομόνωσης για δείγματα ιζήματος. Κατά το στάδιο της απομόνωσης χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα ώστε να διασφαλιστεί η καλύτερη δυνατή απομόνωση DNA. Το πρωτόκολλο των χαστροπικών αλάτων και το Purelink Genomic DNA extraction kit έδωσαν αισθητά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις απομονωμένου DNA συγκριτικά με το εξειδικευμένο PowerSoil kit. Μη εξειδικευμένα πρωτόκολλα, όμως, απαιτούν παραπάνω βήματα και διαδικασίες για να τον καθαρισμό κατά το στάδιο της

απομόνωσης (Duarte et al., 2021). Συνεπώς, το στάδιο της PCR αποτέλεσε πρόκληση για τα δυο πρώτα πρωτόκολλα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην περιεκτικότητα διάφορων ανόργανων ουσιών (ιλύς, άργιλος, πέτρες, κα) και οργανικών ουσιών (χουμικές ουσίες), οι οποίες λειτουργούν ως ανασταλτικοί παράγοντες για τις αντιδράσεις της PCR (Malcolm, 1990). Ως εκ τούτου, η χρήση εμπορικών kit ή πρωτοκόλλων σχεδιασμένα για την απομάκρυνση των αναστολέων θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για δείγματα ιζήματος (Kuntke et al., 2020). Το DNeasy PowerSoil kit, είναι εξειδικευμένο για τέτοιου τύπου δείγματα, καθώς ήταν αποτελεσματικό τόσο στην απομόνωση DNA όσο και στην PCR. Οι Hermans et al. (2017) σύγκριναν έξι διαφορετικά kit εμπορίου, συμπεριλαμβανομένου και kit της Qiagen σε περιβαλλοντικά δείγματα, μεταξύ άλλων και ιζήματος. Οι εν λόγω ερευνητές, συμπέραναν ότι το PowerSoil ενδείκνυται ως καθολικό kit (universal) για δείγματα ιζήματος, καθώς παρέχει υψηλής ποιότητας αποτελέσματα.

Ο βαθμός ταξινόμησης των δυο μεθόδων έφτασε σε διαφορετικά επίπεδα. Τα δεδομένα της μοριακής μεθόδου παρουσιάστηκαν συγκριτικά με αυτά της κλασικής μεθόδου, η οποία φτάνει σε ανώτερη ταξινομική βαθμίδα από αυτή του είδους στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, ώστε να είναι δυνατές οι συγκρίσεις. Για αυτό το λόγο η σύγκριση των μεθόδων έγινε σε επίπεδο υποκλάσης, οικογένειας και είδους. Η πλειοψηφία των taxa που παρατηρήθηκαν κατά την κλασική μέθοδο ήταν στο επίπεδο της οικογένειας ενώ ελάχιστες ήταν οι περιπτώσεις που το επίπεδο ήταν πιο ειδικό (είδος). Η μοριακή μέθοδος, αντίθετα, έδωσε περισσότερες πληροφορίες και μεγαλύτερο βάθος ανάλυσης για τα taxa (επίπεδο γένους-είδους). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι αν και η μοριακή μέθοδος εντόπισε πολλά περισσότερα taxa, τα κοινά μεταξύ των δυο μεθόδων ήταν λίγα σε αριθμό. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για τη συλλογή των βενθικών μακροασπόνδυλων περιορίζεται από ένα χρονικό όριο, δηλαδή 3 λεπτά για λάκτισμα-σάρωση και 1 λεπτό για την βλάστηση. Ο χρονικός αυτός περιορισμός συμβάλει στη λήψη άνισων ποσοτήτων ιζήματος. Ακόμη μικρότερη ήταν η ποσότητα που δόθηκε για τη μοριακή ανάλυση (~ 1/5 της αρχικής ποσότητας). Οι Pansu et al. (2021), χωρίς να έχουν το κριτήριο της σύγκρισης κλασικής-μοριακής μεθόδου, εφάρμοσαν τη δειγματοληψία στα πλαίσια της μοριακής ανάλυσης,

λαμβάνοντας ~10 cm επιφανειακού ιζήματος (~500 mL) για κάθε σταθμό δειγματοληψίας. Γενικά, μελέτες που έχουν ως επίκεντρο την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης με τη χρήση βενθικών μακροασπόνδυλων, η ποσότητα ιζήματος που λαμβάνεται είναι αρκετά μεγαλύτερη αναφορικά με την παρούσα εργασία. Συνεπώς, οι ποσότητες που συλλέχθηκαν και δόθηκαν για μοριακή ανάλυση για την παρούσα εργασία είχαν καθοριστικό ρόλο και ενδεχομένως να συνέβαλαν στη μη ανίχνευση ορισμένων taxa. Η επιλογή των εκκινητών αποτελεί δύσκολη απόφαση και εξαρτάται από το στόχο της μελέτης. Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι fwhF2/ETPDr2n, που δοκιμάστηκαν *in situ* από τους Leese et al. (2020), με μεγαλύτερο ποσοστό αναγνώρισης σε αρθρόποδα (97,31%) και μικρότερα σε ανελίδες (1,66%) και μαλάκια (0,63%). Κατά την κλασική μέθοδο, μεταξύ άλλων, εντοπίστηκαν 13 taxa (αρθρόποδα) και 4 taxa (μαλάκια) τα οποία δεν εμφανίζονται στα αποτελέσματα της μοριακής μεθόδου. Ο ETPDr2n εκκινητής (reverse) που χρησιμοποιήθηκε, έχει το μειονέκτημα ότι δεν εντοπίζει ορισμένα αρθρόποδα-στόχους. Παρόλα αυτά, η μη ανίχνευση ενός taxon σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα δε σημαίνει ότι δεν υπάρχει, αλλά απαιτείται βελτιστοποίηση των μεθόδων και ο σχεδιασμός πιο συγκεκριμένων εκκινητών θα συμβάλει στο να χαθούν ορισμένα taxa όπως Trichoptera, Mollusca και Isopoda (Leese et al, 2020).

Η επιλογή των σημείων δειγματοληψίας σχετίζεται με τους φραγμούς στη ροή, είτε τεχνητούς (φράγματα) είτε φυσικούς (αναβαθμίδες), με σκοπό την παρατήρηση της διαφοροποίησης ανάμεσα στις ανάντη περιοχές, κατάντη περιοχές αμέσως μετά τους φραγμούς και κατάντη περιοχές αρκετά μακριά από τους φραγμούς. Για το σκοπό αυτό, μετρήθηκε η α -diversity, όπου δείχνει τον αριθμό των ειδών που απαντώνται σε κάθε σταθμό δειγματοληψίας. Στην ανεπηρέαστη κατάντη (σταθμός Γυρτώνη 2 κατάντη) από το φράγμα περιοχή απαντώνται τα περισσότερα taxa (37), η πλειοψηφία των οποίων ανήκει στην οικογένεια των *Chironomidae* (ένας από τους κύριους στόχους σε μελέτες ποικιλότητας των μακροασπόνδυλων). Οι Glowacki et al. (2011) εστίασαν στις αλλαγές μεταξύ των ανάντη και κατάντη περιοχών της οικογένειας των *Chironomidae*, με τα αποτελέσματα να δείχνουν ότι στις ανάντη περιοχές υπήρχε μείωση και στις κατάντη αύξηση της ποικιλότητας της συγκεκριμένης

οικογένειας. Μια τέτοια παρατήρηση συνάδει, επίσης, με τα αποτελέσματα των Vaikasas et al. (2013), όπου βρέθηκαν περισσότερες προνύμφες της οικογένειας των *Chironomidae* καθώς επίσης μαλάκια και ολιγόχαιτοι στις κατάντη περιοχές σε σχέση με τις ανάντη. Όμως, αυτή η παραδοχή δεν εφαρμόζεται για όλα τα βενθικά μακροασπόνδυλα. Για παράδειγμα, στην παρούσα εργασία η υποκλάση των *Oligochaeta* απαντάται στις κατάντη περιοχές. Γενικά, οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με την επίδραση των φραγμάτων στη βιοποικιλότητα των βενθικών μακροασπόνδυλων, έδειξαν ότι προκαλούν μείωση των taxa στις κατάντη περιοχές (Wu et al., 2019), λόγω της απομόνωσης και της αλλαγής των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού. Το ίδιο αποτέλεσμα φάνηκε και στους σταθμούς του Ομόλιου, όπου ο ανεπηρέαστος από την αναβαθμίδα σταθμός είχε τα περισσότερα taxa (34). Η συγκέντρωση των μακροασπόνδυλων δείχνουν τις συνθήκες που κατοικούν (dos Santos et al., 2016) και λόγω της περιορισμένης διασποράς τους είναι άμεσα εξαρτώμενα από τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά (Behred et al., 2012). Τα συστήματα που εντοπίζονται κοντά σε αναβαθμίδες έχουν αλληλένδετες οικολογικές διεργασίες, με αποτέλεσμα πολύπλοκες οικολογικές διεργασίες και προάγουν την κατακράτηση ιζημάτων, σωματιδίων οργανικής ύλης και θρεπτικών ουσιών (Barbosa et al., 1999).

Η διαφορετικότητα των ανάντη και κατάντη σταθμών, έγινε με τον υπολογισμό της β -diversity. Ο υπολογισμός της β -diversity, μέσω του εργαλείου USEARCH, δηλώνει διαφορές και συνεπώς μεγαλύτερες τιμές υποδηλώνουν μεγαλύτερη διαφορετικότητα και αυξανόμενες αποστάσεις. Η μεγαλύτερη διαφορά που παρατηρείται στην περιοχή της Γυρτώνης είναι μεταξύ των σταθμών Γυρτώνη 1 κατάντη και Γυρτώνη 3 ανάντη (0,997). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στον ανάντη σταθμό η υποκλάση των *Oligochaeta* (όπου όλοι ανήκουν στην οικογένεια *Naididae*) απαντάται ένα taxon συγκριτικά με τους κατάντη σταθμούς και αντίστοιχα στις κατάντη περιοχές συναντώνται taxa της κλάσης των *Pterygota* (π.χ. *Chironomidae*, *Ephemeroptera* κ.α.). Αντίστοιχα, για την περιοχή του Ομόλιου, οι σταθμοί Ομόλιο 1 κατάντη και Ομόλιο 2 κατάντη παρουσίασαν τη μεγαλύτερη διαφορά (0,920) με την παρουσία περισσότερων συγκριτικά με τη Γυρτώνη ολιγόχαιτων και κατανεμημένοι σχεδόν σε κάθε

σταθμό (εξαίρεση αποτελούν οι *B. vej dovskyanum*, *K. phumlani*, *M. acincta* και *M. houletti*) καθώς και μεγάλο αριθμό σε *Chironomidae*. Κοινός παράγοντας για τη διαφορετικότητα των περιοχών, όσων αφορά την β-diversity, είναι οι σταθμοί 1 κατάντη και 3 ανάντη, όπου οι σταθμοί Γυρτώνη και Ομόλιο 1 κατάντη παρουσιάζουν το μεγαλύτερο δείκτη β-diversity (0,968) με τα taxa των ολιγόχαιτων να είναι περισσότερα στο σταθμό του Ομόλιου. Ο Πηνειός, είναι ένα ποτάμι που χαρακτηρίζεται από χαμηλή ροή και το μεγαλύτερο τμήμα του διέρχεται από αγροτικές περιοχές. Οι φραγμοί (φράγμα, αναβαθμίδα) που συναντώνται κατά μήκος του έχουν διαφορετικό αντίκτυπο και επιπτώσεις στην ποικιλότητα. Η παρουσία των περισσότερων taxa που βρέθηκαν λειτουργούν ως βιοδείκτες για τον χαρακτηρισμό της κατάστασης των υδάτων. Σύμφωνα με τους Xu et al. (2014), η παρουσία των οικογενειών *Chironomidae* και *Ceratorogonidae* (όπου βρέθηκαν στην παρούσα εργασία) χαρακτηρίζουν την ποιότητα των υδάτων ως κακή. Οι Timm et al. (2015) αναφέρουν ότι η οικογένεια των *Naididae* αποτελεί την πιο κοινή οικογένεια ολιγόχαιτων η οποία συναντάται σε κάθε βιογεωγραφική περιοχή, όπου ποτάμια με χαμηλή ροή καθώς και ύδατα με μεγάλο οργανικό φορτίο ευνοούν την ανάπτυξη των ολιγόχαιτων (Benbow, 2009).

Η σύγκριση της α- και β-diversity για τη σύγκριση των δυο μεθόδων έγινε στο επίπεδο της υποκλάσης, όπου η κλασική μέθοδος εντόπισε τέσσερις περισσότερες οικογένειες (*Caenogastropoda*, *Neritimorpha*, *Heterobranchia*, *Hirudinea*). Η κατανομή στο συγκεκριμένο ταξινομικό επίπεδο παρουσιάζεται ομοιόμορφη για την μοριακή μέθοδο, εκτός του σταθμού Ομόλιο 2 κατάντη όπου εντοπίζεται μια κλάση παραπάνω (α-diversity Ομόλιο 2 κατάντη είναι 3). Συνεπώς, η σύγκριση της β-diversity όπως προκύπτει από τις δύο μεθόδους δεν λαμβάνει υπόψη τον πλούτο της ταξινομικής πληροφορίας που προσφέρει η μοριακή μέθοδος. Η αξιολόγηση υδάτινων οικοσυστημάτων με τη χρήση βενθικών μακροασπόνδυλων συνήθως απαιτεί ταξινομικό επίπεδο γένους/είδους, αλλά πολλές φορές μπορεί να προσθέσει “οικολογικό θόρυβο” στην αξιολόγηση, εκτός κι αν είναι γνωστές οι παράμετροι που επηρεάζουν τα συγκεκριμένα taxa (Bailey et al., 2001).

5 Βιβλιογραφία

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques *4692–4693 Nucleic Acids Research, 1997, Vol. 25, No. 22*
- Andrade, V. S., Wiegand, C., Pannard, A., Gagnetten, A. M., Pédrot, M., Bouhnik-Le Coz, M., & Piscart, C. (2020). How can interspecific interactions in freshwater benthic macroinvertebrates modify trace element availability from sediment? *Chemosphere, 245*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125594>
- Bailey, R. C., Norris, R. H., & Reynoldson, T. B. (2001). Taxonomic resolution of benthic macroinvertebrate communities in bioassessments. *Journal of the North American Benthological Society, 20(2)*, 280–286. <https://doi.org/10.2307/1468322>
- Barbosa, F. A. R., J. Padisa´k, E. L. G. Espindola, G. Borics & O. Rocha, 1999. The cascading Reservoir Continuum Concept (CRCC) and its application to the River Tieteˆ basin, Saˆo Paulo State, Brazil. In Tundisi, J. G. &M. Straskaba (eds.), *Theoretical Reservoir Ecology and its Applications*. International Institute of Ecology, Brazilian Academy of Sciences and Backhuys Publishers, Saˆo Carlos.
- Behrend, R., Takeda, A., Gomes, L., & Fernandes, S. (2012). Using oligochaeta assemblages as an indicator of environmental changes. *Brazilian Journal of Biology, 72(4)*, 873–884. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842012000500014>
- Benbow, M. E. (2009). Annelida, Oligochaeta and Polychaeta. *Encyclopedia of Inland Waters*, 124–127. <https://doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00257-X>
- Bista, I., Carvalho, G. R., Tang, M., Walsh, K., Zhou, X., Hajibabaei, M., Shokralla, S., Seymour, M., Bradley, D., Liu, S., Christmas, M., & Creer, S. (2018). Performance of amplicon and shotgun sequencing for accurate biomass estimation in invertebrate community samples. *Molecular Ecology Resources, 18(5)*, 1020–1034. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12888>
- Bressler, D. W., Stribling, J. B., Paul, M. J., & Hicks, M. B. (2006). Stressor tolerance values for benthic macroinvertebrates in Mississippi. *Hydrobiologia, 573(1)*, 155–172. <https://doi.org/10.1007/s10750-006-0266-1>
- C, P. R. (2013). *Illumina Sequencing Overview*.
- Camargo, J. A., Alonso, Á., & De La Puente, M. (2005). Eutrophication downstream from small reservoirs in mountain rivers of Central Spain. *Water Research, 39(14)*, 3376–3384. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.05.048>
- Courtney, G. W., & Cranston, P. S. (2015). Order Diptera. In *Ecology and General Biology: Thorp and Covich’s Freshwater Invertebrates* (Fourth Edi). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00040-1>

- Cristescu, M. E. (2014). From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: Towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 29(10), 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001>
- Davidson, N., Delany, S., & Seddon, M. (2001). *Biodiversity Impacts of Large Dams: Waterbirds*. September. https://www.researchgate.net/publication/255643683_Biodiversity_Impacts_of_Large_Dams
- De Los Reyes Arguelles, E., & Martinez-Goss, M. (2021). Classical Taxonomy. *Methods in Microalgal Studies*, April, 145–153.
- de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Maske, B. L., De Dea Lindner, J., Vale, A. S., Favero, G. R., Viesser, J., de Carvalho, J. C., Góes-Neto, A., & Soccol, C. R. (2020). An updated review on bacterial community composition of traditional fermented milk products: what next-generation sequencing has revealed so far? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–20. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1848787>
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., de Vere, N., Pfrender, M. E., & Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21), 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- dos Santos, N. C. L., de Santana, H. S., Dias, R. M., Borges, H. L. F., de Melo, V. F., Severi, W., Gomes, L. C., & Agostinho, A. A. (2016). Distribution of benthic macroinvertebrates in a tropical reservoir cascade. *Hydrobiologia*, 765(1), 265–275. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2419-6>
- Duarte, S., Leite, B. R., Feio, M. J., Costa, F. O., & Filipe, A. F. (2021). Integration of DNA-based approaches in aquatic ecological assessment using benthic macroinvertebrates. *Water (Switzerland)*, 13(3), 1–25. <https://doi.org/10.3390/w13030331>
- Emilson, C. E., Thompson, D. G., Venier, L. A., Porter, T. M., Swystun, T., Chartrand, D., Capell, S., & Hajibabaei, M. (2017). DNA metabarcoding and morphological macroinvertebrate metrics reveal the same changes in boreal watersheds across an environmental gradient. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13157-x>
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., & Blaxter, M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11(4), 839–850. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01485.x>
- Gerino, M., Stora, G., Gilbert, F., Poggiale, J., Gerino, M., Stora, G., Gilbert, F., & Poggiale, J. (2021). *MACRO-INVERTEBRATE FUNCTIONAL GROUPS IN FRESHWATER AND MARINE SEDIMENTS: A COMMON MECHANISTIC CLASSIFICATION* Mermillod-Blondin, G Desrosiers, P Vervier

- Gill, R. J., Baldock, K. C. R., Brown, M. J. F., Cresswell, J. E., Dicks, L. V., Fountain, M. T., Garratt, M. P. D., Gough, L. A., Heard, M. S., Holland, J. M., Ollerton, J., Stone, G. N., Tang, C. Q., Vanbergen, A. J., Vogler, A. P., Woodward, G., Arce, A. N., Boatman, N. D., Brand-Hardy, R., ... Potts, S. G. (2016). Protecting an Ecosystem Service: Approaches to Understanding and Mitigating Threats to Wild Insect Pollinators. *Advances in Ecological Research*, 54(January), 135–206. <https://doi.org/10.1016/bs.aecr.2015.10.007>
- Głowacki, Ł., Grzybkowska, M., Dukowska, M., Penczak, T., 2011. Effects of damming a large lowland river on chironomids and fish assessed with the (multiplicative partitioning of) true/Hill biodiversity measure. *River Res. Appl.* 27 (5), 612e629.
- Godfray, H. C. J., & Knapp, S. (2004). Taxonomy for the twenty-first century: Introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1444), 559–569. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1457>
- Grützke, J., Malorny, B., Hammerl, J. A., Busch, A., Tausch, S. H., Tomaso, H., & Deneke, C. (2019). Fishing in the soup – pathogen detection in food safety using metabarcoding and metagenomic sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 10(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01805>
- Gužvić, M. (2013). The history of DNA sequencing. *Journal of Medical Biochemistry*, 32(4), 301–312. <https://doi.org/10.2478/jomb-2014-0004>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hermans, S. M., Buckley, H. L., & Lear, G. (2018). Optimal extraction methods for the simultaneous analysis of DNA from diverse organisms and sample types. *Molecular Ecology Resources*, 18(3), 557–569. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12762>
- Illumina Inc. (2017). Illumina sequencing introduction. *Illumina Sequencing Introduction, October* 1–8. https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
- Invitrogen. (2016). PureLink Genomic DNA Kits. *User Manual, February* 1–18.
- Kanbar, H. J. (2011). *Impacts of Dams on Biodiversity. Septembe*, 1.

- Kchouk, M., Gibrat, J. F., & Elloumi, M. (2017). Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*, 09(03). <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000395>
- Kiffney, P. M., & Clements, W. H. (1994). Effects of heavy metals on a macroinvertebrate assemblage from a Rocky Mountain stream in experimental microcosms. *Journal of the North American Benthological Society*, 13(4), 511–523. <https://doi.org/10.2307/1467847>
- Kotov, A. A., & Gololobova, M. A. (2016). Traditional taxonomy: Quo vadis? *Integrative Zoology*, 11(6), 500–505. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12215>
- Kuntke, F., de Jonge, N., Hesselsøe, M., & Lund Nielsen, J. (2020). Stream water quality assessment by metabarcoding of invertebrates. *Ecological Indicators*, 111(December 2019), 105982. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105982>
- L. Malcolm, R. (1990). The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. *Analytica Chimica Acta*, 232(C), 19–30. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)81222-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)81222-2)
- Leese, F., Sander, M., Buchner, D., Elbrecht, V., Haase, P., & Zizka, V. M. A. (2021). Improved freshwater macroinvertebrate detection from environmental DNA through minimized nontarget amplification. *Environmental DNA*, 3(1), 261–276. <https://doi.org/10.1002/edn3.177>
- Loreau, M. (2000). Are communities saturated? On the relationship between α , β and γ diversity. *Ecology Letters*, 3(2), 73–76. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00127.x>
- Meatyrd, B. (2005). Biodiversity, an introduction. In *Biological Conservation* (Vol. 122, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.07.009>
- Mulder, C. P. H., Bazeley-White, E., Dimitrakopoulos, P. G., Hector, A., Scherer-Lorenzen, M., & Schmid, B. (2004). Species evenness and productivity in experimental plant communities. *Oikos*, 107(1), 50–63. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.13110.x>
- Muzzey, D., Evans, E. A., & Lieber, C. (2015). Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Current Genetic Medicine Reports*, 3(4), 158–165. <https://doi.org/10.1007/s40142-015-0076-8>
- Ochieng, H., Okot-Okumu, J., & Odong, R. (2019). Taxonomic challenges associated with identification guides of benthic macroinvertebrates for biomonitoring freshwater bodies in East Africa: A review. *African Journal of Aquatic Science*, 44(2), 113–126. <https://doi.org/10.2989/16085914.2019.1612319>
- Palacio, M. (n.d.). *Periphyton protocols chapter 6 epa*.
- Pansu, J., Chapman, M. B., Hose, G. C., & Chariton, A. A. (2020). Comparison of an extracellular v. total DNA extraction approach for environmental DNA-based

- monitoring of sediment biota. *Marine and Freshwater Research*.
<https://doi.org/10.1071/MF20269>
- Pentinsaari, M., Salmela, H., Mutanen, M., & Roslin, T. (2016). Molecular evolution of a widely adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life. *Scientific Reports*, 6(March), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep35275>
- Pires, A. C., & Marinoni, L. (2010). DNA barcoding and traditional taxonomy unified through integrative Taxonomy: A view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropica*, 10(2), 339–346.
<https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000200035>
- Preston, F. W. (1948). With respect to commonness or rarity. *Ecology*, 29(3), 254–283.
- Purvis, A., & Hector, A. (2000). Getting the measure of biodiversity. *Nature*, 405(6783), 212–219. <https://doi.org/10.1038/35012221>
- Rom, C. I. S. C. D. (2005). *WATER FRAMEWORK DIRECTIVE CIS CD ROM -2005 VERSION Water Framework Directive. December 2003*.
<http://www.waterframeworkdirective.wdd.moa.gov.cy/docs/pdf/wfd.pdf>
- Schuster, S. C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods*, 5(1), 16–18. <https://doi.org/10.1038/nmeth1156>
- Shiel, R. (1989). Rotifer Symposium V. *Rotifer Symposium V, April*.
<https://doi.org/10.1007/978-94-009-0465-1>
- Siddula, S. S., Babu, P., & Jain, P. C. (2018). Water Level Monitoring and Management of Dams using IoT. *Proceedings - 2018 3rd International Conference on Internet of Things: Smart Innovation and Usages, IoT-SIU 2018*.
<https://doi.org/10.1109/IoT-SIU.2018.8519843>
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity [16]. In *Nature* (Vol. 163, Issue 4148, p. 688). <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Solieri, L., Dakal, T. C., & Giudici, P. (2013). Next generation sequencing and its potential impact on food microbial genomics. *Annals of Microbiology*, 63(1), 21–37. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0478-8>
- Spellerberg, I. A. N. F., & Fedor, P. J. (2003). Tribute To Claude Shannon (1916–2001). *Global Ecology and Biogeography*, 177–179.
- Thiele, D. (1991). Polymerase chain reaction (PCR) and applications. *Immunitat Und Infektion*, 19(5), 138–142.
- Timm, T., & Martin, P. J. (2015). Clitellata: Oligochaeta. In *Thorpe and Covich's Freshwater Invertebrates: Ecology and General Biology: Fourth Edition* (Fourth Edi, Vol. 1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00021-8>

- Vaikasas, S., Palaima, K., & Pliuraite, V. (2013). Influence of hydropower dams on the state of macroinvertebrates assemblages in the Virvyte river, Lithuania. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 21(4), 305–315. <https://doi.org/10.3846/16486897.2013.796956>
- Vallania, A., & Corigliano, M. D. C. (2007). The effect of regulation caused by a Dam on the distribution of the functional feeding groups of the benthos in the sub-Basin of the Grande River (San Luis, Argentina). *Environmental Monitoring and Assessment*, 124(1–3), 201–209. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9218-5>
- Vamos, E. E., Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Short coi markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, 1, 1–22. <https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625>
- Vandenbergh, J. (2015). River terraces as a response to climatic forcing: Formation processes, sedimentary characteristics and sites for human occupation. *Quaternary International*, 370, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2014.05.046>
- Wang, Z., Duan, X., & Pan, B. (2014). Effects of pollution on macroinvertebrates and water quality bio-assessment. *Hydrobiologia*, 729(1), 247–259. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1504-y>
- Wangensteen, O. S., Palacín, C., Guardiola, M., & Turon, X. (2018). DNA metabarcoding of littoral hardbottom communities: High diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ*, 2018(5), 1–30. <https://doi.org/10.7717/peerj.4705>
- Wen, B., He, M., Song, J., Zong, B., Lu, Y., & Shu, X. (2000). Study on DeNOx performance of Ce-Mg-Al mixed oxides. *Chinese Journal of Catalysis*, 21(1), 34.
- Whittaker, A. R. H., & Whittaker, R. H. (1972). Evolution and Measurement of Species Diversity Published by: International Association for Plant Taxonomy (IAPT) Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/1218190> . extend access to Taxon. EVOLUTION AND MEASUREMENT OF SPECIES DIVERSITY ". *Taxon*, 21(2/3), 213–251.
- Wooley, J. C., Godzik, A., & Friedberg, I. (2010). A primer on metagenomics. *PLoS Computational Biology*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000667>
- Wright, J. F. (1992). Spatial and temporal occurrence of invertebrates in a chalk stream, Berkshire, England. *Hydrobiologia*, 248(1), 11–30. <https://doi.org/10.1007/BF00008882>
- Wright, J. F., Winder, J. M., Gunn, R. J. M., Blackburn, J. H., Symes, K. L., & Clarke, R. T. (2000). Minor local effects of a River Thames power station on the macroinvertebrate fauna. *Regulated Rivers: Research and Management*, 16(2), 159–174. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1646\(200003/04\)16:2<159:AID-RRR575>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1646(200003/04)16:2<159:AID-RRR575>3.0.CO;2-B)

Wu, H., Chen, J., Xu, J., Zeng, G., Sang, L., Liu, Q., Yin, Z., Dai, J., Yin, D., Liang, J., & Ye, S. (2019). Effects of dam construction on biodiversity: A review. *Journal of Cleaner Production*, 221, 480–489.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.03.001>

Ελληνική βιβλιογραφία

Βερέσογλου, Δ. Σ. Οικολογία (2004). Γ' Έκδοση

Καλινδέρης, Ι. Α., & Στεφανίδης. (2015). Το χειμαρικό περιβάλλον (δυναμικό) του Θεσσαλικού Πηνειού ποταμού. *ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΙΕΥΘΕΤΗΣΗΣ ΟΡΕΙΝΩΝ ΥΔΑΤΩΝ Α.Π.Θ. Πανεπιστημιακή Ταχ. Θυρίδα 268, 54124 Θεσ/νίκη*

Σιμοπούλου, Δ. (2015). Διαχρονική υδρολογική διαφοροποίηση του Πηνειού. Επιπτώσεις στο περιβάλλον. *Διπλωματική μεταπτυχιακή εργασία.*

Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

USEARCH: (<https://drive5.com/usearch/>)

NCBI BLAST: (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

NCBI data base:

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)