



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**



**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Το γενετικό απόθεμα του *Squalius orpheus* του Νέστου ποταμού»**

**Παναγιώτα Πετρούδη**  
**Σπανού Δέσποινα-Σελίνα**

**ΒΟΛΟΣ 2022**

**«Το γενετικό απόθεμα του *Squalius orpheus* του Νέστου ποταμού»**

### **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

- 1) **Γεώργιος Γκάφας:** Επίκουρος Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυοαποθεμάτων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων.**
- 2) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος:** Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.
- 3) **Άρης Ψιλοβίκος:** Καθηγητής, Αειφορική Διαχείριση Υδατικών Πόρων, Τμήμα Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

*Αφιερώνεται στις οικογένειές μας*

## Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε όσους συνέβαλαν στη συγγραφή και ολοκλήρωση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας. Ευχαριστούμε τον επιβλέποντα καθηγητή μας κύριο Γεώργιο Γκάφα για την συνεργασία και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της συγγραφής της εργασίας μας. Επίσης, ευχαριστούμε θερμά την κύρια Ιωάννα Σαραντοπούλου για τη βοήθεια που μας προσέφερε κατά την υλοποίηση του εργαστηριακού μέρους του πειράματος, καθώς και τον κύριο Άρη Ψιλοβίκο για την παροχή των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την διεκπεραίωση της έρευνας. Τέλος ευχαριστούμε τις οικογένειες και φίλους μας, που συνέβαλαν, ο καθένας με τον τρόπο του και μας στήριξαν κατά τη διαδικασία συγγραφής της εργασίας αυτής αλλά και των σπουδών μας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μία μελέτη της πληθυσμιακής γενετικής του είδους *Squalius orpheus* στον ποταμό Νέστο, με στόχο την εξαγωγή συμπερασμάτων για την κατάταξη των πληθυσμών, και τη συγκριτική ανάλυση με τα διαθέσιμα δεδομένα. Το *S. orpheus* είναι ενδημικό στα Βαλκάνια, και παρά την περιγραφή του στην Ελλάδα το 2006, η συστηματική του κατάταξη παραμένει ταξινομική πρόκληση. Ελάχιστες εργασίες έχουν δημοσιευτεί για τη γενετική συσχέτιση των πληθυσμών του. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με ηλεκτραλιεία. Γενετικό υλικό απομονώθηκε από τον ιστό 14 ιχθύων που αλιεύτηκαν. Το τμήμα DNA μιτοχondριακού γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI), ενισχύθηκε με PCR και ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση. Η αλληλούχιση των δειγμάτων μέσω του συστήματος Blast, της βάσης GenBank έδειξε 8 αλληλουχίες να αντιστοιχούν σε άτομα του είδους. Μέσω του NCBI, έγινε ανάκτηση 8 ακόμη αλληλουχιών γονιδίου COI του είδους από τον Βόρειο ελλαδικό χώρο, για τη σύγκριση και συσχέτιση με τα υπόλοιπα δείγματα. Η επεξεργασία των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα Aliview, MEGA, Fabox, Arlequin και popArt. Για τη σύγκριση των πληθυσμών υπολογίστηκαν οι δείκτες  $F_{ST}$ , Tajima's D και έγινε ανάλυση AMOVA. Οι πληθυσμοί οπτικοποιήθηκαν με φυλογενετικό δέντρο Μέγιστης Πιθανοφάνειας, και δίκτυο απλοτύπων Median Joining Network. Τα αποτελέσματα συνολικά βρέθηκαν στατιστικά μη σημαντικά εξαιτίας του μικρού αριθμού δειγμάτων, με μόνο στατιστικά σημαντικό συμπέρασμα τη γενετική διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς Έβρου και Νέστου. Η διαφορά οφείλεται πιθανά σε γεωγραφική απομόνωση και παύση γενετικής ροής. Ιδανικά η επανάληψη της μελέτης, θα αποδώσει σημαντικά συμπεράσματα για τους ιχθυοπληθυσμούς και την κατάσταση του είδους στα εσωτερικά ύδατα της Ελλάδας.

Λέξεις κλειδιά: *Squalius orpheus*, πληθυσμιακή γενετική, γονίδιο COI, γενετική διαφοροποίηση, εσωτερικά ύδατα Βόρειας Ελλάδας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	1
1.1	Βιοποικιλότητα του γένους <i>Squalius</i> .....	1
1.2	Είδη <i>Squalius</i> της Μεσογείου .....	5
1.3	Πληθυσμιακές μελέτες στην περιοχή της Μεσογείου .....	5
1.4	Το είδος <i>Squalius orpheus</i> .....	8
1.5	Γονίδιο COI σε πληθυσμιακές μελέτες .....	10
1.6	Υποθέσεις έρευνας .....	12
<b>2</b>	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	14
2.1	Περιοχή δειγματοληψίας.....	14
2.2	Εξαγωγή γενετικού υλικού.....	15
2.3	Διαδικασία ηλεκτροφόρησης .....	18
2.4	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	20
2.5	Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων PCR.....	22
2.6	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων .....	22
<b>3</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	27
<b>4</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	36
4.1	Ανάλυση Αποτελεσμάτων .....	36
4.2	Γονιδιακή ροή των ιχθύων εσωτερικών υδάτων .....	39
4.3	Επιπτώσεις φραγμάτων στη γενετική διαφοροποίηση ιχθύων .....	43
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	47
	Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία .....	47
	Ελληνική Βιβλιογραφία .....	54
	<b>ABSTRACT</b> .....	56

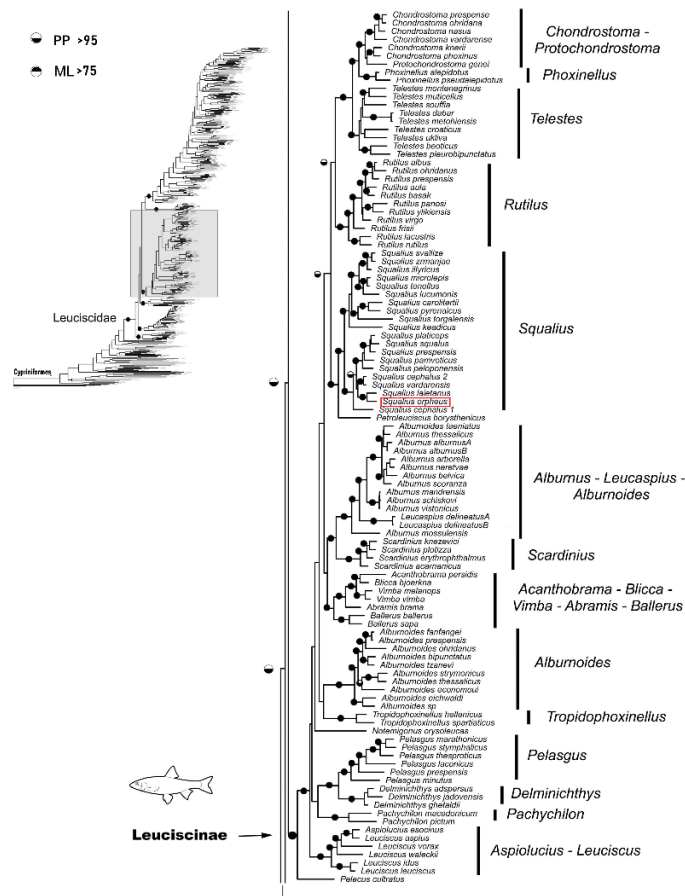
# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Βιοποικιλότητα του γένους *Squalius*

Το γένος *Squalius* ανήκει στο φύλο Chordata, κλάση Actinopterygii, τάξη Cypriniformes, οικογένεια Leuciscidae και υποοικογένεια Leuciscinae. Το γένος αποτελείται από 52 περιγραφόμενα είδη, παρουσιάζοντας ευρύ φάσμα εξάπλωσης στην Ευρώπη και τη Μέση Ανατολή. Λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των ειδών του, ανήκει στα πιο διαφοροποιημένα γένη της οικογένειας Leuciscidae, με πιθανώς υποεκτιμημένη ποικιλομορφία (Froese & Pauly 2019, Fricke et al. 2020). Η πλειοψηφία του γένους εντοπίζεται σε μεμονωμένες λεκάνες στη Μεσόγειο, όντας ενδημικό (Kottelat & Freyhof 2007, Bogutskaya & Zupancic 2010). Το γένος *Squalius* υποδιαιρείται γενικά σε τρεις εξελικτικές γενεαλογικές γραμμές: τη «Μεσογειακή», την «Ευρασιατική» - οι οποίες πιθανώς απομονώθηκαν από την έναρξη της ορογένεσης των Άλπεων κατά τη διάρκεια του Μειόκαινου - και την «Paratethys». Η «Μεσογειακή» γενεαλογία αποτελείται από μικρά είδη από τη νότια Ισπανία, την κεντρική Ιταλία, τη νότια Ελλάδα και τα Βαλκάνια. Η «Ευρασιατική» γενεαλογία αποτελείται κυρίως από τάξα μεγάλων μεγεθών που κατανέμονται ευρέως σε Κεντρική Ευρώπη, Ασία και Βόρεια Μεσόγειο. Η γενεαλογία «Paratethys», περιέχει μικρά είδη, που εντοπίζονται γύρω από τη λεκάνη της Μαύρης Θάλασσας και τη Δυτική Ανατολία (Sanjur et al. 2003). Επιπλέον, εντός της «Μεσογειακής» γενεαλογίας παρατηρούνται τρεις υπογενεαλογίες, μια Ιβηρική, μια Ιταλο-Αδριατική και μια Ελληνική, στην περιοχή της Πελοποννήσου (Perea et al. 2010).



Η οικογένεια των Leuciscidae εμφανίζει έντονη ποικιλομορφία στα Βαλκάνια, στην περίοδο της πρώιμης Ολιγόκαινου, γεγονός που οφείλεται στη περίπλοκη γεωλογική και βιογεωγραφική ιστορία της περιοχής. Το γένος *Squalius*, θεωρείται εξελικτικά «αρχαίο» και χρονολογικά εντοπίζεται στη μέση της Μειόκαινου περιόδου (Buj et al. 2019). Εξαίρεση αποτελούν κάποιες γενεαλογίες του γένους *Squalius*, που αντιπροσωπεύουν πρόσφατα διαφοροποιημένες ομάδες (Perea et al. 2010). Η σημερινή κατάταξη της υποοικογένειας και του γένους παρουσιάζεται παρακάτω (Εικ. 1).



**Εικόνα 1:** Δέντρο εξέλιξης των Leuciscinae, με βάση σύνολο δεδομένων γονιδίων *cytb*, *COI*, *Rag1*, *IRBP*. Οι μαύροι κύκλοι είναι οι κόμβοι με τιμές ML (μέγιστης πιθανολογίας) >75 και PP (Bayesian posterior probabilities) >95. Οι τιμές εκτιμήθηκαν στο RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood, v.7.0.4) (Schönhuth et al. 2018).

Εντός της οικογένειας Leuciscidae, η υποοικογένεια Leuciscinae θεωρείται ιδιαίτερης εξελικτικής σημασίας για τον έλεγχο βιογεωγραφικών υποθέσεων εξέλιξης για τη λεκάνη της Μεσογείου. Τα παλαιότερα απολιθώματα που θα μπορούσαν να αποδοθούν στην υποοικογένεια των Leuciscinae, έχουν ανακτηθεί από την Κεντρική Ανατολία και έχουν χρονολογηθεί στο διάστημα της Ολιγοκαίνου με Μειοκαίνου περιόδου, 23,5 – 24,5 εκατομμύρια χρόνια πριν (εφεξής MA) (Böhme & Ilg 2003). Μια εξελικτική υπόθεση για την προέλευση της υποοικογένειας Leuciscinae στη λεκάνη της Μεσογείου υποστηρίζει ότι τα Euro-Siberian τάξα, με προέλευση από την ανατολική Ασία, εξαπλώθηκαν νότια στην Ευρώπη και τη Δυτική Ασία. Η εξάπλωση αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω προσωρινών παραποτάμων, κατά την Ολιγόκαινο και τη Μειόκαινο περίοδο. Στη συνέχεια εισέβαλαν στα Νότια Βαλκάνια μέσω δύο μεγάλων οδών αποικισμού.

Ο πρώτος αποικισμός, που αναφέρεται συχνά ως «Νότια» διαδρομή διασποράς, μπορεί να είχε πραγματοποιηθεί στη Ολιγόκαινο ή τη Μειόκαινο περίοδο. Εισήγαγε στα Βαλκάνια «παλαιότερες» σιβηρικές γενεαλογίες, πιθανώς προερχόμενες από τη Νοτιοδυτική Ασία. Το δεύτερο κύμα αποικισμού, που αναφέρεται ως «Βόρεια» διαδρομή διασποράς, πραγματοποιήθηκε στην αιχμή της Πλειόκαινου με Πλειστόκαινου περιόδου. Περιελάμβανε την εκτροπή κοιτών μεταξύ του Δούναβη και του Αξιού και τη σύνδεση της Μαύρης Θάλασσας (τότε λίμνη γλυκού νερού) με το Αιγαίο Πέλαγος, μέσω ενός συστήματος ποταμών. Τα περισσότερα προηγούμενα είδη αποικιστών εξαλείφθηκαν από αυτό το κύμα αποικισμού, που έφερε στη Βορειοανατολική Ελλάδα «σύγχρονες» ευρωπαϊκές γενεαλογίες του Δούναβη.

Οι υποθέσεις που αντιτίθενται σε αυτό το μοντέλο υποστηρίζουν ότι ο αποικισμός των ποταμών της Μεσογείου δεν εξηγείται από μια «Βόρεια» επέκταση. Ένα εναλλακτικό μοντέλο που προτείνεται από τον Bianco (1990), υποθέτει ότι ένας Ασιατικός πρόγονος εξαπλώθηκε στη Μεσόγειο κατά τη Lago-Mare φάση, στη διάρκεια της κρίσης αλατότητας της Μεσσηνίας (MSC). Στην Πλειόκαινο περίοδο, 5,5 MA, η λεκάνη της Μεσογείου αποξηράθηκε σχεδόν ολοκληρωτικά και ξαναγέμισε με γλυκό νερό από την Παρατηθής θάλασσα. Το μεταγενέστερο άνοιγμα των στενών του Γιβραλτάρ (Krijgsman et al. 1999) γέμισε την περιοχή της Μεσογείου με θαλασσινό νερό, οδηγώντας σε απομόνωση των νέων πληθυσμών γλυκού νερού, μαζί με την εμφάνιση έντονων φαινομένων «vicariance» (Penzo et al. 1998, Ketmaier et al. 2004). Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, το υψηλό επίπεδο ενδημικών κυπρινοειδών στην Ιβηρική Χερσόνησο και τη Νότια Ελλάδα οφείλεται στη φάση Lago-Mare της Μεσογείου (Bianco 1990). Η ακρίβεια της υπόθεσης αυτής έχει αμφισβητηθεί σχετικά με την επιρροή της στο γένος (Doadrio & Carmona 2003, Perea et al. 2010). Πρόσφατες παλαιογεωγραφικές έρευνες υποστηρίζουν τη διάσπαση ορισμένων ομάδων Leuciscinae στην πρώιμη-μέση Μειόκαινο, 20 με 12 MA, δημιουργώντας τα περισσότερα σημερινά γένη (Marton 2008). Το Ιβηρικό *Squalius* θεωρείται ότι διαφοροποιήθηκε από το *Squalius* των Βαλκανίων και της Ιταλίας περίπου 14,6 MA (Perea et al. 2010). Κατά την Άνω Μειόκαινο περίοδο, μετά το άνοιγμα της θάλασσας του Αιγαίου, ορισμένες ομάδες ελληνικών και ανατολικών Leuciscinae διαφοροποιήθηκαν. Παραδείγματα αποτελούν το *Squalius ghigii/irideus* από το νησί της Ρόδου και τη Νοτιοδυτική Ανατολία, και το *Squalius keadicus* από τη Νότια Ελλάδα. Η διαφοροποίηση άρχισε στα τέλη της Σεραβάλλιου περίπου 12 MA, και τελείωσε κατά τη διάρκεια της επίκλυσης του Τορτονίου μεταξύ 10 και 9 MA (Rögl 2001). Αυτά τα τάξα χωρίστηκαν 8,7

ΜΑ. Στα τέλη της Σεραβάλλιου 12,5 ΜΑ, η ανύψωση των Δειναρικών Άλπεων δημιούργησε φυσικά εμπόδια για τα γένη *Chondrostoma*, *Squalius* και *Telestes* τα οποία διαχωρίστηκαν περίπου 9,7 ΜΑ, 9,2 ΜΑ και 12,4 ΜΑ αντίστοιχα (Perea et al. 2010). Απολιθώματα του γένους *Squalius* στην Ιταλία χρονολογήθηκαν 1,5 ΜΑ και στην Ρουμανία 1-1,1 ΜΑ (Böhme & Ilg 2003).

## 1.2 Είδη *Squalius* της Μεσογείου

Τα περισσότερα από τα 52 είδη που ανήκουν στο γένος *Squalius* είναι ενδημικά και εντοπίζονται σε εσωτερικά νερά. Το γένος παρουσιάζει μεγάλη ποικιλότητα ειδών, ιδίως στη λεκάνη της Μεσογείου (Geiger et al. 2014), με δύο είδη γνωστά από τις λεκάνες απορροής του Ευφράτη και του Τίγρη (*Squalius lepidus* και *Squalius berak*) (Turan et al. 2013) και τέσσερα είδη από λεκάνες του Ιράν (*S. berak*, *S. lepidus*, *S. namak* και *S. Turcicus*) (Khaefi et al. 2016).

## 1.3 Πληθυσμιακές μελέτες στην περιοχή της Μεσογείου

Η συστηματική των *Squalius* στη Μεσόγειο παραμένει μια ταξινομική πρόκληση. Οι πληθυσμιακές έρευνες της γενεαλογίας του γένους ομαδοποιούνται στις περιοχές της Αδριατικής θάλασσας, της Ιβηρικής χερσονήσου και της Ελλάδας, που αντιστοιχούν στη

«Μεσογειακή» γενεαλογία. Η μορφολογική ποικιλομορφία των χαρακτηριστικών, που παραδοσιακά χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση των ειδών του γένους, έχει απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα, βάσει της υψηλής φαινοτυπικής πολυμορφίας που παρατηρείται (Buj 2019). Τονίζεται ότι ελάχιστες μελέτες έχουν αναλύσει πυρηνικούς δείκτες ή έχουν εξετάσει ολόκληρο το εύρος κατανομής του γένους (Almada & Sousa-Santos 2010, Perea et al. 2010, Waap et al. 2011, Sousa-Santos et al. 2019).

Οι Zdeněk et al. (2015) εξέτασαν τις φυλογενετικές αναλύσεις της παραλλακτικότητας της αλληλουχίας στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) κυτοχρώματος b (cyt b) για τα *Squalius* από διάφορα συστήματα ποταμών της Αλβανίας στην περιοχή της Αδριατικής θάλασσας, και εντόπισαν τρεις γενετικές ομάδες με ασαφή ταξινομική θέση. Οι Buj et al. (2019) μελέτησαν την ταξινόμηση του γένους στην Αδριατική λεκάνη, στις χώρες της Κροατίας και της Βοσνίας-Ερζεγοβίνης. Ο φυλογενετικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε βάσει του μιτοχονδριακού γονιδίου cyt b και δύο πυρηνικών γονιδίων - ενεργοποίησης του ανασυνδυασμού 1 και της ροδοψίνης. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν έξι είδη *Squalius* στη λεκάνη της Αδριατικής, με το *Squalius janae* να αποτελεί νεότερο συνώνυμο του *Squalius Squalus*. Επαληθεύτηκε η υψηλή ποικιλομορφία και δύο εξελικτικά ανεξάρτητες ομάδες. Εκτός από την αλλοπατρική ποικιλομορφία ως κύρια δύναμη της απόκλισης των ειδών της Αδριατικής, εντοπίστηκαν αρκετές περιπτώσεις φυσικών υβριδισμών, που συμβάλλουν στην παρατηρούμενη ποικιλομορφία.

Στην Ιβηρική χερσόνησο, μια φυλογενετική ανάλυση που βασίστηκε στην αλληλουχία του μιτοχονδριακού γονιδίου του cyt b, χρησιμοποιήθηκε για να αποκαλύψει μονοφυλετικές ομάδες, που είχαν την επαρκή εξελικτική σημασία για να θεωρηθούν ως

νέα είδη (Doadrio & Carmona 2006). Στην ανατολική Ισπανία, τα είδη του γένους *Squalius* (εξαιρουμένων των υβριδικών συμπλεγμάτων), αποτελούν μια πολύ καλά καθορισμένη μονοφυλετική ομάδα με περισσότερα από 6 εκατομμύρια χρόνια εξελικτικής ιστορίας (Sousa-Santos et al. 2007), εύρημα που έρχεται αντιμέτωπο με προηγούμενα αποτελέσματα φυλογενετικών μελετών (Doadrio & Carmona 2003). Οι αναλύσεις ανακατασκευής των προγόνων βασίστηκαν στην αλληλουχία του μιτοχονδριακού γονιδίου του *cyt b* έδειξαν ότι, μεταξύ των γενεαλογικών γραμμών του γένους, συνέβησαν διαδικασίες αλλοπάτριας ειδογένεσης και διασποράς, οι οποίες συνδέονται με την παλαιογεωγραφική διαμόρφωση της Ιβηρικής Χερσονήσου, κατά τη διάρκεια του Καινοζωικού (Perea et al. 2021).

Στην Ελλάδα, στην περιοχή της Πελοποννήσου, ερευνήθηκε η μιτοχονδριακή ενσωμάτωση στο γονιδίωμα πληθυσμών, χρησιμοποιώντας mtDNA *cyt b* και δυο νουκλεϊκά γονίδια. Εντοπίστηκαν ενδείξεις πλήρους μιτοχονδριακής ενσωμάτωσης σε δύο πληθυσμούς του *Squalius peloponensis*, πιθανώς λόγω της δευτερογενούς επαφής μεταξύ των λεκανών διασποράς. Η απομόνωση των πληθυσμών από γεωγραφικά εμπόδια, που προέκυψαν κατά τη διάρκεια του Πλειστόκαινου στη δυτική Πελοπόννησο, ήταν η πηγή της εξέλιξης των δύο αμοιβαία μονοφυλετικών υποκλάσεων, που υποδηλώνει την πιθανή διαδικασία ειδογένεσης (Perea et al. 2016).

Οι Seifertová et al. (2011) χρησιμοποίησαν δεδομένα από πολυμορφικούς μικροδορυφορικούς δείκτες και αλληλουχία mtDNA του *cyt b* για την ανάλυση δεδομένων *Squalius cephalus* από ποτάμια της Ευρώπης που περιβάλλουν τη Μεσόγειο. Μέσω της μελέτης αποδεικνύεται ο σαφής διαχωρισμός σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες απλότυπων mtDNA, οι οποίες αντιστοιχούν σε τέσσερις κύριες φυλογενετικές γραμμές. Με βάση τα

μικροδορυφορικά δεδομένα, εντοπίζεται υψηλή απόκλιση μεταξύ όλων των ζευγών πληθυσμών, υποδηλώνοντας τον έντονο κατακερματισμό των ενδιαιτημάτων του γλυκού νερού. Οι εμφανείς αποκλίσεις των αποτελεσμάτων μεταξύ των μεσογειακών πληθυσμών, αντικατοπτρίζουν τη διαφορετική προέλευσή τους, καθώς και τη χαμηλή συμβολή τους στη γενετική δεξαμενή του γένους στην κεντρική Ευρώπη.

#### 1.4 Το είδος *Squalius orpheus*

Το είδος *Squalius orpheus*, κοινώς γνωστό ως Ποταμοκέφαλος Θράκης (Εικ. 2), περιγράφηκε αρχικά από τους Kottelat & Economidis (2006) στον ποταμό Έβρο στην Ελλάδα.



**Εικόνα 2:** *Squalius orpheus* (Kottelat & Freyhof 2007)

Μέχρι το 2006 θεωρούνταν εσφαλμένα μέρος του πληθυσμού του είδους *Squalius cephalus* στη νότια Ευρώπη, παρά την αναγνώριση της ποικιλομορφίας από ορισμένους

συγγραφείς. Η διαφορετική μορφολογία του είδους *S. orpheus* αποδείχθηκε βάσει μοριακών μελετών, υποδεικνύοντας τη διακριτή γενεαλογία. Το είδος είναι ενδημικό στα Βαλκάνια, και πληθυσμοί του έχουν εντοπιστεί σε εσωτερικά ύδατα Ελλάδας (Kottelat & Economidis 2006), Βουλγαρίας (Kolev 2013), Τουρκίας (Karatas et al. 2021) και Ρουμανίας (Docan et al. 2021). Η εξάπλωσή του στην Ελλάδα (Εικ. 3) εκτείνεται από τη λίμνη Βόλβη έως τον Έβρο. Εντοπίζεται και στη Θάσο, όπου πιθανώς εισήχθη (Koutsikos et al. 2012). Είναι ρεόφιλο και κατοικεί σε μεγάλη ποικιλία ενδιαιτημάτων, κυρίως σε μικρά ποτάμια και μεγάλα ρέματα, με μέτρια ροή. Σύμφωνα με τη λίστα της IUCN (2008), κατηγοριοποιείται ως Μειωμένου Ενδιαφέροντος (Least Concern), με μόνη απειλή την ξηρασία και εκτροπή των ποταμών.



**Εικόνα 3:** Γεωγραφική εξάπλωση του είδους στην Ελλάδα (Παπαθανασίου 2022).



Η γενετική ανάλυση αποκάλυψε συγγένειες του *S. orpheus* από τα υδάτινα συστήματα της Θράκης με τα τάξα *Squalius* των νήσων Λέσβου και Εύβοιας και τα τάξα *Squalius* της Τουρκίας (Geiger et al. 2014). Έρευνες επικεντρωμένες στο είδος, πραγματοποιήθηκαν, συγκρίνοντας δείγματα των πληθυσμών των ποταμών Νέστου - ανάντη και κατόντη των υδροηλεκτρικών φραγμάτων -, Στρυμόνα και Έβρου, με τη χρήση του μιτοχονδριακού γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης c (COI) (Σαπουνίδης 2014). Η ανάλυση υπέδειξε σημαντικό βαθμό γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ όλων των πληθυσμών των ποταμών. Περαιτέρω ανάλυση του γένους *Squalius* βάσει του γονιδίου COI, για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου και την έρευνα της τοπολογίας των πληθυσμών, υποστηρίζει ότι, οι γενετικές αποστάσεις δικαιολογούν την προτεινόμενη κατάταξη του είδους (Τσούπας 2018).

#### 1.5 Γονίδιο COI σε πληθυσμιακές μελέτες

Τα μιτοχόνδρια, ως ενδοκυτταρικά οργανίδια, είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού, της απόπτωσης και του ελέγχου του οξειδωτικού στρες. Το mtDNA είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο. Οι πρώτες μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας, σε επίπεδο DNA, αφορούσαν το mtDNA, λόγω μικρού μεγέθους, εύκολης απομόνωσης - σε σχέση με το πυρηνικό DNA - και ύπαρξης χιλιάδων αντιγράφων στο κύτταρο (Atig et al. 2009). Μελέτες έδειξαν ότι στο mtDNA, οι πολυμορφισμοί συσσωρεύονται με ταχύτερο ρυθμό, εξαιτίας των υψηλότερων ρυθμών μετάλλαξης του, και της απουσίας διορθωτικών μηχανισμών κατά

την αντιγραφή του (σε σχέση με το πυρηνικό DNA) (Wilson et al. 1985). Στα ζωικά κύτταρα, το mtDNA είναι απλοειδές και κληρονομείται από το θηλυκό γονέα. Επειδή οι απόγονοι κληρονομούν ένα γενότυπο mtDNA, και λόγω της έλλειψης ανασυνδιασμού κατά την αντιγραφή του, καθίσταται ιδιαίτερα χρήσιμο στην κατασκευή φυλογενετικών δέντρων (Birky et al. 1989), καθώς και στην έρευνα της εξελικτικής ιστορίας και γεωγραφικής προέλευσης των ατόμων ενός είδους (Lansman et al. 1981).

Πρόσφατα, παραδοσιακές μέθοδοι ταυτοποίησης των ειδών έχουν συμπληρωθεί με τη χρήση μοριακών δεικτών (Wheeler 2004). Μια δημοφιλής τέτοια προσέγγιση αποτελεί το DNA barcoding (Hebert et al. 2003), που χαρακτηρίζεται ως απλή, γρήγορη και προσιτή μέθοδος μοριακής ταυτοποίησης ειδών. Η μέθοδος στηρίζεται στην αλληλουχία ενός τμήματος του γονιδίου COI του mtDNA, για τον διαχωρισμό των ειδών και την αντιστοίχιση των ατόμων σε είδη.

Το COI είναι γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνες και επομένως εμφανίζει ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, δεν περιλαμβάνει κωδικόνια λήξης και ιντρόνια στην ευθυγράμμιση, που διαταράσσουν τη μετάφραση της αλληλουχίας DNA σε αμινοξέα (Buhay 2009). Η ταυτοποίηση πραγματοποιείται μέσω αλληλουχιών 650 ζευγών βάσεων (bp) (Park et al. 2010). Αποκαλύπτει κρυπτογραφημένη ποικιλομορφία, ταυτοποιώντας δείγματα, όταν τα χαρακτηριστικά τους έχουν προσδώσει εσφαλμένη ταξινόμηση, λόγω της μορφολογικής τους ομοιότητας (Hebert et al. 2003). Θραύσματα αυτού του γονιδίου χρησιμοποιούνται συχνά για την εξαγωγή συμπερασμάτων φυλογένεσης, καθώς καμία άλλη γενετική περιοχή δεν εντοπίζεται σε τόσες ταξινομικά επαληθευμένες βάσεις δεδομένων, με αλληλουχίες

που καλύπτουν πλήθος από τάξα, με σημαντικότερη τη βάση δεδομένων το σύστημα BOLD (<http://boldsystems.org/>).

## 1.6 Υποθέσεις έρευνας

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η πληθυσμιακή γενετική ανάλυση του είδους *S. orpheus* βάσει του μιτοχονδριακού γονιδίου COI και ο έλεγχος της διαφοροποίησης των πληθυσμών στα εσωτερικά ύδατα της Βόρειας Ελλάδας. Πρωταρχική υπόθεση της εργασίας είναι η διερεύνηση της ύπαρξης γενετικής διαφοροποίησης ανάντη και κατόντη των φραγμάτων του ποταμού Νέστου, ενώ δευτερευόντως, η σύγκριση και συσχέτιση των δειγμάτων με πληθυσμούς των ποταμών Έβρου και Κόσυνθου, και των λιμνών Βόλβης και Κερκίνης.

Ο ποταμός Νέστος είναι διασυνοριακός ποταμός μήκους 243 χλμ. που διασχίζει τα βουλγαροελληνικά σύνορα στη Νοτιοανατολική Ευρώπη. Ανήκει στους τρεις ποταμούς του Βορείου Αιγαίου που πηγάζουν από τη Βουλγαρία και διαθέτει λεκάνη απορροής έκτασης 5.479 km<sup>2</sup> (Marinon 1957). Βρίσκεται μοιρασμένος κατά το ήμισυ περίπου σε ελληνικό και βουλγαρικό έδαφος και διαμορφώνει ένα οικοσύστημα μείζονος σημασίας κατά το σύνολο της έκτασής του, από την πηγή του στο όρος Ρίλα μεταξύ οροσειρών Αίμου και Ροδόπης έως την εκβολή του στο Θρακικό Πέλαγος απέναντι από το νησί της Θάσου (Σαπουνίδης 2014). Η λεκάνη απορροής του ποταμού στην Ελλάδα οριοθετείται από γεωγραφικά πλάτη: 42° Βόρεια, 40,51° Νότια και γεωγραφικά μήκη: 25° Ανατολικά, 23,30° Δυτικά, διασχίζοντας τους νομούς Δράμας, Ξάνθης και Καβάλας. Το τμήμα της

λεκάνης που εντοπίζεται στο ελληνικό έδαφος χωρίζεται σε τρία τμήματα που περιλαμβάνουν το βόρειο ορεινό τμήμα, τα Στενά του Νέστου και το Δέλτα του ποταμού. Στο βόρειο ορεινό τμήμα σημειώνεται η ύπαρξη δυο φραγμάτων παραγωγής ενέργειας και παροχής αρδευτικού νερού - του «Θησαυρού» και της «Πλατανόβρυσης» - και αντίστοιχα οι δυο τεχνητοί τους ταμιευτήρες που επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα του νερού του ποταμού (Πετροδημοπούλου 2011). Κατά μήκος του Νέστου, το ποτάμιο σύστημα είναι κυρίως ορεινό, με εξαίρεση το Δέλτα του και επομένως ο αριθμός των ειδών ιχθύων που εντοπίζονται σε αυτό είναι μικρότερος, συγκριτικά με τα δύο γειτονικά ποτάμια του Βορείου Αιγαίου της περιφέρειας Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης, των Στρυμόνα και Έβρου. Το σύνολο των ενδημικών ειδών είναι ιδιαίτερα αντιπροσωπευτικό και αποτελείται από κεντροευρωπαϊκά (Central European), πανευρωπαϊκά (pan European) και παλαιαρκτικά (Palearctic) είδη, καθώς και ενδημικές μορφές της Ανατολίας (Economidis & Banarescu 1991).

Το Δέλτα του και οι παράκτιες λιμνοθάλασσες που σχηματίζονται κοντά στις εκβολές του ποταμού προστατεύονται από τη Σύμβαση Ραμσάρ και υπάγονται στο δίκτυο Natura 2000 της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

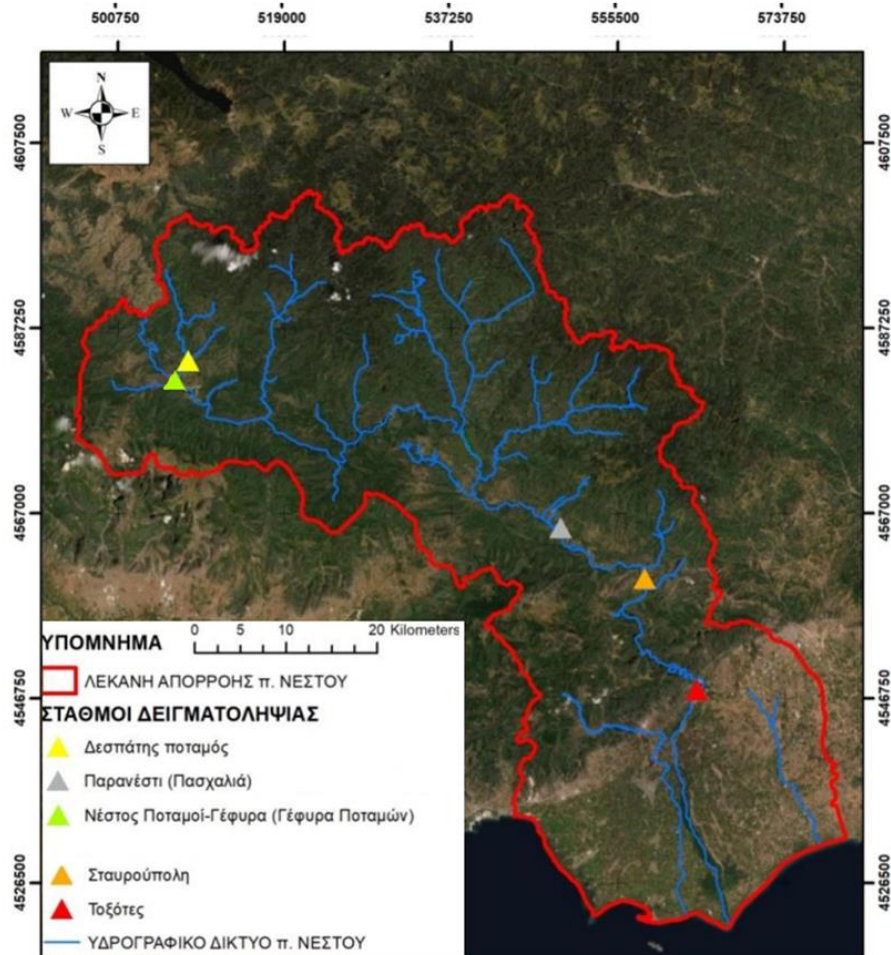
Η παρούσα ανάλυση πραγματοποιείται υπό το πρίσμα της εξέτασης της προσφερόμενης βιβλιογραφίας, με στόχο την εξαγωγή πρώτων συμπερασμάτων για την κατάταξη των πληθυσμών και τη συγκριτική ανάλυση των τελευταίων με τα πρωτογενή δεδομένα που προέκυψαν από την έρευνα των συγγραφέων της εργασίας.

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Περιοχή δειγματοληψίας

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν τις ημερομηνίες 9-10/7/2020, στις περιοχές: Γέφυρα Νέστου και Δεσπάτης ποταμός ανάντη των φραγμάτων, και Τοξότες, Πασχαλιά (Παρανέστι), και Σταυρούπολη κατάντη των φραγμάτων (Εικ. 4). Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με φορητή συσκευή ηλεκτραλιείας σύμφωνα με το ευρωπαϊκό πρωτόκολλο CEN 2003. Η ηλεκτραλιεία αποτελεί αποτελεσματικό τρόπο σύλληψης ιχθύων αποκλειστικά για ερευνητικούς σκοπούς (Reynolds 1996). Οι απαραίτητες άδειες για τη δειγματοληψία χορηγήθηκαν από το Υπουργείο Περιβάλλοντος, Ενέργειας και Κλιματικής Αλλαγής.

Οι ιχθύες που συνελήφθησαν συντηρήθηκαν σε πάγο εφαρμόζοντας ευζωία κατά τη θανάτωση και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο του τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ο χειρισμός των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τις τοπικές κατευθυντήριες γραμμές για τη μεταχείριση των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (σύμφωνα με την Επίσημη Εφημερίδα της Ελληνικής Κυβέρνησης αριθ. 106/30 του Απρίλη 2013). Στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, ακολουθήθηκαν οι κανόνες υγιεινής του εργαστηρίου και τηρήθηκαν τα κατάλληλα πρωτόκολλα.



**Εικόνα 4:** Περιοχές δειγματοληψίας στον ποταμό Νέστο (αρχική εικόνα Parathanasiou & Psilonikos 2022).

## 2.2 Εξαγωγή γενετικού υλικού

Στα υλικά και μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο περιλαμβάνονται:

λαβίδα, νυστέρι, τρυβλίο Petri, Eppendorf 1,5mL, πιπέτες 2-20μL, 20-200μL, 100-1000μL και τα αντίστοιχα ρύγγη, υδατόλουτρο, φυγόκεντρος (Centrifuge 5804 R, Eppendorf,

Germany), θερμοκυκλοποιητής, θάλαμος αποστείρωσης υπεριώδους ακτινοβολίας, φούρνος μικροκυμάτων, ποτήρι ζέσεως, ζυγός ακριβείας, ογκομετρικές φιάλες.

Η απομόνωση ποσότητας σάρκας από την περιοχή του ουραίου ή πλευρικού περυγίου, για την εξαγωγή γενετικού υλικού, πραγματοποιήθηκε μετά την αφαίρεση λεπιών με αποστειρωμένο νυστέρι. Ο ιστός έπειτα τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο Eppendorf (Biologix, BMT-15N) και παρέμεινε σε αλκοόλη 90% στην κατάψυξη μέχρι την εξαγωγή DNA.

Το πρωτόκολλο πυκνού χλωριούχου νατρίου (Aljanabi & Martinez 1997) που ακολουθήθηκε για τα 14 δείγματα αναγράφεται παρακάτω και αποτελείται από τα στάδια:

- Τοποθέτηση τμήματος ιστού 1mg σε αποστειρωμένο Eppendorf χωρητικότητας 1.5mL με βοήθεια λαβίδας και νυστεριού.
- Προσθήκη 400μL lysis buffer (0,4M NaCl, 10mM Tris-HCL, 2mM EDTA με pH 8). Το lysis buffer διαλύει την πυρηνική και κυτταρική μεμβράνη και απελευθερώνει το γενετικό υλικό. Διατηρεί το pH 8 σταθερό κατά τη διάρκεια της εξαγωγής του DNA. Το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης διατηρεί την ακεραιότητα του DNA, διαχωρίζει το DNA από άλλα κυτταρικά υπολείμματα και το προστατεύει από την όξινη αποικοδόμηση.
- Προσθήκη 80μL 10% SDS -απορρυπαντικό που βοηθάει στη λύση των κυττάρων κατά την εξαγωγή DNA
- Προσθήκη 8μL πρωτεΐνάσης K (συγκέντρωσης 20mg/mL) που μετουσιώνει τις πρωτεΐνες. Ακολουθεί ελαφρά ανακίνηση με vortex.

- Τα δείγματα τοποθετούνται για επώαση στο υδατόλουτρο όλο το βράδυ σε θερμοκρασία 55-65°C ώστε να αποικοδομηθούν οι πρωτεΐνες των κυττάρων και να απελευθερωθεί το DNA.
- Προσθήκη 300μL NaCl 6M. Το NaCl βοηθά στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες με το DNA.
- Ανάδευση με vortex
- Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 12.000 στροφές για 10 λεπτά
- Αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και τοποθέτηση σε νέο Eppendorf χωρητικότητας 1,5mL
- Προσθήκη στο διάλυμα ίσης ποσότητας (500μL) ισοπροπανόλης (σε θερμοκρασία -20°C, επιτρέπει την εξαγωγή μεγαλύτερης ποσότητας DNA για τη συσσώρευση και σχηματισμό ορατού λευκού ιζήματος).
- Ανάδευση με vortex
- Τοποθέτηση σε ψύξη στους -20°C για 1 ώρα
- Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 12.000 στροφές για 10 λεπτά
- Απομάκρυνση υπερκείμενου (ισοπροπανόλης) και προσθήκη 200μL αιθανόλης 70% στην πελέτα
- Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 12.000 στροφές για 5 λεπτά
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα πελέτας με 200μL αιθανόλης 70%
- Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 12.000 στροφές για 5 λεπτά
- Απομάκρυνση αιθανόλης και αφυδάτωση πελέτας σε θερμοκρασία δωματίου ή στον κλίβανο επώασεως με ανοιχτό πόμα για περίπου 20 λεπτά στους 40°C. Για τη



σωστή λειτουργία της PCR πρέπει τα υπολείμματα αιθανόλης να εξατμιστούν πλήρως.

- Προσθήκη 20μL διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) στα φιαλίδια με το απομονωμένο DNA. Για την επίτευξη της καλύτερης διάλυσης τα δείγματα τοποθετούνται στο ψυγείο (4°C) για μία ημέρα περίπου.

Η αποτελεσματικότητα της εξαγωγής DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση όλων των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% w/v σε TBE, παρατήρηση σε υπεριώδες φως (UV) και φωτογράφιση του πηκτώματος (Εικ. 5). Ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τα προϊόντα της PCR με πήκτωμα αγαρόζης 1,2% w/v σε TBE (Εικ. 6).

### 2.3 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Για την εκκίνηση της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης, αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα.

- Σε θερμοανθεκτική κωνική φιάλη τοποθετείται 0,8g σκόνης αγαρόζης σε 100mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1x (10,8g Tris-HCl, 5,5g Boric acid, 4 ml EDTA 0,5M pH 8) και διαλύεται στο φούρνο μικροκυμάτων (KENWOOD microwave) για 3 λεπτά στους 90°C μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Έπειτα τοποθετείται κάτω από τρεχούμενο νερό ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία του.
- Όταν η θερμοκρασία του μειωθεί στους 50°C προστίθενται 4μL βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το EtBr έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA

και να φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως, ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες γενετικού υλικού στην πηκτή της αγαρόζης.

- Η πηκτή αγαρόζης τοποθετείται στο εκμαγείο με προσοχή ώστε να μην σχηματιστούν φυσαλίδες και προστίθεται χτένα ώστε να δημιουργηθούν οι οπές, τα «πηγάδια» που θα δεχθούν αργότερα τα δείγματα DNA.
- Όταν σταθεροποιηθεί η πηκτή, η χτένα αφαιρείται και το εκμαγείο τοποθετείται μέσα στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης. Ρυθμιστικό διάλυμα TBE προστίθεται μέχρι να καλυφθεί μόλις το πήκτωμα.

Σε κάθε πηγάδι φορτώθηκε με πιπέτα (με την τεχνική by pipetting) ποσότητα 6μL: 4μL DNA δείγματος αναμιγμένη με 2 μL διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) χρωστικής Blue-bromophenol (Invitrogen). Στο πρώτο πηγάδι φορτώθηκε ποσότητα 1 μL μάρτυρα (DNA Ladder) μοριακού βάρους 1Kb και 2 μL διαλύματος φόρτωσης. Το διάλυμα φόρτωσης χρωματίζει τα δείγματα και διευκολύνει την φόρτωση στα πηγάδια του πηκτώματος. Περιέχει επίσης γλυκερόλη, η οποία αυξάνει την πυκνότητα του μοριακού υλικού, το οποίο κατακάθεται στον πυθμένα του πηγαδιού της ηλεκτροφόρησης. Ο μάρτυρας στο πρώτο πηγάδι, υπό υπεριώδες φως δίνει συγκεκριμένες γνωστές ζώνες, και η σύγκρισή του με τα δείγματα προσφέρει τον κατά προσέγγιση υπολογισμό των μηκών των ζωνών των δειγμάτων. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ομοιόμορφο πεδίο τάσης (90 volt) από το τροφοδοτικό (CONSORT E143) στη συσκευή (SCIE-PLAS) 30 λεπτά, μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα TBE σταθερού pH 8. Ακολούθησε παρατήρησή της πηκτής κάτω από υπεριώδες φως και φωτογράφιση από την συσκευή DNR, MiniBisBio-ImagingSystems.

## 2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η διαδικασία της PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (BIOER Life Touch) για την ενίσχυση τμήματος του μιτοχondριακού γονιδίου COI. Το πρωτόκολλο PCR που εφαρμόστηκε αποτελείται από 30 κύκλους αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης με συνθήκες:

- 1) 95°C για 15 λεπτά (αρχική αποδιάταξη)
- 2) 95°C για 1 λεπτό (αποδιάταξη)
- 3) 50°C για 45 δευτερόλεπτα (υβριδοποίηση εκκινήτη)
- 4) 72°C για 1 λεπτό (επιμήκυνση)
- 5) Επανάληψη του 2<sup>ου</sup>, 3<sup>ου</sup>, 4<sup>ου</sup> σταδίου για 30 κύκλους
- 6) 72°C για 10 λεπτά (τελική επιμήκυνση)
- 7) 10°C έως την αφαίρεση των δειγμάτων από την PCR

Η τεχνική της Gradient PCR εφαρμόστηκε στα δείγματα, με θερμοκρασίες 48-58°C, για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινήτων. Αναλυτικά οι θερμοκρασίες ήταν: 48°C, 48,2°C, 48,6°C, 49,5°C, 50,6°C, 52°C, 53,7°C, 55,1°C, 56,2°C, 57,2°C, 57,7°C, 58°C.

Οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν για να τοποθετηθούν τα δείγματα ήταν: 48°C, 48,6°C, 50,6°C, 52°C, 55,1°C, 58°C.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για την κατασκευή του mastermix της PCR που απεικονίζονται παρακάτω (Πιν. 1) προστέθηκαν σε ένα Eppendorf 1,5mL

πολλαπλασιασμένες επί τον αριθμό των 15 δειγμάτων - 14 δείγματα DNA και 1 τυφλό (negative control).

**Πίνακας 1:** Συστατικά PCR mastermix

Συστατικά	Αρχικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR	Όγκος ανά δείγμα (μL)
DNA		1
PCR Buffer (Invitrogen)	5x	5
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen)	25mM	2
dNTP's (Invitrogen)	10mM	0,2
Forward primer (Invitrogen)	10 μM	0,5
Reverse primer (Invitrogen)	10 μM	0,5
Taq DNA Polymerase (Invitrogen)	5 units/μL	0,2
H <sub>2</sub> O		10,6

Σε 14 αριθμημένα Eppendorf PCR tubes των 200μL προστέθηκε 1μL DNA από αντίστοιχο δείγμα και 19 μL από το μίγμα mastermix. Στο 15<sup>ο</sup> Eppendorf προστέθηκαν 19 μL μίγματος mastermix χωρίς DNA, για τη χρήση του ως τυφλό δείγμα. Οι αλληλουχίες

των οικουμενικών εκκινητών (primer) που χρησιμοποιήθηκαν για το εξεταζόμενο γονίδιο ήταν οι : LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3' - Forward Primer) και HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3' - Reverse Primer) (Folmer et al. 1994).

## 2.5 Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων PCR

Η αποτελεσματικότητα της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση των 15 δειγμάτων της PCR σε πήκτωμα αραρόζης 1,2% σε TBE. Το πήκτωμα και η συσκευή ηλεκτροφόρησης προετοιμάστηκαν όπως στην ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απομονωμένου DNA. Τα δείγματα που προέκυψαν από την PCR φορτώθηκαν στα πηγάδια. Ο όγκος σε κάθε πηγάδι είναι 10μL: 8 μL από το τελικό προϊόν της PCR και 2μL διάλυμα φόρτωσης. Έγινε επίσης χρήση 1μL μάρτυρα (Ladder) 100 bp και 2μL διαλύματος φόρτωσης. Μετά την ηλεκτροφόρηση έγινε παρατήρηση του πηκτώματος σε υπεριώδες φως (UV) και φωτογράφιση.

## 2.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Το σύστημα Blast, της βάσης δεδομένων GenBank ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (NCBI) αναγνώρισε τις αλληλουχίες *S. orpheus*. Μέσω του συστήματος NCBI (πρόσβαση 17/3/22), και αφού

πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα στη βάση δεδομένων του γονιδίου COI, έγινε ανάκτηση 8 ακόμη αλληλουχιών του είδους από τον Βόρειο ελλαδικό χώρο, συγκεκριμένα από τις περιοχές των ποταμών Έβρου, Νέστου, Κόσυνθου και των λιμνών Κερκίνη, Βόλβη, για τη σύγκριση και συσχέτιση με τον αρχικό αριθμό δειγμάτων. Τα προγράμματα με τα οποία έγινε επεξεργασία των αλληλουχιών και ελέγχθηκε η φυλογενετική σχέση ανάμεσα στα άτομα του είδους ήταν τα: Aliview, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), Fabox, Arlequin και popArt.

Με τη χρήση του προγράμματος Aliview (v.1.28) (Larsson 2014) έγινε συστοιχία των αλληλουχιών της ανάλυσης PCR και αφαιρέθηκαν περιοχές νουκλεοτιδίων στην αρχή και το τέλος των αλληλουχιών, όπου εμφανίστηκε μεγαλύτερη ασυμβατότητα, για την βελτίωση της στοίχισης.

Το πρόγραμμα MEGA (v.1.1) περιλαμβάνει εύρος επιλογών για τη συναρμολόγηση ευθυγραμμίσεων ακολουθιών, την εξαγωγή συμπερασμάτων για εξελικτικά δέντρα και προγονικές ακολουθίες, την εκτίμηση γενετικών αποστάσεων και διαφοροποιήσεων (Tamura et al. 2021). Με τη χρήση του οπτικοποιήθηκαν οι αλληλουχίες της ανάλυσης PCR των δειγμάτων και κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum likelihood) με 10.000 επαναλήψεις bootstrap (Εικ. 7). Η Μέγιστη Πιθανοφάνεια είναι μια μέθοδος για την εξαγωγή συμπερασμάτων φυλογένεσης, που αξιολογεί την πιθανότητα μιας εξελικτική υπόθεσης. Η μέθοδος αναζητά το δέντρο με την υψηλότερη εξελικτική πιθανότητα. Τα μήκη των κλάδων του δέντρου προσαρμόζονται με στόχο τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας του συνόλου δεδομένων για την εν λόγω τοπολογία, σύμφωνα με το επιθυμητό μοντέλο εξέλιξης. Οι υποθέσεις αξιολογούνται βάσει

της πιθανότητας το προτεινόμενο μοντέλο, και η υποτιθέμενη υπόθεση να οδηγήσουν στο παρατηρούμενο σύνολο δεδομένων (Opperdoes 1997). Η διαδικασία bootstrap προσφέρει αξιολόγηση του φυλογενετικού δέντρου, υποδεικνύοντας τον αριθμό των φορών από τις 100 που σχηματίστηκαν οι κλάδοι του δέντρου, δοκιμάζοντας υποθέσεις των δεδομένων (Soltis & Soltis 2003).

Το πρόγραμμα FaBox (v.1.61) (Villesen 2007) αποτελεί ηλεκτρονική εργαλειοθήκη χειρισμού DNA, και με τη χρήση του έγινε προσδιορισμός κοινών απλότυπων των πληθυσμών του είδους που χρησιμοποιήθηκαν για μετέπειτα στατιστικές αναλύσεις.

Το πρόγραμμα Arlequin (v.3.5.2.2) (Excoffier & Lischer 2010) είναι λογισμικό ανάλυσης δεδομένων πληθυσμιακής γενετικής και προσφέρει ένα σύνολο βασικών μεθόδων και στατιστικών δοκιμών, προκειμένου να εξάγει πληροφορίες σχετικά με τη γενετική και τα δημογραφικά χαρακτηριστικά συλλογής πληθυσμιακών δειγμάτων. Μέσω του προγράμματος προσφέρονται δυνατότητες υπολογισμού της διακύμανσης μεταξύ πληθυσμών ( $F_{ST}$ ), και της τιμής σημαντικότητας (p-value) της. Η ανά ζεύγη  $F_{ST}$  με τιμές από 0-1 μετρά τη δομή του πληθυσμού και παρέχει πληροφορίες εάν είναι γενετικά διακριτή μεταξύ των δυο ερευνώμενων πληθυσμών. Το p-value δείχνει τη στατιστική σημασία των αποτελεσμάτων (Reynolds et al. 1983). Στο πρόγραμμα Arlequin, οι 5 υπό μελέτη πληθυσμοί ομαδοποιήθηκαν γεωγραφικά σε 3 ομάδες στη Βόρεια Ελλάδα, βάσει της εξάπλωσης του *S. orpheus* Ανατολικά προς Δυτικά. Η ομάδα Ανατολικά περιλαμβάνει τα δείγματα του ποταμού Έβρου. Η ομάδα Κεντρικά περιλαμβάνει τα δείγματα που ποταμού Νέστου και του ποταμού Κόσυνθου. Η ομάδα Δυτικά περιλαμβάνει τα δείγματα

της λίμνης Κερκίνης και της λίμνης Βόλβης (Πιν. 2). Οι απαραίτητες συντεταγμένες των περιοχών λήφθηκαν από το Google Maps (<https://www.google.com/maps>).

**Πίνακας 2:** Γεωγραφικές συντεταγμένες και περιοχές δειγματοληψίας της Βόρειας Ελλάδας.

Περιοχή Δειγματοληψίας	Αριθμός Δειγμάτων	Γεωγραφικές Συντεταγμένες
Έβρος	3	40.924198°, 26.271751°
Νέστος	9	40.876252°, 24.794481°
Κόσυνθος	1	41.131097°, 24.918212°
Κερκίνη	2	41.208153°, 23.131443°
Βόλβη	1	40.680461°, 23.471134°

Η Ανάλυση Μοριακής Διακύμανσης (AMOVA) των πληθυσμών έδωσε στατιστικά αποτελέσματα για τη μοριακή απόκλιση μεταξύ ομάδων, διαπληθυσμιακά μεταξύ των ομάδων και ενδοπληθυσμιακά και τη στατιστική σημαντικότητά τους. Πραγματοποιήθηκε επίσης έλεγχος Tajima's D (1989), με σκοπό τη διάκριση μεταξύ των απλότυπων DNA που εξελίσσονται τυχαία και αυτών που εξελίσσονται υπό μια μη τυχαία διαδικασία. Ο έλεγχος απαιτεί αλληλουχίες τουλάχιστον 3 ατόμων ανά δείγμα πληθυσμού, επομένως αναφέρονται τα αποτελέσματα των περιοχών Νέστου και Έβρου.

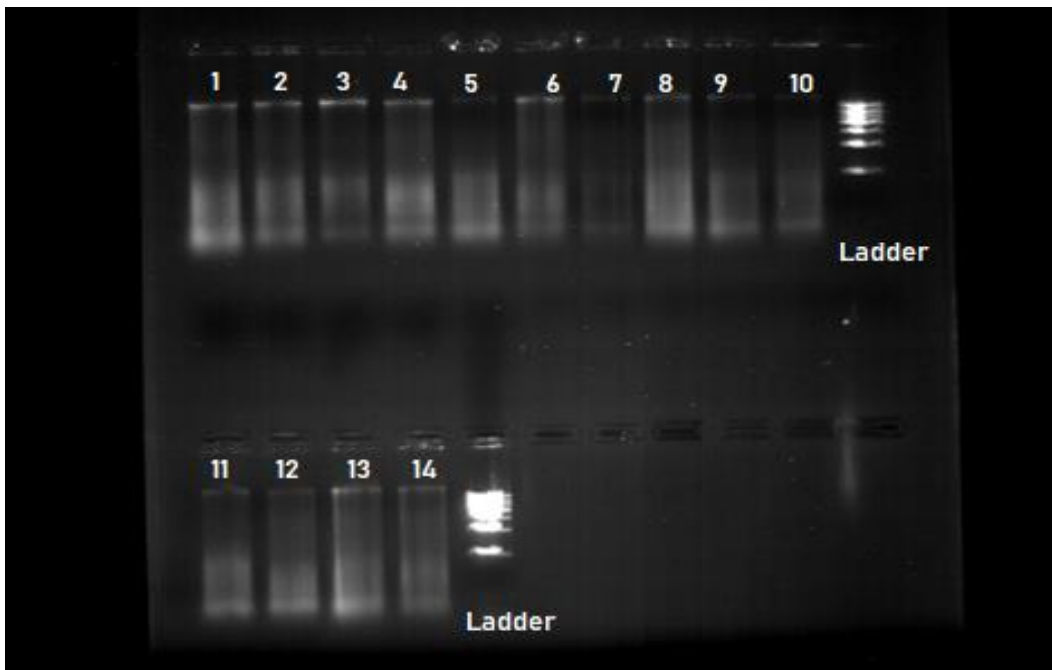
Από γραφική άποψη, οι απλότυποι ταξινομήθηκαν σε ένα δίκτυο κάνοντας χρήση του προγράμματος PopART (v.1.7) (Leigh & Bryant 2015), ενός ελεύθερου λογισμικού



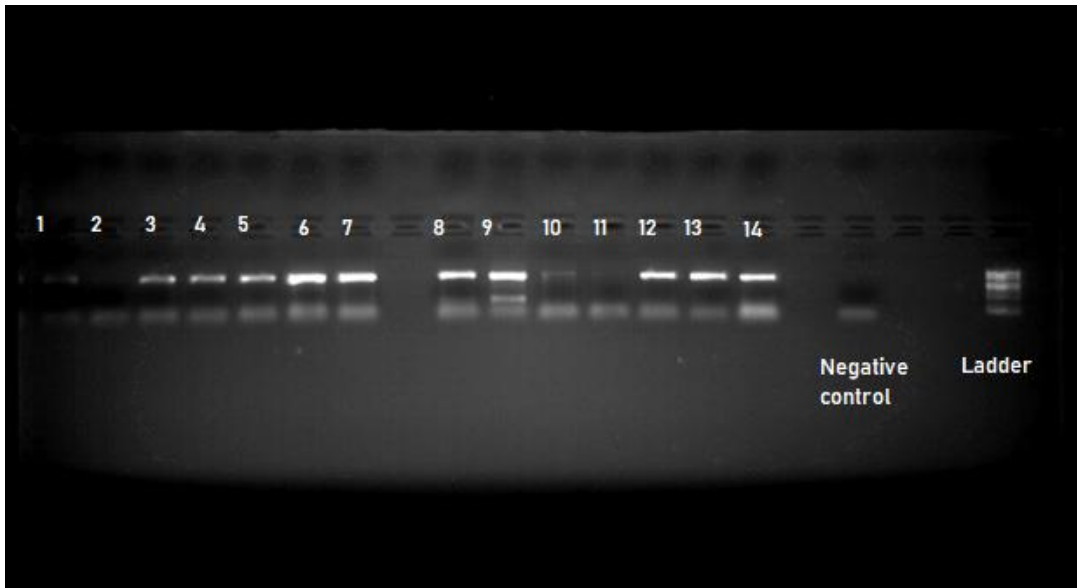
γενετικής πληθυσμών (<http://popart.otago.ac.nz/index.shtml>), με την επιλογή «Map View». Σχεδιάστηκε επίσης το διάγραμμα Median Joining Network, μέθοδος που επιτρέπει την ομαδοποίηση και σύνδεση των απλότυπων των πληθυσμών. Η μέθοδος κατασκευάζει δίκτυα από δεδομένα πληθυσμών (χωρίς ανασυνδυασμούς) που συνδέει χαρακτηριστικά του αλγορίθμου Kruskal για την εύρεση ελάχιστων δένδρων διασποράς, ευνοώντας τις σύντομες συνδέσεις (Bandelt et al. 1999).

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά την απομόνωση γενετικού υλικού του *S. orpheus*, μέσω της τεχνική Gradient PCR που εφαρμόστηκε στα δείγματα, βρέθηκε η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού του εκκινητή COI 50,6°C, η οποία χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία PCR. Τα αντίστοιχα πηκτώματα ηλεκτροφόρησης παρατηρήθηκαν υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Στην Εικόνα 5, διακρίνεται η ηλεκτροφόρηση των 14 δειγμάτων εξαγωγής DNA *S. orpheus* και ο μάρτυρας (Ladder) 1 kb που χρησιμοποιήθηκε δυο φορές για τη σύγκριση των δυο σειρών δειγμάτων. Στην Εικόνα 6, αντίστοιχα, διακρίνονται τα 14 δείγματα DNA, ενισχυμένα μέσω PCR, το τυφλό δείγμα (Negative Control) και ο μάρτυρας 100 bp.



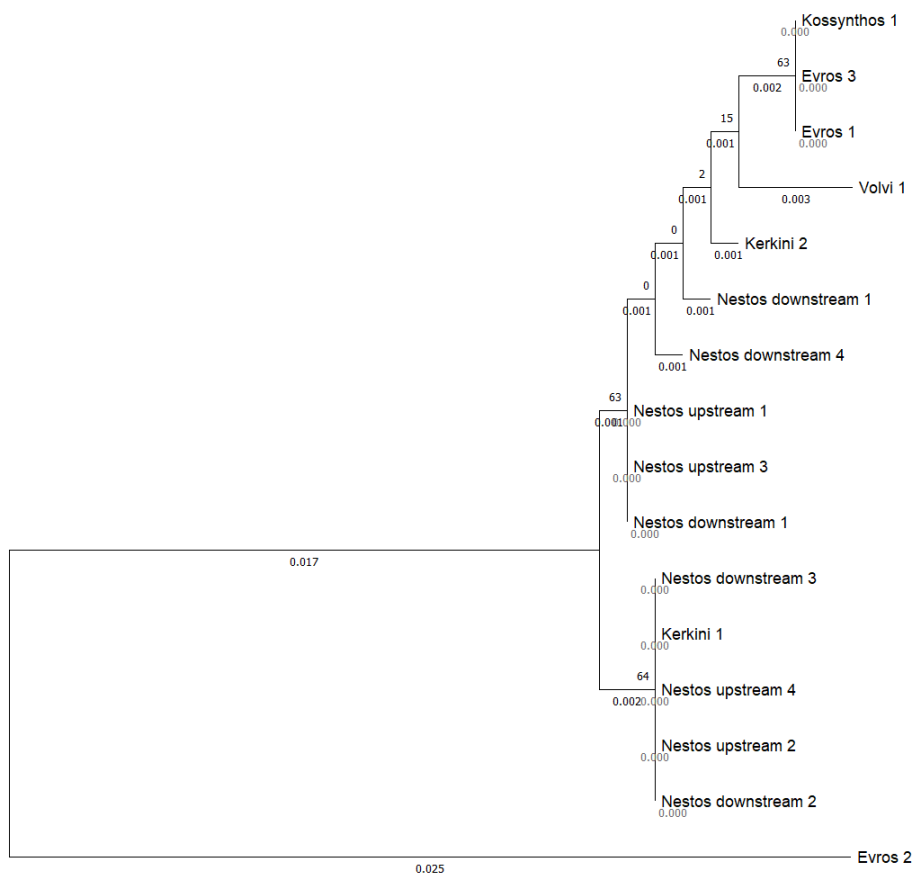
Εικόνα 5: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης απομόνωσης DNA.



**Εικόνα 6:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης διαδικασίας PCR.

Το σύστημα Blast αναγνώρισε 8 αλληλουχίες *S. orpheus* από τα 14 δείγματα του ποταμού Νέστου. Το πρόγραμμα MEGA σχεδίασε φυλογενετικό δέντρο Μέγιστης Πιθανοφάνειας με 10.000 επαναλήψεις bootstrap (Εικ. 7). Για το συγκεκριμένο δέντρο οι πληθυσμοί του Νέστου χωρίστηκαν σε άτομα που αλιεύτηκαν ανάντη και κατόντη των φραγμάτων, σύμφωνα με τα δεδομένα των δειγματοληψιών. Με τον τρόπο αυτό ελέγχθηκε εάν υπάρχει ομαδοποίηση και διαχωρισμός των ατόμων γενετικά, ανάντη και κατόντη των φραγμάτων του ποταμού. Το νούμερο πάνω από τους κόμβους υποδεικνύει τον αριθμό των φορών από τις 100 που σχηματίστηκαν οι κλάδοι του δέντρου. Οι γενετικές αποστάσεις παρατίθενται κάτω από τους κλάδους. Η κλίμακα του φυλογενετικού δέντρου (εδώ 0,01) ορίζει την γενετική απόσταση (Mello 2018), και τις αντικαταστάσεις των βάσεων υπάρχουν ανά περιοχή. Οι τιμές που εντοπίζονται στους κόμβους του δέντρου είναι από 0 έως 64. Οι μεγαλύτερες τιμές παρατηρούνται στο διαχωρισμό δειγμάτων Νέστου (63),

Έβρου-Κόσυνθου (63), και Νέστου Κερκίνης (64). Εδώ η κλίμακα υποδεικνύει ότι σε κάθε 100 βάσεις εντοπίζεται μία αντικατάσταση. Το πιο γενετικά διαφοροποιημένο άτομο φαίνεται να ανήκει σε πληθυσμό του Έβρου με γενετική απόσταση 0,025. Φαίνεται ότι δεν υπάρχει ιδιαίτερη γενετική διαφοροποίηση στα άτομα ανάντη και κατόντη των φραγμάτων που ελέγχθηκαν, τονίζεται όμως ότι το δείγμα του Νέστου αποτελείται από 9 άτομα και επομένως τα γενικότερα συμπεράσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά, όπως φαίνεται και από τις τιμές bootstrap στους διαχωρισμούς των κλάδων.



**Εικόνα 7:** Φυλογενετικό δέντρο *S. orpheus* Μέγιστης Πιθανοφάνειας (MEGA v.11).

Μέσω της επεξεργασίας του προγράμματος Aliview, προέκυψαν αλληλουχίες μεγέθους 615 γενετικών θέσεων. Με το πρόγραμμα FaBox έγινε προσδιορισμός των 5 κοινών απλότυπων των πληθυσμών που χρησιμοποιήθηκαν για μετέπειτα στατιστικές αναλύσεις. Για όλες τις στατιστικές επεξεργασίες που υπέστη το σύνολο των δεδομένων, τονίζεται ότι η ισχύς των αναλύσεων μειώθηκε λόγω του περιρισμένου αριθμού των δειγμάτων του. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας του προγράμματος Arlequin απέδωσαν τους παρακάτω πίνακες  $F_{ST}$  και p-value για τους πληθυσμούς όπως παρουσιάζονται. Το  $F_{ST}$  ανά ζεύγη μετρά τη δομή του πληθυσμού, ως μέτρο της διαφοροποίησης λόγω γενετικής δομής. Οι τιμές του Πίνακα 3 κυμαίνονται από 0,333 έως 0,773. Οι αρνητικές τιμές υποδηλώνουν ομοιογένεια του δείγματος, και η τιμή 1 μεταξύ των πληθυσμών Κόσυνθου και Βόλβης, οφείλεται στην ύπαρξη μοναδικής αλληλουχίας και δεν αποτελεί στατιστικά σημαντικό συμπέρασμα. Σημαντικές τιμές εντοπίζονται μεταξύ των πληθυσμών Νέστου και Κόσυνθου (0,615), Νέστου και Έβρου (0,381), Νέστου και Βόλβης (0,773), Βόλβης και Κερκίνης (0,6).

**Πίνακας 3:** Ανά ζεύγη διακύμανση πληθυσμών (Population pairwise  $F_{STs}$ )

	Νέστος	Κόσυνθος	Έβρος	Βόλβη	Κερκίνη
Νέστος	0,00000				
Κόσυνθος	0,61538	0,00000			
Έβρος	0,38072	-1,00000	0,00000		
Βόλβη	0,77273	1,00000	-0,51724	0,00000	
Κερκίνη	-0,42950	0,33333	-0,15433	0,60000	0,00000

Το p-value υποδεικνύει την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς. Στον Πίνακα 4 επισημαίνεται με έντονη γραφή η τιμή των πληθυσμών που εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική γενετική διαφοροποίηση, μεταξύ των πληθυσμών Νέστου και Έβρου, με τιμή p-value  $0,00901 \pm 0,009$ , μικρότερη από 0,05. Οι υπόλοιπες τιμές p-value είναι μεγαλύτερες από 0,05 και επομένως στατιστικά μη σημαντικές.

**Πίνακας 4:**  $F_{ST}$  p-values (αριθμός μεταθέσεων : 110)

	Νέστος	Κόσυνθος	Έβρος	Βόλβη	Κερκίνη
Νέστος	*				
Κόσυνθος	$0,99099 \pm 0,003$	*			
Έβρος	<b><math>0,00901 \pm 0,009</math></b>	$0,99099 \pm 0,003$	*		
Βόλβη	$0,99099 \pm 0,003$	$0,99099 \pm 0,003$	$0,99099 \pm 0,003$	*	
Κερκίνη	$0,99099 \pm 0,003$	$0,59459 \pm 0,055$	$0,65766 \pm 0,027$	$0,27027 \pm 0,054$	*

Το πρόγραμμα Arlequin πραγματοποίησε ανάλυση μοριακής παραλλακτικότητας (AMOVA) μεταξύ ομάδων, διαπληθυσμιακά εντός ομάδων και ενδοπληθυσμιακά. Αρνητικές τιμές θεωρούνται άκυρες και δεν λαμβάνονται υπόψη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της AMOVA, παρατηρήθηκε ότι το 30,49% της συνολικής γενετικής ποικιλότητας οφείλονταν σε διαφορές μεταξύ των ομάδων Ανατολικά, Κεντρικά και

Δυτικά, ενώ το σημαντικότερο ποσοστό 78,80% οφείλονταν σε διαφορές ενδοπληθυσμιακά, χωρίς όμως στατιστικά σημαντικό p-value.

**Πίνακας 5:** Ανάλυση Μοριακής Διακύμανσης AMOVA

Διακύμανση	Βαθμοί ελευθερίας	Άθροισμα τετραγώνων	Συνιστώσες διακύμανσης	% Διακύμανσης	p-value 0,2512
Μεταξύ ομάδων	2	7,158	0,611 Va	30,49	
Διαπληθυσμιακά εντός ομάδων	2	2,578	-0,186 Vb	-9,29	
Ενδοπληθυσμιακά	11	17,389	1,580 Vc	78,80	
Σύνολο	15	27,125	2,006		

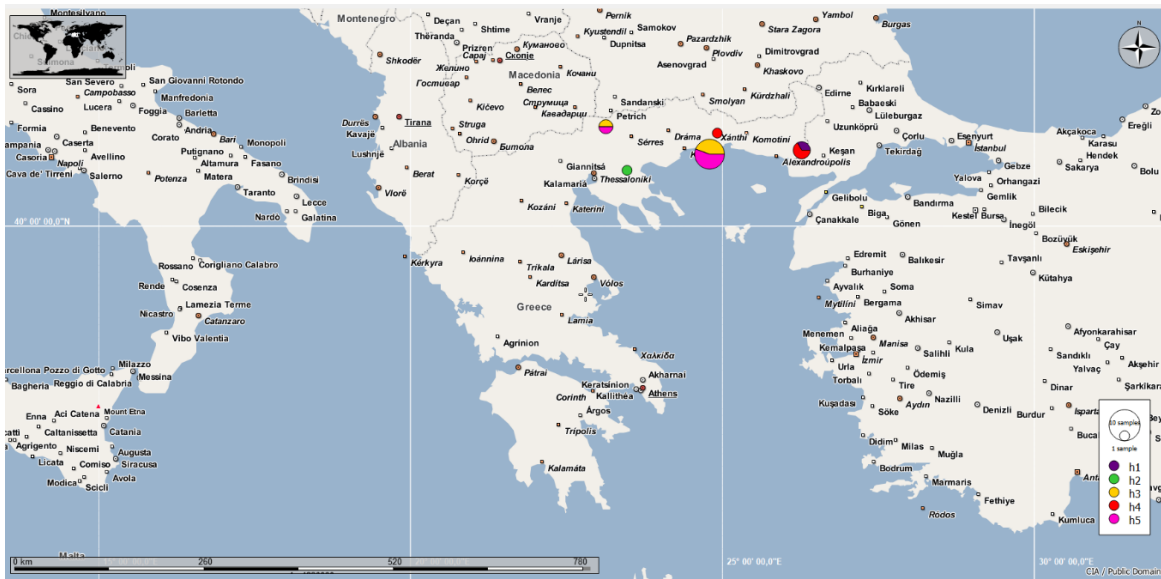
Η ανάλυση Tajima's D πραγματοποιείται για τη διάκριση μεταξύ των απλότυπων DNA που εξελίσσονται τυχαία και αυτών που εξελίσσονται υπό μια μη τυχαία διαδικασία. Ο έλεγχος απαιτεί αλληλουχίες τουλάχιστον 3 ατόμων ανά δείγμα πληθυσμού. Τα αποτελέσματα του Έβρου επομένως αντιστοιχούν σε ακριβώς 3 άτομα, με αντίστοιχο μη σημαντικό p-value (1,000). Για τα δείγματα του Νέστου η τιμή βρέθηκε 1,401, με p-value στατιστικά μη σημαντικό (0,971).

**Πίνακας 6:** Ανάλυση Tajima's D

Στατιστικά	Νέστος	Έβρος
Μέγεθος δείγματος	9	3
S	1	22
Pi	0,555	14,666
Tajima's D	1,401	0,000
Tajima's D p-value	0,971	1,000

Το πρόγραμμα popArt ταξινομεί τους απλότυπους σε ένα δίκτυο πάνω σε χάρτη όπου εντοπίζονται οι τοποθεσίες και οι απλότυποι που αντιστοιχούν σε κάθε περιοχή ομαδοποιημένοι (Εικ. 8). Το μέγεθος του κάθε κύκλου αντιστοιχεί στο μέγεθος του δείγματος. Τα διαφορετικά χρώματα διαχωρίζουν τους απλότυπους στις περιοχές. Συγκεκριμένα, η περιοχή του Έβρου φαίνεται να αποτελείται από δυο απλότυπους (h1 και h4), δυο διαφορετικούς επομένως πληθυσμούς. Ο Νέστος επίσης αποτελείται από δυο απλότυπους (h3 και h5), όμοιους με την Κερκίνη. Η Βόλβη φαίνεται να έχει έναν ξεχωριστό απλότυπο (h2) και στον Κόσυνθο εντοπίζεται ένας απλότυπος (h4) που εμφανίζεται και στον Έβρο.

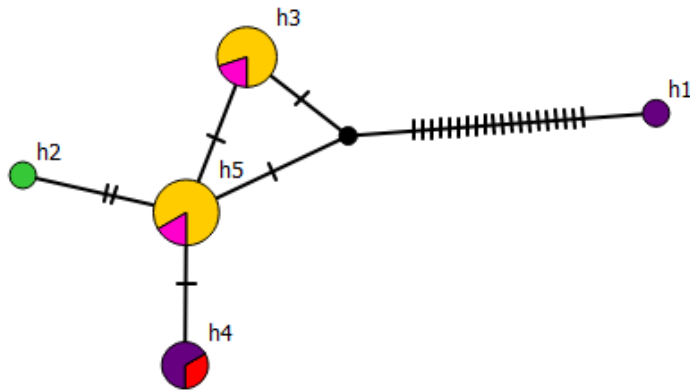




**Εικόνα 8:** Απλότυποι *S. orpheus* ταξινομημένοι σε δίκτυο Map View του προγράμματος PopART (v.1.7).

Το δίκτυο Median Joining Network κατασκευάστηκε βάσει των απλοτύπων mtDNA των 16 ατόμων *S. orpheus* από τους πληθυσμούς Νέστου, Έβρου, Κερκίνης, Βόλβης και Κόσυνθου και παρουσιάζει την αντιστοίχιση των απλοομάδων (Εικ.9). Οι ευθυγραμμισμένες αλληλουχίες είχαν μήκος 615 νουκλεοτίδια. Οι απλότυποι συνδέονται μεταξύ τους βασισμένοι στον αριθμό των μεταλλάξεων (στον αριθμό δηλαδή των διαφορετικών νουκλεοτιδίων). Τα βήματα μετάλλαξης μεταξύ απλοτύπων υποδεικνύονται με σημάδια διαγράμμισης. Το μέγεθος των κύκλων είναι ανάλογο των ατόμων του πληθυσμού. Ο απλότυπος που λείπει υποδεικνύεται με μικρό μαύρο κύκλο, και εξελικτικά διαφέρει κατά 20 βήματα μετάλλαξης από το h1. Οι ομάδες που εμφανίζουν δύο απλότυπους h3 και h5, h1 και h4 περιέχουν δυο διαφοροποιημένους πληθυσμούς.

Παρατηρείται ένα βήμα μετάλλαξης ανάμεσα στους απλότυπους h3, h4 και h5. Ο h2 διαφέρει κατά 2 νουκλεοτίδια.



**Εικόνα 9:** Απλότυποι *S. orpheus* ταξινομημένοι σε δίκτυο Median Joining Network του προγράμματος PopART (v.1.7).

## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Ερμηνεύοντας την επεξεργασία των δεδομένων, είναι ορατά τα σημεία όπου τα αποτελέσματα παρεκκλίνουν από τα αναμενόμενα, γεγονός που φαίνεται να οφείλετε στο μικρό μέγεθος του δείγματος. Με βάση το φυλογενετικό δέντρο του προγράμματος MEGA (Εικ. 7) οι πληθυσμοί ανάντη και κατάντη των φραγμάτων του Νέστου δεν φαίνεται να διαχωρίζονται γενετικά. Στο φυλογενετικό δέντρο, τα ποσοστά bootstrap πάνω από τους κλάδους ερμηνεύονται συνήθως ως μέτρο της πιθανότητας μια φυλογενετική εκτίμηση να αντιπροσωπεύει την πραγματική φυλογένεση. Τιμές που προσεγγίζουν το 100% αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη πιθανότητα σωστής φυλογένεσης. Ποσοστά μικρότερα από 75% παρατηρούνται σε όλους τους κλάδους και αντιστοιχούν σε αδύναμη υποστήριξη κλάδου, ενώ ποσοστά μικρότερα του 50% δεν υποστηρίζονται. Οι παρατηρούμενες μικρές γενετικές αποστάσεις κάτω από τους κλάδους (0 έως 0,025) δείχνουν πληθυσμούς που μοιράζονται παρόμοια γονίδια και προτείνουν στενή σύνδεση πληθυσμών και πρόσφατη διασταύρωση ή ύπαρξη κοινού προγόνου (Baum 2008). Σε περίπτωση που αναφερόμαστε σε δείγματα του Νέστου, οι γενετικές αποστάσεις κυμαίνονται από 0,001 έως 0,002, ενώ για το είδος η μεγαλύτερη απόσταση στο δέντρο είναι 0,025 και εντοπίζεται σε ένα δείγμα του Έβρου. Οι αποστάσεις αυτές συμφωνούν με τιμές που βρέθηκαν ίσες με 0,001 για το είδος ανάντη και κατάντη στο Νέστο (Σαπουνίδης 2014). Παρόμοια τιμή, ίση με 0,003 βρέθηκε επίσης ενδοειδικά σε μελέτη του *S. orpheus* (Τσούπας 2018).

Προχωρώντας στον σχολιασμό της στατιστικής ανάλυσης του προγράμματος Arlequin, στον Πίνακα 3 εντοπίζεται ο δείκτης  $F_{ST}$  και στον Πίνακα 4 το p-value του. Ο δείκτης  $F_{ST}$  παίρνει τιμές από 0-1. Μια τιμή μεγαλύτερη από 0,15 μπορεί να θεωρηθεί σημαντική για τη διαφοροποίηση των πληθυσμών (Frankham et al., 2002). Ο δείκτης σχετίζεται άμεσα με τη διακύμανση της συχνότητας των αλληλόμορφων μεταξύ των πληθυσμών και, αντίστροφα, με το βαθμό ομοιότητας μεταξύ των ατόμων εντός των πληθυσμών. Εάν η τιμή του είναι μικρή, σημαίνει ότι οι συχνότητες των αλληλόμορφων εντός κάθε πληθυσμού είναι παρόμοιες, και εάν είναι μεγάλη, σημαίνει ότι οι συχνότητες των αλληλόμορφων είναι διαφορετικές σε ποσοστό που υποδεικνύει το αποτέλεσμα του δείκτη. Στα αποτελέσματα γενικά φαίνεται η διαφοροποίηση της πλειοψηφίας των πληθυσμών, όμως η μόνη τιμή p-value που υποστηρίζει την διαφοροποίηση είναι  $0,00901 \pm 0,009$  μικρότερη από 0,05 μεταξύ πληθυσμών Νέστου και Έβρου. Οι υπόλοιπες τιμές p-value είναι μεγαλύτερες από 0,05 και επομένως στατιστικά μη σημαντικές (McLeod 2019).

Η ανάλυση AMOVA στον Πίνακα 5, δείχνει ότι μεγαλύτερα ποσοστά εντοπίζονται στην ενδοπληθυσμιακή διακύμανση. Όταν η διασπορά είναι περιορισμένη μεταξύ των πληθυσμών, οι συχνότητες των αλληλόμορφων τείνουν να αποκλίνουν ως αποτέλεσμα τυχαίων διαδικασιών ή φυσικής επιλογής (Slatkin 1985) και η μεγαλύτερη γενετική διακύμανση θα είναι μεταξύ των πληθυσμών. Όταν η διασπορά είναι ευρεία, οι συχνότητες των αλληλόμορφων τείνουν να είναι ομοιογενείς λόγω της ανάμειξης αλληλόμορφων από διαφορετικούς πληθυσμούς, και ένα σημαντικό μέρος της γενετικής ποικιλίας θα εμφανίζεται εντός των πληθυσμών. Η κατανομή της γενετικής ποικιλίας εντός και μεταξύ πληθυσμών εξαρτάται από το ρυθμό μετάλλαξης, τη γενετική παρέκκλιση, τη διασπορά ή

τη ροή γονιδίων και την επιλογή. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, φαινόμενα διασποράς (δηλαδή ροής γονιδίων) είναι δυνατό να εξηγήσουν την διακύμανση, καθώς οδηγούν σε μείωση γενετικής διακύμανσης διαπληθυσμιακά εντός ομάδων και αύξηση της γενετικής διακύμανσης ενδοπληθυσμιακά (Meffe & Vrijen-hoek 1988). Οι αρνητικές συνιστώσες διακύμανσης υποδηλώνουν απουσία γενετικής δομής. Μπορεί όμως να έχουν βιολογική σημασία. Για παράδειγμα, σε οργανισμούς που διασταυρώνονται, τα γονίδια από διαφορετικούς πληθυσμούς μπορεί να σχετίζονται περισσότερο μεταξύ τους από ό,τι τα γονίδια από τον ίδιο πληθυσμό. Οι Gerlach et al. (2010) προτείνουν οι αρνητικές τιμές να λαμβάνονται ως πιθανό προειδοποιητικό σήμα ότι το μέγεθος του δείγματος μπορεί να είναι πολύ μικρό σε σύγκριση με τον αριθμό των αλληλόμορφων. Έτσι, η περαιτέρω δειγματοληψία μπορεί να εξαλείψει τις αρνητικές τιμές και να παρουσιάσει θετικές τιμές, αλλάζοντας τα πιθανά συμπεράσματα.

Η ανάλυση Tajima's D του Πίνακα 6 δείχνει θετική τιμή για τα δείγματα του ποταμού Νέστου. Θα μπορούσε να σχολιαστεί ότι βάσει αποτελεσμάτων εμφανίζει περισσότερη παραλλαγή από την αναμενόμενη, λόγω εξισορροπητικής επιλογής «balancing selection» ή μεγάλου πληθυσμού που έχει συρρικνωθεί, εάν υπήρχε στατιστικά σημαντικό p-value ώστε να το υποστηρίξει (Tajima 1989). Το p-value των παρατηρήσεων είναι μεγαλύτερο από 0,05 και στατιστικά μη σημαντικό. Θα ήταν συνετό να γίνει έλεγχος μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων για να εντοπιστεί η ακριβής τιμή του δείκτη και να ερευνηθεί εάν ο πληθυσμός εξελίσσεται τυχαία ή όχι.

Η οπτικοποίηση των απλότυπων και η τοποθέτησή τους πάνω στο χάρτη έγινε μέσω του προγράμματος popArt. Στην Εικόνα 9, το δίκτυο Median Joining Network

κατασκευάστηκε βάσει των απλοτύπων και παρουσιάζει την αντιστοίχιση των απλοομάδων. Για τις τοποθεσίες Βόλβης και Κόσυνθου, τα δεδομένα δεν επαρκούν για περαιτέρω σχολιασμό πληθυσμών. Για τις υπόλοιπες τοποθεσίες, όλοι οι απλότυποι φαίνεται να είναι κοντά (απέχουν 1 και 2 νουκλεοτίδια) εκτός από το ένα άτομο του Έβρου, που πιθανώς να οφείλεται σε γενετική διαφοροποίηση. Κοινοί μεταξύ τους απλότυποι εμφανίζονται στην Κερκίνη και στο Νέστο, ενώ η γενετική σύσταση του Έβρου φαίνεται να αποτελείται από δυο διαφορετικούς απλότυπους, εκ των οποίων ο ένας είναι κοινός με τον Κόσυνθο (Εικ. 8). Για τις ομοιότητες και διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ πληθυσμών παρουσιάζονται παρακάτω σενάρια γονιδιακής ροής.

#### 4.2 Γονιδιακή ροή των ιχθύων εσωτερικών υδάτων

Τα ενδιαίτηματα των ιχθύων απειλούνται όλο και περισσότερο από μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών που προκαλούνται από ανθρώπινες δραστηριότητες. Συγκεκριμένα, η υπεραλίευση, η καταστροφή των οικοτόπων, η ρύπανση και η εισαγωγή ξενικών ειδών έχουν οδηγήσει σε παγκόσμια μείωση της βιοποικιλότητας των ειδών σε θαλάσσια και εσωτερικά ύδατα (Pauly & Zeller 2016). Ειδικά οι ιχθύες των θαλασσινών και εσωτερικών υδάτων επηρεάζονται έντονα από τις επιπτώσεις της παγκόσμιας κλιματικής αλλαγής. Στις επιπτώσεις περιλαμβάνονται μεταβολές στη θερμοκρασία, τη ροή του νερού και τα υδρολογικά καθεστάτα, τροποποιήσεις στην ποιότητα του νερού, εμφάνιση τοξικότητας και εμπλουτισμό του ενδιαίτηματος με ξενικά είδη (Schindler 2001). Οι περιβαλλοντικές αλλαγές αυτές αποτελούν θεμελιώδη πρόκληση για την επιτυχή

διατήρηση και διαχείριση της ιχθυοπανίδας, καθώς επηρεάζουν την φυλογεωγραφία των ειδών, την ενδοπληθυσμιακή και τη διαπληθυσμιακή γενετική ποικιλομορφία.

Υπάρχουν τρία σενάρια που μπορούν να περιγράψουν τα επίπεδα ροής γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών ιχθύων εσωτερικών υδάτων ποταμών. Σύμφωνα με το πρώτο σενάριο, η ροή γονιδίων μεταξύ των απορροών υπήρξε αμελητέα για μεγάλα χρονικά διαστήματα με αποτέλεσμα τη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των απορροών των εσωτερικών υδάτων. Ένα δεύτερο σενάριο προτείνει την ύπαρξη κάποιας ροής γονιδίων μεταξύ των απορροών που διευκολύνεται από θαλάσσιες οδούς - όπως μέσω διόδων γλυκού νερού «fresh water plumes» - αλλά η γονιδιακή ροή περιορίζεται σε μεγαλύτερες χιλιομετρικές αποστάσεις, προκαλώντας απομόνωση από απόσταση. Το τελευταίο σενάριο εστιάζει στην ύπαρξη εκτεταμένης ροής γονιδίων με αποτέλεσμα μικρή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των απορροών και έλλειψη διακριτής φυλογεωγραφικής δομής (McGlashan & Hughes 2001).

Υπάρχουν αρκετές πιθανές εξηγήσεις ως προς την έλλειψη σημαντικής γενετικής διαφοροποίησης των πληθυσμών Κερκίνης και Νέστου - παρά την παρουσία σημαντικής χιλιομετρικής απόστασης. Η φυσική επιλογή δεν μπορεί να απορριφθεί ως μηχανισμός ομογενοποίησης συχνοτήτων αλληλόμορφων μεταξύ τοποθεσιών, μέσω επιλογής εξισορρόπησης (McGlashan & Hughes 2001). Η έλλειψη απομόνωσης από απόσταση μπορεί να σημαίνει ότι υπήρξαν αρκετά φαινόμενα διασποράς (dispersal) μεγάλων αποστάσεων μεταξύ των πληθυσμών του *S. orpheus* ώστε να διαταράξουν το σχηματισμό της σχέσης απομόνωσης από απόσταση. Η πρώτη υπόθεση βασίζεται στην ύπαρξη φαινομένων «vicariance», όπου το είδος καταλάμβανε ένα μεγάλο, συνεχές γεωγραφικό εύρος. Κατά το πέρασ μεγάλων χρονικών διαστημάτων γεωλογικά, βιολογικά και

κλιματικά γεγονότα οδήγησαν στην εξαφάνιση πληθυσμών του είδους σε όλη την γεωγραφική κατανομή του. Οι πληθυσμοί που επέζησαν επομένως παρουσιάζουν σημαντική χιλιομετρική απομόνωση (McPhee 2008). Μια άλλη πιθανή εξήγηση για την έλλειψη απομόνωσης από απόσταση μεταξύ των πληθυσμών του *S. orpheus* σε Κερκίνη και Νέστο είναι δημογραφικές αλλαγές. Η έλλειψη απομόνωσης δικαιολογείται με κάποιο bottleneck φαινόμενο ή/και φαινόμενο επέκτασης, με ανεπαρκή χρόνο στη συνέχεια δημιουργίας ισορροπίας μετανάστευσης–μετατόπισης (migration–drift equilibrium) (McGlashan & Hughes 2001). Κατά την διάρκεια μεγάλων χρονικών περιόδων, η κίνηση των ιχθύων μεταξύ λεκανών διευκολύνεται από διαδικασίες «headwater capture». Αυτό συμβαίνει όταν ένας παραπόταμος που ρέει προς τον υδροκρίτη μεταξύ λεκανών προκαλεί αρκετή διάβρωση για να διακόψει τον υδροκρίτη, χρησιμεύοντας έτσι ως πλωτή οδός μεταξύ δύο ποταμών. Αν και αυτός ο μηχανισμός είναι κυρίως υπεύθυνος για τη μεταφορά ποτάμιων ιχθύων, μπορεί επίσης να γίνει αίτιο μεταφοράς λιμναίων ιχθύων μεταξύ λεκανών, εάν διαβιούν κατά τμήμα του κύκλου ζωής τους σε ποτάμια. Ο ανθρώπινος παράγοντας είναι επίσης αναμφισβήτητα υπεύθυνος για τη διασπορά των ιχθύων σε μεγάλες αποστάσεις. Η διασπορά συμβαίνει είτε σκόπιμα, ώστε να υπάρχει ικανότητα αλίευσης ενός συγκεκριμένου είδους εκτός της φυσικής περιοχής του (όπως αναφέρεται για την εύρεση του είδους στη Θάσο (Koutsikos et al. 2012), είτε τυχαία (McPhee 2008). Παρόμοια εξήγηση μπορεί να αποδοθεί στην ομοιότητα Έβρου και Κόσυνθου.

Για τη διαφοροποίηση του Έβρου με τις υπόλοιπες τοποθεσίες, μπορεί να σχολιαστεί ότι η γενετική δομή ενός πληθυσμού εξαρτάται από το ενδιαίτημα στο οποίο εντοπίζεται και από την αλληλεπίδραση των ειδών. Τα ποτάμια εμφανίζουν διαφορετικά



χαρακτηριστικά οικοσυστήματος και οι ιχθύες που αποτελούν μέρος της ιχθυοπανίδας προσαρμόζονται με βάση τον οικότοπο στον οποίο διαβιούν, με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση του πληθυσμού ή το σχηματισμό νέων ειδών (Fang 2022). Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα γεωγραφικά εμπόδια μπορούν να περιορίσουν τη ροή των γονιδίων και να προκαλέσουν υψηλά επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών (Perdereau 2014). Οι πληθυσμοί ειδών ιχθύων γλυκού νερού από διαφορετικές λεκάνες παρουσιάζουν συχνά σημαντική γενετική διαφοροποίηση που προκύπτει από τη γεωγραφική απομόνωση (Rossi 2021). Η Βόλβη παρουσιάζεται ως γεωγραφικά απομονωμένη, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει τον μοναδικό απλότυπο. Μεταβάλλοντας τις υδρογραφικές συνδέσεις μεταξύ τμημάτων ποταμών, προκαλείται διαχωρισμός και συγχώνευση παρακείμενων τμημάτων, προωθώντας την ειδογένεση όσο και την εξαφάνιση, αλλά και αυξάνοντας το ρυθμό γενετικής διαφοροποίησης (Albert et al. 2016). Αυτές οι γεωμορφολογικές αλλαγές οδηγούν σε εναλλακτικές παλαιογεωγραφικές υποθέσεις (Thomaz et al. 2015). Ιδιαίτερη δυσκολία παρουσιάζει η εκτίμηση των μεταναστευτικών κινήσεων μεταξύ πληθυσμών και η εύρεση πιθανών μεταναστευτικών εμποδίων. Ως συνέπεια θεωρείται δύσκολη η ερμηνεία της γεωγραφικής διακύμανσης των γενετικά καθορισμένων χαρακτηριστικών (Siegismund 1988).

Αντίστοιχα για τις παρατηρούμενες ενδοπληθυσμιακές διαφορές των ατόμων στις τοποθεσίες Νέστου, Έβρου και Κερκίνης, σύμφωνα με παρόμοιες μελέτες, πιθανολογείται ότι η διαφορά αυτή στη γενετική σύσταση οφείλεται στην ύπαρξη φραγμάτων.

#### 4.3 Επιπτώσεις φραγμάτων στη γενετική διαφοροποίηση ιχθύων

Σύμφωνα με αναφορά του 2014, η «καθαρή» υδροηλεκτρική μορφή ενέργειας συμβάλλει στο 80% της παγκόσμιας ανανεώσιμης ενέργειας (World Bank). Παρά τα κοινωνικά και οικονομικά οφέλη τους για τον άνθρωπο, τα υδροηλεκτρικά φράγματα εμποδίζουν τη φυσική ροή των ποταμών, επηρεάζοντας τα οικοσυστήματα ανάντη και κατάντη των φραγμάτων, ενώ οι τροποποιημένες φυσικοχημικές συνθήκες μεταβάλλουν τη ζωή φυτικών και ζωικών οργανισμών του ποταμού (Agostinho et al. 2002). Οι ταμιευτήρες εμποδίζουν τη διάβαση των νεαρών ιχθύων, όντας «κλειστά σύνορα» για τους αποδημητικούς πληθυσμούς (Turgeon et al. 2019). Συγχρόνως, τα φράγματα έχουν αρνητικές επιπτώσεις στη γενετική δομή των ιχθύων σε ποτάμια, παράκτια και θαλάσσια οικοσυστήματα (Κουτράκης 2009).

Η ύπαρξη ενός φράγματος διαμορφώνει ένα νέο εξελικτικό σενάριο για τους πληθυσμούς ιχθύων γλυκού νερού και επιδρά στην εσωτερική δομή και τη γενετική ποικιλομορφία τους. Η μείωση της συνδεσιμότητας ενός ποταμού ή η ολική διακοπή της επικοινωνίας του είναι ικανή να αυξήσει τη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών, λόγω της μείωσης της γενετικής ροής εντός των πληθυσμών και της αύξησης της τυχαίας γενετικής μετατόπισης (Schlaepfer et al. 2018). Μελλοντικά η διαταραχή της γενετικής ποικιλομορφίας θα μπορούσε να επηρεάσει την καταλληλότητα και την ικανότητα των πληθυσμών να προσαρμοστούν στις περιβαλλοντικές αλλαγές (Reed & Frankham 2003).

Καταγράφονται επομένως σημαντικές διαφορές στην σύνθεση των ιχθυοπληθυσμών ενδοειδικά και ενδοπληθυσμιακά ανάντη και κατόντη ενός φράγματος. Η λειτουργία ενός φράγματος, οδηγεί στη δημιουργία δυο ποτάμιων συστημάτων και ενδαιτημάτων με διαφορετικά υδρομορφολογικά στοιχεία, που φιλοξενούν είτε διαφορετικούς πληθυσμούς είτε πληθυσμούς με γενετικές παραλλαγές. Η κατασκευή των δύο υδροηλεκτρικών φραγμάτων στο ποταμό Νέστο στο τέλος της δεκαετίας του '90 δημιούργησε δύο φραγμαλίμνες. Αυτή η περιβαλλοντική αλλαγή διατάραξε την ισορροπία του ενδαιτηματος και επηρέασε την ποτάμια ιχθυοπανίδα, μετατρέποντας ένα μεγάλο τμήμα του Νέστου σε λιμναίο, κάτι που έχει αρνητικές επιπτώσεις στους πληθυσμούς των ιχθύων (Λεονάρδος και συν. 2021).

Κατά μήκος του ποταμού Έβρου εντοπίζονται περίπου 100 παραπόταμοι, με τα πρώτα αναχώματα να κατασκευάζονται από την Ελλάδα και την Τουρκία το 1956. Πληθώρα μικρότερων φραγμάτων έχουν κατασκευαστεί κατά μήκος των παραποτάμων, και χρησιμοποιούνται για αρδευτικούς σκοπούς, παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας ή υδροδότηση γειτονικών βιομηχανιών. Εμφράξεις έχουν πραγματοποιηθεί στο ελληνικό τμήμα, προκειμένου να διατηρούν υψηλή την υδροφορία στο Δέλτα του ποταμού (Ντιτόρα 2012). Στο βουλγαρικό κομμάτι του ποταμού, είναι γνωστό ότι μεγάλος αριθμός ιχθύων νεαρής ηλικίας περνούν μέσα από τουρμπίνες και υπερχειλίσεις υδροηλεκτρικών φραγμάτων (Janáč et al. 2013). Η εμφάνιση δυο διαφορετικών απλότυπων του ποταμού επομένως, πιθανώς δικαιολογείται από την ύπαρξη των φραγμάτων και «εμποδίων» κατά μήκος του.

Ομοίως στην Κερκίνη, η κατασκευή πρώτου φράγματος το 1932 και στη συνέχεια δεύτερου το 1982, προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στην υδρομορφολογία του συστήματος και ταυτόχρονα κατέστρεψε πολλά ενδιαιτημάτων των ιχθύων. Ειδικά η κατασκευή του δεύτερου φράγματος, οδήγησε σε εξαφάνιση ειδών του ιχθυοπληθυσμού της λίμνης, λόγω εμποδίων σε μεταναστευτικές οδούς, και της διατάραξης των αναπαραγωγικών πεδίων (Crivelli et al. 1995).

Μελέτες των επιπτώσεων των φραγμάτων σε ιχθυοπληθυσμούς προσφέρονται ως αιτιολογία στην διαφοροποίηση της γενετικής σύστασης των ιχθύων. Βάσει των ευρημάτων εργασιών που συσχετίζουν τη ροή γονιδίων των ιχθύων ανάντη και κατόντη, είναι εμφανές ότι τα φράγματα διαχωρίζουν πληθυσμούς και εάν απομονωθούν για αρκετό χρονικό διάστημα είναι δυνατό να διαφοροποιηθούν γενετικά. Σε διδακτορική έρευνα πληθυσμών του είδους *S. orpheus* ανάντη και κατόντη των φραγμάτων του Νέστου, εντοπίστηκε ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοροποίησης στις συχνότητες των απλότυπων (Σαπουνίδης 2014). Στην τεχνική έκθεση στο πλαίσιο του Χρηματοδοτικού Προγράμματος του Πράσινου Ταμείου «ΦΥΣΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ 2020» το είδος εντοπίστηκε ότι διατρέχει υψηλό κίνδυνο από την κατασκευή φραγμάτων, και σύμφωνα με πρόσφατη διδακτορική έρευνα (Μπαρμπιέρι 2020) σε είδη Cyprinidae του ποταμού Λούρου, εμφανίζεται σημαντική αλλοίωση της σύνθεσης και αφθονίας των πληθυσμών τους ανάντη και κατόντη του φράγματος. Για τον έλεγχο της κατάστασης του ποταμού Νέστου, λαμβάνουν χώρα ερευνητικές εργασίες του φορέα ανάθεσης και χρηματοδότησης: ΔΕΗ Α.Ε. – ΔΥΗΠ Συγκρότημα Νέστου, με στόχο την επικαιροποίηση της υφιστάμενης μελέτης για την διερεύνηση της κινητικότητας της

ιχθυοπανίδας κατά μήκος του υδρογραφικού δικτύου του ποταμού Νέστου (Ψιλοβίκος 2022).

Ιδανικά, μελλοντικά θα πραγματοποιούνταν επανάληψη της δειγματοληψίας στοχευμένα στις τοποθεσίες όπου εντοπίζεται το είδος, για τον έλεγχο της γενετικής κατάστασης του, με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος ώστε να επιτευχθεί φυλογενετικός σχεδιασμός και σύγκριση των πληθυσμών. Στην παρούσα εργασία, η έλλειψη στατιστικής υποστήριξης στις αναλύσεις φαίνεται να οφείλεται στο μικρό μέγεθος του δείγματος. Η έλλειψη στατιστικής σημασίας και μη γενετικής διαφοροποίησης στους ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν δημιουργεί ανάγκη περαιτέρω μελέτης και προσφέρεται να αποδώσει σημαντικά συμπεράσματα για τους ιχθυοπληθυσμούς και την κατάσταση του είδους στα εσωτερικά ύδατα της Ελλάδας.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Agostinho A.A., Gomes L.C., Fernandez D.R., Suzuki H.I. (2002) Efficiency of fish ladders for neotropical ichthyofauna. *River Research and Applications*. 18(3):299–306.
- Albert J., Schoolmaster D., Tagliacollo V., Duke-Sylvester S. (2016) Barrier Displacement on a Neutral Landscape: Toward a Theory of Continental Biogeography. *Systematic biology*, 66.
- Aljanabi S.M., Martinez I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25(22):4692–4693.
- Almada V., Sousa-Santos C. (2010) Comparisons of the genetic structure of *Squalius* populations (Teleostei, Cyprinidae) from rivers with contrasting histories, drainage areas and climatic conditions based on two molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57(2):924–931.
- Atig R.K-B., Hsouna S., Beraud-Colomb E., Abdelhak S. (2009) Mitochondrial DNA: properties and applications. *Archives De l'Institut Pasteur De Tunis*. 86(1–4):3–14.
- Bandelt H.J., Forster P., Rohl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16(1):37–48.
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16(1):37–48.
- Baum D. (2008) "Reading a Phylogenetic Tree: The Meaning of Monophyletic Groups." *Nature Education* 1, no. 1: 190. <http://www.nature.com/scitable/topicpage/reading-a-phylogenetic-tree-the-meaning-of-41956>. (accessed 15-08-2022).
- Behrens-Chapuis S., Herder F., Esmaeili H.R., Freyhof J., Hamidan N.A., Özuluğ M., Šanda R., Geiger M.F. (2015) Adding nuclear rhodopsin data where mitochondrial COI indicates discrepancies – can this marker help to explain conflicts in cyprinids? *DNA Barcodes*. 3(1).
- Bianco P. G. (1990) Potential role of the palaeo history of the Mediterranean and Paratethis basins on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 1: 167-184.

- Birky-Jr C.W., Fuerst P., Maruyama T. (1989) Organelle Gene Diversity under Migration, Mutation, and Drift: Equilibrium Expectations, Approach to Equilibrium, Effects of Heteroplasmic Cells, and Comparison to Nuclear Genes. *Genetics*. 121(3):613–627.
- Bogutskaya N., Zupancic P. (2010) *Squalius janae*, a new species of fish from the Adriatic Sea basin in Slovenia (Actinopterygii: Cyprinidae). *Zootaxa*. 2536:53–68.
- Böhme M., Ilg A. (2003) Fossil Fishes, Amphibians, Reptiles - fosFARbase, [www.wahrestaeerke.com/](http://www.wahrestaeerke.com/) (accessed 01-08-2022).
- Buhay J.E. (2009) “COI-like” Sequences Are Becoming Problematic in Molecular Systematic and DNA Barcoding Studies. *Journal of Crustacean Biology*. 29(1):96–110.
- Buj I., Marčić Z., Čavlović K. Čaleta M., Tutman P., Zanella D., Duplić A., Onorato L., Ivić L., Horvatić S., Mustafić P. (2019) Multilocus phylogenetic analysis helps to untangle the taxonomic puzzle of chubs (genus *Squalius*: Cypriniformes: Actinopteri) in the Adriatic basin of Croatia and Bosnia and Herzegovina. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 189(3):953–974. doi:10.1093/zoolinnea/zlz133.
- Doadrio I., Carmona J. (2003) Testing freshwater Lago Mare dispersal theory on the phylogeny relationships of Iberian cyprinid genera *Chondrostoma* and *Squalius* (Cypriniformes, Cyprinidae). *Graellsia*. 59:457–473.
- Doadrio I., Carmona J. (2006) Phylogenetic overview of the genus *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae) in the Iberian Peninsula, with description of two new species. *Cybium*. 30.
- Docan A., Stroe M., Grecu I., Lorena D., Cretu M., Tenciu M., Tenciu M. (2021) DIVERSITY AND DISTRIBUTION OF PARASITES IN SOME FRESHWATER FISH FROM ROMANIAN SECTOR OF PRUT RIVER. Vol. LXIV:442.
- Economidis P.S., Banarescu P.M. (1991) The Distribution and Origins of Freshwater Fishes in the Balkan Peninsula, Especially in Greece. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*. 76(2):257–284.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Fang D.A., He M., Ren Y.-F., Luo H., Zhou Y.-F., Jiang S.-L., You, Y. (2022) Assessment of Genetic Diversity of the Salangid, *Neosalanx taihuensis*, Based on the Mitochondrial COI Gene in Different Chinese River Basins. *Biology*, 11, 968.

- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Fricke R., Eschmeyer W.N., Van Der Laan, R. (2014) Family-group names of Recent fishes. *Zootaxa*. 3882(1):1.
- Froese R., Pauly D. (2022) FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (06/2022). (accessed 01-08-2022).
- Geiger M.F., Herder F., Monaghan M.T., Almada V., Barbieri R., Bariche M., Berrebi P., Bohlen J., Casal-Lopez M., Delmastro G.B., Denys G., Dettai A., Doadrio I., Kalogianni, E., Kaerst H., Kottelat M., Kovačić M., Laporte M., Lorenzoni M., Freyhof J. (2014) Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources*. 14(6):1210–1221.
- Gerlach G., Jueterbock A., Kraemer P., Deppermann J., Harmand P. (2010) Calculations of population differentiation based on GST and D: forget GST but not all of statistics! *Molecular Ecology*. 19(18):3845–3852.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences*. 270(1512):313–321.
- Hillis D.M., Bull J.J. (1993) An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*. 42(2):182–192.
- IUCN. (2008) IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>. (accessed 01-08-2022).
- Janáč M., Jurajda P., Kružíková L., Roche K., Prášek V. (2013) Reservoir to river passage of age-0+ year fishes, indication of a dispersion pathway for a non-native species. *Journal of Fish Biology*. 82(3):994–1010.
- Karataş A., Filiz H., Erciyas-Yavuz K., Özeren S.C., Tok C.V. (2021) The Vertebrate Biodiversity of Turkey. In: Öztürk M., Altay V., Efe R., editors. *Biodiversity, Conservation and Sustainability in Asia: Volume 1: Prospects and Challenges in West Asia and Caucasus*. Cham: Springer International Publishing. p. 175–274.



- Ketmaier V., Bianco P.G., Cobolli M., Krivokapic M., Caniglia R., De Matthaeis E. (2004) Molecular phylogeny of two lineages of Leuciscinae cyprinids (*Telestes* and *Scardinius*) from the peri-Mediterranean area based on cytochrome b data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32(3):1061–1071.
- Khaefi R., Esmaeili H.R., Sayyadzadeh G., Geiger M.F., Freyhof J. (2016) *Squalius namak*, a new chub from Lake Namak basin in Iran (Teleostei: Cyprinidae). *Zootaxa*. 4169(1):145–159.
- Kolev V. (2013) SPECIES COMPOSITION OF THE ICHTHYOFAUNA OF SOME TRIBUTARIES OF THE MARITZA RIVER.
- Kottelat M., Economidis P.S. (2006) *Squalius orpheus*, a new species of cyprinid fish from Evros drainage, Greece (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 17:181–186.
- Kottelat M., Freyhof J. (2007) *Handbook of European Freshwater Fishes*. Kottelat, Cornol & Freyhof, Berlin, xiv + 646 pp.
- Koutsikos N., Zogaris S., Vardakas L., Tachos V., Kalogianni E., Sanda R., Chatzinikolaou Y., Giakoumi S., Economidis P.S., Economou A.N. (2012) Recent contributions to the distribution of the freshwater ichthyofauna in Greece. *Mediterranean Marine Science*. 13:268–277.
- Krijgsman W., Hilgen F.J., Raffi I., Sierro F.J., Wilson D.S. (1999) Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*. 400(6745):652–655.
- Lansman R.A., Shade R.O., Shapira J.F., Avise J.C. (1981). The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. III. Techniques and potential applications. *Journal of Molecular Evolution*. 17(4):214–226.
- Larsson A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics*30(22): 3276-3278.
- Leigh J.W., Bryant D. (2015) popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*. 6(9):1110–1116.
- Marinov I. (1957) *Hydrological reference book of the rivers in Bulgaria*. Science and Art State Publishing House, Sofia, VI: 328 p. (In Bulgarian).
- Marton E. (2008) *Palaeomagnetism and palaeogeography. The Geology of Central Europe Volumen 2: Mesozoic and Cenozoic*. Edited by: McCann T. London: Geological Society, 1033-1035.
- McGlashan D.J., Hughes J.M. (2001) Low levels of genetic differentiation among populations of the freshwater fish *Hypseleotris compressa* (Gobiidae: Eleotridinae):

- implications for its biology, population connectivity and history. *Heredity*. 86(2):222–233.
- McLeod S.A. (2019) What a p-value tells you about statistical significance. <https://www.simplypsychology.org/p-value.html>. (accessed 10-08-2022).
- McPhee M. (2008) How do the same fish species end up in different lakes hundreds of miles apart? *Scientific American*. 298(2):83.
- Meffe G.K., Vrijenhoek R.C. (1988) Conservation genetics in the management of desert fishes. *Conservation Biology* 2: 157–169.
- Mello B. (2018) Estimating TimeTrees with MEGA and the TimeTree Resource. *Molecular Biology and Evolution*. 35(9):2334–2342.
- Opperdoes F. (1997) Maximum Likelihood. [http://www.deduveinstituut.be/~opperd/private/max\\_likeli.html](http://www.deduveinstituut.be/~opperd/private/max_likeli.html). (accessed 10-08-2022).
- Papathanasiou T., Psilovikos A. (2022) Investigation of the Correlation Factor between the Ichthyofauna Status and the Riparian Vegetation in a Mediterranean River, using the QBR Index.
- Park D-S., Suh S-J., Oh H-W., Hebert PD. (2010) Recovery of the mitochondrial COI barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. *BMC Genomics*. 11(1):423.
- Pauly D., Zeller D. (2016) Catch reconstructions reveal that global marine fisheries catches are higher than reported and declining. *Nature Communications*. 7(1):1–9.
- Penzo E., Gandolfi G., Bargelloni L., Colombo L., Patarnello T. (1998) Messinian salinity crisis and the origin of freshwater lifestyle in western Mediterranean gobies. *Molecular Biology and Evolution*. 15(11):1472–1480.
- Perdereau A. C., Kelleher C. T., Douglas G. C., Hodkinson T. R. (2014) High levels of gene flow and genetic diversity in Irish populations of *Salix caprea* L. inferred from chloroplast and nuclear SSR markers. *BMC Plant Biology*, 14, 202.
- Perea S., Böhme M., Zupančič P., Freyhof J., Šanda R., Özuluğ M., Abdoli A., Doadrio I. (2010) Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *BMC Evolutionary Biology*. 10(1):265.
- Perea S., Doadrio I. (2015) Phylogeography, historical demography and habitat suitability modelling of freshwater fishes inhabiting seasonally fluctuating Mediterranean river systems: a case study using the Iberian cyprinid *Squalius valentinus*. *Molecular Ecology*. 24(14):3706–3722.

- Perea S., Sousa-Santos C., Robalo J., Doadrio I. (2021) Historical biogeography of the Iberian Peninsula: multilocus phylogeny and ancestral area reconstruction for the freshwater fish genus *Squalius* (Actinopterygii, Leuciscidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 59(4):858–886.
- Perea S., Vukić J., Šanda R., Doadrio I. (2016) Ancient Mitochondrial Capture as Factor Promoting Mitonuclear Discordance in Freshwater Fishes: A Case Study in the Genus *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae) in Greece. *PLoS One*. 11(12):e0166292.
- Reed D.H., Frankham R. (2003) Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology*. 17(1):230–237.
- Reynolds J., Weir B.S., Cockerham C.C. (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*. 105(3):767–779.
- Reynolds J.B. (1996) Electrofishing. In: Murphy, B.R. and Willis, D.W., Eds., *Fisheries Techniques*, 2nd Edition, American Fisheries Society, Bethesda, MD, 221–253.
- Rögl F. (2001) Mid-Miocene Circum-Mediterranean palaeogeography. *Ber Inst Geol Palaeontol Karl-Franzens Univ Graz Oesterr*, 4: 49–59.
- Rossi A.R., Petrosino G., Crescenzo S., Milana V., Talarico L., Martinoli M., Rakaj A., Lorenzoni M., Carosi A., Ciuffardi L., & Tancioni L. (2021) Phylogeography and population structure of *Squalius lucumonis*: A baseline for conservation of an Italian endangered freshwater fish. *Journal for Nature Conservation*, 64, 126085.
- Sanjur O.I., Carmona J.A., Doadrio I. (2003) Evolutionary and biogeographical patterns within Iberian populations of the genus *Squalius* inferred from molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29(1):20–30.
- Schindler D.W. (2001) The Cumulative Effects of Climate Warming and Other Human Stresses on Canadian Freshwaters in the New Millennium. In: Bendell-Young L, Gallagher P, editors. *Waters in Peril*. Boston, MA: Springer US. p. 165–186.
- Schlaepfer D.R., Braschler B., Rusterholz H.P., Baur B. (2018) Genetic effects of anthropogenic habitat fragmentation on remnant animal and plant populations: a meta-analysis. *Ecosphere*. 9(10):e02488.
- Schönhuth S., Vukić J., Šanda R., Yang L., Mayden R.L. (2018) Phylogenetic relationships and classification of the Holarctic family Leuciscidae (Cypriniformes: Cyprinoidei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 127:781–799.
- Seifertová M., Bryja J., Vyskočilová M., Martínková N., Šimková A. (2012) Multiple Pleistocene refugia and post-glacial colonization in the European chub (*Squalius*

- cephalus) revealed by combined use of nuclear and mitochondrial markers. *Journal of Biogeography*. 39(6):1024–1040.
- Siegismund H. R. (1988) Genetic differentiation in populations of the freshwater amphipods *Gammarus roeseli* and *Gammarus fossarum*. *Hereditas*, 109(2), 269–276.
- Slatkin M. (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 393–430.
- Soltis P.S., Soltis D.E. (2003) Applying the Bootstrap in Phylogeny Reconstruction. *ss*. 18(2):256–267.
- Sousa-Santos C., Collares-Pereira M.J., Almada V. (2007) Reading the history of a hybrid fish complex from its molecular record. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 45(3):981–996.
- Sousa-Santos C., Jesus T.F., Fernandes C., Robalo J.I., Coelho M.M. (2019) Fish diversification at the pace of geomorphological changes: evolutionary history of western Iberian Leuciscinae (Teleostei: Leuciscidae) inferred from multilocus sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 133:263–285.
- Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123(3):585–595. doi:10.1093/genetics/123.3.585.
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 38(7):3022–3027.
- Thomaz A.T., Malabarba L. R., Bonatto S. L., Knowles L. L. (2015) Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: Study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, 42(12), 2389–2401.
- Tsoupas A., Papavasileiou S., Minoudi S., Gkagkavouzis K., Petriki O., Bobori D., Sapounidis A., Koutrakis E., Leonardos I., Karaiskou N., Triantafyllidis A. (2022) DNA barcoding identification of Greek freshwater fishes. *PLoS ONE*. 17(1):e0263118.
- Turan D., Kottelat M., Bayçelebi E. (2013) Two new species of *Squalius*, *S. adanaensis* and *S. seyhanensis* (Teleostei: Cyprinidae), from Seyhan River in Turkey. *Zootaxa*. 3637:308–324.
- Turgeon K., Turpin C., Gregory-Eaves I. (2019) Dams have varying impacts on fish communities across latitudes: a quantitative synthesis. *Ecology Letters*. 22(9):1501–1516.

- Villesen P. (2007) FaBox: an online toolbox for fasta sequences, *Molecular Ecology Notes* 7 (6), 965-968.
- Waap S., Amaral A.R., Gomes B., Manuela Coelho M. (2011) Multi-locus species tree of the chub genus *Squalius* (Leuciscinae: Cyprinidae) from western Iberia: new insights into its evolutionary history. *Genetica*. 139(8):1009.
- Wheeler Q.D. (2004) Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 359(1444):571–583.
- Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M., Gyllensten U.B., Helm-Bychowski K.M., Higuchi R.G., Palumbi S.R., Prager E.M., Sage R.D., Stoneking M. (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*. 26(4):375–400.
- World Bank. (2014) *The World Bank Annual Report 2014*. Washington, DC. World Bank. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/20093> License: CC BY-NC-ND 3.0 IGO. (accessed 01-08-2022).
- Zdeněk L., Sanda R., Švátora M. (2015) Phylogeography of genus *Squalius* in Albania. *Frontiers in Marine Science*. 2.

#### Ελληνική Βιβλιογραφία

- Κουτράκης Μ. (2009) Παραγωγή υδροηλεκτρικής ενέργειας και επιπτώσεις στην ιχθυοπανίδα των ποταμών. *Αμφίβιον*, 80: 10-13.
- Λεονάρδος Ι., Κουτράκης Ε., Μπόμπορη Δ., Σαπουνίδης Α., Χουσιδής Ι., Κοκκινίδου Α., Γκριζή Ο. (2021) Τεχνική έκθεση στο πλαίσιο του Χρηματοδοτικού Προγράμματος του Πράσινου Ταμείου «ΦΥΣΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ 2020»: «Προδιαγραφές χωροθέτησης μικρών υδροηλεκτρικών έργων (ΜΥΗΕ)<10MW με κριτήρια διατήρησης της βιοποικιλότητας και πρόταση μέτρων μείωσης των επιπτώσεων στα προστατευταία αντικείμενα στο πλαίσιο της περιβαλλοντικής αδειοδότησης». Ιωάννινα: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Επιτροπή Ερευνών.
- Μπαρμπιέρι Ρ. (2020) Στοιχεία οντογενετικής ανάπτυξης των κυπρινοειδών του ποταμού Λούρου. *Διδακτορική Διατριβή*, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, σελ. 122.
- Ντιτόρα Α. (2012) Υδατικοί πόροι λεκάνης απορροής ποταμού Έβρου: υφιστάμενη κατάσταση και προοπτικές διαχείρισης. *Διπλωματική Εργασία*, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, σελ.22-23.

- Παπαθανασίου Μ.(2022) Ψάρια του Γλυκού Νερού. Geogreece. <https://www.geogreece.gr/fish.php>. (accessed 10-08-2022).
- Πετροδημοπούλου Ε.Φ. (2011) Αξιολόγηση διαχειριστικών σεναρίων σε διασυνοριακούς υδατικούς πόρους. Εφαρμογή του εργαλείου WEAP στη λεκάνη του Νέστου. Διπλωματική Εργασία, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σελ. 67.
- Σαπουνίδης Α. (2014) Μορφολογική και γενετική ανάλυση ειδών της ιχθυοπανίδας του ποταμού Νέστου. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, σελ. 39-40, 111-116.
- Τσούπας Α.Δ. (2018) DNA barcoding ταυτοποίηση ειδών ιχθύων των εσωτερικών υδάτων της Ελλάδας. Διπλωματική Εργασία, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σελ. 79-81.
- Ψιλοβίκος Α. (2022) «Επικαιροποίηση υφιστάμενης μελέτης για την διερεύνηση της κινητικότητας της ιχθυοπανίδας κατά μήκος του υδρογραφικού δικτύου του ποταμού Νέστου». Φάση 3: Τελική Έκθεση. Φορέας Ανάθεσης και Χρηματοδότησης: ΔΕΗ Α.Ε. – ΔΥΗΠ Συγκρότημα Νέστου. Επιτροπή Ερευνών Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (κωδ. 5928).

## ABSTRACT

This study researches the population genetics of *Squalius orpheus* of the Nestos River, with the aim of concluding the classification of the populations, and the comparative analysis with other available primary data. *S. orpheus* is a species endemic to the Balkans, and despite its identification in Greece in 2006, systematics of the species remain a taxonomic challenge, with few publications offering genetic correlation of its populations. Research sampling was conducted by electrofishing. Genetic material was isolated from the tissue of 14 fish. The mitochondrial DNA portion of the cytochrome oxidase (COI) subunit I gene was amplified by PCR and tested by electrophoresis. Sequencing of the samples through the Blast system of the GenBank database showed 8 sequences corresponding to individuals of the species. Through NCBI, 8 more COI gene sequences of the species were retrieved from the Northern Greece area for comparison and correlation with the other samples. The programs used for sequence processing were Aliview, MEGA, Fabox, Arlequin and popArt.  $F_{ST}$ , Tajima's D and AMOVA analysis were calculated to compare populations. Populations were visualized with a Maximum Likelihood phylogenetic tree, and Median Joining Network haplotype network. Overall, the results were found to be statistically insignificant due to the small number of samples, with the only statistically significant conclusion being the genetic differentiation between the Evros and Nestos populations. The genetic difference is potentially due to geographic isolation and interruption of genetic flow. Ideally, the repetition of the study will provide important conclusions about the fish populations and the status of the species in the inland waters of Greece.

Key words: *Squalius orpheus*, population genetics, COI gene, genetic differentiation, inland waters of Northern Greece.