

Βελτιστοποίηση εργαστηριακών μεθόδων για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας του είδους *Pinna nobilis*.

Μαρία Καμηλάρη^{1,2}, Χαρίκλεια Παπαϊωάννου^{1,2}, Μάριος Σμάνης¹, Αλέξιος Ράμφος¹,
Ιωάννης Θεοδώρου¹, Κώστας Μπαταργιάς¹

¹Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Νέα Κτήρια, Μεσολόγγι
²Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

mkamilar@upatras.gr, χραπαιοαννου@upatras.gr, smanismarios2@gmail.com, aramfos@upatras.gr, jtheo@upatras.gr, cbatargias@upatras.gr

Pinna nobilis Linnaeus, 1758

- το μεγαλύτερο ενδημικό πτεριόμορφο δίθυρο στη Μεσόγειο
- διαδραματίζει σημαντικό οικολογικό ρόλο, συμβάλλοντας στη συνολική αύξηση του επιπέδου τοπικής βιοποικιλότητας των θαλάσσιων βενθικών βιοτόπων
- δεκαετία του 1980 εμφανίζουν σημαντική μείωση λόγω της εκμετάλλευσης από τον άνθρωπο



Εικ 1: Πίννες σε λιβάδι Ποσειδωνίας στο Αργοστόλι, Κεφαλονιάς (Φωτ. Ράμφος Α. 2019)



Εικ2: Μαζική θνησιμότητα Πιννών στην Μεσόγειο. IUCN (Nov 2019)

Καθεστώς προστασίας

- Οδηγία 92/43/EC, (παράρτημα II) είναι **απειλούμενο με εξαφάνιση** είδος στη Μεσόγειο και υπόκειται σε αυστηρούς όρους προστασίας
- Παράρτημα IV της σύμβασης της Βαρκελώνης (UNEP) (1996)**

Ερευνητικό πρόβλημα – Σκοπιμότητα μελέτης

Μετά τις πρόσφατες μαζικές θνησιμότητες της πίννας στην Μεσόγειο (Lattos et al. 2021), η γενετική έρευνα με βάση ζωντανό υλικό γίνεται ολοένα και πιο δύσκολη αφενός λόγω απουσίας ζωντανών ατόμων, αφετέρου λόγω της αυστηρής προστασίας των οποιωνδήποτε εναπομεινάντων ατόμων από πιθανό τραυματισμό ή θανάτωση (Catanese et al. 2022). Επιπλέον, η φαινοτυπική ταυτοποίηση του είδους στα πρώιμα στάδια της πίννας *Pinna* spp. είναι δυσδιάκριτη όσον αφορά στον διαχωρισμό του γόνου *P. nobilis* και του συγγενικού *P. rudis*.

Ως εκ τούτου, η μοριακή ταυτοποίηση των ατόμων - ιδιαίτερα από τα κελύφη νεκρών οργανισμών - είναι απαραίτητη για την ταυτοποίηση των ειδών στην ελληνική επικράτεια καθώς και για την περαιτέρω μελέτη των ατόμων σε φυλογεωγραφικό, γενετικό και οικοφυσιολογικό επίπεδο (Catanese et al. 2022).

Μεθοδολογία – Υλικά

Σύγκριση μεθοδολογικών προσεγγίσεων και πρωτοκόλλων απομόνωσης γενετικού υλικού με στόχο τον προσδιορισμό και ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των ατόμων πίννας από τον ελλαδικό χώρο.

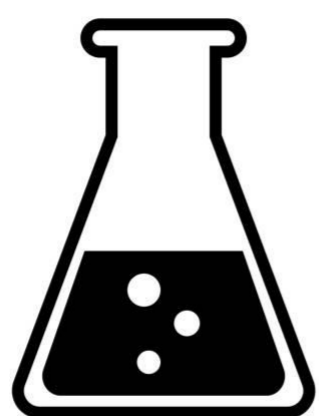
Προετοιμασία δειγμάτων



Θρυμματοποίηση κελύφους
VS
ακέραια κομμάτια κελύφους

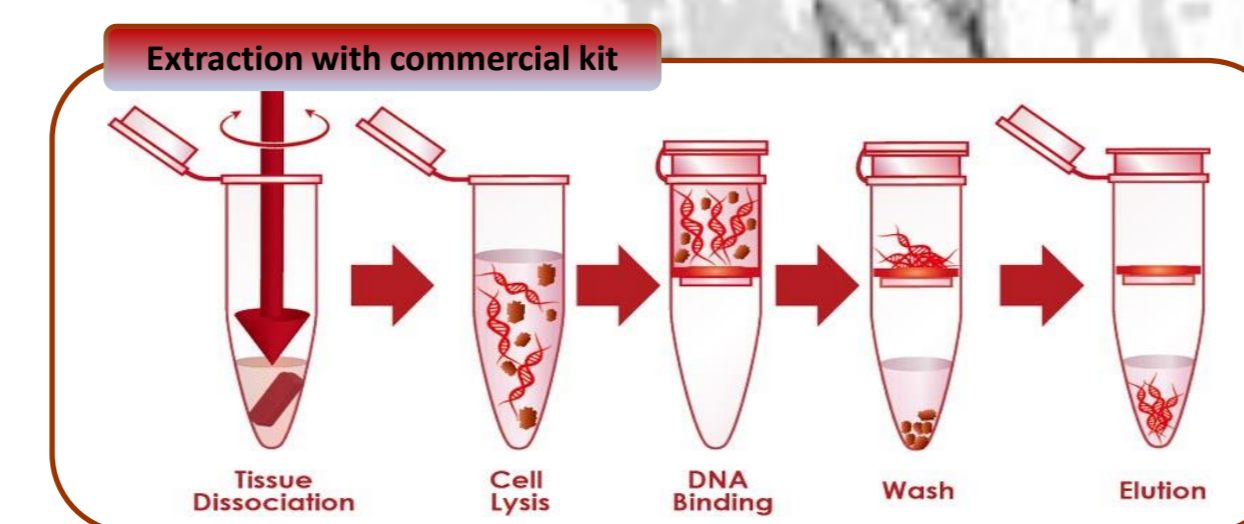
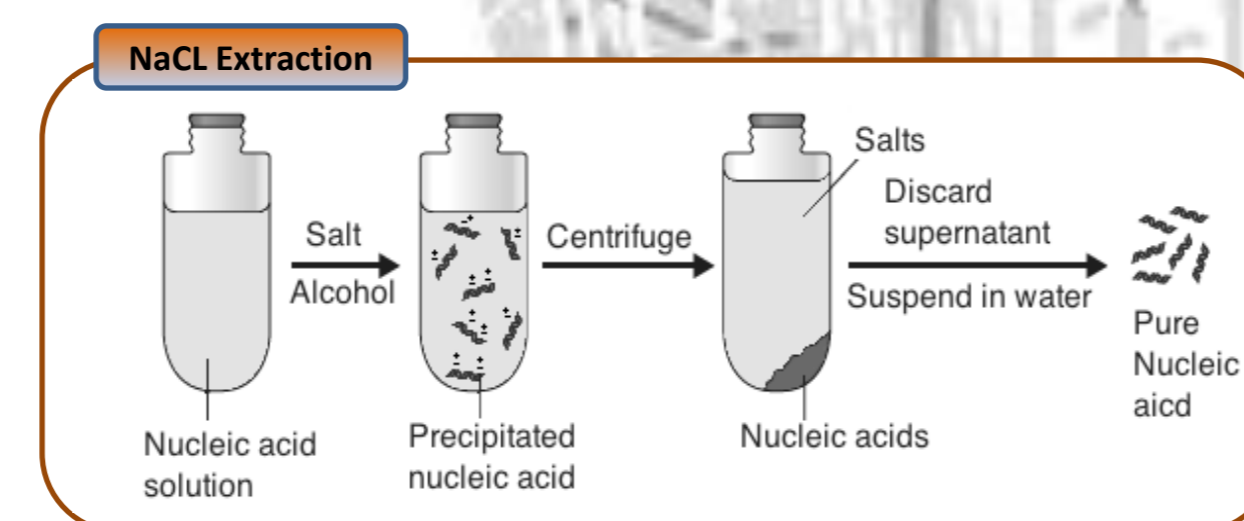
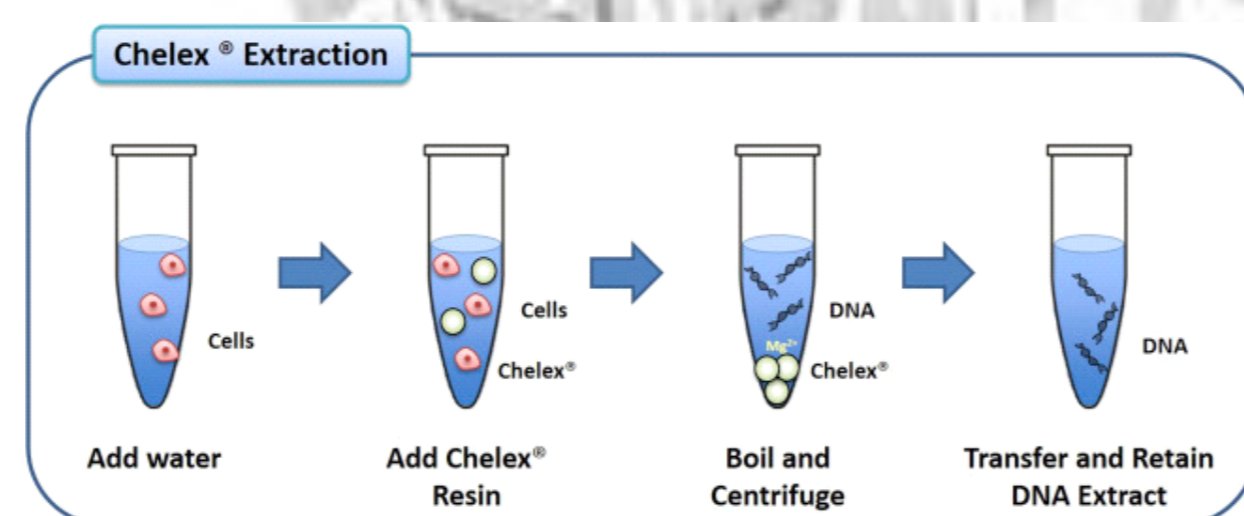


Επώαση σε Proteinase K
24h VS 48h VS 72h



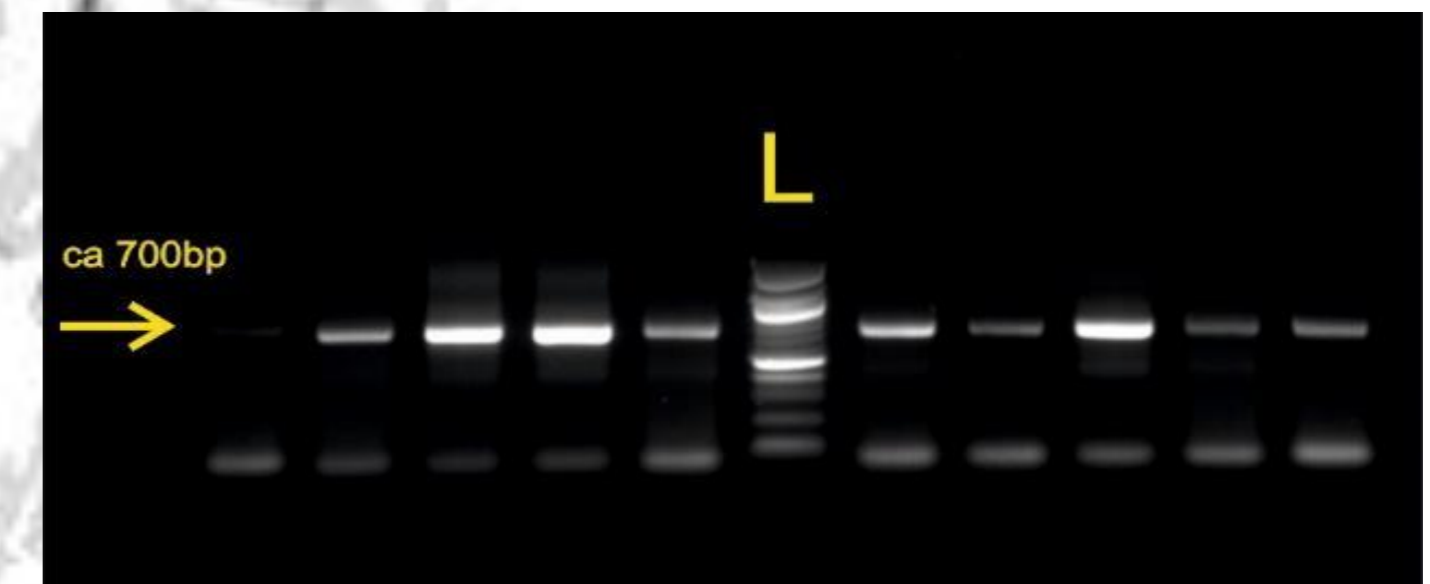
Ενυδάτωση κελύφους με PBS
VS
μη ενυδάτωση κελύφους

Απομόνωση DNA & PCR

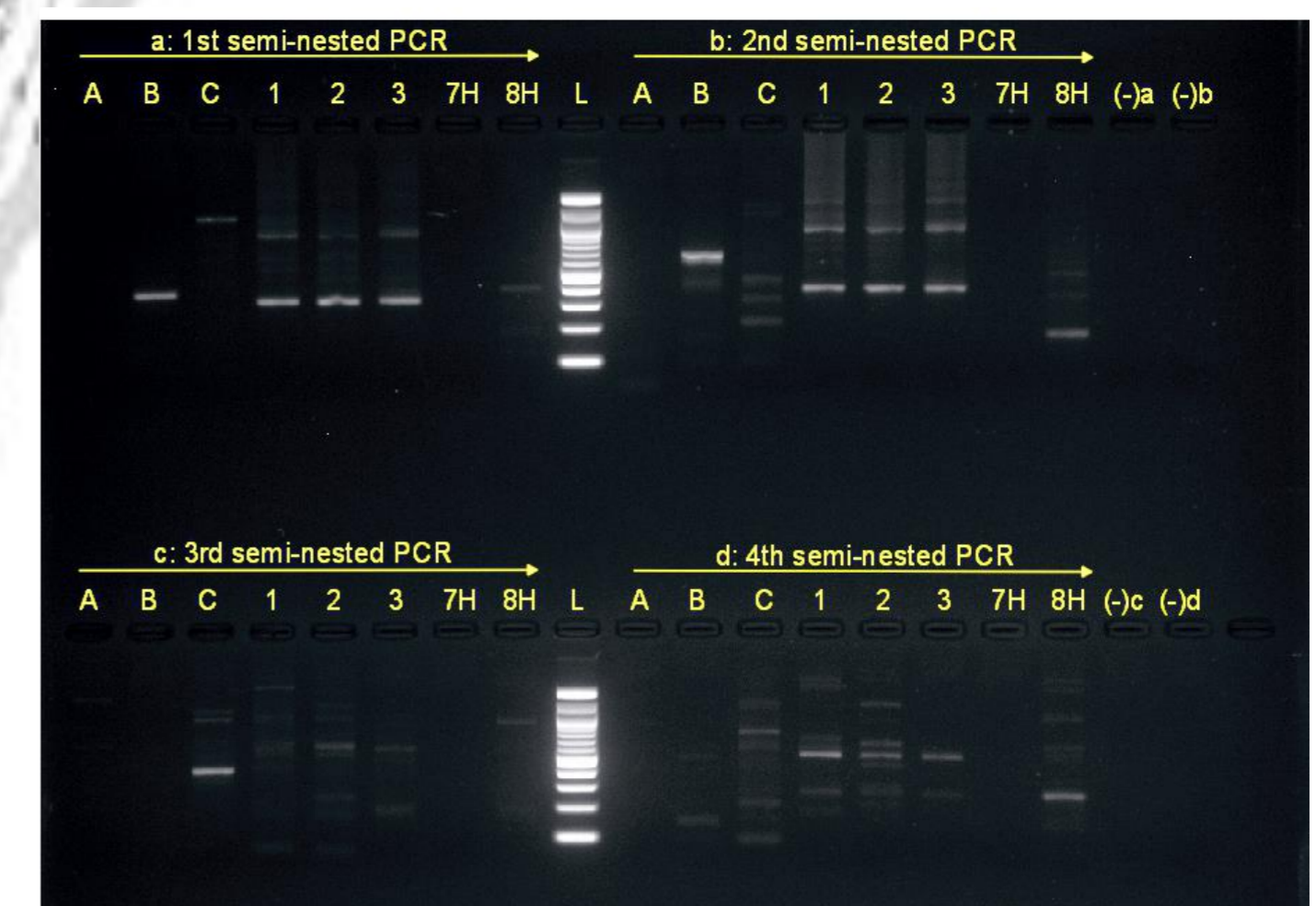


| Primer name | Primer Sequence (5' – 3') | Reference |
|--------------------|---------------------------|----------------------|
| LCO1490 | GGTCAACAATCATAAAGATATTGG | Folmer et al. 1994 |
| HCO2198 | TAAACTTXAGGGTGACCAAAAATCA | Folmer et al. 1994 |
| PnCOI_F_KTSR08 | CCCTGCCAAATTCACCCAGT | Katsares et al. 2008 |
| PnCOI_R_KTSR08 | TTTTGGCTTTTGCCTTCTC | Katsares et al. 2008 |
| PnCOI_Fdg_KTSR08 | CCCTAGCCAAAATTACCCAGT | Katsares et al. 2008 |
| PnCOI_Rdg_KTSR08 | GAAAGAGCAAWAGCCAAAA | Katsares et al. 2008 |
| PnCOI_F_MK22 | CAACACAGGAGAGACTACCA | this study |
| PnCOI_R_MK22 | GGCAGGGTTTTGGGGGA | this study |
| PnCOI_L_SAN13 | GGTTGAACACTATHTCCNCC | Sanna et al. 2013 |
| PnCOI_H_SAN13 | GAAATCATYCCAAAAGC | Sanna et al. 2013 |
| Pmur_COIF_KTSR08 | GAAAGTGCCCGTAACAAAA | Katsares et al. 2008 |
| Pmur_COIR_KTSR08 | TGATAGGGTTCGGGATATG | Katsares et al. 2008 |
| Pmur_COIFdg_KTSR08 | GAAAGTGCCCRGTWACAAART | Katsares et al. 2008 |
| Pmur_COIRdg_KTSR08 | CATATCYGGMACCCCTATCA | Katsares et al. 2008 |

Αποτελέσματα - Συμπεράσματα



Εικ3: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του τμήματος COI με χρήση των εκκινητών Folmer et al. 1994, σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Το γράμμα 'L' υποδεικνύει το μοριακό μάρτυρα (100bp DNA ladder), το βέλος υποδεικνύει τη ζώνη μεγέθους ca. 700bp στην οποία αντιστοιχεί το προϊόν.



Εικ4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του τμήματος COI σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Το γράμμα 'L' υποδεικνύει το μοριακό μάρτυρα (100bp DNA ladder). Ακολούθως παρατίθενται τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δοκιμή. A,B,C: δείγματα από κελύφη νεκρών ατόμων. 1,2,3,7H, 8H: δείγματα κελύφους από ζωντανά άτομα.

| PCR test ID | 1 st PCR primers | 2 nd PCR primers |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| a: 1 st semi-nested | PnCOI_F +R_MK22 | PnCOI_F_MK22 + PnCOI_R_KTSR08 |
| b: 2 nd semi-nested | PnCOI_F +R_MK22 | PnCOI_F_MK22 + PnCOI_Rdg_KTSR08 |
| c: 3 rd semi-nested | PnCOI_F +R_MK22 | PnCOI_F_MK22 + PnCOI_H_SAN13 |
| d: 4 th semi-nested | PnCOI_F +R_MK22 | PnCOI_F_MK22 + Pmur_COIR_KTSR08 |

✗ Με χρήση των universal primers (Folmer et al. 1994) διαπιστώνονται επιμολύνσεις από γενετικό υλικό άλλων οργανισμών (πχ. Υδρόζωα, αμφίποδα κλπ.)

– Οι διαφορετικοί χρόνοι επώασης και η ενυδάτωση ή μη με PBS δε διαφοροποίησαν την ποιότητα του εξαγόμενου DNA.

✓ Η χρήση ειδικών εκκινητών για *Pinna* sp. βελτιώνει την ειδικότητα του πολλαπλασιασμού.

✓ Καλύτερα αποτελέσματα με την 1st semi-nested PCR.

✓ **Σημαντικό αποτέλεσμα:** η επιτυχημένη ενίσχυση του τμήματος της COI από κελύφη νεκρών ατόμων πίννας (δείγματα A, B και C).

Βιβλιογραφία

Catanese et al 2022 doi: [10.1016/j.mex.2022.101708](https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101708) | Folmer et al. Mol Mar Biol Biotechnol. 1994 Oct;3(5):294-9. |Lattos et al. 2021 doi: [10.3390/cells10112838](https://doi.org/10.3390/cells10112838)