

19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων
19th Hellenic Conference of Ichthyologists



ΠΡΑΚΤΙΚΑ
PROCEEDINGS

Υδάτινα Οικοσυστήματα: Σύγχρονες Προσεγγίσεις Διαχείρισης

Συνεδριακό Κέντρο Κάρολος Παπούλιας, Ιωάννινα
30 Οκτωβρίου – 2 Νοεμβρίου 2025

Karolos Papoulias Conference Center, Ioannina
30 October – 2 November 2025

Σύγκριση τεχνικών δειγματοληψίας περιβαλλοντικού DNA για την ανίχνευση ιχθυοποικιλότητας σε τρεις κόλπους της Ελλάδας

Παναγιώτα Ξανθοπούλου^{1,2}, Σάββας Γενίτσαρης³, Βασίλης Παπαθανασίου¹, Ιωάννης Κεφαλός¹, Νατάσσα Στεφανίδου⁴, Αντώνης Μαζάρης⁴, Χρυσούλα Γκουμπίλη¹

¹ Ινστιτούτο Αλιευτικής Έρευνας, Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός-ΔΗΜΗΤΡΑ, Καβάλα

² Τμήμα Ωκεανογραφίας και Θαλασσίων Βιοεπιστημών, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη - xanthopor@inale.gr

³ Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

⁵ Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη

ABSTRACT

Panagiota Xanthopoulou, Savvas Genitsaris, Vasilis Papathanasiou, Ioannis Kefalas, Natassa Stefanidou, Antonios Mazaris, Chrysoula Gubili: Assessing different eDNA sampling techniques for fish community detection in gulfs of Greece

Efficient biomonitoring of coastal areas is essential to design the most appropriate and effective sustainable management strategies to protect important biodiversity, such as endemic and endangered species. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding is an effective method for non-invasive biomonitoring that can generate a lot of biodiversity records with minimal sampling effort. In this study, we applied 12S eDNA metabarcoding to samples from three major gulfs in Greece (Kavala, Saronikos and Thermaikos). Samples were collected via three techniques [a, vacuum pump filtering; b, passive samplers (rolls of gauze); c, inline filtering]. In total, 22 fishes were detected and fish communities diverged among the three gulfs, while the sampling technique was found to significantly affect species composition. Inline filtering provided most species records, followed by vacuum pump filters. Our findings suggest that eDNA-based biodiversity assessments are valuable in coastal ecosystems, but the choice of sampling techniques is critical.

Keywords: environmental DNA, metabarcoding, 12S rRNA, fish, Greece, coastal areas, port

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι παράκτιες περιοχές αποτελούν εξαιρετικά σημαντικά, δυναμικά και ποικιλόμορφα οικοσυστήματα, καθώς περιλαμβάνουν σημαντικούς τύπους οικολόγων, όπως εκβολές, λιμνοθάλασσες και θαλάσσια λιβάδια. Έτσι, δίνουν θέση σε σημαντικά ενδιαίτηματα για πολλά θαλάσσια είδη, όπως ενδημικά, κινδυνεύοντα και σπάνια είδη, προσφέροντας καταφύγια, περιοχές αναπαραγωγής και ανάπτυξης, ιδιαίτερα για ιχθυοπληθυσμούς (Beck *et al.* 2001). Ωστόσο, η έντονη ανθρώπινη παρουσία στις παράκτιες περιοχές, π.χ. μεγάλα λιμάνια και πόλεις, τουρισμός, εντατική αλιεία και ρύπανση, επιβαρύνει τα παράκτια οικοσυστήματα, καθιστώντας αναγκαία την εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων παρακολούθησης και διαχείρισης (Brown *et al.* 2018).

Η μετακωδικοποίηση του περιβαλλοντικού DNA (eDNA metabarcoding), δηλαδή του γενετικού υλικού το οποίο έχει απελευθερωθεί από οργανισμούς στο περιβάλλον, έχει αναδειχθεί ως μια σύγχρονη, μη επεμβατική μέθοδος βιοπαρακολούθησης, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση μεγάλου εύρους οργανισμών σε περιβαλλοντικά δείγματα, π.χ. θαλασσινό νερό (Thomsen & Willerslev 2015). Η τεχνική αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών ειδών με υψηλή ακρίβεια, ακόμη και σε περιπτώσεις όπου οι παραδοσιακές μέθοδοι δειγματοληψίας αποτυγχάνουν, όπως είδη κρυπτικά, μικροσκοπικά ή σε χαμηλή αφθονία (Thomsen & Willerslev 2015).

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, εφαρμόστηκε η τεχνική eDNA metabarcoding για την αξιολόγηση της ιχθυοπανίδας σε τρεις κόλπους της Ελλάδας (Καβάλα, Σαρωνικός και Θερμαϊκός). Οι τρεις κόλποι φιλοξενούν τις σημαντικότερες ιχθυόσκαλες, ενώ οι κόλποι Σαρωνικός και Θερμαϊκός φιλοξενούν τα μεγαλύτερα εμπορικά λιμάνια της χώρας. Τα δείγματα συλλέχθηκαν μέσω τριών διαφορετικών τεχνικών φιλτραρίσματος και η μετακωδικοποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση ειδικών εκκινητών, οι οποίοι είναι ειδικά σχεδιασμένοι για ανίχνευση ιχθύων (Miya *et al.* 2015).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

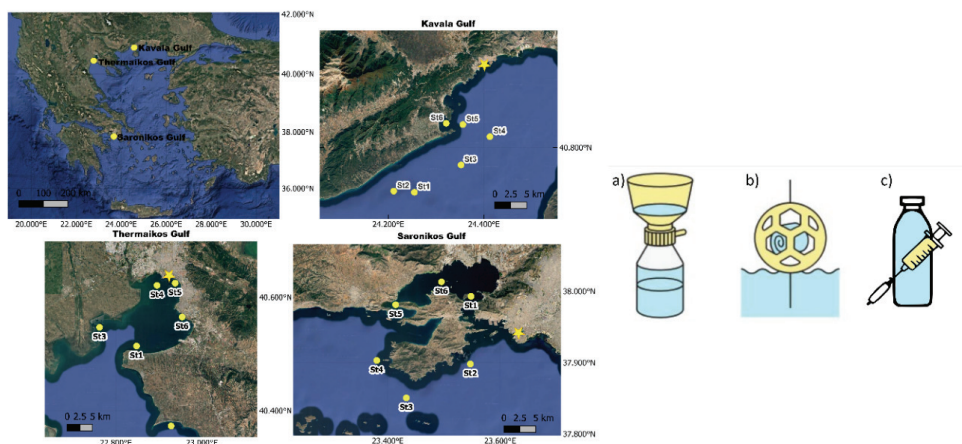
Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στους κόλπους Θερμαϊκό, Σαρωνικό και στον κόλπο Καβάλας (Εικόνα 1). Σε κάθε περιοχή ορίστηκαν έξι σταθμοί και λήφθηκαν δείγματα σε δύο βάθη (επιφάνεια και τέλος της εύρωτης ζώνης). Για κάθε βάθος λήφθηκαν δείγματα με τρεις διαφορετικούς τρόπους (Εικόνα

1): α) σε ανοιχτά φίλτρα με αντλία κενού (0,22 μm ; ένα λίτρο θαλασσινού νερού), β) μέσω παθητικής συλλογής σε ρολό γάζας, και γ) μέσω έγκλειστου φίλτρου με χρήση σύριγγας (steriex; 0,22 μm ; ένα λίτρο θαλασσινού νερού). Για την συλλογή του νερού προς διήθηση χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης νερού τύπου Niskin 5 L.

Η απομόνωση του eDNA έγινε με το DNeasy PowerWater Kit (Qiagen, Γερμανία). Για την ενίσχυση του επιθυμητού κωδικοποιητικού τμήματος DNA, χρησιμοποιήθηκε το MiFish ζεύγος εκκινητών, το οποίο έχει σχεδιαστεί ειδικά για την ανίχνευση ιχθύων στοχεύοντας μια περιοχή του 12S rRNA γονιδίου (Miya *et al.* 2015). Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε στην πλατφόρμα Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, USA) στις εγκαταστάσεις της Novogene (Cambridge, Ηνωμένο Βασίλειο). Η βιοπληροφορική ανάλυση των παραγόμενων αλληλουχιών διεκπεραιώθηκε μέσω της διαδικασίας MJOLNIR (<https://github.com/uiit-metabarcoding/MJOLNIR>), όπου οι αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν σε ταξινομικά λειτουργικές μονάδες (MOTUs) και αντιστοιχίστηκαν σε ταξινομικές ομάδες. Για την αντιστοίχιση σε επίπεδο είδους τέθηκε ως όριο το 97% ομοιότητας με αλληλουχίες του είδους στη βάση δεδομένων DUFa (<https://github.com/uiit-metabarcoding/DUFa>). Η επρροή της περιοχής δειγματοληψίας, σταθμών, δειγματοληπτικών μεθόδων και ζώνης βάθους ελέγχθηκαν με ανάλυση PERMANOVA (vegan 2.6-2) στο RStudio 1.4.1717.

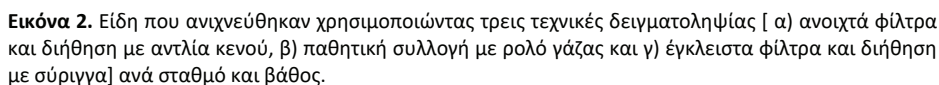
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συνολικά 12,297,457 αλληλουχίες (reads) ομαδοποιήθηκαν σε MOTUS, τα οποία αντιστοιχίστηκαν σε 22 είδη ψαριών (Εικόνα 2). Ο γαύρος *Engraulis encrasicolus* υπήρξε το πιο συχνά ανιχνευόμενο είδος με παρουσία σε όλους τους σταθμούς, εκτός από τον St2 στην Καβάλα. Η παρουσία όλων των ειδών είναι γνωστή στις ελληνικές θάλασσες, εκτός από τον σολομό *Salmo salar*, ο οποίος δεν βρίσκεται στην Ελλάδα και δεν αφορά σε καταγεγραμμένο ξενικό είδος στον Σαρωνικό κόλπο, επομένως θεωρήθηκε πως το γενετικό υλικό του είδους είτε απορρίφθηκε είτε μεταφέρθηκε παθητικά μέσω ρευμάτων στην περιοχή δειγματοληψίας. Επιπλέον, στον St4 του Σαρωνικού κόλπου ανιχνεύθηκε ερυθρός τόνος *Thunnus thynnus*.



Εικόνα 1. Σταθμοί και τεχνικές δειγματοληψίας που χρησιμοποιήθηκαν στους κόλπους Καβάλας, Θερμαϊκό και Σαρωνικό: α) ανοιχτό φίλτρο με αντλία κενού, β) παθητική δειγματοληψία με ρολά γάζας, γ) έγκλειστα αποστειρωμένα φίλτρα με χρήση σύριγγας.

Figure 1. Sampling stations in Kavala, Saronikos, and Thermaikos gulfs and sampling techniques: a) vacuum pump filtering; b) passive samplers (rolls of gauze); c) inline sterile filtering.



421

Η ανάλυση PERMANOVA έδειξε ότι υπήρχε ομοιογένεια ανάμεσα στους σταθμούς της κάθε περιοχής και πως οι ιχθυοκοινότητες που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα από την επιφάνεια και το τέλος της εύφωτης ζώνης δεν διέφεραν σημαντικά ($p > 0,05$). Επιπλέον, οι ιχθυοπληθυσμοί φάνηκαν να διαφέρουν τόσο γεωγραφικά ανάμεσα στους τρεις κόλπους ($R^2=0,093$, $p < 0,001$), όσο και εξαιτίας των μεθόδων δειγματοληψίας ($R^2=0,068$, $p < 0,001$), καθώς και η τομή περιοχής και μεθόδου (αποτελέσματα της κάθε μεθόδου στην ίδια περιοχή) αποφαίνεται σημαντική ($R^2=0,142$, $p = 0,002$). Πράγματι, η παθητική συλλογή με ρολά γάζας παρήγαγε τις λιγότερες καταγραφές σε επίπεδο είδους σε σχέση με τις μεθόδους ενεργητικής διήθησης (Εικόνα 2). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η εκτίμηση της βιοποικιλότητας ιχθύων με την τεχνική του DNA metabarcoding επηρεάζεται άμεσα από την τεχνική δειγματοληψίας που χρησιμοποιείται, ενώ φαίνεται πως σε κάθε σταθμό δειγματοληψίας δείγματα επιφανειακών υδάτων μπορούν να παρέχουν επαρκή αποτελέσματα για την εκτίμηση της σύνθεσης των ιχθυοκοινοτήτων σε παράκτιες περιοχές.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του έργου “Next-generation monitoring and mapping tools to assess marine ecosystems and biodiversity (NEMO-Tools)”. Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Εθνικού Σχεδίου Ανάκαμψης και Ανθεκτικότητας «Ελλάδα 2.0», με τη χρηματοδότηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης – NextGenerationEU (Φορέας Υλοποίησης: ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Brown EJ, Vasconcelos RP, Wennhage H, Bergström U, Støttrup JG *et al.* (2018) Conflicts in the coastal zone: human impacts on commercially important fish species utilizing coastal habitat. *ICES Journal of Marine Science*, 75(4), 1203-1213
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY *et al.* (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088
- Beck MW, Heck KL, Able KW, Childers DL, Eggleston DB *et al.* (2001) The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates: a better understanding of the habitats that serve as nurseries for marine species and the factors that create site-specific variability in nursery quality will improve conservation and management of these areas. *Bioscience*, 51(8), 633-641
- Thomsen PF, Willerslev E (2015) Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological conservation*, 183, 4-18