

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΔΑΣΟΛΟΓΙΑΣ & ΦΥΣΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ & ΑΛΙΕΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Alosa
macedonica* (λιπαριά) ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΑΛΛΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ
ΓΕΝΟΥΣ *Alosa***

**ΚΕΧΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ
Μεταπτυχιακή διατριβή**

**Επιβλέπων καθηγητής:
Απόστολος Π. Αποστολίδης**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2015

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιχθυοκομίας και Αλιείας του Τομέα Ζωικής Παραγωγής της Γεωπονικής Σχολής του Α.Π.Θ. στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμη της Ζωικής Παραγωγής».

Φτάνοντάς στο τέλος αυτής της διαδρομής, με την ολοκλήρωση της συγγραφής της μεταπτυχιακής μου διατριβής, νιώθω την ανάγκη να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους αυτούς που με στήριξαν όλο αυτό το διάστημα και χωρίς αυτούς η εκπόνηση αυτής της εργασίας θα ήταν αδύνατη.

Δεν μπορώ παρά να αρχίσω από τον επιβλέποντά μου, Καθηγητή κ. Αποστολίδη Απόστολο για την ανάθεση του θέματος, τις πολύτιμες συμβουλές του και τη βοήθεια του με κάθε τρόπο σε κάθε στάδιο της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ ακόμη τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Δασολογίας και Φυσικού περιβάλλοντος κύριο Κοκκινάκη Αντώνιο και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας κύριο Μαυρομάτη Αθανάσιο για τη συνεργασία και τις γόνιμες παρατηρήσεις τους που συνέβαλαν στη βελτίωση αυτού του πονήματος.

Ένα μεγάλο και θερμό ευχαριστώ οφείλω στον διδάκτορα πλέον Γιάννη Γιάντση, για τη συνεχή του καθοδήγηση στο εργαστήριο, και την κάθε μορφής στήριξη που μου παρείχε ακούραστα και αδιαμαρτύρητα, πολλές φορές και πέρα από αυτό που του αναλογούσε.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Ανδρέα Γεωργιάδη για τη συνεργασία μας στο εργαστήριο, τις υποδείξεις και τις συμβουλές του όποτε του ζητήθηκε.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την υλική, ηθική και ψυχολογική υποστήριξη τους και την υπομονή τους όλο αυτό το διάστημα. Χωρίς αυτούς δεν θα τα είχα καταφέρει.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1. Γενικά στοιχεία για το είδος <i>Alosa macedonica</i> (λιπαριά)	6
Το γένος <i>Alosa</i> στον ελλαδικό χώρο	7
Το είδος <i>Alosa macedonica</i>	8
Συστηματική κατάταξη του είδους	9
Αναπαραγωγή της λιπαριάς	10
Τροφικές συνήθειες του είδους	11
Αλίευση του είδους	12
1.2. Η λίμνη Βόλβη	12
Κλίμα	13
Φυσικοχημικές παράμετροι της λίμνης	14
Ιχθυοπανίδα	15
Καθεστώς προστασίας	16
Το φαινόμενο του ευτροφισμού στη λίμνη	16
1.3. Γενετική ποικιλότητα	17
Η γενετική ποικιλότητα ως συνιστώσα της βιοποικιλότητας	18
Πληθυσμιακό μέγεθος και γενετική ποικιλότητα	18
Γενετική δομή και διατήρηση απειλούμενων πληθυσμών	19
Πως μετριέται η γενετική ποικιλότητα	20
1.4. Το μιτοχονδριακό DNA	21
Προέλευση	21
Γενικά χαρακτηριστικά	21
Πολυμορφισμοί στο μιτοχονδριακό DNA	23
Ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA	24
Εφαρμογές του μιτοχονδριακού DNA στην έρευνα	24
1.5. Σκοπός της εργασίας	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1. Συλλογή των δειγμάτων	26
2.2. Εξαγωγή DNA	26
2.3. Η PCR-RFLP μεθοδολογία	28
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	28
Η τεχνική RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism)	28
Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε	29
2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζη	33
2.5. Ανάλυση της πρωτοδιάταξης του DNA	34
2.6. Στατιστική επεξεργασία	35
Γενετική ποικιλότητα	35
Φυλογενετικά δένδρα	35
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1. RFLP's	37
3.2. Αλληλούχηση	38
3.3. Φυλογένεση του είδους	41

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
4.1. Γενετική ποικιλότητα	42
4.2. Φυλογένεση του είδους	43
4.3. Διατήρηση του είδους	44
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	57

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Γενικά στοιχεία για το είδος *Alosa macedonica* (Λιπαριά)

Το είδος *Alosa macedonica* ανήκει στην οικογένεια Clupeidae, όπου συγκαταλέγονται ψάρια τροπικών, θερμών και εύκρατων υδάτινων οικοσυστημάτων. Η οικογένεια Clupeidae περιλαμβάνει επτά υποοικογένειες, 63 γένη και περίπου 170 είδη, από τα οποία αρκετά εισέρχονται στα εσωτερικά νερά, άλλα είναι ανάδρομα και άλλα ζουν αποκλειστικά στα εσωτερικά νερά (Banareescu 1990). Μια από τις επτά υποοικογένειες είναι αυτή των Alosinae, η οποία περιλαμβάνει 7 γένη και 31 είδη, μεταξύ των οποίων και το γένος *Alosa* που έχει και το μεγαλύτερο αριθμό ειδών (Whitehead 1985).

Σχετικά με την ετυμολογία του γένους *Alosa*, το όνομα προέρχεται από τη λατινική λέξη *halec* η οποία σημαίνει αλίπαστος (Hostlandt 1991).

Το γένος *Alosa* περιλαμβάνει ψάρια μεσαίου ή μεγάλου μεγέθους που μπορούν να φτάσουν μέχρι τα 75 cm ολικό μήκος (Hostlandt 1991). Το σώμα τους παρουσιάζεται αρκετά πλατυσμένο πλευρικά και καλύπτεται από καλά ανεπτυγμένα λέπια, ενώ ο αριθμός των σπονδύλων κυμαίνεται από 43 ως 59 (Hostlandt 1991).

Τα είδη του γένους *Alosa* διαχωρίζονται σε δύο ομάδες σύμφωνα με τα εξωτερικά χαρακτηριστικά τους (Hostlandt 1991):

- Αλόζες** (Shads): με ψηλό σώμα, πλευρικά πλατυσμένο και βραχεία σε μέγεθος ουραία περιοχή. Το κεφάλι είναι ψηλό, μεγάλο σε μέγεθος και πλευρικά πλατυσμένο με σφηνοειδές σχήμα, ενώ τα θωρακικά πτερύγια είναι μακριά (π.χ. *Alosa caspia*).
- Ρέγκες** (Herrings): με σώμα χαμηλό, όχι πλευρικά πλατυσμένο και που δεν παρουσιάζει βράχυνση στην ουραία περιοχή. Το κεφάλι είναι χαμηλό, όχι πλευρικά πλατυσμένο και το σχήμα του δεν είναι σφηνοειδές, ενώ τα θωρακικά πτερύγια είναι κοντά (π.χ. *Alosa alosa* και *Alosa fallax*).

Οι αλόζες εξαιτίας ορισμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών θεωρούνται πιο πρωτόγονες από τις ρέγκες. Επίσης οι δύο ομάδες εμφανίζουν διαφορές ως προς την οικολογία τους. Οι αλόζες προτιμούν περισσότερο τα λιμνάζοντα νερά ενώ οι ρέγκες τα ρέοντα. Δεν υπάρχουν ανάδρομες αλόζες ενώ αντίθετα οι ρέγκες είναι συχνά ανάδρομες και κατά την περίοδο της αναπαραγωγής τους μεταναστεύουν σε ποταμούς (Hostlandt 1991).

Το γένος *Alosa* περιλαμβάνει 22 είδη (Koltelat 1997). Όσον αφορά τη γεωγραφική τους κατανομή μπορούν να αναφερθούν τα εξής:

•Δυτικός Ατλαντικός : 6 είδη

Όλα τα είδη του Δυτικού Ατλαντικού είναι ανάδρομα και κατά την περίοδο αναπαραγωγής μεταναστεύουν στους ποταμούς της Βόρειας Αμερικής για να γεννήσουν.

•Ανατολικός Ατλαντικός- Μεσόγειος: 5 είδη

Από τα 5 είδη που κατανέμονται στον Ανατολικό Ατλαντικό και τη Μεσόγειο, τα 3 είναι ανάδρομα. Τα υπόλοιπα 2, το *Alosa agone* και το *Alosa killarnensis* είναι λιμναία ολοβιωτικά και διαβιούν αποκλειστικά σε διάφορες λίμνες της Κεντρικής και Βόρειας Ιταλίας το πρώτο και στη λίμνη Lough Lean (Killarney) της Δυτικής Ιρλανδίας το δεύτερο (Quignard & Douchement 1991). Όσον αφορά το δεύτερο είδος, επικρατεί σύγχυση αναφορικά με την ταξινομική του κατάσταση αφού άλλοι ερευνητές το θεωρούν ξεχωριστό είδος και άλλοι υποείδος του *Alosa fallax*, με το όνομα *Alosa fallax killarnensis*.

•Ποντοκάσπια ζώνη : 11 είδη

Από τα 11 είδη της ποντοκάσπιας ζώνης, τα 6 βρίσκονται στην Κασπία, ενώ στη Μαύρη Θάλασσα υπάρχουν άλλα 3 είδη. Τέλος άλλα δύο είδη, το *Alosa macedonica* και το *Alosa vistonica* είναι λιμναία ολοβιωτικά και ζουν αποκλειστικά στις λίμνες Βόλβη και Βιστωνίδα αντίστοιχα.

Το γένος *Alosa* στον ελλαδικό χώρο

Το γένος *Alosa* απαντά στον ελλαδικό χώρο με 3 είδη : *Alosa fallax*, *Alosa macedonica* και *Alosa vistonica* (Bobori et al 2001).

Το είδος *A. fallax* (κοινές ονομασίες κέππα, φρίσσα ή σαρδελομάνα) έχει καταγραφεί στο Βόρειο Αιγαίο, στη λιμνοθάλασσα του Πόρτο Λάγο, στο Ιόνιο Πέλαγος, στον Κορινθιακό και Πατραϊκό κόλπο, στους ποταμούς Έβρο, Νέστο, Στρυμόνα, Πηνειό, Αχελώο καθώς και στη λίμνη Βιστωνίδα (Bobori et al 2001).

Το είδος *Alosa vistonica* (κοινή ονομασία θρίτσα) είναι ψάρι ενδημικό στη λίμνη Βιστωνίδα. Η λίμνη αυτή βρίσκεται στη Θράκη, στα σύνορα των νομών Ξάνθης και Ροδόπης. Ενώνεται μέσω ενός καναλιού με το Θρακικό πέλαγος, οπότε οι συνθήκες που επικρατούν μοιάζουν πολύ με αυτές λιμνοθάλασσας. Το είδος αρχικά είχε περιγραφεί ως υποείδος με το όνομα *Alosa caspia vistonica* από τους Economidis & Sinis (1986). Ωστόσο, ο Kottelat (1997) αναθεωρώντας τη συστηματική κατάταξη του είδους *Alosa caspia* κατέταξε το *vistonica* ως διαφορετικό είδος.

Μορφολογικά το *Alosa vistonica* παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το *Alosa macedonica*. Σύμφωνα με τους Economidis & Sinis η θρίτσα, όπως και η λιπαριά προέρχονται από προγόνους από την Ποντοκάσπια λεκάνη και προσαρμόστηκε στη λεκάνη απορροής της λίμνης Βιστωνίδας. Κατά τη διάρκεια μιας μεσοπαγετωνικής περιόδου του Τεταρτογενούς, που χαρακτηριζόταν από υψηλή αλατότητα, το είδος απομονώθηκε στο λιμναίο τμήμα της Βιστωνίδας αφού δεν ήταν σε θέση να διαπεράσει το φράγμα υψηλής αλατότητας του Βορείου Αιγαίου. Στο κάτω μέρος της Βιστωνίδας, όπου επικρατεί υφάλμυρο

νερό, βρίσκεται επίσης και το είδος *Alosa fallax* καθώς εισέρχεται εύκολα από την ανοιχτή θάλασσα.

Το γεγονός ότι το *Alosa vistonica* δεν έχει παρατηρηθεί στα κοντινά ποτάμια (Έβρος και Νέστος) επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι το είδος δε μεταναστεύει.

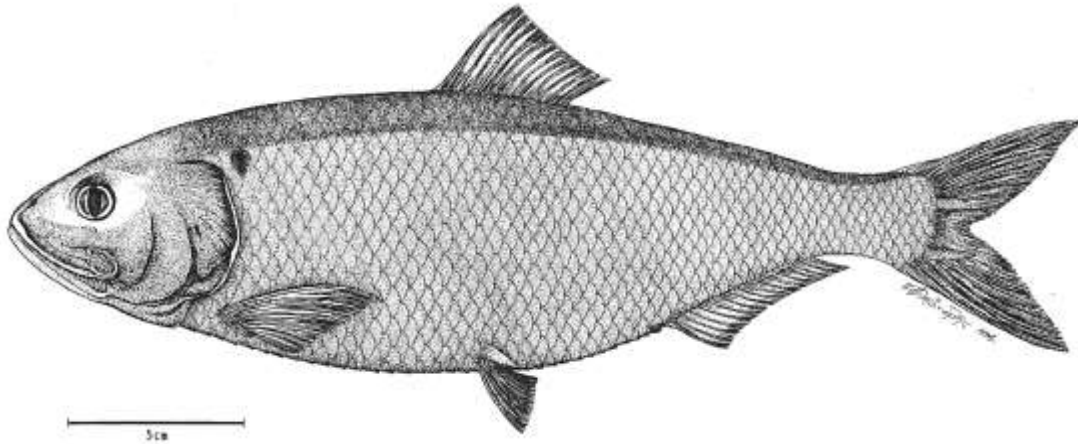
Ο πληθυσμός του στη λίμνη Βιστωνίδα έχει εκλείψει τα τελευταία χρόνια. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην εξάπλωση των αλμυρών νερών μέχρι το λιμναίο τμήμα της Βιστωνίδας ή και σε ρύπανση από αστικά και γεωργικά λύματα του οικοτόπου του. Ως εκ τούτου θα πρέπει να χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά απειλούμενο (Bobori et al 2001) ή ακόμα και εξαφανισμένο (extinct) είδος σύμφωνα με ακόμα πιο πρόσφατες μελέτες (Bobori & Economidis 2006). Δυστυχώς μετά από επικοινωνία που είχαμε με τοπικούς ψαράδες, μας διαβεβαίωσαν ότι το ψάρι έχει πιθανότατα εξαφανιστεί, αφού έχουν χρόνια να το αλιεύσουν.

Το είδος *Alosa macedonica*

Το είδος *Alosa macedonica* με κοινό όνομα λιπαριά (Εικόνα 1), αποτελεί ενδημικό είδος της λίμνης Βόλβης. Η παρουσία του *A. macedonica* έχει αναφερθεί και στη γειτονική λίμνη Κορώνεια (Ananiadis 1951). Ενδεχομένως η εμφάνισή του εκείνη την περίοδο να οφείλονταν στην ύπαρξη ενός καναλιού 12 km (ενωτική τάφρος) διαμέσου του οποίου οι δύο λίμνες επικοινωνούσαν επιτρέποντας έτσι την άνοδο της λιπαριάς. Αργότερα η μείωση της στάθμης του νερού και το φράξιμο της ενωτικής τάφρου από φερτά υλικά δεν επέτρεπαν τη συνεχή επικοινωνία μεταξύ των δύο λιμνών (Κλεανθίδης 2002). Ακόμα, η υποβάθμιση των αβιοτικών και βιοτικών παραμέτρων της λίμνης Κορώνειας (Γραμματικοπούλου κ.α. 1996) κατέστησαν το περιβάλλον της λίμνης ακατάλληλο τόσο για τη διαβίωση της λιπαριάς όσο και για άλλα είδη ψαριών.

Το είδος εξαφανίστηκε από τη λίμνη Κορώνεια το 1995 που η λίμνη στέγνωσε κι έτσι απεβίωσαν όλα τα ψάρια που ζούσαν εκεί (Crivelli 1996).

Σχετικά με την ετυμολογία, το όνομα *macedonica* επιλέχθηκε επειδή το είδος ανακαλύφθηκε στη λίμνη Βόλβη της Μακεδονίας (Economidis & Sinis 1991).



Εικόνα 1: *Alosa macedonica* (Vinciguerra 1921) από Economidis & Sinis 1986

Όσον αφορά την προέλευση του είδους, το *Alosa macedonica* αντιπροσωπεύει κατάλοιπο της ποντοκάσπιας ιχθυοπανίδας και δεν έχει σχέση με την ιχθυοπανίδα της Δυτικής Ευρώπης (Economidis & Sinis 1986). Σύμφωνα με μορφολογικές μελέτες των παραπάνω ερευνητών, οι πρόγονοι του *A. macedonica* ανήκαν σε ένα ανάδρομο είδος που προέρχονταν από την Ποντοκασπική λεκάνη και κατοικούσε στη θαλάσσια περιοχή του Β. Αιγαίου. Κατά την Κατώτερη τεταρτογενή περίοδο, όταν η Μυγδονία λίμνη επικοινωνούσε μέσω του Κρανολακου με το Στρυμονικό κόλπο, η λιπαριά πραγματοποιώντας ποταμότοκες μεταναστεύσεις έφτασε στη Βόλβη. Στη συνέχεια όμως, εξαιτίας της νέας αποκοπής της λίμνης από τη θάλασσα (Ψιλοβίκος 1977), η λιπαριά αναγκάστηκε να ζήσει ολοβιωτικά στη λίμνη. Αργότερα, όταν αποκαταστάθηκε ξανά η επικοινωνία της λίμνης με τη θάλασσα διαμέσου των στενών της Ρεντίνας, η απομόνωση και ο εγκλιματισμός του είδους στο γλυκό νερό δεν επέτρεψαν την επιστροφή του στα νερά του Β. Αιγαίου, που χαρακτηρίζονταν από υψηλή αλατότητα και λειτουργούσαν ως φυσικό εμπόδιο στην επάνοδο της λιπαριάς στη θάλασσα. Η προσαρμογή της λιπαριάς στο λιμναίο περιβάλλον, διαφοροποίησε επομένως το είδος στη μορφή με την οποία παρουσιάζεται μέχρι σήμερα.

Συστηματική κατάταξη του είδους

Για πρώτη φορά η λιπαριά περιγράφεται ως νέο είδος από τον Vinciguerra το 1921. Ο Vinciguerra θεώρησε το νέο είδος πολύ σημαντικό καθώς αποτελούσε μαζί με το είδος *Clupea fintalacustris* των λιμνών της Λομβαρδίας (Β. Ιταλία), το δεύτερο ευρωπαϊκό Clupeidae που έχει προσαρμοστεί ολοκληρωτικά στα εσωτερικά νερά.

Οι Economidis και Sinis (1986), αναφέρουν ως κύριους διαγνωστικούς χαρακτήρες για το διαχωρισμό του από άλλα είδη τα εξής:

- παρουσία μικρών δοντιών στα υπερώια
- μια μόνο μαύρη κηλίδα στο σώμα, πίσω από το βραγχιακό επικάλυμμα
- 48 ως 50 σπόνδυλοι
- 106 ως 128 μαύρες και πυκνές βραγχιακές άκανθες πάνω στο πρώτο βραγχιακό τόξο, αρκετά πιο μακριές από τα νηματοειδή βράγχια
- μέγιστο ολικό μήκος σώματος 35 cm
- μορφή σώματος αλαζοειδής, δηλαδή με σώμα πλευρικά πλατυσμένο και βραχύ ουραίο τμήμα.

Οι Economidis και Sinis επισημαίνουν ότι οι πρώτοι 3 χαρακτήρες αρκούν για να διαχωρίσουν το *Alosa macedonica* από το *Alosa alosa*. Επίσης, ο μεγάλος αριθμός των βραγχιακών ακανθών διαφοροποιεί το *A. macedonica* από τα είδη *A. caspia*, *A. maotica*, *A. pontica* και *A. fallax* της Μαύρης Θάλασσας που αναφέρονται από τον Svetovidov (1973). Τέλος, το μόνο είδος που παρουσιάζει αριθμό βραγχιακών ακανθών μεγαλύτερο από 100 είναι το *Alosa caspia bulgarica* (Marinov 1963). Εντούτοις, τα δύο είδη διαφοροποιούνται και σε αυτή την περίπτωση αφού το *A. caspia bulgarica* είναι είδος ανάδρομο και με γεωγραφική κατανομή εντελώς διαφορετική του *A. macedonica*.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω η συστηματική κατάταξη του είδους είναι:

Κλάση	Osteichthyes
Υποκλάση	Euteleostei
Υπερτάξη	Clupeomorpha
Τάξη	Clupeiformes
Υποτάξη	Clupeoidei
Οικογένεια	Clupeidae
Υποοικογένεια	Alosinae
Γένος	<i>Alosa</i>
Είδος	<i>macedonica</i>

Αναπαραγωγή της λιπαριάς

Ο πληθυσμός της λιπαριάς κατά το μεγαλύτερο μέρος του αποτελείται από άτομα ηλικίας μικρότερης των 4 ετών αν και υπάρχουν άτομα που φτάνουν και τα 6 χρόνια. Ως προς το μήκος κατά μέσο όρο φτάνουν τα 200 mm.

Η γενετική ωρίμανση τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά άτομα επέρχεται από τον πρώτο χρόνο ζωής, γεγονός που όπως φαίνεται αποτελεί ένα ισχυρό μέσο προσαρμογής και επιβίωσης της λιπαριάς στο περιβάλλον της λίμνης παρέχοντας ταυτόχρονα στο είδος την ικανότητα γρήγορης γενετικής ανανέωσης του πληθυσμού.

Το είδος χαρακτηρίζεται από υψηλή γονιμότητα και μικρό μέγεθος αυγών σε σχέση με άλλα ολοβίωτικά είδη του γένους *Alosa*.

Η περίοδος ωοτοκίας του *Alosa macedonica* αρχίζει γύρω στα μέσα Ιουνίου και ολοκληρώνεται στα μέσα Αυγούστου, με θερμοκρασία νερού από 21-25°C. Η ωοτοκία επιτελείται τμηματικά και γίνονται τουλάχιστον δύο ωοαποθέσεις (Κλεανθίδης 2002). Όσον αφορά τα αρσενικά, παρουσιάζουν σε σχέση με τα θηλυκά μεγαλύτερη ποσοστιαία αύξηση και μείωση του GSI (γοναδοσωματικός δείκτης) στην αρχή και το τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου, αντίστοιχα. Έτσι θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα αρσενικά άτομα ωριμάζουν λίγο νωρίτερα από τα θηλυκά, πλησιάζουν πρώτα στους χώρους αναπαραγωγής, όπου παραμένουν και απελευθερώνουν το σπέρμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Έχει παρατηρηθεί ότι το *A. macedonica* όπως και άλλα ολοβιωτικά είδη ή πληθυσμοί *Alosa* παρουσιάζουν σημαντική χρονική υστέρηση στην αναπαραγωγική τους περίοδο σε σχέση με τα μεταναστευτικά ανάδρομα είδη *Alosa*. Αυτή η διαφορά ενδέχεται να οφείλεται στην παρουσία διαθέσιμης τροφής στη λίμνη οπότε και οι ενεργειακές ανάγκες του είδους για την ωρίμανση των γονάδων ικανοποιούνται μόνο την Άνοιξη όταν τα διαθέσιμα τροφικά αποθέματα της λίμνης φτάνουν σε ένα επίπεδο (Berd & Gremaldi 1966). Αντίθετα στο θαλάσσιο περιβάλλον που διαβιούν τα ανάδρομα είδη *Alosa*, τα τροφικά αποθέματα είναι μεγαλύτερα και με πιο σταθερή παρουσία, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα ωρίμανσης των γονάδων από τα τέλη του χειμώνα και επιτρέποντας παράλληλα την έναρξη μετανάστευσης προς τα γλυκά νερά.

Έτσι λοιπόν και στην περίπτωση του *Alosa macedonica* που χαρακτηρίζεται από ζωοπλακτοφαγία, η έναρξη ωρίμανσης των γονάδων συμπίπτει χρονικά και εξαρτάται άμεσα από το ανοιξιάτικο μέγιστο της αφθονίας του ζωοπλαγκτού που παρατηρείται στη Βόλβη τον Απρίλιο. Εκτός όμως από την ωρίμανση των γονάδων, η περίοδος ωοτοκίας στα ψάρια θα πρέπει να διασφαλίζει την εκκόλαψη των αυγών και την αύξηση των προνυμφών που θα γεννηθούν γι' αυτό γίνεται σε περιόδους που η διαθέσιμη τροφή για την ανάπτυξη τους είναι άφθονη (Johling 1995). Όσον αφορά το *A. macedonica*, φαίνεται ότι η καθυστερημένη χρονικά περίοδος ωοτοκίας του είδους τοποθετεί τα νεαρά άτομα που θα γεννηθούν κοντά στο άλλο μέγιστο του ζωοπλαγκτού που παρατηρείται στη λίμνη κατά τη φθινοπωρινή περίοδο παρέχοντας τους έτσι τη δυνατότητα γρήγορης αύξησης ώστε να ανταπεξέλθουν στις χαμηλές θερμοκρασίες και στη μειωμένη παρουσία τροφής στη διάρκεια του χειμώνα.

Τροφικές συνήθειες του είδους

Οι τροφικές συνήθειες των ειδών του γένους *Alosa* έχουν αποτελέσει συχνό αντικείμενο έρευνας εξαιτίας της επιλεκτικής θήρευσης που ασκούν στο ζωοπλαγκτό, τον τροφικό ανταγωνισμό με άλλα ζωοπλαγκτοφάγα είδη, τη θήρευση που ασκούν στο γόνιο άλλων ψαριών, τη συχνή εισαγωγή τους σε λίμνες για να αποτελέσουν τροφή για ιχθυοφάγα ψάρια και τέλος για τα φαινόμενα μαζικής θνησιμότητας που παρουσιάζουν οι πληθυσμοί τους.

Όσον αφορά τις τροφικές συνήθειες του *Alosa macedonica* ελάχιστες είναι οι διαθέσιμες πληροφορίες. Η διατροφή ατόμων από 120 ως 350 mm συνίσταται κυρίως από καρκινοειδή (κλαδόκερα και κωπήποδα), ενώ στα μεγαλύτερα σε μέγεθος άτομα μπορεί να περιέχει και ψάρια (Economidis & Sinis 1991).

Αλίευση του είδους

Η λιπαριά αποτελούσε ένα από τα κυριότερα αλιεύματα της λίμνης Βόλβης, φτάνοντας ως και το 68% της ετήσιας αλιευτικής παραγωγής της λίμνης (Bobori et al 2001). Τα τελευταία χρόνια ωστόσο δεν αλιεύεται συστηματικά, λόγω χαμηλής εμπορικής αξίας, και προτιμώνται πλέον άλλα είδη ψαριών όπως τα Κυπρινοειδή. Ωστόσο εξακολουθεί να αλιεύεται σε μικρές ποσότητες στις αρχές του καλοκαιριού και αποτελεί προϊόν αλιείας για την τοπική κοινωνία που καταναλώνεται κυρίως παστό. Μάλιστα στο χωριό Μικρή Βόλβη γίνεται κάθε χρόνο μια γιορτή προς τιμήν της, η γιορτή της λιπαριάς.

Το είδος περιλαμβάνεται στη κόκκινη λίστα με τα επαπειλούμενα είδη από τον οργανισμό IUCN (International Union for Conservation of Nature) και χαρακτηρίζεται ως τρωτό (vulnerable).

Ο πληθυσμός του *Alosa macedonica* φαίνεται να παρουσιάζει αυξητική τάση τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω υπεραλίευσης των θηρευτών της (Zarfadjian 1996).

Αν και στο παρελθόν η αλίευση του ψαριού ήταν αλόγιστη και η υπεραλίευση του συχνό φαινόμενο, σήμερα που οι ψαράδες όλο και λιγοστεύουν αυτό δεν φαίνεται να αποτελεί απειλή για το είδος. Αντίθετα, ο συνεχής ευτροφισμός της λίμνης και η άντληση του νερού για άρδευση ενδέχεται να αποτελέσουν απειλές στο μέλλον. Μπορεί ακόμη να απειληθεί από την εισαγωγή άλλων ειδών στη λίμνη. Παρόλο που το είδος προστατεύεται από την ελληνική νομοθεσία δυστυχώς στην πράξη τυγχάνει μικρής προσοχής.

1.2.Η λίμνη Βόλβη

Η λίμνη Βόλβη (συντεταγμένες 40°40'54'N 23°28'02'E, Εικόνα 2), γνωστή παλαιότερα και ως λίμνη Μπεσικίων αποτελεί τη μεγαλύτερη λίμνη της Μακεδονίας και τη δεύτερη μεγαλύτερη φυσική λίμνη της χώρας μετά τη λίμνη Τριχωνίδα. Βρίσκεται στην Κεντρική Μακεδονία, στο νομό Θεσσαλονίκης, περίπου 35 km βορειοανατολικά από την πόλη της Θεσσαλονίκης και 8 χλμ. δυτικά από την θάλασσα του Στρυμονικού κόλπου. Είναι διατεταγμένη σε σειρά με την λίμνη Κορώνεια και σε απόσταση 11,5 km από αυτήν. Στα ανατολικά της βρίσκονται τα στενά της Ρεντίνας ή αλλιώς Μακεδονικά Τέμπη. Η λίμνη Βόλβη έχει σχήμα επίμηκες, διεύθυνση ανατολικά-δυτικά, το μέσο μήκος είναι 19,5 km και το μέσο πλάτος της 3,4 km. Η επιφάνεια της λίμνης, για μέση στάθμη 37 μέτρα, έχει έκταση 70,8 km² και όγκο νερού 940 x 10³ m³. Το συνολικό μήκος ακτογραμμών της είναι 54,4 km και μέγιστο βάθος που φτάνει τα 23 μέτρα. Το μέσο βάθος της είναι 13,5 m. Η λίμνη Βόλβη απορρέει στη θάλασσα (Στρυμονικό κόλπο) μέσω του ποταμού Ρήχιου. Πολλές φορές η επικοινωνία μεταξύ της λίμνης και του Ρήχιου χάνεται εξαιτίας της μείωσης της στάθμης του νερού στη λίμνη.



Εικόνα 2: η λίμνη Βόλβη (www.newpost.gr)

Η λίμνη είναι τεκτονικής προέλευσης και σχηματίστηκε κατά το Κατώτερο Πλειστόκαινο (Ψιλοβίκος 1977). Εκατομμύρια χρόνια πριν, η λίμνη Βόλβη μαζί με τη λίμνη Κορώνεια και όλη τη λεκάνη της Μυγδονίας αποτελούσαν μια μεγάλη ενιαία λίμνη, τη Μυγδονία. Οι γειτονικές αυτές λίμνες είναι ό,τι απόμεινε από τότε και καλύπτουν τα βαθύτερα σημεία της κοιλάδας της Μυγδονίας, που χωρίζει το Χολομώντα και το Χορτιάτη από τον υπόλοιπο ορεινό όγκο της Κεντρικής Μακεδονίας (Παυλίδης κ.α. 1984).

Η λίμνη Βόλβη αποτελεί τον κύριο φυσικό αποδέκτη των γύρω χειμάρρων μεταξύ των οποίων είναι : στη νότια πλευρά, τα ρέματα της Κερασιάς, του Χολομώντα (Ατσαλιώτικο), και της Παζαρούδας (Μεγάλο Ρέμα), στη Βορειοανατολική πλευρά το ρέμα της Βαμβακιάς και στα δυτικά το ρέμα του Δερβενίου. Η Βόλβη δέχεται επίσης τα νερά δύο θερμομεταλλικών πηγών (Νέας Απολλωνίας και Μ. Αλεξάνδρου) που βρίσκονται στη νότια πλευρά της, ενώ παλαιότερα υπήρχε επικοινωνία και με τη λίμνη Κορώνεια διαμέσου αποστραγγιστικής τάφρου.

Οι ακτές της λίμνης στη νότια πλευρά της παρουσιάζονται ομαλές, χαμηλές και αμμώδεις ενώ αντίθετα στη βόρεια είναι απότομες και βραχώδεις. Η ανατολική και η δυτική πλευρά της λίμνης εμφανίζουν χαμηλές, αμμώδεις και ιλυώδεις ακτές.

Σύμφωνα με τη μυθολογία, Βόλβη ήταν το όνομα μιας νύμφης με την οποία ο Ηρακλής απέκτησε ένα γιο, τον Όλυνθο. Απ' αυτήν πήρε την ονομασία της η λίμνη.

Κλίμα

Το κλίμα της περιοχής χαρακτηρίζεται ως μεσόθερμο (μεταβατικό μεταξύ μεσογειακού και ηπειρωτικού τύπου) με ξηρή περίοδο το καλοκαίρι, ενώ στα ανώτερου υψομέτρου τμήματα επικρατούν δριμύτερες κλιματικές συνθήκες. Ο

ετήσιος μέσος όρος της θερμοκρασίας αέρα είναι περίπου 15°C (Ζεϊμπέκη 2004). Οι βροχοπτώσεις στην περιοχή παρουσιάζουν δύο μέγιστα από τα οποία ένα κύριο το Μάιο με 57,5 mm και ένα δευτερεύον, που υπολείπεται ελάχιστα από το κύριο, το Νοέμβριο με 56,9 mm (Υ.ΠΕ.ΧΩ.Δ.Ε. 1986) Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η λίμνη Βόλβη αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα για το κλίμα της περιοχής αφού ο υδατικός της όγκος αποτελεί “αποθήκη” θερμότητας επηρεάζοντας έτσι τη θερμοκρασία και την υγρασία της περιοχής (Μυλόπουλος & Τολίκας 2002). Η ύπαρξη τυπικής βλάστησης μεσογειακού τύπου στα κατώτερα παραλίμνια τμήματα της Βόρειας πλευράς της συνηγορεί στην άποψη του Μεσογειακού κλίματος (Υ.ΠΕ.ΧΩ.Δ.Ε 1984).

Όσον αφορά τους ανέμους που πνέουν στην περιοχή, επικρατέστεροι σε ένταση και συχνότητα είναι ο Βαρδάρης (βορειοδυτικός άνεμος) και ο Ρουπελιώτης (βορειοανατολικός) (Υ.ΠΕ.ΧΩ.Δ.Ε 1986).

Φυσικοχημικές παράμετροι της λίμνης

Η θερμοκρασία του νερού στην επιφάνεια της λίμνης παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του έτους, εμφανίζοντας τις χαμηλότερες τιμές τους μήνες Ιανουάριο –Φεβρουάριο και τις υψηλότερες τους Ιούλιο –Αύγουστο (Economidis 1991). Η θερμοκρασία του νερού από το Σεπτέμβριο μέχρι τον Απρίλιο διατηρείται σταθερή σχεδόν σε όλο το βάθος του νερού ενώ από το Μάιο ως τον Αύγουστο η λίμνη εμφανίζει θερμική στρωμάτωση με θερμόκλινο που παρουσιάζεται σε βάθος μεταξύ 10-14 m. Επίσης, η λίμνη δεν παγώνει τη χειμερινή περίοδο και η θερμοκρασία του νερού δεν κατεβαίνει κάτω από τους 4°C καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Zarfadjian 1989). Αν ληφθούν υπόψη όλα τα παραπάνω στοιχεία, τότε σύμφωνα με την κατάταξη κατά Hutchinson (1957), η Βόλβη μπορεί να θεωρηθεί λίμνη θερμού μονόμικτου τύπου (Zarfadjian 1989).

Όσο για την κατανομή του διαλυμένου οξυγόνου, παρουσιάζεται ομοιόμορφη σε όλη τη στήλη του νερού καθ' όλη τη φθινοπωρινή και χειμερινή περίοδο εξαιτίας της ανάμιξης των νερών από τη δράση των ανέμων. Ωστόσο από το Μάιο και καθ' όλη τη θερινή περίοδο, ταυτόχρονα με τη θερμική στρωμάτωση, οι διαφορές του διαλυμένου οξυγόνου στη στήλη του νερού μεγιστοποιούνται, φτάνοντας σε συνθήκες σχεδόν ανοξικές πάνω απ' το βυθό (Economidis 1991). Σύμφωνα με τη Μουστάκα (1988), οι διαφορές στο διαλυμένο οξυγόνο μεταξύ επιφάνειας και βυθού οφείλονται στην αυξημένη παραγωγή οξυγόνου στα επιφανειακά στρώματα εξαιτίας της φωτοσύνθεσης, στην έντονη αποικοδόμηση στα κατώτερα στρώματα και στην απουσία ανάμιξης των ανώτερων με τα κατώτερα στρώματα.

Όσον αφορά το pH της λίμνης, βρίσκεται στην αλκαλική περιοχή. Συγκεκριμένα, κατά την περίοδο '77-'78 το pH κυμάνθηκε μεταξύ 7,40- 8,75 (Σίνης 1981), ενώ για την περίοδο '85 – '86 βρισκόταν μεταξύ 7,3- 9,3 τόσο στην επιφάνεια όσο και στα βυθό της λίμνης (Zarfadjian 1989).

Τέλος, η ειδική αγωγιμότητα στα νερά της λίμνης, κατά την περίοδο 1977-78 κυμάνθηκε μεταξύ 730×10^{-6} και 1220×10^{-6} mhos \times cm $^{-1}$.

Ιχθυοπανίδα

Η ιχθυοπανίδα του συστήματος των λιμνών Κορώνειας και Βόλβης εντάσσεται ζωογεωγραφικά στον τομέα Στρυμόνα - Έβρου της Ποντοκαστικής ζώνης από την οποία και κατάγεται (Economidis & Sinis 1982).

Σε ό,τι αφορά την ιχθυοπανίδα της λίμνης, αναφέρονται 24 είδη ψαριών και 3 υβρίδια των ειδών *Leuciscus cephalus macedonicus* x *Chalcalburnus chalcoides macedonicus* (Economidis & Sinis 1988) και του *Abramis brama* με τα είδη *Scardinius erythrophthalmus* και *Rutilus rutilus* (Economidis & Heeler 1989, Πίνακας 1). Στη λίμνη κατά καιρούς έχουν πραγματοποιηθεί εμπλουτισμοί, όπως το 1986 με άτομα του είδους *Silurus aristotelis* (Economidis 1991). Ακόμη, επίσης το 1986 πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός με άτομα του είδους *Perca fluviatilis*, μετά από πρωτοβουλία του αλιευτικού συνεταιρισμού της περιοχής. Η λίμνη αλιεύεται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους εκτός από το διάστημα Απριλίου – Μαΐου, που αποτελεί την κύρια αναπαραγωγική περίοδο για όλα σχεδόν τα είδη.

Πίνακας 1 : Κατάλογος ειδών ψαριών που έχουν καταγραφεί στη λίμνη Βόλβη (Economidis 1991, Economou et al, 2007). Ονοματολογία σύμφωνα με Kottelat & Freyhof (2007) και Froese & Pauly (2010).

Είδος	Κοινή ονομασία
<i>Abramis brama</i> (Linnaeus, 1758)	Λεστιά
<i>Alburnus</i> sp. Volvi Kottelat & Economidis, 2006	Σίρκο
<i>Alburnus volviticus</i> Freyhof & Kottelat, 2007	Γελάρτζα
<i>Alosa macedonica</i> (Vinciguerra, 1921)	Λιπαριά
<i>Anguilla anguilla</i> (Linnaeus, 1758)	Χέλι
<i>Barbus strumicae</i> Karaman, 1955	Βεργιάνα
<i>Carassius gibelio</i> (Bloch, 1782)	Πεταλούδα
<i>Cobitis strumicae</i> Karaman, 1955	Θρακοβελονίτσα
<i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus, 1758	Γριβάδι
<i>Esox lucius</i> Linnaeus, 1758	Τούρνα
<i>Gambusia holbrooki</i> Girard, 1859	Κουνουπόψαρο
<i>Knipowitschia caucasica</i> (Berg, 1916)	Ποντογωβιός
<i>Perca fluviatilis</i> Linnaeus, 1758	Περκί
<i>Petroleuciscus borysthenicus</i> (Kessler, 1859)	Τσαϊλάκι
<i>Pseudorasbora parva</i> (Temminck & Schlegel, 1846)	Ψευτορασμπόρα
<i>Rhodeus amarus</i> (Bloch, 1782)	Μουρμουρίτσα
<i>Rutilus rutilus</i> (Linnaeus, 1758)	Τσιρώνι
<i>Salaria fluviatilis</i> (Asso, 1801)	Ποταμοσαλιάρα
<i>Scardinius erythrophthalmus</i> (Linnaeus, 1758)	Κοκκινοφτέρα
<i>Silurus aristotelis</i> Garman, 1890	Γλανίδι
<i>Silurus glanis</i> Linnaeus, 1758	Γουλιανός
<i>Squalius rphesus</i> Kottelat & Economidis, 2006	Τυλινάρι
<i>Tinca tinca</i> (Linnaeus, 1758)	Γληνί
<i>Vimba melanops</i> (Heckel, 1837)	Μαλαμίδα

Καθεστώς προστασίας

Το υγροτοπικό σύμπλεγμα Κορώνειας - Βόλβης - Ρήχιου ποταμού αποτελεί ευαίσθητο οικοσύστημα εξαιρετικά μεγάλης σημασίας ως προς το ρόλο που διαδραματίζει για τη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας και τη διαφύλαξη της βιοποικιλότητας. Το υγροτοπικό σύστημα περιλαμβάνει λίμνες (Κορώνεια, Βόλβη), ποτάμια, παρόχθια δάση (παραλίμνιο δάσος Απολλωνίας, δάσος Ρεντίνας), καλαμώνες, υγρολίβαδα, θαμνώδεις και γεωργικές εκτάσεις συγκροτώντας έτσι έναν υδροβιότοπο διεθνούς σημασίας. Σε διεθνές, ευρωπαϊκό και εθνικό επίπεδο και σε ότι αφορά στο καθεστώς προστασίας, η περιοχή των λιμνών Κορώνειας –Βόλβης έχει χαρακτηριστεί ως:

- Υγρότοπος διεθνούς σημασίας με την ονομασία “λίμνες Βόλβη και Κορώνεια” βάσει της Διεθνούς Σύμβασης Ramsar “ περί προστασίας των διεθνούς ενδιαφέροντος υγροτόπων” (Ν.Δ.191/74(ΦΕΚ350/Α/29-11-74), Ν 1751/88 (ΦΕΚ 26/Α/9-2-88) Ν 1950/91(ΦΕΚ 84/Α/31-5-91))
- Ζώνη Ειδικής Προστασίας (Special Protected Area –SPA) με κωδικό και ονομασία “GR 1220009 Λίμνες Βόλβη και Λαγκαδά και Στενά Ρεντίνας” σε εφαρμογή της οδηγίας 79/409/ΕΟΚ “Περί της διατηρήσεως των Άγριων Πτηνών” (ΚΥΑ 41498/29-11-85 (ΦΕΚ 757/Β) ΚΥΑ 294283/98(ΦΕΚ 68/Β/98))
- Τόπος Κοινοτικής Σημασίας (Sites of Community Interest –SCI) για ένταξη στο Ευρωπαϊκό Οικολογικό Δίκτυο “Natura 2000” με κωδικούς “GR 1220001 Λίμνες Βόλβη και Λαγκαδά –ευρύτερη περιοχή” και “ GR 1220003 Στενά Ρεντίνας – ευρύτερη περιοχή” σε εφαρμογή της οδηγίας 92/43/ΕΟΚ “ Για τη διατήρηση των φυσικών οικοτόπων καθώς και της άγριας πανίδας και χλωρίδας” ΚΥΑ 33318/3028/98 (ΦΕΚ 1289/Β/28-12-98)
- Καταφύγια Άγριας Ζωής με τις ονομασίες “Λίμνη Λαγκαδά” (ΦΕΚ 398/Β/83), “Προφήτης –Νυμφόπετρα” (ΦΕΚ 423/Β/83), “Εκβολή Ρήχιου –Βόλβη” (ΦΕΚ 569/25-5-91) και “ Παραλίμνιο δάσος Πλατάνων” (ΦΕΚ 172/ 14-4-86)
- Εθνικό Πάρκο Υγροτόπων των λιμνών Κορώνειας –Βόλβης και των Μακεδονικών Τεμπών (ΚΥΑ 6919, ΦΕΚ 248/5-3-2004)

Επίσης προστατεύεται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2000/60/ΕΕ για την προστασία των νερών.

Ακόμη, το σύστημα Κορώνειας - Βόλβης έχει τεράστια οικολογική σημασία και από ορνιθολογική άποψη, αριθμώντας περίπου 204 είδη πτηνών, πολλά από τα οποία μάλιστα ανήκουν στα σπάνια και απειλούμενα (Βασιλάκης 1994). Συμπεριλαμβάνεται στην οδηγία 79/409/ΕΕΕ της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη διατήρηση και προστασία όλων των άγριων πτηνών.

Το φαινόμενο του ευτροφισμού στη λίμνη

Η λίμνη Βόλβη είναι μια λίμνη που παρουσιάζει το φαινόμενο του

ευτροφισμού. Ο ευτροφισμός είναι περιβαλλοντικό πρόβλημα που παρουσιάζεται σε λίμνες ή κλειστούς αβαθείς κόλπους κάτω από ορισμένες συνθήκες. Στην ουσία δημιουργείται υπέρμετρη αύξηση της συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων, που προκαλείται από τον εμπλουτισμό των υδάτων με απορροές θρεπτικών στοιχείων (νιτρικά και φωσφορικά ιόντα από λιπάσματα και απορρυπαντικά). Τα βακτήρια και τα φύκη (algae) αυξάνονται σε αριθμό τόσο, που σχηματίζουν επικάλυμμα στις υδάτινες επιφάνειες, προκαλώντας σκίαση στο νερό κάτω από την επιφάνεια. Χωρίς φως, οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί στον πυθμένα θανατώνονται, προσφέροντας ακόμη μεγαλύτερη ποσότητα τροφής σε άλλα βακτήρια, που συνεχίζουν να αναπτύσσονται. Καθώς ο αριθμός των βακτηρίων αυξάνεται, η κατανάλωση του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου αυξάνεται δραματικά, ενώ η παραγωγή ελαττώνεται, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει οξυγόνο για τους μη φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, όπως, π.χ. τα ψάρια. Τα ψάρια είναι οι πρώτοι οργανισμοί που πεθαίνουν ενώ ακολουθούν και τα βακτήρια δημιουργώντας ένα νεκρό οικοσύστημα. Αποτέλεσμα του ευτροφισμού είναι η πτώση της ποιότητας του νερού, η μεταβολή της χλωρίδας και πανίδας των νερών, η μείωση της αισθητικής αξίας του περιβάλλοντος καθώς και οι περιορισμένες δυνατότητες για αναψυχή.

1.3.Γενετική ποικιλότητα

Η διατήρηση υψηλής γενετικής ποικιλότητας στους ελεύθερους πληθυσμούς θεωρείται πλέον σημαντική προϋπόθεση για τη διατήρησή τους. Για το λόγο αυτό, η Διεθνής Ένωση για τη Διατήρηση της Φύσης (IUCN) αναγνωρίζει τη γενετική ποικιλότητα ως ένα από τα τρία θεμελιώδη επίπεδα βιοποικιλότητας (τα άλλα δύο είναι η ποικιλότητα των ειδών και η ποικιλότητα των οικοσυστημάτων) που πρέπει να διατηρηθούν για τη μακροχρόνια επιβίωση των ειδών (McNeely et al 1990).

Οι φυσικοί πληθυσμοί αντιμετωπίζουν συνεχείς προκλήσεις εξαιτίας των περιβαλλοντικών αλλαγών όπως είναι οι νέες ασθένειες, τα παράσιτα, οι ανταγωνιστές και οι θηρευτές, η ρύπανση και η κλιματική αλλαγή (Frankham 1997). Για να αντιμετωπίσουν τις αλλαγές αυτές, οι πληθυσμοί θα πρέπει να έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται, αλλιώς αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο της εξαφάνισης. Αν και η πλαστική προσαρμογή των ειδών μπορεί να είναι αποτελεσματική σε κάποιες περιπτώσεις, έχει ωστόσο περιορισμένες δυνατότητες. Στη συντριπτική πλειονότητα των περιβαλλοντικών αλλαγών οι πληθυσμοί θα πρέπει να προσαρμοστούν γενετικά μέσω της φυσικής επιλογής. Απαραίτητη προϋπόθεση των πληθυσμών και των ειδών να προσαρμοστούν εξελικτικά στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες είναι η ύπαρξη γενετικής ποικιλότητας (Frankham et al 2002).

Δείκτες γενετικής ποικιλότητας αποτελούν ο αριθμός αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο, το ποσοστό ετεροζυγωτίας και το ποσοστό πολυμορφικών τόπων (Nei et al 1975).

Η γενετική ποικιλότητα ως συνιστώσα της βιοποικιλότητας

Δύο είναι οι λόγοι που εξηγούν γιατί η ποικιλότητα του γενετικού υλικού είναι σημαντική και κατά συνέπεια η διατήρησή της αναγκαία. Κατά πρώτον η γενετική ποικιλότητα είναι απαραίτητη για την προσαρμογή ενός είδους στις διαρκώς μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αντανακλά τις δυνατότητες εξέλιξής του. Είδη ή πληθυσμοί που έχουν υποστεί σημαντική υποβάθμιση της γενετικής τους ποικιλότητας στερούνται του απαραίτητου πρωτογενούς εξελικτικού δυναμικού πάνω στο οποίο δρα η φυσική επιλογή. Αναμένεται επομένως να έχουν μειωμένες πιθανότητες πλαστικής προσαρμογής και μακρόχρονης επιβίωσης (long term persistence) στην περίπτωση αλλαγών στο περιβάλλον διαβίωσής τους.

Κατά δεύτερον χαρακτηρές οι οποίοι συνδέονται με την προσαρμοστικότητα (fitness) όπως είναι η αύξηση ή η ανάπτυξη, η γονιμότητα, η επιβίωση, η ανθεκτικότητα σε ασθένειες και η μεταβολική αποδοτικότητα φαίνεται να συσχετίζονται άμεσα με τη γενετική ποικιλότητα (Allendorf & Leary 1996). Η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας ενδέχεται να οδηγήσει σε μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας των ατόμων ή των πληθυσμών, γεγονός που θέτει σε κίνδυνο ακόμα και την άμεση (short term) επιβίωσή τους (Lacy 1997).

Μια διαδικασία που οδηγεί σε μείωση της γενετικής ποικιλότητας και παρατηρείται συνήθως σε μικρούς, απομονωμένους πληθυσμούς είναι η ομομιξία (inbreeding) δηλαδή η διασταύρωση στενά συγγενικών ατόμων.

Η αλματώδης τεχνολογική πρόοδος που σημειώθηκε τις τελευταίες δεκαετίες στη μοριακή βιολογία επέτρεψε τη συστηματική αξιοποίηση μεγάλου όγκου γενετικών δεδομένων προκειμένου να βρεθεί απάντηση σε ερωτήματα οικολογίας και εξέλιξης τα οποία σχετίζονται άμεσα με τη διατήρηση των ειδών.

Πληθυσμιακό μέγεθος και γενετική ποικιλότητα

Σε έναν πληθυσμό δε συνεισφέρουν όλα τα άτομα εξίσου στη γενετική σύσταση της επόμενης γενιάς. Για το λόγο αυτό, το δραστικό μέγεθος ενός πληθυσμού (N_e) και όχι το πραγματικό μέγεθος (N) είναι αυτό που επηρεάζει τα επίπεδα της γενετικής ποικιλότητας. Το δραστικό μέγεθος αποτελεί μια σύνθετη θεωρητική έννοια της γενετικής πληθυσμών (Crandall et al 1999) που πρακτικά αντιστοιχεί στον αριθμό των επιτυχώς αναπαραγόμενων ατόμων εντός του πληθυσμού. Τυπικά λοιπόν, το δραστικό μέγεθος υπολείπεται του πραγματικού και μάλιστα σε βαθμό που ποικίλει έντονα μεταξύ ειδών και πληθυσμών και εξαρτάται από παράγοντες όπως το μέγεθος των οικογενειών, η αναλογία των φύλων, το αναπαραγωγικό σύστημα, η μετανάστευση και τυχαία γεγονότα (Frankham 1995). Για παράδειγμα, μελέτες σε είδη θηλαστικών έχουν δείξει ότι ο λόγος N_e/N κυμαίνεται μεταξύ 0,06 και 0,83 (Frankham 1995). Οι μειώσεις του

δραστικού μεγέθους μπορούν να επηρεάσουν τη γενετική ποικιλότητα μέσω της δράσης της γενετικής παρέκκλισης (genetic drift).

Η γενετική παρέκκλιση, δηλαδή η τυχαία διακύμανση των αλληλομορφικών συχνοτήτων από γενιά σε γενιά εξαιτίας των διαφορών μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και την αναπαραγωγική επιτυχία (Wright 1931). Είναι μια διαδικασία που μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια αλληλομόρφων από ένα πληθυσμό ή στην πιο ακραία μορφή σε απώλεια πολυμορφισμού για ένα γονίδιο με την εγκαθίδρυση ενός και μοναδικού αλληλομόρφου εντός του πληθυσμού (fixed allele). Οι πληθυσμοί με μικρό δραστικό μέγεθος εμφανίζονται πιο ευάλωτοι στην αρνητική δράση της γενετικής παρέκκλισης με αποτέλεσμα να κινδυνεύουν με άμεση (μέσα σε λίγες γενιές) υποβάθμιση της γενετικής τους ποικιλότητας ακόμα και εξαιτίας τυχαίων γεγονότων (Frankham et al 2002).

Όταν ένας μεγάλος πληθυσμός υφίσταται σημαντικές και απότομες μειώσεις του μεγέθους του, τότε διέρχεται από μια κατάσταση που ονομάζεται δημογραφική στενωπός (bottleneck). Η κατανόηση των επιδράσεων των στενωπών στη γενετική ποικιλότητα αποτελεί σημαντική παράμετρο όσον αφορά στη διατήρηση απειλούμενων ειδών ή πληθυσμών. Συνήθως η μείωση του πληθυσμιακού μεγέθους (και επομένως και του δραστικού μεγέθους) οδηγεί σε γενετικές στενωπούς, δηλαδή σε καταστάσεις απώλειας της γενετικής ποικιλότητας λόγω έντονης γενετικής παρέκκλισης, σε φαινόμενα ενδογαμίας και στην εγκαθίδρυση θνησιγενών αλληλομόρφων που με τη σειρά τους μειώνουν την ικανότητα προσαρμογής και αυξάνουν την πιθανότητα εξαφάνισης (Frankham 1995). Επομένως οι πληθυσμοί που έχουν πρόσφατα διέλθει από στενωπό είναι σημαντικό να εντοπίζονται ώστε να υπόκεινται σε ειδικές δράσεις διαχείρισης και διατήρησης.

Χαμηλή γενετική ποικιλότητα έχει παρατηρηθεί ωστόσο και σε είδη που σήμερα εμφανίζονται σχετικά άφθονα. Σ' αυτές τις περιπτώσεις δημογραφικά γεγονότα του παρελθόντος που επιβεβαιώνονται από ιστορικά στοιχεία φαίνεται ότι διαμόρφωσαν τα σύγχρονα επίπεδα ποικιλότητας. Πληθυσμοί δηλαδή που διήλθαν από στενωπό ή ιδρύθηκαν από μια μικρή ομάδα ατόμων (founder effect) στο παρελθόν, μπορεί σήμερα να παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας ακόμα και στην περίπτωση που έχουν αυξηθεί σε μέγεθος.

Γενετική δομή και διατήρηση απειλούμενων πληθυσμών

Η πιο σημαντική γενετική επίπτωση της πληθυσμιακής υποδιαίρεσης είναι ότι τα άτομα των διακριτών πληθυσμών δεν μπορούν να αναπαράγονται ελεύθερα και τυχαία μεταξύ τους με αποτέλεσμα οι τελευταίοι να οδηγούνται σταδιακά σε γενετική διαφοροποίηση. Η μετακίνηση γονιδίων από έναν πληθυσμό σε έναν άλλο είναι μια διαδικασία γνωστή και ως γονιδιακή ροή και εξαρτάται από τους ρυθμούς μετανάστευσης των ατόμων μεταξύ των πληθυσμών (Page & Holmes 1998). Η γονιδιακή ροή δρα αντισταθμιστικά στις απώλειες γενετικής ποικιλότητας λόγω της τυχαίας παρέκκλισης ή της επιλογής, εισάγει πολυμορφισμό σε έναν πληθυσμό και είναι ένας παράγοντας που

διατηρεί την ενδοειδική γενετική ποικιλότητα ομογενοποιώντας τους πληθυσμούς (Slatkin 1994). Πληθυσμοί οι οποίοι εμφανίζουν χαμηλά ή μηδενικά επίπεδα γονιδιακής ροής αναμένεται να οδηγηθούν με την πάροδο του χρόνου σε πολύ διαφορετικές συχνότητες αλληλομόρφων εξαιτίας της γενετικής παρέκκλισης.

Ένα κλασσικό και αναμενόμενο πρότυπο διαφοροποίησης της γενετικής δομής που παρατηρείται εξαιτίας της γεωγραφικά περιορισμένης γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών είναι η «απομόνωση λόγω απόστασης» (Slatkin 1993). Όταν τα άτομα ενός είδους παρουσιάζουν μειωμένες δυνατότητες διασποράς τότε ακόμα και σε μικρή γεωγραφική κλίμακα οι απομακρυσμένοι πληθυσμοί αναμένεται να είναι περισσότερο διαφοροποιημένοι σε σχέση με γειτονικούς. Αυτό οδηγεί σε θετική συσχέτιση των γενετικών και των γεωγραφικών αποστάσεων είτε εντός ενός συνεχώς κατανεμημένου είδους είτε μεταξύ πληθυσμών με διακριτή γεωγραφική θέση (Sokal & Jacquez 1991).

Ο κατακερματισμός των ενδιαιτημάτων και η επακόλουθη υποδιαίρεση των πληθυσμών που οφείλεται συχνά σε ανθρωπογενείς παρεμβάσεις έχει αναγνωριστεί ως μια από τις σημαντικότερες απειλές για τη γενετική ποικιλότητα των ειδών καθώς μπορεί να επηρεάσει τόσο τη δημογραφική σύνθεση όσο και τα πρότυπα γενετικής δομής (Frankham et al 2002). Ο περιορισμός ή η παύση της γονιδιακής ροής λόγω της δημιουργίας φραγμάτων για παράδειγμα αναμένεται να οδηγήσει σε γρήγορη απώλεια της γενετικής ποικιλότητας και σε φαινόμενα ενδογαμίας ιδιαίτερα στην περίπτωση που οι προκύπτοντες απομονωμένοι πληθυσμοί έχουν χαμηλό πληθυσμιακό μέγεθος (Reed & Frankham 2003).

Προκειμένου να καταστρωθούν και να εφαρμοστούν κατάλληλες διαχειριστικές δράσεις για την προστασία της γενετικής ποικιλότητας ενός είδους είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε την πληθυσμιακή δομή και το βαθμό διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών του (Eizirik et al 2001). Ιδιαίτερα για τα απειλούμενα είδη, η γνώση της γενετικής δομής αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για την αποτελεσματική διατήρησή τους (Bergl & Vigilant 2007).

Πως μετρείται η γενετική ποικιλότητα

Αρκετές μεθοδολογικές προσεγγίσεις έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί για την αποτίμηση με άμεσο ή έμμεσο τρόπο της ποικιλότητας του γενετικού υλικού. Η γενετική ποικιλότητα μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με τη βοήθεια διαφόρων χαρακτήρων όπως είναι κάποια ποσοτικά χαρακτηριστικά του φαινότυπου (π.χ. μορφομετρικές μετρήσεις), λειτουργικές πρωτεΐνες, γονίδια ή περιοχές του πυρηνικού, του μιτοχονδριακού ή του χλωροπλαστικού DNA ή τα χρωμοσώματα (Frankham et al 2002). Οι μορφολογικοί χαρακτήρες αν και είναι εύκολο να παρατηρηθούν και να μετρηθούν δεν αποτελούν ιδανικούς δείκτες για τη μελέτη πληθυσμιακών και εξελικτικών διεργασιών καθώς μπορεί να επηρεάζονται από το περιβάλλον ή να τελούν υπό τον έλεγχο της φυσικής επιλογής (Beebee & Rowe 2004). Αντίθετα, η αξία των μοριακών δεικτών (πολυμορφικές πρωτεΐνες και αλληλουχίες DNA) στην περιγραφή της γενετικής ποικιλότητας και στον εντοπισμό σημαντικών πληθυσμιακών δομών και

εξελικτικών γραμμών έχει πλέον εμπεδωθεί στην έρευνα και τη διαχειριστική πρακτική (Sunpuks 2000).

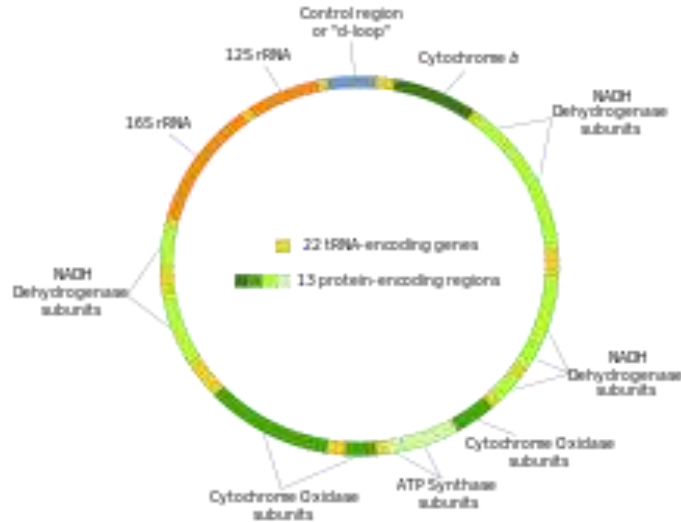
1.4. Το μιτοχονδριακό DNA

Προέλευση

Η ύπαρξη DNA στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες δημιούργησε ερωτηματικά σχετικά με την προέλευση αυτών των οργανιδίων. Με βάση μορφολογικές, βιοχημικές και μοριακές παρατηρήσεις, τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες μοιάζουν πολύ περισσότερο με προκαρυωτικά κύτταρα παρά με ευκαρυωτικά, μέσα στα οποία βρίσκονται. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη της θεωρίας της ενδοσυμβίωσης (Margoulis 1970). Σύμφωνα με αυτή, τόσο τα μιτοχόνδρια όσο και οι χλωροπλάστες είναι απόγονοι οργανισμών που έμοιαζαν με βακτήρια οι οποίοι για κάποιους λόγους εισήλθαν σε κύτταρα πρωτοευκαρυωτικών οργανισμών, απέκτησαν μαζί τους σχέσεις ενδοσυμβίωσης και στη συνέχεια εξελίχθηκαν σε μιτοχόνδρια ή χλωροπλάστες (Gray 1992). Από τη στιγμή που δημιουργήθηκε η σχέση ενδοσυμβίωσης, μια σχέση συνεργατική αλλά και ταυτόχρονα ανταγωνιστική, τα «πρωτομιτοχόνδρια» μπορούσαν να επηρεάσουν όχι μόνο τη δική τους αναπαραγωγή αλλά και το ρυθμό αναπαραγωγής του ξενιστή τους. Η χρονική στιγμή που εμφανίστηκε η συμβιωτική σχέση μεταξύ των οργανισμών δεν είναι σαφώς προσδιορισμένη.

Γενικά χαρακτηριστικά

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι κυκλικό δίκλωνο μόριο (Εικόνα 3) του οποίου το μέγεθος κυμαίνεται από 14000- 26000 ζεύγη βάσεων και το μοριακό του βάρος από 10-12 Mds (Wallace 1982). Στα ψάρια όμως το μέγεθός του είναι αρκετά σταθερό και κυμαίνεται από 15200 ως 19800 ζεύγη βάσεων (Bolligton & Hebert 1991). Η ποσότητα του είναι συνήθως λιγότερη από το 1% του συνολικού DNA του κυττάρου. Κάθε κύτταρο περιέχει μεγάλο αριθμό αντιγράφων αυτού του γονιδιώματος.



Εικόνα 3: το μιτοχονδριακό DNA (www.norwaydna.no)

Το μιτοχονδριακό DNA των σπονδυλωτών περιλαμβάνει (Εικόνα 3) δύο γονίδια για ριβοσωμικά RNAs (12s και 16s), 22 γονίδια για μεταφορικά RNAs και 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων οι οποίες συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα. Αυτά είναι τα εξής: τα γονίδια για τις 7 υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND 1,2,3,4,4L,5,6), το γονίδιο για μια υπομονάδα του κυτοχρώματος b, τα γονίδια για τις τρεις υπομονάδες του κυτοχρώματος c (COI, II και III) και δύο γονίδια για τις δυο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPase 6 και 8). Όλες οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες είναι πλούσιες σε υδρόφοβα αμινοξέα και ιδιαίτερα σε λευκίνη.

Επίσης περιέχει και μια μη κωδική περιοχή η οποία ονομάζεται βρόγχος εκτόπισης (displacement loop ή D-loop), όπου έχουν εντοπιστεί οι προαγωγείς για τη μεταγραφή των δύο αλυσίδων καθώς και η ακολουθία έναρξης της αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας. Στα σπονδυλωτά οι δυο αλυσίδες του mtDNA έχουν περιγραφεί ως ελαφριά (L) και βαριά (H). Η διάκριση αυτή οφείλεται στο διαφορετικό περιεχόμενο τους σε γουανίνη και θυμίνη. Η ελαφριά αλυσίδα φέρει 8 τύπους tRNAs και το γονίδιο για την υπομονάδα 6 της αφυδρογονάσης του NADH(ND6). Όλα τα άλλα γονίδια περιλαμβάνονται στη βαριά αλυσίδα. Η πλειοψηφία των γονιδίων για τις πρωτεΐνες και για τα rRNAs εναλλάσσονται με ένα τουλάχιστον γονίδιο tRNA.

Το μιτοχονδριακό DNA είναι μόριο μητρικά κληρονομούμενο. Η πιο απλή εξήγηση για τη μητρική κληρονόμηση του είναι ότι τα μιτοχόνδρια του σπερματοζωαρίου δεν διαπερνούν το κυτταρόπλασμα του ωαρίου κατά τη γονιμοποίηση, γεγονός που ίσως οφείλεται σε κάποια τροποποίηση του mtDNA του σπέρματος (Lansman et al 1983). Ένας άλλος λόγος είναι η μεγάλη περιεκτικότητα του ωαρίου σε μιτοχόνδρια (Avise 1991). Φαινόμενα «πατρικής διαρροής», δηλαδή κληρονόμησης του mtDNA και από τον πατρικό γονέα έχουν παρατηρηθεί σε κάποια έντομα και στο μύδι (Zouros et al 1992). Το δραστικό

μέγεθος πληθυσμού του μιτοχονδριακού γονιδιώματος ισοδυναμεί με το $\frac{1}{4}$ αυτού του πυρηνικού γονιδιώματος. Έτσι το mtDNA είναι πιο ευάλωτο σε έντονα πληθυσμιακά φαινόμενα, όπως αυτά της στενωπού ή της γενετικής παρέκκλισης.

Πολυμορφισμοί στο μιτοχονδριακό DNA

Οι πιο κοινές μεταλλάξεις στο ζωικό mtDNA είναι οι αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων. Επίσης παρουσιάζονται σε μικρότερο βαθμό πολυμορφισμοί που οφείλονται σε αλλαγές μήκους του γενώματος (Sederoff 1984), οι οποίες εντοπίζονται συνήθως στην περιοχή D-loop. Οι μικρές διαφορές μήκους (1-6 ζεύγη βάσεων) πιθανόν να προκύπτουν από ολίσθηση κατά την αντιγραφή ενώ οι μεγαλύτερες οφείλονται σε ελλείμματα ή διπλασιασμούς ακολουθιών. Πολλές περιπτώσεις ετεροπλασμίας μήκους ή θέσης έχουν αναφερθεί στο μιτοχονδριακό DNA των ψαριών (Chapman 1987, Bentzen et al 1988).

Ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA

Μελέτες ομολογίας έχουν δείξει ότι τα γονίδια για τα μεταφορικά και τα ριβοσωμικά RNAs είναι καλά συντηρημένα ανάμεσα στα σπονδυλωτά (Chang et al 1994). Επίσης, από συγκρίσεις της ακολουθίας των αμινοξέων μεταξύ των 13 πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το mtDNA έχει βρεθεί ότι οι τρεις υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης και το κυτόχρωμα b είναι καλά συντηρημένα ανάμεσα στα σπονδυλωτά, ενώ η υπομονάδα 8 της ATPάσης και τα ND 2 και ND6 ποικίλουν περισσότερο. Το πιο συντηρημένο γονίδιο είναι το COIII ενώ το πιο μεταβλητό το ND 6 (Chang et al 1994).

Έχουν προταθεί αρκετοί λόγοι για τον ταχύτερο ρυθμό εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA (Brown 1983)

- Η γ-πολυμεράση, το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την αντιγραφή του mtDNA έχει περιορισμένες δυνατότητες επιδιόρθωσης λαθών
- Ο χρόνος γενιάς του mtDNA είναι πολύ μικρότερος από αυτόν του πυρηνικού λόγω της συνεχούς αντικατάστασης μιτοχονδρίων. Έτσι το mtDNA υφίσταται περισσότερους κύκλους αντιγραφής συγκριτικά με το πυρηνικό, με αποτέλεσμα να αυξάνουν οι πιθανότητες λαθών
- Ελεύθερες ρίζες οι οποίες υπάρχουν μέσα στα μιτοχόνδρια ως ενδιάμεσοι μεταβολίτες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις στο mtDNA. Η εκδοχή αυτή έχει πάψει να υποστηρίζεται
- Λόγω του μεγάλου αριθμού αντιγράφων του mtDNA σε κάθε κύτταρο, επιβλαβείς μεταλλάξεις σε ένα ή περισσότερα από αυτά τα αντίγραφα θα έχουν μικρή επίδραση στο μεταβολισμό του κυττάρου
- Το μικρό μέγεθος του mtDNA καθώς και ο μικρός αριθμός γονιδίων που περιέχει που κωδικοποιούν πρωτεΐνες είναι ένας σημαντικός παράγοντας της ύπαρξης πολλών μεταλλάξεων

- Το πυρηνικό DNA είναι προσδεμένο σε ιστόνες που όπως είναι γνωστό παρουσιάζουν μεγάλη εξελικτική συντηρητικότητα σε αντίθεση με το mtDNA που είναι γυμνό (Wilsonetal 1985, Avise 1991).

Εφαρμογές του μιτοχονδριακού DNA στην έρευνα

Το μιτοχονδριακό DNA έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμο εργαλείο για μελέτες μεταξύ ειδών αλλά και για ενδοειδικές (διαπληθυσμιακές) μελέτες. Εξαιτίας της μητρικής του κληρονομής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό του μητρικού γονέα σε ένα υβρίδιο καθώς επίσης και για τη μελέτη κατεύθυνσης του υβριδισμού (Dowling 1989). Τέλος, επειδή κληρονομείται μητρικά και δεν υπόκειται σε διαδικασίες ανασυνδυασμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έρευνα της εξελικτικής ιστορίας και της μετακίνησης ατόμων ενός είδους (Lansman et al 1981). Στα ψάρια το mtDNA έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη φυλογενετικών σχέσεων τόσο μεταξύ των πληθυσμών ενός είδους (Apostolidis et al 1996), όσο και μεταξύ διαφορετικών ειδών (Zhu et al 1994, Duvernell 1995).

1.5.Σκοπός της εργασίας

Αν και το είδος *Alosa macedonica* έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του (Economidis & Sinis 1986), καθώς και όσον αφορά την οικολογία του, ελάχιστα πράγματα είναι γνωστά για την πληθυσμιακή γενετική δομή του και τη φυλογενετική του θέση, όπου εκτός από την ανάλυση 1490 ζευγών βάσεων του mtDNA που περιλάμβανε ένα τμήμα του κυτοχρώματος b και ένα τμήμα του γονιδίου ND1 σε δύο μόνο άτομα (Faria et al 2006) δεν έχουν γίνει άλλες γενετικές έρευνες.

Ως εκ τούτου, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της γενετικής σύστασης του ενδημικού είδους *Alosa macedonica* της λίμνης Βόλβης, μελετώντας το μιτοχονδριακό DNA. Ειδικότερα, οι επιμέρους στόχοι της εργασίας ήταν:

- Μια πρώτη ενδοπληθυσμιακή γενετική ανάλυση για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας του είδους με τη χρήση μοριακών δεικτών
- Μια προσπάθεια να καθοριστεί η φυλογενετική κατάσταση του είδους σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη του γένους *Alosa*.

Η γνώση της γενετικής δομής των ειδών είναι απαραίτητο εργαλείο για την ορθολογική τους διαχείριση και μπορεί να συμβάλλει στην προστασία και τη διατήρησή τους.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.Συλλογή των δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε τον Οκτώβριο του 2012 από τη λίμνη Βόλβη (Εικόνα 4). Συνολικά ελήφθησαν 40 άτομα. Η συλλογή έγινε με δίχτυα από τοπικούς αλιείς. Τα άτομα αυτά μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε πάγο και η εξαγωγή DNA έγινε τις αμέσως επόμενες μέρες.



Εικόνα 4: χάρτης της λίμνης Βόλβης

2.2. Εξαγωγή DNA

Η απομόνωση DNA στα περισσότερα άτομα έγινε από λήψη ιστού από το ουραίο ή το πλευρικό πτερύγιο. Για την εξαγωγή DNA εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο των Hills et al (1996) όπως περιγράφεται παρακάτω.

Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA (Hills et al)

- Σε αριθμημένα φιαλίδια erpendorf (χωρητικότητας 2mL) τοποθετήθηκαν 500μL διαλύματος 2xCTAB*. Το CTAB είναι απορρυπαντικό και προκαλεί λύση των κυτταρικών μεμβρανών
- Στη συνέχεια προστέθηκε ένα μικρό κομμάτι ιστού από το ουραίο ή το πλευρικό πτερύγιο.
- Ακολούθησε προσθήκη 10μl πρωτεΐνης K (από διάλυμα συγκέντρωσης 10mg/mL) και ελαφρά ανακίνηση
- Τα φιαλίδια με το μίγμα τοποθετήθηκαν κατόπιν για επώαση σε υδατόλουτρο για τουλάχιστον 3-4 ώρες σε θερμοκρασία 56°C ώστε να

- αποικοδομηθούν οι πρωτεΐνες των κυττάρων και να απελευθερωθεί το DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συνδυασμένη δράση του CTAB και του ένζυμου (πρωτεϊνάση) το οποίο λειτουργεί σε ευνοϊκή θερμοκρασία.
- Μετά το πέρας της επώασης προστέθηκαν 500μL διαλύματος φαινόλης*/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25/24/1 και ακολούθησε ανακίνηση σε συσκευή Vortex
 - Το μίγμα έπειτα φυγοκεντρήθηκε για 3 λεπτά με ταχύτητα 12000 στροφές ανά λεπτό. Σε αυτό το στάδιο το περιεχόμενο του φιαλιδίου διαχωρίζεται σε δύο φάσεις (άνω και κάτω). Η φαινόλη από μόνη της έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών οι οποίες με αυτόν τον τρόπο καθιζάνουν στη φαινολική (κάτω) φάση. Το DNA όμως δε διαθέτει υδρόφοβες περιοχές και παραμένει έτσι διαλυτό στην υδατική (άνω) φάση. Ο ρόλος του χλωροφορμίου είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο το διαχωρισμό των δύο φάσεων. Η ισοαμυλική αλκοόλη εμποδίζει τη δημιουργία φυσαλίδων κατά τη διάρκεια της απομόνωσης των πυρηνικών οξέων
 - Στη συνέχεια αφαιρέθηκε προσεκτικά η υδατική φάση (πάνω στρώμα) και τοποθετήθηκε σε νέο καθαρό φιαλίδιο
 - Στο νέο φιαλίδιο προστέθηκαν 500μL διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24/1 και ακολούθησε εκ νέου ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 3 λεπτά με ταχύτητα 12000 στροφές ανά λεπτό
 - Το περιεχόμενο και πάλι διαχωρίστηκε σε δύο φάσεις ενώ στη συνέχεια και πάλι απομακρύνθηκε προσεκτικά η πάνω φάση και τοποθετήθηκε σε νέα φιαλίδια
 - Έπειτα προστέθηκε διπλάσιος όγκος παγωμένης απόλυτης αιθανόλης και ανακινήθηκε χειροκίνητα. Στο στάδιο αυτό το DNA αφυδατώνεται από την αιθανόλη, κατακρημνίζεται και γίνεται ορατό με γυμνό μάτι με τη μορφή ινών. Σε περίπτωση που αυτό δε συμβεί πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα σε ταχύτητα 2000-3000 στροφές ανά λεπτό.
 - Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα DNA ξεπλύθηκε με 70% παγωμένη αιθανόλη
 - Το προτελευταίο βήμα ήταν η αφαίρεση ξανά του υπερκείμενου, ενώ το ίζημα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου έως την εξάτμιση των υπολειμάτων της αιθανόλης. Εδώ πρέπει να δίνεται προσοχή ώστε να απομακρυνθεί εξολοκλήρου η αιθανόλη γιατί η παρουσία της μπορεί να αναστείλει τη λειτουργία της PCR.
 - Τέλος στα φιαλίδια με το απομονωμένο πλέον DNA προστέθηκαν 100-200μL διαλύματος TE*. Για την επίτευξη της καλύτερης διάλυσης τα δείγματα αφέθηκαν στη συντήρηση (4°C) για μία ημέρα περίπου και κατόπιν τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη (-20°C) όπου μπορούν να διατηρηθούν θεωρητικά επ' άπειρον.

**η σύσταση και ο τρόπος παρασκευής των αντιδραστηρίων με αστερίσκο περιγράφονται στο παράρτημα*

Ο έλεγχος αποτελεσματικότητας της μεθόδου έγινε με ηλεκτροφόρηση όλων των ατόμων σε πηκτική αγαρόζης 1%, παρατήρηση σε υπεριώδες φως (UV) και φωτογράφιση της κάθε πηκτής.

2.3. Η PCR- RFLPμεθοδολογία

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μια μέθοδος για την ενζυμική παραγωγή μιας DNA ακολουθίας-στόχου *in vitro*. Η αντίδραση χωρίζεται σε τρεις φάσεις. Κατά την πρώτη (denaturation) με τη βοήθεια πολύ υψηλής θερμοκρασίας (91-95°C) αποδιατάσσεται η διπλή έλικα του DNA σε δύο μονόκλωνες. Κατά τη δεύτερη φάση (annealing) οι εκκινητές συνδέονται με τις μονόκλωνες αλυσίδες που προέκυψαν στην προηγούμενη φάση. Εδώ απαιτείται απότομη πτώση της θερμοκρασίας που εξαρτάται ακριβέστερα από την αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές. Η τρίτη και τελευταία φάση της αντίδρασης είναι η σύνθεση των νέων αλυσίδων DNA (polymerization) με τη βοήθεια του ενζύμου *Taq* πολυμεράση.

Η τεχνικήRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Η συγκεκριμένη τεχνική αποτέλεσε επανάσταση κατά την ανακάλυψη της και βασίζεται στη χρήση ειδικών ενζύμων περιορισμού. Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού όπως αλλιώς λέγονται, είναι βακτηριακά ένζυμα που πέπτουν (κόβουν) πάντα προς την κατεύθυνση 5'→3' σαν βιολογικά ψαλίδια δίκλινα μόρια DNA σε συγκεκριμένα σημεία της ακολουθίας τους (θέσεις αναγνώρισης-πέψης). Ο φυσικός τους ρόλος είναι η καταστροφή κάθε ξένου μορίου DNA το οποίο εισέρχεται στο βακτήριο. Το DNA του ίδιου του βακτηρίου προστατεύεται από την καταστροφή επειδή η ειδική θέση αναγνώρισης έχει τροποποιηθεί (συνήθως από μεθυλίωση μιας από τις βάσεις νουκλεοτιδίων που συμμετέχουν στην ακολουθία της αναγνώρισης). Τα ένζυμα περιορισμού είναι σε θέση να αναγνωρίσουν σχετικά μικρού μήκους ειδικές ακολουθίες στο DNA και εκεί να το κόβουν. Το ένζυμο κόβει το DNA σε κάθε θέση που υπάρχει η συγκεκριμένη ακολουθία. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί πολλά τέτοια ένζυμα με εκατοντάδες εξειδικεύσεις. Τα ένζυμα αυτά περιγράφονται από τα βακτήρια που τα παράγουν με τρία γράμματα π.χ. *Hae* από το *Haemophilus aegypticus*. Σε περίπτωση που το ένα και το αυτό βακτήριο παράγει περισσότερα από ένα τέτοια ένζυμα τότε αυτά ονομάζονται με ρωμαϊκούς αριθμούς π.χ. τύποι *Hae*II και *Hae*III. Τα περισσότερα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν τετραμερείς πενταμερείς ή εξαμερείς αλληλουχίες νουκλεοτιδίων οι οποίες περιγράφονται πάντα από τα αριστερά προς τα δεξιά κατά την κατεύθυνση πάντοτε 5'→3'. Έτσι όταν γράφουμε την αλληλουχία GAATTC εννοούμε 5' - -GAATTC- - 3'.

Η πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού έχει σαν αποτέλεσμα θραύσματα των οποίων ο αριθμός και το μέγεθος διαφέρουν μεταξύ ατόμων, πληθυσμών και ειδών.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της εν λόγω τεχνικής είναι ότι είναι πολύ χρήσιμη στην μελέτη του μιτοχονδριακού DNA καθώς εκεί δεν τίθεται θέμα ετερόζυγης και ομόζυγης κατάστασης.

Το κυριότερο μειονέκτημα είναι τα σχετικά χαμηλά επίπεδα πολυμορφισμού που μπορεί να ανιχνεύσει η συγκεκριμένη τεχνική αφού απαιτείται μεγάλος αριθμός ενζύμων για την ανάλυση μεγάλου αριθμού βάσεων και το σχετικά υψηλό κόστος που αυτό συνεπάγεται.

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε

Η τεχνική των RFLP's εφαρμόστηκε σε δύο περιοχές του μιτοχονδριακού DNA σε όλα τα άτομα που ελήφθησαν. Συγκεκριμένα, στα γονίδια ND5/ND6 (γονίδια της αφυδρογονάσης του NADH) και στο γονίδιο ND1 μαζί με τμήμα του γονιδίου 16sRNA με μήκος 2468 και 2005 ζεύγη βάσεων, αντίστοιχα. Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκαν παγκόσμιοι εκκινητές από τη βιβλιογραφία (Πίνακας 2). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μίγμα τελικού όγκου 50μL σε erppendorf Thermocycler συσκευή. Οι συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών και οι συνθήκες του προγράμματος που ακολουθήθηκε περιγράφονται στους Πίνακες 3 και 4 αντίστοιχα.

Πίνακας 2: Παγκόσμιοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν				
Εκκινητής	Ακολουθία (5'→3')	Πηγή	Περιοχή πολ/σμου	Θερμοκρασία
ND5/6-A	AATAGCTCATCCATTGGTCTTAGG	Nielsen et al 1998	ND5 & ND6	54°C
ND5/6-B	TAACAACGGTGGTTTTCAAGTCA	Nielsen et al 1998		
ND1-A	GCCTCGCCTGTTTACCAAAAACAT	Nielsen et al 1998	ND1 και τμήμα του 16srRNA	57°C
ND1-B	GGTATGGGCCCGAAAGCTTA	Nielsen et al 1998		
Glu tRNA*	GAAGAACCACCGTTGTTATTC	Kotlik et al 2008	Cyt b	50°C
Thr tRNA*	GATCTTCGGATTACAAGACC	Kotlik et al 2008		
L8558*	AGCTTCTTCGACCAATTTATGAG	Guiffra et al 1994	ATPase VI & CO III	50°C
H9945*	CGTCTACAAAGTGTCAAGTATCA	Apostolidis et al 2008		

*οι εκκινητές με * χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της πρωτοδιάταξης (κεφάλαιο 2.5)

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις συστατικών αντίδρασης PCR

Συγκεντρώσεις συστατικών αντίδρασης PCR-RFLP
50 ng αρχικού DNA
5 μ L ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) 10x
1,2 μονάδες Taq πολυμεράσης
2 mM MgCl ₂
0,25 mM από κάθε Dntp
30 pmoI από κάθε εκκινητή

Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για την αντίδραση της PCR περιέχει: 670 mM Tris-HCl pH 8,8 και 166mM (NH₄)₂SO₄

Πίνακας 4: Πρόγραμμα αντίδρασης PCR

Πρόγραμμα PCR αντίδρασης	
94°C για 5 min για την αρχική αποδιάταξη του DNA	
32 κύκλοι από	94°C για 60 sec για την αποδιάταξη του DNA
	50-57°C* για 75 sec για τον υβριδισμό των εκκινητών
	72°C για 65 sec για τον πολλαπλασιασμό των επιλεγμένων από τους εκκινητές τμημάτων του DNA
72°C για 8 min για την ολοκλήρωση των συνθέσεων	

*ανάλογα με την περιοχή του DNA που επιλεγόταν για πολλαπλασιασμό (βλ. πίνακα 2)

Όλα τα προϊόντα PCR ελέγχθηκαν πρώτα σε πηκτή αгарόζης 1% που περιείχε 0,5 μ L / mL βρωμιούχο αιθίδιο σε διάλυμα TBE.

Πέντε τυχαία δείγματα από κάθε περιοχή ελεγχθήκαν για πολυμορφισμό με 22 περιοριστικές ενδονουκλεάσες (*AclI*, *MluNI*, *XhoI*, *NdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *AluI*, *HindIII*, *BamHI*, *MseI*, *NheI*, *DdeI*, *AgeI*, *PstI*, *HincII*, *NruI*, *SmaI*, *EcoRI*, *TaqI*, *PshBI*, *MboI*, *AfaI*, Πίνακας 5).

Η διαδικασία που ακολούθησε ήταν η εξής: συνολικός όγκος πέψης: 10 μ L εκ των οποίων:

- 7 μ L από το προϊόν PCR
- 8 μονάδες από το κάθε ένζυμο
- 1.5 μ L ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)
- συμπληρωματικό BSA σε όποια ένζυμα το απαιτούσαν
- ανάλογη ποσότητα νερού μέχρι τη συμπλήρωση του τελικού όγκου.

Πίνακας 5: Ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν. (N=A ή C ή G ή T, R=A ή G, Y=T ή C)

Περιοριστική ενδονουκλεάση	Σημείο κοπής	Θερμοκρασία επώασης
Aci I	C/CGC	37°C
	GGC/G	
Mlu N I	TGG/CNCA	37°C
	ACNC/GGT	
Xho I	C/TCGAG	37°C
	GAGTC/C	
Nde I	CA/TATG	37°C
	GTAT/AC	
Hae III	GG/CC	37°C
	CC/GG	
Hinf I	G/ANTC	37°C
	CTNA/G	
Alu I	AG/CT	37°C
	TC/GA	
Hind III	A/AGCTT	37°C
	TTCGA/A	
Bam H I	G/GATCC	37°C
	CCTAG/G	
Mse I	T/TAA	37°C
	AAT/T	
Nhe I	G/CTAGC	37°C
	CCTAG/G	
Dde I	C/TNAG	37°C
	GANT/C	
Age I	A/CCGGT	37°C
	TGGCC/A	
Pst I	CTGCA/G	37°C
	G/ACGTC	
Hinc II	GTY/RAC	37°C
	CAR/YTG	
Nru I	TCG/CGA	37°C
	AGC/GCT	
Sma I	CCC/GGG	25°C
	GGG/CCC	
Eco R I	G/AATTC	37°C
	CTTAA/G	
Taq I	T/CGA	65°C
	AGC/T	
Psh B I	AT/TAAT	37°C
	TAAT/TA	
Mbo I	/GATC	37°C
	CTAG/	
Afa I	GT/AC	37°C
	CA/TG	

Η αντίδραση της πέψης πραγματοποιούνταν στην απαιτούμενη θερμοκρασία για το κάθε ένζυμο για πέντε ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της πέψης, ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% και έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) με παρουσία μάρτυρα γνωστού μήκους (H3 RTU, NIPPON genetics, Japan) για να γίνει η σύγκριση.

Τελικά, δύο ένζυμα (HinfI και PstI) έδειξαν πολυμορφισμό και επιλεχθήκαν για περαιτέρω ανάλυση σε όλα τα άτομα.

2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Το DNA είναι μόριο αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό. Εξ' αιτίας αυτού, όταν βρεθεί μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθος και τη μάζα του. Η πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε οριζόντιες παράλληλες σειρές με σκοπό το διαχωρισμό των διαφορετικών σε μέγεθος και σχήμα τμημάτων DNA. Η αγαρόζη είναι ένα πολυσακχαριτικό παράγωγο της D-γαλακτόζης που περιέχει σε εστερική μορφήθειικό οξύ. Βρίσκεται στα φύκια και σχηματίζει μετά από θέρμανση ζελατινώδη μάζα (gel) (Βάρβογλης 2005). Ειδικότερα παράγεται από το θαλάσσιο ροδοφύκος *Gracilaria dura* ή συνθετικά, με το προϊόν όμως που παράγεται από την φυσικής προέλευσης αγαρόζη να εμφανίζει σαφή πλεονεκτήματα, καλύτερη ποιότητα και χαμηλότερο κόστος (Meena et al 2006).

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής στο εργαστήριο περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- σε κωνική φιάλη τύπου p y r e x με αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες τοποθετήθηκε η κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 1xTBE και η ανάλογη ποσότητα αγαρόζης, έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή εκατοστιαία συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης
- έπειτα το περιεχόμενο της φιάλης θερμάνθηκε μέχρι να αρχίσει να αφρίζει (θερμοκρασία βρασμού) ώστε η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και κατόπιν αφέθηκε να κρυώσει μέχρι τη θερμοκρασία των 45 – 50°C
- στη συνέχεια προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) τόσο ώστε η τελική συγκέντρωσή του στην πηκτή να είναι 0,5μg/mL και ακολούθησε ανάδευση ούτως ώστε το EtBr να διαλυθεί πλήρως. Η προσθήκη του EtBr αποσκοπεί στη χρώση – σήμανση του DNA ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες του στην πηκτή της αγαρόζης. Το EtBr έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA και να φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως
- το περιεχόμενο της φιάλης τοποθετήθηκε σε εκμαγείο και αφού απομακρύνθηκαν τυχόν φυσαλίδες προσαρτήθηκε η κτένα δημιουργίας «πηγαδιών» στα οποία κατόπιν θα «φορτωθεί» το DNA
- μετά την πήξη της αγαρόζης (περίπου 45 λεπτά) απομακρύνθηκε προσεκτικά η χτένα ώστε να δημιουργηθούν τα «πηγάδια»
- σε κάθε σειρά πηγαδιών φορτώθηκαν όλα τα δείγματα μαζί με διάλυμα

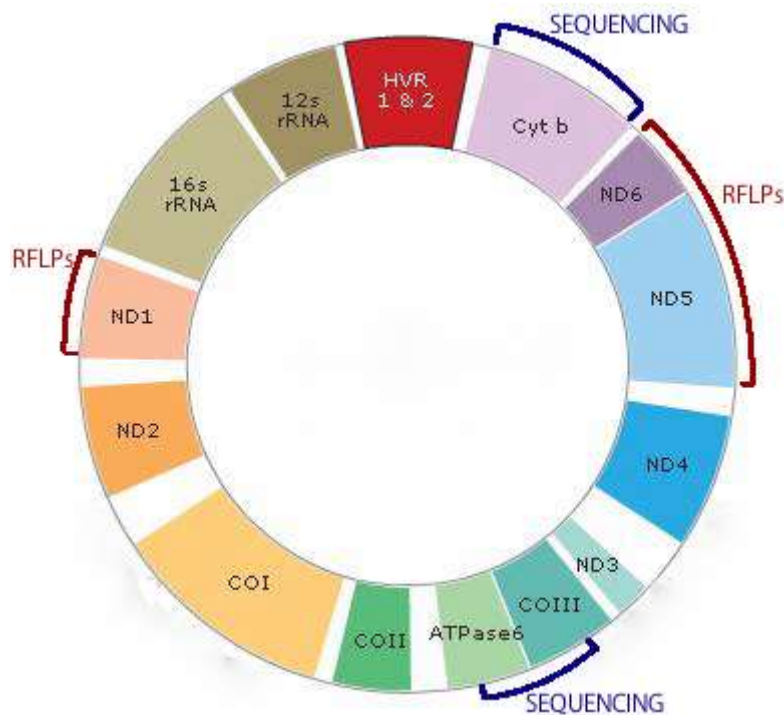
φόρτωσης (loading buffer) και ένας μάρτυρας γνωστής συγκέντρωσης που δίνει γνωστά προϊόντα (ζώνες) ώστε συγκρίνοντας τα δείγματα μαζί του να μπορούν να υπολογιστούν κατά προσέγγιση τα μήκη των ζωνών των δειγμάτων

- μετά την παρασκευή της πηκτής και τη φόρτωση ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και παρατήρησή κάτω από υπεριώδες φως.

2.5. Ανάλυση της πρωτοδιάταξης του DNA

Η ανάλυση της πρωτοδιάταξης ή απλούστερα η αλληλούχηση του DNA (DNA sequencing), είναι μια τεχνική που καθορίζει την ακριβή σειρά των νουκλεοτιδίων (Αδείνη- Θυμίνη- Γουανίνη- Κυτοσίνη) σε μια αλληλουχία DNA. Οι πρώτες αλληλουχίες «διαβάστηκαν» στις αρχές τις δεκαετίας του '70 με μεθόδους βασισμένες στη δυσδιάστατη χρωματογραφία. Τις επόμενες δεκαετίες σημειώθηκε αλματώδης πρόοδος και σ' αυτήν την τεχνική με αυτοματοποιημένες μεθόδους που βασίζονται στο φθορισμό.

Στην περίπτωση του εν λόγω πειράματος, έντεκα άτομα από την περιοχή του κυτοχρώματος b (Cyt b), και άλλα πέντε για την περιοχή της ATPάσης VI/κυτοχρωμικής οξειδάσης III (ATPVI/COIII) αναλύθηκαν με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία (Εικόνα 5). Τα δείγματα που επιλεχθήκαν για αλληλούχηση και για τις δύο περιοχές ήταν αντιπροσωπευτικά και όχι τυχαία ώστε να ανταποκρίνονται σε όλους τους απλότυπους που προέκυψαν από την ανάλυση με τα RFLP's.



Εικόνα 5: οι περιοχές του mtDNA στις οποίες εφαρμόστηκαν οι δυο τεχνικές (RFLP's και sequencing)

Όλα τα προϊόντα μετά την ενίσχυση τους με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Πίνακας 2), πέρασαν από τη διαδικασία του καθαρισμού με το εμπορικό προϊόν NucleoSpin PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Germany) για την απομάκρυνση περιττών νουκλεοτιδίων, εκκινητών, ένζυμων και άλλων ακαθαρσιών σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Τα καθαρισμένα δείγματα στάλθηκαν στην εταιρία VBC -Biotech (Βιέννη, Αυστρία) για αλληλούχηση, χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή για κάθε περιοχή του DNA (Glu tRNA και L 8558, Πίνακας 4).

Οι αλληλουχίες «διαβάστηκαν» με χρήση του λογισμικού BioEdit έκδοση 7.1.9 (Hall 1999).

2.6. Στατιστική επεξεργασία

Γενετική ποικιλότητα

Οι σύνθετοι γονότυποι κωδικοποιήθηκαν με γράμματα με τη σειρά που εμφανίστηκαν. Σε κάθε δείγμα δόθηκε κωδικός τεσσάρων γραμμάτων με τα πρώτα δύο γράμματα να αντιπροσωπεύουν τα διακριτά πρότυπα όπως προέκυψαν από τα RFLP's και τα άλλα δύο από τα πρότυπα αλληλούχησης.

Οι σχέσεις μεταξύ απλοτύπων (σύνθετοι γονότυποι) προσδιορίστηκαν συνδυάζοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα RFLP's και την αλληλούχηση. Τα δεδομένα ερευνήθηκαν και αναπαρασταθήκαν με τη μέθοδο "median- joining" όπως προτείνεται από το πρόγραμμα NETWORK έκδοση 4.6.1.1. (Bandelt et al 1999).

Η γενετική ποικιλότητα αξιολογήθηκε από την απλοτυπική και νουκλεοτιδική ποικιλότητα όπως αυτά προέκυψαν από τα δεδομένα των RFLP's.

Η απλοτυπική ποικιλότητα υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$h = n(1 - \sum p_i^2) / (n-1)$$

όπου p_i είναι η συχνότητα του κάθε απλότυπου στο δείγμα και n το μέγεθος του δείγματος (Nei 1987).

Η νουκλεοτιδική ποικιλότητα (π) αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των νουκλεοτιδικών διαφορών ανά θέση μεταξύ δύο απλοτύπων μέσα σε ένα πληθυσμό και υπολογίστηκε όπως περιγράφουν οι Hartt & Clark (1997).

Φυλογενετικά δένδρα

Τα φυλογενετικά δένδρα είναι γραφικές αναπαραστάσεις που αποτελούνται από κόμβους (ταξινομικές ομάδες) και κλάδους (τμήματα που συνδέουν τους κόμβους) και τα οποία συνοψίζουν τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ ειδών ή πληθυσμών (Avisé 1994, Hartl & Clark 1997). Οι εξωτερικοί κόμβοι αναπαριστούν υπάρχουσες ταξινομικές ομάδες ενώ οι εσωτερικοί προγονικές. Τα μήκη των κλάδων αντανάκλουν τον αριθμό των εξελικτικών αλλαγών μεταξύ προγονικών και απογονικών μονάδων.

Τα φυλογενετικά δένδρα στην παρούσα μελέτη δημιουργήθηκαν με τις μεθόδους της μέγιστης πιθανότητας (maximum likelihood) και της μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony) καθώς και τη μέθοδο neighbor-joining στο πρόγραμμα MEGA έκδοση 5.05 και με τη Bayesian μέθοδο στο πρόγραμμα BEAST 1.7.5. με συνένωση των δύο τμημάτων των ακολουθιών στα οποία έγινε η αλληλούχιση για να αξιολογηθεί η απόκλιση μεταξύ απλοτύπων που σημειώθηκε.

Στην κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων χρησιμοποιούνται και άλλοι δύο παράμετροι:

- Τα όρια εμπιστοσύνης. Εδώ χρησιμοποιείται η μέθοδος bootstrap (Felsenstein 1985) που υπολογίζει τα επίπεδα αξιοπιστίας στους κλάδους του φυλογενετικού δένδρου. Δηλαδή κατασκευάζει μια σειρά από νέες μήτρες δεδομένων επιλέγοντας N τυχαία δεδομένα από την αρχική μήτρα. Το αποτέλεσμα είναι οι νέες μήτρες να έχουν τον ίδιο αριθμό δεδομένων με την αρχική αλλά κάποιοι χαρακτήρες να έχουν μείνει εκτός της νέας μήτρας ενώ κάποιοι άλλοι υπάρχουν δυο φορές. Στη συνέχεια με βάση αυτές τις νέες μήτρες δεδομένων κατασκευάζονται N νέα φυλογενετικά δένδρα. Τέλος, από τα δένδρα αυτά επιλέγεται το κοινής αποδοχής δένδρο (majority rule consensus tree) στο οποίο αναγράφεται η αξιοπιστία της ομαδοποίησης, δηλαδή πόσες φορές στο σύνολο των N δέντρων που κατασκευάστηκαν, τα δεδομένα ομαδοποιούνται με το συγκεκριμένο τρόπο.
- Η εξωομάδα (outgroup). Προκειμένου να κατασκευαστεί το φυλογενετικό δένδρο, γίνεται σύγκριση των μελετώμενων ειδών με κάποιο άλλο είδος που είναι συγγενικό με τα προς μελέτη είδη αλλά ανήκει σε διαφορετική ταξινομική ομάδα. Έτσι, τα δεδομένα τοποθετούνται στο δέντρο με βάση τις ομοιότητες ή τις διαφορές που έχουν μεταξύ τους καθώς και με το συγγενικό είδος. Όσες περισσότερες ομοιότητες υπάρχουν με την εξωομάδα τόσο πιο κοντά τοποθετούνται στο δέντρο. Αν υπάρχουν ενδείξεις ότι η εξωομάδα έχει διαχωριστεί από τον κοινό πρόγονο πιο νωρίς από τα υπόλοιπα δεδομένα τότε όσο πιο κοντά οι ταξινομικές μονάδες σε αυτή, τόσο πιο προγονικές είναι.

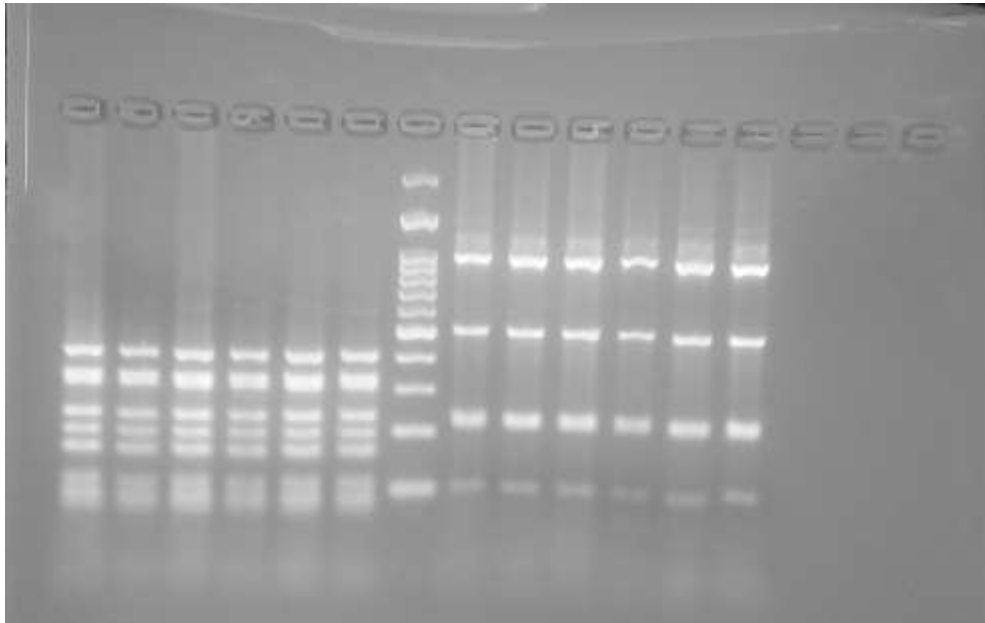
Στην εν λόγω μελέτη, για την κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων χρησιμοποιήθηκαν τρία ακόμη διαφορετικά άτομα *Alosa sp.* των οποίων οι αλληλουχίες για το *cyt b* και το *ATPaseVI / COIII* ήταν διαθέσιμες: το ευρωπαϊκό *A. alosa* (κωδικός στη GenBank: NC_009575.1) και τα είδη της Β. Αμερικής *A. sapidissima* και *A. pseudoharengus* (κωδικοί NC_014690.1 και NC_009576.1, αντίστοιχα). Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες από το είδος *Brevoortia tyrannus* (κωδικός: AP009618.1) που ορίστηκε ως εξωομάδα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. RFLP's

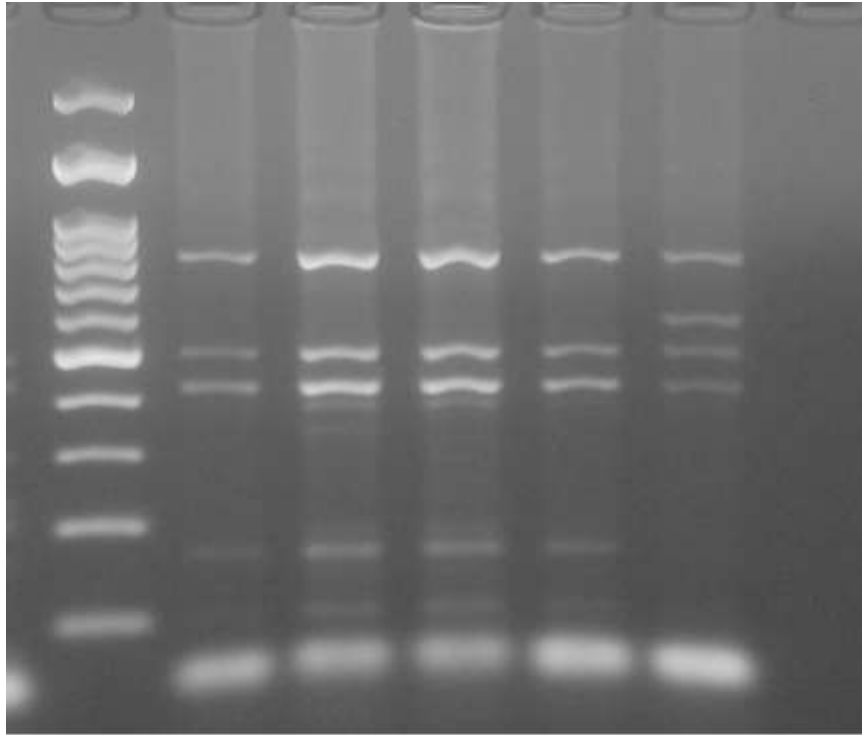
Και οι δύο περιοχές που ερευνήθηκαν με τη μέθοδο των RFLP's (γονίδια ND 1/16srRNA και ND5/ND6, αντίστοιχα) έδειξαν πολύ χαμηλά επίπεδα πολυμορφισμού.

Ο έλεγχός στα πέντε τυχαία άτομα για την περιοχή ND1/16srRNA αποκάλυψε ότι 15 από τις 22 περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τουλάχιστον μια θέση κοπής, αλλά καμία από αυτές δεν ήταν πολυμορφική (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Παράδειγμα πέψης της περιοχής ND 1/16 srRNA με τα ένζυμα περιορισμού HaeIII και HinfI

Τα δύο ένζυμα που ανίχνευσαν πολυμορφισμό στον αρχικό έλεγχο στην περιοχή ND5/ND6 (HinfI και PstI, Εικόνα 7) παρουσίασαν αρχικά 7 θέσεις κοπής από τις οποίες οι 3, ήταν πολυμορφικές. Η ανάλυση των δεδομένων από αυτούς τους πολυμορφισμούς κατέδειξε μόνο τρεις διαφορετικούς απλότυπους.



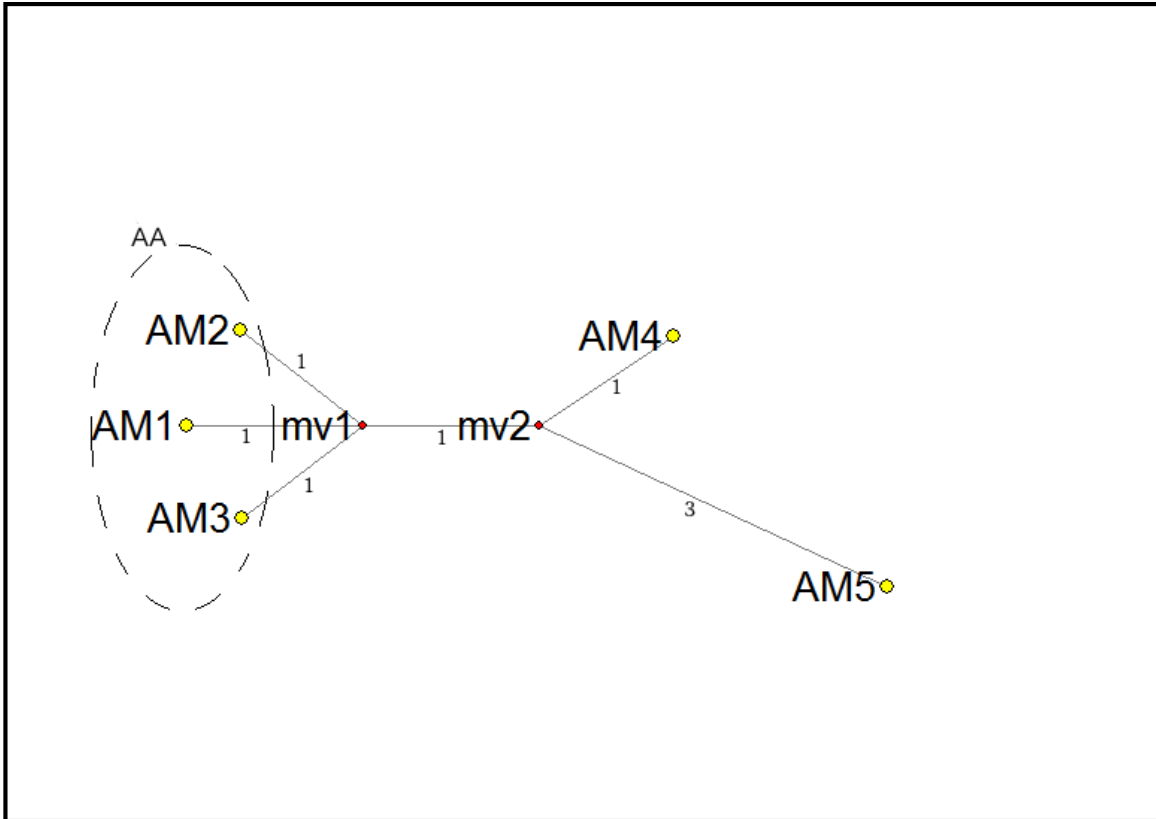
Εικόνα 7: πολυμορφισμός που παρατηρήθηκε μετά την πέψη της περιοχής ND 5/6 με το ένζυμο HinfI

Η απλοτυπική και νουκλεοτιδική ποικιλότητα υπολογίστηκαν σε 0,099 και 0,0062 αντίστοιχα.

3.2. Αλληλούχιση

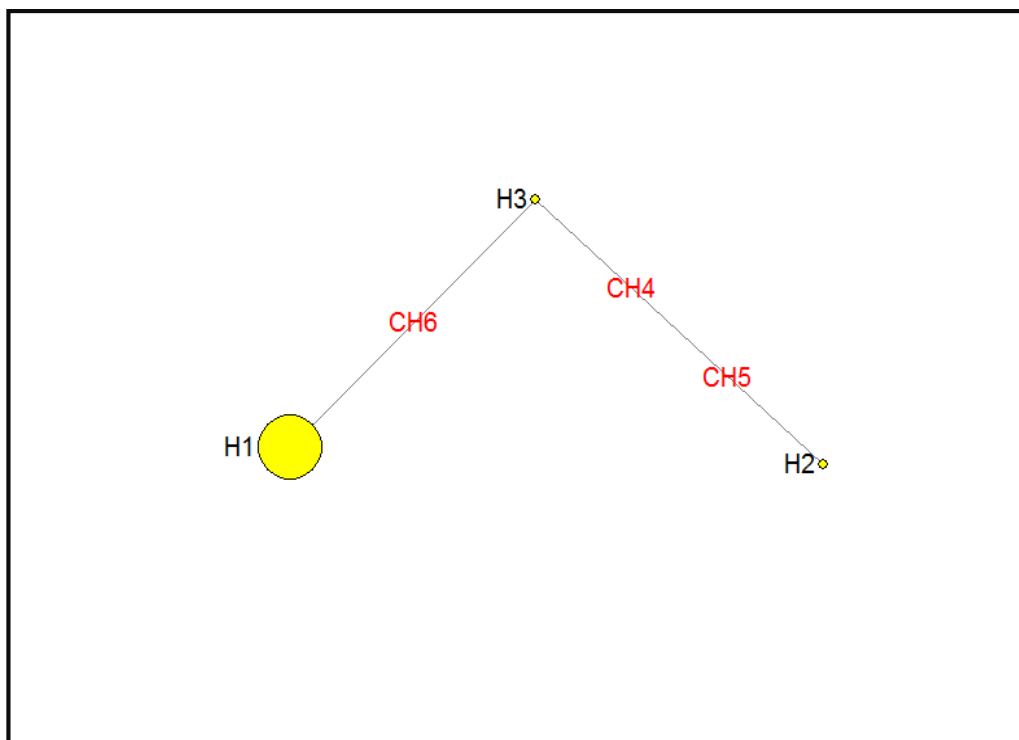
Η ανάλυση της πρωτοδιάταξης πραγματοποιήθηκε σε 980 bp για το κυτόχρωμα b και 900 bp για το γονίδιο της ATPάση VI/ COIII. Τρεις και τέσσερις πολυμορφικές θέσεις παρατηρήθηκαν, αντίστοιχα, ορίζοντας ίσους αριθμούς διαφορετικών απλοτύπων (τρεις και τέσσερις για τις δύο περιοχές, αντίστοιχα)

Ο συνδυασμός των δεδομένων από την ανάλυση με RFLP'ς και την αλληλούχιση αποκάλυψε πέντε σύνθετους γονότυπους (απλότυπους) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Το δίκτυο median joining που προέκυψε από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων με την τεχνική των RFLP's και την ανάλυση της πρωτοδιάταξης. Οι ενδιάμεσοι φορείς (mv1 & mv2) αναπαριστούν απλότυπους που δεν βρέθηκαν. Τα νούμερα στις γραμμές καταδεικνύουν τα βήματα μεταλλάξεων μεταξύ των απλοτύπων. Οι απλότυποι στο διακεκομμένο κύκλο αντιστοιχούν στον AA απλότυπο που προέκυψε από την ανάλυση με την τεχνική των RFLP's.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν υπάρχει άμεση σύνδεση των πέντε απλοτύπων που παρατηρήθηκαν αλλά μέσω δύο ενδιάμεσων φορέων από τους οποίους ίσως να προέκυψαν οι πέντε απλότυποι. Οι ενδιάμεσοι φορείς υποδηλώνουν είτε υπάρχοντες απλότυπους που δεν αντικατοπτρίζονται στη δειγματοληψία, είτε παλαιούς απλότυπους που πλέον έχουν εξαφανιστεί.



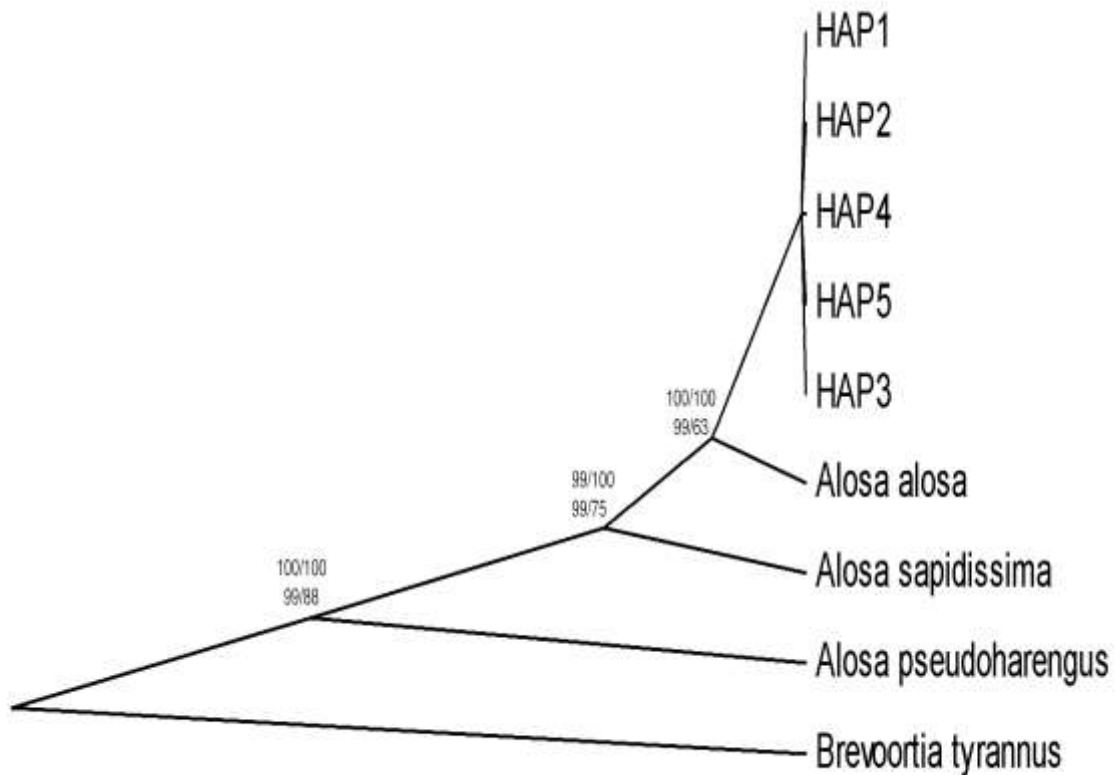
Εικόνα 9: Το δίκτυο median joining για τους 3 απλότυπους που προέκυψαν από την ανάλυση μόνο με τα RFLP's. Στο εν λόγω δίκτυο το μέγεθος των κυκλικών περιοχών είναι ανάλογο με τη συχνότητα εμφάνισης του κάθε απλοτύπου καθώς η ανάλυση των RFLP's εφαρμόστηκε σε όλα τα άτομα.

Όπως φαίνεται από το δίκτυο median joining με την ανάλυση μόνο με τα RFLP's (Εικόνα 9) δεν φαίνεται να υπάρχουν χαμένοι απλότυποι. Η διαφορά αυτή πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η αλληλούχιση έγινε μόνο σε 11 και 5 άτομα και μάλιστα ειδικότερα για τη δεύτερη περιοχή (ATPaseVI/ COIII) τα άτομα αυτά ήταν αντιπροσωπευτικά σε σχέση με τους προηγούμενους απλότυπους που είχαν προκύψει. Έτσι, αυξάνονται οι πιθανότητες να υπάρχουν όντως αυτοί οι ενδιάμεσοι φορείς.

Η αστεροειδής δομή των απλοτύπων σε συνδυασμό με τη χαμηλή απλοτυπική και νουκλεοτιδική ποικιλότητα που παρατηρείται συνιστούν παράγοντες που υποδεικνύουν εξάπλωση του μεγέθους του πληθυσμού έπειτα από μείωση του δραστικού μεγέθους του πληθυσμού ή από στενωπό.

3.3. Φυλογένεση του είδους

Για να γίνει μια πρώτη εκτίμηση της φυλογένεσης του είδους, δημιουργήθηκαν κάποια φυλογενετικά δένδρα, το επικρατέστερο των οποίων απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Δένδρο κοινής αποδοχής (consensus tree) Τα επίπεδα αξιοπιστίας (bootstraps) και οι Bayesian πιθανότητες που είναι μεγαλύτερες του 50% φαίνονται για τον κάθε κλάδο ως εξής: ML (maximum likelihood): πάνω αριστερά, NJ (neighbor-joining): πάνω δεξιά, MP (maximum parsimony): κάτω αριστερά, Bayesian: κάτω δεξιά

Αυτό περιλαμβάνει τους 5 απλότυπους του *Alosa macedonica* που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, 3 απλοτύπους άλλων ειδών *Alosa* που ήταν διαθέσιμοι στην GenBank και έναν απλότυπο του είδους *Brevoortia tyrannus* που ορίστηκε ως εξωομάδα.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Γενετική ποικιλότητα

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και ιδιαίτερα από την ανάλυση των RFLPs, το είδος *Alosa macedonica* φαίνεται να παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί αν εξετάσουμε πιο προσεκτικά την πληθυσμιακή εξέλιξη του είδους τα τελευταία χρόνια.

Η υπεραλίευση της λιπαριάς αποτελούσε σύνηθες φαινόμενο μέχρι τη δεκαετία του 1960. Την εποχή εκείνη οι ψαράδες ήταν πολλοί και η λιπαριά ένα από τα πιο περιζήτητα ψάρια από τους κατοίκους των γύρω περιοχών. Αποτελούσε μάλιστα ένα από τα πιο αλιευμένα είδη στη Βόλβη φτάνοντας ακόμα και το 68% της ετήσιας παραγωγής της λίμνης (Bobori et al 2001, Crivelli 2006). Τα τελευταία χρόνια ωστόσο, και πιο συγκεκριμένα από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 η αλόγιστη αλίευση του ψαριού σταμάτησε αφ' ενός λόγω της σταδιακής μείωση των ψαράδων αλλά κυρίως διότι άλλαξαν οι προτιμήσεις των καταναλωτών σε άλλα είδη με υψηλότερη εμπορική αξία.

Τα είδη αυτά ήταν θηρευτές (*Perca fluviatilis*- περκί, *Aspius aspius* και *Silurus glanis*- γουλιανός) (Σίνης 1981) ή ανταγωνιστικά ως προς την τροφή είδη (*Cyprinus carpio*-γριβάδι, κυρίως νεαρά άτομα) του *Alosa macedonica*. Το γεγονός αυτό προκάλεσε διαταραχές στην τροφική αλυσίδα που επηρέασε κατ' επέκταση το μέγεθος του πληθυσμού και άλλων ειδών που διαβιούσαν στη λίμνη. Έτσι, η μείωση του πληθυσμού τους οδήγησε σε μια μεγάλη και απότομη αύξηση του πληθυσμού της λιπαριάς (Zarfadjian et al 1996). Κάτι τέτοιο καταδεικνύει επανεγκαθίδρυση του πληθυσμού της λιπαριάς στη λίμνη Βόλβη που είναι πολύ πιθανόν να προέκυψε από λίγα μόνο άτομα. Αυτή η απότομη αύξηση του πληθυσμού του είδους έπεται από μια σημαντική μείωση ενδέχεται ίσως να εξηγεί την απώλεια κάποιων κεντρικών απλοτύπων σε μια αστεροειδή δομή δικτύου (βλ. Εικ.8).

Λαμβάνοντας υπόψη αφ' ενός τα επίσης χαμηλά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας που παρατηρήθηκαν στο είδος *Alosa fallax killarnensis*, ένα επίσης ενδημικό ψάρι της λίμνης Lough Lean (Ιρλανδία) σε σχέση με άλλα είδη *Alosa* (Jolly et al 2012) και αφ' ετέρου τη γενικότερα χαμηλή γενετική ποικιλότητα που παρουσιάζεται στα περισσότερα ψάρια των εσωτερικών υδάτων που ζουν σε απομονωμένους πληθυσμούς στην Ελλάδα (Apostolidis 2008, Mamouris et al 2005) τα χαμηλά επίπεδα απλοτυπικής και νουκλεοτιδικής ποικιλότητας που παρατηρήθηκαν στην εργασία αυτή ήταν μάλλον αναμενόμενα.

Παρόμοια χαμηλά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας έχουν παρατηρηθεί και σε άλλα είδη των εσωτερικών υδάτων στην Ελλάδα και αλλού π.χ στα είδη *Leuciscus cephalus* (Imsiridou et al.,1998), *Silurus glanis* και *Silurus aristotelis*

(Triantafyllidis, Abatzopoulos & Economidis 1999) στην Ελλάδα, στο είδος *Chondrostoma lusitanicum* (Collares-Pereira 1980, Mesquita et al., 2001) στην Ευρώπη και στο είδος *Nannoperca axleyanna* στην Αυστραλία (Hughes et al., 1999).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι τα αποτελέσματα αυτά αφορούν μόνο τις περιοχές του μιτοχονδριακού DNA που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο, μεταγενέστερες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο με ανάλυση της πρωτοδιάταξης στην περιοχή ελέγχου (D-loop) του μιτοχονδριακού DNA αποκάλυψαν αυξημένα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας (Giantsis et al 2015). Φαίνεται λοιπόν πως για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων χρειάζονται επιπλέον αναλύσεις και με άλλους μοριακούς δείκτες που να συμπεριλαμβάνουν περισσότερες περιοχές του μιτοχονδριακού αλλά κυρίως του πυρηνικού DNA (π.χ. μικροδορυφόροι).

4.2. Φυλογένεση του είδους

Παρά τη μεγάλη σημασία τους σε επιστημονικό αλλά και οικονομικό επίπεδο, πολύ λίγα είναι γνωστά για τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών του γένους *Alosa* πράγμα που έχει ως αποτέλεσμα τη συστηματική και ταξινομική αβεβαιότητα που ενδέχεται να επηρεάσει την εγκαθίδρυση επαρκών μέτρων διατήρησης των ειδών αυτών.

Τα περισσότερα είδη *Alosa* είναι ανάδρομα, υπάρχουν όμως και αμφίδρομα και είδη που διαβιούν αποκλειστικά στη θάλασσα ή στα εσωτερικά ύδατα. Ωστόσο μεταξύ των ανάδρομων ειδών υπάρχουν και πληθυσμοί που ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους αποκλειστικά σε εσωτερικά ύδατα. Αυτή η ποικιλομορφία στις στρατηγικές διαβίωσης τους σε συνδυασμό με την ικανότητα τους να εποικούν νέους οικοτόπους, κάνει τα είδη του γένους *Alosa* ενδιαφέροντα μοντέλα για τη μελέτη της ειδογένεσης και της προσαρμογής. Επίσης η τεράστια μορφολογική ποικιλομορφία μεταξύ των ειδών κάνει την εφαρμογή μοριακών τεχνικών απαραίτητη για την κατανόηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών του γένους.

Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση που έγινε στην παρούσα μελέτη, και οι τέσσερις φυλογενετικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν (maximum likelihood, maximum parsimony, neighbor-joining και Bayesian) κατέδειξαν φυλογενετικά δένδρα παρόμοιας δομής.

Σύμφωνα μ' αυτές, όπως αναμενόταν, το *Alosa macedonica* είναι πιο κοντά φυλογενετικά με το ευρωπαϊκό *Alosa alosa* παρά με τα είδη της Βόρειας Αμερικής *Alosa sapidissima* και *Alosa pseudoharengus*. Σε παρόμοια αποτελέσματα έχουν καταλήξει και οι Faria et al (2006, 2012) η μελέτη των οποίων υποστηρίζει την αποίκιση της Βόλβης από τη Μαύρη Θάλασσα και όχι από τα είδη της Δυτικής Ευρώπης. Στη συγκεκριμένη μελέτη μάλιστα υποστηρίζεται ότι υπάρχει στενότερη σχέση του *Alosa macedonica* με το *Alosa fallax* παρά με το *A. alosa*.

Τα είδη από την Ποντο-Κασπική ζώνη αποτελούν μια διακριτή βιογεωγραφική οντότητα και παρουσιάζουν συγκεκριμένες μορφολογικές

διαφορές, όπως είναι η παρουσία δοντιών στα υπερώια (Bobori et al 2001), πράγμα που μπορεί να υποδηλώνει ότι μπορεί να αποτελούν ένα διαφορετικό υπογένος *caspiatosa* (Bagliniere 2000). Πάντως, αν το *caspiatosa* θεωρηθεί έγκυρο υπογένος, τότε το υπογένος *alosa* θα καταστεί παραφυλετικό.

Γενικά φαίνεται, τόσο μορφολογικά όσο και γενετικά, όλα τα είδη *Alosa* της Μαύρης Θάλασσας να έχουν πολλές ομοιότητες και μικρές διαφορές. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι η Πόντο-Κασπική περιοχή περιέχει πολλά είδη *Alosa* και πολλά υποείδη, ενδέχεται να υποδεικνύει ότι μια ραγδαία διαφοροποίηση έλαβε χώρα μετά την αποίκιση της Μαύρης Θάλασσας και της Κασπίας Θάλασσας.

Η Ποντο-Κασπική περιοχή έχει περιγραφεί ως ένα σημαντικό καταφύγιο κατά τη διάρκεια των παγετώνων και πηγή αποικισμού για πολλά είδη των εσωτερικών υδάτων, συμπεριλαμβανομένης και της λιπαριάς. Οι κλιματικές και περιβαλλοντικές αλλαγές κατά το Πλειστόκαινο φαίνεται να έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στις φυλογεωγραφικές διαιρέσεις (Bardakci et al 2006).

Υπάρχει η υπόθεση ότι πολλά διάδρομα ή ευρύαλα είδη ψαριών από την Ποντο-Κασπική ζώνη προσαρμόστηκαν να ζουν και/ή να μετακινούνται σε νερά χαμηλής αλατότητας (λιγότερο από 19‰). Αλλιώς δεν μπορεί να εξηγηθεί γιατί μόνο πολύ λίγα από αυτά μπόρεσαν να προσαρμοστούν και να εγκαθιδρυσουν μόνιμους πληθυσμούς στη Μεσόγειο. Η απομόνωση του *Alosa macedonica* και ενδεχομένως του *Alosa vistonica* στις λίμνες Βόλβη και Βιστωνίδα αντίστοιχα, χρονολογείται πιθανότατα στη χρονική περίοδο που το Βόρειο Αιγαίο είχε γλυκά ή υφάλμυρα νερά, δηλαδή πριν την τελευταία υπέρβαση της Μεσογείου και την αύξηση της αλατότητας της σχεδόν στα σημερινά επίπεδα (Bobori et al 2001).

Συνεπώς η υψηλή αλατότητα που επικράτησε στο Βόρειο Αιγαίο συγκρινόμενη με αυτή της Μαύρης Θάλασσας έπαιξε το ρόλο του φράγματος που απέτρεψε την εξάπλωση των δύο ειδών σε όλο το Αιγαίο. Η φυλογενετική σχέση των δύο ειδών με το υπογένος *caspiatosa* της Ποντοκασπικής λεκάνης κυρίως λόγω της ύπαρξης δοντιών στην υπερώια επιβεβαιώνει την στενή φυλογενετική σχέση της ιχθυοπανίδας των γλυκών και υφάλμυρων νερών του Βορείου Αιγαίου και της Ποντοκασπικής λεκάνης (Bobori et al 2001).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει πάντως το γεγονός ότι παρόμοια διαδρομή αποικισμού από την Ποντο-Κασπική περιοχή φαίνεται να ακολούθησε και ο πληθυσμός του *Rutilus rutilus* που διαβιεί επίσης στη λίμνη Βόλβη (Tsoumani et al 2014).

Επίσης για τον καθορισμό ενός είδους, πρέπει πάντα να λαμβάνουμε υπ' όψη ότι απαιτείται πολυδιάστατη μελέτη, που να περιλαμβάνει μορφομετρικές αναλύσεις, αλλά και ανάλυση αρκετών μοριακών δεικτών.

4.3. Διατήρηση του είδους

Η διατήρηση της βιοποικιλότητας αποτελεί πλέον όλο και μεγαλύτερη απαίτηση και ανοιχτό πεδίο ερευνών για πολλούς κλάδους των βιολογικών

επιστημών. Στο στόχαστρο των επιστημόνων δεν έχουν μπει μόνο τα είδη που απειλούνται αλλά και σπάνιες φυλές ή απομονωμένοι πληθυσμοί καθώς και οι βιότοποι που κινδυνεύουν αφού η καταστροφή τους αυτόματα θα σήμαινε και την εξαφάνιση πολλών ειδών χλωρίδας και πανίδας ταυτόχρονα. Για τα ενδημικά είδη όμως υπάρχει ένας παραπάνω λόγος ανησυχίας και ανάγκη για περισσότερη προσοχή αφού δεν υπάρχει «απόθεμα» τους πουθενά αλλού και η εξαφάνισή τους από ένα συγκεκριμένο βιότοπο λόγω ενός τυχαίου γεγονότος, είτε φυσικού είτε προκαλούμενο από τον άνθρωπο θα σήμαινε αυτόματα και την παντελή τους εξαφάνιση.

Η Ελλάδα κατέχει μια από τις πλουσιότερες ιχθυοπανίδες σε είδη των εσωτερικών υδάτων. Αποτελεί μάλιστα σημείο ενδιαφέροντος όσον αφορά τη βιοποικιλότητα για όλη την Ευρώπη (Maitland & Crivelli 1996, Economou et al 2007).

Πιο συγκεκριμένα στον Ελλαδικό χώρο διαβιούν 161 είδη ψαριών των εσωτερικών υδάτων, συμπεριλαμβανόμενων των διάδρομων και των ευρύαλων ειδών (Bobori & Economidis 2006, Economou et al 2007, Kottelat & Freyhof 2007). 47 από αυτά (29,2%) είναι ενδημικά στην Ελλάδα, 14 (8,7%) ζουν και σε γειτονικές χώρες και 28 (17,4 %) είναι ενδημικά στη Βαλκανική χερσόνησο. Σχεδόν το 40% από αυτά θεωρείται ότι βρίσκεται σε κίνδυνο (Bobori et al 2001) ενώ για αρκετά είδη η ταξινομική τους θέση δεν είναι ξεκαθαρισμένη.

Η Ελλάδα έχει ποικιλόμορφη τοπογραφία και άνιση κατανομή βροχοπτώσεων, η οποία είναι 3 φορές μεγαλύτερη στα δυτικά τμήματα από ότι στα ανατολικά (Koussouris 1998). Αυτό προκάλεσε μεγάλες αλλαγές στην υδρολογία και δημιούργησε διακριτά τοπικά περιβάλλοντα που ευνοούσαν την απομόνωση των ειδών των εσωτερικών υδάτων και τον ενδημισμό (Economidis 1995). Τα περισσότερα ενδημικά είδη στην Ελλάδα βρίσκονται σε απομονωμένες περιοχές κυρίως στα νότια και δυτικά της χώρας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο βαθμός ενδημισμού είναι αντιστρόφως ανάλογος με την αφθονία των ειδών. Δηλαδή, όσο περισσότερα ενδημικά είδη έχει μια περιοχή τόσο μικρότερη αφθονία ειδών παρουσιάζει. Πιο συγκεκριμένα στην Ελλάδα, τα περισσότερα ενδημικά είδη ζουν στα νότια και δυτικά της χώρας όπως προαναφέρθηκε, αλλά τα περισσότερα είδη βρίσκονται στα βόρεια (Economou et al 2007).

Λόγω της συνεχούς αύξησης της ανθρώπινης παρέμβασης στα υδάτινα οικοσυστήματα, και ειδικά αυτά των εσωτερικών υδάτων (Perry & Vanderklein 1996, Maitland & Morgan 1997, Trudgill et al 1999, Boon et al 2000) η διατήρηση και η προστασία των ψαριών των εσωτερικών υδάτων, η βιοποικιλότητα τους και οι οικοτόποι τους τυγχάνουν μεγάλης προσοχής (Kirchhofer & Hefti 1996, Collares-Pereira et al, 2002).

Στην Ελλάδα η κατάσταση δε διαφέρει από τις άλλες χώρες λόγω της δραματικής αύξησης της ζήτησης νερού τα τελευταία χρόνια (Angelakis & Diamandopoulos 1995). Ακόμη, η μόλυνση του νερού, ο ευτροφισμός κ.α. συντέλεσαν στην υποβάθμιση των επιφανειακών αποθεμάτων νερού και των υδάτινων οικοτόπων (Bobori et al 2001). Λόγω ανθρωπίνων δραστηριοτήτων η Ελλάδα έχασε το 75% των υδροβιοτόπων της από το 1900 (OECD 2000). Αυτές οι ακραίες συνθήκες επηρεάζουν τις βιολογικές δραστηριότητες των ψαριών με

τραγικές συνέπειες στους πληθυσμούς τους π.χ. η εξάλειψη των πληθυσμών της Κορώνειας τον Αύγουστο του 1995 (Gregoriadou et al 1997). Ακόμη, οι Economidou et al (1991) ανέφεραν ότι αρκετοί φυσικοί πληθυσμοί εκτοπίστηκαν από απομονωμένες λεκάνες απορροής μέσω ρεμάτων στη Δυτική Ελλάδα λόγω μιας εκτεταμένης περιόδου ξηρασίας σε συνδυασμό με καταστροφή των οικοτόπων τους λόγω κατασκευής καναλιών άρδευσης. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα 3 ενδημικά είδη (*Eudontomyzon hellenicus*, *Leuciscus keadikus* και *Valencia letourneuxi*) να τεθούν σε καθεστώς προστασίας που κυρίως περιλαμβάνει προγράμματα παρακολούθησης.

Άλλα ενδημικά είδη που επηρεάστηκαν από την υποβάθμιση των οικοτόπων τους είναι τα : *Phoxinus phoxinus*, *Gasterosteus aculeatus*, *Pungitius platigaster*, *Economidichthys pygmaeus*, *Cobitus punctilineata*. Ακόμη τα είδη *Knipowitschia thessala* και *Cobitus stephanidisi* έχουν εξαφανιστεί από τους φυσικούς τους οικοτόπους (πηγές Χασάμπαλι και Βελεστίνου) στη Θεσσαλία (Economidou et al 2003).

Γενικά, πολλά είδη του γένους *Alosa* παρουσιάζουν μείωση στον πληθυσμό τους, οπότε θα πρέπει να εφαρμοστούν πρακτικές διατήρησης (Waldman 2003). Το γένος *Alosa* είναι εξαιρετικά ευάλωτο σε ανθρωπογενείς αλλαγές ειδικά με αυτές που σχετίζονται με την ποιότητα των τόπων ωοτοκίας και την πρόσβαση σε αυτούς.

Όπως προκύπτει από όλες τις αναφορές στο είδος και την προστασία του, παρά την πολύ μικρή διασπορά του που περιορίζεται μόνο στη λίμνη Βόλβη, η εξέλιξη του *Alosa macedonica* χαρακτηρίζεται ισορροπημένη χωρίς εμφανή κίνδυνο στο άμεσο μέλλον, καθώς η Βόλβη είναι σχετικά ελεγχόμενη (Bobori et al 2001). Ωστόσο οι πιο πρόσφατες αλιευτικές τακτικές, έχουν οδηγήσει σε μια πιο ήπια και ασυνήθιστη εκμετάλλευση του πληθυσμού της. Συνεπώς, δεδομένου ότι η Βόλβη αποτελεί ένα μικρό και κλειστό σύστημα, όταν εμφανίζεται υπερπληθυσμός ενός είδους, υποσιτισμένα άτομα είναι πιο συχνό φαινόμενο. Για να αποφύγουμε λοιπόν την απότομη αύξηση του πληθυσμού του που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα διαταραχές στην τροφική αλυσίδα και αλλαγές στο μέγεθος του πληθυσμού και άλλων ειδών, οι μελλοντικές πρακτικές διαχείρισης πρέπει να βοηθήσουν ώστε να διατηρηθεί μια ισορροπία μεταξύ των πληθυσμών όλων των ειδών που διαβιούν στη λίμνη. Μία από τις μεθόδους με τις οποίες μπορεί να πραγματοποιηθεί αυτό είναι η προώθηση της αλίευσης ίσων ποσοτήτων ετησίως των διαφορετικών ειδών ψαριών (μέθοδος TAC- Total Available Catch). Αυτή η μέθοδος αναμένεται να επιφέρει μια ισορροπία μεταξύ όλων των ειδών που διαβιούν στη λίμνη και να μειώσει τις απότομες αυξομειώσεις στους πληθυσμούς τους (Bobori et al 2001).

Πάντως, είναι προφανές ότι πρέπει να τεθεί σε ισχύ ένα καθεστώς προστασίας και διατήρησης σύντομα για να αντιμετωπιστεί η αυξανόμενη ανθρωπογενής επίδραση στη λίμνη Βόλβη. Γενικά η προσέγγιση του να γίνεται προσπάθεια να προστατευτεί μόνο το είδος αυτό καθ' αυτό θεωρείται πλέον λάθος και παρωχημένη από τους ειδικούς σε θέματα διατήρησης. Όλο το οικοσύστημα θα πρέπει να αντιμετωπίζεται σαν μια ολότητα που θα προστατευτεί στο σύνολό της.

Ο καθορισμός των 'μονάδων' ενός είδους που βρίσκεται σε κίνδυνο και των κατάλληλων πρακτικών διαχείρισης που πρέπει να εφαρμοστούν είναι ένα από τα πιο κρίσιμα κεφάλαια της βιολογίας διατήρησης. Από αυτήν την οπτική, οι γενετικές πληροφορίες συνδυασμένες με άλλες οικολογικές και βιολογικές πληροφορίες μπορούν να παρέχουν εξαιρετικά χρήσιμες πληροφορίες όσον αφορά τη διαχείριση και τη διατήρηση των πληθυσμών που βρίσκονται σε κίνδυνο. Κάποιοι ερευνητές προτείνουν ότι η κατάλληλη μονάδα διατήρησης για ένα επαπειλούμενο είδος είναι το ίδιο το είδος (Caughley & Gunn 1996) ενώ κάποιοι άλλοι διαχωρίζουν τμήματα του είδους που βρίσκονται σε ανεξάρτητη εξελικτική πορεία (Evolutionary Significant Units- ESUs). Κάτι τέτοιο τεκμηριώνεται από αμοιβαία μονοφυλετικότητα σε επίπεδο μιτοχονδριακού DNA και σημαντική απόκλιση συχνότητας αλληλομόρφων σε πυρηνικούς γενετικούς τόπους. Τέτοιες μονάδες μπορεί να είναι πληθυσμοί, υποείδη ή είδη (Moritz 1994, Waples 1995). Η διατήρηση της γενετικής ποικιλότητας είναι σημαντική παράμετρος της διατήρησης και της εξελικτικής βιολογίας, αφού είναι το πρώτο βήμα για τις εξελικτικές αλλαγές εντός των πληθυσμών (Frankel & Soule 1981).

Περίληψη

Η λιπαριά (*Alosa macedonica*) είναι ένα ενδημικό είδος ψαριού που απαντάται αποκλειστικά στη λίμνη Βόλβη και χαρακτηρίζεται ως τρωτό από την Κόκκινη Λίστα με τα απειλούμενα είδη του IUCN. Αν και αποτελεί σημαντικό αλιευτικό προϊόν για την τοπική κοινωνία, δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για την πληθυσμιακή γενετική δομή του και λίγα είναι γνωστά για τη φυλογενετική του θέση αφού προηγούμενες μελέτες του είδους αφορούσαν μορφομετρικά χαρακτηριστικά και άλλα βιολογικά και αλιευτικά του στοιχεία. Εντούτοις είναι γνωστό πως η γνώση της γενετικής δομής των ειδών αποτελεί μία από τις βασικότερες παραμέτρους για την ορθολογική τους διαχείριση. Ως εκ τούτου, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν μια πρώτη εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας της λιπαριάς με ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA.

Για το σκοπό αυτό 40 δείγματα λιπαριάς συλλέχθηκαν από τη λίμνη Βόλβη και αναλύθηκαν με την PCR-RFLP μεθοδολογία που εφαρμόστηκε σε 2 τμήματα του μιτοχονδριακού DNA (ND5/6 και ND1). Σε κάθε τμήμα δοκιμάστηκαν 22 περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε 5 τυχαία άτομα. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ανάλυση της πρωτοδιάταξης σε ένα κομμάτι 950 βάσεων του κυτοχρώματος b και σε ένα κομμάτι 850 βάσεων των γονιδίων της ATPάσης 6 και της κυτοχρωμικής οξειδάσης (CO) III σε 11 και 5 αντιπροσωπευτικά άτομα, αντίστοιχα. Τα τμήματα αυτά καλύπτουν σχεδόν το μισό μιτοχονδριακό γονιδίωμα .

Δύο από τα 22 περιοριστικά ένζυμα αποκάλυψαν πολυμορφισμό στο τμήμα ND5/6, ενώ δεν ανιχνεύτηκε πολυμορφισμός στο γονίδιο ND1. Κατά την αλληλούχιση του κυτοχρώματος b και των γονιδίων ATPVI-COIII παρατηρήθηκαν 4 και 3 πολυμορφικές θέσεις αντίστοιχα. Ο συνδυασμός των παραπάνω αποτελεσμάτων αποκάλυψε συνολικά 5 σύνθετους γονότυπους. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι το *A.macedonica* είναι πιο κοντά φυλογενετικά με το Ευρωπαϊκό *A.alosa* από ότι με άλλα είδη *Alosa* της Β. Αμερικής.

Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει ότι αν και το είδος δεν κινδυνεύει άμεσα με εξαφάνιση, η προστασία και η ορθολογική του διαχείριση θεωρείται επιβεβλημένη καθώς αποτελεί ενδημικό είδος ιδιαίτερης σημασίας για την τοπική κοινωνία. Οι μελλοντικές στρατηγικές διαχείρισης θα πρέπει να επικεντρωθούν όχι μόνο στη διατήρηση της ενδοπληθυσμιακής γενετικής του ποικιλότητας αλλά και στην προστασία του οικοσυστήματος του. Ακόμη, σε ότι αφορά τον προσδιορισμό της γενετικής του δομής απαιτούνται επιπλέον μελέτες που να περιλαμβάνουν και άλλους μοριακούς δείκτες κυρίως του πυρηνικού DNA όπως π.χ. οι μικροδορυφορικοί δείκτες.

Summary

Macedonian shad (*Alosa macedonica*) is a landlocked fish species endemic to Lake Volvi classed as vulnerable in the IUCN Red List of threatened species. Although it is an important fishing product for the local society, no information is available about its population genetic structure and little is known for its phylogenetic position since previous studies on *A. macedonica* have dealt with its morphologic features, fishery aspects and other life history characteristics, though such knowledge is important for proper fishery management. Thus, this study was designed to provide a first estimate of the genetic variability of the species using mitochondrial DNA (mtDNA) analysis.

To achieve this goal, 40 *A. macedonica* specimens were collected from Lake Volvi and were investigated through PCR-RFLP analysis of two mtDNA gene fragments (ND5/6 and ND1). Each segment was screened with 22 restriction endonucleases, in a test sample of 5 individuals. A 950-bp fragment of the cytochrome b and a 850-bp fragment of the ATPaseVI–COIII genes were also sequenced in 11 and 5 representative individuals, respectively. These four segments covered approximately half of the mitochondrial genome.

Two out of the 22 restriction enzymes used were found to detect variability in the ND5/6 segment, while no polymorphism was detected in the ND1 gene. The sequence analyses of the cytochrome b and ATPVI-COIII segments revealed 4 and 3 variable sites, respectively. The combination of both RFLP and sequencing datasets yielded a total of 5 composite haplotypes (genotypes). Low levels of genetic diversity seem to characterize the species. On the other hand phylogenetic analysis revealed that *Alosa macedonica* is phylogenetically closer to the European *A. alosa* than to the North American *Alosa* species, which in congruence with a previous study.

This study shows that although the species is not threatened with extinction in the near future, its protection and sustainable management is considered essential as it is an endemic and vulnerable species of particular importance for the local community. Concerning its genetic diversity, more genetic studies including other molecular markers of mitochondrial and nuclear DNA are required for safer conclusions. Practically, future management strategies of the species should focus to the maintenance of its population genetic diversity in a conservation point of view.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Ξένα βιβλιογραφία

- Allendorf F.W. & Leary R.F., 1996. Heterozygosity and fitness in natural populations in animals. Conservation Biology: the science of scarcity and diversity. Sinauer Associates Sunderland. Massachusetts USA: 57-76.
- Ananiadis S.I., 1951. A preliminary survey of the Hagios Vassilios lake. Πρακτ. Ελλ. Υδροβιολ. Ινστ. 5(2): 25-71.
- Angelakis A. & Diamadopoulos E., 1995. Water resources management in Greece: current status and prospective outlook. Wat. Sci. Technol. 32(9-10), 267-272.
- Apostolidis A.P., Karakousis Y., Triantaphyllidis C., 1996. Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Salmo trutta* (brown trout) populations as revealed by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. Heredity 77, 608-618.
- Apostolidis A.P., Loukovitis D., Tsigenopoulos C.S., 2008. Genetic characterization of brown trout (*Salmo trutta*) populations from the Southern Balkans using mtDNA sequencing and RFLP analysis. Hydrobiologia 600, 169-176.
- Avice J.C., 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. Annu. Rev. Genet. 25, 45-69.
- Avice J.C., 1994. Molecular markers. Natural history and evolution. Chapman and Hall, New York.
- Bagliniere J.L., 2000. Le genre *Alosa* sp. In: Bagliniere, J.L., Elie, P. (Eds.), Lesaloses *Alosa alosa* et *Alosa fallax* spp.. Inra-Cemagref, Paris, pp. 1-30.
- Banareescu P., 1990. Zoogeography of fresh waters Vol. 1. General distribution and dispersal of freshwater animals. AULA- Verlag, Wiesbaden, Germany.
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16,37-48.
- Bardakci F., Degerli N., Ozdemir O., Basibuyuk H.H., 2006. Phylogeography of the Turkish brown trout *Salmo trutta* L.: mitochondrial DNA PCR-RFLP variation. Journal of Fish Biology 68 (Supplement A) 36-55.
- Beebee T. & Rowe G., 2004. An introduction to Molecular Ecology. Oxford University Press, New York.
- Bentzen P., Legget W.C., Brown G.G., 1998. Length and restriction site heteroplasmy in the mitochondrial DNA of American shad (*Alosa sapidissima*). Genetics 118, 509-518.
- Berd A.& Gremaldi E., 1966. Biologia dell' agone (*Alosa ficta lacustris*) del lago Maggiore. Mem. Inst. Ital. Idrobiol. 20: 41-83.

- Bergl R.A.& Vigilant L., 2007. Genetic analysis reveals population structure and recent migration within the highly fragmented range of CrossRiver gorilla. *Molecular ecology* 16: 501-516.
- Bobori D.C., Koutrakis E.T., Economidis P.S., 2001. Shad species in Greek waters . A historical overview and present status. *Bull. Fr. Peche Piscic.*
- Bobori D.C.& Economidis P.S., 2006. Freshwater fishes of Greece: Their biodiversity, fisheries and habitats. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 9(4): 407-418.
- Bollington N. &Hebert P.D.N., 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 80-94.
- Boon P.J., Davies B.R., Petts G.E., (Eds.), 2000. *Global Perspectives on River Conservation. Science, Policy and Practice.* JohnWiley and Sons, Ltd, Chichester.
- Brown W.M., 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. In *Evolution of genes and proteins* 63-88. Sinauer Associates Massachusetts.
- Caughley G. & Gunn A., 1996. *Conservation Biology in Theory and Practice.* Blackwell Science, Cambridge, Massachusetts.
- Chang Y.S., Huang F.L., Lo T.B., 1994. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *J. Mol. Evol* 38, 138-155.
- Chapman R.W., 1987. Changes in the population structure of male striped bass *Morone saxatilis* spawning in the three areas of the Chesapeake Bay from 1984 to 1986. *Fish Bull* 85, 167-170.
- Collares-Pereira M.J., Cowx I.G., Coelh M.M., (Eds.), 2002. *Conservation of Freshwater Fishes: Options for the Future.* Fishing News Books/Blackwell Science, Oxford.
- Crandall K.A., Posada D., Vasco D., 1999. Effective population sizes: missing measures and missing concepts. *Animal Conservation* 2: 317-319.
- Crivelli A.J., 1996. The freshwater fish endemic to the Northern Mediterranean region. An action plan for their conservation
- Crivelli A.J., 2006. *Alosa macedonica*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>
- Dowling T.E., Smith G.R., Brown W.M., 1989. Reproductive isolation and introgression between *Notropis cornutus* and *Notropis chrysocephalus* (family: Cyprinidae): comparison of morphology, allozymes and mitochondrial DNA. *Evolution* 43, 620-634.
- Duvernell D.D.& Aspinwall N., 1995. Introgression of *Luxilus cornutus* mtDNA into allopatric populations of *Luxilus chrysocephalus* (Teleostei: Cyprinidae) in Missouri and Arkansas. *Mol. Ecol* 4, 173-181.
- Economidis P.S.& Sinis A.I., 1982. Les poissons des lacs Koronia et Volvi (Macedoine, Grece). Considerations systematiques et zoogeographiques. *Biologia Gallo-Hellenica* 9: 291-236.
- Economidis P.S.& Sinis A.I., 1986. Situation taxinomique et comparaisons des Aloses (Pisces, Clupeidae), pronenant des lacs Volvi et Vistonis (Grece). Description d' une nouvelle sous- espece: *Alosa caspia vistonica*. *J. Nat. Hist.* 20.

- Economidis P.S.& Sinis A.I., 1988. A natural hybrid of *Leuciscus cephalus macedonicus* × *Chalcalburnus chalcoides macedonicus* (Pisces, Cyprinidae) from lake Volvi (Macedonia, Greece). *Journal of fish biology*,32: 593-605.
- Economidis P.S.& Heeler A., 1989. Hybrids of *Abramis brama* with *Scardinius erythrophthalmus* and *Rutilus rutilus* from lake Volvi (Macedonia, Greece). *Journal of fish biology*,35: 295-299.
- Economidis P.S.& Sinis A.I., 1991. *Alosa macedonica* (Vinciguerra 1921) in: Hoestlandt H (ed). *The freshwater fishes of Europe vol 2 Clupeidae, Anguillidae*. AULA- Verlag, Wiebaden
- Economidis P. S., 1991. Check List of Freshwater Fishes of Greece. Society for the Protection of Nature. 9 - 38.
- Economidis P.S., 1995. Endangered freshwater fishes of Greece. *Biol. Conserv.* 72, 201–211.
- Economou A.N., Daoulas C., Economidis P.S., 1991. Observations of the biology of *Leuciscus "svallize"* in the Kremasta reservoir (Greece). *Hydrobiol.* 213, 99–111.
- Economou A.N., Zogaris S., Giakoumi S., Barbieri R., Petridis D., 2003. Developing a biotic river typology and defining referreconditions in the rivers of Greece: a spatially-based approach. EESD Project: Development, evaluation & implementation of a standardized fish-based assessment method for the ecological status of European rivers (FAME). Work Package 6,35 pp. http://fame.boku.ac.at/downloads/D9_13_SBM_Reports/ecoregion_6_SBA_Economou_etal.pdf
- Economou A.N., Giakoumi S., Vardakas L., Barbieri R., Stoumboudi M., Zogaris S., 2007. The freshwater ichthyofauna of Greece - an update based on a hydrographic basin survey. *Mediterranean Marine Science* 8(1): 91-166.
- Eizirik C., Kim J.H., Menotti-Raymond M., Crawshaw P.G., O'Brien S.J., Johnson W.E., 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*). *Molecular ecology* 10: 65-69.
- Faria R., Weiss S., Alexandrino P., 2006: A molecular phylogenetic perspective on the evolutionary history of *Alosa* spp. (Clupeidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40 298–304.
- Faria R., Weiss S., Alexandrino P., 2012. Comparative phylogeography and demographic history of European shads (*Alosa alosa* and *A. fallax*) inferred from mitochondrial DNA. *BMC Evol. Biol.* 12, 194.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein J., 1993. Phylogeny inference package (PHYLIP) version 3.5. SeattleWA: University of Washington Department of Genetics.
- Frankel O.H. & Soule M.E., 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham R., 1995. Effective population/ adult population size ration in wildlife: a review. *Genetical Research*, Cambridge 66: 95-107.
- Frankham R., 1995. Conservation genetics. *Animal review of genetics* 29: 305-327.

- Frankham R., 1997. Do island population have less genetic variation than mainland populations ? *Heredity*, 78: 311-327.
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A., 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Froese R. & Pauly D., Editors. 2008. *FishBase*. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (04/2008).
- Giantsis I.A., Kechagia S, Apostolidis A.P., 2015. Evaluating the genetic status of the IUCN vulnerable Macedonian shad (*Alosa macedonica*, Vinciguerra, 1921) from lake Volvi. *Journal of applied ichthyology* 31: 184-187.
- Giuffra E., Bernatchez L., Guyomard R., 1994. Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from Northern Italy. *Molecular Ecology* 3, 161–172.
- Gray M.W., 1992. The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cyt.* 141, 233-257.
- Gregoriadou A., Delidou-Tsogia K., Tsoumbaris P., Bobori D.C., Katsougiannopoulos V., 1997. Microbiological and chemical parameters of the lake Koronia (Northern Greece). pp. 428–435. In: Th. Lekkas (Ed.) *Proceedings of the 5th Conference on Environmental Science and Technology*, 1997 Sept 9–12. Molyvos, Lesvos (In Greek).
- Hall T.A., 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.
- Hartl D.L. & Clark A.G., 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K., 1996. *Molecular systematics*, 2nd edition. Sinauer Associates Inc. Sanderland Massachusetts USA.
- Hoestlandt H., 1991. *Alosa* Link 1970. pp. 86-87. in Hoestlandt H (ed). *The freshwater fishes of Europe vol.2. Clupeidae, Anguillidae*. AULA- Verlag, Wiesbaden.
- Huchinson G.E., 1957. *A treatise on Limnology vol I: Geography, Physics and Chemistry*. Chapman & Hall, London.
- Hughes J., Ponniah M., Hurwood D., Chenoweth S., Arthington A., 1999. Strong genetic structuring in a habit specialist, the Oxleyan Pygmy Perch *Nannoperca oxleyana*. *Heredity*, 83, 5–14.
- Imsiridou A., Apostolidis A.P., Durand J.D., Briolay J., Bouvet Y., Triantaphyllidis C., 1998. Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek chub *Leuciscus cephalus* L. (Pisces, Cyprinidae) populations as revealed by RFLP analysis of mitochondrial DNA. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26,415–429.
- Jobling M. ,1995. *Environment biology of fishes*. Chapman & Hall, London
- Jolly M.T., Aprahamian M.W., Hawkins S.J., Henderson P.A., Hillman R., O'Maoileidigh N., Maitland P.S., Piper R., Genner M.J., 2012. Population genetic structure of protected allis shad (*Alosa alosa*) and twaite shad (*Alosa fallax*). *Marine Biology* 159: 675-687.

- Kirchhofer A., Hefti D., (Eds.) 1996. Conservation of Endangered Freshwater Fish in Europe. Birkhauser Verlag, Basel.
- Kotlík P., Marková S., Choleva L., Bogutskaya N.G., Ekmekci F.G., Ivanova P.P., 2008. Divergence with gene flow between Ponto-Caspian refugia in an anadromous cyprinid *Rutilus frisii* revealed by multiple gene phylogeography. *Molecular Ecology* 17, 1076-1088.
- Kottelat M., 1997. European freshwater fishes. *Biologia Bratislava* 52.
- Kottelat M. & Freyhof J., 2007. Handbook of European freshwater fish. Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin, xiv + 646 pp.
- Koussouris T., 1998. The water in nature, in development, in environmental protection. Monographs on marine sciences. National Centre for Marine Research, Athens.
- Lacy R.C., 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian population. *Journal of Mammalogy* 78: 320-335.
- 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. *J. Mol. Evol* 17, 214-226.
- Lansman R.A., Avise J.C., Huettel M.D., 1983. Critical experimental test of the possibility of “paternal leakage” of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 80, 1969-1971.
- Maitland P.S. & Crivelli A.J., 1996. Conservation of freshwater fish 94pp. In: Conservation of Mediterranean wetlands ed by J. Skinner & AJ Crivelli. Tour du Valat, Arles.
- Maitland P.S. & Morgan N.C., (Eds.) 1997. Conservation Management Of Freshwater Habitats. Lakes, Rivers and Wetlands. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts.
- Mamuris Z., Stoumboudi M.TH., Stamatis C., Barbieri R., Moutou K.A., 2005. Genetic variation in populations of the endangered fish *Ladigesocypris ghigii* and its implications for conservation. *Freshwater Biology* 50: 1441–1453.
- Margoulis L., 1970. Origin of eukaryotic cells. Yale University Press.
- Marinov B., 1963. About the systematic situation of puzanok of Valeka river. *Annuaire de l' Universite de Sofia, Faculte de Biologie, Geologie et Geographie*.
- McNeely J.A., Miller K.R., Reid W.V., Mittermeier R.A., Werner T.B., 1990. Conserving the world's biological diversity, IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank, Washington DC.
- Meena R., Siddhanta A.K., Prasad K., Ramavat B.K., Eswaran K., Thirupathi S., Ganesan M., Mantri A.V., Subba Rao P.V., 2006. Preparation, characterization and benchmarking of agarose from *Gracilaria dura* of Indian waters. *Carbohydrate Polymers* 69, 179-188.
- Mesquita N., Carvalho G., Shaw P., Crespo E. & Coelho M.M, 2001. River basin-related genetic structuring in an endangered fish species, *Chodrostoma lusitanicum*, based on mtDNA sequencing and RFLP analysis. *Heredity* 86, 253–264.

- Moritz C., Dowling T.E., Brown W.M., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA : relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst* 18, 269- 292.
- Moritz C., 1994. Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9, 363–373.
- Nei M., Marayuma T., Chakraborty R., 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10.
- Nei M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nielsen E.E., Hansen M.M., Mensberg K.LD., 1998. Improved primer sequences for the mitochondrial ND1, ND3/4 and ND5/6 segments in salmonid fishes: Application to RFLP analysis of Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 53, 216-220.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 2000. *Environmental performance reviews–Greece*. Greek Ministry of Environment and Public Works, Athens.
- Page R.D.M. & Holmes E.E., 1998. *Molecular Evolution, a phylogenetic approach*. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Perry J. & Vanderklein E. (Eds.), 1996. *Water Quality. Management of a Natural Resource*. Blackwell Science, Massachusetts.
- Quignard J.P. & Douchement C.L., 1991. *Alosa alosa* (Linnaeus 1785) pp 88-126 in: Hoestlandt H (ed). *The freshwater fishes of Europe vol. 2. Clupeidae, Anguillidae*, AULA- Verlag, Wiesbaden
- Reed D.V.T. & Frankham R., 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17: 230-237.
- Saitou N. & Nei M., 1987. The neighbor- joining method: a new method of reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sederoff R.R., 1984. Structural variation in mitochondrial DNA. *Adv. Genet.* 22, 1-108.
- Slatkin M., 1993. Isolation by distance in equilibrium and non equilibrium population. *Evolution* 47: 264-279.
- Slatkin M., 1994. Gene flow and population structure. In Real L (ed). *Ecological Genetics*. Princeton University Press, Princeton, USA, pp 3-17.
- Sokal R.R. & Jacquez G.M., 1991. Testing inferences about microevolutionary processes by means of spatial autocorrelation. *Evolution* 45: 152-168.
- Sunnucks P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199-203.
- Svetovidov A.N., 1973. Clupeidae pp 99-109. in: Hureau J.C, & Monod T (eds). *Checklist of the fishes of the Northern- eastern Atlantic and of the Mediterranean*, Paris, UNESCO
- Triantafyllidis A., Abatzopoulos T.J., Economidis P.S., 1999. Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Silurus glanis* and *Silurus aristotelis* (Pisces, siluridae) populations assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. *Heredity*, 82, 503–509.

- Trudgill T., Walling D.E., Webb B.W. (Eds.), 1999. Water Quality. Processes and Policy. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester.
- Tsoumani M., Georgiadis A., Giantsis I.A., Leonardos I, Apostolidis A.P., 2014. Phylogenetic relationships among southern Balkan *Rutilus* species inferred from cytochrom b sequence analysis: Micro-geographic resolution and taxonomic implications. *Biochem. System. Ecol.* 54, 172-178.
- Wallace D.C., 1982. Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol. Rev.* 46, 208-240.
- Waples R.S., 1995. Evolutionary significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. *American Fisheries Society Symposium* 17, 8–27.
- Whitehead, 1985. Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, ancovies and wolf-herrings. Part 1- Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. *FAO fish Synops* 125 (Vol 7- part 1)
- Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M., Gyllesten U.B., Helm- Bychowski K.M., Higuchi B.C., Palumbi S.R., Prager C.M., Sage R.D., Stoneking M., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc* 26, 375-400.
- Wright S., 1931. Evolution in Mendelian population. *Genetics* 16: 97-159.
- Zarfdjian M.H., Economidis P.S., Sinis A., 1996. Large zooplankton predation by fish in Lake Volvi (Macedonia, Greece). In: Armantrout, N.B., ed. Theme 1. Condition of the world's aquatic habitats. *Proceedings of the World Fisheries Congress, Athens, Greece.* Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi, pp. 267–278.
- Zhu D., Jamieson B.G.M., Hugal A., Moritz C., 1994. Sequence evolution and phylogenetic signal in control- region and cytochrome b sequences of rainbow fishes (Melanotaeniidae). *Mol Biol Evol* 11, 672-683.
- Zouros E., Freemank R., Ball A.O., Pogson G.H., 1992. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* 359, 412-414.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Βάρβογλης Α., 2005. Επίτομη Οργανική Χημεία. Εκδόσεις ΖΗΤΗ
- Γραμματικοπούλου Ν., Κεχαγιάς Δ., Οικονομίδης Γ., 1996. Περιβαλλοντική έκθεση “Σχέδιο διάσωσης λίμνης Κορώνειας”. Υ.ΠΕ.ΧΩ.ΔΕ- Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Θεσσαλονίκης.
- Ζεϊμπέκη Α., 2004. Διαχείριση των υδατικών πόρων της υπολεκάνης Βόλβης. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Κλεανθίδης Π., 2002. Βιολογία της αναπαραγωγής, τροφικές συνήθειες και δυναμική πληθυσμού του ενδημικού ψαριού *Alosa macedonica* (Vinciguerra 1921) της λίμνης Βόλβης. Διδακτορική διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Μουστακα Μ., 1988. Εποχιακές διακυμάνσεις, ετήσια περιοδικότητα και χωρική κατανομή των φυτοπλαγκτικών πληθυσμών της λίμνης Βόλβης. Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Μυλόπουλος Γ. & Τολίκας Δ., 2001. Εμπλουτισμός της λίμνης Κορώνειας από τον βαθύ υδροφόρα. Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Θεσσαλονίκης, Διεύθυνση Υδάτινων Πόρων & Εγγείων Βελτιώσεων.
- Παυλίδης Γ., Γκούτνερ Β., Ζαρφατζιάν Μ., Διαμαντόπουλος Ι., Τζώρτζη Π., Κόκκας Δ., Εμινόγλου Χ., 1984. Πρόγραμμα οριοθέτησης υγροτόπων σύμβασης Ramsar Α' φάση. Υγροβιότοπος λιμνών Κορώνειας –Βόλβης. Διεύθυνση Περιβάλλοντος ΥΧΟΠ.
- Σίνης Α., 1981. Η αυτοοικολογία του ενδημικού είδους *Alosa (caspiatosa) macedonica* (Vinciguerra) (pisces : Clupeidae) της λίμνης Βόλβης. Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Υ.ΠΕ.ΧΩ.Δ.Ε. 1984. Υγροβιότοπος λιμνών Κορώνειας και Βόλβης, Πρόγραμμα οριοθέτησης υγροβιοτόπων σύμβασης Ramsar.
- Ψιλοβίκος Α.Α., 1977. Παλαιογεωγραφική εξέλιξη της λεκάνης και της λίμνης της Μυγδονίας (Λαγκαδά- Βόλβης). Διδακτορική διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ:

- **2xCTAB:** σε ογκομετρικό σκεύος τοποθετούνται 50mL Tris-HCl συγκέντρωσης 1M και pH=8, 175mL NaCl συγκέντρωσης 4M (ή 40,9gr), 20mL EDTA, 10gr CTAB και αποσταγμένο νερό μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει τα 500mL και ακολουθεί ανάδευση
- **EDTA:** αιθυλενο-διαμινο-τετρα-ακετικό οξύ ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)
- **Tris-HCl:** 2-αμινο-2-υδροξυμεθυλο-1,3-προπανοδιόλη, υδροχλώριο ($C_4H_{11}NO_3ClH$)
- **Αιθανόλη:** (CH_3CH_2OH) αποτελεί έναν ισχυρό αφυδατικό παράγοντα που αντικαθιστά τα μόρια του νερού τα οποία ενυδατώνουν το DNA. Έτσι το DNA καθίσταται αδιάλυτο στο υδατικό μέσο και καθιζάνει
- **TE:** για 100mL TE προστίθενται 0,5mL Tris-HCl συγκέντρωσης 2M και pH=7,4, 0,2mL EDTA συγκέντρωσης 0,5M και pH=8 και 99,3mL αποσταγμένο νερό. Το προϊόν διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου ή στη συντήρηση ($4^{\circ}C$)
- **Φαινόλη:** αποτελεί ένα κυκλικό παράγωγο του βενζολίου με ένα υδροξύλιο (κυκλική αλκοόλη) με μοριακό τύπο C_6H_5OH . Στο εμπόριο διατίθεται σε δύο μορφές την κρυσταλλική και την υγροποιημένη. Η υγροποιημένη χρησιμοποιείται κατευθείαν μετά από εξισορρόπηση. Αντίθετα η κρυσταλλική μορφή πρέπει να αποσταχθεί στους $160^{\circ}C$ ώστε να απομακρυνθούν οι διάφοροι οξειδωτικοί παράγοντες (πχ. κινόνες) για την αποφυγή καταστροφής των φωσφοδιεστερικών δεσμών (Σκούρας 1993). Η εξισορρόπηση της φαινόλης επιτυγχάνεται με την προσθήκη σε σωλήνα falcon των 50mL που περιέχει 20mL αποσταγμένης (υγρής) φαινόλης, 25mL Tris συγκέντρωσης 1M και pH=8. Ακολουθεί ανακίνηση και διαχωρισμός των δύο φάσεων και κατόπιν απομάκρυνση της άνω φάσης (Tris). Έπειτα προστίθεται TE μέχρι τελικό όγκο 45mL και ακολουθεί εκ νέου ανακίνηση και απομάκρυνση της άνω φάσης. Τέλος προστίθεται TE ξανά και ο σωλήνας τοποθετείται στο ψυγείο ή στην κατάψυξη αφού προηγουμένως καλυφθεί με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητη. Η φαινόλη είναι μια άκρως διαβρωτική χημική ένωση και μπορεί να προκαλέσει σοβαρά εγκαύματα αν έρθει σε επαφή με το δέρμα. Για το λόγο αυτό πρέπει κατά τη χρήση της να λαμβάνονται απαραίτητες προφυλάξεις όπως εργαστηριακή ποδιά, γάντια και επαγωγός για εξαέρωση ενώ σε περίπτωση που στάξει πάνω στο γυμνό δέρμα πρέπει να ξεπλυθεί άμεσα με άφθονο νερό και σαπούνι.
- **Χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη 24/1:** παρασκευάζεται με την προσθήκη των δύο ενώσεων στην παραπάνω αναλογία και τη ανάδευση

του μίγματος. Φυλάσσεται σε σκοτεινόχρωμα μπουκάλια καλά κλεισμένα επειδή υπάρχει κίνδυνος εξάτμισης, σε θερμοκρασία 4°C.

- **TBE:** τα 1000mL TBE περιέχουν 54gr Tris, 27,5gr βορικό οξύ, 20 mL Na₂EDTA συγκέντρωσης 0,5M και τον υπολειπόμενο όγκο αποσταγμένο νερό.
- **Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης (loading buffer):** για την παρασκευή 10mL loading buffer χρησιμοποιούνται 5mL γλυκερόλη (CH₂OHCHOHCH₂OH), 250μL 40xTBE, 1mL κυανού της βρωμοφαινόλης, 1mL κυανού του ξυλενίου και 2,75mL νερό. Διατηρείται στους -20°C.
- **Κυανού της βρωμοφαινόλης:** είναι χρωστική που προκύπτει από την ανάμιξη 5gr βρωμοφαινόλης με 50mL νερού και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide EtBr):** 1gr EtBr (C₂₁H₂₀N₃Br) αραιώνεται σε 100mL νερού και τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη μετά από ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου ή στη συντήρηση (4°C). Απαραίτητη είναι η παραμονή του μακριά από το ηλιακό φως. Το EtBr είναι ισχυρό μεταλλαξογόνο και καρκινογόνο οπότε χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση του. Απαραίτητη προφύλαξη, εκτός από τα γάντια είναι η σχολαστική πλύση όλων των σκευών που χρησιμοποιήθηκαν ή ήρθαν σε επαφή με το αιθίδιο.

