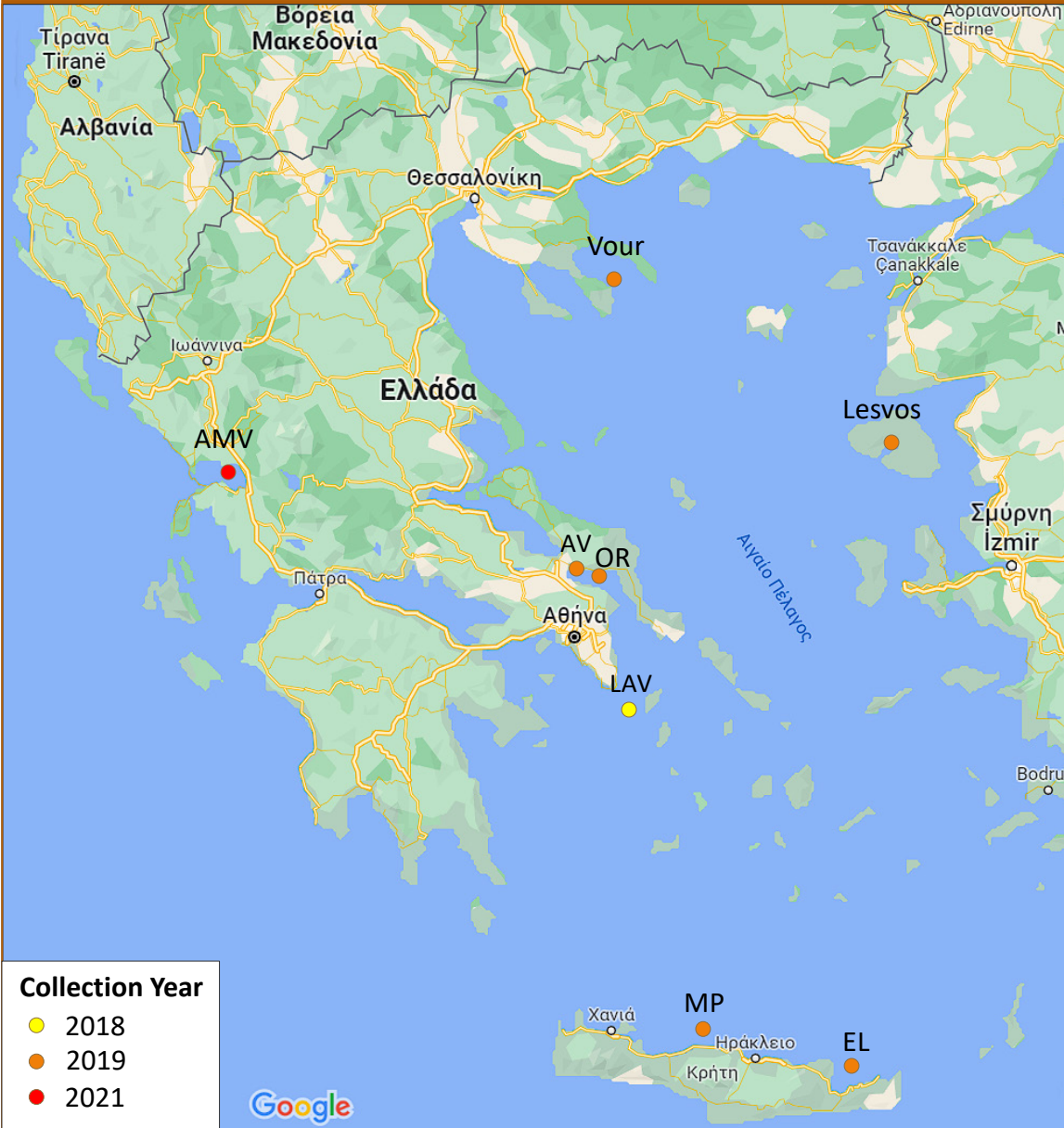


Εισαγωγή

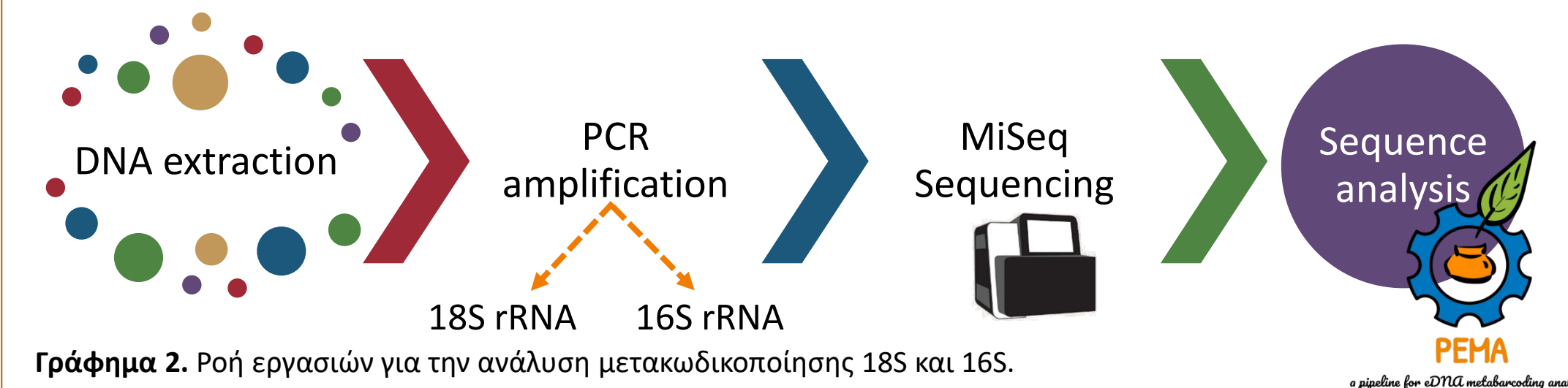
Η πίννα η ευγενής (*Pinna nobilis*) είναι το μεγαλύτερο ενδημικό δίθυρο μαλάκιο της Μεσογείου και είναι αυστηρώς προστατευόμενο είδος που περιλαμβάνεται στο Παράρτημα II της Σύμβασης της Βαρκελώνης, στο Προεδρικό Διάταγμα 67/1981 και στο Παράρτημα IV της Οδηγίας 92/43/ΕΟΚ. Το 2016 παρατηρήθηκε μαζική θνησιμότητα σε πληθυσμούς *P. nobilis* στην Ισπανία και μέχρι το 2019 το φαινόμενο είχε εξαπλωθεί στην Ιταλία, τη Γαλλία και την Ελλάδα. Έως το 2021 αναφέρθηκαν επίσης θνησιμότητες στις κροατικές ακτές της Αδριατικής και στη Τουρκία. Για το φαινόμενο κατηγορείται το πρώτιστο *Haplosporidium pinnae*, ένα ειδοειδικό παράσιτο της πίννας, ακτινοβακτήρια του γένους *Mycobacterium* και το πρωτεοβακτήριο *Vibrio mediterranei*, τα οποία έχουν εντοπιστεί ιστολογικά, ή και μοριακά σε ασθενείς ή πρόσφατα νεκρές πίννες.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν (α) η αξιολόγηση της κατάστασης των εναπομενόντων πληθυσμών στην Ελλάδα και ο προσδιορισμός των αιτιών θνησιμότητας της πίννας στην Ελλάδα, (β) η διερεύνηση της ύπαρξης πιθανού ενδιάμεσου ξενιστή ή φορέα του *H. pinnae* σε άλλους βενθικούς οργανισμούς, με έμφαση σε δίθυρα μαλάκια και (γ) η μελέτη του συνολικού ευκαρυωτικού και προκαρυωτικού μικροβιώματος της πίννας, για να εντοπιστούν άλλα πιθανά ευκαιριακά παθογόνα που συμβάλλουν στη θνησιμότητα του είδους.

Υλικά και Μέθοδοι



Γράφημα 1. Τοποθεσίες δειγματοληψίας και έτος συλλογής.

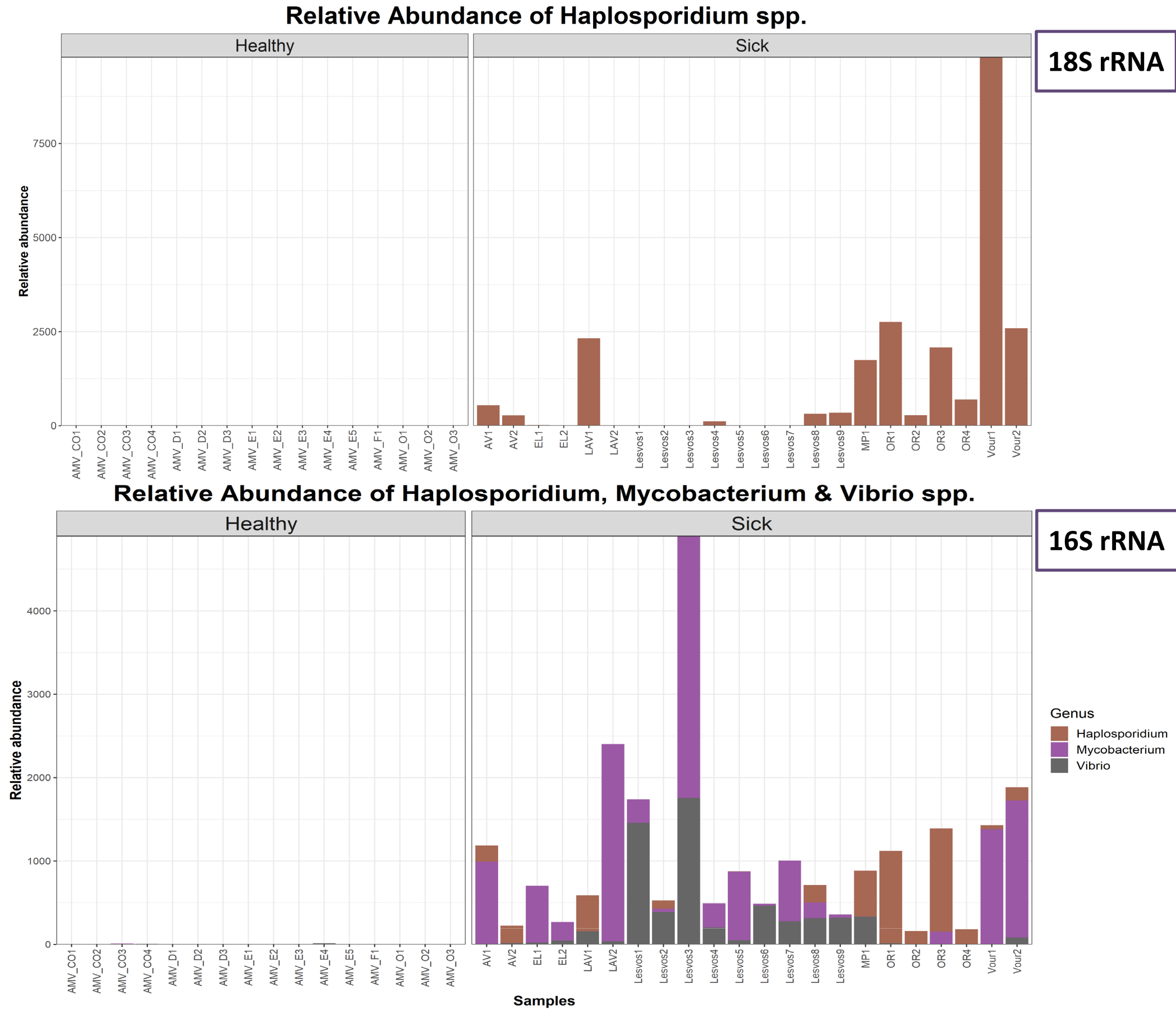


Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από διαφορετικούς ιστούς και έγιναν:

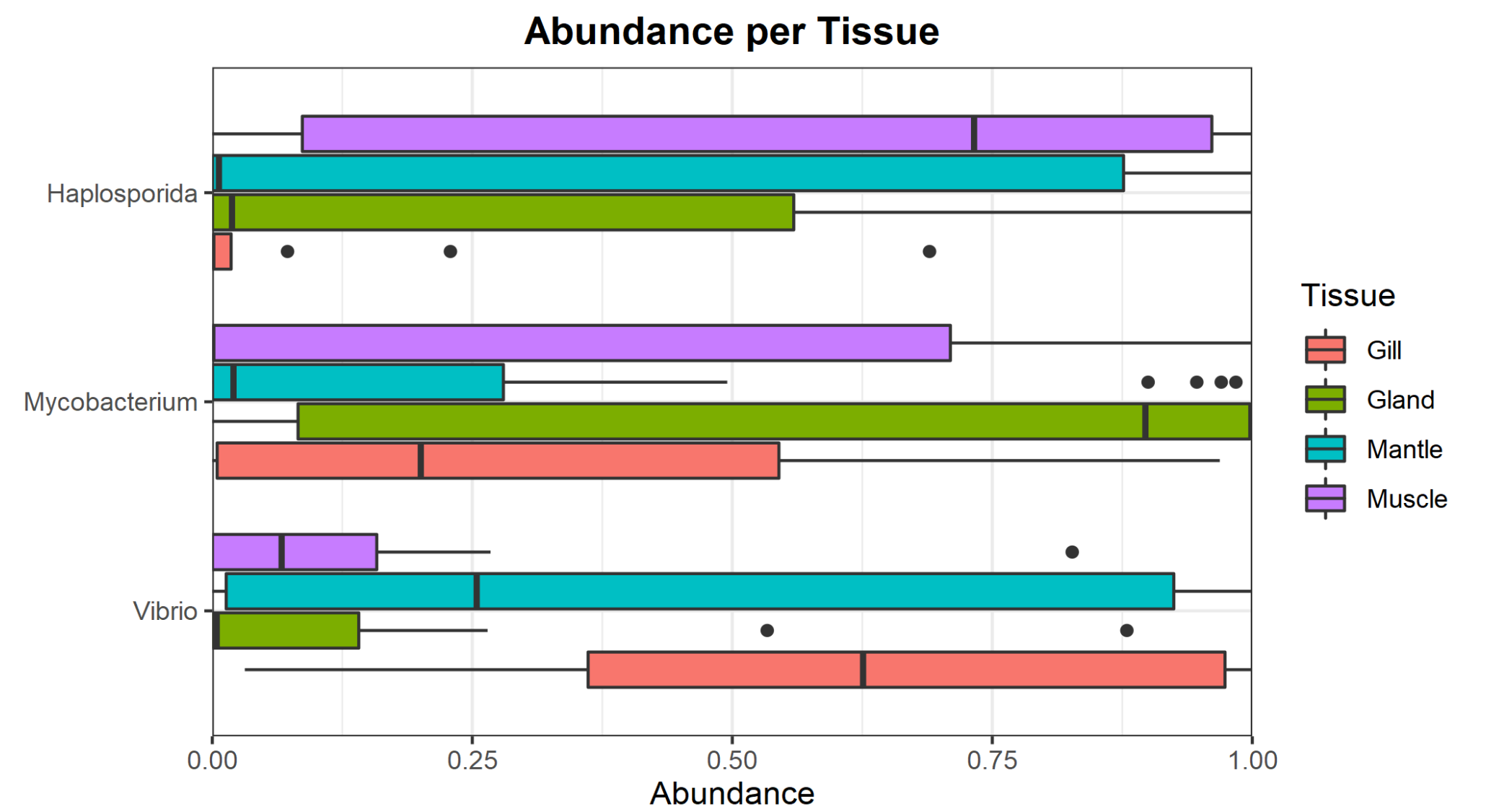
- PCR για το γονίδιο του 18S rRNA του *Haplosporidium pinnae*.
- PCR για το γονίδιο του 16S rRNA *Mycobacterium* spp. και Sanger sequencing των προϊόντων.
- Ανάλυση μετακωδικοποίησης των γονιδίων rRNA 18S και 16S για προσδιορισμό του μικροβιώματος στους διαφορετικούς πληθυσμούς.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μετακωδικοποίησης μελετήθηκαν με τη χρήση των πακέτων Phyloseq και MicrobiomeMarker στην R (v. 4.1.3) και έγινε ανάλυση LEfSe για τη σύγκριση του μικροβιώματος υγιών-ασθενών ατόμων

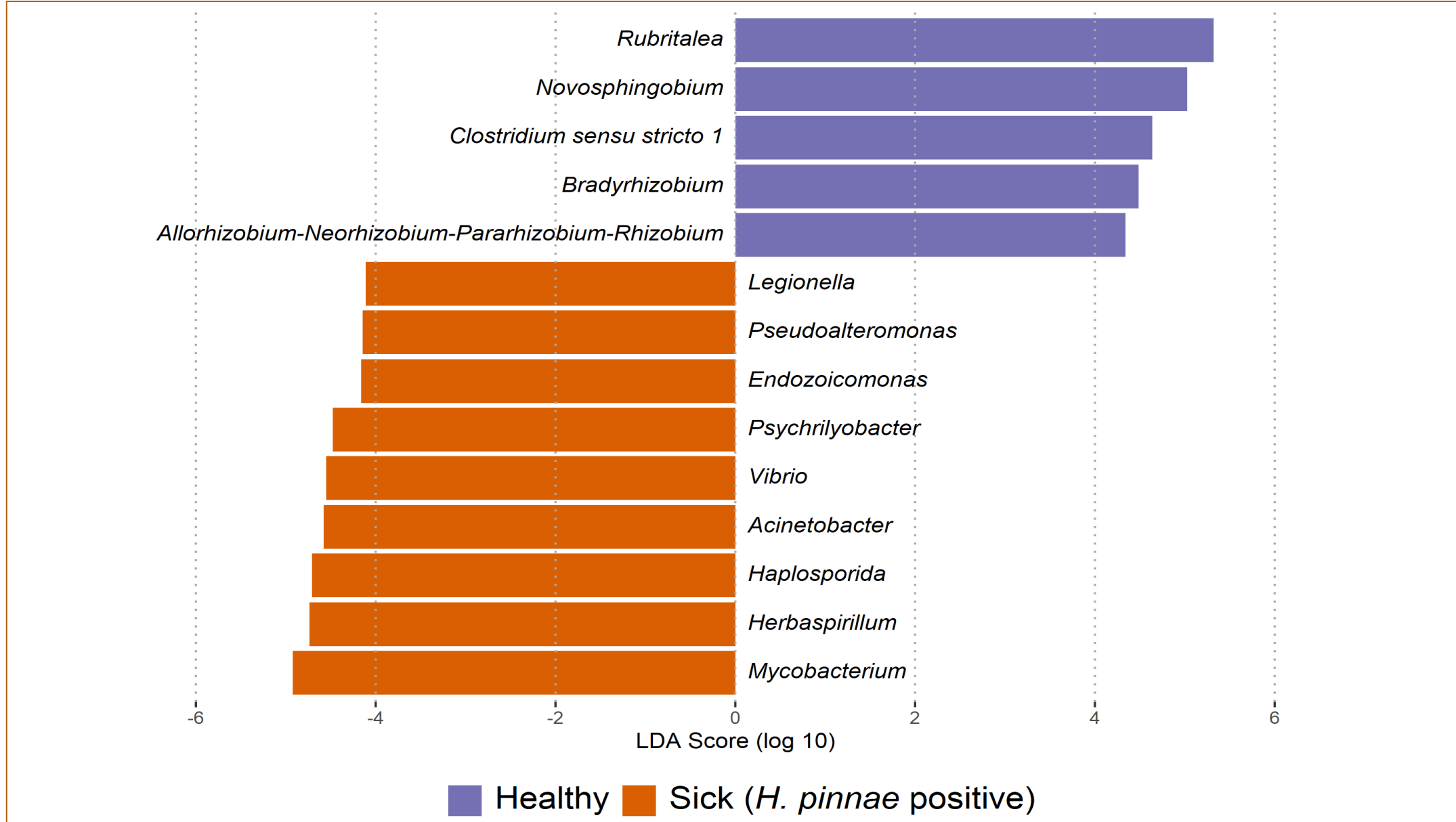
Αποτελέσματα



Γράφημα 3. Η συγκέντρωση παθογόνων (*H. pinnae*, *Mycobacterium* spp., *Vibrio* spp.) τις υγιείς πίννες (Αμβρακικού) και στις ασθενείς πίννες (θετικές στο *H. pinnae*). Επιτολασμός: *H. pinnae* 0% στις υγιείς/95% στις ασθενείς, *Mycobacterium* spp. 19% στις υγιείς/86% στις ασθενείς, *Vibrio* spp. 50% στις υγιείς/100% στις ασθενείς.



Γράφημα 4. Σχετική αφθονία παθογόνων ανά ιστό στις ασθενείς πίννες (θετικές στο *H. pinnae*). Muscle-Mantle, $P = 0.028$, *Mycobacterium* spp.: Gland-Mantle, $P = 0.009$, *Vibrio* spp.: Gill-Gland, $P < 0.001$, Gill-Muscle. $P = 0.007$, Mantle-Gland, $P = 0.01$



Γράφημα 5. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης LEfSe για τα γένη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ υγιών και ασθενών ατόμων βάσει του τεστ Kruskal-Wallis με $p < 0.05$, με $LDA < -4$ και $LDA > 4$ (πιο άφθονα στα ασθενή και υγιή αντίστοιχα)

Συζήτηση και Συμπεράσματα

- Ο πληθυσμός του Αμβρακικού ήταν αρνητικός στο *H. pinnae* και τα *Mycobacterium* και *Vibrio* spp. εντοπίστηκαν σε πολύ μικρές αφθονίες.
- Οι υπόλοιπες πίννες ήταν προσβεβλημένες από *H. pinnae* και σχεδόν σε όλες υπήρχε ταυτόχρονη παρουσία *Mycobacterium* spp. ή/και *Vibrio* spp., όμοια με πληθυσμούς της Ισπανίας, Ιταλίας, Κροατίας και Τουρκίας.
 - Τα *Mycobacterium* έφεραν μεγαλύτερη ομοιότητα με αυτά του συμπλέγματος *M. simae*.
 - Τα πιο άφθονα *Vibrio* spp. άνηκαν στους κλάδους Splendidus ή Harveyi, ενώ το *V. mediterranei* ήταν σπανιότερο ASV.
- Κύριο αίτιο του φαινομένου θεωρείται το *H. pinnae*, το οποίο απουσίαζε πλήρως από τον υγιή πληθυσμό, ενώ τα *Mycobacterium* και *Vibrio* μάλλον αποτελούν ευκαιριακά παθογόνα που συμβάλλουν στη θνησιμότητα μετά την αρχική προσβολή και καταπόνηση του οργανισμού της πίννας από το *H. pinnae*.
- Οι άλλοι υδρόβιοι οργανισμοί ήταν αρνητικοί στο *H. pinnae*. Δεν υπάρχει ένδειξη ότι ο κύκλος ζωής του παράσιτου περιλαμβάνει ενδιάμεσους ξενιστές.
- Το μικροβίωμα μεταξύ υγιών και ασθενών πιννών διέφερε στατιστικά σημαντικά και παρατηρήθηκαν πιθανά γένη-βιοδείκτες, όπως και σε άλλα δίθυρα (Richard *et al.*, 2021).
 - Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το *Endozoicomonas* spp., γένος παρών μόνο στις ασθενείς πίννες και προκαλλεί μαζικές θνησιμότητες σε άλλα είδη.
- Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη που συγκρίνει το ευκαρυωτικό και προκαρυωτικό μικροβίωμα μεταξύ υγιών και ασθενών πιννών.
- Ο πληθυσμός του Αμβρακικού αποτελεί νέα καταγραφή και τον μοναδικό υγιή πληθυσμό αυτού του μεγέθους ($n > 100$) από την έναρξη του φαινομένου μαζικής θνησιμότητας το 2017.

Αναφορές

1. Andree, K. B. et al. (2021a) 'Vibrio mediterranei, a potential emerging pathogen of marine fauna: investigation of pathogenicity using a bacterial challenge in Pinna nobilis and development of a species-specific PCR', Journal of Applied Microbiology, 130(2). doi: 10.1111/jam.14756.
2. Carella, F. et al. (2020) 'In the Wake of the Ongoing Mass Mortality Events: Co-occurrence of Mycobacterium, Haplosporidium and Other Pathogens in Pinna nobilis Collected in Italy and Spain (Mediterranean Sea)', Frontiers in Marine Science, 7. doi: 10.3389/fmars.2020.00048.
3. Catanese, G. et al. (2018) 'Haplosporidium pinnae sp. nov., a haplosporidan parasite associated with mass mortalities of the fan mussel, Pinna nobilis, in the Western Mediterranean Sea', Journal of Invertebrate Pathology, 157(July), pp. 9–24. doi: 10.1016/j.jip.2018.07.006.
4. Grau, A. et al. (2021) 'Wide-geographic and long-term analysis of the role of pathogens in the decline of Pinna nobilis to critically endangered species', in Prep, 9(March), pp. 1–20. doi: 10.3389/fmars.2022.66640.
5. Katharios, P. et al. (2015) 'Environmental marine pathogen isolation using mesocosm culture of sharpnout seabream: Striking genomic and morphological features of novel Endozoicomonas sp.', Scientific Reports, 5(August), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep17609.
6. Künlü, I. E. et al. (2021a) 'Mass mortality in endangered fan mussels Pinna nobilis (Linnaeus 1758) caused by co-infection of Haplosporidium pinnae and multiple Vibrio infection in Çanakkale Strait, Turkey', Biomarkers, 26(5), pp. 450–461. doi: 10.1080/1354750X.2021.1910344.
7. Pavlinec, Ž. et al. (2020) 'Assessment of predominant bacteria in noble pen shell (Pinna nobilis) collected in the Eastern Adriatic Sea', Environmental Monitoring and Assessment, 192(9). doi: 10.1007/s10661-020-08541-6.
8. Rabaoui, L. et al. (2009) 'Associated fauna of the fan shell Pinna nobilis (Mollusca: Bivalvia) in the northern and eastern Tunisian coasts', Scientia Marina, 73(1). doi: 10.3989/scimar.2009.73n1129.
9. Richard, J. C. et al. (2021) 'Mussel mass mortality and the microbiome: Evidence for shifts in the bacterial microbiome of a declining freshwater bivalve', Microorganisms, 9(9). doi: 10.3390/microorganisms9091976.
10. Zafeiropoulos, H. et al. (2020) 'PEMA: A flexible Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding Analysis of the 16S/18S ribosomal RNA, ITS, and COI marker genes', GigaScience, 9(3), pp. 1–12. doi: 10.1093/gigascience/giaa022.