Μελέτη του φαινομένου μαζικής θνησιμότητας του είδους *Pinna nobilis*

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Ιόλη Μουτσοπούλου

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2022

Investigation of the mass mortality event of the species *Pinna nobilis*

MSc Thesis dissertation

Ioli Moutsopoulou

HERAKLION 2022

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη vi

Abstract vii

Ευχαριστίες viii

1. Εισαγωγή 1

1.1. Είδος και οικολογία 1

1.2. Καθεστώς Προστασίας 1

1.3. Περιστατικά Μαζικής Θνησιμότητας (Mass Mortality Events) 2

1.3.1. ΜΜΕ σε Δίθυρα 3

1.3.2. ΜΜΕ στην *Pinna nobilis* 4

1.3.3. Παθογόνα Υπεύθυνα για το ΜΜΕ στις Πίννες 5

1.3.4. ΜΜΕ Πίννας και άλλοι οργανισμοί 6

1.4. Σκοπός 7

2. Υλικά και Μέθοδοι 8

2.1. Πειραματικός Σχεδιασμός 8

2.2. Περιοχές Δειγματοληψίας 8

2.3. Μέθοδοι Δειγματοληψίας 10

2.4. Απομόνωση Γενετικού Υλικού 11

2.5. Διερεύνηση Παρουσίας *Haplosporidium pinnae* 11

2.6. Διερεύνηση Παρουσίας *Mycobacterium* spp. 12

2.6.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) 12

2.6.2. Ηλεκτροφόρηση και Καθαρισμός Προϊόντων PCR 13

2.6.3. Αλληλούχιση κατά Sanger 13

2.6.4. Ανάλυση Αλληλουχιών 14

2.7. Μετακωδικοποίηση των γονιδίων 18S και 16S rRNA 14

2.7.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) 14

2.7.2. Προετοιμασία Pool και αλληλούχιση στην πλατφόρμα Illumina MiSeq 15

2.7.3. Ανάλυση Δεδομένων Αλληλούχισης 16
2.7.4. Δείκτες Ποικιλότητας και Σχετικές Αφθονίες 17
2.7.5. Σύγκριση Αφθονίας *H. pinnae, Mycobaceterium* spp. και *Vibrio* spp. μεταξύ Ιστών 18
2.7.6. Σύγκριση Μικροβιώματος Υγιών και Ασθενών Ατόμων 18
3. Αποτελέσματα 20
3.1. Μοριακός Εντοπισμός Παθογόνων Οργανισμών 20
3.1.1. Παρουσία του *H. pinnae* σε είδη εκτός του *P. nobilis* 20
3.1.2. Παρουσία του *H. pinnae* σε άτομα *P. nobilis* 20
3.1.3. Παρουσία *Mycobacterium* spp. σε άτομα *P. nobilis* 20
3.2. Ανάλυση Μετακωδικοποίησης 23
3.2.1. Αφθονίες και Δείκτες Ποικιλότητας 18s rRNA 23
3.2.2. Αφθονίες και Δείκτες Ποικιλότητας 16s rRNA 24
3.2.3. Παθογόνα Σχετιζόμενα με το ΜΜΕ της *P. nobilis* 26
3.2.4. Σύγκριση Μικροβιώματος Υγιών και Ασθενών *P. nobilis* 31
4. Συζήτηση 37
4.1. Κατάσταση Ελληνικών Πληθυσμών 37
4.2. Πιθανοί Ενδιάμεσοι Ξενιστές και Κύκλος Ζωής *H. pinnae* 38
4.3. Σύγκριση μικροβιώματος 38
4.4. Αίτια Θνησιμότητας 41
4.5. Προοπτική Πληθυσμού Αμβρακικού και Συστάσεις 44
Παράρτημα 9
Α) Πρωτόκολλο εξαγωγής DNA 9
Β) Πρωτόκολλο PCR για *Haplosporidium pinnae* και *Mycobacterium sp.* 9
Γ) Πρωτόκολλο Καθαρισμού Προϊόντων PCR με το κιτ QIAquick: 10
Δ) Πρωτόκολλο Αντίδρασης Αλληλούχισης και Καθαρισμός της Αντίδρασης 11
Ε) Πρωτόκολλο PCR για 18s και 16S rRNA 12
ΣΤ) Πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων PCR με μαγνητικά beads 14

Ζ) Accession no. Αλληλουχιών 14
Η) Παράμετροι του PEMA 15
Θ) Στοιχεία Δειγμάτων 16
Βιβλιογραφία 17

Περίληψη

Η πίννα η ευγενής (*Pinna nobilis*) είναι ενδημικό είδος και το μεγαλύτερο δίθυρο μαλάκιο της Μεσογείου, φτάνει έως και 120 εκ. μήκος και απαντάται σε μαλακό υπόστρωμα. Τα τελευταία χρόνια ο πληθυσμός της πίννας έχει μειωθεί δραματικά, ξεκινώντας με μαζικές θνησιμότητες πληθυσμών στην Ισπανία και πλέον σε όλη τη Μεσόγειο, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Το φαινόμενο μαζικής θνησιμότητας (mass mortality event – MME) έχει αποδοθεί, μεταξύ άλλων, σε μια παρασιτική νόσο από το πρωτόζωο *Haplosporidium pinnae*, το οποίο έχει εντοπιστεί ιστολογικά και μοριακά σε ιστούς ασθενών ατόμων. Η ένταση του φαινομένου οδήγησε στην αλλαγή της κατάστασης του είδους από απειλούμενο σε κρισίμως κινδυνεύον από την IUCN το Δεκέμβριο του 2019. Στην παρούσα μελέτη έγινε μοριακή ανάλυση για την παρουσία του *H. pinnae* σε 16 άτομα *P. nobilis* από ένα νέο πληθυσμό στον Αμβρακικό κόλπο και 26 βενθικούς οργανισμούς από περιοχές στις οποίες ήταν γνωστή η παρουσία της πίννας, για να γίνει αξιολόγηση της κατάστασης του πληθυσμού και διερεύνηση της ύπαρξης ενδιάμεσων ξενιστών για το *H. pinnae*. Επιπλέον, έγινε μοριακή ανάλυση για το βακτήριο *Mycobacterium* sp. σε 38 άτομα *P. nobilis* και αναλύσεις μετακωδικοποίησης για τα γονίδια 18S και 16S rRNA για να ελεγχθεί η παρουσία του παράσιτου *H. pinnae* και των βακτηρίων *Mycobacterium* spp. και *Vibrio* spp., αλλά και για τη σύγκριση του ευκαρυωτικού και προκαρυωτικού μικροβιώματος ενός φαινομενικά υγειούς πληθυσμού με το μικροβίωμα ασθενών πληθυσμών. Κανένας βενθικός οργανισμός πλην της πίννας δεν βρέθηκε θετικός στο *H.* pinnae και τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι ο πληθυσμός του Αμβρακικού ήταν υγιής (αρνητικός), ενώ οι υπόλοιποι πληθυσμοί ήταν ασθενείς και θετικοί για *H. pinnae*, *Mycobacterium* spp. και *Vibrio* spp. Τα περισσότερα ASVs *Mycobacterium* spp. ταυτίστηκαν με είδη του συμπλέγματος *M. simiae* και τα πιο άφθονα ASVs *Vibrio* spp. ανήκαν στον κλάδο Splendidus, ωστόσο το *V. mediterranei* εντοπίστηκε σε λίγα αντίγραφα μόνο σε δύο περιοχές. Η ανάλυση LEfSe υπέδειξε 143 γένη-δείκτες των οποίων η αφθονία διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στα υγιή και ασθενή άτομα. Πιο άφθονα στις υγιείς πίννες ήταν τα γένη *Rubritalea, Novosphingobium, Bradyrhizobium* και στα ασθενή τα *Mycobacterium, Haplosporidium* και *Vibrio*, τα οποία είναι γνωστά παθογόνα της πίννας, αλλά και λοιποί οργανισμοί που έχουν ενδεχομένως ευκαιριακά παθογόνο δράση, όπως τα *Endozoicomonas*, *Psychrilyobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudoalteromonas* και *Legionella.* Συνολικά, τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τον ρόλο του *H. pinnae* ως πρωταρχικό παθογόνο, το οποίο προκαλεί διαταραχή του μικροβιώματος και την επακόλουθη αύξηση ευκαιριακών παθογόνων που συντελούν στη θνησιμότητα της πίννας.

Abstract

Pinna nobilis, also known as the noble pen shell, is an endemic fan mussel, the largest bivalve mollusk of the Mediterranean Sea, reaching up to 120 cm length, and it is found in a range of depths between 0.5 and 60 m in soft substrate and seagrass meadows. During the last years, the pen shell populations have decreased drastically, beginning from Spain, and spreading to the rest of the Mediterranean basin, including Greece. The mass mortality event (MME) has been attributed, among other causes, to a parasitic disease caused by the novel protozoan *Haplosporidium pinnae*, which has been identified with histology and molecular techniques in the tissues of sick individuals. The magnitude of the phenomenon led to the change of the fan mussel's status to Critically Endangered by the IUCN in December 2019. In this study, a PCR was conducted to identify the presence of the parasite in 16 *P. nobilis* individuals from Amvrakikos Gulf and in 26 benthic metazoans from locations where *P. nobilis* was known to exist, to assess the new population's health condition and to investigate the existence of intermediate hosts for *H. pinnae*. In addition to that, PCR for *Mycobacterium* was conducted in 38 *P. nobilis* individuals. Lastly, a metabarcoding analysis for the 18S rRNA and 16S rRNA genes was conducted to investigate the presence of *H. pinnae, Mycobacterium* and *Vibrio* spp., but also to compare the eukaryotic and prokaryotic microbiome of a presumably healthy population and that of affected (sick) populations. None of the benthic organisms, except for the pen shell, didn't give a positive signal for *H. pinnae.* The results of the PCR and the metabarcoding analysis confirmed that the pen shells from Amvrakikos Gulf were healthy (*H. pinnae* negative), but the other populations were sick and positive to *H. pinnae, Mycobacterium* and *Vibrio* spp. The majority of the ASVs of *Mycobacterium* spp. were identified as species of the *M. simiae* complex and the most abundant ASVs of *Vibrio* spp. belonged to the Splendidus clade, while *V. mediterranei* was identified in few copies in only two locations. LEfSe analysis pointed out 143 biomarker genera, which differed, statistically significantly, in abundance between healthy and sick individuals. The most abundant genera of healthy pen shells included *Rubritalea, Novosphingobium, Bradyrhizobium*, while in sick pen shells the genera *Mycobacterium, Haplosporidium* και *Vibrio* stood out, which are well known pathogens, but also other, potentially opportunistic pathogens, like *Endozoicomonas*, *Psychrilyobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudoalteromonas* and *Legionella.* To conclude, this study's results confirm the role of *H. pinnae* as the initial disease factor, which causes a disruption of the microbiome and the subsequent increase of opportunistic pathogens, which eventually lead to the pen shell mass mortality.

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί, τουλάχιστον στη τελική μορφή της και στον ζητούμενο χρόνο, δίχως τη συμβολή πολλών ανθρώπων.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου, ερευνήτρια Χριστίνα Παυλούδη, η οποία με εμπιστεύτηκε για να αναλάβω το συγκεκριμένο κομμάτι της έρευνας για τις πίννες, με δίδαξε με ιδιαίτερη υπομονή τις απαιτούμενες τεχνικές στο εργαστήριο και με καθοδήγησε κατά τη συγγραφή του κειμένου.

Στη συνέχεια, ένα θερμό ευχαριστώ οφείλω στον ερευνητή Παντελή Καθάριο, ο οποίος άκουσε την επιθυμία μου να ασχοληθώ με παράσιτα, βρήκε το ιδανικό θέμα για εμένα, δέχτηκε να γίνει επιβλέποντας καθηγητής μου και με καθοδήγησε στο κομμάτι της μελέτης των παθογόνων οργανισμών. Επίσης ευχαριστώ τον καθηγητή Μανώλη Λαδουκάκη και τον ερευνητή Γιώργο Κωτούλα για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική τριμελή επιτροπή και τον χρόνο που επένδυσαν στην εργασία μου.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον ερευνητή Γιάννη Ίσσαρη, ο οποίος παρατήρησε πρώτος τη μαζική θνησιμότητα *P. nobilis* στις ελληνικές θάλασσες, γιατί χωρίς εκείνον το θέμα της εργασίας και τα δείγματα μάλλον δεν θα υπήρχαν, και τη Γεωργία Σαραφίδου για τις συμβουλές της στο εργαστήριο και τη συγγραφή της πτυχιακής. Επιπλέον, ένα τεράστιο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στους τεχνικούς του Εργαστηρίου Γενετικής για τη πολύτιμη υποστήριξη τους και την ευχάριστη παρέα τους. Ευχαριστώ τη Βασιλική Τερζόγλου, την Κατερίνα Οικονομάκη και την Ειρήνη-Σλάβκα Πολόβινα, που μοιράστηκαν τις γνώσεις τους, ιδίως στα τελευταία βήματα μου στο εργαστήριο και τον Jon Bent Kristoffersen, χωρίς τον οποίον δεν θα ήταν εφικτή η έγκαιρη αλληλούχιση των δειγμάτων.

Ευχαριστώ τα αγαπημένα μου πρόσωπα, Ιορδάνη Μαγίοπουλο, Μαρία Γιαννουλάκη, Γεωργία Τζουγανάτου, Ευτυχία Παρισσοπούλου και Γεωργία Τσιλινγγίρογλου, που με ανέχτηκαν όταν μιλούσα ασταμάτητα για τις πίννες και με στήριξαν όταν ήμουν εξαντλημένη και απογοητευμένη με τη πρόοδο μου.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Κάτια και Αλέξη, και στον αδερφό μου, Ορφέα, για τη στήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

1. Εισαγωγή

1.1. Είδος και οικολογία

Η πίννα η ευγενής (*Pinna nobilis*) είναι το μεγαλύτερο ενδημικό δίθυρο μαλάκιο της Μεσογείου. Ανήκει στην οικογένεια Pinnidae, που χωρίζεται σε τρία γένη βενταλιόμορφων δίθυρων (fan mussels), *Pinna*, *Streptopinna* και *Atrina.* Απαντάται σε μαλακά υποστρώματα και σε λιβάδια φανερόγαμων (*Posidonia oceanica*, *Cymodocea nodosa*) σε μικρά βάθη από 0.5 έως 60 m (Vázquez-Luis *et al.*, 2017). Φτάνει τα 120 cm μήκος, με ένα τμήμα του οστράκου θαμμένο στο υπόστρωμα και στηριζόμενο από τον ανεπτυγμένο του βύσσο, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία πυκνών φανερόγαμων το προστατεύει από έντονους κυματισμούς του νερού (Butler, Vicente and Gaulejac, 1993; Hendriks *et al.*, 2011).

Η πίννα επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα θαλάσσια οικοσυστήματα. Τρέφεται με διήθηση και λόγω του μεγέθους της φιλτράρει εξαιρετικά μεγάλους όγκους θαλασσινού νερού, αυξάνοντας τη διαύγεια του. Παράλληλα, ο βύσσος της σταθεροποιεί τα χαλαρά υποστρώματα, το κέλυφος της παρέχει επιφάνεια εγκατάστασης ξένων οργανισμών, αυξάνοντας τη βιοποικιλότητα (Rabaoui *et al.*, 2009; Catanese *et al.*, 2018), και σχετίζεται με δύο συμβιωτικά καρκινοειδή, τα *Pontonia pinnophylax* and *Nepinnotheres pinnotheres* (Rabaoui, Zouari and Hassine, 2008).

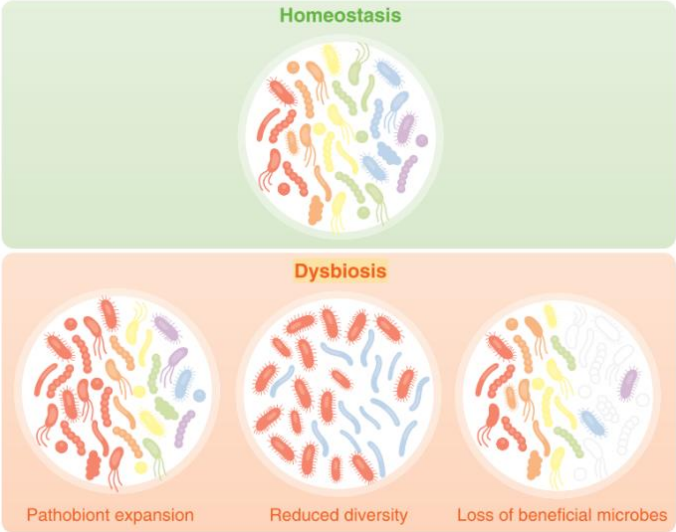
1.2. Καθεστώς Προστασίας

Οι πληθυσμοί της πίννας έχουν δεχτεί σημαντική μείωση, κυρίως από ανθρωπογενείς παράγοντες. Κίνδυνοι του είδους στο παρελθόν ήταν η παράνομη αλιεία τους για τον βύσσο όπου χρησιμοποιούνταν ως ανθεκτικό νήμα (μετάξι της θάλασσας) και αργότερα για το ίδιο το όστρακο προς κατανάλωση. Ερασιτεχνικές ή εμπορικές δραστηριότητες μπορούν να φθείρουν τα όστρακα ή να καταστρέψουν τα ενδιαιτήματα τους (Catanese et al., 2018; Deudero et al., 2015; Öndes et al., 2020; Vazquez-Luis et al., 2014). Λόγω της τρωτότητας του είδους, είναι αυστηρώς προστατευόμενο και περιλαμβάνεται στο Παράρτημα ΙΙ της Σύμβασης της Βαρκελώνης, στο Προεδρικό Διάταγμα 67/1981 και στο Παράρτημα IV της Οδηγίας 92/43/ΕΟΚ. Εξαιτίας της σοβαρότητας του φαινομένου μαζικής θνησιμότητας (βλ. 1.3.2), η κατάταξη του είδους στην IUCN άλλαξε από τρωτό (vulnerable) σε κρισίμως κινδυνεύον (critically endangered) το 2019.

1.3. Περιστατικά Μαζικής Θνησιμότητας (Mass Mortality Events)

Ως περιστατικά μαζικής θνησιμότητας (Mass Mortality Events – MME) ορίζονται οι ξαφνικοί, μαζικοί θάνατοι πληθυσμών προκαλούμενοι από γνωστά ή άγνωστα αίτια. Διαφέρουν από τη θνησιμότητα που σχετίζεται με την ηλικία ή την τρωτότητα σε συγκεκριμένα ηλικιακά στάδια και μπορούν γρήγορα (αναλογικά με τη διάρκεια γενεών του οργανισμού) να προκαλέσουν δραστική μείωση του πληθυσμού ανεξαρτήτως ηλικιακής ομάδας (Fey *et al.*, 2015).

Τα παθογόνα μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες βάσει τις συνθήκες υπό τις οποίες προκαλούν βλάβη στους ξενιστές τους: α) υποχρεωτικά, β) προαιρετικά και γ) ευκαιριακά. Επιπλέον μπορεί να έχουν διαφορετικά επίπεδα εξειδίκευσης, δηλαδή να είναι γενικευμένα (generalists) έως και εξειδικευμένα αποκλειστικά σε ένα είδος (ειδοειδικά - species specific). Τα υποχρεωτικά παθογόνα έχουν συγκεκριμένες απαιτήσεις σε ξενιστές και συνθήκες μετάδοσης και δε μπορούν να πολλαπλασιαστούν χωρίς τον κατάλληλο ξενιστή. Τα προαιρετικά παθογόνα είναι ικανά να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν και εκτός του ξενιστή τους, έχουν μεγαλύτερο εύρος ξενιστών και ο τρόπος όπου προκαλούν ασθένεια μπορεί να διαφοροποιείται περισσότερο, δεδομένου ότι δεν είναι πάντα παθογόνα. Τέλος, τα ευκαιριακά παθογόνα είναι ικανά να επιβιώσουν εκτός ξενιστή, μπορεί να υπάρχουν είτε στο περιβάλλον ή εξίσου σε υγιείς και ασθενείς ξενιστές, αλλά προκαλούν παθογένεια μόνο υπό συγκεκριμένες συνθήκες, όπως ένα εξασθενημένο ανοσοποιητικό (Burge *et. al.*, 2013; Scheffer, 1991).



Εικόνα 1: Σχηματική εικόνα των τριών τύπων δυσβίωσης όπως ορίζονται από τους Petersen & Round (2014).

Πηγή: Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. Cellular microbiology, 16(7), 1024–1033. https://doi.org/10.1111/cmi.12308

Η συμβολή ευκαιριακών παθογόνων, τα οποία ενδέχεται να ευθύνονται για τη θνησιμότητα των οργανισμών, θα μπορούσε να εξηγηθεί με την έννοια της δυσβίωσης. Η δυσβίωση είναι μια έννοια όπου εμφανίστηκε αρχικά για να εξηγήσει ανθρώπινες χρόνιες νόσους αλλά έχει εισαχθεί και ως πιθανή εξήγηση για ασθένειες υδρόβιων οργανισμών (Egan and Gardiner, 2016). Οι Petersen & Round (2014) αναφέρουν τρεις τύπους δυσβίωσης οι οποίοι μπορεί να συμβαίνουν ταυτόχρονα ή μεμονωμένα: α) την αύξηση εν δυνάμει παθογόνων ή βλαβερών οργανισμών (pathobionts), β) την απώλεια ωφέλιμων

μικροοργανισμών και γ) την συνολική απώλεια μικροβιακής ποικιλότητας.

Όταν γίνονται αντιληπτά ΜΜΕ σε υδρόβιους οργανισμούς, το φαινόμενο είναι συνήθως ήδη εκτεταμένο και η ζημιά που είχε προκληθεί αρχικά δεν είναι ορατή. Συνεπώς, αποτελεί μια πρόκληση να διακριθεί αν η εικόνα του ασθενούς οργανισμού είναι αποτέλεσμα του αρχικού παθογόνου, δράσης ευκαιριακών παθογόνων που εμφανίστηκαν λόγω δυσβίωσης, σαπροφυτικών οργανισμών που εγκαταστάθηκαν στους ημιθανείς ή νεκρούς πλέον οργανισμούς, ή αν εξαρχής η ασθένεια ήταν απόρροια ταυτόχρονης μόλυνσης από πολλά παθογόνα (Egan and Gardiner, 2016). Ομοίως και στην περίπτωση της *P. nobilis*, δεν υπάρχει ομόφωνη άποψη για την ακριβή πορεία της ασθένειας στον οργανισμό της πίννας και τη διαδοχή των παθογόνων.

1.3.1. ΜΜΕ σε Δίθυρα

Ήδη από το 1920, υπάρχουν καταγραφές περιστατικών μαζικής θνησιμότητας σε δίθυρα μαλάκια, σε διάφορα είδη γλυκού και θαλασσινού νερού. Ακραία περιβαλλοντικά φαινόμενα έχουν κατηγορηθεί για μαζικές θνησιμότητες, με κύρια αίτια την ανοξία λόγω υψηλών θερμοκρασιών, ή τις ανθίσεις φυτοπλαγκτού (algal blooms) (Gambi *et al.*, 2010; Kubota *et al.*, 2021; Oosterhuis, Pardo and Ferreira-Rodríguez, 2021). Επιπροσθέτως, έχουν αναγνωριστεί πολυάριθμα παθογόνα δίθυρων, κάποια εξειδικευμένα σε έναν ξενιστή, ενώ άλλα μεταδίδονται και μεταξύ ειδών (Hine and Thorne, 2000; Renault and Novoa, 2004; Caceres-Martinez and Vasquez-Yeomans, 2008; Zannella *et al.*, 2017). Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στη βιβλιογραφία σε εκτρεφόμενα είδη με οικονομικό ενδιαφέρον, όπως στα *Crassostrea virginica, C. angulata* και *Ostrea edulis,* αν και έχουν καταγραφεί και μελετηθεί ΜΜΕ και σε άγρια είδη, όπως το *Actinonaias pectorosa.* Στον Πίνακα 1, φαίνονται επιγραμματικά ορισμένα είδη (πλην της *P. nobilis*) που έχουν γίνει υποκείμενα φαινομένων μαζικής θνησιμότητας τον τελευταίο αιώνα.

Τα δίθυρα μπορούν να προσβληθούν από διάφορες κατηγορίες παθογόνων οργανισμών, όπως από βακτήρια, πρώτιστα και ιούς, ενώ έχουν εντοπιστεί και παρασιτικά κωπήποδα και χαιτόγναθα (Leibovitz, 1990; Waser *et al.*, 2021). Απότομες, μαζικές θνησιμότητες έχουν καταγραφεί κυρίως από παράσιτα του κλάδου SAR του βασιλείου Protista, με κυριότερα γένη τα *Perkinsus*, *Haplosporidium*, *Bonamia* και *Marteilia* (Hine and Thorne, 2000), ενώ ασθένεια προκαλούν και γνωστά γένη βακτηρίων, όπως τα *Vibrio* spp. Ιδιαίτερα για τα *Vibrio* spp. υπάρχουν περιπτώσεις όπου δρουν ως πρωταρχικά παθογόνα, όπως στο δίθυρο *Perna viridis*, αλλά μπορούν να είναι και ευκαιριακά παθογόνα σε ήδη εξασθενημένους οργανισμούς, π.χ. παράλληλη προσβολή από *Vibrio* spp. του κλάδου Splendidus σε δίθυρα θετικά σε *Ostreid herpesvirus* 1 (OsHV-1) (Destoumieux-garzón *et al.*, 2021; Laith *et al.*, 2021).

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας παθογόνων που έχουν προκαλέσει τα πιο έντονα φαινόμενα μαζικής θνησιμότητας σε δίθυρα τον τελευταίο αιώνα, πότε προσβλήθηκαν, πού και από ποιο παθογόνο.

Είδος	Ομάδα Ενδιαφέροντος	Έτος	Τοποθεσία	Αίτια	Αναφορά
Crassostrea virginica	Εκτρεφόμενο	1920, 1948	ΗΠΑ	*Perkinsus marinus* (Dermo disease)	(Hine and Thorne, 2000; Caceres-Martinez and Vasquez-Yeomans, 2008)
		1952, 1959	ΗΠΑ	*Haplosporidium nelsoni* (MSX)	(Barber, Kanaley and Ford, 1991; Ford, Kanaley and Littlewood, 1993)
Crassostrea angulata	Εκτρεφόμενο	1968	Γαλλία	Gill Iridovirus	(Arzul and Carnegie, 2015)
Ostrea edulis	Εκτρεφόμενο	1949	Νορβηγία	*Mytilicola intestinalis*	(Leibovitz, 1990)
		1970	Γαλλία	*Marteilia refringens* (Aber disease)	(Caceres-Martinez and Vasquez-Yeomans, 2008)
		1979-1980	Ευρώπη	*Bonamia ostreae*	(Hudson and Hill, 1991)
Crassostrea gigas	Εκτρεφόμενο	2010-2015	Αυστραλία	Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1)	(Paul-Pont *et al.*, 2014; Cain *et al.*, 2021)
Actinonaias pectorosa	Ενδημικό	2016-σήμερα	ΗΠΑ	Clinch densovirus 1	(Richard *et al.*, 2021)

1.3.2. ΜΜΕ στην *Pinna nobilis*

Το φθινόπωρο του 2016 παρατηρήθηκε μαζική θνησιμότητα σε πληθυσμούς από πίννες σε πολλές περιοχές της νοτιοδυτικής Μεσογείου (Ισπανία) (Vázquez-Luis *et al.*, 2017). Μέχρι το 2018, το φαινόμενο εμφανίστηκε και σε άλλες περιοχές της Ισπανίας, στη βορειοδυτική Ιταλία και τις γαλλικές ακτές της Κορσικής (Catanese *et al.*, 2018). Το ίδιο έτος ξεκίνησαν ανεπίσημες αναφορές αυξημένων θανάτων στο Αιγαίο και με δειγματοληψία στη περιοχή της Λέσβου επιβεβαιώθηκε η θανάτωση του μεγαλύτερου μέρους των πληθυσμών του νησιού (Katsanevakis, 2019). Το 2019 είχαν επηρεαστεί όλοι οι γνωστοί πληθυσμοί της Ελλάδας (Zotou *et al.*, 2020) και θνησιμότητες υπήρχαν και στις κροατικές ακτές της Αδριατικής Θάλασσας (Šarić *et al.*, 2020). Το καλοκαίρι του 2020 καταγράφηκε 100% θνησιμότητα και στις τουρκικές ακτές του Αιγαίου (Öndes *et al.*, 2020), ενώ η θάλασσα του Μαρμαρά, όπου διατηρούσε μέχρι τότε φαινομενικά υγιή πληθυσμό, αναφέρθηκε ως πληγείσα το 2021 (CINAR *et al.*, 2021).

Πέντε χρόνια μετά την έναρξη του ΜΜΕ, απομένουν λίγες περιοχές με μικρούς, απομονωμένους πληθυσμούς ή μεμονωμένα φαινομενικά υγιή άτομα. Πρόκειται για την υπεράλμυρη λιμνοθάλασσα Mar Menor και το Δέλτα του Ebro στην Ισπανία (Giménez-Casalduero *et al.*, 2020), τις λιμνοθάλασσες Thau and Salses-Leucate στον Κόλπο του Leon, οι οποίες έχουν διατηρήσει το

90% του πληθυσμού τους, το Εθνικό Πάρκο Port-Cros στη Γαλλία όπου έχουν παρατηρηθεί οκτώ ζωντανά άτομα (García-March *et al.*, 2020; Ruitton and Lefebvre, 2021) και τη λιμνοθάλασσα Faro, στην Ιταλία όπου έχουν βρεθεί 18 ζωντανά άτομα (Donato *et al.*, 2021). Επίσης παρατηρήθηκαν τελευταία φορά το 2019 και 2020 μερικά ζωντανά, φαινομενικά υγιή άτομα στο εσωτερικό του Κόλπου της Καλλονής στη Λέσβο και τον Κόλπο του Λαγανά στη Ζάκυνθο (Zotou *et al.*, 2020).

Οι συγκεκριμένες περιοχές έχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Πρώτον, είναι λιμνοθάλασσες ή εκβολές ποταμών, οπότε περιορίζεται η ανταλλαγή νερού με την ανοιχτή θάλασσα από στενά περάσματα ή από τις κινήσεις του νερού, και ενδεχομένως να δυσχεραίνεται η είσοδος του παθογόνου. Δεύτερον, έχουν αλατότητα αποκλίνουσα από τη μέση τιμή της Μεσογείου (ορισμένες είναι υπεράλμυρες, ενώ άλλες υφάλμυρες). Ενώ έχουν χαρακτηριστεί ως οι τελευταίες δεξαμενές επιζώντων *P. nobilis*, οι ίδιες περιοχές δέχονται έντονη ανθρωπογενή πίεση, από βιομηχανικές, αγροτικές και λοιπές δραστηριότητες και επακόλουθα προκαλούν καταπόνηση στους υδρόβιους οργανισμούς που διαβιούν εκεί. Επιπλέον, είναι πιο επιρρεπείς σε ακραίες καιρικές συνθήκες. Η θερμοκρασία των υδάτων αυξάνεται απότομα σε καύσωνες και η αλατότητα μπορεί να μεταβληθεί έντονα μετά από απότομες βροχοπτώσεις (Prado *et al.*, 2021). Τέλος, πρόκειται για ευτροφικά ύδατα με τον κίνδυνο έντονων ανθίσεων φυτοπλαγκτού και την αύξηση ευκαιριακών οργανισμών, ή την εξάντληση του διαθέσιμου οξυγόνου, όπως συνέβη στη λιμνοθάλασσα Mar Menor το διάστημα 2015-2016 όπου λόγω τοξικών ανθίσεων προκλήθηκε μαζική θνησιμότητα στις πίννες σε βάθος κάτω των 3 m (Nebot-Colomer *et al.*, 2021).

1.3.3. Παθογόνα Υπεύθυνα για το ΜΜΕ στις Πίννες

Ως αίτιο της ασθένειας αναγνωρίστηκε ένα νέο είδος πρώτιστου της οικογένειας Haplosporidiidae, το *Haplosporidium pinnae*, το οποίο έχει χαρακτηριστεί ιστολογικά και μοριακά από ασθενείς πίννες (Catanese *et al.*, 2018). Η εικόνα των ασθενών ατόμων περιλαμβάνει συρρικνωμένο μανδύα, έλλειψη αντίδρασης σε ερεθίσματα και αργό κλείσιμο του κελύφους. Επιπλέον συμπτώματα στα σοβαρά ασθενή άτομα είναι διάχυτο οίδημα στα βράγχια και τον μανδύα, σκουρόχρωμος πεπτικός αδένας, σε ορισμένες περιπτώσεις κυστίδια πάνω σε αυτόν και απουσία του στυλίσκου ή/και του βύσσου.

Ο κύκλος ζωής του *H. pinnae* δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως. Όταν αναγνωρίστηκε, δεν υπήρχε προηγούμενη καταγραφή του και θεωρήθηκε νέο είδος, ειδοειδικό στην *P. nobilis*. Έχουν διατυπωθεί θεωρίες για κάποιο πιθανό ενδιάμεσο, πλαγκτονικό ξενιστή, χωρίς να έχει βρεθεί κάποιος ως τώρα (Cabanellas-Reboredo *et al.*, 2019). Ωστόσο, οι Scarpa *et al.* (2020) εντόπισαν το πρώτιστο σε τρία *Ruditapes decussatus* (συλλεγμένα το 2014) και ένα *Mytilus galloprovincialis* (συλλεγμένο το 2019), ένδειξη ότι το παράσιτο προϋπήρχε στο θαλάσσιο περιβάλλον και είναι ικανό να επιβιώσει σε ιστούς και άλλων δίθυρων, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν στοιχεία ότι

προκαλούσε κάποια ασθένεια στα προσβεβλημένα άτομα. Παρατηρείται και στα βράγχια και τον μανδύα, αλλά τα αναπαραγωγικά στάδια, δηλαδή οι σπορόκυστεις με σπόρια έχουν εντοπιστεί μόνο στον πεπτικό αδένα (Catanese *et al.*, 2018; Tiscar *et al.*, 2022).

Στη βιβλιογραφία η ασθένεια πλέον χαρακτηρίζεται ως πολυπαραγοντική. Η επικρατέστερη θεωρία είναι ότι αρχικά προκαλείται από το *H. pinnae*, αλλά στη πλειονότητα των ασθενών δειγμάτων έχουν βρεθεί ιστολογικά ή μοριακά και στελέχη του γένους *Mycobacterium*. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί πολλαπλά είδη του γένους *Vibrio* και έμφαση έχει δοθεί στο *V. mediterranei*, το οποίο είναι ικανό να προκαλέσει εκτεταμένες θνησιμότητες σε πίννες (Andree *et al.*, 2021a). Τα δύο αυτά γένη θεωρείται ότι συμβάλουν στη θνησιμότητα, καθώς πολλά από αυτά είναι γνωστά παθογόνα άλλων υδρόβιων οργανισμών (Carella *et al.*, 2019; Prado *et al.*, 2019; Pavlinec *et al.*, 2020; Šarić *et al.*, 2020; Scarpa *et al.*, 2020; Andree *et al.*, 2021b; Künili *et al.*, 2021a; Lattos, Bitchava, *et al.*, 2021; Tiscar *et al.*, 2022). Τα μυκοβακτήρια είναι Gram-θετικά βακτήρια του φύλου Actinobacteria, και τα *Vibrio* είναι Gram-αρνητικά βακτήρια του φύλου Proteobacteria, άφθονα στο θαλάσσιο περιβάλλον και με κάποια γνωστά περιβαλλοντικά στελέχη.

1.3.4. ΜΜΕ Πίννας και άλλοι οργανισμοί

Η *Pinna rudis*, ένα άλλο είδος του ίδιου γένους το οποίο φτάνει μικρότερα μεγέθη αλλά μοιάζει μορφολογικά με την *P. nobilis*, διατηρεί από την αρχή του φαινομένου υγιείς πληθυσμούς (Vázquez-Luis *et al.*, 2017; Catanese *et al.*, 2018). Το συγκεκριμένο είδος εντοπίζεται στη δυτική και κεντρική Μεσόγειο, δεν έχει καταγραφεί στις ελληνικές θάλασσες (Nebot-Colomer *et al.*, 2016) και έχει βρεθεί σε πιο βαθιά νερά και σκληρά υποστρώματα, ή υποθαλάσσιες σπηλιές (Nebot-Colomer *et al.*, 2016; Martinović *et al.*, 2021). Μετά τις μαζικές θνησιμότητες *P. nobilis* σε περιοχές της Ισπανίας και της Ιταλίας, έχει καταγραφεί η εξάπλωση και η αύξηση των πυκνοτήτων της *P. rudis* σε θώκους όπου υπήρχαν *P. nobilis* (Donato *et al.*, 2021; Kersting and Ballesteros, 2021). Οι Vázquez-Luis et al. (2021) περιέγραψαν τρία νεαρά δίθυρα όπου έχουν μορφολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά ενδιάμεσα των ειδών *P. nobilis* και *P. rudis* και τα χαρακτήρισαν ως υβρίδια, τα οποία επίσης ήταν υγιή.

Κοινό ενδιαίτημα με την *P. nobilis* έχει και το εισβολικό δίθυρο *Pinctada radiata*. Πρόκειται για είδος ενδημικό της Ερυθράς Θάλασσας, το οποίο εμφανίστηκε μετά τη διάνοιξη της διώρυγας του Σουέζ στη Μεσόγειο. Πρώτη φορά καταγράφηκε στην Αίγυπτο το 1874 (Lodola *et al.*, 2013) και εξαπλώθηκε αρχικά στην νοτιοανατολική Μεσόγειο, ευνοούμενο από την ανοχή του σε μεγάλα εύρη αλατότητας και αργότερα από τις διαρκώς αυξανόμενες θερμοκρασίες (Lodola *et al.*, 2013; Moussa, 2018; Ballesteros *et al.*, 2020). Στην Ελλάδα εισήχθη αρχικά ως πιθανό είδος για υδατοκαλλιέργεια και εγκατέστησε άγριους πληθυσμούς (Theodorou, Perdikaris and Spinos, 2019; Katsanevakis *et al.*, 2020). Πλέον εντοπίζεται σε όλη τη Μεσόγειο και συγκεκριμένα στη

λιμνοθάλασσα Faro έχει καταλάβει, μαζί με την *P. rudis*, τη θέση των πλέον εξαφανισμένων *P. nobilis* στο κανάλι της λίμνης, χωρίς να παρουσιάζει σημάδια ασθένειας (Donato *et al.*, 2021). Πριν τα ΜΜΕ, υπήρχαν παρατηρήσεις παρουσίας *P. radiata* προσκολλημένων πάνω σε *P. nobilis*, αξιοποιώντας το κέλυφος τους ως το σκληρό υπόστρωμα που χρειάζονται. Αποτέλεσμα αυτού ήταν το είδος να εποικήσει ενδιαιτήματα σε περιοχές όπου δεν θα ήταν εφικτή η διαβίωση του χωρίς την παρουσία της πίννας.

1.4. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας χωρίζεται σε τρία σκέλη. Κύριος στόχος ήταν (α) η αξιολόγηση της κατάστασης των εναπομενόντων πληθυσμών στην Ελλάδα και ο προσδιορισμός των αιτιών θνησιμότητας της πίννας στην Ελλάδα (μεταξύ των παθογόνων *H. pinnae, Mycobacterium* spp. και *Vibrio* spp.), (β) η διερεύνηση της ύπαρξης πιθανού ενδιάμεσου ξενιστή ή φορέα του πρώτιστου *H. pinnae* σε άλλους βενθικούς οργανισμούς στο θαλάσσιο περιβάλλον, με έμφαση σε άλλα δίθυρα μαλάκια και ιδίως στο εισβολικό *P. radiata*, το οποίο μπορεί να λειτουργούσε ως δεξαμενή της ασθένειας, ή να συνέβαλε στην εξάπλωση της 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.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Πειραματικός Σχεδιασμός

Για την παρούσα μελέτη, τα δείγματα προέρχονταν από ασθενείς πίννες που συλλέχθηκαν στον ελλαδικό χώρο μεταξύ 2018-2019 και υγιείς πίννες που συλλέχθηκαν το 2021, μαζί με άλλα είδη δίθυρων και λοιπών υδρόβιων βενθικών οργανισμών.

Το πρώτο στάδιο ήταν ο αρχικός μοριακός έλεγχος των δειγμάτων για την παρουσία των κύριων παθογόνων που βιβλιογραφικά έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για τη μαζική θνησιμότητα, δηλαδή το *H. pinnae* και είδη του γένους *Mycobacterium*.

Το δεύτερο στάδιο ήταν η επέκταση του μοριακού ελέγχου για την παρουσία του *H. pinnae* και σε άλλα είδη, στην προσπάθεια να αποσαφηνιστεί ο κύκλος ζωής του και να διερευνηθεί εάν υπάρχει κάποιος ενδιάμεσος ξενιστής.

Το τρίτο στάδιο ήταν η μελέτη του συνολικού ευκαρυωτικού και προκαρυωτικού μικροβιώματος των ατόμων για την πληρέστερη καταγραφή των ήδη γνωστών παθογόνων μικροοργανισμών (*H. pinnae*, *Mycobacterium* spp., *Vibrio* spp.) αλλά και για να διερευνηθεί η ενδεχομένη παρουσία και άλλων ειδών που μέχρι τώρα δεν είχαν συνδεθεί με το φαινόμενο της μαζικής θνησιμότητας.

Τέλος, βάσει των αποτελεσμάτων των προηγούμενων σταδίων, ήταν δυνατή και η συγκριτική μελέτη μεταξύ ασθενών και υγιών πληθυσμών.

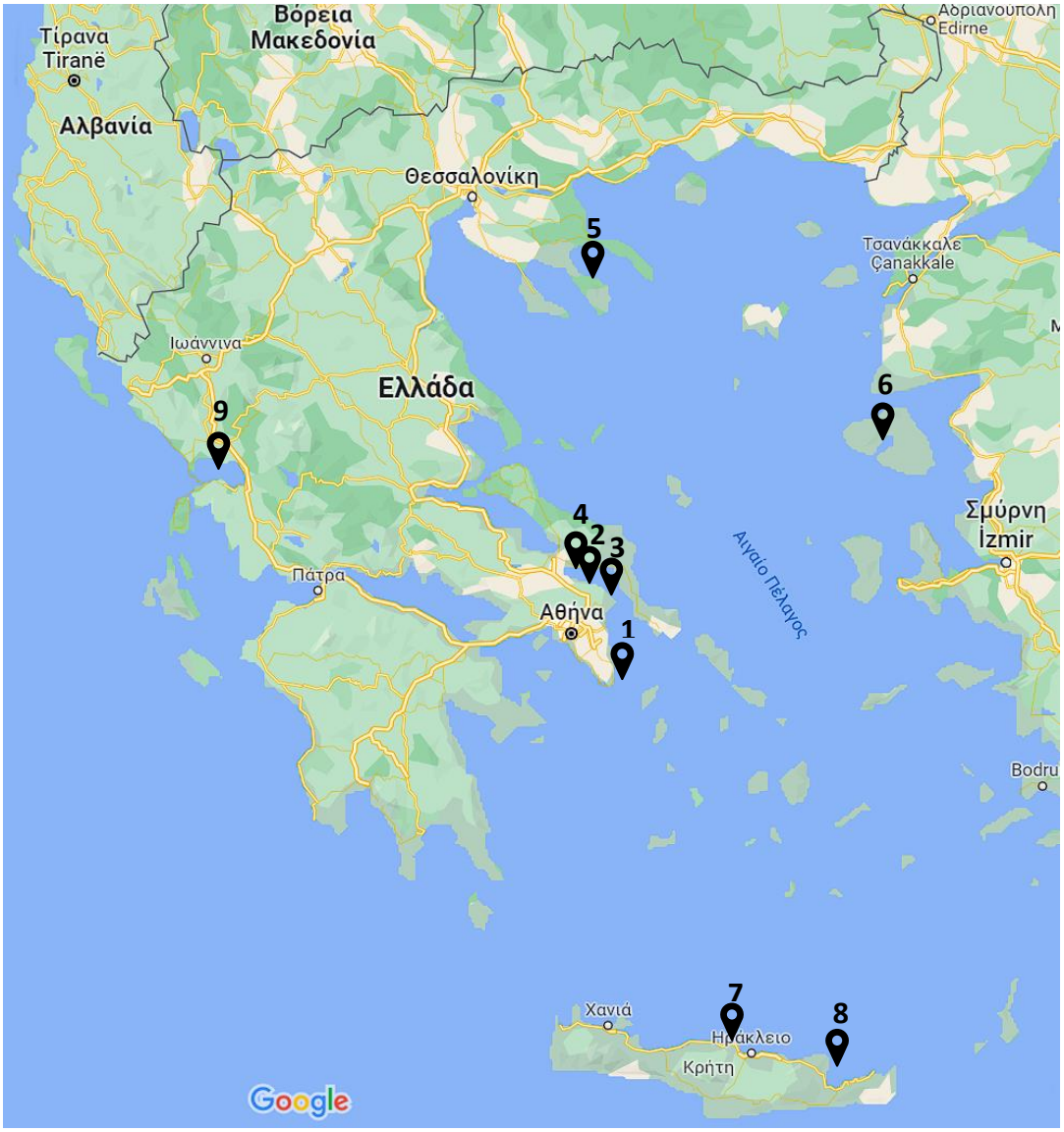
2.2. Περιοχές Δειγματοληψίας

Τα δείγματα συλλέχθηκαν με αυτόνομη κατάδυση από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Οι περιοχές δειγματοληψίας ήταν στην Στερεά Ελλάδα (Ταξιάρχης, Ωρωπός, Αυλίδα και Λαύριο), Μακεδονία (Βουρβουρού), στα Ν. Βορείου Αιγαίου (Λέσβος), στην Κρήτη (Μπαλί και Ελούντα) και στην Ήπειρο (Αμβρακικός κόλπος).

Στον Πίνακα 2 αναγράφεται ο αριθμός των ατόμων και το είδος του κάθε οργανισμού και οι τοποθεσίες φαίνονται και στον χάρτη της εικόνας 2.

Πίνακας 2: Οι περιοχές δειγματοληψίας, τα έτη συλλογής, τα συλλεγμένα είδη και ο αριθμός των ατόμων.

Περιοχή	Γεωγραφικό Διαμέρισμα	Έτος Δειγματοληψίας	Είδος	Αριθμός Ατόμων
1) Λαύριο	Στερεά Ελλάδα	2018	*Pinna nobilis*	2
2) Ωρωπός	Στερεά Ελλάδα	2018	*Pinna nobilis*	4
		2021	*Ostrea* sp.	4
			Ολοθούριο	1
			Ασκίδιο	1
3) Ταξιάρχης	Στερεά Ελλάδα	2021	*Arca noae*	3
			Σπόγγος	3
4) Αυλίδα	Στερεά Ελλάδα	2018	*Pinna nobilis*	2
5) Βουρβουρού	Μακεδονία	2018	*Pinna nobilis*	2
6) Λέσβος	Νησιά Β. Αιγαίου	2018	*Pinna nobilis*	9
7) Μπαλί	Κρήτη	2018	*Pinna nobilis*	1
8) Ελούντα	Κρήτη	2018	*Pinna nobilis*	2
9) Αμβρακικός	Ήπειρος	2021	*Pinna nobilis*	16
			Pinctada radiata	1
			Pinctada sp.	4
			Λοιπά δίθυρα	3
			Murex sp.	6



Εικόνα 2: Χάρτης των τοποθεσιών δειγματοληψίας: 1) Λαύριο, 2) Ωρωπός, 3) Ταξιάρχης, 4) Αυλίδα, 5) Βουρβουρού, 6) Λέσβος, 7) Μπαλί, 8) Ελούντα, 9) Αμβρακικός Κόλπος.

2.3. Μέθοδοι Δειγματοληψίας

Τα δείγματα πίννας από τη Στερεά Ελλάδα, τη Μακεδονία, το Β. Αιγαίο και την Κρήτη συλλέχθηκαν μεταξύ Αυγούστου 2018 και Μαρτίου 2019. Από το κάθε άτομο, κατόπιν μακροσκοπικού ελέγχου στο πεδίο και συλλογής τους, στο εργαστήριο αφαιρούνταν 50-100 mg κάθε οργάνου (Σαραφίδου, 2019). Με εξαίρεση τις πίννες από την Ελούντα και τον Ευβοϊκό Κόλπο (Ωρωπός και Αυλίδα), οι οποίες έδειχναν υγιείς, οι υπόλοιπες ήταν εμφανώς άρρωστες. Τα άρρωστα άτομα διακρίνονταν από τη μειωμένη απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα, αργό κλείσιμο του κελύφους και συρρίκνωση του μανδύα (Vázquez-Luis *et al.*, 2017).

Στον Αμβρακικό κόλπο εντοπίστηκε μεγάλος πληθυσμός (n > 100) ατόμων μικρού μεγέθους χωρίς μακροσκοπικές ενδείξεις ασθένειας και έγινε συλλογή 16 ατόμων και συντήρηση τους χωρίς το κέλυφος σε αιθανόλη 100%. Ομοίως συλλέχθηκαν και συντηρήθηκαν οι υπόλοιποι οργανισμοί (δίθυρα *Ostrea* sp., *Arca noae, Mytilus* sp., γαστερόποδα *Murex* sp., σπόγγοι, ολοθούρια και ασκίδια) από τις περιοχές Ωρωπός, Ταξιάρχης και Αμβρακικός κατά τη δειγματοληψία την άνοιξη του 2021. Όλα τα δείγματα συντηρήθηκαν σε αιθανόλη 100% σε πλαστικά δοχεία και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Τα δείγματα ορίστηκαν ως υγιή ("Healthy") εφόσον είχαν εικόνα υγιούς ατόμου και η PCR για το *H. pinnae* ήταν αρνητική, ως ασθενή αλλά φαινομενικά υγιή ("Sick Presumably Healthy") όταν είχαν εικόνα υγιούς ζώου κατά τη συλλογή, αλλά κατά τον μοριακό έλεγχο βρέθηκαν θετικά και ασθενή ή ημιθανή ("Sick Presumably Moribund") όταν είχαν τα προαναφερθέντα συμπτώματα στο πεδίο ή ήταν πρόσφατα νεκρά και κατά τον μοριακό έλεγχο βρέθηκαν θετικά.

2.4. Απομόνωση Γενετικού Υλικού

Στις πίννες από την Αττική, τη Μακεδονία, τη Λέσβο και την Κρήτη η εξαγωγή γενετικού υλικού είχε προηγηθεί της παρούσας μελέτης και υπήρχαν διαθέσιμα δείγματα από διαφορετικά όργανα (πεπτικός αδένας, προσαγωγός μυς, βράγχια, γονάδα, μανδύας, κτενίδια και προσακτρίδα). Όσον αφορά στις πίννες του Αμβρακικού, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία τριών οργάνων (πεπτικού αδένα, μανδύα και βραγχίων) και ακολούθησε εξαγωγή σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Sambrook *et al.* (1998) (βλ. Παράρτημα Α). Ομοίως έγινε η απομόνωση από τα υπόλοιπα δίθυρα, με εξαίρεση τρία άτομα που ήταν πολύ μικρά και έγινε εξαγωγή από ολόκληρο το άτομο. Στα δείγματα του γένους *Murex* έγινε εξαγωγή μόνο από τον πόδα, ενώ στους σπόγγους και το ολοθούριο δεν επιλέχτηκε συγκεκριμένο όργανο.

Η συγκέντρωση του απομονωμένου γενετικού υλικού προσδιορίστηκε με φασματοφωτόμετρο NanoDrop 1000 και όλα τα δείγματα αραιώθηκαν έως την επιθυμητή συγκέντρωση των 20 ng/μl για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Τα stock των δειγμάτων καθώς και οι αραιώσεις αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

2.5. Διερεύνηση Παρουσίας *Haplosporidium pinnae*

Στα δείγματα *P. nobilis* του Αμβρακικού (48 δείγματα από 16 πίννες) και στα δείγματα των υπόλοιπων οργανισμών από τις περιοχές του Ωρωπού, Ταξιάρχη και Αμβρακικού (51 δείγματα από 26 άτομα) έγινε διερεύνηση της παρουσίας του παράσιτου *Haplosporidium pinnae*. Για την διερεύνηση της παρουσίας του παράσιτου, έγινε PCR με κυκλοποιητή BioRad T100. Για τον πολλαπλασιασμό του επιθυμητού γενετικού τόπου χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές (primers)

στοχευμένοι σε τμήμα του γονιδίου 18S rRNA του *H. pinnae* σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Πίνακας 3) και ως θετικός μάρτυρας μια ασθενής πίννα (LAV1) στην οποία η παρουσία του παθογόνου είχε πιστοποιηθεί σε προηγούμενο χρόνο τόσο ιστολογικά όσο και μοριακά. Για τον πολλαπλασιασμό του γενετικού τόπου, έγινε αντίδραση τελικού όγκου 10 μl, που περιείχε 1 μl γενομικού DNA (20 ng/μl), 5 units FastGene Taq Polymerase, 1X Buffer A, 4 mM dNTPs, 0.5 μl από κάθε εκκινητή και ddH_2O μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλοποιητή αναφέρονται αναλυτικά στο Παράρτημα Β.

Πίνακας 3: Οι εκκινητές της PCR για το H. pinnae.

Γενετικός Τόπος	Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος Τόπου (bp)	Αναφορά
18S rRNA	HPNF3	CATTAGCATGGAATAATAAAACACGAC	600	(Catanese *et al.*, 2018)
	HPNR3	GCGACGGCTATTTAGATGGCTGA		

Τα προϊόντα κάθε αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν για 40 λεπτά στα 80 V σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με 3 μl βρωμιούχου αιθιδίου, ώστε να φανεί εάν υπάρχει το επιθυμητό προϊόν. Το πήκτωμα έπειτα τοποθετούταν σε πλάκα υπεριώδους ακτινοβολίας και γινόταν οπτικοποίηση και φωτογράφηση με το πρόγραμμα Nippon GDS. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης είναι όμοια για τα προϊόντα όλων των PCR που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης (2.5, 2.6 και 2.7).

2.6. Διερεύνηση Παρουσίας *Mycobacterium* spp.

2.6.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Στα δείγματα *P. nobilis* από όλες τις περιοχές δειγματοληψίας (118 δείγματα οργάνων από 36 πίννες) έγινε επίσης διερεύνηση της παρουσίας βακτηρίων του γένους *Mycobacterium*. Χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών σε διαδοχικές PCR (βλ. Πίνακας 4), οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι για να πολλαπλασιάζουν τμήμα του γονιδίου 16S rRNA, και ως θετικός μάρτυρας μια ασθενής πίννα (LAV2) στην οποία η παρουσία του παθογόνου είχε πιστοποιηθεί σε προηγούμενο χρόνο τόσο ιστολογικά όσο και μοριακά. Για τον πολλαπλασιασμό του γενετικού τόπου με το πρώτο ζεύγος, έγινε αντίδραση τελικού όγκου 10 μl, ενώ ακολούθως έγινε δεύτερη αντίδραση (nested PCR) τελικού όγκου 15 μl με το άλλο ζεύγος εκκινητών. Κάθε αντίδραση περιείχε 1 μl γενομικού DNA (20 ng/μl) ή 3 μl προϊόντος αντίδρασης, 1 unit FastGene Taq Polymerase, 1X Buffer A, 0.2 mM dNTPs, 0.6 μl από κάθε εκκινητή και ddH_2O μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλοποιητή αναφέρονται αναλυτικά στο Παράρτημα Β.

Πίνακας 4: Οι εκκινητές της PCR για το Mycobacterium.

Γενετικός Τόπος	Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος Τόπου (bp)	Αναφορά
16S rRNA	T39	GCGAACGGGTGAGTAACACG	924	(Talaat, Reimschuessel and Trucksis, 1997)
	T13	TGCACACAGGCCACAAGGGA		
16S rRNA	preT43	AATGGGCGCAAGCCTGATG	300	
	T531	ACCGCTACACCAGGAAT		

Οι εκκινητές των δύο PCR ελέγχθηκαν πριν από τις πειραματικές δοκιμές με το εργαλείο TestPrime της SILVA (Klindworth *et al.*, 2013; Quast *et al.*, 2013) για να προσδιοριστεί *in silico* το ποσοστό κατά το οποίο είναι εξειδικευμένοι στο γένος *Mycobacterium*. Επειδή δεν ήταν εφικτός ο ταυτόχρονος έλεγχος για τα δύο ζεύγη εκκινητών της nested PCR, αρχικά ελέγχθηκε το ζεύγος T39 και T13, που έδειξε 86.2% αντιστοίχιση με τα *Mycobacterium* spp. και ακολούθως ελέγχθηκε το ζεύγος preT43 και T531, που μεταξύ των γενών που αναμενόταν να πολλαπλασιαστούν κατά την πρώτη PCR, είχε 92% αντιστοίχιση με τα *Mycobacterium* spp.

2.6.2. Ηλεκτροφόρηση και Καθαρισμός Προϊόντων PCR

Μετά από κάθε PCR γινόταν ηλεκτροφόρηση όπως περιγράφηκε στο 2.5 για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της αντίδρασης. Από την εικόνα των προϊόντων στο πήκτωμα αγαρόζης, έγινε επιλογή 24 δειγμάτων με έντονη ένδειξη της επιθυμητής ζώνης και απουσίας άλλων ζωνών για να γίνει αλληλούχιση κατά Sanger και να επιβεβαιωθεί ότι η ζώνη αντιστοιχεί σε *Mycobacterium* sp.

Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με το QIAquick PCR Purification Kit, σύμφωνα με τις οδηγίες (βλ. Παράρτημα Γ) και μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του καθαρισμένου προϊόντος.

2.6.3. Αλληλούχιση κατά Sanger

Στα καθαρισμένα PCR προϊόντα έγιναν αντιδράσεις αλληλούχισης (sequencing reaction), τόσο με τον forward όσο και με τον reverse εκκινητή. Ακολούθως, για να καθαριστεί το DNA έγινε καταβύθιση με μείγμα EDTA 0.5 M, NaOAc 3M (pH 4.6) και 99% αιθανόλης και πλύσεις με 70% αιθανόλη. Τέλος προστέθηκαν 10 μl HiDi Formamide και έγινε αποδιάταξη των αλυσίδων σε κυκλοποιητή ώστε να γίνει η αλληλούχιση κατά Sanger με τη συσκευή ABI 3730 analyzer. Πιο αναλυτικά αναφέρονται οι συνθήκες της αντίδρασης και του καθαρισμού στα Παραρτήματα Δ και Ε.

2.6.4. Ανάλυση Αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit Sequence Align Editor (v.7.2.5.0) (Hall, Biosciences and Carlsbad, 2011). Αφαιρέθηκαν τα τμήματα με θόρυβο στα άκρα των αλληλουχιών από τον forward και τον reverse εκκινητή, ευθυγραμμίστηκαν με το πακέτο CrustalW (Julie D., Desmond G. and Gibson, 1994) και ενώθηκαν ώστε να προκύψει μια αλληλουχία ανά δείγμα. Για κάθε αλληλουχία έγινε BLAST στη βάση νουκλεοτιδίων του NCBI προκειμένου να προσδιοριστούν ταξινομικά. Έπειτα, επιλέχθηκαν ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες από διάφορα είδη του γένους *Mycobacterium* και από άλλα συγγενικά είδη. Τέλος με το πρόγραμμα Molecular Evolutionary Genetics Analysis (v.11) (MEGA11) (Tamura, Stecher and Kumar, 2021) ευθυγραμμίστηκαν οι αλληλουχίες που προέκυψαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας με αυτές που επιλέχθηκαν από την NCBI (Παράρτημα Ζ) και κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας για να ελεγχθεί και η φυλογενετική ταξινόμηση των αλληλουχιών.

2.7. Μετακωδικοποίηση των γονιδίων 18S και 16S rRNA

2.7.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για να υπάρχει μια συνολική εικόνα του ευκαρυωτικού και προκαρυωτικού μικροβιώματος των *P. nobilis*, πολλαπλασιάστηκε περιοχή των γονιδίων του ευκαρυωτικού 18S rRNA και του προκαρυωτικού 16S rRNA αντίστοιχα.

Χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών για κάθε γονίδιο, όπως αναφέρονται στον Πίνακα 5. Για τον πολλαπλασιασμό των γενετικών τόπων, έγινε αντίδραση τελικού όγκου 25 μl. Κάθε αντίδραση περιείχε 2.5 μl γενομικού DNA (20 ng/μl) για το 18S και 7.5 μl γενομικού DNA (20 ng/μl) για το 16S, 0.5 unit KAPPA HiFi Polymerase, 1X KAPPA HiFi Buffer, 0.625 mM dNTPs, 1.25 μl από κάθε εκκινητή και ddH_2O μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλοποιητή αναφέρονται αναλυτικά στο Παράρτημα Ε.

Μετά την πρώτη PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για όλα τα δείγματα και τους αρνητικούς μάρτυρες, που αντιμετωπίσθηκαν ως δείγματα μέχρι το στάδιο της ανάλυσης μετακωδικοποίησης, και καθαρισμός των δειγμάτων με μαγνητικά σφαιρίδια NucleoMag (αναλυτικά το πρωτόκολλο αναφέρεται στο παράρτημα ΣΤ).

Πίνακας 5: Οι εκκινητές που επιλέχτηκαν για τον πολλαπλασσιασμό τμήματος του γονιδίου 18S rRNA ευκαρυωτικών οργανισμών και 16S rRNA προκαυρωτικών οργανισμών για την ανάλυση μετακωδικοποίησης.

Γενετικός Τόπος	Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος Τόπου (bp)	Αναφορά
18S rRNA	1380F	CCCTGCCHTTTGTACACAC	266	(Amaral-zettler *et al.*, 2009)
	1510R	CCTTCYGCAGGTTCACCTAC		
16S rRNA	341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	599	(Klindworth, Pruesse, Schweer, Jorg Peplies, *et al.*, 2013; Apprill *et al.*, 2015)
	805RB	GACTACNVGGGTATCTAATCC		

Πριν την αλληλούχιση των προϊόντων της αντίδρασης, απαραίτητη ήταν η προσθήκη adapters στα άκρα των πολλαπλασιασμένων τμημάτων DNA κάθε δείγματος. Οι adapters αποτελούνταν από τρία διαφορετικά τμήματα: α) το τμήμα πρόσδεσης αλληλούχισης (sequencing binding site), β) τον δείκτη (index) και γ) περιοχές συμπληρωματικές στα ολιγονουκλεοτίδια του flow-cell (regions complementary to the flow-cell oligos). Ενώ τα τμήματα α και γ είναι ίδια, οι συνδυασμοί των β διέφεραν ανά δείγμα, ώστε να είναι εφικτή η αναγνώριση και ο διαχωρισμός τους κατά την ανάλυση. Για αυτό τον σκοπό, πραγματοποιήθηκε δεύτερη PCR με διαφορετικό συνδυασμό forward και reverse εκκινητών.

Κάθε αντίδραση περιείχε περίπου 20 ng/μl καθαρισμένου προϊόντος PCR από την πρώτη, 0.5 unit KAPPA HiFi Polymerase, 1X KAPPA HiFi Buffer, 0.625 mM dNTPs, 2.5 μl από κάθε εκκινητή και ddH_2O μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλοποιητή αναφέρονται αναλυτικά στο Παράρτημα Ε.

2.7.2. Προετοιμασία Pool και αλληλούχιση στην πλατφόρμα Illumina MiSeq

Τα δείγματα αραιώθηκαν σε ddH_2O ώστε η τελική συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων να είναι 10 nM, χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση } (nM) = \frac{10^6 * \textit{Συγκέντρωση } (ng/\mu l)}{\textit{Ολικό μήκος } (bp) * 660}$$

Όπου το ολικό μήκος της αλληλουχίας ήταν 266 bp για το18S rRNA και 600 bp για το 16S rRNA.

Τελικά προστέθηκε 1 μl καθαρισμένου, αραιωμένου προϊόντος της δεύτερης PCR από κάθε δείγμα σε ένα Eppendorf tube για να δημιουργηθεί το pool κάθε γονιδίου. Καθαρίστηκαν 100 μl του pool με μαγνητικά σφαιρίδια και διαλύθηκαν σε 50 μl elution buffer για το 18S rRNA και ddH_2O ομοίως για το 16S rRNA. Για να επιβεβαιωθεί ότι τα τμήματα DNA είχαν το επιθυμητό μέγεθος,

έγινε ηλεκτροφόρηση των καθαρισμένων pool σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με 1.5 μl βρωμιούχου αιθιδίου στα 50 V για 45 min. Σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκαν 8 μl από το pool και 2 μl Orange DNA Loading Dye (6X) και χρησιμοποιήθηκε ως ladder ο FastGene 50 bp DNA Marker.

Έπειτα έγινε αλληλούχιση των δειγμάτων στην πλατφόρμα Illumina MiSeq χρησιμοποιώντας το MiSeq Reagent Kit v3 (2 x 300 bp).

2.7.3. Ανάλυση Δεδομένων Αλληλούχισης

Οι αλληλουχίες όπου προέκυψαν από την πλατφόρμα Illumina MiSeq αναλύθηκαν στο Zorba (Zafeiropoulos *et al.*, 2021b, 2021a), τις συστοιχίες υπολογιστών υψηλής απόδοσης (high performance computing cluster - HPC) του ΕΛΚΕΘΕ. Για την πλειοψηφία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε κοινός συνδυασμός δεικτών (indices) για τις πολλαπλασιασμένες περιοχές 18S rRNA και 16S rRNA και για να γίνει η ανάλυση έπρεπε να διαχωριστούν. Ο διαχωρισμός και η αφαίρεση των αλληλουχιών των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με το πακέτο cutadapt (v2.9) (Martin, 2011). Έπειτα χρησιμοποιήθηκε το PEMA (v2.1.4) (Zafeiropoulos *et al.*, 2020) για την περαιτέρω επεξεργασία των αλληλουχιών. Συγκεκριμένα ορίστηκαν οι απαραίτητες παράμετροι και το PEMA έκανε την ανάλυση σε τρία στάδια.

Πρώτον, έγινε έλεγχος της ποιότητας και μια προεργασία των αλληλουχιών (.fastq αρχεία) με τα παρακάτω πακέτα:

1) FastQC (v.0.11.8) (Andrews, 2010): Αξιολογεί την ποιότητα των αλληλουχιών και τις βαθμολογεί (quality score).
2) Trimmomatic (v.0.38) (Bolger, Lohse and Usadel, 2014): Αφαιρεί αλληλουχίες βάση του βαθμού (quality score) του FastQC. Επίσης μπορεί να αφαιρέσει αλληλουχίες των adapters της Illumina, εάν λόγω σφάλματος περιέχονται ακόμα στην αλληλουχία.
3) BayesHammer (από το πακέτο SPAdes v3.13.0) (Bankevich *et al.*, 2012; Nurk *et al.*, 2013): Διορθώνει τις αλληλουχίες.
4) PANDAseq (v2.11) (Masella *et al.*, 2012): Ενώνει τις forward και reverse αλληλουχίες.
5) Obiuniq (από το πακέτο OBITools v1.2.12) (Boyer *et al.*, 2016): Μειώνει τον όγκο των αλληλουχιών, καταγράφοντας τον αριθμό επαναλήψεων πανομοιότυπων αλληλουχιών (dereplication).

Δεύτερον, επιλέχτηκε ο τρόπος οργάνωσης (clustering) μεταξύ OTUs (Operational Taxonomic Units) και ASVs (Amplicon Sequence Variant). Προτιμήθηκαν τα ASVs, για να αποφευχθεί η ομαδοποίηση των δεδομένων και ενδεχομένως να προσπεραστεί κάποια αλληλουχία από οργανισμό όπου δεν έχει καταγραφεί ξανά. Με αυτή τη μέθοδο θεωρήθηκε ότι αποτυπώθηκε

σωστότερα η ποικιλότητα του μικροβιώματος. Για να γίνει αυτό από το PEMA, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος SWARM (Mahé *et al.*, 2014, 2015).

Τρίτον, έγινε ταξινομική αντιστοίχιση των αλληλουχιών βάση ευθυγράμμισης (alignment-based taxonomy assignment). Για αυτό χρησιμοποιήθηκε ως βάση δεδομένων ριβοσωμικού RNA η Silva (v. 132) (Quast *et al.*, 2013). Σε όλες τις επακόλουθες αναλύσεις, διορθώθηκαν οι αφθονίες των δειγμάτων ως προς τους αρνητικούς μάρτυρες που είχαν επίσης αλληλουχηθεί. Δεν συμπεριλήφθηκαν οι αλληλουχίες που χαρακτηρίστηκαν ως "No hits" και τα είδη του βασιλείου Animalia (Metazoa), που, εν προκειμένω, ήταν αλληλουχίες που αντιστοιχούσαν στις ίδιες τις πίννες, σε σπόγγους κ.α., με σκοπό να διακρίνεται καλύτερα η διαφοροποίηση μεταξύ των μικροβίων.

Λόγω του γεγονότος ότι δεν εντοπίστηκαν αλληλουχίες *Mycobacterium* spp., του οποίου η παρουσία επιβεβαιώθηκε με την αλληλούχιση όπως περιγράφηκε στο 2.6., έγινε αναζήτηση σε υποσύνολο των ASVs (σε όσα έφτασαν μέχρι το 2° επίπεδο "Bacteria" και μέχρι το 3° επίπεδο "Actinobacteriota") στην βάση νουκλεοτιδίων του NCBI. Η ταξινομική κατάταξη των ASVs όπου αναγνωρίστηκαν ως *Mycobacterium* spp. διορθώθηκε αναλόγως.

Η περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα R-Studio (v.4.1.3) (RStudio Team, 2020). Οι παράμετροι αφθονίας και ποικιλότητας υπολογίστηκαν με το πακέτο Phyloseq (v.1.38.0) (McMurdie and Holmes, 2013, 2015), η one-way ANOVA, το post-hoc Tukey's HSD test και ανάλυση LEfSe με το πακέτο microbiomeMarker (v.1.0.2) (Yang, 2021) και τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με το πακέτο ggplot2 (v.3.3.5) (Wickham, 2016).

2.7.4. Δείκτες Ποικιλότητας και Σχετικές Αφθονίες

Από τον αριθμό των ASVs ανά δείγμα, υπολογίστηκαν η α- και η β-ποικιλότητα. Η α-ποικιλότητα αφορά τα διαφορετικά ASVs για κάθε δείγμα μεμονωμένα και υπολογίστηκε με τρεις δείκτες, την παρατηρούμενη αφθονία (observed richness), τον δείκτη Chao1 (Chao, 1984) και τον δείκτη ACE (Chao and Lee, 1992; Chao and Yang, 1993).

$$S_{observed} = n_{OTUs}$$

Όπου n_{OTUs} = αριθμός διαφορετικών ASVs ανά δείγμα.

$$S_{Chao1} = S_{Observed} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2\,(n_2 + 1)},$$

Όπου

S_{chao1} = η εκτιμώμενη αφθονία, S_{obs}= ο παρατηρούμενος αριθμός ειδών, n_1 = ο αριθμός ASVs με μια μόνο αλληλουχία (singletons) και n_2 = ο αριθμός ASVs με δύο μόνο αλληλουχίες (doubletons).

$$S_{ACE} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{F_1}{C_{ACE}}\gamma^2_{ACE},$$

Όπου,

S_{abund} και S_{rare} = ο αριθμός των άφθονων και σπάνιων ASVs αντίστοιχα, C_{ACE} = sample abundance coverage estimator, F_1 = η συχνότητα των ειδών με μια αλληλουχία (singletons) και γ^2 = ο εκτιμώμενος συντελεστής διασποράς για σπάνια ASVs.

Για τη β-ποικιλότητα, η οποία αφορά διαφορές ανάμεσα στα ASVs που βρέθηκαν στις διαφορετικές υποομάδες δειγμάτων, υπολογίστηκε με τη χρήση του δείκτη ανομοιογένειας Bray-Curtis:

$$BC_{ij} = 1 - \frac{2C_{ij}}{S_i + S_j},$$

Όπου,

C_{ij} = το άθροισμα των μικρότερων τιμών για τα είδη κοινά ανάμεσα στις δύο ομάδες και S_i, S_j τα συνολικά είδη που εμφανίζονται και στις δυο περιοχές.

Με το πακέτο vegan (v.2.5-7) (Oksanen *et al.*, 2020) κατασκευάστηκαν μήτρες ομοιότητας σύμφωνα με τους υπολογισμένους δείκτες Bray-Curtis ανάμεσα σε ζεύγη κατηγοριών δειγμάτων (ανά περιοχή) που στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τις απεικονίσεις nMDS (non-metric Multi-Dimensional Scaling). Τέλος, έγινε PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance) για να ελεγχθεί αν οι διαφορές ανάμεσα στις ομάδες έχουν στατιστική ισχύ.

2.7.5. Σύγκριση Αφθονίας *H. pinnae, Mycobaceterium* spp. και *Vibrio* spp. μεταξύ Διαφορετικών Οργάνων

Στις ασθενείς πίννες (θετικές για το *H. pinnae*) έγινε μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA) για να γίνει σύγκριση της αφθονίας 16S rRNA των κύριων ύποπτων παθογόνων (*Haplosporidium* spp., *Mycobacterium* spp., *Vibrio* spp.) για τη θνησιμότητα της *P. nobilis* σε τέσσερα διαφορετικά όργανα (βράγχια, πεπτικός αδένας, μανδύας και μυς). Τα υπόλοιπα όργανα εξαιρέθηκαν της ανάλυσης λόγω έλλειψης επαρκών επαναλήψεων ($n \leq 2$). Ακολούθησε post-hoc Tukey's HSD test για να προσδιοριστεί μεταξύ ποιων οργάνων παρουσιάζονται διαφορές στις αφθονίες.

2.7.6. Σύγκριση Μικροβιώματος Υγιών και Ασθενών Ατόμων

Για τη σύγκριση του μικροβιώματος μεταξύ υγιών ατόμων (μη προσβεβλημένα άτομα από *H. pinnae* όπως προέκυψε από την PCR και την ανάλυση μετακωδικοποίησης) και ασθενών ατόμων

πίννας και για τον εντοπισμό ταξινομικών ομάδων-δεικτών (σε επίπεδο γένους) που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες, πραγματοποιήθηκε ανάλυση LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size).

Η ανάλυση έγινε όπως περιγράφηκε από τους Lin και Peddada (2020). Αρχικά έγινε έλεγχος της διακύμανσης της διασποράς με τεστ Kruskal-Wallis και επιλέχτηκαν όσες ταξινομικές ομάδες διέφεραν μεταξύ των υγιών και ασθενών ατόμων. Έπειτα, για να υπολογιστεί το μέγεθος της επίδρασης (effect size), εφαρμόστηκε μοντέλο γραμμικής διακριτικής ανάλυσης (linear discriminant analysis model) με εξαρτημένη μεταβλητή την ομάδα (υγιή-ασθενή) και με ανεξάρτητες μεταβλητές την παρατηρούμενη αφθονία και τα δημογραφικά στοιχεία. Το μέγεθος επίδρασης που προκύπτει ανά ταξινομική ομάδα αποτελεί μέτρο του μέσου της διακύμανσης και δείχνει την διακριτική του ισχύ. Τέλος, υπολογίστηκε το LDA με τον λογάριθμο του μεγέθους επίδρασης και οι ταξινομικές ομάδες κατατάσσονται βάση της τιμής αυτού.

Στη παρούσα μελέτη η ανάλυση έγινε σε επίπεδο γένους και ως κατώφλι ορίστηκε το LDA = 2, ώστε να επιλεχθούν γένη με τιμές μόνο άνω της συγκεκριμένης και με επίπεδο σημαντικότητας < 0.05. Μετά την αναγνώριση ASVs με υψηλή συχνότητα, έγινε BLAST των αλληλουχιών στην NCBI Nucleotide database και σύγκριση με τις πιο όμοιες αλληλουχίες.

Επιπλέον, κατασκευάστηκαν γραφήματα Krona (Ondov, Bergman and Phillippy, 2011) για τα υγιή και τα ασθενή άτομα χωριστά, με την ταξινομία όπως ορίστηκε από τη Silva και προστέθηκαν οι διορθώσεις όσον αφορά το *Mycobacterium* spp. Επίσης, προστέθηκαν τα LDA από την ανάλυση LEfSe, με θετικές τιμές για τα γένη που πιο άφθονα γένη (με P-value < 0.05) στις υγιείς πίννες και αρνητικές τιμές για τα πιο άφθονα γένη στις ασθενείς και μηδενικές για τα υπόλοιπα (μη σημαντικά, P-value > 0.05).

3. Αποτελέσματα

3.1. Μοριακός Εντοπισμός Παθογόνων Οργανισμών

3.1.1. Παρουσία του *H. pinnae* σε είδη εκτός του *P. nobilis*

Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν διάφοροι οργανισμοί, με έμφαση στα δίθυρα, όμως υπήρχαν και σπόγγοι, γαστερόποδα (*Murex* sp.), ολοθούρια και ασκίδια. Από την PCR για το *H. pinnae* δεν προέκυψαν θετικά δείγματα και δεν έγινε περαιτέρω ανάλυση στους συγκεκριμένους οργανισμούς.

3.1.2. Παρουσία του *H. pinnae* σε άτομα *P. nobilis*

Οι πίννες από τις περιοχές Λαύριο, Αυλίδα, Ωρωπός, Ελούντα, Μπαλί, Λέσβο και Βουρβουρού είχαν ελεγχθεί για το *H. pinnae* πριν την παρούσα εργασία, ήταν θετικές και συνεπώς για το υπόλοιπο της εργασίας θα αναφέρονται ως ασθενείς. Οι πίννες από τον Αμβρακικό ήταν όλες αρνητικές, οπότε ο πληθυσμός του Αμβρακικού θεωρείται υγιής (Πίνακας 6).

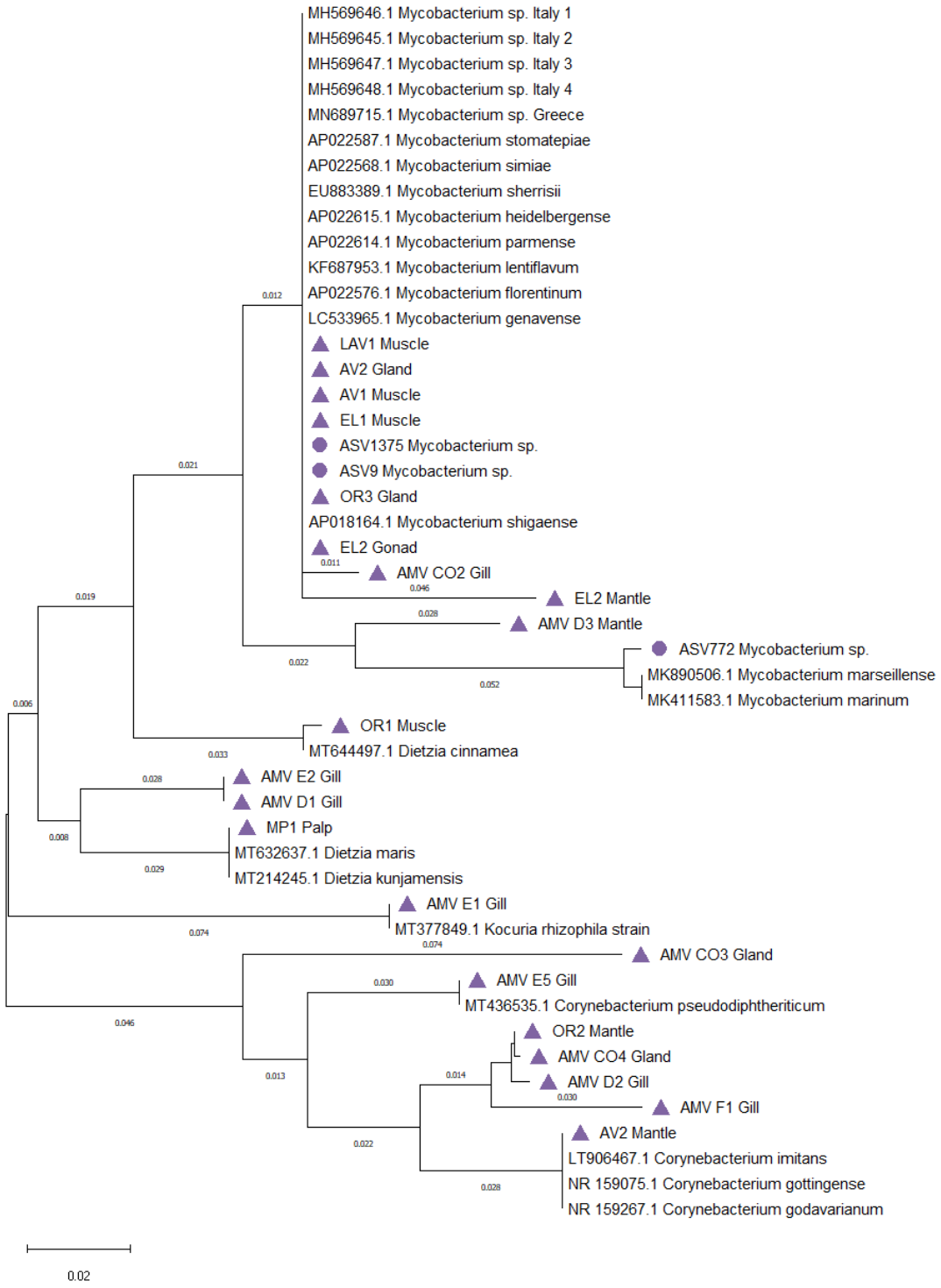
3.1.3. Παρουσία *Mycobacterium* spp. σε άτομα *P. nobilis*

Μετά την PCR με τους εκκινητές T39-T19 και preT43-T531, εμφανίστηκε σε όλες τις πίννες, τουλάχιστον σε ένα όργανο, η ζώνη επιθυμητού μήκους (300 bp) για θετικό αποτέλεσμα για *Mycobacterium* spp. (Πίνακας 6).

Παρά τον *in silico* έλεγχο με το εργαλείο TestPrime, μεταξύ των 24 δειγμάτων (από 19 διαφορετικά άτομα) που αλληλουχήθηκαν, μόνο τα εννέα παρουσίασαν υψηλή ομοιότητα (> 97%) με *Mycobacterium* spp., επτά με *Corynebacterium* spp., τρία με *Dietzia* spp., ένα με *Kocuria rhizophila* και τέσσερα δεν είχαν ικανοποιητική ποιότητα κορυφών ώστε να ενωθεί η forward και η reverse αλληλουχία και να γίνει BLAST στη βάση νουκλεοτιδίων του NCBI (τα 3 προέρχονταν από διαφορετικά όργανα των ίδιων ατόμων). Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα ήταν ένδειξη ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεν είναι επαρκώς ειδικοί (specific) για το γένος *Mycobacterium*, διότι πολλαπλασίασαν και άλλα συγγενικά γένη και κατά συνέπεια δεν είναι απολύτως βέβαιο ότι όσα προϊόντα PCR δεν αλληλουχήθηκαν, αφορούν όντως το συγκεκριμένο γένος.

Στο Γράφημα 1 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με τις αλληλουχίες από τα δείγματα και είδη καταχωρημένα στη βάση νουκλεοτιδίων του NCBI (Παράρτημα Ζ). Οι αλληλουχίες που απομονώθηκαν από την Αυλίδα (AV2), τον Ωρωπό (OR3), το Λαύριο (LAV1) την Ελούντα (EL1, EL2), δηλαδή από ασθενή άτομα, ήταν πιο όμοιες μεταξύ τους. Επίσης ήταν όμοιες με τις αλληλουχίες που εντοπίστηκαν σε πίννες από άλλες περιοχές (Ιταλία και Ελλάδα) και είδη του

συμπλέγματος *Mycobacterium simiae*. Τα δείγματα από τον Αμβρακικό (υγιή) (AMV D3 και AMV CO3, διέφεραν περισσότερο από τα ασθενή και τις αλληλουχίες αναφοράς.



Γράφημα 1: Φυλογενετικό δέντρο όπου δείχνει τις ομοιότητες των *Mycobacterium* spp. από την αλληλούχιση Sanger (▲), ορισμένα ASVs 16S rRNA (●) και αλληλουχιών αναφοράς. Όσες αλληλουχίες αναφέρουν τις λέξεις "Italy", "Greece" προήλθαν από πίννες στην αντίστοιχη χώρα.

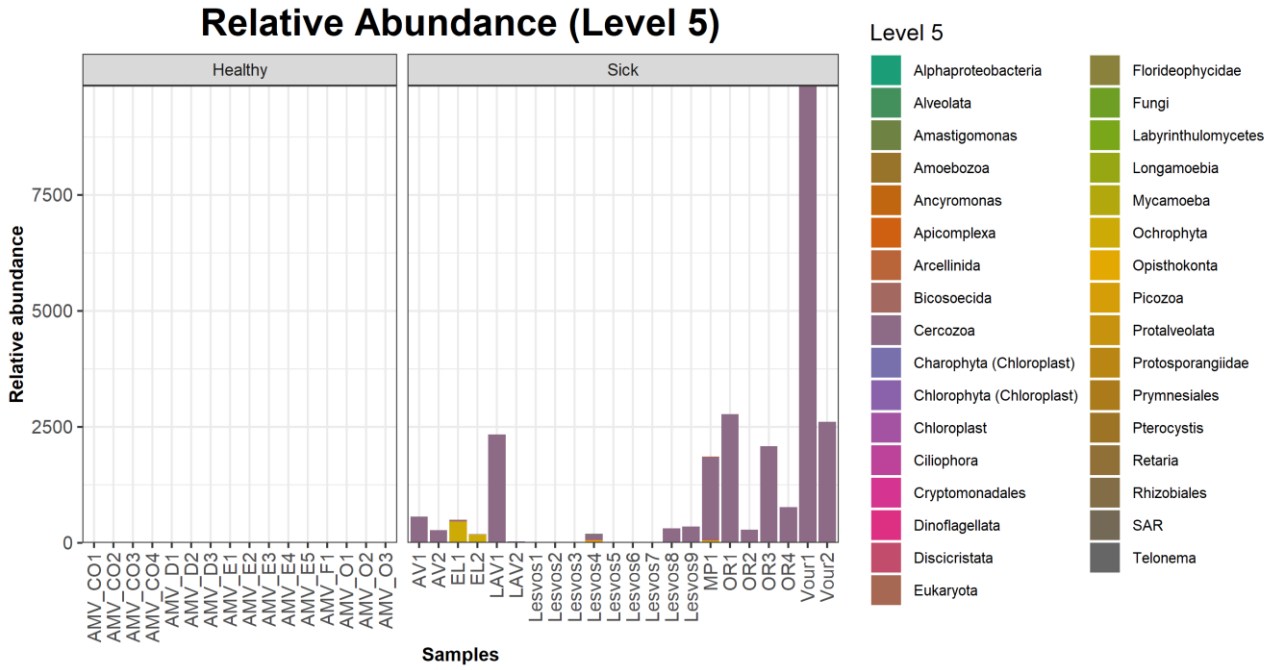
Πίνακας 6: Παρουσία *Haplosporidium pinnae*, *Mycobacterium* spp. και *Vibrio* spp. στις πίννες με τους ειδικούς εκκινητές και τη μετακωδικοποίηση των 18S rRNA και 16S rRNA. Με αστερίσκο (*) στη στήλη *Mycobacterium* spp. (Sanger) συμβολίζονται τα δείγματα όπου αλληλουχήθηκαν και ταυτίστικαν με *Mycobacterium* spp.

	H. pinnae (Sanger)	*H. pinnae*(μετακωδικοποίηση 18S rRNA)	*H. pinnae* (μετακωδικοποίηση 16S rRNA)	*Mycobacterium* spp. (Sanger)	*Mycobacterium* spp. (μετακωδικοποίηση)	*Vibrio* spp. (μετακωδικοποίηση)
AMV01				+		
AMV02				+		
AMV03				+		+
AMVE1				+		
AMVE2				+		
AMVE3				+		
AMVE4				+		+
AMVE5				+		
AMVD1				+ *		
AMVD2				+		
AMVD3				+ *		+
AMVF1				+		
AMVCO1				+		+
AMVCO2				+ *		+
AMVCO3				+		+
AMVCO4				+		+
MP1	+	+	+	+		+
EL1	+	+	+	+ *	+	+
EL2	+	+	+	+ *	+	+
Lesvos1	+			+	+	+
Lesvos2	+		+	+	+	+
Lesvos3	+	+		+	+	+
Lesvos4	+	+		+	+	+
Lesvos5	+	+	+	+	+	+
Lesvos6	+	+		+	+	+
Lesvos7	+	+		+	+	+
Lesvos8	+	+	+	+	+	+
Lesvos9	+	+		+	+	+
Vour1	+	+	+	+	+	
Vour2	+	+	+	+	+	+
OR1	+	+	+	+		
OR2	+	+	+	+		
OR3	+	+	+	+ *	+	
OR4	+	+	+	+		
AV1	+	+	+	+ *	+	
AV2	+	+	+	+ *		+
LAV1	+	+	+	+ *		
LAV2	+	+		+	+	

3.2. Ανάλυση Μετακωδικοποίησης

3.2.1. Αφθονίες και Δείκτες Ποικιλότητας 18s rRNA

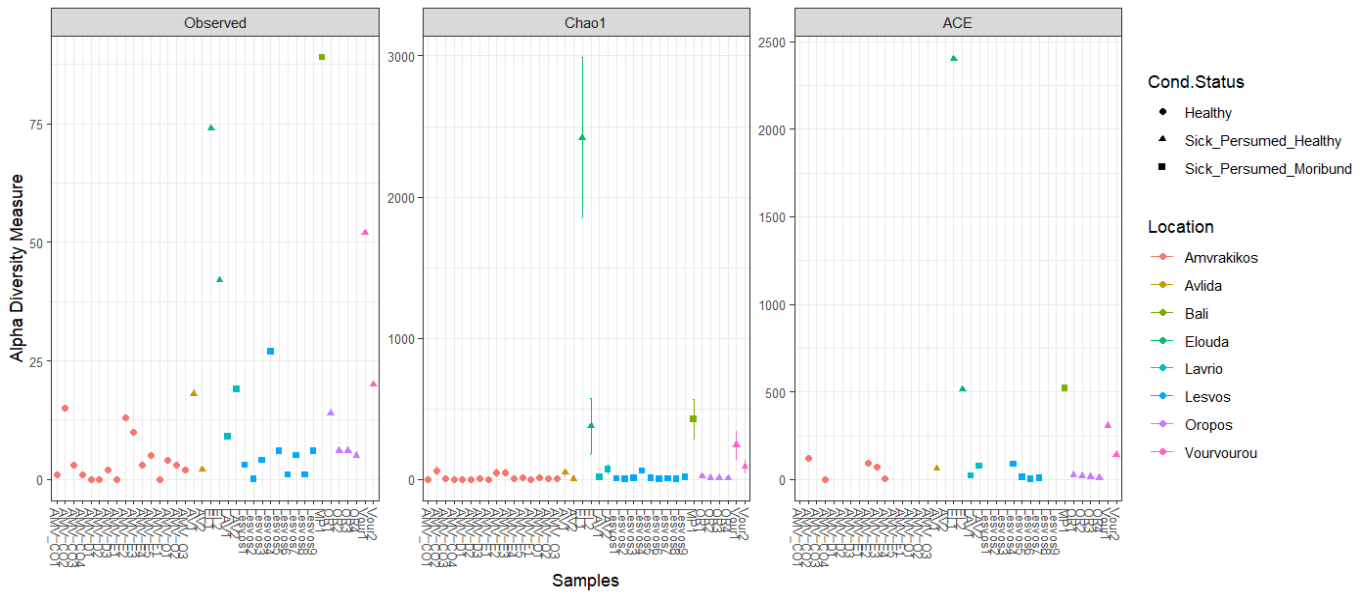
Ο τελικός αριθμός ASVs, μετά την αφαίρεση των ASVs που ανήκαν σε Animalia (Metazoa), ήταν 367. Τα φύλα με τα περισσότερα ASVs ήταν τα Ochrophyta (~30% επί του συνόλου), τα Cercozoa (~21%) και τα Dinoflagellata (~12%). Στο γράφημα 2 παρουσιάζονται τα reads ανά πίννα και τα διαφορετικά χρώματα δείχνουν σε ποια ταξινομική ομάδα αντιστοιχούσαν. Τα Cercozoa (στα οποία ανήκει το *H. pinnae*) είχαν τα περισσότερα reads αν και δεν ήταν το πιο άφθονο φύλο σε ποικιλομορφία (διαφορετικά ASVs). Απουσία των μετάζωων, οι υγιείς πίννες (Αμβρακικού) έχουν πολύ μικρές ή μηδενικές αφθονίες ευκαρυωτικών οργανισμών.



Γράφημα 2: Η σχετική αφθονία (αριθμός reads) βάσει του 18S rRNA στο ταξινομικό επίπεδο 5 ανά πίννα.

Όσον αφορά την α-ποικιλότητα όλων των ατόμων, δεν υπάρχει συγκεκριμένη διάκριση μεταξύ των υγιών ατόμων (Αμβρακικού) και των ασθενών (υπόλοιπες περιοχές). Σε ορισμένα ασθενή άτομα, ανεξαρτήτως εικόνας κατά τη συλλογή τους (φαινομενικά υγιή ή φαινομενικά ασθενή), η αφθονία είναι λίγο υψηλότερη (Γράφημα 3).

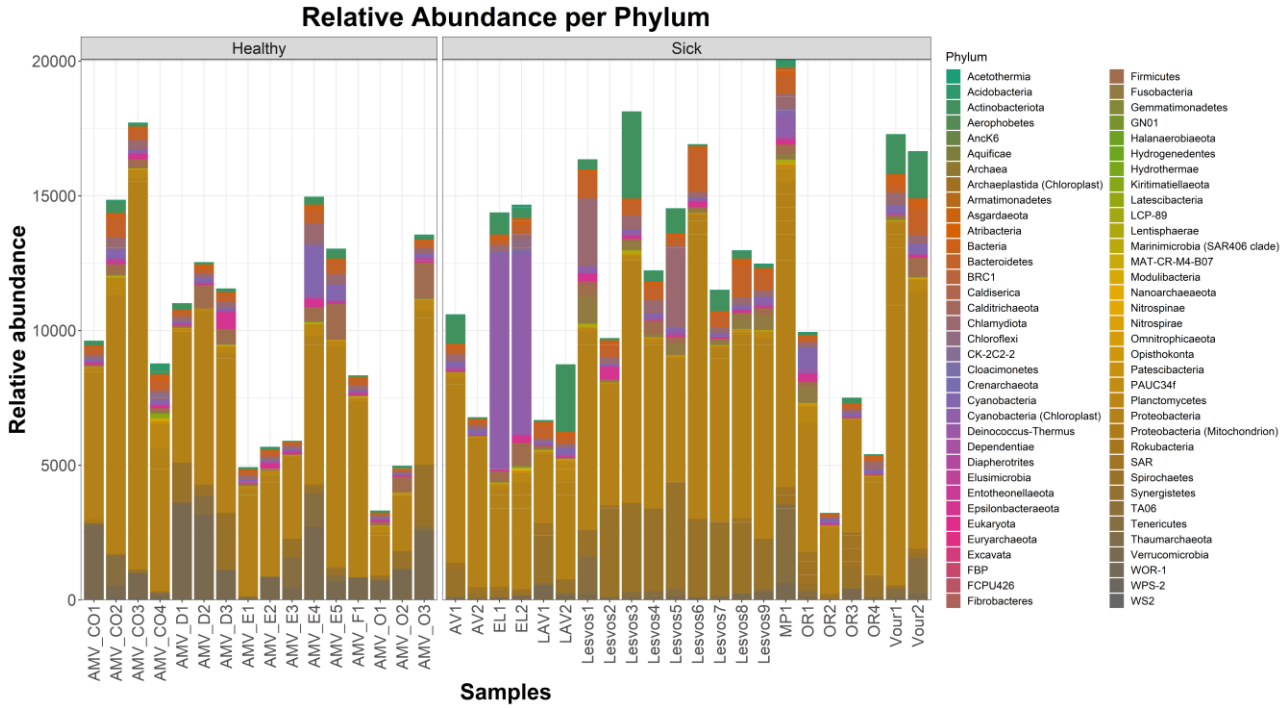
Μετά την αφαίρεση των ASVs των μετάζωων, αρκετά υγιή άτομα είχαν μηδενικά ASVs, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η ανάλυση nMDS για τη σύγκριση της β-ποικιλότητας των πιννών από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας.



Γράφημα 3: Η α-ποικιλότητα σε επίπεδο ASVs από την ανάλυση μετακωδικοποίησης του 18S rRNA ανά πίννα ως παρατηρούμενη ποικιλότητα (συνολικός αριθμός ASVs), ως δείκτης Chao1 και ως δείκτης ACE. Με διαφορετικό χρώμα επισημαίνεται η περιοχή συλλογής και με διαφορετικό σχήμα η κατάσταση κατά τη συλλογή (Healthy = Υγιή, Sick_Persumed_Healthy = Ασθενή Φαινομενικά Υγιή, Sick_Persumed_Moribund = Ημιθανή ή Πρόσφατα Νεκρά).

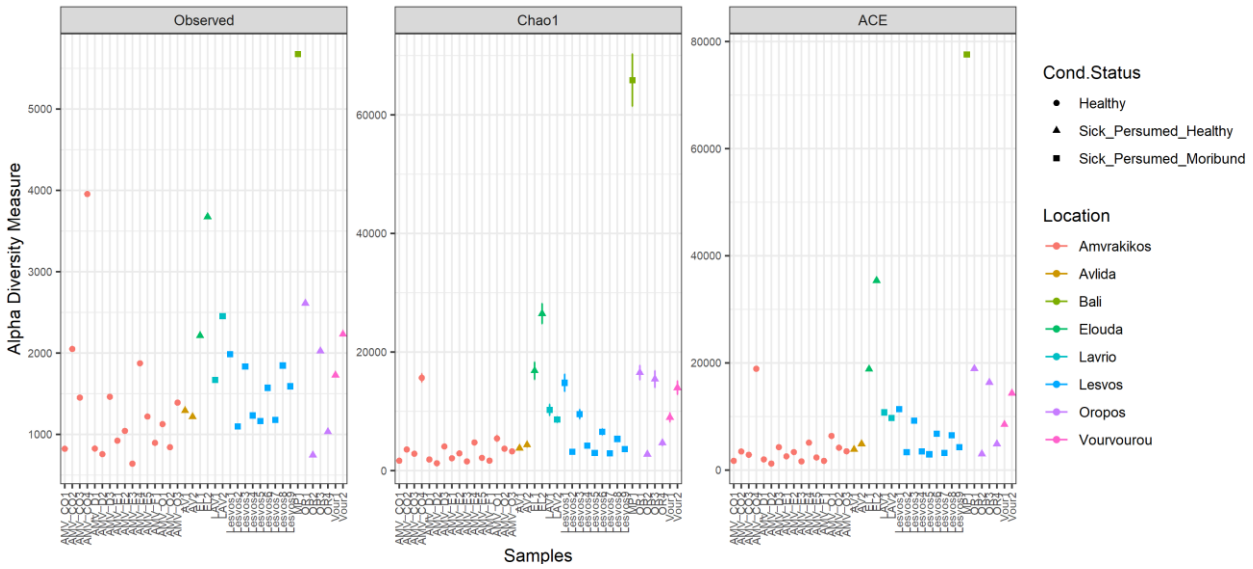
3.2.2. Αφθονίες και Δείκτες Ποικιλότητας 16s rRNA

Ο τελικός αριθμός ASVs, μετά την αφαίρεση των μετάζωων, ήταν 22.076. Το 79.8% των αλληλουχιών που αναγνωρίστηκαν ανήκουν στο βασίλειο Bacteria, 20.1% στα Protista (SAR) και 0.1% στα Archaea. Τα πέντε πιο άφθονα φύλα (με περισσότερα διαφορετικά ASVs) αποτέλεσαν το 86.3% των συνολικών ASVs. Ήταν τα Proteobacteria (47.4% των συνολικών μικροβίων), τα Cercozoa (19.2%), τα Planctomycetes (9.5%) και τα Bacteroidetes (5.7%) και τα Actinobacteria (3.3%) (Γράφημα 4). Τα Proteobacteria περιλάμβαναν τις κλάσεις Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria και Deltaproteobacteria (35.1%, 6.3% και 6% των συνολικών ASVs αντίστοιχα). Τα Cercozoa αποτελούνταν σχεδόν αποκλειστικά από την κλάση Ascetosporea. Τα Plactomycetes αποτελούνταν κυρίως από Planctomycetacia (8.7%), τα Bacteroidetes κυρίως από Bacteroidia (5.7%), ενώ τα Actinobacteria από Actinomycetes (2.4%) και Acidimicrobia (0.8%).



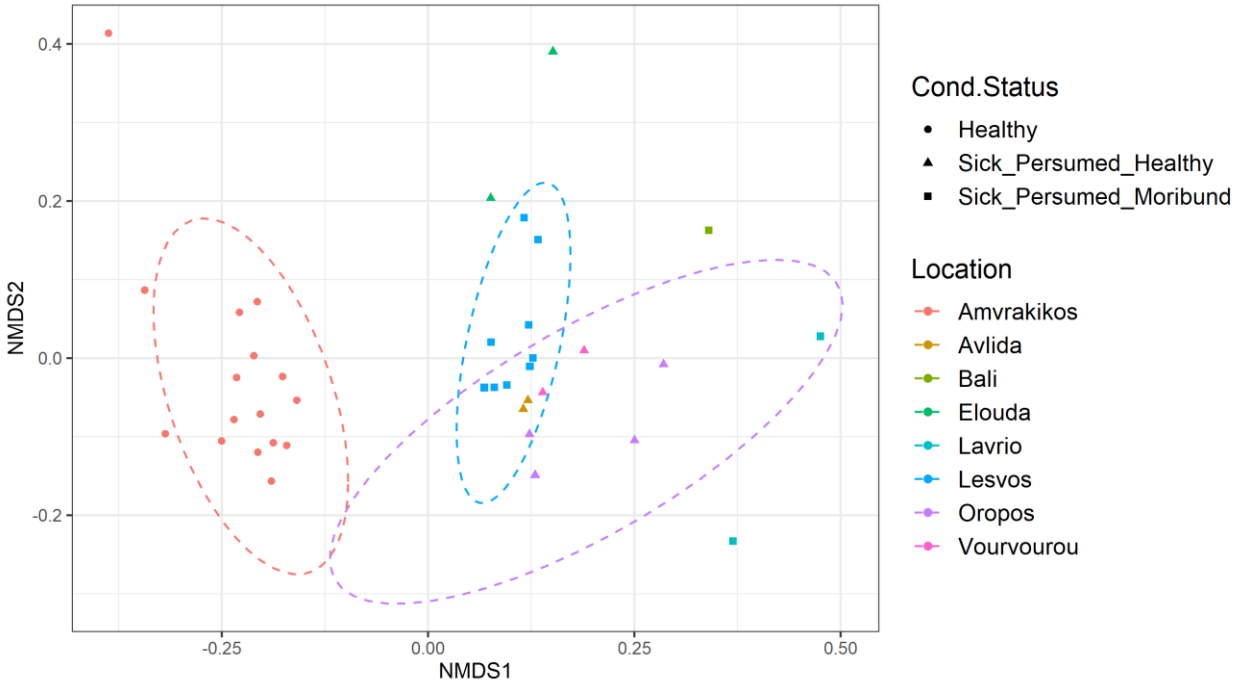
Γράφημα 4: Η σχετική αφθονία (αριθμός reads) 16S rRNA σε επίπεδο φύλου ανά πίννα.

Η α-ποικιλότητα, όμοια με του 18S rRNA, δε διαφέρει πολύ μεταξύ υγιών και ασθενών ατόμων. Αν και δεν υπάρχει ξεκάθαρος διαχωρισμός ανάμεσα στις υγιείς πίννες και τις ασθενείς, ορισμένες από τις ασθενείς τείνουν να έχουν υψηλότερη α-ποικιλότητα (πιο εμφανές με τους δείκτες Chao1 και ACE) (Γράφημα 5).



Γράφημα 5: Η α-ποικιλότητα σε επίπεδο ASVs από την ανάλυση μετακωδικοποίησης του 16S rRNA ανά πίννα ως παρατηρούμενη ποικιλότητα, ως δείκτης Chao1 και ως δείκτης ACE. Με διαφορετικό χρώμα επισημαίνεται η περιοχή συλλογής και με διαφορετικό σχήμα η κατάσταση κατά τη συλλογή (Healthy = Υγιή, Sick_Persumed_Healthy = Ασθενή Φαινομενικά Υγιή, Sick_Persumed_Moribund = Ημιθανή ή Πρόσφατα Νεκρά).

Για τη β-ποικιλότητα, στην nMDS (stress = 0.12) (Γράφημα 6) διαχωρίζονται καθαρά τα υγιή (αρνητικά σε *H. pinnae*) από τα ασθενή άτομα (θετικά σε *H. pinnae*).Τα δείγματα του Αμβρακικού διακρίνονται από τα υπόλοιπα, ενώ και της Λέσβου και του Ωρωπού αντίστοιχα ομαδοποιούνται ανά περιοχή. Από τις υπόλοιπες περιοχές ήταν διαθέσιμα μόνο 1 ή 2 άτομα, οπότε δεν ήταν εφικτή η ομαδοποίηση τους. Από την PERMANOVA φαίνεται ότι τα δείγματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς τον παράγοντα τοποθεσία (location) [F(7,38)=5.3145, p<0.001], εκτιμώμενη κατάσταση κατά τη συλλογή (status) [F(1,38)=5.7192, p<0.001], υπόστρωμα (substrate) [F(2,38)=4.5848, p<0.001] και κατάσταση υγείας (condition) [F(1,38)=11.786, p<0.001].



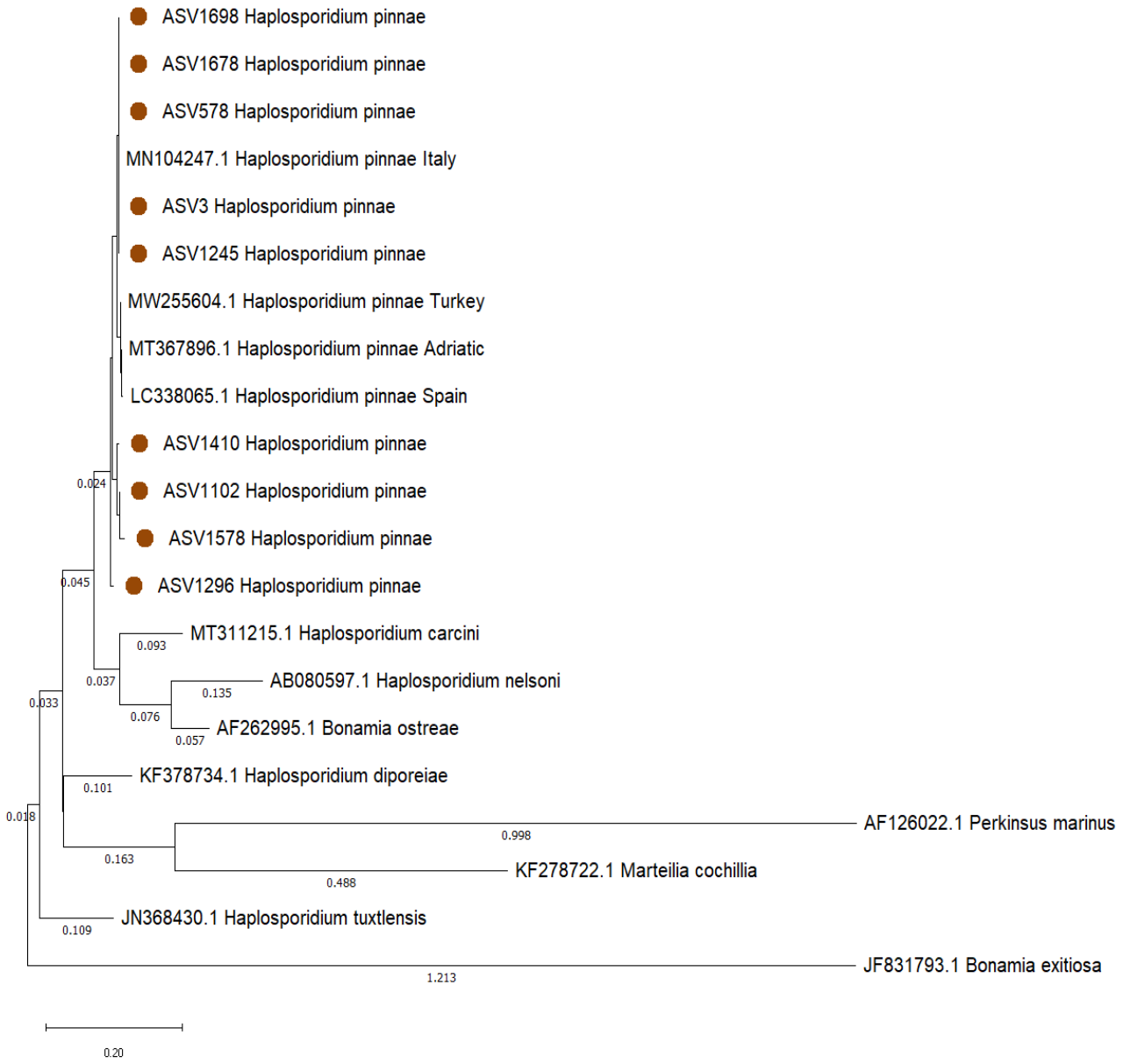
Γράφημα 6: Η nMDS για τα άτομα από κάθε πληθυσμό. Με διαφορετικό χρώμα επισημαίνεται η περιοχή συλλογής και με διαφορετικό σχήμα η κατάσταση κατά τη συλλογή (Healthy = Υγιή, Sick_Persumed_Healthy = Ασθενή Φαινομενικά Υγιή, Sick_Persumed_Moribund = Ημιθανή ή Πρόσφατα Νεκρά).

3.2.3. Παθογόνα Σχετιζόμενα με το ΜΜΕ της *P. nobilis*

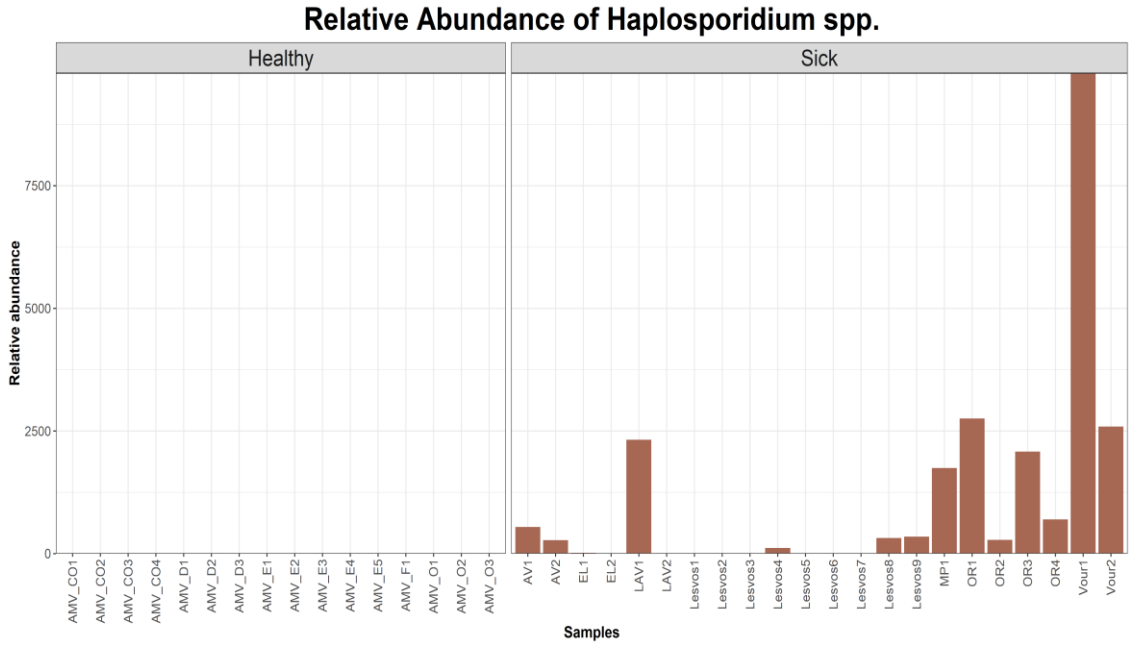
3.2.3.1. Haplosporidium pinnae

Το *H. pinnae* εντοπίστηκε στην ανάλυση μετακωδικοποίησης του 18S rRNA, αλλά και του 16S rRNA (9 και 4161 ASVs αντίστοιχα), καθώς ως ευκαρυωτικός οργανισμός έχει γονίδιο 18S rRNA πυρηνικής προέλευσης και 16S rRNA μιτοχονδριακής προέλευσης. Η ταξινομία με τη Silva 132 προσδιόρισε τα ASVs έως το επίπεδο της τάξης (Haplosporida) και με BLAST στη βάση του NCBI επιβεβαιώθηκε ότι πρόκειται για *Haplosporidium pinnae.* Τα αποτελέσματα επαλήθευσαν την αρνητική PCR (βλ. 3.1.2 και Πίνακα 6) του πληθυσμού του Αμβρακικού, αν και σε τρία άτομα βρέθηκε το ASV3 του 18S rRNA (reads = 1 ανά πίννα). Στις πίννες από την Αυλίδα, τον Ωρωπό, τη

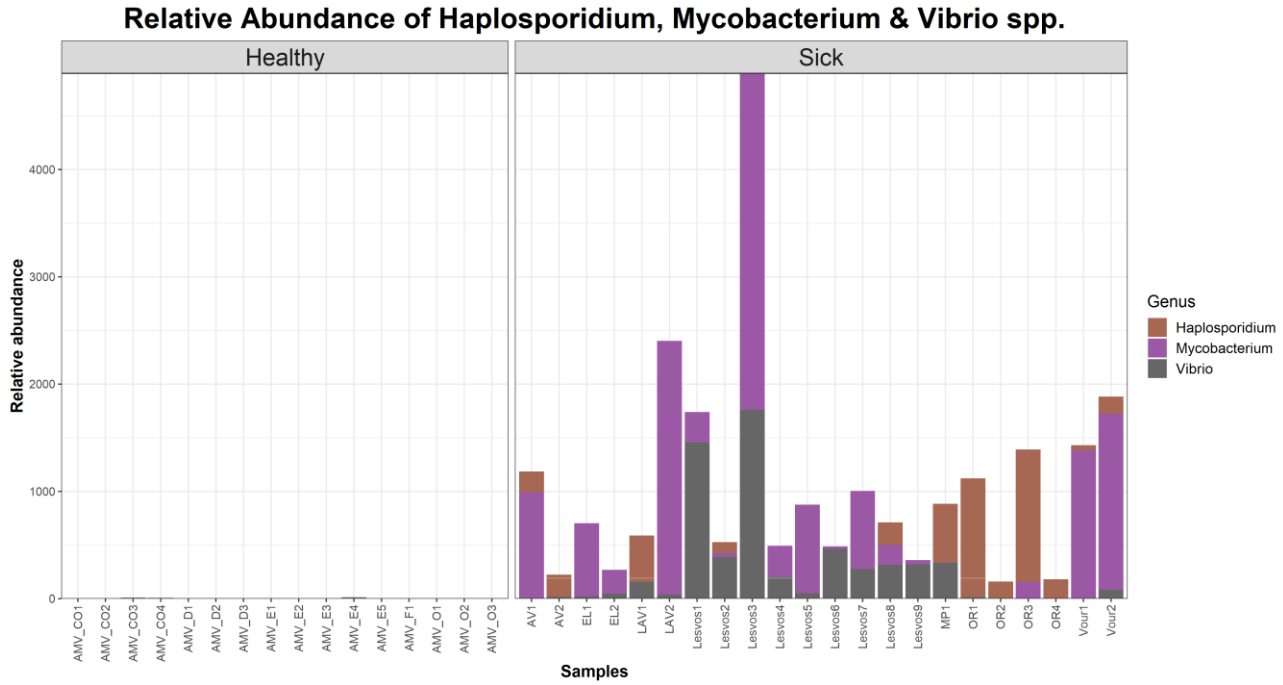
Βουρβουρού και στη πίννα LAV1 από το Λαύριο βρέθηκαν ASVs *H. pinnae* και για τα δύο γονίδια. Στις πίννες από την Ελούντα βρέθηκαν μόνο ASVs στο 18S rRNA και το ίδιο και στο LAV2. Στα δείγματα της Λέσβου, σε ορισμένα άτομα βρέθηκαν ASVs μόνο στο 18S rRNA (Lesvos 4, Lesvos 7, Lesvos9) ή μόνο στο 16S rRNA (Lesvos 2, Lesvos 5) και σε ορισμένα και στα δύο γονίδια (Lesvos 3, Lesvos 6, Lesvos 8). Διαγραμματικά φαίνεται το φυλογενετικό δέντρο με τα ASVs 18S rRNA της παρούσας μελέτης, αλληλουχιών *H. pinnae* από άλλες περιοχές και άλλων συγγενικών ειδών (Γράφημα 7) και οι αφθονίες των reads των ASVs στα γραφήματα 8 (18S rRNA) και 9 (16S rRNA).



Γράφημα 7: Δέντρο μέγιστης πιθανοφάνειας με αλληλουχιές με τα ASVs 18S rRNA του *H. pinnae* (●) και αλληλουχίες αναφοράς. Όσες αλληλουχίες αναγράφουν κάποια τοποθεσία (π.χ. Turkey) προήλθαν από πίννες στην αντίστοιχη περιοχή.



Γράφημα 8: Η αφθονία των reads από ASVs του γένους *Haplosporidium* από τη μετακωδικοποίηση του 18S rRNA ανά πίννα.



Γράφημα 9: Η αφθονία των reads από ASVs των *Haplosporidium*, *Mycobacterium* και *Vibrio* από τη μετακωδικοποίηση του 16S rRNA ανά πίννα.

3.2.3.2. *Mycobacterium* spp.

Είδη του γένους *Mycobacterium* εντοπίστηκαν σε 224 ASVs κατόπιν BLAST όλων των αλληλουχιών βακτηρίων που η Silva δεν μπόρεσε να ταυτοποιήσει. Στον πληθυσμό του

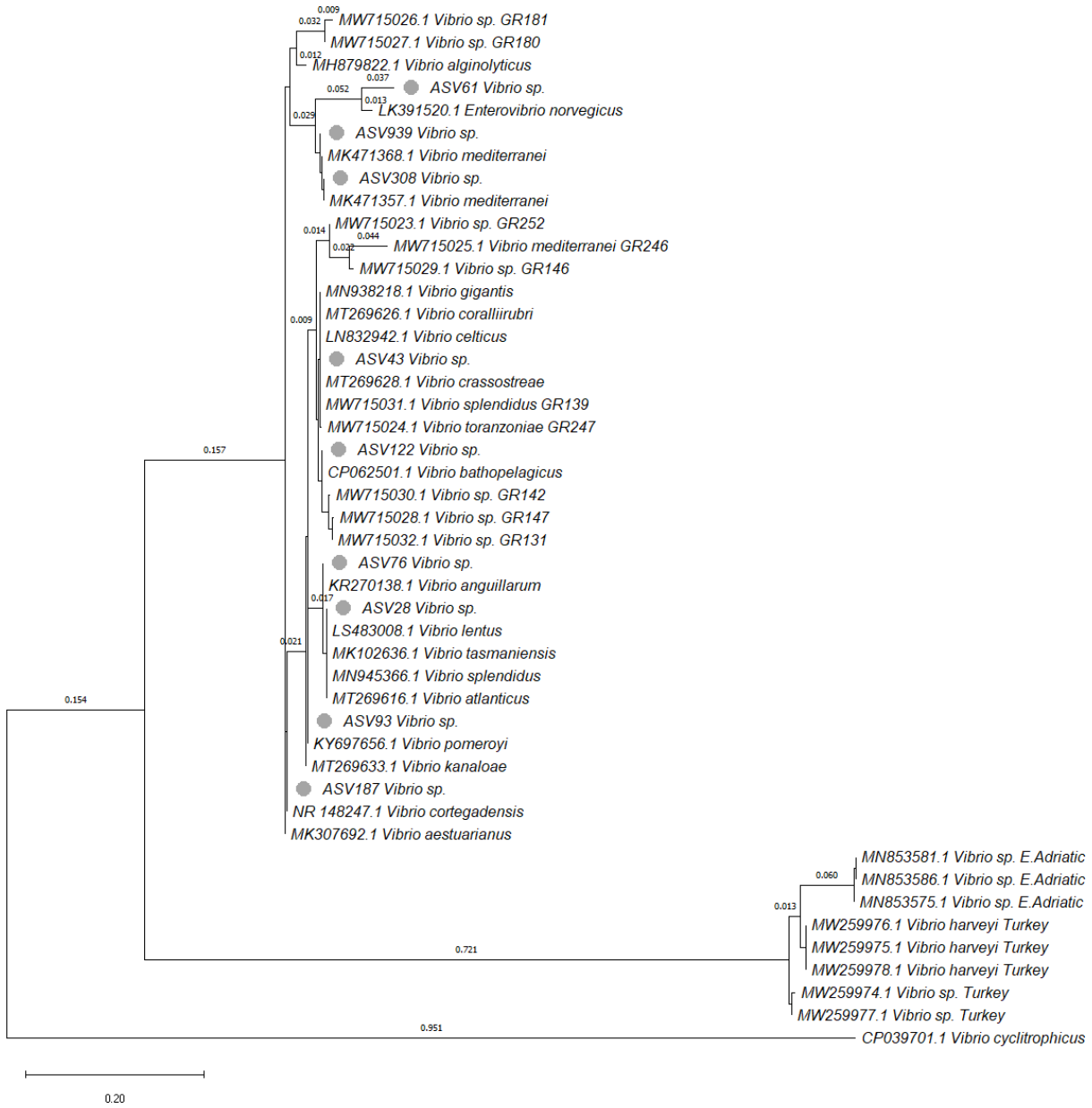
Αμβρακικού δεν εντοπίστηκε *Mycobacterium* spp. εκτός από τρείς πίννες (AMV D2, AMV F1 και AMV CO3 με reads < 5 ανά πίννα). Θετικοί ήταν επίσης οι πληθυσμοί της Ελούντας, της Λέσβου και της Βουρβουρούς, καθώς και 1 άτομο από τον Ωρωπό (OR3), ένα από την Αυλίδα (AV1) και ένα από το Λαύριο (LAV2). Η πίννα από το Μπαλί (MP1), μια από τον Ωρωπό (OR1) και μια από το Λαύριο (LAV1) είχαν reads < 3, ενώ δύο πίννες από τον Ωρωπό (OR2 και OR4) και μία από την Αυλίδα (AV2) ήταν αρνητικές (Πίνακας 6 και Γράφημα 9).

Το 97.7% των reads προήλθε από το ASV9, το οποίο είχε ταύτιση 100% με πολλαπλά είδη του συμπλέγματος *Mycobacterium simiae* (*M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heidelbergense*, *M. parmense*, *M. stomatepiae*, *M. florenticum* και το *M. shigaense*). Συνεπώς δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστεί το ακριβές είδος.

3.2.3.3. *Vibrio* spp.

Είδη του γένους *Vibrio* εντοπίστηκαν σε 565 ASVs, όπως προσδιορίστηκαν ταξινομικά από την Silva. Στον πληθυσμό του Αμβρακικού εντοπίστηκαν βακτήρια του γένους *Vibrio* σε 11 πίννες (reads/πίννα < 15) και οι υπόλοιπες πέντε πίννες ήταν αρνητικές. Ο πληθυσμός του Ωρωπού, της Αυλίδας και μια πίννα από την Βουρβουρού (Vour1) είχαν επίσης μικρές αφθονίες *Vibrio* (reads/πίννα < 16), ενώ οι υπόλοιπες πίννες (Ελούντα, Μπαλί, Λέσβος, Λαύριο και Vour2) παρουσίασαν υψηλότερες αφθονίες σε *Vibrio*.

Το 85.7% των reads προήλθε από εννέα ASVs (ASV28, ASV61, ASV43, ASV122, ASV76, ASV93, ASV187, ASV290, ASV308). Από αυτά τα ASVs, όλα εκτός του ASV61 και ASV308 ταυτίστηκαν με 99.3% ή περισσότερο με *Vibrio* του κλάδου Splendidus (*V. tasmaniensis, V. cyclitrophicus, V. lentus, V. atlanticus, V. crassostreae, V. corallirubri, V. gigantis, V. celticus, V. bathopelagicus, , V. pomeroyi*), του κλάδου Harveyi (*V. alginolyticus,*), του κλάδου Anguillarum (*V. anguillarum, V. aesturianus*) το ASV61 παρουσίασε ομοιότητα κατά 96% με ορισμένα ακαλλιέργητα βακτήρια και 95.5% ομοιότητα με *Enterovibrio norvegicus*, ενώ το ASV 308 και άλλα 14 σπανιότερα ASVs ταυτίστηκαν με ομοιότητα άνω του 97% με *V. mediterranei* και το *V. shilonii* (Γράφημα 10). Όλα τα ASVs όπου παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με το *V. mediterranei* ήταν παρόντα μόνο στη πίννα από το Μπαλί και αυτές του Λαυρίου (τρία άτομα συνολικά).



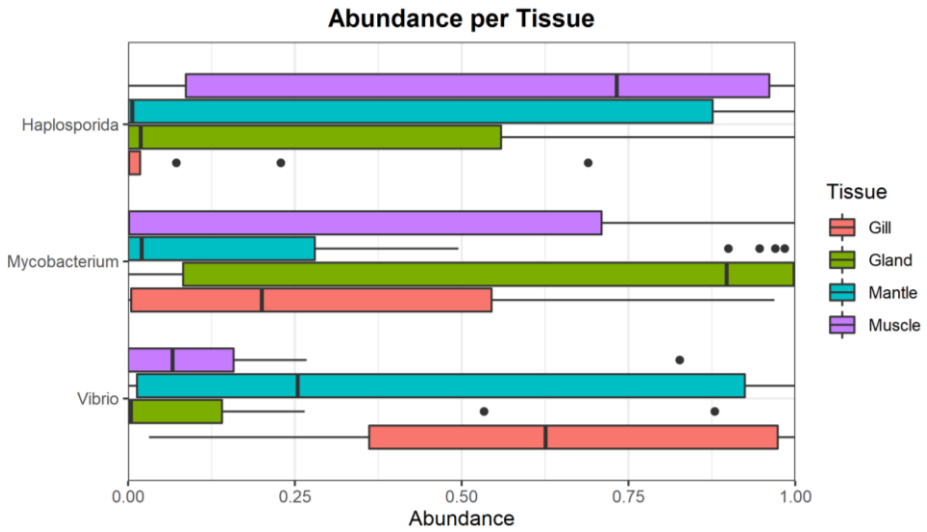
Γράφημα 10: Φυλογενετικό δέντρο που δείχνει τις ομοιότητες των ASVs του 18S rRNA για τα Vibrio spp. (●) και αλληλουχιών αναφοράς. Όσες αλληλουχίες αναφέρουν χώρα, π.χ. "Turkey", "Spain", προήλθαν από πίννες στην αντίστοιχη περιοχή.

3.2.3.4. Παρουσία Haplosporidium, Mycobacterium, Vibrio σε Διαφορετικούς Ιστούς σε ασθενή άτομα

Για τη σύγκριση της αφθονίας του 16S rRNA των τριών παθογόνων (*H. pinnae, Mycobacterium* spp. και *Vibrio* spp.) μεταξύ τεσσάρων οργάνων (βράγχια, πεπτικός αδένας, μανδύας και μυς) πραγματοποιήθηκε one-way ANOVA. Η one-way ANOVA έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά τουλάχιστον μεταξύ δυο οργάνων και για τα τρία παθογόνα. Για το *H. pinnae* ήταν

αυξημένο κυρίως στον μυ ($p = 0.044$, $Eta^2 = 0.12$), για τα *Mycobacterium* spp. στον πεπτικό αδένα ($p = 0.010$, $Eta^2 = 0.16$), και στα *Vibrio* spp. στα βράγχια ($p < 0.001$, $Eta^2 = 0.27$).

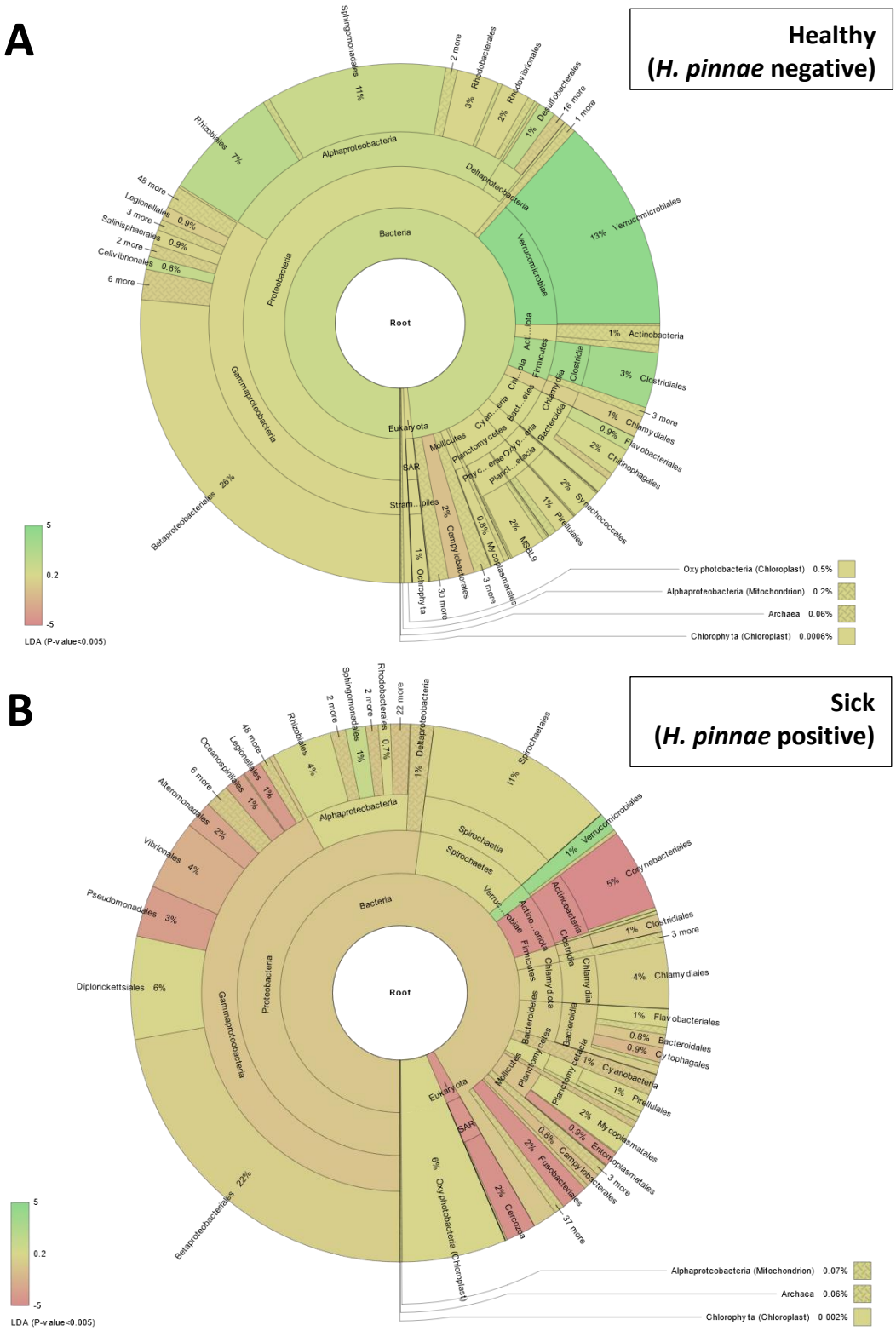
Το τεστ Tukey's HSD για πολλαπλές συγκρίσεις έδειξε ότι η αφθονία του *H. pinnae* διέφερε σημαντικά μεταξύ του μανδύα και του μυ ($p = 0.028$, 95% C.I. = [0.038, 0.908]). Η αφθονία των *Mycobacterium* spp. διέφερε μεταξύ μανδύα και πεπτικού αδένα ($p = 0.009$, 95% C.I. = [-0.711, -0.789]). Τέλος, οι αφθονία των *Vibrio* spp. διέφερε μεταξύ μανδύα και πεπτικού αδένα ($p = 0.01$, 95% C.I. = [0.061, 0.589]), μεταξύ βράγχιων και πεπτικού αδένα ($p < 0.001$, 95% C.I. = [-0.815, -0.187]) και μεταξύ βράγχιων και μυ ($p = 0.007$, 95% C.I. = [-0.833, -0.102]).



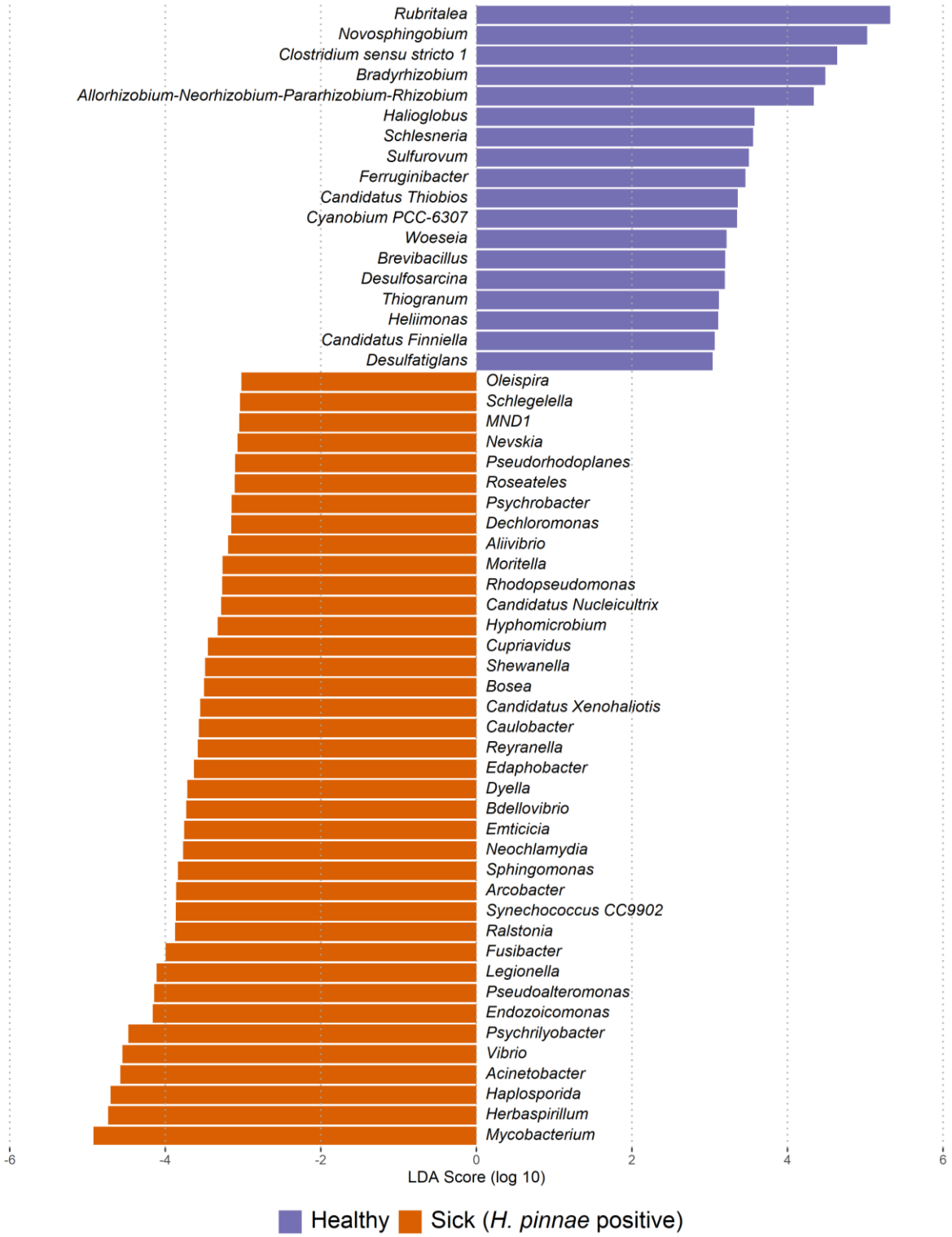
Γράφημα 11: Σύγκριση της αφθονίας του H. pinnae, Mycobacterium spp. και Vibrio spp. μεταξύ διαφορετικών οργάνων των ασθενών ατόμων.

3.2.4. Σύγκριση Μικροβιώματος Υγιών και Ασθενών *P. nobilis*

Συγκρίνοντας το συνολικό μικροβίωμα του υγιούς πληθυσμού με αυτό των ασθενών, φαίνεται διαφορά στη σύσταση του (Γράφημα 12). Στις υγιείς πίννες, το 99% των reads είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί και 1% ευκαρυωτικοί (εκ των οποίων το 98% είναι Diatomea), ενώ στις ασθενείς το 98% είναι προκαρυωτικοί 2% ευκαρυωτικοί (εκ των οποίων το 89% είναι *H. pinnae*). Τα φύλα προκαρυωτικών οργανισμών με τα περισσότερα reads στις υγιείς πίννες είναι τα Proteobacteria (62%), τα Verrucomicrobia (13%), τα Bacteroidetes (8.1%), τα Spirochaetes (5%) και τα Firmicutes (4%). Στις ασθενείς πίννες, πιο άφθονα είναι τα Proteobacteria (57%), τα Spirochaetes (12%), τα Actinobacteriota (6%), τα Chlamydiota (4%) και τα Bacteroidetes (4%). Μεγάλη διαφορά παρατηρείται εντός της κλάσης των Proteobacteria, όπου στα υγιή τα Gammaproteobacteria αποτελούν το 33% των συνολικών reads προκαρυωτικών οργανισμών, τα Alphaproteobacteira το 21% και τα Deltaproteobacteria το 3%, ενώ στα ασθενή, τα Gammaproteobacteria αποτελούν το 46%, Alphaproteobacteria το 9% και τα Deltaproteobacteria το 1%.



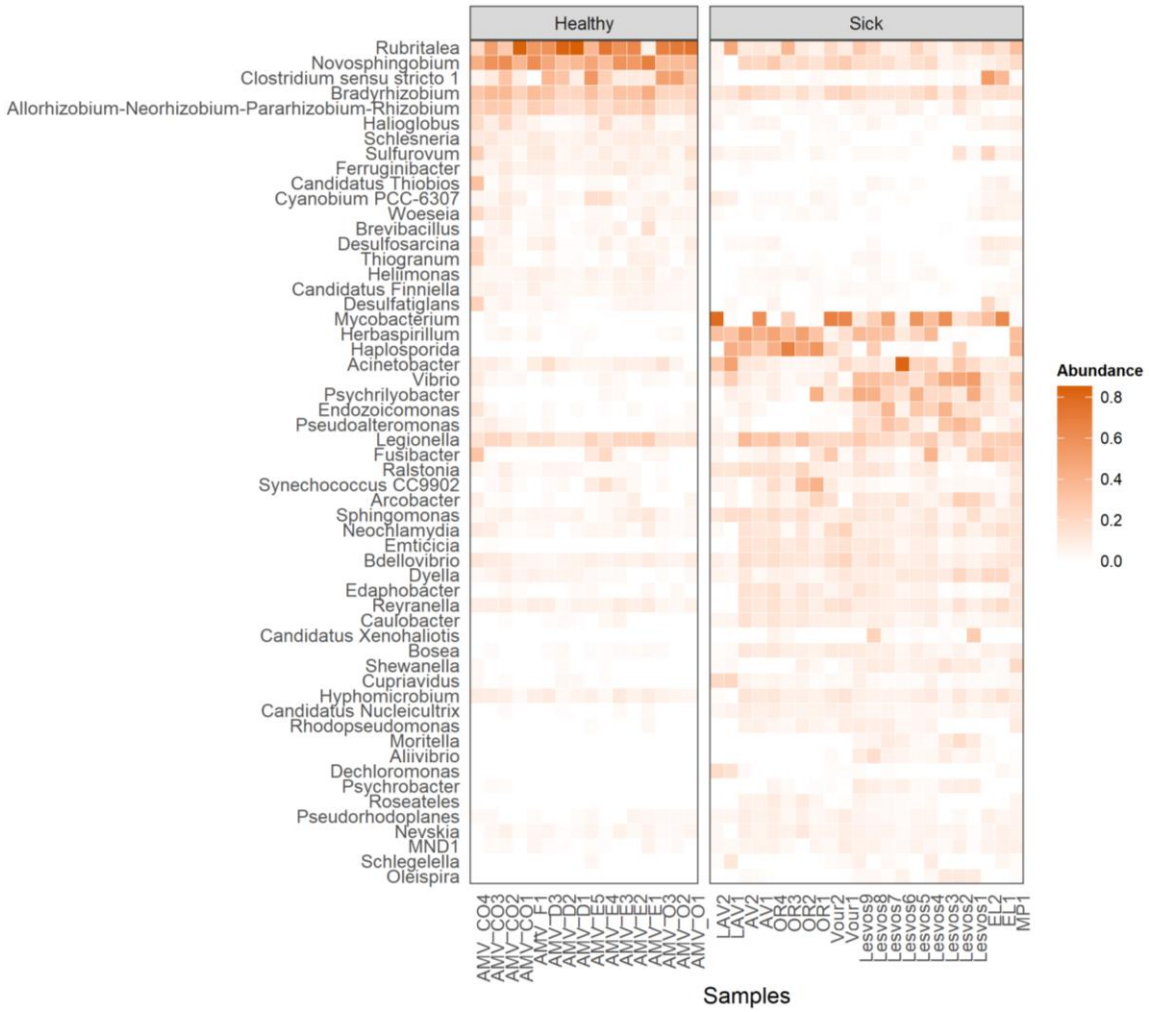
Γράφημα 12: Η μικροβιακή βιοποικιλότητα του 16S rRNA στις υγιείς πίννες (α) και στις ασθενείς (β) σε επίπεδο βασιλείου, φύλου, τάξης και κλάσης. Με κόκκινο χρωματίζονται οι ταξινομικές ομάδες πιο άφθονες στις ασθενείς πίννες (LDA < -2), με πράσινο οι άφθονες ταξινομικές ομάδες στις υγιείς (LDA > 2) και με κίτρινο αυτές που δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των υγιών και ασθενών ατόμων.



Γράφημα 13**:** Ανάλυση LEfSe που παρουσιάζει τα γένη των οποίων οι αφθονίες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ υγιών και ασθενών ατόμων βάσει του τεστ Krushkal-Wallis με $p < 0.05$. Στο παρόν γράφημα παρουσιάζονται από τα συνολικά 143 γένη-δείκτες τα 56 με LDA < -3 και LDA > 3 (πιο άφθονα στα ασθενή και υγιή αντίστοιχα).

Η ανάλυση LEfSe εντόπισε 143 γένη-δείκτες (markers) τα οποία διέφεραν μεταξύ των υγιών και των ασθενών ατόμων με |LDA| > 2 και P-value < 0.05. Πιο άφθονα στις υγιείς πίννες ήταν 48 γένη-δείκτες, ενώ τα υπόλοιπα 95 στις ασθενείς πίννες (Γραφήματα 13 και 14). Τα LDA παρουσιάζονται με θετικό ή αρνητικό πρόσημο ανάλογα με την αυξημένη αφθονία στις υγιείς ή ασθενείς πίννες αντίστοιχα για να είναι ευκολότερος ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο ομάδων.

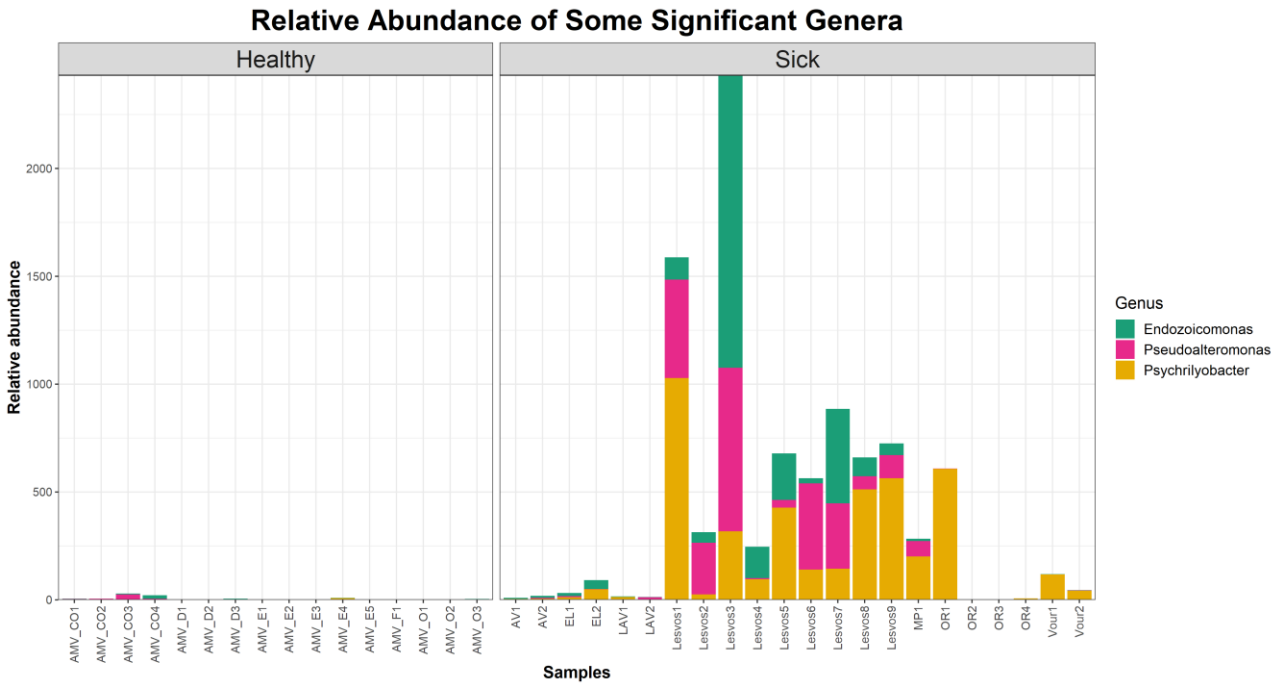
Τα γένη με το υψηλότερο LDA είναι τα *Rubritalea* spp. (167 ASVs), *Novosphingobium* spp. (44 ASVs), *Clostridium* sensu stricto spp. (26 ASVs), *Bradyrhizobium* spp. (29 ASVs) και *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* spp. (39 ASVs). Τα γένη με το χαμηλότερο LDA είναι τα *Mycobacterium* spp. (222 ASVs), *Herbaspirillum* spp. (186 ASVs), *Haplosporidium* spp. (8044 ASVs), *Acinetobacter* spp. (614 ASVs), *Vibrio* spp. (4125 ASVs), *Psychrilyobacter* spp. (47 ASVs), *Endozoicomonas* spp. (135 ASVs) και *Pseudoalteromonas* spp. (131 ASVs). Παρατηρείται ότι τα τρια χαρακτηρισμένα παθογόνα του ΜΜΕ είναι γένη-δείκτες με πολύ χαμηλά LDA (LDA < -4).



Γράφημα 14**:** Heatmap των τετραγωνικών ριζών των σχετικών αφθονιών από τα 56 γένη-δείκτες με LDA < -3 και LDA > 3 (πιο άφθονα στα ασθενή και τα υγιή αντίστοιχα). Για το γένος *Haplosporidium* οι αφθονίες που φαίνονται είναι από το γονίδιο 16S rRNA.

3.2.4.1. Βακτήρια Ιδιαίτερου Ενδιαφέροντος

Με την ανάλυση LEfSe παρατηρήθηκαν ορισμένα βακτήρια που διέφεραν μεταξύ των δύο ομάδων. Πιο συγκεκριμένα ήταν μειωμένα ή απόντα στα υγιή άτομα και αυξημένα στα ασθενή άτομα και, κατά συνέπεια, θα μπορούσαν να είναι δυνητικά ευκαιριακά παθογόνα. Η αφθονία ανά άτομο όσων έχουν |LDA| > 3 παρουσιάζεται και στο γράφημα 14, αλλά κρίθηκε σκόπιμο τρία από αυτά να παρουσιαστούν πιο λεπτομερώς (Γράφημα 15). Οι λόγοι για τους οποίους αποτελούν ενδιαφέροντα ευρήματα περιγράφονται αναλυτικότερα στη συζήτηση (4.3).



Γράφημα 15: : Η αφθονία reads ASVs των *Endozoicomonas*, *Pseudoalteromonas* και *Psychrilyobacter* ανά πίννα.

Σημαντικότερο θεωρήθηκε το *Endozoicomonas* spp., το οποίο εντοπίστηκε σε 135 ASVs που προσδιορίστηκαν ταξινομικά από τη Silva. Στον πληθυσμό του Αμβρακικού υπήρχαν σε 9 άτομα πολύ μικρές αφθονίες (reads/πίννα < 15), ομοίως και για τις πίννες από τον Ευβοϊκό και Βουρβουρού, το Μπαλί και μία από την Ελούντα (EL1), ενώ ήταν πιο άφθονα στην άλλη πίννα από την Ελούντα και σε αυτές της Λέσβου. Το 91.2% των reads προήλθε από τρία ASVs (ASV57, ASV64, ASV123) τα οποία έμοιαζαν κατά 96-97% με τα είδη *E. elysicola*, *E. montiporae* και *E. eunceicola.*

Επίσης, παρατηρήθηκε το γένος *Psychrilyobacter*, με 47 ASVs, εκ των οποίων το 98.6% των reads προήλθε από τα ASV36 και ASV40, τα οποία ταυτίστηκαν κατά 100% με το είδος *P. atlanticus*. Στον πληθυσμό του Αμβρακικού υπήρχαν reads < 10, αλλά σε ορισμένες πίννες των υπόλοιπων περιοχών ήταν αυξημένη η αφθονία του.

Τέλος, τα *Pseudoalteromonas* spp. ήταν άφθονα κυρίως στο Μπαλί και τη Λέσβο, δεν βρέθηκαν καθόλου στη Βουρβουρού, την Αυλίδα και τον Ωρωπό και στον Αμβρακικό, με εξαίρεση μια πίννα (AMV CO3), είχε reads < 5. Το 80% των reads προήλθε από το ASV32, το οποίο ταυτίστηκε κατά 100% με πολλά είδη του γένους (*P. carrageenovora, P. atlantica, P. hodoensis, P. undina, P. tetraodonis, P. distincta*).

4. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη έγινε αξιολόγηση της κατάστασης πληθυσμών *P. nobilis* από την Ελλάδα με χρήση μοριακών τεχνικών. Παρόμοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν για ελληνικούς πληθυσμούς (Σαραφίδου, 2019; Lattos, Giantsis, Karagiannis and Michaelidis, 2020; Zotou *et al.*, 2020; Lattos, Bitchava, *et al.*, 2021; Lattos, Feidantsis, *et al.*, 2021), όμως στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος για τα τρία κύρια παθογόνα (*H. pinnae*, *Mycobacterium* spp. και *Vibrio* spp.) σε πίννες που συλλέχθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές από την έναρξη του ΜΜΕ. Επίσης είναι η πρώτη εργασία όπου κάνει σύγκριση μεταξύ του μικροβιώματος ενός υγειούς πληθυσμού και των υπόλοιπων, που έχουν πλέον εξαφανιστεί λόγω του φαινομένου μαζικής θνησιμότητας.

4.1. Κατάσταση Ελληνικών Πληθυσμών

Οι ελληνικοί πληθυσμοί του Ευβοϊκού κόλπου (Αυλίδα, Ωρωπός, Ταξιάρχης), του Λαυρίου, της Κρήτης (Ελούντα και Μπαλί), της Λέσβου, της Ζακύνθου και του Θερμαϊκού κόλπου είχαν ελεγχθεί κατά το διάστημα 2018-2020. Η θνησιμότητα έφτανε το 100% και οι πίννες ήταν προσβεβλημένες με *H. pinnae* και με εξαίρεση τους κόλπους της Καλλονής στη Λέσβο και του Λαγανά στη Ζάκυνθο, όπου η τελευταία αναφορά φαινομενικά υγιών πληθυσμών εκεί έγινε το 2020 (Σαραφίδου, 2019; Lattos, Giantsis, Karagiannis and Michaelidis, 2020; Zotou *et al.*, 2020).

Κατά τη δειγματοληψία που έγινε την άνοιξη του 2021, δεν βρέθηκαν ζωντανές πίννες στον Ευβοϊκό κόλπο, το Θερμαϊκό κόλπο και την Κρήτη. Ωστόσο, βρέθηκε πληθυσμός από νεαρές *P. nobilis* στον Αμβρακικό κόλπο. Ο πληθυσμός ξεπερνούσε τα 100 άτομα τα οποία βρίσκονταν σε μικρό βάθος (1-2 m) ανάμεσα σε *Cymodocea nodosa*. Λόγω του δύσκολου διαχωρισμού των νεαρών *P. nobilis* από τις νεαρές *P. rudis* βάσει μορφολογίας (Nebot-Colomer *et al.*, 2016) και της παρατηρούμενης εξάπλωσης της *P. rudis* από την έναρξη του ΜΜΕ (Donato *et al.*, 2021; Kersting and Ballesteros, 2021), τέθηκε το ερώτημα αν ο πληθυσμός αποτελείται όντως από *P. nobilis*, αν πρόκειται για *P. rudis*, ή ενδεχομένως για υβρίδια (Vázquez-Luis *et al.*, 2021). Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν καταγραφές παρουσίας της *P. rudis* πέραν της Δυτικής και Κεντρικής Μεσογείου (Ισπανία, Γαλλία και έως την Αδριατική θάλασσα), καθώς και ότι εκτός των πλαισίων αυτής της μελέτης, έγινε αλληλούχιση των γονιδίων του μιτοχονδριακού 16S rRNA και της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (COI) των πιννών του Αμβρακικού Κόλπου και προκύπτει ότι πρόκειται για το είδος *P. nobilis* (Σαραφίδου και Παυλούδη, αδημοσίευτα αποτελέσματα), αποκλείστηκε το ενδεχόμενο ο συγκεκριμένος πληθυσμός να είναι άλλο είδος ή υβρίδιο.

4.2. Πιθανοί Ενδιάμεσοι Ξενιστές και Κύκλος Ζωής *H. pinnae*

Λόγω της εκτεταμένης εξάπλωσης του δίθυρου *P. radiata* σε ενδιαιτήματα που ήταν γνωστή η παρουσία της πίννας χρησιμοποιώντας το κέλυφος της ως σκληρό υπόστρωμα, το συγκεκριμένο δίθυρο θεωρήθηκε ως πιθανός ενδιάμεσος ξενιστής ή φορέας του *H. pinnae.* Ομοίως συλλέχθηκαν άλλα μαλάκια (δίθυρα και γαστερόποδα) και λοιπά μετάζωα (σπόγγους, ολοθούρια και ασκίδια), όμως η PCR κανενός από τα παραπάνω δεν έδωσε θετικό σήμα για *H. pinnae.* Οι Scarpa *et al.* (2020) είναι οι μόνοι που αναφέρουν ως τώρα θετικό αποτέλεσμα μοριακής ανάλυσης σε άλλους οργανισμούς εκτός της *P. nobilis* (*Ruditapes decussatus* και *Mytilus galloprovincialis*), ακόμη και σε ορισμένα δείγματα που είχαν συλλεχθεί το 2014, πριν την έναρξη του ΜΜΕ. Το γεγονός ότι είχαν θετικό σήμα σε άλλα δίθυρα, δεν σημαίνει ωστόσο ότι οι συγκεκριμένοι οργανισμοί ήταν ασθενείς, διότι μπορεί το *H. pinnae* ήταν μέρος του φυσιολογικού μικροβιώματος τους, ή να μην προκαλούσε αλλαγές στην παθολογία τους.

Στην περίπτωση του *H. nelsoni*, συγγενικού είδους με το *H. pinnae*, είχε γίνει επίσης αναζήτηση ενδιάμεσου ξενιστή του παράσιτου στο περιβάλλον των στρειδιών που προσβάλει και είχαν δώσει θετικό σήμα διάφορα είδη μακροπανίδας, όπως πολύχαιτα και γαστερόποδα (Ford *et al.*, 2018). Στη συγκεκριμένη μελέτη δόθηκε έμφαση στο γεγονός ότι αυτοί οι οργανισμοί διαβιούν πολύ κοντά στα δίθυρα και τρέφονται με ίζημα και περιττώματα των δίθυρων, με αποτέλεσμα να είναι πολύ πιθανό να βρεθούν κύτταρα *H. nelsoni* στον οργανισμό τους χωρίς να υπάρχει πραγματική μόλυνση. Επίσης, ακόμη και αν το παράσιτο χρησιμοποιεί έναν οργανισμό ως ξενιστή, ενδέχεται να είναι αδιέξοδος ξενιστής (dead-end host), δηλαδή να μην είναι κατάλληλος για την ολοκλήρωση του βιολογικού του κύκλου και την επαναμόλυνση του κύριου ξενιστή του (Baum, 2008).

Στη παρούσα εργασία, τα δείγματα λοιπών θαλάσσιων οργανισμών συλλέχθηκαν την άνοιξη του 2021 από την περιοχή του Ευβοϊκού Κόλπου (Ωρωπός και Ταξιάρχης), στην οποία δεν υπάρχουν πλέον ζωντανές πίννες. Επίσης συλλέχθηκαν από τον Αμβρακικό Κόλπο, που ο πληθυσμός είναι υγιής όπως προκύπτει από την εικόνα τους στο πεδίο και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Αν και θα ήταν πιο πλήρης η εικόνα από τον Ευβοϊκό αν τα δείγματα είχαν συλλεχθεί την ίδια περίοδο με τις πίννες, δεν υπάρχει κάποια ένδειξη ότι κάποιος από αυτούς τους οργανισμούς ήταν φορέας ή ξενιστής και ότι το πρώτιστο μπορεί να επιβιώσει σε άλλα δίθυρα απουσία της πίννας.

4.3. Σύγκριση μικροβιώματος

Οι μικροοργανισμοί αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της βιομάζας των θαλάσσιων οικοσυστημάτων. Τα δίθυρα, όπως και οι περισσότεροι θαλάσσιοι οργανισμοί, έχουν στον οργανισμό τους πληθώρα συμβιωτικών μικρόβιων (Egan and Gardiner, 2016). Η σχέση μεταξύ των

διάφορων ειδών και του ξενιστή τους είναι πολύπλοκη και ο τρόπος με τον οποίο συνεργάζονται με τον οργανισμό του ξενιστή τους παραμένει άγνωστος. Σύμφωνα με τη θεωρία της δυσβίωσης, πολλές ασθένειες οφείλονται αποκλειστικά ή εν μέρει στο γεγονός ότι το μικροβίωμα ενός οργανισμού είναι διαφοροποιημένο από την «υγιή» του κατάσταση (Petersen and Round, 2014). Έτσι, συγκρίνοντας υγιή και ασθενή άτομα, αναμένεται να παρατηρηθούν αποκλίσεις στην αφθονία οργανισμών που αποτελούν το «φυσιολογικό μικροβίωμα» ή απουσία τους, παρουσία υποχρεωτικών ή ευκαιριακών παθογόνων και ενδεχομένως και σαπροφάγων μικροοργανισμών, όπου μπορούν να εγκατασταθούν στους ιστούς ενός ασθενή ή πρόσφατα νεκρού ξενιστή (Burge *et al.*, 2013; Egan and Gardiner, 2016).

Στην παρούσα μελέτη, δεν υπήρχε έντονη διάκριση στους δείκτες ποικιλότητας ανάμεσα στις υγιείς πίννες και τις ασθενείς, αλλά οι ασθενείς, λόγω του γεγονότος ότι είναι μολυσμένες από παθογόνα που φυσιολογικά απουσιάζουν από το μικροβίωμά τους, τείνουν να έχουν υψηλότερη αφθονία σε διαφορετικά ASVs. Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν στα δίθυρα του γλυκού νερού *Actinonaias pectorosa*, μεταξύ φαινομενικά υγιών και φαινομενικά ασθενών ατόμων (Richard *et al.*, 2021).

Στα υγιή, πολύ άφθονα ήταν τα γένη *Bradyrhizobium* και *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, τα οποία είναι αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, χαρακτηριστικά στο ριζικό σύστημα διάφορων φυτών (ρύζι, ψυχανθή κ.α.) (Ormeño-Orrillo and Martínez-Romero, 2019). *Bradyrhizobium* spp. έχουν απομονωθεί από το γυμνοβράγχιο *Rostanga alisae* (Zhukova *et al.*, 2022), από ορισμένα μύδια με άγνωστο λειτουργικό ρόλο (King *et al.*, 2019), ενώ η παρουσία συμβιωτικών, αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων σε δίθυρα μαλάκια έχει παρατηρηθεί στα βράγχια, ιδίως σε είδη που ανοίγουν στοές σε ξύλα (Hickman *et al.*, 2020; Zhukova *et al.*, 2022).

Άφθονο ήταν και το γένος *Novosphingobium*, το οποίο οι Minton et al. (2015) παρατήρησαν ως ένα από τα πιο άφθονα γένη σε βιοφίλμ του κελύφους θαλάσσιων γαστερόποδων, αλλά ο ρόλος του είναι άγνωστος. Τέλος ήταν αυξημένη η παρουσία των *Rubritalea* spp., το οποίο σε θρεπτικό υλικό σχηματίζει αποικίες πορτοκαλί χρώματος πλούσιες σε βιταμίνες, καροτενοειδή και αντιβιοτικές ουσίες. Έχει απομονωθεί από κάποιο θαλάσσιο ασκίδιο, του οποίου θεωρήθηκε συμβιωτικό, αλλά παρατηρήθηκε ως αρκετά άφθονο σε φαινομενικά υγιείς *P. nobilis*. Οι συγγραφείς θεώρησαν ότι ενδέχεται να ωφελεί την πίννα με την παραγωγή καροτενοειδών (Yoon *et al.*, 2011; Pavlinec *et al.*, 2020).

Στα ασθενή άτομα, ορισμένα από τα πιο άφθονα γένη είναι γνωστά για την παθογόνο δράση τους, όπως τα *Haplosporidium, Mycobacterium* και *Vibrio*, τα οποία έχουν υποδειχτεί ως αίτια για το ΜΜΕ στις πίννες. Αναλυτικότερα σχολιάζονται στην υποενότητα 4.4.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αυξημένη αφθονία του γένους *Endozoicomonas*. Τα *Endozoicomonas* spp. θεωρούνται συνήθως επωφελή για θαλάσσιους οργανισμούς και αναφέρονται ως πιθανοί κύριοι συμβιωτικοί οργανισμοί (core symbionts) των κοραλλιών *Stylophora pistillata* και *Pocillopora verrucosa* (Neave *et al.*, 2016). Παράλληλα, στο δίθυρο τις οικογένειας Pinnidae, *Atrina pectinata,* έχει καταγραφεί ένα νέο είδος, το *Endozoicomonas atrinae*, χωρίς περιγραφή του ρόλου του (Hyun *et al.*, 2014). Παρόλα αυτά, το *Ca*. *E. cretensis* προκαλεί επιθυλιοκύστεις και θνησιμότητα σε προνύμφες ιχθύων υδατοκαλλιεργειών (Katharios *et al.*, 2015; Qi *et al.*, 2018).

Αυξημένα ήταν και τα *Acinetobacter* spp. τα οποία μπορεί να συγκεντρωθούν μέσω της διηθηματοφαγίας σε μεγάλη αφθονία στα δίθυρα (π.χ. παρουσία στον πεπτικό αδένα του δίθυρου του γλυκού νερού *Villosa nebulosa*) και μπορεί να δράσουν ως παθογόνα (Zannella *et al.*, 2017; Aceves *et al.*, 2018). Ένα άλλο άφθονο είδος στις ασθενείς πίννες της παρούσας μελέτης και σε άλλες είναι το *Psychrilyobacter* (Lattos *et al*., 2021; Lattos *et al*., 2020b). Για το γένος αυτό δεν υπάρχουν καταγεγραμμένες θνησιμότητες σε δίθυρα, αλλά έχει παρατηρηθεί σε άτομα *Crassostrea gigas* ανθεκτικά στον Ostreid herpesvirus (OsHV) και σε άτομα του ίδιου είδους που είχαν μολυνθεί πειραματικά (challenge experiment) (de Lorgeril *et al.*, 2018; King *et al.*, 2019).

Το γένος *Pseudoalteromonas* συσχετίζεται θετικά με υγιή μαλάκια και μικρο- ή μακροφύκη. Στα δίθυρα έχει βρεθεί στην αιμολέμφο (π.χ. στο *Modiolus kurilensis*), που παράγει ενεργούς μεταβολίτες έναντι ιών, βακτηρίων και φυτοπλαγκτού και θεωρείται ότι έχει προστατευτικό ρόλο. Επίσης οι μεταβολίτες του αναστέλλουν ή θανατώνουν είδη του γένους *Vibrio* και *Shewanella* και παρουσιάζει κυνηγετική συμπεριφορά ("wolfpack predation") (Eliseikina *et al.*, 2021). Από την ανάλυση μετακωδικοποίησης βρέθηκε ότι στα υγιή αποτελούσε το 0.04% των συνολικών reads ενώ στα ασθενή το 2%. Επίσης τα *Vibrio* και τα *Shewanella* ήταν μεταξύ των πιο άφθονων γενών στις ασθενείς πίννες αυτής της μελέτης, οπότε ενδεχομένως η τόσο μεγάλη αφθονία των *Pseudoalteromonas* να οφείλεται στην αφθονία της τροφής τους. Παρόλα αυτά, το είδος *P. piscicida* έχει προκαλέσει μαζικές θνησιμότητες σε ψάρια (Nelson and Ghiorse, 1999) και ασθένεια (bleaching disease) σε καλλιεργούμενα φύκη (Zhang *et al.*, 2022) και το *P. agarivorans* σε σπόγγους (Romanenko *et al.*, 2003).

Άλλα λιγότερο άφθονα βακτήρια με ενδεχόμενη δράση ως παθογόνο είναι το *Ca. Xenohaliotis*, διότι σε ένα είδος μαλακίου (*Haliotis* spp.) το συγγενές είδος *Xenohaliotis californiensis* είναι υπεύθυνο για την ασθένεια Withering Syndrome of Abalone (OIE, 2019) και το *Arcobacter,* το οποίο αναφέρεται ως ευκαιριακά παθογόνο, παρόν στην αιμολέμφο μυδιών. Σε μελέτη όπου μολύνθηκαν μύδια με καλλιεργούμενο στέλεχος του είδους *Vibrio cyclitrophicus* μεταβλήθηκε η αφθονία του, πιθανόν ως απόκριση στην αλλαγή της κατάστασης υγείας του ζώου (Li *et al.*, 2019).

Επίσης τα *Aliivibrio* spp., είναι ψυχρόφιλα βακτήρια που περιλαμβάνουν παθογόνα είδη για κάποιους ιχθύες (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Lattos *et al.*, 2020a; Pavlinec *et al.*, 2020).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο ρόλος των *Legionella* spp., ενός ανθρώπινου παθογόνου που σε ολιγοτροφικά περιβάλλοντα ενσωματώνεται σε βιοφίλμ, μπορεί να εγκατασταθεί και να τραφεί με νεκρές μάζες κυττάρων και είναι γνωστό για τον ενδοκυτταρικό πολλαπλασιασμό του σε πρωτόζωα-ξενιστές (Boamah *et al.*, 2017), αν και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, τα Cercozoa (στα οποία ανήκει το *H. pinnae*) δεν ευνοούν αυτή τη συμπεριφορά του.

4.4. Αίτια Θνησιμότητας

Συνολικά, το φαινόμενο μαζικής θνησιμότητας είναι πολύπλοκο και μεταξύ ερευνητών οι απόψεις διίστανται για το κύριο αίτιο του παθογόνου. Οι Vázquez-Luis *et al.* (2017) παρατήρησαν το *Haplosporidium pinnae*, ένα νέο απλοσπορίδιο που δεν είχε εντοπιστεί μέχρι τότε. Το *H. pinnae* προκαλούσε ορατές αλλοιώσεις στον πεπτικό αδένα και επέφερε φθορά στο σύνολο του οργανισμού της πίννας. Αργότερα βρέθηκαν ιστολογικά και μοριακά μεγάλα φορτία από *Mycobacterium* spp. όπου επίσης προκαλούσαν αλλοιώσεις στους ιστούς, ενώ οι περισσότερες ασθενείς πίννες δεν ήταν μολυσμένες από *H. pinnae* (Carella *et al.*, 2019). Τέλος, παρατηρήθηκε παράλληλη μόλυνση από *H. pinnae* και *Vibrio* spp. σε ασθενείς ή πρόσφατα νεκρές πίννες και σε ορισμένες περιπτώσεις ταυτόχρονη μόλυνση και με *Mycobacterium* (Carella *et al.*, 2020; Prado *et al.*, 2020; Künili *et al.*, 2021b).

Στη παρούσα μελέτη οι πίννες από τον Αμβρακικό δεν βρέθηκαν θετικές στο *H. pinnae*, αποτέλεσμα όπου επιβεβαίωνε την καλή κλινική τους εικόνα. Τα ελάχιστα reads ASVs σε τρία άτομα πιθανόν να οφείλονται σε index hopping, δηλαδή εσφαλμένη κατανομή των αποτελεσμάτων στα δείγματα της DNA βιβλιοθήκης κατά τη προετοιμασία για την αλληλούχιση. Επιπλέον, από παρακολούθηση του πληθυσμού έξι μήνες μετά, οι πίννες παράμεναν φαινομενικά υγιείς, ενώ στη περίπτωση της Ελούντας όπου ήταν επίσης φαινομενικά υγιείς και αποδείχτηκαν μολυσμένες από *H. pinnae*, εντός μισού έτους ο πληθυσμός είχε εξαφανιστεί. Όσον αφορά τα *Mycobacterium* spp. και *Vibrio* spp. βρέθηκαν σε λίγες υγιείς πίννες και σε πολύ μικρές αφθονίες.

Αντίθετα, οι υπόλοιπες πίννες ήταν όλες θετικές με PCR για το *H. pinnae* και σχεδόν όλες (εκτός από δύο πίννες από τη Λέσβο) και με την ανάλυση μετακωδικοποίησης. Επιπλέον, στις συγκεκριμένες πίννες είχε εντοπιστεί ιστολογικά εκτεταμένη παρουσία *H. pinnae* και ειδικότερα στις πίννες από τον Ωρωπό, την Αυλίδα, το Λαύριο, τη Λέσβο και το Μπαλί παρατηρήθηκε και *Mycobacterium* spp (Grau *et al.*, 2021). Η αφθονία του *Mycobacterium* spp. ήταν υψηλότερη στον πεπτικό αδένα σε σχέση με τον μανδύα, παρατήρηση που έγινε και από τους Grau et al. (2021), οι οποίοι σχολιάζουν ότι οι PCR με δείγμα ιστού από τον μανδύα έδιναν ψευδή αρνητικά

αποτελέσματα, κυρίως σε δείγματα που συλλέχθηκαν πριν το ΜΜΕ, διότι η μόλυνση από μυκοβακτήρια συνήθως δεν εξαπλώνεται πέρα του πεπτικού αδένα και των γύρω συνδετικών ιστών. Ωστόσο, κατά το ΜΜΕ παρατήρησαν εξάπλωση και στον μανδύα.

Το γένος *Mycobacterium* περιλαμβάνει περιβαλλοντικά στελέχη και αργά αναπτυσσόμενα βακτήρια που συνήθως προκαλούν χρόνιες μολύνσεις, αντί για μια ταχεία παθολογική κατάσταση, όπως αυτή όπου προκάλεσε το ΜΜΕ στις πίννες σε σύντομο χρονικό διάστημα. Οι Grau *et al.* (2021) αναφέρουν ότι *Mycobacterium* spp. βρέθηκε σε πίννες συλλεγμένες πριν το ΜΜΕ, αλλά στις νεότερες πίννες (πριν και κατά τη διάρκεια του ΜΜΕ) απουσίαζε. Τα δίθυρα ως διηθηματοφάγοι οργανισμοί μπορούν να προσλάβουν μυκοβακτήρια από το περιβάλλον και αυτά να διατηρηθούν στο πεπτικό τους σύστημα για μεγάλο διάστημα, ώστε σε περίπτωση διαταραχής του οργανισμού του δίθυρου (π.χ. αυξημένες θερμοκρασίες), να δράσουν ως παθογόνα (Davidovich, Morick and Carella, 2020). Αυτή η θεωρία θα μπορούσε να είναι άλλη μια αιτιολόγηση για την ελάχιστη παρουσία μυκοβακτηρίων στις πίννες του Αμβρακικού, καθώς πρόκειται για υγιή, νεαρά άτομα, ενώ οι ασθενείς πίννες είναι ταυτόχρονα μολυσμένες από πολλαπλά παθογόνα. Ενδέχεται όμως, συγκεκριμένα είδη *Mycobacterium* να μην ευθύνονται εξαρχής για ασθένεια και να είναι παρόντα ως μέρος της φυσιολογικής μικροβιοχλωρίδας των υγιών ατόμων.

Τα πιο άφθονα ASVs των *Mycobacterium* spp. έφεραν μεγαλύτερη ομοιότητα με το σύμπλεγμα του *M. simiae* και με *Mycobacterium* spp. απομονωμένα από άλλες ασθενείς πίννες. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα από πίννες στην Ιταλία και την Ελλάδα (Carella *et al.*, 2019; Lattos *et al.*, 2020; Scarpa *et al.*, 2020; Tiscar *et al.*, 2022). Κατά τη διόρθωση της ταξινομίας, εκτός από τις αλληλουχίες όπου παρουσίαζαν υψηλή ομοιότητα με *Mycobacterium* spp., υπήρχαν και ASVs που έμοιαζαν εξίσου με βακτήρια του γένους *Mycobacterium*, αλλά και με τα συγγενικά γένη *Rhodococcus* και *Gordonia*. Επιπλέον, στις υγιείς πίννες, τα *Rhodococcus* spp. αποτελούσαν το 5% και τα *Gordonia* spp. το 68% των ακτινοβακτηρίων, αλλά στις ασθενείς το 98% αποτελεί το *Mycobacterium* spp. Παρόλα αυτά, τα *Rhodococcus* και τα *Gordonia* δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ υγιών και ασθενών, διότι τα ακτινοβακτήρια στις υγιείς πίννες ήταν πολύ λιγότερα αναλογικά με τα υπόλοιπα φύλα. Οι Scarpa et al. (2020) απομόνωσαν σε καλλιέργεια *Rhodococcus erythropolis* και αναφέρουν ότι ενδεχομένως να έχει αντιβιοτική δράση και να προστατεύει τις πίννες, αλλά δεδομένης της παρουσίας του γένους μόνο σε ένα δείγμα της μελέτης τους, δεν ήταν εφικτός ο έλεγχος μιας τέτοιας υπόθεσης.

Όσον αφορά τα *Vibrio* spp. ήταν πιο άφθονα στα βράγχια των ασθενών *P. nobilis*. Εντοπίστηκαν κυρίως στις πίννες της Λέσβου και της Κρήτης, αλλά σε άλλες ασθενείς πίννες και στις υγιείς πίννες του Αμβρακικού ήταν σπανιότερα. Η πλειοψηφία των ASVs αφορά *Vibrio* του κλάδου Splendidus και του κλάδου Harveyi, ενώ και τα ASVs με μεγαλύτερη ομοιότητα με το *V. mediterranei* βρίσκονταν σε μικρές αφθονίες μόνο στις πίννες από δύο περιοχές (Λέσβος και Μπαλί). Το *V.*

mediterranei αναφέρθηκε πρώτη φορά ως κύρια αιτία θνησιμότητας από τους Prado *et al.* (2020) σε *P. nobilis* υπό συνθήκες αιχμαλωσίας και η λοιμογόνος δράση του επιβεβαιώθηκε με μόλυνση ατόμων από καλλιέργεια *V. mediterranei* (Andree *et al.*, 2021b). Στην Τουρκία το πιο κυρίαρχο είδος σε άρρωστες πίννες ήταν το *Vibrio harveyi* (40% των θετικών δειγμάτων), ενώ το *V. mediterranei* βρέθηκε μόνο στο 10% (Künili *et al.*, 2021b). Στην Ελλάδα έχουν εντοπιστεί *Vibrio* του κλάδου Splendidus (*V. splendidus, V. gigantis*, *V. crassostreaec*), του κλάδου Harveyi (*V. harveyi, V. aesturianus, V. alginolyticus)* και σε μικρότερες αφθονίες *V. mediterranei (Lattos et al., 2021; Lattos et al., 2020b)* και στην Ιταλία έχει εντοπιστεί *V. alginolyticus* σε μια περιοχή και *V. mediterranei* σε μία άλλη, σε άτομα ημιθανή ή προσφάτως νεκρά (Carella *et al.*, 2020). Αν και το *V. mediterranei* είχε αναφερθεί ως ιδιαίτερα λοιμογόνο για τις πίννες, από την παρούσα βιβλιογραφία αλλά και τα δικά μας αποτελέσματα, δεν πρόκειται για το πιο άφθονο είδος, παρά τη δυναμική του ως παθογόνο.

Η ποικιλότητα των *Vibrio* spp. στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι μεγάλη και στα δίθυρα μαλάκια υπάρχουν πολλά παραδείγματα συμβίωσης. Ιδιαίτερα τα *Vibrio* των κλάδων Splendidus και Harveyi εντοπίζονται συχνά σε δίθυρα και μπορεί να είναι ευκαιριακά παθογόνα, ιδιαίτερα ευνοούμενα από θερμοκρασίες άνω των 17°C (στην περίπτωση των Harveyi) και τη φυσιολογική κατάσταση του ξενιστή τους (μειωμένες άμυνες λόγω άλλης μόλυνσης, στρεσογόνων παραγόντων κ.α.) (Destoumieux-garzón *et al.*, 2021). Τα *Vibrio* spp. στη περίπτωση της πίννας φαίνεται να είναι ευκαιριακά παθογόνα όπου πολλαπλασιάζονται και αυξάνονται έντονα μετά από καταπόνηση του οργανισμού από την πρωταρχική μόλυνση από *H. pinnae.* Αντίστοιχα στη περίπτωση της μεγάλης θνησιμότητας σε πίννες σε συνθήκες αιχμαλωσίας, ενδέχεται ο παράγοντας όπου πυροδότησε τη θνησιμότητα να ήταν το stress των ζώων.

Αν και η υπάρχουσα βιβλιογραφία έχει ασχοληθεί κυρίως με τα τρία παραπάνω παθογόνα, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν και άλλα εν δυνάμει επιβλαβή βακτήρια για τις *P. nobilis*. Οι μελέτες μετακωδικοποίησης του μικροβιώματος στις πίννες είναι λιγοστές και εστιάζουν σε λίγα OTUs/ASVs, αλλά επίσης δεν ήταν εφικτή η σύγκριση των ασθενών ατόμων με έναν υγιή πληθυσμό, ή με *P. nobilis* πριν το ΜΜΕ, οπότε η ανάλυση LEfSe στη παρούσα μελέτη αναμένεται να υπέδειξε περισσότερους οργανισμούς ενδιαφέροντος από μια απλή επιλογή των πιο άφθονων OTUs ή γενών.

Ιδιαίτερα σημαντικός θα μπορούσε να είναι ο ρόλος του *Endozoicomonas* spp. ως δευτερεύον παθογόνο, ενώ αρκετά ενδιαφέρον θα ήταν να προσδιοριστεί ο ρόλος των *Pseudoalteromas* spp. τα οποία αναφέρονται στη βιβλιογραφία με δύο εντελώς διακριτούς και αντιφατικούς ρόλους – ως ενδοσυμβιώτες ή/και βακτήρια ασπίδες στην αιμολέμφο των δίθυρων και ως παθογόνα ικανά να προκαλέσουν θνησιμότητες σε ιχθύες και άλλους θαλάσσιους οργανισμούς. Επίσης τα γένη

Acinetobacter, *Psychrilyobacter*, *Aliivibrio* κ.α. ενδέχεται να δρουν ως ευκαιριακά παθογόνα και η δράση τους χρήζει διερεύνησης.

Συμπερασματικά, οι μελέτες για το μικροβίωμα των δίθυρων μαλακίων και της πίννας ειδικότερα είναι λιγοστές και υπάρχουν πολλοί μικροοργανισμοί για τους οποίους οι γνώσεις μας είναι περιορισμένες. Τα αίτια της θνησιμότητας φαίνονται να είναι πρωτίστως το *Haplosporidium pinnae*, το οποίο εξαπλώθηκε με ταχύ ρυθμό στις πίννες προκαλώντας εκτεταμένη συμπτωματολογία και δευτερευόντως λοιποί οργανισμοί, όπως τα βραδέως αναπτυσσόμενα *Mycobacterium* spp. που προϋπήρχαν στις πιο μεγάλης ηλικίας πίννες, και τα ταχέως αναπτυσσόμενα, ευκαιριακά *Vibrio* spp., οι οποίοι αναπτύχθηκαν πιθανότατα ως αποτέλεσμα του καταπονημένου ανοσοποιητικού του ξενιστή τους, διαταράσσοντας την ισορροπία του μικροβιώματος και οδηγώντας τελικά στη θνησιμότητα των περισσότερων μεσογειακών πληθυσμών. Όσον αφορά τα γένη-δείκτες των υγιών και των ασθενών πιννών, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η παρουσία του DNA στους ιστούς της πίννας, χωρίς άλλους τύπους αναλύσεων, δεν αποδεικνύει ότι οι οργανισμοί αυτοί ήταν ακέραιοι, ζωντανοί και παθογόνοι (ή ωφέλιμοι στη περίπτωση των υγιών) και δεν είχαν βρεθεί τυχαία λόγω της αφθονίας τους στο περιβάλλον, ή της ηθολογίας διαβίωσης των ζώων. Οι υψηλές αφθονίες συγκεκριμένων γενών μόνο σε υγιή ή άρρωστα είναι μια ένδειξη ότι δεν πρόκειται για τυχαίο γεγονός, αλλά χρειάζεται επιπλέον διερεύνηση για να επιβεβαιωθεί ο ευεργετικός ή επιβαρυντικός ρόλος τους. Τέτοιες μελέτες μπορεί να απαιτούν παρακολούθηση των δίθυρων σε συνθήκες αιχμαλωσίας (η οποία ως τώρα ήταν ανεπιτυχής), ή πειραματική μόλυνση (challenge experiments), χωρίς αυτές οι μεθοδολογίες να εγγυόνται την επιτυχή προσομοίωση των συνθηκών που επικρατούν στον οργανισμό των πιννών στη φύση. Ενδέχεται επίσης τα στελέχη όπου πρέπει να μελετηθούν να μην είναι καλλιεργήσιμα, η ποσότητα και ο τρόπος χορήγησης τους να διαφέρει σημαντικά από τη φυσιολογική μόλυνση, το μικροβίωμα των ζώων σε αιχμαλωσία να διαφέρει και τα ζώα να βρίσκονται λόγω του πειράματος σε κατάσταση στρες. Οι παραπάνω μέθοδοι δεν ενδείκνυνται εξαρχής σε ένα κρισίμως κινδυνεύον είδος, του οποίου οι εναπομένοντες πληθυσμοί είναι πολύτιμοι και πρέπει να προστατευτούν για τη διασφάλιση της επιβίωσης του στη Μεσόγειο. Είναι όμως δυνατόν να γίνουν συγκριτικές μελέτες του μικροβιώματος από συλλεγμένα άτομα *P. nobilis* από άλλες χώρες πριν και κατά τη διάρκεια του ΜΜΕ, οι οποίες μπορεί να δώσουν μια πληρέστερη εικόνα του υγιούς μικροβιώματος της πίννας.

4.5. Προοπτική Πληθυσμού Αμβρακικού και Συστάσεις

Ο πληθυσμός του Αμβρακικού μισό χρόνο μετά τη δειγματοληψία έδειχνε ακόμη υγιής και ανεπηρέαστος από το ΜΜΕ. Πρόκειται για μια περιοχή που δέχεται ανθρωπογενείς μεγάλες πιέσεις, αξιοποιείται από υδατοκαλλιέργειες και δέχεται τις εκβολές ποταμών από την ηπειρωτική

Ελλάδα με έντονη αγροτική παραγωγή. Οι πίννες βρίσκονται σε ρηχά ύδατα, γεγονός που ενδέχεται να αποτελέσει πρόβλημα όταν αυξηθεί το μέγεθος του κελύφους τους με την ηλικία. Επιπλέον, ορισμένα σημεία του κόλπου, κυρίως ανατολικά, είναι ανοξικά για μεγάλο διάστημα του έτους, οπότε υπάρχει προβληματισμός για ενδεχόμενες μαζικές θνησιμότητες σε περίπτωση ακραίων θερμοκρασιών τους καλοκαιρινούς μήνες ή ανθίσεων λόγω ευτροφισμού, όπως συνέβη στη περίπτωση της λιμνοθάλασσας Mar Menor (Giménez-Casalduero *et al.*, 2020).

Συστήνεται παρακολούθηση της κατάστασης του πληθυσμού μη επεμβατικά και ενδεχόμενη καταγραφή των περιβαλλοντικών συνθηκών, που θα μπορούσαν να εξηγήσουν γιατί η συγκεκριμένη περιοχή επιτρέπει την επιβίωση του, και η προστασία του πληθυσμού από παράνομη αλιεία ή φθορά από ανθρώπινες δραστηριότητες.

Παράρτημα

A) Πρωτόκολλο εξαγωγής DNA

1. Τεμαχισμός δειγμάτων με αποστειρωμένα ξυραφάκια και τοποθέτηση σε Eppendorf tubes (2 ml).
2. Πλύση με 800 μl απιονισμένου νερού για 15 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 13.000 rcf για 2 λεπτά.
3. Αφαίρεση υπερκείμενου.
4. Προσθήκη 600 μl διαλύματος buffer (0.5 M Tris, 0.1 M EDTA & 2% SDS, pH 8.8) για τη λύση των κυττάρων, φυγοκέντρηση στις 13.000 rcf για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου. Επανάληψη πλύσης δύο φορές.
5. Προσθήκη 600 μl buffer και 6.25 μl πρωτεϊνάσης K 20 mg/ml. Ανακίνηση σε vortex για λίγα δευτερόλεπτα και επώαση σε υδατόλουτρο στους 55°C κατά τη διάρκεια της νύχτας.
6. Τοποθέτηση στο ψυγείο έως ότου να φτάσει η θερμοκρασία τους 20°C.
7. Προσθήκη 400 μl διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεϊνών (5 M νιτρικού αμμωνίου, pH 8.0) και χειροκίνητη αναστροφή για 5 λεπτά.
8. Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στα 13.000 rcf και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο Eppendorf.
9. Προσθήκη 600 μl ισοπροπανόλης και ανακίνηση με αναστροφή.
10. Επώαση στους –20°C για 4 έως 24 ώρες.
11. Φυγοκέντρηση στις 13000 rcf για 30 λεπτά.
12. Αφαίρεση υπερκείμενου, προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70% (–20°C) και ελαφριά ανακίνηση με αναστροφή.
13. Φυγοκέντρηση 30 λεπτών στις 13.000 rcf και αφαίρεση του υπερκείμενου με πιπέτα.
14. Εξάτμιση υπολειμμάτων αιθανόλης.
15. Προσθήκη 50 μl απιονισμένου νερού.

B) Πρωτόκολλο PCR για *Haplosporidium pinnae* και *Mycobacterium sp.*

Πίνακας 7: Οι ποσότητες αντιδραστηρίων ανά αντίδραση για τις PCR για το Haplosporidium pinnae και το Mycobacterium sp. Για το H. pinnae οι εκκινητές ήταν οι HPNF3 και HPNR3 και για το Mycobacterium sp. ήταν οι T13-T39 για την πρώτη PCR και preT43-T531 για τη nested PCR.

	Haplosporidium pinnae	***Mycobacterium sp.***	
Συστατικό		Πρώτη PCR	Nested PCR
	Ποσότητα (μl)		
DNA (20 ng/μl)	1	1	3
10x Buffer A	1	1	1.5
Forward Εκκινητής (10μM)	0.5	0.6	0.9
Reverse Εκκινητής (10μM)	0.5	0.6	0.9
KAPPA dNTP Mix (10μM)	0.4	0.2	0.3

FastGene Taq Πολυμεράση (5U/μl)	0.5	0.1	0.15
ddH_2O	6.1	6.5	8.25
Συνολικός Όγκος Αντίδρασης	10	10	15

Πίνακας 8: Οι συνθήκες του κυκλοποιητή για τις PCR του Haplosporidium pinnae και του Mycobacterium sp.

Για το *Haplosporidium pinnae*

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	5 min	1
Αποδιάταξη	95	30 sec	35
Πρόσδεση Εκκινητών	55	30 sec	
Επιμήκυνση	72	30 sec	
Τελική Επιμήκυνση	72	5 min	1

Για το *Mycobacterium* sp. (ίδιες συνθήκες και για τις δύο PCR)

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	5 min	
Αποδιάταξη	94	1 min	30
Πρόσδεση Εκκινητών	50	1 min	
Επιμήκυνση	72	1 min	
Τελική Επιμήκυνση	72	5 min	

Γ) Πρωτόκολλο Καθαρισμού Προϊόντων PCR με το κιτ QIAquick:

1. Προσθήκη Buffer PB σε αναλογία 5:1 με το προϊόν της PCR. Αν το χρώμα είναι πορτοκαλί ή μωβ προσθήκη 10 μl CH_3COONa (οξικού νατρίου) pH 5.0 και ανάδευση ώστε να γίνει κίτρινο.
2. Προσθήκη του δείγματος σε κολώνα QIAquick και φυγοκέντρηση για 30-60 sec στις 17.900 rcf. Απόρριψη του υποκείμενου.
3. Πλύση με 750 μl Buffer PE και φυγοκέντρηση για 30-60 sec στις 17.900 rcf. Απόρριψη του υποκείμενου.
4. Φυγοκέντρηση 2η φορά για 1 min στις 17.900 rcf για απομάκρυνση της περίσσειας buffer.
5. Μεταφορά της κολώνας σε νέο Eppendorf tube.
6. Αναμονή 1 min και προσθήκη 30 μl ddH_2O στο κέντρο της μεμβράνης και φυγοκέντρηση για 1 min στις 17.900 rcf.

Δ) Πρωτόκολλο Αντίδρασης Αλληλούχισης και Καθαρισμός της Αντίδρασης

Πίνακας 9: Οι ποσότητες αντιδραστηρίων ανά αντίδραση για την αντίδραση αλληλούχισης. Για κάθε δείγμα υπήρχε μια επανάληψη με τον forward εκκινητή και μια με τον reverse.

Για την Αντίδραση Αλληλούχισης

Συστατικό	Ποσότητα (μl)
Καθαρισμένο PCR Προϊόν	7 (τελική συγκέντρωση ~40 ng/μl)
ddH_2O	
5x buffer	1.5
Forward ή Reverse Εκκινητής (10μM)	0.5
Big Dye	1
Συνολικός Όγκος Αντίδρασης	10

Πίνακας 10: Οι συνθήκες της αντίδρασης αλληλούχισης για τον κυκλοποιητή.

Για την Αντίδραση Αλληλούχισης

Βήμα	**Θερμοκρασία (°C)**	**Διάρκεια**	**Κύκλοι**
Αποδιάταξη	96	1 min	1
Επιμήκυνση	96	10 sec	35
	50	15 sec	
	60	4 min	

Πίνακας 11: Το mastermix για τον καθαρισμό των αντιδράσεων αλληλούχισης ανά αντίδραση και για 48 αντιδράσεις.

Συστατικό	**Ποσότητα ανά αντίδραση (μl)**	**Για 60 αντιδράσεις (48 + ~10% απώλεια (μl)**
EDTA (0.5 M)	0.1	6
NaOAc (3 M, pH 4.6)	0.2	12
99% Ethanol	24	1.440

1. Μεταφορά δειγμάτων σε πλάκα για τον αλληλουχητή ABI. Προσθήκη 24.3 μl mastermix σε κάθε πηγαδάκι. Κάλυψη με καπάκια, ανάδευση στο vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min σε σκοτάδι.
2. Φυγοκέντρηση στις 3700 rpm για 30 min στους 4°C.

3. Αφαίρεση καπακιών, κάλυψη της πλάκας με χαρτί, αναστροφή της πλάκας και φυγοκέντρηση για 15 sec στις 400 rpm για να αφαιρεθεί η αιθανόλη, ενώ το DNA παραμένει ως πέλλετ στον πάτο του πηγαδιού.
4. Πλύση με 70 μl αιθανόλης 70% (σε θερμοκρασία δωματίου) και φυγοκέντρηση στις 3700 rpm για 15 min στους 4ºC.
5. Κάλυψη της πλάκας ξανά με χαρτί, αναστροφή και φυγοκέντρηση στις 400 rpm για 15 sec.
6. Ξήρανση των δειγμάτων για 1 h στους 37ºC σε σκοτεινές συνθήκες.

Ε) Πρωτόκολλο PCR για 18s και 16S rRNA

Πίνακας 12: Οι ποσότητες αντιδραστηρίων ανά αντίδραση για την πρώτη PCR για το 18S και το 16S rRNA. Για το 18S rRNA οι εκκινητές ήταν οι 1380F και 1510R και για το 16S rRNA ήταν οι 341F και 805RB.

	18S rRNA	**16S rRNA**
Συστατικό	**Ποσότητα (μl)**	
DNA (20 ng/μl)	2.5	7.5
5x buffer	5	5
Forward Εκκινητής (10μM)	1.25	1.25
Reverse Εκκινητής (10μM)	1.25	1.25
KAPPA dNTP Mix (10μM)	0.625	0.625
KAPPA HiFi HotStart DNA Πολυμεράση (1U/μl)	0.625	0.625
BSA (20 mg/ml)	-	0.75
ddH_2O	13.75	8
Συνολικός Όγκος Αντίδρασης	25	25

Πίνακας 13: Οι συνθήκες του κυκλοποιητή για τις PCR του 18S και του 16S rRNA.

Για το 18S rRNA

Βήμα	**Θερμοκρασία (ºC)**	**Διάρκεια**	**Κύκλοι**
Αρχική αποδιάταξη	95	5 min	1
Αποδιάταξη	98	20 sec (1ºC/sec)	30
Πρόσδεση Εκκινητών	63	90 sec (3ºC/sec)	
Επιμήκυνση	72	90 sec (1ºC/sec)	
Τελική Επιμήκυνση	72	10 min	1

Για το 16S rRNA

Βήμα	Θερμοκρασία (ºC)	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	5 min	
Αποδιάταξη	98	20 sec	25
Πρόσδεση Εκκινητών	57	2 min	
Επιμήκυνση	72	1 min	
Τελική Επιμήκυνση	72	7 min	

Πίνακας 14: Οι ποσότητες αντιδραστηρίων ανά αντίδραση για τη δεύτερη PCR για το 18S και το 16S rRNA. Οι εκκινητές ήταν συνδιασμοί εκκινητών με δείκτες (indices) και αντάπτορες της Illumina.

Για τους Αντάπτορες της Illumina

Συστατικό	Ποσότητα (μl)
Καθαρισμένο PCR Προϊόν	13.75 (τελική συγκέντρωση ~10 ng/μl)
ddH_2O	
5x buffer	5
Forward Εκκινητής (10μM)	2.5
Reverse Εκκινητής (10μM)	2.5
KAPPA dNTP Mix (10μM)	0.625
KAPPA HiFi HotStart DNA Πολυμεράση (1U/μl)	0.625
Συνολικός Όγκος Αντίδρασης	25

Πίνακας 15: Οι συνθήκες του κυκλοποιητή για τις PCR για τους Αντάπτορες της Illumina.

Για τους Adapters της Illumina

Βήμα	Θερμοκρασία (ºC)	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	1
Αποδιάταξη	98	20 sec	30
Πρόσδεση Εκκινητών	56	30 sec	
Επιμήκυνση	72	30 sec	
Τελική Επιμήκυνση	72	5 min	1

ΣΤ) Πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων PCR με μαγνητικά beads

1. Ανάδευση με vortex για 1 min του μείγματος μαγνητικών σφαιριδίων ενώ βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας σφαιριδίων στο DNA (20 μl σφαιριδίων : 20 μl DNA
3. Ανάδευση με πιπετάρισμα (10 φορές ή παραπάνω).
4. Επώαση για 5 λεπτά
5. Επώαση στον μαγνήτη για 8 λεπτά.
6. Αφαίρεση υπερκείμενου.
7. Προσθήκη 200 μl φρέσκιας αιθανόλης 80%, επώαση για 30 sec, αφαίρεση υπερκείμενου.
8. Επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
9. Αφαίρεση υπολειμμάτων αιθανόλης με πιπέτα 10 μl και εξάτμιση για 5 λεπτά.
10. Προσθήκη 20 μl νερού, αφαίρεση Eppendorf από τον μαγνήτη κι επαναιώρηση με πιπετάρισμα 10 φορές ή παραπάνω.
11. Επώαση για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Αναμονή στον μαγνήτη για 5 λεπτά.
13. Μεταφορά ~ 20 μl καθαρισμένου προϊόντος σε νέο Eppendorf.

Ζ) Accession no. Αλληλουχιών

Πίνακας 16: Οι αλληλουχίες πρώτιστων και βακτηρίων όπου χρησιμοποιήθηκαν στα Γραφήματα 1, 7, 10.

Ascetosporia		Actinobacteria		Vibrio	
MN104247.1	*Haplosporidium pinnae*	**MH569645.1**	*Mycobacterium* sp.	**MW715026.1**	*Vibrio* sp.
MW255604.1	*Haplosporidium pinnae*	**MH569646.1**	*Mycobacterium* sp.	**MW715027.1**	*Vibrio* sp.
MT367896.1	*Haplosporidium pinnae*	**MH569647.1**	*Mycobacterium* sp.	**MW715028.1**	*Vibrio* sp.
LC338065.1	*Haplosporidium pinnae*	**MH569648.1**	*Mycobacterium* sp.	**MW715030.1**	*Vibrio* sp.
MT311215.1	*Haplosporidium carcini*	**MN689715.1**	*Mycobacterium* sp.	**MW715032.1**	*Vibrio* sp.
AB080597.1	*Haplosporidium nelsoni*	**AP022568.1**	*Mycobacterium simiae*	**MN853581.1**	*Vibrio* sp.
KF378734.1	*Haplosporidium diporeiae*	**AP022568.1**	*M. stomatepiae*	**MN853586.1**	*Vibrio* sp.
JN368430.1	*Haplosporidium tuxtlensis*	**EU883389.1**	*M. sherrisii*	**MN853575.1**	*Vibrio* sp.
AF26995.1	*Bonamia ostreae*	**AP22615.1**	*M. heidelbergense*	**MW259974.1**	*Vibrio* sp.
JF831793.1	*Bonamia exitiosa*	**AP22614.1**	*M. parmense*	**MW259977.1**	*Vibrio* sp.
AF126022.1	*Perkinsus marinus*	**KF687953.1**	*M. lentiflavum*	**MW259975.1**	*Vibrio harveyi*

Ascetosporia		Actinobacteria		Vibrio	
KF278722.1	*Marteilia cochillia*	**AP022576.1**	*M. florentinum*	**MW259976.1**	*Vibrio harveyi*
		LC533965.1	*M. genavense*	**MW259978.1**	*Vibrio harveyi*
		AP018164.1	*M. shigaense*	**MK471368.1**	*Vibrio mediterranei*
		MK890505.1	*M. marseillense*	**MK471357.1**	*V. mediterranei*
		MK411583.1	*M. marinum*	**MW715025.1**	*V. mediterranei*
		MT644497.1	*Dietzia cinnamea*	**MN945366.1**	*V. splendidus*
		MT632637.1	*D. maris*	**MN938218.1**	*V. splendidus*
		MT214245.1	*D. kunjamensis*	**MH879822.1**	*V. alginolyticus*
		MT377849.1	*Kocria rhizophila*	**MN938218.1**	*V. gigantis*
		LT906467.1	*Corynebacterium imitans*	**MT269626.1**	*V. coralliirubri*
		MT436535.1	*C. pseudodiphtheriticum*	**LN832942.1**	*V. celticus*
		NR159075.1	*C. gottingense*	**MT269628.1**	*V. crassostreae*
		NR159267.1	*C. godavarianum*	**MW715024.1**	*V. toranzoniae*
				CP062501.1	*V. bathopelagicus*
				KR270138.1	*V. anguillarum*
				LS483008.1	*V. lentus*
				MK102636.1	*V. tasmaniensis*
				MT269616.1	*V. atlanticus*
				KY697656.1	*V. pomeroyi*
				MT269633.1	*V. kanaloae*
				NR148247.1	*V. cortegadensis*
				MK307692.1	*V. aestuarianus*
				CP039701.1	*V. cyclitrophicus*

Η) Παράμετροι του PEMA

Τα αρχεία .tsv με τα οποία ορίστηκαν οι παράμετροι του PEMA για να γίνει η επεξεργασία των βιβλιοθηκών είναι ανεβασμένα στο Google Drive. Επισυνάπτονται σύνδεσμοι για τα εν λόγω αρχεία:

- Παράμετροι 18S:

https://drive.google.com/file/d/1FdsTdRKA7EKH6o-kKhqkRxIt9l7YQk7i/view?usp=sharing

- Παράμετροι 16S:

https://drive.google.com/file/d/1jQxFB0pQuQ_75OH8sX-r1MIKnkC1s-A1/view?usp=sharing

Θ) Στοιχεία Δειγμάτων

	Ημερομηνία Συλλογής	Τοποθεσία (Location)	Υπόστρωμα (Substrate)	Κατάσταση κατά τη συλλογή (Status)	Ασθένεια (Condition)
AMV01	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMV02	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMV03	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVE1	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVE2	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVE3	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVE4	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVE5	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVD1	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVD2	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVD3	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVF1	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVCO1	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVCO2	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVCO3	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
AMVCO4	Άνοιξη 2021	Αμβρακικός	-	Φαινομενικά Υγιές	Υγιές
MP1	Άνοιξη 2019	Μπαλί	+	Φαινομενικά Ασθενές	Ασθενές
EL1	Χειμώνας 2019	Ελούντα	+	Φαινομενικά Υγιές	Ασθενές
EL2	Χειμώνας 2019	Ελούντα	+	Φαινομενικά Υγιές	Ασθενές
Lesvos1		Λέσβος	-	Φαινομενικά Ασθενές	Ασθενές
Lesvos2		Λέσβος	+	Φαινομενικά Ασθενές	Ασθενές
Lesvos3		Λέσβος	-	Φαινομενικά Ασθενές	Ασθενές
Lesvos4		Λέσβος	-	Φαινομενικά Ασθενές	Ασθενές
Lesvos5		Λέσβος	+	Φαινομενικά Ασθενές	Ασθενές
Lesvos6		Λέσβος	-	Φαινομενικά Ασθενές	Ασθενές
Lesvos7		Λέσβος	-	Φαινομενικά Ασθενές	Ασθενές
Lesvos8		Λέσβος	+	Φαινομενικά Ασθενές	Ασθενές
Lesvos9		Λέσβος	-	Φαινομενικά Ασθενές	Ασθενές
Vour1	Άνοιξη 2019	Βουρβουρού	+	Φαινομενικά Υγιές	Ασθενές
Vour2	Άνοιξη 2019	Βουρβουρού	+	Φαινομενικά Υγιές	Ασθενές
OR1	Άνοιξη 2019	Ωρωπός	+	Φαινομενικά Υγιές	Ασθενές
OR2	Άνοιξη 2019	Ωρωπός	+	Φαινομενικά Υγιές	Ασθενές
OR3	Άνοιξη 2019	Ωρωπός	+	Φαινομενικά Υγιές	Ασθενές
OR4	Άνοιξη 2019	Ωρωπός	+	Φαινομενικά Υγιές	Ασθενές
AV1	Άνοιξη 2019	Αυλίδα	+	Φαινομενικά Υγιές	Ασθενές
AV2	Άνοιξη 2019	Αυλίδα	+	Φαινομενικά Υγιές	Ασθενές
LAV1	Καλοκαίρι 2018	Λαύριο	+	Φαινομενικά Ασθενές	Ασθενές
LAV2	Καλοκαίρι 2018	Λαύριο	-	Φαινομενικά Ασθενές	Ασθενές

Βιβλιογραφία

Aceves, A. K. *et al.* (2018) 'Description and characterization of the digestive gland microbiome in the freshwater mussel Villosa nebulosa (Bivalvia: Unionidae)', *Journal of Molluscan Studies*, 84(3), pp. 240–246. doi: 10.1093/MOLLUS/EYY014.

Amaral-zettler, L. A. *et al.* (2009) 'Correction : A Method for Studying Protistan Diversity Using Massively Parallel Sequencing of V9 Hypervariable Regions of Small-Subunit Ribosomal A Method for Studying Protistan Diversity Using Massively Parallel Sequencing of V9 Hypervariable Regions of ', (June 2014). doi: 10.1371/journal.pone.0006372.

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.

Andree, K. B. *et al.* (2021b) '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), pp. 617–631. doi: 10.1111/jam.14756.

Andrews, S. (2010) *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*. Available at: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/.

Apprill, A. *et al.* (2015) 'Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton', *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), pp. 129–137. doi: 10.3354/ame01753.

Arzul, I. and Carnegie, R. B. (2015) 'New perspective on the haplosporidian parasites of molluscs', *Journal of Invertebrate Pathology*, 131(October), pp. 32–42. doi: 10.1016/j.jip.2015.07.014.

Ballesteros, E. *et al.* (2020) 'The pearl oyster Pinctada imbricata radiata (Leach, 1814) (Bivalvia: Pteriidae) reaches Minorca, Balearic Islands', *Bolletí de la Societat d'Història Natural de les Balears*, 63, pp. 97–108.

Bankevich, A. *et al.* (2012) 'SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing', *Journal of Computational Biology*, 19(5), pp. 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.

Barber, R., Kanaley, S. and Ford, S. (1991) 'Recent observations on the spore state of Haplosporidium nelsoni (= MSX) in the eastern oyster Crassostrea virginica', *Journal of Shellfish Research*, 10(1).

Baum, S. G. (2008) 'Zoonoses-with friends like this, who needs enemies?', *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 119.

Beaz-Hidalgo, R. *et al.* (2010) 'Aliivibrio finisterrensis sp. nov., isolated from Manila clam, Ruditapes philippinarum and emended description of the genus Aliivibrio', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), pp. 223–228. doi: 10.1099/ijs.0.010710-0.

Boamah, D. K. *et al.* (2017) 'From many hosts, one accidental pathogen: The diverse protozoan hosts of Legionella', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, p. 477. doi: 10.3389/fcimb.2017.00477.

Bolger, A. M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014) 'Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data', *Bioinformatics*, 30(15), pp. 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.

Boyer, F. *et al.* (2016) 'obitools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding', *Molecular Ecology Resources*, 16(1), pp. 176–182. doi: 10.1111/1755-0998.12428.

Burge, C. A. *et al.* (2013) 'Special Issue Oceans and Humans Health: The Ecology of Marine Opportunists', *Microbial Ecology*, 65(4), pp. 869–879. doi: 10.1007/s00248-013-0190-7.

Butler, A., Vicente, N. and Gaulejac, B. De (1993) 'Ecology of the pterioid bivalves Pinna bicolor Gmelin and Pinna nobilis L.', *Marine Life*, 3, pp. 37–45.

Cabanellas-Reboredo, M. *et al.* (2019) 'Tracking a mass mortality outbreak of pen shell Pinna nobilis populations: A collaborative effort of scientists and citizens', *Scientific Reports*, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-49808-4.

Caceres-Martinez, J. and Vasquez-Yeomans, R. (2008) *Pathology in bivalve molluscs: major problems and challenges for bivalve production in Latin America*, *Current status of the culture and management of bivalve molluscs and future prospects: factors affecting sustainability in Latin America. First FAO Technical Regional Workshop, 20-24 August 2007, Puerto Montt, Chile. Estado actual del cultivo y manejo de*. Available at: http://search.proquest.com/docview/869581846?accountid=14643.

Cain, G. *et al.* (2021) 'Reduction in Virulence over Time in Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) Microvariants between 2011 and 2015 in Australia'. doi: 10.3390/v13050946.

Carella, F. *et al.* (2019) 'A mycobacterial disease is associated with the silent mass mortality of the pen shell Pinna nobilis along the Tyrrhenian coastline of Italy', *Scientific Reports*, 9(1). doi: 10.1038/s41598-018-37217-y.

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.

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.

Chao, A. (1984) *Non-parametric estimation of the classes in a population*, *Scandinavian Journal of Statistics*. doi: 10.2307/4615964.

Chao, A. and Lee, S. M. (1992) 'Estimating the number of classes via sample coverage', *Journal of the American Statistical Association*, 87(417), pp. 210–217. doi: 10.1080/01621459.1992.10475194.

Chao, A. and Yang, M. C. K. (1993) 'Stopping Rules and Estimation for Recapture Debugging with Unequal Failure Rates', *Biometrika*, 80(1), p. 193. doi: 10.2307/2336768.

CINAR, M. E. *et al.* (2021) 'The last fortress fell: mass mortality of Pinna nobilis in the Sea of Marmara', *Mediterranean Marine Science*, 22(3), p. 669. doi: 10.12681/mms.27137.

Davidovich, N., Morick, D. and Carella, F. (2020) 'Mycobacteriosis in aquatic invertebrates: A review of its emergence', *Microorganisms*, pp. 1–20. doi: 10.3390/microorganisms8081249.

Destoumieux-garzón, D. *et al.* (2021) 'Vibrio-bivalve interactions in health and disease. Minireview Vibrio - bivalve interactions in health and disease'.

Deudero, S., Vázquez-Luis, M. and Álvarez, E. (2015) 'Human stressors are driving coastal benthic long-lived sessile fan mussel pinna nobilis population structure more than environmental stressors', *PLoS ONE*, 10(7). doi: 10.1371/journal.pone.0134530.

Donato, G. *et al.* (2021) 'Noble fan-shell, Pinna nobilis, in Lake Faro (Sicily, Italy): Ineluctable decline or extreme opportunity?', *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 261(August). doi: 10.1016/j.ecss.2021.107536.

Egan, S. and Gardiner, M. (2016) 'Microbial dysbiosis: Rethinking disease in marine ecosystems', *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN). doi: 10.3389/fmicb.2016.00991.

Eliseikina, M. G. *et al.* (2021) 'Identification and analysis of the biological activity of the new strain of Pseudoalteromonas piscicida isolated from the hemal fluid of the bivalve Modiolus kurilensis (F. R. Bernard, 1983)', *Archives of microbiology*, 203(7), pp. 4461–4473. doi: 10.1007/S00203-021-02432-1.

Fey, S. B. *et al.* (2015) 'Recent shifts in the occurrence, cause, and magnitude of animal mass mortality events', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(4), pp. 1083–1088. doi: 10.1073/PNAS.1414894112/SUPPL_FILE/PNAS.1414894112.SD01.XLS.

Ford, S. E. *et al.* (2018) 'Investigating The Life Cycle of Haplosporidium Nelsoni (Msx): A Review', *Journal of Shellfish Research*, 37(4), pp. 679–693. doi: 10.2983/035.037.0402.

Ford, S. E., Kanaley, S. A. and Littlewood, D. T. J. (1993) 'Cellular responses of oysters infected with Haplosporidium nelsoni: Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes', *Journal of Invertebrate Pathology*, 61(1). doi: 10.1006/jipa.1993.1009.

Gambi, M. C. *et al.* (2010) 'Mortality Events Along the Campania Coast (Tyrrhenian Sea) in Summers 2008 and 2009 and Relation To Thermal Conditions', *Biol. Mar. Mediterr*, 17(1), pp. 126–127.

García-March, J. R. *et al.* (2020) 'Can we save a marine species affected by a highly infective, highly lethal, waterborne disease from extinction?', *Biological Conservation*. doi: 10.1016/j.biocon.2020.108498.

Giménez-Casalduero, F. *et al.* (2020) 'Pinna nobilis in the Mar Menor coastal lagoon: A story of colonization and uncertainty', *Marine Ecology Progress Series*, 652, pp. 77–94. doi: 10.3354/meps13468.

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.2022.666640.

Hall, T., Biosciences, I. and Carlsbad, C. (2011) 'BioEdit: An important software for molecular biology', *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(June), pp. 60–61.

Hendriks, I. E. *et al.* (2011) 'Seagrass Meadows Modify Drag Forces on the Shell of the Fan Mussel Pinna nobilis', *Estuaries and Coasts*, 34(1). doi: 10.1007/s12237-010-9309-y.

Hickman, C. *et al.* (2020) *Integrated Principles of Zoology*. 17th edn. New York: McGraw-Hill Education.

Hine, P. M. and Thorne, T. (2000) 'A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia', *Diseases of Aquatic Organisms*, 40(1). doi: 10.3354/dao040067.

Hudson, E. B. and Hill, B. J. (1991) 'Impact and spread of bonamiasis in the UK', *Aquaculture*, 93(3), pp. 279–285. doi: 10.1016/0044-8486(91)90240-8.

Hyun, D. W. *et al.* (2014) 'Endozoicomonas atrinae sp. nov., isolated from the intestine of a comb pen shell Atrina pectinata', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 7), pp. 2312–2318. doi: 10.1099/ijs.0.060780-0.

Julie D., T. J. T., Desmond G., H. and Gibson (1994) 'CLUSTAL W (improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice)', *Nucleic Acids Research*, 22(22), pp. 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.

Katharios, P. *et al.* (2015) 'Environmental marine pathogen isolation using mesocosm culture of sharpsnout seabream: Striking genomic and morphological features of novel Endozoicomonas sp.', *Scientific Reports*, 5(August), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep17609.

Katsanevakis, S. (2019) 'The cryptogenic parasite Haplosporidium pinnae invades the Aegean Sea and causes the collapse of Pinna nobilis populations', *Aquatic Invasions*, 14(2), pp. 150–164. doi: 10.3391/ai.2019.14.2.01.

Katsanevakis, S. *et al.* (2020) 'Biological Invasions in the Aegean Sea: Temporal Trends, Pathways, and Impacts'. doi: 10.1007/698_2020_642.

Kersting, D. K. and Ballesteros, E. (2021) 'Is the local extinction of Pinna nobilis facilitating Pinna rudis recruitment?', *Mediterranean Marine Science*, 22(3), p. 623. doi: 10.12681/mms.27809.

King, W. L. *et al.* (2019) 'Variability in the composition of pacific oyster microbiomes across oyster families exhibiting different levels of susceptibility to OsHV-1 µvar disease', *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), p. 473. doi: 10.3389/fmicb.2019.00473.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, Jörg, *et al.* (2013) 'Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies', *Nucleic Acids Research*, 41(1), pp. 1–11. doi: 10.1093/nar/gks808.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, Jorg, *et al.* (2013) 'Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies', *Nucleic Acids Research*, 41(1). doi: 10.1093|nar|gks808.

Kubota, K. *et al.* (2021) 'EVIDENCE of MASS MORTALITY of the LONG-LIVED BIVALVE MERCENARIA STIMPSONI CAUSED by A CATASTROPHIC TSUNAMI', *Radiocarbon*, 63(6), pp. 1629–1644. doi: 10.1017/RDC.2021.98.

Künili, İ. 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.

Künili, İ. E. *et al.* (2021b) '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). doi: 10.1080/1354750X.2021.1910344.

Laith, A. A. *et al.* (2021) 'Histopathological and immunological changes in green mussel, Perna viridis, challenged with Vibrio alginolyticus', *Fish and Shellfish Immunology*, 118(September), pp. 169–179. doi: 10.1016/j.fsi.2021.08.032.

Lattos, A., Giantsis, I. A., Karagiannis, D. and Michaelidis, B. (2020) 'First detection of the invasive Haplosporidian and Mycobacteria parasites hosting the endangered bivalve Pinna nobilis in Thermaikos Gulf, North Greece', *Marine Environmental Research*, 155. doi: 10.1016/j.marenvres.2020.104889.

Lattos, A., Giantsis, I. A., Karagiannis, D., Theodorou, J. A., *et al.* (2020a) 'Gut symbiotic microbial communities in the iucn critically endangered pinna nobilis suffering from mass mortalities, revealed by 16s rrna amplicon ngs', *Pathogens*, 9(12). doi: 10.3390/pathogens9121002.

Lattos, A., Giantsis, I. A., Karagiannis, D., Theodorou, J. A., *et al.* (2020b) 'Gut symbiotic microbial communities in the iucn critically endangered pinna nobilis suffering from mass mortalities, revealed by 16s rrna amplicon ngs', *Pathogens*, 9(12), pp. 1–21. doi: 10.3390/pathogens9121002.

Lattos, A., Feidantsis, K., *et al.* (2021) 'Pathophysiological responses of pinna nobilis individuals enlightens the etiology of mass mortality situation in the mediterranean populations', *Cells*, 10(11). doi: 10.3390/cells10112838.

Lattos, A., Bitchava, K., *et al.* (2021) 'The Implication of Vibrio Bacteria in the Winter Mortalities of the Critically Endangered Pinna nobilis', *Microorganisms*, 9(5), p. 922. doi: 10.3390/microorganisms9050922.

Leibovitz, L. (1990) 'Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs', *Transactions of the American Fisheries Society*, 119(1), pp. 163–165. doi: 10.1577/1548-8659-119.1.163.

Li, Y. F. *et al.* (2019) 'Temperature elevation and Vibrio cyclitrophicus infection reduce the diversity of haemolymph microbiome of the mussel Mytilus coruscus', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-019-52752-y.

Lin, H. and Peddada, S. Das (2020) 'Analysis of microbial compositions: a review of normalization and differential abundance analysis', *npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1). doi: 10.1038/S41522-020-00160-W.

Lodola, A. *et al.* (2013) 'Range expansion and biometric features of Pinctada imbricata radiata (Bivalvia: Pteriidae) around Linosa Island, Central Mediterranean Sea (Italy)', *Italian Journal of Zoology*, 80(2), pp. 303–312. doi: 10.1080/11250003.2013.775363.

de Lorgeril, J. *et al.* (2018) 'Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters', *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-06659-3.

Mahé, F. *et al.* (2014) 'Swarm: Robust and fast clustering method for amplicon-based studies', *PeerJ*, 2014(1), p. e593. doi: 10.7717/PEERJ.593/SUPP-8.

Mahé, F. *et al.* (2015) 'Swarmv2: Highly-scalable and high-resolution amplicon clustering', *PeerJ*, 2015(12), p. e1420. doi: 10.7717/PEERJ.1420/SUPP-1.

Martin, M. (2011) 'Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads', *EMBnet.journal*, 17(1), p. 10. doi: 10.14806/ej.17.1.200.

Martinović, R. *et al.* (2021) 'Recruitment and Growth of the Fan Mussel Pinna nobilis in the Montenegrin Adriatic Coast and Comparison with the Western Mediterranean', *Handbook of Environmental Chemistry*, 109, pp. 193–213. doi: 10.1007/698_2021_749.

Masella, A. P. *et al.* (2012) 'PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences', *BMC Bioinformatics*, 13(1), p. 31. doi: 10.1186/1471-2105-13-31.

McMurdie, P. J. and Holmes, S. (2013) 'Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data', *PLoS ONE*, 8(4). doi: 10.1371/journal.pone.0061217.

McMurdie, P. J. and Holmes, S. (2015) 'Shiny-phyloseq: Web application for interactive microbiome analysis with provenance tracking', *Bioinformatics*, 31(2), pp. 282–283. doi: 10.1093/bioinformatics/btu616.

Minton, R. L., Creech, C. C. and Jackson, D. W. (2015) 'Bacterial diversity and abundance in shell biofilms from the freshwater snail Pleurocera canaliculatum (Cerithioidea: Pleuroceridae)', *Polish Journal of Microbiology*, 64(2), pp. 181–184. doi: 10.33073/pjm-2015-027.

Moussa, R. M. (2018) 'The potential impacts of low and high salinities on salinity tolerance and condition index of the adult pearl oyster Pinctada imbricata radiata (Leach, 1814)', *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 79(1). doi: 10.1186/s41936-018-0021-y.

Neave, M. J. *et al.* (2016) 'Differential specificity between closely related corals and abundant Endozoicomonas endosymbionts across global scales', *The ISME Journal 2017 11:1*, 11(1), pp. 186–200. doi: 10.1038/ismej.2016.95.

Nebot-Colomer *et al.* (2016) 'Population Structure and Growth of the Threatened Pen Shell, Pinna rudis (Linnaeus, 1758) in a Western Mediterranean Marine Protected Area', *Mediterranean Marine Science*, 17(3), p. 785. doi: 10.12681/mms.1597.

Nebot-Colomer, E. *et al.* (2021) 'Living under threat: Will one of the last Pinna nobilis populations be able to survive?', *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. doi: 10.1002/aqc.3738.

Nelson, E. J. and Ghiorse, W. C. (1999) 'Isolation and identification of Pseudoalteromonas piscicida strain Cura-d associated with diseased damselfish (Pomacentridae) eggs', *Journal of Fish Diseases*, 22(4), pp.

253–260. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00168.x.

Nurk, S. *et al.* (2013) 'Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads', *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 7821 LNBI, pp. 158–170. doi: 10.1007/978-3-642-37195-0_13.

OIE (2019) 'Chapter 2.4.8. - Infection With Xenohaliotis californiensis.', *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.*, 7(2), pp. 1–7. Available at: https://www.oie.int/en/home/.

Oksanen, J. *et al.* (2020) 'vegan: Community Ecology Package'. Available at: https://cran.r-project.org/package=vegan.

Öndes, F. *et al.* (2020) 'Mass mortality of the fan mussel, Pinna nobilis in Turkey (eastern Mediterranean)', *Marine Ecology*, 41(5). doi: 10.1111/maec.12607.

Öndes, F., Kaiser, M. J. and Güçlüsoy, H. (2020) 'Human impacts on the endangered fan mussel, Pinna nobilis', *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 30(1). doi: 10.1002/aqc.3237.

Ondov, B. D., Bergman, N. H. and Phillippy, A. M. (2011) 'Interactive metagenomic visualization in a Web browser', *BMC Bioinformatics*, 12, p. 385. doi: 10.1186/1471-2105-12-385.

Oosterhuis, D., Pardo, I. and Ferreira-Rodríguez, N. (2021) 'How does summer environmental degradation influence native mussels in Corbicula invaded rivers?', *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 31(6), pp. 1245–1256. doi: 10.1002/aqc.3547.

Ormeño-Orrillo, E. and Martínez-Romero, E. (2019) 'A genomotaxonomy view of the bradyrhizobium genus', *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), p. 1334. doi: 10.3389/FMICB.2019.01334/BIBTEX.

Paul-Pont, I. *et al.* (2014) 'Descriptive epidemiology of mass mortality due to Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in commercially farmed Pacific oysters (Crassostrea gigas) in the Hawkesbury River estuary, Australia', *Aquaculture*, 422–423, pp. 146–159. doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2013.12.009.

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.

Petersen, C. and Round, J. L. (2014) 'Microreview Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease'. doi: 10.1111/cmi.12308.

Prado, P. *et al.* (2019) 'Presence of Vibrio mediterranei associated to major mortality in stabled individuals of Pinna nobilis L.', *Aquaculture*, p. 734899. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734899.

Prado, P. *et al.* (2020) 'Presence of Vibrio mediterranei associated to major mortality in stabled individuals of Pinna nobilis L.', *Aquaculture*, 519. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734899.

Prado, P. *et al.* (2021) 'Pinna nobilis in suboptimal environments are more tolerant to disease but more vulnerable to severe weather phenomena', *Marine Environmental Research*, 163. doi: 10.1016/j.marenvres.2020.105220.

Qi, W. *et al.* (2018) 'Ca. Endozoicomonas cretensis: A novel fish pathogen characterized by genome plasticity', *Genome Biology and Evolution*, 10(6), pp. 1363–1374. doi: 10.1093/gbe/evy092.

Quast, C. *et al.* (2013) 'The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools', *Nucleic Acids Research*, 41(D1). doi: 10.1093/nar/gks1219.

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.

Rabaoui, L., Zouari, S. T. and Hassine, O. K. Ben (2008) 'Two species of Crustacea (Decapoda) associated with the fan mussel, pinna nobilis Linnaeus, 1758 (Mollusca, Bivalvia)', *Crustaceana*, 81(4), pp. 433–446. doi: 10.1163/156854008783797507.

Renault, T. and Novoa, B. (2004) 'Viruses infecting bivalve molluscs', *Aquatic Living Resources*, 17(4), pp. 397–409. doi: 10.1051/alr:2004049.

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.

Romanenko, L. A. *et al.* (2003) 'Pseudoalteromonas agarivorans sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), pp. 125–131. doi: 10.1099/ijs.0.02234-0.

RStudio Team(2022) (2022) 'RStudio: Integrated Development for R', *RStudio, Inc., Boston, MA*. PBC, Boston, p. http://www.rstudio.com/. Available at: http://www.rstudio.com/.

Ruitton, S. and Lefebvre, C. (2021) 'Toward a recovery of the pen shell Pinna nobilis in the French Mediterranean open sea?', *429-Sci. Rep. Port-Cros Natl. Park*, 35, pp. 429–434.

Šarić, T. *et al.* (2020) 'Epidemiology of noble pen shell (Pinna nobilis l. 1758) mass mortality events in adriatic sea is characterised with rapid spreading and acute disease progression', *Pathogens*, 9(10), pp. 1–21. doi: 10.3390/pathogens9100776.

Scarpa, F. *et al.* (2020) 'Multiple non-species-specific pathogens possibly triggered the mass mortality in pinna nobilis', *Life*, 10(10). doi: 10.3390/life10100238.

Scheffer, R. P. (1991) 'Role of toxins in evolution and ecology of plant pathogenic fungi', *Experientia*, 47(8), pp. 804–811. doi: 10.1007/BF01922460.

Talaat, A. M., Reimschuessel, R. and Trucksis, M. (1997) 'Identification of mycobacteria infecting fish to the species level using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis', *Veterinary Microbiology*, 58(2–4), pp. 229–237. doi: 10.1016/S0378-1135(97)00120-X.

Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. (2021) 'MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11', *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), pp. 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120.

Theodorou, J. A., Perdikaris, C. and Spinos, E. (2019) 'On the occurrence of rayed pearl oyster Pinctada imbricata radiata (Leach, 1814) in Western Greece (Ionian Sea) and its biofouling potential', *Biharean Biologist*, 13(1).

Tiscar, G. *et al.* (2022) 'New insights about Haplosporidium pinnae and the pen shell Pinna nobilis mass mortality events', *Journal of Invertebrate Pathology*, 190(March), p. 107735. doi: 10.1016/j.jip.2022.107735.

Vázquez-Luis, M. *et al.* (2017) 'S.O.S. Pinna nobilis: A mass mortality event in western Mediterranean Sea', *Frontiers in Marine Science*, 4(JUL), pp. 1–6. doi: 10.3389/fmars.2017.00220.

Vázquez-Luis, M. *et al.* (2021) 'Natural hybridization between pen shell species: Pinna rudis and the critically endangered Pinna nobilis may explain parasite resistance in P. nobilis', *Molecular Biology Reports 2021 48:1*, 48(1), pp. 997–1004. doi: 10.1007/S11033-020-06063-5.

VÁZQUEZ-LUIS, M. *et al.* (2014) 'Spatial distribution modelling of the endangered bivalve Pinna nobilis in a Marine Protected Area', *Mediterranean Marine Science*, 15(3), p. 626. doi: 10.12681/mms.796.

Waser, A. M. *et al.* (2021) 'Invasive oysters as new hosts for native shell-boring polychaetes: Using historical

shell collections and recent field data to investigate parasite spillback in native mussels in the Dutch Wadden Sea', *Journal of Sea Research*, 175(January), p. 102086. doi: 10.1016/j.seares.2021.102086.

Wickham, H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. Available at: https://ggplot2.tidyverse.org.

Yang, C. (2021) 'microbiomeMarker: microbiome biomarker analysis toolkit. R package version 1.1.1.', p. https://github.com/yiluheihei/microbiomeMarker. doi: https://doi.org/10.5281/zenodo.3749415.

Yoon, J. *et al.* (2011) 'Rubritalea halochordaticola sp. nov., a carotenoidproducing verrucomicrobial species isolated from a marine chordate', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(7), pp. 1515–1520. doi: 10.1099/ijs.0.025031-0.

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.

Zafeiropoulos, H. *et al.* (2021a) '0s and 1s in marine molecular research: A regional HPC perspective', *GigaScience*, pp. 1–12. doi: 10.1093/gigascience/giab053.

Zafeiropoulos, H. *et al.* (2021b) 'The IMBBC HPC facility: history, configuration, usage statistics and related activities'. doi: 10.5281/ZENODO.4665308.

Zannella, C. *et al.* (2017) 'Microbial diseases of bivalve mollusks: Infections, immunology and antimicrobial defense', *Marine Drugs*. doi: 10.3390/md15060182.

Zhang, X. *et al.* (2022) 'Pseudoalteromonas piscicida X-8 causes bleaching disease in farmed Saccharina japonica', *Aquaculture*, 546(August 2021), p. 737354. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737354.

Zhukova, N. V *et al.* (2022) 'Multiple bacterial partners in symbiosis with the nudibranch mollusk Rostanga alisae', *Scientific Reports*, 12(1), p. 169. doi: 10.1038/s41598-021-03973-7.

Zotou, M. *et al.* (2020) 'Pinna nobilis in the Greek seas (NE Mediterranean): On the brink of extinction?', *Mediterranean Marine Science*, 21(3). doi: 10.12681/MMS.23777.

Σαραφίδου, Γ. (2019) *Μαζική θνησιμότητα πληθυσμού πίνας (Pinna nobilis)*. Πανεπιστήμιο Κρήτης.