

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Πληθυσμιακή γενετική ανάλυση του δημόσπογγου
Alysina aerophoba, Nardo 1833 στην Μεσόγειο βάση του COI γονι-
δίου»**

Τσοτουλίδης Παναγιώτης

ΒΟΛΟΣ 2023

**«Πληθυσμιακή γενετική ανάλυση του δημόσπογγου
Aplysina aerophoba, Nardo 1833 στην Μεσόγειο βάση του COI γονι-
δίου»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- 1. Γκάφας Γεώργιος**, Αναπληρωτής Καθηγητής (Ph.D.), Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυοποθεμάτων, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- 2. Βαφείδης Δημήτριος**, Καθηγητής (Ph.D.), Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπόνδυλων και άμεση – έμμεση χρηστικότητα τους. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3. Εξαδάκτυλος Αθανάσιος**, Καθηγητής (Ph.D.), Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

*Στις Αθανασία, Νεκταρία και
Γαρυφαλλιά*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η αποπεράτωση της διπλωματικής διατριβής αποτέλεσε μία μακροχρόνια προσπάθεια, κατά την οποία έλαβα πληθώρα νέας γνώσης και κλήθηκα να αντιμετωπίσω αρκετά προβλήματα. Παρόλα αυτά, οφείλω να ομολογήσω πως σε καμία περίπτωση δεν θα μπορούσε να τελεσφορήσει η προσπάθεια αυτή χωρίς τη συνεχή και ανιδιοτελή υποστήριξη εκ μέρους της οικογένειας μου, η οποία άλλωστε μου παρείχε τη δυνατότητα να φοιτήσω και ακολούθως να αναπτυχθώ πνευματικώς.

Συνεπικουρικά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Γκάφα Γεώργιο, ο οποίος εδώ και τρία συναπτά έτη είναι πάντα εκεί να με βοηθήσει και να με κατευθύνει προς την ορθή κατεύθυνση για τη δημιουργία μίας ολιστικής εργασίας. Σε αυτή τη προσπάθεια συνετέλεσε, επίσης, η κυρία Σαραντοπούλου Ιωάννα, η αρωγή της οποίας ως προς το εργαστηριακό σκέλος ήταν πολύτιμη και απαραίτητη, έτσι ώστε να κατανοήσω τις εργαστηριακές εφαρμογές που απαιτούνταν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δημόσπογγος *Aplysina aerophoba* αποτελεί ένα από τα αντιπροσωπευτικότερα είδη σφουγγαριού της Μεσογείου, ενώ θεωρείται αυτόχθονο είδος της λεκάνης. Η σπουδαιότητά του έγκειται όχι μόνο στο γεγονός ότι αποτελεί κύριο είδος της βενθικής πανίδας, αλλά από αυτόν εξάγονται πολλά βιομόρια, με δυναμική φαρμακευτική δράση, πράγμα που μονοπώλησε το ενδιαφέρον των ερευνητών. Στη παρούσα ερευνητική εργασία εξετάστηκε πληθυσμός *A. aerophoba* από το κεντρικό Αιγαίο πέλαγος και συγκρίθηκε με άλλους μεσογειακούς πληθυσμούς, χρησιμοποιώντας το γονίδιο της υπομονάδας *c* της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI), η χρήση του οποίου φέρει μία πληθώρα πλεονεκτημάτων. Όσον αφορά τον πληθυσμό του σπόγγου από το Αιγαίο πέλαγος παρουσίασε 5 διαφορετικούς απλοτύπους, ενώ παρατηρείται υψηλή ποικιλομορφία βάση του δείκτη F_{ST} και της ανάλυσης μοριακής διακύμανσης. Μεταξύ των πληθυσμών της Μεσογείου, φαίνεται να υπάρχει γενετική διαφοροποίηση, ενώ οι πληθυσμοί από την Ιταλία και την Ισπανία εμφάνισαν κοινό απλότυπο. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με αρκετές εργασίες, οι οποίες υποστηρίζουν τη διαφοροποίηση των πληθυσμών ενός είδους μεταξύ της ανατολικής και δυτικής Μεσογείου θάλασσας. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαχρονικά εναλλασσόμενες κλιματολογικές και γεωμορφολογικές συνθήκες της λεκάνης. Με τον υπολογισμό του δείκτη Tajima's D επιβεβαιώνεται η θεωρία της ουδετερότητας, καθώς οι μεταλλάξεις δεν μεταβάλλουν τις αλληλικές συχνότητες των υπό εξέταση πληθυσμών *A. aerophoba*. Τέλος, από τη δημογραφική μελέτη του αιγαιοπελαγίτικου πληθυσμού, προέκυψε πως αυτός δεν υπέστη καμία ισχυρή μεταβολή σε εξελικτικό χρόνο.

Λέξεις κλειδιά: πληθυσμιακή γενετική, COI, *Aplysina aerophoba*, δημογραφία, φυλογεωγραφία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Γενικά για τους σπόγγους	1
1.2. Γεωγραφική κατανομή σπόγγων.....	4
1.3. <i>Aplysina aerophoba</i> , Nardo 1833	7
1.4. Πληθυσμιακή γενετική ανάλυση	8
1.5. Μιτοχονδριακό γενετικό υλικό και COI γονίδιο.....	10
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	12
2.1. Συλλογή δειγμάτων, εξαγωγή γενετικού υλικού και PCR.....	12
2.2. Βιοπληροφορική ανάλυση	15
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	19
3.1. NCBI Nucleotide BLAST.....	19
3.2. MEGA11	20
3.3. FABOX v.1.61.	21
3.4. AMOVA (Analysis of Molecular Variance).....	23
3.5. Δείκτης γενετικής ποικιλότητας (F_{ST})	24
3.6. Tajima's D.....	24
3.7. DIY-ABC v.2.1.0.....	25
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	28
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	33
6. ABSTRACT	44
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	45

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά για τους σπόγγους

Οι σπόγγοι είναι η πρώτη ταξινομική ομάδα των μεταζώων (με πάνω από 8.500 καταγεγραμμένα είδη, World Porifera Database; **Bell et al.**, 2015), ενώ εμφανίζονται σε ένα ευρύ φάσμα ενδιαιτημάτων (**Wörheide et.al.**, 2012), καθώς έχουν εντοπιστεί από ρηχές λίμνες με γλυκό νερό έως και σε υδροθερμικές πηγές της αβύσσου. Η εξελικτική τους επιτυχία μαρτυρείται από το γεγονός πως τα σφουγγάρια αποτελούν τη παλαιότερη ομάδα μεταζώων, με περισσότερα από 600 εκατομμύρια έτη παρουσίας (**Yin et.al.**, 2015; **Li et.al.**, 1998), ενώ η ύπαρξή τους στο Αιγαίο πέλαγος καταγράφεται στα κείμενα της αρχαιοελληνικής γραμματείας (**Gerovasileiou et.al.**, 2018; **Voultsiadou et.al.**, 2017).

Οι σπόγγοι παρουσιάζουν μία ποικιλία εφαρμογών, με αποτέλεσμα να αποτελούν πλέον αντικείμενο κοινωνικοοικονομικής συζήτησης και ερευνητικών προσπαθειών. Χαρακτηριστικές εφαρμογές των σπόγγων αποτελούν οι εξής:

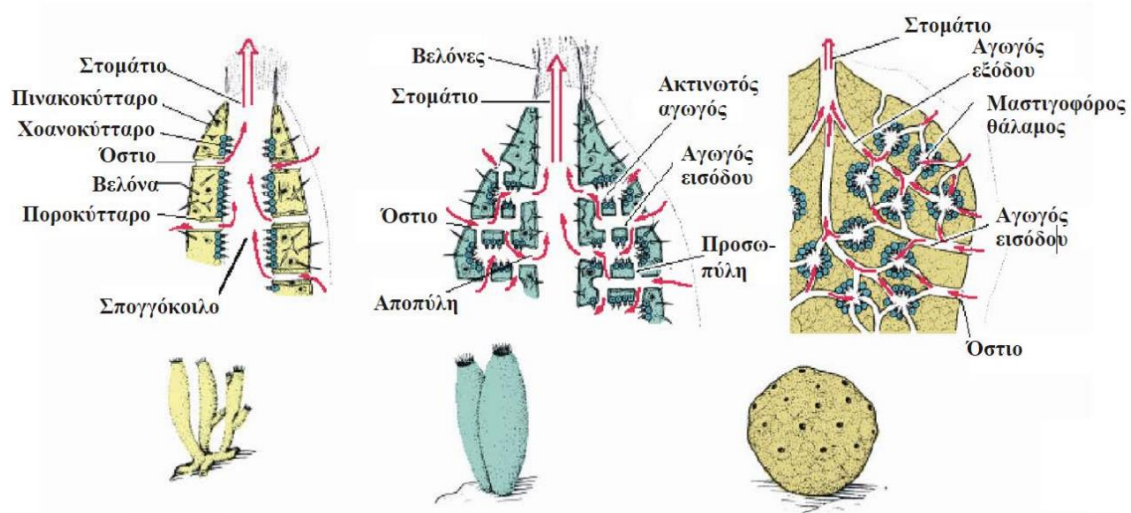
1. Εμπορική εκμετάλλευση των ειδών καθαρισμού. Τέτοιες δραστηριότητες παρατηρούνται ανά την υφήλιο, ενώ στην Ελλάδα εξέχον παράδειγμα αποτελεί η Κάλυμνος.
2. Οι σπόγγοι φαίνεται να διαχωρίστηκαν νωρίς στην εξελικτική ιστορία των μεταζώων, πράγμα που τους καθιστά σημαντικούς οργανισμούς μελέτης όχι μόνο για την εξέλιξη των σημερινών ζώων, αλλά και για τη σχεδίαση των φυλογενετικών δένδρων τους (**Wörheide et al.**, 2012).
3. Μπορεί να γίνει μελέτη της κυτταρικής διαφοροποίησης, καθώς αποτελούν τον απλούστερο οργανισμό ως προς την φυσιολογία και ανατομία. Μυστήριο αποτελεί, βέβαια, πως επιτυγχάνεται συγχρονισμένη κίνηση απουσία οργανωμένου νευρικού συστήματος.

4. Η αναγεννητική τους ικανότητα αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό, μιας και από ένα τμήμα μπορεί να δημιουργηθεί ολόκληρος οργανισμός. Αποσαφηνίζεται πως υπάρχει διαφωνία ως προς την ύπαρξη οργανωμένου ιστού στους σπόγγους, καθώς από πολλούς το εξωτερικό στρώμα πινακοκυττάρων θεωρείται ημιτελής ιστός.

5. Οι σπόγγοι αποτελούν πηγή βιοδραστικών ουσιών με φαρμακευτική δράση κατά μολύνσεων από παθογόνους μικροοργανισμούς, καρκινικών κυττάρων και αυτοάνοσων νόσων (Lee et al., 2001). Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός πως ήδη πολλές βιοδραστικές θαλάσσιες ουσίες εκπορεύονται από σπόγγους των ρηχών υδάτων και της βαθιάς θάλασσας (Higa et al., 2001). Οι βιοδραστικές αυτές ουσίες προέρχονται από τον μεταβολισμό των μικροοργανισμών που συνάπτουν σχέση αμοιβαιότητας με τους σπόγγους.

Η τυπική δομή ενός σπόγγου είναι πλήρως αντίστοιχη με τον τρόπο λήψης των θρεπτικών συστατικών, που είναι η διηθηματοφαγία, μία μορφή αιωρηματοφαγίας. Ως εδραίοι, λοιπόν, οργανισμοί απορροφούν το περιβάλλον ύδωρ, το οποίο διηθούν, απορροφώντας τα θρεπτικά συστατικά που επιπλέουν σε αυτό (de Goeij et al., 2008). Βάση, λοιπόν, της πολυπλοκότητας του συστήματος πρόσληψης των θρεπτικών, οι σπόγγοι μπορούν να κατηγοριοποιούνται σε τρεις σωματοδομές / τύπους: ασκώδης, συκώδης και λευκώδης (εικόνα 1). Και στους τρεις, ο σπόγγος περιβάλλεται εξωτερικά από ένα στρώμα πινακοκυττάρων, τα οποία διακόπτονται από πόρους – δερμικά όστια, από όπου εισέρχεται το νερό. Από εκεί το νερό κατευθύνεται από ένα σύστημα αγωγών και θαλάμων στα χοανοκύτταρα, η δομή των οποίων επιτρέπει το φιλτράρισμα του ύδατος, ενώ η στοίχισή τους μέσα στο σώμα του οργανισμού καθορίζει και σε ποιόν από τους παραπάνω τρεις τύπους θα ανήκει. Η περιοχή μεταξύ του πινακοδέρματος και των περιοχών με χοανοκύτταρα συμπληρώνεται από μία παχύρρευστη μάζα που λέγεται μεσοϋλή. Ένα χοανοκύτταρο είναι ένα κύτταρο που στον έναν πόλο του φέρει μία πληθώρα από

τριχοειδή (περιλαΐμιο) και ένα μαστίγιο, υπεύθυνα για την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και την δημιουργία ροής αντίστοιχα. Τα χρονοκύτταρα, μάλιστα, θεωρείται ότι εξελίχθηκαν από τα χρονομαστιγωτά (Laundon et al., 2019; Cavalier-Smith et al., 2017), τα οποία θεωρούνται πρόγονοι της πολυκυτταρικότητας των μεταζώων (Maldonado et al., 2004).



Εικόνα 1: Οι τρεις σωματοδομές των σπόγγων. Στο κάτω σχέδιο φαίνεται εξωτερικά ο σπόγγος, ενώ στο άνω σχέδιο πως διαμορφώνεται εσωτερικά. **Πηγή:** Σημειώσεις κ. Κουμουνδούρου Γ.

Ταξινομικά οι σπόγγοι μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κλάσεις, οι οποίες είναι: Calcarea, Hexactinellida, Homoscleromorpha και Demospongiae, και οι οποίες διαφοροποιούνται από την πρώτη έκδοση του Systema porifera (Cardenas et al., 2012). Τα χαρακτηριστικά κάθε μίας από τις παραπάνω κλάσεις αναλύονται στον **πίνακα 1**, που ακολουθεί.

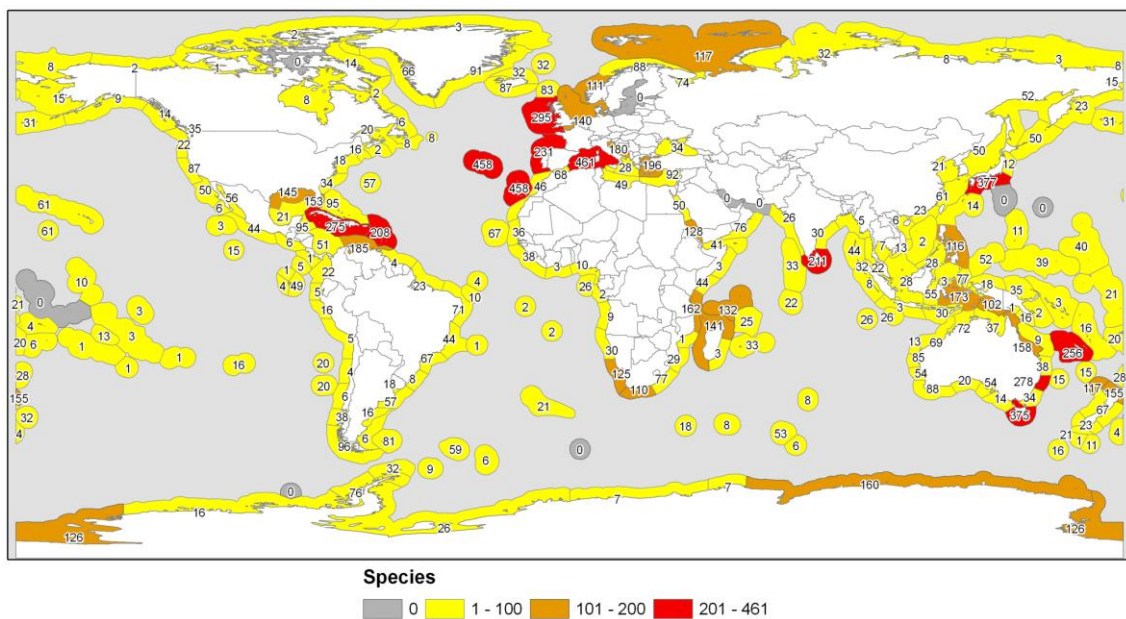
Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας κύριων χαρακτηριστικών των τεσσάρων κλάσεων σπόγγων.

Κλάση	Χαρακτηριστικά
Calcarea (Ασβεστόσπογγοι)	Σπόγγοι με σκληρίτες από CaCO ₃ που εντοπίζονται σε θαλάσσια ύδατα (Voigt et al. , 2012b; Wörheide et al. , 2012). Εμφανίζουν τρεις μορφές οργάνωσης (ασκώδης, λευκώδης και συκώδης τύπος), ενώ είναι σε μέγεθος μικροί.
Hexactinellida (Υαλόσπογγοι)	Σπόγγοι με σκληρίτες από Si που εντοπίζονται στα βαθιά θαλάσσια νερά (Wang et al. , 2010). Παρουσιάζουν συγκυτιακό τρόπο οργάνωσης (Wörheide et al. , 2012), ενώ εμφανίζουν συκώδη ή λευκώδη τύπο.
Demospongiae (Δημόσπογγοι)	Σπόγγοι με σκληρίτες από Si ή σπογγίνη ή και τα δύο (Borchiellini et al. , 2004; Van Soest et al. , 1990). Εμφανίζουν μόνο λευκώδη τύπο οργάνωσης. Εντοπίζονται τόσο σε γλυκά ύδατα όσο και σε θαλάσσια και το 85% των γνωστών μέχρι σήμερα ειδών σπόγγων ανήκουν σε αυτή τη κλάση (Hooper et al. , 2002, Systema Porifera).
Homoscleromorpha (Ομοσκληρόμορφοι)	Στους ομοσκληρόμορφους μπορεί να λείπει ο σκελετός. Εντοπίζονται σε κρυφά ενδιαιτήματα. Τα κύτταρα του πινακοδέρματος συνδέονται μεταξύ τους με προσκολλητικές κυτταρικές συνδέσεις (Ereskovsky et al. , 2014; 2007).

1.2. Γεωγραφική κατανομή σπόγγων

Οι σπόγγοι δύνανται να εντοπιστούν σε παγκόσμια κλίμακα και σε ένα ευρύ φάσμα ενδιαιτημάτων (**van Soest et al.**, 2012), γεγονός που κάνει πολλά είδη

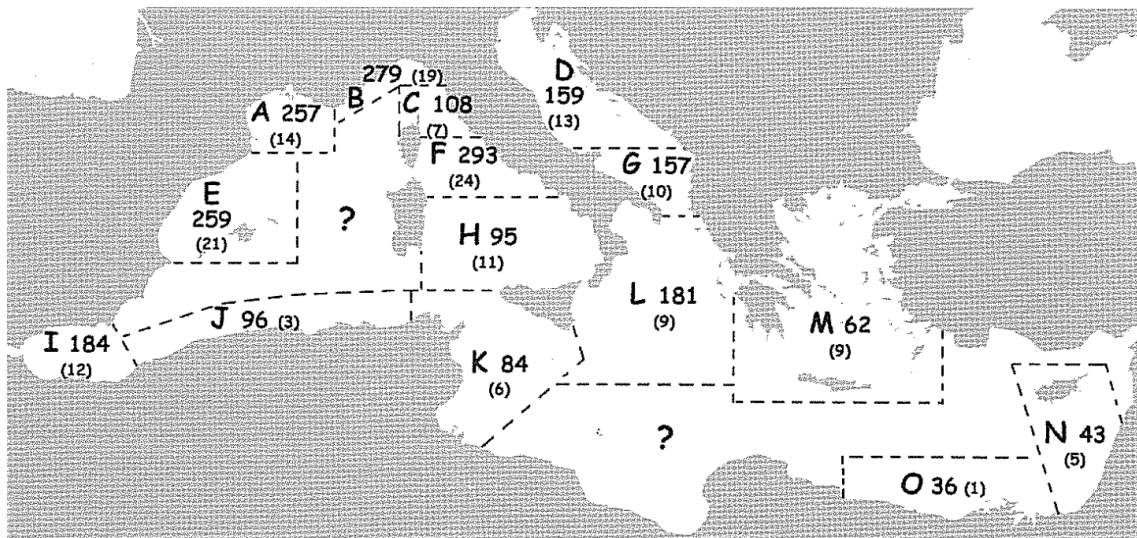
κοσμοπολίτικα. Ο van Soest, 2012 στο Systema Porifera προσπάθησε να δημιουργήσει μία ολιστική εργασία με το σύνολο των παρατηρημένων σπόγγων παγκοσμίως. Παρατήρησε πως η κατανομή των πληθυσμών σπόγγων παρουσιάζει αντιστοιχία με το κοινό ζωικό πρότυπο, πράγμα που σημαίνει πως περισσότερα είδη υπάρχουν στα τροπικά και υποτροπικά ύδατα και λιγότερα στα πολικά, όπως απεικονίζεται στην **εικόνα 2**. Επιπροσθέτως, από το σύνολο των σπόγγων που καταχωρήθηκαν στην παγκόσμια βάση σπόγγων (World Porifera Database) το 83% αντιστοιχεί σε δημόσπογγους, από 8% σε υαλόσπογγους και ασβεστόσπογγους και 1% σε ομοσκληρόμορφους, πράγμα που συμφωνεί με την μεσογειακή κατανομή (van Soest et al., 2012).



Εικόνα 2: Αριθμός καταγεγραμμένων ειδών σπόγγων σύμφωνα με το World Porifera Database. Είναι σαφές πως η Μεσόγειος θάλασσα και ο ΒΑ Ατλαντικός ωκεανός αποτελούν κέντρα βιοποικιλότητας σπόγγων. **Πηγή:** van Soest et al., 2012

Η Μεσόγειος είναι oligotροφική θάλασσα, που χαρακτηρίζεται από μεγάλο ρυθμό εξάτμισης και συνεπώς υψηλή αλατότητα. Γεωγραφικά, διακρίνεται σε ανατολική

και δυτική με σύνορο να αποτελεί το στενό μεταξύ Σικελίας και Τυνησίας. Οι δύο υπο-περιοχές εμφανίζουν διακριτά χαρακτηριστικά, τόσο φυσικοχημικά όσο και βιολογικά. Ταυτόχρονα, η συνολική βιοποικιλότητα και βιομάζα των σπόγγων αυτής υπερβαίνει του ΒΑ Ατλαντικού ωκεανού και αντιπροσωπεύει το 11% της παγκόσμιας βιοποικιλότητας αυτών (Xavier et al., 2012), μετατρέποντάς την σε παγκόσμιο hotspot βιοποικιλότητας σπόγγων (Pansini et al., 2003). Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός πως έχουν καταγραφεί 649 είδη σε ολόκληρη τη λεκάνη (Voultsiadou, 2009; Pansini et al., 2003). Η κατανομή αυτών στη λεκάνη φαίνεται να παρουσιάζει ένα πρότυπο αφθονίας από την ΒΔ περιοχή προς την ΝΑ, όπως φαίνεται στην **εικόνα 3** (Pansini et al., 2003). Εξαιρέση αποτελούν οι σπόγγοι καθαρισμού, η αφθονία των οποίων βαίνει μειούμενη από τα ανατολικά προς τα δυτικά, λόγω περιβαλλοντικών συνθηκών (Voultsiadou, 2009). Σε όλη τη λεκάνη, πάντως, οι σπόγγοι διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη σύσταση των βενθικών κοινοτήτων, παρουσιάζοντας υψηλούς δείκτες ενδημισμού (Coll et al., 2010).



Εικόνα 3: Αφθονία καταγεγραμμένων σπόγγων κάθε περιοχής της Μεσογείου. **Πηγή:** Pansini et al., 2003

1.3. *Aplysina aerophoba*, Nardo 1833

Ο σπόγγος *Aplysina aerophoba* αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς σπόγγους της Μεσογείου, που δύναται να εντοπιστεί σε βάθη από 5 έως 20 m, με μέγιστη καταγεγραμμένη πυκνότητα να είναι τα 1,6 άτομα m⁻² (Coppari et al., 2016). Πηγή τροφής του αποτελούν επιπλέοντα οργανικά θρύμματα, τα οποία καταναλώνει με απορρόφηση του ύδατος, ενώ γίνεται χρήση του DOM (de Goeij et al., 2008), κυρίως από την διήθηση του θαλασσίου βακτηρίου *Syneococcus* (Coppari et al., 2016). Στη μεσοϋλή του φιλοξενεί πλειάδα μικροοργανισμών, ο μεταβολισμός των οποίων παράγει αρκετές βιοδραστικές ουσίες (Binnewerg et al., 2020). Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο το μικροβίωμά του έχει μελετηθεί εκτενώς. Παρόλα αυτά, δεν έχει μελετηθεί αρκετά η βιολογία του σπόγγου. Στον πίνακα παρακάτω φαίνεται η ταξινόμική του είδους, σύμφωνα με το NCBI και το WoRMS. Η αναπαραγωγή του επιτυγχάνεται τόσο αγενώς όσο και εγγενώς, αλλά σε κάθε περίπτωση η ανάπτυξη είναι γραμμική και με διαφοροποιημένο ρυθμό σωματικής αύξησης για κάθε άτομο (Wulff et al., 1991).

Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Porifera
Κλάση	Demospongiae
Υποκλάση	Verongimorpha
Τάξη	Verongiida
Οικογένεια	Aplysinidae
Γένος	<i>Aplysina</i>
Είδος	<i>Aplysina aerophoba</i>

Το κλασικό ενδιαίτημα του *A. aerophoba* στα μεσογειακά ύδατα είναι ο πυθμένας των ρηχών υδάτων με άφθονο φως (**Idan et al.**, 2018), για να ωφελείται της δράσης των συμβιωτικών κυανοβακτηρίων. Παράλληλα, κατά τη διάρκεια του θέρους λόγω επικράτησης ακόμη ολιγοτροφικότερων συνθηκών, η διασπορά του είδους επεκτείνεται ακόμη και κάτω από το θερμοκλινές, όπου υπάρχουν σταθερότερες συνθήκες (**Coppari et al.**, 2016). Ωστόσο, η εξάπλωση του είδους σε ενδιαιτήματα της Μεσογείου που δεν παρουσιάζονται, όπως στις ημι-φωτεισμένες σπηλιές, έχει σχέση με την κλιματική αλλαγή. Στη σύμβαση της Βαρκελώνης, τα είδη του γένους *Aplysina* ανήκουν σε καθεστώς προστασίας της βιοποικιλότητάς τους.

1.4. Πληθυσμιακή γενετική ανάλυση

Η πληθυσμιακή γενετική είναι η μελέτη της γενετικής σύνθεσης των πληθυσμών, συμπεριλαμβανομένων των κατανομών και των αλλαγών στο γονότυπο και τη συχνότητα φαινοτύπων σε απόκριση των διαδικασιών της φυσικής επιλογής, της γενετικής παρέκκλισης, της μετάλλαξης και της γονιδιακής ροής (**Feng et al.**, 2023). Όσον αφορά τους σπόγγους, χρησιμοποιήθηκαν πυρηνικές μικροδορυφορικές περιοχές ιδίως κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας ή/και το γονίδιο COI του mtDNA, την ώρα που παρατηρείται υψηλή συντηρητικότητα του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού στα διπλοβλαστικά φύλα (**Bell et al.**, 2015).

Γενετικά οι μαζικές θανατώσεις (φυσικής ή ανθρωπογενούς αιτιολογίας) συνήθως οδηγούν στην επικράτηση του φαινομένου του στενωπού και συνακολουθούμενη μείωση της γενετικής ποικιλότητας (**Riesgo et al.**, 2016). Η κατάσταση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του δείκτη ενδογαμίας (**Frankham**, 2005). Η μείωση του δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους και η αύξηση της ενδογαμίας οδηγεί σε μείωση της εξελικτικής

δυναμικής και της αρμοστικότητας των ειδών στο ενδιαίτημά τους (**Frankhman**, 2005; **Spielman et al.**, 2004). Αποσαφηνίζεται πως στους σπόγγους και γενικά στους προσκολλημένους οργανισμούς, παρατηρείται υψηλός δείκτης ενδογαμίας (**Portela et al.**, 2016).

Για τις μελέτες πληθυσμιακής γενετικής και μοριακής βιολογίας του είδους αντιμετώπιστηκε το πρόβλημα της υψηλής συγγένειας με το είδος *Aplysina cavernicola* (**Chevaldonne et al.**, 2006). Τα δύο είδη εμφάνισαν τη μεγαλύτερη εξελικτική σχέση συγκριτικά με τους πληθυσμούς του ΒΑ Ατλαντικού ωκεανού και της Καραϊβικής (**Idan et al.**, 2018; **Heim et al.**, 2007). Το ερώτημα που τέθηκε λοιπόν ήταν ποιος μοριακός δείκτης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ώστε να γίνονται οι μελέτες χωρίς να συγχέονται τα δύο είδη σπόγγου. Το 2006 ο Pierre **Chevaldonne** χρησιμοποίησε τους μοριακούς δείκτες COI (mtDNA), ITS-2 (cDNA) και Miac-1 (μικροδορυφορική περιοχή), προς διελεύκανση του ερωτήματος αυτού. Κατέληξε, λοιπόν, στο ότι η περιοχή ITS-2 είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί λόγω των πολλών αντιγράφων στο γονιδίωμα, ενώ αποδοτικότερη αποδείχθηκε η δορυφορική περιοχή, λόγω της υψηλής αλληλικής διαφοροποίησης μεταξύ των υπό εξέταση πληθυσμών. Ο **Heim et al.**, 2007 διερεύνησε το ίδιο ερώτημα χρησιμοποιώντας τους μοριακούς δείκτες ITS-1, -2, COI, 16SrRNA, 12SrRNA και άλλους. Διαπίστωσε πως μόνο το COI απέδωσε στη διάκριση μεταξύ των ειδών *A. cavernicola* και *A. aerophoba*. Πλέον στις μελέτες πληθυσμιακής γενετικής χρησιμοποιείται κατά κόρων το γονίδιο COI, ιδίως για το *A. aerophoba* στη Μεσόγειο. Επιπροσθέτως, από την ανάλυση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας στο COI έδειξε ότι υπάρχουν έξι φυλογενετικές πορείες (**Heim et al.**, 2007).

1.5. Μιτοχονδριακό γενετικό υλικό και COI γονίδιο

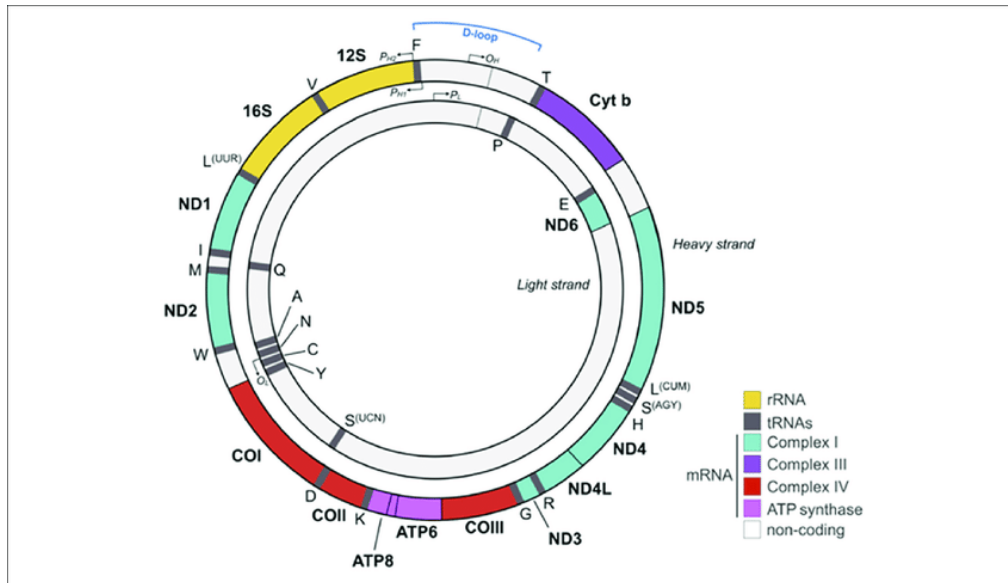
Το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό των ζώων (mtDNA) (**εικόνα 4**) διαδραματίζει ολόένα και σημαντικότερο ρόλο στη μελέτη της πληθυσμιακής γενετικής και της εξελικτικής βιολογίας. Με τη μελέτη του mtDNA μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα όσον αφορά τη δομή του πληθυσμού, τη γεωγραφική διαφοροποίηση, τη ζωογεωγραφία και τη φυλογένεση (**Harrison**, 1989). Συνεπώς, οι αλληλουχίες του mtDNA είναι ιδανικές για τη μελέτη της πληθυσμιακής δομής, της γονιδιακής ροής, του υβριδισμού και των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών του ίδιου είδους (**Avise et al.**, 1994; **Moritz et al.**, 1987), για τους εξής λόγους:

1. Σε ένα κύτταρο υπάρχουν πολλά αντίγραφα του mtDNA.
2. Το mtDNA είναι πιο χαρακτηρισμένο από το πυρηνικό (**Hagelberg**, 1994)
3. Λόγω αδυναμίας διενέργειας ανασυνδυασμού, οι τυχόν μεταλλαγές οφείλονται αποκλειστικώς σε μεταλλάξεις (**Hagelberg**, 1994).
4. Είναι απλοειδές.
5. Δεν υπάρχουν εσωτερικές μη μεταγραφόμενες περιοχές, όπως μεταθετά στοιχεία, ψευδογονίδια, ιντρόνια και επαναλήψεις βάσεων (**Avise et al.**, 1987). Εξαίρεση αποτελεί η τρίκλωνη περιοχή D-loop (**Stoneking et al.**, 1991), που δεν μεταγράφεται αλλά ελέγχει τη μεταγραφή των μιτοχονδριακών γονιδίων.
6. Το mtDNA εξελίσσεται πέντε με δέκα φορές ταχύτερα του πυρηνικού.

Παρόλα αυτά, θεωρίες υποστηρίζουν ότι η χρήση του mtDNA ως μοριακός δείκτης για πληθυσμιακές – φυλογενετικές μελέτες είναι προβληματική, λόγω του ότι τα γονίδια του δεν είναι κατάλληλα συντηρημένα (**Deagle et al.**, 2014; **Chen**, 2012). Κάποιοι από τους γενετικούς τόπους που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι το 16SrRNA (**Wörheide et.al.**, 2012), 18SrRNA (**Manuel et.al.**, 2003), 28SrRNA (**Dohrmann et.al.**,

2008) και το γονίδιο για τη shock protein Hsp70 (**Koziol et.al., 1998**). Πλέον, για τις φυλογενετικές αναλύσεις και τη μελέτη της πληθυσμιακής γενετικής χρησιμοποιείται ευρέως το γονίδιο της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής c οξειδάσης (COI). Αυτό διότι:

1. Εντοπίζεται στο mtDNA.
2. Εμφανίζει τόσο εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές, όσο και ευμεταύλητες.
3. Είναι χρήσιμο για την εύρεση διαφορών εντός ενός πληθυσμού ενός είδους (**Chevaldonne et.al., 2006**). Η ποικιλότητα, δε, των νουκλεοτιδίων αποτελεί καλό δείκτη για τη πρώτη αξιολόγηση της κατάστασης των πληθυσμών, ιδίως όταν η απογραφή είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί (**Petit-Marty, 2020**).
4. Στον τομέα της οικολογίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση της βιοποικιλότητας σε μία περιοχή με τη τεχνική eDNA (**Deagle et al., 2014**).
5. Η αλληλουχία του έχει καταχωρηθεί για πολλά είδη, πράγμα που το κάνει ιδανικό τόσο για ενδοπληθυσμιακές όσο και για μεταξύ πληθυσμών συγκρίσεις (**Deagle et al., 2014**).
6. Οι πρόσφατες εξελίξεις στα πρωτόκολλα προσδιορισμού αλληλουχίας DNA συνηγορούν υπέρ της χρήσης του, ιδίως για μελέτη μεταζώων (**Andujar et al., 2018**).
7. Υπάρχουν πλεονεκτήματα σχετικά με τη μείωση του θορύβου (**Andujar et al., 2018**), που αναφέρεται στο επίπεδο διακύμανσης της γονιδιακής έκφρασης ακόμη και όταν δύο οργανισμοί μοιράζονται κοινές γενετικές πληροφορίες και περιβαλλοντικές συνθήκες (**Raser et al., 2005**).



Εικόνα 4: MtDNA. Φαίνονται τα γονίδια και η περιοχή D-loop. Τα γονίδια του έχουν σχέση με τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης και του κυτταρικού μεταβολισμού. **Πηγή:** <https://www.researchgate.net/>

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συλλογή δειγμάτων, εξαγωγή γενετικού υλικού και PCR

Αρχικά, συλλέχθηκαν έξι δείγματα *A. aerophoba* από το Αιγαίο πέλαγος με κατάδυση, τα οποία συντηρήθηκαν στους $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, χωρίς καμία περαιτέρω κατεργασία. Από τα δείγματα αυτά παραλήφθηκε τμήμα τους, αποτελούμενο τόσο από πινακόδερμα όσο και από μεσοϋλη, όπου εφαρμόστηκαν ατελέσφορα τα πρωτόκολλα εξαγωγής DNA με EDTA και με εμπορικό kit. Επιτυχώς εξήχθη το DNA με εφαρμογή του πρωτοκόλλου ctab (Doyle & Doyle, 1987), όπου περιγράφεται ως εξής:

1. Σε 25 mg δείγματος προστίθενται σε ένα eppendorf 500 μlt ctab, 1 μlt β -mercaptoethanol και 30 μlt PtnK συγκέντρωσης 20 $\mu\text{g}/\text{lt}$.
2. Το δείγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο των $56\text{ }^{\circ}\text{C} - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ για όλη τη νύκτα.

3. Στο παραπάνω erpendorf προστίθενται 500 μ l χλωροφόρμιο:ισομυλική αλκοόλη (24:1), αφού το erpendorf φτάσει σε $T_{\Delta\Omega\text{ΜΑΠΙΟΥ}}$.
4. Αναδεύεται 10 min και κατόπιν φυγοκεντρείται για 15 min στις 12.000 rpm σε $T 4^{\circ}\text{C}$.
5. Λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα και τοποθετείται σε άλλο erpendorf.
6. Προστίθεται σε αυτό ισοπροπανόλη, όση τα $2/3$ του όγκου του διαλύματος αυτού.
7. Αναδεύεται έως ότου αναμειχθούν επαρκώς.
8. Αφήνεται για 30 min σε $T_{\Delta\Omega\text{ΜΑΠΙΟΥ}}$.
9. Φυγοκεντρείται για 15 min στις 12.000 rpm σε $T 4^{\circ}\text{C}$.
10. Αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα ισοπροπανόλης, καθώς το γενετικό υλικό έχει καθιζάνει ήδη.
11. Εκτελούνται δύο πλύσεις με 75% αιθανόλη (κρύα). Σε κάθε πλύση προστίθενται 200 μ l αιθανόλη και κατόπιν φυγοκεντρείται για 5 min.
12. Προστίθενται 25 – 30 ml Tris-HCl ανάλογα με το ίζημα.

Αφού το γενετικό υλικό των δειγμάτων εξαχθεί, συνεχίζεται η διαδικασία με τον προσδιορισμό της ποιότητας και καθαρότητας του εξαγόμενου υλικού. Ως εκ τούτου, το γενετικό υλικό ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης, αφού πρώτα παρασκευαστεί το τζελ αγαρόζης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται ως ακολούθως:

1. Σε 60 ml 1x TBE προστίθενται 0,48gr αγαρόζης.
2. Το διάλυμα τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων, έως ότου γίνει διαφανές αλλά χωρίς να επέλθει έντονος βρασμός.
3. Ψυχραίνεται υπό τρεχούμενο νερό.
4. Προστίθενται 3,5 μ l midoree green (δείκτης αγαρόζης) και κατόπιν αναδεύεται και χύεται το διάλυμα στον δίσκο του ηλεκτροφορέα, εφαρμόζοντας παράλληλα χτένα για τον σχηματισμό των πηγαδακίων.

5. Ο δίσκος τοποθετείται σε χαμηλή θερμοκρασία για 10-20 min, έως ότου γίνει στερεό.
6. Σε αριθμημένες θέσεις ανάδευσης προστίθενται στη θέση (1) τα εξής: 1 μlt ladder και 1 μlt loading buffer. Στις υπόλοιπες θέσεις (2...) προστίθενται 5 μlt DNA δείγματος και 1 μlt loading buffer. Σε κάθε θέση εφαρμόζεται ανάδευση με τη τεχνική by-pipeting.
7. Με χρήση πιπέτας λαμβάνονται τα παραπάνω διαλύματα και εκχύνονται στα πηγαδάκια του στερεού τζελ αγαρόζης.
8. Εφαρμόζονται στον ηλεκτροφορητή και αφήνονται για όση ώρα απαιτηθεί για να φτάσει το διάλυμα με το DNA δύο θήκες μακριά από τα αρχικά πηγαδάκια.
9. Αφού τελειώσει η διαδικασία, τοποθετείται το τζελ με το DNA στη συσκευή UV και με τη χρήση λογισμικού λαμβάνεται τη φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης.

Το midoree green προστίθεται στο τζελ αγαρόζης, καθώς είναι υπεύθυνο για την οπτικοποίηση του γενετικού υλικού στη συσκευή UV. Αυτό διότι αποτελεί το μέσον απορρόφησης της ακτινοβολίας. Το loading buffer αποτελεί, ουσιαστικά, μείγμα με γλυκερόλη (6x) μαζί με χρωστική. Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται για οπτικοποίηση της διαδρομής του DNA του δείγματος εντός του τζελ.

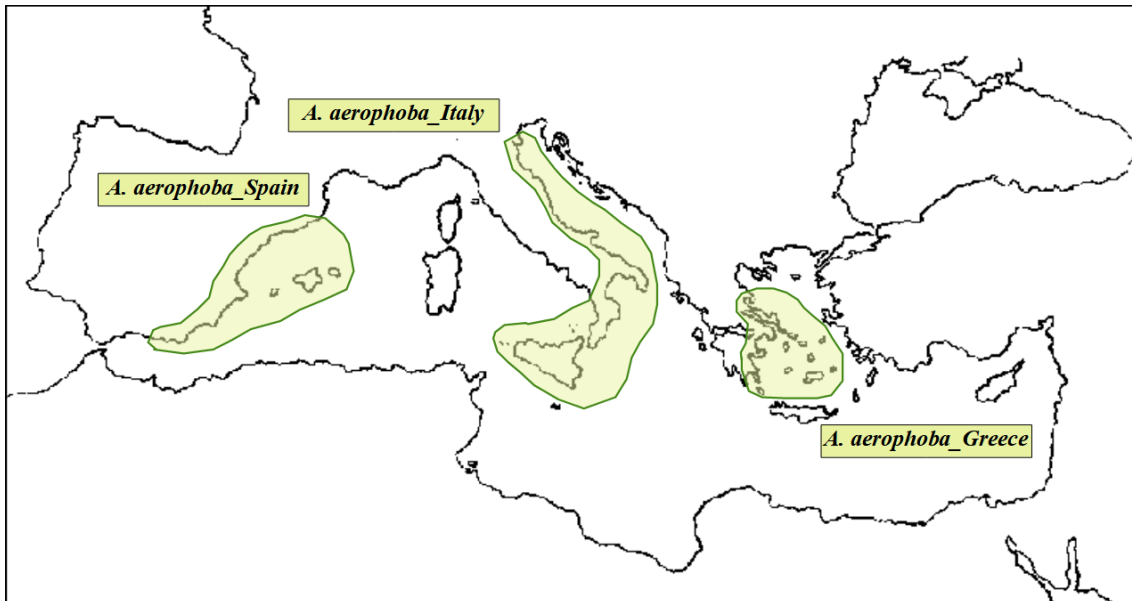
Μετά από αυτό, εφαρμόστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου COI από κάθε δείγμα. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές γενικής χρήσης (universal) COI forward (5'→3') και reverse (3'→5'), αλλά τα αποτελέσματα λήφθηκαν ανεπιτυχώς για τα έξι δείγματα. Έτσι, παρασκευάστηκαν ειδικοί εκκινητές για το γονίδιο COI του *A. aerophoba*, του οποίου η αλληλουχία είναι για το forward 5'- AATTAGACTGGAGTTATCTGC - 3' και για το reverse 3'- GCATAGTAATTGCTCCAGC - 5'. Επειδή οι εκκινητές ελήφθησαν σε μορφή σκόνης, διαλύθηκαν σε T-Buffer (10 μmol Tris-HCL, 1 μmol EDTA). Αφού παρασκευαστεί το διάλυμα με τους εκκινητές (primer solution) με την απαιτούμενη ποσότητα T-Buffer,

τοποθετείται σε υδατόλουτρο για 5-10 λεπτά. Προκειμένου να καθοριστούν σε ποιες ιδανικές συνθήκες ($MgCl_2$ και T) πρέπει να πραγματοποιηθεί η PCR, εφαρμόζεται πρώτα η gradient PCR. Ως εκ τούτου, για τη θερμοκρασία, η T 49,5 °C προέκυψε ως η καταλληλότερη για τα δείγματα. Όσον αφορά το $MgCl_2$, ήταν πιο αποτελεσματικό σε ποσότητα 2 μl. Τέλος, παρασκευάζεται το MasterMix, δηλαδή ένα διάλυμα με όλα τα απαραίτητα στοιχεία για τη PCR στη σωστή ποσότητα για τα απαιτούμενα δείγματα. Για ένα δείγμα, προστέθηκαν 8,6 μl H_2O , 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος, 2 μl $MgCl_2$, 1,5 μl εκκινητή forward, 1,5 μl εκκινητή reverse, 0,2 μl DNTP's και 0,2 μl TaqPolymerase. Τέλος, πριν από τον κυκλοποιητή, προστέθηκε 1 μl DNA. Εκεί επιτυγχάνονται 30 κύκλοι στην ιδανική θερμοκρασία για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου στόχου.

2.2. Βιοπληροφορική ανάλυση

Οι αλληλουχίες του COI γονιδίου των σπόγγων του Αιγαίου πελάγους παραλήφθηκαν αποθηκευμένες σε `_ab1` και σε `_F.fasta`. Επειδή σε κάθε αλληλουχία υπήρχαν γονιδιακές θέσεις με αδιευκρίνιστη αζωτούχα βάση, χρησιμοποιήθηκε αρχικά η εφαρμογή MEGA11, όπου αφού οι αλληλουχίες φορτώθηκαν, με τη μορφή `_ab1`, αποσαφηνίστηκε ποια βάση αντιστοιχεί σε κάποια άγνωστη θέση, μέσω της μελέτης του χρωματογραφήματος. Κατόπιν, αυτές φορτώθηκαν στο πρόγραμμα του NCBI Nucleotide BLAST, έτσι ώστε να διαπιστωθεί πως τα έξι δείγματα αντιστοιχούν πράγματι στο *A. aerophoba*. Οι αλληλουχίες, λοιπόν, που αντιστοιχούσαν στο υπό μελέτη είδος αποθηκεύτηκαν σε ένα κοινό Notepad, στο οποίο προστέθηκαν και οι αλληλουχίες που βρέθηκαν στο NCBI από διάφορες περιοχές της Μεσογείου. Συγκεκριμένα, λοιπόν, στο τελικό Notepad υπήρχαν αλληλουχίες από την Ελλάδα (κεντρικό Αιγαίο πέλαγος), την Ισπανία (Gulf of Rosses) (Steinert et al., 2017) και την Ιταλία (Costa G. et al., 2020). Οι

αλληλουχίες πήραν τη κωδική ονομασία >GREECE-1|U|GREECE, όπου με GREECE-1 δηλώνεται το δείγμα, το |U| σημαίνει πως το συγκεκριμένο δείγμα είναι αδιευκρίνιστου φύλου και με GREECE δηλώνεται η χώρα προέλευσης του δείγματος. Οι περιοχές από όπου ελήφθησαν αλληλουχίες του COI γονιδίου από το NCBI αναπαρίστανται στην **εικόνα 5**.




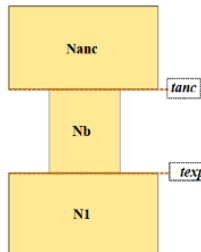
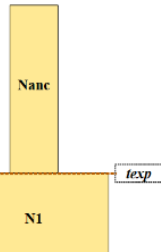
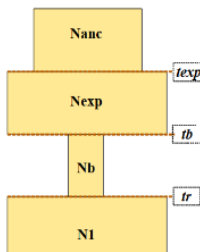
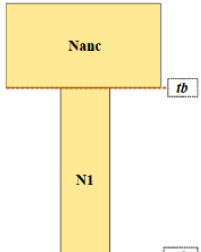
Εικόνα 5: Οι περιοχές, από όπου ελήφθησαν και συγκρίθηκαν οι αλληλουχίες από το COI γονίδιο του *A. aerophoba*.

Το τελικό Notepad φορτώνεται στο πρόγραμμα Aliview, όπου γίνεται στοίχιση των αλληλουχιών. Οι επεξεργασμένες αυτές αλληλουχίες αποθηκεύονται σε μορφή fasta και φορτώνονται στη διαδικτυακή πλατφόρμα FABOX v.1.61., έτσι ώστε να εξαχθούν οι απλότυποι από τις αλληλουχίες καθώς επίσης και η γραμμή εντολών που θα χρησιμοποιηθεί στην εφαρμογή Arlequin v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Σε αυτήν εξετάζεται η ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των υπό μελέτη πληθυσμών. Η γραμμή εντολών τροποποιήθηκε κατά τέτοιο τρόπο, ώστε οι αλληλουχίες από την Ισπανία και την Ιταλία να συστήνουν τον πληθυσμό «WEST» και οι απλότυποι από την Ελλάδα τον πληθυσμό

«EAST». Συγκεκριμένα, λοιπόν, εφαρμόζεται η μέθοδος AMOVA (Analysis of Molecular Variance), διενεργείται έλεγχος ουδετερότητας (neutrality test, Tajima's test), ενώ υπολογίζεται και ο δείκτης F_{ST} . Η στατιστική επεξεργασία AMOVA χρησιμοποιείται για να μετρηθεί η γενετική διαφοροποίηση τόσο εντός του κάθε πληθυσμού όσο και μεταξύ των υπό μελέτη πληθυσμών (Huang et al., 2021; Urbaniak et al., 2021). Έτσι, μπορεί να εξεταστεί εάν η γενετική διαφοροποίηση είναι ισχυρότερη εντός ενός πληθυσμού ή μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών (Szczecinska et al., 2016). Ο δείκτης Tajima's D μετρά τη νουκλεοτιδική διαφοροποίηση της υπό μελέτη αλληλουχίας με την υποθετική αλληλουχία που θα πρόκυπτε εάν το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος του πληθυσμού απ' όπου προέρχεται παραμένει διαρκώς σταθερό και το σύνολο των εκδηλωμένων πολυμορφισμών είναι ουδέτερο (Tajima, 1989). Επιπροσθέτως, ο βαθμός διαφοροποίησης μεταξύ πληθυσμών σε ουδέτερους τόπους δεικτών, όπως εκτιμάται από τον δείκτη F_{ST} , υποδεικνύει τον αναμενόμενο βαθμό διαφοροποίησης των πληθυσμών ως αποτέλεσμα της συνδυασμένης επίδρασης της γενετικής παρέκκλισης και της γονιδιακής ροής (Merilä et al., 2001). Οι εκτιμήσεις μπορεί να έχουν αρνητικές τιμές που δεν έχουν βιολογικό νόημα, αλλά αντισταθμίζουν τις υπερεκτιμήσεις, ειδικά σε χαμηλά επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης (Willing et al., 2012). Σύμφωνα με αυτό, παίρνουμε ως παραδοχή ότι οι αρνητικές τιμές είναι ίσες με το μηδέν. Είναι σημαντικό να μην υπολογίζεται ο R_{ST} , καθώς αυτός ο δείκτης είναι επιτυχής μόνο εάν τα δείγματα που εξετάζουμε είναι περισσότερα από 50 (Riesgo et al., 2016).

Τέλος, οι απλότυποι που ανιχνεύθηκαν μόνο στο κεντρικό Αιγαίο αποθηκεύτηκαν στο NotePad και φορτώθηκαν στην εφαρμογή diy-abc v.2.1.0, προκειμένου να εφαρμοστεί η θεωρία της σύμφυσης (coalescence theory) για αυτόν τον πληθυσμό. Επομένως, υποθετικά δημογραφικά μοντέλα του πληθυσμού *A. aerophoba* εξετάστηκαν με bayesian

στατιστικά, όπως παρουσιάζονται στην **εικόνα 6**. Διευκρινίζεται ότι για κάθε σενάριο ορίστηκαν διαφορετικές αριθμητικές τιμές ως παράμετροι (priors). Μετά τον καθορισμό των δημογραφικών σεναρίων, διευκρινίστηκε ποιες στατιστικές παράμετροι θα υπολογιστούν. Αναφέρεται ότι για τον – bayesian – υπολογισμό των παραμέτρων και την αξιολόγηση των δημογραφικών σεναρίων ορίστηκαν 5.000.000 επαναλήψεις στο (Run computations).

Scenario 1	Scenario 2	Scenario 3	Scenario 4	Scenario 5
				
N1 t0 sample 1	N1 t0 sample 1 texp VarNe 1 Nb tanc VarNe 1 Nanc	N1 t0 sample 1 t0 VarNe 1 Nexp texp VarNe 1 Nanc	N1 t0 sample 1 tr VarNe 1 Nb tb VarNe 1 Nexp texp VarNe 1 Nanc	N1 t0 sample 1 tb VarNe 1 Nanc

Εικόνα 6: Συγκεντρωτική έκθεση των δημογραφικών σεναρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην εφαρμογή diy-abc v.2.1.0, για την εξακρίβωση του ισχύοντος δημογραφικού μοντέλου για τους σπόγγους *A. aerophoba* των ελληνικών δειγμάτων. Επιτυγχάνεται, ταυτοχρόνως, οπτικοποίηση αυτών, στην οποία το πάχος του εκάστοτε τμήματος είναι ανάλογο του μεγέθους του εκεί πληθυσμού. Αποσαφηνίζονται τα εξής: **N1**→ υπάρχων πληθυσμός, **t0**→ χρόνος σε $t=0$, **tb**→ χρόνος εκδήλωσης του φαινομένου του στενωπού (bottleneck effect), **tr**→ χρόνος πληθυσμιακής ανάκτησης, **Nanc**→ προγονικός πληθυσμός, **Nb**→ πληθυσμός που έχει υποστεί το φαινόμενο του στενωπού, **texp**→ χρόνος που παρατηρήθηκε πληθυσμιακή ανάπτυξη, **tanc**→ χρόνος στον οποίο ο προγονικός πληθυσμός υπέστη για πρώτη φορά κάτι.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. NCBI Nucleotide BLAST

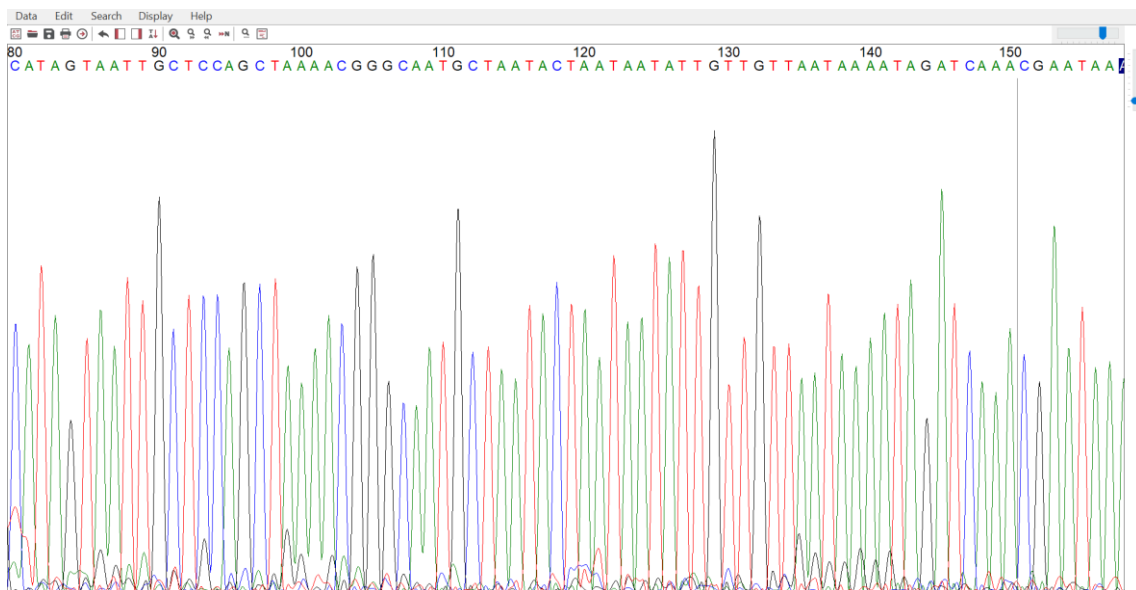
Αφού στο εξαγόμενο γενετικό υλικό κάθε ενός εκ των έξι δειγμάτων εφαρμόστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τους primers για το γονίδιο της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, τα δείγματα στάλθηκαν σε διαπιστευμένο εργαστήριο αλληλούχισης, ώστε να ληφθούν οι αλληλουχίες των δεοξυριβονουκλεοτιδίων για κάθε ένα απ' αυτά. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ελήφθησαν με τη μορφή `_ab1` και `_F.fasta`. Κάθε αρχείο `_F.fasta` φορτώθηκε στο πρόγραμμα Nucleotide BLAST, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί το είδος, στο οποίο αντιστοιχεί κάθε μία από τις αλληλουχίες αυτές, όπως φαίνεται στον παρακάτω **πίνακα 2**.

Πίνακας 2: Αντιστοίχιση των αλληλουχιών που ελήφθησαν από το διαπιστευμένο εργαστήριο με το είδος μέσω του NCBI Nucleotide BLAST.

Όνομα δείγματος	Κωδική ονομασία	Είδος αντιστοίχισης	Γονίδιο	Ποσοστό αντιστοίχισης αλληλουχίας
sp1	GREECE-1	<i>Aplysina aerophoba</i>	COI	99,24%
sp2	GREECE-2	<i>Aplysina aerophoba</i>	COI	99,38%
sp3	GREECE-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	COI	99,71%
sp4	GREECE-4	<i>Aplysina aerophoba</i>	COI	97,97%
sp5	GREECE-5	<i>Aplysina aerophoba</i>	COI	99,58%
sp6	GREECE-6	<i>Aplysina aerophoba</i>	COI	97,71%

3.2. MEGA11

Στο πρόγραμμα MEGA11 φορτώθηκαν όλες οι αλληλουχίες που είχαν αποθηκευτεί σε μορφή `.ab1`, έτσι ώστε να εξαχθεί το χρωματογράφημά τους όπως φαίνεται στην **εικόνα 7**. Όσον αφορά τα μοβ γράμματα, αυτά προκύπτουν από αδυναμία του εργαστηρίου αλληλούχισης να αντιστοιχηθούν οι συγκεκριμένες γονιδιακές θέσεις με κάποιο συγκεκριμένο δεοξυριβονουκλεοτίδιο, με αποτέλεσμα να αντικαθίστανται απ' αυτά βάση προκαθορισμένης ονοματολογίας του IUPAC (IUPAC codes). Η αντικατάσταση των γραμμάτων αυτών επιτυγχάνεται με παρατήρηση των καμπύλων των χρωματογραφημάτων, με αποτέλεσμα τελικώς να παραλαμβάνεται η πλήρης αλληλουχία δεοξυριβονουκλεοτιδίων της συγκεκριμένης γονιδιακής περιοχής χωρίς ασυνέχειες.



Εικόνα 7: Τυπική μορφή χρωματογραφήματος, μετά την εισαγωγή της αλληλουχίας του COI γονιδίου κάποιου είδους στο πρόγραμμα MEGA11. Αποσαφηνίζεται πως σε αυτό το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στη θυμίνη (T), το πράσινο στην αδενίνη (A), το μαύρο στη γουανίνη (G) και το μπλε στη κυτοσίνη (C), ενώ με μοβ χρώμα φαίνονται τα αδιευκρίνιστα γράμματα.

3.3. FABOX v.1.61.

Αφού διευκρινιστούν τα δεοξυριβουοκλεοτίδια με το πρόγραμμα MEGA11, δημιουργήθηκε ένα σημειωματάριο με τις αλληλουχίες βάσεων του COI γονιδίου από την Ελλάδα, την Ισπανία και την Ιταλία. Αυτό φορτώθηκε στη διαδικτυακή εφαρμογή FABOX v.1.61., η οποία κατέδειξε την ύπαρξη έξι διακριτών απλοτύπων, ο ένας κοινός μεταξύ των δειγμάτων από την Ισπανία και την Ιταλία (MED-1) και οι υπόλοιποι πέντε να εντοπίζονται μεταξύ των δειγμάτων του Αιγαίου πελάγους (MED-2,3,4,5,6) (βλέπε Παράρτημα). Στον **πίνακα 3** φαίνονται τα χαρακτηριστικά κάθε απλοτύπου.

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας των εξαγόμενων απλοτύπων από το FABOX v.1.61. Φαίνονται, επίσης, το μήκος των αλληλουχιών του γονιδίου καθώς επίσης και η χώρα προέλευσης της αλληλουχίας.

Α/Α απλοτύπου	Όνομα απλοτύπου	Αριθμός αλληλουχιών	Μήκος αλληλου- χίας απλοτύπου	Χώρα προέλευ- σης αλληλουχιών
1.	MED-1	4	488 bp	ITALY-1 SPAIN-1, -2, -3
2.	MED-2	1	488 bp	GREECE-6
3.	MED-3	1	488 bp	GREECE-5
4.	MED-4	1	488 bp	GREECE-4
5.	MED-5	1	488 bp	GREECE-3
6.	MED-6	2	488 bp	GREECE-1, -2

Από τα αποτελέσματα του FABOX v.1.61 οι αλληλουχίες των σπόγγων της Μεσογείου διακρίθηκαν σε δύο ομάδες, με την ομάδα WEST να ενσωματώνει τα άτομα A.

aerophoba της Ισπανίας και της Ιταλίας και με την ομάδα EAST να αντιπροσωπεύει τα άτομα του σπόγγου από το Αιγαίο πέλαγος, όπως φαίνεται στον **πίνακα 4**.

Πίνακας 4: Συμπεριληπτικός πίνακας αντιστοίχισης των δύο υπό σύγκριση πληθυσμών με τους απλοτύπους που εντοπίζονται σε άτομα του *A. aerophoba* στη Μεσόγειο θάλασσα.

Πληθυσμός	Αριθμός ατόμων	Αριθμός απλοτύπων	Απλότυποι
WEST	4	1	MED-1
EAST	6	5	MED-2, -3, -4, -5, -6

Τέλος, οι αλληλουχίες των σπόγγων από το Αιγαίο πέλαγος (Ανατολική Μεσόγειος), που εξακριβώθηκαν στη παρούσα εργασία, αναρτήθηκαν στη βάση δεδομένων NCBI, με τους ληφθέντες κωδικούς αριθμούς (accession number) να φαίνονται στον **πίνακα 5**.

Πίνακας 5: Αντιστοίχιση δειγμάτων από το Αιγαίο πέλαγος με τους απλοτύπους και τον κωδικό αριθμό καταχώρησης (accession number) στο NCBI.

Δείγμα σπόγγου	Απλότυπος	Accession number NCBI
GREECE_1	MED-6	SUB13503082 seq_1 OR100702
GREECE_2		SUB13503082 seq_2 OR100701
GREECE_3	MED-5	SUB13503082 seq_3 OR100700
GREECE_4	MED-4	SUB13503082 seq_4 OR100699
GREECE_5	MED-3	SUB13503082 seq_5 OR100698
GREECE_6	MED-2	SUB13503082 seq_6 OR100697

3.4. AMOVA (Analysis of Molecular Variance)

Ακολουθείται στατιστική επεξεργασία των δύο υπό εξέταση πληθυσμών με την ανάλυση της μοριακής διακύμανσης (AMOVA) να εκτελείται στην εφαρμογή Arlequin v.3.5. Για την στατιστική επεξεργασία AMOVA (bayesian statistical analysis, AMOVA) ορίζεται η μηδενική υπόθεση (H_0) ως καμία γενετική διαφοροποίηση εντός ενός πληθυσμού ή μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών ($p > 0,05$), ενώ κατά την υπόθεση H_1 υπάρχει στατιστικώς σημαντική γενετική διαφοροποίηση εντός ενός γενετικού τόπου σε έναν συγκεκριμένο πληθυσμό ($p < 0,05$). Από το πρόγραμμα Arlequin v.3.5. αναδείχθηκε πως η γενετική διαφοροποίηση εντός των πληθυσμών EAST και WEST με ποσοστό περίξ του 50%, όπως απεικονίζεται στον **πίνακα 6**. Αυτό επιβεβαιώνεται από την εφαρμογή ανάλυσης της μοριακής διακύμανσης, όπου $p = 0,024 \pm 0,005 < 0,05$ (Υπόθεση H_1).

Πίνακας 6: Εφαρμογή της ιεραρχικής ανάλυσης μοριακής διακύμανσης (AMOVA) για τους πληθυσμούς EAST και WEST για το *A. aerophoba*. Ο πληθυσμός WEST συστήνεται από τους απλοτύπους της Ισπανίας και της Ιταλίας, όπως εξήχθησαν από το NCBI, ενώ ο πληθυσμός EAST από τους υπόλοιπους του Αιγαίου πελάγους.

Διαφοροποίηση	df	Sum of squares	Variance components	Ποσοστό διαφοροποίησης	Δείκτης ετεροζυγωτίας
Μεταξύ πληθυσμών	1	7.200	1,24Va	49,8	
Εντός πληθυσμών	8	10.000	1,25Vb	50,2	F_{ST} = 0,49
Σύνολο	9	17.000	248,96		

3.5. Δείκτης γενετικής ποικιλότητας (F_{ST})

Από την εφαρμογή Arlequin v.3.5. εκτιμήθηκε, επιπροσθέτως, ο δείκτης γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των WEST και EAST πληθυσμών, ο οποίος σύμφωνα με τον **Wright** παίρνει τιμές από 0 έως 1, με αύξηση της γενετικής διαφοροποίησης δύο ή περισσότερων πληθυσμών βάσει ενός γενετικού τόπου όσο πλησιάζει τη τιμή 1. Ως εκ τούτου, δεν υπάρχει καμία γενετική διαφοροποίηση για δείκτη F_{ST} ίσο με 0. Για τους δύο πληθυσμούς *A. aerophoba* φαίνεται πως υπάρχει υψηλή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των EAST και WEST, καθώς ο δείκτης F_{ST} είναι ίσος με 0,49 (49%). Τέλος, το αποτέλεσμα αυτό χάρει στατιστικής υποστήριξης μιας και $p=0,018<0,05$ (Υπόθεση H_1), ενώ τα αποτελέσματα φαίνονται στον **πίνακα 7**.

Πίνακας 7: Υπολογισμός του δείκτη γενετικής ποικιλομορφίας (fixation index, F_{ST}) μεταξύ των πληθυσμών *A. aerophoba* EAST και WEST, όπως εξήχθη από την εφαρμογή Arlequin v.3.5. Αποσαφηνίζεται πως το ποσοστό σημαντικότητας ανέρχεται σε 0,05 (95%).

Πληθυσμός	EAST	WEST
EAST	0	
WEST	$F_{ST} = 0,49$ (49%), $p = 0,03 \pm 0,01$	0

3.6. Tajima's D

Ακολούθως, για τον δείκτη Tajima's D (**Tajima**, 1989) η μηδενική υπόθεση (H_0) σημαίνει πως στον πληθυσμό έδρασε η ουδέτερη εξέλιξη, όπου οι πολυμορφισμοί είναι αθόρυβοι και δεν επηρεάζουν τις αλληλικές συχνότητες των ατόμων ($p>0,05$), ενώ σύμφωνα με την εναλλακτική υπόθεση H_1 οι πολυμορφισμοί οδηγούν σε αλλαγή των

αλληλικών συχνοτήτων του πληθυσμού και συνεπώς δρα η φυσική επιλογή ($p < 0,05$). Εν προκειμένω, φαίνεται πως για τους δύο πληθυσμούς του *A. aerophoba*, EAST και WEST, απορρίπτεται η υπόθεση H1, πράγμα το οποίο σημαίνει πως οι τυχαίες μεταλλάξεις δεν οδηγούν σε αλλαγή των αλληλικών συχνοτήτων των πληθυσμών. Όσον αφορά, δε, τον πληθυσμό WEST, όπου Tajima's D = 0, η παρατηρούμενη γενετική διαφοροποίηση είναι ίδια με την αναμενόμενη. Τα αποτελέσματα του υπολογισμού του δείκτη Tajima's D περιλαμβάνονται συμπεριληπτικά στον ακόλουθο **πίνακα 8**.

Πίνακας 8: Δείκτης Tajima's D και τα p-value αυτού για τους δύο υπό εξέταση πληθυσμούς του *A. aerophoba*, όπου στον πληθυσμό WEST υπάρχουν οι απλότυποι από την Ισπανία και την Ιταλία και στον πληθυσμό EAST οι απλότυποι από την Ελλάδα. Ορίζεται πως το επίπεδο εμπιστοσύνης των στατιστικών αποτελεσμάτων ορίζεται το 95%, $p = 0,05$.

Στατιστικά	Πληθυσμός EAST	Πληθυσμός WEST	Μέσος όρος	Τυπική από- κλιση
Μέγεθος πληθυσμού	6	4	5	1,41
S	9	0	4,5	6,36
Pi	4	0	2	2,83
Tajima's D	0,09	0	0,04	0,06
Tajima's D p-value	0,522	1	0,76	0,34

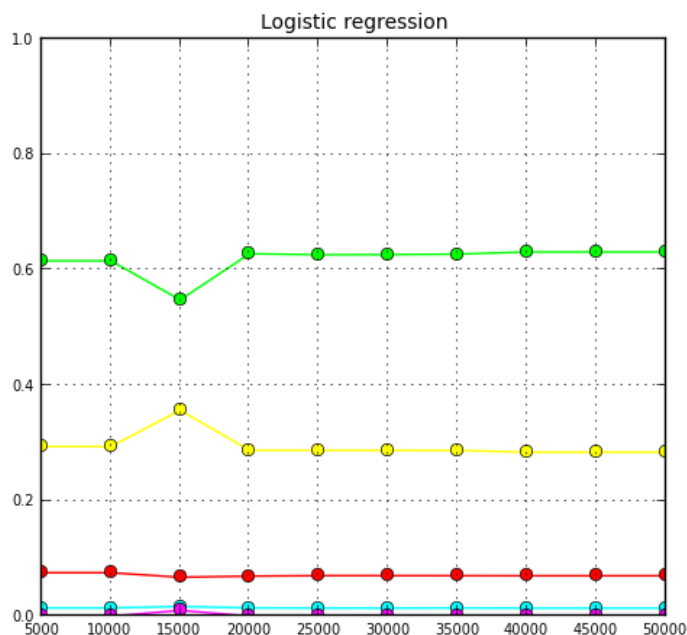
3.7. DIY-ABC v.2.1.0

Σε τελευταίο επίπεδο, με εφαρμογή του diy-abc v.2.1.0, επιβεβαιώθηκε το σενάριο 1 για τον πληθυσμό του συγκεκριμένου σπόγγου στο κεντρικό Αιγαίο. Τα αριθμητικά

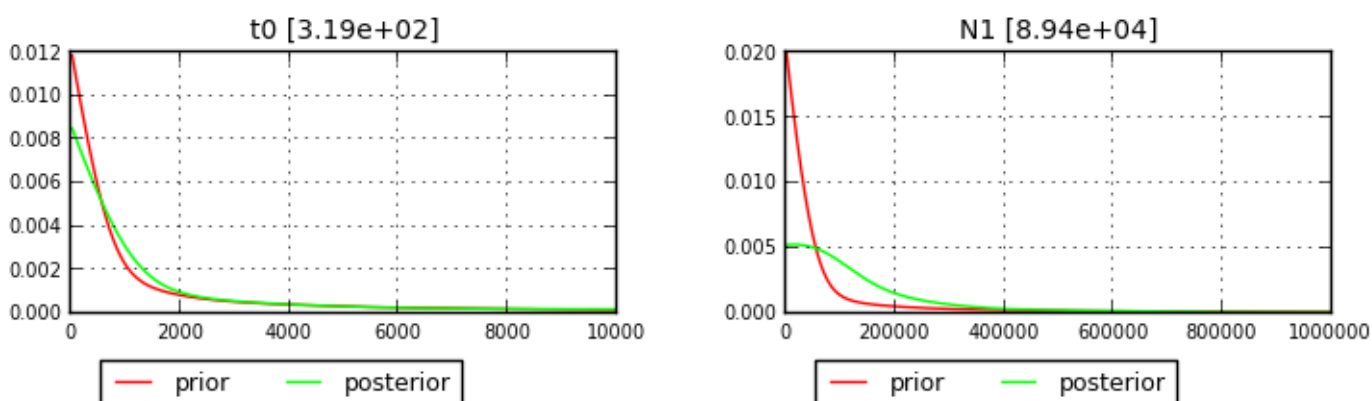
χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό των παραμέτρων (priors) στο historical mode της εφαρμογής παρουσιάζονται στον **πίνακα 9**, όπου φαίνεται και η σχέση μεταξύ των παραμέτρων αυτών. Το **σχήμα 1** δείχνει ότι το σενάριο 1 ισχύει με πιθανότητα 60%. Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε μια μεταγενέστερη κατανομή των παραμέτρων για το σενάριο, όπου για το συγκεκριμένο οι παράμετροι ήταν οι t_0 και N_1 . Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης φαίνονται στο **σχήμα 2**. Τέλος, οι στατιστικές παράμετροι, διάμεσος και μέσος όρος, τόσο για το t_0 όσο και για το N_1 παρουσιάζονται στον **πίνακα 10**, όπου η διάμεσος πληροφορεί για το πόσα άτομα υπάρχουν κατά μέσο όρο στη γενιά (για N_1) και πόση είναι η διάρκεια της γενεάς του *A. aerophoba* (για t_0).

Πίνακας 9: Καθορισμός των ιστορικών παραμέτρων (priors) στο diy-abc v.2.1.0 και παράθεση των αναλογικών συσχετισμών αυτών.

Ιστορικοί παράμετροι (priors)	N_1	t_0	t_{exp}	N_b	t_{anc}	N_{anc}	N_{exp}	t_r	t_b
Ελάχιστο	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Μέγιστο	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6
Αναλογίες	$t_{anc} > t_{exp} > t_b > t_r > t_0, N_{exp} > N_{anc} > N_1 > N_b$								



Σχήμα 1: Ανάλυση παλινδρόμησης των σεναρίων στην εφαρμογή diy-abc v.2.1.0. όπως διατυπώνονται στην εικόνα 6, όπου καταδεικνύεται πως πιθανότερο είναι να ισχύει με ποσοστό 60% το σενάριο 1 (πράσινη γραφική παράσταση), όσον αφορά τον πληθυσμό *A. aerophoba* του Αιγαίου πελάγους. Αποσαφηνίζεται πως με κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύεται το σενάριο 5, με κόκκινο χρώμα το σενάριο 2, με γαλάζιο χρώμα το σενάριο 3 και με μοβ χρώμα το σενάριο 4.



Σχήμα 2: Ανάλυση των παραμέτρων του σεναρίου 1, η κατανομή των οποίων φαίνεται να επιβεβαιώνει το σενάριο αυτό, όπως εκτελέστηκε από το diy-abc v.2.1.0. Παρατηρείται τομή των γραφικών παραστάσεων τόσο του t_0 όσο και του N_1 με τον άξονα των x . Ο άξονας των x υποδηλώνει τον αριθμό που τέθηκε στα priors κατά τον σχηματισμό των μοντέλων.

Πίνακας 10: Παράθεση των στατιστικών μεγεθών (διάμεσος και μέσος όρος) για τα μεγέθη του σεναρίου 1 (N1 και t0), όπως προέκυψαν από τη στατιστική επεξεργασία στο diy-abc v.2.1.0.

	N1	t0
N1	8,49e + 04	3,19 + 02
t0	4,57e + 04	1,1e + 01

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Διαχρονικά η Μεσόγειος θάλασσα αποτέλεσε πεδίο ισχυρών γεωμορφολογικών και κλιματολογικών αλλαγών (**Antonioli et al.**, 2007). Ως εκ τούτου, οι ισχυρές περιβαλλοντικές πιέσεις που δεχόντουσαν οι μόνιμοι πληθυσμοί της λεκάνης οδηγούσε σε διαφοροποιήσεις της πληθυσμιακής τους δυναμικής (**McKelvey et al.**, 1983), ενώ οι εξελικτικές δυνάμεις λειτουργούσαν άλλοτε υπέρ της συγχώνευσης πληθυσμών και άλλοτε την ανέστελλαν (**Cox & Moore**, 1993). Όσον αφορά τους πληθυσμούς σπόγγων, ήταν πιο ευάλωτοι λόγω της εδραίας μορφής τους, αλλά παράλληλα αποτελούν μία από τις πιο αρχέγονες ομάδες μεταζώων στη Μεσόγειο (**Voultsiadou.**, 2007). Συνεπώς εξάγεται το συμπέρασμα πως η εξέλιξη των σφουγγαριών θα μπορούσε να φωτίσει διάφορες πτυχές της εξέλιξης των μεταζώων, ιδίως των εδραίων φύλων, χωρίς, βέβαια, ακόμη να έχει αποσαφηνιστεί εάν ο τελευταίος κοινός πρόγονος των μεταζώων είναι σπογγόμορφος, όπως λέει η μονοφυλετική θεωρία (**Wörheide et al.**, 2012). Το επιχείρημα αυτό ενισχύεται περαιτέρω από το γεγονός πως η ελεύθερη κολυμβητική προνύμφη των σπόγγων, η παρεγγυμούλα, είναι δομικώς όμοια με το γαστρίδιο που σχηματίζεται στα λοιπά μετάρζωα (θεωρία γαστριδίωσης του **Haeckel**) (**Haeckel**, 1874) και υφίσταται δομική απλούστευση (simplification) πριν την προσκόλληση σε στέρεο υπόστρωμα (**Maldonado**, 2004).

Από την ανάλυση μοριακής διακύμανσης (AMOVA) φαίνεται πως υπάρχει υψηλή γενετική διαφοροποίηση της τάξης του 50% τόσο εντός των πληθυσμών EAST και WEST, όσο και μεταξύ τους. Η υψηλή αυτή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών μαρτυρείται και από τον υπολογισμό του δείκτη F_{ST} . Η υψηλή γενετική διαφοροποίηση σε κάθε πληθυσμό *A. aerophoba* έρχεται σε αντίθεση με τον υψηλό δείκτη ενδημισμού που παρατηρείται γενικώς στους μεσογειακούς πληθυσμούς σπόγγου (Coll et al., 2010). Το πρότυπο αυτό διαφοροποίησης των πληθυσμών μεταξύ της ανατολικής και δυτικής λεκάνης (Voultsiadou et al., 2009; Pansini et al., 2003), παρατηρείται και σε άλλους σπόγγους όπως για παράδειγμα το *Petrosia ficiformis* (Riesgo et al., 2019), ενώ σε άλλους όπως ο κοινός *Spongia officinalis* εμφανίζεται ελάχιστη γενετική ροή (Nm) (Dallianis T. et al., 2011).

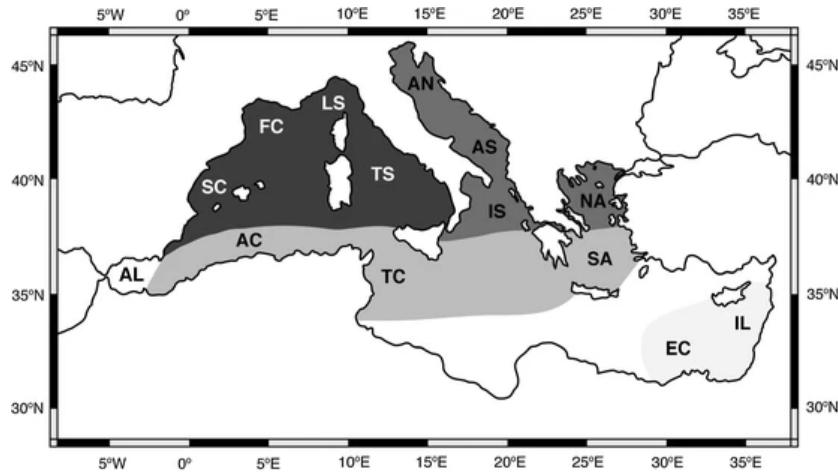
Η διαφοροποίηση των πληθυσμών ανατολικά και δυτικά που υποδεικνύεται και στη παρούσα εργασία, φαίνεται να σχετίζεται με τη μεσσινιακή κρίση αλατότητας (MSC) (Trajer et al., 2021; Moura et al., 2013) και τη παγετώδη περίοδο της περιόδου του Πλειστόκαινου. Και τα δύο φαινόμενα άσκησαν ισχυρή περιβαλλοντική πίεση στους πληθυσμούς της Μεσογείου (Hewit et al., 2000), καθώς λόγω της μείωσης της στάθμης της θάλασσας ενώθηκαν χερσαίες εκτάσεις (Roveri et al., 2014), σταματώντας τη γενετική ροή μεταξύ των πληθυσμών (Konstantinidis et al., 2022; Feidantsis et al., 2022; Gkafas et al., 2017). Συνεπώς, η πιθανή διακοπή της γενετικής επικοινωνίας, οδήγησε σε επικράτηση της ειδογένεσης, ενώ τα φαινόμενα του στενωπού μείωναν περαιτέρω το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος (N_e), πράγμα που έχει αποδειχθεί για το *Petrosia ficiformis* (Riesgo et al., 2019). Εν προκειμένω, για τους πληθυσμούς *A. aerophoba* παρατηρήθηκαν έξι απλότυποι, ένας στη δυτική Μεσόγειο και οι υπόλοιποι στο Αιγαίο, πράγμα που συνηγορεί υπέρ αυτής της θεωρίας. Παρόλα αυτά, η υψηλή γενετική

διαφοροποίηση εντός των πληθυσμών αντιτίθενται των κατά περιόδους πληθυσμιακών σμικρύνσεων (**Dalianis et al.**, 2011).

Σε δεύτερο επίπεδο, ο υπολογισμός του δείκτη Tajima's D υποδεικνύει πως οι πληθυσμοί EAST και WEST εξελίχθηκαν σύμφωνα με την ουδέτερη θεωρία (neutrality theory), κατά την οποία υπάρχει ισορροπία μεταξύ των υπαρχόντων πολυμορφισμών και της γενετικής παρέκκλισης (**Korneliussen et al.**, 2013; **Tajima**, 1989). Καθ' όλη τη διάρκεια εξέλιξης των πληθυσμών σπόγγου *A. aerophoba* οι μεταλλάξεις ήταν ουδέτερες, πράγμα το οποίο σημαίνει πως δεν επηρέαζαν την αρμοστικότητα των σπόγγων στο περιβάλλον. Επιπροσθέτως, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι μελετώμενοι πληθυσμοί δεν επεκτάθηκαν, καθώς μόνο οι αρνητικές, υψηλές τιμές του δείκτη υποδηλώνουν πληθυσμιακή αύξηση (population expansion) (**Felix et al.**, 2022).

Η ανατολική Μεσόγειος θάλασσα είναι βαθύτερη και ολιγοτροφικότερη από την δυτική, ενώ χαρακτηρίζεται από διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (**Danovaro et al.**, 1999). Εάν συνυπολογιστεί διακοπή της γενετικής ροής, οι πληθυσμοί θα τείνουν να εξελίσσονται διακριτά, πράγμα που καταδεικνύεται σε πολλές μελέτες των πληθυσμών σπόγγων βάσει κάποιου μοριακού δείκτη (**Riesgo et al.**, 2016). Για το *A. aerophoba* ο πληθυσμός EAST δεν χαρακτηρίζεται μόνο από την ύπαρξη πέντε απλοτύπων, αλλά ταυτόχρονα φαίνεται να μην διαδραματίστηκε καμία πληθυσμιακή μεταβολή μέχρι σήμερα σε αυτόν. Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται και από το γεγονός πως παρατηρήθηκε υψηλή γενετική ποικιλομορφία εντός του πληθυσμού, πράγμα που θα ερχόταν σε αντίφαση με κάποια δραστική πληθυσμιακή μείωση. Πιθανώς, η βαθύτερη υδάτινη στήλη της Ανατολικής Μεσογείου να προστάτευσε τους πληθυσμούς εδραίων οργανισμών τόσο από τη MSC όσο και από την τελευταία παγετώδη περίοδο, αλλά η ολιγοτροφικότερη φύση της να μην τους επιτρέπει δραστική πληθυσμιακή αύξηση.

Συγκεντρωτικά, όσον αφορά την δημογραφική και εξελικτική ιστορία του σπόγγου *A. aerophoba*, αυτός φαίνεται να αποτελεί ενδημικό είδος της Μεσογείου προερχόμενος από την θάλασσα της Τιθύος (Schmitt et al., 2005). Κατόπιν, οι πληθυσμοί αυτού δέχθηκαν δύο ισχυρές περιβαλλοντικές πιέσεις, μία κατά την MSC και μία κατά την τελευταία παγετώδη περίοδο του Πλειστόκαινου, οι οποίες οδήγησαν σε ραγδαίες γεωμορφολογικές αλλαγές στη λεκάνη, ενώνοντας χερσαίες εκτάσεις και διακόπτοντας την επικοινωνία μεταξύ των πληθυσμών *A. aerophoba*. Οι αλλαγές αυτές οδήγησαν σε διαφοροποίηση των πληθυσμών του σπόγγου μεταξύ ανατολικής και δυτικής λεκάνης, πράγμα που υποδηλώνει πιθανό εμπόδιο στη γονιδιακή ροή στα στενά της Σικελίας, όπως άλλωστε υποδεικνύεται και από το πρότυπο άλλων σπόγγων. Με την υποχώρηση της τελευταίας παγετώδους περιόδου, οι πληθυσμοί συνέχισαν να εξελίσσονται ανεξάρτητα, πιθανώς λόγω του γεγονότος ότι οι παρεγχυμούλες δεν διαβιούν για μεγάλο χρονικό διάστημα και η πολυπλοκότητα της ακτογραμμής δημιουργούν έναν φυσικό φραγμό της κατανομής (Pansini et al., 2003) (εικόνα 8), με αποτέλεσμα να μην μπορούν να μεταφερθούν σε μεγάλες αποστάσεις. Τέλος, παρά τις ισχυρές περιβαλλοντικές πιέσεις, φαίνεται πως στον πληθυσμό της ανατολικής Μεσογείου δεν υπήρξε μείωση του δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους άρα και μείωση της γενετικής ποικιλομορφίας. Η αυξημένη αυτή γενετική ποικιλομορφία οδηγεί σε αύξηση της αρμοστικότητας του σπόγγου (Reed et al., 2003; Booy et al., 2000), πράγμα που το κάνει πλέον ένα από τα περισσότερο χαρακτηριστικά είδη σπόγγου της Μεσογείου.



Εικόνα 8: Απεικόνιση της γενικής αφθονίας των σπόγγων στη Μεσόγειο, στον οποίο όσο εντονότερη η απόχρωση στη παλέτα του μαύρου, τόσο μεγαλύτερη αφθονία. Είναι σαφής η μείωση της κατά τον άξονα βορειοδυτική – νοτιοανατολική Μεσόγειος, καθώς αφενός οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι δυτικά ευνοϊκότερες και αφετέρου το χαμηλό προσδόκιμο ζωής των παρεγγυμύλων σε συνδυασμό με την πολυπλοκότητα της ακτογραμμής οδηγούν σε διακοπή της Nm μεταξύ των πληθυσμών *A. aerophoba* Ανατολικά και Δυτικά. **Πηγή:** Voultziadou, 2009.

Τέλος, αξίζει να τονιστεί ότι η συνεχώς εντεινόμενη ανθρωπογενής δραστηριότητα έχει οδηγήσει τις τελευταίες δεκαετίες σε δραστική μείωση των πληθυσμών πολλών ειδών σπόγγου της Μεσογείου (Idan et al., 2018; Lionello et al., 2014), πράγμα που πιθανώς οδηγεί σε μείωση της γενετικής ποικιλότητας και προσαρμοστικότητας των ειδών. Επιπροσθέτως, δε, η διαρκής αύξηση της θερμοκρασίας λόγω της κλιματικής αλλαγής και η εισαγωγή ξενικών ειδών από τη διώρυγα του Σουέζ (Galil et al., 2018), αποτελούν δύο παραμέτρους που επηρεάζουν άμεσα όχι μόνο το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος, αλλά και τον βιολογικό κύκλο πολλών ειδών, ιδίως όμως των εδραίων. Ως εκ τούτου, γεννάται το ερώτημα, σε ποιον βαθμό θα επηρεαστούν οι πληθυσμοί του *A. aerophoba* στη Μεσόγειο θάλασσα υπό τις συνεχώς μεταβαλλόμενες συνθήκες αυτές; Απαιτείται περαιτέρω ερευνητική προσπάθεια για να δοθεί απάντηση στο ερώτημα αυτό και να

εξεταστεί αναλυτικότερα η βιολογία και η οικολογία ενός από τους πιο αντιπροσωπευτικούς σπόγγους της μεσογειακής πανίδας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andújar, C., Arribas, P., Yu, D. W., Vogler, A. P., & Emerson, B. C. (2018). Why the COI barcode should be the community DNA metabarcode for the metazoa.

Antonioli, F., Anzidei, M., Lambeck, K., Auriemma, R., Gaddi, D., Furlani, S., Orru, P., Solinas, E., Gaspari, A., Karinja, S., Kovacic, V., & Surace, L. (2007). Sea-level change during the Holocene in Sardinia and in the northeastern Adriatic (central Mediterranean Sea) from archaeological and geomorphological data. *Quaternary Science Reviews*, 26(19-21), 2463-2486.

Avise, J. C., Nelson, W. S., & Sugita, H. (1994). A speciation history of “living fossils”: molecular evolutionary patterns in horseshoe crabs. *Evolution*, 48(6), 1986-2001.

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C., A., & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 489-522.

Bell, J. J., McGrath, E., Biggerstaff, A., Bates, T., Cárdenas, C. A., & Bennett, H. (2015). Global conservation status of sponges. *Conservation Biology*, 29(1), 42-53.

Binnewerg, B., Schubert, M., Voronkina, A., Muzychka, L., Wysokowski, M., Petrenko, I., Djurovic, M., Kovalchuk, V., Tsurkan, M., Martinovic, R., Bechmann, N., Fursov, A., Ivanenko, V. N., Tabachnick, K. R., Smolii, O. B., Joseph, Y., Giovine, M., Bornstein, S. R., Stelling, A. L., Tunger, A., & Ehrlich, H. (2020). Marine biomaterials: Biomimetic

and pharmacological potential of cultivated *A. aerophoba* marine demosponge. *Materials Science and Engineering: C*, 109, 110566.

Booy, G., Hendriks, R. J. J., Smulders, M. J. M., Van Groenendael, J. M., & Vosman, B. (2000). Genetic diversity and the survival of populations. *Plant biology*, 2(04), 379-395.

Borchiellini, C., Chombard, C., Manuel, M., Alivon, E., Vacelet, J., & Boury-Esnault, N. (2004). Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Molecular phylogenetics and evolution*, 32(3), 823-837.

Cárdenas, P., Pérez, T., & Boury-Esnault, N. (2012). Sponge systematics facing new challenges. *Advances in marine biology*, 61, 79-209.

Cavalier-Smith, T. (2017). Origin of animal multicellularity: precursors, causes, consequences—the choanoflagellate/sponge transition, neurogenesis and the Cambrian explosion. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1713), 20150476.

Chen, R., Mias, G. I., Li-Pook-Than, J., Jiang, L., Lam, H. Y., Chen, R., Miriami, E., Karczewski, K. J., Hariharan, M., Dewey, F., E., Cheng, Y., Clark, M., J., Im, H., Habegger, L., Balasubramanian, S., O’Huallachain, M., Dudley, J., T., Hillenmeyer, S., Haraksingh, R., Sharon, D., & Snyder, M. (2012). Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell*, 148(6), 1293-1307.

Chevaldonné, P., Lejeusne, C., Pillon, Y., Dehollain, C., Lecroisey, C., Rocher, C., Aurele, D., Chenuil, A., Perez, T., Boury-Esnault, N., & Vacelet, J. (2006). Molecular phylogeography of Mediterranean and Eastern Atlantic sponges of the genus *A.*. In *Molecular phylogeography of Mediterranean and Eastern Atlantic sponges of the genus A.* (p. 273).

Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Ben Rais Lasram, F., Aguzzi, J., Ballesteros, E., Bianchi, C.N., Corbera, J., Dailianis, T., Danovaro, R., Estrada, M., Frogli,

- C., & Voultsiadou, E. (2010). The biodiversity of the Mediterranean Sea: estimates, patterns, and threats. *PloS one*, 5(8), e11842.
- Coppari**, M., Gori, A., Viladrich, N., Saponari, L., Canepa, A., Grinyó, J., Olariaga, A., & Rossi, S. (2016). The role of Mediterranean sponges in benthic–pelagic coupling processes: *A. aerophoba* and *Axinella polypoides* case studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 477, 57-68.
- Costa**, G., Violi, B., Bavestrello, G., Pansini, M., & Bertolino, M. (2020). *A. aerophoba* (Nardo, 1833)(Porifera, Demospongiae): an unexpected miniaturised growth form from the tidal zone of Mediterranean caves: morphology and DNA barcoding. *The European Zoological Journal*, 87(1), 73-81.
- Cox** C B and **Moore** P D 1993 *Biogeography - an ecological and evolutionary approach* (fifth edition) Blackwell Scientific, Oxford
- Dalianis**, P., Tsigenopoulos, C.S., Dounas, C., Voultsiadou, E. (2011). Genetic diversity of the imperilled bath sponge *Spongia officinalis* Linnaeus, 1759 across the Mediterranean Sea: patterns of population differentiation and implications for taxonomy and conservation. *Molecular ecology*, 20, 3757-3772.
- Danovaro**, R., Dinet, A., Duineveld, G., & Tselepides, A. (1999). Benthic response to particulate fluxes in different trophic environments: a comparison between the Gulf of Lions–Catalan Sea (western-Mediterranean) and the Cretan Sea (eastern-Mediterranean). *Progress in Oceanography*, 44(1-3), 287-312.
- Deagle**, B. E., Jarman, S. N., Coissac, E., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2014). DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biology letters*, 10(9), 20140562.

- de Goeij, J. M., van den Berg, H., van Oostveen, M. M., Epping, E. H., & Van Duyl, F. C.** (2008). Major bulk dissolved organic carbon (DOC) removal by encrusting coral reef cavity sponges. *Marine Ecology Progress Series*, 357, 139-151.
- Dohrmann, M., Janussen, D., Reitner, J., Collins, A. G., & Wörheide, G.** (2008). Phylogeny and evolution of glass sponges (Porifera, Hexactinellida). *Systematic Biology*, 57(3), 388-405.
- Dohrmann, M., Haen, K. M., Lavrov, D. V., & Wörheide, G.** (2012). Molecular phylogeny of glass sponges (Porifera, Hexactinellida): increased taxon sampling and inclusion of the mitochondrial protein-coding gene, cytochrome oxidase subunit I. *Ancient Animals, New Challenges: Developments in Sponge Research*, 11-20.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L.** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue (No. RESEARCH).
- Ereskovsky, A. V., Tokina, D. B., Bezac, C., & Boury-Esnault, N.** (2007). Metamorphosis of cinctoblastula larvae (Homoscleromorpha, Porifera). *Journal of Morphology*, 268(6), 518-528.
- Ereskovsky, A. V., & Tokina, D. B.** (2007). Asexual reproduction in homoscleromorph sponges (Porifera; Homoscleromorpha). *Marine Biology*, 151, 425-434.
- Ereskovsky, A. V., Lavrov, D. V., & Willenz, P.** (2014). Five new species of Homoscleromorpha (Porifera) from the Caribbean Sea and re-description of *Plakina jamaicensis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 94(2), 285-307.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L.** (2010): Arlequin suite v.3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. – *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.

- Feidantsis, K., Gkafas, G. A., Exadactylos, A., Michaelidis, B., Staikou, A., Hatzioanou, M., Apostologamvrou, C., Sarantopoulou, J., & Vafidis, D. (2022).** Different Interspecies Demographic Histories within the Same Locality: A Case Study of Sea Cucumbers, Cuttlefish and Clams in Greek Waters. *Sustainability*, 14(21), 14380.
- Felix Sr, P. T., Santos, A. C. D. S., Nascimento, I. A. D., & Silva, L. S. D. (2022).** Population Genetics and Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of the Monkeypox virus interferon-alpha-beta receptor gene and its evolutionary relationship with the Orthopoxvirus genus. *bioRxiv*, 2022-09.
- Feng, H., Chen, W., Hussain, S., Shakir, S., Tzin, V., Adegbayi, F., Ugine, T., Fei, Z., & Jander, G. (2023).** Horizontally transferred genes as RNA interference targets for aphid and whitefly control. *Plant Biotechnology Journal*, 21(4), 754-768.
- Frankham, R. (2005).** Genetics and extinction. *Biological conservation*, 126(2), 131-140.
- Galil, B. S., Marchini, A., & Occhipinti-Ambrogi, A. (2018).** East is east and West is west? Management of marine bioinvasions in the Mediterranean Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 201, 7-16.
- Gerovasileiou, V., Dailianis, T., Sini, M., del MAR OTERO, M. A. R. I. A., Numa, C., Katsanevakis, S., & Voultsiadou, E. (2018).** Assessing the regional conservation status of sponges (Porifera): the case of the Aegean ecoregion. *Mediterranean Marine Science*, 19(3), 526-537.
- Gkafas, G. A., Exadactylos, A., Rogan, E., Raga, J. A., Reid, R., & Hoelzel, A. R. (2017).** Biogeography and temporal progression during the evolution of striped dolphin population structure in European waters. *Journal of biogeography*, 44(12), 2681-2691.

- Haeckel** E. (1874). Die Gastrea-Theorie, die phylogenetische Klassifikation des Tierreichs, und die Homologie der Keimblätter.
- Hagelberg**, E. (1994). Mitochondrial DNA from ancient bones. *Ancient DNA: Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens*, 195-204.
- Harrison**, R. G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 4(1), 6-11.
- Heim**, I., Nickel, M., & Brümmer, F. (2007). Molecular markers for species discrimination in poriferans: a case study on species of the genus *A.* *Porifera Research*, 1, 361-371.
- Hewitt**, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913.
- Higa**, T., Tanaka, J., Ohtani, I. I., Musman, M., Roy, M. C., & Kuroda, I. (2001). Bioactive compounds from coral reef invertebrates. *Pure and Applied Chemistry*, 73(3), 589-593.
- Hooper**, J. N., & Van Soest, R. W. (2002). *Systema Porifera. A guide to the classification of sponges* (pp. 1-7). Springer Us.
- Huang**, K., Wang, T., Dunn, D. W., Zhang, P., Sun, H., & Li, B. (2021). A generalized framework for AMOVA with multiple hierarchies and ploidies. *Integrative Zoology*, 16(1), 33-52.
- Idan**, T., Shefer, S., Feldstein, T., Yahel, R., Huchon, D., Ilan, M. (2018). Shedding light on the East-Mediterranean mesotrophic sponge ground community and the regional sponge fauna. *Mediterranean Marine Science* 19(1): 84-106.
- Konstantinidis**, I., Gkafas, G. A., Papathanasiou, V., Orfanidis, S., Küpper, F. C., Arnaud-Haond, S., & Exadactylos, A. (2022). Biogeography pattern of the marine angiosperm

Cymodocea nodosa in the eastern Mediterranean Sea related to the quaternary climatic changes. *Ecology and Evolution*, 12(5), e8911.

Korneliussen, T. S., Moltke, I., Albrechtsen, A., & Nielsen, R. (2013). Calculation of Tajima's D and other neutrality test statistics from low depth next-generation sequencing data. *BMC bioinformatics*, 14(1), 1-14.

Koziol, C., S. P. Leys, I. M. Müller, and W. E. G. Müller. 1998. Cloning of 1 HSP70 genes from the marine sponge *Sycon raphanus* (Calcarea) and *Rhabdocalyptus dawsoni* (Hexactinellida). An approach to solve the phylogeny of sponges. *Biol. J. Linn. Soc.* 62:581–592.

Laundon, D., Larson, B. T., McDonald, K., King, N., & Burkhardt, P. (2019). The architecture of cell differentiation in choanoflagellates and sponge choanocytes. *PLoS biology*, 17(4), e3000226.

Lee, Y. K., Lee, J. H., & Lee, H. K. (2001). Microbial symbiosis in marine sponges. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL-*, 39(4), 254-264.

Li, C. W., Chen, J. Y., & Hua, T. E. (1998). Precambrian sponges with cellular structures. *Science*, 279(5352), 879-882.

Lionello, P., Abrantes, F., Gacic, M., Planton, S., Trigo, R., & Ulbrich, U. (2014). The climate of the Mediterranean region: research progress and climate change impacts. *Regional Environmental Change*, 14, 1679-1684.

Maldonado, M. (2004). Choanoflagellates, choanocytes, and animal multicellularity. *Invertebrate Biology*, 123(1), 1-22.

Manuel, M., Borchiellini, C., Alivon, E., Le Parco, Y., Vacelet, J., & Boury-Esnault, N. (2003). Phylogeny and evolution of calcareous sponges: monophyly of *Calcinea* and

Calcaronea, high level of morphological homoplasy, and the primitive nature of axial symmetry. *Systematic biology*, 52(3), 311-333.

McKelvey, B., & Aldrich, H. (1983). Populations, natural selection, and applied organizational science. *Administrative Science Quarterly*, 101-128.

Merilä, J. (2001). Cryptic evolution in a wild bird population. *Nature* 412: 76-79.

Moritz, C. T. E. D., Dowling, T. E., & Brown, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 269-292.

Moura, A. E., Natoli, A., Rogan, E., & Hoelzel, A. R. (2013). Atypical panmixia in a European dolphin species (*Delphinus delphis*): implications for the evolution of diversity across oceanic boundaries. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(1), 63-75.

Pansini, M., & Longo, C. (2003). A review of the Mediterranean Sea sponge biogeography with, in appendix, a list of the demosponges hitherto recorded from this sea. *Biogeographia—The Journal of Integrative Biogeography*, 24(1).

Pérez-Portela, R., Cerro-Gálvez, E., Taboada, S., Tidu, C., Campillo-Campbell, C., Mora, J., & Riesgo, A. (2016). Lonely populations in the deep: genetic structure of red gorgonians at the heads of submarine canyons in the north-western Mediterranean Sea. *Coral Reefs*, 35, 1013-1026.

Petit-Marty, N. P., Nagelkerken, I., Conell, S. D., & Schunter, C. M. (2020). Natural CO₂ seeps give clues about fish adaptation to ocean acidification. In VII International Symposium on Marine Sciences (ISMS 2020). Spain.

Raser, J. M., & O'shea, E. K. (2005). Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science*, 309(5743), 2010-2013.

- Reed, D. H., & Frankham, R. (2003).** Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation biology*, 17(1), 230-237.
- Riesgo, A., Taboada, S., Pérez-Portela, R., Melis, P., Xavier, J. R., Blasco, G., & López-Legentil, S. (2019).** Genetic diversity, connectivity and gene flow along the distribution of the emblematic Atlanto-Mediterranean sponge *Petrosia ficiformis* (Haplosclerida, Demospongiae). *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 1-18.
- Riesgo, A., Pérez-Portela, R., Pita, L., Blasco, G., Erwin, P. M., & López-Legentil, S. (2016).** Population structure and connectivity in the Mediterranean sponge *Ircinia fasciculata* are affected by mass mortalities and hybridization. *Heredity*, 117(6), 427-439.
- Roveri, M., Flecker, R., Krijgsman, W., Lofi, J., Lugli, S., Manzi, V., ... & Stoica, M. (2014).** The Messinian Salinity Crisis: past and future of a great challenge for marine sciences. *Marine Geology*, 352, 25-58.
- Schmitt, S., Hentschel, U., Zea, S., Dandekar, T., & Wolf, M. (2005).** ITS-2 and 18S rRNA gene phylogeny of Aplysinidae (Verongida, Demospongiae). *Journal of Molecular Evolution*, 60, 327-336.
- Spielman, D., Brook, B. W., & Frankham, R. (2004).** Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(42), 15261-15264.
- Steinert, G., Gutleben, J., Smidt, H., & Sipkema, D. (2017).** Phylogenetic diversity and connectivity of Poribacteria among wide range of globally distributed sponge-hosts. Unpublished.
- Stoneking, M., Hedgecock, D., Higuchi, R. G., Vigilant, L., & Erlich, H. A. (1991).** Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic

amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *American journal of human genetics*, 48(2), 370.

Szczecińska, M., Sramko, G., Wołosz, K., & Sawicki, J. (2016). Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe. *PLoS One*, 11(3), e0151730.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.

Trájer, A. J., Sebestyén, V., & Padisák, J. (2021). The impacts of the Messinian Salinity Crisis on the biogeography of three Mediterranean sandfly (Diptera: Psychodidae) species. *Geobios*, 65, 51-66.

Urbaniak, J., Kwiatkowski, P., & Pawlikowski, P. (2021). Genetic diversity of *Salix lapponum* populations in Central Europe. *PhytoKeys*, 184, 83.

van Soest, R. W., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N. J., Santodomingo N., Vanhoorne B. & Hooper, J. N. (2012). Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS one*, 7(4), e35105.

van Soest, R., Díaz, M. C., & Pomponi, S. A. (1990). Phylogenetic classification of the halichondrids (Porifera, Demospongiae). *Beaufortia*, 40(2), 15-62.

Voigt, O., Wülfig, E., & Wörheide, G. (2012). Molecular phylogenetic evaluation of classification and scenarios of character evolution in calcareous sponges (Porifera, Class Calcarea). *PLoS One*, 7(3), e33417.

Voultsiadou, E., Gerovasileiou, V., Vandepitte, L., Ganias, K., & Arvanitidis, C. (2017). Aristotle's scientific contributions to the classification, nomenclature and distribution of marine organisms. *Mediterranean Marine Science*, 18(3), 468-478.

Voultsiadou, E. (2009). Reevaluating sponge diversity and distribution in the Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, 628, 1-12.

Voultsiadou, E. (2007). Sponges: an historical survey of their knowledge in Greek antiquity. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(6), 1757-1763.

Wang, X., Wiens, M., Schröder, H. C., Hu, S., Mugnaioli, E., Kolb, U., Tremel W., Pignano D. & Müller, W. E. (2010). Morphology of sponge spicules: silicatein a structural protein for bio-silica formation. *Advanced engineering materials*, 12(9), B422-B437.

Willing, E. M., Dreyer, C., & Van Oosterhout, C. (2012). Estimates of genetic differentiation measured by F_{ST} do not necessarily require large sample sizes when using many SNP markers.

Wörheide, G., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., Larroux, C., Maldonado, M., Voigt, O., Borchellini C. & Lavrov, D. V. (2012). Deep phylogeny and evolution of sponges (phylum Porifera). *Advances in marine biology*, 61, 1-78.

Wulff, J. L. (1991). Asexual fragmentation, genotype success, and population dynamics of erect branching sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 149(2), 227-247.

Xavier, J. R., & Van Soest, R. W. (2012). Diversity patterns and zoogeography of the Northeast Atlantic and Mediterranean shallow-water sponge fauna. *Hydrobiologia*, 687, 107-125.

Yin, Z., Zhu, M., Davidson, E. H., Bottjer, D. J., Zhao, F., & Tafforeau, P. (2015). Sponge grade body fossil with cellular resolution dating 60 Myr before the Cambrian. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(12), E1453-E1460.

6. ABSTRACT

Aplysina aerophoba is one of the most representative sponge species of the Mediterranean, while it is considered an indigenous species of the basin. Its importance lies not only in the fact that it is a main species of the benthic fauna, but many biocompounds with potential pharmaceutical action are extracted from it, which monopolized the interest of researchers. In the present research work, a population of *A. aerophoba* from the central Aegean sea was examined and compared with other Mediterranean populations, using the cytochrome oxidase (COI) subunit c gene, the use of which has a multitude of advantages. Regarding the population of the sponge from the Aegean Sea, it presented six different haplotypes, while a high diversity is observed based on the F_{ST} index (fixation index) and molecular variation analysis. Among Mediterranean populations, there appears to be genetic differentiation between populations, while populations from Italy and Spain showed a common haplotype. This result is in agreement with several works, which support the differentiation of populations of a species between the eastern and western Mediterranean Sea. This fact may be due to the seasonally changing climatic and geomorphological conditions of the basin. By calculating the Tajima's D index, the neutrality theory is confirmed, as the mutations do not change the allelic frequencies of the *A. aerophoba* populations under consideration. Finally, from the demographic study of the Aegean population, it emerged that it did not undergo any strong change in evolutionary time.

Key words: population genetics, COI, *Aplysina aerophoba*, demographics, phylogeography

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Απλότυποι πληθυσμών *A. aerophoba* από τη Μεσόγειο θάλασσα

MED-1

GGAGACGATCATTTATATAATGTTATAGTAACGGCACATGCTTTTGTATGATATTCTTTTATAGTA
 ATGCCTGTTATGATAGGAGGTTTTGGTAATTGATTAGTTCCATTATATATTGGAGCACCAGATAT
 GGCTTTCCCTCGGTTAAATAATATTAGTTTTTGTATTATTACCCCCAGCACTAATTTTATTATTGGG
 GTCTGCTTTTATAGAACAAGGGGCGGTACGGGTTGAACCGTCTATCCGCCATTATCAAGTATA
 CAAACACATTCTGGGGGTTCCGGTAGATATGGCAATATTTAGTCTTCATTTGGCCGGAATTCCT
 CCATATTAAGCTCTATTAATTTTATAACTACAATTTTAAATATGAGGGCGCCAGGGATGACTATG
 GACAGATTACCTTTATTCGTTTGATCTATTTATTAACAACAATATTATTAGTATTAGCCTTGCCC
 GTTTTAGCTGGAGCAATTAATCTATGCTTTTAAAC

MED-2

GGAGACGATCATTTATATAATGTTATAGTAACGGCACATGCTTTTGTATGATATTCTTTTATAGTA
 ATGCCTGTTATGATAGGAGGTTTTGGTAATTGATTAGTTCCATTATATATTGGAGCACCAGATAT
 GGCTTTCCCTCGGTTAAATAATATTAGTTTTTGTATTATTACCCCCAGCACTAATTTTATTATTGGG
 GTCTGCTTTTATAGAACAAGGGGCTGGTACGGGTTGAACCGTCTATCCGCCATTATCAAGTATA
 CAAACACATTCTGGGGGTTCCGGTAGATATGGCAATATTTAGTCTTCATTTGGCCGGAATTCCT
 CCATATTAAGCTCTATTAATTTTATAACTACAATTTTAAATATGAGGGCGCCAGGGATGACTATG
 GACAGATTACCTTTATTCGTTTGATCTATTTATTAACAACAATATTATTAGTATTAGCATTGCCC
 GTTTTAGCTGGAGCAATTAATCTATGCAGATAAC

MED-3

CGAGACGATCATTTATATAATGTTATAGTAACGGCACATGCTTTTGTATGATATTCTTTTATAGTA
 ATGCCTGTTATGATAGGAGGTTTTGGTAATTGATTAGTTCCATTATATATTGGAGCACCAGATAT
 GGCTTTCCCTCGGTTAAATAATATTAGTTTTTGTATTATTACCCCCAGCACTAATTTTATTATTGGG
 GTCTGCTTTTATAGAACAAGGGGCTGGTACGGGTTGAACCGTCTATCCGCCATTATCAAGTATA
 CAAACACATTCTGGGGGTTCCGGTAGATATGGCAATATTTAGTCTTCATTTGGCCGGAATTCCT
 CCATATTAAGCTCTATTAATTTTATAACTACAATTTTAAATATGAGGGCGCCAGGGATGACTATG
 GACAGATTACCTTTATTCGTTTGATCTATTTATTAACAACAATATTATTAGTATTAGCATTGCCC
 GTTTTAGCTGGAGCAATTAATCTATGCAGATAAC

MED-4

GGAGACGATCATTATATAATGTTATAGTAACGGCACATGCTTTTGTTATGATATTCTTTTAGTA
ATGCCTGTTATGATAGGAGGTTTGGTAATTGATTAGTTCCATTATATATTGGAGCACCAGATAT
GGCTTCCCTCGGTTAAATAATATTAGTTTTTGATTATTACCCCAGCACTAATTTATTATTGGG
GTCTGCTTTTATAGAACAAGGGGCTGGTACGGGTGAACCGTCTATCCGCCATTATCAAGTATA
CAAACACATTCTGGGGGTTCCGGTAGATATGGCAATATTTAGTCTTCATTTGGCCGGAATTCCT
CCATAATAAGCTCTATTAATTTATAACTACAATTTAAATATGAGGGCGCCAGGGATGACTATG
GACAGATTACCTTTATTCGTTTGATCTATTTTATTAACAACAATATTATTAGTATTAGCATTGCC
GTTTTAGCTGGAGCAATTAATATGCTTTTAAC

MED-5

CGAGACGATCCTTTATATATTGTTATAGTAACGGCACATGCTTTTGTTATGATATTCTTTTATTA
ATGCCTGTTATGATAGGAGGTTTGGTAATTGATTAGTTCCATTATATATTGGAGCACCAGATAT
GGCTTCCCTCGGTTAAATAATATTAGTTTTTGATTATTACCCCAGCACTAATTTATTATTGGG
GTCTGCTTTTATAGAACAAGGGGCTGGTACGGGTGAACCGTCTATCCGCCATTATCAAGTATA
CAAACACATTCTGGGGGTTCCGGTAGATATGGCAATATTTAGTCTTCATTTGGCCGGAATTCCT
CCATATTAAGCTCTATTAATTTATAACTACAATTTAAATATGAGGGCGCCAGGGATGACTATG
GACAGATTACCTTTATTCGTTTGATCTATTTTATTAACAACAATATTATTAGTATTAGCATTGCC
GTTTTAGCTGGAGCAATTAATATGCAGATAAC

MED-6

GGAGACGATCATTATATAATGTTATAGTAACGGCACATGCTTTTGTTATGATATTCTTTTAGTA
ATGCCTGTTATGATAGGAGGTTTGGTAATTGATTAGTTCCATTATATATTGGAGCACCAGATAT
GGCTTCCCTCGGTTAAATAATATTAGTTTTTGATTATTACCCCAGCACTAATTTATTATTGGG
GTCTGCTTTTATAGAACAAGGGGCTGGTACGGGTGAACCGTCTATCCGCCATTATCAAGTATA
CAAACACATTCTGGGGGTTCCGGTAGATATGGCAATATTTAGTCTTCATTTGGCCGGAATTCCT
CCATATTAAGCTCTATTAATTTATAACTACAATTTAAATATGAGGGCGCCAGGGATGACTATG
GACAGATTACCTTTATTCGTTTGATCTATTTTATTAACAACAATATTATTAGTATTAGCATTGCC
GTTTTAGCTGGAGCAATTAATATGCTTTTAAC