

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τίτλος
**‘Ανάλυση του μεταγραφώματος του είδους *Cymodocea nodosa*,
σύγκριση με *Zostera marina* και με χερσαία φυτά’**

ΟΝΟΜΑ: Θεόδωρος Δάνης
A.M: 1590

Βόλος, 26/6/2018

Τίτλος: ‘Ανάλυση του μεταγραφώματος του είδους *Cymodocea nodosa*, σύγκριση με *Zostera marina* και με χερσαία φυτά’

Διμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Γενετική Υδροβίων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων

Βαφείδης Δημήτριος, Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπόνδυλων και άμεση - έμμεση χρηστικότητα τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων

Στην οικογένεια μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ Α. Εξαδάκτυλο, για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τον κ. Δ. Βαφείδη για τις χρήσιμες συμβουλές του και την καθοδήγησή του καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ Μ. Μαλανδράκη και τον κ Μ. Κάβουρα για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά τους, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού, καθώς επίσης και για την αμέριστη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ-ΒΙΟΓΕΩΓΡΑΦΙΑ	11
1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ.....	12
1.3 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	12
1.4 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	14
1.5 ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΦΑΝΕΡΟΓΑΜΩΝ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ .	15
1.6 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΑΓΓΕΙΟΣΠΕΡΜΩΝ	16
1.7 -ΟΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΤΙΚΗ	18
1.8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ	20
1.8.1 BLAST-Basic Local Alignment Search Tool.....	21
1.9 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	23
1.9.1 Βάσεις Δεδομένων Νουκλεοτιδικών Αλληλουχιών.....	23
1.9.2 Βάσεις δεδομένων Πρωτεϊνικών ακολουθιών	24
1.10 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ	25
1.11 ΣΚΟΠΟΣ	26
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	27
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	29
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	32
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	36
5.1 ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	36
5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα θαλάσσια φανερόγαμα είναι μία μοναδική ταξινομική βαθμίδα του Βασιλείου των φυτών πλήρως βυθισμένων και προσαρμοσμένων στο θαλάσσιο οικοσύστημα. Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η εύρεση εξελικτικών διαφορών ανάμεσα στα είδη *Cymodocea nodosa* και *Zostera marina* στην προσαρμογή τους, κατά την μετοίκηση από το χερσαίο στο θαλάσσιο περιβάλλον. Το διαθέσιμο μεταγράφομα της *C.nodosa* αναλύθηκε μέσω ομικών τεχνικών, τόσο με θαλάσσια όσο και με χερσαία φυτά. Τα αποτελέσματα φανέρωσαν ότι οι περισσότερες αντιστοιχίες σε ορθόλογα εμφανίζονται στα είδη *Elaeis guineensis*, (19%) *Phoenix dactylifera* (17%) που είναι μονοκοτυλήδονα, όπως και η *C.nodosa* αλλά και στο είδος *Zea mays* (17%) που είναι δικοτυλήδονο. Επιπλέον, τα περισσότερα μετάγραφα σωρεύονται στις γονιδιακές οντολογίες που σχετίζονται με το κυτταρόπλασμα και την σύνδεση του ATP. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ο εγκλιματισμός των φανερόγαμων στο υποθαλάσσιο περιβάλλον τα 'ώθησε' να αποδεσμευτούν από την παρουσία γονιδίων για την προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία και του μπλε χρώματος. Μετάγραφα, για τις δομές των στομάτων και της βιοσύνθεσης πτητικών ουσιών, απουσιάζουν επίσης και από τα δύο φανερόγαμα με την μόνη εξαίρεση, το ένζυμο 1-αμινοκυκλοπροπάνιο-1-καρβοξυλική οξυδάση (ACO) της σύνθεσης του αιθυλενίου, να παρουσιάζεται στην *C.nodosa* που ενδεχομένως να έχει προσφύγει σε διαφορετική εξελικτική πορεία από το *Z.marina*.

ABSTRACT

Seagrasses are a unique taxonomic rank of the kingdom of Plants and they are totally submerged and acclimated in marine environment. The aim of this study was the discovery of differences in the evolutionary path, between *Cymodocea nodosa* and *Zostera marina*, when they move from terrestrial to marine environment. Furthermore, there was comparison among transcriptomes of *C.nodosa* and a mixture of terrestrial plants. The results revealed that most ortholog matches are found in *Elaeis guineensis* (19%) and *Phoenix dactylifera* (17%) which are monocots like *C.nodosa* and *Zea mays* (17%) which is eudicot species. In addition, most of transcripts accumulate in the cytoplasm-related and ATP-binding gene ontologies. In conclusion, genes that are related with UV protection and blue radiation have all over been omitted because of the acclimatization in marine environment. Stomatia- related transcripts are totally absent in both seagrasses. Genes that are related in biosynthesis of volatile substances are absent too in two seagrasses with one exception the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase (ACO), which is a key enzyme for the ethylene biosynthesis and exists in transcriptome of *C.nodosa*. This observation shed some light in evolutionary course between *C.nodosa* and *Z.marina*, which it seems to be divergent.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα θαλάσσια φανερόγαμα ή αγγειόσπερμα δεν είναι φύκη. Είναι ανθοφόρα φυτά τα οποία αναπτύσσονται και αυξάνονται, παράκτια και σε εκβολές ποταμών, πλήρως βυθισμένα. Εξελίχθηκαν από τα θαλάσσια φύκη σε χερσαία φυτά και έπειτα επέστρεψαν πάλι στο θαλάσσιο οικοσύστημα (Williams, 2016). Ανήκουν όλα στην Τάξη των Alismatales και είναι μονοκοτυλήδονα, επειδή κάθε σπόρος έχει μόνο ένα εμβρυακό φύλλο ή κοτυληδόνα. Η δομή τους, στο κατώτερο τμήμα, περιλαμβάνει ρίζες, που βοηθούν τόσο στην αγκύρωση του φυτού στο κινητό υπόστρωμα, όσο και στην συγκράτηση του ίδιου του υποστρώματος, ανατρέποντας την διάβρωση του. Επιπλέον, διαθέτουν κορμό, εξειδικευμένα φύλλα που καλύπτονται από επιβιωτικούς οργανισμούς, αλλά και εμφανή άνθη και καρπούς, που προκύπτουν από υδρόφιλη επικονίαση.

Τα φυτά αυτά αποτελούν θεμελιώδη κομμάτια του θαλάσσιου οικοσυστήματος. Είναι σημαντικοί πρωτογενείς παραγωγοί, καθώς παρέχουν οργανικές προμήθειες στα άμεσα εξαρτημένα τροφικά πλέγματα που συμμετέχουν. Οι λειμώνες που σχηματίζουν, δρουν ως τόποι σύζευξης, ωοτοκίας αλλά και ως καταφύγια για τα εμβρυικά στάδια, πληθώρας υδρόβιων ζωικών οργανισμών. Επιπλέον, θεωρούνται σημαντικό οικοσύστημα για τους ανθρώπους, διότι συμμετέχουν σημαντικά στην αλιεία και στην στρατολόγηση πολλών ιχθυοαποθεμάτων.

Εξαιτίας της ευαισθησίας που έχουν στην ποιότητα του νερού χρησιμοποιούνται και ως βιοδείκτες για την υγεία του οικοτόπου, παρέχοντας πληροφορίες για τον βαθμό καταπάτησης και ρύπανσης της παράκτιας ζώνης από τον άνθρωπο, αλλά και των

κλιματικών αλλαγών. Οι πληροφορίες που εκμαιεύονται είναι καθοριστικές ώστε να βελτιωθούν οι στρατηγικές διαχείρισης και προστασίας. Η πίεση που τους ασκείται, είτε υποβαθμίζοντας το αβιοτικό περιβάλλον είτε δρώντας άμεσα στους λειμώνες, καταστρέφοντάς τους, με συνεχείς εκβαθύνσεις ή σύρσεις μηχανότρατας, τα οδήγησε στον εποικισμό βαθύτερων ζωνών.

Το σύνολο των πληροφοριών ωστόσο για την εξέλιξη, την προσαρμογή, και την φυσιολογία των θαλάσσιων φανερόγαμων βρίσκεται στο σύνολο του γονιδιώματος. Λόγω τη τεράστιας πληροφορίας των γενωμάτων, η συνεισφορά της Βιοπληροφορικής καθώς και των νέων, υψηλής απόδοσης -ομικών (omics) τεχνικών, που συμπεριλαμβάνει, είναι απαραίτητη. Η σύμπραξη των επιστημών της Βιολογίας, της Πληροφορικής, της Στατιστικής και των Μαθηματικών αποτέλεσε το γεφύρωμα στην μεταχείριση και ερμηνεία του γενώματος δίνοντας καθοριστικές απαντήσεις στην πορεία των εξαιρετικών αυτών οργανισμών στον γεωλογικό χρόνο.

1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ-ΒΙΟΓΕΩΓΡΑΦΙΑ

Συστηματική κατάταξη του θαλάσσιου φανερόγαμου *Cymodocea nodosa* (Ucria Ascherson): Βασίλειο: **Viridiplantae** (Greenplants) (Cavalier-Smith 1981), Φύλο: **Tracheophyta** (Cavalier-Smith), Κλάση: **Liliopsida** (Monocots), Τάξη: **Najadales** (Dumort., 1929), Οικογένεια: **Cymodoceaceae** (Vines, 1895), Γένος: **Cymodocea** (K.D.Koenig, 1806).

Το κυρίαρχο αυτό είδος της μεσοπαράλιας και υποπαράλιακής ζώνης απαντά ευρύτατα στην Μεσόγειο θάλασσα, στους κόλπους και τις λιμνοθάλασσές της. Ωστόσο,

υπάρχει στις Νότιες ακτές του Ατλαντικού ωκεανού, στις Νότιες ακτές της Ισπανίας καθώς και στις Κανάριες Νήσους.

1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Η *C.nodosa* είναι ένας διπλοειδής οργανισμός (Koce et al., 2003) και αναπαράγεται είτε με αγενή πολλαπλασιασμό είτε εγγενώς με την βλάστηση σπορίων (Ruggiero et al., 2005). Είναι δίοικο είδος με άμισχα θηλυκά άνθη, φέροντας δύο ωοθήκες (Caye & Meinesz, 1985). Η ανθοφορία συμβαίνει την άνοιξη (Ruggiero et al., 2005). Την εποχή αυτή τα άνθη των αρσενικών και θηλυκών είναι ευδιάκριτα. Στο άνθος του θηλυκού οι στήμονες επιμηκύνονται, ενώ ο ύπερος ‘αναδεικνύει’ τα νηματώδη στίγματα, ανερχόμενα από το εσωτερικό του άνθους (Buia&Mazzella 1991).

Η γύρη είναι νηματοειδούς μορφής και απελευθερώνεται από τους ανθήρες κατά την χαμηλή παλίρροια (Cox & Humphries, 1993). Μετά την υδρόφιλη επικονίαση και την επερχόμενη γονιμοποίηση οι καρποί παραμένουν στο αρχικό μητρικό φυτό μέχρι το τέλος του καλοκαιριού. Η απελευθέρωσή τους προβλέπει την χωρική διασπορά του φυτού, ενώ οι σπόροι μπορεί να παραμείνουν για αρκετό χρονικό διάστημα στο θαλάσσιο υπόστρωμα μέχρι τις κατάλληλες συνθήκες της εκβλάστησης.

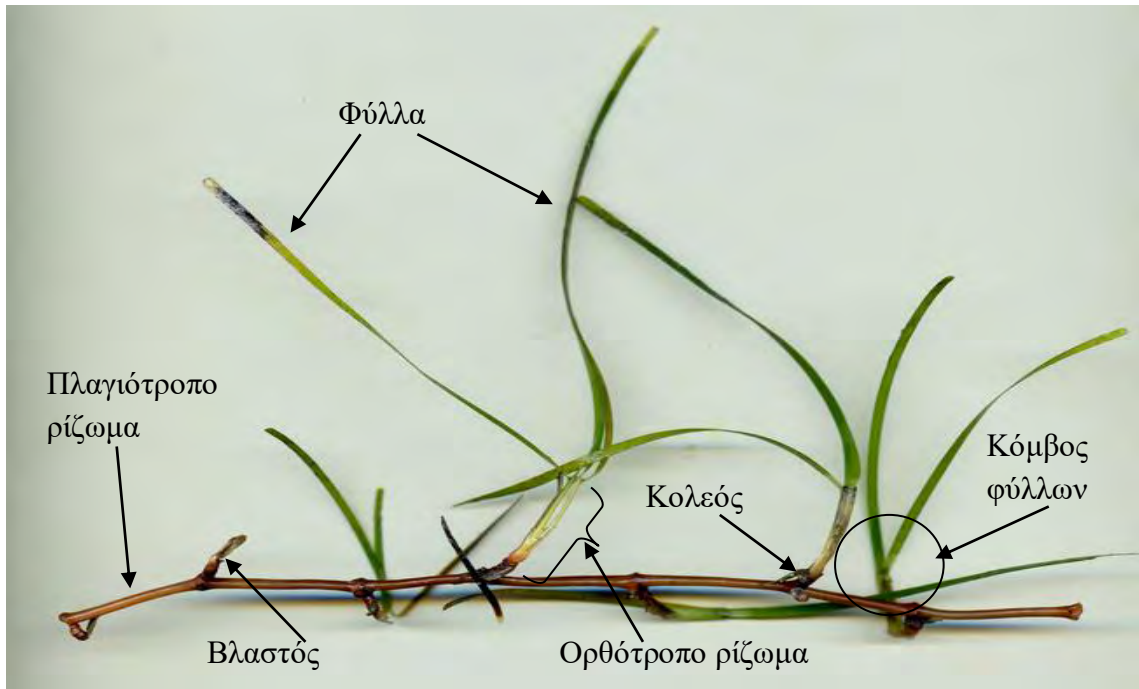
1.3 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το βάθος αύξησης και ανάπτυξης, του *C.nodosa*, είναι σε βάθη από 0,4-7m ενώ στην Γαλλία έχει βρεθεί και τα 18m (Caye&Meinesz 1985). Το υπόστρωμα ευδοκίμησης του αποτελείται από χονδρόκοκκη άμμο ή πηλό, σε περιοχές ηλιόλουστες με κυματική ή χωρίς δράση (Εικόνα 1). Τα φύλλα είναι επιμήκη πλάτους μερικών

χιλιοστών, πράσινου χρώματος, με συνήθης μήκος 40cm και εμφανίζονται σε αντικριστή και εναλλασσόμενη διάταξη. Οι βλαστοί φύονται στους κόμβους, το σημείο τομής του οριζόντιου και κάθετου άξονα. Οι άξονες του ριζώματος εμφανίζουν πλαγιοτροπική ανάπτυξη εκ των οποίων φύονται άξονες-βλαστοί με ορθοτροπική ανάπτυξη (Εικόνα 2).



Εικόνα 1: *Cymodocea nodosa* σε αραιό λιβάδι χωρίς εισβολές από άλλα είδη http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=Wcb51064700e37413&-session=abv4:AC1F0BCA0314a19842QK9F919D8A



Εικόνα 2: Μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους *C.nodosa* <http://www.floracatalana.net/cymodocea-nodosa-uctia-asch->

1.4 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η *C. nodosa* αποτελεί ένα ευρύαλο είδος της θαλάσσιας χλωρίδας και ευδοκیمی στην υποπαραλιακή ζώνη των ακτογραμμών. Οι κύριες διαδικασίες ανάπτυξης και αύξησής της, η φωτοσύνθεση και η κυτταρική αναπνοή, πραγματοποιούνται όπως και στα χερσαία φυτά. Ωστόσο, η διεξαγωγή της ανταλλαγής αερίων με το θαλάσσιο περιβάλλον επιτυγχάνεται μέσω της λεπτής πορώδης επιδερμίδας των φύλλων και όχι με στόματα. Εσωτερικά των φύλλων υπάρχουν αεροφόροι χώροι, το αερέγχυμα, το οποίο αποτελεί την αποθήκη των αερίων οξυγόνου (O_2) και διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), ώστε να χρησιμοποιηθούν σε συνθήκες ανοξίας. Επίσης, παρέχουν και την κατάλληλη ανόρθωση των φύλλων, με σκοπό την μεγιστοποίηση της φωτοσύνθεσης. Επίσης, μέσω των φύλλων έχει την ικανότητα να αναπληρώνει την έλλειψη σε θρεπτικά

συστατικά που ενδεχομένως να συμβεί, απευθείας από το θαλάσσιο περιβάλλον (Hartog, 1970).

1.5 ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΦΑΝΕΡΟΓΑΜΩΝ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Τα θαλάσσια φανερόγαμα ξαναγύρισαν στην θάλασσα εδώ και περίπου 200 εκατομμύρια χρόνια. Στην επιστροφή τους στο θαλάσσιο περιβάλλον διατήρησαν κάποια χαρακτηριστικά από τους χερσαίους προγόνους τους όπως τον κορμό, τα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς. Ωστόσο, στην μετάβαση τους στην θάλασσα ‘επένδυσαν’ σε χαρακτηριστικά, που τους προσδίδουν προσαρμογή στο θαλάσσιο περιβάλλον, διαφορετικά από αυτά που απαιτούν τα χερσαία φυτά. Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός χρειάστηκε να μορφοποιηθεί ώστε να αξιοποιηθούν οι αλλαγές της έντασης του φωτός κατά μήκος της υδάτινης στήλης, που μειώνεται ανάλογα με το βάθος και η διαφορετική σύνθεση του μήκους κύματος του φωτός που φτάνει στα φυτά. (Juvia et al., 1998). Επιπλέον, τα θαλάσσια αγγειόσπερμα χαρακτηρίζονται από τις υψηλότερες απαιτήσεις σε φως μεταξύ των αγγειόσπερμων (Orth et al., 2006). Ένας, παράγοντας που ευθύνεται για τις υψηλές απαιτήσεις τους σε φως είναι τα ανοξικά ιζήματα στα οποία είναι ριζωμένο. Τα ιζήματα αυτά αμβλύνουν το πρόβλημα της επάρκειας του οξυγόνου στο εσωτερικό των ιστών των φυτών. Επομένως, η ένταση της φωτοσύνθεσης θα πρέπει να είναι επαρκής για να ισοσταθμίσει τις απώλειες. Ωστόσο, όταν η εσωτερική μεταφορά οξυγόνου από τον βλαστό στις ρίζες είναι αναποτελεσματική είναι ικανά να καταφύγουν σε ζυμωτικό μεταβολισμό (Terrados et al., 1999).

Εξειδικευμένα στο θαλάσσιο περιβάλλον τα θαλάσσια φανερόγαμα συχνά υπόκεινται σε υψηλά επίπεδα αλατότητας στα παράκτια ή δελταϊκά οικοσυστήματα που

διαβιούν. Είναι γνωστό ότι τα υψηλά επίπεδα νατρίου (Na^+) είναι τοξικά. Πολλές, μεταβολικές λειτουργίες, όπως η πρωτεϊνοσύνθεση και οι ενζυμικές καταλύσεις χρειάζονται το κάλιο (K^+) ως συν-παράγοντα. Επομένως, η αύξηση του επιπέδου του Na^+ δημιουργεί ανταγωνιστικό περιβάλλον για το K^+ με αποτέλεσμα να μειώνεται η απόδοση των μεταβολικών αντιδράσεων. Επιπλέον, διατήρησαν το αγγειακό σύστημα για την μεταφορά χυμών ενώ ανέπτυξαν φύλλα εξειδικευμένα για προσαρμογή στο υποθαλάσσιο οικοσύστημα, χωρίς τις δομές των χερσαίων φυτών, τα στόματα. Τέλος, η ανεμόφιλη επικονίαση αντικαταστάθηκε από την υδρόφιλη. Εκτός, από το γένος *Enhalus* που η επικονίαση διεκπεραιώνεται πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας τα υπόλοιπα είδη παρουσιάζουν υποθαλάσσια επικονίαση, κατά την οποία παράγονται σπόροι οι οποίοι διασπείρονται τόσο με αβιοτικούς όσο και βιοτικούς παράγοντες (Larkum et al., 2007).

1.6 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΑΓΓΕΙΟΣΠΕΡΜΩΝ

Υπάρχοντα στοιχεία από Den Hartog, (1970) δείχνουν ότι τα θαλάσσια αγγειόσπερμα αποίκισαν το θαλάσσιο περιβάλλον περίπου 100 εκατομμύρια χρόνια πριν, γεγονός το οποίο υποδεικνύει την πρώιμη εμφάνισή τους σε σχέση συγκριτικά με την κοινά αποδεκτή εμφάνιση των αγγειόσπερμων, 400 εκατομμύρια χρόνια πριν (Raven, 1977). Η καταγραφή απολιθωμάτων είναι περιορισμένη. Τα περισσότερα και παλαιότερα παράλληλα απολιθώματα ανήκουν στα γένη *Posidonia* και *Thalassocharis* (Den Hartog, 1970). Αυτό αποδεικνύει ότι τα περισσότερα θαλάσσια φανερόγαμα είχαν ήδη εδραιωθεί κατά το τέλος της Ηώκαινου περιόδου (Larkum & Den Hartog 1989). Τα γένη *Phyllospadix* και *Enhalus* εμφανίστηκαν αρκετά αργότερα, ωστόσο από τα

υπόλοιπα είδη. Επιπλέον, το είδος *Enhalus acoroides* είναι το μοναδικό που του λείπει ο μηχανισμός της υδρόφιλης επικονίασης, ενώ καθώς η μορφή του και η επικονίαση του μοιάζουν με του γένους εσωτερικών υδάτων *Vallisneria*, θεωρείται ότι αποτελεί πρόγονό του (Larkum & Den Hartog, 1989).

Επιπλέον, κατά τους ίδιους συγγραφείς, Larkum & Hartog (1989), οι πιθανοί πρόγονοι των θαλάσσιων αγγειόσπερμων ήταν παράκτια φυτά όπως τα μανγγρόβια και διάφορα άλλα ελώδη φυτά, που στο σύνολο τους συγκαταλέγονται στα υδρόφυτα. Η αρχική υπόθεση στηρίζεται στο γεγονός ότι τα υδρόφυτα εμφανίζουν πληθώρα προσαρμογών στις συνθήκες του θαλάσσιου περιβάλλοντος οι οποίες είναι απαραίτητες για την εποίκηση των αγγειόσπερμων στα θαλάσσια παράκτια οικοσυστήματα.

Η σπανιότητα των απολιθωμάτων και οι ανίσχυρες υποθέσεις για την καταγωγή των θαλάσσιων φανερόγαμων αντικαταστάθηκαν από τις αναλύσεις μοριακών μεθόδων. Οι Les et al., (1997) εξέτασαν γονιδιακές αλληλουχίες από χλωροπλάστες θαλάσσιων αγγειόσπερμων και απέδειξαν ότι η καταγωγή τους είναι πολλαπλή. Η τάξη *Hydrocharitaceae* εξελίχθηκε από εσωτερικών υδάτων προγόνους ενώ από προγόνους αλυκών η γενικότερα ευρέων υδάτων η τάξη *Zosteraceae*.

Οι τεχνολογίες αλληλούχησης γνώρισαν τεράστια άνθιση από τότε που αλληλουχήθηκε το γένωμα του φυτού μοντέλου *Arabidopsis thaliana*. Από εκεί και έπειτα μέχρι το 2013-2014 αλληλουχήθηκαν 49 είδη φυτών (Michael & Jackson, 2013). Η πρόσφατη αλληλούχηση, και η πρώτη όσο αφορά τα θαλάσσια φανερόγαμα, του αγγειόσπερμου *Zostera marina* επισήμανε πως το είδος υποβλήθηκε σε διπλασιασμό γονιδιώματος περίπου 72-64 εκατομμύρια χρόνια πριν αλλά η ανάλυση εξέλιξης μέσω της σύγκρισης του γονιδιώματος του με πληθώρα χερσαίων φυτών και του είδους

Spyrodella polyrizha απέδειξε ότι παρέκκλινε από το μονοκοτυλήδοно γένος *Spyrodela* περίπου 135-107 εκατομμύρια χρόνια πριν (Olsen et al., 2016).

Τα θαλάσσια φανερόγαμα αποτελούν ένα μοναδικό οικολογικό σύνολο. Η επαναποίκηση συνέβη αποκλειστικά από την ταξινομική τάξη *Alismatales* και εκτιμάται ότι πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις (3) ανεξάρτητες φορές κατά την διάρκεια της εξέλιξής τους. Μόνο τέσσερις (4) των ανώτατων αυτών φυτών, *Posidoniaceae*, *Cymodoniaceae*, *Hydrocharitaceae* και *Zosteraceae* αποτελούνται αποκλειστικά από είδη που διαβιούν στο θαλάσσιο περιβάλλον.

1.7 -ΟΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΑΤΙΚΗ

Η ανάπτυξη νέων τεχνικών όπως των -ομικών και η αλληλούχηση νέας γενιάς έχουν συνεισφέρει στην απότομη και γρήγορη αύξηση της διαθεσιμότητας των μοριακών προφίλ των θαλάσσιων φανερόγαμων. Τα μοριακά τους προφίλ αποτελούν πολύτιμες πηγές για τον καθορισμό των μηχανισμών που συνέβαλαν στην εξέλιξη και την προσαρμογή τους στο θαλάσσιο περιβάλλον. Επιπλέον, τα εργαλεία της Βιοπληροφορικής συνδράμουν στην διαχείριση της ογκώδους αυτής πληροφορίας καθώς τα διαθέσιμα λογισμικά αυξάνονται και εξελίσσονται ραγδαία. Μελέτες έχουν αποδείξει πόσο παρόμοια ή διαφορετικά είναι τα θαλάσσια αγγειόσπερμα και τα χερσαία φυτά σε μοριακό επίπεδο. Ωστόσο, η ραγδαία αύξηση γνώσεων για τα θαλάσσια αγγειόσπερμα οφείλεται στην αλληλούχηση και τον σχολιασμό γονιδίων χερσαίων φυτών όπως *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Zea mays* κ.α. Παρόλα αυτά το παράδοξο είναι ότι ακόμα στις διεθνείς βάσεις δεδομένων δεν υπάρχει ολοκληρωμένα σχολιασμένο γονιδίωμα θαλάσσιων αγγειόσπερμων.

Η τρέχουσα γενωμική πληροφορία των θαλάσσιων φανερόγαμων ολοένα και αυξάνεται. Το πρώτο γονιδίωμα που αλληλουχήθηκε ήταν του κοσμοπολίτικου είδους *Zostera marina* (Olsen et al., 2016) το οποίο προσέφερε ποικίλα και σημαντικά συμπεράσματα για την γονιδιωματική των θαλάσσιων αγγειόσπερμων. Παρόλο που έχουν αλληλουχηθεί τα γονιδιώματα μόνο δύο ειδών, *Z. marina* και *Zostera muelleri*, πληροφορία που μπορεί να προκύψει και από τα υπόλοιπα είδη θα βοηθήσει στην εξήγηση των διαφορετικών γενωμάτων που υπάρχουν στα θαλάσσια φανερόγαμα, αλλά και στις εξελικτικές δυνάμεις που διέγειραν την αποίκιση και προσαρμογή τους στο θαλάσσιο περιβάλλον.

Κατά την διάρκεια της μετάβασης τους στο θαλάσσιο περιβάλλον υπέστησαν γονιδιακές μεταβολές. Η απόκτηση, αλλά ταυτόχρονα και η απώλεια γονιδίων συνείσφεραν κατάλληλα ώστε να επιβιώσουν και να εποικήσουν στα παράκτια οικοσυστήματα. Η απόκτηση γονιδίων διευκόλυνε τις διαδικασίες προσαρμογής τους στο θαλάσσιο περιβάλλον, όπως την ωσμωτική ρύθμιση, την ανταλλαγή αερίων, την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη στομάτων, την αντίσταση στην υπεριώδη ακτινοβολία αλλά και αυτά που σχετίζονται με την βιοσύνθεση του εξωτερικού στρώματος της υδρόφιλης γύρης έχουν εξαφανιστεί. Επιπλέον, βιοχημικά μονοπάτια πτητικών ουσιών, όπως το αιθυλένιο και τα τερπενοειδή, τα οποία εμπλέκονται στην διατήρηση του πρωτογενή μεταβολισμού (Olsen et al., 2016) φαίνεται να απουσιάζουν στα είδη *Z. Marina* και το Αυστραλιανό είδος *Z. Muelleri* (Kong et al., 2014; Golicz et al., 2015; Tyng Lee et al., 2016; Olsen et al., 2016), ενώ μελέτες ανάλυσης γονιδιακών μεταγραφωμάτων (EST) στο είδος *Zostera noltii* (Massa et al., 2011) και στο είδος *Z. Marina* η αποτυχία ανίχνευσης

βιοχημικών μονοπατιών του αιθυλενίου κυρίως, υποδεικνύουν ότι τουλάχιστον για είδη του Βόρειου Ημισφαιρίου το παραπάνω γεγονός συνιστάται ένα ευρύ φαινόμενο.

Προηγούμενες μελέτες από τους Dattolo et al. (2013), Kong et al. (2014), Golicz et al. (2015) και Olsen et al. (2016) παρείχαν σημαντικές ανακαλύψεις για την ορμονική ρύθμιση στα θαλάσσια φανερόγαμα και ιδιαίτερα για το βιοχημικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται η ορμόνη αιθυλένιο. Δεδομένου ότι το αιθυλένιο είναι μία πτητική, αέρια ορμόνη και τα θαλάσσια φανερόγαμα στερούνται τα στόματα, η μερική ή ολοκληρωτική απώλεια του αιθυλενίου αντικατοπτρίζει την επένδυση, των αγγειόσπερμων αυτών, σε δομές που είναι πολύτιμες για την προσαρμογή και την επιβίωσή τους στο υποθαλάσσιο περιβάλλον. Η ολοκλήρωση και τα συμπεράσματα της αλληλούχησης του γονιδιώματος του είδους *Z. marina* οδηγούν στην υπόθεση ότι ίσως το μονοπάτι του αιθυλενίου έχει μειωθεί ή εκλείπει στα είδη του γένους *Zostera* (Olsen et al., 2016). Συνεπώς, λόγω της καταστολής του βιοχημικού μονοπατιού του αιθυλενίου, μερικώς ή πλήρως, τα θαλάσσια φυτά θα πρέπει να έχουν ενδεχομένως εναλλακτικά μονοπάτια σηματοδότησης, ανεξάρτητα του αιθυλενίου, τα οποία θα εμπλέκονται σε διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες όπως η φύτρωση βλαστών, η ανάπτυξη ριζών, ο καθορισμός φύλου και η ωρίμανση καρπών και ανθών (ανασκόπηση Dolan 1996).

1.8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ

Η άνθιση της υπολογιστικής βιολογίας επέφερε ένα σύνολο προβλημάτων που έπρεπε να επιλυθούν πριν αποτελέσει το κατεξοχήν εργαλείο μεταχείρισης του μεγάλου όγκου βιολογικών δεδομένων. Η σύγκριση των βιολογικών ακολουθιών, είτε αμινοξέα που σχηματίζουν πρωτεΐνες, είτε νουκλεοτίδια που σχηματίζουν μόρια γενετικού

υλικού ήταν τα σημαντικότερα προβλήματα του συνόλου. Η σύγκρισή τους αποτελεί την κινητήριο δύναμη για ανάγνωση και ταυτοποίηση νέων ειδών, την κατασκευή φυλογενετικών δένδρων, την χαρτογράφηση γονιδιωμάτων και την ανίχνευση μεταλλάξεων ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων.

Οι χαρακτηριστικότεροι αλγόριθμοι πολλαπλής ευθυγράμμισης είναι οι ευριστικές μέθοδοι FASTA, BLAST και η μέθοδος CLUSTAL W. Η ταχύτητά τους είναι αρκετές φορές πιο μεγάλη από αυτήν των υπόλοιπων αλγορίθμων με αποτέλεσμα να πλεονεκτούν και να αποτελούν σημαντικό εργαλείο ανάλυσης και αναζήτησης βιολογικών βάσεων δεδομένων.

1.8.1 BLAST-Basic Local Alignment Search Tool

Συγκεκριμένα ο αλγόριθμος Blast (Altschul, Gish, Miller, Myers & Lipman, 1990), αποτελεί μία τεχνική που χρησιμοποιείται για την σύγκριση μίας γνωστής ακολουθίας (query) έναντι μίας βάσης δεδομένων (database) και υπολογίζει το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των αντιστοιχιών. Αναπτύχθηκε και διατηρείται ακόμα από το NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Η διαδικασία ξεκινά με την ακολουθία που τίθεται προς αναζήτηση (query) η οποία χωρίζεται σε τμήματα-λέξεις μήκους “w” και ονομάζονται w-μέρη. Τα w-μέρη προκύπτουν από την ανάγνωση του πλαισίου της ακολουθίας, προχωρώντας κάθε φορά κατά ένα γράμμα μέχρι το τέλος της ακολουθίας. Έτσι, δημιουργείται μία λίστα με w-μέρη που έχουν εξαχθεί από την ζητούμενη ακολουθία. Η αναζήτηση των λέξεων έναντι της βάσης δεδομένων προσδίδει ένα αποτέλεσμα, που χρησιμοποιώντας έναν

δεδομένο πίνακα υποκαταστάσεων (substitution matrix), ξεπεράσει ή ισούται με την τιμή "T", τότε οι λέξεις επεκτείνονται ώστε να παραχθούν στοιχίσεις που θα υπερβαίνουν το κατώφλι (threshold) "S". Κάθε ακριβής αντιστοιχία πιθανότατα να αποτελεί και ζεύγος υψηλής βαθμολογίας (high scoring pair, HSP). Η τιμή "T" καθορίζει την ταχύτητα και ακρίβεια της αναζήτησης, που στην περίπτωση του BLAST "θυσιάζεται" η ευαισθησία για την αύξηση της ταχύτητας.

Το πρόγραμμα BLAST παρέχει ποικίλα εργαλεία-εκδόσεις που εκτελούν διαφορετικές λειτουργίες:

➤ **Blastn**

Συγκρίνει μία νουκλεοτιδική αλληλουχία (DNA) με μία νουκλεοτιδική βάση δεδομένων (DNA)

➤ **Blastp**

Συγκρίνει την αμινοξική αλληλουχία που τίθεται προς αναζήτηση με μία βάση πρωτεϊνικών ακολουθιών (πρωτεΐνη - πρωτεΐνη).

➤ **Blastx**

Συγκρίνει μία νουκλεοτιδική αλληλουχία (DNA) αφού έχει μεταφραστεί και στα 6 πιθανά πλαίσια ανάγνωσης (6 reading frames) με μία βάση δεδομένων πρωτεϊνών.

➤ **tBlastn**

Συγκρίνει την πρωτεϊνική ακολουθία με βάση νουκλεοτιδικών δεδομένων (DNA), η οποία έχει μεταφραστεί και στα 6 πλαίσια ανάγνωσης.

➤ **tBlastx**

μεταφράζει μία νουκλεοτιδική ακολουθία (DNA) στα 6 πλαίσια ανάγνωσης και τη συγκρίνει με βάση νουκλεοτιδικών δεδομένων (DNA), η οποία και αυτή έχει μεταφραστεί σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης.

1.9 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Οι βιολόγοι και οι μοριακοί βιολόγοι με την χρήση ειδικών τεχνικών κατάφεραν να συλλέξουν ακολουθίες DNA τόσο από ευκαρυώτες όσο και από προκαρυώτες. Ωστόσο, η μετατροπή τους σε ψηφιακές βάσεις δεδομένων σε συνδυασμό με τα εργαλεία που προαναφέρθηκαν και πολλά άλλα, αποτέλεσαν τις πηγές άντλησης πολλών βιολογικών και εξελικτικών απαντήσεων.

Η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε σε μορφές κατάλληλες για ανάγνωση μέσω των ηλεκτρονικών υπολογιστών. Έτσι, δημιουργήθηκαν Βάσεις Νουκλεοτιδικών και Βάσεις Πρωτεϊνικών Ακολουθιών. Η δημιουργία τους εμφανίστηκε στην Αμερική από το NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), στην Ιαπωνία από το National Institute of Genetics (<https://www.nig.ac.jp/nig/>) και στην Ευρώπη από το European Molecular Biology Laboratory (<http://www.embl.org/>).

1.9.1 Βάσεις Δεδομένων Νουκλεοτιδικών Αλληλουχιών

- GenBank-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
- EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/ena/browse>)
- DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>)

Ο συνδυασμός, ωστόσο, των τριών παραπάνω βάσεων δεδομένων είναι η:

- INSDC (<http://www.insdc.org/>)

1.9.2 Βάσεις δεδομένων Πρωτεϊνικών ακολουθιών

Στις προεπιλογές του BLAST χρησιμοποιούνται συγκεκριμένες αμινοξικές βάσεις που διατηρούνται από το NCBI και παρατίθενται παρακάτω:

1. Nr: περιέχει ένα σύνολο πρωτεϊνικών ακολουθιών της GenBank μη πλεονάζων, μαζί με μεταφρασμένες περιοχές από:
PDB (Protein Data Bank Proteins)
CDS (Coding Sequence)
SwissProt
PIR (Protein Information Resource)
PRF
2. HPRD (Human Protein Reference Database)
3. Refseq
4. KOG
5. Pfam

Επίσης στις πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων συμπεριλαμβάνεται και η UniProt (Universal Protein database) του EMBL.

1.10 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

- ❖ EXPECTVALUE (E-VALUE): Το E-value αντικατέστησε το p-value που βάσει μίας προσεγγιστικής σχέσης (Waterman, 1995) το p-value είναι περίπου ίσο με το e-value. Ισούται με τον ακριβή αριθμό αντιστοιχιών (αμινοξέα ή νουκλεοτιδικές βάσεις) που αναμένεται να εντοπιστούν στην δεδομένη βάση δεδομένων λόγω καθαρής τύχης και όχι βάση βιολογικής σχέσης. Η τιμή της παραμέτρου εξαρτάται από το μέγεθος της ακολουθίας (query), καθώς είναι πιθανότερο να βρεθούν αντιστοιχίες για μικρότερου μήκους ακολουθίες αλλά και το μέγεθος της βάσης δεδομένων που προφανώς η τυχαιότητα αντιστοιχίας είναι αντιστρόφως ανάλογη του όγκου της.

$$E = K * N \exp(-\lambda S)$$

κ = μήκος αλληλουχίας, λ = μήκος βάσης δεδομένων $N = \kappa * \lambda$

Οι τιμές που μπορούν να εκφράσουν το e-value μπορεί να είναι ακέραιες ή δεκαδικές. Στο BLAST εξορισμού είναι ίση με 10. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που προκύπτουν, θεωρούνται βιολογικώς σημαντικά όταν η τιμή e-value είναι κοντά στο μηδέν (0).

- ❖ BITSCORE: Το bitscore αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους στατιστικής επικύρωσης των αποτελεσμάτων του εξαγωγίμου αρχείου (output) του BLAST. Η ερμηνεία της τιμής σχετίζεται με την ακρίβεια και την ποιότητα της ευθυγράμμισης, καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή τόσο ακριβέστερη είναι η ευθυγράμμιση. Στο BLAST εξορισμού χρησιμοποιείται ο πίνακας αντικατάστασης BLOSUM62 για τον υπολογισμό του bitscore.

$$S' = \frac{\lambda * S - \log K}{\log 2}$$

Υπολογισμός του bit score

- ❖ ALIGNMENT: Ανάλογα με την παράμετρο που θα καθοριστεί βάση του πειράματος καθορίζεται και ο μέγιστος αριθμός ευθυγραμμίσεων που θα εμφανιστούν στο output αρχείο.

1.11 ΣΚΟΠΟΣ

Η εύρεση διαφορών στην προσαρμογή του είδους *Cymodocea nodosa* σε σχέση με το είδος *Zostera marina* κατά την εξελικτική τους πορεία από το χερσαίο στο θαλάσσιο περιβάλλον.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Όλες οι αναλύσεις της παραπάνω έρευνας διεκπεραιώθηκαν στους ισχυρούς υπολογιστές (server) της σχολής Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής. Το αρχείο που μελετήθηκε ήταν αποτέλεσμα της Κατασκευής και Συναρμολόγησης του Μεταγραφώματος του θαλάσσιου φανερόγαμου *Cymodocea nodosa* που υλοποιήθηκε μέσω του προγράμματος ΘΑΛΛΗΣ 2014-2016. Το πλήρες μεταγράφομα (transcriptome) του φυτού *Cymodocea nodosa* μεταχειρίστηκε μέσω του αρχείου fasta, Trinity_RSEM. Η διαδικασία ανάλυσης ξεκίνησε με την εύρεση των μεταγραφωμάτων (transcripts) σε αντίστοιχες βάσεις δεδομένων διάφορων φυτών που διαθέτουν ικανοποιητικά χαρακτηρισμένο και σχολιασμένο μεταγράφομα. Τα αρχεία που περιέχουν τα μεταγραφώματα των φυτών αποκτήθηκαν από NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Έπειτα, με την παρακάτω εντολή πραγματοποιήθηκε συγχώνευση όλων των μεταγραφωμάτων, των υπό μελέτη φυτών, που θα αποτελέσουν την ενιαία database αναζήτησης των ακολουθιών του είδους *C. nodosa*.

Τα hits στο εξερχόμενο αρχείο φιλτραρίστηκαν και επιλέχθηκαν τα transcripts που ικανοποιούσαν τις εξής συνθήκες:

- ✓ E-value < 10^{-8}
- ✓ Slength > 200 νουκλεοτιδικές βάσεις ή 70 αμινοξέα
- ✓ Alignment/q-length >70%
- ✓ Alignment/s-length >70%

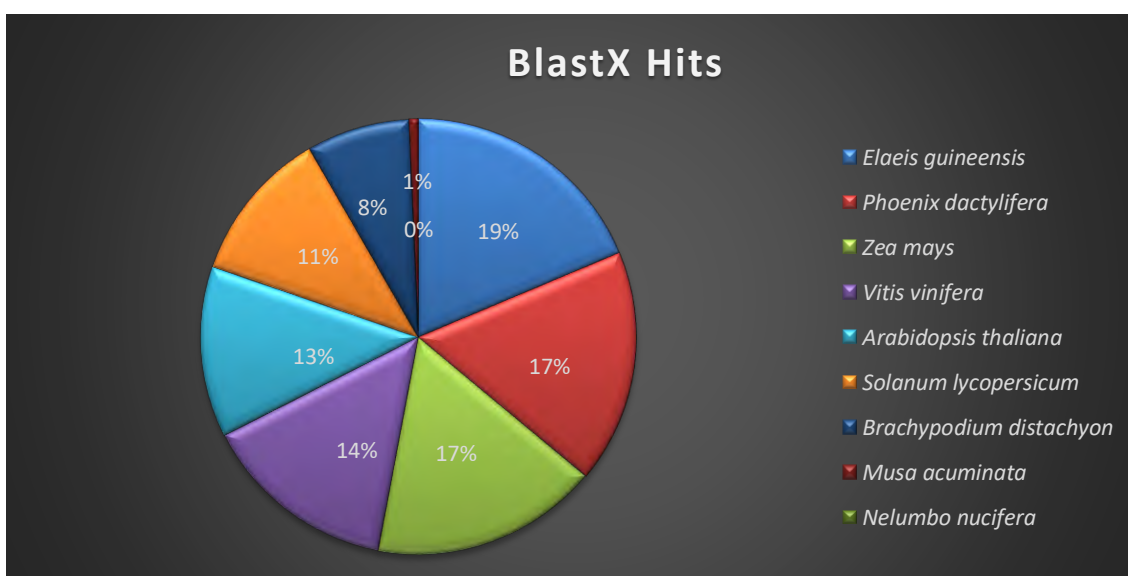
Η σύγκρισή του έναντι των διαφορετικών φυτών, που επιλέχθηκαν για μελέτη, μέσω του εργαλείου Blastx που προαναφέρθηκε, διασφαλίζει ότι το τελικό αρχείο που προκύπτει θα περιέχει γονίδια που υπάρχουν στα χερσαία φυτά και όχι στο *Z. marina*.

Τα μετάγραφα που παραμένουν ενδεχομένως να υπάρχουν παραπάνω από μία φορές στο τελικό αρχείο ή να είναι παρόμοια χωρίς να αντιπροσωπεύουν διαφορετική βιολογική δραστηριότητα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την μείωση του πλεονασμού τους είναι η κατασκευή συμπλεγμάτων (clusters) βάση του προγράμματος CD-HIT. Τα τελικά μετάγραφα αντιστοιχήθηκαν με ορθόλογα του είδους *Arabidopsis thaliana*, TAIR 10 protein release (blastx; Cut off-value 10e-05) και ταξινομήθηκαν σε γονιδιακές οντολογίες (Gene Ontology) μέσω του διαδικτυακού προγράμματος DAVID χρησιμοποιώντας Benjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR < 0.05).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

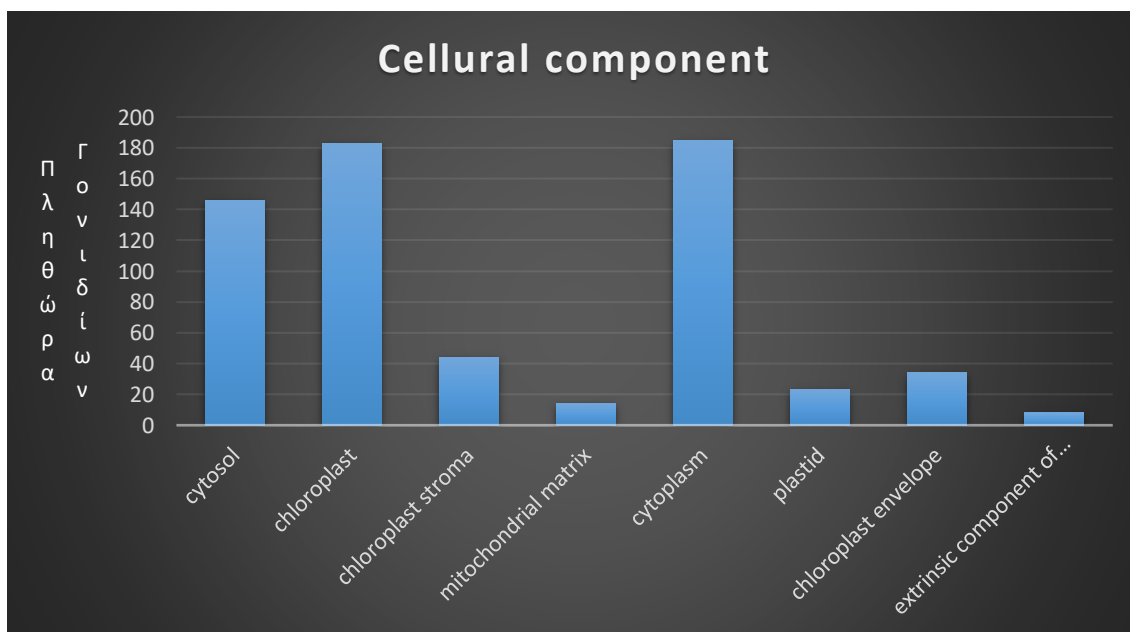
Η εκ νέου «De novo» συναρμογή και ανάλυση μεταγραφώματος παρέχει μία αρκετά περιεκτική και πλήρης εικόνα του γονιδιώματος ενός οργανισμού, που δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα, με αποτέλεσμα να μην είναι απαραίτητη η συνολική αλληλούχησή του .

Το αρχείο με το συνολικό μεταγράφομα, του *C. nodosa*, που κατασκευάστηκε εκ νέου περιέχει 70,049 μετάγραφα (Malandrakis et al., 2017), από τα οποία αντιστοιχήθηκαν με τα 9 διαφορετικά φυτά μέσω του BLASTX (e-value cut off 10^{-5}) 11.289 (16.11%) (Διάγραμμα 1). Το είδος *C. Nodosa* ανήκει στα μονοκοτυλήδονα φυτά, τα υψηλότερα ποσοστά συμμετοχής εμφανίζονται στα είδη *E. guineensis*, (19%) *P. Dactylifera* (17%) που είναι μονοκοτυλήδονα και στο είδος *Z. Mays* (17%) που είναι δικοτυλήδονο.

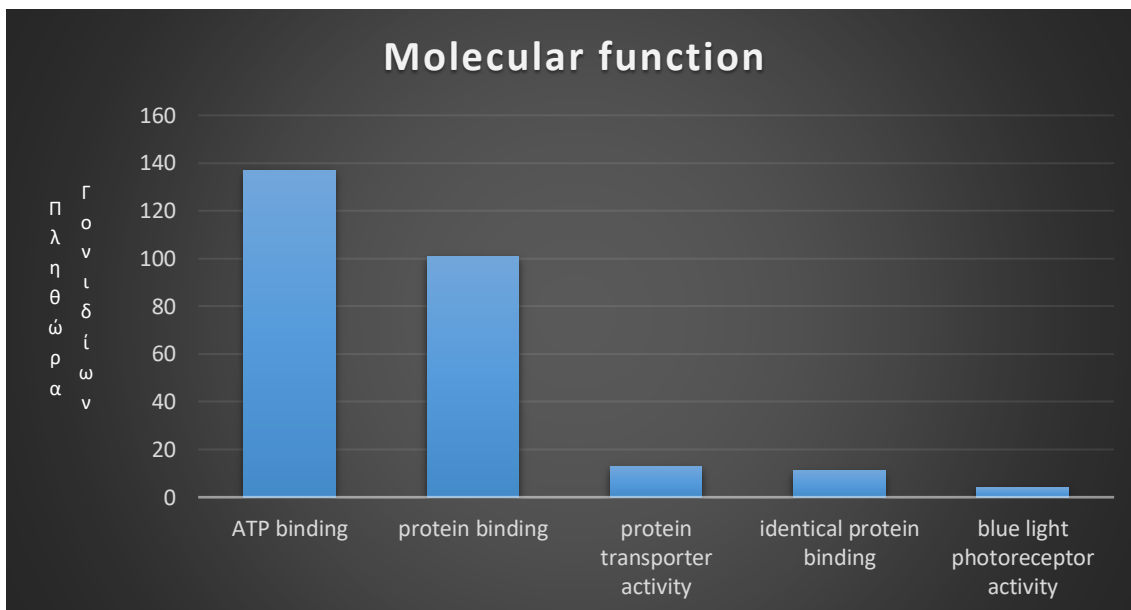


Διάγραμμα 1: High-score BlastX Hits του μεταγραφώματος του *C. nodosa* μεταξύ των 9 φυτών

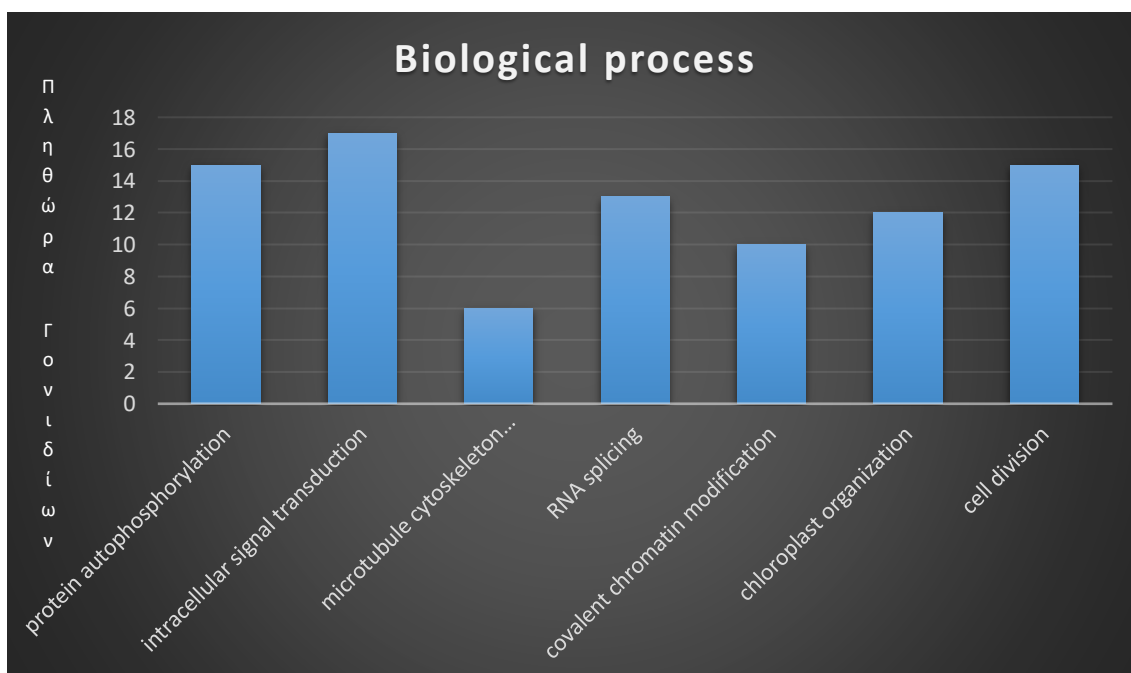
Στο σύνολο των 11.289 γονιδίων μόνο 961 απουσιάζουν από το είδος *Z. marina*. Ωστόσο, μόνο τα 880 αντιστοιχήθηκαν με ορθόλογα του είδους *Arabidopsis thaliana*, TAIR 10 protein release εκ των οποίων στα 854 μετάγραφα αποδόθηκαν όροι (GO-terms). Τα μετάγραφα κατανέμονται σε τρεις κύριες *Cellular Component* (97.5%, 833) (Διάγραμμα 2), *Molecular Function* (76.5%, 653) (Διάγραμμα 3) και *Biological Process* (76.6%, 654) (Διάγραμμα 4) και το καθένα μπορεί να αντιστοιχηθεί σε παραπάνω από μία κατηγορίες. Μεταξύ των 854 μεταγραφωμάτων 211 εμπλέκονται σε μεταβολικά μονοπάτια της βάσης δεδομένων Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Στην κατηγορία *Biological Process* κυριαρχούν οι ομάδες γονιδίων “protein autophosphorylation” και “embryo development ending in seed dormancy”, στην κατηγορία *Cellular Component* οι ομάδες “cytosol”, “chloroplast” και “cytoplasm” και οι ομάδες “ATP binding” και “protein binding” στην κατηγορία *Molecular Function*.



Διάγραμμα 2: Γονιδιακές οντολογίες με τα στοιχεία του κυττοσολίου



Διάγραμμα 3: Γονιδιακές οντολογίες των μοριακών λειτουργιών του κυττάρου



Διάγραμμα 4: Γονιδιακές οντολογίες που σχετίζονται με τις βιολογικές διαδικασίες του κυττάρου

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα θαλάσσια φανερόγαμα αποτελώντας μία οικολογική ομάδα ακολούθησαν εξελικτικά μονοπάτια προς το υγρό-θαλάσσιο περιβάλλον τρεις με τέσσερις φορές κατά τον γεωλογικό χρόνο. Στην παρούσα μελέτη το συνολικό μεταγράφομα του είδους *C. nodosa* και ακόμη εννέα αντιπροσώπων του χερσαίου περιβάλλοντος, συγκρίθηκαν με το μεταγράφομα του *Z. marina*, ώστε να ερευνηθεί η εξελικτική πορεία των δύο θαλάσσιων φανερόγαμων. Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των αντιστοιχίσεων με τα είδη των χερσαίων φυτών, οι περισσότερες αντιστοιχήσεις ανήκαν στο είδος *E. guineensis* (19%) και στο είδος *P. dactylifera* (17%). Το γεγονός αυτό ήταν προσδοκώμενο καθώς τα παραπάνω δύο είδη και το *C. nodosa* ανήκουν στην Ομοταξία των μονοκοτυλήδων, γεγονός που συνάδει και με τα αποτελέσματα του Blastx έναντι της παγκόσμιας βάσης πρωτεϊνών (nr) (Malandrakis et al., 2017). Ωστόσο, οι Kong et al., (2014) ισχυρίζονται ότι ο διαχωρισμός μονοκοτυλήδων και δικοτυλήδων συνέβη αφού το *Z. Marina* εδραιώθηκε στο θαλάσσιο περιβάλλον, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό αντιστοιχίσεων έναντι της βάσης δεδομένων nr, ανήκαν σε δικοτυλήδονα είδη όπως το *Glycine max* και το *V. vinifera*. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι μπορεί να υπάρχουν σημαντικές εξελικτικές διαφορές στα δύο φανερόγαμα, παρόλο που στράφηκαν στο θαλάσσιο οικοσύστημα.

Επιβιώνοντας πλήρως βυθισμένα στο θαλάσσιο περιβάλλον, τα φανερόγαμα αντιμετωπίζουν ίσως την μεγαλύτερη γνωστή απειλή για αυτά, το περιορισμένο φως (Ralph et al., 2007). Το φως συνεισφέρει σημαντικά στην σηματοδότηση των φυτών. Τα φυτά “αισθάνονται”, μέσω φωτοϋποδοχέων που διαθέτουν, το μήκος κύματος του φωτός, την ένταση, την διάρκεια του καθώς και την κατεύθυνσή του. Τα φύλλα διαθέτουν πέντε είδη υποδοχέων που προσαρμόζονται κατάλληλα για την

μεγιστοποίηση της φωτοσύνθεσης και προλαμβάνουν την καταστροφή, καθώς τα χερσαία και υδροχαρή φυτά συχνά εκτίθενται σε υπεριώδης ακτινοβολία (UV). Σύμφωνα με τους Olsen et al., (2016) τα γονίδια που σχετίζονται με την προστασία σε υπεριώδης ακτινοβολία (UVR8) (Binkert et al., 2014) έχουν χαθεί πλήρως στο *Z. marina* ενώ επίσης δεν καταγράφηκαν στην ανάλυση μεταγραφώματός του από τους Kong et al. (2014), γεγονός που υποδεικνύεται από την παρούσα μελέτη. Ομοίως, τα γονίδια των φωτοϋποδοχέων του μπλε χρώματος (CRY2) έχουν εκλείψει στο *Z. marina* (Kong et al., 2014; Olsen et al., 2016) σε αντίθεση με τα συγγενικά είδη *Posidonia oceanica* (Greco et al., 2013), *Spirodela polyrhiza*, καθώς επίσης και με τα αποτελέσματα μας.

Μελέτες που έχουν βασιστεί σε μοριακές μεθόδους (Dattolo et al., 2013; Kong et al., 2014; Golicz et al., 2015; Olsen et al., 2016; Tyng Lee et al., 2017) συνέβαλαν σημαντικά στην αποκωδικοποίηση των ρόλων ορμονών, στα θαλάσσια φανερόγαμα. Συγκεκριμένα μία αέρια φυτό-ορμόνη, το αιθυλένιο, που εμπλέκεται σε σημαντικές λειτουργίες όπως η ανάπτυξη του φυτού, η βλάστηση του σπόρου, η πτώση των φύλλων και η ωρίμανση των καρπών, φαίνεται ότι το μονοπάτι βιοσύνθεσής της ίσως έχει εκλείψει πλήρως στο *Z. muelleri* (Golicz et al., 2015; Tyng Lee et al., 2017) και στο *Z. noltii* (Golicz et al., 2015). Η κατασκευή του γονιδιώματος του *Z. marina* ενισχύει τους ισχυρισμούς ότι το μονοπάτι του αιθυλενίου έχει μειωθεί αρκετά μεταξύ των ειδών *Zostera sp.*, καθώς και την προσαρμογή των θαλάσσιων φανερόγαμων στο υποθαλάσσιο οικοσύστημα. Ωστόσο, το ένζυμο 1-αμινοκυκλοπροπάνιο-1-καρβοξυλική οξυδάση (ACO) που έχει εκλείψει στο *Z. marina* (Olsen et al., 2016) και στο *Z. muelleri* (Golicz et al., 2015) και συμμετέχει στο βιοχημικό μονοπάτι του αιθυλενίου, ανιχνεύθηκε στην παρούσα μελέτη, με κωδικό ορθόλογου γονιδίου TR67303 | c0_g1.

Επιπλέον, ορθόλογα γονίδια τα οποία λείπουν από το γονιδίωμα του *Z. marina*, όπως η συνθάση ACC (ACS), δεν ανιχνεύθηκαν στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Παραδόξως, τα γονίδια ACO και ACS έχουν ανιχνευτεί στο γονιδίωμα του *S. polyrhiza* (Wang et al. 2014) που αποτελεί σημαντικό “συγγενή” του *Z. marina*. Παρόλα αυτά η ανίχνευση γονιδίων μέσω της “εκ νέου” συναρμογής του μεταγραφώματος είναι ριψοκίνδυνη, καθώς είναι δυναμικό, και η ανίχνευση σποραδικών ορθόλογων που σχετίζονται με την βιοσύνθεση του αιθυλενίου στο *C. nodosa* (Malandrakis et al. 2017), δεν επιβεβαιώνουν την ύπαρξη του.

Όσον αφορά τις υπόλοιπες πτητικές φυτό-ορμόνες, τα θαλάσσια φανερόγαμα έχουν χάσει την ικανότητα τους να τις συνθέτουν. (Kuo & Hartog 2006). Σημαντικά, μονοπάτια τερπενοειδών και διτερπενοειδών στο *Z. muelleri* και *Z. marina*, που σχετίζονται με την σύνθεση πτητικών ουσιών, έχουν χαθεί (Olsen et al., 2016; Tyng Lee et al., 2017). Η ύπαρξη ορθόλογων γονιδίων στα αποτελέσματα μας, που εμπλέκονται σε κύρια βιοχημικά μονοπάτια σύνθεσης μονοτερπενοειδών και διτερπενοειδών (geranyl geranyl reductase, GGR; Geranyl diphosphate synthase 1, GDS1) επιβεβαιώνει ενδεχομένως εξελικτικές διαφορές που συνείσφεραν στην προσαρμογή των θαλάσσιων αγγειόσπερμων στο υποθαλάσσιο περιβάλλον.

Τα στόματα είναι κυτταρικές δομές στην επιφάνεια των φύλλων των φυτών και αποτελούνται από δύο εξειδικευμένα κύτταρα που περικλείουν έναν πόρο. Ελέγχουν την ανταλλαγή αερίων με το εξωτερικό περιβάλλον καθώς και την ωσμωρύθμιση αλλά και την εξατμισοδιαπνοή. Τα θαλάσσια φανερόγαμα δεν διαθέτουν στόματα, παρόλο που οι πρόγονοι τους είναι χερσαία φυτά (Kuo & Hartog, 2006). Η απώλεια των στομάτων είναι σε συνάφεια με την εκφύλιση των μονοπατιών βιοσύνθεσης πτητικών ουσιών. Η απουσία ορθόλογων στα αποτελέσματα μας, καθώς και από τα γονιδιώματα

των *Z. marina* και *Z. muelleri* (Olsen et al., 2016; Tyng Lee, 2017) αντικατοπτρίζει τον εγκλιματισμό τους στις συνθήκες της υποπαραλιακής ζώνης και την προσφυγή σε νέα κατάλληλα εξελικτικά χαρακτηριστικά.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agostini, S., Pergent, G., & Marchand, B. (2003). Growth and primary production of *Cymodocea nodosa* in a coastal lagoon. *Aquatic Botany*, 76(3), 185–193.
- Ahmed, I. M., Nadira, U. A., Bibi, N., Cao, F., He, X., Zhang, G., & Wu, F. (2015). Secondary metabolism and antioxidants are involved in the tolerance to drought and salinity, separately and combined, in Tibetan wild barley. *Environmental and Experimental Botany*, 111, 1–12.
- Al-Aqeel, S., Ryu, T., Zhang, H., Chandramouli, K. H., & Ravasi, T. (2016). Transcriptome and Proteome Studies Reveal Candidate Attachment Genes during the Development of the *Barnacle amphibalanus* Amphitrite. *Frontiers in Marine Science*, 3.
- Alberto, F., Gouveia, L., Arnaud-Haond, S., Pérez-Lloréns, J. L., Duarte, C. M., & Serrão, E. A. (2005). Within-population spatial genetic structure, neighbourhood size and clonal subrange in the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Molecular Ecology*, 14(9), 2669–2681.
- Alsterberg, C., Eklof, J. S., Gamfeldt, L., Havenhand, J. N., & Sundback, K. (2013). Consumers mediate the effects of experimental ocean acidification and warming on primary producers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), 8603–8608.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Sherlock, G. (2000). Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25(1), 25–29.
- Barakat, A., Staton, M., Cheng, C., Park, J., Yassin, N. B. M., Ficklin, S., Sederoff, R. (2012). Non-human and non-rodent vertebrate genomics Chestnut resistance to the blight disease: insights from transcriptome analysis. *BMC Plant Biology*, 12(1), 38.
- Barrón, C., Marbà, N., Terrados, J., Kennedy, H., & Duarte, C. M. M. (2004). Community metabolism and carbon budgets along a gradient of seagrass

- (*Cymodocea nodosa*) colonization. *Limnology and Oceanography*, 49(5), 1642–1651.
- Beer, S. (2001). Seagrass Ecology. *Aquatic Botany*, 71(1), 79–80.
- Ben Dor, A., Shamir, R., & Yakhini, Z. (1999). Clustering gene expression patterns. *Journal of Computational Biology*, 6(3–4), 281–297.
- Bergmann, N., Winters, G., Rauch, G., Eizaguirre, C., Gu, J., Nelle, P., ... Reusch, T. B. H. (2010). Population-specificity of heat stress gene induction in northern and southern eelgrass *Zostera marina* populations under simulated global warming. *Molecular Ecology*, 19(14), 2870–2883.
- Bortone, S. A. (1998). *Seagrasses - Monitoring, Ecology, Physiology, and Management*.
- Boudouresque, C. F., Bernard, G., Pergent, G., Shili, A., & Verlaque, M. (2009). Regression of Mediterranean seagrasses caused by natural processes and anthropogenic disturbances and stress: A critical review. *Botanica Marina*, 52(5), 395–418.
- Buia, M. C., & Mazzella, L. (1991). Reproductive phenology of the Mediterranean seagrasses *Posidonia oceanica* (L.) Delile, *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers., and *Zostera noltii* Hornem. *Aquatic Botany*, 40(4), 343–362.
- Burnell, O. W., Connell, S. D., Irving, A. D., Watling, J. R., & Russell, B. D. (2014). Contemporary reliance on bicarbonate acquisition predicts increased growth of seagrass *Amphibolis antarctica* in a high-CO₂ world. *Conservation Physiology*, 2(1), 1–11.
- Cancemi, G., Buia, M. C., & Mazzella, L. (2002). Structure and growth dynamics of *Cymodocea nodosa* meadows. *Scientia Marina*, 66(4), 365–373.
- Caye, G., & Meinesz, A. (1985). Observations on the vegetative development, flowering and seeding of *Cymodocea nodosa* (Ucria) ascherson on the Mediterranean coasts of France. *Aquatic Botany*, 22(3–4), 277–289.
- Chandna, R., Azooz, M., & Ahmad, P. (2013). *Recent Advances of Metabolomics to Reveal Plant Response During Salt Stress. Salt stress in plants*.

- Costa, V., Angelini, C., De Feis, I., & Ciccodicola, A. (2010). Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Cox, p. A., & Humphries, C. J. (1993). Hydrophilous pollination and breeding system evolution in seagrasses: a phylogenetic approach to the evolutionary ecology of the Cymodoceaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 113(3), 217–226.
- Cunha, A. H., & Duarte, C. M. (2007). Biomass and leaf dynamics of *Cymodocea nodosa* in the Ria Formosa lagoon, South Portugal. *Botanica Marina*, 50(1), 1–7.
- Durbin, R., Eddy, S., Krogh, A., & Mitchison, G. (1998). Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids. *Analysis*, 356.
- D'Esposito, D., Orrù, L., Dattolo, E., Bernardo, L., Lamontara, A., Orsini, L., Procaccini, G. (2016). Transcriptome characterisation and simple sequence repeat marker discovery in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Scientific Data*, 3, 1–9.
- Enríquez, S., & Rodríguez-Román, A. (2006). Effect of water flow on the photosynthesis of three marine macrophytes from a fringing-reef lagoon. *Marine Ecology Progress Series*, 323(October 2006), 119–132.
- Fanna, K., Yang, Z., Peipei, S. U. N., Limin, L. I. U., & Yunxiang, M. a O. (2013). Generation and analysis of expressed sequence tags from the salt-tolerant eelgrass species, *Zostera marina*, 32(8), 68–78.
- Foyer, C. H., Bloom, A. J., Queval, G., & Noctor, G. (2009). Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 455–484.
- Fraire-Velazquez, S., Emmanuel, V., Fraire-velázquez, S., & Balderas-hernández, V. E. (2013). Abiotic Stress in Plants and Metabolic Responses. *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*, 25–48.
- Franssen, S. U., Gu, J., Bergmann, N., Winters, G., Klostermeier, U. C., Rosenstiel, P., Reusch, T. B. H. (2011). Transcriptomic resilience to global warming in the seagrass *Zostera marina*, a marine foundation species. *Proceedings of the ...*, 108(48), 19276–19281.

- Franssen, S. U., Gu, J., Winters, G., Huylmans, A.-K., Wienpahl, I., Sparwel, M., Bornberg-Bauer, E. (2014). Genome-wide transcriptomic responses of the seagrasses *Zostera marina* and *Nanozostera noltii* under a simulated heatwave confirm functional types. *Marine Genomics*, *15*, 65–73.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, *28*(23), 3150–3152.
- Garber, M., Grabherr, M. G., Guttman, M., & Trapnell, C. (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature Methods*, *8*(6), 469–477.
- Garrido, M., Lafabrie, C., Torre, F., Fernandez, C., & Pasqualini, V. (2013). Resilience and stability of *Cymodocea nodosa* seagrass meadows over the last four decades in a Mediterranean lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *130*, 89–98.
- Golicz, A. A., Schliep, M., Lee, H. T., Larkum, A. W. D., Dolferus, R., Batley, J., Edwards, D. (2015). Genome-wide survey of the seagrass *Zostera muelleri* suggests modification of the ethylene signalling network. *Journal of Experimental Botany*, *66*(5), 1489–1498.
- Golicz, A. A., Schliep, M., Lee, H. T., Larkum, A. W. D., Dolferus, R., Batley, J., Edwards, D. (2015). Genome-wide survey of the seagrass *Zostera muelleri* suggests modification of the ethylene signalling network. *Journal of Experimental Botany*, *66*(5), 1489–1498.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, *29*(7), 644–652.
- Grace, J. B. (1993). The adaptive significance of clonal reproduction in angiosperms: an aquatic perspective. *Aquatic Botany*, *44*(2–3), 159–180.
- Green, E. P., & Short, F. (2004). *World Atlas of Seagrasses*. *Botanica Marina* (B. 47).
- Greco, M., Chiappetta, A., Bruno, L., & Bitonti, M. B. (2013). Effects of light deficiency on genome methylation in *Posidonia oceanica*. *Marine Ecology Progress Series*, *473*, 103–114.

- Guidetti, P., Lorenti, M., Buia, M. C., & Mazzella, L. (2002). Temporal dynamics and biomass partitioning in three Adriatic seagrass species: *Posidonia oceanica*, *Cymodocea nodosa*, *Zostera marina*. *Marine Ecology*, 23(1), 51–67.
- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J., & Hinch, D. K. (2008). Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 132(2), 220–235.
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494–1512.
- Hogarth, P. (2013). The biology of mangroves and seagrasses. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Hony, D., & Twell, D. (2003). Comparative Analysis of the Arabidopsis Pollen Transcriptome *Society*, 132(2), 640–652.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44–57.
- Hughes, A. R., Bando, K. J., Rodriguez, L. F., & Williams, S. L. (2004). Relative effects of grazers and nutrients on seagrasses: A meta-analysis approach. *Marine Ecology Progress Series*, 282(July 2016), 87–99.
- Hughes, A. R., & Stachowicz, J. J. (2004). Genetic diversity enhances the resistance of a seagrasses ecosystem to disturbance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(24), 8998–9002.
- Imadi, S. R., Kazi, A. G., Ahanger, M. A., Gucel, S., & Ahmad, P. (2015). Plant transcriptomics and responses to environmental stress: an overview. *Journal of Genetics*, 94(3), 525–537.
- Invers, O., Pérez, M., & Romero, J. (1999). Bicarbonate utilization in seagrass photosynthesis: Role of carbonic anhydrase in *Posidonia oceanica* (L.) Delile and *Cymodocea nodosa* (Ucria) ascherson. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 235(1), 125–133.

- Jahnke, M., Christensen, A., Micu, D., Milchakova, N., Sezgin, M., Todorova, V., Procaccini, G. (2016). Patterns and mechanisms of dispersal in a keystone seagrass species. *Marine Environmental Research*, *117*, 54–62.
- Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., Yamanishi, Y. (2008). KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Research*, *36*(SUPPL. 1), 480–484.
- Karol, K. G., McCourt, R. M., Cimino, M. T., & Delwiche, C. F. (2001). The closest living relatives of land plants. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5550), 2351–2353.
- Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Falaleeva, M., & Stamm, S. (2013). Function of alternative splicing. *Gene*, *514*(1), 1–30.
- Kenrick, P., & Crane, P. R. (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, *389*(4), 33–39.
- Khalafallah, A. A., Geneid, Y. A., Shaetaey, S. A., & Shaaban, B. (2013). Responses of the seagrass *Halodule uninervis* (Forssk.) Aschers. to hypersaline conditions. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, *39*(3), 167–176.
- Kilminster, K., Forbes, V., & Holmer, M. (2014). Development of a ‘sediment-stress’ functional-level indicator for the seagrass *Halophila ovalis*. *Ecological Indicators*, *36*, 280–289.
- Kim, D. J., & Smith, S. M. (1994). Molecular cloning of cucumber phosphoenol pyruvate carboxykinase and developmental regulation of gene expression. *Plant Mol Biol*, *26*(1), 423–434.
- Koce, J. D., Vilhar, B., Bohanec, B., & Dermastia, M. (2003). Genome size of Adriatic seagrasses. *Aquatic Botany*, *77*(1), 17–25.
- Koch, M. S., Schopmeyer, S. A., Kyhn-Hansen, C., Madden, C. J., & Peters, J. S. (2007). Tropical seagrass species tolerance to hypersalinity stress. *Aquatic Botany*, *86*(1), 14–24.
- Koch, M. S., Schopmeyer, S. A., Nielsen, O. I., Kyhn-Hansen, C., & Madden, C. J. (2007). Conceptual model of seagrass die-off in Florida Bay: Links to

- biogeochemical processes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350(1–2), 73–88.
- Kong, F., Li, H., Sun, P., Zhou, Y., & Mao, Y. (2014). De novo assembly and characterization of the transcriptome of seagrass *Zostera marina* using illumina paired-end sequencing. *PLoS ONE*, 9(11), 1–19.
- Kong, F., Li, H., Sun, P., Zhou, Y., & Mao, Y. (2014). De novo assembly and characterization of the transcriptome of seagrass *Zostera marina* using illumina paired-end sequencing. *PLoS ONE*, 9(11), 1–19.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T., & Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74(8), 1301–1322.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., & Scharf, K. D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 310–316.
- Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1593–1608.
- Kumar, A., Gupta, N., Bahadur, B., Venkat, M., Leela, R., Ii, V., & Genomics, P. (2015). *Plant Biology and Biotechnology* (B. II).
- Kuo, J., & den Hartog, C. (2001). Chapter 2 - Seagrass taxonomy and identification key. *Global Seagrass Research Methods*, (1998), 31–58.
- Larkum, A. W. D., Orth, R. J., & Duarte, C. M. (2006). *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*.
- Les, D. H., Garvin, D. K., & Wimpee, C. F. (1991). Molecular evolutionary history of ancient aquatic angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(November), 10119–10123.
- Lewis, L. A., & McCourt, R. M. (2004). Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany*, 91(10), 1535–1556.

- Lockhart, D. J., & Winzeler, E. A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature-London*, 405(June), 827–836.
- Malandrakis, E., Dadali, O., Kavouras, M., Danis, T., Panagiotaki, P., Miliou, H., Exadactylos, A. (2017). Identification of the abiotic stress-related transcription in little Neptune grass *Cymodocea nodosa* with RNA-seq. *Marine Genomics*, 34, 47–56.
- Malea, P., & Zikidou, C. (2011). Temporal variation in biomass partitioning of the seagrass *Cymodocea nodosa* at the Gulf of Thessaloniki, Greece. *Journal of Biological Research*, 15, 75–90.
- Marba, N., & Duarte, C. M. (1994). Growth-Response of the Seagrass *Cymodocea nodosa* to Experimental Burial and Erosion, 107(3), 307–311.
- Marbà, N., & Duarte, C. M. (1995). Coupling of Seagrass (*Cymodocea Nodosa*) Patch Dynamics to Subaqueous dune Migration. *Journal of Ecology*, 83(3), 381–389.
- Mazucca, S., Björk, M., Beer, S., Felisberto, P., Gobert, S., Procaccini, G., Santos, R. (2013). Establishing Research Strategies, Methodologies and Technologies to Link Genomics and Proteomics to Seagrass Productivity, Community Metabolism, and Ecosystem Carbon Fluxes. *Frontiers in Plant Science*, 4(March), 1–20.
- McMahon, K., van Dijk, K. -j., Ruiz-Montoya, L., Kendrick, G. A., Krauss, S. L., Waycott, M., Duarte, C. (2014). The movement ecology of seagrasses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1795), 20140878–20140878.
- Mercado, J. M., Niell, F. X., Silva, J., & Santos, R. (2003). Use of light and inorganic carbon acquisition by two morphotypes of *Zostera noltii* Hornem. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 297(1), 71–84.
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1), 15–19.
- Moore. (1976). © 1976 Nature Publishing Group. *Nature*, 260, 643–645.
- Muscolo, A., Sidari, M., Mallamaci, C., & Attinà, E. (2007). Changes in germination and glyoxylate and respiratory enzymes of *Pinus pinea* seeds under various abiotic stresses. *Journal of Plant Interactions*, 2(4), 273–279.

- Natij, L., Khalil, K., Loudiki, M., & Elkalay, K. (2014). A first attempt at seagrass repartitioning in the Moroccan coasts, *10*(2), 401–408.
- Oetjen, K., & Reusch, T. B. H. (2007). Genome scans detect consistent divergent selection among subtidal vs. intertidal populations of the marine angiosperm *Zostera marina*. *Molecular Ecology*, *16*(24), 5156–5167.
- Olesen, B., Enríquez, S., Duarte, C. M., & Sand-Jensen, K. (2002). Depth-acclimation of photosynthesis, morphology and demography of *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* in the Spanish Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, *236*, 89–97.
- Olsen, J. L., Rouzé, P., Verhelst, B., Lin, Y., Bayer, T., Collen, J., ... Van de Peer, Y. (2016). The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea. *Nature*, *530*(7590), 331–335.
- Ono, H., Ishii, K., Kozaki, T., Ogiwara, I., Kanekatsu, M., & Yamada, T. (2015). Removal of redundant contigs from de novo RNA-Seq assemblies via homology search improves accurate detection of differentially expressed genes. *BMC Genomics*, *16*(1), 1–13.
- Orth, R. J., Carruthers, T. J. B., Dennison, W. C., Duarte, C. M., Fourqurean, J. W., Heck, K. L., Williams, S. L. (2006). A Global Crisis for Seagrass Ecosystems. *Bioscience*, *56*(12), 987–996.
- Papenbrock, J. (2012). Highlights in Seagrasses' Phylogeny, Physiology, and Metabolism: What Makes Them Special? *ISRN Botany*, *2012*, 1–15.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(6), 4056–4075.
- Phillips, R. C., & Milchakova, N. A. (2003). Seagrass Ecosystems. *Морський Екологічний Журнал*, 29–39.
- Piro, A., Marín-Guirao, L., Serra, I. A., Spadafora, A., Sandoval-Gil, J. M., Bernardeau-Esteller, J., Mazzuca, S. (2015). The modulation of leaf metabolism plays a role in

- salt tolerance of *Cymodocea nodosa* exposed to hypersaline stress in mesocosms. *Frontiers in plant science*, 6(June), 464.
- Polifrone, M., & Rosell-Fieschi, M. (2014). Degradation of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson meadow at Las Canteras Beach (Gran Canaria, Canary Islands, Atlantic Ocean). *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(4), 270–273.
- Press, N. A. (2006). The National Academies Keck Futures Initiative The Genomic Revolution -- Implications for Treatment and Control of Infectious Disease: Working Group Summaries The National Academies Keck Futures Initiative.
- Procaccini, G., Beer, S., Björk, M., Olsen, J., Mazzuca, S., & Santos, R. (2012). Seagrass ecophysiology meets ecological genomics: Are we ready? *Marine Ecology*, 33(4), 522–527.
- Procaccini, G., Olsen, J. L., & Reusch, T. B. H. (2007). Contribution of genetics and genomics to seagrass biology and conservation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350(1–2), 234–259.
- Ralph, P. J., Durako, M. J., Enríquez, S., Collier, C. J., & Doblin, M. A. (2007). Impact of light limitation on seagrasses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350(1–2), 176–193.
- Rasheed, M. A. (2004). Recovery and succession in a multi-species tropical seagrass meadow following experimental disturbance: The role of sexual and asexual reproduction. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 310(1), 13–45.
- Reddy, J. K., & Hashimoto, T. (2001). Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*, 21, 193–230.
- Republic, C. (2005). Clustering of Activity Patterns, 52, 37–52.
- Reusch, T. B. H., Ehlers, A., Hammerli, A., & Worm, B. (2005). Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 2826–2831.

- Ruggiero, M. V., Reusch, T. B. H., & Procaccini, G. (2005). Local genetic structure in a clonal dioecious angiosperm. *Molecular Ecology*, *14*(4), 957–967.
- Serra, I. A., & Mazzuca, S. (2011). *Posidonia oceanica: From ecological status to genetic and proteomic resources. Seagrass: Ecology, Uses and Threats.*
- Serra, I. A., Nicastro, S., Mazzuca, S., Natali, L., Cavallini, A., & Innocenti, A. M. (2013). Response to salt stress in seagrasses: PIP1;1 aquaporin antibody localization in *Posidonia oceanica* leaves. *Aquatic Botany*, *104*, 213–219.
- Sghaier, Y. R., Zakhama-Sraieb, R., & Charfi-Cheikhrouha, F. (2012). Seasonal Variation of *Cymodocea Nodosa* in the Ghar El Melh Lagoon (Tunisia), With Reference To Insolation, Temperature and Salinity Effects. *Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer*, *39*, 117–125.
- Shafer, D. J., Kaldy, J. E., Sherman, T. D., & Marko, K. M. (2011). Effects of salinity on photosynthesis and respiration of the seagrass *Zostera japonica*: A comparison of two established populations in North America. *Aquatic Botany*, *95*(3), 214–220.
- Shendure, J., Mitra, R. D., Varma, C., & Church, G. M. (2004). Advanced sequencing technologies: Methods and goals. *Nature Reviews Genetics*, *5*(5), 335–344.
- Short, F., Carruthers, T., Dennison, W., & Waycott, M. (2007). Global seagrass distribution and diversity: A bioregional model. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *350*(1–2), 3–20.
- Sidari, M., Mallamaci, C., & Muscolo, A. (2008). Drought, salinity and heat differently affect seed germination of *Pinus pinea*. *Journal of Forest Research*, *13*(5), 326–330.
- Street, I. H., & Schaller, G. E. (2016). Ethylene: a gaseous signal in plants and bacteria. *The Biochemist*, *38*(5), 4–7.
- Szeto, L. K., Liew, A. W.-C., Yan, H., & Tang, S. (2003). Gene expression data clustering and visualization based on a binary hierarchical clustering framework. *Journal of Visual Languages & Computing*, *14*(4), 341–362.

- Terrados, J. (1993). Sexual reproduction and seed banks of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson meadows on the southeast Mediterranean coast of Spain. *Aquatic Botany*, 46(3–4), 293–299.
- Terrados, J., Duarte, C. M., Kamp-Nielsen, L., Agawin, N. S. R., Gacia, E., Lacap, D., Greve, T. (1999). Are seagrasses growth and survival constrained by the reducing conditions of the sediment? *Aquatic Botany*, 65(1–4), 175–197.
- Terrados, J., & Ros, J. D. (1992). Growth and primary production of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson in a Mediterranean coastal lagoon: the Mar Menor (SE Spain). *Aquatic Botany*, 43(1), 63–74.
- Timme, R. E., & Delwiche, C. F. (2010). Uncovering the evolutionary origin of plant molecular processes: comparison of Coleochaete (Coleochaetales) and Spirogyra (Zygnematales) transcriptomes. *BMC Plant Biol*, 10, 96.
- Timperio, A. M., Egidi, M. G., & Zolla, L. (2008). Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, 71(4), 391–411.
- Touchette, B. W., & Burkholder, J. M. (2000). Overview of the physiological ecology of carbon metabolism in seagrasses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 250(1–2), 169–205.
- Tsirika, A., & Haritonidis, S. (2005). A survey of the benthic flora in the National Marine Park of Zakynthos (Greece). *Botanica Marina*, 48(1), 38–45.
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., & Shinozaki, K. (2010). Omics analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(2), 132–138.
- Van der Heide, T., Govers, L. L., De Fouw, J., Olf, H., Van der Geest, M., Van Katwijk, M. M., Van Gils, J. a. (2012). Seagrasses Partner With Clams to Stay Healthy Microbial Survey of Human Body Reveals Extensive Variation. *Science*, 336, 1432–1434.
- Voesenek, L. A. C. J., Pierik, R., & Sasidharan, R. (2015). Plant Life without Ethylene. *Trends in Plant Science*, 20(12), 783–786.

- Wang, W., Haberer, G., Gundlach, H., Gläßer, C., Nussbaumer, T., Luo, M. C., Messing, J. (2014). The *Spirodela polyrhiza* genome reveals insights into its neotenus reduction fast growth and aquatic lifestyle. *Nature Communications*, 5, 1–13.
- Ward, J. A., Ponnala, L., & Weber, C. A. (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *American Journal of Botany*, 99(2), 267–276.
- Williams, S. L. (2016). From sea to sea. *Nature*, 1–2.
- Wingler, A., & Roitsch, T. (2008). Metabolic regulation of leaf senescence: Interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology*, 10 (SUPPL. 1), 50–62.
- Winters, G., Nelle, P., Fricke, B., Rauch, G., & Reusch, T. B. H. (2011). Effects of a simulated heat wave on photophysiology and gene expression of high- and low-latitude populations of *Zostera marina*. *Marine Ecology Progress Series*, 435, 83–95.
- Wissler, L., Codoñer, F. M., Gu, J., Reusch, T. B. H., Olsen, J. L., Procaccini, G., & Bornberg-Bauer, E. (2011). Back to the sea twice: identifying candidate plant genes for molecular evolution to marine life. *BMC evolutionary biology*, 11(1), 8.
- Wolf, J. B. W. (2013). Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: An RNA-seq tutorial. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 559–572.
- Yang, Y., & Smith, S. A. (2013). Optimizing de novo assembly of short-read RNA-seq data for phylogenomics. *BMC Genomics*, 14(1), 1.
- Young, M. D., Wakefield, M. J., & Smyth, G. K. (2010). goseq: Gene Ontology testing for RNA-seq datasets Reading data. *Gene*, 1–21.
- Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., & Oshlack, A. (2010). Genome Biology | Full text | Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias.

- Yue, J., Hu, X., Sun, H., Yang, Y., & Huang, J. (2012). Widespread impact of horizontal gene transfer on plant colonization of land. *Nature Communications*, 3, 1152–1159.
- Zhang, J. Z., Laudencia-Chingcuanco, D. L., Comai, L., Li, M., & Harada, J. J. (1994). Isocitrate lyase and malate synthase genes from *Brassica napus* L. are active in pollen. *Plant physiology*, 104(3), 857–864.
- Zhou, H., Cheng, F. Y., Wang, R., Zhong, Y., & He, C. (2013). Transcriptome comparison reveals key candidate genes responsible for the unusual reblooming trait in tree peonies. *PLoS ONE*, 8 (11).

5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αμουτζοπούλου-Σχοινά Ε. (2007) Οι λειμώνες των θαλάσσιων φανερόγαμων στον Παγασητικό κόλπο. Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σελ. 322