

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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Πληθυσμιακή γενετική ανάλυση του είδους *Holothuria tubulosa* στο
Αιγαίο πέλαγος»**

Κωνσταντινίδης Ιωάννης

ΒΟΛΟΣ 2012

«Πληθυσμιακή γενετική ανάλυση του είδους *Holothuria tubulosa* στο Αιγαίο πέλαγος»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1) Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής - Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών. Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπων,***

2) Δημήτριος Βαφείδης, Αναπληρωτής Καθηγητής - Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση - έμμεση χρηστικότητα τους. Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος,***

3) Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια - Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος.***

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, Επίκουρο Καθηγητή κ. Αθανάσιο 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 τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, τον κ. Δημήτριο Βαφειδή, Αναπληρωτή Καθηγητή, ο οποίος αφιέρωσε προσωπικό χρόνο και έκανε προσπάθειες για τη συλλογή δειγμάτων τα οποία χωρίς τη δική του συνεισφορά θα ήταν πολύ δύσκολο να βρεθούν και να μελετηθούν, και την κα. Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Μανόλη Μαλανδράκη που με στήριξε εντός και εκτός εργαστηρίου, συνετέλεσε στην διεκπεραίωση αυτής της εργασίας και με έβγαλε από πολλά αδιέξοδα όπως επίσης την Λέκτορα κ. Έλενα Γκολομάζου, και τον Γιώργο Γκάφα που μου έδωσαν εναλλακτικές λύσεις και με στήριξαν σε προβλήματα που προέκυψαν στο εργαστήριο.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ολοθούρια αποτελούν σημαντικό κρίκο της θαλάσσιας βενθικής πανίδας γι' αυτό και τα βιολογικά και λειτουργικά τους χαρακτηριστικά έχουν αποτελέσει κέντρο έρευνας. Παρόλα αυτά οι γενετικές προσεγγίσεις των οργανισμών αυτών είναι ελάχιστες. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο γενετικός πολυμορφισμός του ολοθουρίου *Holothuria tubulosa* με 206 δείγματα που συλλέχθηκαν από 6 διαφορετικές περιοχές του Αιγαίου Πελάγους. Ο γενετικός πολυμορφισμός μεταξύ των δειγμάτων προσδιορίστηκε με την μέθοδο της τυχαίας ενίσχυσης πολυμορφικού DNA (RAPD). Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν 35 τυχαίοι δεκαμερές εκκινητές (primers) και ο κύριος σκοπός ήταν να επιλεγθούν αυτοί που θα έδιναν τον μεγαλύτερο πολυμορφισμό έτσι ώστε να μελετηθεί ο βαθμός διαφοροποίησης του είδους από περιοχή σε περιοχή. Εξαιτίας ορισμένων δυσχερειών όπως για παράδειγμα με τη φύση του δείγματος, τη συντήρηση αλλά και την ποιότητα των εκκινητών το πείραμα στράφηκε στην αναζήτηση του καλύτερου συνδυασμού δειγματοληψίας και υλικών που θα έδιναν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Μετά από περίπου 6 μήνες εργαστηριακών δοκιμών έγινε σαφές πως το δέρμα των ολοθουρίων περιέχει ουσίες (όπως θραύσματα ασβεστίου) που δρουν παρεμποδιστικά κατά τη διάρκεια της εξαγωγής του DNA αλλά και κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Αποδείχθηκε πως η καλύτερη ποιότητα DNA εξήχθη από τις γονάδες και τα πλοκάμια του οργανισμού όπως επίσης το διάλυμα DMSO στους (-24°C) και το υγρό άζωτο είναι τα μοναδικά μέσα συντήρησης ιστών τέτοιου είδους. Παρά τον επαρκή αριθμό δειγμάτων, αποδείχθηκε πως κανένα δεν ήταν κατάλληλο για την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας.

Λέξεις κλειδιά: Ολοθούρια, τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, εκκινητές.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Γενικά.....	8
1.2 Συστηματική ταξινόμηση.....	10
1.3 Γεωγραφική εξάπλωση.....	10
1.4 Μορφολογία.....	11
1.5 Πληθυσμιακά Χαρακτηριστικά	12
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
2.1 Ανίχνευση ποιότητας και ποσότητας DNA	18
2.1.1 Ηλεκτροφόρηση.....	18
2.1.2. <i>NanoDrop Spectrophotometer</i>	20
2.2 Επιλογή RAPD εκκινητών	22
2.3 Πρωτόκολλα PCR.....	24
2.4 Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων PCR	26
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	28
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42
5.1 Ξένη Βιβλιογραφία.....	42
5.2 Ελληνική Βιβλιογραφία.....	47
6. ABSTRACT	48

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Για πολλά χρόνια οι επιστήμονες πίστευαν πως οι θαλάσσιοι πόροι ήταν ανεξάντλητοι λόγω του μεγάλου βάθους και της τεράστιας έκτασης της θάλασσας. Με την πάροδο του χρόνου η εντύπωση αυτή αποδείχθηκε λανθασμένη, καθώς πλέον υπάρχουν τόσο μαθηματικές όσο και πρακτικές αποδείξεις πως τα θαλάσσια αποθέματα συνεχώς μειώνονται.

Η αειφορική διαχείριση κάθε υδρόβιου περιβάλλοντος καθίσταται μοναδική λύση για να είναι εφικτή η άντληση των φυσικών πόρων στο μέλλον. Για να επιτευχθεί μία τέτοιου είδους διαχείριση, θα πρέπει πρώτα να γνωρίζουμε όλα τα χαρακτηριστικά, τις συνήθειες, τις στρατηγικές και τις ηθικές των οργανισμών που διαβιούν σε κάθε θαλάσσιο ενδιαίτημα.

Η ραγδαία άνοδος της γενετικής τα τελευταία χρόνια έχει δώσει την δυνατότητα στον άνθρωπο να μελετήσει κάθε οργανισμό και να προσδώσει τις συμπεριφορές του στις ανάλογες γενετικές δομές που τον απαρτίζουν. Μια από τις ενδιαφέρουσες αναλύσεις είναι και αυτή της πληθυσμιακής δομής των ειδών χάριν στην οποία μπορούν να προκύψουν διαφορές ανάμεσα σε άτομα του ίδιου είδους που διαβιούν είτε σε ίδιες είτε σε διαφορετικές περιοχές.

Οι γενετικές σχέσεις και τα γεωγραφικά φράγματα είναι δύο αντικρουόμενοι μηχανισμοί που καθορίζουν την πληθυσμιακή δομή των ειδών. Η πρώτη κρατάει ομογενοποιημένο το γενετικό υπόβαθρο ενός πληθυσμού ενώ η δεύτερη επιτρέπει την διαφοροποίησή του. Γι' αυτό το λόγο η παρατήρηση και κατανόηση της γονιδιακής ροής των οργανισμών δίνει τη δυνατότητα καλύτερης προσέγγισης του τρόπου διαχείρισης αυτών των πληθυσμών (Shunter et al. 2011).

Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) η μελέτη της πληθυσμιακής γενετικής έχει απλουστεύσει σε πολύ μεγάλο βαθμό την διαδικασία εύρεσης διαφοροποιήσεων. Οι διαφοροποιήσεις αυτές, είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων όπως αυτή της αλλαγής των συνθηκών διαβίωσης ή της μετανάστευσης ενός πληθυσμού.

Έτσι λοιπόν, μέσα από τις γενετικές αναλύσεις και τους γενετικούς δείκτες που επιλέγονται είναι εύκολο να υπολογιστεί η γενετική ποικιλότητα κάθε είδους και πληθυσμού. Στην συγκεκριμένη περίπτωση προκύπτει ένα βασικό ερώτημα. Ο χαμηλός πολυμορφισμός οφείλεται σε χαμηλή γενετική ποικιλότητα ή είναι πιθανό να οφείλεται στην δοκιμή περιορισμένου αριθμού ή ακατάλληλων γενετικών δεικτών; Σύμφωνα με τους Arnaud et al. (2005), η χρήση κατάλληλων γενετικών δεικτών αποτελεί ισχυρό κριτήριο για την αξιολόγηση των πολυμορφισμών ενός είδους.

Η ανάπτυξη νέων τεχνικών την τελευταία δεκαετία, παρείχε νέα εργαλεία για την εξέταση της γενετικής ποικιλότητας τόσο πληθυσμιακά όσο και ενδοπληθυσμιακά (Avisé 1989, Avisé 1994, Parker et al. 1998, Sunnucks 2000). Παρόλα αυτά κάθε νέα τεχνική έφερνε επιπρόσθετα εμπόδια και κατέρριπτε σημαντικά αποτελέσματα (Parker et al. 1998). Η χρήση καταλληλότερων γενετικών δεικτών απέδιδε εντονότερους πολυμορφισμούς, ενώ όταν τα επίπεδα της ποικιλομορφίας ενός οργανισμού ήταν χαμηλά, οι γενετικοί δείκτες είχαν χαμηλή ικανότητα να προσεγγίσουν τις πληθυσμιακές παραμέτρους (Beaumont and Pether 1996; Charlesworth 1998, Lemaire et al. 2000, Parker et al. 1998, Pogson et al. 1995).

Σκοπός της παρούσας προπτυχιακής διατριβής είναι η εξέταση γενετικού πολυμορφισμού σε άτομα ολοθουρίων του είδους *Holothuria tubulosa* Gmellin, 1788 (Echinodermata: Holothuridea) από έξι διαφορετικές περιοχές του Αιγαίου Πελάγους. Η εκτίμηση του επιπέδου της διαφοροποίησης, ευελπιστώ να δώσει ικανά

αποτελέσματα έτσι ώστε σε συνδυασμό με άλλες εργασίες να δημιουργηθεί μία ολοκληρωμένη εικόνα για την συμπεριφορά του είδους αυτού.

1.2 Συστηματική ταξινόμηση

Πίνακας 1.2.1. Συστηματική ταξινόμηση του είδους *Holothuria tubulosa*.

Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Echinodermata (Bruguiere, 1791)
Κλάση	Holothuroidea (de Blainville, 1834)
Υποκλάση	Aspidochirotea (Grube, 1840)
Τάξη	Aspidochirotida (Grube, 1840)
Οικογένειες	Holothuridae (Ludwig, 1894)
Γένος	<i>Holothuria</i> (Linnaeus, 1767)
Είδος	<i>H. tubulosa</i> (Gmelin, 1788)

1.3 Γεωγραφική εξάπλωση

Η γεωγραφική εξάπλωση των ολοθουρίων καλύπτει μεγάλη έκταση στις παγκόσμιες θάλασσες. Πιο συγκεκριμένα η παρουσία τους αναφέρεται κοντά σε λειμώνες φανερογάμων των εύκρατων περιοχών (Gustato et al. 1982, Sewell & Bergquist 1990, Bulteel et al. 1992, Sewell 1992), σε κοραλλιογενείς σχηματισμούς τροπικών περιοχών (Bakus 1973, Uthicke 1997), αλλά και σε πολικές περιοχές (Paul & Menziew 1974, Gutt & Piepenburg 1991).

Το υπό μελέτη είδος (*H. tubulosa*) συναντάται κυρίως στη Μεσόγειο θάλασσα και στο ανατολικό τμήμα του Ατλαντικού ωκεανού, από το Γιβραλτάρ έως το Βσικαϊκό κόλπο (Tortonese 1965, Mezali et al. 2003, Valls 2004, Despalatovic et al. 2004, Ocana & Sanchez 2005, Tanti & Schembri 2006, Warnau et al. 2006).

Στην Εικόνα 1.3.1 φαίνονται αναλυτικά οι περιοχές της Μεσογείου όπου η ύπαρξη του είδους έχει επισημανθεί.



Εικόνα 1.3.1. Γεωγραφική εξάπλωση του είδους *Holothuria tubulosa* στις ακτές της Μεσογείου και του ανατολικού Ατλαντικού ωκεανού (πηγή: Google earth).

1.4 Μορφολογία

Η εξωτερική μορφολογία των ολοθουρίων χαρακτηρίζεται από μαλακό και γλοιώδες σώμα, σκωληκοειδούς μορφής. Στην μία άκρη εντοπίζεται το στόμα και στην άλλη ο απεκκριτικός πόρος (έδρα). Έχουν πεντακτινωτή συμμετρία και σε κάθε μία από τις πέντε σειρές παρατηρούνται ποδίσκοι βάδισης με τους οποίους γίνεται εφικτή η προσκόλλησή τους επάνω σε επιφάνειες. Το υδροφορικό σύστημα αποτελείται από ένα σύνολο κλειστών σωλήνων που βρίσκονται στο εσωτερικό του σώματος και συγκοινωνούν με το θαλασσίνο νερό μέσα από τη μαδρεπορική πλάκα (Λαζαρίδου 1984, Καζανίδης 2010). Επίσης ένας κυκλικός σωλήνας περιβάλλει το πρόσθιο τμήμα του πεπτικού συστήματος από τον οποίο εκφύονται πέντε ακτινωτοί σωλήνες (με μορφή πλοκαμιών) από τους οποίους προκύπτουν περιστοματικές

κεραίες (Brusca & Brusca 2003). Το πεπτικό σύστημα του *H. tubulosa* χωρίζεται σε 3 τμήματα. Στο πρώτο τμήμα, το οποίο ξεκινάει από το στόμα και καταλήγει στο σφιγκτήρα, συγκεντρώνεται το ίζημα. Στο δεύτερο γίνεται η πέψη των θρεπτικών του ιζήματος και καταλαμβάνει ένα μεγάλο κομμάτι του εντέρου ενώ το τρίτο τμήμα αποτελείται από το κατερχόμενο μέρος του εντέρου και αποκαλείται ως ζώνη αποβολής (Massin & Jangoux 1976, Mezzali et al. 2003).

1.5 Πληθυσμιακά Χαρακτηριστικά

Τα στοιχεία σχετικά με τα πληθυσμιακά χαρακτηριστικά του *H. tubulosa* αφορούν κυρίως την πληθυσμιακή κατανομή (πυκνότητα), τη σωματική αύξηση καθώς και την επίδραση που ασκούν σε αυτές τις παραμέτρους ο τύπος του υποστρώματος και οι υδρογραφικές συνθήκες (Καζανίδης 2010).

Στα αργιλώδη υποστρώματα παρουσιάζεται μεγαλύτερη πυκνότητα ατόμων του είδους αυτού σε σχέση με τα ιλυώδη και τα αμμοϊλυώδη υποστρώματα (Simunovic et al. 2000). Οι λειμώνες της *P. oceanica* φαίνεται να αποτελούν ιδανικό τόπο διαβίωσης καθώς εκεί παρατηρούνται οι μεγαλύτεροι και πυκνότεροι πληθυσμοί (Gustato et al. 1982, Coulon & Jangoux 1993, Simunovic & Grubelie 1998). Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας όπως αναφέρθηκε προηγουμένως είναι και οι υδρογραφικές συνθήκες που διαμορφώνονται με το βάθος και τον κυματισμό. Η ανάδευση της υδάτινης στήλης μπορεί να προσδώσει θρεπτικότερα υποστρώματα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα δείγματα των ολοθουρίων του είδους *Holothuria tubulosa* συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας το 2009, 2011 και 2012. Οι πρώτες 5 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν το 2009 έλαβαν χώρα:

1. Στη νήσο Αρκοί,
2. Στη Μάραθο (σύμπλεγμα των Αρκών νήσων)
3. Στις Αλυκές Βόλου,
4. Στην Κάτω Γατζέα Βόλου και
5. Στην Ηρακλείτσα Καβάλας.

Οι δειγματοληψίες κατά το 2011 ήταν μηνιαίες, καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου και έγιναν στον Άγιο Στέφανο Βόλου στα πλαίσια μεταπτυχιακής διατριβής του Πανεπιστημίου Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος που μελετούσε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τη διαφοροποίηση των γονάδων του είδους *Holothuria tubulosa* κατά τη διάρκεια του χρόνου. Η τελευταία δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε τον Ιούλιο του 2012 για να γίνει σύγκριση φρέσκου δείγματος με τα υπόλοιπα που ήταν αποθηκευμένα σε διάλυμα DMSO στους -24°C (δειγματοληψία 2009) και σε διάλυμα αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου 25°C (δειγματοληψία 2011).

Πίνακας 2.1. Αναλυτικά τα στοιχεία των δειγματοληψιών

Χρονιά	Περιοχή Δειγματοληψίας	Αριθμός Δειγμάτων	Θερμοκρασία Αποθήκευσης	Μέσο Αποθήκευσης	Απομονωμένος Ιστός
2009	Αρκοί (Π)	22	-24°C	DMSO	Δέρμα
	Μάραθος (Μ)	10			
	Αλυκές (Α)	10			
	Κάτω Γατζέα (Γ)	24			
	Ηρακλείτσα (Κ)	17			
2011	Άγιος Στέφανος	120	25°C	Αιθανόλη 70%	Γονάδες
2012	Άγιος Στέφανος	3	-	-	Γονάδες
			-	-	Δέρμα
			-	-	Πλοκάμια

Τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των ιστών από τα ολοθούρια (*Holothuria tubulosa*) ήταν:

- Ψαλίδι
- Νυστέρια
- Λαβίδα
- Falcon tubes (15ml)
- Eppendorf tubes (1,5ml)
- Ζυγός ακριβείας



Οι αρχικές δοκιμές απομόνωσης DNA έγιναν στα δείγματα του 2009 τα οποία στο σύνολό τους ήταν 83. Η απομόνωση του γενωμικού DNA έγινε ακολουθώντας τροποποιημένη μέθοδο (Exadactylos, 1997) της κλασικής φαινόλης/χλωροφορμίου (Miler et al., 1988). Τα βήματα τα οποία ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Μικρό κομμάτι ιστού ($\approx 0,01\text{g}$) τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο Eppendorf (Biologix, BMT-15N).
2. Στο Eppendorf προστέθηκαν:
 - 500 μL TNE (10Mm Tris-HCl, 100Mm NaCl, 10Mm EDTA, pH 8)
 - 70 μL SDS περιεκτικότητας 10%
 - 10 μL Πρωτεϊνάση K (Proteinase K) συγκέντρωσης 20mg/ml
3. Ακολούθησε λιοτρίβιση του ιστού με έμβολο μέσα στο παραπάνω διάλυμα.
4. Το Eppendorf τοποθετήθηκε για επώαση σε υδατόλουτρο στους 55°C για όλη τη νύχτα έτσι ώστε να διαλυθεί ο ιστός πλήρως και να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες.
5. Μετά την επώαση προστίθεται διάλυμα συνολικού όγκου 600 μL με αναλογία 25:24:1
 - 300 μL φαινόλη
 - 288 μL χλωροφόρμιο
 - 12 μL ισοαμυλική αλκοόλη
6. Ανακινούνται ελαφρώς για 10 λεπτά σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα (rotator) στους 40 κύκλους/λεπτό και φυγοκεντρώνται (Eppendorf

Centrifuge 5804 R) για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές το λεπτό (rpm) στους 4°C για να γίνει ο διαχωρισμός των φάσεων.

7. Μετά το τέλος της φυγοκέντρισης αφαιρείται προσεκτικά η επάνω φάση (υδατική ή υπερκείμενη φάση) και τοποθετείται σε νέο Eppendorf.
8. Στο νέο Eppendorf προστίθενται εκ νέου 400μL χλωροφορμίου-ισοαμυλικής με αναλογία 24:1.
9. Ακολούθησε ανάδευση για 10 λεπτά σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα και φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
10. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρισης, αφαιρείται ξανά η υπερκείμενη φάση και τοποθετείται σε τρίτο Eppendorf.
11. Στη συνέχεια προστίθενται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και 10% του όγκου της υπερκείμενης φάσης οξικό νάτριο (Sodium Acetate) συγκέντρωσης 3M.
12. Το Eppendorf τοποθετείται στην κατάψυξη στους -20°C για 30 λεπτά.
13. Φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4°C.
14. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης παρατηρείται λευκό ίζημα (DNA pellet) στο κάτω μέρος του Eppendorf.
15. Αφαιρέθηκε προσεκτικά το περιέχομενο του Eppendorf χωρίς να φύγει η πελέτα και προστίθεται 1 ml αιθανόλης 70%.
16. Φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4°C.
17. Αφαιρέθηκε η αιθανόλη τελείως και το Eppendorf τοποθετήθηκε σε αντλία κενού σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά έτσι ώστε να εξατμιστούν τελείως τα υπολείμματα αιθανόλης.

18. Τέλος, η πελέτα που προκύπτει μέσα στο Eppendorf διαλύεται σε 50μL υπερκάθαρου νερού ή σε ίση ποσότητα διαλύματος TE και αποθηκεύεται στους -20°C, μέχρι να αναλυθεί.

Επειδή ο ιστός ήταν αρκετά σκληρός και το παραπάνω πρωτόκολλο δεν απέδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα, δοκιμάστηκαν αρκετά πρωτόκολλα απομόνωσης DNA και έγιναν πολλές μετατροπές σε αυτά.

Το πρότυπο πρωτόκολλο στο οποίο εφαρμόστηκαν οι διάφορες μετατροπές ήταν το CTAB Protocol σύμφωνα με τους Doyle & Doyle 1990.

Περίληπτικά η εφαρμογή του ήταν πανομοιότυπη με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω. Η αντικατάσταση της φαινόλης και η χρήση διαφορετικών χημικών ουσιών από τις προβλεπόμενες όπως αυτή της β-μερκαπτοαιθανόλης αποτέλεσαν σημάδι βελτίωσης της ποιότητας και της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA. Συγκεκριμένα το πρωτόκολλο απομόνωσης DNA, CTAB , περιγράφεται από τα εξής βήματα:

1. Παρασκευάζονται 10mL διαλύματος απομόνωσης (CTAB extraction buffer – 2% CTAB, 0,1M Tris/HCl-pH 8.0, 20mmol/L EDTA pH 8.0, 1.4mol/L NaCl) Λίγο πριν τη χρήση του διαλύματος προστίθεται και 1.5% beta-mercaptoethanol.
2. Τοποθετείται μικρή ποσότητα ιστού μέσα σε Eppendorf tubes και προστίθενται 600μL του παραπάνω διαλύματος.
3. Ακολουθεί λιοτρίβιση έτσι ώστε να διαλυθεί ο ιστός και προστίθενται 5μL πρωτεϊνάσης K (Proteinase K).
4. Τα δείγματα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 60°C για 1-2 ώρες
5. Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου : ισοαμλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1.

6. Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4°C.
7. Αφαλείται η υπερκείμενη φάση και τοποθετείται σε δεύτερο Eppendorf.
8. Στο δεύτερο Eppendorf προστίθεται ίση ποσότητα ισοπροπανόλης και τα δείγματα τοποθετούνται για 30 λεπτά στους -20°C.
9. Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4°C.
10. Απομακρύνεται η ισοπροπανόλη προσεκτικά για να μη χαθεί η πελέτα του DNA και προστίθεται 1ml αιθανόλης 70% για πλύση.
11. Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4°C.
12. Απομακρύνεται η αιθανόλη προσεκτικά και τα δείγματα τοποθετούνται σε αντλία κενού για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αιθανόλης.
13. Τέλος οι πελέτες διαλύονται σε 50μL υπερκάθαρο νερό ή TE (Tris – EDTA) και διατηρούνται στους -24°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

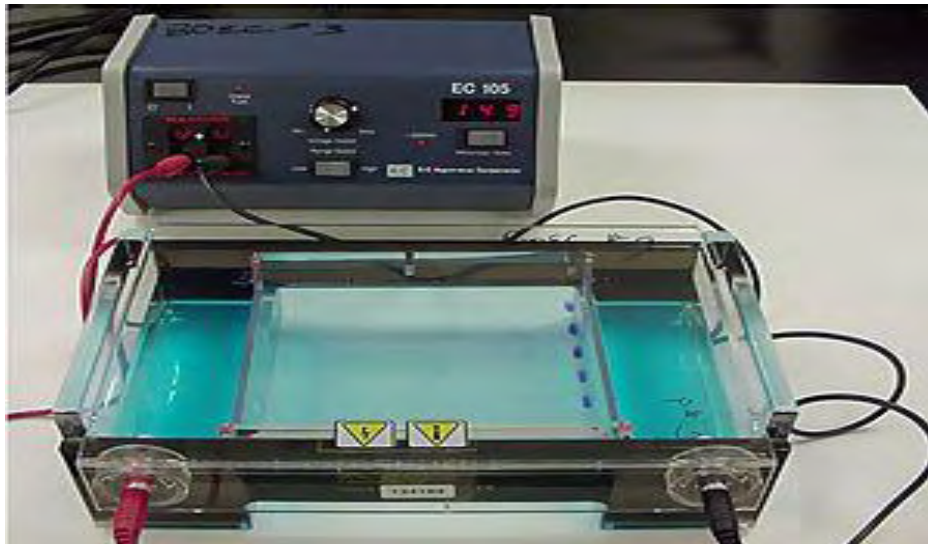
Όλα τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA ήταν της εταιρίας Scharlau.

2.1 Ανίχνευση ποιότητας και ποσότητας DNA

Η ανίχνευση της ποιότητας του απομονωμένου DNA γίνεται με δύο μεθόδους.

2.1.1 Ηλεκτροφόρηση

Η πρώτη είναι η κλασική μέθοδος ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1,5% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris/HCl - pH 8, Boric Acid, EDTA) το οποίο παρασκευάζεται με συγκέντρωση 10x (Stock Buffer) και αραιώνεται κατά 10 φορές για να χρησιμοποιηθεί έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1x.

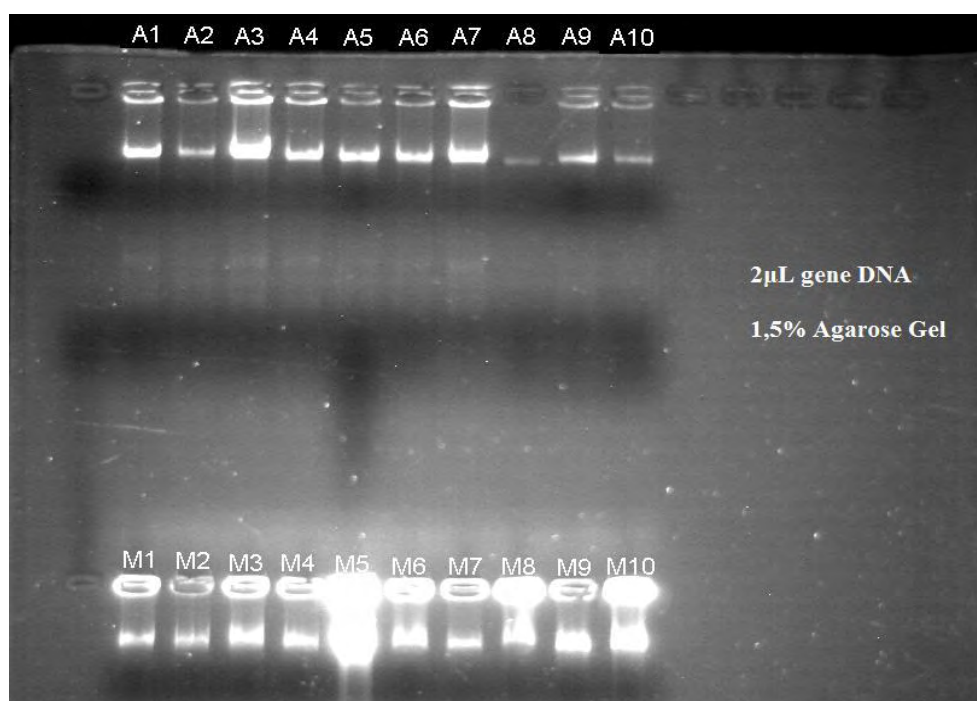


Εικόνα 2.1.1.1. Μπάνιο ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό τάσης.

Η πηκτή αгарόζης παρασκευάζεται με τη διάλυση 1,5gr αгарόζης σε 100ml διαλύματος TBE 1x. Στη συνέχεια τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται ωσότου οι νιφάδες αгарόζης να διαλυθούν πλήρως και να ομογενοποιηθούν. Προστίθεται μικρή ποσότητα Βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium Bromide) $\approx 2,5\mu\text{L}$ η οποία επιτρέπει τον φθορισμό του DNA όταν αυτό εκτεθεί σε ακτίνες UV, γίνεται καλή ανακίνηση έτσι ώστε να διαλυθεί πλήρως το αιθίδιο και τέλος τοποθετείται μέσα στην τετράγωνη πλάκα ηλεκτροφόρησης.

Η πλάκα ηλεκτροφόρησης είναι διαμορφωμένη έτσι ώστε να εφαρμόζουν 4 ειδικά χτενάκια. Αφού κρυώσει το διάλυμα στην πλάκα, παίρνει μορφή πηκτής γέλης (gel) και μόλις αφαιρεθούν τα χτενάκια σχηματίζονται τα πηγάδια στα οποία φορτώνονται τα δείγματα. Κάθε χτενάκι μπορεί να σχηματίσει 16 πηγάδια τα οποία έχουν όγκο από 10-18μl ανάλογα με την ρύθμιση της χτένας. Ο συνολικός όγκος που τοποθετείται σε κάθε πηγάδι είναι περίπου 10μL : 7μL ddH₂O, 2μL DNA και 1μL χρωστική Blue-bromophenol, (Invitrogen). Η χρωστική είναι απαραίτητη στην ηλεκτροφόρηση καθώς αποτελεί έναν τρόπο σήμανσης του DNA κατά την διαδικασία του τρεξίματος μέσα στο gel και επιπλέον προσθέτει μοριακό βάρος στο DNA και έτσι το εξαναγκάζει να καθίσει μέσα στο πηγάδι. Το ρυθμιστικό διάλυμα

του μπάνιου της ηλεκτροφόρησης είναι ίδιο με αυτό που παρασκευάστηκε η πηκτή αγαρόζης, δηλαδή TBE 1x. Αφού βυθιστεί η πλάκα με την πηκτή αγαρόζης μέσα στο μπάνιο ηλεκτροφόρησης φορτώνεται ένα δείγμα DNA σε κάθε πηγάδι αφού αναμιχθούν όλα τα συστατικά με την τεχνική by pipetting. Στη συνέχεια η συσκευή συνδέεται σε παροχή τάσης 90 volt για 30-45λεπτά. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε φωτογραφική μηχανή (DNR, Mini Bis Bio-Imaging Systems) υπό υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και προκύπτει η εικόνα του πηκτώματος όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



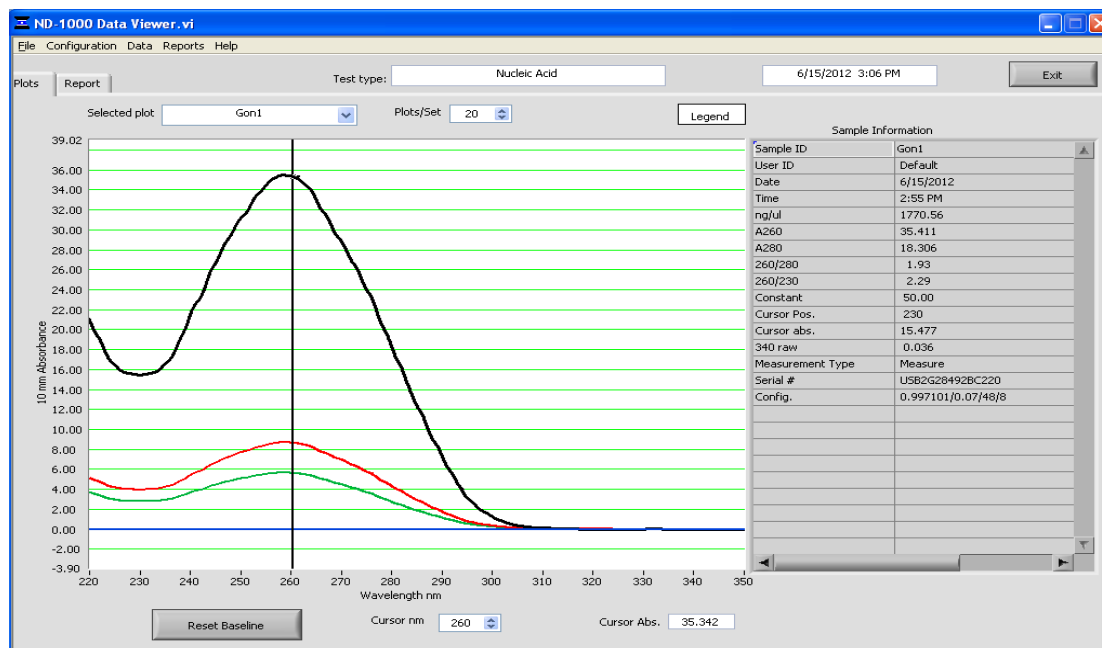
Εικόνα 2.1.1.2. Φωτογραφική απεικόνιση ποιότητας και ποσότητας DNA υπό υπεριώδη ακτινοβολία σε πηκτή αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος.

2.1.2. NanoDrop Spectrophotometer

Το NanoDrop spectrophotometer ND-1000 έχει παρόμοια τεχνολογία με ένα συμβατικό φασματοφωτόμετρο αλλά έχει πολλές πρόσθετες δυνατότητες. Η χρήση της επιφανειακής τάσης του δείγματος απαιτεί μόνο 1 έως 2 µL δείγματος. Το δείγμα

διατηρείται πάνω στην οπτική ίνα του NanoDrop η οποία αξιολογεί την απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας UV από το δείγμα κατά μήκος ενός φάσματος απορρόφησης 220 nm έως 750 nm. Το όργανο συνοδεύεται από ειδικό λογισμικό για να επιτρέπει την ανάλυση του σήματος στην οθόνη του υπολογιστή. Αν και η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού είναι ακόμη ευαίσθητη και μπορεί να υποπέσει σε πολλές παγίδες όπως και η παραδοσιακή μέθοδος του φασματοφωτομέτρου UV, το NanoDrop είναι ισχυρό μέσο υπολογισμού καθώς εκτός από τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δείγματος και την αναλογία απορρόφησης A_{260}/A_{280} και A_{260}/A_{230} , εμφανίζει όλο το φάσμα απορρόφησης του δείγματος σε γραφική μορφή (Εικ. 2.1.2.1.). Αυτό επιτρέπει να γίνονται εύκολα ανιχνεύσιμες οι προσμείξεις ξένων ή ανεπιθύμητων ουσιών στο απομονωμένο δείγμα DNA ενώ ταυτόχρονα με βάση τα μήκη κύματος είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν. Οι ουσίες αυτές θα μπορούσαν να περάσουν απαρατήρητες σε μια παραδοσιακή φασματοφωτομετρία με UV ή ακόμα και στην απλή ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. Ο λόγος για τον οποίο ενδιαφέρει ο έλεγχος και η απομάκρυνση αυτών των ουσιών είναι γιατί δρουν παρεμποδιστικά στην αντίδραση της PCR.

Ένα επιπρόσθετο όφελος του Nanodrop είναι η δυνατότητα να καταγράφει την συγκέντρωση του DNA μετρώντας μόλις 1μL δείγματος. Γι' αυτό και όταν μετράται η ποιότητα και ποσότητα ενός δείγματος, θα πρέπει το DNA να είναι καλά διαλυμένο μέσα στο Eppendorf. (Kelly et al. 2012).



Εικόνα 2.1.2.1. Γραφική απεικόνιση ποιότητας και συγκέντρωσης DNA με ανάλυση δείγματος σε Nanodrop ND-1000.

2.2 Επιλογή RAPD εκκινητών

Οι εκκινητές (RAPD primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι ίδιοι με αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν στις μεταπτυχιακές διατριβές των Καπετάνιος 2006 και Παπαγεωργίου 2006 στο τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, όπως επίσης και δύο επιπρόσθετοι εκκινητές οι οποίοι δοκιμάστηκαν πειραματικά. Συγκεκριμένα οι αλληλουχίες των δεκαμερών παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.1:

Πίνακας 2.2.1. Αναλυτική καταγραφή των δεκαμερών primer που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Κωδικός Primer	Αλληλουχία	Εταιρεία
A02	5'-CAGGCCCTTC-3'	Invitrogen
A03	5'-AGTCAGCCAC-3'	Invitrogen
A04	5'-AATCGGGCTG-3'	Invitrogen
A09	5'-GGGTAACGCC-3'	Invitrogen
A10	5'-GTGATCGCAG-3'	Invitrogen
F03	5'-CCTGATCACC-3'	Invitrogen
F04	5'-GGTGATCAGG-3'	Invitrogen
F12	5'-ACGGTACCAG-3'	Invitrogen
F10	5'-GGAAGCTTGG-3'	Invitrogen
Pr14	5'-GGTGACGCAG-3'	Invitrogen
R02	5'-CACAGCTGCC-3'	Invitrogen
R13	5'-GGACGACAAG-3'	Invitrogen
Y01	5'-GTGGCATCTC-3'	Invitrogen
Y02	5'-CATCGCCGCA-3'	Invitrogen
Y05	5'-GGCTGCGACA-3'	Invitrogen
Y08	5'-AGGCAGAGCA-3'	Invitrogen
Y15	5'-AGTCGCCCTT-3'	Invitrogen
Y18	5'-GTGGAGTCAG-3'	Invitrogen
UBC-521	5'-CCGCCCCACT-3'	Invitrogen
UBC-526	5'-AACGGGCACC-3'	Invitrogen
UBC-542	5'-CCCATGGCCC-3'	Invitrogen
UBC-717	5'-CCCACACCCA-3'	Invitrogen
UBC-725	5'-GGGTTGGGTG-3'	Invitrogen
UBC-726	5'-GGTGTGGGTG-3'	Invitrogen
UBC-728	5'-GTGGGTGGGTG-3'	Invitrogen
UBC-730	5'-CCACACCCAC-3'	Invitrogen
UBC-735	5'-GGGAGAGGAG-3'	Invitrogen
UBC-750	5'-GGGTGGTGTG-3'	Invitrogen
Primer 1	5'-ACCCGGAAAC-3'	Biolegio
Primer 2	5'-TCGCAGCGAG-3'	Biolegio
Primer 3	5'-TGATGGCGTC-3'	Biolegio
OPG 11	5'-AGCGTCCTCC-3'	Invitrogen
OPG 16	5'-TGCCCGTCGT-3'	Invitrogen

Για να βρεθούν οι κατάλληλοι εκκινητές που θα έδιναν τους περισσότερους δυνατούς πολυμορφισμούς, δοκιμάστηκαν όλοι με μια σειρά αντιπροσωπευτικών δειγμάτων από την κάθε δειγματοληψία που έγινε το 2009 και 2011.

2.3 Πρωτόκολλα PCR

Το τελικό πρωτόκολλο PCR που εφαρμόστηκε προέκυψε μετά από πολλές δοκιμές και μετατροπές σε υπάρχοντα πρωτόκολλα αλλά και εμπειρικά. Στο σύνολο το πρωτόκολλο αποτελείται από 40 κύκλους ενώ τα στάδια αναλυτικά ήταν:

- Πρώτη αποδιάταξη : 95°C για 5:00 λεπτά
- 1^ο Βήμα: 95°C για 1:30 λεπτό
- 2^ο Βήμα: 36°C για 1:00 λεπτό
- 3^ο Βήμα: 72°C για 1:30 λεπτό
- 4^ο Βήμα: Επανάληψη του 1^{ου}, 2^{ου} και 3^{ου} βήματος για 39 φορές
- 5^ο Βήμα: Τελική επιμήκυνση, 72°C για 7:00 λεπτά
- 6^ο Βήμα: 10°C μέχρι να βγουν τα δείγματα από τον κυκλοποιητή (PCR).

Επίσης ακολουθήθηκαν πρωτόκολλα Gradient PCR στα οποία εφαρμόστηκαν ίδια βήματα με τη μόνη διαφορά να παρουσιάζεται στο 2^ο βήμα. Οι θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ήταν από τους 35°C μέχρι και τους 44°C. Η κατανομή θερμοκρασίας στα πηγάδια της PCR ήταν:

Πίνακας 2.3.1. Κατανομή θερμοκρασίας στα πηγάδια του κυκλοποιητή κατά τη διάρκεια εφαρμογής της Gradient PCR.

1	2	3	4	5	6	7	8
35,3°C	37,1°C	39,1°C	40,8°C	42,1°C	43,1°C	43,8°C	44°C

Για να πραγματοποιηθεί μια PCR θα πρέπει οι συγκεντρώσεις και η ποσότητα των αντιδραστηρίων που την απαρτίζουν να είναι σωστές. Τα αντιδραστήρια είναι τα εξής:

- ✓ DNA
- ✓ Buffer C
- ✓ MgCl₂
- ✓ DNTP's
- ✓ Primer
- ✓ Taq-Polymerase
- ✓ H₂O

Για την εύρεση του καταλληλότερου συνδυασμού έγιναν αρκετές δοκιμές στις συγκεντρώσεις και τις ποσότητες των παραπάνω υλικών. Η τελική μορφή που εφαρμόστηκε ήταν:

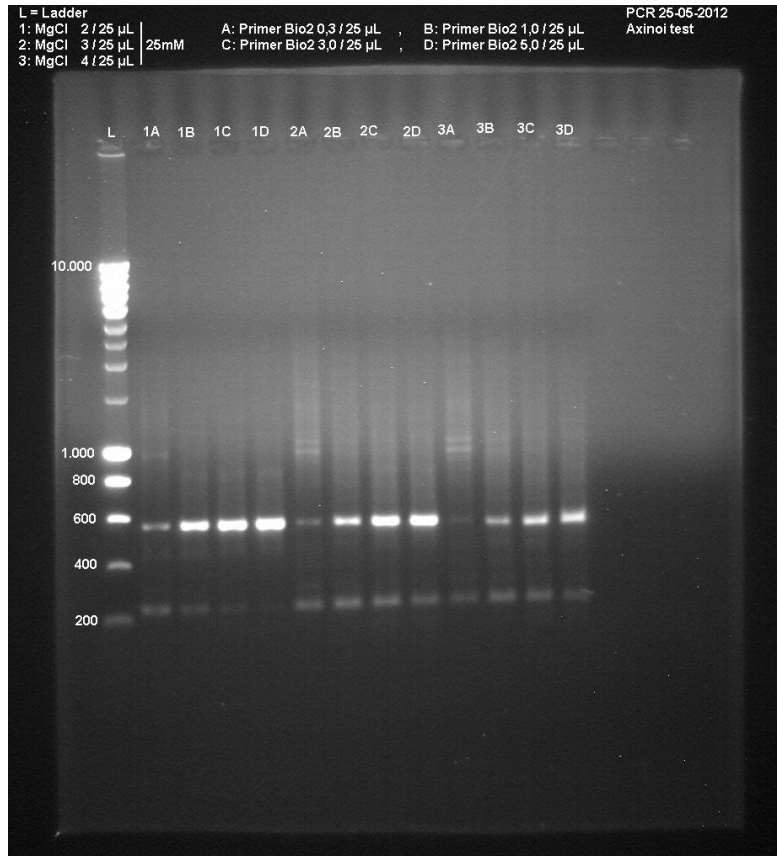
Πίνακας 2.3.2. Αντιδραστήρια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
DNA	1 μL
Buffer C	5 μL
MgCl ₂	3 μL
DNTP's	0,5 μL
Primer	3 μL
Taq Polymerase	0,2 μL
H ₂ O	12,3 μL
Σύνολο	25 μL

2.4 Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων PCR

Μετά το τέλος της PCR τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% ίδιο με αυτό που περιγράφηκε για την ηλεκτροφόρηση γονιδιοματικού DNA. Το gel τοποθετείται μέσα στο μπάνιο ηλεκτροφόρησης και στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα που προέκυψαν από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο όγκος σε κάθε πηγάδι είναι διαφορετικός καθώς δεν προστίθεται υπερκάρω νερό (ddH₂O). Από τον πίνακα 2.3.2 προκύπτει ότι στα tubes της PCR περιέχονται περίπου 25μL (με κάποιες μικρές απώλειες υδρατμών εντός του tube). Από αυτά χρησιμοποιούνται τα 10μL ενώ η χρωστική (Blue-Bromophenol) είναι απαραίτητη για λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ο τελικός όγκος στα πηγάδια του πηκτώματος είναι 12μL: 10μL DNA και 2μL χρωστική. Σε κάθε ηλεκτροφόρηση PCR τοποθετείται ένας μάρτυρας (Ladder) ο οποίος σχηματίζει συγκεκριμένο αριθμό μπαντών με συγκεκριμένο μήκος βάσεων. Τις περισσότερες φορές χρησιμοποιείται Ladder που σχηματίζει μπάντες ανά 100 νουκλεοτιδικές βάσεις (bp) και φορτώνεται μαζί με χρωστική στο πρώτο πηγάδι κάθε σειράς. Ο όγκος είναι πολύ μικρότερος από τον όγκο των δειγμάτων και συνήθως δε ξεπερνά τα 2μL: 1μL Ladder + 1μL χρωστική (Blue-bromophenol). Ένας από τους κύριους λόγους που τοποθετείται ο μάρτυρας στο πήκτωμα αγαρόζης είναι η ταυτοποίηση του μήκους των μπαντών που σχηματίζουν τα δείγματα της PCR αλλά ταυτόχρονα προϋποθέτει για τυχόν προβλήματα του πηκτώματος της αγαρόζης όπως για παράδειγμα κακή κατασκευή. Αν το πήκτωμα δεν έχει παρασκευαστεί σωστά μπορεί να εκτρέψει τις μπάντες των δειγμάτων αλλά και του Ladder πράγμα που γίνεται αντιληπτό καθώς ο Ladder έχει προκαθορισμένο σχηματισμό επάνω στο πήκτωμα. Αφού τοποθετηθεί το πήκτωμα μέσα στο μπάνιο ηλεκτροφόρησης και φορτωθούν όλα τα δείγματα και ο μάρτυρας, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση με τάση στα

90Volt. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε φωτογραφική μηχανή υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και προκύπτει η εικόνα του πηκτώματος όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

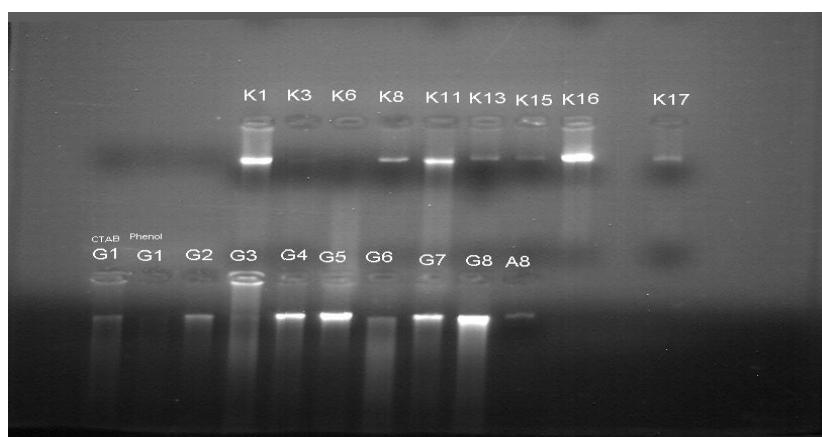


Εικόνα 2.4.1. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων αχινού μετά από PCR με διαφορετικές συγκεντρώσεις $MgCl_2$ και του Primer 2 της Biolegio.

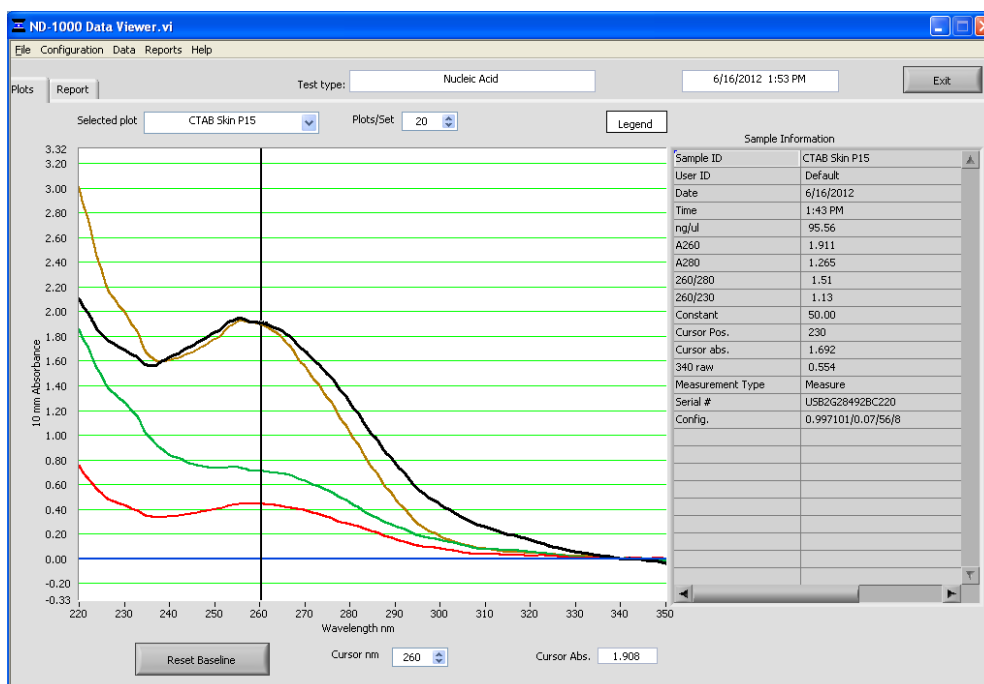
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η γενετική ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR και το σκοράρισμα των αλληλόμορφων γονιδίων που θα προέκυπταν από τα 203 δείγματα γονάδων και δέρματος του είδους *Holothuria tubulosa*.

Αρχικά έγινε απομόνωση DNA στα 83 δείγματα δέρματος που είχαν διατηρηθεί σε διάλυμα DMSO (Dimethylsulfoxide) στους -24°C . Ακολουθήθηκαν και τα δύο πρωτόκολλα που αναφέρθηκαν παραπάνω (πρωτόκολλο απομόνωσης DNA με τη μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου και CTAB) όπως επίσης και μια σειρά παραλλαγών αυτών για την καλύτερη δυνατή ποιότητα DNA. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων ήταν ικανοποιητική ενώ η πραγματική εικόνα για την ποιότητα του απομονωμένου DNA δόθηκε από την φασματοφωτομέτρηση των δειγμάτων στη συσκευή Nanodrop ND-1000. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1 η ποιότητα του DNA φαίνεται να είναι αρκετά καλή. Παρόλα αυτά η φασματοφωτομέτρηση δείχνει κακή ποιότητα του απομονωμένου DNA (Εικ. 3.2).



Εικόνα 3.1. Απομόνωση DNA από δείγματα δέρματος του είδους *Holothuria tubulosa* που διατηρήθηκαν σε διάλυμα DMSO στους -24°C .



Εικόνα 3.2. Αποτέλεσμα Nanodrop ND-1000 από δείγματα δέρματος του είδους *Holothuria tubulosa* που διατηρήθηκαν σε διάλυμα DMSO στους -24°C .

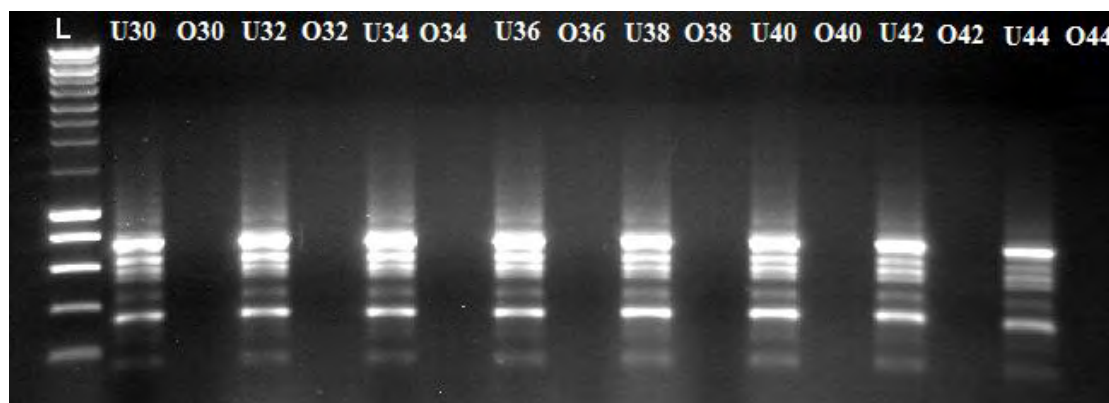
Εύκολα μπορεί κανείς να διακρίνει πως η ποιότητα του γενωμικού DNA είναι κακή από τους δείκτες απορρόφησης A_{260}/A_{280} και A_{260}/A_{230} . Σύμφωνα με το βιβλίο οδηγιών της συσκευής η καθαρότητα του DNA για τον πρώτο δείκτη (A_{260}/A_{280}) προσδιορίζεται κοντά στην τιμή ~ 1.8 ενώ για τον δεύτερο δείκτη (A_{260}/A_{230}) το εύρος 1.8-2.2 είναι αποδεκτό. Αν ο δεύτερος λόγος είναι αισθητά μικρότερος, αυτό μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία ανεπιθύμητων ουσιών οι οποίες μπορεί να είναι πιθανοί παρεμποδιστές της PCR. Η αναλογία ng/ul υποδεικνύει την συγκέντρωση του DNA. Στον παρακάτω πίνακα γίνεται σύγκριση των δύο κύριων πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα δέρματος.

Πίνακας 3.1. Σύγκριση κύριων πρωτοκόλλων απομόνωσης DNA.

Πρωτόκολλο	Αναλογία A_{260}/A_{280}	Αναλογία A_{260}/A_{230}	Συγκέντρωση (ng/ul)
Φαινόλης/Χλωροφορμίου	1.56	0.56	35.46
CTAB	1.51	1.13	95.56

Η ποιότητα του DNA είναι εξίσου κακή με την εφαρμογή και των δύο πρωτοκόλλων παρόλα αυτά παρατηρείται κατά μέσο όρο 3 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση DNA με το πρωτόκολλο απομόνωσης CTAB.

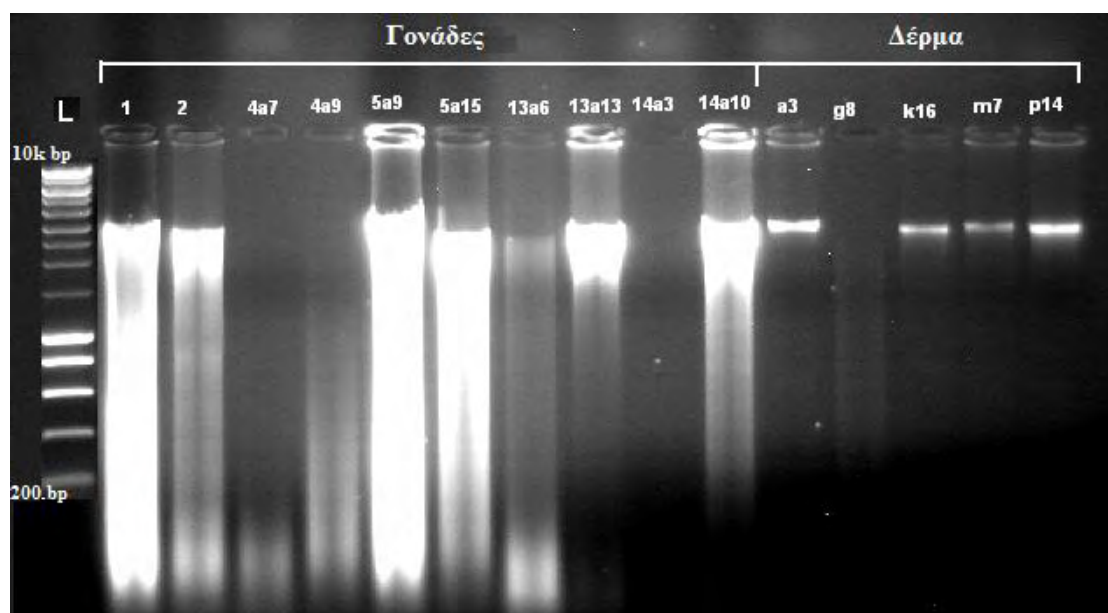
Ως φυσικό επακόλουθο, από τα 83 δείγματα δέρματος, κανένα δεν λειτούργησε στην PCR. Παρόλα αυτά έγιναν αρκετές δοκιμές όπως Gradient PCR (Εικ. 3.3), προσθήκη 3% DMSO ως αντιδραστήριο και αλλαγές στο πρωτόκολλο της PCR όπως μεγαλύτερη διάρκεια πρώτης αποδιάταξης, τελικής επιμήκυνσης και περισσότερων κύκλων.



Εικόνα 3.3. Εφαρμογή Gradient PCR με δείγματα αχιών (U) και δείγματα ολοθουρίων (O). Για να εξεταστεί το επίπεδο λειτουργίας των εκκινητών σε διαφορετικές συνθήκες επιλέχθηκε μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος, από 30°C - 44°C.

Μετά από τα παραπάνω αποτελέσματα και την αδυναμία απομόνωσης καθαρού DNA από τα δείγματα δέρματος, αναζητήθηκαν δείγματα εσωτερικών οργάνων από το είδος *Holothuria tubulosa*. Σε συνεργασία με το εργαστήριο θαλάσσιας βιολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος βρέθηκαν 120 δείγματα γονάδων του ίδιου είδους τα οποία όμως είχαν μελετηθεί μορφολογικά και είχαν διατηρηθεί σε αιθανόλη 70% και σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Οι γονάδες ήταν σε καλή κατάσταση αλλά για την

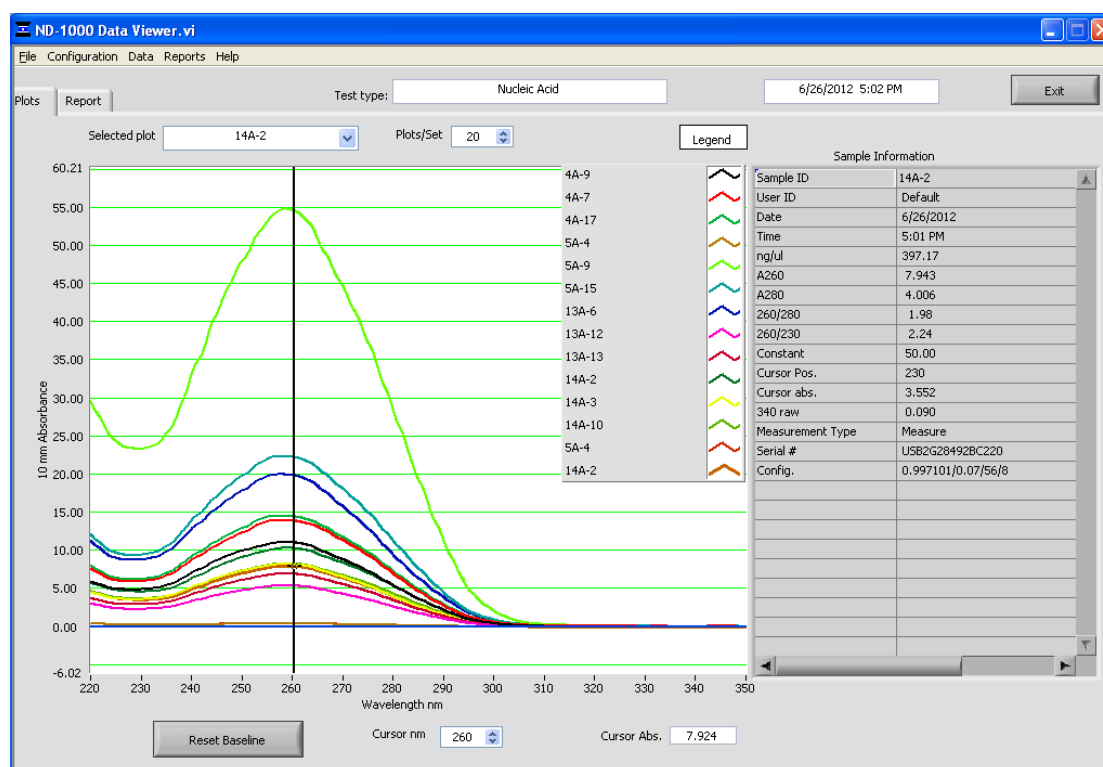
απομόνωση του DNA ήταν απαραίτητη η απαλλαγή των δειγμάτων από την αιθανόλη. Εφαρμόστηκαν τα ίδια πρωτόκολλα απομόνωσης DNA όπως και για τα δείγματα δέρματος. Συγκεκριμένα η ηλεκτροφόρηση έδειξε κατακερματισμό του DNA (Εικ.3.4.) ενώ το Nanodrop έδειξε πως το δείγμα ήταν απαλλαγμένο από ανεπιθύμητες ουσίες (Εικ.3.5.). Προφανώς ο έλεγχος των δειγμάτων και με τις δύο μεθόδους (Ηλεκτροφόρηση & Nanodrop) απέδωσε την αιτία και στις δύο περιπτώσεις απομόνωσης DNA. Τα αποτελέσματα ήταν και πάλι αρνητικά καθώς η συντήρηση των δειγμάτων δεν ήταν η προβλεπόμενη για γενετικές αναλύσεις.



Εικόνα 3.4. Απομόνωση DNA από δείγματα γονάδων και δέρματος του είδους *Holothuria tubulosa* που διατηρήθηκαν σε αιθανόλη 70% στους 25°C.

Σε αντίθεση με τα δείγματα δέρματος που είχαν καλή εικόνα στην ηλεκτροφόρηση και αποδεδειγμένα δεν είχαν αποδώσει στην PCR, παρατηρείται το αντίστροφο φαινόμενο στα δείγματα των γονάδων. Δηλαδή, κατακερματισμός του DNA όπως επίσης και θολερότητα στην ηλεκτροφόρηση ενώ στο Nanodrop υψηλούς δείκτες απορροφητικότητας με $A_{260}/A_{280} = 1.98$ και $A_{260}/A_{230} = 2.24$ και

συγκέντρωση DNA αρκετά υψηλή από 281,39 ng/ul έως 1770,56 ng/ul με μέσο όρο στα 363,01 ng/ul.



Εικόνα 3.5. Αποτελέσματα Nanodrop ND-1000 από δείγματα γονάδων του είδους *Holothuria tubulosa* που διατηρήθηκαν σε αιθανόλη 70% στους 25°C.

Για την PCR επιλέχθηκαν τα καλύτερα δείγματα DNA από τις γονάδες όπως επίσης και μίγμα αυτών. Η ηλεκτροφόρησή τους έδειξε θολούρα και όχι σχηματισμό μπαντών στο πήκτωμα όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6. Παρόλα αυτά ήταν μια πρώτη ένδειξη πως με προσαρμογή των αντιδραστηρίων θα ήταν πολύ πιθανό να υπάρξει αποτέλεσμα.



Εικόνα 3.6. Ηλεκτροφόρηση PCR με δείγματα γονάδων και δέρματος του είδους *Holothuria tubulosa*. Όπου L: Ladder, Gctab: δείγμα γονάδας απομονωμένο με CTAB, Gph/c: δείγμα γονάδας απομονωμένο με φαινόλη/χλωροφόρμιο, Sctab: δείγμα δέρματος απομονωμένο με CTAB και Sph/c: δείγμα δέρματος απομονωμένο με φαινόλη/χλωροφόρμιο.

Παρά τις προσπάθειες οι ενδείξεις δε βελτιώθηκαν και έτσι η έρευνα στράφηκε στον αποκλεισμό παραγόντων που ευθύνονταν για αυτήν την αναποτελεσματικότητα. Το γεγονός ότι τα δείγματα αχιών, καρχαριών και ασκιδίων λειτουργούσαν με τα ίδια αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνταν και για τα ολοθούρια έδωσε την εντύπωση πως στα δείγματα των ολοθουρίων υπάρχουν παρεμποδιστικοί παράγοντες που αποτρέπουν την αντίδραση της πολυμεράσης. Επίσης στο στάδιο δόθηκε βρέθηκε πως το stock των RAPD primers ήταν επιμολυσμένο με ξένο DNA και σύμφωνα με τις δοκιμές παρουσίαζαν μπάντες ίδιες με αυτές των αχιών. Για την αποσαφήνιση αυτής της εντύπωσης εφαρμόστηκε PCR σε δείγματα γονάδων και δέρματος ολοθουρίων, αχιών και καρχαριών. Τα αποτελέσματα ήταν διαφωτιστικά καθώς στην PCR

προστέθηκαν δείγματα χωρίς DNA τα οποία στην ηλεκτροφόρηση εμφάνιζαν μπάντες (Εικ3.7.).



Εικόνα 3.7. Ηλεκτροφόρηση PCR – έλεγχος αντιδραστηρίων.

Τα δείγματα 1,2,12 και 13 περιέχουν DNA από τις γονάδες, τα 3,4,14 και 15 περιέχουν DNA από το δέρμα των ολοθουρίων, τα 5,6,7,16,17 και 18 περιέχουν DNA αχινών ενώ τα 8,9,10,19,20 και 21 περιέχουν DNA καρχαριών. Όλα τα δείγματα είχαν αναμενόμενα αποτελέσματα όπως σε κάθε άλλη εφαρμογή τους σε PCR. Στα δείγματα 11 και 22 προστέθηκαν όλα τα αντιδραστήρια εκτός από DNA ενώ στο δείγμα 23 δεν προστέθηκε RAPD εκκινητής. Ο σχηματισμός μπαντών στα πηγάδια 11 και 22 είναι εμφανής επομένως καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για επιμολυσμένους εκκινητές. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως η προσθήκη DNA από δείγματα ολοθουρίων επιδρά αρνητικά στην αντίδραση της PCR και ταυτόχρονα παρεμποδίζει

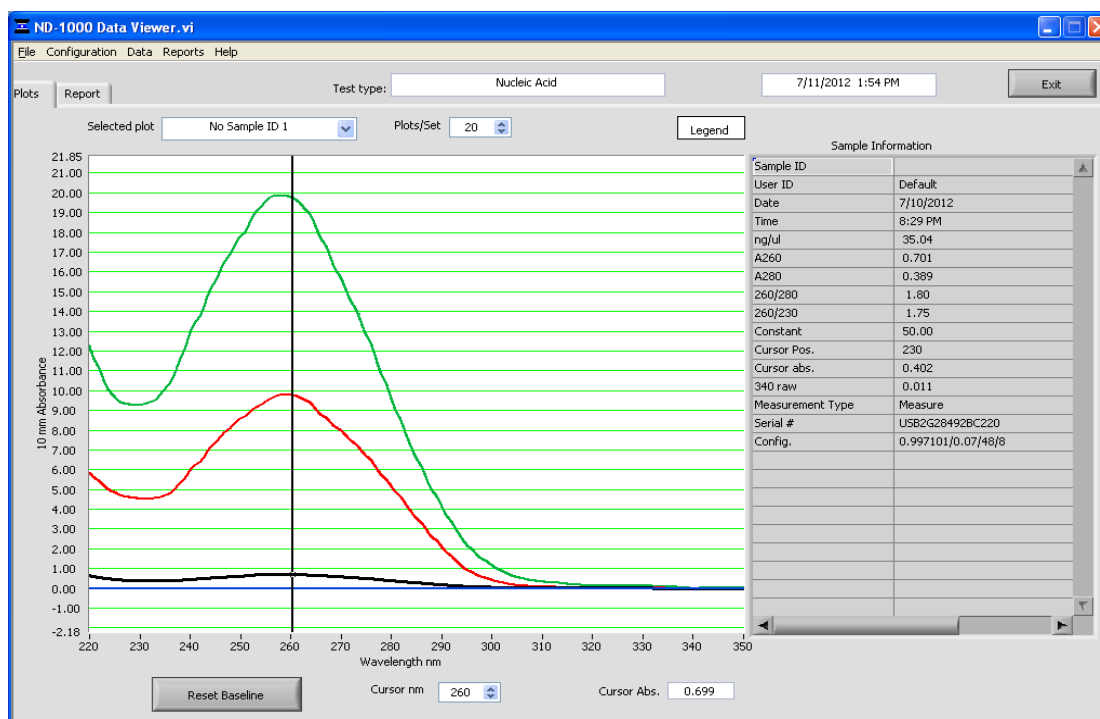
και το ξένο DNA που περιείχαν οι εκκινητές. Αυτό συνεπάγεται πως η δοκιμή νέων εκκινητών με τα δείγματα των ολοθουρίων θα είχε τα ίδια αποτελέσματα. Έτσι η έρευνα στράφηκε προς νέα δειγματοληψία για απομόνωση DNA από φρέσκα δείγματα όπου οι παράγοντες συντήρησης δε θα είχαν καμία επίδραση στο τελικό αποτέλεσμα. Σε συνεργασία με το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής, βρέθηκαν δύο νέοι δεκαμερείς RAPD primers οι OPG11 και OPG16. Από τη νέα δειγματοληψία απομονώθηκαν τρία είδη ιστών.

- ✓ Δέρμα
- ✓ Πλοκάμια
- ✓ Γονάδες

Η απομόνωση DNA έγινε με το πρωτόκολλο CTAB και η ανάλυσή τους έγινε στο Nanodrop (Εικ. 3.8.). Τα αποτελέσματα είναι αισθητά καλύτερα σε σχέση με τα 203 δείγματα που είχαν συντηρηθεί για αρκετό καιρό. Παρόλα αυτά το δείγμα DNA που είχε απομονωθεί από το δέρμα του οργανισμού εμφάνιζε χαμηλό λόγο A_{260}/A_{230} και η συγκέντρωσή του ήταν πολύ χαμηλότερη σε σχέση με τα δείγματα πλοκαμιού και γονάδας. Στον παρακάτω πίνακα διακρίνεται εύκολα η διαφορά στην ποιότητα και ποσότητα των απομονωμένων δειγμάτων.

Πίνακας 3.2. Αναλυτικά αποτελέσματα φρέσκων δειγμάτων από το Nanodrop.

Δείγμα DNA	Αναλογία A_{260}/A_{280}	Αναλογία A_{260}/A_{230}	Συγκέντρωση (ng/ul)
Δέρμα	1.80	1.75	35.04
Πλοκάμι	1.89	2.15	488.46
Γονάδα	2.05	2.13	988.87



Εικόνα 3.8. Αποτελέσματα Nanodrop από την τελευταία δειγματοληψία φρέσκων δειγμάτων.

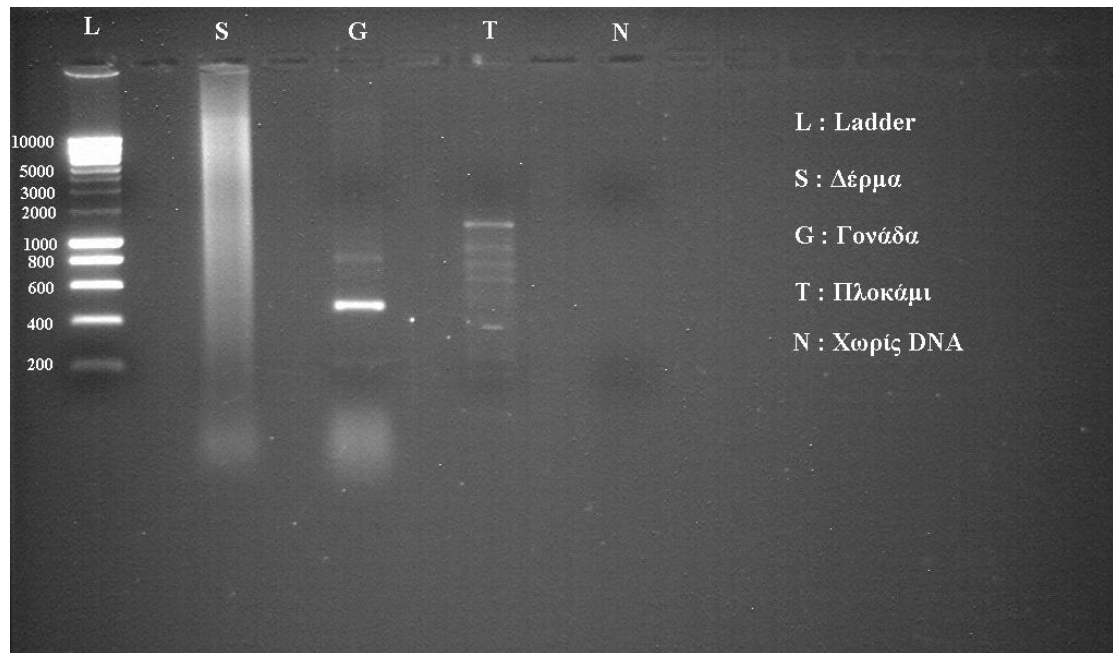
- Γονάδα
- Πλοκάμι
- Δέρμα

Παρόλο που η συγκέντρωση DNA της γονάδας είναι διπλάσια από αυτή που απομονώθηκε από το πλοκάμι, οι συντελεστές απορρόφησης του πλοκαμιού είναι καλύτεροι. Η PCR που εφαρμόστηκε για τα νέα δείγματα ήταν ίδια με αυτή των προηγούμενων δειγμάτων ως προς το πρωτόκολλο και τα αντιδραστήρια. Στη φάση αυτή οι εκκινητές OPG11 και OPG16 δεν ήταν κατάλληλοι και έτσι έγινε η εξής μετατροπή στα αντιδραστήρια της PCR:

Πίνακας 3.3. Αντιδραστήρια τελικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
DNA	1 μL
Buffer C	5 μL
MgCl₂	3 μL
DNTP's	0,5 μL
Primers (OPG11 + OPG16)	4 (2+2) μL
Taq Polymerase	0,2 μL
H₂O	11,3 μL
Σύνολο	25 μL

Η προσθήκη και των δύο εκκινητών (OPG11 και OPG16) στα δείγματα έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Αφού ολοκληρώθηκε η PCR το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφήθηκε υπό υπεριώδη ακτινοβολία και τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στην Εικόνα 3.9.



Εικόνα 3.9. Τελική ηλεκτροφόρηση PCR φρέσκων δειγμάτων δέρματος, γονάδας και πλοκαμιού.

Κρίνοντας από την παραπάνω φωτογραφία παρατηρούνται τα εξής:

1. Ύπαρξη παρεμποδιστών στα δείγματα δέρματος που δεν επιτρέπουν την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.
2. Εντονότερη εμφάνιση μπάντας στο DNA της γονάδας.
3. Μεγαλύτερος πολυμορφισμός στο DNA του πλοκαμιού αλλά πιο ισχνές σε σχέση με αυτές που σχηματίζονται στη γονάδα.
4. Στο πηγάδι "N" προστέθηκαν όλα τα αντιδραστήρια εκτός από DNA και το αποτέλεσμα δίνει τα διαπιστευτήρια του για την επιμόλυνση όλων των αρχικών RAPD εκκινητών.
5. Το δείγμα από γονάδα σχηματίζει 3 μπάντες με πιο έντονη αυτή στις 500 περίπου νουκλεοτιδικές βάσεις, ενώ διακρίνονται ελάχιστα μία μπάντα στις 800 και στις 200 βάσεις.
6. Το δείγμα από πλοκάμι σχηματίζει πολλές μπάντες που διακρίνονται ελάχιστα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η γενετική ποικιλομορφία και δομή του είδους *Holothuria tubulosa* από 6 διαφορετικούς πληθυσμούς του Αιγαίου πελάγους. Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της τυχαίας ενίσχυσης πολυμορφικού DNA (RAPD). Οι γενετικοί μοριακοί δείκτες έχουν εξελιχθεί σε ισχυρά εργαλεία για την ανάλυση των γενετικών σχέσεων και της γενετικής ποικιλομορφίας. Ως επέκταση στην ποικιλία των υπαρχόντων τεχνικών χρησιμοποιώντας πολυμορφικούς δείκτες DNA, η τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μοριακή οικολογία, στην ταξινόμηση, στην αξιολόγηση των σχέσεων συγγένειας, στην ανάλυση δειγμάτων ανάμικτου γονιδιώματος, και στη δημιουργία ειδικών ανιχνευτών. Κύρια πλεονεκτήματα της τεχνολογίας RAPD

1. Καταλληλότητα για εργασίες ανώνυμων γονιδιωμάτων,
2. Εφαρμογή σε προβλήματα όπου μόνο περιορισμένες ποσότητες του DNA είναι διαθέσιμες,
3. Αποτελεσματικότητα και χαμηλό κόστος. (Hadrys et al., 1992)

Η τεχνική αυτή μπορεί να είναι σχετικά πιο εύκολη από άλλες γενετικές μεθόδους αλλά ταυτόχρονα κρύβει πολλές παγίδες. Οι ενισχύσεις της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR πραγματοποιούνται σε μη αυστηρές συνθήκες και είναι τυχαίες με αποτέλεσμα να προκύπτει επαναληψιμότητα των παρατηρήσεων κάτι που απαιτεί προσεκτικό έλεγχο των πειραματικών συνθηκών. (Naish et al., 1995). Έχουν αναφερθεί πολλά τεχνικά προβλήματα από την εφαρμογή της μεθόδου RAPD από πολλούς συγγραφείς στον τομέα της γενετικής των πληθυσμών. Για να μελετηθούν οι γενωμικοί πολυμορφισμοί ανάμεσα σε πληθυσμούς ενός είδους, οι

γενετικοί δείκτες που ενισχύουν τυχαία πολυμορφικό DNA είναι οι πιο κατάλληλοι δείκτες για να βρεθούν διαφορές μέσα σε ολόκληρο το γονιδίωμα του οργανισμού. (Welsh and McClelland, 1990 : Williams et al., 1990). Οι RAPD δείκτες αποκαλύπτουν συνήθως αρκετούς ανεξάρτητους γενετικούς τόπους. (Williams et al., 1993).

Ιδιαίτερη βάση δόθηκε στην εξαγωγή όσο το δυνατόν καλύτερου σε ποιότητα και ποσότητα DNA κάτι που καταστήθηκε αδύνατο εξαιτίας της κακής εκμετάλλευσης των δειγμάτων και της συντήρησής τους. Τα ολοθούρια, ως βενθικοί οργανισμοί έρχονται σε επαφή με τον πυθμένα και λόγω της αργής κίνησής τους είναι πιθανό να αναπτυχθούν επάνω στο δέρμα τους διάφοροι φυτικοί οργανισμοί και μικροοργανισμοί. Αυτό έχει ως συνέπεια την δημιουργία ερωτηματικών για το κατά πόσο το DNA που εξάγεται από το δέρμα είναι πραγματικά από τον υπό μελέτη οργανισμό. Όπως αποδείχθηκε τελικά το δέρμα των ολοθουρίων εμπεριέχει ουσίες είτε οργανικές είτε ανόργανες που παρεμποδίζουν την λειτουργία της PCR. Αξίζει να σημειωθεί πως απ' όλες τις περιοχές του δέρματος που εξετάστηκαν μόνο η περίπτωση των πλοκαμιών είχε καλά αποτελέσματα στην εξαγωγή του DNA και την PCR.

Αναφορές για εφαρμογή της τεχνικής RAPD σε ολοθούρια, δεν έχει γίνει στο παρελθόν, παρόλα αυτά σε αρκετές δημοσιευμένες εργασίες (Welsch and McClelland 1990, Williams et al. 1990, Williams et al. 1993, Yu and Paul 1993, Lynch et al. 1994, Suyama et al. 2000) η εξαγωγή DNA από ιστό δέρματος θαλάσσιων αγγουριών και άλλων βενθικών οργανισμών όπως αστεριών και αχινών παρουσιάζεται εύκολη με το πρωτόκολλο απομόνωσης CTAB. Δεν αναφέρεται αν τα δείγματα είναι φρέσκα ή διατηρημένα σε κάποιο μέσο και σε πολλές περιπτώσεις παραλείπεται η χρήση της πρωτεΐνάσης K (Proteinase K) στο στάδιο της επώασης, κάτι που οδηγεί το τελικό

προϊόν να εμπεριέχει ανεπιθύμητες πρωτεΐνες οι οποίες παρεμποδίζουν το στάδιο αποδιάταξης της PCR.

Σύμφωνα με τον Lawrence 2006 στην ετήσια αναφορά του για την διατήρηση του ιστού των ολοθουρίων, αναφέρει πως η απομόνωση DNA από διατηρημένο ιστό θαλάσσιου αγγουριού είναι αποδεδειγμένα δύσκολη. Η διατήρηση του ιστού σε αλκοόλη δεν είναι αποτελεσματική αν και συνηθίζεται να χρησιμοποιείται για την διατήρηση ιστών που προορίζονται για γενετικές αναλύσεις καθώς είναι εύκολη σε πρακτικό αλλά και συμφέρουσα σε οικονομικό επίπεδο. Αναφέρει πως το υγρό άζωτο είναι αποτελεσματικό στη διατήρηση του ιστού ενώ ο καλύτερος συνδυασμός για την απομόνωση DNA από τον ιστό διατηρημένο σε υγρό άζωτο είναι να χρησιμοποιηθεί DNA kit. Παρόλα αυτά η μεταφορά δεξαμενών με υγρό άζωτο στο πεδίο και η διατήρηση των ιστών δεν είναι πρακτική και είναι οικονομικά ασύμφορη. Ένα ακόμα μέσο που κρίνεται κατάλληλο για την συντήρηση του ιστού είναι το DMSO (Dimethylsulfoxide) buffer. Στην ίδια αναφορά τονίζεται το γεγονός πως από καμία περιοχή του δέρματος των ολοθουρίων δε μπορεί να εξαχθεί ποιοτικό DNA. Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό οφείλεται πιθανότατα στα θραύσματα ασβεστίου που παρεμβάλλονται με την αντίδραση της PCR. Ικανοποιητική ήταν η απομόνωση DNA από τα εσωτερικά όργανα αλλά και από την βάση των πλοκαμιών του οργανισμού.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 Ξένη Βιβλιογραφία

Arnaud-Haond S., Alberto F., Teixeira S., Procaccini G., Serrao E.A. and Duarte C.M. (2005). Assessing Genetic Diversity in Clonal Organisms: Low Diversity or Low Resolution? Combining Power and Cost Efficiency in Selecting Markers. *Journal of Heredity* :96(4):434–440.

Avise J.C. (1989). A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology & Evolution* 4:279–281.

Avise J.C. (1994). Molecular markers, natural history, and evolution. New York: Chapman & Hall.

Bakus G.J. (1973). The biology and ecology of tropical holothurians. In: Jones OA, Endean R, eds. Biology and Geology of coral reefs, Volume 2. Academic Press, New York, pp. 325-367.

Beaumont A.R. and Pether S.M.J., (1996). Allozyme variation and gene flow between cockle *Cerastoderma edule* populations in southern United Kingdom. *Fisheries Research* 28:263–275.

Brusca R.C. and Brusca G.J. Phylum Echinodermata. Invertebrates 828-837.

Bulteel P., Jangoux M. and Coulon P. (1992). Biometry, bathymetric distribution, and reproductive cycle of the holothuroid *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) in Mediterranean seagrass beds. *Marine Ecology* 13(1): 53-62.

Charlesworth B. (1998). Measure of divergence between populations and the effects of forces that reduce variability. *Molecular Biology Evolution* 15:538–543.

Coulon P. and Jangoux M. (1993). Feeding rate and sediment reworking by the holothuroid *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) in a Mediterranean seagrass bed off Ischia Island, Italy. *Marine Ecology Progress Series*. 92:201-204.

Despalatovic M., Grubelic I., Simunovic A., Antolic B. and Zuljevic A. (2004). Reproductive biology of the holothurians *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) in the Adriatic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 84:409-414.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Exadactylos A. (1997). Population Genetics of the Dover sole, *Solea solea* L. Linnaeus, 1758. Teleostei: Soleidae. Ph.D. Thesis. University of Liverpool, School of Biological Sciences, Port Erin Marine Lab., UK.

Gustato G., Villari A., Del Claudio S., Pedata P. (1982). Ulteriori dati sulla distribuzione di *Holothuria tubulosa*, *Holothuria poli* e *Holothuria stellati* nel Golfo di Napoli. *Bolletino della Societa dei Naturalisti in Napoli*. 91:1-14.

Gutt J. and Piepenburg D. (1991). Dense aggregations of three deep-sea holothurians in the southern Weddell Sea, Antarctica. *Marine Ecology Progress Series* 68:277-285.

Hadrys H., Balick M. and Schierwater B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular ecology* 1: 55-63.

Kelly A. Boesenberg-Smith, PSM, Mohammad M. Pessaraki, M.D., and Donna M. Assessment of DNA Yield and Purity: an Overlooked Detail of PCR Troubleshooting *Clinical Microbiology Newsletter*. 34(1).

Lawrence A.J. (2006). Darwin Initiative for the Sustainable Use of Sea Cucumber in Egypt and the Red Sea. *Department of Biological Sciences, University of Hull*. Annual Report 2006.

Lemaire C., Allegrucci G., Naciri M., Bahri-Sfar L., Kara H., and Bonhomme F. (2000). Do discrepancies between microsatellites and allozyme variation reveal differential selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Molecular Ecology* 9:457–468.

Lynch M. and Milligan B. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91–99.

Massin C. and Jangoux M. (1976). Observations ecologiques sur *Holothuria tubulosa*, *H. poli* et *H. forskali* (Echinodermata-Holothuroidea) et comportement alimentaire de *H. tubulosa*. *Cahiers de Biologie Marine*, Tome XVII 45-59.

Mezali K., Chekaba B., Zupo V. and Asslah B. (2003). Comportement alimentaire de cinq especes d'holothuries aspidochiotes de la presqu'ile de Sidi Fredj (Algerie). *Bulletin de la Societe zoologique de France*. 128(1-2):49-62.

Miller, T. J., Crowder L. B., Rice J. A., and Marschall E. A. 1988. Larval size and recruitment mechanisms in fish: towards a conceptual framework. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45:1657-1670.

Naish K.A., Warren M., Bardakci F., Skibinski D.O.F., Carvalho G.R., Mair G.C. (1995). Multilocus DNA fingerprinting and RAPD reveal similar genetic relationships between strains of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) *Molecular Ecology*. 4:271-274.

Ocana A. and Sanchez T.L. (2005). Spawning of *Holothuria tubulosa* in the Alboran Sea. *Zoologica baetica*. 16:147-150.

Parker P.G., Sow A.A., Schug M.D., Booton G.C. and Fuerst P.A. (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79:361–382.

Paul A.Z. and Menzies R.J. (1974). Benthic Ecology of the High Arctic Deep Sea. *Marine Biology* 27:251-262.

Pogson G.H., Mesa K.A., and Boutilier R.G. (1995). Genetic population and gene flow in the Atlantic cod *Gadus morhua*: a comparison of allozyme and nuclear RFLP loci. *Genetics* 139:375–385.

Sewell M.A. (1992). Reproduction of the temperate aspidochirote *Stichopus mollis* in New Zealand. *Ophelia*. 35:103-121.

Sewell M.A. and Bergquist P.R. (1990). Variability in the reproductive cycle of *Stichopus mollis*. *Invertebrate Reproduction and Development*. 17:1-7.

Simunovic A. and Grubelic I. (1998). A contribution to the knowledge of the species *Holothuria tubulosa* Gmellin, 1788 in the coastal area of the central eastern Adriatic. *Acta Adriatica*. 39(1):13-23.

Simunovic A., Piccinetti C., Bartulovic M. and Grubelic I. (2000). Distribution and abundance of the species *Holothuria tubulosa* Gmellin, 1788 and *Holothuria forskali* Delle Chiaje, 1823 in the Adriatic Sea. *Acta Adriatica*. 41:3-16.

Schunter C., Carreras-Carbonell J., Macpherson E., Tintore J., Vidal-Vijande E., Pascual A., Guidetti P. and Pascual M. (2011). Matching genetics with oceanography: directional gene flow in a Mediterranean fish species. *Molecular Ecology*. 20 : 5167-5181.

Sunnucks P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution* 15:199–203.

Suyama Y., Obayashi K., Hayashi I. (2000). Clonal structure in a dwarf bamboo (*Sasa senanensis*) population inferred from amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprints. *Molecular Ecology* 9:901–906.

Tanti C.M. and Schembri P.J. (2006). A synthesis of the echinoderm fauna of the Maltese islands. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 86:163-165.

Taylor K. (1967). The chromosomes of some lower chordates. *Chromosome* 21:181–188.

Tortonese E. (1965). Fauna d'Italia-Echinodermata. Bologna: Claderini.

Uthicke S. (1997). Seasonality of asexual reproduction in *Holothuria atra*, *Holothuria edulis* and *Stichopus chloronotus* on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*. 129: 435-441.

Valls A. (2004). Natural spawning observation in *Holothuria tubulosa*. *SPC Beche-de-Mer information Bulletin*. 19: 40.

Warnau M., Dutrieux S., Ledent G., Rodriguez y Baena A.M. and Dupois P. (2006). Heavy metals in the sea cucumber *Holothuria tubulosa* from the Mediterranean *Posidonia oceanica* Ecosystem: Body compartment, Seasonal, Geographical and Bathymetric variations. *Environmental Bioindicators*. 1:268-285.

Welsh J. and McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrarily primers. *Nucleic Acids Research* 18:7213–7218.

Williams J., Hanafey M., Rafalski J., and Tingey S. (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymology* 218:704–740.

Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski J., and Tingey S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531–6535.

Yu K. and Pauls K. (1993). Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. *Theoretical and Applied Genetics* 86:788–794.

5.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

Καζανίδης Γ. (2010). Δυναμική πληθυσμών και αναπαραγωγή του *Holothuria tubulosa* (Holothuroidea: Echinodermata) στο Αιγαίο. Προπτυχιακή Διατριβή Εργασία. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Λαζαρίδου – Δημητριάδου Μ. (1984). Holothuroidea (Ολοθουροειδή). *Γενική Ζωολογία*. 264-267.

6. ABSTRACT

Sea cucumbers are an important link of marine benthic fauna that's why their biological and functional characteristics are researched. However, genetic approaches to such organisms are minimal. In this thesis we studied the genetic polymorphism of *Holothuria tubulosa* with 206 samples collected from 6 different regions of the Aegean sea. The genetic polymorphism was determined by the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. In this technique we used 35 random decamer primers. The main purpose was to select those who would give the highest level of polymorphism in order to study the extend of diversification of that species from one region to another. Due to certain difficulties such as the nature and preservation of the samples and the quality of the primers the experiment turned to find the most suitable combination of sampling and materials that would give the desired results. After about 6 months of laboratory tests became clear that the sea cucumber *Holothuria tubulosa* contains substances in its skin (such as calcium fragments) which inhibit the DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR). It was found that the best DNA quality was extracted by the gonads and the tentacles as well as the DMSO solution (to -24°C) and the liquid nitrogen are the best way to preserve such tissues. Despite the sufficient number of samples it is proved that none was appropriate to fulfill the present study.

Key words: Sea cucumber, random amplified polymorphic DNA, polymerase chain reaction, primers.