

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μοριακή ποικιλότητα μικροευκαρυωτών από την υδάτινη στήλη της
λίμνης Κάρλας»**

ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΑΝΔΡΕΑΣ

ΒΟΛΟΣ 2010

**«Μοριακή ποικιλότητα μικροευκαρυωτών από την υδάτινη στήλη της λίμνης
Κάρλας»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1) Κωνσταντίνος Κορμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία υδρόβιων μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.

2) Ιφιγένεια Κάγκαλου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Υδρολογία - Λιμνολογία και Ποταμολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

3) Μαρία Μουστάκα – Γούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Υδροβοτανική, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, **Μέλος**.

**«Κάποτε γνώρισα μια λίμνη
που 'θελε να' ναι θάλασσα»**

Μιλτιάδης Πασχαλίδης – Παραμύθι με λυπημένο τέλος (1995)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το θέμα της παρούσης μελέτης, μου ανατέθηκε και πραγματοποιήθηκε υπό την καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωσταντίνου Κορμά, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και πρώτο από όλους για την επιστημονική του καθοδήγηση, τις συμβουλές του αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Ευχαριστώ τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής μου, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Μαρία Μουστάκα - Γούνη καθώς και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Ιφιγένεια Κάγκαλου, που βοήθησαν με τα εποικοδομητικά τους σχόλια στη βελτίωση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστίες χρωστάω επιπλέον στις κα Μαρία Παχιαδάκη και κα Αλεξάνδρα Μεζίτη, για τις χρήσιμες υποδείξεις τους κυρίως στο πειραματικό μέρος της εργασίας μου.

Με περισσή ευγνωμοσύνη ευχαριστώ τους γονείς μου, οι οποίοι στηρίζουν τις αποφάσεις της ζωής μου.

Τέλος, ευχαριστώ και όλους τους ανθρώπους οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου, τα ονόματα των οποίων δε μπορούν να αναφερθούν, αλλά πρέπει να γνωρίζουν ότι έχουν τόσο το σεβασμό, όσο και την ευγνωμοσύνη μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μικροσκοπικοί ευκαρυώτες, κατέχοντας μία σειρά δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών, παίζουν σημαντικό ρόλο στα υδάτινα οικοσυστήματα. Μόλις πρόσφατα έχουν αρχίσει να γίνονται έρευνες των μικροσκοπικών ευκαρυωτικών οργανισμών και οι περισσότερες από αυτές επικεντρώνονται στα θαλάσσια οικοσυστήματα.

Στην παρούσα μελέτη, έγινε προσπάθεια να εκτιμηθεί η μοριακή ποικιλότητα των μικροσκοπικών ευκαρυωτών στη υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας. Δείγμα νερού συλλέχθηκε το Μάρτιο του 2010. Χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές βασισμένες στη δημιουργία βιβλιοθηκών του φυλογενετικού γονιδίου 18S rRNA για την ανάλυση της ποικιλότητας. Οι βιβλιοθήκες που δημιουργήθηκαν αποτελούνταν από δύο κλάσματα των νάνο- και πικοευκαρυωτών. Αναλύθηκε ένα σύνολο 65 και 78 κλώνων και αποκαλύφθηκαν 27 και 32 μοναδικοί φυλότυποι από τις βιβλιοθήκες των νάνο- και πικοευκαρυωτών, αντίστοιχα. Κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δένδρο, χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες των γονιδίων και οι φυλότυποι ομαδοποιήθηκαν σε 11 μεγάλες ταξινομικές ομάδες. Η ταξινομική ομάδα των Cercozoa κυριάρχησε και στις δύο βιβλιοθήκες, ακολουθούμενη από την ταξινομική ομάδα των Chlorophyta. Η κοινότητα των μικροσκοπικών ευκαρυωτών φάνηκε να είναι μη εξειδικευμένη σε επίπεδο είδους και η ποικιλότητα που παρατηρήθηκε ήταν υψηλή. Χαρακτηριστική ήταν η παρουσία φυλότυπων που σχετίστηκαν φυλογενετικά με είδη που παράγουν τοξίνες, καθώς και με παρασιτικά είδη.

Λέξεις κλειδιά: μικροσκοπικοί ευκαρυώτες, γονίδιο 18S rRNA, λίμνη Κάρλα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά μικροσκοπικών ευκαρυωτών.....	1
1.2 Γενικές ιδιότητες μικροοργανισμικών κοινοτήτων.....	3
1.3 Δυσκολίες μελέτης μικροσκοπικών ευκαρυωτών.....	5
1.4 Προσεγγίσεις στην ανάλυση ποικιλότητας μικροσκοπικών ευκαρυωτών.....	7
1.5 Σκοπός της εργασίας.....	8
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	9
2.1 Περιοχή μελέτης.....	9
2.2 Δειγματοληψία – Επεξεργασία δείγματος.....	10
2.3 Απομόνωση DNA.....	11
2.4 Ενίσχυση φυλογενετικού γονιδίου 18S rRNA.....	11
2.5 Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	14
2.6 Δημιουργία βιβλιοθηκών DNA.....	14
2.7 Έλεγχος αποικιών.....	15
2.8 Απομόνωση πλασμιδίων.....	17
2.9 Αλληλούχιση.....	17
2.10 Υπολογισμός κάλυψης βιβλιοθηκών.....	18
2.11 Υπολογισμός δεικτών ποικιλότητας.....	18
2.12 Φυλογενετική ανάλυση.....	20
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	22
3.1 Κάλυψη βιβλιοθήκης.....	22
3.2 Ανάλυση φυλοτύπων.....	23
3.3 Ταξινομικές ομάδες των δυο βιβλιοθηκών.....	29

3.4 Ανάλυση ποικιλότητας	30
3.5 Παρουσίαση φυλογενετικού δένδρου	30
3.6 Εμφάνιση όμοιων φυλοτύπων.....	38
3.7 Χαρακτηριστικά των ταξινομικών ομάδων που βρέθηκαν.....	40
4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	53
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58
6.ABSTRACT.....	72
7.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	73
7.1 Αντίγραφο περίληψης 5 ^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Οικολογίας, Πάτρα 2010.....	I
7.2 Αντίγραφο αναρτημένης ανακοίνωσης 14 th International Conference on Harmful Algae, Κρήτη 2010.....	II

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το σωματικό μέγεθος του ανθρώπου ως είδος είναι μεγάλο σε σύγκριση με τους περισσότερους από τους υπόλοιπους έμβιους οργανισμούς. Ο Keddy (1989) αναφέρει ότι το σωματικό μέγεθος του είδους μας, επηρεάζει την αντίληψη που έχουμε για τη φύση και η βιολογική έρευνα στρέφεται περισσότερο στα σπονδυλωτά, θεωρώντας τα την πιο σημαντική ταξινομική ομάδα. Από την άλλη πλευρά, τα έντομα έχουν το μεγαλύτερο αριθμό ειδών στη βιόσφαιρα (Samways 1993) και οι περισσότερες έρευνες συνδυάζουν τη βιοποικιλότητα με μεγάλου μεγέθους οργανισμούς (Pace 1997). Ωστόσο, αν διαμελισθεί ένα έντομο και εξεταστεί στο μικροσκόπιο, θα παρατηρήσουμε εκατοντάδες είδη μικροοργανισμών, αλλά ακόμη και μία χούφτα χώματος περιέχει τόσους μικροοργανισμούς που ο ακριβής αριθμός τους παραμένει άγνωστος (Pace 1997). Η ύπαρξη των μικροοργανισμών ανακαλύφθηκε πριν περίπου 300 χρόνια με την ανακάλυψη του μικροσκοπίου από το Leeuwenhoek και η μικροοργανισμική ποικιλότητα σε πολλά μέρη του πλανήτη μας παραμένει σχετικά άγνωστη. Εάν θέλουμε να κατανοήσουμε τη βιόσφαιρα είναι σημαντικό να πραγματοποιούνται έρευνες της μικροοργανισμικής κοινότητας στο περιβάλλον (Pace 1997).

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά μικροσκοπικών ευκαρυωτών

Οι ευκαρυώτες (Eukarya) αποτελούν μία από τις τρεις επικράτειες (domains) της ζωής, με τις άλλες δύο να είναι τα Archaea και τα Bacteria (Woese *et al.* 1990). Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης οι ευκαρυώτες έχουν αναπτύξει αρκετά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Ένα από αυτά είναι η ικανότητά τους να εγκολπώνουν τεμάχια τροφής ή άλλα κύτταρα, διαδικασία γνωστή ως φαγοκυττάρωση. Αυτό το

πρότυπο τροφοληψίας διευκόλυνε το σχηματισμό μόνιμων σχέσεων μεταξύ διαφορετικών μορφών ζωής μέσω της ενδοσυμβίωσης και διεύρυνε τους χρησιμοποιούμενους οικολογικούς θώκους (Stanier 1970).

Οι υδρόβιοι μικροσκοπικοί ευκαρυωτικοί οργανισμοί απαντώνται τόσο σε θαλάσσια όσο και σε λιμναία οικοσυστήματα, καταλαμβάνοντας ένα σημαντικό μέρος της βιομάζας (Courties *et al.* 1994, Fogg 1995). Οι μικροσκοπικοί ευκαρυώτες είναι πιθανό να ανήκουν σε διαφορετικές λειτουργικές ομάδες και επομένως παίζουν σημαντικό ρόλο ως αυτότροφοι, ετερότροφοι ή μικτότροφοι οργανισμοί (Lepere *et al.* 2007). Ανάλογα με το μέγεθός τους ταξινομούνται σε πικοευκαρυώτες με μέγεθος από 0,2-2 μm , νανοευκαρυώτες με μέγεθος από 2-20 μm και μικροευκαρυώτες με μέγεθος 20-200 μm (*sensu* Fenchel 1987). Στους μικροσκοπικούς ευκαρυώτες ανήκουν τα πικοφύκη (picoalgae) που συμμετέχουν στην πρωτογενή παραγωγή καθώς και τα μαστιγιοφόρα, άχρωμα ετερότροφα κύτταρα, τα οποία θεωρούνται οι σημαντικότεροι βοσκητές προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων και έχουν σημαντικό ρόλο στην ανοργανοποίηση του οργανικού υλικού (Caron *et al.* 1999a). Παρά το μικρό τους μέγεθος, έχει βρεθεί ότι τα πικοφύκη ($< 2 \mu\text{m}$, *sensu* Fenchel 1987) συνεισφέρουν τουλάχιστον στο 10% της παγκόσμιας πρωτογενούς παραγωγής των υδάτινων οικοσυστημάτων (Fouilland *et al.* 2004). Πειράματα σε συνθήκες έλλειψης και περίσσειας αζώτου έδειξαν ότι οι πικοευκαρυώτες βρίσκονται σε πλεονεκτική θέση έναντι των μεγαλύτερων κυττάρων ως προς την πρόσληψη του στοιχείου αυτού, εξαιτίας της μεγαλύτερης επιφάνειας προς όγκο (Fouilland *et al.* 2004). Στην ίδια μελέτη οι πικοευκαρυώτες φάνηκε να είναι πιο αποτελεσματικοί στην απορρόφηση των φωτονίων και συνεπώς στην αποτελεσματικότερη αξιοποίηση ενός θρεπτικού σε συνθήκες έλλειψης.

Ετερότροφα και μικτότροφα μαστιγωτά, βλεφαριδωτά αλλά και δινομαστιγωτά μπορούν να βρεθούν από τις παγωμένες λίμνες της Ανταρκτικής (Laybourn-Parry *et al.* 2000) έως το θαλασσίνο νερό που βρίσκεται κάτω από τους πάγους του Αρκτικού Ωκεανού (Sherr *et al.* 1997). Η εξάπλωση των αυτότροφων πικοευκαρυωτών περιορίζεται στα ανώτερα 100-200 m (ευφωτική ζώνη) και μειώνεται σημαντικά με την αύξηση του βάθους (Hall & Vincent 1990). Οι συγκεντρώσεις των μικροσκοπικών ευκαρυωτών στην εύφωτη ζώνη των υδάτινων οικοσυστημάτων κυμαίνονται μεταξύ 10^2 και 10^4 κύτταρα ανά ml νερού (Caron *et al.* 1999a) και αποτελούν δομικό λίθο στα θαλάσσια τροφικά πλέγματα (Diez *et al.* 2001b). Επιπλέον, ένα μεγάλο μέρος των μικροσκοπικών ευκαρυωτών, κυρίως Fungi και Perkinsozoa ανήκουν σε πιθανά παράσιτα του φυτοπλαγκτού (Lepere *et al.* 2008). Οι μελέτες επικεντρώνονται κυρίως στους μικροσκοπικούς ευκαρυώτες των θαλάσσιων τροφικών πλεγμάτων και συνεπώς η ποικιλότητα, η κατανομή και η αφθονία των μικροσκοπικών ευκαρυωτών που διαβιούν σε εσωτερικά ύδατα παραμένουν γενικώς άγνωστες (Lepere *et al.* 2007).

1.2 Γενικές ιδιότητες μικροοργανισμικών κοινοτήτων

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε βιοκοινότητες εσωτερικών αλλά και θαλάσσιων οικοσυστημάτων έπαιξαν σπουδαίο ρόλο στην ιστορία και την ανάπτυξη της επιστήμης της οικολογίας (Lindeman 1942, Hutchinson 1957, Paine 1980). Στις μικροοργανισμικές κοινότητες, η αύξηση μεμονωμένων κυττάρων οδηγεί στο σχηματισμό πληθυσμών. Πληθυσμοί οι οποίοι είναι μεταβολικά συγγενείς ονομάζονται μεταβολικές ομάδες ενώ σύνολα μεταβολικών ομάδων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζουν τις μικροοργανισμικές κοινότητες. Οι μικροοργανισμικές κοινότητες

αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον καθορίζοντας ολόκληρο το οικοσύστημα (Madigan *et al.* 2005).

Τα φυσικά ενδιαίτηματα των μικροοργανισμών παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλότητα. Όποιο ενδιαίτημα επιτρέπει την ανάπτυξη ανώτερων οργανισμών μπορεί επίσης να υποστηρίξει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ωστόσο, η ανάπτυξη μικροοργανισμών παρουσιάζει αξιοσημείωτη επιτυχία σε ακραίες περιβαλλοντικές και φυσικές-χημικές συνθήκες (Madigan *et al.* 2005) όπου δεν υπάρχουν ανώτεροι μικροοργανισμοί. Σημαντικές αλλαγές σε περιβαλλοντικές παραμέτρους θα προκαλέσουν μαζικές αλλαγές στη δομή των μικροοργανισμικών κοινοτήτων, αλλά ακόμα και ήπιες αλλαγές είναι γνωστό ότι επιφέρουν αλλαγές στη σύσταση της μικροοργανισμικής κοινότητας (Caron & Countway 2009). Ένα άλλο χαρακτηριστικό των μικροοργανισμικών κοινοτήτων δίνεται από τον όρο “σπάνια βιόσφαιρα” (rare biosphere) και αναφέρεται στο μεγάλο αριθμό ταξινομικών μονάδων που είναι παρόντες σε πολλές μικροοργανισμικές κοινότητες αλλά σε μικρές αφθονίες. Ο όρος αυτός έχει εμφανιστεί στην επιστημονική βιβλιογραφία σχετικά πρόσφατα και είναι απόρροια μελετών μικροοργανισμικής ποικιλότητας με τεχνικές που χρησιμοποιούν την ανάλυση αλληλουχιών DNA (Sogin *et al.* 2006). Ο παραπάνω όρος δεν περιορίζεται σε μία συγκεκριμένη ομάδα μικροοργανισμών ή σε συγκεκριμένες μικροοργανισμικές κοινότητες, καθώς και σε ιζήματα έχουν παρατηρηθεί αρκετές σπάνιες αλληλουχίες ανάμεσα σε ένα μικρό αριθμό επικρατουσών αλληλουχιών (Elshahed *et al.* 2008).

Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν εποχικές αλλαγές στη δομή της κοινωνίας των μικροσκοπικών ευκαρυωτών σε σχέση με περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως η βόσκηση, αλλά και με τους πόρους του συστήματος (Cleven & Weisse 2001). Η δομή της κοινότητας μπορεί επίσης να αλλάξει από την παρουσία ή την απουσία ιών

(Fuhrman 1999). Οργανισμοί όπως τα Cladocera και ειδικά το γένος της *Daphnia* είναι γνωστό ότι λειτουργούν ως βοσκητές σε ένα μεγάλο φάσμα σωματιδίων στην υδάτινη στήλη (Jurgens 1994). Ετερότροφα μαστιγωτά μπορούν επίσης να ασκούν άνωθεν (top-down) επιρροή στο τροφικό επίπεδο καταναλώνοντας βακτήρια κατά προτίμηση (Sakka *et al.* 2000) αλλά και μικρά ευκαρυωτικά φύκη (Parslow *et al.* 1986).

1.3 Δυσκολίες μελέτης μικροσκοπικών ευκαρυωτών

Το μικρό μέγεθος των μονοκύτταρων ευκαρυωτικών οργανισμών δυσχεραίνει την ταξινόμηση τους με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά που είναι ορατά με οπτικό ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα ταξινομικά κριτήρια όπως οι εξωτερικές κυτταρικές δομές (κυτταρικά τοιχώματα, περιβλήματα, μαστίγια) απουσιάζουν από τους μικρού μεγέθους εκπροσώπους των μονοκύτταρων ευκαρυωτών ή αλλοιώνονται κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, συντήρησης και εξέτασής τους (Caron *et al.* 1999b). Επιπλέον, η μορφολογική ταξινόμηση έχει περιορισμούς διότι διαφορετικά είδη μπορεί να έχουν ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά (Laurin *et al.* 2008). Η μελέτη μονοκύτταρων μικροοργανισμών με μεθόδους καλλιέργειας εμπλουτισμού μπορεί να αλλοιώσει την ποικιλότητα και να υπερεκτιμήσει μικροοργανισμούς που δεν είναι άφθονοι στο υπό μελέτη οικοσύστημα (Lim *et al.* 1999). Η άποψη που σχηματίζουμε από καλλιεργητικές προσεγγίσεις για τη μικροοργανισμική ποικιλότητα απέχει από την πραγματικότητα καθώς αρκετοί μικροοργανισμοί είναι αδύνατο να καλλιεργηθούν με τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους καλλιέργειας (Pace 1997). Τέλος, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και οι θρεπτικές απαιτήσεις που χαρακτηρίζουν ένα μικροοργανισμό αποτύγχαναν στον προσδιορισμό της εξελικτικής σχέσης μεταξύ των μικροοργανισμών.

Συνεπώς, η γενική έλλειψη διακριτών μορφολογικών χαρακτηριστικών για αυτούς τους μονοκύτταρους οργανισμούς και η επιλεκτικότητα του εμπλουτισμού οδήγησε στην μελέτη των μικροσκοπικών οργανισμών με μοριακές τεχνικές εξαλείφοντας αρκετούς περιορισμούς. Πρωτοπόρος στην χρήση μοριακών τεχνικών ήταν ο Carl Woese ο οποίος συγκρίνοντας αλληλουχίες που κωδικοποιούν τις ριβοσωμικές υπομονάδες συνέδεσε φυλογενετικά τους περισσότερους οργανισμούς αναθεωρώντας την γνώση που έχουμε για την εξέλιξη της ζωής. Μόλις πρόσφατα οι μοριακές τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των μικροσκοπικών ευκαρυωτών στα υδάτινα οικοσυστήματα (Diez *et al.* 2001a, Moon van der Staay *et al.* 2001, Massana *et al.* 2002). Ωστόσο, πληροφορίες μοριακών αλληλουχιών φάνηκαν χρήσιμες και σε παλαιότερες μελέτες στον υπολογισμό δεικτών ποικιλότητας (Watve & Gangal 1996, Nubel *et al.* 1999). Η κύρια μοριακή τεχνική βασίζεται στην ανάλυση του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (small subunit rRNA) με στόχο την εύρεση της μοριακής ποικιλότητας των μικροσκοπικών ευκαρυωτών σε διάφορα οικοσυστήματα (Massana *et al.* 2004, Takishita *et al.* 2007, Lefevre *et al.* 2008).

Το ριβοσωμικό RNA και τα αντίστοιχα γονιδιά του είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μόρια για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ ειδών (van de Peer *et al.* 1993). Οι Olsen και Woese (1993) τόνισαν τα πλεονεκτήματα των μορίων rRNA ως μοριακά ρολόγια, καθώς είναι μόρια σταθερά παρόντα σε όλα τα είδη που παράγουν πρωτεΐνες. Ο αριθμός των διαφορών στην αλληλουχία ενός μακρομορίου είναι ανάλογος με τον αριθμό των σταθερών μεταλλάξεων οι οποίες παγιώνονται στο DNA που κωδικοποιεί το μακρομόριο αυτό στους δυο υπό σύγκριση οργανισμούς (Madigan *et al.* 2005). Ο ρυθμός μετάλλαξης της

υπό μελέτη αλληλουχίας πρέπει να μεταβάλλεται με τρόπο κατάλληλο για την μετρούμενη εξελικτική απόσταση. Οι van de Peer *et al.* (1993) σημειώνουν ότι η μεγάλη υπομονάδα του ριβοσωμικού RNA επειδή είναι μεγάλο μόριο έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να υποστεί μετάλλαξη και συνεπώς είναι κατάλληλο μόριο για κοντινές εξελικτικές σχέσεις. Αντίθετα η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα είναι ένα μοριακό ρολόι που δείχνει βαθύτερα στον εξελικτικό χρόνο και δίνει τις πιο διαφωτιστικές πληροφορίες για τους μικροοργανισμούς. Οι ριβοσωμικές υπομονάδες περιέχουν αρκετές περιοχές με εκτενώς συντηρημένες αλληλουχίες χρήσιμες για την επίτευξη σωστών στοιχίσεων ενώ χαρακτηρίζονται από σημαντική μεταβλητότητα σε άλλες περιοχές τους καθιστώντας τες εξαιρετικά φυλογενετικά χρονόμετρα (Madigan *et al.* 2005)

1.4 Προσεγγίσεις στην ανάλυση ποικιλότητας μικροσκοπικών ευκαρυωτών

Το γονίδιο που χρησιμοποιείται για φυλογενετική ανάλυση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι το 18S rRNA και μπορεί να ενισχυθεί και να κλωνοποιηθεί από περιβαλλοντικά δείγματα. Οι Ranjard *et al.* (2000) αναφέρουν ότι οι μοριακές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται ώστε να ερευνηθεί η γενετική πληροφορία από μικροοργανισμικές κοινότητες του περιβάλλοντος, ονομάζονται αναλύσεις DNA ολόκληρης της κοινότητας. Μέσα σε λίγα χρόνια, η ανάλυση γονιδίων της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας που ενισχύονται άμεσα από περιβαλλοντικά δείγματα έχει αλλάξει πλήρως την θεώρηση που είχαμε για την βιόσφαιρα (Pace 1997). Συγκρινόμενη με την ανάλυση της βιοποικιλότητας πολυκύτταρων ζώων και φυτών η ανάλυση της μικροοργανισμικής ποικιλότητας αποτελεί πρόκληση. Δείκτες ποικιλότητας που χρησιμοποιούνται στην οικολογία των φυτών και των ζώων

χρησιμοποιούνται επίσης από την επιστήμη της μικροοργανισμικής οικολογίας (Ludwig & Reynolds 1988). Αν και υπάρχει περιορισμός ως προς την χρήση τέτοιων δεικτών στην ανάλυση της μικροοργανισμικής κοινότητας, επειδή δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε άμεσα το είδος, αρκετές μελέτες στο παρελθόν χρησιμοποίησαν τέτοιους δείκτες (Torsvik *et al.* 1989, Leach *et al.* 1992, Moyer *et al.* 1994). Συνεπώς, η χρήση φυλογενετικών δένδρων αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στην μελέτη μικροοργανισμικών κοινοτήτων. Μελέτες αλληλουχιών του γονιδίου 18S rRNA τόσο από καλλιεργημένα αλλά και μη καλλιεργημένα είδη, υποδηλώνουν ότι οι εξελικτικές αποστάσεις τους μπορούν να διαχωρίσουν μεγάλες κατηγορίες των Πρωτοζώων (Park *et al.* 2008). Οι Massana *et al.* (2004) αναφέρουν πως η δημιουργία βιβλιοθηκών με γονίδια της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας από περιβαλλοντικά δείγματα επιτρέπει τον προσδιορισμό της ποσοτικής σύστασης της μικροοργανισμικής κοινότητας και την εύρεση της φυλογενετικής ποικιλότητας. Επιπλέον, η ανάλυση αλληλουχιών του γονιδίου 18S rRNA μπορεί να δώσει τη σχετική συνεισφορά διαφορετικών ταξινομικών ομάδων σε ένα υδάτινο οικοσύστημα (Not *et al.* 2009)

1.5 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εκτίμηση της ποικιλότητας του γονιδίου 18S rRNA στη λίμνη Κάρλα στις αρχές της άνοιξης. Εκτιμήθηκε η ποικιλότητα τόσο των πικο- (0,2 – 2 μm) όσο και των νανοευκαρυωτών (2-20 μm). Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό να συμβάλει στην γνώση μας για την ποικιλότητα των μικροσκοπικών ευκαρυωτικών οργανισμών που διαβιούν στα εσωτερικά υδάτινα οικοσυστήματα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Η περιοχή της μελέτης

Η λίμνη Κάρλα (39° 29'02''N, 22° 51'41''E) είναι η περιοχή στην οποία διενεργήθηκε η δειγματοληψία. Η λίμνη βρίσκεται υπό καθεστώς πλήρωσης καθώς αποστραγγίστηκε το 1962 μέσω σήραγγας προς τον Παγασητικό Κόλπο αφήνοντας μόνιμες μικρής έκτασης ελώδεις περιοχές. Η δομή και η λειτουργία της λίμνης ήταν άμεσα συνδεδεμένη με τον ποταμό Πηνειό, καθώς τα πλημμυρικά φαινόμενα του Πηνειού παρείχαν νερό στην Κάρλα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Το παραπάνω στοιχείο σε συνδυασμό με την ποικιλότητα των ειδών ορνιθοπανίδας και ιχθυοπανίδας χαρακτήριζαν την λίμνη ως εύτροφη αλλά με μεγάλη σταθερότητα πριν από την αποξήρανσή της (Ananiadis 1956).

Η απόφαση για την επαναπλήρωση της λίμνης λήφθηκε στη δεκαετία του 1990 εκτρέποντας νερό από τον ποταμό Πηνειό, όμως η πραγματική πλήρωσή της ξεκίνησε το Σεπτέμβριο του 2009, αφού πρώτα είχε κατασκευαστεί περιφερειακό φράγμα που περικλείει έκταση 38 km². Η πρόσφατα αποκατασταθείσα λίμνη αντιπροσωπεύει ένα μοναδικό οικοσύστημα για τη μελέτη των μικροσκοπικών ευκαρυωτών, καθώς η οικολογική διαδοχή των βιοκοινοτήτων της διακόπηκε απότομα τη δεκαετία του '60 και επανεκκινήθηκε τεχνητά τον τελευταίο χρόνο. Ένα τέτοιο οικοσύστημα βρίσκεται υπό συνεχείς μεταβολές, μέχρι η λίμνη να σταθεροποιήσει τη στάθμη της. Αυτές οι μεταβολές σε συνδυασμό με την επικρατούσα κλιματική αλλαγή καθιστούν αυτό το οικοσύστημα μοναδικό για τη μελέτη του εποικισμού και την επακόλουθη εγκατάσταση μικροοργανισμών και μικροοργανισμικών κοινοτήτων σε φυσική κλίμακα.

2.2 Δειγματοληψία – Επεξεργασία δείγματος

Δείγμα νερού συλλέχθηκε επιφανειακά από την παρόχθια ζώνη της λίμνης κατά τον Μάρτιο του 2010. Την ημέρα της δειγματοληψίας η θερμοκρασία του νερού ήταν 12,5° C, το pH είχε τιμή 8,3, η αγωγιμότητα 55,6 mS και η αλατότητα 7,6 psu. Οι παραπάνω τιμές μετρήθηκαν με φορητό *in situ* ανιχνευτή WTW. Το δείγμα νερού διηθήθηκε σχεδόν αμέσως μετά τη συλλογή του χρησιμοποιώντας συσκευή διήθησης μέσω μεμβρανικού ηθμού. Πραγματοποιήθηκε προ-διήθηση χρησιμοποιώντας ηθμό με μέγεθος πόρων 180 μm ώστε να παρακρατηθούν μεγάλα τεμάχια οργανικού υλικού και ζωοπλαγκτού. Οι σχετικά μεγάλοι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που τυχόν υπήρχαν παρακρατήθηκαν διενεργώντας μία ακόμα προ-διήθηση με ηθμό των 20 μm ώστε να αποφευχθεί το φράξιμο των ηθμών με μικρότερους πόρους. Αναφέρεται ότι κατά την διαδικασία διήθησης κύτταρα μεγαλύτερα από το μέγεθος των πόρων του ηθμού μπορεί να περάσουν και να παρακρατηθούν στον επόμενο ηθμό που θα χρησιμοποιηθεί, φράζοντάς το και παρακρατώντας οργανισμούς μικρότερους από τους επιθυμητούς (Diez *et al.* 2001b). Ακολούθησαν άλλες δυο διαδοχικές διηθήσεις χρησιμοποιώντας ηθμούς των 2 μm και 0,2 μm ώστε να συγκεντρώσουμε πάνω σε αυτά, τα επιθυμητά κλάσματα των νανοευκαρυωτών και πικοευκαρυωτών, αντίστοιχα. Η διαδικασία της διήθησης πραγματοποιήθηκε υπό κενό του οποίου όμως η πίεση ήταν μικρότερη από 150 mm Hg ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή των κυττάρων που επικάθονταν στο φίλτρο. Τα φίλτρα των 2 και 0,2 μm αποθηκεύτηκαν προσωρινά στους -24° C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

2.3 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το τυποποιημένο UltraClean Soil DNA isolation kit (MoBio Laboratories) ακολουθώντας το πρωτόκολλο που προτείνει ο κατασκευαστής για μέγιστη απόδοση. Το πρωτόκολλο απομόνωσης βασίζεται στον συνδυασμό μηχανικής λύσης των κυττάρων με εξειδικευμένα σφαιρίδια, θέρμανσης και χρήσης απορρυπαντικών. Για την απομόνωση του DNA από το κλάσμα των νανοευκαρυωτών χρησιμοποιήθηκαν δυο φίλτρα των 2 μm όπου συνολικά είχαν διηθηθεί 350 ml νερού και άλλα δυο φίλτρα των 0,2 μm για το κλάσμα των πικοευκαρυωτών όπου συνολικά είχαν διηθηθεί 400 ml νερού. Τα φίλτρα τεμαχίστηκαν σε λεπτές λωρίδες χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο νυστέρι. Το ολικό DNA φυλάχτηκε στους $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ μετά το τέλος της απομόνωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με χρήση φασματοφωτομέτρου NanoDrop ND-1000 δίνοντας τιμές 10,6 ng/ μL για το κλάσμα των νανοευκαρυωτών και 13,3 ng/ μL για το κλάσμα των πικοευκαρυωτών.

2.4 Ενίσχυση φυλογενετικού γονιδίου 18S rRNA

Το ανακτώμενο DNA είναι μείγμα γονιδιωματικού DNA όλων των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο ενδιαίτημα. Η ενίσχυση γίνεται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελεί τον ταχύτερο τρόπο ώστε να ερευνήσουμε τους μικροοργανισμούς από ένα περιβαλλοντικό δείγμα (Saiki *et al.*, 1988).

Για τον έλεγχο ενίσχυσης του γονιδίου 18S rRNA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές EukA (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') και EukB (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3') οι οποίοι είναι ειδικοί για ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Medlin *et al.*, 1988). Ο εκκινητής EukA προσδένεται στις θέσεις 2 έως 22

του γονιδίου 18S rRNA του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Αντίστοιχα, ο εκκινητής EukB στο γονίδιο 18S rRNA του μύκητα *S. cerevisiae* προσδένεται στις θέσεις 1795 έως 1772 (Behnke *et al.*, 2006). Το μείγμα της PCR τελικού όγκου 50 μ L περιείχε περίπου 10,6 ng περιβαλλοντικού DNA για τους νανοευκαρυώτες και περίπου 13,3 ng περιβαλλοντικού DNA για τους πικοευκαρυώτες, 10 μ L buffer 5x (Green GoTaq Flexi buffer, Promega), 200 μ M από κάθε 5'-τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 μ M από κάθε εκκινητή και 1,25 U Taq πολυμεράσης (GoTaq DNA polymerase, Promega). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR ήταν αρχική αποδιάταξη στους 95° C για 15 min, ακολουθούμενη από τρία στάδια:

- a) της αποδιάταξης στους 95° C για 45 sec
- b) της υβριδοποίησης των εκκινητών στους 55° C για 1 min και
- c) της επιμήκυνσης των θυγατρικών κλώνων στους 72° C για 2 min και 30 sec.

Ο θερμοκρασιακός κύκλος των τριών παραπάνω σταδίων επαναλήφθηκε για 30 κύκλους. Έπειτα ακολούθησε το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης στους 72° C για 7 min. Τα προϊόν της αντίδρασης διατηρήθηκε προσωρινά στους 10° C και είχε μοριακό βάρος περίπου 1800 bp.

Σε μελέτες ανάλυσης των μικροοργανισμικών κοινοτήτων όπου η ενίσχυση φυλογενετικών γονιδίων γίνεται με PCR συχνά υπάρχει η ανεπιφύλακτη παραδοχή ότι η PCR ενεργεί χωρίς αποκλίσεις και άρα οι οργανισμοί που είναι αριθμητικά περισσότεροι στο περιβάλλον θα αναπαρασταθούν από επικρατείς κλώνους σε μία βιβλιοθήκη κλώνων (Polz & Cavanaugh, 1998). Ωστόσο, η τεχνική της PCR ενέχει αρκετούς τεχνικούς περιορισμούς και αποκλίσεις (von Wintzingerode *et al.* 1997, Spiegelman *et al.* 2005). Οι μήτρες DNA οι οποίες αγγίζουν συγκεντρώσεις κορεσμού

στο μείγμα της PCR σταματούν αναγκαστικά να ενισχύονται ενώ οι υπόλοιπες συνεχίζουν την ενίσχυσή τους καθώς η χημική κινητική των επιμέρους αντιδράσεων της PCR είναι πολύπλοκη (Sardelli 1993). Στους αρχικούς κύκλους της PCR, χαμηλή συγκέντρωση μήτρας DNA μπορεί να επηρεάσει την προσκόλληση των εκκινητών (Polz & Cavanaugh 1998). Ο αριθμός κύκλων που πραγματοποιείται μια αντίδραση PCR μπορεί επίσης να επιφέρει αποκλίσεις. Η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης μειώνεται όσο αυξάνονται οι κύκλοι καθώς μειώνονται οι συγκεντρώσεις των εκκινητών, των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων αλλά και η δραστηριότητα του ενζύμου (Ruano *et al.* 1991, Sardelli 1993). Οι Suzuki & Giovannoni (1996) εκτιμούν ότι υπάρχει πιθανότητα μια νεοσυντιθέμενη αλυσίδα να επανασυνδεθεί με τα ομόλογα τμήματά της οδηγώντας σε σχηματισμό χμαιορών (ανεπιθύμητων προϊόντων της PCR) όταν ο αριθμός των κύκλων είναι μεγάλος.

Συνεπώς, για να παρακαμφθούν οι αποκλίσεις της PCR ακολούθησε βελτιστοποίηση των κύκλων (cycle optimization) και το παραπάνω πρωτόκολλο επαναλήφθηκε στους 19, 21, 23, 25, 27 και 29 κύκλους. Το πρωτόκολλο ολοκληρώθηκε με τον μικρότερο αριθμό κύκλων στους οποίους ανιχνεύθηκε το επιθυμητό προϊόν και ήταν 27 κύκλοι για το δείγμα των νανοευκαρυωτών και 25 κύκλοι για το δείγμα των πικοευκαρυωτών.

Μετά το πέρας της ενίσχυσης του επιθυμητού γονιδίου το αποτέλεσμα της όλης αντίδρασης οπτικοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε διάλυμα 1x TAE και η συσκευή ηλεκτροφόρησης που έφερε το πήκτωμα αφέθηκε για 30 min στα 90 Volts. Η χρώση του πηκτώματος έγινε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου.

2.5 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR είναι ένα βήμα το οποίο πρέπει να πραγματοποιηθεί πριν ακολουθήσουν άλλες εφαρμογές επί του δείγματος που ενισχύθηκε. Στην προκειμένη περίπτωση ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες απόδοσης της κλωνοποίησης. Ο καθαρισμός του DNA πραγματοποιήθηκε με το τυποποιημένο kit Montage (Millipore, USA) ακολουθώντας τις υποδείξεις του κατασκευαστή. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε επιτρέπει την συμπύκνωση των προϊόντων από κάθε αντίδραση PCR και απομακρύνει εκκινητές και τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια που δεν αξιοποιήθηκαν κατά την PCR. Ο έλεγχος του καθαρισμού έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

2.6 Δημιουργία βιβλιοθηκών DNA

Τα καθαρά προϊόντα της PCR από το δείγμα DNA των νανοευκαρυωτών και των πικοευκαρυωτών χρησιμοποιήθηκαν ώστε να κατασκευαστούν αντίστοιχα δυο βιβλιοθήκες κλώνων με τα γονίδια 18S rRNA. Χρησιμοποιήθηκε το τυποποιημένο Topo XL PCR cloning kit (Invitrogen Co.) και ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροώσμωση (electroporation) με βάση το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Κατά τη μέθοδο της ηλεκτροώσμωσης εφαρμόζεται υψηλή τάση στο βακτηριακό εναιώρημα, με αποτέλεσμα να προκαλούνται προσωρινές οπές στο κυτταρικό περίβλημα από τις οποίες περνά το DNA. Το βακτηριακό εναιώρημα στην συγκεκριμένη περίπτωση ήταν κύτταρα *Escherichia coli*. Η Taq πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε στην PCR προσθέτει στα 3'-άκρα του προϊόντος της PCR μια δεόξυαδενίνη. Το kit περιείχε ευθυγραμμισμένο φορέα κλωνοποίησης με μια βάση δεόξυθυμίνης στα 3'- άκρα του και συνεπώς το ένθεμα που προέκυψε από την PCR μπορεί να δεσμοποιηθεί

αποτελεσματικά με το φορέα. Ο φορέας κλωνοποίησης φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη καθώς και το θανατογόνο γονίδιο *ccdB* της *E.coli*. Τα παραπάνω γονίδια αποτελούν χρήσιμους δείκτες ώστε από το βακτηριακό πληθυσμό να επιλέξουμε τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν καθώς το θανατογόνο γονίδιο αδρανοποιείται όταν το ένθεμα δεσμοποιηθεί στο φορέα και το γονίδιο της καναμυκίνης προσδίδει ανθεκτικότητα στο μέσο επίστρωσης που θα χρησιμοποιήσουμε.

Προσθήκη του προϊόντος της PCR έγινε στα πλασμίδια (φορείς κλωνοποίησης) και το μείγμα επωάστηκε στους 25° C για 5 min ώστε να ενσωματωθεί το επιθυμητό γονίδιο στα πλασμίδια. Μετά το πέρας των 5 min διάλυμα αλάτων προστέθηκε ώστε να τερματιστεί η αντίδραση της ενσωμάτωσης. Ακολούθησε μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων με την διαδικασία της ηλεκτροώσμωσης και κατόπιν παρήχθη θρεπτικό μέσο ανάρρωσης στα κύτταρα και επωάστηκαν στους 37° C για 1 h. Τρυβλία με θρεπτικό μέσο Luria-Bertani agar και καναμυκίνη συγκέντρωσης 50 µg/ml επιστρώθηκαν ασηπτικά χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές ποσότητες (40 µL, 60 µL και 100 µL) από το βακτηριακό ελαιώρημα και επωάστηκαν στους 37° C για 16 h. Η ίδια διαδικασία κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε τόσο για τα γονίδια 18S rRNA των νανοευκαρυωτών όσο και για τα γονίδια 18S rRNA των πικοευκαρυωτών.

2.7 Έλεγχος αποικιών

Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία LB agar με καναμυκίνη θεωρούνται μετασχηματισμένες και τα πλασμίδια τους ορθώς ανασυνδυασμένα. Ωστόσο, διενεργήθηκε έλεγχος ώστε να είμαστε απόλυτα βέβαιοι για τους κλώνους που έχουν λάβει το πλασμίδιο μαζί με το ένθεμα. Η παρουσία του ενθέματος (γονίδιο 18S rRNA)

ελέγχθηκε με colony PCR χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών M13F (5'-GTAAAACGACGCCAG-3') και M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Οι εκκινητές είναι ειδικοί για το φορέα κλωνοποίησης που χρησιμοποιήσαμε και πλαισιώνουν εκατέρωθεν το ένθεμα. Η τεχνική της colony PCR έχει την διαφορά ότι αντί να προστεθεί μήτρα DNA προστίθεται μικρή ποσότητα βακτηριακής αποικίας. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθείται επιτρέπει πρώτα την λύση των βακτηριακών κυττάρων και έπειτα την αποδιάταξη του DNA.

Το μείγμα της PCR τελικού όγκου 20 μ L περιείχε 4 μ L buffer 5x (Green GoTaq Flexi buffer, Promega), 40 μ M από κάθε 5'-τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 μ M από κάθε εκκινητή και 0,5 U Taq πολυμεράσης (GoTaq DNA polymerase, Promega). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR ήταν αρχική αποδιάταξη στους 94° C για 4 min, ακολουθούμενη από τρία στάδια:

- a) της αποδιάταξης στους 94° C για 30 sec
- b) της υβριδοποίησης των εκκινητών στους 52,5° C για 30 sec και
- c) της επιμήκυνσης των θυγατρικών κλώνων στους 72° C για 1min και 30 sec.

Ο θερμοκρασιακός κύκλος των τριών παραπάνω σταδίων επαναλήφθηκε για 25 κύκλους. Έπειτα ακολούθησε το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης στους 72° C για 7 min. Το προϊόν της PCR είχε μοριακό βάρος περίπου 2000 bp.

2.8 Απομόνωση πλασμιδίου

Μετά τον έλεγχο των αποικιών ως προς την παρουσία του γονιδίου 18S rRNA δημιουργήθηκαν ασηπτικά υγρές καλλιέργειες των βακτηριακών κλώνων που ήταν

θετικοί στην τεχνική της colony PCR. Οι υγρές καλλιέργειες είχαν 1,4 ml υγρού θρεπτικού μέσου Luria-Bertani και καναμυκίνη συγκέντρωσης 50 µg/ml. Η επώασή τους πραγματοποιήθηκε στους 37° C για 18 h στις 180 rpm. Σκοπός της δημιουργίας των υγρών καλλιεργειών ήταν η ποσοτικοποίηση του πλασμιδίου που βρίσκεται στους βακτηριακούς κλώνους. Επίσης, δημιουργήθηκε απόθεμα των υγρών καλλιεργειών σε γλυκερόλη, όπου 100 µL κάθε υγρής καλλιέργειας και 100 µL γλυκερόλης 50% αναμίχθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80° C.

Η απομόνωση του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε με το τυποποιημένο Nucleospin Plasmid QuickPure kit (Macherey-Nagel GmbH and Co. KG, Germany) όπως προτείνει ο κατασκευαστής. Τα πρωτόκολλο απομόνωσης των πλασμιδίων βασίζεται στην λύση των βακτηριακών κυττάρων με χρήση ανιονικού απορρυπαντικού. Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος ουδετεροποιεί το pH και δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες ώστε το πλασμιδιακό DNA να προσδεθεί σε ειδική στήλη SiO₂. Μακρομοριακά κυτταρικά συστατικά, άλατα, μεταβολίτες και νουκλεάσες απομακρύνονται με ρυθμιστικό διάλυμα. Τέλος, το πλασμιδιακό DNA εκλούεται με ελαφρά αλκαλικό διάλυμα υπό συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος. Τα απομονωμένα πλασμίδια φυλάχτηκαν στους -20° C.

2.9 Αλληλούχιση

Τα γονίδια αλληλουχήθηκαν με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς αγγείου στην εταιρεία MacroGen Inc. (Seoul, Korea) σε συσκευή αλληλούχισης τριχοειδούς αγγείου με τη χρήση του BigDye Terminator kit (Applied Biosystems Inc.). Για κάθε κλώνο λήφθηκαν τρεις αλληλουχίες με επικάλυψη περίπου 200 βάσεων και μήκος ανάγνωσης περίπου 950 βάσεις. Η επικάλυψη των τμημάτων βοήθησε στην συνένωση των

κομματιών και στην απόκτηση της αλληλουχίας του ενισχυμένου γονιδίου από κάθε κλώνο. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι M13F (5'-GTAAAACGACGCCAG-3'), 1179rE (5'-CCCGTGTGAGTCAAATT-3') και M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3').

2.10 Υπολογισμός κάλυψης της βιβλιοθήκης (Clone coverage)

Οι βιβλιοθήκες των κλώνων πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικές του περιβάλλοντος που μελετάται έτσι ώστε να μπορέσουμε αργότερα να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα. Αν από μια βιβλιοθήκη αναλυθούν λιγότεροι κλώνοι από ό,τι πρέπει η ποικιλότητα δεν θα αντιπροσωπεύει την ποικιλότητα του υπό μελέτη περιβάλλοντος (Kemp & Aller 2004). Οι Kemp & Aller (2004) πρότειναν μία διαδικασία χρησιμοποιώντας τους δείκτες S_{Chao1} (Chao 1984) και S_{ACE} (Chao *et al.* 1993), με την οποία βιβλιοθήκες κλώνων ελέγχονται και αποφασίζεται αν το μέγεθος του υποδείγματος της βιβλιοθήκης είναι αντιπροσωπευτικό (<http://www.aslo.org/lomethods/free/2004/0114a.html>).

Ο δείκτης Good's C χρησιμοποιήθηκε ως κύριος δείκτης στην παρούσα μελέτη. Είναι ένας μη παραμετρικός δείκτης εκτίμησης του ποσοστού των φυλοτύπων μιας βιβλιοθήκης με άπειρους κλώνους που θα αντιπροσωπεύεται σε ένα μικρότερο υποδείγμα της βιβλιοθήκης. Όπως τον όρισε ο Good (1953), ο δείκτης δίνεται από τον τύπο $[1-(n_i/N)]$, όπου n_i είναι ο αριθμός των φυλοτύπων που εμφανίζονται μόνο μία φορά στη βιβλιοθήκη (singletons) και N είναι ο συνολικός αριθμός κλώνων.

2.11 Υπολογισμός δεικτών ποικιλότητας

Η εκτίμηση της ποικιλότητας μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας δείκτες, ορισμένοι από τους οποίους ενσωματώνουν σε μια ενιαία αριθμητική τιμή τον αριθμό

των ειδών και τη σχετική αφθονία των ειδών. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήσαμε τον δείκτη Shannon (Shannon & Weaver 1949) που δίνεται από τον τύπο:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

όπου,

H' = ο μέσος βαθμός αβεβαιότητας στην πρόβλεψη του είδους στο οποίο ανήκει ένα άτομο που συλλαμβάνεται τυχαία από ένα δείγμα S ειδών και N ατόμων.

S = ο αριθμός των ειδών του δείγματος και

p_i = η σχετική πληθυσμιακή πυκνότητα του είδους i . Η σχετική πυκνότητα είναι ο αριθμός ατόμων του είδους i προς το συνολικό αριθμό ατόμων του δείγματος (N).

Η τιμή του H' κυμαίνεται μεταξύ μηδενός και μιας μέγιστης τιμής που εξαρτάται από τον αριθμό των ειδών που παρατηρήθηκαν. Όταν $H' = 0$, στο δείγμα υπάρχει μόνο ένα είδος, ενώ όταν ο δείκτης αυξάνει σημαίνει ότι έχουμε πολλά είδη ή ισομερή κατανομή των ειδών. Το μέγιστο που μπορεί να λάβει ο δείκτης είναι $H_{\max} = \ln S$ (S = ο αριθμός των ειδών του δείγματος). Ο δείκτης H' μεγιστοποιείται όταν όλα τα είδη του δείγματος αντιπροσωπεύονται από τον ίδιο αριθμό ατόμων.

Εκτός του δείκτη Shannon χρησιμοποιήθηκε και ο δείκτης ομοιογένειας ή ισομερούς κατανομής J (Pielou 1969) ο οποίος δίνεται από τον τύπο $[H'/H_{\max}]$, όπου H' ο εκτιμηθείς δείκτης ποικιλότητας Shannon και H_{\max} ο δείκτης ποικιλότητας όταν όλα τα είδη του δείγματος αντιπροσωπεύονται από ίσο αριθμό ατόμων στο δείγμα.

Ο δείκτης Shannon παρουσιάζει κάποια προβλήματα όπως το ότι δεν εκτιμά τις αποστάσεις μεταξύ των διαφορετικών ταξινομικών ομάδων στις οποίες ανήκουν τα είδη

και πως επηρεάζεται από το κριτήριο ομοιότητας που χρησιμοποιείται για την ομαδοποίηση των φυλοτύπων (Watve & Gangal 1996). Παρά τους περιορισμούς του ο δείκτης επιλέχθηκε καθώς είναι ένας δείκτης που συχνά χρησιμοποιείται στην επιστήμη της Οικολογίας. Ο δείκτης Shannon δείχνει με μεγαλύτερη ακρίβεια τις αλλαγές στην αφθονία των σπάνιων ειδών αποτελώντας ένα χρήσιμο δείκτη στην εκτίμηση της μικροοργανισμικής ποικιλότητας (Hill *et al.* 2003).

2.12 Φυλογενετική ανάλυση

Παρά τις πειραματικές προσπάθειες να αποφύγουμε την δημιουργία χμαιρών, όλες οι αλληλουχίες ελέγχθηκαν για την ανίχνευση τους. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Pintail (www.cardiff.ac.uk/biosi/research/biosoft/) που βασίζεται στον συνονόματο αλγόριθμο που περιγράφηκε από τους Aschelford *et al.* (2005). Ο αλγόριθμος βασίζεται στον υπολογισμό εξελικτικών αποστάσεων μεταξύ της υπό ελέγχου και μίας συγγενικής αξιόπιστης αλληλουχίας. Εάν η εξελικτική απόστασή τους διαφέρει κατά μήκος του γονιδίου, η αλληλουχία υπό έλεγχο πιθανότατα έχει προέλθει από φυλογενετικά απομακρυσμένες πατρικές αλληλουχίες και αποτελεί χίμαιρα. Οι χίμαιρες που εντοπίστηκαν, αποκλείστηκαν από περαιτέρω υπολογισμούς.

Οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) και χρησιμοποιώντας το κριτήριο ομοιότητας (>98%) (Stackebrandt & Goebel 1994) οι κλώνοι ομαδοποιήθηκαν και θεωρήθηκαν μέλη του ίδιου φυλότυπου. Με την βοήθεια του προγράμματος BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) κάθε αλληλουχία συγκρίθηκε με διαθέσιμες αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων του National Center for

Biotechnology Information (NCBI) και βρέθηκαν οι συγγενικά κοντινότεροι φυλότυποι της κάθε αλληλουχίας.

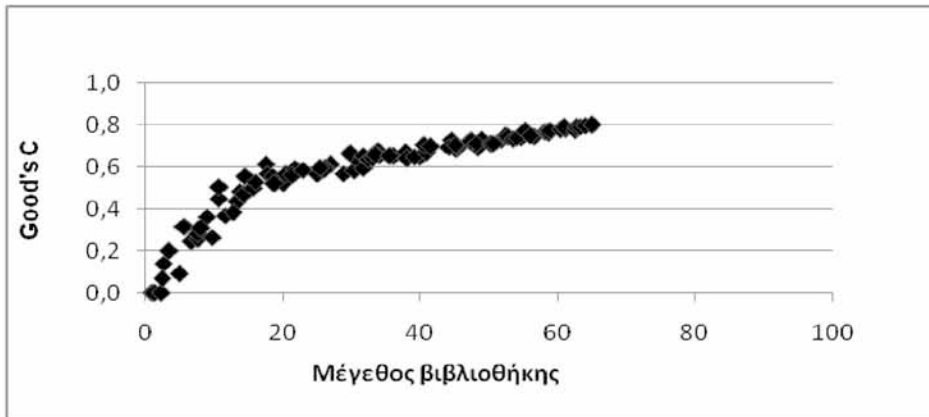
Η κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA έκδοση 4 (Tamura *et al.* 2007). Η τοπολογία του δένδρου βασίστηκε στην μέθοδο του κοντινότερου γείτονα (Neighbour- Joining) και έγινε διόρθωση κατά Jukes-Cantor. Η αρχή της μεθόδου του κοντινότερου γείτονα περιγράφεται από τους Saitou & Nei (1987). Η μέθοδος βασίζεται στην εύρεση φυλοτύπων ανά ζεύγη (γειτόνων) και στη μεταξύ τους σύνδεση ώστε να ελαχιστοποιείται το ολικό μήκος κλαδιού του δένδρου. Η παραπάνω ελαχιστοποίηση πραγματοποιείται σε κάθε στάδιο ομαδοποίησης των φυλότυπων έχοντας ξεκινήσει από ένα δένδρο αστεροειδούς τοπολογίας. Για τον υπολογισμό της απόστασης του κάθε ζεύγους και συνεπώς την ελαχιστοποίηση και αναταξινόμηση τους χρησιμοποιείται μία μήτρα αποστάσεων. Έλεγχος της στατιστικής εγκυρότητας της τοπολογίας του δένδρου έγινε με την μέθοδο bootstrap. Με τη μέθοδο αυτή επιλέγονται κάθε φορά αλληλουχίες, οι χαρακτήρες τους επανατοποθετούνται και η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται (στην προκειμένη περίπτωση 1000 φορές). Με βάση τις επανατοποθετήσεις των χαρακτήρων κατασκευάζονται δένδρα και τα αποτελέσματα αποτελούν μέτρο της στατιστικής εγκυρότητας, ωστόσο η μέθοδος εμφανίζει περιορισμούς (Felsenstein 1985).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

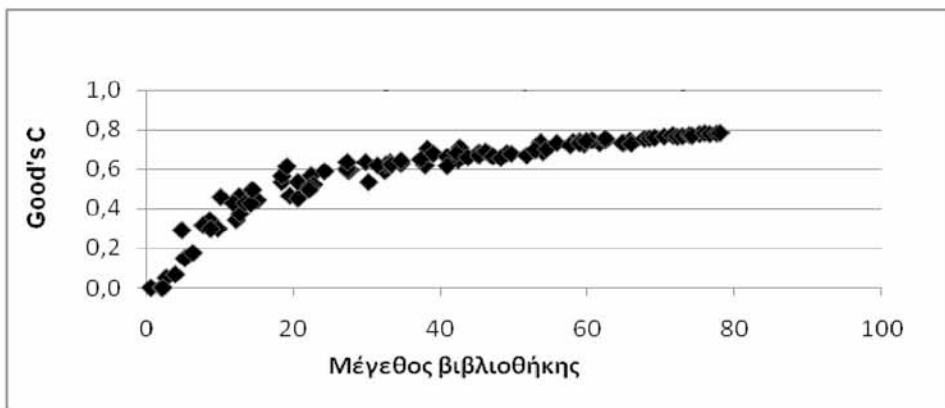
Ένα σύνολο από 65 και 78 κλώνους από τις βιβλιοθήκες των νάνο- και πικοευκαρυωτών, αντίστοιχα, απέμεινε για ανάλυση μετά την απαλλαγή από τις χημειρικές αλληλουχίες. Οι κλώνοι αυτοί ομαδοποιήθηκαν σε 27 και 32 φυλότυπους, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας κριτήριο ομοιότητας 98%. Οι φυλότυποι που είχαν έναν αντιπροσωπευτικό κλώνο (singletons) αποτελούσαν το 48,1% των φυλότυπων που βρέθηκαν στη βιβλιοθήκη των νανοευκαρυωτών και το 53,1% στη βιβλιοθήκη των πικοευκαρυωτών.

3.1 Κάλυψη της βιβλιοθήκης

Έλεγχος ως προς την κάλυψη των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το δείκτη του Good's C (1953). Οι τιμές που έδωσε ο δείκτης ήταν 0,8 για το κλάσμα των νανοευκαρυωτών και 0,78 για το κλάσμα των πικοευκαρυωτών. Αυτό σημαίνει ότι το υποδείγμα που πήραμε καλύπτει το 80% και 78% των βιβλιοθηκών για τους νάνο- και πικοευκαρυώτες αντίστοιχα. Κατασκευάστηκαν επίσης διαγράμματα, των οποίων οι καμπύλες προσφέρουν μία εκτίμηση για την ποικιλότητα των φυλότυπων σε σχέση με την δειγματοληπτική προσπάθεια που καταβλήθηκε. Δειγματοληπτική προσπάθεια στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι ο αριθμός των κλώνων που αλληλουχήθηκαν. Οι καμπύλες όπως φαίνονται στο Σχήμα 1 και Σχήμα 2 τείνουν να γίνουν ασυμπτωτικές.



Σχήμα 1. Κάλυψη της βιβλιοθήκης των νανοευκαρυωτών.



Σχήμα 2. Κάλυψη της βιβλιοθήκης των πικοευκαρυωτών

3.2 Ανάλυση φυλοτύπων

Ο Πίνακας 1 και ο Πίνακας 2 παρουσιάζουν τους φυλοτύπους που βρέθηκαν στη βιβλιοθήκη των νανοευκαρυωτών και των πικοευκαρυωτών, αντίστοιχα.

Οι κυρίαρχοι φυλότυποι (>50%) στη βιβλιοθήκη των νανοευκαρυωτών άνηκαν στην ταξινομική ομάδα των Cercozoa (με σχετική αφθονία 43%) και στην ταξινομική ομάδα των Haptophyceae (με σχετική αφθονία 6,2%). Οι φυλότυποι (KRL01N21, KRL01N41, KRL01N33) που άνηκαν στην ταξινομική ομάδα των Cercozoa σχετίστηκαν με φυλότυπους ακαλλιέργητων οργανισμών. Ο φυλότυπος KRL01N21 είχε χαμηλότερη ομοιότητα (96%) με το γένος *Ebria* ενώ για τους φυλότυπους KRL01N41 και

KRL01N33 παρατηρήθηκε ομοιότητα (92% και 86% αντίστοιχα) με το γένος *Protaspis*. Ο φυλότυπος που ανήκει στα Haptophyceae βρέθηκε να είναι στενά συσχετισμένος (99%) με το είδος *Prymnesium nemamethecum*.

Στο κλάσμα των πικοευκαρυωτών ο κυρίαρχος φυλότυπος (KRL01P10) σχετίστηκε στενά (99%) με το είδος *Cyclotella meneghiniana* με σχετική αφθονία 15,4%. Οι φυλότυποι KRL01P41 και KRL01P42 βρέθηκε να ανήκουν στα Cercozoa και σχημάτιζαν τη δεύτερη αφθονότερη ομάδα με το άθροισμα της σχετικής αφθονίας τους να είναι 20,5%. Οι παραπάνω φυλότυποι σχετίστηκαν (97%) με φυλότυπους ακαλλιέργητων μικροοργανισμών. Μακρινότερη συσχέτιση βρέθηκε με το είδος *Ebria tripartita* (96%) και *Protaspis obliqua* (93%) για τους φυλότυπους KRL01P41 και KRL01P42, αντίστοιχα. Ο φυλότυπος KRL01P18 άνηκε στο 50% των επικρατών φυλοτύπων με σχετική αφθονία (9%) και σχετίστηκε στενά (99%) με το είδος *Scenedesmus communis*.

Πίνακας 1. Στοιχεία φυλοτύπων βιβλιοθήκης ναυοευκαρυωτών. Η εύρεση ταξινομικής ομάδας έγινε με βάση την κατάταξη της GenBank. Αστερίσκος (*): απουσία δεδομένων για περιβάλλον απομόνωσης ή την εύρεση αυτού σε καλλιέργειες παγκόσμιων τραπεζών φύλαξης μικροοργανισμών.

Φυλότυπος	Σχ. αφθονία (%)	Πλησιέστερος συγγενής (% ομοιότητα) [κωδικός GenBank]	Περιβάλλον απομόνωσης	Πιθανή ταξινομική ομάδα
KRL01N21	17,1	<i>Cercozoa</i> sp. CC-2009a (97%) [FJ824126]	Θαλάσσιο (άμμος)	Cercozoa
KRL01N41	15,4	Uncultured marine eukaryote clone NOR46.27 (97%) [DQ314814]	Θαλάσσιο (Αρκτικός)	Cercozoa
KRL01N33	10,8	Uncultured cercozoan clone B12 5um (98%) [FN263034]	Υφάλμυρο (Βαλτική)	Cercozoa
KRL01N43	6,2	<i>Prymnesium nemamethecum</i> (99%) [AM491004]	*	Haptophyceae
KRL01N46	3,1	<i>Pseudopedinella elastica</i> (98%) [U14387]	*	Stramenopiles
KRL01N47	3,1	<i>Chlamydomonas</i> sp. ICE-W (98%) [AY731083]	Εσωτερικά ύδατα (πάγος Ανταρκτικής)	Chlorophyta
KRL01N69	3,1	<i>Chlorella sorokiniana</i> strain Prag A14 (99%) [X74001]	*	Chlorophyta
KRL01N89	3,1	<i>Treubaria schmidlei</i> (98%) [U73474]	*	Chlorophyta
KRL01N4t	3,1	<i>Didinium nasutum</i> (99%) [U57771]	*	Alveolata
KRL01N25	3,1	<i>Cyclotella meneghiniana</i> clone p567 (99%) [AJ535172]	*	Stramenopiles
KRL01N56	3,1	<i>Colpodella edax</i> (99%) [AY234843]	Εσωτερικά ύδατα (λίμνη Ρωσίας)	Alveolata
KRL01N38	3,1	Uncultured Chytridiomycota clone T1P1AeD10 (92%) [GQ995313]	Έδαφος (παγετώνες Himalaya)	Fungi
KRL01N39	3,1	Uncultured katablepharidophyte clone 3c-E7 (99%) [FN690517]	Θαλάσσιο πάγο (θάλασσα Bothnian)	Katablepharidophyta
KRL01N52	3,1	Uncultured alveolate clone PAC8SP2005 (97%) [EU162630]	Εσωτερικά ύδατα (λίμνη Pavin)	Alveolata
KRL01N2t	1,5	<i>Protaspis obliqua</i> isolate2 (93%) [FJ824122]	Θαλάσσιο (άμμος)	Cercozoa
KRL01N32	1,5	<i>Peridinium foliaceum</i> (97%) [Y10567]	*	Stramenopiles
KRL01N40	1,5	Uncultured fungus clone PFH1AU2004 (96%) [DQ244009]	Εσωτερικά ύδατα (λίμνη Pavin)	Fungi
KRL01N50	1,5	Uncultured marine eukaryote clone NA1_1F3 (98%) [EF526885]	Θαλάσσιο (ανοξικό φιλτράρισμα)	Choanoflagellata
KRL01N57	1,5	Eimeriidae environmental sample clone Elev_18S_1206 (90%) [EF024716]	Έδαφος (ριζόσφαιρα ιτιάς)	Cercozoa
KRL01N62	1,5	<i>Paulsenella vonstoschii</i> (97%) [AJ968729]	Θαλάσσιο (θάλασσα Wadden)	Alveolata
KRL01N72	1,5	Uncultured freshwater cercozoan clone PCF1AU2004 (98%) [DQ243991]	Εσωτερικά ύδατα (λίμνη Pavin)	Cercozoa
KRL01N76	1,5	<i>Scenedesmus communis</i> (99%) [X73994]	*	Chlorophyta
KRL01N83	1,5	Codonosigidae environmental sample clone Amb_18S_1490 (91%) [EF02401]	Έδαφος (ριζόσφαιρα ιτιάς)	Choanoflagellata
KRL01N95	1,5	<i>Scenedesmus ovalternus</i> (99%) [X81966]	*	Chlorophyta
KRL01N113	1,5	<i>Strombomonas acuminata</i> strain S716 (99%) [EU624029]	*	Euglenozoa
KRL01N90	1,5	Eukaryote marine clone ME1-17 (99%) [AF363186]	Θαλάσσιο (Μεσόγειος)	Stramenopiles
KRL01N103	1,5	<i>Chlamydomonas</i> sp. MBIC10592 (98%) [AB058371]	*	Chlorophyta

Πίνακας 2. Στοιχεία βιβλιοθήκης πικοευκαρυωτών. Η εύρεση ταξινομικής ομάδας έγινε με βάση την κατάταξη της GenBank. Αστερίσκος (*): απουσία δεδομένων για περιβάλλον απομόνωσης ή την εύρεση αυτού σε καλλιέργειες παγκόσμιων τραπεζών φύλαξης μικροοργανισμών.

Φυλότυπος	Σχ. αφθονία(%)	Πλησιέστερος συγγενής (% ομοιότητα) [κωδικός GenBank]	Περιβάλλον απομόνωσης	Πιθανή ταξινομική ομάδα
KRL01P10	15,3	<i>Cyclotella meneghiniana</i> clone p567 (99%) [AJ535172]	*	Stramenopiles
KRL01P41	11,4	<i>Cercozoa</i> sp. CC-2009a (97%) [FJ824126]	Θαλάσσιο (άμμος)	Cercozoa
KRL01P18	8,9	<i>Scenedesmus communis</i> (99%) [X73994]	*	Chlorophyta
KRL01P42	8,9	Uncultured marine eukaryote clone NOR46.27 (97%) [DQ314814]	Θαλάσσιο (Αρκτικός Ωκεανός)	Cercozoa
KRL01P131	5,0	<i>Paulsenella vonstoschii</i> (97%) [AJ968729]	Θαλάσσιο (θάλασσα Wadden)	Alveolata
KRL01P3	3,8	<i>Colpodella edax</i> (99%) [AY234843]	Εσωτερικά ύδατα (λίμνη Ρωσίας)	Alveolata
KRL01P118	3,8	Uncultured katablepharidophyte clone 3c-E7 (99%) [FN690517]	Θαλάσσιο πάγο (θάλασσα Bothnian)	Katablepharidophyta
KRL01P119	2,6	<i>Coleps hirtus</i> (99%) [U97109]	*	Alveolata
KRL01P45	2,6	<i>Carteria radiosa</i> (96%) [D86500]	*	Chlorophyta
KRL01P31	2,6	Chlorellaceae sp. TP-2008 (99%) [FM205843]	*	Chlorophyta
KRL01P38	2,6	Uncultured freshwater cercozoan clone PCF1AU2004 (98%) [DQ243991]	Εσωτερικά ύδατα (λίμνη Pavin)	Cercozoa
KRL01P51	2,6	Uncultured fungus clone CCW24Z (93%) [AY230211]	Αλμυρός βάλτος	Fungi
KRL01P91	2,6	<i>Cryptomonas</i> sp. M420 (99%) [AJ007280]	Θαλάσσια&Εσωτ. Ύδατα	Cryptophyta
KRL01P121	2,6	Codonosigidae environmental sample clone Amb_18S_1490 (91%) [EF024012]	Soil (aspen rhizosphere)	Choanoflagellata
KRL01P44	2,6	Chlorophyte sp. I-155 clone A1(97%) [EF432529]	*	Chlorophyta
KRL01P6	1,3	<i>Closteriopsis acicularis</i> (99%) [Y17470]	*	Chlorophyta
KRL01P53	1,3	<i>Dermocystidium</i> sp. (95%) [U21336]	Εσωτ. ύδατα (ξενιστής: <i>Salvelinus fontinalis</i>)	Mesomycetozoa
KRL01P78	1,3	<i>Scenedesmus pectinatus</i> var. <i>pectinatus</i> (99%) [AB037092]	*	Chlorophyta
KRL01P95	1,3	<i>Colacium</i> sp. Jjockji033107A (99%) [FJ719601]	*	Euglenozoa
KRL01P114	1,3	<i>Thalassiosira pseudonana</i> strain CCMP 1007 (99%) [DQ093367]	Θαλάσσια & Εσωτ. Ύδατα	Stramenopiles
KRL01P141	1,3	<i>Oocystis</i> sp. AN 2/29-4 (99%) [AY195966]	Εσωτερικά ύδατα	Chlorophyta
KRL01P217	1,3	Uncultured Chytridiomycota clone T4P1AeE08 (92%) [GQ995419]	Έδαφος (παγετώνες Himalaya)	Fungi
KRL01P219	1,3	Uncultured alveolate clone PAC8SP2005 (98%) [EU162630]	Εσωτερικά ύδατα (λίμνη Pavin)	Alveolata
KRL01P224	1,3	Uncultured eukaryote clone kor_250804_14 (95%) [FJ15733]	Εσωτερικά ύδατα (λίμνη Κορώνεια)	Fungi
KRL01P15	1,3	<i>Protaspis grandis</i> (95%) [DQ303924]	Θαλάσσιο	Cercozoa
KRL01P75	1,3	<i>Didinium nasutum</i> (99%) [U57771]	*	Alveolata
KRL01P106	1,3	Uncultured fungus clone PFH1AU2004 (96%) [DQ244009]	Εσωτερικά ύδατα (λίμνη Pavin)	Fungi
KRL01P155	1,3	<i>Pseudopedinella elastica</i> (98%) [U14387]	*	Stramenopiles
KRL01P195	1,3	Uncultured marine eukaryote clone SA2_1E12 (98%) [EF527125]	Θαλάσσιο (ανοξικό φθόρδ)	Chlorophyta
KRL01P208	1,3	<i>Skeletonema costatum</i> strain B211 (99%) [DQ396523]	Θαλάσσιο (Κόλπος Naples)	Stramenopiles
KRL01P209	1,3	<i>Euglena</i> sp. Bibong100404-2 (93%) [FJ719610]	*	Euglenozoa
KRL01P234	1,3	<i>Peridinium balticum</i> (99%) [Y10566]	*	Stramenopiles

Τόσο στη βιβλιοθήκη των νανοευκαρυωτών όσο και στη βιβλιοθήκη των πικοευκαρυωτών βρέθηκαν αρκετοί φυλότυποι των οποίων ο πλησιέστερος συγγενής είχε απομονωθεί από θαλάσσιο περιβάλλον. Άλλα περιβάλλοντα απομόνωσης αποτέλεσαν εσωτερικά ύδατα, υφάλμυρα οικοσυστήματα και έδαφος σε κάποιες περιπτώσεις. Μοναδική ήταν η περίπτωση όπου το περιβάλλον απομόνωσης ήταν αλμυρός βάλτος (KRL01P51) και επίσης μοναδική η περίπτωση όπου ο πλησιέστερος μικροοργανισμός απομονώθηκε από τον ξενιστή του (KRL01P53). Η έλλειψη στοιχείων για τα περιβάλλοντα απομόνωσης όλων των οργανισμών δεν μας επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των φυλοτύπων κατά περιβάλλον απομόνωσης πλησιέστερου συγγενή.

Το κριτήριο ομοιότητας (>98%) χρησιμοποιήθηκε ώστε να συγκριθούν οι φυλότυποι μεταξύ των δύο βιβλιοθηκών (νάνο- και πικοευκαρυωτών) με αποτέλεσμα να βρεθούν 14 όμοιοι φυλότυποι στις δύο βιβλιοθήκες. Η σύγκριση των δύο βιβλιοθηκών δίνεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Όμοιοι φυλότυποι στις δύο βιβλιοθήκες. Εκατέρωθεν της μεσαίας στήλης είναι οι όμοιοι φυλότυποι των δύο βιβλιοθηκών και συσχετίζονται με τον φυλότυπο της μεσαίας στήλης. Με κόκκινο δίνονται οι περιπτώσεις όπου οι σχετικές αφθονίες είναι μεγαλύτερες στο κλάσμα των πικοευκαρυωτών

Βιβλιοθήκη νανοευκαρυωτών	Σχ. αφθονία(%)	Πλησιέστερος συγγενής (%ομοιότητα) [κωδικός GenBank]	Σχ. αφθονία(%)	Βιβλιοθήκη πικοευκαρυωτών
KRL01N21	16,9	<i>Cercozoa</i> sp. CC-2009a (97%) [FJ824126]	11,4	KRL01P41
KRL01N41	15,4	Uncultured marine eukaryote clone NOR46.27 (97%) [DQ314814]	8,9	KRL01P42
KRL01N25	3,08	<i>Cyclotella meneghiniana</i> clone p567 (99%) [AJ535172]	15,3	KRL01P10
KRL01N39	3,08	Uncultured katablepharidophyte clone 3c-E7 (99%) [FN690517]	3,8	KRL01P118
KRL01N46	3,08	<i>Pseudopedinella elastica</i> (98%) [U14387]	1,3	KRL01P155
KRL01N4t	3,08	<i>Didinium nasutum</i> (99%) [U57771]	1,3	KRL01P75
KRL01N56	3,08	<i>Colpodella edax</i> (99%) [AY234843]	3,8	KRL01P3
KRL01N69	3,08	<i>Chlorella sorokiniana</i> strain Prag A14(99%) [X74001]	2,6	KRL01P31
KRL01N40	1,54	Uncultured fungus clone PFH1AU2004 (96%) [DQ244009]	1,3	KRL01P106
KRL01N62	1,54	<i>Paulsenella vonstoschii</i> (97%) [AJ968729]	5,0	KRL01P131
KRL01N72	1,54	Uncultured freshwater cercozoan clone PCF1AU2004 (98%) [DQ243991]	2,6	KRL01P38
KRL01N76	1,54	<i>Scenedesmus communis</i> (99%) [X73994]	8,9	KRL01P18
KRL01N83	1,54	Codonosigidae environmental sample clone Amb_18S_1490 (91%) [EF02401]	2,6	KRL01P121
KRL01N95	1,54	<i>Scenedesmus</i> sp. (99%) [X81966] και [AB037092]	1,3	KRL01P78

3.3 Ταξινομικές ομάδες των δύο βιβλιοθηκών

Με βάση τις ομαδοποιήσεις των αλληλουχιών σε ταξινομικές ομάδες δημιουργήθηκε ο Πίνακας 4 ο οποίος είναι διαιρημένος στην βιβλιοθήκη των νανο- και πικοευκαρυωτών και φαίνεται η σχετική αφθονία της κάθε ταξινομικής ομάδας στην κάθε βιβλιοθήκη.

Πίνακας 4. Σχετικές αφθονίες της κάθε ταξινομικής ομάδας στο εκάστοτε κλάσμα.

	Βιβλιοθήκη νανοευκαρυωτών		Βιβλιοθήκη πικοευκαρυωτών	
	# φυλοτύπων	Σχ. αφθονία (%)	# φυλοτύπων	Σχ. αφθονία (%)
Cercozoa	6	47,7	4	24,4
Chlorophyta	6	13,8	8	21,8
Alveolata	4	10,8	5	14,1
Stramenopiles	4	9,2	5	20,5
Haptophyceae	1	6,2	0	0,0
Fungi	2	4,6	4	6,4
Katablepharidophyta	1	3,1	1	3,8
Choanoflagellata	2	3,1	1	2,5
Euglenozoa	1	1,5	2	2,6
Cryptophyta	0	0,0	1	2,5
Mesomycetozoa	0	0,0	1	1,3
Σύνολο	27	100,0	32	100,0

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 4 η ταξινομική ομάδα των Cercozoa κυριαρχεί και στις δύο βιβλιοθήκες αποτελώντας την αφθονότερη ομάδα των μικροσκοπικών ευκαρυωτών στο περιβάλλον της παρούσας μελέτης. Δεύτερη αφθονότερη ταξινομική ομάδα είναι τα Chlorophyta, ωστόσο ο αριθμός φυλοτύπων που παρατηρήθηκαν (14 συνολικά) είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό φυλοτύπων (10 συνολικά) που βρέθηκαν στα Cercozoa. Δύο ακόμα ταξινομικές ομάδες είναι σχετικά άφθονες, τα Alveolata και τα Stramenopiles, όμως οι σχετικές αφθονίες τους διαφέρουν μεταξύ των δύο κλασμάτων. Στην βιβλιοθήκη των νανοευκαρυωτών τα Alveolata έχουν μεγαλύτερη σχετική αφθονία από τα Stramenopiles, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στην βιβλιοθήκη

των πικοευκαρυωτών. Τέλος, οι ταξινομικές ομάδες των Cryptophyta και Mesomycetozoa δεν έχουν κανένα αντιπρόσωπο στην βιβλιοθήκη των νανοευκαρυωτών, ενώ δεν υπάρχει κανένας αντιπρόσωπος των Haptophyceae στην βιβλιοθήκη των πικοευκαρυωτών.

3.4 Ανάλυση ποικιλότητας

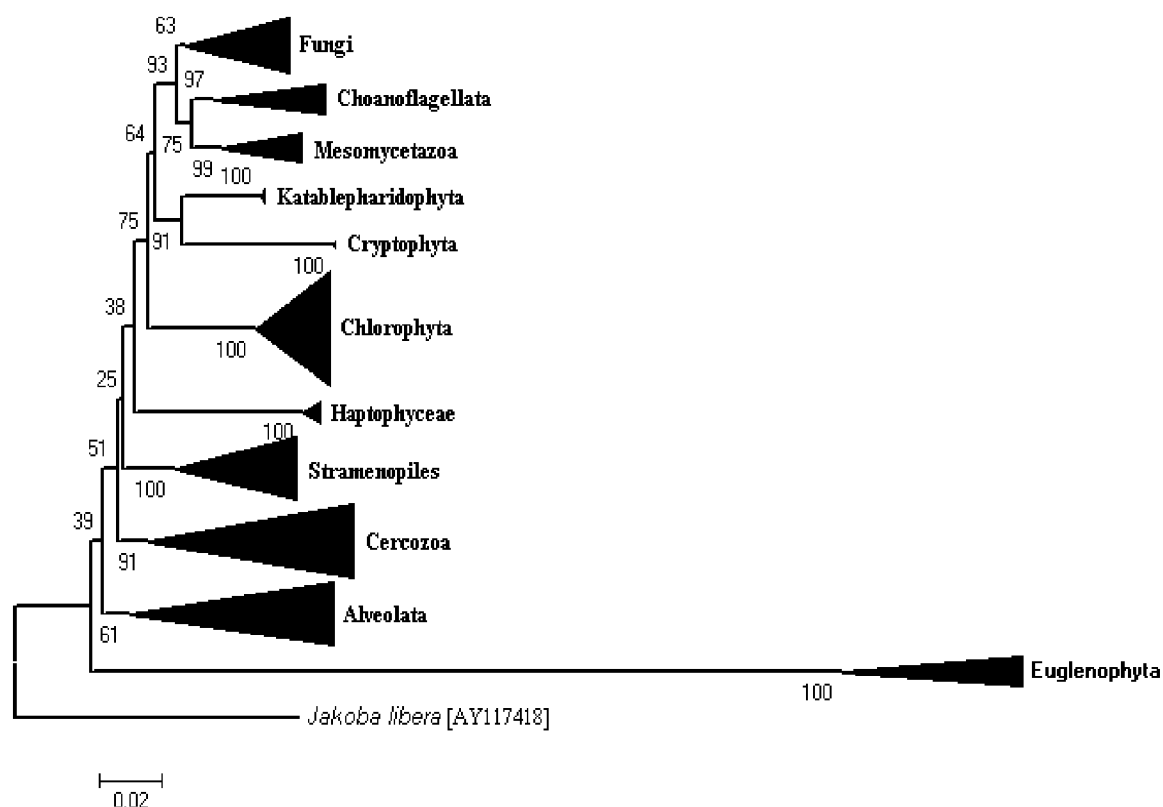
Η ποικιλότητα αναλύθηκε χρησιμοποιώντας τον δείκτη Shannon και τον δείκτη ισομερούς κατανομής J. Η τιμή που έδωσε ο δείκτης Shannon για την βιβλιοθήκη των νανοευκαρυωτών ήταν 2,9 και η αντίστοιχη τιμή του δείκτη J για την ίδια βιβλιοθήκη ήταν 0,9. Στην βιβλιοθήκη των πικοευκαρυωτών ο δείκτης Shannon πήρε την τιμή 3,1 και ο δείκτης J την τιμή 0,9. Η μέγιστη τιμή του δείκτη Shannon που θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε στην βιβλιοθήκη των νανοευκαρυωτών είναι $H_{\max} = 3,29$ και στην βιβλιοθήκη των πικοευκαρυωτών είναι $H_{\max} = 3,46$.

3.5 Παρουσίαση φυλογενετικού δένδρου

Το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες του φυλογενετικού γονιδίου 18S rRNA και των δύο βιβλιοθηκών, τις αλληλουχίες των πλησιέστερων συγγενών καθώς και αλληλουχίες που στηρίζουν την δομή του δένδρου και βοηθούν στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε μία απομακρυσμένη αλληλουχία (outgroup) από τις υπόλοιπες αλληλουχίες των γονιδίων που βρέθηκαν για να εντοπιστεί η ρίζα του φυλογενετικού δένδρου. Συνολικά στοιχήθηκαν 137 φυλότυποι ώστε να δημιουργηθεί το δένδρο το οποίο δίνεται σε τέσσερα σχήματα για βέλτιστη απεικόνιση. Στο Σχήμα 3 δίνεται το φυλογενετικό δένδρο όπου φαίνονται όλες οι ταξινομικές ομάδες στις οποίες ανήκουν οι φυλότυποι

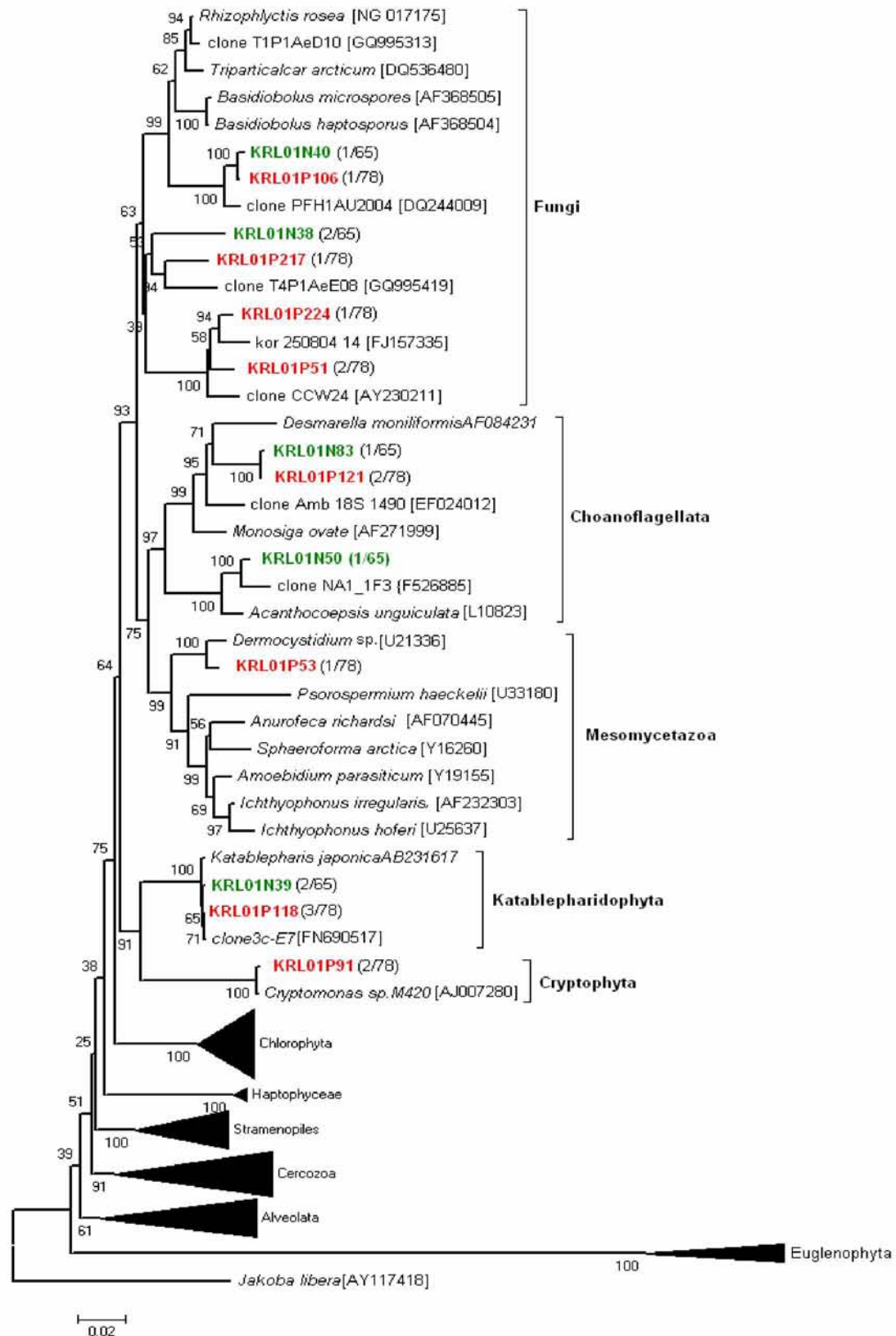
που βρέθηκαν. Στα υπόλοιπα σχήματα (Σχ. 4, Σχ. 5 και Σχ. 6) δίνονται ξεχωριστά οι επιμέρους ομάδες ώστε να φανεί ποιοι φυλότυποι εμπίπτουν στην κάθε ομάδα.

Τα ποσοστά επανάληψης των ομαδοποιήσεων των κλάδων που έγιναν με τον ίδιο τρόπο χρησιμοποιώντας το bootstrap test δίνονται δίπλα σε κάθε κλάδο. Το φυλογενετικό δένδρο δίνεται υπό κλίμακα με το μήκος των κλάδων να αντιπροσωπεύει τις εξελικτικές αποστάσεις μεταξύ των φυλότυπων. Οι περιβαλλοντικές αλληλουχίες από την λίμνη Κάρλα ομαδοποιήθηκαν με τον παραπάνω τρόπο στις εκάστοτε ομάδες. Οι φυλότυποι που ανήκουν στη βιβλιοθήκη των νανοευκαρυωτών δίνονται με έντονα πράσινα γράμματα, ενώ με κόκκινα έντονα γράμματα δίνονται οι φυλότυποι που ανήκουν στη βιβλιοθήκη των πικοευκαρυωτών. Οι παρενθέσεις δίπλα στους φυλότυπους που βρέθηκαν, δίνουν τον αριθμό των κλώνων που ανήκουν στο συγκεκριμένο φυλότυπο από τους συνολικούς κλώνους που αναλύθηκαν.



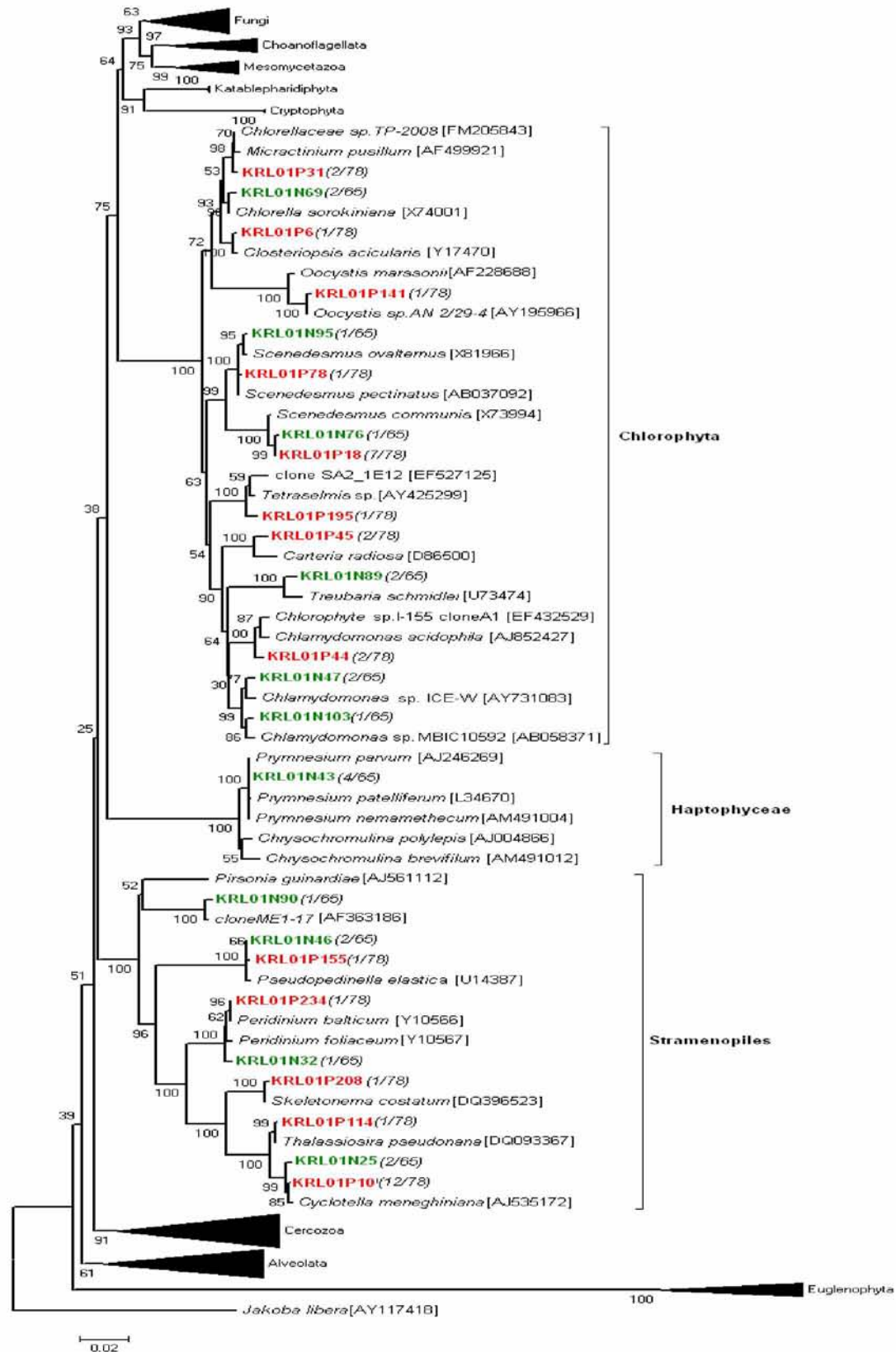
Σχήμα 3. Το φυλογενετικό δένδρο όπου φαίνονται συνεπτυγμένες οι ταξινομικές ομάδες που βρέθηκαν στην λίμνη Κάρλα. Η μπάρα αποτελεί μέτρο των νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων (δύο αλλαγές ανά 100 νουκλεοτιδικές θέσεις)

Η κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες και των δύο βιβλιοθηκών αποκάλυψε ότι οι αλληλουχίες ανήκουν σε 11 μεγάλες ταξινομικές ομάδες. Οι ταξινομικές ομάδες που βρέθηκαν είναι Fungi, Choanoflagellata, Mesomycetozoa, Katablepharidophyta, Cryptophyta, Chlorophyta, Haptophyceae, Stramenopiles, Cercozoa, Alveolata και Euglenophyta (Σχ.3). Τα σχήματα που ακολουθούν στις επόμενες σελίδες (Σχ. 4, Σχ. 5 και Σχ. 6) αποτελούν το ίδιο φυλογενετικό δένδρο αλλά δίνονται ανεπτυγμένες οι ταξινομικές ομάδες.

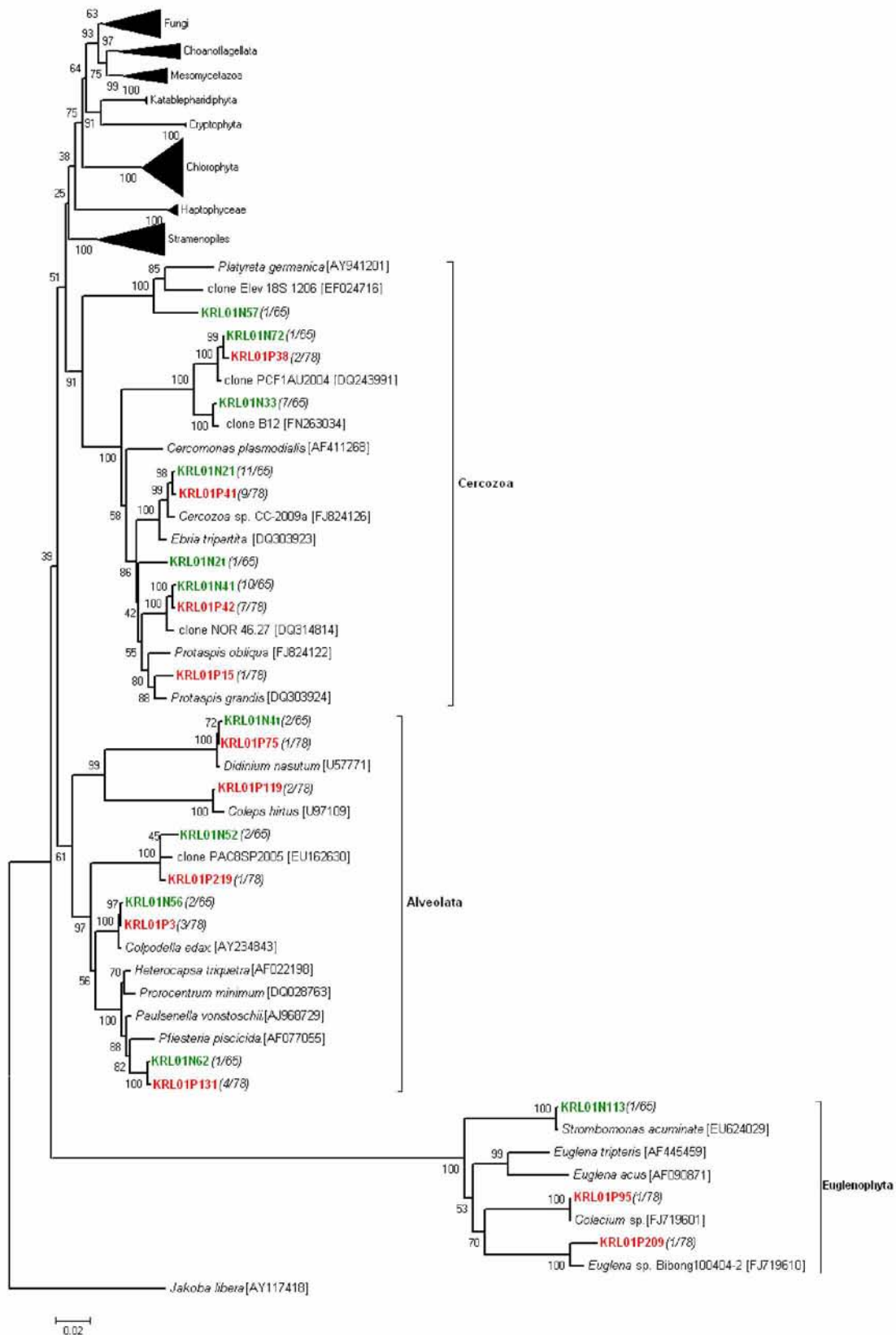


Σχήμα 4. Η τοπολογία του δένδρου όπου φαίνονται ανεπτυγμένες οι ομάδες των Fungi,

Choanoflagellata, Mesomycetozoa, Katablepharidophyta και Cryptophyta.



Σχήμα 5. Η τοπολογία του δένδρου με ανεπτυγμένες τις ομάδες των Chlorophyta, Haptophyceae και Stramenopiles.



Σχήμα 6. Η τοπολογία του δένδρου με ανεπτυγμένες τις ομάδες των Cercozoa, Alveolata και Euglenophyta

Όλοι οι φυλότυποι βρέθηκαν ομαδοποιημένοι κοντά σε προηγουμένως χαρακτηρισμένους μικροοργανισμούς ή σε αλληλουχίες περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Αναλύοντας τις ανεπτυγμένες ομάδες του Σχήματος 4 προκύπτει ότι στην ομάδα των Fungi ομαδοποιήθηκαν συνολικά έξι αλληλουχίες. Στον ίδιο κλάδο βρέθηκαν και αλληλουχίες χαρακτηρισμένων ειδών όπως τα *Rhizophlyctis rosea* και *Tritiparticalcar arcticum* που ανήκουν στα Chytridiomycota, καθώς και αλληλουχίες των ειδών *Basidiobolus microspores* και *Basidiobolus haptosporus*. Ωστόσο, οι αλληλουχίες που βρέθηκαν φάνηκε να έχουν μεγαλύτερη συσχέτιση με φυλότυπους ακαλλιέργητων μικροοργανισμών του κλάδου των Fungi. Στον κλάδο των Choanoflagellata βρέθηκαν τρεις αλληλουχίες που συσχετίστηκαν στενά με φυλότυπους ακαλλιέργητων μικροοργανισμών παρά με αλληλουχίες χαρακτηρισμένων ειδών. Ωστόσο, αλληλουχίες χαρακτηρισμένων ειδών όπως τα *Desmarella moniliformis*, *Monosiga ovata* και *Acanthocoeopsis unguiculata* τοποθετήθηκαν στον ίδιο κλάδο. Στον κλάδο των παρασιτικών Mesomycetozoa βρέθηκε μία αλληλουχία η οποία συσχετίστηκε με το γένος *Dermocystidium*. Αλληλουχίες που ανήκουν σε άλλα παρασιτικά γένη όπως τα *Psorospermium*, *Ichthyophonus* και *Amoebidium* ομαδοποιήθηκαν στον ίδιο κλάδο. Στον κλάδο των Katablepharidophyta βρέθηκαν δύο αλληλουχίες να σχετίζονται στενά με το είδος *Katablepharis japonica*. Στενά σχετισμένη με το γένος *Cryptomonas* βρέθηκε μία αλληλουχία και τοποθετήθηκε στον κλάδο των Cryptophyta.

Οι ανεπτυγμένες ομάδες στο Σχήμα 5 είναι τα Chlorophyta, Haptophyceae και Stramenopiles. Στον κλάδο των Chlorophyta βρέθηκαν 14 αλληλουχίες και παρατηρήθηκαν εσωτερικοί κλάδοι που αντιπροσωπεύουν επιμέρους ταξινομικές ομάδες, όπως τα Trebouxiophyceae, τα Chlorophyceae και τα Prasinophyceae. Παρά το γεγονός ότι η επιστημονική κοινότητα έχει αποδεχθεί τις εξελικτικές αυτές γραμμές, οι

σχέσεις μεταξύ των εξελικτικών αυτών γραμμών είναι ασαφείς (Proschold & Leliaert, 2007) και συνεπώς δεν απεικονίζονται στο Σχήμα 5. Αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες χαρακτηρισμένων ειδών που βρίσκονται στον κλάδο των Chlorophyta και με τις οποίες σχετίστηκαν οι αλληλουχίες που βρέθηκαν είναι τα είδη *Chlorella sorokiniana*, *Closteriopsis acicularis*, *Carteria radiosa*, *Treubaria schmidle*, *Oocystis marsonii* καθώς και τα γένη *Scenedesmus* και *Chlamydomonas*. Στον κλάδο των Haptophyceae εμπίπτει μία αλληλουχία η οποία σχετίστηκε στενά με την αλληλουχία του *Prymnesium nemamethecum*. Στον ίδιο κλάδο ανήκουν αλληλουχίες του γένους *Prymnesium* και *Chrysochromulina*. Στον κλάδο των Stramenopiles εμπίπτουν εννέα αλληλουχίες εκ των οποίων οι οκτώ είναι στενά συσχετισμένες με χαρακτηρισμένους μικροσκοπικούς ευκαρυώτες όπως τα είδη *Pseudopedinella elastica*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Cyclotella meneghiniana* και *Peridinium balticum*. Μία από τις εννέα αλληλουχίες συσχετίστηκε στενότερα με αλληλουχία ακαλλιέργητου μικροοργανισμού και μακρινότερα με αλληλουχία του χαρακτηρισμένου μικροοργανισμού *Pirsonia guinardiae*.

Στο Σχήμα 6 είναι ανεπτυγμένες οι ταξινομικές ομάδες των Cercozoa, Alveolata και Euglenophyta. Στον κλάδο των Cercozoa εμπίπτουν 10 αλληλουχίες οι οποίες ως επί το πλείστον τους φαίνεται να έχουν κοντινότερη σχέση με αλληλουχίες ακαλλιέργητων μικροοργανισμών παρά με χαρακτηρισμένους μικροσκοπικούς ευκαρυώτες. Ωστόσο, στον ίδιο κλάδο εμπίπτουν αλληλουχίες από χαρακτηρισμένα Cercozoa όπως τα είδη *Platyretia germanica*, *Cercomonas plasmodialis*, *Ebria tripartita* και είδη του γένους *Protaspis*. Εντός του κλάδου της ταξινομικής ομάδας των Cercozoa παρατηρείται ένας νέος εξελικτικός κλάδος. Ο κλάδος των Alveolata περιέχει εννέα αλληλουχίες που σχετίζονται με αλληλουχίες χαρακτηρισμένων ειδών όπως τα

Didinium nasutum, *Coleps hirtus*, *Colpodella edax*, και *Pfiesteria piscicida*. Τέλος, ο κλάδος των Euglenophyta είναι φανερά απομακρυσμένος από τους υπόλοιπους κλάδους και περιέχει τρεις αλληλουχίες συσχετισμένες με αλληλουχίες χαρακτηρισμένων ειδών που ανήκουν στα γένη *Colacium*, *Euglena* καθώς και *Strombomonas*.

Αναλύθηκαν δύο βιβλιοθήκες κλώνων αποτελούμενες από το κλάσμα των πικοευκαρυωτών και των νανοευκαρυωτών από την υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας. Τα κλάσματα αυτά επιλέχθηκαν ώστε τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας να είναι συγκρίσιμα με άλλες παρόμοιες μελέτες τόσο σε εσωτερικά (Lefranc *et al.* 2005, Richards *et al.* 2005, Lepere *et al.* 2006, Lefevre *et al.* 2008, Wu *et al.* 2009, Genitsaris *et al.* 2009) όσο και σε θαλάσσια οικοσυστήματα (Diez *et al.* 2001b, Moon van der Staay *et al.* 2001, Massana *et al.* 2004, Dominique *et al.* 2006, Park *et al.* 2008, Not *et al.* 2009).

Οι τιμές του δείκτη κάλυψης των δύο βιβλιοθηκών ήταν αρκετά υψηλές ώστε να έχουμε αντιπροσωπευτική εικόνα της ποικιλότητας του υπό μελέτη οικοσυστήματος και αναλύοντας περισσότερους κλώνους ελάχιστοι νέοι φυλότυποι θα αποκαλύπτονταν.

3.6 Εμφάνιση όμοιων φυλοτύπων

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκαν όμοιοι φυλότυποι τόσο στο κλάσμα των νάνο- όσο και στο κλάσμα των πικοευκαρυωτών. Παρά τις προσπάθειές μας να το αποφύγουμε, ένα γνωστό πρόβλημα το οποίο αναφέρεται στη βιβλιογραφία είναι το φράξιμο των πόρων ενός ηθμού κατά τη διαδικασία της διήθησης. Το φράξιμο οδηγεί στην παρακράτηση οργανισμών μικρότερων από τους επιθυμητούς (Diez *et al.* 2001b). Το παραπάνω δεδομένο εξηγεί την παρουσία κάποιων πικοευκαρυωτών στο κλάσμα των νανοευκαρυωτών αλλά και υποδηλώνει το πρόβλημα

της κλασματικής διήθησης. Παρατηρώντας τον Πίνακα 3, οι περιπτώσεις όπου η σχετική αφθονία κάποιων όμοιων φυλοτύπων είναι μεγαλύτερη στο κλάσμα των πικοευκαρυωτών αλλά εμφανίζονται και στο κλάσμα των νανοευκαρυωτών (δίνονται με κόκκινο), επιβεβαιώνουν τον παραπάνω ισχυρισμό.

Ωστόσο, είναι γνωστά παραδείγματα μικροσκοπικών ευκαρυωτικών οργανισμών του ίδιου είδους που αλλάζουν τόσο το μέγεθος, όσο και τη γενικότερη εξωτερική μορφολογία τους. Περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα τροφής και η παρουσία θηρευτών οδηγούν σε αυτές τις αποκλίσεις. Αναφέρονται χαρακτηριστικά βιβλιογραφικά παραδείγματα για τα είδη *Didinium nasutum* και *Scenedesmus communis* με τα οποία σχετίστηκαν αλληλουχίες όμοιες και στις δύο βιβλιοθήκες. Ο Hewett (1988) αναφέρει ότι το μέγεθος του *D. nasutum* αυξάνει όταν στο περιβάλλον το μέγεθος της λείας είναι μεγάλο, φαινόμενο που παρατηρείται και σε άλλα πρωτόζωα τα οποία θηρεύουν. Ο Trainor (1992) αναφέρει ότι το είδος *S. communis* αλλάζει τη δομή του σώματος και σχηματίζει αποικίες που διαφέρουν μορφολογικά ανάλογα με τη θερμοκρασία. Η μορφολογική διαφορά των αποικιών στο γένος *Scenedesmus* ήταν τέτοια που παλαιότερα οδήγησε σε λανθασμένη ταξινόμηση αυτών των αποικιών (Trainor 1992). Διαφορετικές μορφές μπορεί να παρατηρηθούν και όταν ένα είδος επιδεικνύει περίπλοκο κύκλο ζωής, κάτι που συμβαίνει στα παρασιτικά είδη (Cachon & Cachon 1987). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το είδος *Pfiesteria piscicida*. Στο είδος αυτό παρατηρούνται 24 ή και παραπάνω στάδια ζωής, τα οποία διαφέρουν σε μέγεθος και μπορεί να είναι μικρότερα από 10 μm αλλά να αγγίζουν και τα 400 μm (Burkholder & Glasgow 1997). Τέλος, αναφέρεται και η περίπτωση του είδους *Colpodella edax*, το οποίο έχει δύο στάδια ζωής, τροφοζώιτες με μαστίγια και κύστες, με τις κύστες να έχουν σφαιρικό

σχήμα και μικρότερο μέγεθος (Leander *et al.* 2003). Συνεπώς, οι όμοιοι φυλότυποι που βρέθηκαν στα δύο κλάσματα μπορεί να αντιπροσωπεύουν διαφορετικό μορφότυπο αλλά και διαφορετικό στάδιο στον κύκλο ζωής ενός μικροοργανισμού.

3.7 Χαρακτηριστικά των ταξινομικών ομάδων που βρέθηκαν

Η κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου αποτελεί ένα τρόπο ώστε να αποκομίσουμε βιολογική πληροφορία που βοηθά στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Στην προκειμένη περίπτωση το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε ώστε να ομαδοποιήσουμε τις αλληλουχίες σε ταξινομικές ομάδες με απώτερο σκοπό την αποκάλυψη της δομής της βιοκοινότητας των μικροσκοπικών ευκαρυωτών. Οι αλληλουχίες που ήταν όμοιες και στις δύο βιβλιοθήκες συμπεριλήφθηκαν σκοπίμως στο φυλογενετικό δένδρο, καθώς όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι όμοιοι φυλότυποι στις δύο βιβλιοθήκες μπορεί να αναπαριστούν διαφορετικό μορφότυπο ή στάδιο στο κύκλο ζωής ενός δεδομένου μικροοργανισμού. Συνεπώς, οι όμοιες αλληλουχίες που βρίσκονται σε διαφορετικό κλάσμα ενδέχεται να έχουν διαφορετική οικολογική σημασία και άρα η απεικόνισή τους στο δένδρο είναι θεμιτή. Αναφέρονται οι ταξινομικές ομάδες με τα χαρακτηριστικά που τις συνοδεύουν τόσο αυτές όσο και τους φυλότυπους που ομαδοποιήθηκαν σε αυτές.

Cercozoa. Τα Cercozoa βρέθηκε να είναι η κυρίαρχη ταξινομική ομάδα και στις δύο βιβλιοθήκες με αρκετά μεγάλη διαφορά από τις υπόλοιπες ταξινομικές ομάδες. Οι οργανισμοί αυτοί είναι ετερότροφοι και περιλαμβάνουν τόσο βακτηριοφάγα είδη όσο και αρπακτικά, τα οποία φαγοκυτταρώνουν διάφορα διάτομα στα θαλάσσια οικοσυστήματα (Schnepf & Kuhn 2000). Τα περισσότερα από τα Cercozoa καθορίζονται με βάση μοριακά χαρακτηριστικά και επιδεικνύουν τεράστια

μορφολογική, οικολογική και γενετική ποικιλότητα (Keeling 2001). Η κατηγορία αυτών των μικροοργανισμών εμφανίζεται σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα (Romari & Vaulot 2004). Αλληλουχίες που σχετίστηκαν με *Cercosozoa* έχουν βρεθεί και στην θάλασσα όπως στην Ανταρκτική, στη Μεσόγειο Θάλασσα, στο Βόρειο Ατλαντικό αλλά όχι στο ισημερινό επίπεδο του Ειρηνικού (Diez *et al.* 2001b, Moon-van der Staay *et al.* 2001). Σε εσωτερικά ύδατα τα *Cercosozoa* έχουν βρεθεί να είναι κυρίαρχα (Lepere *et al.* 2006) αλλά ποτέ δεν ήταν κυρίαρχα στο θαλάσσιο περιβάλλον (Diez *et al.* 2001b, Moon-van der Staay *et al.* 2001, Dawson & Pace 2002, Romari & Vaulot 2004). Η ταξινομική ομάδα των *Cercosozoa* δε βρέθηκε σε ολιγότροφο σύστημα ενώ η παρουσία της συνδέθηκε με ολιγομεσότροφη και εύτροφη λίμνη (Lefranc *et al.* 2005).

Ο φυλότυπος KRL01N33 σχετίστηκε με τον φυλότυπο B12 (ομοιότητα 98%) που βρέθηκε σε ίζημα υφάλμυρων νερών της Βαλτικής θάλασσας. Στην ερευνά τους οι Piwosz και Pernthaler (2010) αναφέρουν ότι ο φυλότυπος B12 βρέθηκε στη μεσόφαση μεταξύ οξυγονομένου και μη οξυγονομένου νερού, υποθέτοντας ότι ανήκει σε βενθικό ευκαρυωτικό οργανισμό ο οποίος τυχαία μπορεί να βρεθεί στην στήλη του νερού (tychoplaktonic). Ο φυλότυπος B12 βρέθηκε κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και η παρουσία του μειώθηκε όταν η θερμοκρασία του νερού έπεσε κάτω από τους 17°C (Piwosz & Pernthaler 2010). Τα *Cercosozoa* έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν κύστεις (Hoppenrath & Leander 2006), ένα χαρακτηριστικό που πιθανόν τους επιτρέπει να βρεθούν σε ανοξικά ιζήματα (Piwosz & Pernthaler 2010). Ο φυλότυπος KRL01N57 είχε μακρινή σχέση με τον φυλότυπο Elev_18S_1206 ο οποίος βρέθηκε σε χώμα και συγκεκριμένα στη ριζόσφαιρα του είδους *Populus tremuloides* από τους Lesaulnier *et al.* (2008). Οι φυλότυποι KRL01N21 και KRL01P41 σχετίστηκαν (ομοιότητα 97%) με τον φυλότυπο *Cercosozoa* sp. CC-2009a. Η αλληλουχία του γονιδίου 18S rRNA του

φυλότυπου *Cercozoa* sp. CC-2009a ανήκει στο νεοχαρακτηρισμένο είδος *Botuliforma benthica* (Chantangsi & Leander 2010). Στην έρευνα των Chantangsi & Leander (2010) το είδος *B. benthica* βρίσκεται στον ίδιο κλάδο με το είδος *Ebria tripartita*. Οι φυλότυποι KRL01N21 και KRL01P41 της παρούσας μελέτης βρίσκονται και αυτοί στον ίδιο κλάδο με το είδος *Ebria tripartita* (βλ. Σχ. 6). Παρόλο που το δείγμα στο οποίο βρέθηκε ο φυλότυπος *Cercozoa* sp. CC-2009a ήταν θαλάσσια άμμος το είδος *B. benthica* ακολουθεί ένα περιστροφικό πρότυπο κολύμβησης. Το είδος *Ebria tripartita* τρέφεται με φυτοπλαγκτόν και ιδιαίτερα με διάτομα του γένους *Skeletonema* και *Thalassiosira* (Hargraves 2002). Οι φυλότυποι KRL01N72 και KRL01P38 συσχετίστηκαν στενά με τον φυλότυπο PCF1AU2004 και ομαδοποιήθηκαν σε ένα νέο εξελικτικό κλάδο των *Cercozoa*. Ο φυλότυπος PCF1AU2004 βρέθηκε σε λίμνη της Γαλλίας και ομαδοποιήθηκε σε ένα καινούριο κλάδο των *Cercozoa* (Novel clade III) στην έρευνα των Lefevre *et al.* (2007). Οι φυλότυποι KRL01N41 και KRL01P42 σχετίστηκαν (ομοιότητα 97%) με τον φυλότυπο NOR46.27 ο οποίος βρέθηκε στον Αρκτικό Ωκεανό σε βάθος 5m και σε αλατότητα 33,49 psu. Στον κλάδο των *Cercozoa* ομαδοποιήθηκαν και είδη του γένους *Protaspis* με τα οποία παρατηρήθηκε μακρινή σχέση με τον φυλότυπο KRL01P15. Το γένος *Protaspis* αποτελείται από κοινούς θηρευτές στα θαλάσσια βενθικά οικοσυστήματα (Hoppenrath & Leander 2006).

Chlorophyta. Τα Chlorophyta αποτέλεσαν τη δεύτερη αφθονότερη ταξινομική ομάδα και στις δύο βιβλιοθήκες παρόλο που ο αριθμός φυλοτύπων που βρέθηκε είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των *Cercozoa*. Το δεδομένο αυτό υποδηλώνει ότι η ποικιλότητα (σε αριθμό ειδών) των Chlorophyta είναι μεγαλύτερη από την ποικιλότητα των *Cercozoa*, παρά το γεγονός ότι τα *Cercozoa* είναι αφθονότερα. Τα Chlorophyta είναι φωτοσυνθετικοί ευκαρυωτικοί οργανισμοί. Τα Chlorophyta είναι χαρακτηριστική

ταξινομική ομάδα οικοσυστημάτων με υψηλά ποσά θρεπτικών συστατικών (Lepere *et al.* 2007). Τα Chlorophyta βρέθηκε να κυριαρχούν και σε βιβλιοθήκη κλώνων της λίμνης Κορώνειας, μία υπερεύτροφη, ρυπασμένη και έντονα τροποποιημένη λίμνη (Genitsaris *et al.* 2009).

Οι περισσότεροι από τους φυλότυπους που ομαδοποιήθηκαν στα Chlorophyta σχετίστηκαν στενά με αλληλουχίες χαρακτηρισμένων ειδών σε αντίθεση με την μελέτη των Fawley & Buchheim (2004) στην οποία μόνο ελάχιστες αλληλουχίες σχετίστηκαν με χαρακτηρισμένα είδη. Οι Fawley & Buchheim (2004) μελέτησαν τρία διαφορετικά λιμναία οικοσυστήματα και από τους 93 φυλότυπους που βρήκαν συνολικά, μόνο τέσσερις συσχετίστηκαν με χαρακτηρισμένα είδη υποθέτοντας ότι τα μικροφύκη εμφανίζουν κρυπτικά είδη. Χαρακτηρισμένα είδη που ανήκουν στα γένη *Closteriopsis*, *Scenedesmus* και *Chlorella* αποτελούν κοινά αλλά όχι άφθονα είδη του φυτοπλαγκτού (An *et al.* 1999, Ustinova *et al.* 2001, Bashan *et al.* 2008). Ο φυλότυπος KRL01P18 (σχετική αφθονία 9% στη βιβλιοθήκη των πικοευκαρυωτών) συσχετίστηκε (99%) με είδος του γένους *Scenedesmus*, καθώς και οι φυλότυποι KRL01N76, KRL01P78 και KRL01N95. Το γένος *Scenedesmus* μπορεί να αποτελέσει ένα μεγάλο κλάσμα της συνολικής βιομάζας του φυτοπλαγκτού και βρίσκεται τόσο σε εσωτερικά όσο και σε υφάλμυρα ύδατα, ειδικά όταν το περιβάλλον είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά (An *et al.* 1999). Ο φυλότυπος KRL01N69 σχετίστηκε (99%) με το είδος *Chlorella sorokiniana*. Το είδος αυτό μπορεί να αντέξει σε υψηλές θερμοκρασίες και εντάσεις φωτός και έχει δειχθεί ότι μπορεί να απομακρύνει αποτελεσματικά τα αμμωνιακά άλατα NH_4^+ που βρίσκονται στο νερό (Bashan *et al.* 2008). Ο φυλότυπος KRL01P45 σχετίστηκε με το είδος *Carteria radiosia*. Μελέτη σε εύτροφη λίμνη της Ανταρκτικής έδειξε ότι τα Chlorophyta συμπεριλαμβανομένου του γένους *Carteria* αποτέλεσαν

μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού των μικροοργανισμών που βρέθηκαν κατά την εαρινή άνθιση (Buttler 1999). Ο φυλότυπος KRL01P195 σχετίστηκε (98%) με τον φυλότυπο SA2_1E12 ο οποίος απομονώθηκε από τους Behnke *et al.* (2010) από ανοξικό φιόρδ. Ο φυλότυπος KRL01P195 βρέθηκε στον ίδιο κλάδο με είδος του γένους *Tetraselmis*. Οι Tardio *et al.* (2003) αναφέρουν ότι είδη του γένους *Tetraselmis* ήταν αυτά τα οποία έδειξαν το μέγιστο βαθμό πολλαπλασιασμού σε βέλτιστες συνθήκες εμπλουτισμού με φώσφορο.

Alveolata. Η ταξινομική ομάδα των Alveolata αποτελεί μία από τις κυρίαρχες ομάδες σε διάφορες θάλασσες του παγκόσμιου ωκεανού (Park *et al.* 2008, Not *et al.* 2009). Οι Diez *et al.* (2001b) βρήκαν ότι τα Alveolata ήταν η δεύτερη σε αφθονία ταξινομική ομάδα στην Μεσόγειο και στο Β. Ατλαντικό και οι Moon-van der Staay *et al.* (2001) ότι αποτελούν σημαντική ταξινομική ομάδα και στο ισημερινό επίπεδο του Ειρηνικού Ωκεανού. Τα Alveolata μπορούν να βρεθούν σε διάφορα περιβάλλοντα όπως ολιγότροφα, εύτροφα και ανοξικά. Οι Dominique *et al.* (2006) αναφέρουν ότι τα Alveolata κυριάρχησαν σε έναν ολιγότροφο σταθμό δειγματοληψίας τους, ωστόσο η συγκεκριμένη ταξινομική ομάδα έχει βρεθεί και σε εύκρατα παράκτια ύδατα όπου υπάρχουν σημαντικές ποσότητες θρεπτικών συστατικών (Romari & Vaultot 2004). Οι Behnke *et al.* (2006) βρήκαν ότι σε ένα θαλάσσιο ανοξικό φιορδ στο οποίο παρατηρούνται διαβαθμίσεις O_2/H_2S τα Alveolata ήταν και εκεί η κυρίαρχη ομάδα μεταξύ των πρωτόζωων. Όσο γνωρίζουμε, αλληλουχίες που ανήκουν σε Alveolata παρατηρούνται σε λιμναία οικοσυστήματα (Richards *et al.* 2005, Lepere *et al.* 2008) σε μικρότερες όμως σχετικές αφθονίες σε σύγκριση με τα θαλάσσια οικοσυστήματα. Εξάιρεση αποτελεί η έρευνα των Lefevre *et al.* (2008) όπου τα Alveolata κυριάρχησαν στην υπό μελέτη λίμνη, ωστόσο σημειώνουν ότι η εμφάνισή τους ακολουθούσε εποχικό

πρότυπο. Στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι στα Alveolata ανήκουν γένη όπως το γένος *Colpodella*, τα οποία είναι υποχρεωτικά παράσιτα στα υδάτινα οικοσυστήματα.

Οι φυλότυποι KRL01P3 και KRL01N56 σχετίστηκαν στενά (99%) με το είδος *Colpodella edax*. Το είδος χαρακτηρίζεται από κύτταρα (<10μm) τα οποία θηρεύουν πρωτόζωα μεγαλύτερα από τα ίδια, ωστόσο μπορεί να αποτελούν και παράσιτα των Chlorophyta ή των Cryptophyta (Brugerolle 2002). Το είδος διαπερνά το κύτταρο με τη βοήθεια ενός ρύγχους (rostrum) και απομυζά το κυτταρόπλασμα μέσα σε λίγα λεπτά (Brugerolle 2002). Το πρότυπο θρέψης είναι γνωστό ως μυζοκύτωση (myzocytosis) και οι Lefevre *et al.* (2008) το θεωρούν χαρακτηριστικό του παρασιτισμού. Ο φυλότυπος PAC8SP2005 που βρέθηκε από τους Lefevre *et al.* (2008) σε λίμνη της Γαλλίας ομαδοποιήθηκε στα Alveolata και μάλιστα σε ένα καινούριο κλάδο των Perkinsozoa. Με τον φυλότυπο PAC8SP2005 σχετίστηκαν οι φυλότυποι KRL01N52 (ομοιότητα 97%) και KRL01P219 (ομοιότητα 98%). Ο φυλότυπος KRL01P119 σχετίστηκε (99%) με το είδος *Coleps hirtus* το οποίο προτιμά μεσότροφα ύδατα και δεν είναι πολυάριθμο σε εύτροφα οικοσυστήματα (Beaver & Crisman 1989). Η σχετική αφθονία του είδους που παρατηρήσαμε στην βιβλιοθήκη των πικοευκαρυωτών ήταν 2,6%. Το γένος *Coleps* αποτελεί θηρευτή του γένους *Cryptomonas* (Pedros-Alio *et al.* 1995). Οι φυλότυποι KRL01N4t και KRL01P75 συσχετίστηκαν με το είδος *Didinium nasutum*, έναν ετερότροφο αρπακτικό οργανισμό. Το πρότυπο θήρευσης που ακολουθεί βασίζεται στη χρήση τοξικών κύστεων (toxicysts) για να παγιδεύσει και να παραλύσει το θήραμα του, το οποίο αργότερα το εγκολπώνει με το πρόσθιο κυτταρόστομά του (Wessenberg & Antipa 1970). Οι φυλότυποι KRL01N62 και KRL01P131 συσχετίστηκαν (97%) με το είδος *Paulsenella vonstoschii*, ωστόσο η τοπολογία του δένδρου τους εμφανίζει πιο κοντά στο είδος *Pfiesteria piscicida*. Οι Kuhn & Medlin

(2005) έδειξαν ότι τόσο το είδος *Paulsenella vonstoschii* όσο και το είδος *Pfiesteria piscicida* ανήκουν στην τάξη Peridinales. Τα δύο αυτά είδη δρουν παρασιτικά και έχουν παρόμοιο πρότυπο τροφοληψίας (myzocytosis) και κύκλο ζωής (Steidinger *et al.* 2001). Το γένος *Paulsenella* έχει θαλάσσιους εκπροσώπους που τρέφονται με θαλάσσια διάτομα (Schnepf *et al.* 1985) και το είδος *P. vonstoschii* έχει παρατηρηθεί σχεδόν να εξαλείφει έναν πληθυσμό διατόμων (Drebes & Schnepf, 1988).

Stramenopiles. Τα Stramenopiles αποτελούν ταξινομική ομάδα των πικοευκαρυωτών αρκετά συνηθισμένη στα θαλάσσια οικοσυστήματα (Diez *et al.* 2001b, Massana *et al.* 2004), εντοπίζονται όμως και σε λιμναία οικοσυστήματα (Lefranc *et al.* 2005, Lefevre *et al.* 2008, Lepere *et al.* 2008). Οι Moon van der Staay *et al.* (2001) τονίζουν ότι τα Stramenopiles έχουν ρόλους κλειδιά στους ωκεανούς (ιδιαίτερα τα διάτομα) και περιλαμβάνουν τόσο αυτότροφες όσο και ετερότροφες ομάδες. Οι Lefevre *et al.*, 2008 αναφέρουν ότι η παρουσία των Stramenopiles στην ερευνά τους αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού.

Οι φυλότυποι KRL01P10 και KRL01N25 συσχετίστηκαν (99%) με το είδος *Cyclotella meneghiniana*, με τον φυλότυπο KRL01P10 να είναι κυρίαρχος στην βιβλιοθήκη των πικοευκαρυωτών. Το είδος *C. meneghiniana* είναι από τα πιο κοινά είδη διατόμων που απαντώνται σε μεγάλη ποικιλία εσωτερικών υδάτων αλλά έχει την τάση να γίνει άφθονο σε ρυπασμένα περιβάλλοντα (Finlay *et al.* 2002). Παγκόσμια έχει καταγραφεί ως άφθονο ή σε αξιοσημείωτες συχνότητες εμφάνισης σε πέντε ρυπασμένους ποταμούς και σε τέσσερις υπερεύτροφες λίμνες (Finley *et al.* 2002). Ο φυλότυπος KRL01P208 συσχετίστηκε (99%) με την αλληλουχία του γονιδίου 18S rRNA του είδους *Skeletonema costatum* που βρέθηκε στον κόλπο Naples από τους Sarno *et al.* (2005). Στον κόλπο Naples το είδος συνεισφέρει σημαντικά στην

φυτοπλαγκτική άνθιση κατά το τέλος της άνοιξης (Ribera d'Alcala' *et al.* 2004). Γενικά, αναφέρεται ως είδος με αντοχές σε ένα εύρος περιβαλλόντων, αλλά ευδοκیمی σε παράκτια ύδατα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά (Hasle 1973). Ο φυλότυπος KRL01P208 σχετίστηκε (99%) με το είδος *Thalassiosira pseudonana*. Το γένος *Thalassiosira* αποτελείται κυρίως από θαλασσινά είδη (180 είδη), ενώ τουλάχιστο 12 είδη έχουν βρεθεί σε εσωτερικά ύδατα (Round *et al.* 1990, Silva & Hasle 1994). Ο φυλότυπος KRL01P234 σχετίστηκε (99%) με το είδος *Peridinium balticum* και ο φυλότυπος KRL01N32 σχετίστηκε (97%) με το είδος *Peridinium foliaceum*. Το γένος *Peridinium* περιλαμβάνει είδη τα οποία πιθανόν σχετίζονται με την παραγωγή τοξινών (Rengefors & Legrand 2001). Οι Kempton *et al.* (2002) αναφέρουν ότι το είδος *P. foliaceum* (με την νέα ονομασία *Kryptoperidinium foliaceum*) είναι ένα είδος που προκαλεί ερυθρές παλίρροιες στη Ν.Καρολίνα. Ο φυλότυπος KRL01N90 συσχετίστηκε με τον θαλασσινό φυλότυπο ME1-17 (99%) ο οποίος έχει προέλθει από την Μεσόγειο και ομαδοποιήθηκε σε νέο κλάδο των Stramenopiles από τους Diez *et al.* (2001b).

Haptophyceae. Τα Haptophyceae αποτελούν μία ταξινομική ομάδα φωτοσυνθετικών μικροσκοπικών ευκαρυωτών, η οποία στις περισσότερες μελέτες τόσο σε θαλάσσια όσο και σε εσωτερικά ύδατα παρουσίασε σχετικά μικρή συχνότητα εμφάνισης (Diez *et al.* 2001b, Moon van der Staay *et al.* 2001, Lefranc *et al.* 2005, Richards *et al.* 2005, Lepere *et al.* 2008, Not *et al.* 2009). Εξάιρεση αποτελεί η έρευνα των Genitsaris *et al.* (2009) όπου το *Prymnesium parvum* αποτέλεσε το κυρίαρχο μορφοείδος στην υπερεύτροφη λίμνη Κορώνεια. Ο φυλότυπος KRL01N43 συσχετίστηκε στενά (99%) με το είδος *Prymnesium nemamethecum* και η τοπολογία του δένδρου ομαδοποιεί τον φυλότυπο αυτό εξίσου κοντά στα είδη *Prymnesium pateliferrum* και *Prymnesium parvum*. Το γένος *Prymnesium* εμφανίζεται και σε

θαλάσσιο περιβάλλον (Diez *et al* 2001b, Not *et al.* 2009) υποδεικνύοντας ότι τα είδη του γένους αυτού αντέχουν σε μεγάλο εύρος αλατότητας. Τα Haptophyceae έχουν ανθεκτικά στάδια ζωής (Paddock 1968) και το γένος *Prymnesium* σχηματίζει κύστες (Beltrami *et al.* 2007). Είδη του γένους *Prymnesium* σχηματίζουν ανθίσεις σε υφάλμυρα και εσωτερικά ύδατα και μπορεί να έχουν τεράστιο αντίκτυπο στο βιογεωχημικό κύκλο, την οικολογία αλλά και την οικονομία (Edvardsen & Medlin 2007). Μαζικοί θάνατοι ψαριών αλλά και πουλιών έχουν αποδοθεί σε ανθίσεις ειδών του γένους *Prymnesium* (Lindholm *et al.* 1999, Moustaka-Gouni *et al.* 2004).

Fungi. Η ομάδα των Fungi που βρίσκεται στα εσωτερικά ύδατα απαρτίζεται από ποικίλες ταξινομικές ομάδες με εξίσου ποικίλο τρόπο ζωής (Sigee 2005). Αποτελείται από σαπροτροφικούς οργανισμούς αλλά και από γνωστά παράσιτα του φυτοπλαγκτού στα εσωτερικά ύδατα και η ταξινομική ομάδα των Chytridiomycota εμπλέκεται στη ρύθμιση του πληθυσμού των διατόμων (Ibelings *et al.* 2004, Lefevre *et al.* 2008). Οι Ibelings *et al.* (2004) αναφέρουν ότι επιλεκτικός παρασιτισμός των Fungi σε συγκεκριμένο είδος μπορεί να τερματίσει απότομα φυτοπλαγκτικές ανθίσεις και να ευνοήσει την ανάπτυξη άλλων ειδών που ανταγωνίζονται τους ίδιους πόρους. Η ομάδα των Chytridiomycota μπορεί να προσβάλει πάνω από το 90% των κυττάρων που μπορούν να λειτουργήσουν ως ξενιστές και κάθε προσβολή έχει ως αποτέλεσμα τον θάνατο του ξενιστή (Canter & Lund 1951). Η ταξινομική ομάδα των Fungi, που αποτελείται αποκλειστικά από ετερότροφους μικροσκοπικούς ευκαρυώτες, έχει βρεθεί σε oligότροφη, μεσότροφη και εύτροφη λίμνη, αποτελώντας την κυρίαρχη ομάδα στην oligότροφη λίμνη (Lefranc *et al.* 2005). Η παρουσία των μυκήτων σε μεσότροφη λίμνη της Γαλλίας ήταν εντονότερη την εαρινή/καλοκαιρινή περίοδο (Lefevre *et al.* 2008). Καθώς η παρουσία των μυκήτων είναι σχετικά μικρή στα πελαγικά θαλάσσια

οικοσυστήματα (Diez *et al.* 2001b, Massana *et al.* 2004, Yuan *et al.* 2004) οι Lepere *et al.* (2006) ισχυρίζονται ότι η παρουσία των Fungi αποτελεί χαρακτηριστικό των λιμναίων οικοσυστημάτων.

Οι φυλότυποι KRL01N40 και KRL01P106 σχετίστηκαν (96%) με το φυλότυπο PFH1AU2004 ο οποίος βρέθηκε σε oligομεσότροφη λίμνη της Γαλλίας. Ο φυλότυπος PFH1AU2004 τοποθετήθηκε στον κλάδο των Chytridiomycota από τους Lefevre *et al.* (2007). Οι φυλότυποι KRL01N38 και KRL01P217 συσχετίστηκαν (92%) με τον φυλότυπο T4P1AeE08 [GQ995419] ο οποίος βρέθηκε στην μελέτη των Freeman *et al.* (2009). Η μελέτη των Freeman *et al.* (2009) δεν περιλαμβάνει το όνομα του φυλοτύπου στη τοπολογία του φυλογενετικού δένδρου που παρουσιάζεται, ωστόσο σημειώνει ότι όλες οι αλληλουχίες της μελέτης έχουν κατατεθεί στη GenBank με αριθμούς GQ995246 - GQ995438 και GQ995439 - GQ995448, συμπεριλαμβάνοντας και τον παραπάνω φυλότυπο. Οι παραπάνω αλληλουχίες έχουν βρεθεί σε έδαφος παγετώνων, ένα περιβάλλον που χαρακτηρίζεται από τους Freeman *et al.* (2009) ως παγερό, εκτεθειμένο σε υψηλή υπεριώδη ακτινοβολία το καλοκαίρι και με δραματικές διακυμάνσεις υγρασίας. Στην παραπάνω μελέτη το 70% των αλληλουχιών των Fungi άνηκε σε Chytridiomycota, παρόλο που όπως αναφέρεται τα Chytridiomycota απαιτούν στήλη νερού για την αναπαραγωγή τους. Η παρουσία των Chytridiomycota στο περιβάλλον των παγετώνων αποδίδεται στην υπάρχουσα υγρασία (Freeman *et al.* 2009). Αξίζει να αναφερθεί ότι στον κλάδο των Chytridiomycota οι μελέτες είναι περιορισμένες και οι περιγραφές για τα είδη αυτού του κλάδου είναι ανεπαρκείς (Shearer *et al.* 2004). Ο φυλότυπος KRL01P224 σχετίστηκε (95%) με τον φυλότυπο kor_250804_14 ο οποίος βρέθηκε στην υπερέυτροφη λίμνη Κορώνεια από τους Genitsaris *et al.* (2009). Ο φυλότυπος KRL01P51 σχετίστηκε (93%) με τον φυλότυπο

CCW24, ο οποίος βρέθηκε στην υδάτινη στήλη ανοξικού θαλάσσιου περιβάλλοντος με αλατότητα 31,6 psu και συγκέντρωση οξυγόνου 0.06 mg/ml (Stoeck & Epstein 2003).

Katablepharidophyta. Η ταξινομική ομάδα των Katablepharidophyta αποτελείται από ετερότροφα μαστιγωτά, τα οποία αρχικά είχαν ταξινομηθεί ως Cryptophyta και μόλις πρόσφατα αποδείχθηκε ότι αποτελούν ξεχωριστή ομάδα, αδελφική των Cryptophyta (Okamoto & Inouye 2005). Η τοπολογία του φυλογενετικού δένδρου που κατασκευάστηκε συμφωνεί με το παραπάνω δεδομένο. Οι Okamoto *et al.* (2009), αναθεωρώντας την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, αναφέρουν ότι η ταξινομική ομάδα των Katablepharidophyta αποτελείται από κοσμοπολίτικα είδη τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο ως θηρευτές τόσο σε θαλάσσια όσο και σε εσωτερικά οικοσυστήματα. Οι φυλότυποι KRL01P118 και KRL01N39 συσχετίστηκαν (99%) με τον φυλότυπο 3c-E7 ο οποίος όπως φαίνεται από τις πληροφορίες της GenBank [FN690517] απομονώθηκε από θαλάσσιο πάγο.

Choanoflagellata. Η ταξινομική ομάδα των Choanoflagellata βρίσκεται τόσο σε εσωτερικά (Lepere *et al.* 2006, Lefranc *et al.* 2005) όσο και σε θαλάσσια ύδατα (Moon van der Staay *et al.* 2001). Η ταξινομική ομάδα αυτή παρατηρήθηκε σε μέτριες συγκεντρώσεις θρεπτικών (Lepere *et al.* 2007) ενώ δεν παρατηρήθηκε στην εύτροφη λίμνη της μελέτης των Lefranc *et al.* (2005). Η ταξινομική ομάδα των Choanoflagellata αποτελείται από επιφυτικούς οργανισμούς οι οποίοι εξαρτώνται τόσο από την παρουσία μικροφυκών (Carrías *et al.* 1998), όσο και από την ποιότητα των διαθέσιμου οργανικού υλικού, καθώς αρκετά μέλη της είναι προσαρμοσμένα στη χρήση διαλυμένου οργανικού υλικού και κολλοειδών οργανικών σωματιδίων (Sherr *et al.* 1997)

Οι φυλότυποι KRL01N83 και KRL01P121 σχετίστηκαν με τον φυλότυπο Amb_18S_1490 ο οποίος βρέθηκε στη ριζόσφαιρα του είδους *Populus tremuloides* από

τους Lesaulnier *et al.* (2008). Ο φυλότυπος KRL01N50 συσχετίστηκε στενά (98%) με τον φυλότυπο NA1_1F3. Ο φυλότυπος NA1_F3 απομονώθηκε από τη μεσόφαση μεταξύ οξυγονομένου και μη οξυγονομένου θαλασσινού νερού από ένα ανοξικό φιορδ (Behnke *et al.* 2010)

Euglenophyta. Μέλη της ταξινομικής ομάδας των Euglenophyta διαβιούν σε αλμυρά, υφάλμυρα και εσωτερικά ύδατα και μπορεί να είναι φαγότροφοι, οσμώτροφοι ή αυτότροφοι μικροοργανισμοί (Linton *et al.* 2010). Στον κλάδο των Euglenophyta βρέθηκαν τρεις φυλότυποι που ανήκουν σε τρία διαφορετικά γένη (*Euglena*, *Strombomonas* και *Colacium*). Τα γένη *Euglena*, *Strombomonas* και *Colacium* είναι όλα γένη που φωτοσυνθέτουν (Triemer & Farmer 2007). Αξίζει να σημειωθεί ότι είδη που ανήκουν στο γένος *Colacium* είναι επιβιώτες και σχηματίζουν αποικίες πάνω σε άλλους υδρόβιους οργανισμούς (Al-Dhaheri & Willey 1996). Ο φυλότυπος KRL01P95 σχετίστηκε (99%) με είδος του γένους *Colacium*.

Cryptophyta. Η ταξινομική ομάδα των Cryptophyta βρίσκεται τόσο σε εσωτερικά (Lefranc *et al.* 2005, Lepere *et al.* 2006, Genitsaris *et al.* 2009, Wu *et al.*, 2009) όσο και σε θαλάσσια οικοσυστήματα (Not *et al.* 2009, Massana *et al.* 2004). Οι Lepere *et al.* (2007) εντόπισαν Cryptophyta σε χαμηλές αλλά και υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών σε συνδυασμό με παρουσία ή απουσία ψαριών. Οι Lefranc *et al.* (2005) σημειώνουν ότι τα Cryptophyta βρέθηκαν σε λίμνες διαφορετικής κατάστασης (ολιγότροφη, ολιγομεσότροφη και εύτροφη). Οι Wu *et al.* (2009) εντόπισαν μέλη της ταξινομικής ομάδας των Cryptophyta σε όλες τις λίμνες που μελέτησαν, όπου η κάθε μια είχε διαφορετική αλατότητα και υψόμετρο. Cryptophyta έχουν αναφερθεί και σε λίμνες της Ανταρκτικής (McKnight *et al.* 2000, Marshall & Laybourn-Parry 2002). Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω βιβλιογραφικά παραδείγματα

Cryptophyta απαντώνται σε αρκετά διαφορετικά περιβάλλοντα. Ο μοναδικός φυλότυπος KRL01P91 που βρέθηκε σε αυτή την ταξινομική ομάδα συσχετίστηκε (99%) με είδος του γένους *Cryptomonas*.

Mesomycetazoa. Η ταξινομική ομάδα των Mesomycetazoa αποτελείται από προαιρετικά ή υποχρεωτικά παράσιτα (Mendoza *et al.* 2002). Στα Mesomycetazoa έχουν περιγραφεί δύο τάξεις, εκ των οποίων η τάξη των Dermocystida αποτελείται αποκλειστικά από παθογόνους μικροοργανισμούς τόσο των ψαριών (*Dermocystidium* sp.) όσο των θηλαστικών και των πουλιών (Mendoza *et al.* 2002). Ο φυλότυπος KRL01P53 ομαδοποιήθηκε στην ταξινομική ομάδα των Mesomycetazoa και σχετίστηκε (95%) με είδος του γένους *Dermocystidium*. Το γένος *Dermocystidium* παρασιτεί σε ιχθύδια εσωτερικών υδάτων κυρίως όταν η θερμοκρασία του νερού είναι χαμηλή (Hoglund *et al.* 1997).

Να σημειωθεί ότι οι παραπάνω ταξινομικές ομάδες παρατηρήθηκαν και οπτικά με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά σε μη συντηρημένο, φρέσκο δείγμα νερού (M. Moustaka-Gouni, αδημοσίευτα δεδομένα). Παρατηρήθηκαν σχεδόν όλα τα είδη της ταξινομικής ομάδας των Chlorophyta και κάποια είδη της ομάδας των Fungi. Βρέθηκαν επίσης είδη που ανήκουν στα γένη *Coleps*, *Skeletonema*, *Thalassiosira* αλλά και είδη του γένους *Prymnesium* και *Pfiesteria* που είναι γνωστά ότι παράγουν τοξίνες. Άλλοι οργανισμοί οι οποίοι βρέθηκαν και επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των μοριακών τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στα γένη *Cyclotella*, *Colpodella*, *Peridinium*, *Cryptomonas*, *Ebria* καθώς και *Euglena*.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ποικιλότητα του φυλογενετικού γονιδίου 18S ήταν υψηλή. Οι δείκτες Shannon τόσο στην βιβλιοθήκη των νανοευκαρυωτών όσο και στη βιβλιοθήκη των πικοευκαρυωτών βρέθηκαν να είναι πολύ κοντά στη μέγιστη τιμή που θα μπορούσε να πάρει ο δείκτης υποδηλώνοντας αυξημένη ποικιλότητα των μικροσκοπικών ευκαρυωτών στην λίμνη Κάρλα. Ο λόγος της παρατηρούμενης προς την μέγιστη ποικιλότητα είναι σχεδόν ταυτόσημος για τις δύο βιβλιοθήκες οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ισοκατανομή στην αφθονία των ειδών. Η παρατηρούμενη ποικιλότητα, το γεγονός ότι κάθε κλάσμα είχε φυλότυπους που είχαν έναν αντιπροσωπευτικό κλώνο (singletons) αλλά και η παρουσία 11 μεγάλων ταξινομικών ομάδων υποδηλώνει μία μη εξειδικευμένη κοινότητα μικροσκοπικών ευκαρυωτών σε επίπεδο είδους.

Η σύνθεση της κοινότητας των μικροσκοπικών ευκαρυωτών φαίνεται να είναι αρκετά περίπλοκη εφόσον βρέθηκαν 11 μεγάλες ταξινομικές ομάδες. Οι ταξινομικές ομάδες που βρέθηκαν στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις ως προς το πρότυπο θρέψης, τα ενδιαιτήματα που διαβιούν αλλά και το επίπεδο τροφικής κατάστασης στο οποίο ευημερούν. Όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, όλες οι ταξινομικές ομάδες εμφανίζονται τόσο σε εσωτερικά όσο και σε θαλάσσια οικοσυστήματα, στην υδάτινη στήλη του νερού αλλά και στο ίζημα. Αρκετοί φυλότυποι της λίμνης Κάρλας σχετίστηκαν με φυλότυπους που έχουν βρεθεί σε υδάτινα οικοσυστήματα διαφορετικής αλατότητας και θερμοκρασίας αλλά και σε ίζημα ή χώμα. Ακραία περιβάλλοντα υπό συνθήκες ανοξίας και έδαφος παγετώνων αποτελούν ενδιαιτήματα κάποιων μικροσκοπικών ευκαρυωτών, οι αλληλουχίες των οποίων συσχετίστηκαν με φυλότυπους της παρούσας μελέτης. Φυλότυποι που

εμπίπτουν στα Cercozoa, Alveolata, Chlorophyta, Fungi και Choanoflagellata συσχετίστηκαν με αλληλουχίες μικροσκοπικών ευκαρυωτών που απομονώθηκαν σε ανοξικά περιβάλλοντα.

Η λίμνη Κάρλα αποτελεί ένα νεοσχηματιζόμενο οικοσύστημα το οποίο βρίσκεται υπό συνεχείς μεταβολές. Κάποιοι μικροοργανισμοί πιθανόν απέμειναν στις ελώδεις εκτάσεις και στο ίζημα αυτών, μετά την ξήρανση της λίμνης, καθώς είναι γνωστός ο σχηματισμός ανθεκτικών κύστεων στα Cercozoa (Hoppenrath & Leander 2006), στα Haptophyceae (Beltrami *et al.* 2007) και στα Alveolata (Leander *et al.* 2003). Ωστόσο, νέοι μικροσκοπικοί ευκαρυώτες εποίκίζουν το νεοσχηματιζόμενο οικοσύστημα. Ένας πιθανός τρόπος προέλευσης των μικροσκοπικών ευκαρυωτών στη λίμνη είναι η μεταφορά τους μέσω εισροής υδάτων από τον ποταμό Πηνειό, καθώς η λίμνη Κάρλα δέχεται ύδατά του για τον επαναπλημμυρισμό της. Η αερομεταφορά μικροσκοπικών ευκαρυωτών αποτελεί έναν ακόμα τρόπο ώστε αυτοί να βρεθούν στην υδάτινη στήλη της λίμνης. Μονοκύτταρα φύκη υπάρχουν στην ατμόσφαιρα και μπορεί να προέρχονται από υδάτινα περιβάλλοντα ή από χερσαίες εκτάσεις (Carson & Brown 1976). Οι μετεωρολογικές συνθήκες αποτελούν βασικό παράγοντα της εξάπλωσης τους (Brown *et al.* 1964). Οι Chrisostomou *et al.* (2009) πραγματοποίησαν μία έρευνα για αερομεταφερόμενους φυτοπλαγκτονικούς μικροοργανισμούς πάνω από τη φραγμαλίμνη του Πολυφύτου. Η πλειοψηφία των αερομεταφερόμενων φυτοπλαγκτονικών μικροοργανισμών ήταν Chlorophyta (αναφέρονται τα γένη *Chlorella* και *Scenedesmus*), αλλά και ταξινομικές ομάδες όπως Cryptophyta, Euglenophyta και Bacillariophyta. Όλες οι παραπάνω ταξινομικές ομάδες βρέθηκαν και στην υδάτινη στήλη της φραγμαλίμνης του Πολυφύτου. Η ταξινομική ομάδα των Chlorophyta έχει βρεθεί να είναι κυρίαρχη και σε άλλες αεροβιολογικές μελέτες

(Brown *et al.* 1964, Schlichting 1969) και αποτελεί τους πρώτους εποικιστές σε τεχνητές λίμνες (Williams *et al.* 1994). Αλληλουχίες που ομαδοποιήθηκαν στις ταξινομικές ομάδες των Chlorophyta, Cryptophyta, Euglenophyta καθώς και διάτομα απομονώθηκαν από την υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας. Μικροσκοπικοί ευκαρυώτες θαλασσινής προέλευσης έχουν επίσης καταγραφεί να αερομεταφέρονται (Stevenson & Collier 1962, Maynard 1968). Μεταφορά μικροσκοπικών ευκαρυωτών μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με τα παρυδάτια πουλιά (Proctor 1959) καθώς και με είδη υδρόβιων εντόμων (Revill *et al.* 1967). Η παρουσία φυλοτύπων στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας που συσχετίστηκαν με φυλότυπους μικροσκοπικών ευκαρυωτών διαφορετικών οικολογικών απαιτήσεων εξηγείται από τους παραπάνω τρόπους.

Τα Cercozoa και τα Chlorophyta ήταν οι ομάδες που κυριάρχησαν και στις δύο βιβλιοθήκες. Η παρουσία της ταξινομικής ομάδας των Cercozoa έχει συσχετιστεί με ολιγομεσότροφα και εύτροφα οικοσυστήματα (Lefranc *et al.* 2005), ενώ τα Chlorophyta είναι χαρακτηριστική ταξινομική ομάδα οικοσυστημάτων με υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών (Lepere *et al.* 2007, Genitsaris *et al.* 2009). Οι φυλότυποι που ομαδοποιήθηκαν στα Chlorophyta ξεπερνούν σε αριθμό τους φυλότυπους όλων των υπόλοιπων ταξινομικών ομάδων, γεγονός που εκτός από την υψηλή ποικιλότητα της ταξινομικής αυτής ομάδας, υποδηλώνει ότι το οικοσύστημα έχει συμπτώματα ευτροφισμού. Επιπλέον, ο φυλότυπος που κυριάρχησε στη βιβλιοθήκη των πικοευκαρυωτών συσχετίστηκε με το είδος *Cyclotella meneghiniana*, το οποίο έχει την τάση να γίνεται άφθονο σε ρυπασμένα περιβάλλοντα (Finlay *et al.* 2002). Η ταξινομική ομάδα των Cercozoa ήταν η αφθονότερη, αποτελεί όμως μία ομάδα που εμφανίζεται σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα (Romari & Vaulot 2004). Ο νέος εξελικτικός κλάδος

που εμφανίστηκε στην ομάδα των Cercozoa αφήνει την υπόνοια ύπαρξης άγνωστων μικροσκοπικών ευκαρυωτών που ανήκουν στην ομάδα αυτή.

Οι αλληλουχίες που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη σχετίστηκαν με αλληλουχίες ταξινομικών ομάδων που παίζουν διαφορετικό ρόλο στο τροφικό πλέγμα. Τα Chlorophyta, Euglenophyta και Haptophyceae περιλαμβάνουν είδη περισσότερα εκ των οποίων είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί. Τα Cercozoa περιλαμβάνουν ετερότροφα είδη που θηρεύουν βακτήρια και διάτομα (Schnepf & Kuhn 2000). Διάτομα του γένους *Skeletonema*, *Thalassiosira* και *Cyclotella* συσχετίστηκαν με φυλότυπους της λίμνης Κάρλας. Τα Katablepharidophyta περιλαμβάνουν ετερότροφα μαστιγωτά (Okamoto & Inouye 2005) και το γένος *Coleps* (Alveolata) αποτελεί θηρευτή του γένους *Cryptomonas* (Pedros-Alio *et al.* 1995). Η ταξινομική ομάδα των Stramenopiles αποτελείται από αυτότροφες και ετερότροφες ομάδες (Moon van der Staay *et al.* 2001). Κάποιοι φυλότυποι συσχετίστηκαν και με παρασιτικά είδη όπως το είδος *Colpodella edax* που μπορεί να παρασιτεί σε Chlorophyta ή Cryptophyta (Brugerolle 2002) και το είδος *Paulsenella vonstoschii* που θηρεύει επί των διατόμων (Drebes & Schnepf 1988). Η ταξινομική ομάδα των Fungi αποτελείται από σαπροτροφικούς οργανισμούς, γνωστά παράσιτα του φυτοπλαγκτού αλλά και των διατόμων (Ibelings *et al.* 2004, Lefevre *et al.* 2008). Το γένος *Dermocystidium* περιλαμβάνει είδη αποκλειστικά παθογόνα για τα ψάρια (Mendoza *et al.* 2002).

Τόσο οι τεχνικές μοριακής ανίχνευσης όσο και η μορφολογική παρατήρηση συνηγορούν στην παρουσία ειδών που είναι γνωστά ότι παράγουν τοξίνες. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι βρέθηκαν φυλότυποι τριών διαφορετικών ειδών που παράγουν τοξίνες, ταυτόχρονα την ίδια περίοδο στο οικοσύστημα. Παραδείγματα αποτελούν είδη του γένους *Prymnesium* και του γένους *Pfiesteria* στα οποία έχουν

αποδοθεί αρκετοί θάνατοι ψαριών σε παράκτια οικοσυστήματα (Burkholder *et al.* 2001). Το είδος *Pfiesteria piscicida* έχει βρεθεί σε εύρος θερμοκρασιών και αλατοτήτων σε παράκτιες τοποθεσίες (Ruble *et al.* 2005), καθώς επίσης έχει βρεθεί αντοχή στην αλατότητα σε πειράματα καλλιέργειών (Sullivan & Anderson 2001). Οι Rhodes *et al.* (2006) αναφέρουν ότι η θερμοκρασία και η αλατότητα επηρεάζουν ελάχιστα την παρουσία του είδους καθώς ανιχνεύθηκε σε αλατότητες 0,1-17,8 psu και θερμοκρασία 3,2 °C - 25,5 °C. Η παραγωγή τοξινών όμως από το γένος *Pfiesteria* αυξάνεται σε υψηλά φορτία θρεπτικών (Burkholder & Glasgow 1997, Glasgow *et al.* 2001). Φυλότυποι συσχετίστηκαν επίσης με είδη του γένους *Peridinium* τα οποία πιθανόν σχετίζονται με την παραγωγή τοξινών (Rengefors & Legrand, 2001).

Η λίμνη Κάρλα αποξηράνθηκε οδηγώντας τα νερά της στον Παγασητικό κόλπο μέσω σήραγγας. Η τυχόν απελευθέρωση νερού μέσω της σήραγγας ενδέχεται να οδηγήσει τους παραπάνω μικροσκοπικούς ευκαρυώτες στο θαλάσσιο οικοσύστημα του Παγασητικού. Ωστόσο, οι Logares *et al.* (2009) επισημαίνουν ότι παρόλο που φαίνεται ως πιθανό σενάριο να συμβαίνει τακτική ανταλλαγή μικροοργανισμών μεταξύ θαλάσσιων και εσωτερικών οικοσυστημάτων (μέσω εκβολικών συστημάτων, κατακρημνισμάτων και αερομεταφοράς) είναι δύσκολο να προσδιορίσουμε την μακροπρόθεσμη επιτυχία της εγκατάστασης στο νέο ενδιαίτημα. Αρκετές φυλογενετικές αναλύσεις σε διάφορους μικροοργανισμούς (Archaea, Bacteria, Eukarya και ιούς) υποδεικνύουν ότι το διαχωριστικό όριο μεταξύ θαλάσσιων και εσωτερικών οικοσυστημάτων αποτελεί ένα σημαντικό φραγμό του εποικισμού (Logares *et al.* 2009).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Al-Dhaheer R., Willey R. (1996) Colonization and reproduction of the epibiotic flagellate *Colacium vesiculosum* (Euglenophyceae) on *Daphnia pulex*. Journal of Phycology, 32:770-774
- An S., Friedl T., Hegewald E. (1999) Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. Plant Biology, 1:418-428
- Ananiadis C. I. (1956) Limnological study of lake Karla. Bulletin de l' Institute Oceanographic, 1083: 1-19
- Ashelford K., Chuzhanova N., Fry J., Jones A., Weightman A. (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. Applied and Environmental Microbiology, 71:7724-7736
- Bashan L., Trejo A., Huss V., Hernandez J., Bashan Y. (2008) *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. Bioresource Technology, 99:4980-4989
- Beaver J., Crisman T. (1989) Analysis of the community structure of planktonic ciliated protozoa relative to trophic state in Florida lakes. Hydrobiologia, 174:177-184
- Behnke A., Bunge J., Barger K., Breiner H., Alla V., Stoeck T. (2006) Microeukaryote community patterns along an O₂/H₂S gradient in a supersulfidic anoxic fjord (Framvaren, Norway). Applied and Environmental Microbiology. 72:3626-3636
- Behnke A., Barger K., Bunge J., Stoeck T. (2010) Spatio-temporal variations in protistan communities along an O₂/H₂S gradient in the anoxic Framvaren Fjord (Norway). FEMS Microbiology Ecology. 72:89-102
- Beltrami, O., Escobar M., Collantes G. (2007) New record of *Prymnesium parvum* f. *patelliferum* (Green, Hibberd & Piennar) Larsen stat. nov. (Prymnesiophyceae) from Valparaiso Bay. Investigaciones Marinas, 35:97-104
- Brown R., Larson D., Bold H. (1964) Airborne algae: their abundance and heterogeneity. Science, 143:583-585

- Brugerolle G. (2002) *Cryptophagus subtilis*: a new parasite of cryptophytes affiliated with the perkinsozoa lineage. *European Journal of Protistology*, 37:379-390
- Burkholder J., Glasgow H. (1997) *Pfiesteria piscicida* and other *Pfiesteria*-like dinoflagellates: behavior, impacts, and environmental controls. *Limnology and Oceanography*, 42:1052-1075
- Burkholder J., Glasgow H., Deamer-Melia N. (2001) Overview and present status of the toxic *Pfiesteria* complex. *Phycologia*, 40:106-134
- Buttler H. (1999) Seasonal dynamics of the planktonic microbial community in a maritime Antarctic lake undergoing eutrophication. *Journal of Plankton Research*, 21:2393-2419
- Cachon J., Cachon M. (1987) Parasitic dinoflagellates. In: Taylor F.J. (Ed). *The biology of dinoflagellates*. Blackwell Scientific publishers, Oxford, pp 571-610
- Canter H., Lund J. (1951) Studies on plankton parasites. III. Examples of interaction between parasitism and others factors determining the growth of diatoms. *Ann. Bot.*, 15:359-71
- Caron D., Peele E., Lim L., Dennett M. (1999a) Picoplankton and nanoplankton and their trophic coupling in the surface waters of the Sargasso Sea south of Bermuda. *Limnology and Oceanography*, 44:259-272
- Caron D., Gast R.J., Lim E.L., Dennett M. (1999b) Protistan community structure: molecular approaches for answering ecological questions. *Hydrobiologia*, 401:215-227
- Caron D., Countway P. (2009) Hypotheses on the role of the protistan rare biosphere in a changing world. *Aquatic Microbial Ecology*, 57:227-238
- Carrias J., Amblard C., Quiblier-Lloberas C., Bourdier G. (1998) Seasonal dynamics of free and attached heterotrophic nanoflagellates in an oligomesotrophic lake. *Freshwater Biology*, 39:91-101
- Carson J., Brown R. (1976) The correlation of soil algae, airborne algae, and fern spores with meteorological conditions on the island of Hawaii. *Pacific Science*, 10:197-205
- Chantangsi C., Leander B. (2010) An SSU rDNA barcoding approach to the diversity of marine interstitial cercozoans, including descriptions of four novel genera and

- nine novel species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60:1962-1977
- Chao A. (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11:265-270
- Chao A, Ma M., Yang M.C.K. (1993) Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika*, 80:193-201
- Chrisostomou A., Moustaka-Gouni M., Sgardelis S., Lanaras T. (2009) Air-dispersed phytoplankton in a Mediterranean river-reservoir system (Aliakmon-Polyphytos, Greece). *Journal of Plankton Research*, 31:877-884
- Cleven E., Weisse T. (2001) Seasonal succession and taxon-specific bacterial grazing rates of heterotrophic nanoflagellates in Lake Constance. *Aquatic Microbial Ecology*, 23:147-161
- Courties C., Vaquer M., Trousselier J., Lautier M., Chretiennot D., Neveux J., Machado C., Claustre H. (1994) Smallest eukaryotic organism. *Nature*, 370:255
- Dawson S., Pace N. (2002) Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments. *PNAS* 99: 8324–8329
- Diez B., Pedros-Alio C., Marsh T., Massana R. (2001a) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblage and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied Environmental Microbiology*, 67:2942-2951
- Diez B., Pedros-Alio C. Massana R. (2001b) Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied Environmental Microbiology*, 67:2932-2941
- Dominique M., Zhu F., Balague V., Ras J., Vaulot D. (2006) Eukaryotic picoplankton communities of the Mediterranean Sea in summer assessed by molecular approaches (DGGE, TTGE, QPCR). *FEMS Microbial Ecology*, 55:404-415
- Drebes G. Schnepf E. (1988) *Paulsenella* Chatton (Dinophyta), ectoparasites of marine diatoms: development and taxonomy. *Helgol Meeresunters*, 42:563-581
- Edwardsen B., Medlin L. (2007) Molecular systematics of Haptophyta. In: Brodie J., Lewis J., (eds) *Unraveling the Algae: The Past Present and Future of Algal Systematics*, the Systematics Special Volume Series 75. Taylor and Francis, London, p 183-196

- Elshahed M., Youssef N., Spain A., Sheik C. (2008) Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:5422–5428
- Fawley M., Buchheim M. (2004) Molecular diversity among communities of freshwater microchlorophytes. *Microbial Ecology*, 48:489-499
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791
- Fenchel. T. (1987) *Ecology of Protozoa: The Biology of Free-living Phagotrophic Protozoa*. Science Technical Publishers, Madison, WI.
- Finlay B., Monaghan E., Maberly S. (2002) Hypothesis: the rate and scale of dispersal of freshwater diatom species is a function of their global abundance. *Protist*, 153:261-273
- Fogg G. (1995) Some comments on picoplankton and its importance in the pelagic ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology*, 9:33-39
- Fouilland E., Descolas-Gros C., Courties C., Collos Y., VaquerA., Gasc A (2004) Productivity and growth of a natural population of the smallest free-living eukaryote under nitrogen deficiency and sufficiency. *Microbial Ecology*, 48:103-110
- Freeman K.R., Martin A.P., Karki D., Lynch R.C., Mitter M.S., Meyer A.F., Longcore J.E., Simmons D.R., Schmidt S.K (2009) Evidence that chytrids dominate fungal communities in high-elevation soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 18315-18320
- Fuhrman J. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399:541–548
- Genitsaris S., Kormas K., Moustaka-Gouni M. (2009) Microscopic eukaryotes living in a dying lake (Lake Koronia, Greece). *FEMS Microbial Ecology*, 69:75-83
- Glasgow H., Burkholder J., Morton S., Springer J. (2001) A second species of ichthyotoxic *Pfiesteria*. *Phycologia*, 40:234-245
- Good I. J. (1953) The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika*, 40:237-264
- Hall J., Vincent W. (1990) Vertical and horizontal structure in the picoplankton communities of a coastal upwelling system. *Marine Biology* 106:465-471

- Hargraves P. E. (2002) The ebridian flagellates *Ebria* and *Hermesium*. *Plankton Biology and Ecology*, 49:9-16
- Hasle G. (1973) Morphology and taxonomy of *skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *Norwegian Journal of Botany*, 20:109-37
- Hewett W. (1988) Predation by *Didinium nasutum*. Effects of predator and prey size. *Ecology*, 69:135-145
- Hill T., Walsh K., Harris J., Moffett B. (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 43:1-11
- Hoglund J., Alfjorden A., Nikkila T. (1997). Infection of juvenile salmon *Salmo salar* with a *Dermocystidium*-like organism in Sweden. *Diseases of Aquatic Organisms*, 30:171-176
- Hoppenrath M., Leander B. S. (2006) Dinoflagellate, euglenid or cercomonad? The ultrastructure and molecular phylogenetic position of *Protaspis grandis* n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53:327-342
- Hutchinson G. (1957) A treatise on limnology. John Wiley and Sons Inc., New York, p 1015
- Ibelings B., De Bruin A., Kagami M., Rijkeboer M., Brehm M., van Donk E. (2004) Host parasite interactions between freshwater phytoplankton and chytrid Fungi. *Journal of Phycology*, 40:437-453.
- Jurgens K. (1994) Impact of *Daphnia* on planktonic microbial food web: a review. *Marine Microbial Food Webs*, 8:295-324
- Keddy P. A. (1989) Competition. Chapman & Hall. London
- Keeling P.J. (2001) Foraminifera and Cercozoa are related in actin phylogeny: two orphans find a home? *Molecular Biology Evolution*, 18:1551-1557
- Kemp P.F, Aller J.Y. (2004) Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? *Limnology and Oceanography Methods*, 2:114–125
- Kempton J., Wolney J., Tengs T., Rizzo P., Morris R., Tunnell J., Scott P., Steidinger K., Hymel S., Lewitus A. (2002) *Kryptoperidinium foliaceum* blooms in South Carolina: a multi-analytical approach to identification. *Harmful Algae*, 1:383-92

- Kuhn S., Medlin L. (2005) The systematic position of the parasitoid marine dinoflagellate *Paulsenella vonstoschii* (Dinophyceae) inferred from nuclear-encoded small subunit ribosomal DNA. *Protist*, 156:393-398
- Laurin V., Labbe N., Parent S., Juteau P., Villemur R. (2008) Microeukaryote diversity in a marine methanol-fed fluidized denitrification system. *Microbial Ecology*, 56:637-648
- Laybourn-Parry J., Mell E., Roberts E. (2000) Protozoan growth rates in Antarctic lakes. *Polar Biology*, 23:445-451
- Leach J., Rhoads M., Vera Cruz C., White F., Mew T., Leung H. (1992) Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a repetitive DNA element. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:2188-2195
- Leander B., Kuvardiva O., Aleshin V., Mylnikov A., Keeling P. (2003) Molecular phylogeny and surface morphology of *Colpodella edax* (Alveolata): Insights into the phagotrophic ancestry of Apicomplexans. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50:334-340
- Lefevre E., Bardot C., Noel C., Carrias J., Viscogliosi E., Amblard C., Sime-Ngando T. (2007) Unveiling fungal zooflagellates as members of freshwater picoeukaryotes: evidence from a molecular diversity study in a deep meromictic lake. *Environmental Microbiology*, 9:61-71
- Lefevre E., Roussel B., Amblard C., Sime-Ngando T. (2008) The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes reveals high occurrence of putative parasitoids in the plankton. *PloS ONE*, 3:1-10
- Lefranc M., Thenot A., Lepere C., Debroas D. (2005). Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:5935-5942
- Lepere C., Boucher D., Jardillier L., Domaizon I., Debroas D. (2006) Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a lacustrine ecosystem (Lake Pavin). *Applied and Environmental Microbiology*, 72:2971-2981

- Lepere C, Domaizon I., Debroas D. (2007) Community composition of lacustrine small eukaryotes in hypereutrophic conditions in relation to top-down and bottom-up factors. *FEMS Microbial Ecology*, 61:483-495
- Lepere C., Domaizon I., Debroas D. (2008) Unexpected importance of potential parasites in the composition of the freshwater small-eukaryote community. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:2940-2949
- Lesaulnier C., Papamichail D., McCorkle S., Ollivier B., Skiena S., Taghavi S., Zak D., van der Lelie D. (2008) Elevated atmospheric CO₂ affects soil microbial diversity associated with trembling aspen. *Environmental Microbiology*, 10:926-941
- Lim E., Dennet M., Caron D. (1999) The ecology of *Paraphysomonas imperforata* based on studies employing oligonucleotide probe identification in coastal water samples and enrichment cultures. *Limnology and Oceanography*, 44:37-51
- Lindeman R. L. (1942) The trophodynamic aspect of ecology. *Ecology*, 23:399-418
- Lindholm T., Ohman P., Kurki-Helasmo K., Kincaid B., Meriluoto J. (1999) Toxic algae and fish mortality in a brackish-water lake in Alan SW Finland. *Hydrobiologia*, 397:109–120
- Linton E.W., Karnkowska-Ishikawac A., Kim J.I., Shin W., Bennett M.S., Kwiatowski J., Zakrys B., Triemer R.E. (2010) Reconstructing euglenoid evolutionary relationships using three genes: nuclear SSU and LSU, and chloroplast SSU rDNA sequences and the description of *Euglenaria* gen. nov. (Euglenophyta). *Protist*, 161:603-619.
- Logares R., Brate J., Bertilsson S., Clasen J.L., Shalchian-Tabrizi K., Rengefors K. (2009). Infrequent marine-freshwater transitions in the microbial world. *Trends in Microbiology*, 17:414-422
- Ludwig J. A., Reynolds J.F. (1988) *Statistical ecology: a primer on methods and computing*. p. 85. John Wiley & Sons, New York
- Madigan M., Martinko J., Parker J. (2005). *Brocks Biology of Microorganisms*. 10th edition, Southern Illinois University Carbondale. p 387,729,730,1389

- Marshall W., Laybourn-Parry J. (2002) The balance between photosynthesis and grazing in Antarctic mixotrophic cryptophytes during summer. *Freshwater Biology*, 47:2060–2070
- Massana R., Guillou L., Diez B., Pedros-Alio C. (2002) Unveiling the organisms behind novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean. *Applied Environmental Microbiology*, 68:4554–4558
- Massana R., Castresana J., Balague V., Guillou L., Romari K., Groisillier A., Valentin K., Pedros-Alio C. (2004) Phylogenetic and ecological analysis of novel marine Stramenopiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:3528–3534
- Maynard N. (1968). Significance of airborne algae. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 8:225–226
- McKnight D., Howes B., Taylor C., Goehring D. (2000) Phytoplankton dynamics in a stably stratified Antarctic lake during winter darkness. *Journal of Phycology*, 36:852–861
- Medlin L., Elwood H. J., Stickel S., Sogin M.L (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA coding regions. *Gene*, 71:491–499
- Mendoza L., Taylor J., Ajello L. (2002) The class Mesomycetozoea: a heterogeneous group of microorganisms at the animal–fungal boundary. *Annual Review of Microbiology*, 56:315–344
- Moon-van der Staay S.Y, De Wachter R., Daniel V. (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 409:607–61
- Moustaka-Gouni M., Cook C.M., Gkelis S., Michaloudi E., Pantelidakis K., Pyrovetsi M., Lanaras T. (2004) The coincidence of a *Prymnesium parvum* bloom and the mass kill of birds and fish in Lake Koronia. *Harmful Algal News*, 26:1–2
- Moyer C., Dobbs F., Karl D. (1994) Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied Environmental Microbiology*, 60:871–879

- Not F., del Campo J., Balague V., de Vargas C., Massana R. (2009) New insights into the diversity of marine picoeukaryotes. *PLoS ONE*, 4:7143
- Nubel U., Garcia-Pinchel F., Kuhl M., Muyzer G. (1999) Spatial scale and the diversity of benthic cyanobacteria and diatoms in a salina. *Hydrobiologia*, 401:201–208
- Okamoto N., Inouye I. (2005) The katablepharids are a distant sister group of the Cryptophyta: a proposal for Katablepharidophyta divisio nova/Kathablepharida phylum novum based on SSU rDNA and betatubulin phylogeny. *Protist*, 156: 163-179
- Okamoto N., Chantangsi C., Horak A., Leander B., Keeling P. (2009) Molecular phylogeny and description of the novel Katablepharid *Roombia truncata* gen. et sp. nov., and establishment of the hacrobia taxon nov. *PLoS ONE* 4: e7080
- Olsen G., Woese C. (1993) Ribosomal RNA: a key to phylogeny *FASEB J*, 7:113-123
- Pace N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276:734-740
- Paddock T. (1968) A possible aid to survival of the marine coccolithophorid *Cricosphaera* and similar organisms. *British Phycological Bulletin*. 3:519-523
- Paine R. (1980) Food webs: linkage, interaction strength and community infra-structure. *Journal of Animal Ecology*, 49:667-686
- Park S., Park B., Pham V., Yoon D., Kim S., Rhee S. (2008) Microeukaryotic diversity in marine environments, an analysis of surface layer sediments from the east sea. *Journal of Microbiology*, 46:244-249
- Parslow, J., Doucette D., Taylor R., Harisson P. (1986) Feeding by the zooflagellates *Pseudobodo* sp. on *Micromonas pusilla*. *Marine Ecology Progress Series*, 29:237–246
- Pedros-Alio C., Massana R., Latasa R., Garci-Cantizano J., Gasol J. (1995) Predation by ciliates on a metalimnetic *Cryptomonas* population: feeding rates, impact and effects of vertical migration. *Journal of Plankton Research*, 17:2131-2154
- Pielou, E. C. (1969) Association tests versus homogeneity tests: Their use in subdividing quadrats into groups. *Plant Ecology*, 18:4-18
- Piwosz K., Pernthaler J. (2010) Seasonal population dynamics and trophic role of planktonic nanoflagellates in coastal surface waters of the Southern Baltic Sea. *Environmental Microbiology*, 12:364-377

- Polz M.F., Cavanaugh C. M. (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 64:3724-3730
- Proctor V. (1959). Dispersal of freshwater algae by migratory water birds. *Science*, 130: 623-624
- Proschold T., Leliaert F. (2007) Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In: Brodie J., Lewis J., (eds) *Unraveling the Algae: The Past Present and Future of Algal Systematics*, the Systematics Special Volume Series 75. Taylor and Francis, London, p 123-153
- Ranjard L., Poly F., Nazaret S. (2000) Monitoring complex bacterial communities using cultureindependent molecular techniques: application to soil environment. *Researches in Microbiology*, 151:167–177
- Rengefors K., Legrand C. (2001) Toxicity in *Peridinium aciculiferum* - an adaptive strategy to outcompete other winter phytoplankton? *Limnology & Oceanography*, 46:1990-1997
- Revill D., Steward K., Schlichting H. (1967) Passive dispersal of viable algae and protozoa by certain craneflies and midges. *Ecology*, 48:1023- 1027
- Rhodes L., Adamson J., Rublee P., Schaefer E. (2006) Geographic distribution of *Pfiesteria* spp. (Pfiesteriaceae) in Tasman Bay and Canterbury, New Zealand (2002-03). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 40:211 – 220
- Ribera d'Alcala` M., Conversano F., Corato F., Licandro P., Mangoni O., Marino D., Mazzocchi M. G., Modigh M., Montresor M., Nardella M., Saggiomo V., Sarno D., Zingone A. (2004) Seasonal patterns in plankton communities in a pluriannual time series at a coastal Mediterranean site (Gulf of Naples): an attempt to discern recurrences and trends. *Scientia Marina*, 68:65-83
- Richards T.A, Vepritskiy A.A, Gouliamova D.E., Nierzwicki-Bauer S.A (2005) The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages. *Environmental Microbiology*, 7:1462-2920
- Romari K., Vaultot D. (2004) Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. *Limnology & Oceanography*, 49:784-798

- Round F., Crawford R., Mann D. (1990) The diatoms biology and morphology of the genera. Cambridge University Press, Cambridge, p 747
- Ruano G., Brash D. E., Kidd K.K. (1991) PCR: the first few cycles. *Amplifications*, 7:1-4
- Rublee P., Remington D., Schaefer E., Marshall M. (2005) Detection of the Dinozoans *Pfiesteria piscicida* and *P. shumwayae*: A review of detection methods and geographic distribution. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52:83-89
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491
- Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425
- Sakka A., Legendre L., Gosselin M., Delesalle B. (2000) Structure of the oligotrophic planktonic food web under low grazing of heterotrophic bacteria: Takapoto Atoll, French Polynesia. *Marine Ecology Progress Series*, 197:1-17
- Samways (1993) Insects in biodiversity conservation: some perspectives and directives. *Biodiversity and Conservation*, 2:258-282
- Sardelli A. D. (1993) Plateau effect—understanding PCR limitations. *Amplifications*, 9:1-5
- Sarno D., Wiebe H., Kooistra C., Medlin L., Percopo I., Zingone A. (2005) Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae) II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *Journal of Phycology*, 41:151-176
- Schlichting H. (1969) The importance of airborne algae and protozoa. *Journal of Air Pollution Control Association*, 19:946-951
- Schnepf E., Kuhn F. (2000) Food uptake and fine structure of *Cryothecomonas longipes* sp. nov., a marine nanoflagellate incertae sedis feeding phagotrophically on large diatoms. *Helgol Mar Res.*, 54:18-32
- Schnepf E., Deichgraber G., Drebes G. (1985) Food uptake and the fine structure of the dinophyte *Paulsenella* sp., an ectoparasite of marine diatoms. *Protoplasma*, 124:188-204

- Shannon C.E., Weaver W. (1949) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press. Urbana. p 117
- Shearer A., Langsam M., Longcore E. (2004) Fungi in freshwater habitats. In: Muller M., Bills F. Foster S. (eds) Biodiversity of Fungi. Elsevier Academic Press, London, p 513–531
- Sherr E., Sherr B., Fessenden L. (1997) Heterotrophic protists in the central Arctic Ocean. *Deep-Sea Research II* 44: 1665–1682
- Sigee D. (2005) Fungi and fungal-like organisms: aquatic biota with a mycelial growth form. In: *Freshwater Microbiology. Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*. John Wiley & Sons Ltd, England , p. 371-395
- Silva P., Hasle G. (1994) Proposal to conserve Thalassiosiraceae against Lauderiaceae and Planktoniellaceae (Algae). *Taxon* 43:287-289
- Sogin M., Morrison H., Huber J., Welch D. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored ‘rare biosphere’. *Proceeding of the National Academy of Science. USA* 103:12115-12120
- Spiegelman D, Whissell G., Greer C.W (2005) A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology*, 51:355–386.
- Stackebrandt E., Goebel B. (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:846-849
- Stanier R. (1970) Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance. *Symposium of the Society for General Microbiology*, 20:1-38
- Steidinger K., Landsberg J., Richardson R., Truby E., Blakesley B., Scott P., Tester P., Tengs T., Mason P., Morton S., Seaborn D., Litaker W., Reece K., Oldach D. (2001) Classification and identification of *Pfiesteria* and *Pfiesteria*-like species. *Environmental and Health Perspectives*, 109:661-665
- Stevenson R. , Collier A. (1962) Preliminary observations of the occurrence of airborne marine phytoplankton. *Lloydia*, 25:89-93

- Stoeck T., Epstein S. (2003) Novel eukaryotic lineages inferred from small-subunit rRNA analyses of oxygen-depleted marine environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:2657-2663.
- Sullivan B., Anderson R. (2001) Salinity tolerances of 62 strains of *Pfiesteria* and *Pfiesteria*-like heterotrophic flagellates (Dinophyceae). *Phycological Research*, 49:207–214
- Suzuki M. T., Giovannoni S.J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 62:625-630
- Takishita K, Tsuchiya M, Kawato M, Oguri K, Kitazato H ., Maruyama T. (2007) Genetic diversity of microbial eukaryotes in anoxic sediment of the saline meromictic Lake Namako-ike (Japan): on the detection of anaerobic or anoxic tolerant lineages of eukaryotes. *Protist*, 158:51–64
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599 (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publication>)
- Tardio M., Tolotti M., Novarino G., Cantonati M. (2003) Ecological and taxonomic observations on the flagellate algae characterising four years of enclosure experiments in Lake Tovel (Southern Alps). *Hydrobiologia*, 502:285–296
- Torsvik V., Goksoyr J., Daae F. (1989) High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 56:782–787
- Trainor F. (1992) Cyclomorphosis in *Scenedesmus communis* Hegew. Ecomorph expression at low temperature, *European Journal of Phycology*, 27:75-81
- Triemer R., Farmer M. (2007) A decade of euglenoid molecular phylogenetics. In: Brodie J., Lewis J., (eds) *Unraveling the Algae: The Past Present and Future of Algal Systematics*, the Systematics Special Volume Series 75. Taylor and Francis, London, p 315 - 330
- Unrein F., Izaguirre I., Massana R., Balague V., Gasol J. (2005) Nanoplankton assemblages in maritime Antarctic lakes: characterisation and molecular fingerprinting comparison. *Aquatic Microbial Ecology*, 40:269–282

- Ustinova I., Krientiz L., Huss V. (2001) *Closteriopsis acicularis* (G. M. Smith) Belcher et Swale is a fusiform alga closely related to *Chlorella kessleri* Fott et Nováková (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *European Journal of Phycology*, 36:341-351
- van de Peer Y., Neefs J., De Rijk P., de Wachter P. (1993) Reconstructing evolution from eukaryotic small-ribosomal-subunit RNA sequences: Calibration of the Molecular Clock. *Journal of Molecular Evolution*, 37:221-232
- von Wintzingerode F., Gobel U.B., Stackenbrandt E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21:213-229
- Watve M., Gangal R. (1996) Problems in measuring bacterial diversity and a possible solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:4299-4301
- Wessenberg H., Antipa C (1970) Capture and ingestion of *Paramecium* by *Didinium nasutum*. *Journal of Protozoology*, 17:250-270
- Williams D., Tavares-Cromar A., Coleman J. (1994) Colonization dynamics of algae in small artificial ponds. *Canadian Journal of Botany /Revue Canadien de Botanique*, 72:1654-1665
- Woese C., Kandler R., Wheelis M. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings on the National Academy of Science. USA*. 87:4576-4579
- Wu Q., Chatzinotas A., Wang J., Boenigk J. (2009) Genetic diversity of eukaryotic plankton assemblages in eastern Tibetan lakes differing by their salinity and altitude. *Microbial Ecology*, 58:569-581
- Yuan J., Chen M., Peng S., Zhou H., Chen Y., Qu L. (2004) Genetic diversity of small eukaryotes from the coastal waters of Nansha Islands in China. *FEMS Microbiology Letters*, 240:163-170

6. ABSTRACT

Microscopic eukaryotes having various structural and functional features are fundamental components in aquatic ecosystems. Research on microscopic eukaryotes have only recently been carried out, with most of them being focused on marine ecosystems. In the present study, the molecular diversity of microscopic eukaryotes in the water body of lake Karla was estimated. Water sample was collected in March 2010. Molecular techniques based on clone libraries of 18S rRNA genes were used to estimate the diversity of this phylogenetic gene. Two clone libraries of the nano- and picoeukaryotes' fraction were constructed. A number of 65 and 78 clones remained for analysis and were attributed to 27 and 32 phylotypes of the nano- and pikoeukaryotes' fractions respectively. The phylogenetic tree was constructed using the sequences of the genes and the phylotypes were grouped in 11 major groups. The dominant group was that of Cercozoa, followed by the group of Chlorophyta. Microscopic eukaryotes seemed to form a non-specialized community and the observed diversity was high. A special characteristic of the community was the presence of phylotypes affiliated to toxin-producing and parasitic species.

Keywords: microscopic eukaryotes, 18S rRNA gene, lake Karla.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ελληνική Οικολογική Εταιρεία - Ελληνική Ζωολογική Εταιρεία - Ελληνική Βοτανική Εταιρεία
5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Οικολογίας - «Οικολογικές διεργασίες στο χώρο και το χρόνο»
Πάτρα 7 - 10 Οκτωβρίου 2010

Μοριακή ποικιλότητα νανο- και πικοευκαρυωτών στη Λίμνη Κάρλα

Ανδρέας Οικονόμου¹, Μαρία Μουστάκα-Γούνη², Κωνσταντίνος Α. Κορμάς^{1*}

¹ Τμήμα Ιχθυολογίας & Υδατικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. E-mail: kkoramas@uth.gr

² Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Παρουσιάζονται τα προκαταρκτικά αποτελέσματα για τη μοριακή ποικιλότητα των μικροσκοπικών ευκαρυωτών στην λίμνη Κάρλα, της οποίας η επαναπλήρωση ξεκίνησε το 2009 μετά από περίπου 60 χρόνια που ήταν αποξηραμένη. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκε η ποικιλότητα του γονιδίου 18S rRNA με PCR ενίσχυση και κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων για την ομάδα του νανοπλαγκτού (2 – 20 μm) και του πικοπλαγκτού (0,2 – 2 μm) της υδάτινης στήλης το Μάρτιο 2010. Ελέγχθηκαν συνολικά 69 και 82 κλώνοι από το κλάσμα των νανοευκαρυωτών και πικοευκαρυωτών, αντίστοιχα, και έγινε μερική αλληλούχιση (ca. 850 bp). Στους νανοευκαρυώτες βρέθηκαν 42 μοναδικοί φυλότυποι (60,8% των ελεγχθέντων). Η σύγκριση των αλληλουχιών με ήδη γνωστές αλληλουχίες έδειξε ότι ο επικρατής φυλότυπος είχε ομοιότητα 95% με *Ebria tripartita* (σχετική αφθονία 15,9%) και ακολουθούσαν τα *Protaspis obliqua* (ομοιότητα 93%, σχετική αφθονία 5,7%), *Cryothecomonas longipes* (ομοιότητα 94%, σχετική αφθονία 4,3%) και *Prymnesium parvum* (ομοιότητα 100%, σχετική αφθονία 4,3%). Στο κλάσμα των πικοευκαρυωτών βρέθηκαν 44 μοναδικοί φυλότυποι (53,6% των ελεγχθέντων). Ο επικρατής φυλότυπος σε αυτό το κλάσμα είχε ομοιότητα 99% με *Cyclotella* cf. *scaldensis* (σχετική αφθονία 9,7%). Ακολουθούσαν τα *Ebria tripartita* (ομοιότητα 95%, σχετική αφθονία 8,53%) και *Protaspis obliqua* (ομοιότητα 93%, σχετική αφθονία 6,09%). Επίσης βρέθηκαν αρκετοί φυλότυποι χυτριομυκήτων και ένας που σχετίζεται με το γένος *Cryptosporidium*. Αρκετοί από τους φυλότυπους σχετίζονταν με τοξικά ή παρασιτικά είδη. Συνολικά, 13 φυλότυποι ήταν κοινοί και στις δύο ομάδες ενώ και στα δύο κλάσματα βρέθηκαν αρκετοί φυλότυποι οι οποίοι δεν είχαν γνωστούς συγγενείς καθώς επίσης και αρκετοί μορφότυποι οι οποίοι επίσης δεν ήταν σίγουρη η ταξινομική τους θέση. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν είτε την ύπαρξη άγνωστων ευκαρυωτικών μικροοργανισμών ή την ύπαρξη πολύπλοκων κύκλων ζωής για μερικούς γνωστούς μικροσκοπικούς ευκαρυώτες.

Microbial gangs are taking over the water column of a reconstructed lake

A. Oikonomou¹, M. Katsiapi², P. Berillis¹, M. Moustaka-Gouni², K. Ar. Kormas^{1*}

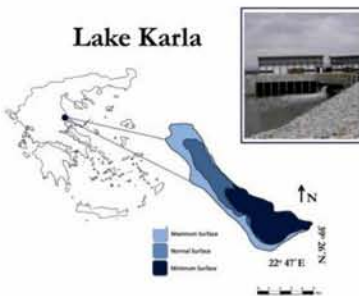
¹ Department of Ichthyology & Aquatic Environment, University of Thessaly, 384 46 Nea Ionia, Greece *E-mail: kkormas@uth.gr

² Department of Botany, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, 541 24 Thessaloniki, Greece

... the Mission

To investigate the diversity of Lake Karla's microbial community during the first year after its reconstruction

The Scene...



- ❖ The lake (ca. 80 km²) was drained through a subterranean tunnel to Pagasitikos Gulf (Aegean Sea) in 1962
- ❖ Small-scale marshes were preserved until today
- ❖ Refilling started in September 2009 from River Pinios (surface area 38 km², max depth 1.5 m)

...the Challenge

The lake provides a unique chance to study the first microbial colonists in a natural scale aquatic environment

Methods used...

- ❖ Collection of surface water samples in March, April & June 2010 from an out-shore station
- ❖ Molecular analysis (of samples collected in March 2010): Pre-filtering and then collection on 0.2 µm isopore filters, DNA extraction, 16S rRNA gene PCR amplification with the primers CYA106F, CYA781R(a), CYA781R(b), 18S rRNA gene PCR amplification with EukA and EukB primers, cloning and sequencing, phylogenetic analysis, neighbour-joining tree construction
- ❖ Microscopic analysis: Morphological identification of phytoplankton was performed in live and preserved (Lugol and formaldehyde) samples with a light microscope (under light and phase contrast). Phytoplankton counts were performed using the inverted microscope method.

...the first Fingerprints...

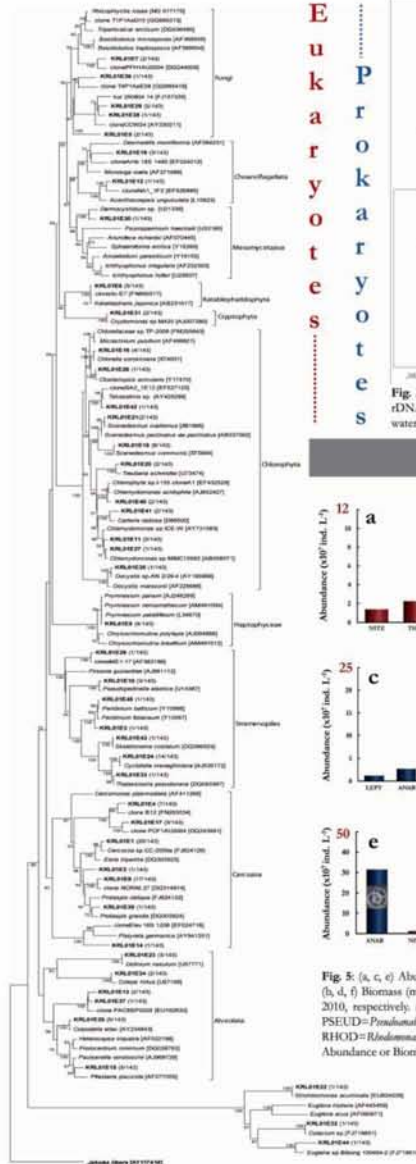


Fig. 2: Phylogenetic tree of relationships of 16S rDNA of the prokaryotic phylotypes found in the water column of Lake Karla

Eukaryotes



Fig. 3: Phylogenetic tree of relationships of 16S rDNA of the prokaryotic phylotypes found in the water column of Lake Karla

...the Suspects...

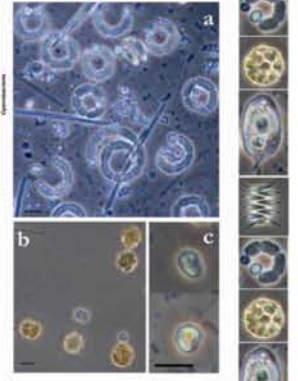


Fig. 4: Micrographs of (a) *Anabaenopsis* cf. *steckinii*, (b) *Pfiesteria* sp., (c) *Prymnesium* cf. *parvum* found in Lake Karla (scale: 10 µm)

...the Seen & Captured...

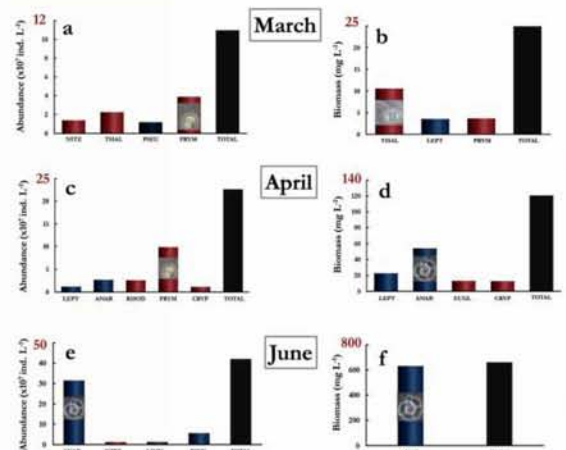


Fig. 5: (a, c, e) Abundance ($\times 10^3$ individuals L⁻¹) of the abundant phytoplankton species (>90% of the total); (b, d, f) Biomass (mg L⁻¹) of the dominant phytoplankton species (>90% of the total) in March, April & June 2010, respectively. (ANAB=*Anabaenopsis* cf. *steckinii*, NITZ=*Nitzschia* sp., LIMN=*Limnospira* cf. *robusta*, PSEUD=*Pseudonitzschia* sp., PRYM=*Prymnesium* cf. *parvum*, THAL=*Thalassiosira* sp., RHOD=*Rhodomonas* sp., EUGL=*Euglena* sp., LEPT=*Leptodinium* sp., CRYP=*Cryptomonas* sp., TOTAL=Total Abundance or Biomass)

- ❖ Phylotypes related to marine, brackish, inland water habitats, salt marshes, soil
- ❖ Occurrence and dominance of toxin-producers (Dinophytes, Haptophytes, Cyanobacteria)
- ❖ Dominance shift from spring-eukaryotes to summer-prokaryotes

The Verdict...

- ❖ The lake's colonists consisted a diverse microbial community indicating a hypertrophic status
- ❖ The found phylotypes and morphotypes were of aquatic and terrestrial origin including known-toxin producers (species of *Anabaenopsis*, *Planktothrix*, *Prymnesium*, *Pfiesteria*) in high numbers
- ❖ In recent flooding events the drainage channel was open posing a threat to the receiving coastal area of the Pagasitikos Gulf due to organisms like *Pfiesteria*

14th International Conference on Harmful Algae, Crete, Greece 1-5 November 2010