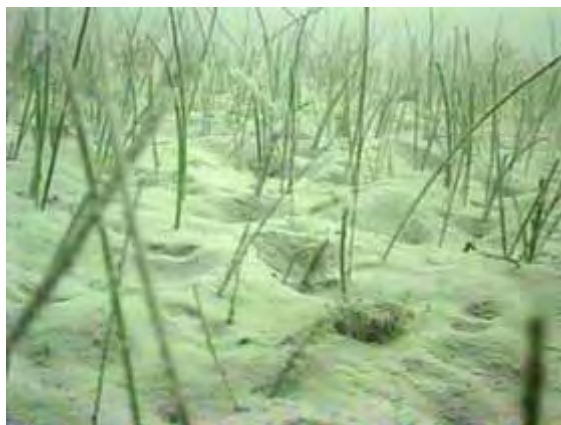


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μεταβολικό προφίλ του θαλάσσιου αγγειόσπερμου,
Cymodoceanodos»**



**Ναθαναήλ Καλλής
Νικολίνα – Αλεξάνδρα Ξαζίρη
Δανάη – Κωνσταντίνα Χαλκιά**

ΒΟΛΟΣ 2016

**«Μεταβολικό προφίλ του θαλάσσιου αγγειόσπερμου,
Cymodoceanodosa»**

Διμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (ΠΘ), Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος (ΤΓΙΥΠ), Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (ΠΘ), ***Επιβλέπων***.

Ουρανία Παυλή, Λέκτορας Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (ΠΘ), ***Μέλος***.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ειλικρινείς μας ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στο να φέρουμε εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία.

Ιδιαίτερα θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο καθώς και το μέλος της εξεταστικής μας επιτροπής αποτελούμενη από την κα. Ουρανία Παυλή για την πολύτιμη βοήθειά τους και τη διαρκή υποστήριξή τους, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τους Πανεπιστημιακούς Διδάσκοντες του τμήματος κ. Μενέλαο Κάβουρα και τον κ. Αλέξη Λόλα για την άμεση και πολύτιμη βοήθεια τους.

Τέλος, θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας στις οικογένειες μας για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία έγινε με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του περιβάλλοντος στο μεταβολικό προφίλ του είδους *Cymodocea nodosa*, υπό συνθήκες ανάπτυξης σε διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές του Ελλαδικού χώρου. Οι σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα συσσώρευσης μεταβολιτών, σχετίζονται με την απόκριση των ειδών σε ποικίλες περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε φυτικό υλικό του είδους *Cymodocea nodosa* που συλλέχθηκε από τρεις διαφορετικές περιοχές (Βρασίδα, Γατζέα και Τρίκερι), όπου και επικρατούν διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Λήφθηκαν τουλάχιστον 3 δείγματα ιστού για κάθε μία από τις υπό μελέτη επεμβάσεις (διαφορετικοί τύποι ιστού: φύλλα, ρίζες, ριζώματα). Κατά τη συλλογή τους, τα δείγματα τοποθετήθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια, στη βαθιά κατάψυξη (-80 °C), έως ότου χρησιμοποιηθούν για τις αναλύσεις της μεταβολομικής. Στη μεταβολομική ανάλυση, αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση των μεταβολιτών, σε δύο διαδοχικές εκχυλίσεις του κλάσματος των πολικών μεταβολιτών και του κλάσματος των μη πολικών μεταβολιτών ενώ, η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών έγινε έμμεσα, με την χρήση ριβιτόλης (εσωτερικός μάρτυρας). Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύθηκαν σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας και η ταυτοποίηση των μεταβολιτών που περιέχονται στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού και βιβλιοθηκών που περιλαμβάνουν φάσματα και δείκτες δέσμευσης για πληθώρα μεταβολιτών που απαντώνται σε φυτικούς οργανισμούς. Η ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση περίπου 200 μεταβολιτών στα φύλλα και τις ρίζες/ριζώματα φυτών του είδους *C. nodosa*. Στη συνέχεια, ακολούθησε "φιλτράρισμα" που αφορούσε κυρίως στην εξασφάλιση της επαναληψιμότητας μεταξύ των βιολογικών επαναλήψεων ($n \geq 3$). Συνολικά, 111 μεταβολίτες παρουσίασαν υψηλή επαναληψιμότητα και αυτοί ανήκουν στις κατηγορίες των ζαχάρων, αμινοξέων, οργανικών οξέων, πολυολών, αζωτούχων ενώσεων, φωσφορικών αλάτων και άλλων ενώσεων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΕΣ ΣΕΛΙΔΕΣ.....	I-II-III
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1 Το είδος <i>Cymodocea nodosa</i>	5
1.1.1 Μορφολογικά γνωρίσματα του είδους <i>Cymodocea nodosa</i>	6
1.1.2 Γεωγραφικό Φάσμα του είδους <i>Cymodocea nodosa</i>	8
1.1.3 Λειτουργικά Χαρακτηριστικά του είδους <i>Cymodocea nodosa</i>	9
1.2 Συγγενικά είδη.....	9
1.2.1 Το είδος <i>Posidonia oceania</i>	9
1.2.2 Το είδος <i>Ruppia cirrhosa</i>	10
1.2.3 Το είδος <i>Zostera marina</i>	11
1.2.4 Το είδος <i>Potamogeton pectinatus</i> (<i>Stuckenia pectinate</i>).....	12
1.3 Επιπτώσεις των περιβαλλοντικών διαταραχών στο θαλάσσιο αγγειόσπερμο <i>Cymodocea nodosa</i>	13
1.4 Δευτερογενής Μεταβολισμός – Θαλάσσιοι Οργανισμοί.....	14
1.5 Μέθοδοι Προσδιορισμού του Μεταβολικού Προφίλ.....	16

1.5.1 Αέρια Χρωματογραφία (<i>Gas Chromatography</i>).....	16
1.5.2 Φασματομετρία μαζών (<i>Mass Spectrometry</i>).....	18
1.6 Σκοπός της μελέτης.....	21
2.Υλικά και Μέθοδοι.....	22
2.1 Φυτικό υλικό.....	22
2.2 Απομόνωση μεταβολιτών.....	23
2.3 Ανάλυση Αέριας Χρωματογραφίας –Φασματομετρίας μαζών (GC-MS)...	24
2.4 Στατιστική Ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	24
3. Αποτελέσματα.....	25
4. Συζήτηση	31
5. Βιβλιογραφία.....	35
ABSTRACT.....	38

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Γενικά

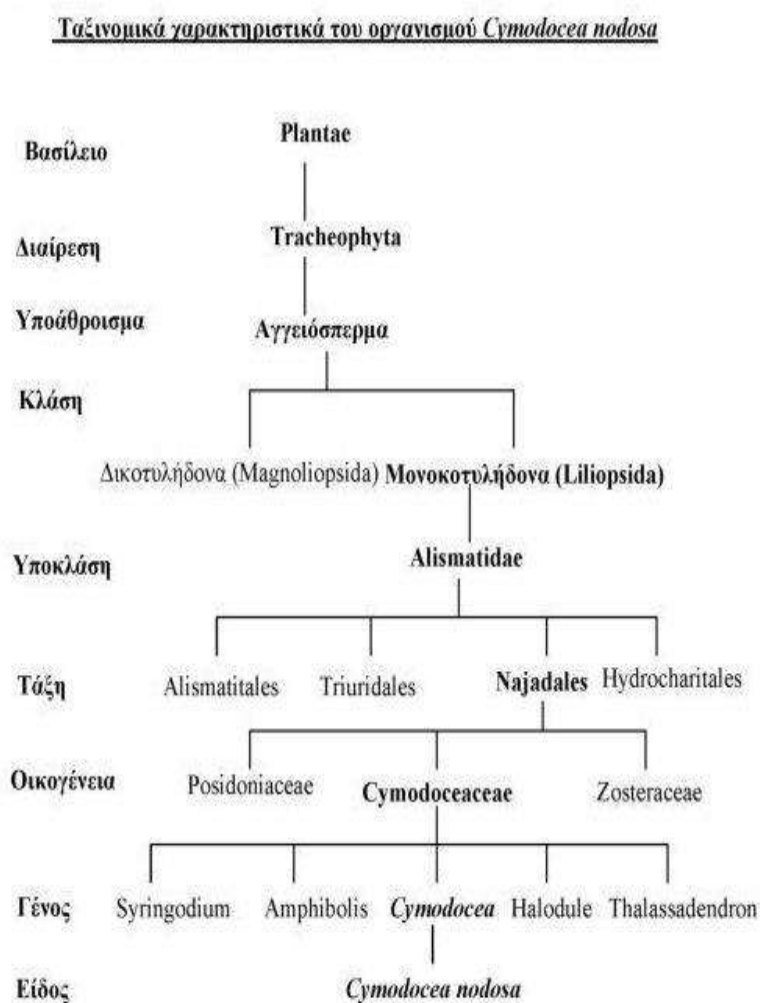
Τα αγγειόσπερμα είναι κλωνικές θαλάσσιες εγκαταστάσεις, που διαμορφώνουν έναν από τους πιο οικολογικούς βιότοπους των τροπικών παράκτιων θαλασσίων περιβαλλόντων (Greenand Short,2003). Μεταξύ άλλων βασικών παραγόντων (φως, θερμοκρασία και θρεπτική διαθεσιμότητα), η αλατότητα έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει τη δομή, την παραγωγικότητα και τη διανομή των αγγειοσπέρμων (McMillan and Moseley,1967; Zieman,1974 and Mc Comb,1990; Vermaat et al.,2000; Fernandez-Torquemada et al., 2005).

Τα αγγειόσπερμα (αγγείο+σπέρμα, δηλαδή εκείνα που περιβάλλουν τους σπόρους τους με αγγεία) συνιστούν τη μεγαλύτερη ομοταξία των σπορόφυτων. Σήμερα περιλαμβάνουν το 85% των φυτών που υπάρχουν στη Γη. Τα είδη των αγγειοσπέρμων κατανέμονται σε 400 περίπου οικογένειες, 226.000 είδη και 2 βασικές κλάσεις. Τα αγγειόσπερμα είναι ανώτερα φυτά καθώς έχουν εμφανή σπόρια και εντυπωσιακά τις περισσότερες φορές άνθη. Βιολογικά, χαρακτηρίζονται από τη διπλή γονιμοποίηση καθώς και από τον κλειστό καρπό. Ανάλογα με τον αριθμό των κοτυληδόνων που έχουν τα σπόρια τους, χωρίζονται σε μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα. Στα αγγειόσπερμα φυτά, το λεύκωμα στο εσωτερικό του σπόρου σχηματίζεται κατά τη γονιμοποίηση.

1.1 Το είδος *Cymodocea nodosa*

Το είδος *Cymodocea nodosa* ανήκει στην τάξη *Najadales*, που προέρχεται από τις Ναϊάδες, οι οποίες με τη σειρά τους αποτελούσαν τις νύμφες των ποταμών, των πηγών και των κρηνών. Στην τάξη *Najadales* ανήκουν οι οικογένειες *Posidoniaceae*,

Cymodoceaceae και *Zosteraceae*. Τα είδη των ανωτέρω οικογενειών, εξαιτίας της φυσιολογίας τους, συχνά χρησιμοποιούνται ως μοντέλα μελέτης προσαρμογής και αντίδρασης σε στρεσογόνους παράγοντες του περιβάλλοντος όπου ευδοκούν (Balestri and Cinelli, 2001) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Ταξινόμικά χαρακτηριστικά του είδους *Cymodocea nodosa*.

Σημαντικό είδος της οικογένειας *Cymodoceaceae*, είναι το είδος *Cymodocea nodosa*, το οποίο είναι κοινό σε όλη τη Μεσόγειο και κάτω από την ακτή της Δυτικής Αφρικής. Το όνομά του προέρχεται από το όνομα μιας Νηρηίδας που κατά την μυθολογία προκαλούσε κύματα. Ο πληθυσμός είναι σταθερός με εξαίρεση κάποιες τοπικές πτώσεις που προέρχονται εξαιτίας των ανθρωπογενών απειλών. Το συγκεκριμένο αγγειόσπερμο δεν αποτελεί είδος υπό εξαφάνιση. Παρόλα αυτά, όπως και άλλα είδη που ανήκουν στην τάξη *Najadales*, αξιοποιείται μοντέλο μελέτης προσαρμογής και αντίδρασης σε στρεσογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Balestri and Cinelli, 2001).

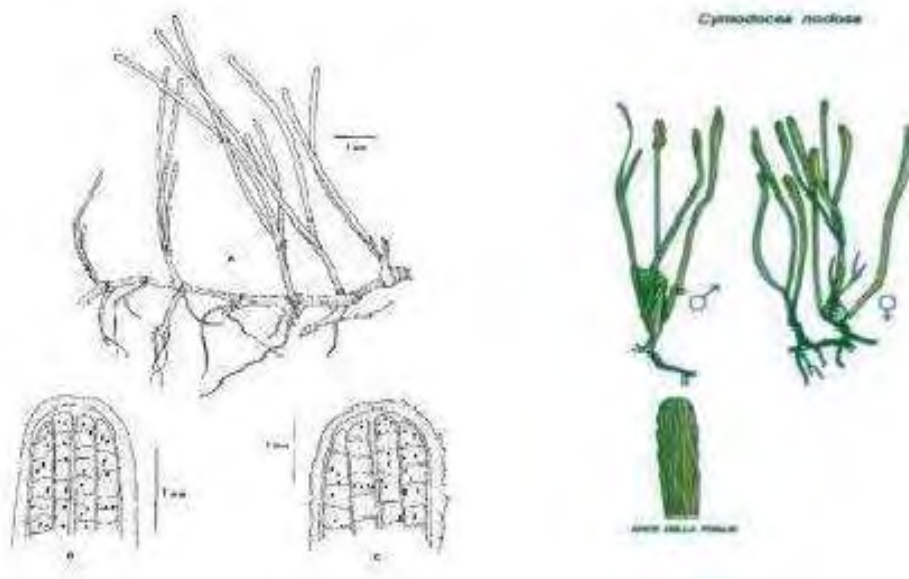
1.1.1 Μορφολογικά γνωρίσματα του είδους *Cymodocea nodosa*

Το ρίζωμα του *Cymodocea nodosa* είναι εύρωστο και αποτελείται από μία μόνο διακλαδιζόμενη ρίζα η οποία φτάνει τα 28cm μήκος. Το φύλλο είναι γραμμικό, μάκρους 10-30cm, πλάτους 2-4 mm, ενώ λεπταίνει στην άκρη. Η κορυφή του φύλλου είναι αμβλύνους στρογγυλή, ενώ κάποιες φορές εμφανίζεται ως χειλική. Τα νεύρα είναι 7 έως 9. Τα ακραία νεύρα περιγράφουν την κορυφαία περιοχή, ενώ το κύριο νεύρο των φύλλων συχνά είναι εμφανές.

Το αρσενικό άνθος έχει μίσχο από 7-10cm. Οι ανθήρες περιβάλλονται από έναν βελοειδή σχηματισμό και από μία μικρή κίτρινη προεξοχή που φέρει κόκκινες κηλίδες (τανίνη), μήκους 11 έως 15 mm. Το θηλυκό άνθος είναι άμισχο, η ωοθήκη είναι ωοειδής και έχει μήκος 3 mm. Τα στίγματα είναι 22-25 mm μακριά και ο στύλος είναι 2-3 mm.

Ο άμισχος καρπός είναι ημικυκλικός, πλευρικά συμπυκνωμένος, μήκους 8 mm, πλάτους 6 mm και πάχους 1,5mm. Βρίσκεται στην παχιαία πλευρά και φέρει 3 παράλληλα ακρολοφία που είναι ολικώς ή μερικώς οδοντωτά, από τα οποία το μεσαίο είναι το κυρίαρχο. Το εξωκάρπιο είναι πλάγιο, γαμψό και εύρωστο, μήκους 1-2,5mm και έχει σκληρό έγχυμα. Το *Cymodocea nodosa* παράγει δύο σπόρους στη βάση των θηλυκών βλαστών, όπου δεν υπάρχουν έντονες ρευματικές αναταραχές, οι οποίοι παραμένουν κάτω από το ίζημα έως ότου να εμφανιστεί βλάστηση (Buia & Mazzella, 1991). Αυτό υποδηλώνει την ιδιαίτερα περιορισμένη διασπορά του σπόρου που επιβεβαιώνεται κυρίως από δύο μηχανισμούς. Ο μηχανισμός των σπόρων που

διασκορπίζονται επάνω στην ακτή και των σπόρων που μεταφέρονται από τους θετικά επιπλέοντες αποσυνδεδεμένους βλαστούς.



Εικόνα 2:Μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους *Cymodocea nodosa*.

Μέχρι σήμερα, δεν είναι διαθέσιμη καμία εκτίμηση της διασποράς του σπόρου για αυτό το είδος και ακαθόριστη παραμένει η δυνατότητα για τη διασπορά γύρης. Σπορόφυτα του είδους *C.nodosa* έχουν βρεθεί στην περιφέρεια των καθιερωμένων εκτάσεων. Παρόλα αυτά, η πιθανότητα διάδοσής τους και αύξησής τους ώστε να αναπτύξουν μια νέα έκταση υπολογίζεται σε περίπου 10% (Duarte & Sant-Jensen,1990), αν και αυτός ο αριθμός μπορεί να είναι υψηλότερος εφόσον ληφθούν υπόψη τα καθιερωμένα λιβάδια.

1.1.2 Γεωγραφικό Φάσμα του είδους *Cymodocea nodosa*

Το *Cymodocea nodosa* βρίσκεται σε όλη τη Μεσόγειο και επεκτείνεται στο Βορρά του Ατλαντικού Ωκεανού έως τα μέσα της Πορτογαλίας. Επίσης, εκτείνεται νότια της Μαδέρας, στους Κανάριους νήσους και στο Πράσινο Ακρωτήριο, καθώς και στις ακτές της Αφρικής και πιο συγκεκριμένα, στη Μαυριτανία και στη Σενεγάλη.



Εικόνα 3:Χάρτης εξάπλωσης του είδους *Cymodocea nodosa*.

Κυριαρχεί στη βλάστηση της δυτικής Μεσογείου, που καλύπτει τις εκτενείς περιοχές σε βάθη 40 έως 50 m.

1.1.3 Λειτουργικά Χαρακτηριστικά του είδους *Cymodocea nodosa*

Το ταχέως αναπτυσσόμενο *Cymodocea nodosa* βρίσκεται συνήθως σε ένα ευρύτερο φάσμα από θαλάσσια περιβάλλοντα με ποικίλα επίπεδα αλατότητας (Hartog, 1970; Hesire, 1978b; Procaccini *et.al.*, 2003; Boudouresque *et.al.*, 2009). Τα πυκνά και ιδιαίτερα παραγωγικά λιβάδια της *C. Nodosa* είναι κοινά στα ανοικτά παράκτια νερά με σταθερές αλατότητες και σε εκβολές όπου οι αλατότητες και οι θερμοκρασίες αυξομειώνονται. Συνεπώς, το *C. nodosa* έχει μεγάλη μορφολογική και λειτουργική προσαρμοστικότητα και έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα πιο ευρυβιοτικά είδη.

Τα λιβάδια της *Cymodocea nodosa* είναι πιο ανεκτικά στις φυσικές και ανθρωπογενείς αυξήσεις αλατότητας και αντιδρούν γρηγορότερα στις μεταβολές των συνθηκών του φωτός. Σε περίπτωση υψηλών θερμοκρασιών και χαμηλών αλατοτήτων, το *C. nodosa* μπορεί να παρουσιάσει βλάστηση περισσότερο από 90% μέσα σε 10 ημέρες.

Στο *C. nodosa*, η βλάστηση που υπάρχει από την ανάπτυξη των σποροφύτων απαιτεί είτε μια μείωση της αλατότητας μεταξύ 20 έως 27 ‰ για μια παρατεταμένη περίοδο (εβδομάδα – μήνες) είτε μια χαρακτηριστική μείωση της τάξης του 10 έως 20‰ για κάποιες ημέρες. Αυτοί οι περιορισμοί φαίνεται να περιορίζουν τη βλάστηση του *C. nodosa* στη δυτική Μεσόγειο, στα λιβάδια κοντά σε πηγές γλυκού νερού κυρίως κατά την περίοδο Απριλίου-Οκτωβρίου

1.2 Συγγενικά είδη

1.2.1 Το είδος *Posidonia oceanica*

Το είδος *Posidonia oceanica* είναι ενδημικό στη Μεσόγειο και είναι το περισσότερο ευρέως διαδεδομένο είδος αγγειοσπέρμου στην περιοχή αυτή.

Χαρακτηρίζεται ως ένας σημαντικός βιότοπος καθώς διαμορφώνει τα είδη και ταυτόχρονα παρέχει βιότοπο για πολλά είδη. Παρόλα αυτά, κατά τις τελευταίες δεκαετίες έχουν σημειωθεί πτώσεις στον πληθυσμό του *P. oceanica*, οι οποίες

οφείλονται στην περιβαλλοντική επιβάρυνση από τις τράτες και τις βάρκες, την παράκτια ανάπτυξη καθώς και τον ευτροφισμό. Οι απώλειες αυτές παρατηρούνται ιδιαίτερα στη δυτική Μεσόγειο. Η γενική πτώση του πληθυσμού στη Μεσόγειο έχει μετρηθεί περίπου ως 10% κατά τη διάρκεια των τελευταίων 100 ετών.



Εικόνα 4:Χαρακτηριστικό λιβάδι του είδους *Posidonia oceanica*.

1.2.2 Το είδος *Ruppia cirrhosa*

Το είδος *Ruppia cirrhosa* είναι ένα ανθεκτικό, ταχέως αναπτυσσόμενο είδος και άφθονο αγγειόσπερμο, το οποίο δεν έχει καμία γνωστή απειλή και αποικίζει γρήγορα. Το γεγονός ότι είναι σχετικά διαδεδομένο και γρήγορο όσον αφορά την ανάπτυξη του, καθιστά δύσκολη την ταξινόμησή του καθώς τον προσδιορισμό του. Το *Ruppia cirrhosa* απαντάται στη Νότια Αφρική, στο Βόρειο-Ανατολικό Ατλαντικό και τη Μεσόγειο. Στη δυτική Ευρώπη, αυτό το είδος εμφανίζεται σε υφάλμυρες περιοχές νερού, όπως οι λίμνες χαμηλής αλατότητας και στις παράκτιες λιμνοθάλασσες. Αυτό το είδος είναι σπάνιο σε θαλάσσιες συνθήκες. Η αφθονία του

μπορεί να κυμανθεί εποχιακά, ενώ κατά τη διάρκεια του χειμώνα μπορεί να εξαφανιστεί εντελώς.



Εικόνα 5: Το είδος αγγειοσπέρματος *Ruppia cirrhosa*

1.2.3 Το είδος *Zostera marina*

Αυτό το είδος είναι διαδεδομένο, περιφερειακά στο βόρειο ημισφαίριο. Έχουν υπάρξει τεκμηριωμένες πτώσεις του πληθυσμού του στα μέρη του γεωγραφικού φάσματος, αλλά δεν είναι επαρκείς για να επιτρέψουν την τοποθέτηση του αγγειοσπέρμου σε μια απειλητική κατηγορία. Είναι διαδεδομένο στα βόρεια γεωγραφικά πλάτη, που βρίσκονται σε όλο το Βόρειο Ατλαντικό, το Βόρειο Ειρηνικό, τη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα. Το *Zostera marina* επεκτείνεται στην Αρκτική συγκεκριμένα στην Αλάσκα, στον Καναδά, στη Γροιλανδία, στη Βόρεια Ευρώπη και στους τροπικούς κύκλους των Μπάχα, Καλιφόρνια, Μεξικό.



Εικόνα 6: Το ευρέως διαδεδομένο είδος *Zostera marina*.

1.2.4 Το είδος *Potamogeton pectinatus* (*Stuckenia pectinate*)

Αυτό το είδος βρίσκεται σε πολλές ηπείρους ανά τον κόσμο, από την Ευρώπη στην Αφρική, την Ασία και τη Νότια Αμερική. Καμία σημαντική απειλή δεν έχει καταγραφεί και παρατίθεται επομένως ως ένας οργανισμός που η εξαφάνισή του εγείρει λιγότερη ανησυχία. Είναι χαρακτηριστικό των ευτροφικών ή υφάλμυρων νερών, όπου μπορεί να διαμορφώσει τις πυκνές στάσεις στις λίμνες, στις δεξαμενές, στους ποταμούς, στα ρεύματα, στα κανάλια, στις τάφρους και στα πλημμυρισμένα ορυκτά έργα. Είναι ανεκτικό στις διαταραχές στα κανάλια και στους πλεύσιμους ποταμούς.



Εικόνα 7: Χαρακτηριστική εικόνα του είδους *Potamogeton pectinatus*

1.3 Επιπτώσεις των περιβαλλοντικών διαταραχών στο θαλάσσιο αγγειόσπερμο *Cymodocea nodosa*

Τα θαλάσσια αγγειόσπερμα, εξελίχθηκαν και προσαρμόστηκαν σε ένα ιδιαίτερο και δυναμικό περιβάλλον, όπως είναι η ευρύτερη υποπαρالياκή ζώνη, αναπτύσσοντας μηχανισμούς αντιμετώπισης της συνεχούς μεταβολής των περιβαλλοντικών συνθηκών (Beer and Koch, 1996). Όμως, η συνεχώς αυξανόμενη ανθρωπογενής παρέμβαση στα παράκτια θαλάσσια οικοσυστήματα, ειδικά τα τελευταία 50 χρόνια, δείχνει να είναι τόσο γρήγορη ώστε να απειλεί τη γενετική ποικιλότητα και τη δυνατότητα προσαρμογής τους (Williams, 2001). Πλέον, ως περιβαλλοντικοί παράγοντες διαταραχής (stressors), εκτός από τις τυπικές φυσικοχημικές παραμέτρους (θερμοκρασία, αλατότητα, pH), πρέπει να θεωρούνται και άλλες επιδράσεις, όπως η επιβάρυνση της υδάτινης στήλης και του ιζήματος από θρεπτικά συστατικά και βαρέα μέταλλα καθώς και η κλιματική αλλαγή (Orthetal., 2006).

Στα πλαίσια αυτά, τα θαλάσσια αγγειόσπερμα γενικότερα και το είδος *Cymodocea nodosa* ειδικότερα αναμένεται να μεταβάλλουν ή/και να αναπτύξουν μηχανισμούς προσαρμογής ώστε να καθίσταται εφικτή τόσο η ανάπτυξη όσο και η απαραίτητη, για την επιβίωση του είδους, διάδοσή τους. Προς την κατεύθυνση αυτή, τα φυτά καθώς και τα θαλάσσια αγγειόσπερμα, δεδομένου της αδυναμίας μετακίνησής τους από τους επικρατούντες παράγοντες καταπόνησης, ενεργοποιούν

ποικίλα βιοχημικά ή/και μοριακά μονοπάτια άμυνας και προσαρμογής. Είναι πλέον ευρέως γνωστό ότι οι προσαρμογές αυτές περιλαμβάνουν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα συσσώρευσης μεταβολιτών οι οποίοι συχνά σχετίζονται με την απόκρισή των ειδών αυτών σε ποικίλες περιβαλλοντικές καταπονήσεις.

1.4 Δευτερογενής Μεταβολισμός – Θαλάσσιοι Οργανισμοί

Παρά το γεγονός ότι ο όρος “φυσικά προϊόντα” θα έπρεπε να περιλαμβάνει όλες τις ανόργανες και οργανικές χημικές ενώσεις που απαντώνται στη φύση, ως φυσικά προϊόντα έχει καθιερωθεί να χαρακτηρίζονται οι ουσίες που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς (Ρούσσης, 1996).

Η κατανόηση της πολυπλοκότητας και της εξειδίκευσης των δευτερογενών μεταβολικών οδών στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς και των προϊόντων τους πολύ γρήγορα οδήγησε στην αντίληψη του πλούτου των αξιοποιήσιμων χημικών ουσιών που μπορούν να προέλθουν από τα δύο αυτά βασίλεια. Από το 1800 μέχρι σήμερα, με τη συσσωρευμένη εμπειρία της παραδοσιακής ιατρικής έχουν ελεγχθεί με επιστημονικά κριτήρια, ως προς την παρουσία βιολογικά δραστικών μεταβολιτών, 30.000 φυτικοί οργανισμοί από τον υπάρχοντα όγκο των 500.000 περίπου ειδών του χερσαίου φυτικού βασιλείου και ένα σημαντικός, αν και συγκριτικά πολύ μικρότερος αριθμός οργανισμών από το θαλάσσιο περιβάλλον.

Η μελέτη των φυσικών προϊόντων από θαλάσσιους οργανισμούς αποτελεί μια σύγχρονη προέκταση της χημείας φυσικών προϊόντων, η οποία για πολλές δεκαετίες εστίαζε το ενδιαφέρον της αποκλειστικά στην απομόνωση και το δόκιμο χαρακτηρισμό νέων βιοδραστικών ουσιών από χερσαίους οργανισμούς. Τα θαλάσσια φυσικά προϊόντα (ή δευτερογενείς μεταβολίτες) είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες συντίθενται από τους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς που ζουν στο θαλάσσιο περιβάλλον. Αυτό χαρακτηρίζεται από συνθήκες σαφώς διαφοροποιημένες από τις αντίστοιχες του χερσαίου χώρου, οι οποίες δημιουργούν ποικίλα οικολογικά περιβάλλοντα στην κύρια θαλάσσια μάζα και τα φυσικά της όρια (πυθμένας, επιφάνεια, παραλία), όπου αναπτύσσονται από μονοκύτταρα φύκη έως ανώτερα θηλαστικά.

Συγκεκριμένα, η διαφορετικότητα έγκειται σε παράγοντες όπως το μεγάλο εύρος πιέσεων, από μία έως εκατοντάδες ατμόσφαιρες, το μικρό σχετικά εύρος

θερμοκρασιών, τον έντονο φωτισμό έως απόλυτο σκοτάδι στο μεγαλύτερο τμήμα του θαλάσσιου όγκου, σε περιοχές οξειδωτικές ή αναγωγικές μικρής ή μεγάλης ανάμιξης, μικρών ή μεγάλων ιονικών συγκεντρώσεων και μικρής ή μεγάλης διαφάνειας. Τα ανωτέρω έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφορών μεταξύ των θαλάσσιων οργανισμών, ενώ ακόμη μεγαλύτερες είναι οι διαφορές μεταξύ αυτών και των αντίστοιχων χερσαίων οργανισμών (Σκούλλος, 1997). Οι παραπάνω συνθήκες έχουν άμεση επίδραση στη βιοσύνθεση και κατ' επέκταση στις δομές των δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μία εξαιρετική ποικιλία και πολυπλοκότητα. Μάλιστα είναι σύνθετες δευτερογενείς μεταβολίτες που απομακρύνονται από το θαλάσσιο περιβάλλον να έχουν χημικές δομές ή δραστικές ομάδες σπάνιες ή άγνωστες στους χερσαίους οργανισμούς.

Από τις πλέον εμφανείς διαφορές μεταξύ τους είναι η σπανιότητα αζωτούχων δομών μεταξύ των θαλάσσιων φυσικών προϊόντων, εξαιτίας των σχετικά μικρών συγκεντρώσεων διαθέσιμων αζωτούχων αλάτων στο υδατικό και ιδιαίτερα το θαλάσσιο περιβάλλον. Ένα μεγάλο ποσοστό είναι αλογονωμένοι μεταβολίτες με μεγάλη ποικιλία δομών. Η ασυνήθιστα μεγάλη αναλογία αλογόνων που παρατηρείται στις χημικές δομές είναι βέβαιο ότι οφείλεται στις μεγάλες συγκεντρώσεις τους, οι οποίες με τη σειρά τους συμβάλλουν στην υψηλή ιονική ισχύ που χαρακτηρίζει το θαλάσσιο νερό και που αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα απόκλισης μεταξύ χερσαίου και θαλάσσιου περιβάλλοντος (Faulkner, and Andersen, 1974).

Παράλληλα, αποτελεί γενική διαπίστωση ότι η συντριπτική πλειοψηφία των δευτερογενών μεταβολιτών δεν είναι προϊόντα ατυχούς διαδικασίας ή τελικής απόρριψης, αλλά αποτελέσματα σύνθεσης με σοβαρό ενεργειακό κόστος προς ικανοποίηση συγκεκριμένων εξειδικευμένων αναγκών (Ρούσης, 1996, 1999]. Οι σοβαρότεροι οικολογικοί ρόλοι που διαδραματίζουν τα φυσικά προϊόντα για τους οργανισμούς που τα συνθέτουν είναι η χημική επικοινωνία, ο προσανατολισμός της νυμφικής εγκατάστασης, οι ορμονικές ρυθμίσεις, ο εδαφικός ανταγωνισμός και η γεωργική οριοθέτηση του ζωτικού χώρου και τέλος, η χημική προστασία από τους θηρευτές και τους παθογόνους μικροοργανισμούς (Ρούσης & Βάγιας, 1997).

Συμπερασματικά, η βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών και πιο συγκεκριμένα, η δομή και η συγκέντρωση τους στον παράγωγο οργανισμό είναι δυνατό να επηρεάζεται από μια πλειάδα εξωτερικών παραγόντων και κατά κανόνα από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Koning and Wright, 1996). Η

παρουσία του νερού και το βάθος είναι μερικές από αυτές. Επίσης, άλλοι παράγοντες που παίζουν κάποιο ρόλο είναι το στάδιο ανάπτυξης καθώς και η αναπαραγωγή. Εξαιτίας λοιπόν αυτών των μεταβαλλόμενων παραμέτρων, το χημικό περιεχόμενο των θαλάσσιων οργανισμών συχνά ποικίλει ποσοτικά αλλά και ποιοτικά, αναλόγως του τόπου και του χρόνου συλλογής.

1.5 Μέθοδοι Προσδιορισμού του Μεταβολικού Προφίλ

1.5.1 Αέρια Χρωματογραφία (*Gas Chromatography*)

Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί μια από τις πολλές μεθόδους χρωματογραφίας. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1952 και αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο, λόγω της ταχύτητας και της ευκολίας εφαρμογής της. Η τελευταία έγκειται στο γεγονός ότι παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης πολύπλοκων μιγμάτων, απαιτεί πολύ μικρή ποσότητα δείγματος, εμφανίζει ευελιξία, αξιοπιστία και χαμηλό κόστος ανάλυσης και εξοπλισμού (<http://teaching.shu.ac.uk>).

Η χρωματογραφία είναι μια διαδικασία διαχωρισμού, που χρησιμοποιεί τη διαφορά των συντελεστών ισορροπίας των συστατικών ενός μίγματος για να διαχωριστούν αυτά ανάμεσα σε μια στατική φάση μεγάλης ειδικής επιφάνειας και μια κινητή φάση, η οποία διέρχεται τη στατική.

Η συνύπαρξη των δύο φάσεων εξασφαλίζει την ταχεία μεταφορά μάζας μεταξύ των φάσεων και τη ραγδαία τοπική ισορροπία. Τα συστατικά του αναλυόμενου μίγματος πρέπει να είναι διαλυτά στην κινητή φάση και πρέπει να υπάρχει κάποιου είδους φυσικοχημική επεξεργασία, η οποία επιτρέπει στα συστατικά του αναλυόμενου μίγματος να ισορροπούν μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Έτσι, οι εξεταζόμενες ουσίες πρέπει να είναι πτητικές ή να μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα με κατάλληλα αντιδραστήρια, όπως συμβαίνει με τις λιπαρές ύλες όπου τα γλυκερίδια των λιπαρών οξέων μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες, πτητικές ενώσεις(<http://www.chemguide.co.uk>).

Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεά ή υγρή. Στην πρώτη περίπτωση (Αέρια-Στερεή Χρωματογραφία) η προσρόφηση είναι η κύρια διαδικασία ισορροπίας που χρησιμοποιείται, ενώ στη δεύτερη περίπτωση (Αέρια - Υγρή Χρωματογραφία),

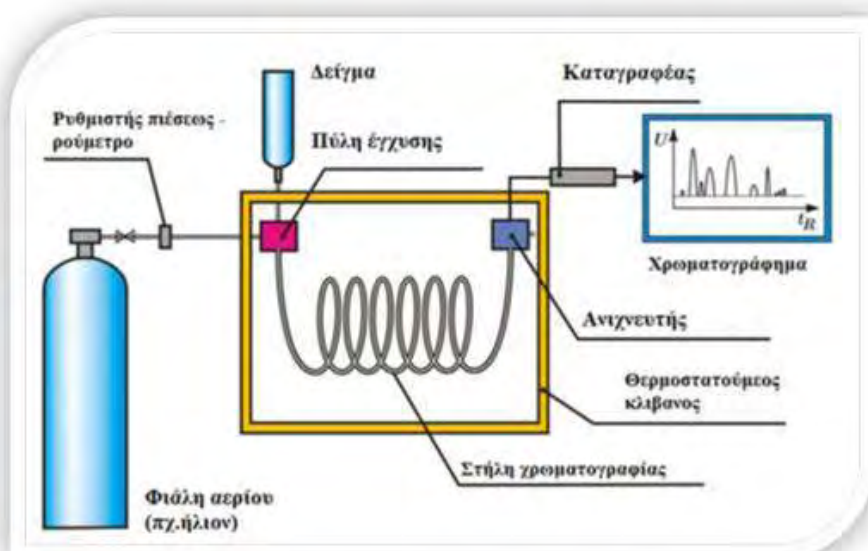
για να αποφευχθούν πιθανές καταστροφικές συνέπειες του μεταφερόμενου δείγματος και να επιτραπεί γρήγορη ανταλλαγή μεταξύ των δυο φάσεων, το υγρό διασκορπίζεται σε μια στερεά φάση. Η κινητή φάση μπορεί να είναι αέρια ή υγρή. Σχεδόν σε όλες τις εφαρμογές θεωρείται ότι η συμπεριφορά της αέριας κινητής φάσης είναι ιδανική.

Τα βασικά μέρη ενός τυπικού συστήματος αέριας χρωματογραφίας είναι τα εξής (εικόνα 2):

- Φέρον αέριο,
- Ρυθμιστής πιέσεως - Ροόμετρο,
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος,
- Στήλες,
- Θερμοστατούμενος κλίβανος,
- Ανιχνευτής και
- Καταγραφέας –H/Y-Εκτυπωτής

Συνοπτικά, ένας αέριος χρωματογράφος λειτουργεί ως εξής: ένα αδρανές φέρον αέριο [συνηθέστερα ήλιο (He)] ρέει συνεχώς, από ένα μεγάλο κύλινδρο που φέρει το αέριο, μέσα από την πύλη έγχυσης, την στήλη και τον ανιχνευτή. Ο ρυθμός ροής του φέροντος αερίου ελέγχεται προσεκτικά για να εξασφαλιστεί η αναπαραγωγή των χρόνων (όγκων) συγκρατήσεως. Το δείγμα εισάγεται (συνήθως με μικροσύριγγα) στην θερμαινόμενη πύλη έγχυσης όπου εξατμίζεται και μεταφέρεται μμέσα στη στήλη, συνήθως μια τριχοειδή στήλη μμήκους 15 με 30m, καλυμμένη εσωτερικά με μία λεπτή (0,2μm) μεμβράνη υψηλού βρασμού (στατική φάση). Το δείγμα χωρίζεται

μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης και τελικά διαχωρίζεται στα συστατικά του βασιζόμενο σε μια σχετική διαλυτότητα στην υγρή φάση και στις σχετικές πιέσεις ατμού (<http://www.chemguide.co.uk>). Μετά τη στήλη, το φέρον αέριο και το δείγμα περνούν από έναν ανιχνευτή. Με τον ανιχνευτή γίνεται φανερή η παρουσία καθενός από τα συστατικά του μίγματος, τα οποία εξέρχονται από τη στήλη, προσδιορίζεται η ποσότητα ή η συγκέντρωσή τους μέσα στο φέρον αέριο και δημιουργείται ένα ηλεκτρικό σήμα. Το σήμα αυτό μεταφέρεται σε ένα σύστημα επεξεργασίας δεδομένων, το οποίο τελικά διαμορφώνει ένα χρωματογράφημα. Στο τέλος του αέριο χρωματογραφήματος δίνονται ο χρόνος συγκράτησης, το εμβαδόν και η εκατοστιαία σύσταση των συστατικών του δείγματος.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση αέριου χρωματογράφου.

(Πηγή: <http://www.bbc.co.uk>)

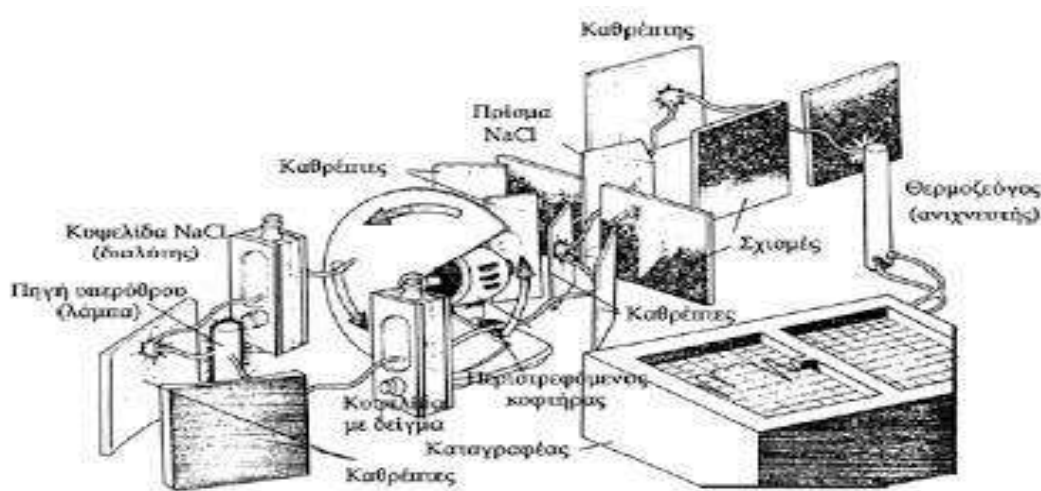
1.5.2 Φασματομετρία μαζών (*Mass Spectrometry*)

Βασική αρχή της φασματομετρίας μαζών είναι η δημιουργία ιόντων, είτε από ανόργανα είτε από οργανικά συστατικά, με οποιαδήποτε κατάλληλη μέθοδο. Ο διαχωρισμός των ιόντων αυτών γίνεται ανάλογα με το πηλίκο m/z (μάζα /φορτίο) και η ανίχνευσή τους ποιοτικά και ποσοτικά, σύμφωνα με το αντίστοιχο πηλίκο τους m/e

και την ποσότητά τους (Guarino, etal., 2010). Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος (MB) της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των διαφόρων ομάδων μεταξύ τους.

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από:

1. το θάλαμο ιοντισμού, όπου μετατρέπεται η ένωση σε ιόντα, συνήθως κατιόντα με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου
2. τον αναλυτή μαζών, όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο m/z ,
3. τον ανιχνευτή (Εικόνα 9). Ο χώρος όπου δημιουργούνται και επιταχύνονται τα ιόντα διατηρείται σε κατάσταση υψηλού κενού. Με τον τρόπο αυτό, δημιουργούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες θέρμανσης ατμοί της προς προσδιορισμό ουσίας χωρίς τη διάσπασή της, που οδηγούνται στο θάλαμο ιοντισμού. Επίσης, απομακρύνονται τα μέρη της και τα ουδέτερα προϊόντα της διάσπασης από το χώρο της ανάλυσης μετά από κάθε μέτρηση.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση φασματοφωτόμετρου.

(Πηγή: <http://pmchemistry.gr>)

Επειδή η ύαλος και ο χαλαζίας κόβουν την υπέρυθρη ακτινοβολία χρησιμοποιούνται κυψελίδες από κρυστάλλους, όπως NaCl, KCl κ.α. Είναι προφανές, ότι λόγω της ευαισθησίας των παραπάνω μορίων στην υγρασία είναι αναγκαία η απουσία νερού ακόμη και από το δείγμα.

Η ποσότητα της ουσίας που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις στην φασματοσκοπία υπέρυθρου κυμαίνεται από 1-15mg.

Ο προσδιορισμός γίνεται:

1. Σε αέρια φάση
2. Σε υγρή φάση μεταξύ 2 πλακών NaCl.
3. Σε διάλυμα
4. Σε στερεή κατάσταση υπό μορφή αιωρήματος σε παραφινέλαιο
5. Σε στερεή κατάσταση υπό μορφή δισκίου με KBr(Guarino, et al.,2010).

1.6 Σκοπός της μελέτης

Τα τελευταία χρόνια, η συνεχώς αυξανόμενη ανθρωπογενής παρέμβαση στα παράκτια θαλάσσια οικοσυστήματα, σε συνδυασμό με την επίδραση της κλιματικής αλλαγής, συχνά απειλεί τη γενετική ποικιλότητα και τη δυνατότητα προσαρμογής των ειδών γενικότερα και των θαλάσσιων αγγειόσπερμων ειδικότερα. Ως απόκριση των ανωτέρω, οι οργανισμοί αναπτύσσουν ποικίλους μηχανισμούς προσαρμογής, προκειμένου να καταστεί εφικτή η ανάπτυξη και διάδοσή τους. Δεδομένου ότι οι προσαρμογές αυτές συχνά περιλαμβάνουν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα συσσώρευσης μεταβολιτών, που σχετίζονται με την απόκριση των ειδών αυτών σε ποικίλες περιβαλλοντικές καταπονήσεις, σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του περιβάλλοντος στο μεταβολικό προφίλ του είδους *Cymodocea nodosa*. Στα πλαίσια αυτά, συλλέχθηκαν δείγματα φύλλων, ρίζας και ριζώματος του είδους *C.nodosa* από τρεις διαφορετικές περιοχές (Βρασίδα, Γατζέα και Τρίκερι). Στο πλαίσιο της μεταβολομικής ανάλυσης, αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση των μεταβολιτών, σε δύο διαδοχικές εκχυλίσσεις του κλάσματος των πολικών μεταβολιτών και του κλάσματος των μη πολικών μεταβολιτών ενώ, η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών έγινε έμμεσα, με την χρήση ριβιτόλης (εσωτερικός μάρτυρας). Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύθηκαν σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας και η ταυτοποίηση των μεταβολιτών που περιέχονται στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού και βιβλιοθηκών που περιλαμβάνουν φάσματα και δείκτες δέσμευσης για πληθώρα μεταβολιτών που απαντώνται σε φυτικούς οργανισμούς.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε φυτικό υλικό του είδους *Cymodocea nodosa* που συλλέχθηκε από τρεις διαφορετικές περιοχές (Βρασίδα, Γατζέα και Τρίκερι), όπου και επικρατούν διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Ειδικότερα, συλλέχθηκαν δείγματα φύλλων και ρίζας/ριζωμάτων σε αναπτυσσόμενα φυτά του είδους *C. nodosa*. Στο παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μεταβολομική ανάλυση:

Πίνακας 1: Δείγματα του είδους *Cymodocea nodosa* που αξιοποιήθηκαν για τις αναλύσεις της μεταβολομικής.

Δείγματα του είδους <i>Cymodoceanodosa</i> - Μεταβολομική ανάλυση			
Περιοχή Δειγματοληψίας	Αριθμός δειγμάτων / Τύπος ιστού		
	Φύλλα	Ρίζες	Ριζώματα
Βρασίδα	3	3	3
Γατζέα	5	3	-
Τρίκερι	5	4	-
Σύνολο: 26 δείγματα			

Κατά τη συλλογή τους, τα δείγματα τοποθετήθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια, στη βαθιά κατάψυξη (-80 °C), έως ότου χρησιμοποιηθούν για τις αναλύσεις της μεταβολομικής. Λήφθηκαν τουλάχιστον 3 δείγματα ιστού για κάθε μία από τις υπό μελέτη επεμβάσεις (διαφορετικοί τύποι ιστού: φύλλα, ρίζες, ριζώματα και διαφορετικές περιοχές: Βρασσίδα, Γατζέα και Τρίκερι) (βιολογικές επαναλήψεις).

2.2 Απομόνωση μεταβολιτών

Τα φυτικά δείγματα ομογενοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές εκχυλίσεις, αρχικά του κλάσματος των πολικών μεταβολιτών και στη συνέχεια του κλάσματος των μη πολικών μεταβολιτών στο πλαίσιο της μεταβολομικής ανάλυσης. Η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών έγινε έμμεσα, με την προσθήκη ριβιτόλης η οποία αξιοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας.

Η απομόνωση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο: Τα φυτικά δείγματα λειοτριβήθηκαν με υγρό άζωτο και 50 mg ιστού μεταφέρθηκαν σε eppendorf. Ακολούθησε η προσθήκη 400 μl mastermix, που περιείχε 395 μl μεθανόλη και 5μl ριβιτόλη (1mgml^{-1} σε H₂O), και το διάλυμα αναμίχθηκε με τη χρήση vortex. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μηχανικό αναδευτήρα για 15 λεπτά στους 70°C. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 μl χλωροφόρμιου και ακολούθησε ανάμιξη των δειγμάτων και τοποθέτησή τους σε μηχανικό αναδευτήρα για 5 λεπτά στους 37°C. Κατόπιν, προστέθηκαν 400 μl νερού (dd H₂O) και τα δείγματα αναμίχθηκαν εκ νέου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές ώστε να απομακρυνθούν τα φυτικά θραύσματα και κατόπιν, 100 ml από το υπερκείμενο μεταφέρθηκαν σε νέο eppendorf. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ξήρανση των δειγμάτων με αέριο άζωτο.

Με την προσθήκη μίγματος n-αλκανίων έγινε ο υπολογισμός του δείκτη δέσμευσης και ακολούθησε ξήρανση υπό κενό για την απομάκρυνση του διαλύτη. Έπειτα, για την αύξηση της πτητικότητας των μεταβολιτών του δείγματος πραγματοποιήθηκε η διαδικασία. Η παραγωγή των πολικών μεταβολιτών έγινε με επαναδιάλυση και επώαση σε κατάλληλο όγκο διαλύματος μεθοξυαμίνης (MOX) και ακολούθησε προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) για την παραγωγή των μη πολικών μεταβολιτών.

2.3 Ανάλυση Αέριας Χρωματογραφίας –Φασματομετρίας μαζών (GC-MS)

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε αέριο χρωματογράφο Agilent 6890GC συζευγμένο με φασματογράφο μάζας Agilent 5973 MSD, ενώ η ταυτοποίηση των μεταβολιτών που περιέχονται στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού AMDIS και διαθέσιμων βιβλιοθηκών που περιλαμβάνουν φάσματα και δείκτες δέσμευσης για πληθώρα μεταβολιτών που απαντώνται σε φυτικούς οργανισμούς.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος μεταξύ της περιοχής του μεταβολίτη στόχου προς την περιοχή του μεταβολίτη αναφοράς (ριβιτόλη) και παρουσιάστηκαν σε σχέση με το νωπό βάρος των δειγμάτων.

2.4 Στατιστική Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση περίπου 200 μεταβολιτών στα φύλλα και τις ρίζες/ριζώματα φυτών του είδους *C. nodosa*. Στη συνέχεια, ακολούθησε "φιλτράρισμα" που αφορούσε κυρίως στην εξασφάλιση της επαναληψιμότητας μεταξύ των βιολογικών επαναλήψεων ($n \geq 3$).

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αφορούσε στη σύγκριση του επιπέδου των ανιχνευθέντων μεταβολιτών στα υπό μελέτη δείγματα ιστού (φύλλα, ρίζες, ριζώματα) που προέρχονταν από τις διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας (Βρασσίδα, Γατζέα και Τρίκερι).

Αρχικά, το σύνολο των βιολογικών επαναλήψεων ανά επέμβαση εκφράστηκε ως μέσος όρος για κάθε μεταβολίτη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων όρων μέσω ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA). Οι συγκρίσεις αφορούσαν στους μέσους όρους των συστατικών που ανιχνεύτηκαν στα υπό μελέτη ιστού και τις διαφορετικές περιοχές.

3. Αποτελέσματα

Η ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση περίπου 200 μεταβολιτών στα φύλλα και τις ρίζες/ριζώματα φυτών του είδους *Cymodoceanodosa*. Στη συνέχεια, ακολούθησε "φιλτράρισμα" που αφορούσε κυρίως στην εξασφάλιση της επαναληψιμότητας μεταξύ των βιολογικών επαναλήψεων ($n \geq 3$).

Συνολικά, 111 μεταβολίτες παρουσίασαν υψηλή επαναληψιμότητα και αυτοί ανήκουν στις κατηγορίες των ζαχάρων, αμινοξέων, οργανικών οξέων, πολυολών, αζωτούχων ενώσεων, φωσφορικών αλάτων και άλλων ενώσεων.

Πίνακας 2. Μέσος όρος ζαχάρων που ανιχνεύθηκαν σε δείγματα φύλλων, ριζωμάτων και ριζών του είδους *Cymodocea nodosa*, τα οποία συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές (Βρασίδα, Γατζέα, Τρίκερι).

Μεταβολίτης	Τύπος ιστού									
	Φύλλα					Ριζώματα		Ρίζες		
	RT	m/z	Blank	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι	Βρασίδα	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι
ZAXAPA	Μέσος Όρος									
D-(+) trehalose	44,955	361	0	0	0	0	16,56342	0,003306	0	0
D-glucose 1	32,086	319	0	0,03579	0,010764	0,008788	0,711443	0,216815	0,04241	0,048326
Fructose BP	31,741	307	0	0	0,007116	0,005555	0	0	0	0,003472
Fructose MP	31,551	73	0	0,046108	0,044451	0,025505	0,344847	0,15499	0,094487	0,077467
Galactose MP	32,086	319	0	0,06786	0,042959	0,027237	0,711443	0,216815	0,080724	0,082108
Glucopyranose [-H ₂ O]	29,402	217	0	0,009529	0,089151	0,055149	0,041891	0,023667	0,146691	0,037989
Kestose, 1-	44,921	361	0	0	0	0	2,657045	0	0	1,471982
Kestose, 6-	45,076	361	0,000522	0,046476	0	1,809855	0,010765	0,075131	0,202929	1,13116
Lactose 2	51,849	204	0	0,002324	0,010659	0	0	0	0	0
Melezitose	46,532	361	0	0,001725	0	0	14,73073	0,001425	0	0
Melibiose 2	45,974	361	0	0	0	0	0,048361	0	0	0
Raffinose	44,950	87	0	4,273017	3,839283	0	17,0185	18,0088	9,046421	16,8872
Sorbose BP	31,549	73	0	0,025054	0	0,006667	0,143923	0	0	0,004167
Sorbose MP	31,741	307	0	0,027292	0,022379	0,017239	0,248392	0,09275	0,035445	0,056618
Sucrose	44,931	361	0,000522	0,08811	16,65201	12,50219	0,784999	0,075131	60,24766	7,781422
Tagatose	31,742	217	0	0,027292	0,029495	0,022793	0,248392	0,09275	0,035445	0,06009

Πίνακας 3. Μέσος όρος αμινοξέων που ανιχνεύθηκαν σε δείγματα φύλλων, ριζωμάτων και ριζών του είδους *Cymodocea nodosa*, τα οποία συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές (Βρασίδα, Γατζέα, Τρίκερι).

Μεταβολίτης	Τύπος ιστού									
	Φύλλα					Ριζώματα		Ρίζες		
	RT	m/z	Blank	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι	Βρασίδα	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι
AMINOΞΕΑ	Μέσος Όρος									
Alanine	19,725	188	0	0,001483	0	0	0,045136	0,008267	0	0
Asparagine [-H ₂ O]	23,427	243	0	0	0	0,001322	0,127157	0,001987	0,140808	0,041988
Asparagine BP1	26,286	188	0	0	0	0	0,032769	0	0,045292	0,01171
Aspartic acid 2	23,733	232	0	0,002132	0,009201	0,006497	0,025078	0,000343	0,062958	0,012539
Beta- alanine 1	21,496	248	0	0,000983	0	0	0,000408	0	0	0
DL-isoleucine 2	17,852	158	0	0,005757	0,00081	0	0,012389	0,005265	0,005104	0,000204
Glycine	18,262	174	0	0,005211	0,00657	0,006991	0,012549	0,009352	0,011539	0,005914
L-alanine 1	12,501	116	0	0,103993	0,007954	0,010706	0,751076	0,229074	0,084742	0,009898
L-asparagine 2	27,297	231	0	0	0	0	0,805233	0	0,214758	0,047234
L-glutamine 3	29,616	156	0	0,000268	0	0	0	0	0,017189	0
L-lysine 2	32,721	317	0	0,000268	0	0	0,013126	0	0	0
L-methionine 2	23,812	176	0	0	0	0	0,002506	0	0,000233	0
L-proline 2	18,063	142	0	1,576585	0,321592	0,429247	1,392762	0,555974	2,858739	0,392065
L-serine 2	19,602	204	0	0,018787	0,008138	0,014719	0,413886	0,048683	0,198446	0,069022
L-threonine 2	20,279	218	0	0,003451	0	0,000105	0,040868	0,005929	0,024402	0,004894
Phenylalanine	26,436	218	0	0,001219	0	0	0	0	0	0
Proline [+CO ₂]	25,351	186	0	0,015765	0,006725	0,00565	0,119676	0,000969	0,042409	0,004982
Tyrosine	33,087	218	0	0	0	0	0,003256	0	0	0
Valine	15,691	144	0	0,012322	0,001581	0,001418	0,035621	0,012206	0,006996	0,000886

Πίνακας 4. Μέσος όρος πολυολών που ανιχνεύθηκαν σε δείγματα φύλλων, ριζωμάτων και ριζών του είδους *Cymodocea nodosa*, τα οποία συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές (Βρασίδα, Γατζέα, Τρίκερι).

Μεταβολίτης	Τύπος ιστού									
	Φύλλα					Ριζώματα		Ρίζες		
	RT	m/z	Blank	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι	Βρασίδα	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι
ΠΟΛΥΟΛΕΣ	Μέσος Όρος									
Allo-inositol	33,306	318	0,000737	1,882418	8,808159	8,174833	7,291139	3,95012	17,98656	5,40276
D-threitol	23,328	217	0	0,001042	0	0	0	0	0	0
Glycerol	17,211	147	0,011006	0,021501	0,007404	0,046603	0,019368	0,005691	0,040607	0,033342
Inositol, myo-	35,939	305	0	0,366223	0,50506	0,253696	0,140447	0,075964	0,423043	0,133266
Mannitol	32,764	319	0	0,007111	0,011447	0	0,000708	0,011123	0,011447	0

Πίνακας 5. Μέσος όρος οργανικών οξέων που ανιχνεύθηκαν σε δείγματα φύλλων, ριζωμάτων και ριζών του είδους *Cymodocea nodosa*, τα οποία συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές (Βρασίδα, Γατζέα, Τρίκερι).

Μεταβολίτης	Τύπος ιστού									
	Φύλλα			Ριζώματα			Ρίζες			
	RT	m/z	Blank	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι	Βρασίδα	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι
Μέσος Όρος										
4-hydroxyphenylacetic acid	26,732	252	0	0,000411	0	0	0,005748	0	0,006814	0
4-guanidinobutyric acid 2	24,081	174	0	1,479319	0,012124	0,028375	0,951602	0,51322	0,128807	0,028497
4-hydroxybenzoic acid	26,480	267	0	0,000885	0,00123	0,000854	0,00871	0,004532	0,000905	0,001505
4-hydroxycinnamic acid	33,207	293	0	0	0,002093	0,004958	0,001222	0,002146	0,000663	0,002455
Caffeic acid	36,883	396	0,005615	0,001822	0,162218	0,139789	0,021894	0,063921	0,17889	0,07314
Citraconic acid 1	19,370	147	0	0	0	0	0,000689	0,001151	0,000471	0
Citric acid	30,506	347	0	0,005465	0,000634	0,002109	1,249573	0,049352	0,114385	0,165203
D-malic acid	22,909	147	0	0,017235	0,031569	0,066141	0,107591	0,003687	0,160055	0,059401
Fumaric acid	19,418	245	0	0	0,000673	0,001066	0,000376	0,000192	0,000478	0,000477
Gluconic acid 2	34,079	333	0	0	0	0	0,004431	0,011403	0	0
Glutamic acid	26,141	246	0	0,003751	0,004181	0,002703	0,012006	0,000669	0,012549	0,001292
Glyceric acid	18,774	189	0	0	0,002537	8,97E-05	0	0	0,001336	5,61E-05
Glycolic acid	11,730	147	0,003966	0,000374	0,001882	0,000589	0	0	0,010741	0,000158
Itaconic acid	19,188	147	0	0,000506	0,002235	0,000261	0,002333	0,00057	0,001726	0,000163
L-(+) lactic acid	11,273	147	0,034258	0,019743	0,032748	0,063853	0,015763	0,02245	0,089667	0,048942
Lactobionic acid 1	43,435	217	0	0,00405	0,010136	0,014682	0	0	0,036724	0,005619
L-glutamic acid 3 (dehydrated)	23,890	156	0	0,007627	0,013883	0,021525	0,021689	0	0,206283	0,022831
Lyxonic acid	29,273	292	0	0	0	0	0,000253	0,001092	0	0
Malonic acid 1	15,341	147	0	0	0	0	0,002744	0	0	0
Methylmalonic acid	13,301	147	0	0	0	0	0	0,003784	0	0
Mucic acid	30,258	333	0	0,002378	0	0	0	0,002129	0	0
Orotic acid, 4,5-dihydro-	29,585	257	0	0	0	0	0,001594	0	0	0
Oxalic acid	12,895	147	0	0,011724	0	0,006736	0	0	0	0,00421
p-toluenesulfonic acid	26,447	229	0	0	0	0	0	0	0,006228	0,000841
Pyrrole -2-carboxylic acid	19,486	240	0	0,003331	0	0	0	0	0	0
Succinic acid	18,437	148	0	0,003864	0,012712	0,01883	0,004613	0,004781	0,039185	0,011125
Trans-aconitic acid	29,020	229	0	0,002828	0,024295	0,02888	0,034966	0,001117	0,122735	0,019651

Πίνακας 6. Μέσος όρος φωσφορικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν σε δείγματα φύλλων, ριζωμάτων και ριζών του είδους *Cymodocea nodosa*, τα οποία συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές (Βρασίδα, Γατζέα, Τρίκερι).

Μεταβολίτης	Τύπος ιστού									
				Φύλλα			Ριζώματα		Ρίζες	
	RT	m/z	Blank	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι	Βρασίδα	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι
ΦΩΣΦΟΡΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ										
Μέσος Όρος										
Phosphoric acid	17,180	299	0,004012	0,009945	0,035311	0,020024	0,457524	0,004815	0,176704	0,024968

Πίνακας 7. Μέσος όρος αζωτούχων ενώσεων που ανιχνεύθηκαν σε δείγματα φύλλων, ριζωμάτων και ριζών του είδους *Cymodocea nodosa*, τα οποία συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές (Βρασίδα, Γατζέα, Τρίκερι).

Μεταβολίτης	Τύπος ιστού									
				Φύλλα			Ριζώματα		Ρίζες	
	RT	m/z	Blank	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι	Βρασίδα	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι
ΑΖΟΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ										
Μέσος Όρος										
2-amino-1-phenylethanol	16,184	174	0,004979	0,016857	0,003368	0,005964	0,008517	0,00872	0,012986	0,004689
2-amino-2-methyl-1,3-propanediol 2	27,578	218	0	0,000604	0	0	0,000259	0	0	0,000179
Beta-cyano-L-alanine	19,971	141	0	0	0	0	0,012776	0	0,011171	0,001265
Butyric acid, 3-amino-, DL-	16,734	116	0	0,006886	0	0	0,007144	0,003665	0,0067	0,000146
D-Ala-D-Ala2	14,615	116	0	0	0,000134	0,002319	0	0	0	0,00145
D-sphingosine 3	12,529	204	0	0,001128	0	0	0,003096	0,006874	0	0
Ethanolamine	17,154	174	0,001258	0,017035	0,004288	0,005165	0,008517	0,008434	0,013815	0,003848
Iminodiacetic acid 2	22,538	232	0	0,001722	0	0	0,040973	0,008193	0,000877	0
L-norleucine 2	17,243	158	0	0,003689	0,000166	0,000295	0,008516	0,004072	0,002349	0,000184
N-methylalanine	14,455	130	0	0,001071	0	0	0,001124	0,000169	0	0
Pipecolic acid 2	19,908	156	0	0,006902	0	0	0,001688	0,000773	0	0
Putrescine	28,932	174	0	0,007478	0	0,002559	0,006448	0,004751	0,000301	0,002016
Sarcosine	12,500	116	0	0	0,00578	0,002861	0	0	0,003264	0,002872
Urea	16,330	147	0	0,002103	0,00149	0,001416	0,000637	0,002368	0,000456	0,001105

Πίνακας 8. Μέσος όρος άλλων ενώσεων που ανιχνεύθηκαν σε δείγματα φύλλων, ριζωμάτων και ριζών του είδους *Cymodocea nodosa*, τα οποία συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές (Βρασίδα, Γατζέα, Τρίκερι).

Μεταβολίτης	Τύπος ιστού									
	Φύλλα			Ριζώματα			Ρίζες			
	RT	m/z	Blank	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι	Βρασίδα	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι
ΆΛΛΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	Μέσος Όρος									
(-)-Epicatechin	48,134	368	0	0	0	0	0,001353	0,000422	0	0
1-hydroxyanthraquinone	9,208	281	0	0,000274	0,000549	0,00049	0,000897	0	0	0
2-butyne-1,4-diol	15,453	147	0	0	0,00041	0,000481	0	0	0,00041	0,000301
Butyro-1,4-lactam	13,832	142	0	0,002254	0	0	0	0,000371	0	0
Catechin	48,430	368	0	0,00375	0,001626	0,001224	0,089735	0,030089	0,071524	0,026493
Isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside	43,438	217	0	0	0,03314	0,002079	0	0	0,019487	0,001299
Methyl-beta-D-galactopyranoside	39,738	204	0	0,019678	0,00775	0	0,001542	0	0,003674	0
Porphine 1	18,996	285	0	0,001582	0,00665	0,001222	0	0,001921	0,010853	0,000237
Sedoheptulose anhydride monohydrate	28,058	204	0	0,002141	0,005397	0,012688	0,003585	0,003187	0,003299	0,006976
Taxifolin	31,035	368	0	0	0,003278	0,000495	0,002642	0,002871	0,012603	0,001253

Πίνακας 9. Μέσος όρος μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν και συνιστούν άγνωστες ενώσεις σε δείγματα φύλλων, ριζωμάτων και ριζών του είδους *Cymodocea nodosa*, τα οποία συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές (Βρασίδα, Γατζέα, Τρίκερι).

Μεταβολίτης	Τύπος ιστού									
	Φύλλα			Ριζώματα			Ρίζες			
	RT	m/z	Blank	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι	Βρασίδα	Βρασίδα	Γατζέα	Τρίκερι
Μέσος Όρος										
M000000_A114002-101-										
xxx_NA_1129.12_TRUE_VARS_ALK_NA	13,567	147	0,177989	0,037449	0,153216	0,252545	0,062325	0,039699	0,49689	0,223009
M000000_A157006-101-										
xxx_NA_1562.47_PRED_VARS_ALK_NA	24,603	292	0	0,00133	0	0	0	0	0	0
M000000_A170001-101-										
xxx_NA_1689.66_PRED_VARS_ALK_NA	27,826	73	0	0,133133	0,027008	0,040101	0,218021	0,260882	0,027006	0,039502
M000000_A176001-101-										
xxx_NA_1743.81_PRED_VARS_ALK_NA	29,076	333	0	0,000511	0	0	0	0	0	0
M000000_A314002-101-										
xxx_NA_3133.14_PRED_VARS_ALK_NA	29,185	217	0	0,000315	0,000385	0,000603	0	0,004962	0	0,001794
M000000_A315004-101-										
xxx_NA_3140.68_PRED_VARS_ALK_NA	29,189	217	0	0,000967	0,001204	0,000166	0	0,001653	0,009782	0,001165
M000000_A192013-101-										
xxx_NA_1912.59_PRED_VARS_ALK_NA	32,404	205	0	0,004303	0,015011	0,01026	0,025446	0,010767	0,058057	0,024718
M000000_A203010-101-										
xxx_NA_2018.25_PRED_VARS_ALK_NA	32,522	318	0,000737	1,882418	0,660434	0,856284	1,391254	1,52259	1,632193	0,848296
M000000_A260002-101-										
xxx_NA_2586.04_PRED_VARS_ALK_NA	32,831	204	0	0,019678	0	0	0	0,000756	0	0
M000000_A310005-101-										
xxx_NA_3069.07_PRED_VARS_ALK_NA	33,896	396	0,005615	0,001068	0,003357	0,000906	0,000694	0	0,001929	0,002057
M000620_A196014-101-										
xxx_NA_1939.95_TRUE_VARS_ALK_NA (Inositol like)	34,694	318	0	0	0,001119	4,234122	0,001905	0	0,001111	2,646326
M000000_A217004-101-										
xxx_NA_2161.61_PRED_VARS_ALK_NA	37,641	204	0	0,003652	0	0	0	0	0	0
M000000_A237006-101-										
xxx_NA_2369.84_PRED_VARS_ALK_NA	38,284	204	0	0	0,001365	0	0	0	0,000811	0
M000000_A259002-101-										
xxx_NA_2582.98_PRED_VARS_ALK_NA	44,304	371	0,002418	0,007709	0,015653	0,02751	0,013769	0,015882	0,051941	0,022968
M000000_A306003-101-										
xxx_NA_3050.9_PRED_VARS_ALK_NA	45,741	361	0	0	0	0	8,56912	0,003306	0	0
M000000_A271004-101-										
xxx_NA_2704.05_PRED_VARS_ALK_NA	45,969	204	0	0,004315	0	0	0,018125	0	0	0
M000000_A278004-101-										
xxx_NA_2774.14_PRED_VARS_ALK_NA	47,135	399	0	0,005458	0,01208	0,027241	0,01421	0,015843	0,043364	0,021948
M000000_A303001-101-										
xxx_NA_3017.8_PRED_VARS_ALK_NA	49,318	204	0	0,012703	0	0	0,001542	0	0	0
M000000_A311004-101-										
xxx_NA_3094.28_PRED_VARS_ALK_NA	51,668	305	0	0	0	0	0,003388	0,008355	0	0

4. Συζήτηση

Τα θαλάσσια αγγειόσπερμα εξελίχθηκαν και προσαρμόστηκαν σε ένα ιδιαίτερα δυναμικό περιβάλλον, γεγονός που έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ποικίλων μηχανισμών άμυνας έναντι καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένου των περιβαλλοντικών, αλλά και της συνεχώς αυξανόμενης ανθρωπογενούς παρέμβασης. Οι παράγοντες αυτοί, σε συνδυασμό με τις μεταβολές που επέφερε η κλιματική αλλαγή, έχουν ως αποτέλεσμα τη ραγδαία μείωση της γενετικής ποικιλότητας των ειδών αυτών, πολλά από τα οποία βρίσκονται υπό την απειλή της εξαφάνισης (Williams, 2001). Σημαντικοί παράγοντες διαταραχής για τα θαλάσσια αγγειόσπερμα είναι οι ακραίες θερμοκρασίες, η υψηλή αλατότητα, οι ακραίες τιμές pH καθώς και η ύπαρξη βαρέων μετάλλων (Orthetal., 2006).

Το θαλάσσιο αγγειόσπερμα *Cymodocea nodosa*, που συνιστά ένα από τα κυριότερα είδη στο θαλάσσιο χώρο της Μεσογείου, αν και δεν βρίσκεται υπό την άμεση απειλή αφανισμού, χαρακτηρίζεται από ευαισθησία σε διάφορους περιοριστικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί σχετίζονται κατά κύριο λόγο με την ύπαρξη διαταραχών καθώς και την καταλληλότητα των συνθηκών φωτισμού και διατροφής (Nielsen and Pedersen, 2000). Ειδικότερα, η ανάπτυξή του σε ζεστά και ήρεμα νερά συχνά οδηγεί σε κατάσταση ανοξίας ενώ παράλληλα, παρουσιάζει ευαισθησία στην έλλειψη φωσφόρου και αζώτου (Binzeretal., 2005).

Ως απόκριση στους ποικίλους παράγοντες καταπόνησης, τα θαλάσσια αγγειόσπερμα γενικότερα και το είδος *Cymodocea nodosa* ειδικότερα αναπτύσσουν μηχανισμούς προσαρμογής ώστε να καθίσταται εφικτή τόσο η ανάπτυξη όσο και η απαραίτητη, για την επιβίωση του είδους, διάδοσή τους. Οι μηχανισμοί αυτοί έγκεινται κυρίως στο γεγονός ότι ενεργοποιούνται ποικίλα βιοχημικά ή/και μοριακά μονοπάτια άμυνας και προσαρμογής τόσο σε επίπεδο έκφρασης γονιδίων όσο και παραγωγής πρωτεϊνών και δευτερογενών μεταβολιτών.

Στα πλαίσια αυτά, αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε ο προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ στο είδος *C. nodosa*, υπό συνθήκες ανάπτυξης σε διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές του Ελλαδικού χώρου. Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκαν δείγματα φύλλων, ριζών και ριζωμάτων από τις περιοχές Βρασίδα, Γατζέα και Τρίκερι. Σύμφωνα με πηγές, οι περιοχές Γατζέα και Τρίκερι, που ανήκουν στην ευρύτερη περιοχή της Μαγνησίας θεωρούνται απαλλαγμένες από

μολύνσεις ενώ αντίθετα, η περιοχή Βρασίδα, που ανήκει στο Νομό Καβάλας πιθανολογείται ότι είναι επιβαρυνμένη. Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε την απομόνωση του περιεχομένου μεταβολιτών και στη συνέχεια, την ανάλυση αέριας χρωματογραφίας-

φασματομετρίας μάζας(GC - MS).

Η μέθοδος GC-MS ανήκει στις τεχνολογίες που επιτρέπουν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μεγάλου εύρους μεταβολιτών και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται συστηματικά σε εργαστηριακή κλίμακα. Πέραν του ότι επιτρέπει την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μερικών εκατοντάδων μεταβολιτών σε μία ανάλυση, η μέθοδος GC-MS υπερέχει έναντι άλλων καθώς έχει πλέον αναπτυχθεί πληθώρα αξιόπιστων πρωτοκόλλων και βιβλιοθηκών με φάσματα μαζών πρότυπων μεταβολιτών που επιτρέπουν την ταυτοποίηση πολλών πολικών και μη πολικών μεταβολιτών, ακόμη και σε σύνθετα βιολογικά εκχυλίσματα.

Η ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση περίπου 200 μεταβολιτών, μέρος των οποίων ωστόσο δεν παρουσίαζε επαρκή επαναληψιμότητα στις υπό μελέτη βιολογικές επαναλήψεις φύλλων και ριζών/ριζωμάτων του είδους *C. nodosa*. Για το λόγο αυτό, ακολούθησε φιλτράρισμα για την εύρεση των συστατικών που παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα επαναληψιμότητας και από την επεξεργασία αυτή προέκυψαν 111 μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν στις κατηγορίες των ζαχάρων, αμινοξέων, οργανικών οξέων, πολυολών, αζωτούχων ενώσεων, φωσφορικών αλάτων και άλλων ενώσεων.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι για αρκετά από τα ανιχνευθέντα συστατικά, η ανάλυση κατέδειξε την ύπαρξη διαφοροποιήσεων μεταξύ των δειγμάτων από τις υπό μελέτη περιοχές. Αναλυτικότερα, οι περισσότεροι από τους ανιχνευθέντες μεταβολίτες παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα συσσώρευσης στις περιοχές Γατζέα και Τρίκερι. Αντίθετα, η περιοχή Βρασίδα παρουσίασε σαφώς διαφορετικό προφίλ τόσο στα φύλλα όσο και στις ρίζες των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Ενδεικτικά, στην κατηγορία των ζαχάρων τα δείγματα παρουσίασαν σαφή διαφοροποίηση ως προς τα επίπεδα συσσώρευσης των φρουκτόζη, γαλακτόζη, γλυκοπυρανόση, μελεζιτόζη και σουκρόζη, ενώ στις ρίζες αντίστοιχα διαφορές παρατηρήθηκαν στα ζάχαρα τρεχαλόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, μελεζιτόζη και σουκρόζη. Όσον αφορά τα αμινοξέα, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν σε αλανίνη, ασπαραγίνη, γλουταμίνη, λυσίνη, φαινυλανανίνη, βαλίνη, προλίνη. Στην

κατηγορία των πολυολών, παρατηρήθηκαν διαφοροποιημένα επίπεδα συγκέντρωσης ινοσιτόλης, τόσο στα φύλλα όσο και στις ρίζες. Επιπρόσθετα, το σύνολο σχεδόν των ανιχνευθέντων αμινοξέων και μεγάλο μέρος των οργανικών οξέων διέφερε επίσης σημαντικά. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν σημαντικές διαφορές στα δείγματα που συλλέχθηκαν από τις περιοχές Βρασίδα, Γατζέα και Τρίκερι, με τις τελευταίες δύο να παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα συγκέντρωσης για το σύνολο σχεδόν των μεταβολιτών, γεγονός που αποδίδεται κυρίως στην εγγύτητα των εν λόγω περιοχών. Όσον αφορά, στο διαφορετικό μεταβολικό προφίλ των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τη Βρασίδα, οι παρατηρηθείσες διαφορές πιθανώς οφείλονται σε επιβάρυνση των θαλάσσιων υδάτων.

Η μελέτη αυτή συνιστά μία από τις πιο ολοκληρωμένες μελέτες σχετικά με το χημικό φορτίο του είδους *C. nodosa*, καθώς η διαθέσιμη πληροφορία για το είδος αυτό υπήρξε σαφώς ελλιπής. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τις έστω και περιορισμένες αναφορές στη βιβλιογραφία έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία των μεταβολιτών που ανήκουν κυρίως στις κατηγορίες των οργανικών οξέων, ζαχάρων, πολυαμινών/αζωτούχων ενώσεων και πολυολών. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί στο παρελθόν από το είδος *C. nodosa* είναι το καφεϊκό οξύ, το κιχωρικό οξύ (οργανικά οξέα), η σουκρόζη (ζάχαρο), η ινοσιτόλη (πολυόλη), η πουτρεσκίνη, η σπερμιδίνη, η σπερμίνη (πολυαμίνες) καθώς και η μονογλυκοσίδη της ισοραμεντίνης και η μονογλυκοσίδη της κερκετίνης (άλλες ενώσεις) (Marianetal., 2000). Ενδιαφέρον ωστόσο είναι το γεγονός ότι τα επίπεδα συσσώρευσης των ανωτέρω μεταβολιτών υπήρξαν παρόμοια με τα αντίστοιχα σε χερσαία είδη. Επίσης, σε προηγούμενες έρευνες έχουν απομονωθεί μεταβολίτες που ανήκουν στην κατηγορία των στεροειδών και περιλαμβάνουν τα συστατικά σιτοστερόλη, χοληστερόλη και στιγμαστερόλη (Sicaetal., 1984). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σύμφωνα με τις προαναφερθέντες έρευνες και επιβεβαιώνουν την παρουσία των συστατικών: καφεϊκό οξύ, σουκρόζη, ινοσιτόλη και πουτρεσκίνη.

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμβάλουν σημαντικά στην απόκτηση γνώσης σχετικά με το χημικό φορτίο του θαλάσσιου αγγειόσπερμου *C. nodosa*, αφού αποτελεί την πρώτη αναφορά για την ανίχνευση δεκάδων νέων συστατικών που ανήκουν στις ομάδες των ζαχάρων, αμινοξέων, οργανικών οξέων, πολυολών, αζωτούχων ενώσεων, φωσφορικών αλάτων και άλλων ενώσεων. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της εργασίας καταδεικνύουν το σημαντικά

διαφοροποιημένο προφίλ των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τις περιοχές Βρασίδα, Γατζέα και Τρίκερι, τόσο σε επίπεδο φύλλων όσο και ριζών. Το γεγονός αυτό, εν μέρει τουλάχιστον, αποδίδεται στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και ειδικότερα στην επιβάρυνση που πιθανολογείται ότι χαρακτηρίζει την περιοχή Βρασίδα του Νομού Καβάλας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση:

1. Alberto F., Gouveia L., (et al.). (2005). Within-population spatial genetic structure, neighbourhood size and clonal subrange in the seagrass *Cymodoceanodosa*. *Molecular Ecology*, 14, 2669–2681.
2. Barro'n C., Marba N., (et al.). (2004). Community metabolism and carbon budget along a gradient of seagrass (*Cymodoceanodosa*) colonization. 1642-1651.
3. Calado G., Duarte P..(2000). Modelling growth of *Ruppiacirrhosa*. *Aquatic Botany*, 68,29-44.
4. Casagrande C., Boudouresque C. F.. (2007). Biomass of *Ruppiacirrhosa* and *Potamogetonpectinatus* in a Mediterranean brackish lagoon, Lake Ichkeul, Tunisia. *Fundamental and Applied Limnology*, 168/3, 243-255.
5. Caye, G., Meinesz, A.. (1986). Experimental study of seed germination in the
6. seagrass *Cymodoceanodosa*. *Aquatic Botany*, 79-87.
7. FungyiC., Zenilda L., (et al.). (2014). Metabolic profile of the brown macroalga *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales) under laboratory UV radiation and salinity conditions. *Journal of applied phycology*, 888-893.
8. Kopka J., Fernie A., (et al.). (2004). Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. *Genome Biology*, 109, 357-369.

9. Lillebo A. I., Flindt M. R., (et al.). (2006). The effect of *Zostera noltii*, *Spartina maritima* and *Scirpus maritimus* on sediment pore-water profiles in a temperate intertidal estuary. *Hydrobiologia*, 555, 175-183.

10. Mannino A. M., Sara G.. (2006). The effect of *Ruppia cirrhosa* features on macroalgae and suspended matter in a Mediterranean shallow system. *Marine Ecology*, 27, 350-360.

11. Matsuda, F., Hirai, M. Y., (et al.). (2010). AtMetExpress development: A phytochemical atlas of *Arabidopsis* development. *Plant Physiology*, vol. 172, no. 2, pp. 566-578.

12. Miernyk J. A., Preťová A. (et al.). (2011). Using proteomics to study sexual reproduction in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction*, 24, 9-22.

13. Olesen B., Enríquez S.. (2002). Depth-acclimation of photosynthesis, morphology and demography of *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* in the Spanish Mediterranean Sea. *Marine ecology progress series*, 236, 89-97.

14. Sandoval- Gil J. M., Ruiz J. M., (et al.). (2012). The effect of salinity increase on the photosynthesis, growth and survival of the Mediterranean seagrass *Cymodocea nodosa*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 263-271.

15. Sandoval- Gil J. M., Ruiz J. M., (et al.). (2012). Tolerance of Mediterranean seagrasses (*Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*) to hypersaline stress: water relations and osmolyte concentrations. *Marine Biology*, 159, 1129-1141.

16. Short F. T., Neckles H. A.. (1998). The effects of global climate change on seagrasses. *Aquatic Botany*, 63, 169-196.

17. Zimmerman R. C., Reguzzoni G. L., (et al.). (1991). Assessment of environmental suitability for growth of *Zostera marina* L. (eelgrass) in San

Francisco Bay. Aquatic Botany, 39, 353-366.

18. Zimmerman R. C., Reguzzoni J. L., (et al.). (1991). Assessment of environmental suitability for growth of *Zostera marina* L. (eelgrass) in San

19. Francisco Bay. Aquatic Botany, 39, 353-366.

Ελληνικές:

1. Καλαδή Μ. (2006). Απομόνωση και φαρμακολογική αξιολόγηση βιοδραστικών μεταβολιτών από θαλάσσια ροδοφύκη: Μελέτη ειδών από τα γένη

Laurencia, *Asparagopsis* και *Falkenbergia*. 60-70.

2. Κόντζα Ι. (2006). Απομόνωση και φαρμακολογική αξιολόγηση βιοδραστικών μεταβολιτών από θαλάσσια φανερόγαμα (*Cymodocea nodosa*), χλωροφύκη

(*Acetabularia acetabulum*) και μικροφύκη (*Odontella aurita*, *Galdieria sulphuraria*, *Chaetoceros spp.*). 103-121.

3. Μιχόπουλος Ν. (2002). Συμβολή στη Μελέτη Θαλάσσιων Πόρων (Δευλ.τερογενείς Μεταβολές από Βενθικούς Οργανισμούς). 35-42.

Ηλεκτρονική:

1. <http://www.iucnredlist.org/details/153534/0>

2. <http://pmchemistry.gr>

3. <http://www.bbc.co.uk>

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the environmental effect on the metabolic profile of the species *Cymodocea nodosa*, under conditions of growth in distinct geographically regions of Greece. Important changes in the level of metabolite accumulation relate to the response in various environmental stresses. In the present study, plant material of the species *Cymodocea nodosa* was collected from three different regions (Brassida, Gatzea and Trikeri), where different environmental conditions are prevailing. For each tissue type under study (leaves, roots, rhizomes), at least three individual samples were collected and assessed as different biological replications, in order to ensure experimental robustness. Immediately after collection, samples were placed in liquid nitrogen and subsequently kept, in deep freezer conditions (- 80 °C), until they were used for metabolomic analyses. Extraction of metabolites was performed at two

subsequent phases, including the polar and non-polar metabolite fraction, whereas quantification of compounds was performed using ribitol as an internal standard. Analyses were performed using Gas-chromatography coupled to Mass-spectrometry (GC-MS) measurements. Metabolites were identified using a plant metabolome

database, with the use of suitable software and libraries that include spectra and indicators of engagement for abundance of metabolites which are usually abundant in plant organisms. The analysis allowed the detection of roughly 200 metabolites in the leaves and the roots/rhizomes of the species *Cymodocea nodosa*. Such data were subsequently filtered in order to ensure high reproducibility among biological replications ($n \geq 3$) analyzed per each treatment. Following infiltration, the analysis yielded in total 111 highly repeatable metabolites which belong to different classes, including sugars, amino-acids, organic acids, polyols, nitrogenous compounds, phosphoric salts and other compounds.