



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



**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μοριακή φυλογένεση ειδών γαστεροπόδων και δίθυρων του νοτίου  
Ευβοϊκού κόλπου για εύρεση συσχετισμού της γενεαλογίας με αβιοτικά  
χαρακτηριστικά»**

**ΠΑΦΡΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

**Βόλος 2022**

**«Μοριακή φυλογένεση ειδών γαστεροπόδων και δίθυρων του νοτίου Ευβοϊκού κόλπου για εύρεση συσχετισμού της γενεαλογίας με αβιοτικά χαρακτηριστικά»**

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή:**

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

*Αφιερώνεται,*

*στην οικογένειά μου*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστώ τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής κ. Γκάφας Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητή του Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθειά του, τη διαρκή του καθοδήγηση και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου αποτελούμενη από τους Βαφείδης Δημήτριος, Καθηγητής Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος και τον Εξαδάχτυλος Αθανάσιος, Καθηγητής Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κύρια Ιωάννα Σαραντοπούλου για τη βοήθειά της στην υλοποίηση του εργαστηριακού μέρους του πειράματος. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστώ πολύ, τον Βαφίδη Δημήτριο για την βοήθεια του στην αναγνώριση των δειγμάτων.

Ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες θέλω να δώσω στην οικογένεια μου για την συνεχείς συμπαράσταση τους, για τις πολύτιμες συμβουλές τους και για όλα όσα μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια της ζωής μου αλλά και των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα έρευνα κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δέντρο από είδη θαλάσσιων γαστεροπόδων και δίθυρων που συναντώνται στην περιοχή του νοτίου Ευβοϊκού κόλπου, χρησιμοποιώντας ως μοριακό δείκτη το μιτοχονδριακό γονίδιο 16S. Αναμφίβολα, οι αβιοτικοί παράγοντες, όπως, το φως, το οξυγόνο, το pH, η θερμοκρασία και άλλοι, επηρεάζουν την επιβίωση, την κατανομή και την αφθονία των βενθικών ειδών σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Χρησιμοποιήθηκε για τα δίθυρα το είδος Σαμάρι, *Solecurtus strigilatus* για την εξαγωγή του DNA κατά το πειραματικό μέρος, ενώ για τη δημιουργία του δέντρου προστέθηκαν επιπλέον και αλληλουχίες των ειδών *Ensis siliqua*, *Callista chione*, *Pinctada radiata*, *Spondylus gaederopus*, *Arca noae*, *Venus verrucosa*, *Acanthocardia tuberculata*, *Solecurtus strigilatus*, *Lithophaga lithophaga*, *Pinna nobilis*, *Mytilus edulis*, *Flexopecten sp.*, *Pecten jacobaeus* και *Venerupis aurea*. Για τη δημιουργία του δέντρου των θαλάσσιων γαστεροπόδων χρησιμοποιήθηκαν *Thais haemastoma*, *Bulla arabica*, *Bolinus bandaris*, *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus*, *Galeodea echinophora*, *Monodonta articulata*, *Luria lurida*, και *Tonna galea*. Σκοπός της εργασίας ήταν να ελεγχθεί μέσω της γενεαλογίας των ειδών εάν οι οικογένειες της περιοχής ενδιαφέροντος ακολουθούν το ίδιο μοτίβο ομαδοποίησης όσον αφορά τα αβιοτικά χαρακτηριστικά: περιβάλλον διαβίωσης και μορφολογία. Τα αποτελέσματα αρχικά έδειξαν ότι οι οικογένειες Solecurtidae, Veneridae, Zonitidae, Solenidae, Cardiidae και Mactridae ομαδοποιούνται με βάση τους αβιοτικούς παράγοντες, ωστόσο κατά την τελική ομαδοποίηση όπου λήφθηκε υπόψιν και η γενεαλογία συγκροτήθηκαν επτά διαφορετικές ομάδες. Κατά την ομαδοποίηση των γαστεροπόδων όπου λήφθηκε υπόψιν και η γενεαλογία συγκροτήθηκαν τέσσερις διαφορετικές ομάδες που αποτελούνταν από

τις οικογένειες Bullida και Muricidae η πρώτη Cassidae, Naticidae και Trochidae η δεύτερη, Tonnididae η τρίτη και Cypraeidae την τέταρτη διαφορετική ομάδα.

**Λέξεις κλειδιά:** φυλογενετική ανάλυση, γαστερόποδα, δίθυρα, αβιοτικοί παράγοντες, ομαδοποίηση οικογενειών, νότιος Ευβοϊκός κόλπος

## Περιεχόμενα

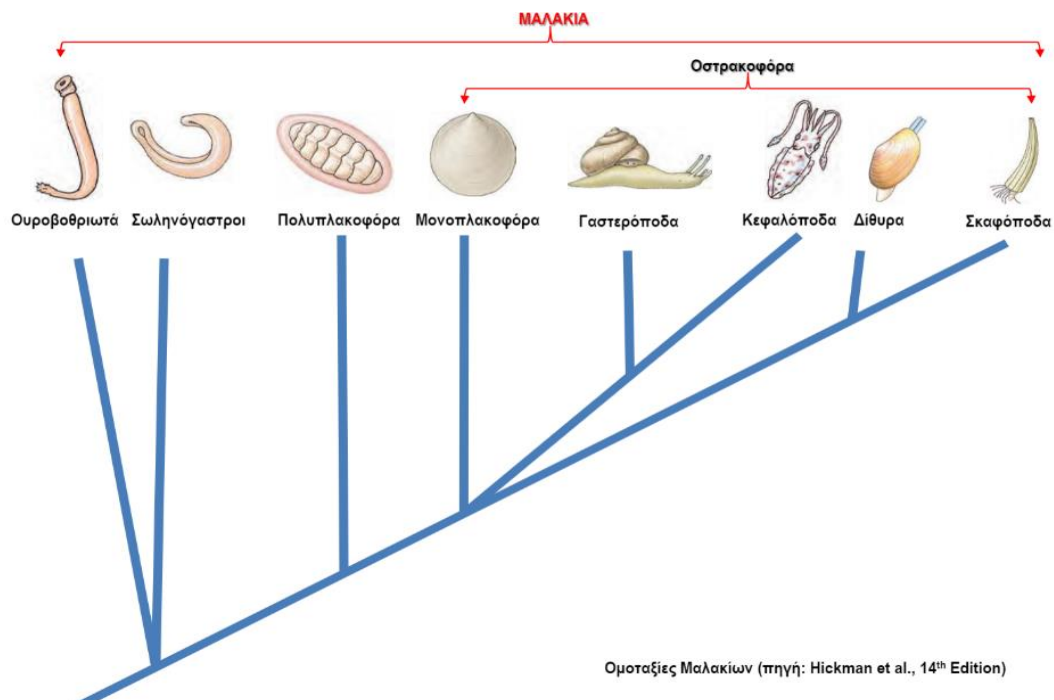
|   |        |
|---|--------|
| 1. Εισαγωγή.....  | - 1 -  |
| 1.1 Αναφορά στην τεράστια ποικιλομορφία των Μαλάκιων .....  | - 1 -  |
| 1.2 Αναφορά στην τεράστια ποικιλομορφία των Γαστεροπόδων .....  | - 2 -  |
| 1.3 Αναφορά στην τεράστια ποικιλομορφία των Δίθυρων.....  | - 3 -  |
| 1.4 Η ποικιλομορφία και η γεωγραφική κατανομή σε συνδυασμό με τα αβιοτικά χαρακτηριστικά σχετίζονται με εξελικτικά χαρακτηριστικά. .... | - 5 -  |
| 1.5 Σύγκριση αβιοτικών παραγόντων βάση μοριακών δεικτών και φυλογένεσης .....   | - 9 -  |
| 1.6 Ανατολική Μεσόγειο διάφορες μελέτες στα Μαλάκια .....   | - 13 - |
| 1.7 Φυλογενετική ανάλυση και η μοριακοί δείκτες.....  | - 14 - |
| 1.8 Υπόθεση Εργασίας.....   | - 16 - |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....  | - 17 - |
| 2.1 Περιοχή Μελέτης.....  | - 17 - |
| 2.2 Εξαγωγή DNA.....  | - 19 - |
| 2.3 Ποσοτικοποίηση DNA .....  | - 20 - |
| 2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....  | - 21 - |
| 2.6 Gel ηλεκτροφόρηση .....   | - 24 - |
| 2.7 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA sequencing).....  | - 24 - |
| 2.8 Στατιστική ανάλυση .....  | - 25 - |
| 3. Αποτελέσματα .....   | - 25 - |
| 3.1. Προϊόντα PCR .....   | - 25 - |
| 3.2. Bayesian Analysis .....  | - 26 - |
| 4. Συζήτηση – Συμπεράσματα .....  | - 33 - |
| 5. Παράρτημα.....   | - 40 - |
| Παρουσίαση των δίθυρων.....   | - 40 - |
| Αλληλουχία 16S .....  | - 51 - |
| ABSTRACT .....  | - 59 - |



## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Αναφορά στην τεράστια ποικιλομορφία των Μαλάκιων

Ένα από τα μεγαλύτερα Φύλα, σε αριθμό ειδών, των Ασπόνδυλων αποτελούν τα Μαλάκια. Τα γαστερόποδα περιλαμβάνουν 80% των ζωντανών ειδών μαλακίων. Πρόκειται για μία πολύ διαφοροποιημένη ομάδα, δεύτερη σε αριθμό ειδών μετά τα Αρθρόποδα (Κούκδα, 2003). Στο φύλο των Μαλάκιων ανήκουν μερικά από τα πιο σημαντικά ασπόνδυλα ζώα, όπως μύδια, στρείδια, σουπιές, χταπόδια και σαλιγκάρια. Περίπου 85.000 - 100.000 είδη μαλακίων έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα (Strong et al., 2008).



Εικόνα 1: Ομοταξίες Μαλακίων (πηγή: Hickman et al., 14 Edition)

Το κύριο χαρακτηριστικό των Μαλακίων είναι το μαλακό τους σώμα, από το οποίο προέρχεται και η ονομασία τους. Ο τρόπος διαβίωσής τους ποικίλει και μπορούν να εντοπιστούν σε μεγάλο εύρος ενδιαιτημάτων, όπως για παράδειγμα, σε τροπικές περιοχές έως και πολικές, ή σε μεγάλα υψόμετρα έως και στα βάθη του ωκεανού. Βέβαια, το μεγαλύτερο ποσοστό των ειδών εντοπίζεται στις θάλασσες (Τσουγγλού, 2015).

Τα Μαλάκια με βάση τον τύπο του οστράκου και του ποδιού χωρίζονται σε επτά ομοταξίες: τα Γαστερόποδα (Gastropoda), τα Ουροβοθριωτά, τα Δίθυρα (Bivalvia), τα Σκαφόποδα (Scaphopoda), τα Κεφαλόποδα (Cephalopoda), τους Σωληνόγαστρους (Neomeniomorpha), (Chaetodermomorpha) και τα Πολυπλακοφόρα (Polyplacophora) (Τσουγγλού, 2015).

## **1.2 Αναφορά στην τεράστια ποικιλομορφία των Γαστεροπόδων**

Τα γαστερόποδα είναι η μεγαλύτερη ομάδα του φύλου «Μαλάκια», στην οποία ανήκουν τα σαλιγκάρια, τα κοχύλια, οι πεταλίδες, γυμνοβράγχια και κάποια πολύ εξελιγμένα σαλιγκάρια που ζουν και αναπνέουν στην ξηρά(Τσουγγλού, 2015).

Τα Γαστερόποδα ζουν στη θάλασσα, στα γλυκά νερά, στη ξηρά και εξαπλώνονται γεωγραφικά από τις τροπικές μέχρι τις υποπολικές περιοχές και στις ερήμους. Εντοπίζεται σε 5.500 μέτρα ύψος μέχρι τα 7500 μέτρα βάθος στη θάλασσα. Στην πλειονότητα τους είναι φυτοφάγα, υπάρχουν και είδη σαρκοφάγα, ενώ μερικά είναι παράσιτα. Πολλά είδη Γαστεροπόδων του γλυκού νερού όπως και της χέρσου, αποτελούν το κύριο ενδιάμεσο ξενιστή για πολλά παράσιτα. Πολλά είδη είναι εδώδιμα, με μεγάλη οικονομική σημασία, ενώ άλλων τα κελύφη έχουν συλλεκτική αξία (Λαζαρίδου-Δημητριάδου, 1992).

Η κλάση των Γαστεροπόδων χωρίζεται σε πέντε υποκλάσεις:

α. Προσωβράγχια (Τάξεις: Archaeogastropoda, Mesogastropoda, Neogastropoda)

β. Ετεροβράγχια

γ.Οπισθοβράγχια (Τάξεις: Entomotaeniata, Cephalospidea, Thecosomata, Xacoglossa, Aplysioida, Notaspidae)

δ. Γυμνόμορφα

ε. Πνευμονοφόρα (Λαζαρίδου-Δημητριάδου, 1992).



Γυμνοβράγχιο (*Antiopeella cristata*)



Γυμνοβράγχιο (*Paraflabellina ischitana*)



Θαλασσιά σαλιγκάρια (*Tonna galea*)



*Naticarius stercusmuscarum*

Τα Γαστερόποδα αποτελούν μια από τις σημαντικότερες ταξινομικές ομάδες της θαλάσσιας πανίδας της Μεσογείου, έχουν καταγραφεί περισσότερα από 1300 είδη θαλασσιών γαστεροπόδων αποτελώντας το 10% του συνολικού αριθμού των θαλασσιών οργανισμών της (Κουτσούμπας, 2004).

### 1.3 Αναφορά στην τεράστια ποικιλομορφία των Δίθυρων

Περισσότερα από 20.000 είδη δίθυρων έχουν καταγραφή μέχρι σήμερα (Γαληνού, Μητσουδη 2007) παγκοσμίως στη θάλασσα, στα γλυκά και στα υφάλμυρα νερά, στην οποία ανήκουν τα πιο γνωστά όστρακα όπως τα μύδια, τα κυδωνιά τα στρείδια, οι πίννες, τα χτένια κ.ά. (Βαρδαλά-Θεοδώρου, 2007). Η Ελλάδα, με διάφορους τύπους βυθού (βραχώδεις και αμμώδεις) και με ακτογραμμή μήκους 17.000 χιλιομέτρα, εντοπίζονται περισσότερα από 300 καταγεγραμμένα είδη δίθυρων, τα οποία κατατάσσονται σε 65 οικογένειες (Zenetos et al., 2005).

Τα δίθυρα είναι ασπόνδυλοι (χωρίς σκελετό και αρθρώσεις) βενθικοί οργανισμοί, ζουν σε όλους τους τύπους υποστρώματος και σε μεγάλο εύρος θερμοκρασίας και αλατότητας. Αποτελούνται από δύο όστρακα, τις θυρίδες, που καλύπτουν και προστατεύουν το σώμα. Η κίνηση ή η βύθιση του οστράκου γίνεται με το πόδι. Το σώμα αφήνει αποτυπώματα στα σημεία ή περιοχές επαφής του με τις θυρίδες τα οποία αποτελούν σημαντικά γνωρίσματα αναγνώρισης και ταξινόμησης. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 1 χιλιοστό μέχρι 1,20 μέτρα του μέτρου το γιγαντιαίο *Tridacna gigas* του Νοτίου Ειρηνικού που μπορεί φτάσει και 300 κιλά. Γενικά, τα Δίθυρα είναι εδώδιμα αν και υπάρχει κίνδυνος δηλητηρίασης(Πογιαρίδου, 1997).



Πίννα, (*Pinna Nobilis*)



Χτένι, (*Pecten jacobaeus*)

Το σχήμα όμως και γενική μορφολογία του κελύφους απεικονίζει από ευθείας τον τρόπο ζωής των Διθύρων και μάλιστα γνώσεις μας για τον τρόπο που τα σύγχρονα δίθυρα έχουν προσαρμοστεί στους ιδιαίτερους τρόπους διαβίωσης μας επιτρέπει να κάνουμε σημαντικούς συσχετισμούς και υποθέσεις για το που υπήρχαν τα Δίθυρα που έχουν εξαφανιστεί. Ανάλογα που ζούσαν τα σημερινά Δίθυρα διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

- Σκαπτικά Δίθυρα
- Δίθυρα με Βύσσο
- Προσκολλημένα-Ελεύθερα Δίθυρα

- Νεκτονικά Δίθυρα
- Διατρητικά Δίθυρα

Τα Δίθυρα χωρίζονται σε πέντε βασικές ομάδες, με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους (NCBI taxonomy, 2014):

1. Heteroconchia: Ισομερείς προσαγωγοί μυς οδοντοφόρου, μερικώς καμπυλωτό ξύστρο.
2. Palaeoheterodonta: Όχι πλήρως οριοθετημένα όρια του μανδύα, εξωτερικός σύνδεσμος πίσω από το περιόστρακο, ξύστρο σαν ανάποδο 'V'
3. Anomalodesmata: Συνήθως έλλειψη ή ατελώς ανεπτυγμένο ξύστρο
4. Pteriomorpha: Έλλειψη πραγματικού ξύστρου, ύπαρξη όμως οδοντοφόρου μυ.
5. Protobranchia: Ειδικά διαμορφωμένα κτενίδια (βράγχια) για διήθηση και πρόσληψη τροφής.

Ωστόσο, νεότερες μελέτες αναγνωρίζουν 6 κύριες ομάδες (Bieler et al., 2014; Gonzalez et al., 2015).

#### **1.4 Η ποικιλομορφία και η γεωγραφική κατανομή σε συνδυασμό με τα αβιοτικά χαρακτηριστικά σχετίζονται με εξελικτικά χαρακτηριστικά.**

Η θερμοκρασία, η αλατότητα, το διαλυμένο οξυγόνο και ο τύπος του υποστρώματος είναι οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή των Γαστεροπόδων (Solsona et al., 2000). Στο Αιγαίο έχουν καταγραφεί περισσότερα 486 είδη Γαστεροπόδων, εκ των οποίων τα 32 είδη (4 οικογένειες) ανήκουν στα Heterobranchia με ποσοστό 7%, 59 είδη (29 οικογένειες) ανήκουν στα Opisthbranchia με ποσοστό 12%, και τα 392 είδη (62 οικογένειες) ανήκουν στα Prosobranchia με ποσοστό 81%.

Κατανομή των ειδών των δίθυρων εξαρτάται από πολλούς φυσικοχημικούς παράγοντες. Κυριότεροι από αυτούς είναι θερμοκρασία, που εξαρτάται από την εποχή, αλατότητα, το βάθος, το υπόστρωμα και φωτοπερίοδος. Από τα 297 είδη δίθυρων που βρέθηκαν στις ελληνικές θάλασσες τα 18 (6 οικογένειες) ανήκουν στα Protobranchia με ποσοστό 6%, τα 77 (12 οικογένειες) στα Pteromorphia με ποσοστό 26%, τα 174 (36 οικογένειες) στα Heterodonta με ποσοστό 59% και τέλος τα υπόλοιπα 28 (8 οικογένειες) ανήκουν στα Anomalodesmata με ποσοστό 9% (Μάλλιας, 2009). Η απότομη και μεγάλη πτώση της θερμοκρασίας επηρεάζει ιδιαίτερα τα θαλάσσια δίθυρα που βρίσκονται στα στάσιμα νερά και ρυάκια. Σε ερευνά που διεξήχθη στις Γαλλικές ακτές, κατά τη διάρκεια του χειμώνα 1962-63, πολυάριθμα μαλάκια πέθαναν στην παραλιακή ζώνη επειδή το υπόστρωμα είχε παγώσει. Η συμπεριφορά τους ποικίλλει ανάλογα με την αλατότητα. Άλλα αντέχουν σε μεγαλύτερες μεταβολές και άλλα πεθαίνουν με μικρές μεταβολές της αλατότητας (Μάλλιας, 2009).

Πληθώρα ερευνών εστιάζει κυρίως σε μορφολογικές διαφορές μεταξύ των ειδών, όπως εκείνη του Bagur et al.(2013), το δίθυρο *Lithophaga patagonica* είναι ένας τοπικά άφθονος κάτοικος σκληρών υποστρωμάτων στα παράκτια ύδατα του Νοτιοδυτικού Ατλαντικού. Σύμφωνα με μια έρευνα που έγινε στην Αργεντινή μελετήθηκε η ηλικία, η ανάπτυξη και η θνησιμότητα σε τέσσερις πληθυσμούς της *Lithophaga patagonica*. Η διάρκεια ζωής σε αυτό το είδος ποικίλλει μεταξύ των πληθυσμών από 6,5 έως 15 χρόνια. Επίσης, οι πληθυσμοί διέφεραν ως προς τις παραμέτρους ανάπτυξης και τη θνησιμότητα. Οι παραλλαγές ανάπτυξης σχετίζονται με διαφορές στον τύπο και τη σκληρότητα του υποστρώματος. Τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν υψηλότερα στους δύο νοτιότερους πληθυσμούς. Βρέθηκαν υψηλές αποκλίσεις στην ανάπτυξη του κελύφους σε κάθε εποχή, αλλά όχι το χειμώνα. Η σύνθεση και η σκληρότητα του υποστρώματος είναι πιθανώς οι

κύριοι παράγοντες που ελέγχουν τις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των πληθυσμών (Bagur et al., 2013).

Σύμφωνα με μια έρευνα μελετήθηκε η ηλικία και η ανάπτυξη της γυαλιστερής από τη νοτιοδυτική ακτή της Πορτογαλίας και υπολογίστηκαν κατά τη διάρκεια μιας περιόδου (ενός χρόνου), χρησιμοποιώντας τόσο τους επιφανειακούς δακτυλίους ανάπτυξης και εσωτερικές γραμμές. Πολλές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ηλικίας και της ανάπτυξης των δίθυρων. Η γρήγορη αύξηση του κελύφους συνέβη την άνοιξη και το καλοκαίρι, ενώ η αργή ανάπτυξη συνέβη κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου και του χειμώνα. Αυτές οι παράμετροι έδειξαν ότι το *Callista spp.* έχουν υψηλότερη απόδοση από άλλα δίθυρα και αυτό σχετίζεται με το γεωγραφικό πλάτος.

Επιπλέον με την μελέτη που έγινε κατά μήκος της ακτογραμμής της Βόρειας και Ανατολικής Τυνησίας για τον πληθυσμό της Πίννας που ασχολείται με τον μορφομετρικό χαρακτήρα και το βάρος. Είναι το μεγαλύτερο μεσογειακό δίθυρο και ένα από τα μεγαλύτερα στον κόσμο, αφού μπορεί να φτάσει περισσότερο από ένα μέτρο συνολικού μήκος (Zavodnik et al., 1991). Οι αναλύσεις έδειξαν διαχωρισμό μεταξύ λιμνοθάλασσας και θαλάσσιων πληθυσμών. Όσον αφορά τους δείκτες βάρους, η στατιστική τους ανάλυση δεν έδειξε διακρίσεις μεταξύ του πληθυσμού είτε σε σχέση με τον γεωγραφικό εντοπισμό είτε σε σχέση με τον μεσαίο τύπο. Συνοψίζοντας, η μορφολογία και η βιομάζα της Πίννας φαίνεται να είναι σε στενή σχέση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. (Lotfi et al., 2012).

Η μελέτη των Derbali et al., (2012) αποσκοπούσε στη διερεύνηση της διανομής, της αφθονίας και της βιολογίας του *C. Glaucum* κατά μήκος της ακτής στην Τυνησία. Τα δείγματα συλλέχθηκαν, επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν, τα δεδομένα όσον αφορά τη

γεωγραφική κατοχή. Η κατανομή του είδους έχει επίσης διερευνηθεί υπόψη με το μέγεθος που ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με την τοποθεσία, ενώ το μήκος κελύφους κυμαινόταν μεταξύ 5 και 37 mm. Τα δείγματα παρουσίασαν μια ισορροπημένη αναλογία φύλου, με αρσενικά που κυριαρχούν μεταξύ των μικρότερων ατόμων και των θηλυκών που κυριαρχούν σε μεγαλύτερες κατηγορίες μεγέθους σε αντίθεση με τα προηγούμενα ευρήματα αυτού του είδους. Τα αποτελέσματα της τρέχουσας μελέτης υποδηλώνουν ότι το *C. Glaucum* πολλαπλασιάζεται στα νότια ύδατα της Τυνησίας (Derbali et al., 2012).

Το ευρωπαϊκό στρείδι είναι ένα εμπορικό θαλάσσιο δίθυρο που διανέμεται στον Ατλαντικό, στην Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα (Beck, 2007). Οι πειραματικές συνθήκες που διερευνήθηκαν προκάλεσαν σημαντικές διαφορές τόσο στις αλλαγές μεγέθους όσο και στις παραμέτρους ανάπτυξης. Στην πραγματικότητα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πυκνότητα αναπαραγωγής είναι ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει το μέγεθος και την απόδοση ανάπτυξης στα εκτρεφόμενα στρείδια. Παρατηρήθηκε μια εποχιακή ταλάντωση στην ανάπτυξη και τον ρυθμό ανάπτυξης των στρειδιών να αυξάνεται κατά την άνοιξη-καλοκαίρι.

Η αναπαραγωγή των γαστερόποδων εξαρτάται από τον παλιρροιακό κύκλο. Η αναπαραγωγική προσαρμογή που σχετίζεται με την θέση των οργανισμών στην μεσοπαλιρροιακή ζώνη, είναι ότι, για να διασφαλιστεί η γονιμοποίηση, οι αναπαραγωγικοί κύκλοι των οργανισμών της ζώνης αυτής είναι συγχρονισμένοι με την ύπαρξη των παλιρροιών, όπως με της παλίρροιες συζυγιών. Άρα, η αναπαραγωγή των γαστερόποδων εξαρτάται από τον παλιρροιακό κύκλο και επιτυγχάνεται κατά την διάρκεια της πλημμυρίδας, η οποία σχετίζεται με τον σεληνιακό κύκλο (Nybakken J. W, 2005).



Τα περισσότερα είδη γαστεροπόδων είναι Ατλαντο-Μεσογειακά (192), ακολουθούν τα ενδημικά της Μεσογείου (128) και τέλος τα Βόρεια (53). Τέσσερα ενδημικά της Μεσογείου βρίσκονται τυπικά στο Αιγαίο δεν έχουν καταγραφεί ακόμα σε άλλες μεσογειακές περιοχές (Koutsoubas et al., 1997).

### **1.5 Σύγκριση αβιοτικών παραγόντων βάση μοριακών δεικτών και φυλογένεσης**

Τα Γαστερόποδα έχουν μια εξελικτική ιστορία περίπου 500 εκατομμυρίων χρόνων, από την οποία πολύ λίγα είναι γνωστά. Ο περιορισμένος αριθμός χαρακτήρων των σκληρών τμημάτων δεν επιτρέπει μια σαφή δημιουργία φυλογενετικών σχέσεων. Τα εξαφανισμένα είδη είναι περισσότερα από αυτά που είναι σε ζωή. Κάποια από τα εξαφανισμένα είδη ανήκαν σε οικογένεια με άγνωστη ανατομία. Μια άλλη δυσκολία είναι η ανάπτυξη παρόμοιου τύπου κοχυλιών σε ανεξάρτητες ομάδες (ομοπλαστική ομοιότητα) που έχει τεκμηριωθεί σε πολλά αρτίγονα γαστερόποδα (Fryda, 2005).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα ποσοστά μετάλλαξης του μιτοχονδριακού DNA συνδέονται με τη διάρκεια ζωής σε είδη σπονδυλωτών, αλλά καμία μελέτη δεν έχει διερευνήσει αυτό σε ασπόνδυλα. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποίησαν ένα μοντέλο ανάλυσης εξέλιξης με φυλογενετική συνδιακύμανση Bayesian χρησιμοποιώντας 12 μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες 76 δίθυρων ειδών. Για να λύσουν αυτό το πρόβλημα, αποφάσισαν να εξετάσουν εξονυχιστικά τα μοτίβα των υποκαταστάσεων του mtDNA σε ασπόνδυλα. Τα δίθυρα έχουν υποστηριχθεί ως εξαιρετικά μοντέλα για τη μελέτη της μακροζωίας (Blier et al., 2017). Πραγματοποίησαν μια πρώτη προκαταρκτική ανάλυση εξελικτικών σημάτων στο μιτοχονδριακό DNA που συνδέονται δυναμικά με χαρακτηριστικά του ιστορικού της ζωής σε δίθυρα. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν τη γνωστή ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της μακροζωίας και του χρόνου παραγωγής (Ljubuncic and Reznick,

2009) και αποδεικνύουν σαφώς μια αρνητική σχέση μεταξύ των ρυθμών υποκατάστασης και της μακροζωίας σε μια ομάδα ασπόνδυλων που επεκτείνουν αυτή τη συσχέτιση που τεκμηριώθηκε προηγουμένως για τα σπονδυλωτά (Lartillot, 2013 ). Αυτή η συσχέτιση δεν διαμεσολαβείτε ούτε από τη θερμοκρασία ούτε από την ηλικία κατά την ωριμότητα.

Οι οικογένεια Veneridae, μια κοσμοπολίτικη και πανταχού παρούσα οικογένεια σε παραθαλάσσια περιβάλλοντα παγκοσμίως, απαριθμούν περισσότερα από 500 είδη. Ιστορικά, η οικογένεια έχει χωριστεί σε 12 υποοικογένειες από τον M. Keen και, παρόλο που αυτή η ταξινομική διάταξη υιοθετήθηκε για λόγους ευκολίας και δεν αντικατοπτρίζει απαραίτητα γενετικές σχέσεις, όπως προτείνει η ίδια η Keen, αυτή η ταξινόμηση εξακολουθεί να είναι αποδεκτή. Παρά τον αποικισμό όλων των τύπων μαλακών βυθών, από τις παράκτιες έως τις βαθιές περιοχές, τα αφροδίσια γενικά παρουσιάζουν λίγες μορφολογικές διαφορές που σχετίζονται με την ανατομία των μαλακών ιστών. Αυτό καθιστά δύσκολο τον εντοπισμό περιπτώσεων μορφολογικού παραλληλισμού μεταξύ των εξελικτικά απομακρυσμένων ειδών και διαφοροποίησης του κελύφους μεταξύ των στενά συγγενών ειδών. Η μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων περιπλέκεται περαιτέρω από τον μεγάλο αριθμό πολυμορφισμών του κελύφους που παρατηρούνται σε πληθυσμούς του ίδιου είδους (Holme 1961 ).

Η μελέτη των Bieler et al., 2014 αποτελεί την πιο πρόσφατη μελέτη που ενσωματώνει ένα πλήθος μορφολογικά δεδομένα μαζί με μοριακά. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 103 δίθυρα είδη ως προς τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά ενώ επίσης έγιναν μοριακές φυλογενέσεις και για 5 γονίδια δείκτες. Για ένα μέρος από τα 103 δίθυρα ενσωματώθηκαν μοριακά δεδομένα από μια άλλη μελέτη που χρησιμοποίησε 4 άλλα γονίδια δείκτες και έτσι για αυτό το υποσύνολο ειδών οι μοριακές φυλογενέσεις βασίστηκαν σε 9 γονίδια δείκτες. Οι μελέτες τους κατέληξαν στο να προτείνουν 6 μονοφυλετικές ομάδες στα

δίθυρα, τα Protobranchia, Pteriomorphia, Palaeoheterodonta, Archiheterodonta, Anomalodesmata και Imparidentia.

Οι φυλογενετικές μελέτες που περιλαμβάνουν το γένος *Panopea* είναι σπάνιες (Taylor et al. 2007). Μια πρόσφατη φυλογενετική μελέτη τριών ειδών *Panopea* αποκάλυψε γενετική και μορφολογική παραλλαγή μεταξύ *Panopea globosa* από τον Κόλπο της Καλιφόρνια και *Panopea generosa* από την ακτή του Ειρηνικού της Baja Καλιφόρνια (Rocha-Olivares et al. 2010). Οι συγγραφείς αυτών των μελετών κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αυτά τα είδη δεν μοιράζονται έναν πρόσφατο πρόγονο και πρότειναν διασπορά ή αντικατάσταση στον Ειρηνικό, ακολουθούμενη από επακόλουθη αναπαραγωγική απομόνωση μεταξύ *Panopea japonica* και *P. generosa* γενεαλογίες ως πιθανούς μηχανισμούς ειδογένεσης. (Rocha-Olivares et al. 2010)

Σε μελέτη Waller, (2006), έχουν καθοριστεί η αλληλουχία μερικών μιτοχονδριακών γονιδίων COI και 16S rRNA από 63 δείγματα 8 ειδών Pectinidae για να αξιολογήσουμε εάν οι γραμμικοί κώδικες DNA μπορούν να διακρίνουν αποτελεσματικά αυτά τα είδη. Αλληλουχίες από ομόλογες περιοχές τεσσάρων άλλων ειδών αυτής της οικογένειας συλλέχθηκαν από την GenBank. Οι συγκρίσεις των επιπέδων απόκλισης αλληλουχιών εντός και μεταξύ των ειδών έδειξαν ότι η γενετική διακύμανση μεταξύ των ειδών υπερβαίνει τη διακύμανση εντός των ειδών. Όταν χρησιμοποιήθηκε ομαδοποίηση γειτονικής ένωσης με βάση τα γονίδια COI και 16S, όλα τα είδη έπεσαν σε αμοιβαία μονοφυλετικά κλάδια με υψηλές τιμές εκκίνησης. Αυτά απέδειξαν ότι αυτά τα είδη χτενιών μπορούν να αναγνωριστούν αποτελεσματικά με γραμμωτό κώδικα DNA. Οι εξελικτικές σχέσεις των Pectinidae εξετάστηκαν επίσης χρησιμοποιώντας τα δύο μιτοχονδριακά γονίδια. Τα αποτελέσματα είναι σχεδόν συνεπή με την ταξινόμηση του

Waller, η οποία προτάθηκε με βάση τη μικροδομή του κελύφους και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά.

Η ταξινόμηση των Γαστερόποδων αναθεωρήθηκε το 2005 από τους Philippe Bouchet και Jean-Pierre Rocroi και είναι ένα σύστημα για την επιστημονική ταξινόμηση των γαστερόποδων μαλακίων. Το Bouchet και το Rocroi χρησιμοποιούν έξι βασικούς κλάδους: Patellogastropoda, Vetigastropoda, Cocculiniformia, Neritimorpha, Caenogastropoda και Heterobranchia. Στο παρελθόν, η ταξινόμηση των γαστερόποδων βασιζόταν σε μεγάλο βαθμό στους μορφολογικούς χαρακτήρες των κατηγοριών, όπως τα χαρακτηριστικά του κελύφους σε είδη με κέλυφος και η εσωτερική ανατομία, συμπεριλαμβανομένης της δομής του radula και των λεπτομερειών του αναπαραγωγικού συστήματος. Οι πρόσφατες εξελίξεις βασίζονται περισσότερο στα μοριακά χαρακτηριστικά του DNA και του RNA. Αυτή η αλλαγή έμφασης σημαίνει ότι τα νεότερα taxa και η ιεραρχία τους υπόκεινται σε συζήτηση, που δύσκολα θα επιλυθεί σύντομα.

Τα Neogastropoda είναι μια πολύ διαφοροποιημένη ομάδα αρπακτικών θαλάσσιων σαλιγκαριών Caenogastropoda. Παραδοσιακά, η μονοφυλία του έχει γίνει ευρέως αποδεκτή με βάση αρκετές μορφολογικές μελέτες που σχετίζονται κυρίως με το πεπτικό σύστημα. Ωστόσο, πρόσφατες μοριακές φυλογενετικές μελέτες αμφισβήτησαν τη μονοφυλία των Neogastropoda λόγω της συμπερίληψης εκπροσώπων άλλων γενεαλογικών γενεαλογιών καινογαστερόποδων (π.χ. Littorinimorpha) στην ομάδα. Το Neogastropoda έχει ταξινομηθεί σε έως και έξι υπεροικογένειες συμπεριλαμβανομένων των Buccinoidea, Muricoidea, Olivioidea, Pseudolivioidea, Conoidea και Cancellarioidea. Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των υπεροικογενειών νεογαστερόποδων παραμένουν άλυτες (Cunha et al., 2009).

Οι οικογένεια Bullidae είναι μια μονοτυπική παγκόσμια οικογένεια που φέρουν κέλυφος και αποτελείται κυρίως από τροπικά είδη, με λίγους αντιπροσώπους να εμφανίζονται σε εύκρατα γεωγραφικά πλάτη. Ζουν σε παλίρροια και ρηγά νερά πάνω σε μαλακά ιζήματα και ανάμεσα σε θαλάσσια χόρτα. Η διατροφή της ομάδας είναι αμφιλεγόμενη. Τα Bullid έχουν θεωρηθεί ότι είναι τα μόνα παμφάγα μέλη της Cephalaspidea (Wägele, 2004).

### **1.6 Ανατολική Μεσόγειο διάφορες μελέτες στα Μαλάκια**

Η μελέτη της ζωογεωγραφίας φανέρωσε ότι τα περισσότερα είδη είναι ατλαντομεσογειακής προέλευσης, ενώ καταγράφηκαν και αλλόχθονα είδη. Τα αλλόχθονα είδη εισήχθησαν στο Αιγαίο ως εκτρεφόμενοι οργανισμοί (υδατοκαλλιέργειες) ή τυχαία (ναυσιπλοΐα) καθώς επίσης μέσω της διώρυγας του Σουέζ, λόγω των κλιματικών αλλαγών (Αλεξόπουλος, 2013)

Μελετήθηκε η πανίδα των Δίθυρων Μαλακίων στην υπό και περιαιγιαλίτιδα του Πατραϊκού κόλπου. Η ποικιλία των δίθυρων του Πατραϊκού κόλπου έφερε στην επιφάνεια 32 είδη, νέα για την ελληνική πανίδα, από τα οποία 17 αποτελούν πρώτες αναφορές για ολόκληρη την ανατολική Μεσόγειο. Τα σήμερα γνωστά είδη Δίθυρων στον Ελληνικό θαλάσσιο χώρο ανέρχονται σε 152, 28 από τα είδη της υποαιγιαλίτιδας και 4 από αυτά της περιαιγιαλίτιδας αναφέρονται για πρώτη φορά στην ελληνική πανίδα. Μικρό ποσοστό αποτελούν τα κοσμοπολίτικα είδη, ενώ το υπόλοιπο είναι ενδημικά της Μεσογείου. Από αυτά αποκλειστικά ενδημικά παραμένουν τα : *Nucula fenuis*, *aegeensis*, *Donax semistraitis*, *Cultellus adriaticus*, *Clousinella brogniarti*, *Venerupis lucens* και *Neo lepton obliquatum*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το είδος *Cultellus adriaticus*, γνωστό μέχρι σήμερα μόνο από την Αδριατική και το δυτικό Ιόνιο. Το είδος ήταν κοινό στην υποαιγιαλίτιδα του Πατραϊκού αλλά έχει εντοπιστεί και σε άλλες περιοχές της Ελλάδος. Σε πολλά από τα Δίθυρα παρατηρείται μέγεθος κατά πολύ μικρότερο του

κανονικού. Ίσως να πρόκειται για το φαινόμενο του ‘ανατολικού Νανισμού’ που δικαιολογείται από τις υψηλές θερμοκρασίες της περιοχής, σε συνδυασμό με τη χαμηλή συγκέντρωση θρεπτικών αλάτων.

Η μελέτη του Kastala et al. εξετάζει τη γενετική δομή του πληθυσμού του απειλούμενου δίθυρου *Pinna nobilis*, με βάση νέες αλληλουχίες mtDNA (COI και 16S rDNA mtDNA). Αυτές οι αλληλουχίες του *P. nobilis* ήταν οι πρώτες αλληλουχίες DNA του είδους που υποβλήθηκαν σε οποιαδήποτε Βάση Γενετικών Δεδομένων. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πληθυσμού από τέσσερις γεωγραφικές περιοχές από την Ελλάδα. Στα πληθυσμιακά δείγματα του *P. nobilis* βρέθηκαν υψηλές τιμές απλοτυπικής ποικιλότητας, με βάση τις αλληλουχίες COI. Μια μεμονωμένη βάση στις αναλυθείσες αλληλουχίες 16S rDNA ήταν διαφορετική σε όλα τα αναλυθέντα άτομα από ένα δείγμα πληθυσμού (νήσος Χίος) διαφοροποιώντας την από τα άλλα.

### **1.7 Φυλογενετική ανάλυση και η μοριακοί δείκτες**

Αρχικά, για τη συστηματική κατάταξη των οργανισμών οι ερευνητικές ομάδες χρησιμοποιούσαν ως κριτήριο κυρίως, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά κάθε οργανισμού που μελετούσαν και σε ανατομική σύγκριση με άλλους παρόμοιους οργανισμούς μπορούσαν να εξάγουν συμπεράσματα για την ταξινόμηση του κάθε είδους. Δηλαδή, τα συμπεράσματα προέκυπταν από παρατηρήσεις στον φαινότυπο, γεγονός το οποίο μπορούσε να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα λόγω του φαινομένου της ομοπλασίας. Γι αυτό το λόγο η επιστημονική κοινότητα στράφηκε προς τα μοριακά δεδομένα, δηλαδή την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων βασιζόμενοι σε μοριακές πληροφορίες που είχαν συλλέξει και επεξεργαστεί. Αρχικά, όταν ήταν ακόμα δύσκολο να ακριβό να συλλεχθούν μοριακές ακολουθίες, οι περισσότερες μελέτες στηρίζονταν στη μελέτη ενός κοινού γονιδίου (ορθόλογου) για τους υπό μελέτη οργανισμούς.

Η μοριακή φυλογένεση είναι μια υπόθεση των εξελικτικών προτύπων και διαδικασιών του και ένα πλαίσιο για την αποσαφήνιση της ταξινόμησής του. Ένα ισχυρά υποστηριζόμενο μοριακό φυλογενετικό δέντρο μπορεί να βοηθήσει στην εκτίμηση των ρυθμών διαφοροποίησης, των χρόνων απόκλισης, των προγονικών κατανομών και των συνθέσεων της κοινότητας και μπορεί να παρέχει στοιχεία σχετικά με ταξινομικές υποθέσεις. Ωστόσο, πολλά taxa σημαντικής εξελικτικής και πρακτικής σημασίας έχουν πολύ ελλιπείς μοριακές φυλογονίες σε επίπεδο είδους, βασισμένες σε λίγα είδη με κατάλληλη αλληλουχία γονιδίων, μη αντιπροσωπευτικά της ποικιλομορφίας της ομάδας ή σε μεγάλο βαθμό ανεπίλυτα.

Η φυλογένεση μπορεί να γίνει με βάση 4 διαφορετικά είδη δεδομένων:

- Μορφολογικών χαρακτηριστικών
- Χρωμοσωμικών χαρακτηριστικών
- Μοριακών ή Βιοχημικών χαρακτήρων
- Ηθολογικών ή Οικολογικών χαρακτηριστικών

#### Μοριακοί Δείκτες

Ως μοριακός δείκτης μπορεί να χαρακτηριστεί ένα γονίδιο ή DNA αλληλουχία με μια γνωστή θέση σε ένα χρωμόσωμα και που σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή χαρακτηριστικό. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μεγάλο ενδιαφέρον για τους μοριακούς δείκτες, αποκαλύπτοντας πολυμορφισμούς σε επίπεδο DNA, καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξελικτική βιολογία και σε φυλογενετικές μελέτες.

Στη συνέχεια παραθέτουμε με συντομία τις πιο κοινές βιοχημικές και μοριακές τεχνικές, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την αποκάλυψη της γενετικής σύστασης και ποικιλομορφίας και διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων :

- Ισοένζυμα
- Τεχνική RAPD
- VNTRs και SSRs
- Μιτοχονδριακό DNA

Οι γενετικοί δείκτες μπορεί να προέρχονται από:

1. Αλληλουχίες μιτοχονδριακού (mt) DNA
2. Αλληλουχίες χλωροπλαστικού (cp) DNA
3. Αλληλουχίες πυρηνικού DNA

### **1.8 Περιοχή δειγματοληψίας**

Ο Ευβοϊκός κόλπος, χαρακτηριζόμενος και ως "Ευβοϊκή θάλασσα", ή κατά τους αρχαίους Έλληνες η «έσω Ευβοϊκή θάλασσα» αποτελεί όλο το θαλάσσιο χώρο μεταξύ Εύβοιας και Στερεάς Ελλάδας. Στην πραγματικότητα πρόκειται για ένα μεγάλου μήκους πορθμό. Ο Ευβοϊκός κόλπος εκτείνεται μεταξύ των ανατολικών ακτών της Αττικοβοιωτίας και των δυτικών ακτών της Εύβοιας. Χωρίζεται σε βόρειο και νότιο Ευβοϊκό από τα στενά της Αυλίδας και του Ευρίπου (40 m πλάτος, 60 m μήκος και 8 m βάθος).

Οι θερμοκρασίες του νερού στο επιφανειακό στρώμα (μέχρι βάθους 20 μέτρα) είναι κατά μέσο όρο 24.5 οC ( το καλοκαίρι) και 16 οC (το φθινόπωρο). Η αλατότητα του νερού σε



αυτό το στρώμα είναι 37%. Από τα σημαντικότερα θαλάσσια οικοσυστήματα στον ελλαδικό χώρο αποτελούν ο Β. και Ν. Ευβοϊκός, κυρίως λόγω του παλιρροϊκού φαινομένου. Επίσης, τα βάθη του δεν χαρακτηρίζονται μεγάλα (κυρίως 10-100 μέτρα, με μέγιστο βάθος τα 430 μέτρα). Η παρουσία ρηγμάτων, του δίνουν ένα ιδιαίτερο ανάγλυφο και ιδιαίτερη μορφή, και παράλληλα με το γνώρισμα των παλιρροϊκών ρευμάτων, σπάνιο φαινόμενο στην Ελλάδα, συντελεί στη συνεχή ανανέωση και στην καλή οξυγόνωση των υδάτων.

### **1.9 Υπόθεση Εργασίας**

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να συμπεράνουμε εάν οι οικογένειες δίθυρων και γαστεροπόδων που υπάρχουν Νότιο Ευβοϊκό ομαδοποιούνται ανάλογα τα αβιοτικά χαρακτηριστικά που διαβιούν. Εξετάζοντας τα πιο συνηθισμένα είδη των οικογενειών που εμφανίζονται στην περιοχή ενδιαφέροντος, ελέγχουμε αν ακολουθούν το ίδιο μοτίβο ομαδοποίησης με άλλες παρόμοιες φυλογενετικές αναλύσεις. Θέλουμε δηλαδή να ερευνήσουμε εάν τα αποτελέσματα της φυλογενετικής μας ανάλυσης αντικατοπτρίζουν τα στοιχεία οικολογίας των οικογενειών.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Περιοχή Μελέτης**

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε στο Νότιο Ευβοϊκό Κόλπο από την περιοχή Βασιλικό μέχρι και Νέα Στύρα. Τα δείγματα συλλέχτηκαν σε βάθος που κυμαίνεται από 2 έως και

40 μέτρα από αυτόνομη και ελεύθερη κατάδυση. Τα δείγματα αφού συλλέχτηκαν μεταφέρθηκαν μέσα σε πάγο στο πανεπιστήμιο και έμπαιναν σε ψύξη.



Εικόνα 2: Σημεία από την δειγματοληψία στο Νότιο Ευβοϊκό κόλπο

Στην συνέχεια αναγνωρίσαμε τα είδη, μετά μέσω της πλατφόρμα National Center for Biotechnology Information (NCBI) βρήκαμε της νουκλεοτιδικές αλληλουχίες 16S για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου. Εκτός από την νουκλεοτιδική αλληλουχία 16S του είδους Σαμάρι, *Solecurtus strigilatus* που δεν υπήρχε στην πλατφόρμα National Center for Biotechnology Information (NCBI).

## 2.2 Εξαγωγή DNA

Για την εξαγωγή του DNA από τους ιστούς των ζώων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της φαινόλης-χλωροφορμίου και αποτελείται από τα παρακάτω στάδια:

1. Προσθήκη 500  $\mu$ L TNE

α) Tris-HCl συγκέντρωσης 10 mM  $\diamond$  διατηρεί το pH σταθερό 7-8

β) EDTA 1 mM διαχωρίζει και απομακρύνει δισθενή κατιόντα ( $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) τα οποία βρίσκονται συνήθως στα μεταποένζυμα και έχουν ανασταλτικό ρόλο.

γ) NaCl 100 mM σταθεροποιεί το DNA σε ισοτονικό μέσο και βοηθά στην αποικοδόμηση των κυτταρικών μεμβρανών

2. Προσθήκη 100  $\mu$ L Tris-HCl συγκέντρωσης 1M

3. Προσθήκη 80  $\mu$ L SDS συγκέντρωσης 20% κατ' όγκου  $\diamond$  δέσμευση κυτταρικών μεμβρανών, λιπιδίων, πρωτεϊνών

4. Προσθήκη 10  $\mu$ L Proteinase K<sup>+</sup> συγκέντρωσης 20 mg/ml  $\diamond$  μετουσιώνει τις πρωτεΐνες

5. Ανάδευση σε vortex.

6. Τοποθέτηση, των δειγμάτων στο υδατόλουτρο στους 60  $^{\circ}$ C για όλο το βράδυ ώστε να διαλυθεί ο ιστός, να σπάσουν τα κύτταρα και να αποδεσμευθεί το DNA. Έπειτα ακολουθεί ο "καθαρισμός" του DNA από τα υπόλοιπα προϊόντα-"θραύσματα".

7. Προσθήκη 300  $\mu$ L φαινόλης που δεσμεύει όλα τα παραπάνω παραπροϊόντα εκτός του DNA

8. Προσθήκη 300  $\mu$ L διάλυμα χλωροφορμίου / ισοαμλικής αλκοόλης σε αναλογία 24 χλωροφόρμιο / 1 ισοαμλική αλκοόλη.

9. Ανάδευση για περίπου 10' με το χέρι και φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά.
10. Μεταφορά της υπερκείμενης υδατικής φάσης σε νέο Eppendorf.
11. Προσθήκη 600  $\mu\text{L}$  διάλυμα χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης, ανάδευση με το χέρι για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες με πριν. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο Eppendorf.
12. Προσθήκη 1 mL αιθανόλης 100%.
13. Προσθήκη 25  $\mu\text{L}$  sodium acetate συγκέντρωσης 3M.
14. Επώαση στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για μισή ώρα, ώστε το DNA να μαζευτεί στον πυθμένα του Eppendorf.
15. Φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 10 λεπτά, ώστε να δημιουργηθεί το ίζημα στον πυθμένα του Eppendorf και απομάκρυνση της αιθανόλης.
16. Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  παγωμένης αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 5 λεπτά.
17. Απομάκρυνση της αιθανόλης και αφυδάτωση των ιζημάτων στον φούρνο για 10-20 λεπτά περίπου, μέχρι να εξατμιστεί τελείως η οποιαδήποτε υγρασία.
18. Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  TE ( 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) και ανάδευση με πιπέτα (bypipetting).

### **2.3 Ποσοτικοποίηση DNA**

Μετά την απομόνωση του DNA, ακολουθεί η ποσοτικοποίησή του , ώστε να φανεί εάν το DNA που εξήχθη από τα δείγματα είναι καλό ως προς την ποιότητα και την

καθαρότητα, ώστε να χρησιμοποιηθεί για την PCR. Η διαδικασία αυτή θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000). Το φασματοφωτόμετρο μετράει σε 230, 260 και 280 μήκος κύματος. Ο λόγος 260/280 μας δείχνει την ποιότητα του DNA, ενώ ο λόγος 260/230 την καθαρότητα και η βέλτιστη τιμή των λόγων αυτών κυμαίνεται από 1,8 έως 2.

#### 2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στη συγκεκριμένη μελέτη εφαρμόστηκε PCR για την ενίσχυση ενός τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S. Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο εξής:

16S-1 (5'-TGACTGTGCAAAGGTAGC-3')

16S-2 (5'-CTGGCTTACGCCGGTCTG-3')

Ενώ για την κατασκευή του mastermix προστέθηκαν τα παρακάτω υλικά σε ένα Eppendorf των 1,5 ml πολλαπλασιασμένα επί τον αριθμό των δειγμάτων (1):

Πίνακας Υλικά mastermix

| Υλικά          | Αρχική Συγκέντρωση | Τελική Συγκέντρωση (μL) |
|----------------|--------------------|-------------------------|
| DNA            | 1                  |                         |
| Buffer         | 5                  | 5                       |
| MgCl           | 2                  | 2                       |
| dNTP's         | 0,2                | 0,2                     |
| Primer Forward | 0,5                | 0,5                     |

|                    |      |      |
|--------------------|------|------|
| Primer Reverse     | 0,5  | 0,5  |
| Taq DNA Polymerase | 0,1  | 0,1  |
| H <sub>2</sub> O   | 10,7 | 10,7 |

Σε 2 PCR tubes των 200μL, έγινε προσθήκη 1μL DNA από κάθε δείγμα στα αντίστοιχα eppendorfs, αφήνοντας και ένα κενό που θα λειτουργήσει ως το 'τυφλό' δείγμα (μάρτυρας), και 19 μL από το mastermix που παρασκευάστηκε.

Οι θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν ήταν οι εξής:

|     |    |      |    |      |      |
|-----|----|------|----|------|------|
| C   | 50 | 54,3 | 56 | 58,5 | 59,8 |
| 16S | S1 | S1   | S1 | S1   | S1   |
| 16S | S2 | S2   | S2 | S2   | S2   |

Για την κατασκευή του mastermix ακολουθήθηκε η παρακάτω συνταγή:

DNA: 1ml

Buffer: 5 ml

MgCl<sub>2</sub>: 2 ml

dNTP's: 0,2 ml

primer: 0,5 + 0,5 ml

taqpolymerase: 0,1 ml

H<sub>2</sub>O: 10,7 ml

Και οι συνθήκες της PCR:

1) 95 οC για 15'

2) 95 οC για 1’

3) 50 οC και 60 οC max για 1’

4) 72 οC για 1’ (30’’)

5) 2,3 και 4 x 30 φορές

6) 72 οC για 15’ (10’)

Για τον έλεγχο των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% w/v

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η ιδανική θερμοκρασία ανόπτησης για τον εκκινητή 16S είναι οι 50 οC.

Έπειτα, εκτελέστηκε η διαδικασία της PCR σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες

Πίνακας 5 Συνθήκες PCR για το γονίδιο 16S

|                       | Θερμοκρασία (οC) | Χρόνος | Κύκλοι |
|-----------------------|------------------|--------|--------|
| Αρχική Αποδιάταξη     | 95               | 15min  | 1      |
| Αποδιάταξη            | 95               | 1min   | 30     |
| Υβριδοποίηση εκκινητή | 50               | 30min  | 30     |
| Επέκταση              | 72               | 30min  | 30     |
| Τελική επέκταση       | 72               | 10min  | 1      |

Όταν ολοκληρώθηκε η αντίδραση, έγινε έλεγχος των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% w/v.

## **2.6 Gel ηλεκτροφόρηση**

Φτιάχνουμε πρώτα το gel με την εξής διαδικασία:

1. Παρασκευή TAE 50x (Tris base 48,4 gr + Acetic Acid 11,42ml + EDTA 0,5M 20ml μέχρι τελικό όγκο 200ml + απιονισμένο νερό μέχρι τα 250ml)
2. Αραίωση 20 ml TAE 50x σε απεσταγμένο νερό 980 ml, για τη σύνθεση TAE 1x σε τελικό όγκο 1000 ml.
3. Ζύγισμα Αγαρόζης 0,72 g
4. Διάλυση της αγαρόζης σε 60 ml TAE 1x και ανάδευση.
5. Θέρμανση στο φούρνο μικροκυμάτων για 1,5 – 2 λεπτά μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές και προσθήκη 3μL βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).
6. Το διάλυμα κρυώνετε κάτω από τρεχούμενο νερό.
7. Τοποθέτηση του gel στην ειδική συσκευή MiniBis DNR, για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων υπό τη λάμπα υπεριώδους φωτός.

## **2.7 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA sequencing)**

Για την κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου πρέπει να γνωρίζουμε την αλληλουχία των γονιδίων των ατόμων που θέλουμε να μελετήσουμε. Έτσι, τα προϊόντα της αντίδρασης της PCR στέλνονται σε ειδικές εταιρίες προς αλληλούχιση.



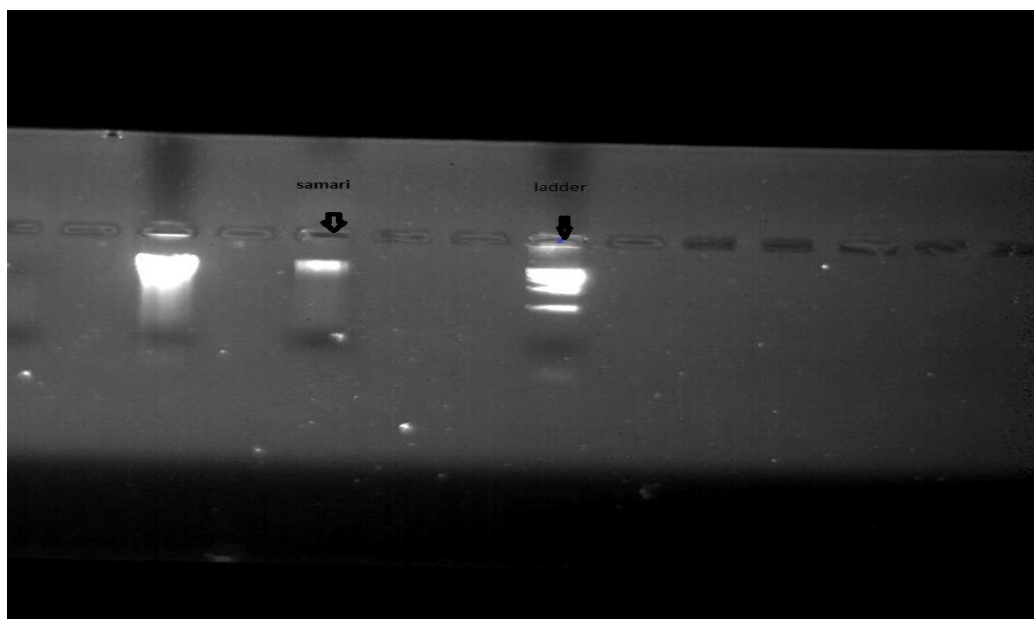
## 2.8 Στατιστική ανάλυση

Αρχικά, ανακτήθηκαν οι αντίστοιχες αλληλουχίες του γονιδίου 16S από τη βάση δεδομένων του NCBI εκτός από το Σαμάρι, *Solecortus strigilatus* που έγινε εξαγωγή DNA. Στη συνέχεια έγινε συστοιχία αυτών, βάση προς βάση με το πρόγραμμα AliView (Larsson, A. 2014), και κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου με το πρόγραμμα MrBayes (Huelsenbeck, J.P., and F. Ronquist. 2001), με βάση τη μέθοδο Bayesian Inference και τις εξής παραμέτρους: (1,500,000 generations, with a 100 generations sampled each time and the burn-in was set to 375,000 (25% of generations)). Το φυλογενετικό δέντρο δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα FigTree (v1.4.4 2006-2018). Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Molecular Evolutionary Genetics Analysis για την στατιστική ανάλυση (γενετικά αποτελέσματα).

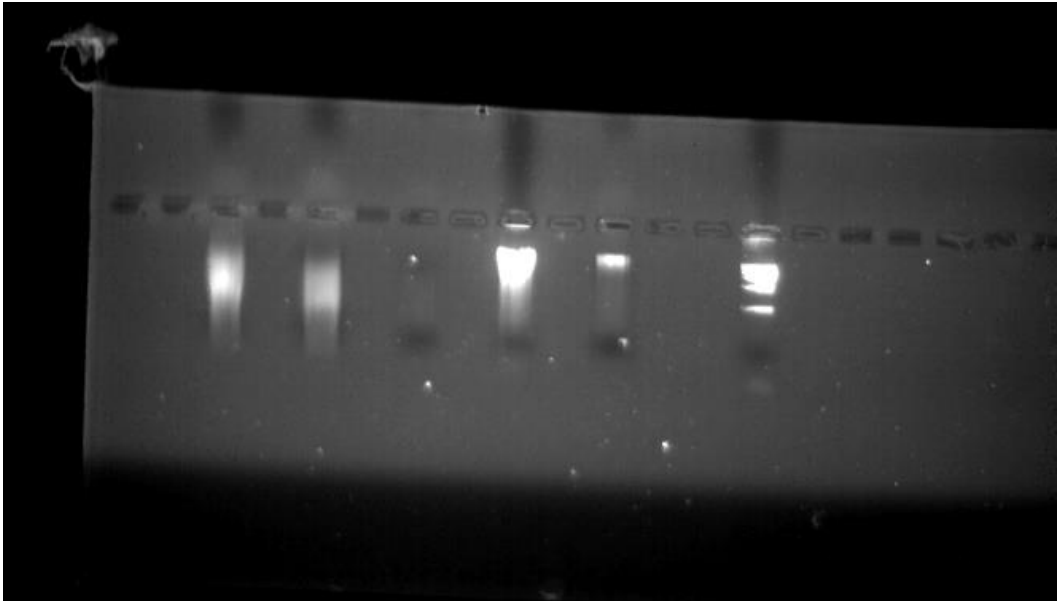
## 3. Αποτελέσματα

### 3.1. Προϊόντα PCR

Αρχικά, παρουσιάζεται το προϊόν του DNA για τα είδη *Solecortus strigilatus*, όπως φάνηκαν υπό την UV ακτινοβολία, έπειτα από την gel ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 2. Προϊόν PCR (*Solecortus strigilatus*)

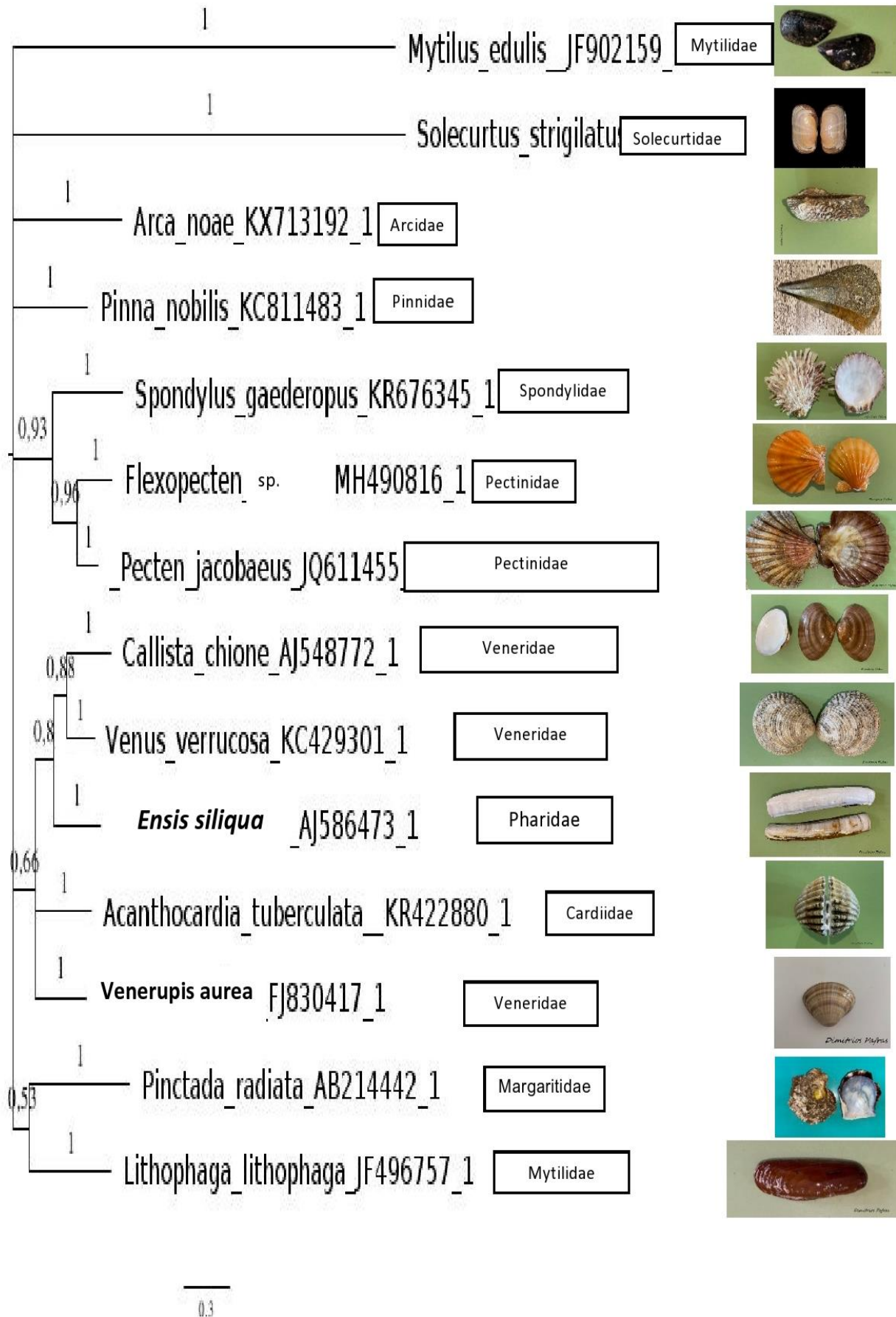


Εικόνα 3. Προϊόν PCR (*Solecurtus strigilatus*)

### 3.2. Bayesian Analysis

Στη συνέχεια, παρατίθεται το φυλογενετικό δέντρο των δίθυρων από την Bayesian ανάλυση (Σχήμα 1) που συγκροτήθηκε από 14 διαφορετικές αλληλουχίες του γονιδίου 16S και έδειξε ότι τα συμπεριλαμβανόμενα είδη συγκρότησαν 7 βασικές ομαδοποιήσεις με εκ των υστέρων πιθανότητα (posterior probability) ήταν 0,53, 0,66, 0,93, 1. Αρχικά στον πρώτος κλάδος με πιθανότητα ίση με 1 περιλαμβάνει την οικογένειες Mytilidae (*Mytilus edulis*). Ο δεύτερος κλάδος με πιθανότητα ίση με 1 περιλαμβάνει την οικογένεια Solecurtidae (*Solecurtus strigilatus*). Ο τρίτος κλάδος με πιθανότητα ίση με 1 περιλαμβάνει την οικογένεια Arcidae (*Arca noae*). Ο τέταρτος κλάδος με πιθανότητα ίση με 1 περιλαμβάνει την οικογένεια Pinnidae (*Pinna nobilis*). Ο πέμπτος κλάδος με πιθανότητα ίση με 0,93 χωρίζεται αρχικά σε άλλους δυο κλάδους με πιθανότητα ίση 1, περιλαμβάνει την οικογένεια Spondylidae (*Spondylus gaederopus*) και με πιθανότητα 0,96 περιλαμβάνει τις οικογένειες Pectinidae (*Flexorpecten sp.*, *Pecten jacobaeus*). Ο εκτός κλάδος με πιθανότητα 0,66 αρχικά χωρίζεται σε άλλους 3 κλάδους. Με πιθανότητα

0,8 περιλαμβάνει τις Οικογένειες Veneridae (*Callista chione*, *Venus verrucosa*), Pharidae (*Ensis siliqua*), με πιθανότητα 1 περιλαμβάνει την οικογένεια Cardiidae (*Acanthocardia tuberculata*) και με πιθανότητα 1 περιλαμβάνει την οικογένεια Veneridae (*Venerupis aurea*). Τέλος ο έβδομος κλάδος με πιθανότητα 0,53 περιλαμβάνει τις Οικογένειες Margaritidae (*Pinctada radiata*), Mytilidae (*Lithophaga lithophaga*).

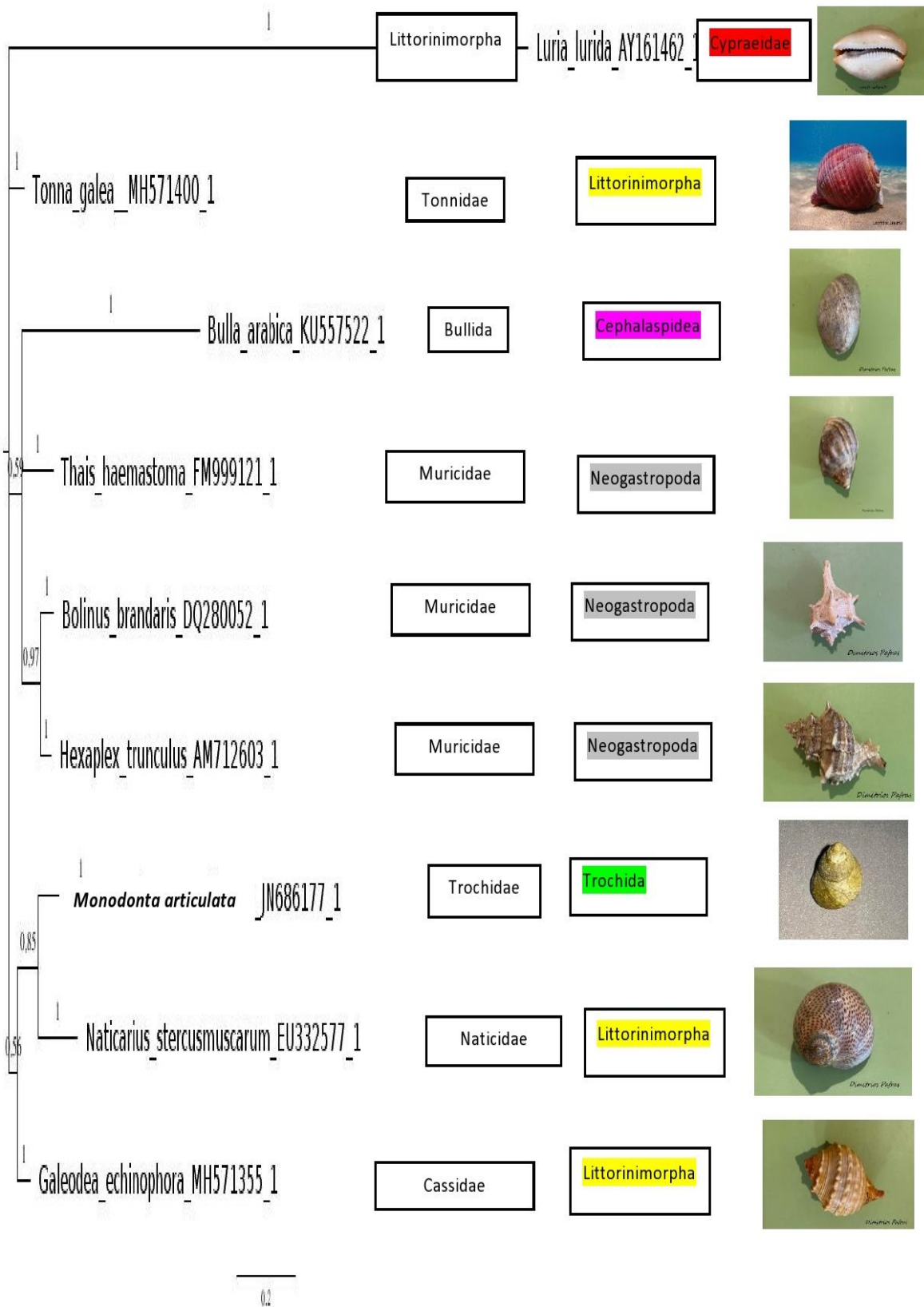


Σχήμα 1: Φυλογενετικό Δέντρο(δίθυρα) με τη μέθοδο MrBayes

| Στήλη1                 | Mytilus | edulis | JF    | Solecurtus | strigil | Pinctada | radiata | Arca  | noae  | KX    | Lithothaga | litropi | Pinna | nobilis | K | Spondylus | geederop | Flexopecten | sp | Pecten | jacobaeu | Callista | chio | Erisis | silt | Venus | verranthocardia |
|------------------------|---------|--------|-------|------------|---------|----------|---------|-------|-------|-------|------------|---------|-------|---------|---|-----------|----------|-------------|----|--------|----------|----------|------|--------|------|-------|-----------------|
| Erisis_siliqua         | 1,681   |        |       |            |         |          |         |       |       |       |            |         |       |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |
| Pinctada_radiata_AB    | 1,143   | 1,244  |       |            |         |          |         |       |       |       |            |         |       |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |
| Arca_noae_KX71319      | 1,085   | 1,150  | 0,752 |            |         |          |         |       |       |       |            |         |       |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |
| Lithothaga_litropagi   | 1,238   | 1,212  | 0,649 | 0,691      |         |          |         |       |       |       |            |         |       |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |
| Pinna_nobilis_KC811    | 1,089   | 0,991  | 0,525 | 0,677      | 0,582   |          |         |       |       |       |            |         |       |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |
| Spondylus_geederop     | 1,294   | 1,096  | 0,794 | 0,600      | 0,702   | 0,540    |         |       |       |       |            |         |       |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |
| Flexopecten_sp_MH4     | 0,990   | 0,854  | 0,630 | 0,549      | 0,600   | 0,556    | 0,454   |       |       |       |            |         |       |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |
| Pecten_jacobaeus_JI    | 1,113   | 0,947  | 0,679 | 0,591      | 0,617   | 0,517    | 0,452   | 0,233 |       |       |            |         |       |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |
| Callista_chione_AJ54   | 1,037   | 0,946  | 0,696 | 0,672      | 0,586   | 0,545    | 0,670   | 0,652 | 0,601 |       |            |         |       |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |
| Solen_marginalis_Au    | 0,850   | 0,939  | 0,665 | 0,709      | 0,633   | 0,541    | 0,672   | 0,511 | 0,644 | 0,405 |            |         |       |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |
| Venus_verrucosa_KC     | 1,032   | 1,004  | 0,704 | 0,625      | 0,578   | 0,504    | 0,630   | 0,593 | 0,574 | 0,329 | 0,345      |         |       |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |
| Acanthocardia_tubercul | 1,015   | 1,094  | 0,595 | 0,624      | 0,582   | 0,527    | 0,663   | 0,558 | 0,629 | 0,451 | 0,433      | 0,414   |       |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |
| Modiola_coralina_FJ8   | 1,118   | 0,994  | 0,616 | 0,613      | 0,612   | 0,616    | 0,595   | 0,517 | 0,564 | 0,471 | 0,419      | 0,380   | 0,458 |         |   |           |          |             |    |        |          |          |      |        |      |       |                 |

Πίνακας 1: Γενετικές απόστασης Διθύρων

Στη συνέχεια, παρατίθεται το φυλογενετικό δέντρο των γαστεροπόδων από την Bayesian ανάλυση (Σχήμα 2) που συγκροτήθηκε από 9 διαφορετικές αλληλουχίες του γονιδίου 16S και έδειξε ότι τα συμπεριλαμβανόμενα είδη συγκρότησαν 4 βασικές ομαδοποιήσεις με εκ των υστέρων πιθανότητα (posterior probability) 0,56, 0,59 και 1. Αρχικά στον πρώτο κλάδος με πιθανότητα 1 περιλαμβάνει την οικογένεια Cypraeidae (*Luria lurida*). Ο δεύτερος κλάδος με πιθανότητα 1 περιλαμβάνει την οικογένεια Tonnidae (*Tonna galea*). Ο τρίτος κλάδος χωρίζεται σε άλλους 3 κλάδους, με πιθανότητα 1 περιλαμβάνει τις οικογένειες Bullidae (*Bulla arabica*), και με πιθανότητά 0,97 και 1 περιλαμβάνει τις οικογένειες Muricidae (*Thais haemastoma*, *Bolinus bandaris*, *Hexaplex trunculus*). Τέλος ο τέταρτος κλάδος χωρίζονται σε άλλους δυο κλάδους με πιθανότητα 0,85 περιλαμβάνει τις οικογένειες Trochidae (*Monodonta articulata*), Naticidae (*Naticarius stercusmuscarum*) και με πιθανότητα 1 περιλαμβάνει την οικογένεια Cassidae (*Galeodea echinophora*).



Σχήμα 2: Φυλογενετικό Δέντρο(Γαστερόποδα) με τη μέθοδο MrBayes

|  | Luria_lurida_AY16 | Bulla_arabica_KU557522_1 | Monodontia_articulata_JN68611 | Naticarius_stercusmuscarum_I | Galeodea_echinophora_MH57 | Tonna_galea_MH571400_1 | Thais_haemastoma_FM99121 | Bolinus_brandaris_DQ280052 | Hexaplex_trunculus_AH172603 |
|--|-------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|  | 0,9157            | 0,8956                   | 0,8203                        | 0,7472                       | 0,7391                    | 0,8780                 | 0,8119                   | 0,8248                     |                             |
|  |                   | 0,4424                   | 0,3857                        | 0,3639                       | 0,3576                    | 0,3611                 | 0,4304                   | 0,3837                     |                             |
|  |                   |                          | 0,2949                        | 0,2792                       | 0,2757                    | 0,2956                 | 0,3070                   | 0,3060                     |                             |
|  |                   |                          |                               | 0,1819                       | 0,1947                    | 0,2387                 | 0,2010                   | 0,2098                     |                             |
|  |                   |                          |                               |                              | 0,1153                    | 0,1840                 | 0,1704                   | 0,1800                     |                             |
|  |                   |                          |                               |                              |                           | 0,1887                 | 0,1618                   | 0,1589                     |                             |
|  |                   |                          |                               |                              |                           |                        | 0,1821                   | 0,1515                     |                             |
|  |                   |                          |                               |                              |                           |                        |                          | 0,0740                     |                             |

Πίνακας 2: Γενετικές απόστασης Γαστεροπόδων



#### 4. Συζήτηση – Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της φυλογένεσης για τα δίθυρα και τις γενετικές ομαδοποιήσεις που συστάθηκαν σε συνδυασμό πάντα και με την στατιστική σημαντικότητα αυτών, βλέπουμε ότι το φυλογενετικό δέντρο χωρίζεται σε 7 κλάδους. Αρχικά, στον πρώτο κλάδο περιλαμβάνει την οικογένεια Mytilidae. Ο δεύτερος κλάδος περιλαμβάνει την οικογένεια Solecurtidae. Ο τρίτος κλάδος περιλαμβάνει την οικογένεια Arcidae. Ο τέταρτος κλάδος την οικογένεια Pinnidae. Ο πέμπτος κλάδος χωρίζεται αρχικά σε άλλους δυο κλάδους, περιλαμβάνει την οικογένεια Spondylidae και την οικογένεια Pectinidae. Ο έκτος κλάδος αρχικά χωρίζεται σε άλλους 3 κλάδους. Αποτελείται από τις οικογένειες Veneridae, Solenidae Cardiidae και Mactridae. Τέλος ο έβδομος κλάδος περιλαμβάνει τις οικογένειες Margaritidae και Mytilidae.

Κάποια από τα χαρακτηριστικά των οργανισμών αποκτούνται κατά την προσαρμογή τους σε ένα περιβάλλον, ενώ κάποια άλλα είναι καθαρά ταξινομικά. Το σχήμα όμως και γενική μορφολογία του κελύφους απεικονίζει από ευθείας τον τρόπο ζωής των Δίθυρων Μαλάκιων και μάλιστα οι σημερινές μας γνώσεις για τον τρόπο που τα σύγχρονα δίθυρα έχουν προσαρμοστεί στους ιδιαίτερους τρόπους διαβίωσης μας επιτρέπει να κάνουμε σημαντικούς συσχετισμούς και υποθέσεις για το πώς ζούσαν τα Δίθυρα που έχουν εξαφανιστεί. Ανάλογα με τον τρόπο ζωής τους τα Δίθυρα που έχουμε συλλέξει διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες. Τα σκαπτικά δίθυρα τα οποία χωρίζονται σε δίθυρα που σκάβουν σε μικρό βάθος ή σε μεγάλο βάθος. Τα αποτελέσματα του συσχετισμού των αβιοτικών χαρακτηριστικών με τον γενετικό συσχετισμό δείχνουν ότι όλα τα είδη των οικογενειών Veneridae, Solenidae και Cardiida αλλά και της οικογένειας Solecurtidae, παρά την ομαδοποίησή τους ως προς τα αβιοτικά χαρακτηριστικά, διαφοροποιούνται ως προς τη γενεαλογία. Τα δίθυρα των δειγμάτων μας που ανήκουν

σε αυτή την κατηγορία είναι Αμμοσωλήνας (*Ensis siliqua*), Γυαλιστερή (*Callista chione*), Κυδώνι (*Venus verrucosa*), *Acanthocardia tuberculata*, Σαμάρι (*Solecurtus strigilatus*) και Μικρή γυαλιστερή (*Venerupis aurea*). Με βάση το γενεαλογικό δέντρο τα σκαπτικά δίθυρα χωρίζονται σε δυο κλάδους. Στο ένα κλάδο ανήκουν τα είδη Αμμοσωλήνας (*Solen marginatus*), Γυαλιστερή (*Callista chione*), Κυδώνι (*Venus verrucosa*), *Acanthocardia tuberculata* και Μικρή γυαλιστερή (*Mactra corallina*) ομαδοποιούνται μαζί ενώ το είδος Σαμάρι (*Solecurtus strigilatus*) ανήκει σε άλλο κλάδο. Τα Δίθυρα με Βύσσο, χωρίζονται σε αυτά που θα στερεωθούν με βύσσο και ζουν μόνιμα στη θέση αυτή, υπάρχουν όμως μερικά γένη Διθύρων όπως που στερεώνονται με βύσσο προσωρινά σε κάποιο στάδιο της ανάπτυξής τους. Τα δίθυρα που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι *Pinctada radiata*, Καλόγνωμη (*Arca noae*), Πίννα (*Pinna nobilis*) και Μύδι Ατλαντικού (*Mytilus edulis*). Τα Δίθυρα με βύσσο σύμφωνα με το γενεαλογικό δέντρο βλέπουμε ότι έχουν χωριστεί σε 4 διαφορετικούς κλάδους. Οι προσκολλημένες και ελεύθερες μορφές Δίθυρων (προσκολλώνται σε σταθερό υπόστρωμα ή άλλο κέλυφος με τη μια θυρίδα ή μικρό τμήμα αυτής και συνήθως το σχήμα τους προσαρμόζεται με τη μορφή του υποστρώματος). Τα δίθυρα των δειγμάτων μας που ανήκει σε αυτή την κατηγορία είναι Βασιλικό στρείδι (*Spondylus gaederopus*). Ο *Spondylus* είναι μορφή που ζει σήμερα προσκολλημένη σε βράχια σε μικρό βάθος. Άλλη μια κατηγορία είναι τα Νεκτονικά Δίθυρα (με ικανότητα κολύμβησης). Τα δίθυρα των δειγμάτων μας που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι το Χτένι (*Pecten jacobaeus*) και Γυαλιστερό Χτένι (*Flexorecten* sp.). Σύμφωνα με το γενεαλογικό δέντρο τα είδη ομαδοποιούνται στον ίδιο κλάδο. Στην τελευταία κατηγορία είναι τα Διατρητικά Δίθυρα (διατρύπουν σκληρά ασβεστολιθικά υποστρώματα ή πιο μαλακά ιζήματα). Το δίθυρο των δειγμάτων μας που ανήκει σε αυτή την κατηγορία είναι Πετροσωλήνα (*Lithophaga lithophaga*).

Σύμφωνα (NCBI taxonomy, 2014) τα Δίθυρα χωρίζονται σε πέντε βασικές ομάδες εκ των οποίων τα δείγματα μας περιέχονται σε δυο (Heteroconchia και Pteriomorphia) από της πέντε ομάδες (Heteroconchia, Pteriomorphia, Palaeoheterodonta, Anomalodesmata και Protobranchia), με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Την Heteroconchia που περιέχει τα είδη Αμμοσωλήνας (*Ensis siliqua*), Γυαλιστερή (*Callista chione*), Κυδώνι (*Venus verrucosa*), *Acanthocardia tuberculata*, Σαμάρι (*Solecurtus strigilatus*) και Μικρή γυαλιστερή (*Venerupis aurea*). Την Pteriomorphia που περιέχει τα είδη *Pinctada radiata*, Βασιλικό στρείδι (*Spondylus gaederopus*), Καλόγνωμη (*Arca noae*), Πετροσωλήνα (*Lithophaga lithophaga*), Πίννα (*Pinna nobilis*), Μύδι Ατλαντικού (*Mytilus edulis*), Γυαλιστερό Χτένι (*Flexorecten* sp.) και Χτένι (*Pecten jacobaeus*). Ωστόσο, νεότερες μελέτες αναγνωρίζουν 6 κύριες ομάδες (Bieler et al., 2014; Gonzalez et al., 2015).

Τα μύδια (*Mytilidae*) διανέμονται στους ωκεανούς παγκοσμίως και καταλαμβάνουν διάφορους βιότοπους με διαφορετικούς τρόπους ζωής. Ωστόσο, η ταξινόμια και η φυλογενεϊά τους παραμένουν ασαφείς από γένος σε επίπεδο οικογένειας λόγω των διαφορούμενων μορφολογικών και ανατομικών χαρακτήρων μεταξύ ορισμένων ταξινομικών ομάδων.

Η οικογένεια *Veneridae* είναι μια μεγάλη ομάδα δίθυρων, σε μεγάλο βαθμό άλυτο φυλογενετικό ιστορικό και ασταθή ταξινόμηση παρά τις πρόσφατες μοριακές και μορφολογικές μελέτες (Chen et al., 2011). Πράγματι, ενώ από τη μια πλευρά η χρήση μορφολογικών χαρακτηριστικών είναι προβληματική αφού τα περισσότερα από αυτά είναι ομοιόμορφα (Mikkelsen et al., 2006), από την άλλη, η χρήση μοριακών δεικτών μπορεί να είναι προβληματική λόγω (i) της διπλής μονογονικής κληρονομικότητας των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων σε ορισμένα αφροδίσια (Mikkelsen et al., 2006), (ii) εγγενείς δυσκολίες στην ενίσχυση και τον προσδιορισμό της

αλληλουχίας «του γονιδίου γραμμικού κώδικα» COI σε αφροδίσια ( Kappner and Bieler, 2006 ) και (iii) η πολύ χαμηλή ανάλυση πυρηνικών δεικτών όπως το γονίδιο H3 και τα ριβοσωματικά 18S/28S rRNAs (Chen et al., 2011). Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, η χρήση ενός εξαιρετικά μεταβλητού και εύκολου στην ενίσχυση πυρηνικού δείκτη όπως το ITS2 είναι ιδιαίτερα ενδεδειγμένη (Cheng et al., 2006). Το ITS2 δεν έχει χρησιμοποιηθεί ποτέ σε φυλογενετικές και ταξινομικές μελέτες των Veneridae.

Ορισμένα είδη των Veneridae καταλαμβάνουν διαφορετικούς οικοτόπους, συμπεριλαμβανομένων των ρηχών υποπαραθαλάσσιων υφάλων, των αμμωδών κόλπων και των χονδρόκοκκων υποστρωμάτων των ηπειρωτικών υφαλοκρηπίδων, και ένας μικρότερος αριθμός ειδών περιορίστηκε σε βαθύτερα νερά (Bieler, 2006). Εντούτοις, είναι δύσκολο να οριστούν ταξινομικές ομάδες εντός των Veneridae σε ορισμένες περιπτώσεις με βάση τους μορφολογικούς χαρακτήρες, οι οποίοι μπορεί να επηρεαστούν από την εξέλιξη της σύγκλισης και τη φαινοτυπική πλαστικότητα (Canapa et al., 2003). Επομένως, το τρέχον σύστημα ταξινόμησης και η φυλογενετική σχέση των Veneridae μπορεί να έρχονται σε σύγκρουση με τις γενετικές αλληλεπιδράσεις.

Η μελέτη του Shimamoto ( 1996 ) είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα. Αυτός ο ερευνητής έλαβε μια φυλογένεση Veneridae με βάση τις μικροδομές του κελύφους και τις συνθέσεις αμινοξέων, στην οποία είδη που έχουν σύνθετη πρισματική δομή φαίνεται να έχουν εξελιχθεί από είδη με διασταυρούμενη ελασματική δομή. Έτσι, στις Veneridae έχουν αναγνωριστεί τρεις μεγάλες ομάδες δομών κελύφους: ο τύπος I (είδος με σύνθετες πρισματικές και διασταυρούμενες δομές), ο τύπος II (είδος χωρίς διασταυρούμενες ελασώδεις δομές) και ο τύπος III (είδος χωρίς σύνθετες πρισματικές δομές). Σύμφωνα με τον Shimamoto ( 1996 ), κάθε υποοικογένεια αποτελείται από είδη με την ίδια μικροδομή

κελύφους, με εξαίρεση τα Chioninae (τύποι I και II), Tarantinae (τύποι I και II) και Callistinae (τύποι I και III).

Από τα αποτελέσματα της φυλογένεσης για τα γαστερόποδα και τις γενετικές ομαδοποιήσεις που συστάθηκαν σε συνδυασμό πάντα και με την στατιστική σημαντικότητα αυτών, βλέπουμε ότι το φυλογενετικό δέντρο χωρίζεται αρχικά σε 4 κλάδους. Αρχικά στον πρώτο κλάδος περιλαμβάνει την οικογένεια Cypraeidae. Ο δεύτερος κλάδος περιλαμβάνει την οικογένεια Tonnididae. Ο τρίτος κλάδος χωρίζεται σε άλλους 3 κλάδους, με τις οικογένειες Bullidae, Muricidae και Hexaplex. Τέλος ο τέταρτος κλάδος χωρίζονται σε άλλους δυο κλάδους με τις οικογένειες Trochidae, Naticidae και Cassidae.

Στο φυλογενετικό δέντρο των γαστεροπόδων (σχήμα 2), στην τάξη των Neogastropoda ανήκουν τα είδη Hexaplex (*Trunculariopsis*) *trunculus*, *Bolinus bandaris* και *Thais haemastoma*. Στην τάξη των Littorinimorpha ανήκουν τα είδη *Tonna galea*, *Naticarius stercusmuscarum*, *Luria lurida* και *Caledia echphora*. Οι δυο παραπάνω τάξεις ανήκουν στα Caenogastropoda τα οποία έχουν κέλυφος. Τα Caenogastropods μικρού μεγέθους αποτελούν ένα μεγάλο ποσοστό της ποικιλότητας των γαστερόποδων και λόγω του απλού κελύφους και του μικρού τους μεγέθους, έχουν αποδειχθεί δύσκολο να ταξινομηθούν (Bouchet et al., 2002). Στην τάξη Trochida ανήκει το είδος *Monodonta articulata*. Η τάξη ανήκει στο clade Vetigastropoda, όπου μπορούν να βρεθούν σε όλους τους ωκεανούς. Στην τάξη Cephalaspidea ανήκει το είδος *Bulla arabica* και στο clade Heterobranchia. Οι Jörger et al. (2010) έχουν επαναπροσδιορίσει τις κύριες ομάδες εντός των Heterobranchia και δημιούργησαν δυο νέα clades Euopisthobranchia και Panpulmonata.

Οι περισσότερες περιγραφές των ζωντανών γαστερόποδων με κέλυφος, ιδιαίτερα εκείνων που έγιναν πριν από δεκαετίες βασίζονται μόνο στη μορφολογία του κελύφους. Έτσι, τα κελύφη των γαστερόποδων είναι επίσης πολύ σημαντικά για ταξινόμηση. Ωστόσο, μια σειρά από χαρακτηριστικά των κελυφών γαστερόποδων σχετίζονται σαφώς με τον τρόπο ζωής τους και τον τόπο διαμονής τους. Η μορφής του κελύφους των γαστερόποδων διατυπώθηκαν από τον Robert Linsley (1977). Το χρώμα και τα σχέδια χρωματισμού των κελυφών των γαστερόποδων μπορεί επίσης να είναι λειτουργικά σε ορισμένες περιπτώσεις, για παράδειγμα παρέχοντας καμουφλάζ από αρπακτικά. Σε άλλες περιπτώσεις, τα μοτίβα χρωματισμού μπορεί να μην έχουν καμία απολύτως λειτουργία.

Το Tonnoidea είναι μια μετρίως ποικιλόμορφη ομάδα μεγάλων, αρπακτικών γαστερόποδων με περίπου 360 είδη. Γνωστοί για την ικανότητά τους να εκκρίνουν θειικό οξύ, το χρησιμοποιούν για να λεηλατήσουν μια ποικιλία ασπόνδυλων, κυρίως εχινόδερμων. Οι Tonnoideans ταξινομούνται επί του παρόντος σε επτά αποδεκτές οικογένειες. Σχετικά γνωστές, ρηγά νερά Bursidae, Cassidae, Personidae, Ranellidae και Tonnidae και τις λιγότερο γνωστές, Laubierinidae και Pisanianuridae βαθέων υδάτων.

Στην οικογένεια Muricidae τα είδη κατοικούν σε σκληρά υποστρώματα όπως πέτρες ή ύφαλοι, αν και μερικά είδη ζουν σε μαλακά υποστρώματα. Μπορούν να βρεθούν σε ρηγά τροπικά έως πολικά νερά παγκοσμίως σε βάθη που κυμαίνονται από μεσοπαλιρροϊκά έως χιλιάδες μέτρα. Η μοριακή φυλογενετική ανάλυση των Barco et al. (2010) υποστηρίζει τη μονοφυλία της οικογένειας Muricidae.

Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των γαστερόποδων συνήθως εμφανίζουν υψηλά ποσοστά γονιδιακής αναδιάταξης μεταξύ των κύριων γενεαλογιών. Ωστόσο, σε κάθε κύρια

γενεαλογία, οι οργανώσεις γονιδιώματος είναι σχετικά σταθερές, με αναδιατάξεις περιορισμένες στα γονίδια tRNA (Grande, Templado, & Zardoya, 2008).

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες έχουν κάνει προσπάθειες ανακατασκευής της φυλογένεσης των Naticidae χρησιμοποιώντας μοριακά δεδομένα. Αυτές οι ανακατασκευασμένες φυλογονίες υποστήριξαν ορισμένες ταξινομήσεις βασισμένες στη μορφολογία (Huelsen et al., 2012), επιτρέποντας την επιβεβαίωση πολλών στενά συγγενών γενών εντός των Naticidae, όπως οι *Polinice* και *Mammilla*. Ωστόσο, εξακολουθεί να λείπει συναίνεση για τις φυλογενετικές σχέσεις εντός των Naticidae, λόγω αντιφατικών αποτελεσμάτων σε προηγούμενες μελέτες (Kang et al., 2018). Μια ισχυρή μοριακή φυλογένεση θα μπορούσε να βοηθήσει πολύ στην κατανόηση των εξελικτικών σχέσεων των μεγάλων γενεαλογικών γραμμών και της εξέλιξης του μορφολογικού χαρακτήρα, όπως σε αυτήν την περίπτωση, η επίλυση της μονοφυλίας της υποοικογένειας και των φυλογενετικών σχέσεων εντός των Naticidae.

Τα Neogastropoda θεωρούνται μια φυσική ομάδα, σαφώς διαφοροποιημένη από άλλα Caenogastropoda. Η μονοφυλία της ομάδας είναι ευρέως αποδεκτή μεταξύ των μορφολογιών και βασίζεται σε αρκετές συναπομορφίες που σχετίζονται κυρίως με την ανατομία του πεπτικού συστήματος. Οι τρέχουσες ταξινομήσεις των Neogastropoda αναγνωρίζουν γενικά έως και έξι υπεριοικογένειες: Buccinoidea, Muricoidea, Olivoidea, Pseudolivoidea, Conoidea και Cancellarioidea. Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των υπεριοικογενειών νεογαστερόποδων που βασίζονται σε μορφολογικούς χαρακτήρες είναι μάλλον ασταθείς, για παράδειγμα, η Cancellarioidea ή η Buccinoidea έχουν εναλλακτικά προταθεί ως αδελφή ομάδα των υπόλοιπων νεογαστερόποδων. Πολύ συχνά η αναγνώριση των αδελφών ειδών βασίζεται στη λεγόμενη μη παραδοσιακή ταξινόμηση, η οποία αντλεί ενδείξεις από τη γενετική, την οικολογία, την ιστορία της ζωής, τη

συμπεριφορά και το χρώμα (Jackson 1994 ). Το χρώμα, ιδιαίτερα, και ιδιαίτερα το μοτίβο του, μπορεί μερικές φορές να είναι έντονα διαγνωστικά στην αναγνώριση ειδών (Knowlton, 1996).

Οι διαφοροποιήσεις ως προς την επιλογή του βιοτόπου που διαβιούν τα διάφορα είδη είναι επίσης πιθανό, να επηρεάζονται και από τον ανταγωνισμό και τη θήρευση (Fehér Z. Et al. 2018). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η μορφολογία του κελύφους ίσως να επηρεάζεται από την παρουσία ή όχι άλλων ειδών στο οικοσύστημα (Chiba S. & Davidson A. 2007), όπως επίσης και από την ανθρωπογενή δραστηριότητα (Abu-Bakar SB. et al. 2014). Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε ο συσχετισμός αβιοτικών παραγόντων που σχετίζονται με το ενδιαίτημα και ενός μορφολογικού με τη γενεαλογία των ειδών, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την διατήρηση των ειδών και πως οι κλιματικές συνθήκες επηρεάζουν τα είδη. Ωστόσο, το φύλο Mollusca εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία και υπάρχουν αρκετά άλλα χαρακτηριστικά που μπορούμε να ελέγξουμε για παρόμοιο σκοπό.

Συγκρίνοντας λοιπόν, παρόμοια μοτίβα από μελέτες που έχουν γίνει σε άλλα είδη δίθυρων και γαστεροπόδων, σε συνδυασμό και με τη σύγκριση της γενεαλογίας βάση μιτοχρονδιακών γονιδίων, μπορούμε να εξάγουμε και τα ανάλογα συμπεράσματα κάθε φορά, ελέγχοντας μια σειρά αβιοτικών παραγόντων που μαρτυράνε πολλά σχετικά με την διατήρηση αλλά και τον έλεγχο των ειδών στο θαλάσσιο περιβάλλον.

## **5. Παράρτημα**

### **Παρουσίαση των δίθυρων:**

**Ομοταξία :** Bivalvia - **Τάξη:** Adapedonta - **Οικογένεια:** Pharidae



1) **Είδος:** Αμμοσωλήνας, *Ensis siliqua* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Ανατολικός Ατλαντικός και Μεσόγειος Θάλασσα.



**Ομοταξία :** Bivalvia - **Τάξη:** Venerida - **Οικογένεια:** Veneridae

2) **Είδος:** Γυαλιστερή, *Callista chione* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Ανατολικός Ατλαντικός και Μεσόγειος Θάλασσα.



**Ομοταξία :** Bivalvia - **Τάξη:** Margaritidae - **Οικογένεια:** Margaritidae

3) **Είδος:** *Pinctada radiata* (Leach, 1814)



**Κατανομή:** Ινδο-Ειρηνικός και Μεσόγειος Θάλασσα

**Ομοταξία :** Bivalvia - **Τάξη:** Pectinida - **Οικογένεια:** Spondylidae

4) **Είδος:** Βασιλικό στρείδι, *Spondylus gaederopus* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Δυτικός Ινδικός Ωκεανός και Μεσόγειος Θάλασσα(Τουρκία και Ελλάδα).



**Ομοταξία:** Bivalvia - **Τάξη:** Arcida - **Οικογένεια:** Arcidae

5) **Είδος:** Καλόγνωμη, *Arca noae* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Ανατολικός Ατλαντικός και Μεσόγειος Θάλασσα.



**Ομοταξία:** Bivalvia - **Τάξη:** Venerida - **Οικογένεια:** Veneridae

6) **Είδος:** Κυδώνι, *Venus verrucosa* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Ανατολικός Ατλαντικός, Μεσόγειος Θάλασσα και Δυτικός Ινδικός Ωκεανός.



**Ομοταξία:** Bivalvia - **Τάξη:** Cardiida - **Οικογένεια:** Cardiidae

7) **Είδος:** *Acanthocardia tuberculata tuberculata* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Μεσόγειο Θάλασσα και στον Βορειοανατολικό Ατλαντικό Ωκεανό.



**Ομοταξία:** Bivalvia - **Τάξη:** Cardiida - **Οικογένεια:** Solecurtidae

8) **Είδος:** Σαμάρι, *Solecurtus strigilatus* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Ανατολικός Κεντρικός Ατλαντικός και Μεσόγειος(Κονγκό και Ελλάδα).

Πηγή εικόνας: wikipedia.org



**Ομοταξία:** Bivalvia - **Τάξη:** Mytilida - **Οικογένεια:** Mytilidae

9) **Είδος:** Πετροσωλήνα, *Lithophaga lithophaga* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Μεσόγειος θάλασσα



**Ομοταξία:** Bivalvia - **Τάξη:** Venerida - **Οικογένεια:** Veneridae

**10) Είδος:** Μικρή γυαλιστερή, *Venerupis aurea* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Βορειοανατολικός Ατλαντικός και Μεσόγειος Θάλασσα.



**Ομοταξία:** Bivalvia - **Τάξη:** Ostreida - **Οικογένεια:** Pinnidae

**11) Είδος:** Πίννα, *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Μεσόγειος και Μαύρη Θάλασσα



**Ομοταξία:** Bivalvia - **Τάξη:** Mytilida - **Οικογένεια:** Mytilidae

**12) Είδος:** Μύδι Ατλαντικού, *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Κοσμοπολιτικό είδος



**Ομοταξία:** Bivalvia - **Τάξη:** Pectinida - **Οικογένεια:** Pectinidae

**13) Είδος:** Γυαλιστερό Χτένι, *Flexorpecten sp.* (Linnaeus, 1758)



**Κατανομή:** Ανατολικός Ατλαντικός, Μεσόγειος και Μαύρη Θάλασσα (Πορτογαλία έως Μαρόκο).

**Ομοταξία:** Bivalvia - **Τάξη:** Pectinida - **Οικογένεια:** Pectinidae

**14) Είδος:** Χτένι, *Pecten jacobaeus* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Ανατολικός Ατλαντικός και Μεσόγειος Θάλασσα(από την Πορτογαλία έως



τα Κανάρια Νησιά, το νησί των Αζορών και στη συνέχεια ανατολικά στον Λίβανο).

**Ομοταξία:** Gastropoda - **Τάξη:** Littorinimorpha - **Οικογένεια:** Tonnidae

**15) Είδος:** Κοχύλα, *Tonna galea* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Ινδο-Ειρηνικός, Ατλαντικός Ωκεανός και Μεσόγειος Θάλασσα.



**Ομοταξία:** Gastropoda - **Τάξη:** Littorinimorpha - **Οικογένεια:** Naticidae

**16) Είδος:** *Naticarius stercusmuscarum* (Gmelin, 1791)

**Κατανομή:** Μεσόγειο Θάλασσα και στη Βορειοδυτική Αφρική.



**Ομοταξία:** Gastropoda - **Τάξη:** Trochida - **Οικογένεια:** Trochidae

**17) Είδος:** *Monodonta articulata* (Lamarck, 1822)

**Κατανομή:** Ισπανία, Πορτογαλία και Μεσόγειο Θάλασσα.



**Ομοταξία:** Gastropoda - **Τάξη:** Littorinimorpha - **Οικογένεια:** Cypraeidae

**18) Είδος:** *Luria lurida* (Linnaeus, 1758)





**Κατανομή:** Μεσόγειος θάλασσα.

**Ομοταξία:** Gastropoda - **Τάξη:** Littorinimorpha - **Οικογένεια:** Cassidae

**19) Είδος:** *Galeodea echinophora* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Μεσόγειος θάλασσα.



**Ομοταξία:** Gastropoda - **Τάξη:** Neogastropoda - **Οικογένεια:** Muricidae

**20) Είδος:** *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Ανατολικός Ατλαντικός και Μεσόγειος(από τη Γαλλία μέχρι την Ισπανία, την Πορτογαλία, το Μαρόκο, τη Μαδέρα και τα Κανάρια Νησιά, συμπεριλαμβανομένης της Μεσογείου).



**Ομοταξία:** Gastropoda - **Τάξη:** Neogastropoda - **Οικογένεια:** Muricidae

**21) Είδος:** Ακανθωτός στρόμπος, *Bolinus bandaris* (Linnaeus, 1758)

**Κατανομή:** Ανατολικός Ατλαντικός και Μεσόγειος (από την Πορτογαλία έως το



κεντρικό Μαρόκο στον Ατλαντικό και ανατολικά στον Λίβανο). Εισήχθη στον Ατλαντικό (Ισπανία).

**Ομοταξία:** Gastropoda - **Τάξη:** Cephalaspidea - **Οικογένεια:** Bullidae

**22) Είδος:** *Bulla arabica* (Malaquias & Reid, 2008)

**Κατανομή:** Δυτικός Ινδικός Ωκεανός και Μεσόγειος Θάλασσα.



**Ομοταξία:** Gastropoda - **Τάξη:** Neogastropoda - **Οικογένεια:** Muricidae

**23) Είδος:** *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1767)

**Κατανομή:** Δυτικού Ατλαντικού Ωκεανού, Ανατολικό Ατλαντικό και Μεσόγειος Θάλασσα.



### Αλληλουχία 16S

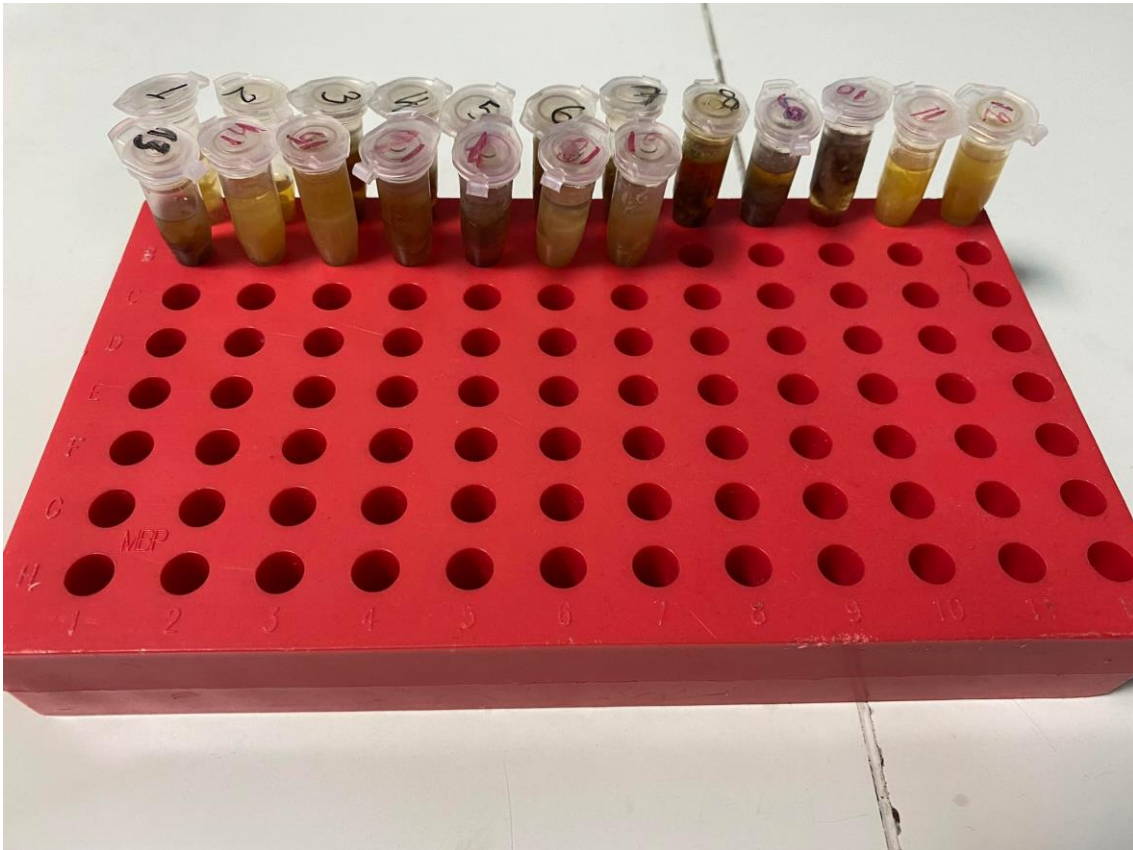
Από τις αλληλουχίες 16S έχουν παρθεί από την πλατφόρμα National Center for Biotechnology Information, μόνο η αλληλουχία του είδους *Solecurtus strigilatus* που δεν υπήρχε στην πλατφόρμα, έγινε εξαγωγή του DNA στο εργαστήριο του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας.

Αλληλουχία 16S δίθυρου *Solecurtus strigilatus*:

>*Solecurtus strigilatus*

```
CTGCTACACCTGATAGGAATCCTGATTCAACATCGAGGTCGCAAACCCCCC  
TCAAATATGACCTTGACAGAGAGATTGCGCTGTTATCCCTGTGGTAACTATC  
TTCTTCTTACCAGCCATGCTGGGTCAGCACCAAATAAGAAGGTATTATTCTC  
CCTTCCTTTCAACCCCGAAAAACATACCCAATAAGCCAAATCAGACTTAA  
GTATAACAAGCTCAACAGGGTCTTCTCGTCTAATAAACTAATCTAAGCCTTT
```

GCACCTTAGAGGTAAAATTCAAACATTACCACCAATAAAGCTTCTCCATCAT  
CCGACCATTTCATACCTTTCCCAATTAAAGGACGACCTATTACGCTACCTT



**Εικόνα παραρτήματος 1: Τα δείγματα μας**

## **Βιβλιογραφία**

### **Ξένη Βιβλιογραφία**

Ameri E., Giannetti G., Antolini B. (1998). Age determination and growth of *Venus verrucosa* L. (Bivalvia: Veneridae) in the southern Adriatic and the Aegean Sea. p. 13-198

Ayache, N., Hmida, L., Cardoso, J., Haouas, Z., Costa, F. and Romdhane, M., 2016. Reproductive Cycle of the Razor Clam *Solen marginatus* (Pulteney, 1799) in the Southern Mediterranean Sea (Gulf of Gabes, South Tunisia).

Bayne, B. L., J. Widdows and R. J. Thompson: Physiological integrations. In: Marine mussels, pp 261–299. Ed. by B. L. Bayne. Cambridge: Cambridge University Press 1976

Bagur, M., Richardson, C., Gutierrez, J., Arribas, L., Doldan, M. and Palomo, M., 2013. Age, growth and mortality in four populations of the boring bivalve *Lithophaga patagonica* from Argentina. pp.49-56.

Beaumont AR, Zouros E (1991) Genetics of scallops. In: Shumway SE, ed. Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. (New York, NY: Elsevier Science B.V.), pp 585–623.

Beaumont AR, Turner G, Wood AR, Skibinski DOF (2004) Hybridisations between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* and performance of pure species and hybrid veliger larvae at different temperatures. *J Exp Mar Biol Ecol* 302: 177–188

Bendezu, I., Slater, J. and Carney, B., 2005. Identification of *Mytilus* spp. and *Pecten maximus* in Irish Waters by Standard PCR of the 18S rDNA Gene and Multiplex PCR of the 16S rDNA Gene. pp.687-696.

Bouzaidi, H., Haroufi, O., Khaili, A., Fanichi, C., Maatouk, M., El-Moumni, B. and Daoudi, M., 2020. Stock assessment and spatial distribution of the smooth clam *Callista chione* (Linnaeus, 1758) exploited in the occidental Mediterranean Sea of Morocco

Butler, A., Vicente, N., De Gaulejac, B. (1993). Ecology of the pteriod bivalves *P. nobilis bicolor* Gmelin and *P. nobilis* L. *Marine Life*, 3(1–2), 37–45.

Bresler V., Abelson A., Fishelson L., Feldstein T., Rosenfeld M., Mokady O. (2003). Marine molluscs in environmental monitoring. I. Cellular and molecular responses. Helgoland Marine Research, Volume 57, Issue 3-4, pp. 157-165

Canapa A, Barucca M, Marinelli A, Olmo E (2000) Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). J Mol Evol 50:93–97

Canapa, A., Schiaparelli, S., Marotta, I. and Barca, M., 2003. Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Veneridae (Mollusca: Bivalvia).

Cunha, R., Grande, C. and Zardoya, R., 2009. Neo gastropod phylogenetic relationships based on entire mitochondrial genomes

Centoducati, G., Tarsitano, E., Bottalico, A., Marvulli, M., Lai, O. and Crescenzo, G., 2007. Monitoring of the Endangered *Pinna nobilis* Linné, 1758 in the Mar Grande of Taranto (Ionian Sea, Italy).

Colsoul, B., Boudry, P., Pérez-Parallé, M., Cetinić, A., Hugh-Jones, T., Arzul, I., Mérour, N., Wegner, K., Merk, V., Peter, C. and Pogoda, B., 2021. Sustainable large-scale production of European flat oyster (*Ostrea edulis*) seed for ecological restoration and aquaculture: a review.

Derbali, A., ELHASNI, K., Jarboui, O. and Ghorbel, M., 2012. Distribution, abundance and biological parameters of *Cerastoderma glaucum* (Mollusca: Bivalvia) along the Gabes coasts (Tunisia, Central Mediterranean).

DERBALI, A., HADJ TAIEB, A., KAMMOUN, W., JARBOUTI, O. and GHORBEL, M., 2022. Mapping stocks and population structure of the cockle *Cerastoderma glaucum* in the littoral zone of Sfax (Tunisia, Central Mediterranean).

Dybern, B. I., H. Ackefors and R. Elmgren (eds.): Recommendation on methods for marine biological studies in the Baltic Sea. The Baltic Marine Biologists Publ. 1, 1–98 (1976)

Garcia- March J.R., Garcia-Carrascosa A.M., Pena Cantero A.L., Wang Y.G. (2006). Population structure, mortality and growth of *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 (Mollusca, Bivalvia) at different depths in Moraira bay. Research Article.

Galinou-Mitsoudi, S., Vlahavas, G. and Papoutsi, O. (2006). Population study of the protected bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) in Thermaikos Gulf (North Aegean Sea). Journal of Biological Research. 5: 47–53.

Garcia-Escarzaga, A. and Gutierrez-Zugasti, I., 2019. Growth patterns of the topshell *Phorcus lineatus* (da Costa, 1778) in northern Iberia deduced from shell sclerochronology.

Ghobashy, A., Yassien, M. and AbouElmaaty, E., 2017. Growth and Morphometric Characteristic of the Bivalve *Callista chione* Population in Timsah Lake, Suez Canal, Egypt.

Gutierrez-Zugasti, I., Garcia-Escarzaga, A., Martin-Chivelet, J. and Gonzalez-orales, M., 2015. Determination of sea surface temperatures using oxygen isotope ratios from *Phorcus lineatus* (Da Costa, 1778) in northern Spain: Implications for paleoclimate and archaeological studies.

Govedich, F., Bain, B., Moser, W., Gelder, S., Davies, R. and Binkhorst, R., 2010. Chapter 12 - Annelida (Clitellata): Oligochaeta, Branchiobdellida, Hirudinida, and Acanthobdellida.

Guidetti P., Boero F. (2004). Desertification of Mediterranean rocky reefs caused by date mussel *Lithofaga lithofaga* (Mollusca: Bivalvia), fishery: effects on adult and juvenile abundance of a temperate fish. *Marine Pollution Bulletin* 48:978-982

Harger, J. R. E.: Comparisons among growth characteristics of two species of sea mussel, *Mytilus edulis* and *M. californianus*. *Veliger* 13, 44–56 (1980)

Hiebenthal, C., Philipp, E., Eisenhauer, A. and Wahl, M., 2012. Interactive effects of temperature and salinity on shell formation and general condition in Baltic Sea *Mytilus edulis* and *Arctica islandica*.

Jørgensen, C. B.: Growth efficiencies and factors controlling size in some mytilid bivalves, especially *Mytilus edulis* L. Review and interpretation. *Ophelia* 15, 175–192 (1976).

Jelesias, J. and Navarro, E., 1990. SHELL GROWTH OF THE COCKLE *CERASTODERMA EDULE* IN THE MUNDACA ESTUARY (NORTH SPAIN). pp.229-238.

Kaufman, A. and Magaritz, M., 2016. The Climatic History of the Eastern Mediterranean as Recorded in Mollusk Shells.

Kautsky, N., 1982. Growth and size structure in a baltic *Mytilus edulis* population.

Katsanevakis, S. (2005). Population ecology of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* in a marine lake. *Endangered Species Research*, 1, 1–9.

Kautsky, N.: On the role of the blue mussel *Mytilus edulis* L. in the Baltic ecosystem. Thesis summary. Univ. Stockholm, Sweden 1–22 (1981b)



Ivell, r., 1979. The biology and ecology of a brackish lagoon bivalve, *Cerastoderma glaucum* Bruguière, in lagoon lungo, Italy. PP.364-382.

Lapema R. (2004). The identity of *Yoldia micrometrica* Sequenza, 1877 and three new deep-sea, protobrands from the Mediterranean (Bivalvia). *Journal of natural history*, 38 p.1045-1057.

Marshall, C. and Wilson, E., 2008. Great scallop (*Pecten maximus*).

Morvezen, R., Charrier, G., Boudry, P., Chauvaud, L., Breton, F., Strand, Ø. and Laroche, J., 2015. Genetic structure of a commercially exploited bivalve, the great scallop *Pecten maximus*, along the European coasts.

Moura, P., Gaspar, M. and Monteiro, C., 2009. Age determination and growth rate of a *Callista chione* population from the southwestern coast of Portugal.

Metaxatos A. (2004). Population dynamics of the venerid bivalve *Callista chione* in a coastal area of the eastern Mediterranean. *Journal of Sea Research*.

Morrow, L. and Yonge, C., 1964. *Physiology of Mollusca*.

MUTLU, E. and ERGEV, M., 2011. Distribution of soft-bottom mollusks (Mollusca) in Mersin Bay (eastern Mediterranean Sea).

Nikula, R. and Vainola, R., 2002. Phylogeography of *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia: Cardiidae) across Europe: a major break in the Eastern Mediterranean.

Rabaoui, L., Tlig-Zouari, S. and Hassine, O., 2012. Morphometry and weight characterization of *Pinnaculus* (Mollusca: Bivalvia) along the northern and eastern Tunisian coastline.

Richardson, C. A., Kennedy, H., Duarte, C. M., Kennedy, D. P., & Proud, S. V. (1999). Age and growth of the fan mussel *Pinna nobilis* from south-east Spanish Mediterranean seagrass (*Posidonia oceanica*) meadows. *Marine Biology*, 133, 205–212.

Ruiz, M., Darriba, S., Rodríguez, R. and López, C., 2015. *Marteilia* sp. and other parasites and pathological conditions in *Solen marginatus* populations along the Galician coast (NW Spain).

Shahidul, I., & Masaru, T. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: A review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 624–649.

Šiletić, T., & Peharda, M. (2003). Population study of the fan shell *Pinna nobilis* L. in Malo and Veliko Jezero of the Mljet National Park (Adriatic Sea). *Scientia Marina*, 67(1), 91–98.

Silva, P., Fuentes, J. and Villaba, A., 2005. Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain).

Scott, P., 1988. Distribution, habitat and morphology of the caribbean coral- and rock-boring bivalve, *lithophaga bisulcata* (D'orbigny) (Mytilidae: lithophaginae). pp.83-95.

Slynko, Y., Slynko, E., Schurov, S. and Ryabushko, V., 2020. The Black Sea *Flexopecten* species-complex (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae): Shell morphology and 16S rDNA variation.

Sukhotin, A., Strelkov, P., Maximovich, N. and Hummel, H., 2007. Growth and longevity of *Mytilus edulis* (L.) from northeast Europe. pp. pages 155-167.

Tlig-Zouari, S. and Zaouali, J. (1994). Croissance individuelle et saisonnière de *Pinna nobilis* dans les îles Kerkennah. Bull. Soc. Sci. Nat. Tunisie. 23: 69-74.

Wang, Y., Yang, Y., Liu, H., Kong, L., Yu, H. and Li, Q., 2020. Phylogeny of Veneridae (Bivalvia) based on mitochondrial genomes.

Zavodnik, D. (1967). Contribution to the ecology of *P. nobilis* L. (Moll., Bivalvia) in the northern Adriatic. Thalassia Jugoslavica, 3(1–6), 93–103.

2022. Phylogeny and Classification of Extant Gastropoda. [ebook] Available at: <<https://www.digitalatlasofancientlife.org/learn/mollusca/gastropoda/phylogeny-and-classification/>> [Accessed 2 April 2022].

### **Ελληνική Βιβλιογραφία**

Μαλλιός, Ν., 2009. Τα δίθυρα (μαλάκια) των ελληνικών θαλασσών. Βόλος.

Ποικιλότητα Θαλάσσιων Οργανισμών. Πανεπιστήμιο Αιγαίου.

Ρούσος, Χ., 2010. Επίδραση συμβατικής και βιολογικής υδατοκαλλιέργειας στη βενθική μαλακοπανίδα στην περιοχή της Λάρυμνας. Βόλος.

Το υποβρύχιο φωτογραφικό υλικό με τους θαλάσσιους οργανισμούς έχει παρθεί από το βιβλίο «Ο κόσμος της θάλασσας» με ISBN: 9789605714390

### **ABSTRACT**

In the present study, the phylogenetic tree was constructed from species of marine gastropods and bivalves found in the region of the southern Gulf of Evia, using the mitochondrial gene 16S as a molecular marker. Undoubtedly, abiotic factors, such as

light, oxygen, pH, temperature, and others, affect the survival, distribution and abundance of benthic species in a specific area. The *Solecurtus strigilatus* was used for the bivalves to extract the DNA during the experimental part, while for the creation of the tree, sequences of the species *Ensis siliqua*, *Callista chione*, *Pinctada radiata*, *Spondylus gaederopus*, *Arca noae*, *Venus verrucosa*, *Acanthocardia tuberculata*, *Solecurtus strigilatus*, *Lithophaga lithophaga*, *Pinna nobilis*, *Mytilus edulis*, *Flexopecten sp.*, *Pecten jacobaeus* and *Venerupis aurea*. *Thais haemastoma*, *Bulla arabica*, *Bolinus bandaris*, *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus*, *Galeodea echinophora*, *Monodonta articulata*, *Luria lurida* and *Tonna galea* were used to create the marine gastropod tree. The aim of this study was to check through phylogenetic relationships whether the gastropods and bivalves families from the region of interest follow the pattern of group together depending on abiotic parameters such as habitat and morphology. The results initially showed that the families Solecurtidae, Veneridae, Zonitidae, Solenidae, Cardiidae and Mactridae were grouped based on abiotic factors, however in the final grouping where the genealogy was taken into account, seven different groups were formed. During the grouping of the gastropods where the genealogy was taken into account, four different groups were formed consisting of the families Bullida and Muricidae the first Cassidae, Naticidae and Trochidae the second, Tonnidae the third and Cypraeidae the fourth different group.

Keywords: phylogenetic analysis, gastropods, bivalves, abiotic factors, grouping of families, southern Evian gulf