

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανάπτυξη στατιστικών μεθόδων στην πληθυσμιακή γενετική
ανάλυση του θαλάσσιου φανερόγαμου, *Cymodocea nodosa*»**

Γεώργιος Οικονόμου

ΒΟΛΟΣ 2011

**«Ανάπτυξη στατιστικών μεθόδων στην πληθυσμιακή γενετική ανάλυση του
θαλάσσιου φανερόγαμου, *Cymodocea nodosa*»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετικής Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπων***,
- 2) **Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Μόνιμη Επίκουρος Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***,
- 3) **Δημήτριος Βαφείδης**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπόνδυλων και άμεση – έμμεση χρησιμότητά τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***.

Στους Γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους βοήθησαν και συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας και κυρίως σε όλη μου την οικογένεια για την ηθική και υλική συμπαράσταση καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Επίκουρο Καθηγητή κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, κα Παναγιώτα Παναγιωτάκη και κ. Δημήτριο Βαφείδη για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλη την ομάδα του εργαστηρίου Γενετικής, κ. Ζαμπούνη Αντώνιο, κ. Μαλανδράκη Εμμανουήλ, κ. Παλαιοκόστα Χρήστο, κ. Μαρτσικάλη Πέτρο και κ. Κάβουρα Μενέλαο για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα θαλάσσια φανερόγαμα είναι θαλάσσια ανθοφόρα φυτά που αναπαράγονται αγενώς, μέσω της επέκτασης των κλώνων τους ή εγγενώς μέσω ανταλλαγής γαμετών. Κατέχουν σημαντικό ρόλο στα θαλάσσια οικοσυστήματα καθώς οι λειμώνες αυτοί εξασφαλίζουν πρωτογενή και δευτερογενή παραγωγή, αποτελούν περιοχές ωοτοκίας και για πολλά είδη νηπιακές περιοχές και κατέχουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαγνωσθούν ή να προβλεφθούν, αρνητικές επιδράσεις από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες και τις φυσικές διεργασίες επειδή οι οργανισμοί αυτοί είναι ευαίσθητοι σε περιβαλλοντικές αλλαγές, καθώς βρίσκονται στα πρώτα στάδια της τροφικής αλυσίδας, και αντιδρούν γρηγορότερα στην παρουσία ρύπων απ' ό τι αντιδρούν οργανισμοί ανώτερων τροφικών επιπέδων της τροφικής αλυσίδας.

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε το θαλάσσιο φανερόγαμο *Cymodocea nodosa*, που ευδοκimeί στη Μεσόγειο θάλασσα, ένα δίοικο θαλάσσιο αγγειόσπερμο που η ανάπτυξή του εξαρτάται από τη βλάστησή του, με αποτέλεσμα αυτό να αποδίδει μια εκτεταμένη μορφολογική πλαστικότητα. Για το είδος αυτό ερευνήθηκε η γενετική ποικιλότητα και η γονιδιακή ροή σε επτά περιοχές, που βρίσκονται σε δύο κόλπους στο Αιγαίο πέλαγος (Παγασητικό και Τορωναίο), με την μέθοδο Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs). Για τη μελέτη έγινε ενίσχυση τεσσάρων γενετικών τόπων, ITSA, ITSB, 18S και 23S, με τη μέθοδο της PCR. Έπειτα χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα περιοριστικά ένζυμα, AluI, RsaI, HaeIII και EcoR1, για την πλήρη χώνευση (RFLPs) των προϊόντων της PCR. Στα προϊόντα των RFLPs έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης ανά γενετικό τόπο και περιοχή. Έγινε λήψη φωτογραφιών των

ηλεκτροφορημένων προϊόντων των RFLPs με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), απ' όπου έγινε σκοράρισμα της απουσίας ή παρουσίας αλληλόμορφων σύμφωνα με το μέγεθος των κομματιών του DNA, χρησιμοποιώντας το λογισμικό UVIDoc Mw package, σε σύγκριση με μάρτυρες μοριακών μεγεθών DNA. Τα αποτελέσματα που εξήχθηκαν επεξεργάστηκαν με τα προγράμματα REAP 4.0, GenAlex, Arlequin, XLSTAT και PHYLIP 3.57C.

Από την επεξεργασία με τη χρήση αυτών των προγραμμάτων, προέκυψε ότι στους πληθυσμούς υπάρχουν 12 διαφορετικοί απλότυποι οι οποίοι κατανέμονται μη ομοιόμορφα στους διαφορετικούς πληθυσμούς, όπως φάνηκε από τις συχνότητές τους και από τα φυλογενετικά δένδρα που δημιουργήθηκαν. Ο πιο πολυμορφικός γενετικός τόπος βρέθηκε ότι ήταν ο ITSΒ. Σε όλους τους πληθυσμούς βρέθηκε ότι δεν υπήρχε ισορροπία Hardy-Weinberg. Επίσης επιβεβαιώθηκε η μικρή γονιδιακή ροή που υπάρχει ανάμεσα στους πληθυσμούς που μελετήθηκαν, από την ανάλυση AMOVA που έγινε και από τον υπολογισμό των τιμών F_{ST} , ολική (0,74771) και μεταξύ των πληθυσμών (έως και 0,89655). Από την ανάλυση Mantel που έγινε δε βρέθηκε κανένας συσχετισμός μεταξύ της γενετικής διαφοροποίησης και της γεωγραφικής απόστασης μεταξύ των πληθυσμών.

Η χωρική διαφοροποίηση είναι πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες ενδεχομένως δρούν ως εκλεκτικές πιέσεις. Επίσης, πιθανόν οι διαφοροποιήσεις αυτές να οφείλονται στη γεωμορφολογία του πυθμένα της θάλασσας, η οποία περιορίζει τη σεξουαλική αναπαραγωγή και διασπορά του είδους. Ο έλεγχος των παραπάνω υποθέσεων έγινε με τον έλεγχο Tajima.

Τελικά, η μελέτη αυτή υποστήριξε την ύπαρξη ευδιάκριτων προτύπων διαφοροποίησης των πληθυσμών του *C. nodosa*, που στις περισσότερες περιπτώσεις

μας υποδεικνύει ότι οι πληθυσμοί βρίσκονται κάτω από φυσικές πιέσεις και έχουν χαμηλή ικανότητα μετανάστευσης. Επίσης, βγήκε το συμπέρασμα ότι η σεξουαλική αναπαραγωγή έχει σημαντική συμβολή στη διατήρηση των πληθυσμών του *C. nodosa* στο βόρειο Αιγαίο πέλαγος.

Λέξεις κλειδιά: *C. nodosa*, RFLPs, Αιγαίο πέλαγος, γενετική ποικιλότητα, γονιδιακή ροή

Keywords: *C. nodosa*, RFLPs, Aegean Sea, genetic diversity, gene flow

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Θαλάσσια φανερόγαμα.....	1
1.2 <i>Cymodocea nodosa</i>	2
1.3 <i>C. nodosa</i> ως βιοδείκτης.....	6
1.4 Γενετική των θαλάσσιων φανερόγαμων και του <i>C. nodosa</i>	7
1.5 Σκοπός της εργασίας	10
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	11
2.1 Δειγματοληψία.....	11
2.2 Απομόνωση DNA	11
2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA	14
2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	15
2.5 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs).....	19
2.6 Επεξεργασία δεδομένων	19
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	21
3.1 Αποτελέσματα	21
3.1.1 Απλότυποι.....	21
3.1.2 Συχνότητες αλληλόμορφων	24

3.1.3	Αναμενόμενη Ετεροζυγωτία.....	33
3.1.4	AMOVA.....	35
3.1.5	Γενετικές Αποστάσεις N_{ei}	36
3.1.6	F_{st}	37
3.1.7	Tajima's Test	38
3.1.8	Ανάλυση PCA.....	39
3.1.9	Ισοροπία Hardy-Weinberg.....	40
3.1.10	Mantel test	41
3.1.11	Φυλογενετικά Δένδρα	42
3.2	Συζήτηση.....	46
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	51
	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	52
	ABSTRACT	58

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Θαλάσσια φανερόγαμα

Τα θαλάσσια φανερόγαμα είναι θαλάσσια ανθοφόρα φυτά ικανά να καταλαμβάνουν χώρο μέσω του ριζώματός τους (Hemminga & Duarte 2000). Τα λιβάδια θαλάσσιων φανερόγαμων είναι υψηλής παραγωγικότητας παράκτια οικοσυστήματα (Bay 1984), που σχηματίζουν φυσικές κατασκευές οι οποίες εξασφαλίζουν μεγάλη βιοποικιλότητα, βιομάζα, πρωτογενή και δευτερογενή παραγωγή (Duarte & Chiscano 1999; Duffy 2006). Κατέχουν σημαντικό ρόλο στην τροφική αλυσίδα καθώς αποτελούν πηγή τροφής ακόμα και για μεγάλα φυτοφάγα ζώα όπως η πράσινη θαλάσσια χελώνα, θαλάσσιες αγελάδες και θαλάσσιοι ελέφαντες, και αποτελούν ένα κρίσιμο ενδιαίτημα για πολλούς θαλάσσιους οργανισμούς καθώς τα λιβάδια αυτά αποτελούν περιοχές φωτοκίας και για πολλά είδη νηπιακές περιοχές (Orth et al. 2006).

Αναπτύσσουν οριζόντιους ριζοειδείς βλαστούς μέσα στα ιζήματα, από τους οποίους εκβλαστάνουν ανορθωμένοι βλαστοί. Τα άνθη των θαλάσσιων αγγειόσπερμων είναι πολύ μικρά, η γύρη που περιέχει τους αρσενικούς γαμέτες συχνά απελευθερώνεται με τη μορφή νημάτων και μεταφέρεται από τα θαλάσσια ρεύματα. Οι μικροσκοπικοί σπόροι, που σε ορισμένα είδη αναπτύσσονται μέσα σε μικρούς καρπούς, είναι το αποτέλεσμα επιτυχημένης γονιμοποίησης και διασπείρονται κυρίως μέσω των θαλάσσιων ρευμάτων και από τα απεκκρίματα των οργανισμών που τρέφονται με τα φυτά αυτά (Castro & Huber 1999).

Τα φανερόγαμα κατέχουν σημαντικό ρόλο στα οικοσυστήματα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαγνωσθούν ή να προβλεφθούν, αρνητικές επιδράσεις από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες και τις φυσικές διεργασίες. Επίσης οι βιοχημικές αντιδράσεις και οι μηχανισμοί προσαρμογής ή η θνησιμότητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της ποιότητας του οικοσυστήματος (Ferrat et al. 2003). Οι οργανισμοί αυτοί είναι ευαίσθητοι σε περιβαλλοντικές αλλαγές, καθώς βρίσκονται στα πρώτα στάδια της τροφικής αλυσίδας, και αντιδρούν γρηγορότερα στην παρουσία ρύπων απ' ό τι αντιδρούν οργανισμοί ανώτερων επιπέδων της τροφικής αλυσίδας (Lovett Doust et al. 1994).

Στην Μεσόγειο αναπτύσσονται τα παρακάτω είδη θαλάσσιων αγγειόσπερων:

- *Zostera marina*
- *Zostera noltii*
- *Halophila stipulacea*
- *Ruppia cirrhosa*
- *Ruppia maritima*
- *Posidonia oceanica*, και
- *Cymodocea nodosa*

1.2 *Cymodocea nodosa*

Η παρούσα μελέτη ασχολήθηκε με το θαλάσσιο φανερόγαμο *C. nodosa* (Εικ. 1). Το φανερόγαμο αυτό αποτελείται από βλαστούς που φέρουν δύο έως πέντε φύλλα. Τα φύλλα έχουν πλάτος 2 - 4 mm και μήκος 10 - 45 cm. Οι βλαστοί του συνδέονται με τα κάθετα ριζώματα μέσω μικρών τμημάτων ριζωμάτων, τα οποία συνδέονται με τη σειρά τους μέσω ενός τμήματος μήκους 1 – 6 cm, σε ένα οριζόντιο ριζώμα. Οι κορυφές

του σχηματίζουν κάθετα ριζώματα και διακλαδίζονται σε νέα οριζόντια ριζώματα. Τα ριζώματα μπορούν να αναπτυχθούν έως και μερικά μέτρα το χρόνο και θεωρείται είδος που μπορεί γρήγορα να αποικίσει γυμνές περιοχές του πυθμένα της θάλασσας.

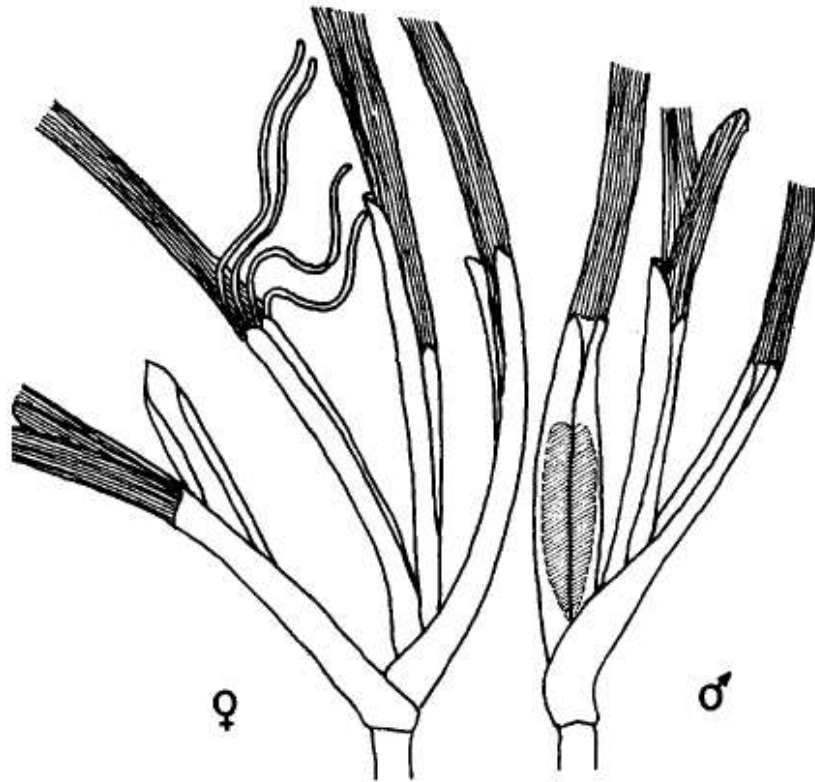


Εικόνα 1: Το θαλάσσιο αγγειόσπερμο *C. nodosa*.

(http://www.ccmар.ualg.pt/biomares/pradarias_marinhas_en.html)

Το είδος *C. nodosa* μπορεί εύκολα να αναγνωριστεί από τα κάθετα ριζώματά του και τα μακριά άσπρα-ροζ οριζόντια τμήματα του ριζώματός του (Borum & Greve 2004). Η ανθοφορία του είδους αυτού παρατηρείται μεταξύ Μάιου και Αυγούστου, άνθη παράγουν τα θηλυκά καθώς και τα αρσενικά άτομα (Εικ. 2) και το κάθε άνθος παράγει 2 σπόρους μήκους 8 mm. Οι καρποί αναπτύσσονται στη βάση του βλαστού των θηλυκών ατόμων (Caye & Meinesz 1985). Αυτό υποδηλώνει περιορισμένη

διασπορά των σπόρων που επιβεβαιώθηκε και από τις χωρικές αναλύσεις αυτοσυσχέτισης (Alberto et al. 2005).



Εικόνα 2: Άνθη του είδους *C. nodosa*, αριστερά φαίνεται το θηλυκό άνθος και δεξιά το αρσενικό άνθος.

Παρόλα αυτά, η μεγάλη απόσταση εξάπλωσης μπορεί να είναι το αποτέλεσμα σπάνιων φαινομένων διασποράς σε μεγάλες αποστάσεις, ίσως μέσω μεταφοράς των καρπών από σπασμένα ριζώματα κατά τη διάρκεια χειμερινών καταγίδων (Ruggiero et al. 2005). Το είδος αυτό ευδοκίμει στην Μεσόγειο Θάλασσα, από τις Κανάριες Νήσους έως την Βόρειο Αφρική (Εικ. 3). Δεν εξαπλώνεται βορειότερα από τις νότιες ακτές της

Πορτογαλίας και εμφανίζεται σε ρηχές ακτές έως 50 – 60 m βάθος (Borum & Greve 2004).



Εικόνα 3: Γεωγραφική εξάπλωση του *C. nodosa*.

Το *C. nodosa* είναι ένα δίοικο θαλάσσιο φανερόγαμο με πολύ μεγάλη εξάπλωση στη Μεσόγειο. Τα υποθαλάσσια λιβάδια (Εικ. 4) της *C. nodosa* δεν παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα καθώς το ρίζωμά τους είναι επιφανειακό και συχνά αντέχει μόνο μια χρονιά, δηλαδή φυτρώνει την άνοιξη και εκριζώνεται το χειμώνα. Τα λιβάδια όμως που αναπτύσσονται σε προστατευμένα μέρη είναι πυκνά και σταθερά, τα φύλλα τους φτάνουν το μισό μέτρο ύψος και η βιοκοινωνία αποκτά αξιοσημείωτη ποικιλία.

Το λιβάδι της *C. nodosa* αρχίζει συνήθως στο μισό μέτρο βάθος και φτάνει μόνο στα 5-10 μέτρα βάθος, λόγω της περιορισμένης διαύγειας των νερών στους κλειστούς κόλπους με λασπώδη βυθό (Παναγιωτίδης & Χατζημπίρος 2004).



Εικόνα 4: Λιβιάδι *C. nodosa*.

(http://doris.ffessm.fr/fiche2.asp?fiche_numero=762)

1.3 *C. nodosa* ως βιοδείκτης

Τα υποθαλάσσια λιβάδια της *C. nodosa* συνήθως δεν είναι αμιγή. Μέσα στο λιβάδι αναπτύσσονται κατά τόπους τα Χλωροφύκη *Caulerpa prolifera* και *Caulerpa racemosa* καθώς και το θαλάσσιο αγγειόσπερμο *Halophila stipulacea*. Τα είδη αυτά θεωρούνται δείκτες αστάθειας και αναπτύσσονται ευκαιριακά όταν η *C. nodosa*

υποχωρεί (Παναγιωτίδης & Χατζημπίρος 2004). Οι Bianchi & Peirano (1995) απέδειξαν ότι ο λόγος των ατόμων *C. nodosa* / *P. oceanica* αποτελεί κριτήριο της ποιότητας των υδάτων. Ο λόγος αυτός παίρνει τιμές από 0,3 σε μη ρυπασμένες περιοχές έως 0,8 σε βιομηχανικές και αστικές περιοχές. Τέλος το *C. nodosa* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την ύπαρξη ρύπανσης στο νερό από βαρέα μέταλλα όπως Cr, Cu, Ni, Al, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Na, Pb και Zn (Catsiki & Panayotidis 1993; Malea 1993; Malea & Haritonidis 1995).

1.4 Γενετική των θαλάσσιων φανερόγαμων και του *C. nodosa*

Η γενετική δομή μπορεί να οριστεί ως μιας μη τυχαία κατανομή των αλληλόμορφων γονιδίων σε μια δεδομένη χωρική κλίμακα, ως αποτέλεσμα της περιορισμένης διασποράς, της επιλογής, της γενετικής παρέκκλισης και της ιστορίας πληθυσμών. Μια σημαντική αρχή που σχετίζεται με τη διασπορά είναι η απομόνωση λόγω απόστασης, η οποία προβλέπει το αναμενόμενο πρότυπο της χωρικής γενετικής δομής (SGS) κάτω από την περιορισμένη διασπορά και την τοπική γενετική παρέκκλιση (Vekemans & Hardy 2004). Έτσι στα φανερόγαμα, όπως και σε όλα τα φυτά, η χωρική γενετική σύνθεση είναι η μη τυχαία διανομή των αλληλόμορφων γονιδίων, η οποία προκύπτει από την τοπική γενετική παρέκκλιση σε συνδυασμό με την περιορισμένη διασπορά των γαμετών τους. Επιπλέον η επικράτηση ή η διασπορά των κατ' επιλογή κατάλληλων γονιδίων ή δεικτών, μπορεί να είναι αποτέλεσμα επιλεκτικών πιέσεων που από τα ετερογενή περιβάλλοντα (Heywood 1991). Λόγο της έλλειψης διαφορετικών επιλογών και κάτω από την περιορισμένη γονιδιακή ροή, η κατά ζεύγη γονιδιακή συγγένεια μεταξύ των ατόμων μειώνεται με την αύξηση της γεωγραφικής

απόστασης, μια διαδικασία που ονομάστηκε απομόνωση λόγω αποστάσεως (Wright 1943).

Για την γενετική δομή στο είδος *C. nodosa* έχουν γίνει διάφορες μελέτες στην Μεσόγειο θάλασσα. Οι Ruggiero et al. (2005) μελέτησαν το είδος *C. nodosa* σε δείγματα προερχόμενα από τη περιοχή της Νάπολι της Ιταλίας, χρησιμοποιώντας επτά μικροδορυφορικούς τόπους και περιέγραψαν τη γενετική δομή και την κλωνική κατανομή του σε τρεις διαφορετικές χωρικές κλίμακες (από μέτρα σε εκατοστά). Μέσα από την μελέτη αυτή βρέθηκε ότι υπάρχει υψηλή κλωνική ποικιλομορφία (έως και 67% των ευδιάκριτων γενοτύπων) και μια ιδιαίτερα αναμιγμένη διαμόρφωση των γονιδίων στις διαφορετικές χωρικές κλίμακες βρέθηκαν. Καμία σημαντική διαφορά στη γενετική δομή δεν βρέθηκε μεταξύ των τριών χωρικών κλιμάκων, δείχνοντας ότι η γενετική ποικιλομορφία διανέμεται ομοιόμορφα κατά μήκος του λιβαδιού.

Οι Alberto et al. (2005) μελέτησαν τη χωρική γενετική δομή του είδους, ανάμεσα σε δύο ακτές της Ισπανίας που τις χωρίζουν περισσότερα από 1000 km ακτογραμμής, με εννιά μικροδορυφορικούς τόπους. Η γενετική αφθονία βρέθηκε 0,38 για την περιοχή του Cadiz και 0,46 για το Alfacs. Επίσης βρέθηκε εξαιρετικά περιορισμένη διασπορά γονιδίων στο Cadiz ($Sp=0,052$).

Η μελέτη της χωρικής κατανομής του *C. nodosa* στη θάλασσα του Cadiz έγινε από τους Alberto et al. (2003) σε ένα δείγμα 40 ατόμων. Χρησιμοποιήθηκαν 38 ζεύγη εκκινητών, με τους οποίους επιτεύχθηκε ενίσχυση 15 πολυμορφικών μικροδορυφορικών περιοχών. Σε αυτούς τους γενετικούς τόπους αναγνωρίστηκαν διάφορα αλληλόμορφα γονίδια, των οποίων ο αριθμός ήταν από δύο έως επτά και η αναμενόμενη ετεροζυγωτία κυμαινόταν από 0,35 – 0,76.

Στη λιμνοθάλασσα Ria Formosa στην Πορτογαλία μελετήθηκε η γενετική παραλλακτικότητα του *C. nodosa* με RAPD, όπου χρησιμοποιήθηκαν 28 εκκινητές. Η μελέτη έγινε συγκρίνοντας άτομα με ή χωρίς ανθούς. Η έλλειψη γενετικής ποικιλομορφίας, που προέκυψε από την ανάλυση και στα λιβάδια όπου υπήρχε ανθοφορία και σε αυτά όπου δεν υπήρχαν ανθοί, δείχνει ότι η παραγωγή ανθών δεν συνδέεται με ένα υψηλότερο επίπεδο γενετικής παραλλακτικότητας (Alberto et al. 2001).

Οι Alberto et al. (2006) ερεύνησαν τη γενετική ποικιλότητα στις Κανάριες Νήσους με τη χρήση μικροδορυφόρων, παίρνοντας δείγματα από έξι περιοχές. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ένας υψηλός βαθμός γενετικής αφθονίας ($R = 0.30 - 0.94$, $mean = 0.67$) και ότι όλα τα λιβάδια διαφοροποιήθηκαν το ένα από το άλλο και δεν υπήρξε κανένας συσχετισμός μεταξύ των γενετικών και γεωγραφικών αποστάσεων.

Το 2008 οι Alberto et al. μελέτησαν τη γονιδιακή ροή στη Μεσόγειο και στον Ατλαντικό Ωκεανό για το *C. nodosa* και πως αυτή επηρεάζεται από το γεωγραφικό περιορισμό (εμπόδιο) της μεταβατικής ζώνης από τον Ατλαντικό στη Μεσόγειο θάλασσα. Χρησιμοποίησαν οχτώ μικροδορυφόρους για τη σύγκριση 20 λιβαδιών του Ατλαντικού με 27 λιβάδια της Μεσογείου. Οι πληθυσμοί των δύο περιοχών παρουσίασαν διαφορετικά μοναδικά, υψηλής συχνότητας αλληλόμορφα γονίδια, εκτός από κάποια μίξη που εμφανίστηκε δυτικά του μετώπου Almeria–Oran. Σε όλους τους πληθυσμούς βρέθηκαν ένας ή μερικοί γενότυποι, εκτός από την περιοχή του Cadiz. Η εξαιρετικά χαμηλή γενοτυπική αφθονία στο Βόρειο Ατλαντικό αντιπαραβαλλόταν με τις υψηλές τιμές που παρατηρήθηκαν στο Νότιο Ατλαντικό και στο μεγαλύτερο μέρος της Μεσογείου. Οι πλέον διαφοροποιημένοι πληθυσμοί ήταν αυτοί που βρισκόταν στα

όρια των υψηλότερων θερμοκρασιών, δηλαδή στους πληθυσμούς του Νότιου Ατλαντικού και της ανατολικής Μεσογείου.

1.5 Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η γενετική ποικιλότητα και τη γονιδιακή ροή του *C. nodosa* σε επτά περιοχές που βρίσκονται σε δύο κόλπους στο βόρειο Αιγαίο πέλαγος, χρησιμοποιώντας RFLP τόπους, για να απαντηθούν οι ακόλουθες ερωτήσεις: (1) ποια είναι η έκταση της αφθονίας των απλότυπων και της γενετικής ποικιλότητας στο αρχιπέλαγος και (2) σε τι βαθμό διαφοροποιούνται οι πληθυσμοί αυτοί μεταξύ τους, ώστε να εκτιμηθεί ο ρόλος τους ως βιοδείκτες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

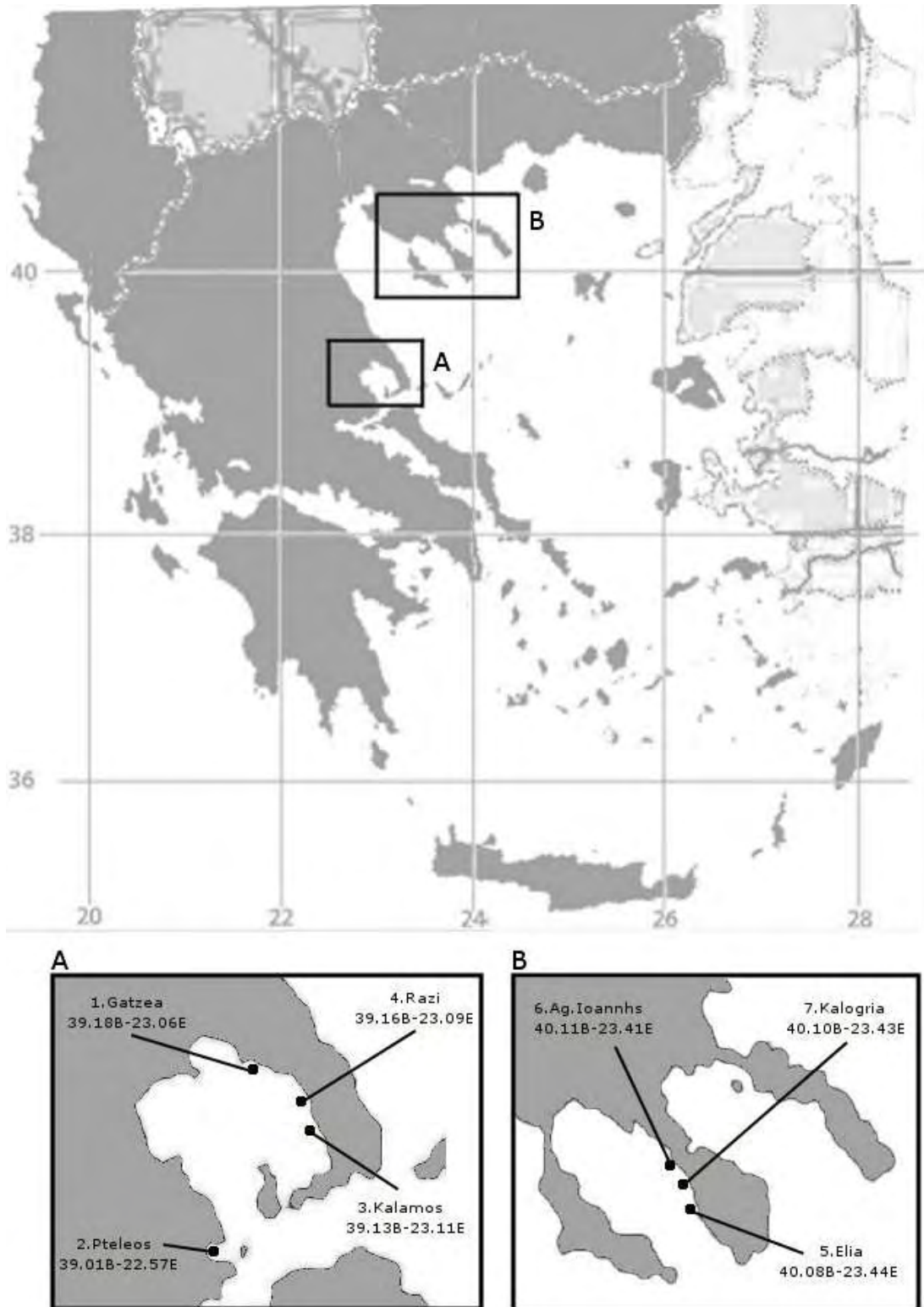
Η δειγματοληψία της μελέτης αυτής έγινε με σκοπό να μελετηθεί η κατανομή του θαλάσσιου φανερόγαμου *C. nodosa* σε δύο ξεχωριστούς κλειστούς κόλπους του Αιγαίου πελάγους, Παγασητικός και Τορωναίος (Εικ. 5). Τα δείγματα του Παγασητικού κόλπου προήλθαν από 4 περιοχές των ακτών της Μαγνησίας όπου είναι γνωστό ότι υπάρχει το είδος αυτό, από την Γατζέα, τον Πτελεό, την Κάλαμο και το Ραζί. Από τον κόλπο Τορωναίο (Χαλκιδική) πάρθηκαν δείγματα από τρεις περιοχές, στην Ελιά, στον Αγ. Ιωάννη και στην Καλογριά. Σε κάθε περιοχή οριοθετήθηκε μια έκταση 60 X 14 m, απ' όπου λήφθηκαν τυχαία 30 άτομα του είδους αυτού από δύοτες. Για το κάθε άτομο πάρθηκαν τρία με πέντε δείγματα από το ίδιο οριζόντιο ρίζωμα.

2.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του γενομικού DNA έγινε ακολουθώντας τροποποιημένη μέθοδο της κλασσικής φαινόλης/χλωροφόρμιου (Miller et al. 1988).

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι:

1. Ένα κομμάτι του δείγματος τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο Eppendorf (Biologix, BMT-15N).
2. Στο Eppendorf προστέθηκαν:
 - 500 μl TNE (10 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8)
 - 70 μl SDS περιεκτικότητας 10 %
 - 20 μl Πρωτεϊνάση K (Proteinase K) συγκέντρωσης 10 mg/l



Εικόνα 5: Περιοχές δειγματοληψίας των δειγμάτων του είδους *C. nodosa* για τη μελέτη.

3. Έγινε λιοτριβίση του ιστού με έμβολο μέσα στο μείγμα.
4. Τοποθετήθηκε το δείγμα για επώαση σε υδατόλουτρο, στους 55° C, για τουλάχιστον 2 ώρες (για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών).
5. Μετά την επώαση προστέθηκαν 600μl φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1.
6. Ανακινήθηκαν ελαφρώς για 10 λεπτά σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα (rotator) στους 40 κύκλους/min και ακολούθησε φυγοκέντριση για 10 λεπτά σε 13.000 στροφές σε θερμοκρασία 4° C για να διαχωριστούν σε 2 φάσεις.
7. Μετά τη φυγοκέντρωση απομακρύνθηκε η υπερκείμενη φάση με τη βοήθεια πιπέτας και τοποθετήθηκε σε καινούριο Eppendorf (το αρχικό Eppendorf με την κάτω φάση πετάχτηκε).
8. Στο νέο Eppendorf προστέθηκαν 400 μl χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1.
9. Ακολούθησε ανάδευση για 10 λεπτά σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα (rotator) στους 40 κύκλους/min και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά σε 13.000 στροφές σε θερμοκρασία 4° C.
10. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης αφαιρέθηκε ξανά το υπερκείμενο και τοποθετήθηκε σε τρίτο Eppendorff στο οποίο προστέθηκε ποσότητα οξικού νατρίου (Sodium acetate) συγκέντρωσης 3M, ίση με το 10% της ποσότητας του υπερκείμενου και ίσος όγκος ισοπροπανόλης με το υπερκείμενο που αφαιρέθηκε.
11. Το Eppendorff τοποθετήθηκε στους -20° C για 30 min (για τη δέσμευση του DNA σε στερεά μορφή).

12. Έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές, στους 4° C.
13. Μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίστηκε λευκό ίζημα (pellet) (στο κάτω μέρος του Eppendorff).
14. Αφαιρέθηκε προσεκτικά η αλκοόλη (χωρίς να πέσει η πελέτα) και προστέθηκε 1 ml αιθανόλη.
15. Στο δείγμα έγινε ξανά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές, στους 4° C.
16. Η αιθανόλη αφαιρέθηκε τελείως και το Eppendorf τοποθετήθηκε με ανοικτό το πώμα στον κλίβανο επώσεως για περίπου 20 λεπτά στους 40° C για να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης.
17. Έπειτα διαλύθηκε η πελέτα σε 50 μl TE και αποθηκεύτηκε σε καταψύκτη στους -20° C, μέχρι να αναλυθεί.

2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA

Μετά την απομόνωση του DNA, προκειμένου να ανιχνευθεί η ποσότητα και η ποιότητά του, έγινε ηλεκτροφόρηση και συγκρίθηκε με το μάρτυρα μοριακών μεγεθών log-2. Η ηλεκτροφόρηση έγινε με πηκτή αγαρόζης (Invitrogen) 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1% (Tris-HCl, Acetic Acid και EDTA, pH 8).

Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν:

- 100 ml TAE
- 1 g στερεής αγαρόζης, και
- 3 μl Βρωμιούχου Αιθιδίου 1%

Η στερεή αγαρόζη διαλύθηκε μέσα στο διάλυμα TAE, με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για 3 λεπτά, στους 90° C. Έπειτα προστέθηκε Βρωμιούχο Αιθίδιο 3 μl και μετά από σύντομη ανακίνηση το διάλυμα ρίχθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο, στο οποίο έχει τοποθετηθεί ειδική “χτένα” για τη δημιουργία θέσεων στις οποίες θα τοποθετούνταν τα δείγματα του DNA. Αφού έπηξε το πήκτωμα, αφαιρέθηκε η χτένα και το τοποθετήθηκε μέσα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης (SCIE-PLAS).

Από τα δείγματα του DNA φορτώθηκαν 6 μl μαζί με την προσθήκη 2 μl χρωστικής βρωμοφαινόλης (Blue-bromophenol) σε κάθε μια θέση. Η χρωστική χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των προϊόντων του DNA. Στη συνέχεια διοχετεύθηκε τάση, 80 Volt, στην συσκευή ηλεκτροφόρησης μέσω του τροφοδοτικού (CONSORT E143) για 30 λεπτά. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετήθηκε στο μηχάνημα DNR, Mini Bis Bio-Imaging Systems, με το οποίο λήφθηκε φωτογραφία της πηκτής με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Από το γενομικό DNA, για το σκοπό της εργασίας, επιλέχθηκαν για ενίσχυση τέσσερα ζεύγη εκκινητών που στόχευαν ριβοσομικές περιοχές, με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η ενίσχυση έγινε με τους εκκινητές που φαίνονται στον Πίνακα 1, χρησιμοποιώντας ένα θερμοκυκλοποιητή MJ Research, PTC-0150.

Οι συνθήκες της PCR, για κάθε εκκινητή, καθορίστηκαν με πειραματικό σχεδιασμό αλλάζοντας μια συνθήκη κάθε φορά και η θερμοκρασία συγκόλλησης του εκκινητή (T_m) υπολογίστηκε με την μαθηματική εξίσωση:

$$Tm(^{\circ}C) = 4 \cdot (C + G) + 2 \cdot (A + T)$$

Όπου C, G, A και T ο συνολικός αριθμός των νουκλεοτιδίων Κυτοσίνης, Γουανίνης, Αδενίνης και Θυμίνης αντίστοιχα. Από το Tm μπορούμε να υπολογίσουμε και τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (Ta) από τον τύπο:

$$Ta(^{\circ}C) = Tm(^{\circ}C) - 5(^{\circ}C)$$

Πίνακας 1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του DNA.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Πηγή
18S	LSU.F	ACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG	Ki & Han 2005
	LSU.R	TGATCCTTCYGCAGGTTCCACC	
23S	p23SrVF1	GGACAGAAAGACCCTATGAA	Ki & Han 2005
	p23SrVR1	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG	
ITSA	ITSAF	TTCCGTAGGTGAACCTGC	Provan et al. 2005
	ITSAR	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	
ITSB	ITSBF	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	Provan et al. 2005
	ITSBR	GGTCCGTGTTTCAAGACGGG	

Οι συνθήκες θερμοκρασιακών κύκλων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του DNA είναι οι ακόλουθες: Μετά από μια δεκάλεπτη αποδιάταξη στους 94° C, ακολουθούν 35 κύκλοι: αποδιάταξης (denaturation) στους 94° C για 45 sec, υβριδισμού (annealing) στους 56° C για 18S, 56° C για 23S, 57° C για ITSA και 58° C για το ITSB για 45 sec και επιμήκυνσης (extention) στους 72° C για 1 min. Τέλος ακολουθεί η τελική επιμήκυνση στους 72° C για 10 min.

Τα προγράμματα συνθηκών θερμοκρασιακών κύκλων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR δίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

	Προγραμματισμός			
Βήμα	18S	23S	ITSA	ITSB
1)	94° C / 10 min	94° C / 10 min	94° C / 10 min	94° C / 10 min
2)	94° C / 45 sec	94° C / 45 sec	94° C / 45 sec	94° C / 45 sec
3)	56° C / 45 sec	56° C / 45 sec	57° C / 45 sec	58° C / 45 sec
4)	72° C / 1 min	72° C / 1 min	72° C / 1 min	72° C / 1 min
5)	Go to 2,	Go to 2,	Go to 2,	Go to 2,
	34 times	34 times	34 times	34 times
6)	72° C / 10 min	72° C / 10 min	72° C / 10 min	72° C / 10 min
7)	4° C / 0	4° C / 0	4° C / 0	4° C / 0
8)	END	END	END	END

Η αντίδραση της PCR έγινε σε συνολικό όγκο 50 μl και αποτελούταν από 5 μl PCR buffer (10X), 2 μl MgCl_2 , 1 μl dNTPs (10 mM από κάθε νουκλεοτίδιο: dATP, dCTP, dGTP και dTTP), 2 μl από κάθε εκκινητή (forward-reverse), 0,5 μl Taq DNA πολυμεράση και 1 μl DNA. Ο υπόλοιπος όγκος μέχρι τα 50 μl συμπληρώθηκε με υπερκάθαρο νερό. Στον Πίνακα 3 δίνονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR. Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν σε ηλεκτροφόρηση με πηκτή αγαρόζης που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο, χρησιμοποιώντας 5 μl από το προϊόν.

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για τελικό όγκο PCR 50 μl .

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Συγκέντρωση (μl)</i>
10X PCR Buffer	5
MgCl_2	2
dNTPs	1
Εκκινητής Forward	2
Εκκινητής Reverse	2
Taq DNA πολυμεράση	0,5
DNA	1
H_2O	36,5
Σύνολο	50

2.5 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs)

Στα προϊόντα PCR που προέκυψαν από όλα τα δείγματα έγινε πλήρης χώνευση (RFLPs) με τα περιοριστικά ένζυμα AluI, RsaI, HaeIII και EcoRI. Στα προϊόντα από τα RFLPs έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο, ανά γενετικό τόπο και περιοχή, χρησιμοποιώντας 10 μl από το προϊόν. Η κάθε πηκτή έπειτα τοποθετήθηκε σε μηχανήμα DNR, Mini Bis Bio-Imaging Systems, με το οποίο λήφθηκε φωτογραφία της με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Από τις φωτογραφίες των RFLPs έγινε το σκοράρισμα της απουσίας ή παρουσίας αλληλόμορφων σύμφωνα με το μέγεθος των κομματιών του DNA, χρησιμοποιώντας το λογισμικό UVIDoc Mw package (St John's Innovation Center, Cambridge, UK) σε σύγκριση με μάρτυρες μοριακών μεγεθών DNA. Από το σκοράρισμα δημιουργήθηκαν οι απλότυποι (Πιν. 4) και οι σύνθετοι απλότυποι (Πιν. 5) των δειγμάτων μας.

2.6 Επεξεργασία δεδομένων

Τα δεδομένα που προήλθαν από την RFLP ανάλυση, επεξεργάστηκαν με τα παρακάτω λογισμικά και υπολογίστηκαν οι παράμετροι που αναφέρονται:

- REAP 4.0 (McElroy et al. 1992)
 - νουκλεοτιδική ποικιλομορφία ανά γενετικό τόπο και
 - ποικιλομορφία των απλότυπων ανά γενετικό τόπο (Roff & Bentzen 1989)
- GenAlex
 - οι συχνότητες αλληλόμορφων ανά πληθυσμό

- οι συχνότητες αλληλόμορφων ανά γενετικό τόπο
- η μέση ετεροζυγωτία για κάθε πληθυσμό (Nei 1978)
- η ισορροπία Hardy-Weinberg, και
- οι γενετικές αποστάσεις κατά Nei (Nei 1978)
- Arlequin 3.1 (Schneider et al. 2000)
 - Τεστ ουδετερότητας Tajima (Tajima 1989)
 - Ανάλυση AMOVA (Excoffier et al. 1992)
 - Τιμές δείκτη Fst (Wright 1951)
- XLSTAT (Addinsoft 2008)
 - Ανάλυση PCA
 - Mantel τεστ
- PHYLIP 3.57c (Felsenstein 1995)
 - Φυλογενετικά δένδρα για κάθε γενετικό τόπο και για όλους τους γενετικούς τόπους μαζί με την μέθοδο UPGMA (Saitou & Nei 1987) και τον αλγόριθμο Cavalli – Sforza.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Αποτελέσματα

3.1.1 Απλότυποι

Από το σκοράρισμα της απουσίας ή παρουσίας αλληλόμορφων σύμφωνα με το μέγεθος των κομματιών του DNA, στα προϊόντα των RFLPs, προέκυψαν οι απλότυποι και οι σύνθετοι απλότυποι (Πιν. 4 και Πιν. 5 αντίστοιχα).

Πίνακας 4: Οι απλότυποι για κάθε γενετικό τόπο.

	ITSB	ITSA	18S	23S
Cym.1.	1111111111110101	1100010111111110	111111011111111	111111
Cym.2.	1111111111110100	1100010111111110	111111011111111	111111
Cym.3.	1111111111111101	1100010111111110	111111011111111	111111
Cym.4.	1111111111110111	1100010111111110	111111011111111	111111
Cym.5.	1111111111110101	1100010111111110	111111111111111	111111
Cym.6.	1111111111110100	1100010111111110	111111111111111	111111
Cym.7.	1111111111110101	1100101011111111	111111011111111	111111
Cym.8.	1111111111110100	1100101011111110	111111011111111	111111
Cym.9.	1111111111110101	1100101011111110	111111011111111	111111
Cym.10.	1111111111111101	1100101011111110	111111111111111	111111
Cym.11.	1111111111110111	1100101011111110	111111011111111	111111
Cym.12.	1111111111111111	0011101011111110	111111011111111	111111

Πίνακας 5: Σύνθετοι απλότυποι για τους τρεις γενετικούς τόπους και οι συχνότητες τους σε κάθε περιοχή.

Απλότυποι	Σύνθετοι RFLP απλότυποι του <i>Cymodocea nodosa</i> (ITSB, ITSA, 18S)	Περιοχή δειγμάτων						
		Γατζέα	Πτελεός	Κάλαμος	Ραζί	Ελιά	Αγ.Ιωάννης	Καλογριά
C.n.1	ABCE ADFG ABDE	3						
C.n.2	ABCF ADFG ABDE	15	15					
C.n.3	ABDE ADFG ABDE	3	9					
C.n.4	ABCG ADFG ABDE	6	3					
C.n.5	ABCE ADFG ACDE	3						
C.n.6	ABCF ADFG ACDE		3					
C.n.7	ABCE BEFH ABDE			6				
C.n.8	ABCF BEFG ABDE			18	12			
C.n.9	ABCE BEFG ABDE			3	15	30	30	12
C.n.10	ABDE BEFG ACDE			3				
C.n.11	ABCG BEFG ABDE				3			
C.n.12	ABDG CEFG ABDE							18

Συνολικά							
Νουκλεοτιδική ποικιλομορφία (%) ανά γενετικό	0,59 / 0,00 /	0,63 / 0,00 /	0,39 / 0,24 /	0,39 / 0,00 /	0,00 / 0,00 /	0,00 / 0,00 /	0,53 / 2,02 /
τόπο	0,11	0,11	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
Ποικιλομορφία απλότυπων (%) ανά γενετικό τόπο	67,12 / 0,00 /	54,92 / 0,00	54,92 /	58,98 / 0,00 /	0,00 / 0,00 /	0,00 / 0,00 /	48,81 / 48,81
	18,31	/ 18,31	32,54 /	0,00	0,00	0,00	/ 0,00
			18,31				
± SE (%)	4,30 / 0,00 /	4,75 / 0,00 /	4,75 / 6,26 /	3,20 / 0,00 /	0,00 / 0,00	0,00 / 0,00	2,77 / 2,77 /
	6,21	6,21	6,21	0,00	/ 0,00	/ 0,00	0,00
Συνολικό μέγεθος δείγματος	30	30	30	30	30	30	30

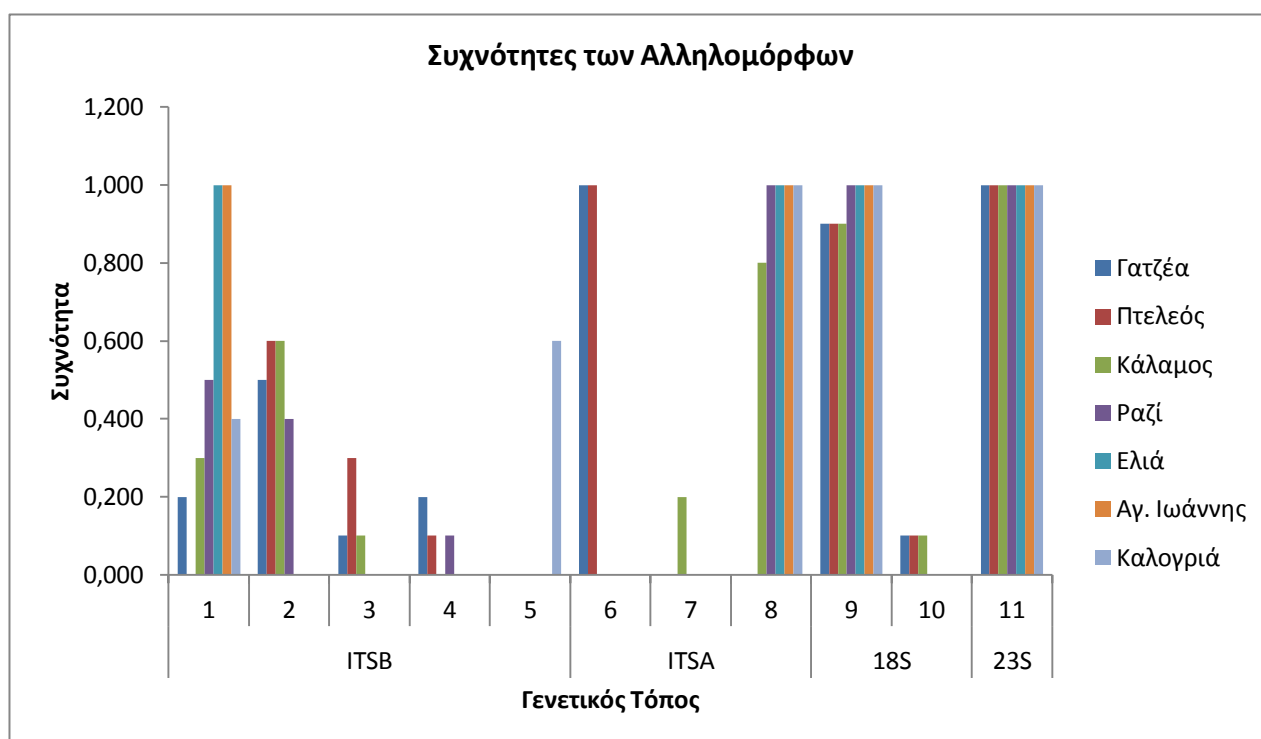
3.1.2 Συχνότητες αλληλόμορφων

Από τους απλότυπους που προέκυψαν υπολογίστηκαν οι συχνότητες των αλληλόμορφων για κάθε πληθυσμό και κάθε γενετικό τόπο (Πιν. 6).

Πίνακας 6: Συχνότητες Αλληλόμορφων ανά πληθυσμό και γενετικό τόπο.

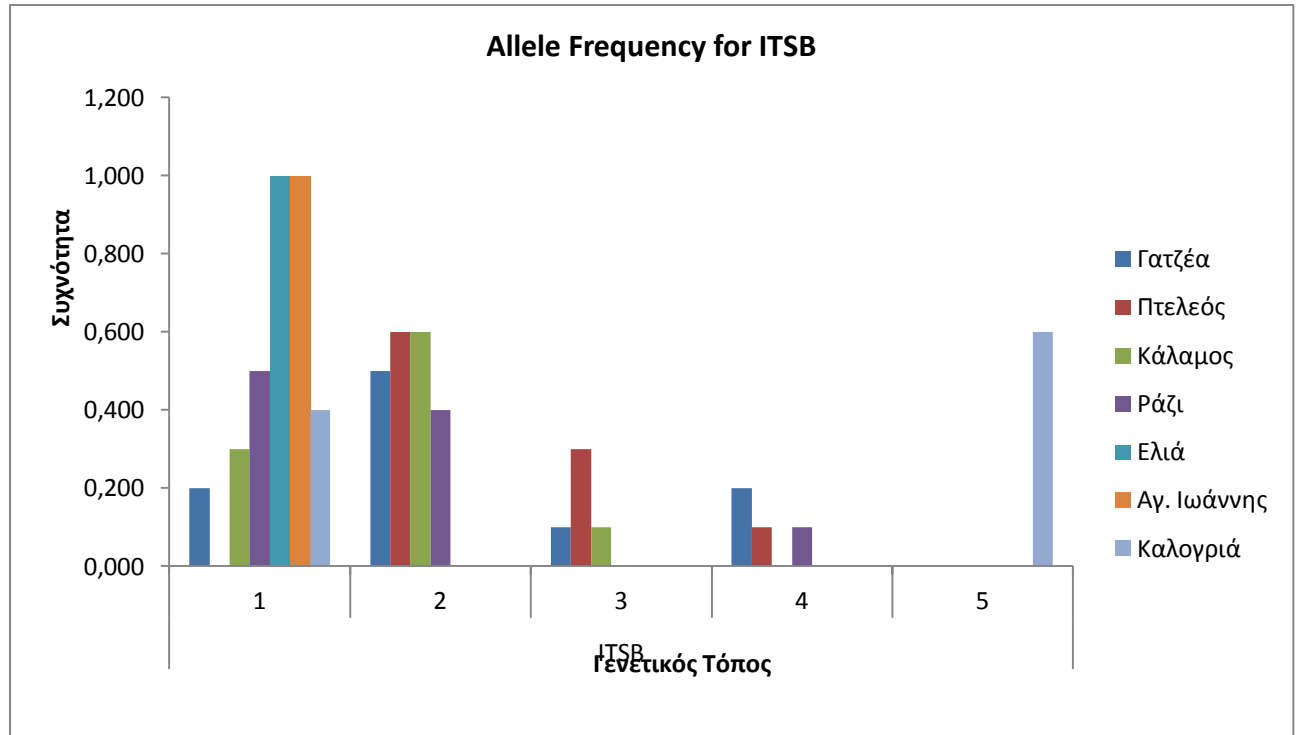
Locus	Allele	Γατζέα	Πτελεός	Κάλαμος	Ραζί	Ελιά	Αγ. Ιωάννης	Καλογριά
ITSB	1	0,200	0,000	0,300	0,500	1,000	1,000	0,400
	2	0,500	0,600	0,600	0,400	0,000	0,000	0,000
	3	0,100	0,300	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
	4	0,200	0,100	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000
	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,600
ITSA	6	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	7	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000
	8	0,000	0,000	0,800	1,000	1,000	1,000	1,000
18S	9	0,900	0,900	0,900	1,000	1,000	1,000	1,000
	10	0,100	0,100	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
23S	11	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων που υπολογίστηκαν απεικονίστηκαν και γραφικώς όπως φαίνεται στο Σχήμα 1. Από το σχήμα αυτό φαίνεται ότι ο γενετικός τύπος ITSB είναι ο πιο πολυμορφικός καθώς εμφανίζει πέντε αλληλομόρφα γονίδια. Οι γενετικοί τύποι ITSA, 18S και 23S εμφάνισαν τρία, δύο και ένα αλληλομόρφα γονίδια αντίστοιχα.

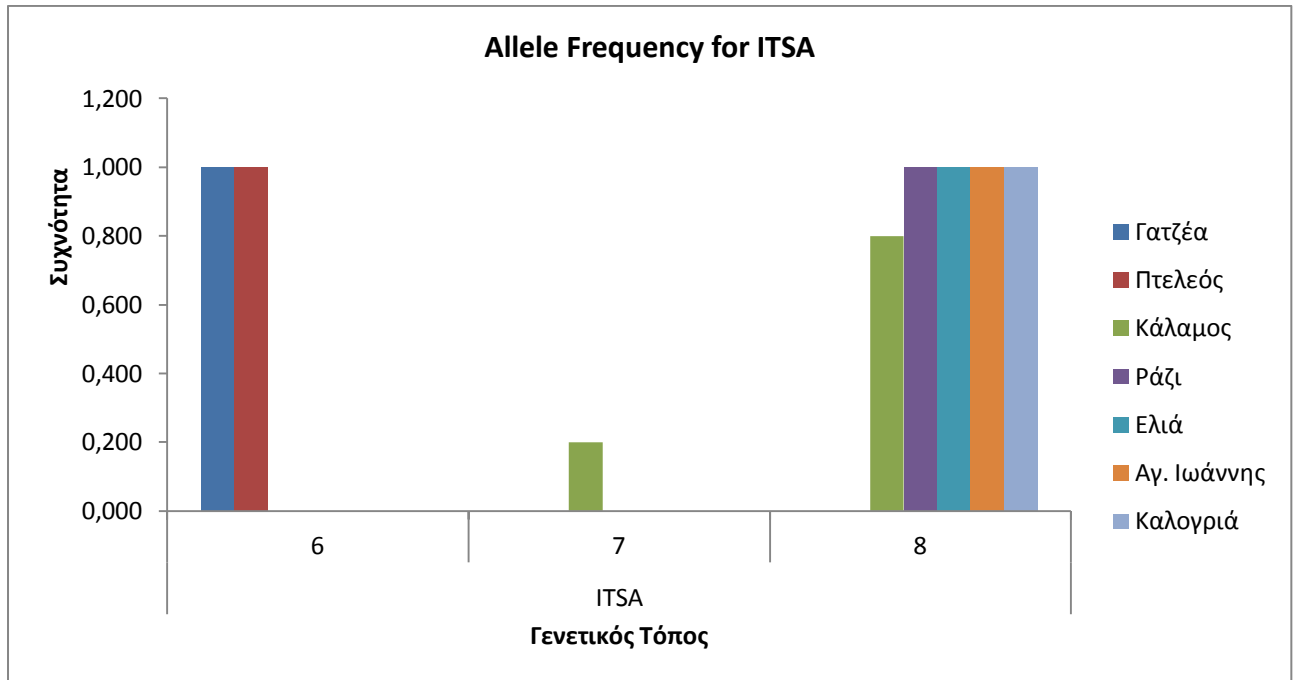


Σχήμα 1: Γραφική παράσταση της συχνότητας αλληλομόρφων ανά πληθυσμό για κάθε γενετικό τύπο.

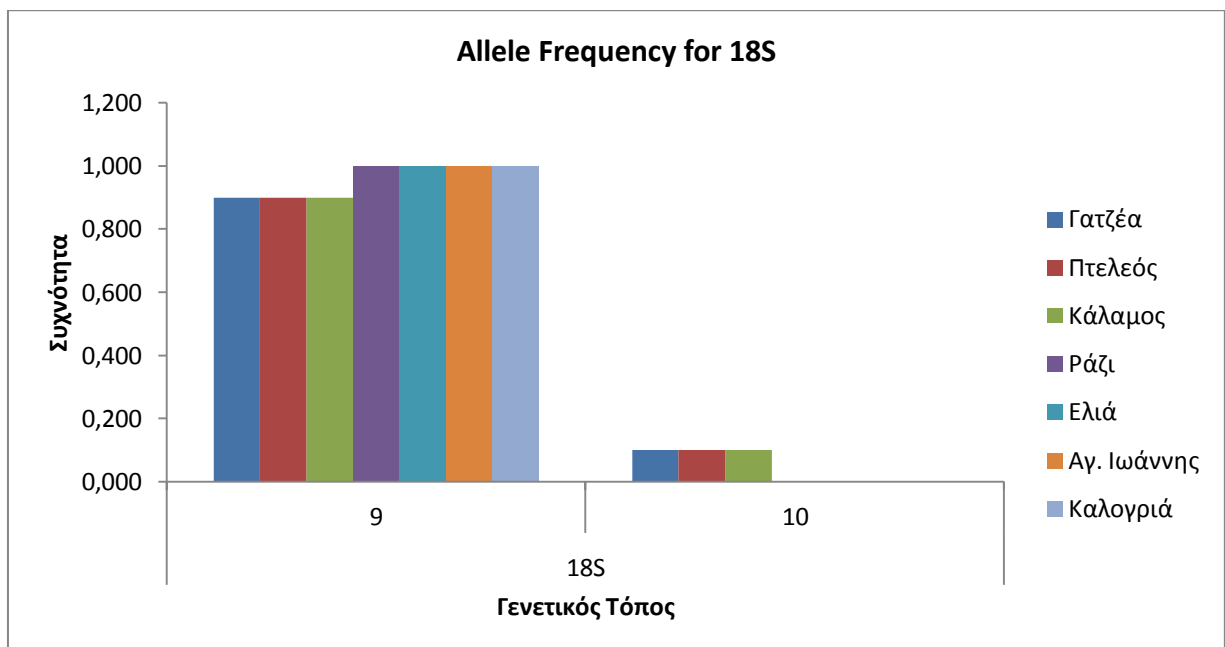
Οι συχνότητες των αλληλόμορφων για κάθε γενετικό τόπο ξεχωριστά δίνονται στα σχήματα 2, 3 και 4. Ο γενετικός τόπος 23S δεν παρουσιάζεται καθώς είχε μόνο ένα αλληλόμορφο γονίδιο.



Σχήμα 2: Γραφική αναπαράσταση της συχνότητας των αλληλόμορφων για τον γενετικό τόπο ITSB.



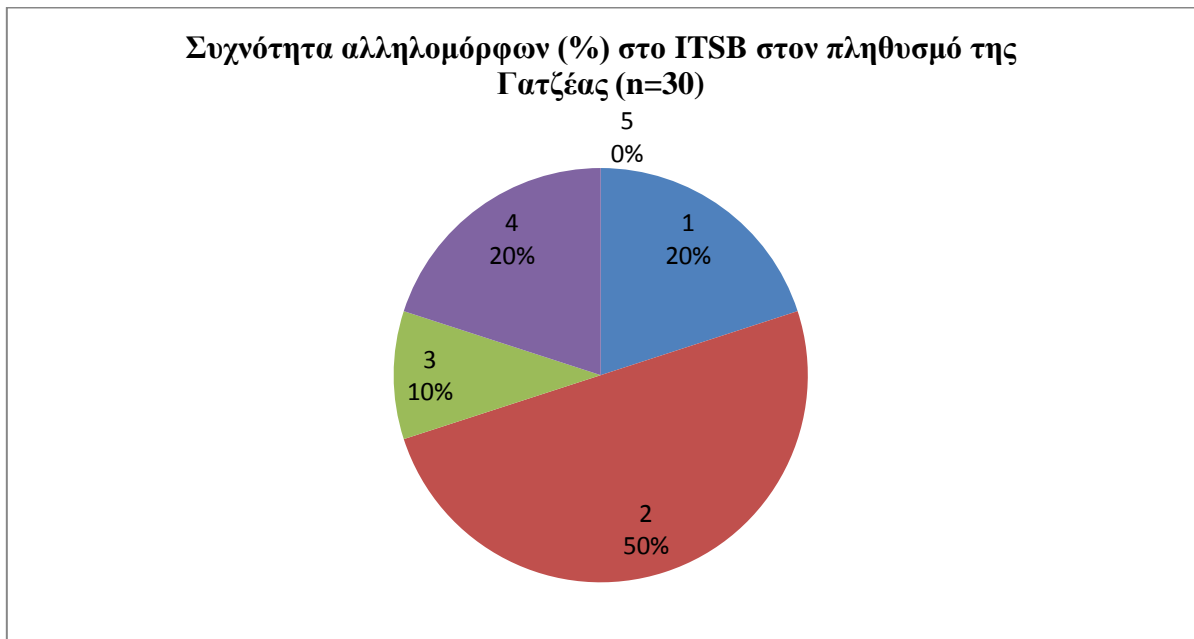
Σχήμα 3: Γραφική αναπαράσταση της συχνότητας των αλληλόμορφων για τον γενετικό τόπο ITSA.



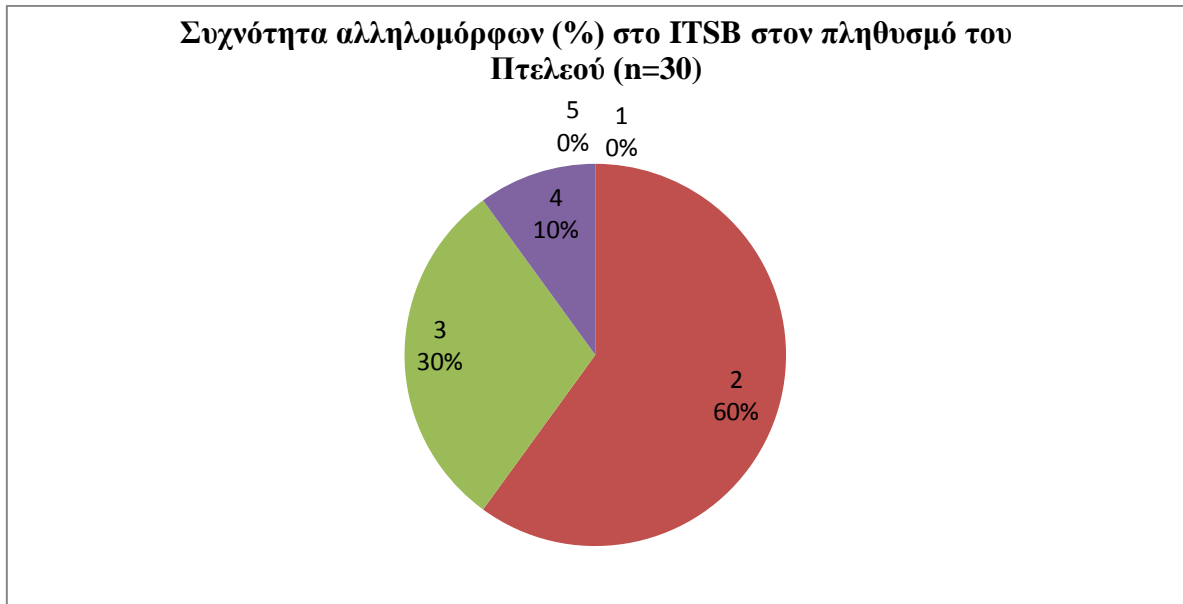
Σχήμα 4: Γραφική αναπαράσταση της συχνότητας των αλληλόμορφων για τον γενετικό τόπο 18S.

Η συχνότητα των αλληλομόρφων επί τις εκατό (%) στην κάθε περιοχή δειγματοληψίας για τον κάθε γενετικό τόπο, απεικονίστηκαν σε γραφήματα πίτας και δίνονται παρακάτω. Τα γραφήματα που παρουσίαζαν συχνότητα 100% (ένα αλληλόμορφο) δεν παρουσιάζονται.

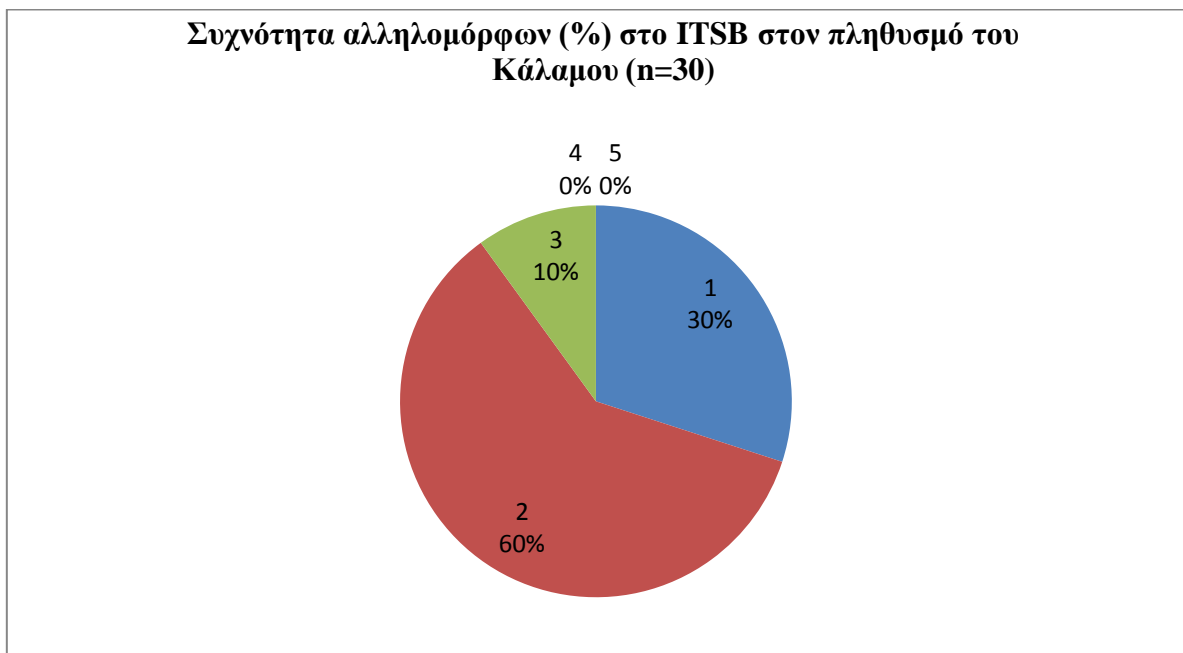
Οι συχνότητες αλληλομόρφων για το γενετικό τόπο ITSB παρουσιάζονται στα Σχήματα 5, 6, 7, 8 και 9. Οι περιοχές Ελιά και Αγ. Ιωάννης παρουσίασαν μόνο το αλληλόμορφο No 1.



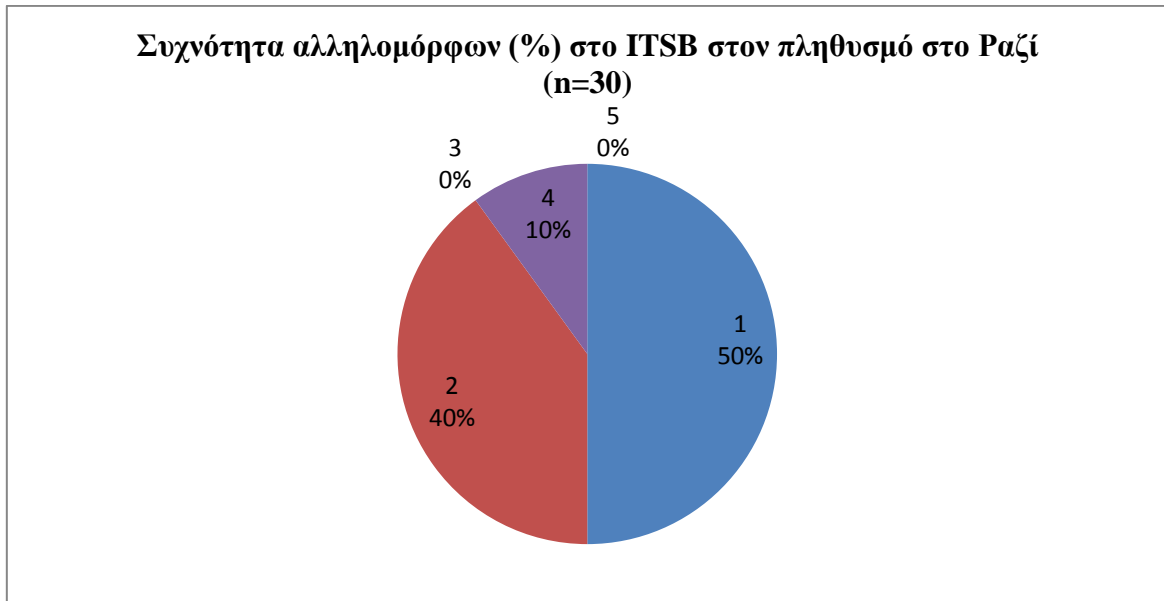
Σχήμα 5: Συχνότητα αλληλομόρφων για τον γενετικό τόπο ITSB στον πληθυσμό της Γατζέας.



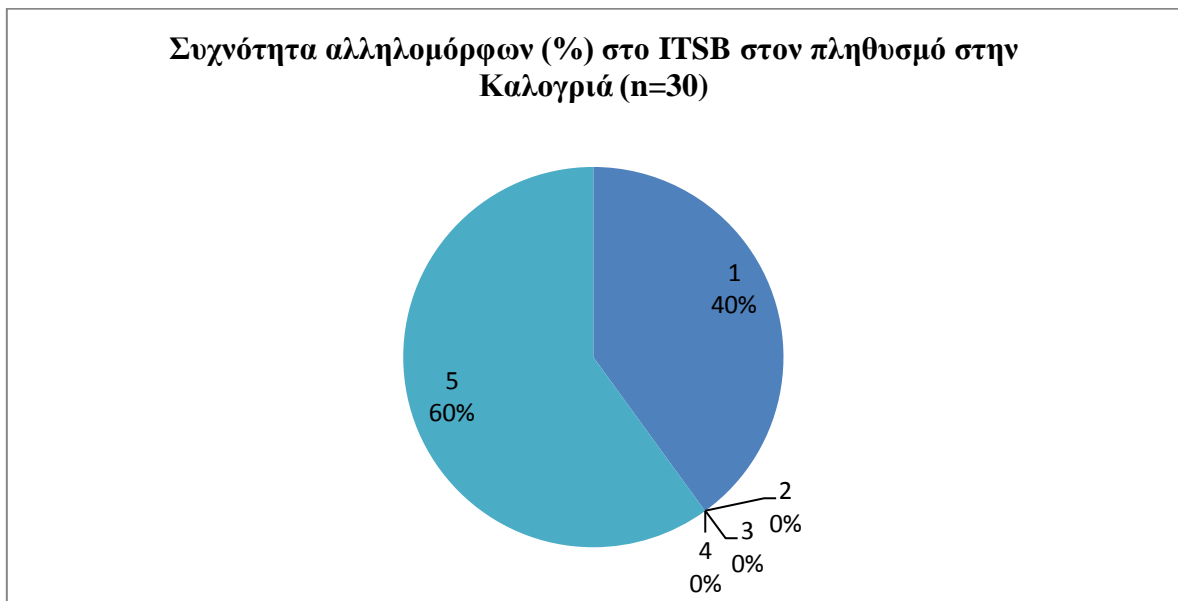
Σχήμα 6: Συχνότητα αλληλομόρφων για τον γενετικό τόπο ITSB στον πληθυσμό του Πτελεού.



Σχήμα 7: Συχνότητα αλληλομόρφων για τον γενετικό τόπο ITSB στον πληθυσμό του Κάλαμου.

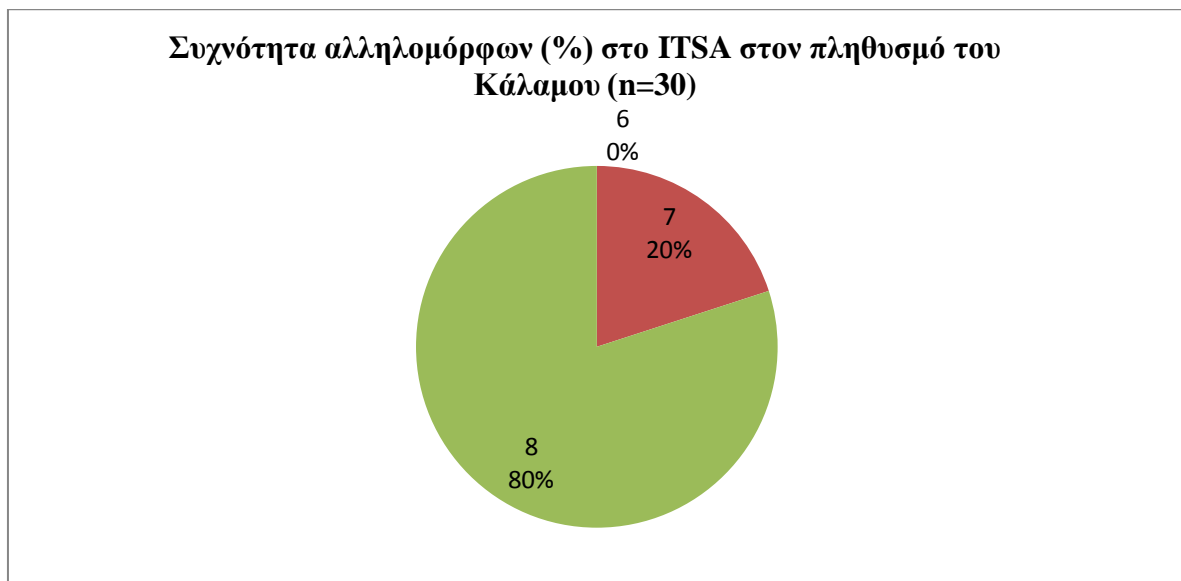


Σχήμα 8: Συχνότητα αλληλομόρφων για τον γενετικό τόπο ITSB στον πληθυσμό στο Ραζί.



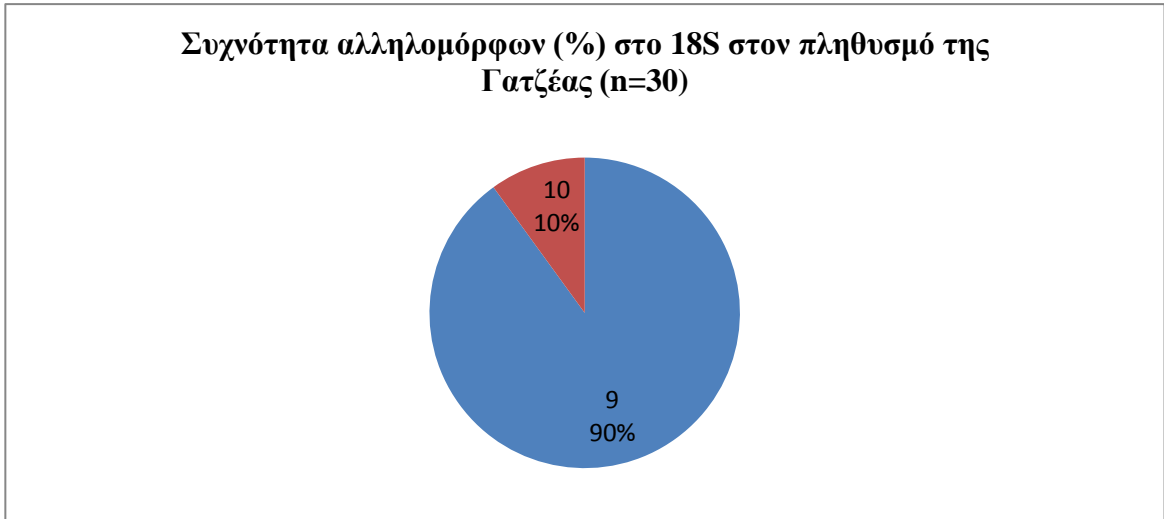
Σχήμα 9: Συχνότητα αλληλομόρφων για τον γενετικό τόπο ITSB στον πληθυσμό στην Καλογριά.

Για το γενετικό τόπο ITSA μόνο στην περιοχή του Κάλαμου παρουσιάστηκαν 2 αλληλόμορφα όπως φαίνεται στο Σχήμα 10, το No 7 σε ποσοστό 20% (6 άτομα) και το No 8 σε ποσοστό 80% (24 άτομα) . Στους πληθυσμούς της Γατζέας και του Πτελεού εμφανίστηκε μόνο το αλληλόμορφο No 6, ενώ στις περιοχές Ραζί, Ελιά, Αγ. Ιωάννης και Καλογριά βρέθηκε μόνο το αλληλόμορφο No 8.

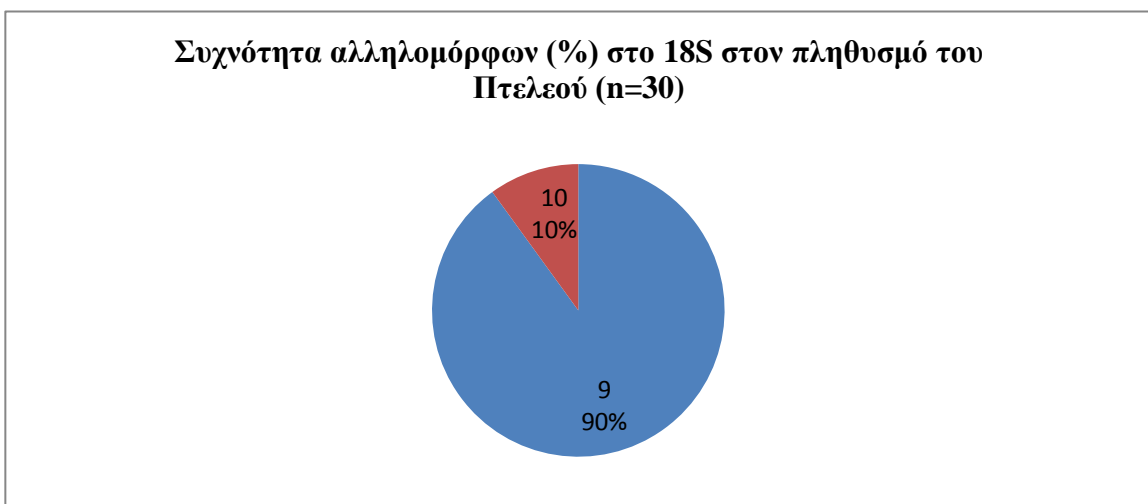


Σχήμα 10: Συχνότητα αλληλομόρφων για τον γενετικό τόπο ITSA στον πληθυσμό του Κάλαμου.

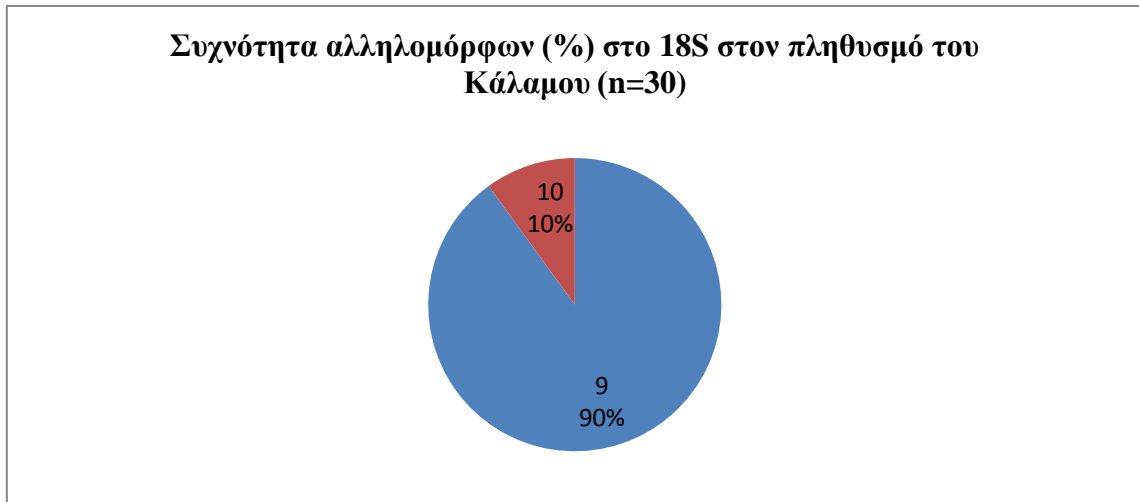
Στο γενετικό τόπο 18S παρουσιάστηκαν μόνο τα αλληλόμορφα No 9 και No 10. Και τα δύο αλληλόμορφα υπήρχαν στους πληθυσμούς της Γατζέας (Σχ. 11), του Πτελεού (Σχ. 12) και του Κάλαμου (Σχ. 13). Ενώ στις άλλες τέσσερις περιοχές βρέθηκε μόνο το αλληλόμορφο No 9. Τέλος, σε όλους τους πληθυσμούς για το γενετικό τόπο 23S εμφανίστηκε μόνο το αλληλόμορφο No 11.



Σχήμα 11: Συχνότητα αλληλομόρφων για τον γενετικό τόπο 18S στον πληθυσμό της Γατζέας.



Σχήμα 12: Συχνότητα αλληλομόρφων για τον γενετικό τόπο 18S στον πληθυσμό του Πτελεού.



Σχήμα 13: Συχνότητα αλληλομόρφων για τον γενετικό τόπο 18S στον πληθυσμό του Κάλாமου.

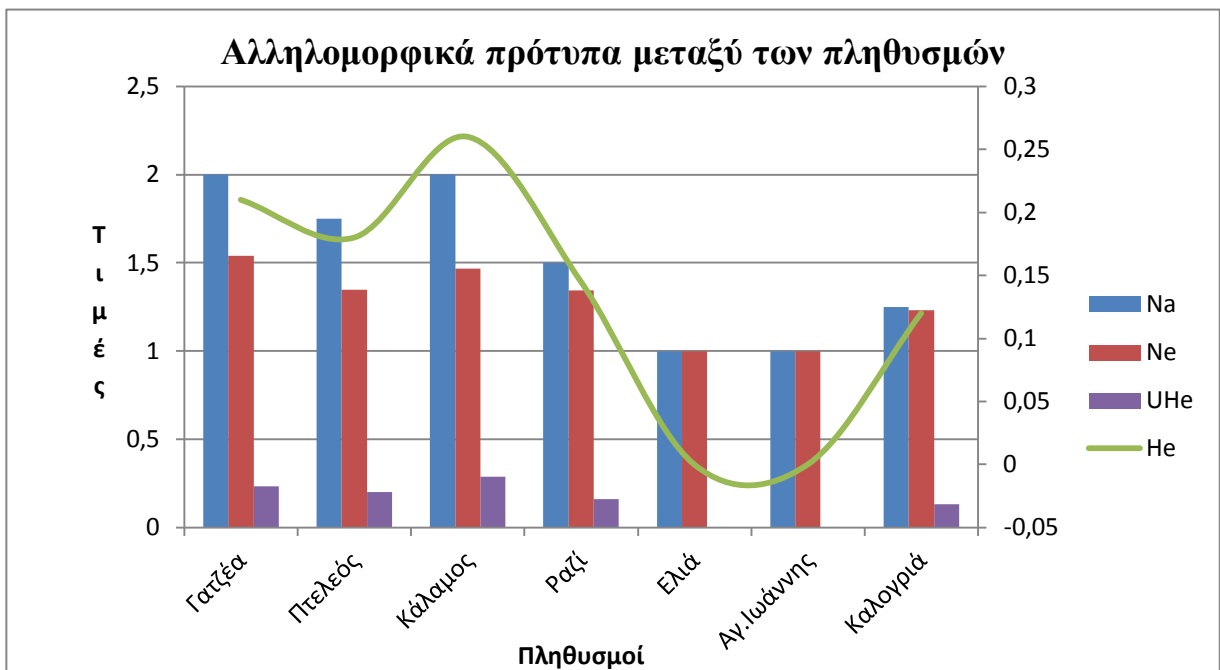
3.1.3 Αναμενόμενη Ετεροζυγωτία

Προκείμενου να μελετηθεί η γονιδιακή ροή μέσα στους πληθυσμούς, υπολογίσθηκε η αναμενόμενη Ετεροζυγωτία (H_e) για κάθε περιοχή. Η τιμές της Ετεροζυγωτίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 7 και η γραφική τους απεικόνιση δίνεται στο σχήμα 14. Από τα αποτελέσματα που φαίνονται στον πίνακα βρέθηκε ότι η γονιδιακή ροή είναι πολύ μικρή καθώς οι τιμές κυμαίνονται από 0 έως 0,260.

N : Αριθμός ατόμων, N_a : Πλήθος αλληλόμορφων, N_e : δραστικό μέγεθος αλληλομόρφων, H_e : εκτιμώμενη ετεροζυγωτία, $U H_e$ σταθμισμένη αναμενόμενη ετεροζυγωτία

Πίνακας 7: Συνολικές τιμές μέσης Ετεροζυγωτίας- Πλήθος αλληλόμορφων για κάθε πληθυσμό.

Πληθυσμός	N	Na	Ne	He	UHe
Γατζέα	30	2,000	1,540	0,210	0,217
Πτελεός	30	1,750	1,348	0,180	0,186
Κάλαμος	30	2,000	1,466	0,260	0,269
Ραζί	30	1,500	1,345	0,145	0,150
Ελιά	30	1,000	1,000	0,000	0,000
Αγ.Ιωάννης	30	1,000	1,000	0,000	0,000
Καλογριά	30	1,250	1,231	0,120	0,124



Σχήμα 14: Γραφική παράσταση των αλληλομορφικών προτύπων.

3.1.4 ΑΜΟΝΑ

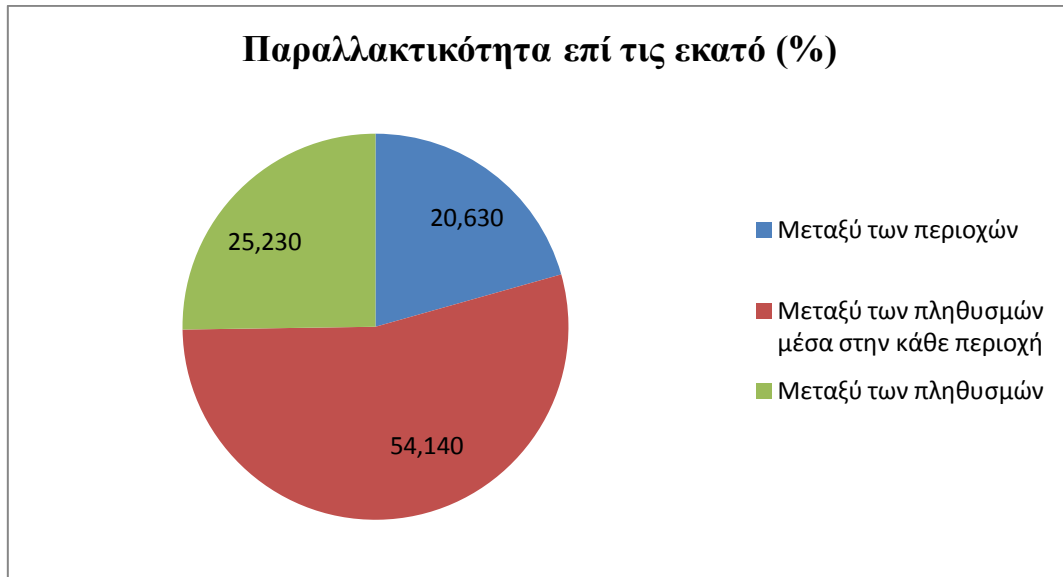
Η παραλλακτικότητα ανάμεσα στον Παγασητικό και τη Χαλκιδική, μεταξύ των πληθυσμών και μεταξύ των πληθυσμών σε μέσα σε κάθε περιοχή υπολογίστηκε από τη στατιστική ανάλυση ΑΜΟΝΑ. Τα ποσοστά της παραλλακτικότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 8 και σε γραφικά στο Σχήμα 15.

Πίνακας 8: Ανάλυση ΑΜΟΝΑ.

Ανάλυση της παραλλακτικότητας	d.f.	Άθροισμα των τετραγώνων	Παραλλακτικότητα επί της εκατό (%)
Μεταξύ των περιοχών	1,0000	76,6610	20,6300
Μεταξύ των πληθυσμών μέσα στην κάθε περιοχή	5,0000	167,6250	54,1400
Μεταξύ των πληθυσμών	203,0000	104,1000	25,2300
Συνολικό	209,0000	348,3860	

Πίνακας 9: Δείκτες προσδιορισμού F στατιστικών.

FSC	0,68212
FCT	0,20633
FST	0,74771



Σχήμα 15: Γραφική παράσταση της γενετικής παραλλακτικότητας επί τις εκατό (%).

3.1.5 Γενετικές Αποστάσεις Nei

Με τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων κατά Nei (Πιν. 10) διαπιστώθηκε η διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών ανά ζεύγη. Οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις βρέθηκαν ανάμεσα στους πληθυσμούς Πτελεού – Ελιάς (0,645), Πτελεού – Αγ. Ιωάννη (0,645), Γατζέας – Ελιάς (0,526) και Γατζέα – Αγ. Ιωάννη (0,526). Ενώ οι μικρότερες διαφοροποιήσεις εμφανίστηκαν ανάμεσα στις περιοχές Γατζέας – Πτελεού (0,015) και Κάλαμος – Ραζί (0,029). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η τιμή Nei ανάμεσα στους πληθυσμούς της Ελιάς και του Αγ. Ιωάννη είναι 0,000. Αυτό υποδηλώνει ότι οι δύο αυτοί πληθυσμοί δεν διαφέρουν καθόλου μεταξύ τους και συμπεριφέρονται σαν ένας πληθυσμός.

Πίνακας 10: Γενετικές αποστάσεις κατά Nei.

Nei's D	Γατζέα	Πτελεός	Κάλαμος	Ραζί	Ελιά	Αγ.Ιωάννης	Καλογριά
Γατζέα	0,000						
Πτελεός	0,015	0,000					
Κάλαμος	0,334	0,344	0,000				
Ραζί	0,393	0,443	0,029	0,000			
Ελιά	0,526	0,645	0,137	0,055	0,000		
Αγ.Ιωάννης	0,526	0,645	0,137	0,055	0,000	0,000	
Καλογριά	0,521	0,581	0,135	0,081	0,099	0,099	0,000

3.1.6 Fst

Η παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών ανά ζεύγη, μελετήθηκε επίσης με την ανάλυση F_{ST} και τα αποτελέσματά της εμφανίζονται στον Πίνακα 11. Από την ανάλυση αυτή βρέθηκε μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ των περιοχών, καθώς εμφανίστηκαν υψηλές τιμές F_{ST} με μέγιστη τιμή 0,89655, ανάμεσα στους πληθυσμούς Γατζέας – Ελιάς και Γατζέας – Αγ. Ιωάννη. Στατιστικώς μη σημαντικές ήταν μόνο δύο τιμές F_{ST} , ανάμεσα στους πληθυσμούς Γατζέας – Πτελεού και Ελιάς – Αγ. Ιωάννη, οι οποίες έχουν σημειωθεί με αστερίσκο στον Πίνακα.

Πίνακας 11: Τιμές δείκτη Fst

Fst	Γατζέα	Πτελεός	Κάλαμος	Ραζί	Ελιά	Αγ.Ιωάννης	Καλογριά
Γατζέα	0,00000						
Πτελεός	0,05031*	0,00000					
Κάλαμος	0,78549	0,76383	0,00000				
Ραζί	0,82617	0,80527	0,07708	0,00000			
Ελιά	0,89655	0,87221	0,40000	0,31724	0,00000		
Αγ. Ιωάννης	0,89655	0,87221	0,40000	0,31724	0,00000*	0,00000	
Καλογριά	0,75829	0,73949	0,53356	0,53994	0,58621	0,58621	0,00000

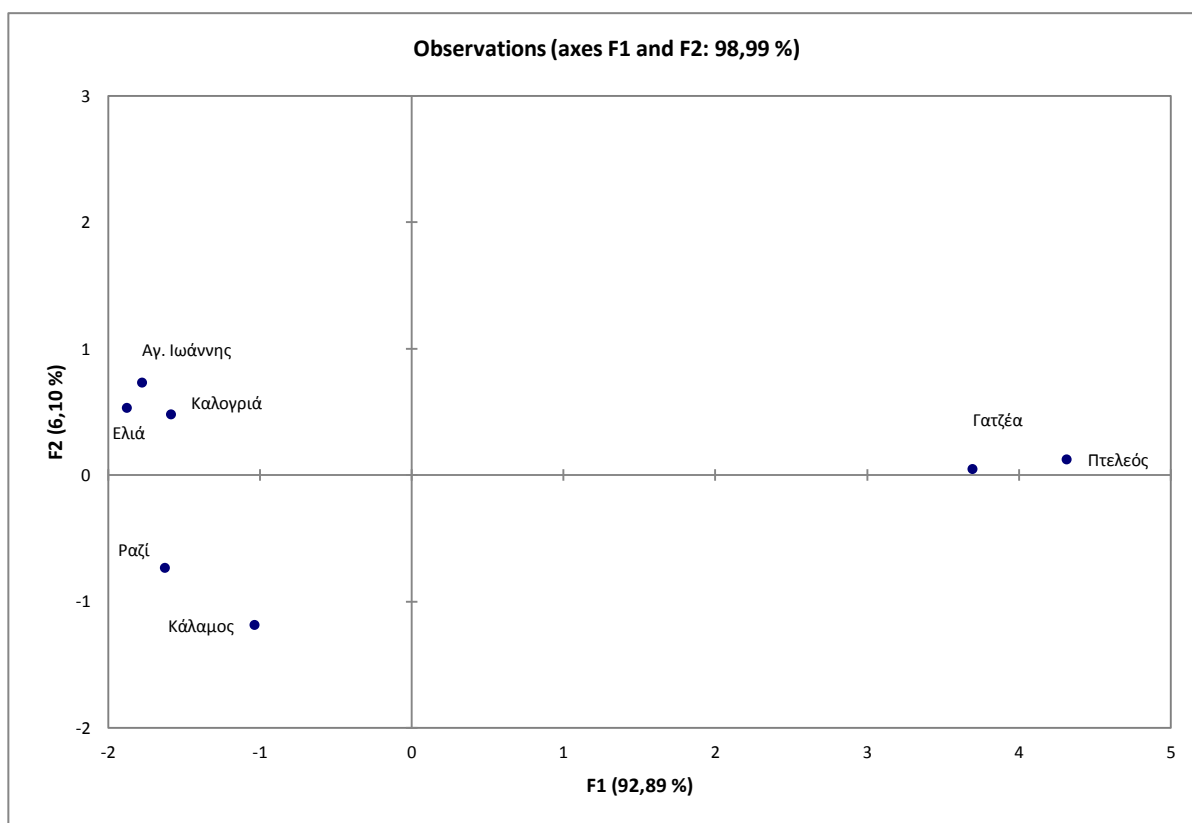
3.1.7 Tajima's Test

Πίνακας 12: Έλεγχος Ουδετερότητας Tajima

Έλεγχος Ουδετερότητας	Γατζέα	Πτελεός	Κάλαμος	Ραζί	Ελιά	Αγ.Ιωάννης	Καλογριά
Tajima							
Μέγεθος δείγματος	30	30	30	30	30	30	30
Tajima's D	0,79722	0,74705	0,48398	0,72190	0,00000	0,00000	2,75992
Tajima's D p-value	0,78800	0,77900	0,71700	0,79400	1,00000	1,00000	1,00000

3.1.8 Ανάλυση PCA

Για την ομαδοποίηση των πληθυσμών γενετικά έγινε ανάλυση PCA, όπως φαίνεται στο Σχήμα 16. Από την ανάλυση αυτή βρέθηκε ότι οι επτά πληθυσμοί δημιουργούν τρεις ευδιάκριτες ομάδες. Η πρώτη ομάδα απαρτίζεται από του πληθυσμούς των περιοχών Αγ. Ιωάννης, Ελιά και Καλογριά, δηλαδή τις τρεις περιοχές από τον κόλπο Τορωναίο, η δεύτερη ομάδα από τις περιοχές Γατζέας και Πτελεού και η τρίτη ομάδα από τις περιοχές Ραζί και Κάλαμος.



Σχήμα 16: Ανάλυση PCA με τη χρήση των γενετικών αποστάσεων κατά Nei

3.1.9 Ισορροπία Hardy-Weinberg

Πίνακας 13: Τεστ χ^2 για την ισορροπία Hardy-Weinberg

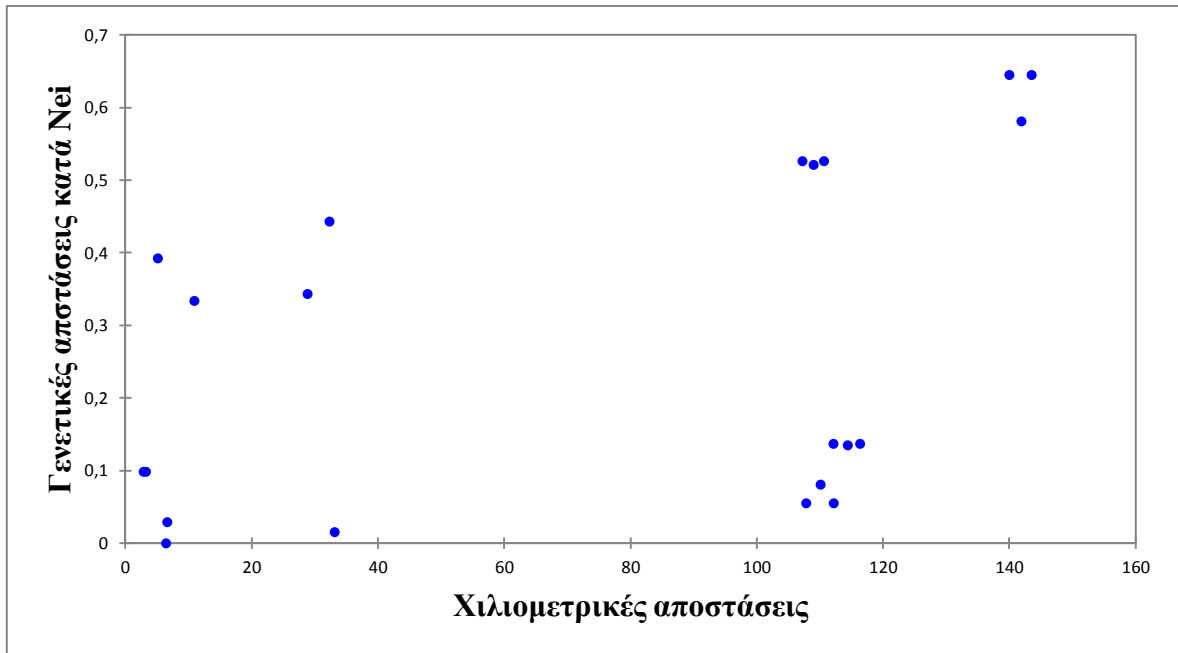
Πληθυσμός	Γενετικός Τύπος	DF	χ^2	Πιθανότητα	Σημαντικότητα
Γατζέα	ITSB	496	485,333	0,625	ns
Γατζέα	ITSA	561	591,000	0,184	ns
Γατζέα	18S	703	718,333	0,336	ns
Γατζέα	23S	666	726,667	0,051	ns
Πτελεός	ITSB	703	733,333	0,207	ns
Πτελεός	ITSA	666	653,333	0,630	ns
Πτελεός	18S	741	695,833	0,881	ns
Πτελεός	23S	780	763,333	0,658	ns
Κάλαμος	ITSB	630	637,917	0,405	ns
Κάλαμος	ITSA	561	548,750	0,636	ns
Κάλαμος	18S	561	522,300	0,878	ns
Κάλαμος	23S	561	533,333	0,794	ns
Ραζί	ITSB	595	621,667	0,217	ns
Ραζί	ITSA	666	693,333	0,224	ns
Ραζί	18S	595	570,833	0,755	ns
Ραζί	23S	666	677,500	0,370	ns
Ελιά	ITSB	595	545,833	0,926	ns
Ελιά	ITSA	666	703,333	0,153	ns
Ελιά	18S	741	760,000	0,306	ns
Ελιά	23S	528	528,833	0,482	ns
Αγ. Ιωάννης	ITSB	703	690,833	0,621	ns
Αγ. Ιωάννης	ITSA	595	626,667	0,178	ns
Αγ. Ιωάννης	18S	666	660,000	0,558	ns
Αγ. Ιωάννης	23S	630	624,833	0,551	ns
Καλογριά	ITSB	741	782,500	0,141	ns
Καλογριά	ITSA	703	708,333	0,437	ns
Καλογριά	18S	561	559,167	0,514	ns
Καλογριά	23S	666	661,250	0,545	ns

3.1.10 Mantel test

Η ανάλυση Mantel έγινε με βάση τις γενετικές αποστάσεις κατά Nei (Πιν. 10) και τις χιλιομετρικές αποστάσεις σε ευθεία γραμμή ανάμεσα στις περιοχές (Πιν. 14).

Πίνακας 14: Χιλιομετρικές αποστάσεις μεταξύ των περιοχών

	Γατζέα	Πτελεός	Κάλαμος	Ράζι	Ελιά	Αγ.Ιωάννης	Καλογριά
Γατζέα	-						
Πτελεός	33,08	-					
Κάλαμος	10,86	28,78	-				
Ράζι	5,07	32,26	6,56	-			
Ελιά	107,17	139,94	112,08	107,77	-		
Αγ.Ιωάννης	110,58	143,46	116,3	112,12	6,38	-	
Καλογριά	108,94	141,85	114,35	110,04	3,19	2,82	-



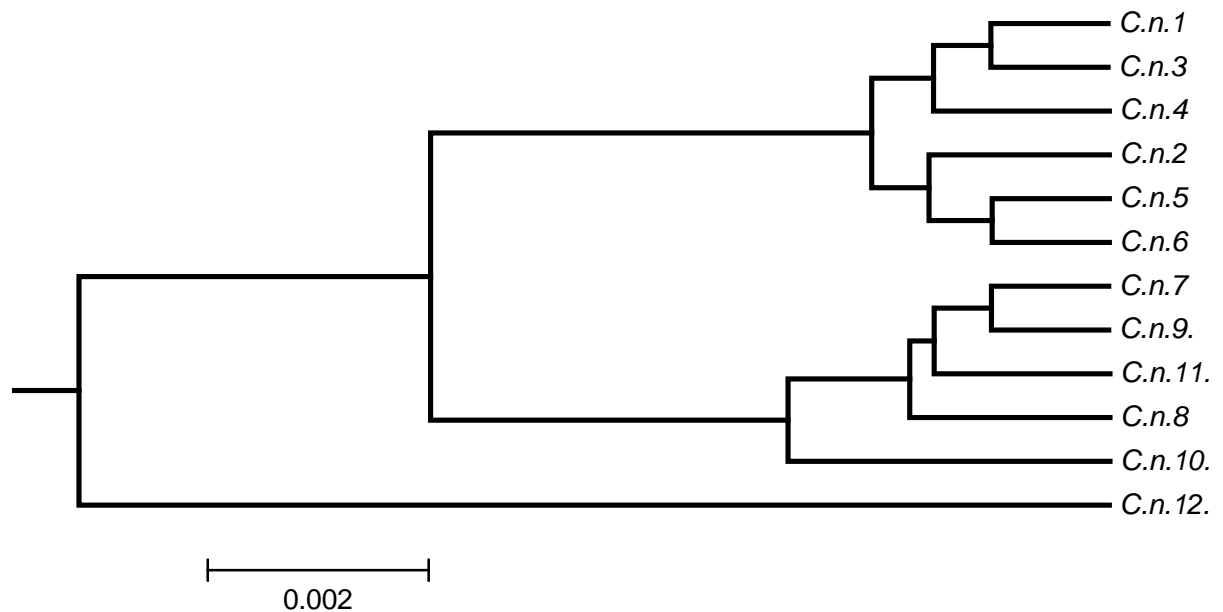
Σχήμα 17: Mantel test με την χρήση των γενετικών αποστάσεων κατά Nei και τις χιλιομετρικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών

r(AB)	0,4228
p-value (Two-tailed)	0,0517
alpha	0,05

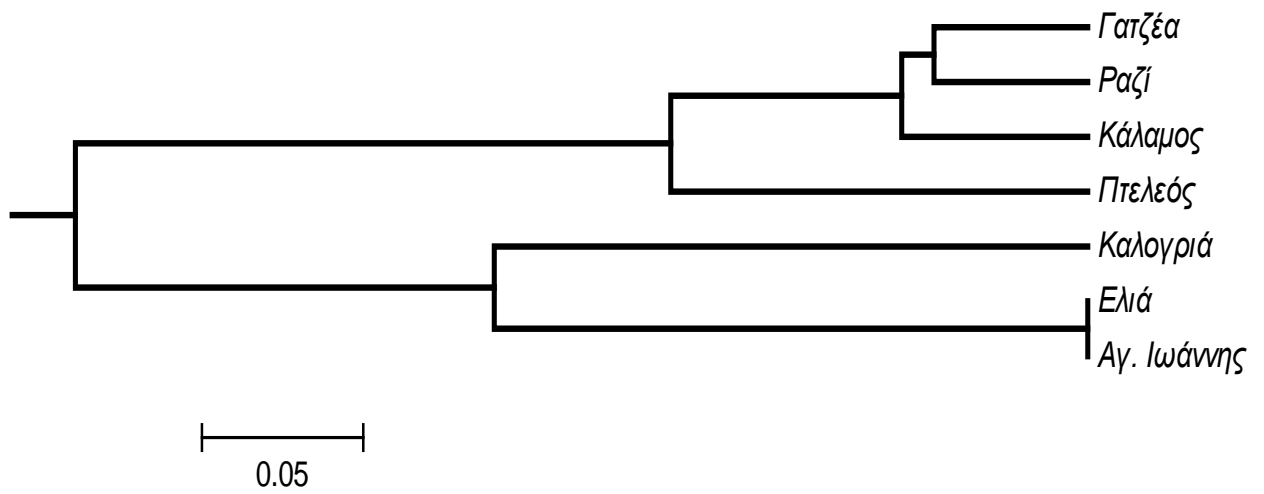
3.1.11 Φυλογενετικά Δένδρα

Από τους απλότυπους που προέκυψαν με βάση τα RFLPs δημιουργήθηκαν φυλογενετικά δένδρα, με την μέθοδο UPGMA και τον αλγόριθμο Cavalli – Sforza. Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δένδρο των σύνθετων απλότυπων και για τους τέσσερις γενετικούς τύπους. Στο δένδρο αυτό βλέπουμε ότι οι απλότυποι

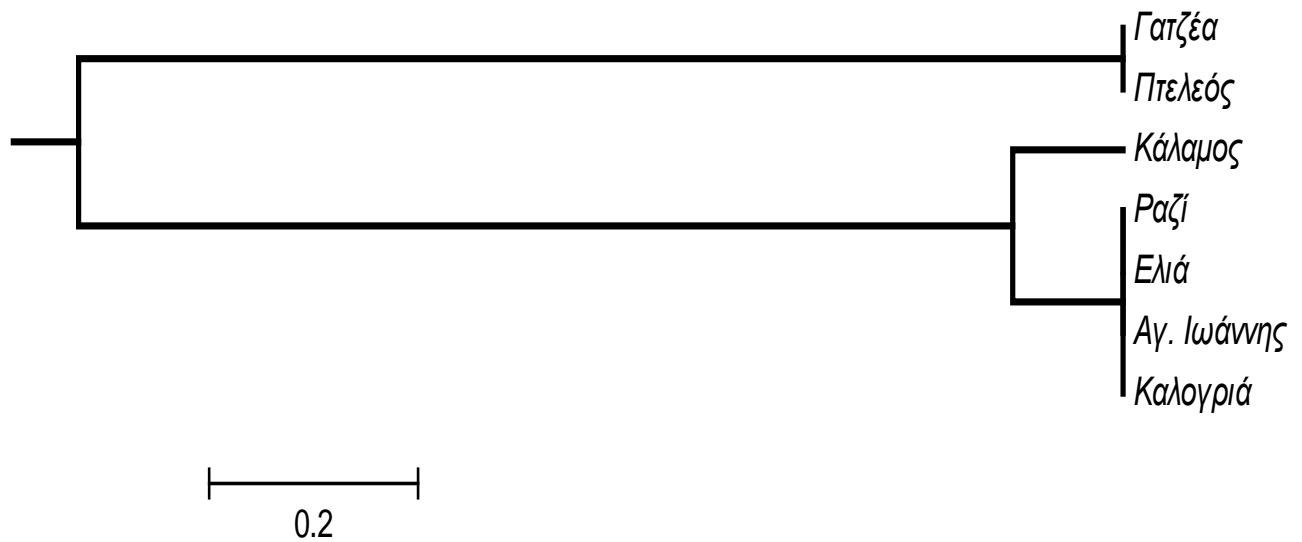
σχηματίζουν δύο ομάδες, η πρώτη ομάδα αποτελείται από τους πρώτους έξι απλότυπους και η δεύτερη από τους άλλους έξι. Όπως δηλαδή κατανέμονται και στους δύο κόλπους, Παγασητικό και Τορωναίο. Στα φυλογενετικά δένδρα που δημιουργήθηκαν για κάθε γενετικό τόπο ξεχωριστά, παρατηρήθηκε ότι για τους γενετικούς τόπους ITSΒ και ITSA ομαδοποιήθηκαν οι πληθυσμοί Γατζέα, Πτελεός, Ραζί και Κάλαμος μαζί (Παγασητικός) και οι πληθυσμοί Καλογριά, Αγ. Ιωάννης και Ελιά μεταξύ τους (Τορωναίος). Ενώ για τους γενετικούς τόπους 18S και 23S ο πληθυσμός από την περιοχή Ραζί ομαδοποιήθηκε μαζί με τους πληθυσμούς του Τορωναίου.



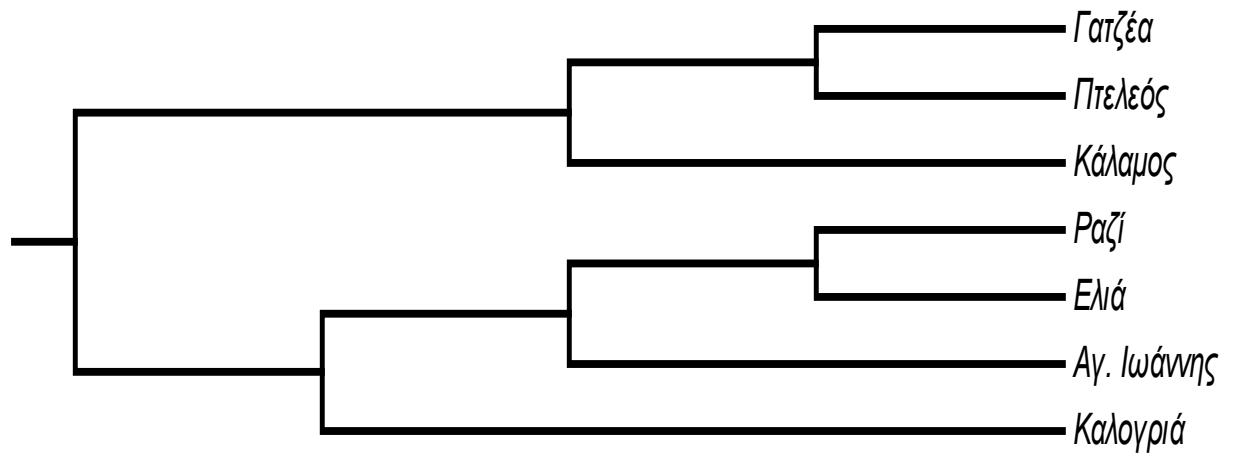
Εικόνα 6: Φυλογενετικό δένδρο των σύνθετων απλότυπων για όλους τους γενετικούς τόπους.



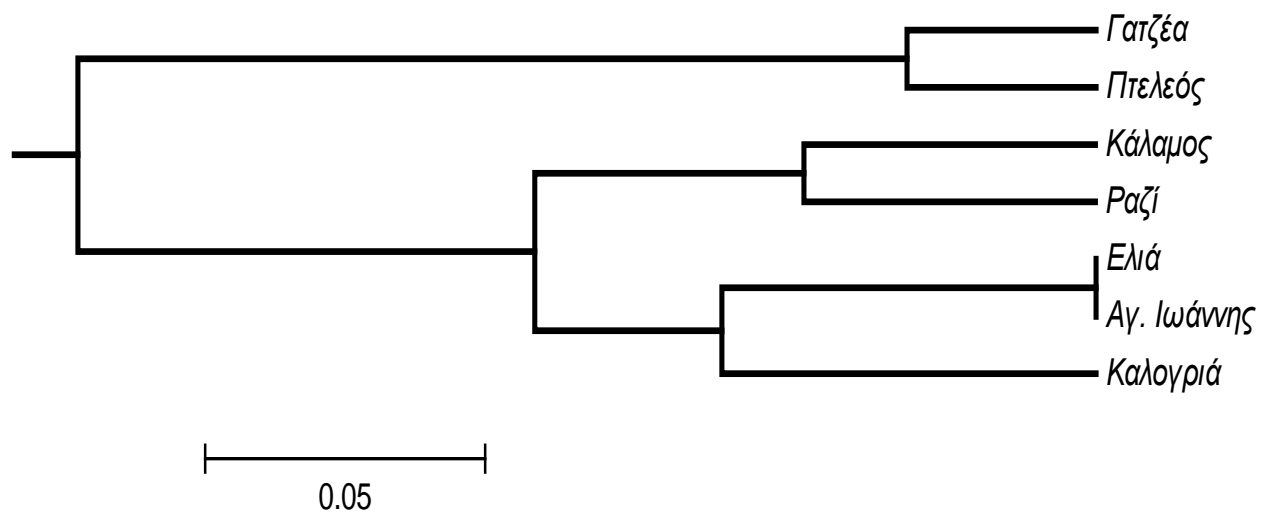
Εικόνα 7: Φυλογενετικό δένδρο των περιοχών δειγματοληψίας για τον γενετικό τόπο ITSb.



Εικόνα 8: Φυλογενετικό δένδρο των περιοχών δειγματοληψίας για τον γενετικό τόπο 23S.



Εικόνα 9: Φυλογενετικό δένδρο των περιοχών δειγματοληψίας για τον γενετικό τόπο 18S.



Εικόνα 10: Φυλογενετικό δένδρο των περιοχών δειγματοληψίας για τον γενετικό τόπο ITSa.

3.2 Συζήτηση

Σε αυτήν την μελέτη ερευνήθηκε η υπόθεση της ύπαρξης μιας μη προσδιορισμένης και κρυπτογραφημένης γενετικής διαφοροποίησης στο αρχιπέλαγος του Βορείου Αιγαίου για το θαλάσσιο αγγειόσπερμο *C. nodosa*. Εξετάστηκαν οι προηγούμενες δημοσιευμένες εργασίες σχετικές με τη στην γενετική πλαστικότητα του *C. nodosa* σε όλη τη Μεσόγειο, όπου η γενετική αφθονία είναι ιδιαίτερα μεταβαλλόμενη και κυμαίνεται από πολύ χαμηλά επίπεδα έως κάποια μέγιστα στις πιο ανατολικές περιοχές (Alberto et al. 2008).

Έγινε ανάλυση της γενετικής δομής επτά πληθυσμών του είδους *C. nodosa* σε όλα τα τρία ιεραρχικά στάδια (μεταξύ των περιοχών, των πληθυσμών ανάμεσα στις δύο περιοχές και των πληθυσμών σε κάθε περιοχή ξεχωριστά), με τη χρήση RFLPs. Από την ανάλυση αυτή βρέθηκε ότι στους πληθυσμούς μας υπάρχουν 12 διαφορετικοί απλότυποι οι οποίοι κατανέμονται μη ομοιόμορφα στους διαφορετικούς πληθυσμούς (Πιν. 5). Συγκεκριμένα οι πρώτοι 6 απλότυποι εμφανίζονται μόνο σε 2 πληθυσμούς (Γατζέα και Πτελεό), ενώ οι υπόλοιποι μοιράζονται στις υπόλοιπες 5 περιοχές. Οι 2 περιοχές της Χαλκιδικής (Ελιά και Αγ. Ιωάννης) εμφανίζουν μόνο ένα απλότυπο. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται σε μια πρόσφατη αποίκηση στις περιοχές αυτές, από την περιοχή της Καλογριάς, όπου οι πληθυσμοί δεν έχουν προλάβει να διαφοροποιηθούνε γενετικά. Ο συχνότερα εμφανιζόμενος απλότυπος είναι ο 9, ο οποίος εμφανίζεται συνολικά σε 90 δείγματα. Η διαφοροποίηση στους απλότυπους φαίνεται και στο δενδρόγραμμα των απλοτύπων (Εικ. 6), όπου οι 6 πρώτοι απλότυποι ομαδοποιούνται μαζί, το οποίο επιβεβαιώνει τη διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε και από τις συχνότητές τους και την παρουσία τους στους 2 μόνο πληθυσμούς, ενώ οι

υπόλοιποι 5 δημιουργούν μια ξεχωριστή ομάδα. Ο απλότυπος 12 χρησιμοποιήθηκε ως εξωομάδα για τη δημιουργία του δένδρου και γι' αυτό δεν ομαδοποιήθηκε.

Για τους πληθυσμούς έγινε τεστ ισορροπίας Hardy-Weinberg (Πιν. 13) από το οποίο προέκυψαν στατιστικά μη σημαντικές διαφορές. Αυτό το γεγονός, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι πληθυσμοί βρίσκονται κάτω από φυσική επιλογή ή υπάρχει τυχαία γενετική παρέκκλιση ή δρουν μεταλλάξεις ή υπάρχει μετανάστευση ανάμεσα στους πληθυσμούς. Από τον υπολογισμό των μέσων τιμών ετεροζυγωτίας, H_e (Πιν. 7) καταλήξαμε στο ότι οι πληθυσμοί έχουν πολύ μικρή ροή γονιδίων καθώς οι τιμές κυμαίνονταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα, από 0 στους πληθυσμούς της Ελιάς και του Αγ. Ιωάννη, έως την υψηλότερη στην περιοχή του Κάλαμου 0,260.

Από την ανάλυση AMOVA (Πιν. 8) υποδείχτηκε ότι η παραλλακτικότητα μεταξύ των 2 περιοχών (Παγασητικός και Χαλκιδική) ήταν 20,63%, μεταξύ των όλων των πληθυσμών 25,23% και μεταξύ των πληθυσμών μέσα στην κάθε περιοχή 54,14%. Επίσης από την ανάλυση αυτή υπολογίστηκε η συνολική τιμή της παραμέτρου $F_{st}=0,74771$, η οποία μας έδειξε ότι έχουμε μικρή γονιδιακή ροή ανάμεσα σε όλους τους πληθυσμούς. Επιπλέον έγινε F_{st} ανάλυση ανά ζεύγη πληθυσμών (Πιν. 11), η οποία μας αποκάλυψε σημαντική παραλλακτικότητα μεταξύ τους, καθώς είχαμε υψηλές τιμές έως και 0,89655 ανάμεσα στον πληθυσμό της Γατζέας και της Ελιάς και της Γατζέας με τον Αγ. Ιωάννη. Έτσι από την ανάλυση F_{st} βγήκε το συμπέρασμα ότι υπάρχει μικρή γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών, που οφείλεται στην περιορισμένη δυνατότητα διασποράς των γαμετών των φανερόγαμων στο θαλάσσιο περιβάλλον και στο γεγονός ότι το θαλάσσιο γεωφυσικό βάθος περιέχει συχνά διάφορα είδη εμποδίων, που έχουν ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της επέκτασης και αποίκησης των φανερόγαμων. Από τις γενετικές αποστάσεις κατά N_{ei} (Πιν. 10) παρατηρήθηκε ότι οι μεγαλύτερες

διαφοροποιήσεις παρουσιάστηκαν ανάμεσα στους πληθυσμούς της Γατζέας και του Πτελεού σε σχέση με όλες τις άλλες περιοχές, με τιμές έως 0,526 και 0,645 αντίστοιχα.

Η ύπαρξη σημαντικής διαφοροποίησης στη δομή των πληθυσμών, σε σχέση με τη γεωγραφική εξάπλωσή του στις δύο ευδιάκριτες περιοχές μελέτης (Παγασητικός και Χαλκιδική), ήταν εμφανής και στα φυλογενετικά δέντρα που δημιουργήθηκαν (Διαγρ. 2, 3, 4 και 5) και αποκάλυψαν την έντονη φυλογεωγραφική δόμηση μεταξύ των περιοχών. Το δενδρόγραμμα που έδωσε την καλύτερη ομαδοποίηση των πληθυσμών ήταν από τον γενετικό τόπο ITSΒ (Εικ. 7), ο οποίος όπως αναφέρεται ήταν και ο πιο πολυμορφικός, όπου οι πληθυσμοί διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με την περιοχή, Παγασητικός και Χαλκιδική. Με την ανάλυση Mantel (Σχ. 17) που έγινε δεβρέθηκε κανένας συσχετισμός μεταξύ της γενετικής διαφοροποίησης και της γεωγραφικής απόστασης μεταξύ των πληθυσμών του *C. nodosa* ($P > 0,05$). Επίσης έγινε ανάλυση PCA (Σχ. 16) απ' όπου οι πληθυσμοί κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 ομάδες, οι περιοχές Ελιά, Καλογριά και Αγ. Ιωάννης ομαδοποιήθηκαν μαζί όπως αναμενόταν καθώς ανήκουν στη Χαλκιδική, η δεύτερη ομάδα δημιουργήθηκε από τις περιοχές Κάλαμος και Ραζί, οι οποίες βρίσκονται σε πολύ κοντινή απόσταση και η τρίτη ομάδα δημιουργήθηκε από τον πληθυσμό της Γατζέας και του Πτελεού.

Οι γενετικές διαφορές, που αποκαλύφθηκαν από τους RFLP απλότυπους, μεταξύ των δειγμάτων του *C. nodosa* μας απεικόνισαν την περιορισμένη ροή γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών σε ορισμένες τοποθεσίες. Αυτή η παρατήρηση μας υποδεικνύει ότι η χωρική διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες μπορούν να δράσουν ως εκλεκτικές πιέσεις. Αυτή η υπόδειξη έχει επίσης προταθεί για τους πληθυσμούς του *C. nodosa* στις Κανάριες Νήσους (Alberto et al. 2006). Επίσης, ίσως αυτή η διαφοροποίηση να οφείλεται στη γεωμορφολογία του

πυθμένα της θάλασσας και σε άλλες κλιματολογικές και γεωλογικές διεργασίες οι οποίες περιορίζουν την εγγενής αναπαραγωγή και διασπορά του είδους.

Είναι πιθανό τόσο τη διαφοροποίηση μεταξύ ομάδων πληθυσμών όσο και μεταξύ πληθυσμών μέσα σε κάθε ομάδα, να οφείλεται στην επίδραση της μη πρόσφατης αποίκησης. Για να εξετασθεί αυτό το σενάριο, υπολογίστηκαν οι τιμές Tajima's D για όλους τους πληθυσμούς (οι τιμές Tajima's D θα πρέπει να είναι στατιστικώς μη σημαντικές). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του τεστ Tajima (Πιν. 12), οι τιμές βρέθηκαν στατιστικώς μη σημαντικές για όλους τους πληθυσμούς. Αυτό μας υποδεικνύει ότι η διαφοροποίηση των επτά πληθυσμών δεν ήταν αποτέλεσμα μιας πρόσφατης αποίκησης αλλά πιθανώς αντανακλά ότι οι πληθυσμοί είναι μακροχρόνιοι και έχουν σταθερή δημογραφική ισορροπία. Το σενάριο αυτό ενισχύεται από την υψηλή ποικιλομορφία απλότυπων και νουκλεοτιδίων που βρέθηκε σε κάποιους πληθυσμούς, τα οποία είναι χαρακτηριστικά μεγάλων σταθερών πληθυσμών με μεγάλη εξελικτική ιστορία, ή είναι αποτέλεσμα δευτερογενούς επαφής γεωγραφικώς απομονωμένων πληθυσμών.

Είναι ευρέως γνωστό ότι τα είδη που πολλαπλασιάζονται μέσω των κλώνων τους παρουσιάζουν περιορισμένη διασπορά των γαμετών τους στα όρια της επέκτασής τους (Billingham et al. 2003). Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι η αμφιγονική αναπαραγωγή συμβάλει ελάχιστα στη συντήρηση των πληθυσμών οι οποίοι εξαπλώνονται κλωνικά (με τους κλώνους τους) (Eckert 2002). Οι Alberto et al. (2001) βρήκαν πολύ περιορισμένη γενετική ποικιλότητα στα όρια εξάπλωσης του *C. nodosa* στις βορειότερες περιοχές του Ατλαντικού (δυτική Πορτογαλία) χρησιμοποιώντας δείκτες RAPD. Εν αντιθέσει αυτό φαίνεται να αναιρείται για την περίπτωση εξάπλωσής του στις Κανάριες Νήσους όπου υπάρχει υψηλή γενοτυπική αφθονία (Alberto et al., 2006).

Για την περίπτωση αυτών των νησιών είχε προταθεί ότι η αμφιγονική αναπαραγωγή είναι μια σημαντική συνιστώσα για τη διατήρηση του πληθυσμού, πρόταση η οποία συμφωνεί με τα υψηλά επίπεδα αναπαραγωγής που επισημάνθηκε επίσης και από τους Reyes et al. (1995).

Τα δείγματα που λήφθηκαν από τις περιοχές Ελιά και Αγ. Ιωάννης, προερχόταν είτε από ανομοιόμορφα λιβάδια είτε από λειμώνες που είχαν τεμαχιστεί από την κυματική δράση και παρουσίασαν χαμηλή νουκλεοτιδική αφθονία. Είναι πιθανό η χαμηλή αφθονία αυτή να οφείλεται είτε στην κυματική δράση, η οποία τεμάχισε τους λειμώνες και στις περιοχές αυτές επικράτησε κλωνική επανεποίκιση, είτε στο φαινόμενο της στενωπού. Σε αντίθεση με τους πληθυσμούς αυτούς, τα δείγματα που προερχόταν από τις υπόλοιπες περιοχές παρουσίασαν υψηλή νουκλεοτιδική ποικιλομορφία, για τις τρεις γενετικές περιοχές ITSB, ITSA και 18S. Δεν μπορούμε να αγνοήσουμε το γεγονός ότι το *C. nodosa* μπορεί να έχει υψηλή δυνατότητα διασποράς στον Παγασητικό κόλπο, η οποία υποστηρίζεται από το γεγονός της παρατήρησης νεαρών σποριόφυτων του είδους, που βρέθηκαν μέσα στους λειμώνες. Παρόμοιες παρατηρήσεις έκαναν και οι Alberto et al. (2006) σε μερικούς λειμώνες στις Κανάριες Νήσους, όπου ανακαλύφθηκε υψηλή δυνατότητα διασποράς.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη υποστήριξε την ύπαρξη ευδιάκριτων προτύπων διαφοροποίησης των πληθυσμών του *C. nodosa*, που στις περισσότερες περιπτώσεις υποδεικνύει ότι οι πληθυσμοί βρίσκονται κάτω από φυσικές πιέσεις και έχουν χαμηλή ικανότητα μετανάστευσης. Αυτό μεταφράζεται σε γενετική απομόνωση και περιορισμένη ροή γονιδίων, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της συχνότητας των αλληλόμορφων λόγω της γενετικής παρέκκλισης. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η εγγενής αναπαραγωγή έχει σημαντική συμβολή στη διατήρηση των πληθυσμών του *C. nodosa* στο βόρειο Αιγαίο πέλαγος. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η γενετική πληθυσμιακή του είδους αυτού θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω και πιθανώς μια ανάλυση με μικροδορυφόρους να μας δείξει περισσότερες γενετικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών προκειμένου να εξαχθούν περισσότερα συμπεράσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Παναγιωτίδης Π., Χατζημπίρος Κ. (2004) ΠΑΡΑΚΤΙΑ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ & ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΙΕΣΕΙΣ ΣΤΙΣ ΑΚΤΕΣ Παραδείγματα από την Ελλάδα. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο και Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, Αθήνα
- Castro P., Huber M.E. (1999) Θαλάσσια Βιολογία (Μετάφραση Κούκουρας Θ. & Βουλτσιάδου Ε.). University Studio Press, Θεσσαλονίκη, σελ. 137-138

Ξένη Βιβλιογραφία

- Addinsoft (2008) XLSTAT-Pro: your data analysis solution. Version 9.0.
- Alberto F., Mata L., Santos R. (2001) Genetic homogeneity in the seagrass *Cymodocea nodosa* at its northern Atlantic limit revealed through RAPD. *Marine Ecology Progress Series* 221: 299–301
- Alberto F., Correia L., Billot C., Duarte C.M., Serrão E. (2003) Isolation and characterization of microsatellite markers for the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Molecular Ecology Notes* 3: 397–399
- Alberto F., Gouveia L., Arnaud-Haond S., Perez-Llorens J.L., Duarte C.M., Serrão E.A. (2005) Within-population spatial genetic structure, neighborhood size and clonal subrange in the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Molecular Ecology* 14, 2669–2681

- Alberto F., Arnaud-Haond S., Duarte C.M., Serrão E.A. (2006) Genetic diversity of a clonal angiosperm near its range limit: the case of *Cymodocea nodosa* at the Canary Islands. *Marine Ecology Progress Series* 309: 117 - 129
- Alberto F., Massa S., Manent P., Diaz-Almela E., Arnaud-Haond S., Duarte C.M., Serrao E.A. (2008) Genetic differentiation ad secondary contact zone in the seagrass *Cymodocea nodosa* across the Mediterranean-Atlantic transition region. *Journal of Biogeography* 35: 1279-1294
- Bay D. (1984) A field study of the growth dynamics and productivity of *Posidonia oceanica* (L.) delile in Calvi Bay, Corsica. *Aquatic Botany* 20: 43–64
- Bianchi C.N., Peirano A. (1995) Atlante delle fanerogame marine della Liguria: *Posidonia oceanica* e *Cymodocea nodosa*. ENEA, Centro Ricerce Ambiente Marino, La Spezia, pp. 1-146
- Billingham M.R., Reusch T.B.H., Alberto F., Serrao E.A. (2003) Is asexual reproduction more important at geographical limits? A genetic study of the seagrass *Zostera marina* in the Ria Formosa, Portugal. *Marine Ecology Progress Series* 265: 77–83
- Borum J., Greve TM. (2004) The four European seagrass species. In *European seagrasses: an introduction to monitoring and management*, Borum J., Duarte CM., Krause-Jensen D. and Greve TM. (Eds). A publication by the EU project Monitoring and Managing of European Seagrasses (M&MS) EVK3-CT-2000-00044
- Catsiki V.A., Panayotidis P. (1993) Copper, chromium and nickel in tissues of the Mediterranean seagrasses *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* (Potamogetonaceae) from Greek coastal areas. *Chemosphere* 26 (5): 963-978

- Caye G., Meinesz A. (1985) Observations on the vegetative development, flowering and seeding of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson on the Mediterranean coasts of France. *Aquatic Botany* 22: 277-289
- Duarte C.M., Chiscano C.L. (1999) Seagrass biomass and production: a reassessment. *Aquatic Botany* 65: 159–174
- Duarte C.M., Middelburg J.J., Caraco N. (2005) Major role of marine vegetation on the oceanic carbon cycle. *Biogeosciences* 2: 1–8
- Duffy J.E. (2006) Biodiversity and the functioning of seagrass ecosystems. *Marine Ecology Progress Series* 311:233–250
- Eckert C.G. (2001) The loss of sex in clonal plants. *Evolutionary Ecology* 15: 501–520
- Excoffier L., Smouse P., Quattro J. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491
- Felsenstein J. (1995) PHYLIP (phylogeny inference package). Version 3.572. Distributed by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle
- Ferrat L., Pergent-Martini C., Roméo M. (2003) Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology* 65:187-204
- Hemminga M.A., Duarte C.M. (2000) Seagrass ecology. *Cambridge University Press*, Cambridge, UK

- Hendriks I.E., Bouma T.J., Morris E.P., Duarte C.M. (2010) Effects of seagrasses and algae of the *Caulerpa* family on hydrodynamics and particle-trapping rates. *Marine Biology* 157:473–481
- Heywood J.S. (1991) Spatial analysis of genetic variation in plant populations. *Annual Review in Ecology and Systematics* 22: 335–355
- Ki J-S., Han M-S. (2007) Nuclear rDNA and chloroplast *rbcL*, *rbcS* and IGS sequence data, and their implications from the Japanese, Korean, and North American harmful algae, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Environmental Research* 103: 299-304
- Lovett Doust J., Schmidt M., Lovett Doust L. (1994) Biological assessment of aquatic pollution: a review, with emphasis on plants as biomonitors. *Biological Reviews* 69: 147-186
- Malea P. (1993) Bioaccumulation of aluminium in the seagrasses *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers and *Posidonia oceanica* (L) Delile and in macroalgae of the gulf of Antikyra (Greece). *Botanica Marina* 36 (5): 423-431
- Malea P., Haritonidis S. (1995) Local distribution and seasonal variation of Fe, Ph, Zn, Cu, Cd, Na, K, Ca, and Mg concentrations in the seagrass *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers in the Antikyra Gulf, Greece. *Marine Ecology* 16 (1): 41-56
- McElroy D., Moran P., Bermingham E., Kornfield I. (1992) REAP: An Integrated Environment for the Manipulation and Phylogenetic Analysis of Restriction Data. *Journal of Heredity* 83(2): 157-158
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:1215

- Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590
- Orth R.J., Carruthers T.J.B., Dennison W.C., Duarte C.M., Fourqurean J.W., Heck JR. K.L., Hughes A.R., Kendrick G.A., Kenworthy W.J., Olyarnik S., Short F.T., Waycott M., Williams S.L. (2006) A Global Crisis for Seagrass Ecosystems. *BioScience* 56(12): 987-996
- Provan J., Wattier R.A., Maggs C.A. (2005) Phylogeographic analysis of the red seaweed *Palmaria palmate* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel. *Molecular Ecology* 14: 793-803
- Reyes J, Sansón M, Afonso-Carrillo J (1995) Distribution and reproductive phenology of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson in the Canary islands. *Aquatic Botany* 50:171–180
- Roff D.A., Bentzen P. (1989) The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: chi 2 and the problem of small samples. *Molecular Biology and Evolution* 6: 539-545
- Ruggiero M.V., Reusch T.B.H., Procaccini G. (2005) Local genetic structure in a clonal dioecious angiosperm. *Molecular Ecology* 14: 957–967
- Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-426
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis. User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. Of Anthropology, University of Geneva, Geneva
- Tajima F. (1989) Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595

- Vekemans X., Hardy O.J. (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* 13: 921–935
- Wright S. (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114–138
- Wright S. (1951) The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 323-354

Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

- http://www.ccmarmar.ualg.pt/biomares/pradarias_marinhas_en.html (Πρόσβαση 10-10-2010)
- http://doris.ffessm.fr/fiche2.asp?fiche_numero=762 (Πρόσβαση 10-10-2010)

ABSTRACT

Marine angiosperms of fanerogames are sea flowering plants with two types of reproduction; asexual, through clonal reiteration of shoots (rhizomes) and sexual, via the exchange of their sexual products. They possess an important part in the marine ecosystem since such meadows retain primary and secondary production; they constitute fish egg-laying regions, fish species recruitment areas and they also play a dominant role in the carbon circle. Moreover, they can be used in order to diagnose or predict negative effects from human and natural stress acts because these organisms are sensitive to environmental changes, and react faster to the pollutant presence than higher level organisms of the food chain do.

The marine fanerogame *Cymodocea nodosa*, that is quite abundant in the Mediterranean sea, was studied. *C. nodosa* is a dioecious marine angiosperm where its growth depends on flora and attributes an extensive morphological plasticity. For this species, the genetic diversity and the genetic flow were investigated among seven natural meadows by using RFLP analysis approach. The studied meadows were located in two gulfs, in the northern Aegean Archipelagos (Pagasitikos and Chalkidiki). In total 210 samples were screened; amplification of four genetic loci (ITSA, ITSB, 18S and 23S), and four restrictive enzymes (*AluI*, *RsaI*, *HaeIII* and *EcoRI*) were used for the total digestion of the PCR products. All RFLPs products, per genetic locus and meadow, were visualized on 1.2% agarose gels buffered with TAE, stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet radiation (UV) light. The haplotype presence or absence according to the size of the DNA pieces using the UVIDoc Mw package software, was compared to the denoted DNA molecular size. Composite

haplotype data and restriction site matrix were used for analyses using REAP 4.0, GenAlex, Arlequin, XLSTAT and PHYLIP 3.57c programs.

Twelve different RFLP haplotypes were revealed by combining haplotype designations for the four surveyed polymorphic restriction enzymes for all loci among the 210 isolates. ITS_B was the most polymorphic locus. In all meadows there was no evidence of divergence from Hardy-Weinberg equilibrium. Alternatively low overall genetic flow value among the studied meadows was detected. The observed values of F_{ST} across all loci and population (total (0.74771) and between the populations (till 0.89655)) revealed the existence of a previously unidentified, non-significant nevertheless, diversity in the North Aegean Sea, implying a possible geographical and reproductive diversity pattern. AMOVA indicated such a significant genetic variation within populations (34%) as among regions (32%) and populations (34%). A non-significant correlation between genetic and geographic distances among the populations was recorded when using a Mantel's test.

From the observations above, it was evident that the reported spatial differentiation could be attributed to differential environmental conditions, which can act as eclectic evolutionary forces. Moreover, these differentiations may be likely due to the sea's level fluctuations and other climatic and geographic factors which might reduce the sexual reproduction and species interspersions. Such scenarios were tested by Tajima's test of neutrality.

In conclusion, this approach suggests a distinct diversity pattern attributed more of *C. nodosa* meadows, which in most cases were to natural or environmental forces rather than their dispersal ability. These were also observed that the sexual reproduction has an

important contribution to the population retention of *C. nodosa* in the North Aegean Archipelagos.

Keywords: *C. nodosa*, RFLPs, Aegean Sea, genetic diversity, gene flow