



Επιτηρητές:

Frithjof C. Küpper
fkuepper@abdn.ac.uk

καθ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη
kalrapad@bio.uth.gr

καθ. Καρπούζας Δημήτριος
dkarpouzas@bio.uth.gr

**"Φύκη που βρίσκονται σε νησιά:
DNA barcoding σε Μακροφύκη
από νησιά της Μεσογείου και από
το νησί Ascension".**

Από:

Ριζούλη Αναστασία

Πτυχιακή εργασία για το τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

(2017-2018)



Supervisors:

Frithjof C. Küpper
fkuepper@abdn.ac.uk

Papadopoulou Kalliopi
kalpapad@bio.uth.gr

Karpouzas Dimitrios
dkarpouzas@bio.uth.gr


**"Insular Algae:
DNA barcoding of Macroalgae
from
Islands in the
Mediterranean
and Ascension Island".**

By

Rizouli Anastasia

A thesis presented for the degree of Biochemistry
and Biotechnology by research at the University
of Thessaly.

(2017-2018)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	
Κυεpper Frithjof 	<i>Επιβλέπων καθηγητής</i> Καθηγητής στο τμήμα Θαλάσσιας Βιοποικιλότητας Oceanlab, Πανεπιστήμιο του Aberdeen , Σκωτία
Παπαδοπούλου Καλλιόπη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Καρπούζας Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή του πανεπιστημίου του Aberdeen, στην Σκωτία, Frithjof Küpper για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στην διεξαγωγή αυτής της έρευνας, η οποία αφορά στην μελέτη της θαλάσσιας χλωρίδας στις παρακάτω δύο περιοχές, καθώς και για την πραγματοποίηση της δειγματοληψίας τόσο από το νησί Ascension αλλά και από το νησί της Ρόδου αλλά και της καλλιέργειας των λαμβανομένων δειγμάτων.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω και τους καθηγητές Παπαδοπούλου Καλλιόπη και Καρπούζα Δημήτριο που με βοήθησαν, ως επιτηρητές, στην διεξαγωγή της πτυχιακής μου εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τον κ. Akira Peters, για την συνεχή του στήριξη και νουθεσία και ειδικά για την εκπαίδευσή μου σε ότι αφορά στην καλλιέργεια και στην μοριακή προσέγγιση της έρευνας. Ειλικρινά απήλαυσα την ευκαιρία που μου έδωσε να παρακολουθήσω και να ενστερνιστώ τις γνώσεις και τις εμπειρίες τους. Πραγματικά εκτίμησα τον τρόπο με τον οποίο με διδάξαν και με βοήθησαν να λύσω όποια προβλήματα αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κα. Λουιζίδου Βίβιαν που μου έδωσε την ευκαιρία να γίνω μέλος της διδακτορικής της έρευνας και μου επέδειξε εμπιστοσύνη ώστε να δουλέψω η ίδια ένα μέρος των δειγμάτων της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Munoz Liliana για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε ώστε να με βοηθήσει στις μοριακές διεργασίες κατά την διαμονή μου στο εργαστήριο Βιοχημείας του πανεπιστημίου του Aberdeen.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Περίληψη	σελ.7
Abstract	σελ.9
2. Εισαγωγή	σελ.10
2.1 Γενική Εισαγωγή	σελ.11
2.2 Γεωγραφική θέση και φυσικό περιβάλλον των περιοχών που μελετώνται	σελ.13
2.3 Κλίμα και θαλάσσια βιοποικιλότητα των περιοχών που μελετώνται	σελ.14
2.4 Οι περιοχές DNA που χρησιμοποιήθηκαν ως μοριακοί δείκτες στη μέθοδο «DNA barcoding»	σελ.16
2.5 Μέθοδος «germling emergence» και «DNA barcoding»	σελ.17
2.6 Σκοπός της εργασίας	σελ.20
3. Υλικά και μέθοδοι	σελ.21
3.1 Συλλογή των δειγμάτων υποστρώματος	σελ.22
3.2 Επάση των δειγμάτων υποστρώματος	σελ.22
3.3 Απομόνωση των στελεχών	σελ.22
3.4 Μοριακές μέθοδοι	σελ.23
3.4.1 Απομόνωση DNA – Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA μακροφυκών με βάση το CTAB	σελ.23
3.4.2 Πρωτόκολλο PCR αντιδράσεων	σελ.25
3.4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	σελ.27
3.4.4 Απομόνωση DNA και αλληλούχιση	σελ.28
4. Αποτελέσματα	σελ.30
4.1 Γενικά αποτελέσματα	σελ.31
4.2 Μοριακά αποτελέσματα	σελ.31
5. Συζήτηση	σελ.43
6. Παραπομπές	σελ.45

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα έρευνα έχει ως στόχο να εξερευνήσει την κρυφή υποπαλιρροιακή θαλάσσια χλωρίδα τόσο στο νησί Ascension όσο και στο νησί της Ρόδου χρησιμοποιώντας:

1) την μέθοδο «germling emergence», δηλ. απομόνωση μονοκαλλιεργειών φυκών που αναδύονται σε καλλιέργειες δειγμάτων, τα οποία έχουν ληφθεί με κατάδυση και τα οποία επωάζονται σε υπόστρωμα και

2) DNA barcoding για την επακόλουθη μοριακή αναγνώριση των απομονωμένων στελεχών.

Συνολικά, εργαστήκαμε πάνω σε ένα σύνολο 61 δειγμάτων, 29 Φαιοφυκών που απομονώθηκαν από δείγματα από το νησί Ascension και 32 Φαιοφυκών που απομονώθηκαν από δείγματα από το νησί της Ρόδου. Όσον αφορά στην μορφολογική και μοριακή ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκαν πυρηνικοί δείκτες DNA για τις εξής περιοχές του γονιδιώματος: α) SSU, β) COI-5P, γ) rbcL και δ) rbcL-rbcLS spacer,

Τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων για τα στελέχη της Ρόδου έδειξαν πως 13 από τις μονοκαλλιέργειες Φαιοφυκών (39%) ανήκουν στην οικογένεια *Chordariaceae* και 3 από αυτές (9%) στην οικογένεια *Acinetosporaceae*. Οι υπόλοιπες μονοκαλλιέργειες Φαιοφυκών ταυτοποιήθηκαν σε είδος όπως περιγράφεται παρακάτω: *Ectocarpaceae sp.*, *Arthrocladia villosa*, *Striaria attenuata*, *Spermatochnus paradoxus*, *Stictyosiphon soriferus*, *Elachista stellaris*, *Sporochnus pedunculatus* και *Giraudya sphacelarioides*.

Όσον αφορά στα στελέχη που απομονώθηκαν από τη νήσο Ascension, τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων, δεν ήταν ποιοτικά επαρκή για μία ολοκληρωμένη φυλογενετική ανάλυση.

1. ABSTRACT

The present study aims to explore the cryptic subtidal marine vegetation present in both Ascension Island and Rhodes Island in the Mediterranean using

i) the “germling emergence method”, i.e. isolation of unialgal cultures emerging in culture from incubated substratum samples obtained by diving and

ii) DNA barcoding for the subsequent molecular identification of the isolated strains.

In total 61 brown algal strains were isolated, 32 of which were Rhodes samples isolates and 29 were Ascension samples isolates. For morphological and molecular identification we used nrDNA and chloroplast DNA markers for the SSU region, COI-5P, *rbcL*, *rbcS* and *rbcLS* spacer.

The molecular results showed that 13 of the brown algae Rhodes isolates (39%) belonged to the *Chordariaceae* family and 3 of them (9%) in the *Acinetosporaceae* family. The rest of the brown isolates were identified by species as *Ectocarpaceae* sp., *Arthrocladia villosa*, *Striaria attenuata*, *Spermatochnus paradoxus*, *Stictyosiphon soriferus*, *Elachista stellaris*, *Sporochnus pedunculatus* and *Giraudya sphacelarioides*.

The results of molecular studies on Ascension isolates, were not of great quality, so we were not able to create a correct phylogeny.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Γενική Εισαγωγή

Τα φύκη είναι φωτοσυνθετικοί φυτικοί οργανισμοί που δεν έχουν βλαστούς ρίζες ή καρπούς όπως τα ανώτερα φυτά. Αντίθετα έχουν πρωτόγονη οργάνωση, πολύ απλή στις κατώτερες ταξινομικά ομάδες και πιο πολύπλοκη στις ανώτερες. Σχηματίζουν σπόρια αντί για σπέρματα. Ορισμένα έχουν πολύπλοκους βιολογικούς κύκλους. Διαφέρουν πολύ από τα σπερματοφύτα, τόσο από τα χερσαία όσο και από τα θαλάσσια.

Τα φύκη, τόσο τα μικροσκοπικά του φυτοπλαγκτόν, όσο και τα μεγαλύτερων διαστάσεων, τα ορατά με γυμνό μάτι κυριαρχούν στην παράκτια ζώνη. Είναι η βάση στις τροφικές αλυσίδες. Εκμεταλλεύονται τα διαφορετικά μήκη κύματος του φωτός στα διαφορετικά βάθη. Συχνά αγκυρώνονται με όργανα προσκόλλησης πάνω σε βράχια, σε άλλα φύκη ή φανερόγαμα φυτά ή ακόμα και πάνω σε ζωικούς οργανισμούς. Άλλα ωστόσο αιωρούνται μέσα στο νερό. Είναι τα κυρίαρχα φυτά κυρίως του αλμυρού νερού.

Από μορφολογικής άποψης υπάρχουν απλές μονοκύτταρες μορφές, αποικιακές, μικροσκοπικές (μικροφύκη), νηματοειδείς έως πολύπλοκες διακλαδισμένες. Μικροσκοπικά-μικροφύκη είναι τα Διάτομα, τα Πυρροφύκη, αρκετά Χλωροφύκη και λίγα Ροδοφύκη. Άλλα είναι ορατά με γυμνό μάτι και αυτό που βλέπουμε το ονομάζουμε θόλο, ή και μεγάλων διαστάσεων που φτάνουν αρκετά μέτρα μήκος όπως κάποια μεγάλα Φαιοφύκη-συνολικά τα αποκαλούμε μακροφύκη. Αυτά βρίσκονται στη θάλασσα και πολλές φορές σχηματίζουν και θαλάσσια δάση. Είναι αξιοσημείωτο το ότι φτάνουν σε τέτοιες διαστάσεις χωρίς στηρικτικούς ιστούς ή ρίζες αλλά αντλώντας θρεπτικά συστατικά από το νερό που τα περιβάλλει.

Τα φυσικά υποστρώματα στην θαλάσσια φυτοβενθική ζώνη, λαμβάνουν έναν «καταρράκτη» από αναπαραγωγικά κύτταρα φυκών. Διαφορετικά κρυμμένα είδη, περιπλέκουν την ταυτοποίηση των μελών του δεδομένου βιόκοσμου. Τέτοιου τύπου φύκη μπορεί να ανήκουν σε μικροσκοπικά είδη (cryptic size), να αντιπροσωπεύουν την μικροσκοπική μορφή αναγνωρισμένων μακροφυκών (cryptic stage), να παρουσιάζουν κρυμμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά (cryptic morphology), ή ακόμη να περιλαμβάνουν διαφορετικά είδη που ομοιάζουν μορφολογικά (cryptic species) (Peters et al. (2015)).

Η μελέτη των αρχικών σταδίων ανάπτυξης των μακροφυκών *in situ* είναι αρκετά δύσκολη και η γνώση αυτής της πλευράς της ιστορίας προέρχεται κυρίως από μελέτες καλλιέργειών στο εργαστήριο. Η επώαση φυσικών υποστρωμάτων σε περιβάλλον πλούσιο σε θρεπτικά και απαλλαγμένο από φυτοφάγους οργανισμούς

(Lotze et al., 2001) και η μετέπειτα απομόνωση των αναπτυσσόμενων βλαστικών μορφών στα αρχικά στάδια της ανάπτυξής τους, ώστε να μελετηθεί η φυσική ποικιλομορφία αυτών των μικροσκοπικών σταδίων ανάπτυξης, ακολουθείται από μοριακή ταυτοποίηση με τη χρήση ειδικευμένων δεικτών (DNA barcoding). Η μέθοδος αυτή έχει πρόσφατα χαρακτηριστεί ως μέθοδος «Germling Emergence» (Peters et al., 2015).

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η χρήση των μεθόδων «germling emergence» και «DNA barcoding» για να διερευνήσουμε την ποικιλότητα των Φαιοφυκών που απομονώθηκαν από δείγματα τα οποία ελήφθησαν, με καταδύσεις, από διάφορα πεδία δειγματοληψίας τόσο στο νησί Ascension του νησιωτικού συμπλέγματος Falkland στο νότιο Ατλαντικό Ωκεανό, όσο και στο νησί της Ρόδου στα Δωδεκάνησα, στο Αιγαίο πέλαγος.

Για την ταυτοποίηση με τη χρήση της μεθόδου DNA barcoding, στην παρούσα έρευνα επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε δείκτες εξειδικευμένους για την μοριακή ταυτοποίηση Φαιοφυκών.

Τα Φαιοφύκη είναι από τις μεγαλύτερες και πιο σημαντικές ομάδες πρωτογενών παραγωγών στα βενθικά και παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα, και είναι μια συνάθροιση από μορφολογικά ποικίλους οργανισμούς, που κυμαίνονται από μικροσκοπικά νήματα μέχρι 60 μέτρα ψηλά φύκια, αλλά, σε αντίθεση με άλλες ετεροκοντόφυτες τάξεις φυκών, δεν περιλαμβάνουν τάξεις με ανεξάρτητο στάδιο μονοκύτταρης ζωής. Τα Φαιοφύκη είναι από τις πιο πολυπληθείς ομάδες πρωτογενών παραγωγών με περίπου 2.000 γνωστά είδη ταξινομημένα σε 270 φύλα και 13-20 οικογένειες. Τα Φαιοφύκη παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα μορφολογικών δομών, από απλά μικροσκοπικά νημάτια (π.χ. *Ectocarpus*) μέχρι μεγάλα και περίπλοκα παρεγχυματικά φυτά (π.χ. *Macrocystis*). Από οικονομικής άποψης, τα Φαιοφύκη είναι μείζονος σημασίας πηγή τροφής, φυσικών προϊόντων και βιοϊατρικών προμηθειών, συμπεριλαμβανομένων των φυκοκολλοιδών όπως είναι το αλγινικό οξύ (Andersen 1992).

Τα κλασικά συστήματα ταξινόμησης για τα Φαιοφύκη βασίζονται σε τέσσερα βασικά χαρακτηριστικά: (α) τον τύπο του κύκλου ζωής του οργανισμού, (β) τον τρόπο αναπαραγωγής, (γ) τους ρυθμούς ανάπτυξης και (δ) την μορφολογική δομή του θόλου (Bold and Wynne 1985, de Reviere and Rousseau 1999). Αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν, αυθαίρετα, αποδοθεί σε προγονικές και προϋπάρχοντες εξελικτικά καταστάσεις και συνήθιζαν να σχηματίζουν συστήματα ταξινόμησης τα οποία, υποθετικά, αντανάκλούν φυλογενετικές σχέσεις. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα «απλά καφέ φύκη», ή Ectocarpales, εκπροσωπούν την προγονική παρακαταθήκη, από όπου έχουν εξελιχθεί όλες οι υπόλοιπες γενεαλογίες (Kylin

1933, Papenfuss 1953, Scagel 1966, Wynne and Loiseaux 1976) με εξαίρεση εκείνη των *Fucales*.

Η τάξη των *Ectocarpales, sensu stricto*, συμπεριλαμβάνει νηματοειδείς θόλους μίας σειράς κυττάρων. Η αναπαραγωγή είναι, συνήθως, ασεξουαλική, αλλά ορισμένα είδη διαθέτουν στελέχη που αναπαράγονται και εγγενώς (με ισογαμία ή ανισογαμία) με γενιές που, σε μεγάλο βαθμό, είναι ισομορφικές.

Στην τάξη των *Chordariales* εμφανίζονται είδη με ψευδοπαρεγχυματικά μακροθάλεια αλλά και με νηματώδη μικροθαλλούς. Στα στελέχη όπου αναπαράγονται εγγενώς, ο μικροθαλλός παράγει ισογαμέτες.

Η τάξη των *Dictyosiphonales* συμπεριλαμβάνει τόσο παρεγχυματικά μακροθάλεια, όσο και νηματώδη μακροθάλεια, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις λειτουργούν ως γαμετόφυτα, που παράγουν ισογαμέτες.

Η τάξη των *Tilopteridales, sensu stricto*, σχηματίζει παρεγχυματικά μακροθάλεια. Η εγγενής αναπαραγωγή, μέσω ωογονίας, φαίνεται να έχει χαθεί σε διαφορετικό βαθμό.

Η τάξη των *Scytosiphonales* σχηματίζει παρεγχυματικά μακροθάλεια και *Ralfsia*-ομοιάζοντα μακροθάλεια (*crustose macrothalli*). Στα εγγενώς αναπαραχθέντα στελέχη, τα μακροθάλεια είναι γαμετοφυτικά και αναπαράγονται με ισογαμέτες. Τα περισσότερα Φαιοφύκη τα οποία διαθέτουν ένα μόνο πλευρικό χλωροπλάστη σε κάθε κύτταρο, ταξινομούνται σε αυτή την τάξη.

Η συστηματική ταξινόμηση που βασίζεται σε μοριακούς δείκτες έχει μεταβάλει σημαντικά την εξελικτική ιστορία όσον αφορά στα Φαιοφύκη. Συγκεκριμένα η τάξη των *Ectocarpales* πλέον δεν θεωρείται πως βρίσκεται στη βάση του γενεαλογικού δέντρου των Φαιοφυκών αλλά μία από τις νεότερες διακλαδώσεις σε αυτό.

Οι περισσότεροι ερευνητές-συγγραφείς, θεωρούν πως η τάξη *Fucales* είναι μία ξεχωριστή γενεαλογία, η οποία παρέκλινε νωρίς στην εξελικτική ιστορία των φυκών, ή ήταν συγγενική τάξη με τα Φαιοφύκη λόγω του ομοιάζοντα γαμετικού κύκλου ζωής, ο οποίος είναι σχετικά παράτυπος για την ομάδα των Φαιοφυκών, ενώ άλλοι θεωρούν πως είναι μια αποκλίνουσα γενεαλογία μέσα σε αυτή των Φαιοφυκών (van den Hoek et al. 1995).



PICTURE 2.1: *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye, Naples, Italy, **Leg. /Isol.** D.G. Mueller, **Culture:** PESI; 10 °C, Zygote obtained, cryopreserved, **Reference:** Stache-Crain et al. (1997)

2.2 Γεωγραφική θέση και φυσικό περιβάλλον των περιοχών που μελετώνται

Η νήσος Ascension είναι ένα απομονωμένο ηφαιστιογενές νησί, που εντοπίζεται 7°56' νότια του Ισημερινού στον Νότιο Ατλαντικό Ωκεανό. Βρίσκεται, περίπου 1.600 χιλιόμετρα (1.000 μίλια) μακριά από τις ακτές της Αφρικής και 2.250 χιλιόμετρα (1.400 μίλια) μακριά από τις ακτές της Βραζιλίας, χονδρικά στο μέσο του κεράτου της νότιας Αμερικής και της Αφρικής. Η νήσος Ascension είναι ένας γεωλογικά νέος σχηματισμός, η κορυφή ενός υποθαλάσσιου ηφαιστείου, το οποίο αναδύθηκε μόλις ένα εκατομμύριο χρόνια πριν. Η τελευταία έκρηξη του ηφαιστείου συνέβη κατά τη διάρκεια του 16^{ου} αιώνα. Εξαιτίας της πολύ μικρής ζωής της νήσου πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας, το χώμα του, κυρίως συνίσταται από εξαϋλωμένο άνθρακα.

Το νησί της Ρόδου είναι το μεγαλύτερο εκ των Δωδεκανήσων και βρίσκεται στο νότιο Αιγαίο Πέλαγος. Το νησί της Ρόδου είναι τοποθετημένο 363 χιλιόμετρα (226 μίλια) νοτιοανατολικά της Ελληνικής ηπειρωτικής χώρας και 18 χιλιόμετρα (11 μίλια) από τις νότιες ακτές της Τουρκίας. Η Ρόδος έχει μήκος 79,7 χιλιόμετρα και πλάτος 38 χιλιόμετρα, με συνολική επιφάνεια 1.400 τετραγωνικά χιλιόμετρα ακτογραμμή που φτάνει τα 220 χιλιόμετρα. Ο ασβεστόλιθος είναι το κύριο υπόβαθρο του νησιού.

2.3 Κλίμα και Θαλάσσια Βιοποικιλότητα των περιοχών που μελετώνται

Η νήσος Ascension έχει ζεστό κλίμα ερήμου (BWh, σύμφωνα με την κλιματική ταξινόμηση του Köppen). Οι θερμοκρασίες στις ακτές κυμαίνονται κατά μέσο όρο από 22,7°C, μέχρι 27,8°C και περίπου 5-6°C χαμηλότερα στο υψηλότερο σημείο του. Ασθενείς βροχές είναι σύνηθες φαινόμενο κατά τη διάρκεια του χρόνου, αλλά τείνουν να εντείνονται μεταξύ του Ιουνίου και του Σεπτεμβρίου. Παρόλο που το νησί βρίσκεται στην τροπική ζώνη, η μέση ετήσια βροχόπτωση είναι πολύ χαμηλή. Αυτό, πιθανώς, συμβαίνει εξαιτίας της σχετικά χαμηλής θερμοκρασίας του ωκεάνιου νερού, καθώς τα ρεύματα Benguela και South Equatorial ρέουν με βόρεια κατεύθυνση δυτικά της Αφρικής. Τα ρεύματα αυτά δημιουργούν φαινόμενα ψύξης στο ανατολικό τμήμα του Νότιου Ατλαντικού Ωκεανού. Τροπικοί κυκλώνες, εμφανίζονται, σχετικά σπάνια, στον Νότιο Ατλαντικό Ωκεανό, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στα ίδια φαινόμενα όπως παραπάνω, καθώς και στην ισχυρή κατακόρυφη διάτμηση του αέρα.

Η Ανταρκτική θεωρείται σε γενικές γραμμές απεμπλουτισμένη όσον αφορά στην ποικιλότητα σε είδη φυκών (Wiencke and Clayton 2002). Πολικά φύκη εμφανίζουν προσαρμοστικότητα, η οποία τους παρέχει πλεονέκτημα στην επιβίωση, στις θερμοκρασίες ψύχους και στο σκότος κατά τους μήνες του χειμώνα (Wiencke et al. 2009).

Σε σαφή αντίθεση με τους εύκρατους και τους τροπικούς βιότοπους, οι πολικές περιοχές χαρακτηρίζονται από παράκτιες περιοχές φτωχές σε φύκη. Αυτό οφείλεται στις ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες στην παράκτια ζώνη- με ακραίες θερμοκρασίες που κυμαίνονται από -50°C έως 5°C (Peck et al. 2006, Waller et al. 2006) και ισχυρές δυνάμεις τριβής από θαλάσσιους πάγους (Barnes and Souster 2011, Barnes et al. 2014). Είναι αξιοσημείωτο πως το φυτοβένθος του Ανταρκτικού Ωκεανού δεν έχει καθόλου εκπροσώπους της τάξης των *Laminariales*, τα οποία είναι παρόντα στην Αρκτική καθώς και σε όλους τους άλλους ψυχρούς και ψυχρούς-εύκρατους βιότοπους του κόσμου. Αντί αυτού, ο οικολογικός τους ρόλος ως προμηθευτές θόλων, σε μεγάλο βαθμό αναπληρώνεται από μέλη της τάξης των *Desmarestiales* (Moe and Silva 1977).

Η κλιματική αλλαγή, μεταβάλλει μέρη της Ανταρκτικής και της Αρκτικής, πιο γρήγορα από οποιαδήποτε άλλη περιοχή του πλανήτη. Στην Ανταρκτική, αυτό εμφανίζεται κυρίως στην χερσόνησο, όπου τεράστιες αλλαγές έχουν παρατηρηθεί τα τελευταία 20-50 χρόνια (Meredith and King 2005, Turner et al. 2009, 2013, Convey et al. 2009). Οι αλλαγές στο φυσικό περιβάλλον χαρακτηρίζονται από όλο και αυξανόμενες θερμοκρασίες, κάλυψη του θαλάσσιου πάγου από τη θάλασσα και

αυξανόμενη τήξη των υποθαλάσσιων τμημάτων των παγόβουνων (Barnes and Souster 2011, Barnes et al. 2014). Η συνεχής εξάπλωση των εξωγήινων ειδών μικροβίων, μυκήτων, φυτών και ζώων έχουν καταγραφεί στις περιοχές υπό της Ανταρκτικής και της Ανταρκτικής, παρόλο που τα περισσότερα καταγεγραμμένα παραδείγματα προέρχονται από χερσαία περιβάλλοντα (Frenot et al. 2005; Greenslade et al. 2012; Molina- Montenegro et al. 2012).

Η μέση θερμοκρασία στην επιφάνεια της θάλασσας γύρω από το νησί της Ρόδου είναι 21.4°C. Χαρακτηριστικοί τύποι ενδιαιτήματος στην ακτοζώνη της Ρόδου, στο Αιγαίο, είναι τα βενθικά στρώματα με *Cystoseira* biocenosis και με *Posidonia oceanica*, κοινότητες από *Lithophyllum lichenoides* σε κοραλλιογενείς υφάλους, τα οποία δημιουργούν ένα απaráμιλλης ομορφιάς θέαμα. Τα φύκη των κοραλλιογενών υφάλων καλύπτουν μεγάλα αλκυονοειδή, κοράλλια και μια μεγάλη ποικιλία από, πολύ συχνά πολύχρωμους ασπόνδυλους οργανισμούς και εκατοντάδες είδη ψαριών (Marine Pollution Bulletin Vol.40).

Αυτές οι κοινότητες φιλοξενούν σφουγγάρια (Porifera), θαλάσσιες ανεμώνες, μέδουσες (Cnidaria), Bryozoa, σκώληκες (Annelida), σαλιγκάρια, δίλοβα όστρακα, καλαμάρια και χταπόδια (Mollusca), αστερίες και θαλάσσιους αχιούς (Echinodermata), καβούρια, αστακούς και γαρίδες (Marine Pollution Bulletin Vol,40). Η μικροχλωρίδα που σχηματίζουν τα φύκη στην περιοχή της Μεσογείου, γενικότερα, χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή βιοποικιλότητα (Coll et al. 2010) καθώς αποτελείται από διάφορα φυτογεωγραφικά στοιχεία και από θερμό, με τάση για τροπικό, κλίμα (Bianchi & Morri 2000). Μεγάλα φύκη, που σχηματίζονται από *Laminariales*, τα οποία φυσιολογικά βρίσκονται σε παράκτια, θερμά οικοσυστήματα ανά τον κόσμο, είναι σπάνια στην Μεσόγειο Θάλασσα (Steneck et al. 2002), και έτσι ο ρόλος τους να σχηματίζουν θόλους αναπληρώνεται από άλλα είδη όπως *Cystoseira* sp. και *Sargassum* (Fucales), το τελευταίο εκ των οποίων παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή ειδογένεση στην Μεσόγειο Θάλασσα. Τα είδη αυτά σχηματίζουν κοινότητες που για πολλά χρόνια θεωρούνταν ότι αποτελούν σημαντικούς οργανισμούς, οι οποίοι συμβάλλουν στο να φτάσει σε μία σταθερή κατάσταση η ανάπτυξη της βλάστησης με την πάροδο του χρόνου (climax stage) σε πετρώδεις ρηχές ακτές της Μεσογείου Θάλασσας (Pérès & Picard 1964). Επιπλέον, σημαντικός είναι ο ρόλος τους στον σχηματισμό μεγάλων βιοκοινοτήτων με υψηλή βιοποικιλότητα σε βαθύτερα νερά (Hereu et al. 2008). Αυτά τα πολυετή είδη, φαίνεται να χαρακτηρίζουν τις αρχαϊκές, ολιγοτροφικές ακτές της Μεσογείου, και να παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία σε φυσικές και ανθρώπινες διαταραχές (Hoffman et al. 1988, Rodriguez-Prieto & Polo 1996, Thibaut et al. 2005).

2.4 Οι περιοχές DNA που χρησιμοποιήθηκαν ως μοριακοί δείκτες για να επιτύχουμε το DNA barcoding

Η γνώση πως διαφορετικά γονίδια συσσωρεύουν μεταλλάξεις με διαφορετικούς ρυθμούς, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στις μοριακές διεργασίες. Η διαφορά αυτή εξαρτάται από το πόσες αλλαγές είναι ικανό να συσσωρεύει ένα γονίδιο χωρίς, ωστόσο, να χάνει την λειτουργία του. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης μοριακών δεδομένων είναι πως, σε σύγκριση με τα δεδομένα από τα απολιθώματα, είναι πολυπληθέστερα και πιο εύκολο να παρατηρηθούν. Με την χρήση μοριακών δεδομένων, λοιπόν, μπορούμε να δημιουργήσουμε ένα πιο καθαρό και ισχυρό γενεαλογικό δέντρο. Από την άλλη, τα μορφολογικά δεδομένα, σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι αρκετά ώστε να διακρίνουμε δύο οργανισμούς σε επίπεδο φύλου, τάξης και οικογένειας. Όταν ερχόμαστε αντιμέτωποι με ένα τέτοιο ζήτημα, χρησιμοποιούμε τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων, τα οποία είναι μεγαλύτερα σε αριθμό και υπάρχουν για πλήθος και ποικιλία οργανισμών. Συνεπώς οι βιομοριακοί δείκτες είναι πλέον βασικές πληροφορίες, οι οποίες είναι διαθέσιμες για τους ερευνητές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να ανασκευαστεί η εξελικτική ιστορία. Η μεγάλη διαφορά των μορφολογικών δεδομένων με εκείνα που προκύπτουν από τις μοριακές διεργασίες, είναι ότι υπάρχουν πολλοί διαθέσιμοι μοριακοί χαρακτήρες, των οποίων η ερμηνεία είναι πιο εύκολη. Ένα ακόμη πλεονέκτημα από την χρήση μοριακών δεδομένων είναι πως όλοι οι έμβιοι οργανισμοί διαθέτουν γενετικό υλικό που αποτελείται από νουκλεϊκά οξέα και η θέση κάθε νουκλεοτιδίου, θεωρητικά, μπορεί να θεωρηθεί ως ένας ανεξάρτητος χαρακτήρας. Οι μορφολογικές προσαρμογές ενός οργανισμού, σε κάθε περίπτωση, αντανακλώνται στα βιομόρια του και το αντίστροφο.

2.5 Μέθοδος «germling emergence» και DNA barcoding

Στην παρούσα έρευνα, έγινε μια προσπάθεια να εξερευνήσουμε την κρυμμένη βλάστηση θαλάσσιων οικοσυστημάτων, σε υποθαλάσσιες περιοχές της νήσου Ascension, που βρίσκεται στον Νότιο Ατλαντικό Ωκεανό, και της Ρόδου που ανήκει στα Δωδεκάνησα του Αιγαίου Πελάγους στη Μεσόγειο Θάλασσα με τον συνδυασμό δύο μεθόδων,

1) με χρήση της μεθόδου «germling emergence», δηλ. την απομόνωση φυκών που βλασταίνουν σε καλλιέργειες από επωαζόμενα δείγματα υποστρώματος του θαλάσσιου εδάφους που έχουν ληφθεί με καταδύσεις, και

2) χρήση της μεθόδου «DNA barcoding» για την μετέπειτα μοριακή αναγνώριση των απομονωμένων στελεχών, και συγκεκριμένα των Φαιοφυκών που απομονώθηκαν.

Η επιτυχής διάκριση σε είδος, των υπό μελέτη οργανισμών, είναι το πιο επιθυμητό αποτέλεσμα της μεθόδου DNA barcoding. Για να επιτύχουμε την παραγωγή μιας πλήρους φυλογένεσης των απομονωμένων στελεχών των Φαιοφυκών εκμεταλλευτήκαμε τέσσερις συγκεκριμένες περιοχές στο DNA:

1. το γονίδιο *rbcl* (διφωσφορική καρβοξυλάση της ριβουλόζης, η μεγάλη αλυσίδα)
2. *rbcl-rbcS* spacer
3. το γονίδιο 5'-COI (*cox1*, οξειδάση του κυτοχρώματος, υπομονάδα I – 5' end),
4. μέρος του γονιδίου SSU (μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος).

Το γονίδιο *rbcl* βρίσκεται, σε ένα μεγάλο μονό αντίγραφο στους χλωροπλάστες, και κωδικοποιεί για την μεγάλη υπομονάδα της 1,5- διφωσφορικής καρβοξυλάσης – οξειγενάσης της Ριβουλόζης (RUBISCO), η οποία χρησιμοποιείται στην αρχική απορρόφηση του διοξειδίου του άνθρακα, κατά τη διάρκεια των σκοτεινών αντιδράσεων της φωτοαναπνοής (CBOL Plant Working Group, 2009). Ωστόσο, αυτοί οι βιοδείκτες δεν έχουν μεγάλη διακριτική δύναμη σε μερικές τάξεις Φαιοφυκών (Du *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012).

Το ένζυμο RUBISCO είναι το πρώτο ένζυμο του κύκλου C3 στα φυτά. Είναι ένα από τα πιο άφθονα και σημαντικά ένζυμα για τα έμβια όντα του πλανήτη και έχει μείζονα ρόλο στον κύκλο του άνθρακα στη γη.

Το γονίδιο *rbcl* βρίσκεται στο γονιδίωμα των χλωροπλαστών σε ένα μοναδικό αντίγραφο και έχει τεράστια φυλογενετική ωφελιμότητα. Έχει μήκος ~1428 bp και είναι καθολικό σε όλα τα φυτά (με εξαίρεση κάποια παράσιτα). Το γονίδιο αυτό είναι πολύ εύκολο να αναγνωστεί, εύκολο να ευθυγραμμιστεί και η δευτερογενής δομή του είναι καλά μελετημένη και παρουσιάζεται σε πολλά αλληλόμορφα με λιγότερες ενθέσεις και απαλοιφές. Το γονίδιο κωδικοποιεί τη μεγάλη υπομονάδα της πρωτεΐνης *rubisco*, ενώ η μικρή υπομονάδα κωδικοποιείται από το γονίδιο *rbcS* στον πυρήνα. Παρόλο που υπάρχουν πολλές παραλλαγές στο μήκος του γονιδίου στα φυτά και στα φύκη, οι ευθυγράμμιση μεταξύ των δύο είναι σχετικά εύκολη.

Ωστόσο, πολλοί ερευνητές προτιμούν την περιοχή 18S rDNA για τις μοριακές αναλύσεις, παρά την αλληλουχία του γονιδίου *rbcl* καθώς η περιοχή εκείνη έχει υψηλότερους ρυθμούς εξέλιξης. Παρόλο που το γονίδιο *rbcl* είναι συντηρημένο και έχει εύκολη ευθυγράμμιση μεταξύ των ποικίλων τάξεων, εμφανίζει μεγαλύτερους

ρυθμούς υποκατάστασης από εκείνο της 18S rDNA. Ο Mc Court et al. προσωρινά συμπέρανε πως, ενώ η αλληλουχία του γονιδίου rbcL, ίσως, δεν είναι πλήρως κατάλληλη για φυλογενετικές μελέτες των γεγονότων διακλάδωσης κατά την εξέλιξη (εκτός εάν είναι δυνατή η λήψη περισσότερων δειγμάτων τα οποία θα είναι πιο διεξοδικότερα καταναμημένα σε τάξεις), φαίνεται να είναι κατάλληλη για την ταξινόμηση των φυκών. Η μη κωδική περιοχή μεταξύ των γονιδίων rbcL και rbcS έχει χρησιμοποιηθεί σε φυλογενετικές μελέτες (e.g., Savolainen et al. 1994, Ehrendorfer et al. 1994, Natali et al. 1995) και η λειτουργία αυτής της περιοχής, για τα Φαιοφύκη, έχει καταγραφεί επαρκώς (Orozco et al. 1990; Manen et al. 1994; Mullet et al. 1985; Gruissem and Zurawski 1985). Η μη κωδική αυτή περιοχή είναι ιδιαίτερα μεταβλητή σε μέγεθος, με εμφανείς διαφορές ανάμεσα σε μεγάλες ομάδες φυκών. Παρά τις μεγάλες διαφορές στο μέγεθος, η εξέλιξη της αλληλουχίας αυτής είναι περιορισμένη, συγκριτικά με εκείνη του γονιδίου rbcL.

Το γονίδιο COI που κωδικοποιεί για την υπομονάδα 1 του ενζύμου οξειδάση του κυτοχρώματος C, είναι ένα γονίδιο που εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην μοριακή ταξινόμηση των ειδών (Hebert et al., 2003b). Το ένζυμο οξειδάση του κυτοχρώματος c είναι μία πολύ γνωστή πρωτεΐνη κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων, στη φωτοσύνθεση, και εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Το γονίδιο COI κωδικοποιεί για μια από τις επτά πολυπεπτιδικές υπομονάδες του συμπλέγματος της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και αποτελείται από περίπου 864 ζεύγη βάσεων (bp). Πέραν της ταυτοποίησης γνωστών και της ταξινόμησης νέων ειδών, η μέθοδος DNA barcoding με την χρήση του συγκεκριμένου γονιδίου ως δείκτη, προτείνεται για την ανακάλυψη των κρυμμένων τάξεων, τη συσχέτιση των διαφορετικών σταδίων ζωής των ίδιων ειδών καθώς και σε γενετικές μελέτες για την διατήρηση της άγριας ζωής. Το γονίδιο Cox1 (COI) φαίνεται πως παρέχει ένα καλύτερο φυλογενετικό δείγμα από τα υπόλοιπα μιτοχονδριακά γονίδια, καθώς έχει αργούς ρυθμούς εξέλιξης. Συγκρινόμενο δε με άλλες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακά γονίδια χρησιμοποιείται ευρέως για τον υπολογισμό των μοριακών φυλογενέσεων. Πολλοί συγγραφείς διαφωνούν με το γεγονός πως ο εξελικτικός ρυθμός του γονιδίου Cox1 είναι ιδιαίτερα γρήγορος ώστε να μπορέσουμε να διαχωρίσουμε πολύ συγγενικά είδη. Η περιοχή αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όσον αφορά στον διαχωρισμό σπονδυλωτών και ασπόνδυλων οργανισμών, αλλά δεν είναι ιδιαίτερα κατάλληλο για φυτά και μύκητες. Συνεπώς, η μικρή υπομονάδα του rDNA (SSU rDNA) έχει προταθεί για χρήση κατά το DNA barcoding στα πρώτιστα, με παράλληλη χρήση ενός δεύτερου βιοδείκτη περισσότερο ειδικού για κάθε ομάδα.

Η μικρή επιτυχία στην ταξινόμηση ειδών με τη χρήση βιοδεικτών των πλαστιδίων οριοθετεί την ωφελιμότητά τους στην ταυτοποίηση με μοριακές

μεθόδους. Η εξήγηση της μικρής επιτυχίας είναι οι χαμηλοί ρυθμοί μεταλλάξεων που παρατηρούνται στα γονιδιώματα των πλαστιδίων σε σύγκριση με εκείνα του πυρήνα (Wolfe *et al.*, 1987).

Το ριβοσωμικό RNA θεωρείται πως είναι ο καλύτερος στόχος για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων καθώς, είναι καθολικό και συντίθεται από υψηλά συντηρημένες αλλά και μεταβλητές περιοχές. Τα ριβοσώματα αποτελούνται από πρωτεΐνες και rRNA. Σε όλους τους οργανισμούς το σύμπλεγμα του ριβοσώματος αποτελείται από δύο υπομονάδες. Η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (SSU) περιέχει ένα μοναδικό τύπο RNA (το 18S rRNA για τους ευκαρυώτες και το 16S rRNA για τους υπόλοιπους οργανισμούς). Η κύρια δομή του SSU rRNA περιέχει δέκα τέτοιες μεταβλητές περιοχές. Επιπλέον τα γονίδια του ριβοσωμικού RNA έχουν περισσότερο αργούς εξελικτικούς ρυθμούς από τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες και είναι ιδιαίτερα σημαντικά στις φυλογενετικές αναλύσεις των απομακρυσμένων ειδών.

2.6 Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της επικείμενης εργασίας είναι να γίνει η φυλογενετική ανάλυση των προαναφερθέντων απομονωμένων στελεχών Φαιοφυκών από δείγματα του υποστρώματος των παράκτιων περιοχών της Ρόδου και της νήσου Ascension. Η μοριακή ανάλυση είναι βασισμένη σε χλωροπλαστικές (rbcL) και πυρηνικές (SSU) περιοχές του γονιδιώματος, έτσι ώστε να αξιολογηθούν οι συστηματικές σχέσεις μεταξύ των Φαιοφυκών, και συγκεκριμένα, να ανιχνευθούν, προηγούμενες μη καταγεγραμμένες και, πιθανώς, νέες τάξεις στις περιοχές αυτές. Στην παρούσα έρευνα συγκρίνουμε αλληλουχίες του DNA τόσο της μεγάλης και της μικρής υπομονάδας της πρωτεΐνης RUBISCO, όσο και της μη κωδικής περιοχής μεταξύ των δύο αυτών γονιδίων, καθώς τα γονίδια αυτά έχουν αξιολογηθεί ως ικανοί φυλογενετικοί δείκτες για την συστηματική ταξινόμηση των Φαιοφυκών.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Συλλογή Δειγμάτων Υποστρώματος

Η συλλογή των δειγμάτων του υποστρώματος από το βυθό της θάλασσας πραγματοποιήθηκε με καταδύσεις, σε διάφορα σημεία τόσο της νήσου Ascension όσο και της Ρόδου. Οι δειγματοληψίες έγιναν σε διάφορα σημεία των δύο νήσων, σε βάθη που κυμαίνονταν από 15 έως 45 μέτρα. Συγκεκριμένα, κάθε δύτες γέμιζε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο Falcon™ των 15ml με περίπου 1cm³ υλικού του υποστρώματος από τον βυθό της θάλασσας, π.χ. άμμος, μικρές πέτρες ή κοχύλια μαλακίων. Το σωληνάριο άνοιξε και έκλεισε μία μοναδική φορά, μέχρι την επεξεργασία των δειγμάτων, στο σημείο δειγματοληψίας, και το δείγμα, ακολούθως, διατηρήθηκε σε θερμοκρασία παρόμοια με εκείνη του περιβάλλοντος από το οποίο συλλέχθηκε.

3.2 Επώαση του υποστρώματος

Μετά την μεταφορά ή την ταχυδρόμηση των δειγμάτων στο εργαστήριο, στο οποίο έγινε η επεξεργασία τους, το υπόστρωμα μεταφέρθηκε σε τρυβλία Petri των 90 mm τα οποία ήταν πληρωμένα με 25ml μέσου καλλιέργειας (εμπλουτισμένο με Provasoli-αποστειρωμένο φυσικό νερό θαλάσσης Starr & Zeikus, 1993) και επώαστηκε στους 15°C υπό φυσικό φώς, μπροστά σε παράθυρο που βρίσκεται στον Βορρά. Τα πρωταρχικά αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν πως με αυτό το μέγεθος των δισκίων που χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση, τα θρεπτικά συστατικά του μέσου καλλιέργειας, δεν εξαντλούνταν με ταχείς ρυθμούς, και οι καλλιέργειες ήταν δυνατό να εξεταστούν στερεοσκοπικά. Τα αποτελέσματα επίσης αποκάλυψαν πως η απουσία γαστρόποδων ή θαλάσσιων γαιοσκωλήκων στα ληφθέντα δείγματα ήταν καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη των βλασταρίων των μακροφυκών. Η μείωση της επιφάνειας του επωαζόμενου υποστρώματος κατά περίπου 0,5cm³, φάνηκε να είναι μία αποτελεσματική μέθοδος ώστε να αποκλείσουμε την εμφάνιση αυτών των φυτοφάγων οργανισμών. Μικρά κοπήποδα, αντιθέτως, διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο, καθώς παρεμπόδισαν τον πολλαπλασιασμό των διατόμων. Συνεπώς, δεν υπήρχε καμία ανάγκη να προστεθεί Διοξειδίο του Γερμανίου, το οποίο κατά συνέπεια μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ανάπτυξη των Φαιοφυκών (Wang, 1993).

3.3 Απομόνωση των επιθυμητών στελεχών

Τα κλωνικά στελέχη των νηματοειδών Φαιοφυκών, απομονώθηκαν με το πέρας 1 έως 3 μηνών από την επώασή τους. Η διαδικασία της απομόνωσης που

πραγματοποιήθηκε ήταν η εξής: κόπηκαν και λήφθηκαν θραύσματα των βλασταρίων των φυκών που είχαν αναπτυχθεί (με τη μέθοδο «germling emergence»), με επιλογή των Φαιοφυκών, ενώ τα πράσινα και κόκκινα φύκη δεν απομονώθηκαν. Από κάθε τρυβλίο Petri, απομονώθηκαν από 1 έως 5 δείγματα, τα οποία επιδείκνυαν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα φύκη με ανυψωμένα νημάτια σε σχηματισμούς κορδέλας, με δισκοειδή πλαστίδια στα κύτταρά τους, εξαπλωμένα φύκη με διαφορετικής πυκνότητας νημάτια και διαφορετικούς κυτταρικούς σχηματισμούς. Τα διπλότυπα στελέχη που προέκυψαν από το ίδιο τρυβλίο Petri, ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχιση και εξαιρέθηκαν από περεταίρω αναλύσεις, αφού, πιθανώς να προέκυψαν με απευθείας αναπαραγωγή κατά την διάρκεια της καλλιέργειας, και όχι από διαφορετικά πρωτογενή στελέχη. Επιπλέον κλώνοι *Ectocarpus*-ομοιαζόντων φυκών, απομονώθηκαν απευθείας, χωρίς καλλιέργεια, από το δείγμα υποστρώματος που λήφθηκε. Σε αρκετά από αυτά, καθώς και σε κάποια από τα στελέχη που απομονώθηκαν με την μέθοδο «germling emergence», η ταυτοποίηση ήταν δυνατή μόνο με την παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών.

3.4 Μοριακές μέθοδοι

3.4.1 Εκχύλιση DNA – πρωτόκολλο για εκχύλιση DNA με χρήση CTAB, από δείγματα μακροφυκών

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε στις δεδομένες πειραματικές διεργασίες για την εκχύλιση του DNA είναι μία τροποποίηση του πρωτοκόλλου εκχύλισης DNA με τη μέθοδο CTAB για Μακροφύκη από τον Strittmatter (2010). Αναλυτικά οι διεργασίες που ακολουθήσαμε καταγράφονται παρακάτω.

Τα απαραίτητα διαλύματα για την διεξαγωγή του πρωτοκόλλου είναι τα εξής:

- α) CTAB buffer, [100 mM Tris/HCl pH 8, 3% (v/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 0.02 M EDTA pH7.5, 2.5 % (w/v) PVPP],
- β) φαινόλη: χλωροφόρμιο: ισοάμυλο-αλκοόλη (σε αναλογία 25:24:1),
- γ) χλωροφόρμιο: ισοάμυλο-αλκοόλη (σε αναλογία 24:1),
- δ) 70% αιθανόλη και
- ε) αποστειρωμένο MQ-H₂O.

Τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- α) 2ml σωλήνες Eppendorf (safe-lock),
- β) 1.5 ml σωλήνες Eppendorf,
- γ) αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και
- δ) αποστειρωμένες ανοξειδωτες ατσάλινες μπίλιες 5mm.

Εκχύλιση DNA πραγματοποιήσαμε σε συνολικά 61 δείγματα εκ των οποίων, 29 ήταν απομονωμένα στελέχη από δείγματα ληφθέντα από περιοχές της νήσου Ascension, και 32 ήταν απομονωμένα στελέχη από δείγματα ληφθέντα από περιοχές της Ρόδου.

Αρχικά, μερικά χιλιοστόγραμμα από την βιομάζα κάθε δείγματος, μεταφέρθηκαν από τα τρυβλία Petri σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του θαλάσσιου νερού στο οποίο γινόταν η επώαση.

Η βιομάζα που συλλέχθηκε από το κάθε δείγμα, στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε σωλήνες Eppendorf 2ml, οι οποίοι περιείχαν ήδη από μία αποστειρωμένη, ανοξειδωτη, ατσάλινη μπίλια (bead) διαμέτρου 5mm και 500μl CTAB buffer τα οποία είχαμε προθερμάνει σε υδατόλουτρο στους 65°C. Το δεύτερο βήμα που ακολουθήσαμε ήταν να «αλέσουμε» τα παραπάνω δείγματα με μηχανική διάσπαση με χρήση «beads» (Qiagen, TissueLyserII) για 1 min. στα 30Hz. Το τρίτο βήμα της διαδικασίας, ήταν η επώαση των «αλεσμένων» δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 65°C για, τουλάχιστον μία ώρα, με περιστασιακή ανάδευση των δειγμάτων. Με το πέρας της επώασης τα δείγματα πρέπει να έχουν «πρασινωπό» χρώμα, διαφορετικά ο χρόνος της επώασης πρέπει να αυξηθεί έως ότου να εμφανίσουν αυτόν τον χρωματισμό. Μετά την επώαση, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες Eppendorf 1.5ml, όπου προσθέσαμε 1vol φαινόλη: CHCl₃: ισοάμυλο αλκοόλη (σε αναλογία 25:24:1) και ανακινήσαμε ελαφρά για αρκετά λεπτά. Κατόπιν, φυγοκεντρήσαμε τα δείγματα στα 10.000g (10.000 στροφές) για 10min. Μετά τη φυγοκέντρηση, μεταφέραμε την υγρή φάση – υπερκείμενο, σε ένα νέο σωληνάριο Eppendorf 1.5ml, προσθέσαμε 1vol CHCl₃: ισοάμυλο αλκοόλη (σε αναλογία 24:1) και αναδεύσαμε ελαφρώς για αρκετά λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρήσαμε τα δείγματα, για ακόμη μια φορά στα 10.000g (10.000 στροφές) για 10min. Μετά την φυγοκέντρηση, μεταφέραμε το υπερκείμενο υγρό σε ένα νέο αποστειρωμένο σωλήνα Eppendorf 1.5ml και προσθέσαμε 1vol ισοπροπανόλης. Τα νέα αυτά διαλύματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 90min. Με το πέρας του χρόνου, φυγοκεντρήσαμε τα διαλύματα σε 15.000g (15.000 στροφές) για 15 min και σε ελεγχόμενη θερμοκρασία 4°C και έπειτα αφαιρέσαμε το υπερκείμενο υγρό.

Η διαδικασία αυτή έπρεπε να γίνει με ιδιαίτερη προσοχή, έτσι ώστε να μην επηρεάσουμε το ίζημα που σχηματίστηκε. Επόμενο βήμα της διαδικασίας ήταν να ξεπλύνουμε το ίζημα, δις, με 70% αιθανόλη, φυγοκεντρώντας για 5 min στα 10.000g μετά από κάθε πλύσιμο. Στη συνέχεια, αφού η αιθανόλη είχε αφαιρεθεί, διαλυτοποιήσαμε το ίζημα με προσθήκη αποστειρωμένου MQ-H₂O. Τέλος επώασαμε στους 4°C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (δηλαδή για τουλάχιστον 12 ώρες) ώστε να επιτρέψουμε την επαναιώρηση του ιζήματος του γενετικού υλικού των δειγμάτων.

Με σκοπό να προσδιοριστεί η καθαρότητα του εκχυλίσματος DNA και η συγκέντρωση του DNA στο κάθε δείγμα, μετρήσαμε τις συγκεντρώσεις DNA των δειγμάτων με τη βοήθεια ενός Νανοφωτομέτρου Implen.

Με στόχο την πραγματοποίηση Αλυσιδωτών Αντιδράσεων Πολυμεράσης (PCRs) για όλα τα δείγματα που προέκυψαν από την εκχύλιση, πραγματοποιήσαμε διαλυτοποίηση τόσο σε 10x όσο και σε 100x, καθώς φαίνεται πως σε μικρότερες συγκεντρώσεις DNA από αυτές που προέκυψαν, οι αντιδράσεις PCR είναι πιο αποτελεσματικές.

3.4.2 Πρωτόκολλο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCRs)

Αρχικά, πρέπει να σημειωθεί ότι, κοινό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση PCR (βασικές και διορθωτικές) σε όλη τη διάρκεια αυτής της έρευνας. Συγκεκριμένα κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε όγκο διαλύματος 25μL, το οποίο αποτελούνταν από:

- 21μL Master Mix redTaq DNA Πολυμεράση (Promega),
- 1.5μL από τον κάθε εκκινητή (Πίνακας 3.2) τους οποίους ήδη διαθέταμε σε διαλυτοποιημένη μορφή 10μM (έτοιμους για χρήση) και
- 1μL (5-50ng*μl⁻¹) από το κάθε δείγμα εκχυλίσματος DNA (το οποίο λειτουργεί ως μήτρα DNA για την εκάστοτε αντίδραση PCR).

Διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν με στόχο την ενίσχυση των γενετικών δειγμάτων. Για κάθε ζευγάρι εκκινητών χρησιμοποιήσαμε εξειδικευμένο πρόγραμμα με τις κατάλληλες θερμοκρασίες και χρόνους για την βέλτιστη πραγματοποίηση της αντίδρασης, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1. Τα στάδια των προγραμμάτων PCR συμπεριλάμβαναν το αρχικό στάδιο μετουσίωσης του DNA (DNA denaturation) το οποίο ακολουθούνταν από, κατά μέσο όρο 33-35 κύκλους επιμήκυνσης, το στάδιο τελικής επιμήκυνσης και την τελική διατήρηση των

προϊόντων της αντίδρασης στους 4°C. Ο αντιδραστήρας PCR μας επέτρεπε να τοποθετήσουμε τα σωληνάρια PCR σε «preheated lead», δηλαδή προθερμασμένη κατάσταση στους 94-95°C, στάδιο που φάνηκε ιδιαίτερα σημαντικό στην αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήσαμε αφορούσαν στην ενίσχυση των παρακάτω αναγραφόμενων περιοχών του γενετικού υλικού των δειγμάτων μας:

- 1) Τη περιοχή 5' του γονιδίου COI (cox1, οξειδάση του κυτοχρώματος c, υπομονάδα 1- 5' άκρο)
- 2) Το γονίδιο rbcL (Το γονίδιο κωδικοποιεί για την μεγάλη αλυσίδα της καρβοξυλάσης της διφωσφορικής Ριβουλόζης)
- 3) Το μεσοδιάστημα των γονιδίων rbcL-rbcS (Το γονίδιο rbcS κωδικοποιεί για την μικρή αλυσίδα της καρβοξυλάσης της διφωσφορικής Ριβουλόζης)
- 4) Τμήμα του γονιδίου SSU (Το γονίδιο SSU κωδικοποιεί για το rRNA της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος)

Συγκεντρωτικά, όλα τα προγράμματα για τις αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν κατά την παρούσα έρευνα αναγράφονται στον Πίνακα 3.1, ενώ όλοι οι εκκινήτες και τα χαρακτηριστικά τους αναγράφονται στον Πίνακα 3.2.

3.4.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Εν συνεχεία των αντιδράσεων PCR, πραγματοποιήσαμε ηλεκτροφορήσεις, με στόχο να επιβεβαιώσουμε τόσο την ενίσχυση του εκάστοτε δείγματος, όσο και την ύπαρξη μοναδικού προϊόντος μετά τις αντιδράσεις PCR καθώς και την ποιότητα των ληφθέντων προϊόντων.

Η ηλεκτροφόρηση στηρίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα μακρομόρια διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους δεδομένου πως είναι ηλεκτρικά φορτισμένα. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σε πήκτωμα αγαρόζης, το DNA, το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, μετατοπίζεται προς την άνοδο όπου βρίσκεται ο θετικός πόλος. Ο ρυθμός μετατόπισης του DNA καθορίζεται από τις εξής παραμέτρους: α) από το μέγεθός του, β) την διαμόρφωσή του (υπερελικωμένο, γραμμικό), γ) την συγκέντρωση της αγαρόζης, δ) την τάση που εφαρμόζεται, ε) την σύσταση και την ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και στ) τη θερμοκρασία.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που παράγεται από φύκη. Τα πηκτώματα αγαρόζης δημιουργούνται σε καλούπια με τήξη της αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα (1xTBE) μέχρις να δημιουργηθεί ένα διαυγές, διαφανές διάλυμα. Τα πηκτώματα αγαρόζης φέρουν πόρους, που το μέγεθός τους εξαρτάται από την συγκέντρωση της αγαρόζης.

Το διάλυμα της αγαρόζης ζεσταίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού ώστε να λιώσει η αγαρόζη και στη συνέχεια προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,1 µg/ml. Ύστερα, το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει επίσης ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE. Η διάρκεια και η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 1-2h και 100V αντίστοιχα.

Το πρωτόκολλο το οποίο ακολουθήσαμε ήταν το εξής: φορτώσαμε 5µL από το κάθε προϊόν των αντιδράσεων PCR σε gel αγαρόζης 1.2% w/v, σε 1xTBE buffer και εφαρμόσαμε ηλεκτρικό ρεύμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για περίπου 1-2 ώρες στα 100V ανάλογα με το μέγεθος του εκάστοτε προϊόντος. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, τοποθετήσαμε το gel αγαρόζης σε GelRed™ (Biotium, Cambridge UK) βαφή, ώστε να γίνουν εμφανείς οι μπάντες μας, για περίπου 1h. Στη συνέχεια παρατηρήσαμε και φωτογραφήσαμε τα αποτελέσματά μας σε UV-light box.

3.4.4. Απομόνωση DNA και αλληλούχιση

Τα προϊόντα PCR που απέδωσαν μονή μπάντα στην ηλεκτροφόρηση, υπόκειντο σε απομόνωση DNA με χρήση GeneJet™ nucleic acid purification kit (ThermoScientific, Waltham, USA). Αντιθέτως τα δείγματα εκείνα που απέδωσαν πολλαπλές μπάντες κατά την ηλεκτροφόρηση, εξήχθησαν από τη γέλη αγαρόζης (με απλή αποκοπή του τμήματος που εμφανίζεται η μπάντα) και καθαρίζονταν με χρήση GeneJet™ gel extraction kit (ThermoScientific), ακολουθώντας το πρωτόκολλο που δίνεται από τον κατασκευαστή. Στη συνέχεια πραγματοποιούμε απομόνωση DNA (με βάση το ίδιο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε στην εκχύλιση γενετικού υλικού από τα αρχικά στελέχη (Παρ. 3.4.1.). Ακολουθώντας της απομόνωσης, σε κάθε μια από τις παραπάνω περιπτώσεις, πραγματοποιήσαμε μετρήσεις της συγκέντρωσης DNA σε κάθε προϊόν, ενώ όπου ήταν απαραίτητο, διαλυτοποιήσαμε τα δείγματα ώστε οι συγκεντρώσεις να ακολουθούν τις απαιτήσεις της εταιρίας που πραγματοποίησε τις αλληλουχίσεις (Source BioScience UK).

Το τελικό βήμα, ήταν η αποστολή των διαλυτοποιημένων προϊόντων των αντιδράσεων PCR στην εταιρεία Source BioScience (UK) προς αλληλούχιση. Τα καθαρά προϊόντα των PCR αλληλουχήθηκαν τόσο με τους «προς τα εμπρός» -

forward εκκινητές όσο και με τους «αντίστροφους» - reverse εκκινητές. Τα αποτελέσματα των αλληλουχίσεων ήταν σε μορφή αρχείων ABI, τα οποία συμπεριλάμβαναν χρωματογράμματα που προέκυπταν από αλληλούχιση τόσο με τους «forward» όσο και με τους «reverse» εκκινητές. Οι αλληλουχίες ελέγχθηκαν (με την βοήθεια των χρωματογραμμάτων) ως προς την ποιότητα τους με τη βοήθεια του προγράμματος Bioedit (Hall 1999), ενώ ευθυγραμμίστηκαν χειροκίνητα με την χρήση του προγράμματος Aliview™ (editor version 1.23) με σκοπό την δημιουργία «consensus»-συναινετικών αλληλουχιών για κάθε προϊόν. Οι συναινετικές αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία του φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιώντας Neighbour- Joining (NJ) ανάλυση.

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Primer pairs ¹	Initial denaturation	Amplification				Final extension
		Cycles	Denaturation	Annealing*	Elongation	
COI-GazF2 COI-GazR2	1min at 94° C	35	30s at 94° C	30s	1min at 72° C	7min at 72°C
rbcL3F rbcS139R rbcL1273F rbcS139R rbcL-461F rbcL-1471R rbcL177F rbcL952R rbcL461F rbcS139R	3min at 95°C	30	30s at 95°C	30s	1–2min at 72°C	7min at 72°C.
SSU NS1-NS4 AFP2F AFP1R	3min at 94°C	35	1min at 94°C	1 min	1.5 min at 72°C	3min at 72°C.

TABLE 3.1.: 1PCR reactions were first attempted with extreme primer combinations (i.e. rbcL3F/rbcS139R) and if these failed, smaller overlapping fragments were targeted.

*Annealing temperatures are specified in Table 2.2.

BIOXHMEIA KAI BIOTECHNOLOGIA

Primer name	Gene	Direction	Sequence (5'→3')	Annealing	
				T°C	Reference
gazF2	cox1	F	CCAACCAYAAAGATATWGGTAC	50	Lane et al. 2007
gazR2	cox1	R	GGATGACCAAARAACCAAAA	50	Lane et al. 2007
rbcl3F	IGS-rbcL	F	GGCACCGGAGAATCTATATG	55	Peters and Ramirez 2001
rbcl139R	rbcS	R	AGACCCCATTAATCCCAATA	55	Peters and Ramirez 2001
rbcl461F	rbcL	F	CTTACTTAAAACTTTCCAAGG	55	Peters and Ramirez 2001
rbcl1471R	rbcL	R	ATSAGGTGTATCTGTTGATGT	46,7	Peters and Ramirez 2001
rbcl77F	rbcL	F	TGGGNTAYTGGGATGCTGA	74,3	Peters and Ramirez 2001
rbcl952R	rbcL	R	CATACGCATCCATTACA	46	Kawai et al. 2007
NS1	SSU	F	GTAGTCATATGCTTGCTC	55	White et al. 1990
NS4	SSU	R	CTCCGTCAATTCCTTAAG	55	White et al. 1990
AFP2F	SSU	F	AGCTCTTCTTGATTCTATG	52.8	
AFP1R	SSU	R	GGTAATGATCCTCCGCAG	62	

Table 3.2.: Primers used in this study, with mention of the name, region, direction, sequence, annealing temperature and source of each primer. F: forward, R: reverse

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Γενικά αποτελέσματα

Συνολικά απομονώθηκαν 33 δείγματα από τα δείγματα υποστρώματος που συλλέχθηκαν από τη νήσο Ascension, 29 εκ των οποίων, ταυτοποιήθηκαν οπτικά ως Φαιοφύκη, ενώ τα 4 από αυτά ταυτοποιήθηκαν ως Ροδόφυτα.

Όσον αφορά στα δείγματα του υποστρώματος που συλλέχθηκαν από το νησί της Ρόδου, απομονώθηκαν 51 δείγματα εκ των οποίων τα 32 ταυτοποιήθηκαν ως Φαιοφύκη, τα 12 ως Χλωροφύκη και τα 6 από αυτά ως Ροδόφυτα.

Στην παρούσα έρευνα, εργαστήκαμε πάνω σε ένα σύνολο 61 δειγμάτων (29 Φαιοφυκών που απομονώθηκαν από δείγματα από το νησί Ascension και 32 Φαιοφυκών που απομονώθηκαν από δείγματα από το νησί της Ρόδου).

Συνεπώς τα δεδομένα που προκύπτουν από τις μοριακές μας αναλύσεις και καταγράφονται παρακάτω, αναφέρονται σε αυτό τον αριθμό δειγμάτων.

4.2 Αποτελέσματα μοριακών διεργασιών

Οι διάφορες αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα (όπως καταγράφονται στους Πίνακες 3.1 και 3.1), απέδωσαν διάφορα αποτελέσματα, κάποια από αυτά ήταν επιτυχή και κάποια είχαν μικρό ποσοστό επιτυχίας.

Συνολικά, οι αντιδράσεις PCR με τα υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας, για το σύνολο των δειγμάτων μας, ήταν εκείνες που πραγματοποιήθηκαν με χρήση του ζεύγους εκκινητών AFP2F-AFP1R. Το ζεύγος αυτό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε για να ενισχύσει την περιοχή SSU του DNA των Φαιοφυκών. Παρόλο που αυτές οι αντιδράσεις είχαν ποσοστό επιτυχίας 100%, οι αλληλουχίες αυτές που προκύπτουν δεν μας παρέχουν αρκετές πληροφορίες για την φυλογενετική ανάλυση καθώς το τμήμα αυτό του γενετικού υλικού των Φαιοφυκών παρουσιάζει χαμηλή περιπλοκότητα και εξελισιμότητα. Συνεπώς, η κύρια χρήση της αντίδρασης με αυτό το ζεύγος εκκινητών, ήταν να επιβεβαιώσουμε πως η διαδικασία της εκχύλισης του DNA σε πρώτο στάδιο της έρευνας ήταν επιτυχής.

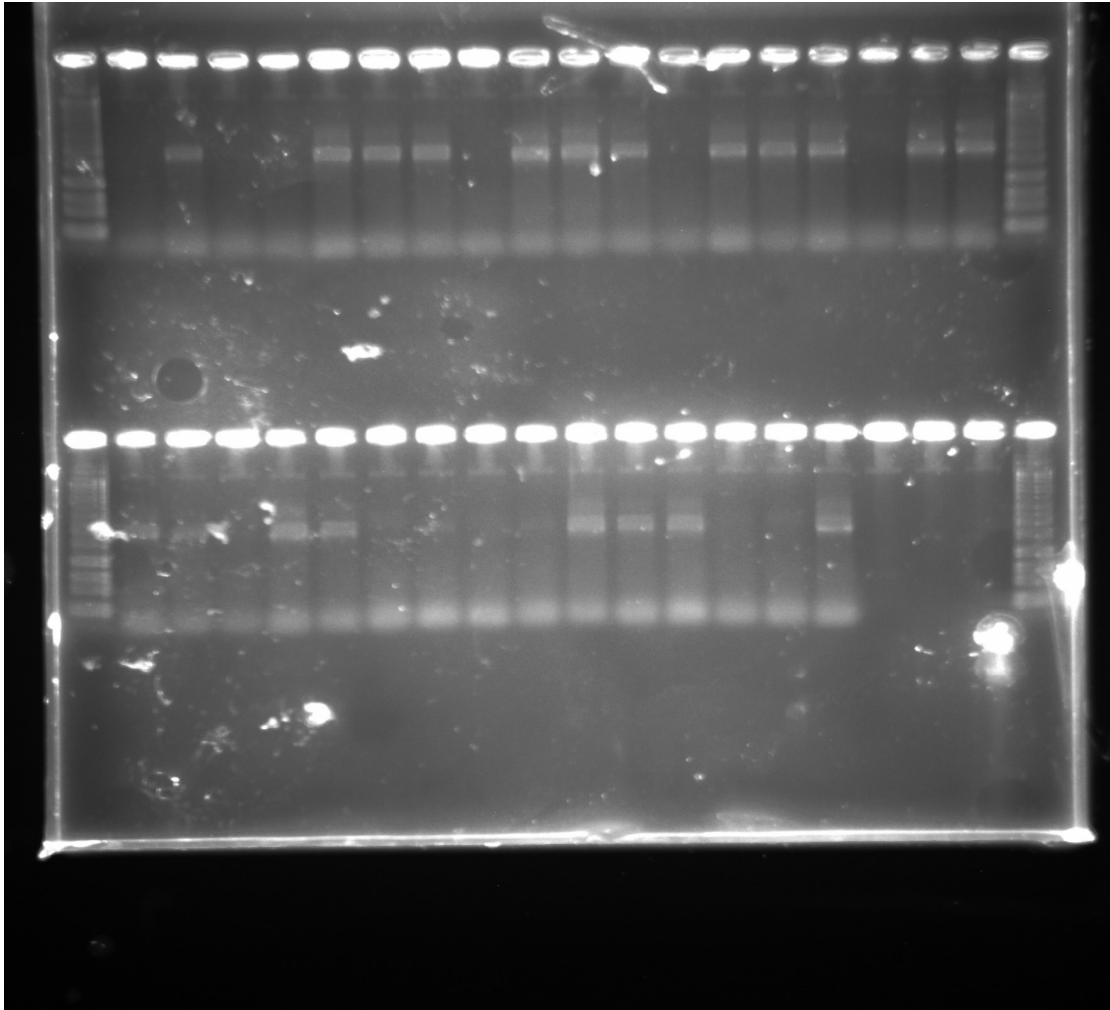
Η ακριβώς επόμενη περιοχή του DNA των Φαιοφυκών που απέδωσε υψηλά ποσοστά επιτυχίας κατά τις αντιδράσεις PCR, και τα αποτελέσματά της αλληλούχισης της φάνηκαν ιδιαίτερα χρήσιμα κατά τη φυλογενετική ανάλυση, ήταν η περιοχή διακλάδωσης των rbcL-rbcS (rbcL-rbcS spacer). Η περιοχή αυτή απέδωσε τις πιο ευανάγνωστες και εύκολα επεξεργάσιμες αλληλουχίες.

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από απομονωμένα δείγματα από την Ρόδο είχαν ακόμα υψηλότερη απόδοση, με ποσοστό επιτυχίας 29/32, δηλαδή 92%. Τα αποτελέσματα αυτών των αντιδράσεων PCR, όπως εμφανίζονται στις ηλεκτροφορήσεις τους, φαίνονται στις Εικόνες 4.1, 4.2 και 4.3. Στην εικόνα 4.1 εμφανίζονται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της ενισχυμένης περιοχής διακλάδωσης των *rbcl-rbcS* γονιδίων, με ζεύγος εκκινητών τα *rbcl3F-rbcS139R*, για τα απομονωμένα δείγματα της Ρόδου. Στην εικόνα 4.2 εμφανίζονται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της ίδιας περιοχής, των ίδιων δειγμάτων, ωστόσο για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών *rbcl461F-rbcS139R*, που στοχεύει σε ενίσχυση μικρότερης περιοχής. Στην εικόνα 4.3 εμφανίζονται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της ενισχυμένης περιοχής διακλάδωσης των *rbcl-rbcS* γονιδίων, με ζεύγος εκκινητών τα *rbcl3F-rbcS139R*.

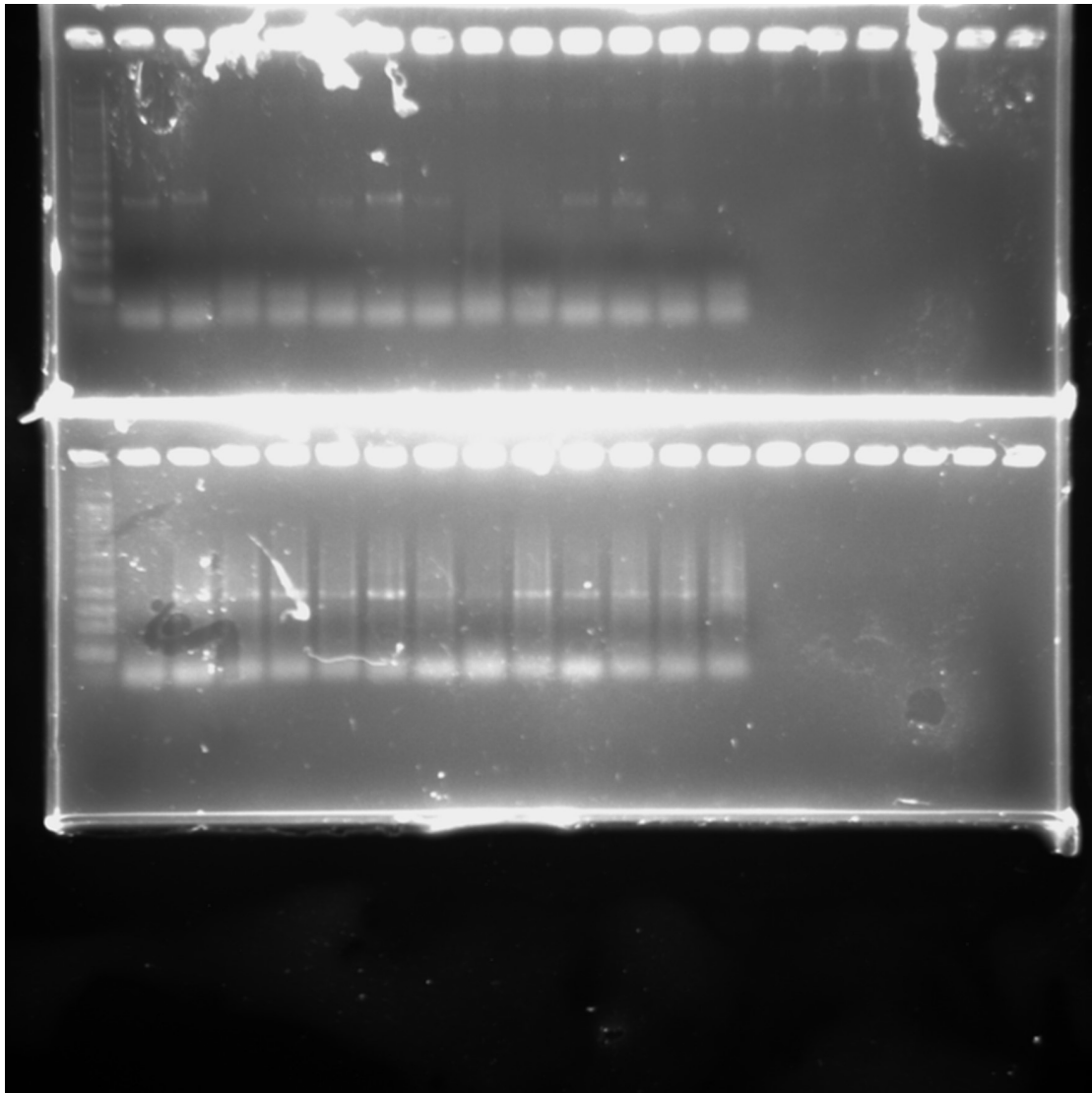
Από την άλλη, η περιοχή *rbcl* που ενισχύθηκε, έδωσε αρκετά χαμηλότερης απόδοσης προϊόντα PCR και κατ' επέκταση αλληλουχίες, παρόλο που έγιναν αρκετές προσπάθειες για βελτιστοποίηση των αντιδράσεων PCR με τα εκάστοτε ζεύγη εκκινητών, όπως αυτά αναγράφονται στον Πίνακα 3.1 και 3.2.

Η περιοχή του 5' άκρου του COI γονιδίου, απέδωσε αρκετά ποιοτικά αποτελέσματα, ωστόσο χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτική, για τα δείγματα, που απομονώθηκαν από τη νήσο Ascension, από τα οποία δεν λάβαμε ποιοτικές πληροφορίες από την ενίσχυση της περιοχής διακλάδωσης των γονιδίων *rbcl-rbcS* (*rbcl-rbcS spacer*).

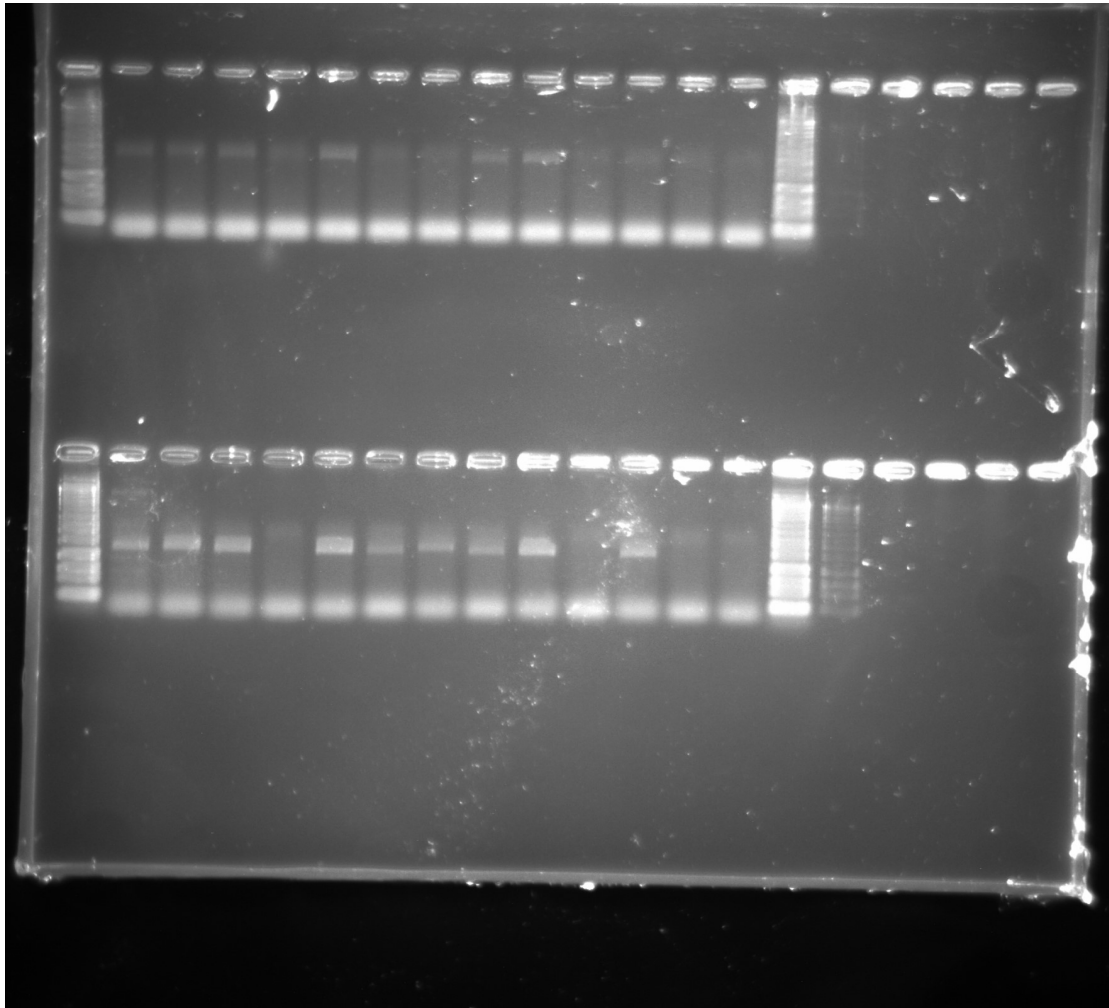
Αυτό συνέβη διότι στα απομονωμένα δείγματα από το νησί της Ρόδου, είχαμε ήδη ποιοτικά προϊόντα PCR και κατ' επέκταση ποιοτικές αλληλουχίες για την περιοχή διακλάδωσης των γονιδίων *rbcl-rbcS* (*rbcl-rbcS spacer*), αφού σε αυτά τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν πρώτα αντιδράσεις PCR με ακραίους συνδυασμούς εκκινητών (π.χ. *rbcl3F/rbcS139R*). Μόνο όταν αυτές οι αντιδράσεις δεν απέδωσαν ποιοτικά προϊόντα, στοχεύσαμε στην ενίσχυση επικαλυπτόμενων τμημάτων (π.χ. *rbcl461F-rbcS139R*).



PICTURE 4.1 Electrophoresis results of PCR amplified DNA region rbcL-rbcS spacer, for Rhodes Islands brown algae isolates. Primer pair used on this PCR reaction was rbcL3F-rbcS139R.



PICTURE 4.2: Electrophoresis results of PCR amplified DNA region rbcL-rbcS spacer, for Rhodes Island brown algae isolates. Primer pair used on this PCR reaction was rbcL461F-rbcS139R (this PCR reaction was conducted on those samples that wasn't amplified on the PCR reaction with the primer pair rbcL3F-rbcS139R).



PICTURE 4.3: Electrophoresis results of PCR amplified DNA region rbcL-rbcS spacer, for Ascension Island brown algae isolates. On the picture there are the results of two different PCR reactions. The upper picture shows the electrophoresis results of a PCR reaction where we used rbcL3F-rbcS139R primer pair. Primer pair used on this PCR reaction shown below was rbcL461F-rbcS139R.

Μετά την παραλαβή των αποτελεσμάτων από την εταιρία Source BioScience, όπου στάλθηκαν για αλληλούχιση, έγινε επεξεργασία των αλληλουχιών χειροκίνητα με τη χρήση του προγράμματος Bioedit, όπως προαναφέρθηκε, ενώ οι συναινετικές αλληλουχίες δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα Aliview. Στη συνέχεια, όλες οι προκύπτουσες αλληλουχίες συγκρίθηκαν για ομοιότητες με δημόσια διαθέσιμες αλληλουχίες στο Genbank, χρησιμοποιώντας το εργαλείο BLASTn του NCBI (Altschul et al. 1990). Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων καταγράφονται στον Πίνακα 4.1, και ήταν ιδιαίτερα χρήσιμα, συνδυαστικά με τα δεδομένα από το φυλογενετικό μας δέντρο, για την συνολική φυλογενετική ανάλυση. Ταυτόχρονα δημιουργήσαμε το φυλογενετικό δέντρο, Εικόνα 4.4, το οποίο είναι ένα NJ φυλόγραμμα που απεικονίζει αλληλουχίες της ενισχυμένης περιοχής διακλάδωσης των γονιδίων *rbcL-rbcS* για όλα τα δείγματα τα οποία επεξεργαστήκαμε.

BIOXHMEIA KAI BIOTECHNOLOGIA

TABLE 4.1 Phylogenetic analysis results of Rhodes isolates

ISOLATES	5'-SSU ID	3'-SSU ID	COI ID	rbcl-rbcS ID	CLOSEST BLAST MATCH
RH15-1-2		BLAST 99% ID Chordariaceae		BLAST 98% ID Giraudya sphacelarioides	Chordariaceae
RH15-2-2		BLAST 99% ID Chordariaceae	BLAST 95% ID Chordariaceae sp.	BLAST 98% ID Halothrix lumbricalis	Chordariaceae
RH15-2-3		BLAST 100% Arthrocladia villosa		BLAST 99% ID Arthrocladia villosa	Arthrocladia villosa
RH15-4-2		BLAST 99% ID Chordariaceae		BLAST rbcl 99% ID Striaria attenuata	Striaria attenuata
RH15-5-3		BLAST 99% ID Chordariaceae		BLAST 99% ID Spermatochnus paradoxus	Spermatochnus paradoxus
RH15-6-1		BLAST 99% ID Ectocarpus spp.			Ectocarpaceae=CY12-03/07
RH15-6-2		BLAST 99% ID Chordariaceae	BLAST 99% ID Chordariaceae sp.	Same as RH48; BLAST 97% ID Chordariaceae (Elachista scutulata)	Chordariaceae sp. 8 AP-2014
RH15-6-3					
RH15-7-1		BLAST 99% ID Punctaria expansa		BLAST 99% ID Stictyosiphon soriferus	Stictyosiphon soriferus
RH15-7-3		BLAST 99% ID Chordariaceae	BLAST 99% ID Chordariaceae sp.	BLAST 99% ID Giraudya sphacelarioides	Elachista stellaris
RH15-7-4		BLAST 99% ID Chordariaceae		BLAST rbcl partial 99% Striaria; Chordariaceae	Striaria attenuata
RH15-7-5					
RH15-7-8		BLAST 99% ID Chordariaceae		BLAST 98% ID Giraudya sphacelarioides	Chordariaceae
RH15-7-9				BLAST 98% ID Striaria attenuata	Chordariaceae
RH15-7-10	BLAST 99% ID Ectocarpus spp.	BLAST 99% ID Ectocarpus spp.		BLAST 95% ID Ectocarpus, Petrospongium, Kuckuckia;	Ectocarpaceae

BIOXHMEIA KAI BIOTECHNOLOGIA

RH15-7-11		BLAST 99% ID Ectocarpus fasciculatus		BLAST 94% ID Kuckuckia, Ectocarpus, Petrospongium, Hincksia	Ectocarpaceae
RH15-8-1		BLAST 99% ID Sporochnus		BLAST 100% ID EF526490_Sporochnus pedunculatus	Sporochnus pedunculatus
RH15-8-3		BLAST 99% ID Punctaria expansa		BLAST 99-100% ID Stictyosiphon soriferus	Stictyosiphon soriferus
RH15-8-4	BLAST 99% ID Chordariaceae, Ectocarpus	BLAST 99% ID Chordariaceae		BLAST 97% Microspongium tenuissimum	Chordariaceae
RH15-8-5	BLAST 98-99% ID Ectocarpales	BLAST 99% ID Chordariaceae and Utriculidium		BLAST 97% ID Hincksia hincksiae; Pylaiella littoralis; Geminocarpus austrogeorgiae	Acinetosporaceae
RH15-8-7		BLAST 99% ID Chordariaceae and Utriculidium		BLAST 98% ID Striaria attenuate	
RH15-8-8			BLAST (short sequence) 97% ID,Chordariaceae sp.		
RH15-8-12		BLAST 99% ID Chordariaceae		BLAST 97% ID Striaria attenuata AF055415.1 and other Chordariaceae	Chordariaceae
RH15-8-13		BLAST 98% ID Chordariaceae and Utriculidium		BLAST rbcl 96% ID Acinetospora sp.	Acinetosporaceae
RH15-8-14		BLAST 99% ID L17013_Aspereococcus bullosus	BLAST 99% ID Chordariaceae sp.		Chordariaceae sp.
RH15-8-15		BLAST 99% ID Chordariaceae		BLAST 98% Giraudya sphacelarioides	Chordariaceae
RH15-8-16		BLAST 99% ID Utriculidium, Chordariaceae and Ectocarpus		BLAST 94% ID Geminocarpus and other Acinetosporaceae	Acinetosporaceae
RH15-8-17		BLAST 99% ID Chordariaceae	no BLAST made, seq is short and weak	BLAST 98% ID Giraudya and other Chordariaceae	Chordariaceae
RH15-8-28		BLAST 99% ID Chordariaceae	BLAST 99% ID Chordariaceae sp.	BLAST rbcl 98% ID Chordariaceae	Chordariaceae sp.

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

RH15-9-3				BLAST rbcl 98% ID Giraudya sphacelarioides	Chordariaceae
RH15-9-5				BLAST rbcl 97% ID Chordariaceae, BLAST spacer no good hit (Austrofilum 91% ID	Chordariaceae
RH15-9-10					
RH15-9-13			BLAST 96% ID Chordariaceae sp.	BLAST rbcl 99% ID Giraudya sphacelarioides; BLAST (Rubisco spacer only) 99% ID Giraudya sphacelarioides	Giraudya sphacelarioides

BΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

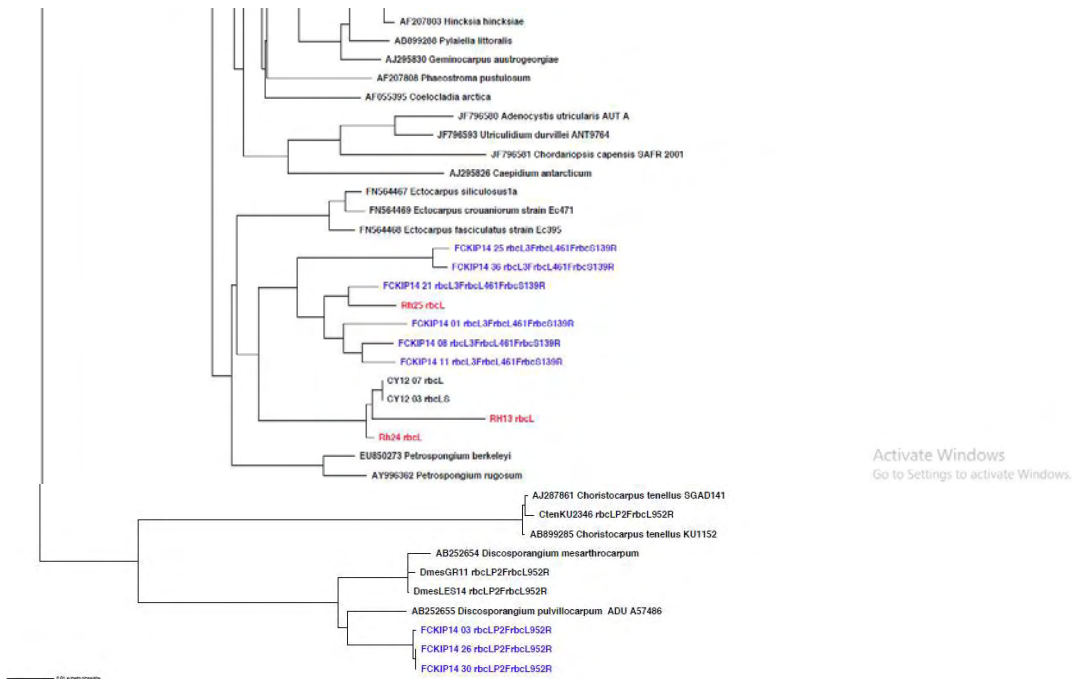


Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.

Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.

Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.

Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.



PICTURE 4.4: Neighbour Joining phylogram displaying *rbcL*, RUBISCO spacer clustering of 57 different brown algal sequences obtained from 58 different cultures raised from environmental samples. A number of 50 sequences, which appear in red, are referring to the cultures that came from the Rhodes Islands samples. The rest sequences are referring to the reference sequences.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Στην παρούσα έρευνα συνδυάσαμε την εφαρμογή δύο μεθόδων, της μεθόδου «germling emergence» και της μεθόδου «DNA barcoding» σε έναν αριθμό δειγμάτων, για να δημιουργήσουμε μια πλήρη φυλογενετική ανάλυση των Φαιοφυκών που απομονώσαμε από τα δείγματά μας.

Συνολικά, απομονώσαμε, με επιτυχία, 84 στελέχη φυκών, από δείγματα που συλλέχθηκαν [η συλλογή των δειγμάτων έγινε στο μέγιστο βάθος όπου είναι δυνατή η βιωσιμότητα φωτοσυνθετικών οργανισμών (circalittoral)], 61 εκ των οποίων (72.6%) ταυτοποιήθηκαν οπτικά μετά την καλλιέργεια τους ως Φαιοφύκη, ενώ τα Χλωροφύκη και τα Ροδόφυτα αντιπροσωπεύονταν από 15,1% και 12,3% αντίστοιχα.

Συνεπώς, καταφέραμε να απομονώσουμε 61 στελέχη Φαιοφυκών από τα δείγματά μας, των οποίων τις φυλογενετικές σχέσεις προσπαθήσαμε να μελετήσουμε. Από αυτά, το ένα, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα των πολλαπλών αντιδράσεων PCR που πραγματοποιήσαμε καθώς και των αλληλουχιών που λάβαμε από αυτά τα ενισχυμένα τμήματα, ήταν επιμολυσμένο με μονοκύτταρο οργανισμό της οικογένειας Heterokont. Οι Heterokont είναι μια οικογένεια ευκαρυωτικών οργανισμών που περιέχει περισσότερα από 25.000 είδη, τα περισσότερα εκ των οποίων αποτελούν είδη φυκών. Μια αναζήτηση και σύγκριση της αλληλουχίας με τη βοήθεια ενός εργαλείου του NCB, BLASTn, αποκάλυψε 92% ομοιότητες με οργανισμούς της οικογένειας Pannovaceae. Τα αποτελέσματα αλληλούχισης της περιοχής SSU που προέκυψαν για τα δείγματα αυτά, δεν απέδωσαν υψηλής ποιότητας χρωματογράμματα ούτε αλληλουχίες, καθώς, λόγω της επιμόλυνσης, ενισχύθηκαν οι αλληλουχίες και των δύο οργανισμών.

Από τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα δείγματα της Ρόδου, 31 ήταν χωρίς καμία επιμόλυνση, όπως απέδειξαν οι καθαρές αλληλουχίες που λάβαμε, και έτσι μπορέσαμε να τα ταξινομήσουμε επαρκώς είτε σε επίπεδο οικογένειας ή είδους. Με την προσθήκη των αλληλουχιών που προέκυψαν από όλα τα δείγματα, τόσο των γονιδίων *rbcl*, όσο και της περιοχής διακλάδωσης των γονιδίων *rbcl-rbcS*, σε μία ευθυγράμμιση με αλληλουχίες αναφοράς, προέκυψε ένα φυλόγραμμα με «Neighbour Joining distance» ανάλυση (Εικόνα 4.1). Στην εικόνα μπορούμε να διακρίνουμε τα απομονωμένα στελέχη που προέκυψαν από τα δείγματα της Ρόδου με κόκκινο χρώμα, ενώ με μπλέ και μαύρο χρώμα εμφανίζονται όλες οι αλληλουχίες αναφοράς που χρησιμοποιήσαμε για την δημιουργία του φυλογράμματος.

Τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων, που προέκυψαν από αυτά τα στελέχη, όπου χρησιμοποιήσαμε ως μοριακούς δείκτες την SSU περιοχή του DNA, το γονίδιο *rbcl*, αλλά και την περιοχή διακλάδωσης των γονιδίων *rbcl-rbcS*, υποδεικνύουν ότι 13 από τα στελέχη των Φαιοφυκών (39%) ανήκουν στην οικογένεια των *Chordariaceae* και 3 από αυτά (9%) στην οικογένεια των *Acinetosporaceae*. Τα υπόλοιπα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως προς το είδος ως ακολούθως: 3 εξ αυτών ταξινομήθηκαν στο είδος *Ectocarpaceae*, 2 στο είδος *Arthrocladia villosa*, 2 στο *Stictyosiphon soriferus*, ένα μοναδικό δείγμα στο *Striaria attenuate*, ένα στο *Spermatochnus paradoxus*, ένα στο *Elachista stellaris*, ένα στο *Sporochnus pedunculatus* και ένα τελευταίο ανήκε στο είδος *Giraudya sphaclarioides*. Για τα υπόλοιπα 3 απομονωμένα στελέχη δεν είχαμε σαφή αποτελέσματα από την αλληλούχιση ώστε να γίνει η συστηματική τους κατάταξη.

Η επιμόλυνση *Pavlovales* ταξινομήθηκε στο φυλόγραμμα ως έξω-ομάδα. Δύο εκ των στελεχών από την περιοχή της Ρόδου, ταξινομήθηκαν ως Φαιοφύκη έξω από την οικογένεια των *Ectocarpales*. Αυτά ήταν *Arthrocladia villosa* και *Sporochnus pedunculatus*. Τα περισσότερα εκ των δειγμάτων που εντάσσονται στην οικογένεια των *Chordariaceae* ταξινομούνται εδώ ως *Giraudya sphaclarioides* και *Elachista stellaris*.

Όσον αφορά στα στελέχη που απομονώθηκαν από τη νήσο *Ascension*, τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων, στο επίπεδο του εργαστηρίου ήταν επαρκή. Ωστόσο τα αποτελέσματα των αλληλουχίσεων δεν ήταν ποιοτικά ώστε να ταυτοποιήσουμε τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των δειγμάτων και να πραγματοποιήσουμε τη συστηματική ταξινόμηση.

7. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Παραπομπές

1. Επεξεργασία από Juliet Brodie, Jane Lewis, 2007
“Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics”
Εκδόσεις: Systematics Association Special Volumes
2. Caio Vinicius Vivas, Ramiris César Souza Moraes, Anderson Alves-Araújo, Marccus Alves, Eduardo Mariano-Neto, Cássio van den Berg, and Fernanda Amato Gaiotto, 2014. “DNA barcoding in Atlantic Forest plants: What is the best marker for Sapotaceae species identification?”
3. Marina Silva Rodrigues, Karina Alessandra Morelli, and Ana Maria Jansen, 2017. “Cytochrome c oxidase subunit 1 gene as a DNA barcode for discriminating *Trypanosoma cruzi* DTUs and closely related species”
4. Anand Patwardhan, Samit Ray and Amit Roy Molecular, 2014. “Markers in Phylogenetic Studies-A Review”
5. Sunoj Kumar, “Molecular markers used in plant phylogeny, 2016 Calicut University
6. Tzen-Yuh Chiang and Barbara A. Schaal, 2008. “Molecular evolution and phylogeny of the atpB– rbcL spacer of chloroplast DNA in the true mosses”
7. Fontanilla IK¹, Wade CM., 2007. “The small subunit (SSU) ribosomal (r) RNA gene as a genetic marker for identifying infective 3rd juvenile stage *Angiostrongylus cantonensis*.”
8. Akira F. Peters, Lucía Couceiro, Konstantinos Tsiamis, Frithjof C. Kupper and Myriam Valero, 2015. “Barcoding of cryptic stages of marine brown algae isolated from incubated substratum reveals high diversity in Acinetosporaceae (Ectocarpales, Phaeophyceae)”
9. Frithjof C. Kupper, Akira F. Peters, Dawn M. Shewring, Martin D. J. Sayer, Alexandra Mystikou, Hugh Brown, Elaine Azzopardi, Olivier Dargent, Martina Strittmatter, Debra Brennan, Aldo O. Asensi, Pieter van West and Robert T. Wilce, 2016. “Arctic marine phytobenthos of Northern Baffin Island”

10. Žuljević A, Peters AF, Nikolić V, Antolić B, Despalatović M, Cvitković I, Isajlović I, Mihanović H, Matijević S, Shewring DM, Canese S, Katsaros C, Küpper FC, 2016. "The Mediterranean deep-water kelp *Laminaria rodriguezii* is an endangered species in the Adriatic Sea."
11. Liliana Munoz, Peters Akira, Kupper Frithjof, 2016. "Molecular approach to the Seaweed biodiversity of Easter Island"
12. Berit L. Siemer,2 Wytze T. Stam, Jeanine L. Olsen, 1998. "Phylogenetic relationships of the brown algal, orders *Ectocarpales*, *Chordariales*, *Dictyosiphonales* and *Tilopteridales* (*Phaeophyceae*) based on RUBISCO large subunit and spacer sequences".
13. Naomi Phillips, Renaud Burrowes, Florence Rousseau, Bruno de Reviere and Gary W. Saunders, 2008. "Resolving evolutionary relationships among the brown algae using chloroplast and nuclear genes".
14. Marta Coll, Chiara Piroddi, Jeroen Steenbeek, Kristin Kaschner, Frida Ben, Rais Lasram, etc. "The biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, Patterns and Threats".
15. Stefano G. A. Draisma, Willem F. Prud'homme van Reine, etc., 2001. "A reassessment of phylogenetic relationships within the *Phaeophyceae* based on RUBISCO large subunit and Ribosomal DNA sequences".
16. Ante Žuljevic, Akira F. Peters, Vedran Nikolic, Boris Antolic, Marija Despalatovic, Ivan Cvitkovic, Igor Isajlovic, Hrvoje Mihanovic, Slavica Matijevic, Dawn M. Shewring, Simonepietro Canese, Christos Katsaros, Frithjof C. Köpper, 2016. "The Mediterranean deep-water kelp *Laminaria rodriguezii* is an endangered species in the Adriatic Sea".
17. Alexandra Mystikou, Aldo O. Asensi, Olivier DeClerck, Dieter G. Møller, Akira F. Peters, Konstantinos Tsiamis, Kyle I. Fletcher, Renato Westermeier, Paul Brickle, Pieter van West and Frithjof C. Köpper, 2016. "New records and observations of macroalgae and associated pathogens from the Falkland Islands, Patagonia and Tierra del Fuego".
18. Marilena Aplikioti, Paraskevi Louzidou, Alexandra Mystikou, Melina Marcou, Petros Stavrou, Stefanos Kalogirou, Konstantinos Tsiamis, Panayotis Panayotidis and Frithjof C. Küpper, 2016. "Further expansion of the alien

seaweed *Caulerpa taxifolia* var. *distichophylla* (Sonder) Verlaque, Huisman & Procacini (Ulvophyceae, Bryopsidales) in the Eastern Mediterranean Sea”.

19. Gkafas.G.A, Orfanidis S., Vafidis D., Panagiotaki P., Kupper F.C., Exadactylos A., 2015. “Genetic diversity and structure of *Cymodocea nodosa* meadows in the Aegean Sea, Eastern Mediterranean”.

20. Alexandra Mystikou, Akira F. Peters, Aldo O. Asensi, Kyle I. Fletcher, Paul Brickle, Pieter van West, Peter Convey and Frithjof C. Kupper, 2014. “Seaweed biodiversity in the south-western Antarctic Peninsula: surveying macroalgal community composition in the Adelaide Island/Marguerite Bay region over a 35-year time span”.

21. Konstantinos Tsiamis, Ergün Taşkın, Sotiris Orfanidis, Petros Stavrou, Marina Argyrou, Panayotis Panayotidis, Tania Tsioli, Burak Ali Cicek, Melina Marcou and Frithjof C. Küpper, 2014. “Checklist of seaweeds of Cyprus (Mediterranean Sea)”.

22. Konstantinos Tsiamis, Panayotis Panayotidis, Maria Salomidi, Alexandra Pavlidou, Julia Kleinteich, Katerina Balanika and Frithjof C. Küpper, 2013. “Macroalgal community response to re-oligotrophication in Saronikos Gulf”.

23. Sergi Joher , Enric Ballesteros , Emma Cebrian , Noemv Sanchez and Conxi Rodrviguez-Prieto, 2012. “Deep-water macroalgal-dominated coastal detritic assemblages on the continental shelf off Mallorca and Menorca (Balearic Islands, Western Mediterranean)”.

24. Marzia Bo, Marco Bertolino, Mireno Borghini, Michela Castellano, Anabella Covazzi Harriague, Cristina Gioia Di Camillo, GianPietro Gasparini, Cristina Misic, Paolo Povero, Antonio Pusceddu, Katrin Schroeder, Giorgio Bavestrello, 2011. “Characteristics of the Mesophotic Megabenthic Assemblages of the Vercelli Seamount (North Tyrrhenian Sea)”.

25. Konstantinos Tsiamis, Marc Verlaque, Panayotis Panayotidis and Barbara Montesanto, 2010. “New macroalgal records for the Aegean Sea (Greece, eastern Mediterranean Sea)”.

26. Ελληνική Φυκολογική Εταιρία, 2008. “Μια βουτιά, μια ματιά στους κήπους του νερού: Γνωρίζοντας τα φύκη”.

27. N. Bianchi and C. Morri, 2000. "Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea: Situation, Problems and Prospects for Future Research".

28. Martina Strittmatter, Claire M. M. Gachon, Dieter G. Müller, Julia Kleinteich, Svenja Heesch, Amerssa Tsirigoti, Christos Katsaros, Maria Kostopoulou, Frithjof C. Küpper, 2013. "Intracellular eukaryotic pathogens in brown macroalgae in the Eastern Mediterranean, including LSU rRNA data for the oomycete *Erychasma dicksonii*".

29. Aldo O. Asensi and Frithjof C. Küpper, 2012. "Seasonal periodicity and reproduction of brown algae (*Phaeophyceae*) at Puerto Deseado (Patagonia)".