



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Η αναστροφή του τρόπου μεταβίβασης του  
μιτοχονδριακού DNA στα δίθυρα και οι φυλογενετικές της  
προεκτάσεις**

ΙΩΑΝΝΗΣ ΘΕΟΛΟΓΙΔΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007





UNIVERSITY OF CRETE  
SCHOOL OF SCIENCES AND ENGINEERING  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

**The reversal of the transmission route of mitochondrial  
DNA in bivalves and its phylogenetic implications**

IOANNIS THEOLOGIDIS

PhD THESIS

HERAKLIO 2007

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο **Εργαστήριο Πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης** του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και υποβλήθηκε στο Τμήμα Βιολογίας.

**Επιβλέπων Καθηγητής:**

Ε. Ζούρος (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

**Συμβουλευτική Επιτροπή:**

Ε. Ζούρος (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Γ. Ροδάκης (Αν. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθήνας)

Ν. Μοσχονάς (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πάτρας)

**Εξεταστική Επιτροπή:**

Χ. Λούης (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Ν. Μοσχονάς (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πάτρας)

Γ. Ροδάκης (Αν. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθήνας)

Δ. Αλεξανδράκη (Αν. Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Χ. Δελιδάκης (Αν Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Κ. Ρουμπελάκη – Αγγελάκη (Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Σ. Πυρίντσος (Επικ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Η διατριβή υποστηρίχτηκε οικονομικά από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΠΕΝΕΔ 01ΕΔ42), το Marine Genomics Europe Network of Excellence και το Πανεπιστήμιο Κρήτης.



**Network of Excellence**  
Joining together scientific communities  
Establish Europe's lead  
in marine genomics



Αφιερωμένη στον ξάδελφό μου,  
Γιώργο Νικολαΐδη

## Πρόλογος

Ευχαριστώ όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Λευτέρη Ζούρο για την εμπιστοσύνη του και για την τεράστια και ανεκτίμητη συμβολή του στην επιστημονική μου κατάρτιση. Νιώθω εξαιρετικά τυχερός που μαθήτευσα πλάι του. Κοντά σε εκείνον, ευχαριστώ τον πρώτο μου δάσκαλο στην εξελικτική βιολογία και μετέπειτα μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Αν. Καθηγητή Γιώργη Ροδάκη. Οι διαλέξεις του (τότε) και οι συμβουλές του (τώρα) ήταν για μένα πολύτιμες. Πολύτιμες και πολύ εποικοδομητικές ήταν επίσης οι υποδείξεις του Καθηγητή Νίκου Μοσχονά, τον οποίο ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ευγένεια και την καλή του διάθεση.

Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις παρατηρήσεις και τις διορθώσεις τους.

Η παρούσα διατριβή δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς τη βοήθεια των συναδέλφων μου. Εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου στη Μ. Δραμουντάνη, στη J. Radojicic, στη Μ. Τράκη, στο Σ. Φοδελιανάκη, στο Μ. Λαδουκάκη και στο Γ. Γουλιέλμο που, καθένας με τον δικό του τρόπο, με βοήθησαν να φτάσω μέχρι το τέλος. Ευχαριστώ την Αθανασία, τη Φωτεινή και τον Κώστα από το εργαστήριο μοριακής βιολογίας του Παν/μίου της Αθήνας για την άψογη συνεργασία και για τη βοήθειά τους, το Δάκη, τον Τίμη, τον Παναγιώτη και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου φυσιολογίας φυτών, τη Λιλίκα και τη Μαρία από το εργαστήριο μοριακής γενετικής ανθρώπου, τη L. Cao και την E. Kenchington από τον Καναδά. Ευχαριστώ το Λευτέρη Σπανό για την ποιοτική δουλειά και συνεργασία.

Αφήνω για το τέλος τους φίλους μου που όλα αυτά τα χρόνια μου χαρίζουν μοναδικές στιγμές, αλλά περισσότερο από όλους, την οικογένειά μου. Τον Αλέκο, τη Μαίρη και τον Αρτέμη που με στήριξαν με όλες τους τις δυνάμεις, σε όλα τα επίπεδα. Δεν υπάρχουν λόγια που να εκφράζουν την αγάπη και την ευγνωμοσύνη μου.

## Περιεχόμενα

	Σελ.
Περίληψη.....	10
Summary.....	12
Λεξικό βασικών όρων και συντομογραφίες.....	15
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
<b>1. 1. Μιτοχόνδρια και μιτοχονδριακό DNA.....</b>	<b>16</b>
1. 1. 1. Μιτοχόνδρια: δομή και λειτουργία.....	16
1. 1. 2. Η προέλευση των μιτοχονδρίων.....	18
1. 1. 3. Το μιτοχονδριακό DNA.....	19
1. 1. 4. Η κληρονόμηση του μιτοχονδριακού DNA.....	22
1. 1. 5. Ο ανασυνδυασμός του μιτοχονδριακού DNA.....	24
1. 1. 6. Η χρήση του mtDNA στην πληθυσμιακή και εξελικτική βιολογία.....	26
<b>1. 2. Η Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα του μιτοχονδριακού DNA.....</b>	<b>28</b>
1. 2. 1. Τα βασικά χαρακτηριστικά του συστήματος της ΔΜΚ.....	28
1. 2. 2. Η εξάπλωση του συστήματος της ΔΜΚ.....	30
1. 2. 3. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα του μυδιού.....	31
1. 2. 4. Η περιοχή ελέγχου (CR) του mtDNA του μυδιού.....	32
1. 2. 5. Ιδιαιτερότητες και μηχανισμοί της ΔΜΚ.....	33
1. 2. 6. Η υπόθεση εργασίας για το μηχανισμό της ΔΜΚ.....	35
1. 2. 7. Τα μη-τυπικά αρσενικά μύδια και η υπόθεση της «αρρενοποίησης».....	37
<b>1. 3. Οι οργανισμοί.....</b>	<b>39</b>
1. 3. 1. <i>Mytilus galloprovincialis</i> και <i>Mytilus edulis</i> .....	39
1. 3. 2. <i>Donax trunculus</i> .....	40
<b>1. 4. Σκοπός της διατριβής.....</b>	<b>41</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
<b>2. 1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων.....</b>	<b>43</b>
2. 1. 1. <i>Mytilus galloprovincialis</i> – <i>Mytilus edulis</i> .....	43
2. 1. 2. <i>Donax trunculus</i> .....	43
<b>2. 2. Εξαγωγή ολικού DNA.....</b>	<b>44</b>
<b>2. 3. Πολλαπλασιασμός μιτοχονδριακού DNA (PCR).....</b>	<b>44</b>
2. 3. 1. Πολλαπλασιασμός της περιοχής ελέγχου (CR) των μορίων mtDNA από τη γονάδα και το σώμα των μη-τυπικών αρσενικών μυδιών.....	44
2. 3. 2. Πολλαπλασιασμός των κωδικών περιοχών των μορίων που περιέχονται στη γονάδα και στο σώμα των μη-τυπικών αρσενικών μυδιών.....	46
2. 3. 3. Οι αντιδράσεις PCR για τον προσδιορισμό της πλήρους πρωτοδιάταξης του αρρενοποιημένου μορίου.....	47

2. 3. 4. Συλλογή πληθυσμιακών δεδομένων για το αρρενοποιημένο μόριο.....	48
2. 3. 5. Η αναζήτηση της ΔΜΚ στο είδος <i>Donax trunculus</i> .....	49
2. 3. 6. Πέψεις των προϊόντων PCR με περιοριστικές ενδονουκλεάσες...	50
<b>2. 4. Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR και προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των ενθεμάτων.....</b>	<b>51</b>
2. 4. 1. Προετοιμασία των προϊόντων PCR για κλωνοποίηση.....	51
2. 4. 2. Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων .....	51
2. 4. 3. Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli DH5α</i> .....	52
2. 4. 4. Έλεγχος θετικών κλώνων.....	53
2. 4. 5. Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA.....	53
2. 4. 6. Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των ενθεμάτων.....	53
<b>2. 5. Ανάλυση αλληλουχιών.....</b>	<b>54</b>
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
<b>3. 1. Το γονιδίωμα C: ένα νέο μιτοχondριακό γονιδίωμα στα αδελφά είδη <i>M. galloprovincialis</i> και <i>M. edulis</i> .....</b>	<b>55</b>
3. 1. 1. Το κυρίαρχο μιτοχondριακό γονιδίωμα των γονάδων των μη-τυπικών αρσενικών μυδιών. A. Η περιοχή ελέγχου (CR).....	55
B. Οι κωδικές περιοχές.....	62
Γ. Προσδιορισμός της πλήρους πρωτοδιάταξης του σύνθετου γονιδιώματος: το γονιδίωμα C.....	66
3. 1. 2. Η κατανομή των μορίων F, M και C στα θηλυκά και αρσενικά άτομα σε πληθυσμούς του <i>M. galloprovincialis</i> . A. Πληθυσμιακή μελέτη.....	68
B. Μη ύπαρξη ομοπλασμικών αρσενικών ατόμων: αναθεώρηση των αποτελεσμάτων Saavedra et al. (1997).....	72
3. 1. 3. Η παγκόσμια εξάπλωση του γονιδιώματος C στα αδελφά είδη <i>M. galloprovincialis</i> και <i>M. edulis</i> .....	75
3. 1. 4. Έλλειψη ενδείξεων σύγκλισης μεταξύ των γονιδιωμάτων M και C.....	78
<b>3. 2. Η αναζήτηση της Διπλής Μονογονεϊκής Κληρονομικότητας (ΔΜΚ) σε άλλα είδη.....</b>	<b>84</b>
3. 2. 1. Η αποτυχία ανίχνευσης της ΔΜΚ στα είδη <i>Venerupis decussatus</i> , <i>Venus verrucosa</i> , <i>Callista chione</i> και <i>Arca noae</i> .....	84
3. 2. 2. Η ανίχνευση της ΔΜΚ στο δίθυρο <i>Donax trunculus</i> (Bivalvia: Donacidae) .....	85
A. Η μελέτη του γονιδίου <i>lrRNA</i> .....	85
B. Η μελέτη του γονιδίου <i>Cytb</i> .....	88
<b>3. 3. Τα φυλογενετικά πρότυπα των μορίων F και M στα δίθυρα με ΔΜΚ.....</b>	<b>91</b>
3. 3. 1. Τα φυλογενετικά πρότυπα του γονιδίου <i>lrRNA</i> στα είδη με	



ΔΜΚ.....	92
3. 3. 2. Τα φυλογενετικά πρότυπα του γονιδίου <i>Cytb</i> στα είδη με ΔΜΚ.....	94
3. 3. 3. Τα φυλογενετικά πρότυπα του γονιδίου <i>COI</i> στα είδη με ΔΜΚ.....	96
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	
4. 1. Η υπόθεση της «αρρενοποίησης» και το νέο γονιδίωμα C.....	100
4. 2. Η «αρρενοποίηση» στα αδελφά είδη <i>M. galloprovincialis</i> και <i>M.</i> <i>edulis</i> .....	102
4. 3. Αναθεώρηση των μη-τυπικών αρσενικών και ερμηνεία της παρουσίας τριπλασμικών ατόμων στους φυσικούς πληθυσμούς.....	104
4. 4. Η εξάπλωση της Διπλής Μονογονεϊκής Κληρονομικότητας του mtDNA στα δίθυρα.....	106
4. 5. Το πρόβλημα της ανίχνευσης της ΔΜΚ.....	108
4. 6. Ο ρόλος της «αρρενοποίησης» στην εμφάνιση και εξέλιξη της ΔΜΚ.....	110
4. 7. Επιστροφή στη Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα:	
Α. Σύγχρονη θεώρηση.....	114
Β. Προοπτικές.....	117
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	120
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	122
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ</b>	
Παράρτημα I.....	137
Παράρτημα II.....	143
Παράρτημα III.....	154
Παράρτημα IV.....	162

## Περίληψη

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) κληρονομείται μητρικά στα περισσότερα είδη μεταζώων. Ωστόσο, σε ορισμένα δίθυρα παρατηρείται, εκτός από μητρική, και πατρική μεταβίβαση του mtDNA. Τα θηλυκά άτομα κληρονομούν μόνο το μητρικό μιτοχονδριακό γονιδίωμα (τύπος F) και είναι συνεπώς ομοπλασμικά, ενώ τα αρσενικά κληρονομούν επιπλέον και το πατρικό γονιδίωμα (τύπος M), με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ετεροπλασμικά για τους δύο τύπους. Το σύστημα είναι γνωστό με τον όρο **Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα (ΔMK)** και είχε μέχρι πρόσφατα εντοπιστεί σε πέντε οικογένειες δίθυρων (Mytilidae, Unionidae, Hyriidae, Margaritiferidae και Veneridae).

Στα μύδια του γένους *Mytilus*, τα οποία αποτελούν τους καλύτερα μελετημένους οργανισμούς με ΔMK, οι δύο τύποι mtDNA (F, M) διαφέρουν στο επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατά 20%. Σε φυσικούς πληθυσμούς *Mytilus* έχουν παρατηρηθεί αρσενικά άτομα που δεν φέρουν το μόριο M (μη-τυπικά αρσενικά), αλλά φαίνονται να είναι ομοπλασμικά για έναν τύπο F, ή ετεροπλασμικά για δύο διαφορετικούς τύπους F. Με βάση αυτήν την παρατήρηση προτάθηκε η υπόθεση της **αρρενοποίησης των F γονιδιωμάτων ή της αναστροφής του τρόπου μεταβίβασης του mtDNA**. Σύμφωνα με την υπόθεση, ένα μόριο F, το οποίο κληρονομείται μητρικά, είναι δυνατό να αλλάξει ρόλο και να μετατραπεί σε πατρικώς κληρονομούμενο. Το «αρρενοποιημένο» μόριο θα λειτουργεί πλέον ως «M» και θα αρχίσει να διαφοροποιείται ανεξάρτητα από την γενεαλογική γραμμή των F τύπων.

Η «αρρενοποίηση» έχει σημαντικές προεκτάσεις που αφορούν στην διαλεύκανση των μηχανισμών της ΔMK και της εξέλιξής της. Εντούτοις, δεν έχουν κατανοηθεί σημαντικές πτυχές της, ενώ ταυτόχρονα, οι παρατηρήσεις που συνηγορούν υπέρ της ύπαρξής της είναι αποσπασματικές. Ελέγξαμε συστηματικά την υπόθεση της «αρρενοποίησης» μελετώντας το περιεχόμενο των γονάδων και των σωματικών ιστών μη-τυπικών αρσενικών μυδιών *Mytilus galloprovincialis* από πληθυσμούς της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας. Όπως προέκυψε, όλα τα μη-τυπικά αρσενικά περιείχαν στις γονάδες τους ένα γονιδίωμα, του οποίου η περιοχή ελέγχου ήταν μεγαλύτερη σε μήκος από εκείνη των τυπικών F και M μορίων. Συγκεκριμένα, ενώ το 5' και το 3' άκρα της περιοχής ελέγχου ήταν τύπου F, το κεντρικό της τμήμα αποτελούταν από επαναλαμβανόμενα και διαδοχικά

διατεταγμένα στοιχεία τύπου M. Το νέο αυτό γονιδίωμα ονομάστηκε C και προσδιορίστηκε η πλήρης πρωτοδιάταξή του. Το μόριο C, εκτός της ρυθμιστικής του περιοχής, έμοιαζε σημαντικά με ήδη γνωστά F τύπου μόρια και θεωρήθηκε ότι ήταν «αρρενοποιημένο», καθώς εντοπίστηκε στις γονάδες όλων των μη-τυπικών αρσενικών, παρέχοντας άμεση απόδειξη για την υπόθεση της «αρρενοποίησης» στο *M. galloprovincialis*. Εντοπίστηκε, επίσης, και σε μη-τυπικά αρσενικά του είδους *M. edulis* από τον Καναδά, υποδεικνύοντας ότι η «αρρενοποίηση» είχε κοινή αφετηρία στα αδελφά είδη *M. galloprovincialis* και *M. edulis*. Η πληθυσμιακή μελέτη για τον εντοπισμό του μορίου C που ακολούθησε, αποκάλυψε ότι δεν υπάρχουν ομοπλασμικά αρσενικά μύδια *M. galloprovincialis*. Αυτή η παρατήρηση αντικρούει την υπόθεση που είχε διατυπωθεί παλαιότερα, ότι τα γεγονότα της «αρρενοποίησης» είναι πιθανό να είχαν σαν αφετηρία την αποτυχία εισόδου των πατρικών μορίων M σε ένα αρσενικό άτομο και την επακόλουθη αντικατάστασή τους από μητρικά μόρια τύπου F. Σύμφωνα με τα νέα δεδομένα, η «αρρενοποίηση» φαίνεται να συνδέεται πάντοτε με την παρουσία του γονιδιώματος C.

Η «αρρενοποίηση», **μηδενίζοντας το χρόνο διαφοροποίησης μεταξύ των μητρικών και πατρικών κληρονομούμενων μορίων mtDNA**, μπορεί να επηρεάσει τις φυλογενετικές σχέσεις τους στα δίθυρα. Ωστόσο, τα δεδομένα σχετικά με την εξάπλωσή της ΔMK στην εν λόγω ομοταξία είναι ελλιπή και για το λόγο αυτό δοκιμάσαμε να την εντοπίσουμε και σε άλλα γένη και οικογένειες. Ελέγξαμε αντιπροσώπους των οικογενειών Veneridae, Arcidae και Donacidae. Ο έλεγχος αποκάλυψε ότι τα αρσενικά άτομα του είδους *Donax trunculus* (Bivalvia, Donacidae) ήταν ετεροπλασμικά για τους δύο γενετικούς τόπους που εξετάστηκαν (*Cytb* και *lrRNA*), σε αντίθεση με τα θηλυκά, τα οποία ήταν ομοπλασμικά, περιέχοντας μόνο τον έναν από τους δύο τύπους που βρέθηκαν στα αρσενικά. Η παραπάνω παρατήρηση αποτελεί απόδειξη για την ύπαρξη της ΔMK στο εν λόγω είδος.

Μετά την εύρεση μίας ακόμα οικογένειας δίθυρων με ΔMK, προχωρήσαμε στην κοινή φυλογενετική ανάλυση των F και M μορίων. Αναλύσαμε τρία τμήματα μιτοχονδριακών γονιδίων (*Cytb*, *COI* και *lrRNA*) από αντιπροσώπους πέντε οικογενειών (Mytilidae, Unionidae, Hyriidae, Veneridae, Donacidae). Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης και αποτιμώντας το ρόλο που μπορεί να έχει διαδραματίσει το φαινόμενο της «αρρενοποίησης», συζητήσαμε τις δύο επικρατέστερες υποθέσεις που εξηγούν την κατανομή της ΔMK. Σύμφωνα με την πρώτη υπόθεση, η ΔMK έχει εμφανιστεί πολλές φορές στην ομοταξία των δίθυρων,

τόσες, όσες είναι και οι διακριτές ομαδοποιήσεις των μητρικών και των πατρικών μορίων στα φυλογενετικά δέντρα. Η δεύτερη υπόθεση δέχεται ότι η ΔΜΚ εμφανίστηκε μόνο μία φορά στα πρωτόγονα δίθυρα και ακολούθως διατηρήθηκε ή εξαλείφθηκε δευτερογενώς κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των διάφορων οικογενειών ή γενών. Αν και η δεύτερη υπόθεση δεν μπορεί από μόνη της να εξηγήσει τη φυλογένεση των μητρικών και των πατρικών μορίων των δίθυρων, προτείναμε ότι, αν συνδυαστεί με το φαινόμενο της «αρρενοποίησης», παρέχει ένα πιο αληθοφανές σενάριο σε σχέση με την υπόθεση των πολλαπλών εμφανίσεων.

## Summary

Mitochondrial DNA (mtDNA) is maternally inherited in most metazoan species. In contrast, biparental transmission is the standard mode of mtDNA inheritance in several bivalve species. Female individuals inherit only the maternal genome (type F) and are homoplasmic, while males inherit, not only the maternal, but also the paternal genome (type M) and are heteroplasmic for both types. This mode of mtDNA transmission is termed Doubly Uniparental Inheritance (DUI) and it was, until recently, detected in five bivalve families (Mytilidae, Unionidae, Hyriidae, Margaritiferidae and Veneridae).

In mussels of genus *Mytilus*, which are the best studied organisms with DUI, the two mtDNA types (F, M) differ by 20%. In natural populations of *Mytilus* there have been observed male individuals that do not contain the M molecule (atypical males). These males are homoplasmic for one F type, or heteroplasmic for two F types. This observation provided the basis for the “masculinization” or “role reversal” hypothesis, according to which an F genome may become paternally transmitted. The “masculinized” molecule functions as “M”.

Masculinization has important implications for mechanism and evolution of DUI. However, it is not yet understood, and the observations that support its existence are fragmentary. We tested the hypothesis of masculinization in a systematic basis by studying the content of gonadal and somatic tissues extracted from atypical *Mytilus galloprovincialis* male mussels from populations of the Mediterranean and the Black Sea. We found that, in all atypical males, the gonad contained a genome that carried a compound control region. The 5' and 3' flanking domains of the control region of this genome were of type F, whereas its central domain consisted of tandemly repeated M-type elements. This new genome was called C (Compound) and it was fully sequenced. Apart from its control region, the C genome was an F-like genome and it was considered to be “masculinized” because it was present in all atypical male gonads. The detection of the C genome provides direct evidence for the masculinization hypothesis in *Mytilus galloprovincialis*. It was also detected in the gonads of atypical *Mytilus edulis* males sampled from the eastern coast of Canada, a finding that suggests a common origin of masculinized genomes in the sibling species *M. galloprovincialis* and *M. edulis*. The population study for the C genome revealed

that homoplasmic males do not exist in *Mytilus galloprovincialis*. This observation rejects the previous hypothesis that masculinization events may have originated from failure of the male mussel to inherit the paternal molecule and subsequent invasion of a typical F-type molecule into the male transmission route. According to the new evidence, masculinization seems to be always associated with the existence of the C genome.

Masculinization can affect the phylogenetic relationships of maternal and paternal mtDNA molecules in the class of bivalvia, because it sets the divergence time between the maternal and paternal genomes to zero. Yet, evidence for the distribution of DUI in bivalvia is incomplete. For this reason, we tried to detect DUI in other genera and families. We tested some representatives of Veneridae, Arcidae and Donacidae. It was revealed that male individuals of species *Donax trunculus* (Bivalvia, Donacidae) were heteroplasmic for the two genetic loci tested (*Cytb* and *lrRNA*), whereas females were homoplasmic, containing only one of the two types that were found in males. This observation is a landmark of DUI and provides evidence for the existence of this system of mtDNA inheritance in a new bivalve family.

After the addition of Donacidae in the list of families with DUI, we proceeded to produce a common phylogenetic analysis of F and M molecules. We analyzed three partial mtDNA genes (*Cytb*, *COI* and *lrRNA*) using sequence data from five families (Mytilidae, Unionidae, Hyriidae, Veneridae, Donacidae). According to the analysis, and by evaluating the potential role of masculinization in phylogeny, we discuss the two dominant hypotheses about the distribution of DUI. The first hypothesis claims that DUI has had multiple and independent origins during the evolution of bivalvia, as many, as the number of the distinct clusters that the maternal and the paternal molecules form together in phylogenetic trees. The alternative hypothesis assumes that DUI originated only once in primitive bivalves and it was subsequently retained or secondarily lost in several genera and families. Although the second hypothesis cannot by itself explain the phylogeny of the maternal and paternal molecules, we proposed that, if combined with the phenomenon of masculinization, it provides a more plausible scenario than the hypothesis of multiple origins.

## Λεξικό βασικών όρων και συντομογραφίες

**Αρρενοποίηση** (ή αναστροφή του τρόπου μεταβίβασης του mtDNA): Η υπόθεση σύμφωνα με την οποία ένα μητρικώς κληρονομούμενο μόριο mtDNA μετατρέπεται σε πατρικώς κληρονομούμενο.

**ΔΜΚ** (Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα – DUI, Doubly Uniparental Inheritance): Ο τρόπος κληρονομησης που παρατηρείται σε ορισμένα δίθυρα και συνίσταται στη μεταβίβαση δύο τύπων mtDNA: Ο τύπος F κληρονομείται μέσω των θηλυκών γαμετικών κυττάρων προς όλους τους απόγονους, ενώ ο τύπος M κληρονομείται μέσω του σπέρματος μόνο προς τους αρσενικούς απόγονους.

**Ετεροπλασμία:** Η συνύπαρξη δύο ή περισσότερων τύπων mtDNA στο ίδιο άτομο. Διακρίνεται σε ετεροπλασμία αλληλουχίας και σε ετεροπλασμία μεγέθους.

**Ομοπλασμία:** Η ύπαρξη ενός μόνο τύπου mtDNA σε κάθε άτομο.

**Τυπικά αρσενικά:** Αρσενικά άτομα που εμφανίζονται ετεροπλασματικά περιέχοντας έναν F και έναν M τύπο mtDNA.

**Μη-τυπικά αρσενικά:** Αρσενικά άτομα που στερούνται M τύπου γονιδιώματος και εμφανίζονται είτε ομοπλασματικά για έναν F τύπο, είτε ετεροπλασματικά για δύο διαφορετικούς F τύπους mtDNA.

**bp :** Ζεύγη νουκλεοτιδικών βάσεων.

**CR (Control Region):** Η κύρια περιοχή ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA.

**mtDNA:** Μιτοχονδριακό DNA.

- **Συντομογραφίες νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών:**

**N** = A,C,G,T

**V** = G,A,C

**D** = G,A,T

**B** = G,T,C

**H** = A,T,C

**W** = A,T

**M** = A,C

**R** = A,G

**K** = G,T

**S** = G,C

**Y** = C,T

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. 1. Μιτοχόνδρια και μιτοχονδριακό DNA

### 1. 1. 1. Μιτοχόνδρια: δομή και λειτουργία

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια που απαντώνται σε όλους σχεδόν τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Εξαιρέση αποτελούν ορισμένοι μονοκύτταροι ευκαρυώτες (*Cryptosporidium parvum*, *Trachipleistophora hominis*, *Entamoeba histolytica*, *Blastocystis hominis*, και *Giardia intestinalis*), οι οποίοι στερούνται μιτοχονδρίων. Πάντως, ακόμα και αυτοί οι «α-μιτοχονδριακοί» οργανισμοί φαίνεται ότι απώλεσαν τα μιτοχόνδριά τους δευτερογενώς, καθώς περιέχουν υπολειμματικές δομές των τελευταίων στο κυτταρόπλασμα που καλούνται μιτοσώματα και επιπλέον διατηρούν αντίγραφα μιτοχονδριακών γονιδίων στο πυρηνικό DNA (Regoes et al. 2005, Chan et al. 2005).

Τα μιτοχόνδρια καταλαμβάνουν σημαντικό μέρος από τον όγκο του ευκαρυωτικού κυττάρου και η παρουσία τους θεωρείται θεμελιώδης για την εξέλιξη των οργανισμών σε συνθετότερες μορφές. Το σχήμα τους μπορεί να μεταβάλλεται ακόμα και μέσα στο ίδιο κύτταρο, αλλά τυπικά απεικονίζονται σαν κυλινδρικοί σχηματισμοί που μοιάζουν με βακτήρια. Το πλάτος τους μπορεί να φτάσει τα 0.5 μm και το μήκος τους τα 7 μm. Έχει δειχτεί, με τη βοήθεια σύγχρονων τεχνικών, ότι τα μιτοχόνδρια μπορούν να διαιρούνται ή να συντήκονται μέσα στο κύτταρο, καθώς και ότι η θέση τους στο κυτταρόπλασμα μπορεί να μην είναι σταθερή (Bereiter-Hann and Voith 1994). Η πλαστικότητα του σχήματός τους και η ικανότητά τους να αλλάζουν θέση είναι ιδιότητες που οφείλονται πιθανότατα στις αλληλεπιδράσεις τους με τον κυτταροσκελετό, με τον οποίο φαίνεται ότι βρίσκονται σε επαφή (Chen and Butow 2005).

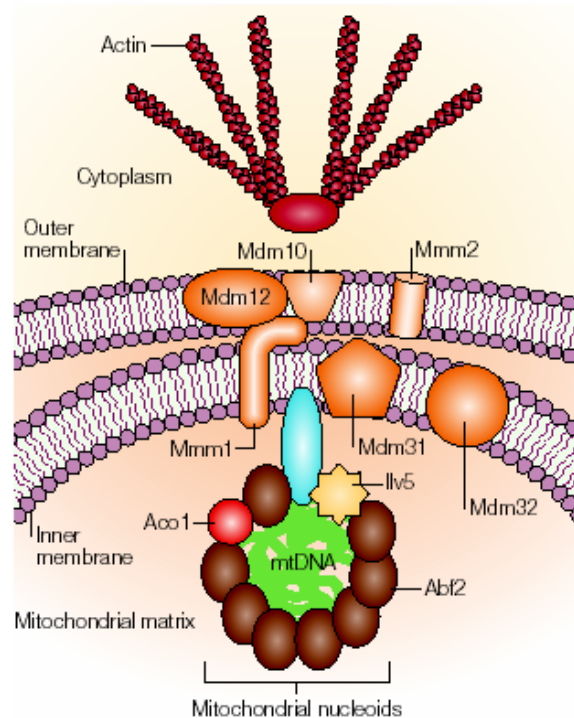
Κάθε μιτοχόνδριο περιβάλλεται από δύο μεμβράνες, οι οποίες έχουν διαφορετική σύσταση, επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες και δημιουργούν δύο ξεχωριστά μιτοχονδριακά διαμερίσματα: μεταξύ των δύο μεμβρανών ορίζεται ο διαμεμβρανικός χώρος, ενώ η εσωτερική μεμβράνη περικλείει τη μιτοχονδριακή μήτρα (matrix). Στην επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης και στη μήτρα επιτελούνται οι βασικές λειτουργίες του μιτοχονδρίου. Η εξωτερική μεμβράνη έχει



πάχος 7 nm και χαρακτηρίζεται από την παρουσία ευμεγεθών πόρων, οι οποίοι επιτρέπουν την είσοδο σε όλα τα μόρια μεγέθους ως και 5 kDa προς το διαμεμβρανικό χώρο. Τα μόρια αυτά που περιλαμβάνουν και μικρές πρωτεΐνες δεν μπορούν στην πλειοψηφία τους να εισχωρήσουν στη μήτρα. Η εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου έχει πάχος 5 nm και σχηματίζει πολύπλοκες αναδιπλώσεις, τις μιτοχονδριακές ακρολοφίες (cristae), οι οποίες αυξάνουν σε μεγάλο βαθμό την επιφάνειά της. Στις αναδιπλώσεις της εσωτερικής μεμβράνης εντοπίζονται διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση καθώς και το σύμπλοκο της ATP συνθετάσης. Στη μήτρα εντοπίζονται ένζυμα που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος, ενδομιτοχονδριακά κοκκία που αποτελούν θέσεις δέσμευσης δισθενών ιόντων (κυρίως  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$ ) και μιτοχονδριακά ριβοσώματα.

Στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων υπάρχουν μόρια μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), τα οποία είναι πακεταρισμένα μέσα σε δομές πρωτεϊνικής σύστασης, τα νουκλεοειδή (Σχήμα 1. 1). Τα νουκλεοειδή συνδέονται με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να προσδένονται, μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων, και με στοιχεία του κυτταροσκελετού (Chen and Butow 2005, Dimmer et al. 2005).

**Σχήμα 1. 1.** Σχηματική απεικόνιση νουκλεοειδούς που περικλείει το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Το νουκλεοειδές βρίσκεται σε επαφή με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω πρωτεϊνών, οι οποίες θεωρείται ότι επικοινωνούν με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. (Από Chen and Butow 2005).

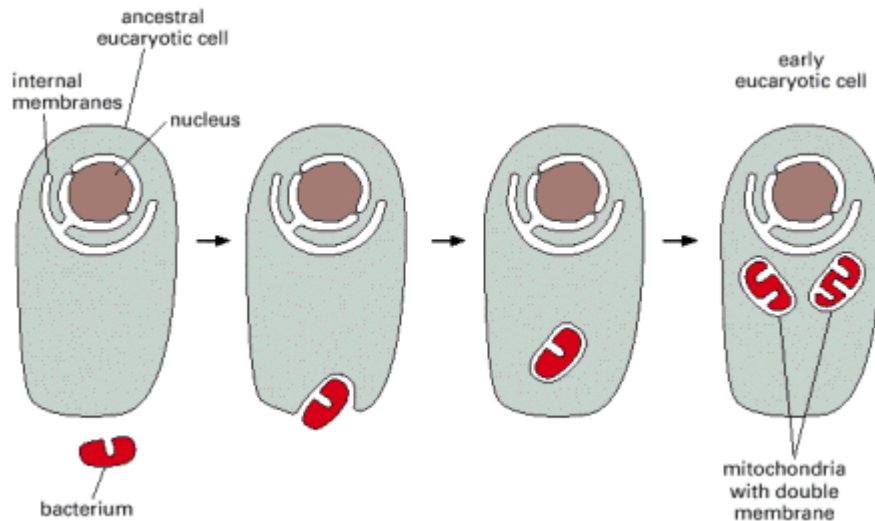


Οι βασικές λειτουργίες που επιτελούνται στα μιτοχόνδρια είναι η διάσπαση του πυροσταφυλικού και των λιπαρών οξέων για την παραγωγή CO<sub>2</sub> και NADH (ή FADH<sub>2</sub> - κύκλος Krebs) και η παραγωγή ενέργειας με τη μορφή του ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν επίσης στη διατήρηση της ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και στην παραγωγή θερμότητας (Alberts et al. 2002, Ballard and Whitlock 2004).

### 1. 1. 2. Η προέλευση των μιτοχονδρίων

Ο προκαρυωτικός χαρακτήρας των γενετικών συστημάτων των μιτοχονδρίων (βλ. § 1. 1. 3) οδήγησε στην πρόταση ότι τα μιτοχόνδρια εξελίχθηκαν από βακτήρια που εισέβαλαν σε ένα πρωτόγονο ευκαρυωτικό κύτταρο με ενδοκύττωση πριν από 2 δισεκατομμύρια χρόνια. Σύμφωνα με αυτήν την ενδοσυμβιωτική υπόθεση (Margulis 1970, 1991), τα ευκαρυωτικά κύτταρα που ήταν αρχικά αναερόβιοι οργανισμοί χωρίς μιτοχόνδρια κάποτε δημιούργησαν μία σταθερή ενδοσυμβιωτική σχέση με ένα απρωτεοβακτήριο (Σχήμα 1. 2), του οποίου το σύστημα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης χρησιμοποίησαν προς όφελός τους (Gray 1999, Andersson et al. 2003). Φαίνεται ότι η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων προήλθε από την πλασματική μεμβράνη του αρχέγονου βακτηρίου, ενώ η εξωτερική προέκυψε πιθανότατα από τη μεμβράνη του φαγοσώματος του κυττάρου ξενιστή. Καθώς η συμβιωτική σχέση διατηρήθηκε, ο προκαρυώτης απώλεσε πολλές από τις αρχικές λειτουργίες του. Μία αντανάκλαση αυτής της διαδικασίας είναι η μετακίνηση και η ενσωμάτωση πολλών γονιδίων του προκαρυώτη προς τον πυρήνα του ξενιστή.

Το ενδοσυμβιωτικό γεγονός που οδήγησε στην ανάπτυξη των μιτοχονδρίων θεωρείται ότι συνέβη πριν από το διαχωρισμό των ζώων από τα φυτά. Εντούτοις, δεν είναι ακόμα απόλυτα σαφές αν τα μιτοχόνδρια έχουν μονοφυλετική προέλευση. Τα σύγχρονα δεδομένα που προκύπτουν από τον προσδιορισμό και τη σύγκριση της πλήρους πρωτοδιάταξης μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων από διαφορετικές ομάδες οργανισμών συνηγορούν υπέρ της μονοφυλετικότητας των μιτοχονδρίων και ορίζουν ως κοντινότερους συγγενείς τους τα ενδοκυτταρικά παράσιτα που ανήκουν στα απρωτεοβακτήρια της τάξης των Rickettsiales (Lang et al. 1999, Gray 1999, Emelyanov 2001a, 2001b, Andersson et al 2003, Emelyanov 2003, Burger et al. 2003, Fitzpatrick et al. 2006).

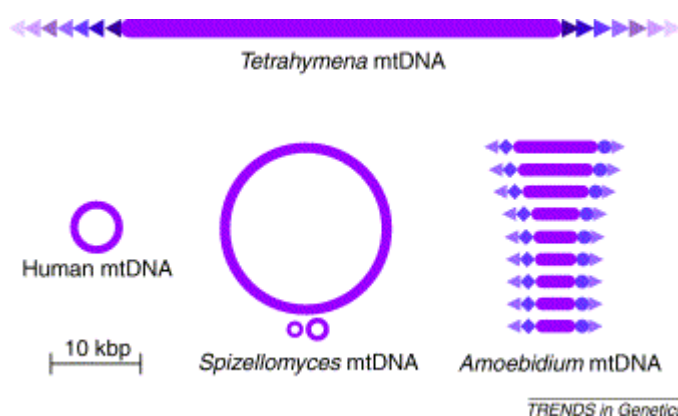


**Σχήμα 1. 2.** Σταδιακή ενσωμάτωση του  $\alpha$ -πρωτεοβακτηρίου στον προγονικό ευκαρυωτικό ξενιστή. Η συμβιωτική σχέση σταθεροποιήθηκε και οδήγησε στην εξέλιξη του βακτηρίου σε μιτοχόνδριο (Από Alberts et al. 2002).

### 1. 1. 3. Το μιτοχονδριακό DNA

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν ξεχωριστό γονιδίωμα, το οποίο προήλθε από ένα ενδοσυμβιωτικό προγονικό  $\alpha$ -πρωτεοβακτήριο (Burger et al. 2003). Εντούτοις, το γενετικό περιεχόμενο των μιτοχονδρίων αποτελεί ένα μικρό κλάσμα σε σχέση με το περιεχόμενο του υποτιθέμενου προγονικού βακτηριακού ενδοσυμβιώτη. Η συρρίκνωση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος αποτελεί γενική αρχή για όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποδίδεται σε δύο διαδικασίες. Η πρώτη αφορά στη βαθμιαία απώλεια γονιδίων που κωδικοποιούσαν για βιοσυνθετικές διεργασίες, οι οποίες πλέον μπορούσαν να καλυφθούν με την εισαγωγή μεταβολιτών από το κυτταρόπλασμα του ξενιστή και η δεύτερη αφορά στη μεταφορά και ενσωμάτωση γονιδίων από το μιτοχόνδριο προς τον πυρήνα του ξενιστή (Gray et al. 1999, Kurland and Andersson 2000, Schneider and Ebert 2004). Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) κωδικοποιεί τελικά έναν μικρό αριθμό πρωτεϊνών, των οποίων τα mRNAs μεταφράζονται από την πρωτεϊνική μηχανή του μιτοχονδρίου. Από τα συστατικά της τελευταίας, άλλα κωδικοποιούνται πάντοτε από το μιτοχονδριακό DNA, όπως συμβαίνει για τα ριβοσωμικά RNAs και τα tRNAs και άλλα κωδικοποιούνται από τον πυρήνα (ριβοσωμικές πρωτεΐνες).

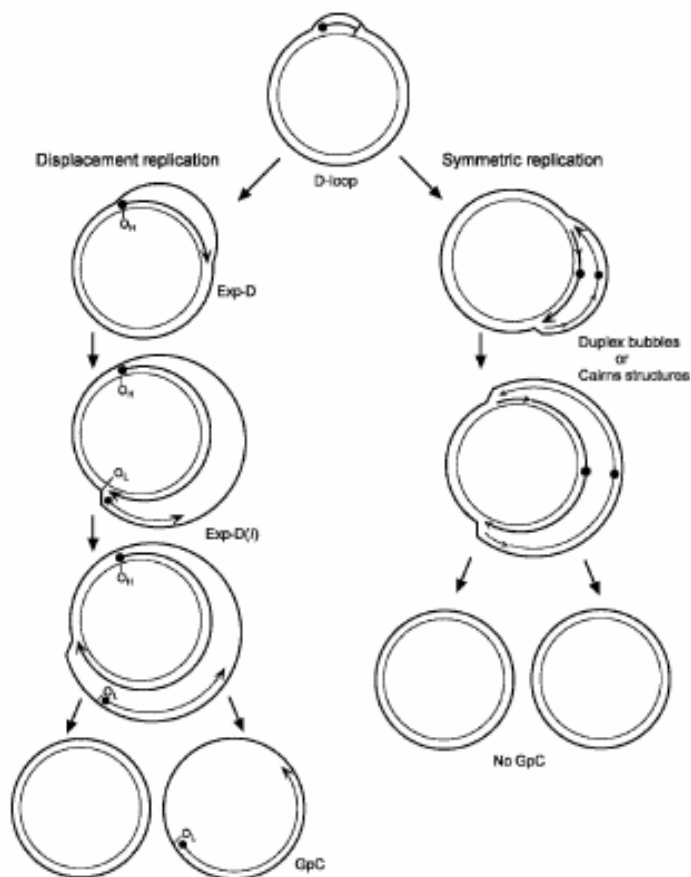
Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα εμφανίζουν πολλές παραλλαγές ως προς το μέγεθος, το περιεχόμενο, τη δομή και την αρχιτεκτονική τους μέσα στα διάφορα ευκαρυωτικά φύλα (Gray et al. 1999, Lang et al. 1999). Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 15 ως 60 kb, αν και υπάρχουν ακραίες περιπτώσεις όπως εκείνη του πρωτίστου *Plasmodium* sp. με μέγεθος μόνο 6 kb ή του ρυζιού (*Oryza sativa*), στο άλλο άκρο, με μέγεθος 490 kb. Ως προς το περιεχόμενο, υπάρχουν γονιδιώματα που κωδικοποιούν από 5 γονίδια μόνο (*Plasmodium*) μέχρι 100 (μαστιγωτά της οικογένειας Jakobidae), ενώ κατά μέσο όρο ο αριθμός των γονιδίων κυμαίνεται από 40 ως 50. Εσώνια και άλλες μη-κωδικές περιοχές απαντούν συχνά στα μιτοχονδριακά γονιδιώματα, τα οποία συνήθως αποτελούνται από ένα κυκλικό μόριο, αν και έχουν παρατηρηθεί πολλές «αρχιτεκτονικές» παραλλαγές που περιλαμβάνουν και ευθύγραμμα μόρια. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα μπορεί τέλος να μοιράζεται σε δύο ή περισσότερα κυκλικά ή ευθύγραμμα «χρωμοσώματα» ίδιου ή διαφορετικού μεγέθους (Σχήμα 1. 3., Burger et al. 2003).



**Σχήμα 1. 3.** Οι δομικές και «αρχιτεκτονικές» παραλλαγές του μιτοχονδριακού DNA των ευκαρυωτικών οργανισμών. (Από Burger et al. 2003).

Το μιτοχονδριακό DNA των μεταζώων δεν εμφανίζει τόσο μεγάλη ποικιλία στη δομή και στο μέγεθος, όσο των άλλων ευκαρυωτών. Πρόκειται για ένα κυκλικό μόριο μεγέθους 13-19 kb. Εξάιρεση, ως προς το μέγεθος αποτελεί το mtDNA του δίθυρου *Placoepecten magellanicus* που φτάνει τα 42 kb (La Roche et al. 1990), ενώ σε ό,τι αφορά στη δομή, ορισμένα Υδρόζωα (π.χ., *Hydra fusca*, *Hydra attenuate*), Σκυφόζωα (π.χ., *Cassiopea* sp.) και Κυβόζωα (π.χ., *Carybdea marsupialis*) περιέχουν ένα γραμμικό μόριο μεγέθους 16 kb ή δύο γραμμικά των 8 kb. Ένα τυπικό μόριο απαρτίζεται από 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές υπομονάδες, 2 που κωδικοποιούν τα ριβοσωμικά RNAs, 22 μεταφορικά RNAs (tRNA) και μία μη-

κωδική περιοχή. Στη μη-κωδική περιοχή εντοπίζονται στοιχεία που ρυθμίζουν την αντιγραφή και τη μεταγραφή και για το λόγο αυτό ονομάζεται περιοχή ελέγχου (control region – CR) ή D-loop (Wolstenholme 1992, Saccone et al. 1999).



**Σχήμα 1. 4.** Τα δύο μοντέλα που προτείνονται για την αντιγραφή του μιτοχondριακού DNA. Στην αριστερή στήλη παρουσιάζεται το μοντέλο της ασύμμετρης αντιγραφής, ενώ στη δεξιά το μοντέλο της σύγχρονης αντιγραφής. Και τα δύο μοντέλα συμφωνούν ως προς το σχηματισμό της χαρακτηριστικής δομής D – loop (Από Brown et al. 2005).

Οι δύο αλυσίδες του mtDNA διαφέρουν σε ό,τι αφορά στην περιεκτικότητά τους σε G και C, ώστε όταν αποδιαταχτούν και φυγοκεντρηθούν σε CsCl να εμφανίζονται σε δύο ζώνες, η μία βαρύτερη της άλλης. Η μία αλυσίδα είναι πλούσια σε γουανίνες και ονομάζεται H (heavy - βαριά) ενώ η άλλη είναι πλούσια σε κυτοσίνες και ονομάζεται L (light - ελαφριά) (Taanman 1999). Δύο είναι τα βασικά μοντέλα που έχουν προταθεί για τον τρόπο αντιγραφής του μιτοχondριακού DNA (Clayton 1982, 2003): η ασύμμετρη και η σύγχρονη αντιγραφή (Σχήμα 1. 4). Σύγχρονα πειραματικά δεδομένα συντείνουν στην άποψη ότι το επικρατέστερο είναι

αυτό της ασύμμετρης αντιγραφής. Σύμφωνα με το μοντέλο, οι δύο αλυσίδες H και L διαθέτουν διαφορετικά σημεία έναρξης. Η αντιγραφή αρχίζει από το σημείο έναρξης της H αλυσίδας (OH), η οποία αντιγράφεται εκτοπίζοντας την L. Η L αλυσίδα παραμένει σε μονόκλωνη κατάσταση μέχρι να αποκαλυφθεί το δικό της σημείο έναρξης (OL) οπότε και αρχίζει να αντιγράφεται (Brown et al. 2005).

#### 1. 1. 4. Η κληρονομία του μιτοχondριακού DNA

Τα μη πυρηνικά γονιδιώματα μεταβιβάζονται κατά κανόνα μέσω του ενός από τους δύο γονείς, πάντα του ίδιου φύλου, στις επόμενες γενιές. Ο γενικός κανόνας της μονογονεϊκής κληρονομίας των κυτταροπλασματικών γονιδιωμάτων καλύπτει τόσο το μιτοχondριακό όσο και το πλαστιδιακό (cp) DNA, αν και η καθολικότητά του τίθεται συχνά υπό αμφισβήτηση (Birky 2001, Korpelainen 2004). Οι βασικότερες εξαιρέσεις του κανόνα αφορούν σε είδη τα οποία αναπαράγονται κυρίως αφυλετικά (Xu et al. 2005). Στα μετάρζωα, το μιτοχondριακό DNA μεταβιβάζεται μητρικά (Avisé 1994, Birky 1995, 2001). Περιστασιακά, έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις κατά τις οποίες παρατηρείται περιορισμένη πατρική κληρονομία του μιτοχondριακού DNA, σε ασπόνδυλα και σε σπονδυλόζωα (Εντομα: *Drosophila melanogaster*: Kondo et al. 1992, Άνθρωπος: *Homo sapiens*: Schwartz and Vissing 2002, Bromham et al. 2003, Τρωκτικά: *Mus musculus*: Gyllensten et al. 1991, Shitara et al. 1998, Αρτιοδάκτυλα: *Bos taurus*: Steinborn et al. 1998, *Ovis aries*: Zhao et al. 2004, Οστεϊχθύες: *Engraulis encrasicolus*: Magoulas and Zouros 1993, Πτηνά: *Parus major*: Kvist et al. 2003, Lepidoptera: Lansman et al. 1983, Arunkumar et al. 2006, Hymenoptera: Meusel and Moritz 1993). Εντούτοις, οι περιπτώσεις αυτές ερμηνεύονται ως «διαρροές» του πατρικού μιτοχondριακού DNA (Korpelainen 2004). Η μόνη περίπτωση εκτεταμένης και συστηματικής πατρικής μεταβίβασης του μιτοχondριακού DNA στα μετάρζωα παρατηρείται σε ορισμένες οικογένειες δίθυρων, τα οποία διαθέτουν ένα ξεχωριστό σύστημα κληρονομίας γνωστό ως διπλή μονογονεϊκή κληρονομικότητα (ΔΜΚ, Κεφάλαιο 1. 2).

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η μονογονεϊκή κληρονομία εμφανίζουν σημαντική διαφοροποίηση μέσα στα διάφορα ευκαρυωτικά φύλα. Η μεταβίβαση των κυτταροπλασματικών γονιδιωμάτων του ενός από τους γονείς προς

τον απόγονό του μπορεί να διακοπεί σε οποιοδήποτε από τα στάδια της φυλετικής αναπαραγωγής:

1. Γαμετογένεση: τα οργανίδια είναι δυνατό να απομονωθούν από τους γαμέτες κατά τη διάρκεια των προ-μειωτικών ή των μειωτικών διαιρέσεων. Τα οργανίδια ή το γενετικό υλικό των οργανιδίων μπορεί να αποσυντεθεί ενώ βρίσκονται μέσα στο γαμέτη.
2. Γονιμοποίηση: το DNA των οργανιδίων αποβάλλεται πριν τη γονιμοποίηση ή δεν εισέρχεται στο αυγό.
3. Ανάπτυξη: τα οργανίδια ή το γενετικό τους υλικό απομακρύνονται επιλεκτικά μέσα στο ζυγωτό. Η απόρριψη των οργανιδίων προς έξω-εμβρυικούς ιστούς κατά τη διάρκεια των πρώτων αυλακώσεων μπορεί να είναι στοχαστική ή κατευθυνόμενη.

Οι διαδικασίες αυτές, όπως και παραλλαγές τους, έχουν παρατηρηθεί σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών, από τα πρώτιστα μέχρι τα ανώτερα φυτά και ζώα (Birky 1995, Birky 2001). Στα ανώτερα ζώα, σύγχρονες προσεγγίσεις υποστηρίζουν ότι τα μιτοχόνδρια του σπέρματος καταστρέφονται με ενεργό τρόπο λίγο μετά τη γονιμοποίηση μέσω διεργασιών που παρουσιάζουν υψηλή ειδικευση για κάθε είδος (Kaneda et al. 1995, Sutovsky et al. 2000, Nishimura et al. 2006).

Η μονογονεϊκή κληρονομία των κυτταροπλασματικών γονιδιωμάτων ερμηνεύεται εξελικτικά σαν ένας χαρακτήρας που ελέγχεται από τον πυρήνα και προστατεύει τα μη-πυρηνικά γονιδιώματα από τις αρνητικές επιδράσεις των εγωιστικών κυτταροπλασματικών παρασίτων (Grun 1976, Cosmides and Tooby 1981, Hoekstra 1990, Hastings 1992, Law and Hutson 1992, Hurst and Hamilton 1992). Η παραπάνω υπόθεση, προκειμένου να εξηγήσει τους λόγους που συνέβαλαν στην εγκαθίδρυση της μονογονεϊκής κληρονομίας, λαμβάνει υπόψη τις ιδιαιτερότητες που παρουσιάζουν τα οργανιδιακά γονιδιώματα, σε αντιπαράθεση με τα πυρηνικά. Τέτοιες ιδιαιτερότητες είναι ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων ανά κύτταρο, το δυσμενές για την ακεραιότητα του DNA περιβάλλον όπου τα μόρια αυτά λειτουργούν, η μικρή έως ελάχιστη επίδραση του ανασυνδυασμού, η φυσική επιλογή που συμβαίνει στο επίπεδο του κυττάρου και οι συνακόλουθες επιδράσεις της τυχαίας παρέκκλισης. Επιπλέον, σημειώνεται ότι η περιστασιακή, μικρής έκτασης αμιγονική κληρονομικότητα, η ετεροπλάσμια και ο ανασυνδυασμός μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των κυτταροπλασματικών συστημάτων μετριάζοντας τις αρνητικές συνέπειες της μονογονεϊκής κληρονομίας, βασικότερη από τις οποίες

είναι η ταχεία συσσώρευση δηλητηριωδών μεταλλαγών (Korpelainen 2004, Barr et al. 2005).

**Ετεροπλασμία:** Σε περιπτώσεις κατά τις οποίες οι μηχανισμοί που εξασφαλίζουν τη μονογονεϊκή κληρονόμηση παρακάμπτονται, όπως για παράδειγμα όταν συμβαίνουν δια-ειδικές διασταυρώσεις (Rokas et al. 2003), τότε παρατηρείται διαρροή κυτταροπλασματικού γενετικού υλικού και μικρής έκτασης αμφιγονική κληρονόμηση, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ετεροπλασμικών ατόμων, δηλαδή ατόμων που περιέχουν περισσότερους από έναν τύπους mtDNA. Ετεροπλασμία είναι δυνατό να προκύψει, επίσης, εξαιτίας μεταλλαγών που συμβαίνουν κατά την πορεία της ζωής ενός οργανισμού. Διακρίνεται σε ετεροπλασμία μεγέθους, όταν παρατηρούνται μόρια διαφορετικών μεγεθών και σε ετεροπλασμία αλληλουχίας, όταν παρουσιάζονται μόρια με διαφορετική νουκλεοτιδική σύσταση. Η ετεροπλασμία έχει ίσως σημαντικές εξελικτικές επιδράσεις, καθώς μπορεί να παρέχει προϋποθέσεις για τη δημιουργία νέων απλότυπων μέσω ανασυνδυασμού (Barr et al. 2005).

### 1. 1. 5. Ο ανασυνδυασμός του μιτοχονδριακού DNA

- *Γενικά στοιχεία για τον ανασυνδυασμό του DNA*

Ο ανασυνδυασμός (recombination) είναι η ανταλλαγή τμημάτων γενετικού υλικού μεταξύ δύο μορίων ή και δύο περιοχών του ίδιου μορίου DNA. Ως αποτέλεσμα, νέοι γενετικοί συνδυασμοί δημιουργούνται και συνεπώς αυξάνεται η γενετική ποικιλομορφία. Διακρίνονται δύο κατηγορίες ανασυνδυασμού του DNA: ο ομόλογος (homologous) και ο μη-ομόλογος (site-specific) ανασυνδυασμός.

#### A) Ομόλογος ανασυνδυασμός

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός συμβαίνει μεταξύ δύο ομόλογων μορίων DNA. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς τέτοιου είδους ανασυνδυασμός είναι αυτός που συμβαίνει κατά τη μείωση και ονομάζεται μειωτικός. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός χωρίζεται στον αμοιβαίο ανασυνδυασμό και στη γονιδιακή μετατροπή (gene conversion). Στην πρώτη περίπτωση τα δύο μόρια DNA που ανασυνδυάζονται ανταλλάσσουν περιοχές DNA με αποτέλεσμα τα θυγατρικά μόρια που προκύπτουν να περιέχουν τμήματα και από τα δύο πατρικά μόρια χωρίς να αλλάζει το μέγεθος



των μορίων. Αντίθετα στη γονιδιακή μετατροπή αλλάζει το περιεχόμενο του ενός από τα δύο μόρια DNA ενώ το άλλο παραμένει ανέπαφο.

### B) Μη-ομόλογος ανασυνδυασμός

Ο μη-ομόλογος (site-specific) ανασυνδυασμός συμβαίνει σε περιοχές DNA που εμφανίζουν μικρή ή δεν εμφανίζουν καμία ομοιότητα. Γενικά, ο μη-ομόλογος ανασυνδυασμός δεν αντιπροσωπεύει ένα μόνο και συγκεκριμένο μηχανισμό, αλλά μάλλον το αποτέλεσμα που προκύπτει από διάφορους μηχανισμούς. Το πρώτο παράδειγμα εντοπίστηκε κατά την ενσωμάτωση του DNA του φάγου λ και του DNA της *E. coli*. Και τα δύο μόρια περιέχουν μία αλληλουχία, 5'-TTTATAC-3', που καλείται περιοχή σύνδεσης (attachment site), η οποία επιτρέπει την πρόσδεση των δύο μορίων με ζευγάρι βάσεων. Στη συνέχεια, με τη συμβολή ενός ενζύμου (*integrase*), το φαγικό DNA ενσωματώνεται στο DNA του βακτηρίου.

Η μετατόπιση DNA (transpositional recombination) είναι ένας άλλος τύπος μη-ομόλογου ανασυνδυασμού κατά τον οποίο ένα μεταθετό στοιχείο μετακινείται μέσα στα χρωμοσώματα. Όπως και ο site-specific ανασυνδυασμός, η μετατόπιση DNA συμβαίνει χωρίς να υπάρχει απαραίτητα ομοιότητα ανάμεσα στα μόρια DNA (Lewin 1997).

#### • ***Ο ανασυνδυασμός του μιτοχονδριακού DNA***

Η ύπαρξη ομόλογου ανασυνδυασμού των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων αποτελεί πεδίο έντονης επιστημονικής διαμάχης τα τελευταία χρόνια. Η διαμάχη εντοπίζεται κυρίως στο μιτοχονδριακό DNA των μεταζώων, και ιδιαίτερα του ανθρώπου, καθώς στα υπόλοιπα ευκαρυωτικά βασίλεια (πρώτιστα, μύκητες και φυτά) η παρουσία του ανασυνδυασμού θεωρείται τεκμηριωμένη (Gray 1989, Toth et al. 1998, Jaramillo-Correa and Bousquet 2005, Manchekar et al. 2005). Η επίλυση του προβλήματος είναι βασικής σημασίας καθώς δύναται να συμβάλει ουσιαστικά στην κατανόηση και στην εξήγηση, όχι μόνο των φυλογενετικών σχέσεων των οργανισμών, αλλά και της γενετικής, της φυσιολογίας και της εξέλιξης των ίδιων των μιτοχονδρίων και των γονιδιωμάτων τους.

Στοιχεία για την παρουσία του ανασυνδυασμού του μιτοχονδριακού DNA έχουν αναφερθεί για πλήθος ζωικών ειδών, όπως είναι ο άνθρωπος (Awadalla et al. 1999, Kraytsberg et al. 2004, Zsurka et al. 2005), τα μυρικαστικά (Slate and Phua 2003, Tsaousis et al. 2004), τα ψάρια (Hoarau et al. 2002, Tsaousis et al. 2005), τα

αμφίβια, τα αμφίποδα, τα τρωκτικά (Ladoukakis and Zouros 2001b), τα δίθυρα (Ladoukakis and Zouros 2001a, Passamonti and Scali 2003), οι νηματώδεις (Lunt and Hyman 1997) τα έντομα (Dowton et al. 2003, Tsaousis et al. 2005) και οι σκορπιοί (Gantenbein et al. 2004). Αν και τα δεδομένα είναι πολυάριθμα, εντούτοις δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμα οι πληθυσμιακές διαστάσεις του φαινομένου, ούτε η συχνότητα εμφάνισής του. Μελέτες σε θηλαστικά προτείνουν ότι το φαινόμενο είναι εξαιρετικά σπάνιο, σε τέτοιο βαθμό, ώστε να μην απαιτείται αναθεώρηση των συμπερασμάτων που είχαν εξαχθεί σχετικά με την εξέλιξη της συγκεκριμένης ομοταξίας μη λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξή του (Sato et al. 2005). Επιπλέον, υπάρχει σε ορισμένες περιπτώσεις προβληματισμός για το κατά πόσο οι ανασυνδυασμένες αλληλουχίες είναι πραγματικές, ή αποτελούν παραπροϊόντα των τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή τους (Piganeau et al. 2004).

Από μία άλλη σκοπιά, προσεγγίσεις που επιχειρούν την ανίχνευση ενζυμικών μηχανισμών επιδιόρθωσης του μιτοχονδριακού DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Recombinational Repair - RER) ίσως συμβάλλουν στην πιο ολοκληρωμένη κατανόηση του προβλήματος. *In vitro* πειράματα προτείνουν ότι τα μιτοχόνδρια των θηλαστικών εμφανίζουν ενεργότητα επιδιόρθωσης του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού και χαρακτηριστικές δομές Holiday (Thyagarajan et al. 1996, Kajander et al. 2001). Η παρουσία ανασυνδυασμού ενισχύεται περαιτέρω με την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και έχουν την ικανότητα να προσδένονται με ειδικό τρόπο στα άκρα δίκλωνων μορίων DNA (Coffey et al. 1999, Cullinane et al. 2000).

### **1. 1. 6. Η χρήση του mtDNA στην πληθυσμιακή και εξελικτική βιολογία**

Το μιτοχονδριακό DNA χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη μελέτη της πληθυσμιακής βιολογίας και της εξέλιξης των οργανισμών (κυρίως των μεταζώων). Οι κυριότερες ιδιότητές του που το καθιστούν κατάλληλο για τέτοιου είδους μελέτες είναι οι ακόλουθες:

α) Το μιτοχονδριακό DNA εξελίσσεται ταχύτερα από το πυρηνικό DNA. Υπολογίζεται ότι εμφανίζει 5 -10 φορές μεγαλύτερο εξελικτικό ρυθμό σε σχέση με το πυρηνικό γονιδίωμα, κυρίως διότι τα μιτοχόνδρια δεν διαθέτουν επαρκείς ενζυμικούς μηχανισμούς για την επιδιόρθωση μεταλλαγών που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή

ή έπειτα από την προσβολή του μορίου από τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Brown et al. 1979, Clayton 1982). Σαν αποτέλεσμα, δημιουργούνται πολυμορφισμοί με τέτοιο ρυθμό ώστε να είναι δυνατή η εξαγωγή φυλογενετικών συμπερασμάτων σε διαειδικό ή ακόμα και διαπληθυσμιακό επίπεδο (Templeton 1983, Avise 1994).

β) Η κληρονομηση του mtDNA είναι κατά κανόνα μονογονεϊκή (§ 1. 1. 4), γεγονός που καθιστά ευκολότερη την ανίχνευση και την εδραίωση των σχέσεων δύο μορίων ανατρέχοντας στο παρελθόν, χωρίς την παρεμβολή άλλων εξελικτικών γραμμών.

γ) Τα μόρια του mtDNA φαίνεται ότι ανασυνδυάζονται με πολύ μικρή συχνότητα (§ 1. 1. 5) και συνεπώς, έχουν ενιαία εξελικτική ιστορία σε όλο το μήκος τους. Από τη στιγμή που η κύρια διαδικασία δημιουργίας πολυμορφισμών είναι η μεταλλαγή, τότε γίνεται ασφαλέστερη και η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την εξελικτική ιστορία δύο αλληλουχιών μελετώντας τις διαφορές τους. Ωστόσο, εκφράζεται πλέον η πεποίθηση ότι, σε κάποιες περιπτώσεις, η επίδραση του ανασυνδυασμού μπορεί να είναι σημαντική (Barr et al. 2005), με αποτέλεσμα να απαιτείται προσοχή κατά τη χρήση αλληλουχιών mtDNA στη φυλογένεση.

δ) Το mtDNA θεωρείται ότι μεταλλάσσεται με σταθερό ρυθμό. Το γνώρισμα αυτό επιτρέπει την εξακρίβωση του απόλυτου χρόνου διάσχισης δύο μιτοχονδριακών γενεαλογικών γραμμών. Η μεθοδολογία που ακολουθείται συνήθως αφορά στη μέτρηση του ρυθμού μεταλλαγής του mtDNA και στην ταυτόχρονη εκτίμηση του χρόνου διάσχισης δύο ομάδων οργανισμών με βάση ιστορικά δεδομένα (π. χ. απολιθώματα). Τελικά, η προβολή των διαφορών των mtDNA αλληλουχιών στο χρόνο επιτρέπει την εκτίμηση του απόλυτου χρόνου διάσχισής τους (μοριακό ρολόι).

ε) Το mtDNA είναι αυτόνομο μόριο, υπάρχει σε πολλά αντίγραφα σε κάθε κύτταρο και μπορεί σχετικά εύκολα να απομονωθεί από το πυρηνικό DNA και να μελετηθεί ανεξάρτητα. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυσή του (π. χ. PCR – RFLP) είναι απλές και χωρίς μεγάλο κόστος και χαρακτηρίζονται από μεγάλη επαναληψιμότητα.

## 1. 2. Η Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα του μιτοχονδριακού DNA

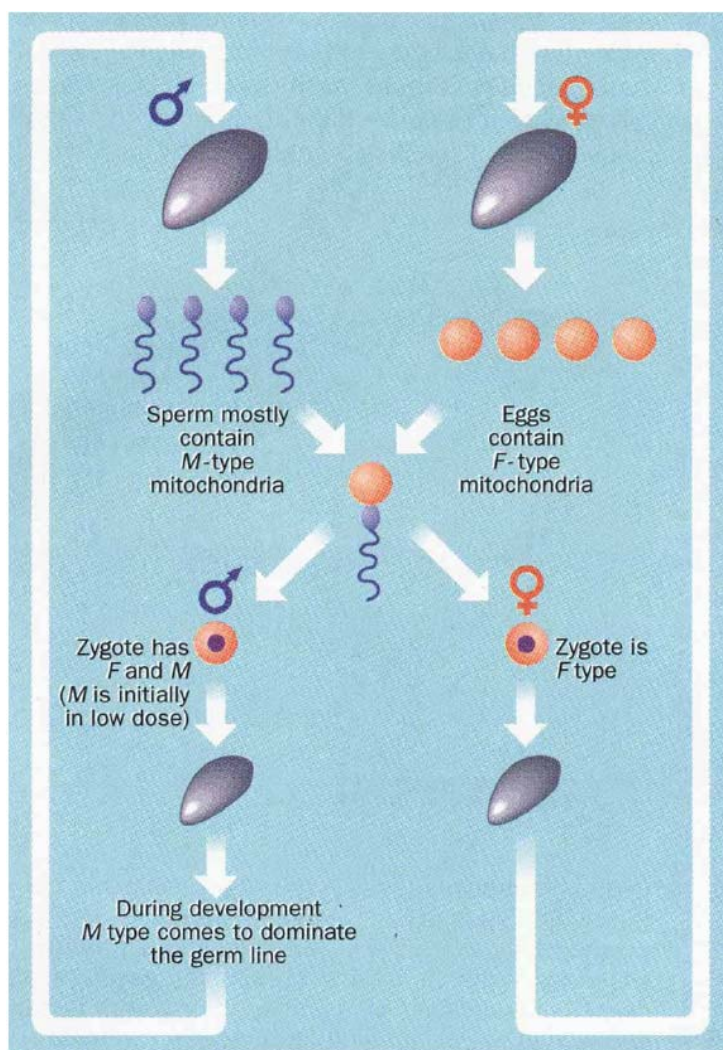
Μία σημαντική απόκλιση από τον κανόνα της μονογονεϊκής κληρονομιάς του μιτοχονδριακού DNA παρατηρείται σε ορισμένα δίθυρα που ανήκουν στις οικογένειες Mytilidae (Skibinski et al. 1994a, b, Zouros et al. 1994a, b, Beagley et al. 1997, Lee and O’Foighil 2004), Veneridae (Passamonti and Scali 2001), Unionidae (Liu et al. 1996, Hoeh et al. 2002, Curole and Kocher 2002) Hyriidae και Margaritiferidae (Hoeh et al. 2002). Τα συγκεκριμένα δίθυρα μεταβιβάζουν δύο ξεχωριστά μιτοχονδριακά γονιδιώματα στους απογόνους τους. Το πρώτο μεταβιβάζεται μέσω των θηλυκών γαμετών προς τους απογόνους και των δύο φύλων και συμβολίζεται σαν τύπος F. Το δεύτερο μεταβιβάζεται μέσω του σπέρματος, μόνο στους αρσενικούς απογόνους και συμβολίζεται ως τύπος M. Το φαινόμενο εντοπίστηκε αρχικά στα μύδια της οικογένειας Mytilidae και είναι γνωστό με τον όρο Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα (ΔΜΚ – Doubly Uniparental Inheritance: DUI, Zouros et al. 1994a).

### 1. 2. 1. Τα βασικά χαρακτηριστικά του συστήματος της ΔΜΚ

Μία φυλογεωγραφική μελέτη σε μύδια που ανήκουν στο είδος *Mytilus edulis* ανέδειξε εκτεταμένη ετεροπλασμία για το μιτοχονδριακό τους DNA. Όπως προέκυψε από την ανάλυση ολόκληρου του μορίου με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, επρόκειτο για ετεροπλασμία που συσχετιζόταν με το φύλο των ατόμων και αφορούσε στην παρουσία δύο διαφορετικών γονιδιωμάτων τα οποία ονομάστηκαν F και M (Fisher and Skibinski 1990). Η γενετική απόσταση μεταξύ των δύο τύπων προσδιορίστηκε στο 20%, τιμή τόσο μεγάλη που δεν ήταν δυνατό να εξηγηθεί μέσω της συσσώρευσης μεταλλαγών σε κάθε άτομο. Σαν πιθανότερο ενδεχόμενο προτάθηκε η αμφιγονική κληρονομιά του μιτοχονδριακού DNA του μυδιού (Hoeh et al. 1991).

Λεπτομερέστερα πειράματα που περιλάμβαναν τη μελέτη τμημάτων mtDNA από διαφορετικούς ιστούς μυδιών (Skibinski et al. 1994a,b) και διασταυρώσεις στο εργαστήριο (Zouros et al. 1994a, b) αποκάλυψαν ότι τα θηλυκά μεταβιβάζουν ένα

μιτοχονδριακό γονιδίωμα προς όλους τους απογόνους τους. Το γονιδίωμα αυτό ονομάστηκε F. Η ιδιαιτερότητα του συγκεκριμένου συστήματος έγκειται στο ότι και τα αρσενικά μύδια μεταβιβάζουν ένα δεύτερο γονιδίωμα (ονομάστηκε M) προς τους αρσενικούς τους απογόνους και μόνο. Κατά συνέπεια, τα θηλυκά άτομα εμφανίζονται ομοπλάσμικά για τον τύπο F, ενώ τα αρσενικά άτομα είναι ετεροπλάσμικά, καθώς περιέχουν και τους δύο τύπους (Σχήμα 1. 5). Ο τύπος F κυριαρχεί στους σωματικούς ιστούς και ο τύπος M εντοπίζεται στις αρσενικές γονάδες (Garrido-Ramos et al. 1998).



**Σχήμα 1. 5.** Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα του mtDNA στα μύδια. Τα θηλυκά άτομα, τα οποία σε αντίθεση με τα αρσενικά εμφανίζονται ομοπλάσμικά, μεταβιβάζουν το mtDNA τους (τύπου F) σε όλους τους απογόνους τους ανεξαρτήτως φύλου. Τα αρσενικά άτομα περιέχουν, εκτός από το mtDNA που κληρονόμησαν από τη μητέρα τους (τύπος F), το mtDNA που κληρονόμησαν από τον πατέρα τους (τύπος M) το οποίο μεταβιβάζουν μόνο στους αρσενικούς τους απογόνους. (Από Hurst and Hoekstra 1994).

Η ΔΜΚ δεν παραβιάζει τον κανόνα της μονογονεϊκής κληρονομιάς των κυτταροπλασματικών γονιδιωμάτων. Αντίθετα, δημιουργεί, μέσα στο είδος, δύο ανεξάρτητες εξελικτικές γραμμές mtDNA που θεωρητικά δεν αναμιγνύονται (Hurst and Hoekstra 1994).

### 1. 2. 2. Η εξάπλωση του συστήματος της ΔΜΚ

Η παρουσία της ΔΜΚ έχει επιβεβαιωθεί και σε άλλα είδη της οικογένειας Mytilidae - *M. galloprovincialis* (Rawson and Hilbish 1995), *M. trossulus* (Geller et al. 1993, Rawson and Hilbish 1995), *M. californianus* (Geller et al. 1993), *Geukensia demissa* (Hoeh et al. 1996), *Brachidontes exustus* (Lee & O' Foighil 2004) – καθώς επίσης και σε άλλες οικογένειες δίθυρων μαλακίων, όπως είναι τα Unionidae (Hoeh et al. 1996, Liu et al. 1996, Hoeh et al. 2002, Curole and Kocher 2002, Chakrabarti et al. 2006), τα Hyriidae, τα Margaritiferidae (Hoeh et al. 2002) και τα Veneridae (Passamonti and Scali 2001). Ωστόσο, το φαινόμενο δεν έχει παρατηρηθεί σε άλλες ομάδες οργανισμών έξω από τα δίθυρα.

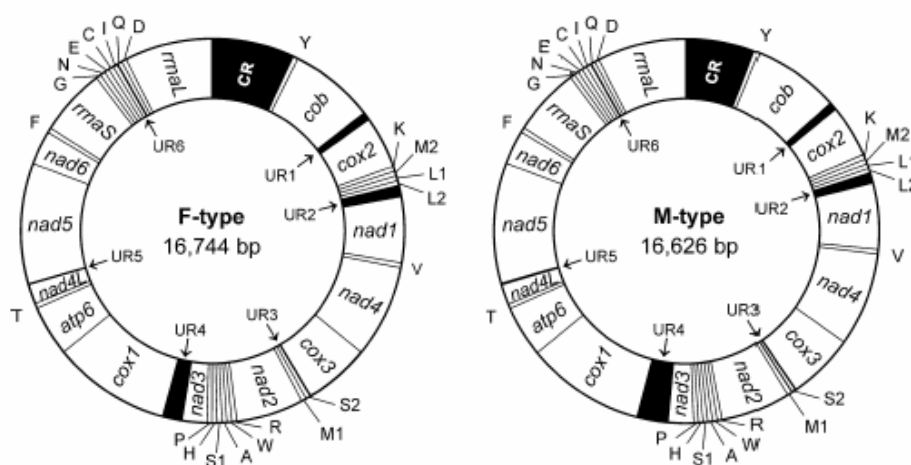
Η εξάπλωση της ΔΜΚ μέσα στα δίθυρα γεννά δύο βασικές υποθέσεις που αφορούν στην εξελικτική ιστορία του φαινομένου. Η πρώτη δέχεται ότι η ΔΜΚ είχε πολλαπλές και ανεξάρτητες εμφανίσεις κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των δίθυρων, ενώ η δεύτερη, και πιο φειδωλή, ορίζει ότι το φαινόμενο «ανακαλύφτηκε» μία μόνο φορά στα αρχέγονα δίθυρα και διατηρήθηκε ή εξαλείφθηκε δευτερογενώς μέσα στις διαφορετικές εξελισσόμενες οικογένειες και είδη. Η υπόθεση των ανεξάρτητων εμφανίσεων προβλέπει ότι αν τοποθετηθούν τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των ειδών που φέρουν τη ΔΜΚ σε ένα φυλογενετικό δέντρο, τότε αυτά θα ομαδοποιηθούν σύμφωνα με το είδος από το οποίο προέρχονται και όχι σύμφωνα με τον τρόπο με τον οποίο κληρονομούνται (αν είναι δηλαδή Μ ή F τύπου). Αντίθετα, σύμφωνα με την υπόθεση της μοναδικής εμφάνισης, τα γονιδιώματα θα ομαδοποιηθούν σύμφωνα με τον τρόπο κληρονομιάς τους (δηλαδή όλα τα F γονιδιώματα θα τοποθετηθούν στον ίδιο κλάδο, και σε έναν άλλο κλάδο θα τοποθετηθούν όλα τα Μ).

Οι παραπάνω υποθέσεις ελέγχθηκαν με την ανάλυση ομόλογων τμημάτων mtDNA από διάφορα είδη με ΔΜΚ. Τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά καθώς η φυλογενετική ανάλυση των μορίων F και Μ υποδείκνυε ότι μέσα στο γένος *Mytilus* η

ΔΜΚ εμφανιζόταν μία φορά (Stewart et al. 1995), ενώ όταν συμπεριλήφθηκαν και αλληλουχίες από άλλες οικογένειες, η ΔΜΚ φαινόταν να έχει ανακαλυφθεί πολλές φορές μέσα στα δίθυρα (Hoeh et al. 1996). Ωστόσο, η εξήγηση των πολλαπλών εμφανίσεων τέθηκε υπό αμφισβήτηση, ιδιαίτερα μετά τη διατύπωση της υπόθεσης ότι τα μόρια τύπου F, σε κάποιες περιπτώσεις, αντικαθιστούν τα Μ στην πατρική γραμμή κληρονομιάς (υπόθεση της «αρρενοποίησης», §. 1. 2. 7).

### 1. 2. 3. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα του μυδιού

Η πρωτοδιάταξη των F και M γονιδιωμάτων του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* έχει προσδιοριστεί πλήρως (Mizi et al. 2005). Είναι επίσης γνωστές οι πλήρεις μιτοχονδριακές αλληλουχίες των μητρικών και πατρικών μορίων από τα είδη *M. edulis* (Boore et al. 2004, Breton et al. 2006), *Venerupis philippinarum* (Passamonti and Scali 2003) και του μυδιού των γλυκών νερών *Inversidens japonensis* (GenBank: AB055625, τύπος F και AB055624, τύπος M).



**Σχήμα 1. 6.** Τα δύο μιτοχονδριακά γονιδιώματα, F και M, του μυδιού *M. galloprovincialis*. Η δομή των μορίων και η διάταξη των γονιδίων τους αποτελούν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των δύο τύπων (Από Mizi et al. 2005).

Τα μόρια F και M του *M. galloprovincialis* και *M. edulis* είναι κυκλικά και περιέχουν τον ίδιο αριθμό γονιδίων και εμφανίζουν όμοια διάταξη και αρχιτεκτονική (Σχήμα 1. 6). Δεν περιέχουν αλληλεπικαλυπτόμενες κωδικές περιοχές, ενώ όλα τα γονίδια κωδικοποιούνται από την ίδια αλυσίδα, γνώρισμα σχετικά σπάνιο στα

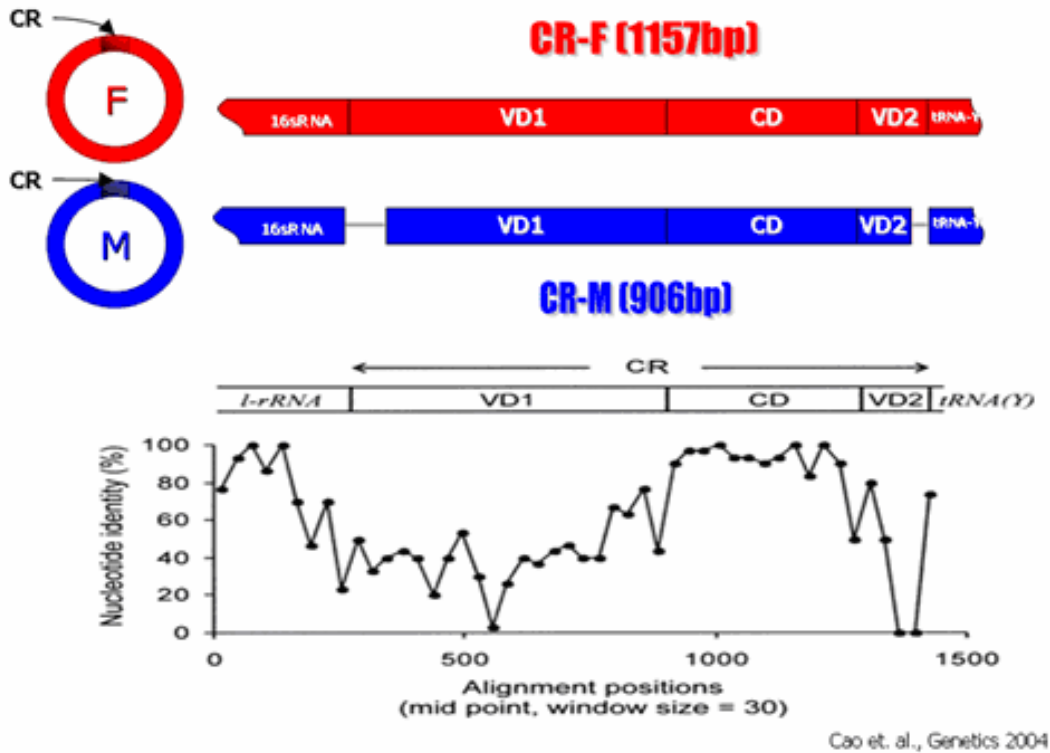
μετάζωα. Επιπρόσθετα, σε σχέση με τα μιτοχονδριακά DNA των μεταζώων, στερούνται του γονιδίου *ATPaseδ* ενώ περιέχουν ένα επιπλέον tRNA της μεθειονίνης. Υπάρχουν επτά μη κωδικές περιοχές με μέγεθος μεγαλύτερο των 10 bp στο mtDNA του μυδιού. Η μεγαλύτερη από αυτές είναι η περιοχή ελέγχου (control region – CR, Κεφ. 1. 2. 4). Η μέση νουκλεοτιδική απόσταση μεταξύ του F και M τύπου του *M. galloprovincialis* προσδιορίζεται στο 20%. Η απόσταση αυτή είναι η μικρότερη σε σχέση με τις αντίστοιχες αποστάσεις άλλων ειδών που εμφανίζουν τη ΔΜΚ. Χαρακτηριστικά, στο μύδι των γλυκών νερών *Inversidens japonensis* η απόσταση F-M φτάνει το 45%, καθώς επίσης παρατηρείται διαφορετική διάταξη των γονιδίων πάνω στα F και M μόρια.

#### 1. 2. 4. Η περιοχή ελέγχου (CR) του mtDNA του μυδιού

Τα μητρικά και πατρικά μόρια των αδελφών ειδών *M. galloprovincialis* - *M. edulis* περιέχουν μία μεγάλη μη-κωδική περιοχή μεταξύ των γονιδίων *lrRNA* και *tRNA<sup>Tyr</sup>* (ή *tRNA-Y*). Πρόσφατα προτάθηκε ότι η περιοχή αυτή αποτελεί την κύρια περιοχή ελέγχου (ή ρυθμιστική περιοχή, CR) του mtDNA του μυδιού, καθώς περιέχει στοιχεία και μοτίβα που είναι εξαιρετικά όμοια με εκείνα της περιοχής ελέγχου του mtDNA των θηλαστικών, για τα οποία είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την αντιγραφή και τη μεταγραφή (Cao et al. 2004b).

Το CR του μυδιού διαφέρει σε μέγεθος ανάμεσα στα M και στα F μόρια, με το CR-F να είναι μεγαλύτερο από το CR-M κατά 150 bp περίπου. Έχει τριμερή δομή, όπως και το CR των θηλαστικών (Σχήμα 1. 7). Το πρώτο τμήμα αποτελεί την πιο διαφοροποιημένη περιοχή του μορίου ανάμεσα στους δύο τύπους και καλείται μεταβλητή περιοχή 1 (Variable Domain 1 – VD1, κατά αντιστοιχία με το HVS1 του mtDNA του ανθρώπου). Η δεύτερη περιοχή, η οποία είναι και η λιγότερο διαφοροποιημένη σε όλο το μόριο, καλείται συντηρημένη περιοχή (Conserved Domain – CD). Τέλος, το CR ολοκληρώνεται με μία αρκετά διαφοροποιημένη τρίτη περιοχή που καλείται μεταβλητή περιοχή 2 (Variable Domain 2 – VD2).





**Σχήμα 1. 7.** Η περιοχή ελέγχου (CR) των δύο μιτοχondριακών γονιδιωμάτων των συγγενικών ειδών *M. galloprovincialis* και *M. edulis*. Α. Η δομή του CR με τις επιμέρους περιοχές του. Β. Οι νουκλεοτιδικές ομοιότητες μεταξύ των μορίων F και M κατά μήκος του CR (Από Cao et al. 2004b).

### 1. 2. 5. Ιδιαιτερότητες και μηχανισμοί της ΔΜΚ

Το σύστημα της ΔΜΚ έχει μελετηθεί εκτενέστερα στα μύδια του γένους *Mytilus*, αναδεικνύοντας σημαντικές πτυχές που πιθανότατα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην κατανόηση του μηχανισμού της. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό αν οι παρατηρήσεις που παρατίθενται παρακάτω γενικεύονται σε όλα τα είδη που εμφανίζουν τον συγκεκριμένο τρόπο κληρονομής του mtDNA και αν έχουν καθολική ισχύ.

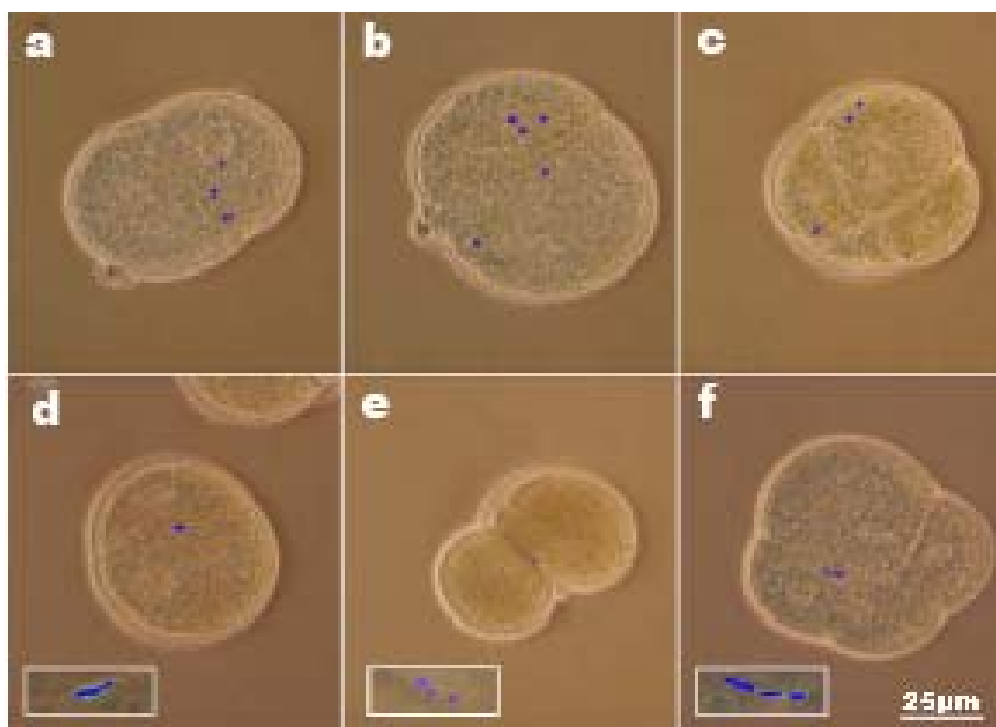
Α) Στο *Mytilus*, η ΔΜΚ φάνηκε να σχετίζεται με τον καθορισμό του φύλου. Από πειράματα διασταυρώσεων στο είδος *M. galloprovincialis* διαπιστώθηκε ότι το φύλο των απογόνων κάθε διασταύρωσης εξαρτιόταν από τα θηλυκά άτομα, ενώ οι αρσενικοί γονείς δεν ασκούσαν καμία επίδραση. Υπήρχαν τριών ειδών θηλυκά: εκείνα που παρήγαγαν σχεδόν μόνο αρσενικά, εκείνα που παρήγαγαν μόνο θηλυκά,

καθώς και άλλα που παρήγαγαν απογόνους σε ίσες αναλογίες φύλου (Saavedra et al. 1997).

B) Η πιστότητα και η σταθερότητα της ΔΜΚ εξαρτάται άμεσα από την κατανομή των μητρικών και των πατρικών γονιδιωμάτων στους ιστούς των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων και από την αυστηρή μεταβίβαση των γονιδιωμάτων αυτών μέσω των αυγών και του σπέρματος. Τα παραπάνω ζητήματα δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως, και επιπλέον, υπάρχουν παρατηρήσεις που αμφισβητούν την αυστηρότητα του συστήματος. Μερικές από αυτές προτείνουν ότι γονιδιώματα Μ τύπου εντοπίζονται σε σωματικούς ιστούς αρσενικών και θηλυκών ατόμων (Stewart et al. 1995, Garrido-Ramos et al. 1998, Dalziel and Stewart 2002), όπως επίσης και σε αυγά (Obata and Komaru 2005). Επιπροσθέτως, υπάρχουν εργασίες που αναφέρουν παρουσία μορίων τύπου F σε σπερματοζώαρια (Skibinski et al. 1994, Saavedra et al. 1997, Beagley et al. 1997). Ωστόσο, οι παραπάνω αναφορές υστερούν σε ορισμένα σημεία, όπως είναι η πιθανή παρουσία μολύνσεων μεταξύ των ιστών που χρησιμοποιούνται ως πηγή DNA για ευαίσθητες αντιδράσεις PCR ή η παρουσία ανασυνδυασμένων ή αρρενοποιημένων μορίων (βλ. Κεφ. 1. 2. 7) που μπορεί να προκαλέσει παρερμηνείες και λάθη. Σχετικά με τα παραπάνω, πρόσφατη μελέτη που διερεύνησε την παρουσία του μορίου F σε καθαρό σπέρμα κατέδειξε ότι το μόριο F παύει να ανιχνεύεται όταν το σπέρμα διοχετευτεί μέσα από διάλυμα Percoll, γεγονός που αντικρούει τις προγενέστερες παρατηρήσεις και προτείνει τη διασφάλιση της σταθερότητας των μηχανισμών της ΔΜΚ (Venetis et al. 2006).

Γ) Οι μηχανισμοί της ΔΜΚ έχουν διαλευκανθεί περαιτέρω από μικροσκοπικές παρατηρήσεις σε σημασμένα - με mitotracker green ή blue - μιτοχόνδρια του σπέρματος μυδίων *M. edulis*. Οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η τύχη των μιτοχονδρίων του σπέρματος εξαρτάται από το αν τα ωάρια προέρχονταν από θηλεοτόκες ή αρρενοτόκες μητέρες (Cao et al. 2004a, Cogswell et al. 2006). Στα αναπτυσσόμενα έμβρυα της πρώτης κατηγορίας, τα 5 ή 6 σπερματικά μιτοχόνδρια διασπείρονται παθητικά, χωρίς να ακολουθούν συγκεκριμένο πρότυπο, μέσα σε μία δεξαμενή που αποτελείται από πολυάριθμα μητρικά μιτοχόνδρια και πιθανότατα «εξαφανίζονται» με στοχαστικό τρόπο καθώς το θηλυκό άτομο αναπτύσσεται (Σχήμα 1. 8). Με βάση αυτόν το μηχανισμό, είναι θεωρητικά δυνατό να εντοπιστούν, περιστασιακά, μόρια Μ σε ιστούς θηλυκών ατόμων – πιθανώς ακόμη και στα γαμετικά κύτταρα - με ευαίσθητες αντιδράσεις PCR. Στα έμβρυα των αρρενοτόκων θηλυκών που βρίσκονται στο στάδιο των δύο ή των τεσσάρων κυττάρων, σχεδόν όλα

τα σπερματικά μιτοχόνδρια εντοπίζονται συσπειρωμένα σε μία θέση, στο μεγαλύτερο κύτταρο. Το κύτταρο αυτό, που καλείται «CD», είναι εκείνο που θα δημιουργήσει μεταξύ άλλων και τη γαμετική σειρά σε επόμενα αναπτυξιακά στάδια (Verdonk and Van Den Biggelaar 1983). Η κατευθυνόμενη τοποθέτηση των σπερματικών μιτοχονδρίων στην αρσενική γονάδα και η επακόλουθη εξάλειψη των μορίων F από το σπέρμα (μέσω διαδικασιών που παραμένουν ακόμα άγνωστες) αρκούν ώστε να διατηρηθεί η σταθερότητα της ΔΜΚ.



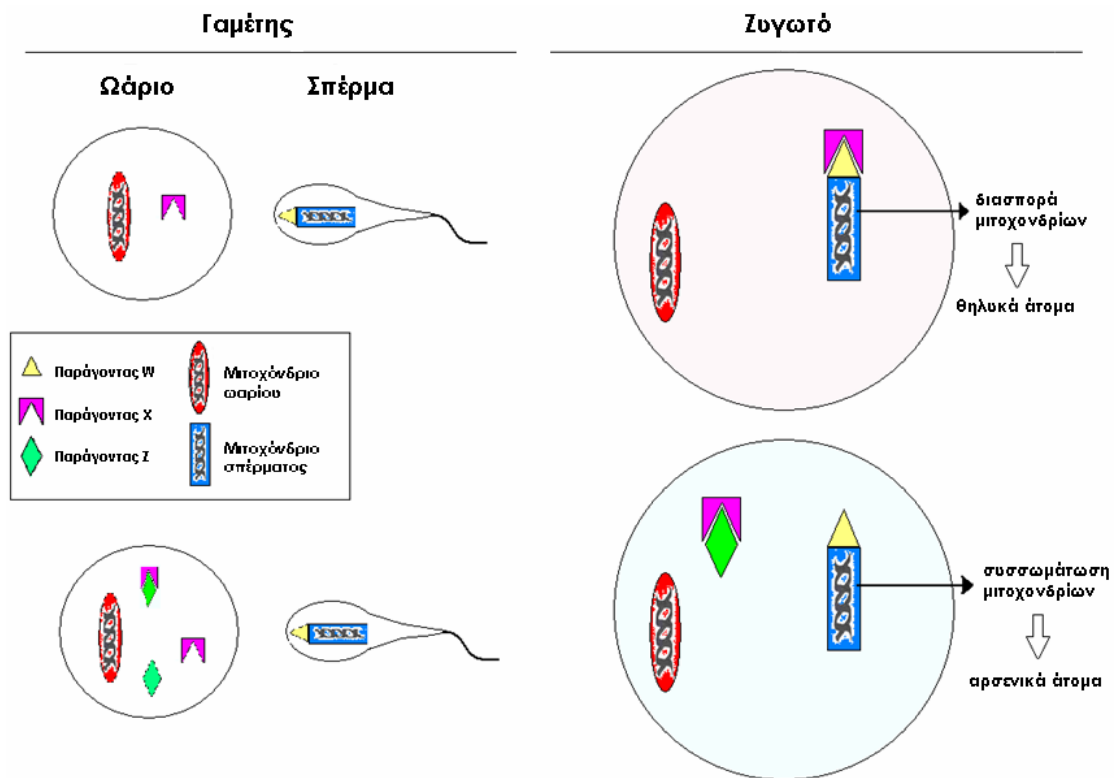
**Σχήμα 1. 8.** Η κατανομή των σπερματικών μιτοχονδρίων στους ιστούς του μυδιού *M. edulis* εξαρτάται από το φύλο του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Μπλε στίγματα: σημασμένα με mitotracker μιτοχόνδρια του σπέρματος. a, b, c: θηλυκό έμβρυο στο στάδιο των 1, 2 και 4 κυττάρων, αντίστοιχα. d, e, f: αρσενικό έμβρυο στο στάδιο των 1, 2 και 4 κυττάρων, αντίστοιχα. (Τροποποιημένο από Cogswell et al. 2006).

### 1. 2. 6. Η υπόθεση εργασίας για το μηχανισμό της ΔΜΚ

Με βάση όλες τις παρατηρήσεις προτάθηκε ένα γενικό μοντέλο για το μηχανισμό της ΔΜΚ (Zouros 2000, Σχήμα 1. 9). Το μοντέλο προϋποθέτει την ύπαρξη τριών παραγόντων (X, W και Z) που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα. Ο παράγοντας X εκφράζεται στην αρσενική γονάδα, εφοδιάζοντας τα σπερματικά

μιτοχόνδρια με μία ουσία που επιτρέπει την αναγνώρισή τους από το ωάριο. Ο παράγοντας W εκφράζεται στα ωάρια και αλληλεπιδρά με τον παράγοντα X, οδηγώντας τα σπερματικά μιτοχόνδρια σε αποσύνθεση. Οι δύο αυτοί παράγοντες πρέπει να υπάρχουν σε όλους τους οργανισμούς, ώστε να εξασφαλίζεται η μονογονεϊκή κληρονομιά του mtDNA.

Η καινοτομία στους οργανισμούς με ΔΜΚ αφορά στην «ανακάλυψη» ενός τρίτου παράγοντα, - παράγοντας Z – ο οποίος θα πρέπει να κωδικοποιείται από τον πυρήνα και να εκφράζεται μόνο στα θηλυκά γαμετικά κύτταρα (Σχήμα 1. 9). Θεωρήθηκαν δύο αλληλόμορφα: το Z, το οποίο παράγει τον παράγοντα και το z που δεν τον παράγει. Ο παράγοντας Z, όταν εκφράζεται στο ωάριο, συγκρατεί τα σπερματικά μιτοχόνδρια σε μορφή συσσωματώματος και αποτρέπει την αποσύνθεσή τους. Τα θηλυκά άτομα με γονότυπο ZZ υποτέθηκε ότι παράγουν τον παράγοντα σε μεγάλες συγκεντρώσεις με πιθανό αποτέλεσμα να γεννούν γιους. Τα ετερόζυγα Zz θηλυκά εκφράζουν τον παράγοντα σε χαμηλότερες ποσότητες και παράγουν ίσο περίπου αριθμό αρσενικών και θηλυκών απογόνων, ενώ τα zz γεννούν μόνο κόρες διότι δεν παράγουν (ή παράγουν ελάχιστα) τον κυτταροπλασματικό παράγοντα.



Σχήμα 1. 9. Η υπόθεση εργασίας της ΔΜΚ (βλ. κείμενο - Τροποποιημένο από Zouros 2000).

### 1. 2. 7. Τα μη-τυπικά αρσενικά μύδια και η υπόθεση της «αρρενοποίησης»

Σε φυσικούς πληθυσμούς *M. edulis*, *M. trossulus* και *M. galloprovincialis* παρατηρούνται αρσενικά άτομα, τα οποία δεν εμφανίζουν την τυπική εικόνα αναφορικά με το μιτοχονδριακό τους DNA. Τα μη-τυπικά αρσενικά φαίνεται ότι στερούνται γονιδιώματος M και εμφανίζονται σαν ομοπλασμικά για έναν F ή σαν ετεροπλασμικά για δύο διαφορετικούς F απλότυπους (Hoeh et al. 1997, Saavedra et al. 1997, Quesada et al. 1999, Ladoukakis et al. 2002). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές προτείνεται η υπόθεση της «αρρενοποίησης» ή της αναστροφής του τρόπου μεταβίβασης του mtDNA, σύμφωνα με την οποία τα γονιδιώματα τύπου F είναι δυνατό να αλλάξουν ρόλο και να εισβάλουν στην πατρική γραμμή κληρονομιάς αντικαθιστώντας τα M. Δεδομένα που συνηγορούν υπέρ της υπόθεσης της «αρρενοποίησης» υπάρχουν, μέχρι σήμερα, μόνο για τα είδη του γένους *Mytilus*.

Πρόσφατα δημοσιεύτηκε ένα πλήρες γονιδίωμα του *M. trossulus*, το οποίο θεωρείται από τους συγγραφείς αρρενοποιημένο (Breton et al. 2006), θεώρηση αρκετά επισφαλής καθώς δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστά τα τυπικά F και M γονιδιώματα του εν λόγω είδους. Οι υπόλοιπες, ως τώρα, μελέτες που αφορούν στο θέμα της «αρρενοποίησης» εξετάζουν ένα ή δύο μικρά τμήματα του mtDNA κυρίως μέσω της ανάλυσης των περιοριστικών τους προτύπων (Saavedra et al. 1997, Quesada et al. 1999, Ladoukakis et al. 2002). Οι μόνες γνωστές αλληλουχίες υποτιθέμενων αρρενοποιημένων μορίων προέρχονται από τμήμα του γονιδίου *COI* των ειδών *M. edulis* και *M. trossulus* (Hoeh et al. 1997), από ένα τμήμα 622 bp της *COIII* και ένα 416 bp του *lrRNA* του ευρωπαϊκού *M. trossulus* (Quesada et al. 1999, Quesada et al. 2003). Ωστόσο, δεν έχουν προσδιοριστεί τα υποτιθέμενα αρρενοποιημένα μόρια, ούτε έχει μελετηθεί σχολαστικά η δομή τους στα συγγενή είδη *M. edulis*, και *M. galloprovincialis*, ιδιαίτερα στην περιοχή ελέγχου (CR) που βρέθηκε να εμφανίζει συστηματικές διαφορές ανάμεσα στα F και στα M μόρια (§ 1. 2. 4). Επιπλέον, δεν έχουν διευκρινιστεί αρκετά ερωτήματα που θα συμβάλουν στην κατανόηση του φαινομένου. Μερικά από αυτά θα μπορούσαν να διατυπωθούν ως εξής: ποιες είναι οι προϋποθέσεις ώστε ένα μόριο F να αλλάξει ρόλο και να «αρρενοποιηθεί», πόσο συχνά συμβαίνει κάτι τέτοιο και, τέλος, πώς κατανέμονται τα αρρενοποιημένα μόρια στους ιστούς των ατόμων;

Η μελέτη της «αρρενοποίησης» μπορεί να αποδειχτεί βασικής σημασίας για την κατανόηση των μηχανισμών της ΔΜΚ. Μπορεί, εξάλλου, να δώσει απαντήσεις

και σε θέματα που αφορούν στην εξέλιξη του συστήματος, διότι θεωρητικά κάθε γεγονός «αρρενοποίησης» μηδενίζει τη διαφοροποίηση μεταξύ των μητρικώς και των πατρικώς μεταβιβαζόμενων μορίων. Είναι συνεπώς πιθανό ότι οι πολλαπλές εμφανίσεις της ΔΜΚ (§ 1. 2. 2), έτσι όπως αποτυπώνονται στα φυλογενετικά δέντρα (π. χ. Hoeh et al. 1996, 1997), δεν αποτελούν πραγματικά γεγονότα εμφάνισης του φαινομένου, αλλά μάλλον γεγονότα αναστροφής του τρόπου μεταβίβασης των μορίων.

### 1. 3. Οι οργανισμοί

#### 1. 3. 1. *Mytilus galloprovincialis* και *Mytilus edulis*

Το γένος *Mytilus* (Linnaeus 1758) ανήκει στην οικογένεια Mytilidae. Περιλαμβάνει τα είδη *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, *M. californianus*, *M. desolacionis* και *M. corsicus*. Ο παραπάνω διαχωρισμός δεν είναι απόλυτος διότι αφενός πολλά είδη υβριδίζονται μεταξύ τους, γεγονός που φανερώνει ότι δεν υπάρχει μεγάλη γενετική ασυμβατότητα, αφετέρου δεν υπάρχει ένας μορφολογικός ή γενετικός χαρακτήρας που να κατατάσσει ξεκάθαρα κάθε άτομο σε ένα από τα είδη που αναφέρθηκαν.

Το είδος *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) αναφέρεται ως «μύδι της Μεσογείου» γιατί θεωρείται ότι κοιτίδα εξάπλωσής του είναι η Μεσόγειος. Στη συνέχεια εξαπλώθηκε στη Μαύρη Θάλασσα και στις ευρωπαϊκές ακτές του Ατλαντικού. Στη Γαλλία, Βρετανία και Ιρλανδία το είδος εμφανίζεται συμπάτρια με το *M. edulis*. Τα δύο είδη υβριδίζονται εκτεταμένα στις ζώνες επαφής τους (Gosling 1992).



Σχήμα 1. 10. Κελύφη από ενήλικα άτομα των ειδών *M. galloprovincialis* (A) και *M. edulis* (B).

Το *Mytilus galloprovincialis* είναι γονοχωριστικό. Ο τρόπος φυλοκαθορισμού στο μύδι δεν είναι όμως γνωστός. Η γονιμοποίηση είναι εξωτερική. Η πλαγκτονική προνύμφη που δημιουργείται αρχικά, εδραιώνεται σε σκληρό υπόστρωμα με τη βοήθεια «νημάτων» (βύσσοις), όπου και παραμένει για το υπόλοιπο της ζωής της. Οι κυριότεροι ιστοί του μυδιού είναι η γονάδα (κατά την περίοδο της αναπαραγωγής

φτάνει το 90% της μάζας του οργανισμού), τα βράγχια, ο μανδύας, ο πεπτικός ιστός, οι μύες και το πόδι (Gosling 1992).

Το είδος *Mytilus edulis* είναι πολύ συγγενικό με το *M. galloprovincialis* (Σχήμα 1. 10). Είναι πολύ κοινό στις ακτές της Μ. Βρετανίας και της Γαλλίας, ενώ απαντάται και στον Καναδά, στις ΗΠΑ στη Χιλή, στα νησιά Φόκλαντ και στην Αργεντινή. Όπως και το *M. galloprovincialis*, είναι γονοχωριστικό είδος και τρέφεται διηθώντας τη στήλη του νερού. Έχει επίσης σπουδαία οικονομική σημασία και καλλιεργείται συστηματικά.

### 1. 3. 2. *Donax trunculus*

Το είδος *Donax trunculus* (Linnaeus 1758, Σχήμα 1. 11) είναι ένα πολύ διαδεδομένο δίθυρο που ανήκει στην οικογένεια Donacidae. Εξαπλώνεται σε θερμές και εύκρατες θάλασσες από τη Σενεγάλη μέχρι τις γαλλικές ακτές και τη Μεσόγειο (Tebble 1966). Ζει σε αμμώδεις παραλίες, σε βάθος μέχρι 2 m στη Μεσόγειο και 6 m στον Ατλαντικό (Gaspar et al. 2002). Είναι γονοχωριστικό είδος και τα ενήλικα άτομα μπορεί να φτάσουν σε μήκος τα 3 cm. Αποτελεί ένα από τα βασικά θηράματα πολλών, μεγαλύτερων σε μέγεθος, σαρκοφάγων δίθυρων και καρκινοειδών και αυτός είναι ο λόγος που παρατηρούνται συχνά διάτρητα κελύφη του στις παραλίες. Είναι εδώδιμο είδος και παρουσιάζει σημαντικό οικονομικό ενδιαφέρον.



Σχήμα 1. 11. Κελύφη ενήλικων ατόμων του είδους *Donax trunculus*.



#### 1. 4. Σκοπός της διατριβής

Η παρούσα διατριβή είχε σαν κύριο στόχο τον έλεγχο της υπόθεσης της «αρρενοποίησης» και τη μελέτη των εξελικτικών συνεπειών της.

Σύμφωνα με την υπόθεση, ένα μητρικώς κληρονομούμενο μόριο mtDNA μετατρέπεται σε πατρικώς κληρονομούμενο. Όπως αναφέρθηκε, η βασική παρατήρηση που υποστήριζε την υπόθεση της «αρρενοποίησης» ήταν ο εντοπισμός μη-τυπικών αρσενικών μυδιών, δηλαδή αρσενικών που δεν έφεραν το τυπικό M μόριο (βλ. Κεφ. 1. 2. 7). Τέτοια αρσενικά μύδια είχαμε εντοπίσει σε προηγούμενες μελέτες, μέσω της ανάλυσης των περιοριστικών προτύπων τμημάτων των κωδικών τους περιοχών σε δείγματα του είδους *M. galloprovincialis* από τη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα (Ladoukakis et al. 2002, Θεολογίδης 2002). Ο πληθυσμός μάλιστα από τη Μαύρη Θάλασσα περιείχε τέτοια αρσενικά σε πολύ υψηλές συχνότητες. Ελέγξαμε αρχικά το περιεχόμενο των γονάδων και των σωματικών ιστών από μη-τυπικά αρσενικά μύδια του πληθυσμού αυτού αναζητώντας τα υποτιθέμενα αρρενοποιημένα μόρια. Εστιαστήκαμε όχι μόνο στις κωδικές, αλλά κυρίως στη ρυθμιστική περιοχή (CR) των μορίων. Η επιλογή αυτή υποκινήθηκε από το γεγονός ότι η ρυθμιστική περιοχή εμφανίζει συστηματικές διαφορές μεταξύ των F και M μορίων του μυδιού (Cao et al. 2004b). Επιπλέον, μετά τον εντοπισμό ανασυνδυασμένων mtDNA μορίων στη ρυθμιστική περιοχή (CR) μη-τυπικών αρσενικών μυδιών *Mytilus trossulus* (Burzynski et al. 2003), άρχισε να διατυπώνεται η υπόθεση ότι η μεταβίβαση των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων μπορεί να συνδέεται με την ενσωμάτωση τμημάτων CR από τα πατρικά στα μητρικά μόρια, μέσω ανασυνδυασμού (Burzynski et al. 2003, Cao et al. 2004b), καθιστώντας τον έλεγχο της εν λόγω περιοχής στα μη-τυπικά αρσενικά *M. galloprovincialis* επιβεβλημένο.

Θεωρήσαμε ότι ο προσδιορισμός της ταυτότητας και της δομής των υποτιθέμενων αρρενοποιημένων μορίων, εκτός από απόδειξη της υπόθεσης της «αρρενοποίησης», θα συνέβαλε στην εξήγηση της φυλογένεσης των F και M μορίων και κατ' επέκταση της εξέλιξης της ίδιας της ΔΜΚ στην ομοταξία των δίθυρων (βλ. § 1. 2. 2). Ωστόσο, η εξήγηση της φυλογένεσης φάνηκε να περιορίζεται από την ελλιπή γνώση σχετικά με την εξέλιξη του φαινομένου στην εν λόγω ομοταξία. Σύμφωνα με τη σημερινή εικόνα, η ΔΜΚ απαντάται σε πολύ απομακρυσμένες υπεροικογένειες, ενώ απουσιάζει ακόμα και ανάμεσα σε πολύ συγγενικά είδη (βλ. § 1. 2. 2 και Κεφ. 4.

4). Σε αυτά τα πλαίσια, δοκιμάσαμε να εντοπίσουμε το φαινόμενο σε οικογένειες δίθυρων για τις οποίες δεν υπάρχουν αναφορές για την παρουσία της ΔΜΚ, καθώς επίσης και σε είδη που ανήκουν σε οικογένειες ή σε γένη των οποίων ορισμένοι τουλάχιστον αντιπρόσωποι αποδεδειγμένα την εμφανίζουν. Τα είδη που εξετάσαμε ήταν τα εξής: *Venus verrucosa*, *Callista chione*, *Venerupis decussatus* (οικ. Veneridae), *Arca noae* (οικ. Arcidae) και *Donax trunculus* (οικ. Donacidae).

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2. 1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

#### 2. 1. 1. *Mytilus galloprovincialis* – *Mytilus edulis*

Τα δείγματα που αναλύθηκαν προέρχονταν από περιοχές της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας. Ανήκαν στο είδος *Mytilus galloprovincialis* (Gosling 1992). Αναλύθηκαν επίσης δείγματα του είδους *Mytilus edulis* που είχαν συλλεχθεί στις ανατολικές ακτές του Καναδά.

Ο προσδιορισμός του φύλου των ατόμων είχε γίνει με μικροσκοπική μελέτη των γονάδων τους στο οπτικό μικροσκόπιο Zeiss σε μεγέθυνση προσοφθάλμιου φακού x10 και αντικειμενικού x40. Στη συνέχεια, οι ιστοί των οργανισμών τεμαχίζονταν και φυλάσσονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 2. 1. 2. *Donax trunculus*

Ενήλικα άτομα του είδους *Donax trunculus* συλλέχτηκαν από τις περιοχές Faro και Algarve στις νότιες ακτές της Πορτογαλίας. Ο προσδιορισμός του φύλου έγινε με την παρατήρηση του χρώματος των γονάδων τους (Gaspar et al. 1999). Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 100% v/v και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο.

## **2. 2. Εξαγωγή ολικού DNA**

Η εξαγωγή ολικού DNA έγινε από τμήμα ιστού κάθε ατόμου με τη μέθοδο της πρωτεϊνάσης K (Miller et al. 1988). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μικρή ποσότητα ιστού κονιορτοποιούταν με υγρό άζωτο σε σωλήνα erpendorf, όπου κατόπιν προστίθονταν 400 μl lysis buffer, 10 μl proteinase K 20 mg/l, 32 μl SDS 10% w/v. Το lysis buffer αποτελούταν από 10 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8 και 400 mM NaCl. Το μείγμα επωαζόταν σε υδατόλουτρο 55°C για τουλάχιστο 4 h και ακολουθούσε προσθήκη 280 μl κορεσμένου διαλύματος NaCl (6 M), vortex για 15 min και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 min. Το υπερκείμενο διάλυμα λαμβανόταν προσεκτικά και μεταφερόταν σε άλλο σωλήνα, όπου το DNA κατακρημιζόταν με προσθήκη ισοπροπανόλης στους -20°C. Μετά από 30 min ακολουθούσε νέα φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min και έπειτα προσθήκη 100 μl οξικού νατρίου (0.3 M, pH 5.2) και 250 μl απόλυτης αιθανόλης. Νέα φυγοκέντρηση για 10 min, αφαίρεση του υπερκείμενου και ξέπλυμα του ιζήματος με 200 μl αιθανόλης 70% v/v. Η αιθανόλη αφαιρούταν προσεκτικά, το ίζημα στέγνωσε στους 37°C ή σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα του DNA επαναδιαλυόταν με προσθήκη 100-200 μl «nanopure» H<sub>2</sub>O. Τέλος, ο έλεγχος της ύπαρξης και της ποιότητας του εξαγόμενου DNA γινόταν με ηλεκτροφόρηση μίας μικρής ποσότητας του διαλύματος (1 μl) σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v.

## **2. 3. Πολλαπλασιασμός μιτοχονδριακού DNA (PCR)**

### **2. 3. 1. Πολλαπλασιασμός της περιοχής ελέγχου (CR) των μορίων mtDNA από τη γονάδα και το σώμα των μη-τυπικών αρσενικών μυδιών**

Για την απόκτηση της περιοχής ελέγχου (CR) των μορίων mtDNA του μυδιού απαιτήθηκε η σύνθεση πέντε κλώνων που ανέκυσαν από τις γονάδες μη-τυπικών αρσενικών ατόμων από τη Μαύρη Θάλασσα. Στον Πίνακα 2. 1 παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάκτηση των εν λόγω κλώνων καθώς και η ειδικότητά τους για τον πολλαπλασιασμό αλληλουχιών F και M τύπου.

Κωδικός	Αλληλουχία	Ειδικότητα	Κλώνος
lola1	ACA TGA KCT GAG TTC CAG AMC GGY GTR AGC	F & M	CL1/CL1A/CL1'
ssMdl2	GTA TAC ACA CGY TAC ACA CC	M	CL1/CL1A/CL1'
gfm16s-f	GCT ACT CTA GGG ATA ACA GCG C	F & M	CL2
MG1-r	GGC TAA GGA TCT GTA ACA TAC	M	CL2
MG2-f	CAC GCT TAA CTT CCC TGC CAC TG	M	CL3
Vccob-r	AAR RAC CAY TCN GGY TGN ACR TG	F & M	CL3
MG1-f	GTA TGT TAC AGA TCC TTA GCC	M	CL4
MG1-r	GGC TAA GGA TCT GTA ACA TAC	M	CL4

**Πίνακας 2. 1:** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάκτηση των 4 κλώνων του σύνθετου αρρενοποιημένου CR.

Ο πρώτος κλώνος (CL1) πολλαπλασιάστηκε με PCR, με το ζευγάρι εκκινητών lola1 και ssMdl2 (Mizi et al. 2005). Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδρώντων ήταν: MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.5 mM από κάθε εκκινητή και *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech ή BRL) 0.03 u/μl, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Ως DNA μήτρα (template DNA) προστέθηκε 1 μl ολικού DNA. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη (pre-denaturation) του DNA στους 94°C για 2 min και ακολούθως 30 επαναλαμβανόμενοι κύκλοι, καθένας εκ των οποίων περιλάμβανε τα εξής τρία στάδια: 1) αποδιάταξη (denaturation) του DNA για 1 min, 2) πρόσδεση (annealing) των εκκινητών στους 54°C για 1 min και 3) επιμήκυνση (extension) στους 72°C για 2 min και 30 sec. Μετά τη συμπλήρωση των 30 κύκλων ακολουθούσε η τελική επιμήκυνση (final extension) στους 72°C για 5 min.

Για τον πολλαπλασιασμό του δεύτερου κλώνου (CL2) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές gfm16s-f: 5'-GCT ACT CTA GGG ATA ACA GCG C-3' και MG1-r: 5'-GGC TAA GGA TCT GTA ACA TAC-3' σε τελικές συγκεντρώσεις αντιδρώντων PCR, που είχαν ως εξής: MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.5 mM από κάθε εκκινητή και *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech ή BRL) 0.03 u/μl, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν όπως περιγράφηκαν παραπάνω με τη διαφορά ότι η πρόσδεση (annealing) των εκκινητών πραγματοποιήθηκε στους 55°C.

Με ανάλογο τρόπο ανακτήθηκε ο κλώνος 3 (CL3) με τη χρήση των εκκινητών MG2-f: 5'-CAC GCT TAA CTT CCC TGC CAC TG-3' και Vccob-r (Mizi et al. 2005). Οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν όμοιες με εκείνες του δεύτερου κλώνου.

Ο τέταρτος κλώνος (CL4) προέκυψε από το συνδυασμό των εκκινητών MG1-f: 5'-GTA TGT TAC AGA TCC TTA GCC-3' και MG1-r: 5'-GGC TAA GGA TCT

GTA ACA TAC-3'. Οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν: MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.5 mM από κάθε εκκινητή και *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech ή BRL) 0.03 u/μl, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη (pre-denaturation) του DNA στους 94°C για 2 min και ακολούθως 30 επαναλαμβανόμενοι κύκλοι, καθένας εκ των οποίων περιλάμβανε τα εξής τρία στάδια: 1) αποδιάταξη (denaturation) του DNA για 1 min, 2) πρόσδεση (annealing) των εκκινητών στους 45°C για 1 min και 20 sec και 3) επιμήκυνση (extension) στους 72°C για 2 min 20 sec. Μετά τη συμπλήρωση των 30 κύκλων ακολουθούσε η τελική επιμήκυνση (final extension) στους 72°C για 5 min.

Λόγω του μεγάλου μεγέθους του και των πολλών επαναλαμβανόμενων περιοχών που περιέχει, ο κλώνος CL4 δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί άμεσα σε όλο του το μήκος με τη χρήση εσωτερικών εκκινητών. Για να μελετηθεί το κεντρικό τμήμα του ανακτήθηκε ο κλώνος CL1' με PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA τον ίδιο τον κλώνο CL4. Οι εκκινητές και οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν όμοιες με εκείνες του κλώνου CL1.

Μελετήθηκε επιπλέον και το CR των mtDNA μορίων που κυριαρχούν στους σωματικούς ιστούς των μη-τυπικών αρσενικών ατόμων. Για την αναπαράσταση των «σωματικών» CR χρησιμοποιήθηκαν δύο κλώνοι (CL5 και CL6). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη του κλώνου CL5 ήταν οι *lola-1* και *tRNA-Y-r* (Mizi et al. 2005). Το ζεύγος εκκινητών που έδωσε τον κλώνο CL6 ήταν: VD1F-f (5'-TGC TGT TGA GGA GAG TGT RAG-3') και *Vccob-r*.

### **2. 3. 2. Πολλαπλασιασμός των κωδικών περιοχών των μορίων που περιέχονται στη γονάδα και στο σώμα των μη-τυπικών αρσενικών μυδίων**

Τρία τμήματα επιλέχθηκαν για τη μελέτη της κωδικής περιοχής των mtDNA μορίων της γονάδας και των σωματικών ιστών των μη-τυπικών αρσενικών μυδίων.

Το πρώτο τμήμα αντιστοιχεί σε μία περιοχή μεγέθους 818 bp περίπου του γονιδίου της υπομονάδας III της κυτοχρωμικής οξειδάσης (*COIII*). Για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος αυτού χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι εκκινητών: COIII-FOR και COIII-REV (Stewart et al. 1996).

Το δεύτερο τμήμα αντιστοιχεί σε μία περιοχή μεγέθους 900 bp του γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI). Για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος αυτού χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι εκκινητών COI-F και F που σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία της *Albinaria coerulea*. Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι εξής: COI-F και F. Οι εκκινητές αυτοί πολυμερίζουν τόσο τις M όσο και τις F τύπου αλληλουχίες.

Το τρίτο τμήμα αποτελεί μέρος του γονιδίου ND5 με μέγεθος 1042 bp. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό του ήταν: ND5F: και ND5R.

Εκκινητής	Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή	Ειδικότητα
COIII-FOR	COIII	5' – TAT GTA CCA GGT CCA AGT CCG TG – 3'	F & M
COIII-REV	COIII	5' – ATG CTC TTC TTG AAT ATA AGC GTA CC – 3'	F & M
COI-F	COI	5' - GGT AAR GAT ATA ATT TAY CCR CGG – 3'	F & M
F	COI	5' – TGT GCT ACM ACR TAR TAA GTA TCA T – 3'	F & M
ND5F	ND5	5' – CTK CWT TAG TKC AYT CTT CWA C – 3'	F & M
ND5R	ND5	5' – CCT CAS ACC ACT ARC TGA TAA G – 3'	F & M

**Πίνακας 2. 2:** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάκτηση των 3 κωδικών περιοχών από τις γονάδες και τους σωματικούς ιστούς των μη-τυπικών αρσενικών μυδίων.

Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδρώντων της PCR ήταν: MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.5 mM από κάθε primer και 0.03 u/μl *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech ή BRL), σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Ως DNA μήτρα (template DNA) χρησιμοποιήθηκε 1 μl ολικού DNA.

### 2. 3. 3. Οι αντιδράσεις PCR για τον προσδιορισμό της πλήρους πρωτοδιάταξης του αρρενοποιημένου μορίου

Η πλήρης πρωτοδιάταξη του αρρενοποιημένου μορίου προσδιορίστηκε μέσω της συνένωσης του σύνθετου CR (§ 2. 3. 1) με 12 κλώνους, οι οποίοι προέκυψαν από αντιδράσεις PCR στην κωδική περιοχή του μορίου. Ο σχεδιασμός των αντιδράσεων έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχουν αρκετά σημαντικές αλληλεπικαλύψεις και να είναι δυνατή η συνένωση των κλώνων. Οι κλώνοι και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάληψή τους παρατίθενται στον Πίνακα 2. 3. Οι εκκινητές MG1-r, MG2-f και gfm16s-f αναφέρθηκαν στην παράγραφο 2. 3. 1. Οι

υπόλοιποι περιγράφονται από τους Mizi et al. (2005), (online supplementary material). Το σύνθετο CR του μορίου προσδιορίστηκε με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 2. 3. 1.

Κλώνος	Εκκινητές	Μήκος (bp)	Θέση πρόσδεσης στο F (Mizi et al. 2005)	Τμήμα	Θέση πρόσδεσης στο νέο μόριο
1	MG2-f* /Vccob-r	1615	264(*M*)-2069	CR - cytb	(CR) 2844-4464
2	cytb-f / c-r	1675	1911-3586	cytb – UR2	4306-5981
3	LEU-f / 2-r	1099	3416-4515	tRNA-Leu – ND1	5811-6910
4	ND1-f / 3-r	1994	4347-6339	ND1 – COIII	6742-8734
5	COIII-482 / k-r	2074	6029-8102	COIII – tRNA-Arg	8424-10497
6	i-f / COI-r	1800	7772-9571	ND2 – COI	10167-11966
7	COI-f / 6-r	1748	9394-11141	COI – ATP6	11789-13536
8	7-f / TELOS-nd5-r	1875	10996-12870	ATP6 – ND5	13391-15265
9	o-f / p-r	1022	12703-13724	ND5 – ND6	15098-16119
10	TELOS-ND6-f / SMALL-r-X	1383	13564-14953	ND6 – 12sRNA	15959-17348
11	12S-f-X / Lola2	2106	14409-16523	12sRNA – 16sRNA	16804-18918
12	gfm16s-f / MG1-r*	1312	16462-467 (*M*)	16sRNA – CR	18857-1430 (CR)

**Πίνακας 2. 3:** Οι συνδυασμοί των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της πλήρους πρωτοδιάταξης του αρρενοποιημένου μορίου. Με αστερίσκο σημειώνονται οι M-ειδικοί εκκινητές (και οι θέσεις πρόσδεσής τους αναφέρονται στο πλήρες M του *M. galloprovincialis*).

Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδρώντων της PCR ήταν: MgCl<sub>2</sub> 3mM, dNTPs 0.2mM, κάθε primer 0.5mM, και *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech ή BRL) 0.03 u/μl, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Ως DNA μήτρα (template DNA) χρησιμοποιήθηκε 1.0 μl ολικού DNA. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν ίδιες με αυτές που περιγράφονται στην προηγούμενη παράγραφο, εκτός από την πρόσδεση (annealing) των εκκινητών που πραγματοποιήθηκε στους 46 - 60°C για 1 min και την επιμήκυνση (extension) στους 72°C για 1 – 2 min.

#### 2. 3. 4. Συλλογή πληθυσμιακών δεδομένων για το αρρενοποιημένο μόριο

Εξετάσαμε τον τύπο της περιοχής ελέγχου του μιτοχondριακού DNA σε 98 αρσενικά και 68 θηλυκά μύδια του είδους *Mytilus galloprovincialis* από πληθυσμούς της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας. Συνοπτικά, οι δοκιμές που εφαρμόστηκαν



στον πληθυσμιακό έλεγχο και τα προϊόντα των αντιδράσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. 4.

Οι συνθήκες όλων των αντιδράσεων που περιγράφηκαν σε αυτήν την παράγραφο ήταν όμοιες με τις συνθήκες που περιγράφηκαν στην παράγραφο 2. 3. 1. για τους κλώνους CL2 και CL6.

Συνδυασμός εκκινητών	CR-F (μήκος*)	CR-M (μήκος*)	CR-σύνθετο (μήκος*)
gfm16s-f/MG1-r	-	732 bp	1703 bp (+ 2491 bp)
VD1F-f/Vccob-r	1939 bp	-	-

**Πίνακας 2. 4:** Οι συνδυασμοί των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του τύπου της περιοχής ελέγχου (CR) μυδίων *M. galloprovincialis* από πληθυσμούς της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας. Ο συνδυασμός των εκκινητών gfm16s-f/MG1-r επιτρέπει την ανίχνευση των τύπων M και σύνθετου. Η διάκριση μεταξύ των δύο γινόταν με βάση το μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης. Το τυπικό CR-F ανιχνευόταν από την παρουσία του προϊόντος που έδινε ο συνδυασμός VD1F-f/Vccob-r. \*: Τα μήκη που αναφέρονται υπολογίστηκαν με βάση τα πλήρη mtDNA του *M. galloprovincialis* (Mizi et al. 2005).

### 2. 3. 5. Η αναζήτηση της ΔΜΚ στο είδος *Donax trunculus*

Ένα τμήμα μεγέθους 510 bp του γονιδίου της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας (*lrRNA*) του είδους *Donax trunculus* πολλαπλασιάστηκε αρχικά με τη χρήση των universal εκκινητών 16SAR-L (Kocher et al., 1989) and 16SBR-H (Palumbi et al., 1996). Για να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός του εν λόγω τμήματος σε όλες τις κατηγορίες δειγμάτων σχεδιάστηκε νέος εκκινητής (Dt16s-r395) με βάση την αλληλουχία που ανακτήθηκε από το πρώτο ζευγάρι. Ο νέος συνδυασμός εκκινητών (16SAR-L / Dt16s-r395) παρήγαγε ένα προϊόν μεγέθους 447 bp σε όλα τα δείγματα.

Για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος του γονιδίου του κυτοχρώματος *b* (*Cytb*) χρησιμοποιήθηκε ένα άλλο ζεύγος universal εκκινητών (UCYTB144F and UCYTB272R, Merritt et al. 1998). Το προϊόν λαμβανόταν από όλες τις κατηγορίες δειγμάτων και είχε μέγεθος 480 bp. Επειδή η απόδοση της παραπάνω αντίδρασης δεν ήταν πάντοτε ικανοποιητική (ιδιαίτερα στα δείγματα των αρσενικών γονάδων),

σχεδιάσαμε ένα νέο ζεύγος εκκινητών (Dteytb-f και Dteytb-r) με βάση τις ήδη ανακτημένες F και M αλληλουχίες του *D. trunculus*. Το νέο προϊόν είχε μέγεθος 432 bp. Συνοπτικά, οι συνδυασμοί των εκκινητών και οι αλληλουχίες τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. 5.

Γενετικός τύπος	Ζεύγος εκκινητών	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>lrRNA</i>	16sar/16sbr	CGCCTGTTTATCAAAAAACAT	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT
<i>lrRNA</i>	16sar/Dt16s-r395	CGCCTGTTTATCAAAAAACAT	CYYTAATYCAACATCGAGGTC
<i>Cytb</i>	UCYTB144F/UCYTB272R	TGAGSNCARATGTCNTWYTG	GCRAANAGRAARTACCAYTC
<i>Cytb</i>	Dteytb-f/Dteytb-r	TGTCGTATTGGGGGGCTACTG	GTACCACTCTGGCTGAATGTG

**Πίνακας 2. 5:** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της ΔΜΚ στο *Donax trunculus*.

Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδρώντων της PCR ήταν: MgCl<sub>2</sub> 3mM, dNTPs 0.2mM, primers 0.5mM και *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech ή BRL) 0.03 u/μl, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Ως DNA μήτρα (template DNA) προσθέταμε 1.0 μl ολικού DNA από κάθε κατηγορία ιστού. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη (pre-denaturation) του DNA στους 94°C για 2 min και ακολούθως 30 επαναλαμβανόμενοι κύκλοι, καθένας εκ των οποίων περιλάμβανε τα εξής τρία στάδια: 1) αποδιάταξη (denaturation) του DNA για 1 min, 2) πρόσδεση (annealing) των εκκινητών στους 42-54°C για 1 min ή 1 min 20 sec και 3) επιμήκυνση (extension) στους 72°C για 1 min. Μετά τη συμπλήρωση των 30 κύκλων ακολουθούσε η τελική επιμήκυνση (final extension) στους 72°C για 5 min.

### 2. 3. 6. Πέψεις των προϊόντων PCR με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι πέψεις των προϊόντων των αντιδράσεων PCR με περιοριστικές ενδονουκλεάσες γινόταν σε διαλύματα με τελικό όγκο 20 μl που περιείχαν:

2 μl buffer 10X

0.2 μl ενζύμου (Minotech 10 u/μl).

x μl προϊόντος PCR (ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος)

20 – (2.2 + x) μl H<sub>2</sub>O

Το μίγμα επωαζόταν στους 37°C για 3 h και έπειτα ηλεκτροφορούσαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1.3 – 1.5% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο και το πήκτωμα φωτογραφιζόταν.

## **2. 4. Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR και προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των ενθεμάτων**

### **2. 4. 1. Προετοιμασία των προϊόντων PCR για κλωνοποίηση**

Σε ορισμένες περιπτώσεις τα προϊόντα της PCR, πριν κλωνοποιηθούν, καθαρίζονταν από τα περισσεύματα των dNTPs και των εκκινητών καθώς και από τα άλατα (MgCl<sub>2</sub>) για να είναι απρόσκοπτη η δράση της λιγάσης. Ο καθαρισμός γινόταν με ιζηματοποίηση του DNA με αιθανόλη (Maniatis et al. 1982). Στο προϊόν της PCR προσθέτονταν 12 μl διαλύματος οξικού νατρίου 3M (pH 5,2) (1/10 του τελικού όγκου) και νερό μέχρι τα 120 μl. Στη συνέχεια προσθέτονταν 2 όγκοι παγωμένης απόλυτης αιθανόλης και μετά από ανακίνηση, το μίγμα τοποθετούνταν στους –80°C για 15 - 30 min για να ιζηματοποιηθεί το DNA. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 15 min, απόρριψη του υπερκείμενου, ξέπλυμα του ιζήματος με παγωμένη αιθανόλη 70%. Το ίζημα αφήνονταν όλη νύχτα για να εξατμισθεί η αιθανόλη, επαναδιαλυόταν σε 10-20 μl H<sub>2</sub>O και φυλασσόταν στους -20°C. Ακολουθούσε ποσοτική εκτίμηση του καθαρού προϊόντος της PCR με οπτικό προσδιορισμό αφού είχε αναλυθεί σε πήκτωμα αγαρόζης μαζί με ένα μάρτυρα DNA γνωστής συγκέντρωσης.

### **2. 4. 2. Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων**

Για την κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε ο φορέας κλωνοποίησης pGEM-T Easy vector (Promega). Το μίγμα της αντίδρασης της λιγάσης ετοιμαζόταν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή σε τελικό όγκο 10 μl και περιείχε:

5  $\mu$ l ligation buffer (2X)  
1  $\mu$ l pGEM – T Easy vector (50 ng/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l T4 ligase  
x  $\mu$ l καθαρό (ή μη) προϊόν PCR  
10 – (7 + x)  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Το τελικό μίγμα επωαζόταν στους 16°C για 8 – 10 h και αποθηκευόταν στους -20°C.

### 2. 4. 3. Μετασηματισμός κυττάρων *E. coli DH5a*

Για την κλωνοποίηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από το στέλεχος *DH5a* του βακτηρίου *Escherichia coli*. Τα κύτταρα αυτά γίνονταν δεκτικά μετασηματισμού (competent) και αποθηκεύονταν στους -80°C. 200  $\mu$ l κυττάρων αφήνονταν να ξεπαγώσουν μέσα σε πάγο. Στα κύτταρα αυτά τοποθετούνταν 4  $\mu$ l από το προϊόν της αντίδρασης της λιγάσης και ανακινούνταν ελαφρά. Ακολουθούσε επαναφορά στον πάγο για 20 min και στη συνέχεια θερμικό σοκ στους 42°C για 45 sec. Μετά το θερμικό σοκ βυθίζονταν αμέσως στον πάγο για 2 min και κατόπιν προστίθεντο 800  $\mu$ l θρεπτικού μέσου (LB) σε κάθε σωλήνα. Οι σωλήνες με τα μετασηματισμένα κύτταρα επωάζονταν υπό ανακίνηση στους 37°C για 45 - 60 min, φυγονεντρούνταν στις 2500 στροφές για 5 min και απλώνονταν σε τριβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό (LB + άγαρ) μαζί με αμικιλίνη ως επιλεκτικό παράγοντα. Ο φορέας κλωνοποίησης (pGEM-T Easy vector) εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη εμπεριέχει και το γονίδιο μεταβολισμού της λακτόζης το οποίο διακόπτεται από το ένθεμα. Για το λόγο αυτό στα ίδια τριβλία είχε επιστρωθεί X-gal (Sigma) 40 $\mu$ l (20%). Αυτό δίνει τη δυνατότητα να ελεγχθούν οι αποικίες που περιέχουν το ένθεμα από εκείνες που περιέχουν μόνο το φορέα. Τα βακτήρια αφήνονταν να αναπτυχθούν για 12 - 16 h και ακολουθούσε η συλλογή των λευκών αποικιών.

Η συλλογή των αποικιών γινόταν με αποστειρωμένα ακρορύγχια. Κάθε λευκή αποικία μεταφερόταν σε αριθμημένη θέση ενός νέου τριβλίου που περιείχε στερεό LB και αμικιλίνη. Το νέο τριβλίο με τις αριθμημένες αποικίες επωαζόταν για 12 – 16 h στους 37°C.

#### **2. 4. 4. Έλεγχος θετικών κλώνων**

Μικρή ποσότητα από την κάθε αριθμημένη αποικία μεταφερόταν σε αποστειρωμένο σωλήνα eppendorf 0,5 ml που περιείχε 20-100 µl STE buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8). Αφού ανακινούνταν ισχυρά για να διασπαστεί η μάζα των κυττάρων, οι σωλήνες τοποθετούνταν στους 95°C για 15 min. Στη συνέχεια αφήνονταν να κρυώσουν. 1µl από αυτό το μίγμα αποτελούσε τη DNA μήτρα για την PCR που θα ακολουθούσε. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR ήταν ίδιες με αυτές που είχαν χρησιμοποιηθεί για να πολλαπλασιαστεί το αντίστοιχο ένθεμα από το ολικό DNA.

#### **2. 4. 5. Καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA**

Τα κύτταρα των κλώνων που επιλέγονταν καλλιεργούνταν για 12 – 16 h σε 5 ml υγρού θρεπτικού (LB) και κατόπιν χρησιμοποιούνταν για την παραλαβή καθαρού πλασμιδιακού DNA. Το πλασμιδιακό DNA καθαριζόταν με κολώνες QIAGEN ή Macherey-Nagel σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των κατασκευαστών.

#### **2. 4. 6. Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των ενθεμάτων**

Όλες οι αλληλουχίες που ανακτήθηκαν και παρουσιάζονται στη μελέτη προέρχονταν από κλωνοποιημένα προϊόντα PCR. Η πρωτοταγής δομή των ενθεμάτων προσδιοριζόταν σε αυτόματο sequencer PT100 της MG Research. Για την ανάγνωση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που είχαν ομόλογες περιοχές πάνω στο πλασμίδιο φορέα pGEM-T easy (SP6: 5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG- 3' και T7: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'). Όταν το μέγεθος των ενθεμάτων ήταν μεγάλο, ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξής τους περιλάμβανε και τη χρήση εσωτερικών εκκινητών (primer walking).

## 2. 5. Ανάλυση αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες λαμβάνονταν με τη μορφή χρωματογραφημάτων, μετατρέπονταν σε μορφή κειμένου με το πρόγραμμα CHROMAS 1.4 και στοιχίζονταν με το πρόγραμμα ClustalX v.1.8 (Thompson et al. 1997). Η επεξεργασία των αλληλουχιών και η εκτίμηση της γενετικής διαφοροποίησής τους γίνονταν με το πρόγραμμα MEGA v. 3. 1 (Kumar et al. 2004). Για τον υπολογισμό του ρυθμού των συνώνυμων (Ks) και μη-συνώνυμων (Ka) αντικαταστάσεων, οι νουκλεοτιδικές στοιχίσεις των κωδικών περιοχών προσαρμόστηκαν έτσι ώστε να αντιστοιχούν στις στοιχίσεις των αμινοξικών αλληλουχιών. Οι τιμές Ks και Ka υπολογίζονταν από το MEGA v3. 1, με βάση τη μέθοδο Nei-Gojobori και τη διόρθωση των Jukes-Cantor. Η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων των αλληλουχιών τύπου F και M των ειδών με ΔΜΚ πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα PAUP (v.4.0b10, Swofford 2003) και Modeltest (Posada and Crandall 1998). Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων με τις μεθόδους σύνδεσης γειτόνων (NJ) και μέγιστης φειδωλότητας (MP) έγινε με το πρόγραμμα MEGA v3. 1 και της μέγιστης πιθανοφάνειας (ML) με το πρόγραμμα TREEFINDER (Jobb et al. 2004).

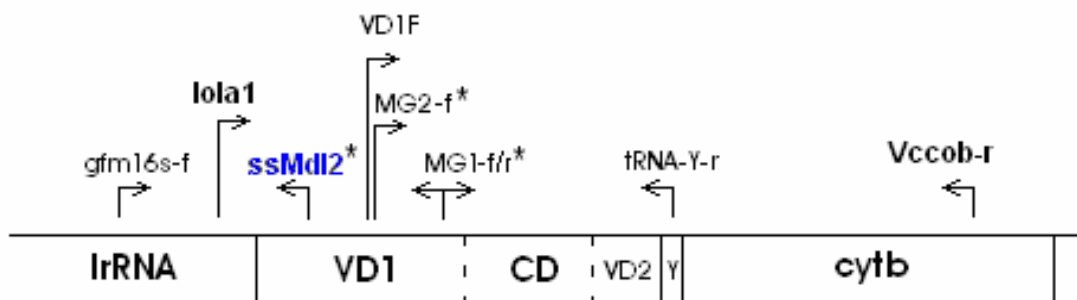
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3. 1. Το γονιδίωμα C: ένα νέο μιτοχondριακό γονιδίωμα στα αδελφά είδη *M. galloprovincialis* και *M. edulis*

##### 3. 1. 1. Το κυρίαρχο μιτοχondριακό γονιδίωμα των γονάδων των μη-τυπικών αρσενικών μυδιών

###### A. Η περιοχή ελέγχου (CR)

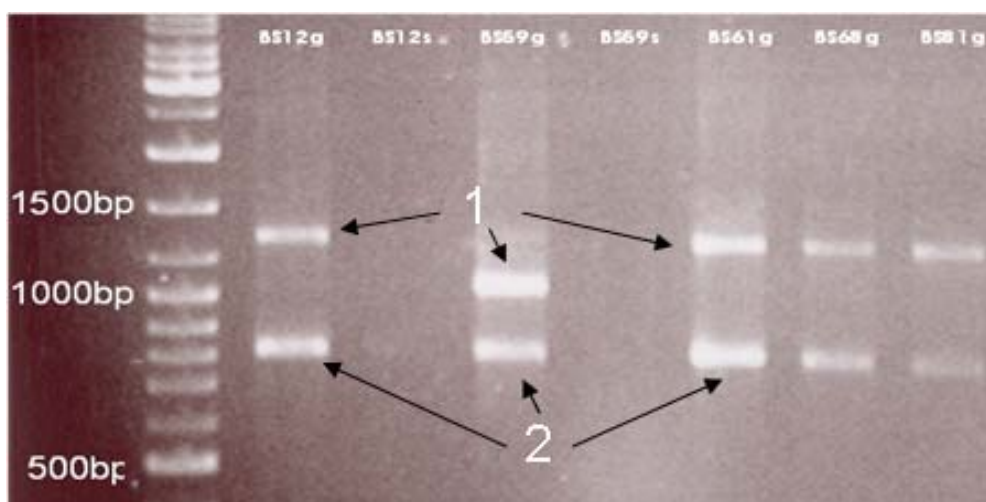
Μελετήσαμε το CR του μιτοχondριακού DNA μορίων που εντοπίστηκαν στις γονάδες μη-τυπικών αρσενικών μυδιών της Μαύρης Θάλασσας<sup>1</sup>. Δοκιμάσαμε να εντοπίσουμε στοιχεία τύπου M στο CR μορίων για τα οποία γνωρίζαμε από προηγούμενες αναλύσεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες ότι οι κωδικές περιοχές τους ήταν F τύπου (Ladoukakis et al. 2002, Θεολογίδης 2002). Οι κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν για την αναπαράσταση της περιοχής ελέγχου παρουσίαζαν μεγάλες αλληλεπικαλύψεις, ώστε να είναι εφικτή και ακριβής η συνένωσή τους. Για τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων του CR χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμοί M-ειδικών εκκινητών με άλλους ειδικούς M ή μη-ειδικούς, ώστε να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός τμημάτων που περιείχαν στοιχεία τύπου M (§ 2. 3. 1, Πίνακας 2. 1).



**Εικόνα 3. 1. 1:** Οι σχετικές θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του CR. Με αστερίσκο σημειώνονται οι ειδικοί M εκκινητές.

<sup>1</sup> Οι κωδικές ονομασίες των ατόμων-δειγμάτων ήταν: BS12, BS23, BS25, BS33, BS59, BS61, BS68, BS81.

Η πρώτη δοκιμή αφορούσε στο ζευγάρι *lola1/ssMdl2*. Ο εκκινητής *ssMdl2* είναι ειδικός για αλληλουχίες τύπου M (Εικόνα 3. 1. 1). Το προϊόν της PCR από το συγκεκριμένο ζεύγος στα τυπικά M μόρια αναμενόταν να έχει μέγεθος 370 bp. Αντίθετα, τα F μόρια δεν παρήγαγαν κανένα προϊόν. Εντούτοις, όπως φαίνεται στην εικόνα 3. 1. 2, το προϊόν που λάβαμε από τις γονάδες των μη-τυπικών αρσενικών αναλυόταν ηλεκτροφορητικά σε δύο ζώνες. Καμία από τις τελευταίες δεν αντιστοιχούσε στο αναμενόμενο για τυπικό M μόριο προϊόν.

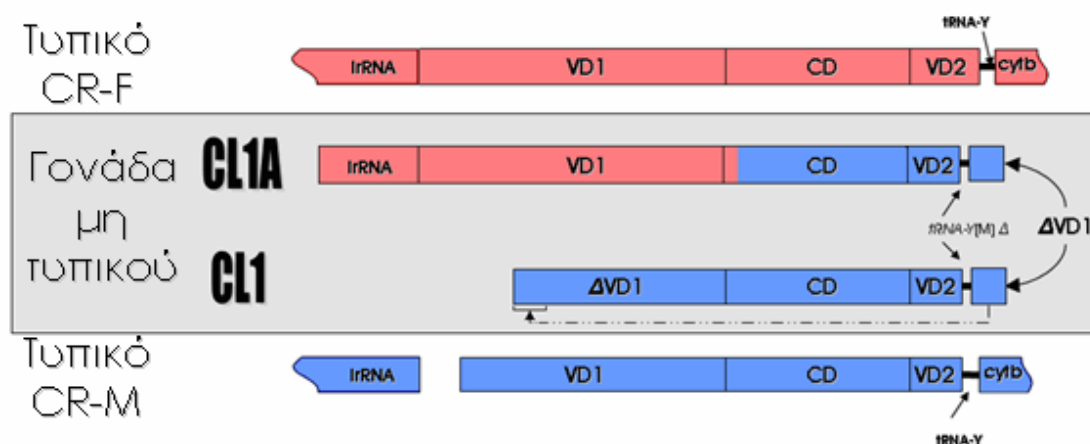


**Εικόνα 3. 1. 2:** Η αντίδραση PCR με τους εκκινητές *lola1* και *ssMdl2* σε δείγματα μη τυπικών αρσενικών. Το ζεύγος αυτό πολλαπλασιάζει μόνο M τύπου αλληλουχίες και δίνει προϊόν μεγέθους 370 bp στα τυπικά M. Στην περίπτωση όμως των μη-τυπικών αρσενικών γονάδων το προϊόν αναλυόταν σε δύο ζώνες μεγαλύτερου μεγέθους. **g:** γονάδα, **s:** σωματικός ιστός.

Τα προϊόντα από κάθε δείγμα κλωνοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η επίπεδο αλληλουχία τους. Η μεγάλη ζώνη (ζώνη 1, Εικόνα 3. 1. 2, 1200 bp) αντιστοιχούσε σε ένα «υβριδικό» CR, το οποίο ενώ από το 5' άκρο του (*lrRNA*) και κατά μήκος του VD1 ήταν τύπου F, μετά τις πρώτες 55 βάσεις στη συντηρημένη περιοχή (CD) μετέπιπτε στον τύπο M, μέχρι το τέλος του CR. Ακολουθούσε ένα ελλειπές *tRNA-Tyr* (*tRNA-Y*) και στη συνέχεια ένα τμήμα DNA VD1 τύπου M. Ο κλώνος ονομάστηκε CL1A και ήταν πανομοιότυπος σε όλα τα μη-τυπικά αρσενικά που εξετάστηκαν, εκτός από μερικά, στα οποία εμφανιζόταν μία έλλειψη 252 bp στο VD1 (Εικόνα 3. 1. 3). Ο δεύτερος κλώνος, CL1 (ζώνη 2, Εικόνα 3. 1. 2), είχε μέγεθος 813 bp και αποτελούσε ένα CR που έμοιαζε με το τυπικό M, αν και εμφάνιζε μερικές ιδιαιτερότητες. Πρώτον, σε σχέση με το τυπικό M απουσίαζε το αρχικό τμήμα του



VD1 μεγέθους 179 bp, ενώ μετά το VD2 ακολουθούσε ένα ελλειπές *tRNA-Tyr* ακριβώς όμοιο με εκείνο του κλώνου CL1A. Τέλος, στο 3' της αλληλουχίας εμφανιζόταν ένα τμήμα VD1-M, όμοιο με εκείνο του κλώνου CL1A, αλλά επίσης όμοιο με το 5' άκρο του ίδιου του κλώνου CL1 (Εικόνα 3. 1. 3).

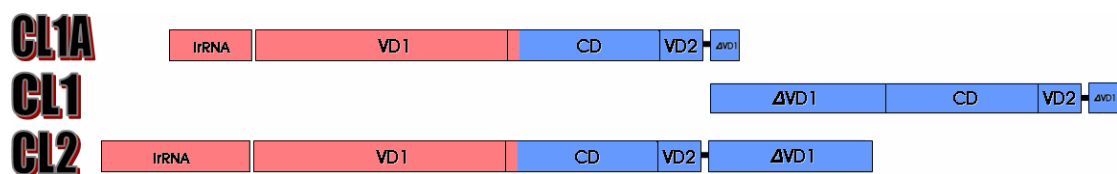


**Εικόνα 3. 1. 3:** Σχηματική αναπαράσταση των προϊόντων της αντίδρασης PCR *lola1* και *ssMdl2* από τη γονάδα των μη-τυπικών αρσενικών (γκρι πλαίσιο) σε σχέση με τα τυπικά CR F και M. Το ανάποδο τριγωνικό πλαίσιο συμβολίζει την έλλειψη μεγέθους 252 bp που εμφάνιζε το VD1 του κλώνου CL1A του δείγματος BS59g (βλ. επίσης ζώνη 1 - Εικόνα 3. 1. 2). Το κενό μεταξύ του *lrRNA* και VD1 στο τυπικό CR-M εκφράζει το μικρότερο μέγεθος του VD1-M σε σχέση με το VD1-F. Η διακεκομμένη γραμμή και το πλαίσιο συμβολίζουν την επανάληψη του αρχικού τμήματος  $\Delta$ VD1 του κλώνου CL1 στο 3' άκρο του. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι περιοχές που είναι F τύπου και με μπλε εκείνες που είναι M τύπου.

Η απόλυτη ομοιότητα του 3' άκρου του κλώνου CL1A με το 5' άκρο του κλώνου CL1 μας οδήγησε στην υπόθεση ότι το CR της γονάδας των μη-τυπικών αρσενικών μυδιών περιείχε ανακατατάξεις και διπλασιασμούς. Θεωρήσαμε ότι ο κλώνος CL1A ακολουθούταν από τον κλώνο CL1 και ότι πιθανότατα υπήρχαν και άλλες επαναλήψεις στη συνέχεια, καθώς στο 3' άκρο του CL1 εντοπιζόταν ένα ακόμη  $\Delta$ VD1 τύπου M. Για να ελέγξουμε την παραπάνω υπόθεση σχεδιάσαμε νέους M-ειδικούς εκκινητές για το CR, βασιζόμενοι στην αλληλουχία του κλώνου CL1 (εκκινητές MG1-f, MG1-r και MG2-f, § 2. 3. 1., Εικόνα 3. 1. 1) καθώς και έναν μη-ειδικό (*gfm16s-f*, § 2. 3. 1) μετατοπισμένο προς το 5' του *lrRNA* σε σχέση με τον *lola1* (Εικόνα 3. 1. 1).

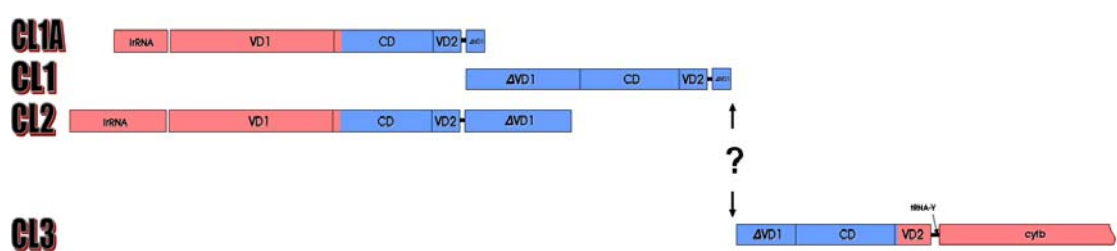
Η απόδειξη ότι ο κλώνος CL1 αποτελούσε τη συνέχεια του κλώνου CL1A στο CR των μορίων της γονάδας των μη-τυπικών αρσενικών προέκυψε μέσω της αντίδρασης *gfm16s-f* / MG1-r (κλώνος CL2). Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης

του κλώνου CL2 κατέδειξε ότι πραγματικά μετά το VD2-M και το ελλειπές *tRNA-Y* του κλώνου CL1A ακολουθούσε ένα ελλειπές VD1 τύπου M (Εικόνα 3. 1. 4). Η αλληλοεπικάλυψη των ομόλογων περιοχών των κλώνων CL1A και CL2 ήταν απόλυτη και στα οχτώ άτομα που εξετάστηκαν.



**Εικόνα 3. 1. 4:** Η επέκταση του κλώνου CL1A επετεύχθη μέσω της αντίδρασης PCR gfm16s-f / MG1-r. Η ανάλυση του προϊόντος της (CL2) υποδείκνυε ότι ίσως οι κλώνοι CL1 και CL1A ήταν συνεχόμενοι και ότι το CR της γονάδας των μη-τυπικών αρσενικών μυδίων ήταν σύνθετο.

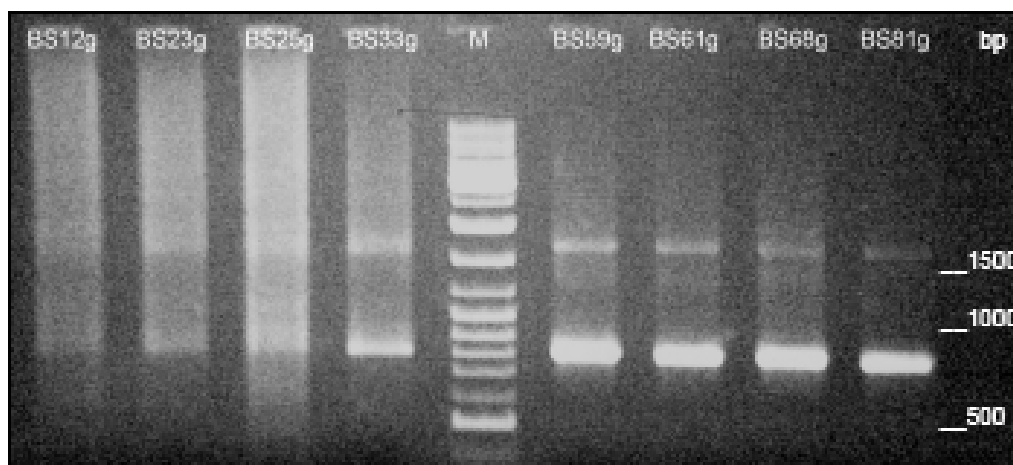
Για να προσδιορίσουμε το 3' άκρο του CR της γονάδας των μη-τυπικών αρσενικών δοκιμάσαμε την αντίδραση MG2-f / Vccob-r (κλώνος CL3). Ο εκκινητής MG2-f σχεδιάστηκε με βάση το ΔVD1M του κλώνου CL1 και είναι ειδικός για M τύπου αλληλουχίες. Η θέση πρόσδεσης του βρίσκεται πιο κοντά προς το 5' άκρο του ΔVD1M σε σχέση με τον εκκινητή MG1-r, ώστε να υπάρχει δυνατότητα αλληλοεπικάλυψης των προϊόντων. Ο δεύτερος εκκινητής προσδενόταν στο 3' άκρο του γονιδίου *Cytb* και δεν εμφάνιζε ειδικότητα F ή M. Ο προσδιορισμός του κλώνου CL3 αποκάλυψε το τμήμα mtDNA που παρουσιάζεται στην Εικόνα 3. 1. 5.



**Εικόνα 3. 1. 5:** Ο εντοπισμός του 3' άκρου του σύνθετου CR της γονάδας των μη-τυπικών αρσενικών με την απόκτηση του κλώνου CL3. Ωστόσο, η συνένωσή του με τους υπόλοιπους κλώνους δεν ήταν ακόμα εφικτή.

Αν και ο κλώνος CL3 φάνηκε να ενώνει το σύνθετο, όπως διαφαινόταν, CR των γονάδων των μη-τυπικών αρσενικών με την κωδική περιοχή του μορίου στο 3' άκρο (το τμήμα του *Cytb* είχε μέγεθος 843 bp και φαινόταν λειτουργικό - στο μέτρο που υπήρχε ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (βλ. § 3. 1. 1. B), δεν μπορούσε να ενωθεί με

τους υπόλοιπους, διότι έτσι όπως είχαν σχεδιαστεί οι αντιδράσεις PCR δεν υπήρχε αλληλοεπικάλυψη με τον κλώνο CL1. Επιπλέον, υπήρχε μία υποψία ότι το κεντρικό τμήμα μπορεί να περιείχε και άλλες επαναλήψεις, καθώς η αλληλοεπικάλυψη των κλώνων CL1 / CL2 δεν ήταν απόλυτη σε όλα τα δείγματα. Για να διαλευκάνουμε τα παραπάνω θέματα προχωρήσαμε στη δοκιμή MG1-f / MG1-r. Επρόκειτο για αντίδραση PCR, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος εκκινητής (ειδικός για VD1 τύπου M) με κατεύθυνση 5' → 3' και αντίστροφα (Εικόνα 3. 1. 1). Εάν ο κλώνος CL3 ήταν η συνέχεια του CL1, τότε το αναμενόμενο προϊόν της αντίδρασης αυτής θα ήταν 801 bp. Ωστόσο, σε όλα τα δείγματα λάβαμε, όχι μόνο το αναμενόμενο προϊόν των 801 bp, αλλά και μία ζώνη με ακριβώς διπλάσιο μέγεθος (Εικόνα 3. 1. 6).



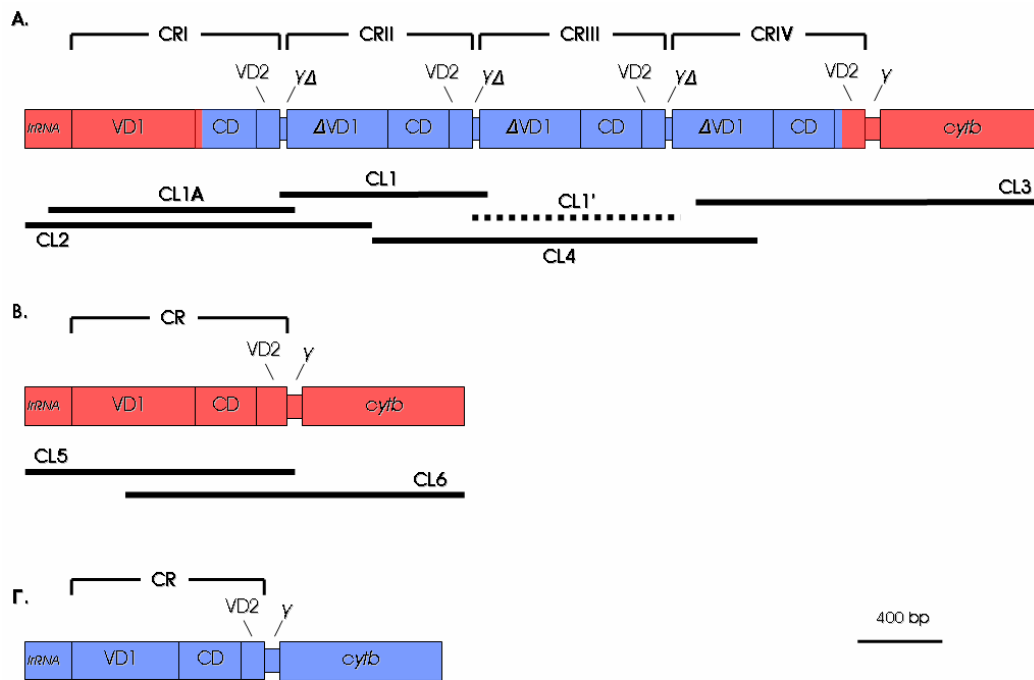
**Εικόνα 3. 1. 6:** Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR με εκκινητές MG1-f / MG1-r. Οι δύο ζώνες αντιστοιχούσαν σε τμήματα DNA με μεγέθη 801bp και 1600 bp.

Η ανάγνωση του μεγάλου προϊόντος της αντίδρασης MG1-f / MG1-r (1600 bp, κλώνος CL4) αποκάλυψε ότι το κεντρικό τμήμα του CR των μη-τυπικών αρσενικών περιείχε, όχι μία, αλλά δύο επαναλήψεις του κλώνου CL1 (CL1 και CL1', Εικόνα 3. 1. 7). Το 3' άκρο του CL4 ταίριαζε απόλυτα με το 5' άκρο του κλώνου CL3.

Τελικά, η συνένωση και η ανάλυση των κλώνων ανέδειξαν 8 πανομοιότυπες αλληλουχίες στην περιοχή του CR, οι οποίες άρχιζαν από τη θέση 16463 του γονιδίου *IrRNA* και ολοκληρώνονταν μέσα στο γονίδιο *Cytb* στη θέση 2068 σύμφωνα με το πλήρες F mtDNA του *M. galloprovincialis* (Mizi et al. 2005, GenBank AY497292). Το μέγεθος των αλληλουχιών κυμαινόταν από 3404 ως 3681 bp. Η λεπτομερής εξέτασή τους και η σύγκρισή τους με γνωστές αλληλουχίες CR M και F mtDNA

μορίων του *M. galloprovincialis* και *M. edulis* αποκάλυψε μία σύνθετη δομή που εξηγεί και το μεγαλύτερο μέγεθός τους σε σχέση με τα τυπικά CR.

Το σύνθετο CR, συγκροτούνταν από τέσσερα επιμέρους CR (CRI, CRII, CRIII, CRIV), τοποθετημένα στη σειρά. Όλα τα επιμέρους CR εμφάνιζαν την τριμερή δομή που χαρακτηρίζει τα τυπικά και διαχωρίζονταν από τρία ελλειπή *tRNA-Tyr* (Εικόνα 3. 1. 7, Παράρτημα Ι).



**Εικόνα 3. 1. 7:** **A.** Σχηματική αναπαράσταση του σύνθετου CR που εντοπίστηκε στη γονάδα των μη-τυπικών αρσενικών μυδιών. **B.** Το τυπικό CR τύπου F που εντοπίστηκε στο σώμα των ίδιων ατόμων. **Γ.** Το τυπικό CR τύπου M (Cao et al. 2004b, Mizi et al. 2005). CL1, CL1A, CL2, CL3, CL4: Οι πέντε κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν για την αναπαράσταση του σύνθετου CR. CL5, CL6: Οι δύο κλώνοι που συνέθεσαν το CR-F των σωματικών ιστών. Δ: Έλλειψη. Υ: *tRNA-Tyr*. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι περιοχές που είναι F τύπου και με μπλε εκείνες που είναι M τύπου.

Το πρώτο τμήμα του CRI ήταν F τύπου και περιλάμβανε ολόκληρο το VD1. Τρία από τα οχτώ μόρια που αναλύθηκαν εμφάνισαν μία έλλειψη 252 bp σε τούτο το τμήμα, δύο από τις οποίες ήταν πανομοιότυπες, ενώ η τρίτη ήταν μετατοπισμένη κατά 23 νουκλεοτίδια προς το 5' άκρο. Στη συνέχεια ακολουθούσε το πρώτο από τα CD του σύνθετου CR (CDI). Αν και η περιοχή αυτή ήταν σχεδόν όμοια μεταξύ των M και F μορίων, η μελέτη των μεταβλητών θέσεων της αλληλουχίας αποκάλυψε ότι

ήταν τύπου M (Παράρτημα I). Συνεπώς, η θέση μετάπτωσης του μορίου από F σε M εντοπίστηκε στο πρώτο τμήμα του CD I που είχε μέγεθος 55 νουκλεοτίδια. Το CRI ολοκληρωνόταν με ένα VD2 τύπου M.

Μεταξύ του CRI και του CR II παρεμβαλλόταν ένα κατάλοιπο του *tRNA-Tyr* M τύπου με μέγεθος 37 bp. Το πρώτο τμήμα του CR II ήταν ένα VD1 τύπου M που εμφάνιζε στην αρχή μία έλλειψη σε σχέση με τα γνωστά VD1-M, μεγέθους 179 bp. Κατά τα άλλα, η αλληλουχία του έμοιαζε σημαντικά με το VD1-M του *M. edulis*. Το VD1 II το διαδεχόταν ένα CD II, το οποίο ήταν τύπου M, όπως τύπου M ήταν και το τρίτο κομμάτι του CR II, το VD2 II. Το ίδιο πρότυπο επαναλαμβανόταν πανομοιότυπο για μία φορά ακόμη, διαμορφώνοντας ένα ακόμα ελλιπές *tRNA-Tyr* και το CR III.

Η μετάβαση από το CR III στο CR IV γινόταν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε προηγούμενα για το CRI, CR II και CR III. Το VD1 IV ήταν όμοιο με τα VD1 II και VD1 III (τύπος M), με τη διαφορά ότι σε μερικά άτομα υπήρχαν μικρές ελλείψεις των 2-3 bp σε ένα σημείο που βρισκόταν 71 bp από την αρχή του, όπου εντοπίζονταν poly(A) σειρές. Το CD IV ήταν και αυτό τύπου M. Και τα τρία CD περιείχαν σε απόλυτα αντίστοιχες θέσεις 6 νουκλεοτίδια που είναι συντηρημένα αποκλειστικά στις τύπου M αλληλουχίες που εξετάστηκαν από το *M. edulis*. Τα τρία τελευταία ήταν κοινά και με το M του *M. galloprovincialis* (Παράρτημα I). Στις πρώτες 48 βάσεις του VD2 III που ακολουθούσε βρέθηκε το δεύτερο σημείο μετάπτωσης της αλληλουχίας, ή οποία επανερχόταν στον τύπο F, συνέχιζε σαν F στο *tRNA-Tyr* και τελικά στο *Cytb*, όπου και ολοκληρωνόταν.

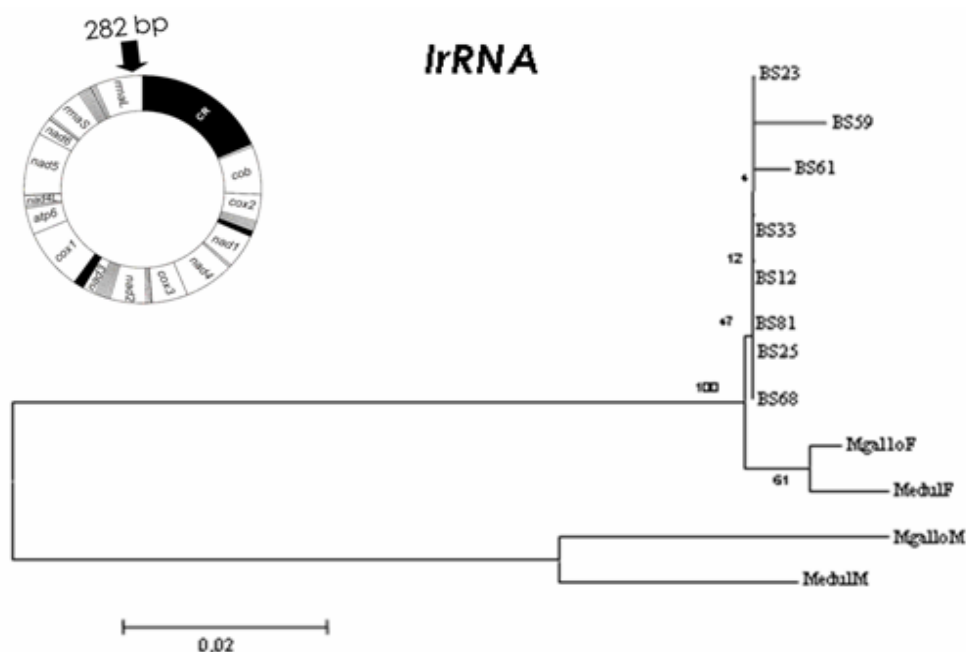
Ταυτόχρονα με το CR των γονάδων, μελετήθηκε το CR από σωματικούς ιστούς των μη-τυπικών αρσενικών και προσδιορίστηκε η πρωτοταγής δομή σε τέσσερα άτομα (BS12, BS59, BS61 και BS81). Το CR των σωματικών ιστών των μη-τυπικών αρσενικών προέκυψε από τη σύνθεση των κλώνων CL5 και CL6 (Εικόνα 3. 1. 7. B). Η ανάλυση των κλώνων αυτών αποκάλυψε ότι το σωματικό CR ήταν όμοιο με το τυπικό CR-F, όπως περιγράφεται σε προηγούμενες μελέτες (Cao et al. 2004b, Mizi et al. 2005). Η συνολική αλληλουχία από το γονίδιο *lrRNA* ως το *Cytb* είχε μέγεθος 2247 bp, ενώ μόνο το CR είχε μήκος 1194 bp. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μία διαδοχική επανάληψη (tandem repeat) μεγέθους 36 bp στην περιοχή του VD1. Ο διπλασιασμός αυτός έχει παρατηρηθεί και σε άλλα τυπικά VD1 τύπου F σε προηγούμενες μελέτες (π.χ. Cao et al. 2004b, απλότυπος gm.6-F).

Θεωρήσαμε ότι το σύνθετο CR ανήκε στο πατρικό μόριο. Το μόριο αυτό ακολουθούσε προφανώς την πατρική γραμμή κληρονομησης, διότι εντοπιζόταν

σταθερά σε όλες τις γονάδες των μη-τυπικών αρσενικών ατόμων. Το τυπικό CR-F αποδόθηκε στο μητρικώς κληρονομούμενο μόριο mtDNA, καθώς κυριαρχούσε στους σωματικούς ιστούς των παραπάνω ατόμων.

## B. Οι κωδικές περιοχές

Το σύνθετο CR γειτονεύει με τα γονίδια *IrRNA* και *Cytb*. Στο 5' άκρο κάθε αλληλουχίας που αναλύσαμε (κλώνος CL2) εντοπίστηκε ένα τμήμα του γονιδίου *IrRNA* μεγέθους 282 bp.



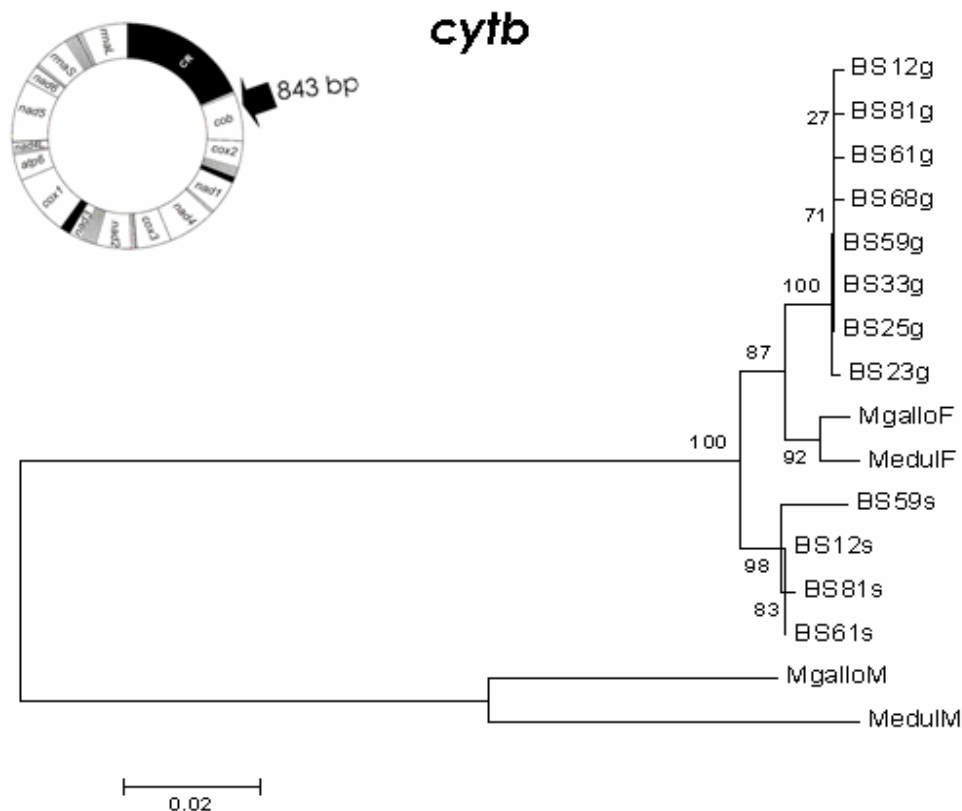
**Εικόνα 3. 1. 8:** N-J (Kimura 2-parameter, 1000 replicates) δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε από τμήμα 282 bp του γονιδίου *IrRNA* από τα μόρια με το σύνθετο CR καθώς και από γνωστά M και F. MgalloF, MgallM: Τα ομόλογα τμήματα από τα πλήρη F και M γονιδιώματα του *M. galloprovincialis* (GenBank AY497292 και AY363687, αντίστοιχα). MedulF, MedulM: Τα ομόλογα τμήματα από τα πλήρη F και M γονιδιώματα του *M. edulis* (GenBank AY484747 και AY823623, αντίστοιχα).

Τα τμήματα *IrRNA* που προηγούνταν του σύνθετου CR συγκροτούσαν έναν ξεχωριστό υποκλάδο, ο οποίος ομαδοποιούταν ξεκάθαρα με τον κλάδο που σχημάτιζαν γνωστές αλληλουχίες τύπου F από τα είδη *M. galloprovincialis* και *M. edulis* (Εικόνα 3. 1. 8). Η διαφοροποίηση των συγκεκριμένων *IrRNA* αλληλουχιών

από τις F δεν ξεπερνούσε το 2.2%, ενώ μεταξύ αυτών και των M κυμαινόταν από 14% έως 16%, όπως συνέβαινε και μεταξύ των F και M (Παράρτημα II).

Μετά το σύνθετο CR (κλώνος CL3), ακολουθούσε το *tRNA-Tyr* και ένα τμήμα που αποτελεί τις πρώτες 843 βάσεις του κυτοχρώματος *b* (*Cytb*). Το *tRNA-Tyr* ήταν σε όλο το μήκος του (68 bp) πανομοιότυπο με το *tRNA-Tyr* τύπου F των *M. galloprovincialis* και *M. edulis*. Το *Cytb* ήταν F, αλλά ομαδοποιήθηκε χωριστά, τόσο από δημοσιευμένες F αλληλουχίες, όσο και από τις F που ανακτήθηκαν από τους σωματικούς ιστούς τεσσάρων από τα οκτώ μη-τυπικά αρσενικά (Εικόνα 3. 1. 9).

Ήταν φανερό ότι το σύνθετο CR συνόρευε με κωδικές περιοχές που χαρακτηρίζονταν ως F, αλλά διακρίνονταν ξεκάθαρα από εκείνες που εντοπίστηκαν στα σωματικά δείγματα να περιστοιχίζουν το τυπικό CR-F. Διακρίνονταν επίσης και από τις F αλληλουχίες που έχουν δημοσιευτεί σε προηγούμενες μελέτες, τόσο από το είδος *M. galloprovincialis* όσο και από το *M. edulis*.



**Εικόνα 3. 1. 9:** N-J (Kimura 2-parameter, 1000 replicates) δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε από τμήμα 843 bp του γονιδίου *Cytb* αρρενοποιημένων, M και F μορίων. **g:** γονάδα μη τυπικού αρσενικού, **s:** σώμα μη τυπικού αρσενικού. MgalloF, MgalloM: Τα ομόλογα τμήματα από τα πλήρη F και M γονιδιώματα του *M. galloprovincialis* (GenBank AY497292 και AY363687, αντίστοιχα). MedulF, MedulM: Τα ομόλογα τμήματα από τα πλήρη F και M γονιδιώματα του *M. edulis* (GenBank AY484747 και AY823623, αντίστοιχα).

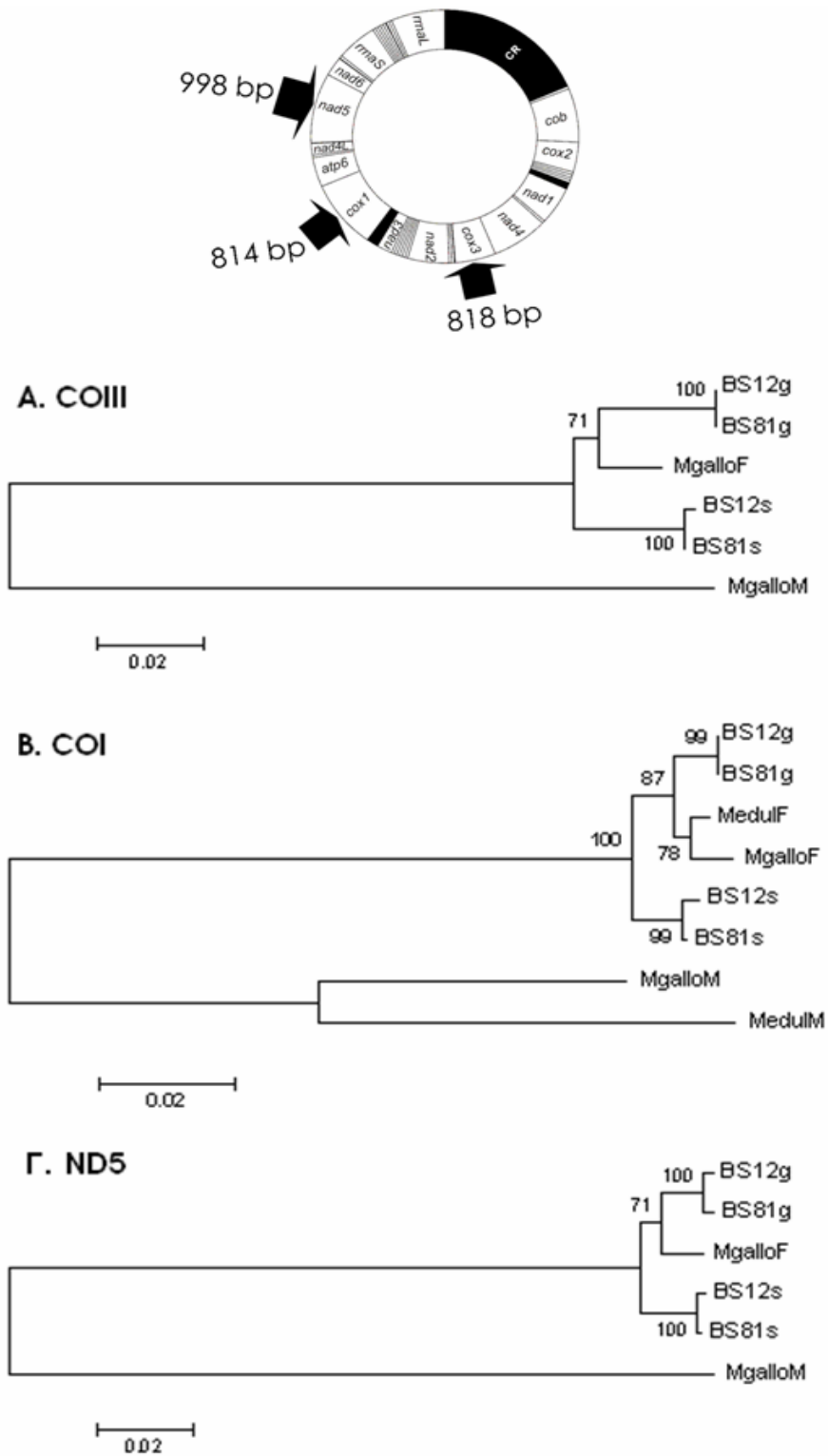
Τμήματα των γονιδίων *COI*, *COIII* και *ND5* είχαν παλαιότερα μελετηθεί στα ίδια μη-τυπικά αρσενικά άτομα με ανάλυση των περιοριστικών τους προτύπων (Θεολογίδης 2002). Σε εκείνη την εργασία είχε αποκαλυφθεί ότι τα άτομα αυτά περιείχαν ένα ή δύο διαφορετικά μόρια που εμφάνιζαν το πρότυπο F. Αποφασίσαμε να προσδιορίσουμε την πρωτοδιάταξη των παραπάνω τμημάτων από δείγματα γονάδων και σωματικών ιστών για να διερευνήσουμε πόσο συγγενές ήταν τελικά το κωδικό τμήμα του μορίου με το σύνθετο CR με τα υπόλοιπα F.

Η πρώτη περιοχή αφορούσε σε τμήμα του γονιδίου *COIII* με μέγεθος 818 bp, η δεύτερη σε ένα τμήμα του γονιδίου *COI* μεγέθους 814 bp και η τρίτη περιλάμβανε το μεγαλύτερο μέρος (998 bp) του γονιδίου *ND5*. Όπως προέκυψε από την ανάλυση των αλληλουχιών, οι γονάδες των μη-τυπικών αρσενικών περιείχαν ένα μόριο που ενώ ήταν F τύπου ήταν συνάμα αρκετά διαφορετικό από το σωματικό τους F, καθώς επίσης και από άλλα τυπικά F των ειδών *M. galloprovincialis* και *M. edulis*.

Η μελέτη των τριών απομακρυσμένων από το CR περιοχών του mtDNA μη-τυπικών αρσενικών μυδίων έδωσε ανάλογα αποτελέσματα με εκείνα που αφορούσαν στις γειτονικές περιοχές του CR (Εικόνα 3. 1. 10). Τα μόρια των γονάδων είχαν σύνθετη περιοχή ελέγχου και κωδικές περιοχές τύπου F, οι οποίες, ωστόσο, ομαδοποιούνταν πάντοτε και ανεξαρτήτως γενετικού τόπου σε ξεχωριστό κλάδο από τις σωματικές F καθώς και από άλλες γνωστές F αλληλουχίες. Η μέση νουκλεοτιδική απόσταση μεταξύ των σύνθετων μορίων ήταν 0.24% (SE = 0.2, Kimura 2-parameter model), ενώ μεταξύ των σύνθετων και των σωματικών ή των άλλων F ήταν 2.05% (SE = 0.4, Kimura 2-parameter model).

Όλες οι παρατηρήσεις από τη μελέτη του CR και των κωδικών περιοχών των μορίων που εντοπίζονταν στις γονάδες των μη-τυπικών αρσενικών μυδίων συνηγορούσαν υπέρ της άποψης ότι στο μύδι *M. galloprovincialis*, εκτός από τα ήδη προσδιορισμένα τυπικά F και M γονιδιώματα, υπήρχε και ένα τρίτο. Το νέο αυτό μόριο αποτελούσε μία ξεχωριστή οντότητα με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά: είχε σύνθετη ρυθμιστική περιοχή (περιοχή ελέγχου) και τύπου F κωδικές περιοχές, οι οποίες όμως ομαδοποιούνταν ξεχωριστά από όλα τα γνωστά F γονιδιώματα. Υποθέσαμε ότι το νέο αυτό σύνθετο γονιδίωμα θα μπορούσε να είναι «αρρενοποιημένο».



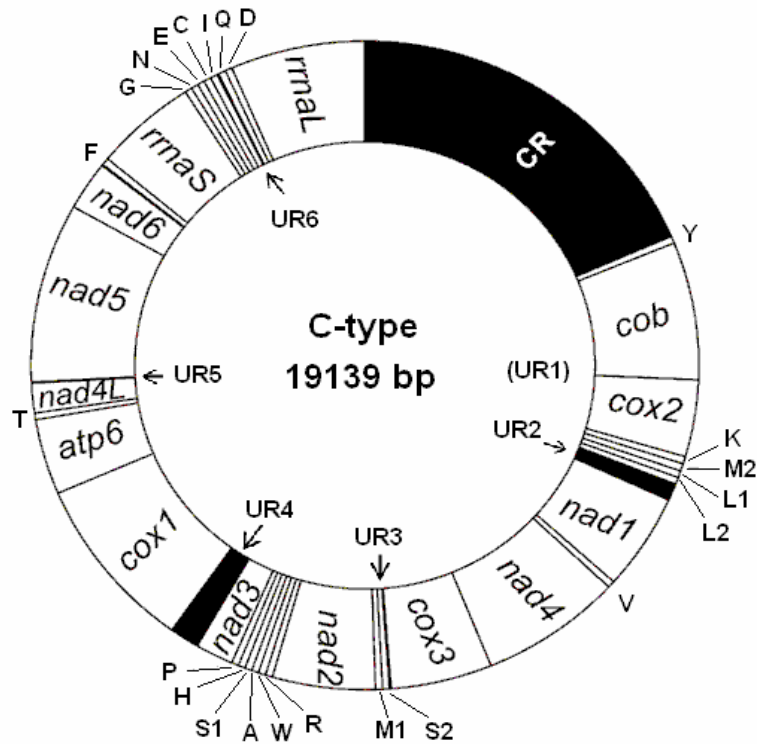


**Εικόνα 3. 1. 10:** N-J (Kimura 2-parameter, 1000 replicates) δενδρογράμματα που κατασκευάστηκαν από τμήματα των γονιδίων *COIII* (Α), *COI* (Β) και *ND5* (Γ). **g:** γονάδα μη τυπικού αρσενικού, **s:** σώμα μη τυπικού αρσενικού. MgallO, MgallM: Τα ομόλογα τμήματα από τα πλήρη F και M γονιδιώματα του *M. galloprovincialis* (GenBank AY497292 και AY363687, αντίστοιχα). MedulF, MedulM: Τα ομόλογα τμήματα από τα πλήρη F και M γονιδιώματα του *M. edulis* (GenBank AY484747 και AY823623, αντίστοιχα).

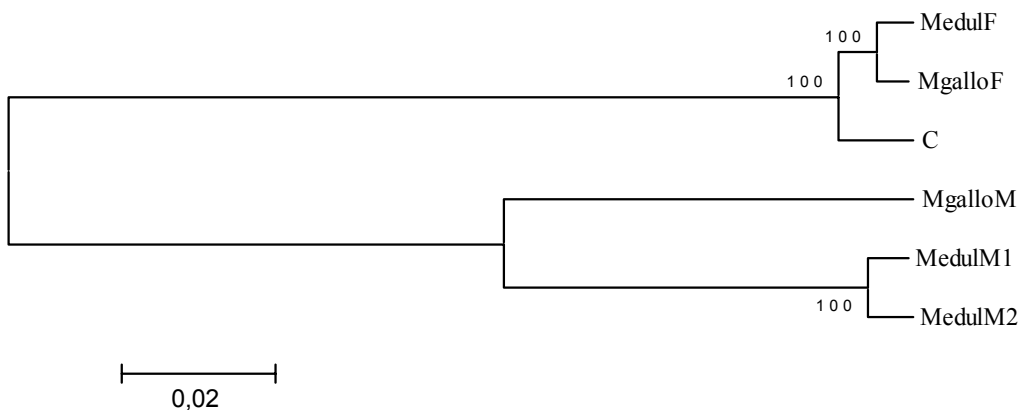
## Γ. Προσδιορισμός της πλήρους πρωτοδιάταξης του σύνθετου γονιδιώματος: το γονιδίωμα C

Η ύπαρξη ενός τρίτου γονιδιώματος mtDNA στο είδος *M. galloprovincialis* φαινόταν πλέον βέβαιη. Για να αποκτήσουμε πλήρη εικόνα για τη δομή και το χαρακτήρα του προχωρήσαμε στον προσδιορισμό ολόκληρης της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας. Αρχικά επιχειρήσαμε να ανακτήσουμε όλο το μόριο σε δύο ή τρεις κλώνους με αντιδράσεις long-PCR. Το εγχείρημα απέτυχε, γεγονός που αποδόθηκε στην παλαιότητα των δειγμάτων και στην εκτεταμένη και επανειλημμένη χρήση τους σε διάφορες προγενέστερες μελέτες. Η ανάκτηση όλου του μορίου έγινε τελικά εφικτή μέσω της σύνθεσης των τμημάτων του CR (§ 3. 1. 1. A) και της κωδικής περιοχής που ανακτήθηκε με τη σύνθεση 12 τμημάτων που ήταν προϊόντα συμβατικών αντιδράσεων PCR. Ο σχεδιασμός των αντιδράσεων έγινε με τέτοιον τρόπο ώστε να εξασφαλιστεί η συνένωση των τμημάτων με βάση αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές τους (§ 2. 3. 3).

Το γονιδίωμα είχε συνολικό μέγεθος 19139 bp. Η διαφορά μεγέθους σε σχέση με τα γνωστά F μόρια του γένους *Mytilus* οφειλόταν αποκλειστικά στη μεγαλύτερη, σύνθετη ρυθμιστική του περιοχή (CR, § 3. 1. 1. A). Η σειρά με την οποία ήταν τοποθετημένα τα γονίδια κατά μήκος του μορίου, καθώς και ο προσανατολισμός τους, ήταν ίδια με τα γνωστά F και M των *M. galloprovincialis* και *M. edulis* (Εικόνα 3. 1. 11). Αναλυτικά, οι νουκλεοτιδικές αποστάσεις (K) και οι ρυθμοί συνώνυμων (Ks) και μη συνώνυμων (Ka) νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων μεταξύ των τελευταίων και του νέου μορίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. 1. 1. Από τον Πίνακα 3. 1. 1 απουσιάζουν οι υπολογισμοί που αφορούν στα γονίδια *Cytb* και *ND6*. Ο λόγος θα εξηγηθεί σε επόμενη παράγραφο (§ 3. 1. 4). Ονομάσαμε το νέο γονιδίωμα C (Compound – εξαιτίας της σύνθετης ρυθμιστικής περιοχής του). Το μόριο C αποδείχτηκε πολύ συγγενές με τα F (βλ. Παράρτημα III). Ωστόσο, όπως είχαν δείξει και οι προηγούμενες αποσπασματικές φυλογενετικές αναλύσεις κωδικών τμημάτων του μορίου, δημιούργησε έναν ξεχωριστό κλάδο μέσα στα F γονιδιώματα (Εικόνα 3. 1. 12).



**Εικόνα 3. 1. 11:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γονιδιώματος C. Η μη κωδική περιοχή UR1 που είχε προσδιοριστεί στα τυπικά F και M του *M. galloprovincialis* δεν υπάρχει στο νέο γονιδίωμα, διότι το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου *Cytb* βρίσκεται μετατοπισμένο κατά 114 νουκλεοτίδια προς το 3' άκρο (αναλυτικότερα βλ. § 3. 1. 6).



**Εικόνα 3. 1. 12:** N-J (Kimura 2-parameter, 1000 replicates) δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε από τα πλήρη F, M και C γονιδιώματα (15756 bp) των μυδιών *M. edulis* και *M. galloprovincialis*. Το CR δεν περιλαμβάνεται στην ανάλυση, ούτε η διπλασιασμένη περιοχή του M μορίου του *M. galloprovincialis* (βλ. Mizi et al. 2005).

Γενετικός τόπος	Γενετική απόσταση & (Τυπικό σφάλμα)					
	C ως προς <i>F M. galloprovincialis</i> / <i>M. edulis</i>			C ως προς <i>M M.. galloprovincialis</i> / <i>M. edulis</i>		
	K	Ks	Ka	K	Ks	Ka
<i>Cytb</i> *						
<i>COII</i>	<b>0.008</b> (0.003) / <b>0.008</b> (0.003)	<b>0.032</b> (0.010) / <b>0.032</b> (0.009)	<b>0.002</b> (0.001) / <b>0.000</b> (0.000)	<b>0.239</b> (0.019) / <b>0.221</b> (0.015)	<b>1.887</b> (0.124) / <b>1.398</b> (0.094)	<b>0.056</b> (0.017) / <b>0.059</b> (0.018)
<i>ND1</i>	<b>0.014</b> (0.004) / <b>0.017</b> (0.004)	<b>0.051</b> (0.014) / <b>0.060</b> (0.015)	<b>0.003</b> (0.002) / <b>0.003</b> (0.002)	<b>0.263</b> (0.019) / <b>0.244</b> (0.016)	<b>1.289</b> (0.096) / <b>1.179</b> (0.095)	<b>0.087</b> (0.013) / <b>0.077</b> (0.013)
<i>ND4</i>	<b>0.039</b> (0.005) / <b>0.038</b> (0.005)	<b>0.152</b> (0.017) / <b>0.152</b> (0.017)	<b>0.004</b> (0.002) / <b>0.003</b> (0.002)	<b>0.274</b> (0.018) / <b>0.280</b> (0.019)	<b>1.345</b> (0.101) / <b>1.579</b> (0.111)	<b>0.093</b> (0.012) / <b>0.085</b> (0.011)
<i>COIII</i>	<b>0.038</b> (0.006) / <b>0.037</b> (0.005)	<b>0.155</b> (0.028) / <b>0.143</b> (0.024)	<b>0.003</b> (0.002) / <b>0.005</b> (0.002)	<b>0.249</b> (0.021) / <b>0.235</b> (0.019)	<b>1.592</b> (0.126) / <b>1.567</b> (0.121)	<b>0.060</b> (0.012) / <b>0.046</b> (0.009)
<i>ND2</i>	<b>0.037</b> (0.007) / <b>0.035</b> (0.006)	<b>0.134</b> (0.018) / <b>0.110</b> (0.017)	<b>0.007</b> (0.002) / <b>0.011</b> (0.003)	<b>0.339</b> (0.023) / <b>0.345</b> (0.026)	<b>1.796</b> (0.125) <b>1.761</b> (0.120)	<b>0.141</b> (0.028) / <b>0.148</b> (0.031)
<i>ND3</i>	<b>0.026</b> (0.006) / <b>0.035</b> (0.008)	<b>0.101</b> (0.032) / <b>0.142</b> (0.043)	<b>0.004</b> (0.004) / <b>0.004</b> (0.004)	<b>0.144</b> (0.023) / <b>0.272</b> (0.036)	<b>0.679</b> (0.099) / <b>2.690</b> (0.196)	<b>0.030</b> (0.012) / <b>0.061</b> (0.016)
<i>COI</i>	<b>0.023</b> (0.004) / <b>0.017</b> (0.003)	<b>0.090</b> (0.030) / <b>0.059</b> (0.022)	<b>0.002</b> (0.001) / <b>0.003</b> (0.001)	<b>0.205</b> (0.008) / <b>0.221</b> (0.011)	<b>1.277</b> (0.081) / <b>1.619</b> (0.089)	<b>0.035</b> (0.005) / <b>0.033</b> (0.006)
<i>ATP6</i>	<b>0.018</b> (0.004) / <b>0.020</b> (0.004)	<b>0.066</b> (0.017) / <b>0.071</b> (0.019)	<b>0.004</b> (0.003) / <b>0.004</b> (0.003)	<b>0.251</b> (0.018) / <b>0.264</b> (0.020)	<b>1.407</b> (0.161) / <b>1.470</b> (0.218)	<b>0.072</b> (0.010) / <b>0.084</b> (0.013)
<i>ND4L</i>	<b>0.011</b> (0.007) / <b>0.007</b> (0.004)	<b>0.048</b> (0.023) / <b>0.031</b> (0.019)	<b>0.000</b> (0.000) / <b>0.000</b> (0.000)	<b>0.328</b> (0.041) / <b>0.329</b> (0.041)	<b>1.789</b> (0.126) / <b>1.767</b> (0.121)	<b>0.115</b> (0.024) / <b>0.097</b> (0.022)
<i>ND5</i>	<b>0.020</b> (0.003) / <b>0.019</b> (0.003)	<b>0.072</b> (0.011) / <b>0.070</b> (0.010)	<b>0.003</b> (0.001) / <b>0.003</b> (0.001)	<b>0.293</b> (0.015) / <b>0.289</b> (0.014)	<b>1.357</b> (0.080) / <b>1.363</b> (0.092)	<b>0.113</b> (0.008) / <b>0.108</b> (0.008)
<i>ND6</i> *						

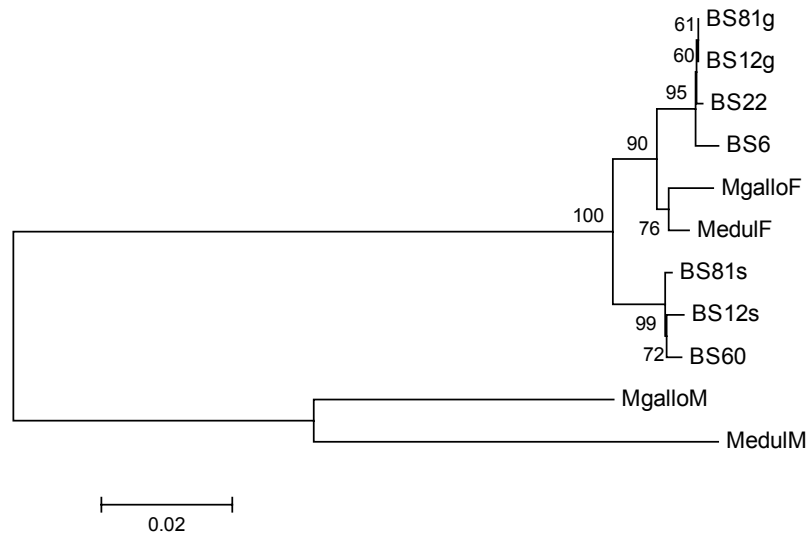
**Πίνακας 3. 1. 1:** Γενετικές αποστάσεις (K) και ρυθμοί συνώνυμων (Ks) και μη-συνώνυμων αντικαταστάσεων (Ka) του μορίου C από τα τυπικά F και M μόρια των *M. galloprovincialis* και *M. edulis*.

### 3. 1. 2. Η κατανομή των μορίων F, M και C στα θηλυκά και αρσενικά άτομα σε πληθυσμούς του *M. galloprovincialis*:

#### A. Πληθυσμιακή μελέτη

Μετά από τον προσδιορισμό του νέου γονιδιώματος και αφού αναλύσαμε *in silico* τα περιοριστικά πρότυπα των κωδικών περιοχών του, διαπιστώσαμε ότι τα τελευταία συνέπιπταν με τα περιοριστικά πρότυπα των αντίστοιχων τμημάτων mtDNA που είχαν αναγνωρισθεί σε θηλυκές γονάδες, σε προγενέστερες πληθυσμιακές μελέτες (Ladoukakis et al. 2002, Θεολογίδης 2002). Αναζητήσαμε και αναλύσαμε τα δείγματα αυτά με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που μελετήσαμε τις γονάδες των μη-τυπικών αρσενικών. Οι δοκιμές περιλάμβαναν την αναζήτηση των τεσσάρων κλώνων του σύνθετου CR (CL1, CL2, CL3 και CL4) και κατέδειξαν (κρίνοντας με βάση τα μεγέθη των προϊόντων) ότι το σύνθετο CR ήταν πιθανότατα παρόν και σε θηλυκές γονάδες μυδιών της Μαύρης θάλασσας και της Μεσογείου.

Προσδιορίσαμε την πρωτοδιάταξη του CR σε τρία από αυτά τα θηλυκά άτομα (BS6, BS22 και BS47). Μετά την ανάλυση και επεξεργασία των αλληλουχιών που προέκυψαν, διαπιστώσαμε ότι το CR αυτών των θηλυκών γονάδων ήταν πανομοιότυπο με εκείνο των μη-τυπικών αρσενικών γονάδων (τύπος C, Παράρτημα I). Επιπλέον, για να βεβαιωθούμε ότι επρόκειτο για το ίδιο μόριο μελετήσαμε τις τρεις κωδικές περιοχές που είχαμε μελετήσει και στην περίπτωση των μη-τυπικών αρσενικών γονάδων (*COIII*, *COI* και *ND5*) από δύο άτομα (BS6 και BS22). Για σύγκριση, αναλύσαμε τις ίδιες κωδικές περιοχές και από ένα θηλυκό που δεν φαινόταν να περιέχει το σύνθετο μόριο (BS60). Οι αναλύσεις έδειξαν ότι και οι τρεις κωδικές περιοχές ήταν πανομοιότυπες, τόσο μεταξύ των θηλυκών BS6 και BS22, όσο και με εκείνες του γονιδιώματος C (Εικόνα 3. 1. 13).



**Εικόνα 3. 1. 13:** N-J (Kimura 2-parameter, 1000 replicates) δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε από τη συνένωση τμημάτων των γονιδίων COIII, COI και ND5. **g:** γονάδα μη τυπικού αρσενικού, **s:** σώμα μη τυπικού αρσενικού. BS6, BS22 και BS60: Τρία από τα θηλυκά άτομα που προστέθηκαν στην ανάλυση. MgalloF, MgallM: Τα ομόλογα τμήματα από τα πλήρη F και M γονιδιώματα του *M. galloprovincialis* (GenBank AY497292 και AY363687, αντίστοιχα). MedulF, MedulM: Τα ομόλογα τμήματα από τα πλήρη F και M γονιδιώματα του *M. edulis* (GenBank AY484747 και AY823623, αντίστοιχα).

Αν και οι αλληλουχίες του θηλυκού BS60, το οποίο δεν περιείχε το νέο σύνθετο μόριο, τοποθετήθηκαν στο «σωματικό» κλάδο των μη-τυπικών αρσενικών υποδηλώνοντας ότι η προηγούμενη απόφασή μας να θεωρήσουμε τα τελευταία μητρικής προέλευσης ήταν σωστή, φάνηκε να δημιουργείται κάποια ασάφεια λόγω της ύπαρξης «μη-τυπικών» θηλυκών που περιείχαν ένα μόριο που προηγουμένως είχαμε χαρακτηρίσει ως αρρενοποιημένο. Ότι κληρονομείται, δηλαδή, μόνο πατρικά. Οι νέες παρατηρήσεις φάνηκε να αντικρούουν αυτή τη θέση. Αποφασίσαμε να διαλευκάνουμε το θέμα αναζητώντας το τυπικό F μόριο σε αυτά τα «μη-τυπικά» θηλυκά, ενώ ταυτόχρονα διεξήγαμε μία ευρύτερη πληθυσμιακή μελέτη για να ξεκαθαρίσουμε πού και πόσο συχνά, σε σχέση με τα τυπικά F και M, απαντάται το μόριο C στους πληθυσμούς του *M. galloprovincialis*. Ο έλεγχος που εφαρμόσαμε στηρίχθηκε στη διάκριση των τριών τύπων CR με ειδικά σχεδιασμένες αντιδράσεις PCR.

Η διάκριση μεταξύ CR-M και σύνθετου CR έγινε δυνατή με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές gfm16s-f και MG1-r (η ίδια αντίδραση που έδωσε τον κλώνο CL2, § 2. 3. 1). Με βάση το μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης

χαρακτηρίστηκε το είδος ή τα είδη CR που υπάρχουν σε κάποιο δείγμα, καθώς το CR-M δίνει προϊόν μεγέθους 732 bp, ενώ το σύνθετο αρρενοποιημένο CR παράγει ένα κύριο προϊόν μεγέθους 1703 bp και σε ορισμένες περιπτώσεις μαζί με ένα πιο αχνό μεγέθους 2491 bp. Αντίθετα, η παρουσία CR τύπου F δεν ανιχνεύεται από την παραπάνω δοκιμή καθώς ο εκκινητής MG1-r είναι ειδικός για αλληλουχίες CR τύπου M. Το CR-F εντοπιζόταν με μία άλλη αντίδραση PCR. Ήταν η αντίδραση που προηγουμένως είχε χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση του κλώνου CL6 (§ 2. 3. 1) και περιλάμβανε το ζεύγος των εκκινητών VD1F-f και Vccob-r. Η αντίδραση αυτή δίνει προϊόν μόνο όταν υπάρχει CR τύπου F στο εκάστοτε δείγμα

Διαπιστώσαμε ότι όλα τα «μη-τυπικά» θηλυκά, τελικά, περιείχαν και το τυπικό F μόριο, από ένα εκ των οποίων λάβαμε την αλληλουχία της ρυθμιστικής του περιοχής. Η παρουσία του σύνθετου μορίου επιβεβαιώθηκε επίσης και σε πληθυσμούς *M. galloprovincialis* από τη Μεσόγειο. Τα αποτελέσματα της πληθυσμιακής μελέτης συνοψίζονται στον Πίνακα 3. 1. 2.

Αρσενικά			Θηλυκά	
Γονάδα	Σώμα	άτομα/ σύνολο (συχνότητα)	Γονάδα και σώμα	άτομα/ σύνολο (συχνότητα)
M, F	(F, M)*	62/98 (0.633)	F	54/68 (0.794)
C, F	F	22/98 (0.224)	F, C	7/68 (0.103)
C, F	F, C	8/98 (0.082)	F, M	5/68 (0.074)
M, C	F, C, M	6/98 (0.061)	F, C, M	2/68 (0.029)

**Πίνακας 3. 1. 2:** Η κατανομή των μορίων C, F και M στους ιστούς αρσενικών και θηλυκών μυδιών *M. galloprovincialis* από τη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα. \*: Η παρένθεση υποδηλώνει την απουσία σωματικών δειγμάτων σε αρκετά τυπικά αρσενικά άτομα.

Όλα τα αρσενικά άτομα περιείχαν τουλάχιστον δύο μόρια εκ των οποίων το ένα ήταν το τυπικό F. Επιπρόσθετα, εντοπίστηκαν και τριπλασμικά αρσενικά και θηλυκά άτομα (F, M και C, βλ. επίσης στην παράγραφο 3. 1. 3, Εικόνα 3. 1. 16. II & III και το Παράρτημα II2, II3 και II4). Η «συμπεριφορά» του γονιδιώματος C, όπως αποκαλυπτόταν από την πληθυσμιακή ανάλυση των γονιδιωμάτων του μυδιού, δεν

έδειχνε να διαφέρει από εκείνη που θα ανέμενε κανείς από ένα πατρικώς κληρονομούμενο μόριο. Η συχνότητά του στα θηλυκά άτομα δεν διέφερε ουσιαστικά από την αντίστοιχη του M γονιδιώματος σε αυτά (SE=0.0368). Ο εντοπισμός των γονιδιωμάτων C και M σε θηλυκά άτομα θα μπορούσε να οφείλεται σε διαρροή του mtDNA του σπέρματος, όπως είχε νωρίτερα εκφραστεί αναφορικά με τον εντοπισμό του M μορίου σε θηλυκούς ιστούς (Stewart et al. 1995, Garrido-Ramos et al. 1998, Dalziel and Stewart 2002), ή ακόμη και σε περιστασιακή, παθητική μεταβίβαση πατρικών μορίων μέσω των θηλυκών γαμετών (Obata and Komaru 2005). Με τον ίδιο τρόπο ήταν δυνατό να εξηγηθεί και η παρουσία αρσενικών και θηλυκών τριπλασμικών ατόμων, δηλαδή ατόμων που περιείχαν και τα τρία γονιδιώματα (§ 4. 3). Το σύνθετο γονιδίωμα βρέθηκε, τέλος, και σε σωματικούς ιστούς των μη-τυπικών αρσενικών, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί είτε σε διαρροή πατρικού mtDNA, είτε σε μόλυνση των σωματικών δειγμάτων από υλικό της γονάδας κατά την απομόνωση του DNA.

#### **B. Μη ύπαρξη ομοπλασμικών αρσενικών ατόμων: αναθεώρηση των αποτελεσμάτων Saavedra et al. (1997)**

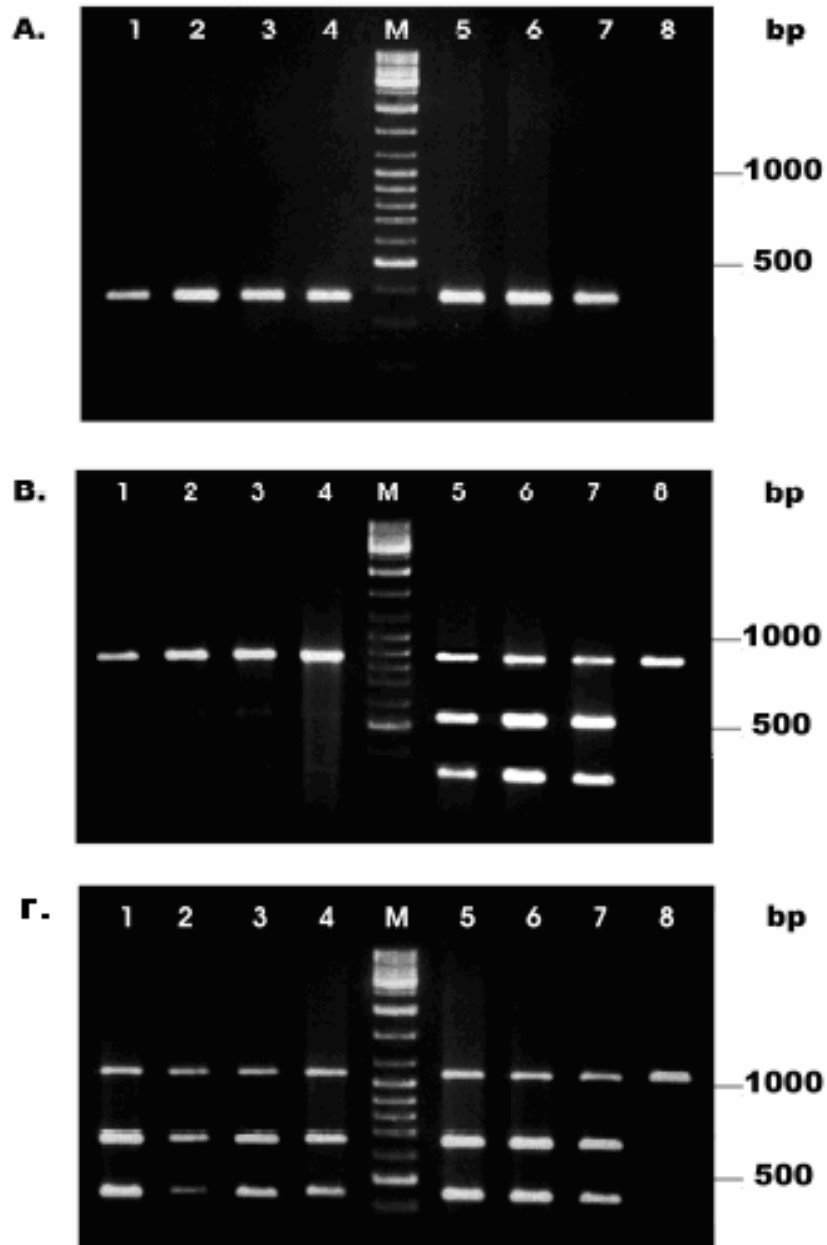
Σύμφωνα με την πληθυσμιακή μελέτη (§ 3. 1. 2. A), τα αρσενικά άτομα *M. galloprovincialis* της Μαύρης Θάλασσας που παλαιότερα θεωρούνταν ομοπλασμικά (Ladoukakis et al. 2002, Θεολογίδης 2002) περιείχαν τελικά δύο μόρια, ένα εκ των οποίων ήταν το C. Η αδυναμία εντοπισμού του δεύτερου μορίου οφειλόταν στην ταυτότητα των περιοριστικών προτύπων των δύο πανομοιότυπων μορίων, του F και του C, στις περιοχές που αναλύθηκαν. Μετά τον προσδιορισμό του σύνθετου CR που χαρακτήριζε το μόριο C, η διάκρισή τους κατέστη ευκολότερη. Ωστόσο, υπήρχαν και άλλες μελέτες που ανέφεραν την παρουσία ομοπλασμικών αρσενικών *M. galloprovincialis* (Saavedra et al. 1997). Με βάση μάλιστα αυτές τις παρατηρήσεις είχε προταθεί ότι η «αρρενοποίηση» θα μπορούσε να έχει σαν αφετηρία την αποτυχία εισόδου του M μορίου σε ένα αρσενικό άτομο και την επακόλουθη αντικατάστασή του από το μόριο F. Ήταν προφανές ότι η παρατήρηση ομοπλασμικών αρσενικών ατόμων έχει σοβαρές συνέπειες στην κατανόηση του φαινομένου της αναστροφής του τρόπου μεταβίβασης του mtDNA στα μύδια. Για αυτόν το λόγο προχωρήσαμε



στην επανεξέταση των μη-τυπικών αρσενικών *M. galloprovincialis* που αναφέρονταν από τους Saavedra et al. (1997).

Οι Saavedra et al. (1997), μελετώντας τον τύπο των μορίων που περιέχονταν σε αρσενικά και θηλυκά άτομα του είδους *M. galloprovincialis* μέσω της ανάλυσης των περιοριστικών προτύπων ενός τμήματος του γονιδίου *COIII*, κατέληξαν στην παρατήρηση ομοπλασμικών αρσενικών μυδίων. Τα περισσότερα από αυτά ήταν απόγονοι του τυπικού αρσενικού ατόμου M70. Επαναλάβαμε τη δοκιμή των Saavedra et al. (1997) για το τμήμα του *COIII*, ενώ παράλληλα μελετήσαμε το CR καθώς και τα περιοριστικά πρότυπα ενός τμήματος 1108 bp του γονιδίου *COI*. Ο τύπος του CR προσδιορίστηκε μέσω δοκιμών PCR με το ζεύγος των εκκινητών *lola1/ssMdl2*. Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3. 1. 1. A, η αντίδραση αυτή παράγει ένα προϊόν μεγέθους 370 bp παρουσία του τυπικού M μορίου και δύο προϊόντα με μεγέθη 1200 bp και 813 bp όταν υπάρχει το μόριο C. Αντίθετα, δεν παράγεται κανένα προϊόν παρουσία του μορίου F.

Αν και η επανάληψη της δοκιμής για το *COIII* έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με εκείνα που είχαν λάβει οι Saavedra et al. (1997) -Εικόνα 3. 1. 14. B- η μελέτη των δύο άλλων γενετικών τόπων αποκάλυψε ότι το μόριο M ήταν παρόν σε όλα τα αρσενικά άτομα (Εικόνα 3. 1. 14, A και Γ). Η αδυναμία εντοπισμού του M προτύπου στο γονίδιο *COIII* αποδόθηκε σε πιθανή μεταλλαγή κάποιας από τις περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών (Theologidis et al. 2007a). Σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις, όλα τα αρσενικά άτομα της μελέτης των Saavedra et al. (1997) είχαν κληρονομήσει το πατρικό M γονιδίωμα του πατέρα τους. Δεν υπήρχαν ενδείξεις «αρρενοποίησης» και συνεπώς η τελευταία εξακολουθούσε να σχετίζεται αποκλειστικά και μόνο με την παρουσία του γονιδιώματος C.



**Εικόνα 3. 1. 14:** Προϊόντα PCR από τους απογόνους των αρσενικών γονέων M70 και M54 (βλ. Saavedra et al. 1997). Σειρές 1-4: αρσενικοί απόγονοι που θεωρούνταν μη τυπικοί. Σειρές 5-7: αρσενικοί τυπικοί απόγονοι. Σειρά 8: θηλυκό άτομο. M: Fermentas 1 kb Ladder Mix. **A:** Τμήμα 370 bp του CR πολλαπλασιασμένο με ειδικούς M εκκινητές (βλ. § 3. 1. 1. A). **B:** Τμήμα 860 bp του γονιδίου *COIII* που υποβλήθηκε σε πέψη με το ένζυμο *Bam*HI. Το προϊόν τύπου F δεν περιέχει περιοριστική θέση, αντίθετα με το M. **Γ:** Τμήμα 1108 bp του γονιδίου *COI* και πέψη με το ένζυμο *Bam*HI. Όμοια με την περίπτωση του *COIII*, το τμήμα F δεν περιέχει περιοριστική θέση σε αντίθεση με το M που κόβεται σε δύο τμήματα με μεγέθη 659 bp και 449 bp.

### 3. 1. 3. Η παγκόσμια εξάπλωση του γονιδιώματος C στα αδελφά είδη *M. galloprovincialis* και *M. edulis*

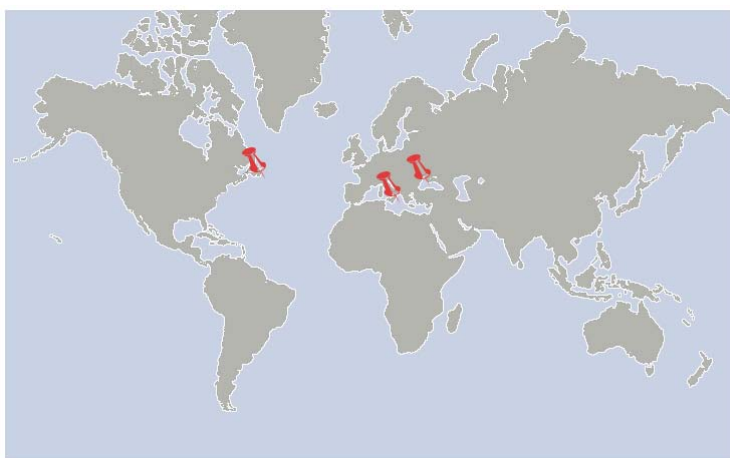
Έχοντας πλέον στη διάθεσή μας ολόκληρη την πρωτοδιάταξη του μορίου C και έχοντας βεβαιωθεί για την ύπαρξή του στους πληθυσμούς *M. galloprovincialis* της Μαύρης Θάλασσας και της Μεσογείου, θεωρήσαμε σκόπιμο να το συγκρίνουμε με τμήματα γονιδίων που είχαν παλαιότερα δημοσιευτεί και αφορούσαν σε υποτιθέμενα αρρενοποιημένα μόρια *M. edulis* (Hoeh et al. 1997) και *M. trossulus* (Quesada et al. 1999, Quesada et al. 2003). Από όλα όσα δοκιμάσαμε, βρήκαμε έναν απλότυπο που εμφάνιζε εκπληκτική ομοιότητα (>99%) σε ένα τμήμα 622 bp του γονιδίου *COI* με το ομόλογο τμήμα του μορίου C. Ο συγκεκριμένος απλότυπος προερχόταν από μη-τυπικό αρσενικό άτομο από πληθυσμό του *M. edulis* του Καναδά και θεωρούνταν «αρρενοποιημένος» (Hoeh et al. 1997, απλότυπος *M. edulis* M-A, GenBank: U68773). Επιπλέον, εντοπίσαμε πανομοιότυπες με του C αλληλουχίες τμημάτων των γονιδίων *COI* και *COIII* που δημοσιεύονταν σε μία πληθυσμιακή μελέτη του μυδιού *M. edulis* από τον Καναδά και τη Β. Ευρώπη (Riginos et al. 2004, απλότυποι: π. χ. 687NS, 690NS, 707NS). Οι αλληλουχίες αυτές ήταν πανομοιότυπες με τις αλληλουχίες του C από τη Μαύρη Θάλασσα, ενώ διέφεραν σημαντικά από άλλες που είχαν εξαχθεί από μύδια του ίδιου ή γειτονικών πληθυσμών. Δυστυχώς, δεν αναφέρεται το φύλο των ατόμων από όπου προέρχονταν καθώς ο σκοπός της εν λόγω μελέτης ήταν διαφορετικός από τον εντοπισμό και τη μελέτη των αρρενοποιημένων μορίων. Οι ενδείξεις ωστόσο για την ύπαρξη του C σε πληθυσμούς μυδιών της Αμερικής και του Καναδά ήταν πολύ ισχυρές ώστε να μας ωθήσουν στην αναζήτηση και στην ανάλυση δειγμάτων *M. edulis* από μη-τυπικά αρσενικά.

Αποκτήσαμε δείγματα από δύο μη-τυπικά αρσενικά άτομα *M. edulis* του Καναδά, για τα οποία υπήρχαν ενδείξεις παρουσίας ανασυνδυασμένου CR (L. Cao and E. Kenchington, προσωπική επικοινωνία) και αναζητήσαμε το σύνθετο CR. Με βάση τα μεγέθη των προϊόντων PCR, όπως αναφέρθηκαν στις παραγράφους 3. 1. 1. Α και 3. 1. 2. Α, διαπιστώσαμε ότι και τα δύο άτομα το περιείχαν. Στη συνέχεια προχωρήσαμε στην ανάκτηση και στον προσδιορισμό των αλληλουχιών των τεσσάρων κλώνων που συνέθεσαν και το σύνθετο CR στο *M. galloprovincialis* (CL1, CL2, CL3 και CL4, § 3. 1. 1. Α). Το CR των δύο αρσενικών του *M. edulis* ήταν πανομοιότυπο με το σύνθετο CR των *M. galloprovincialis* (Παράρτημα I). Μαζί με αυτό, εντοπίστηκε και το τυπικό CR-F και στα δύο άτομα, όπως και το CR-M,

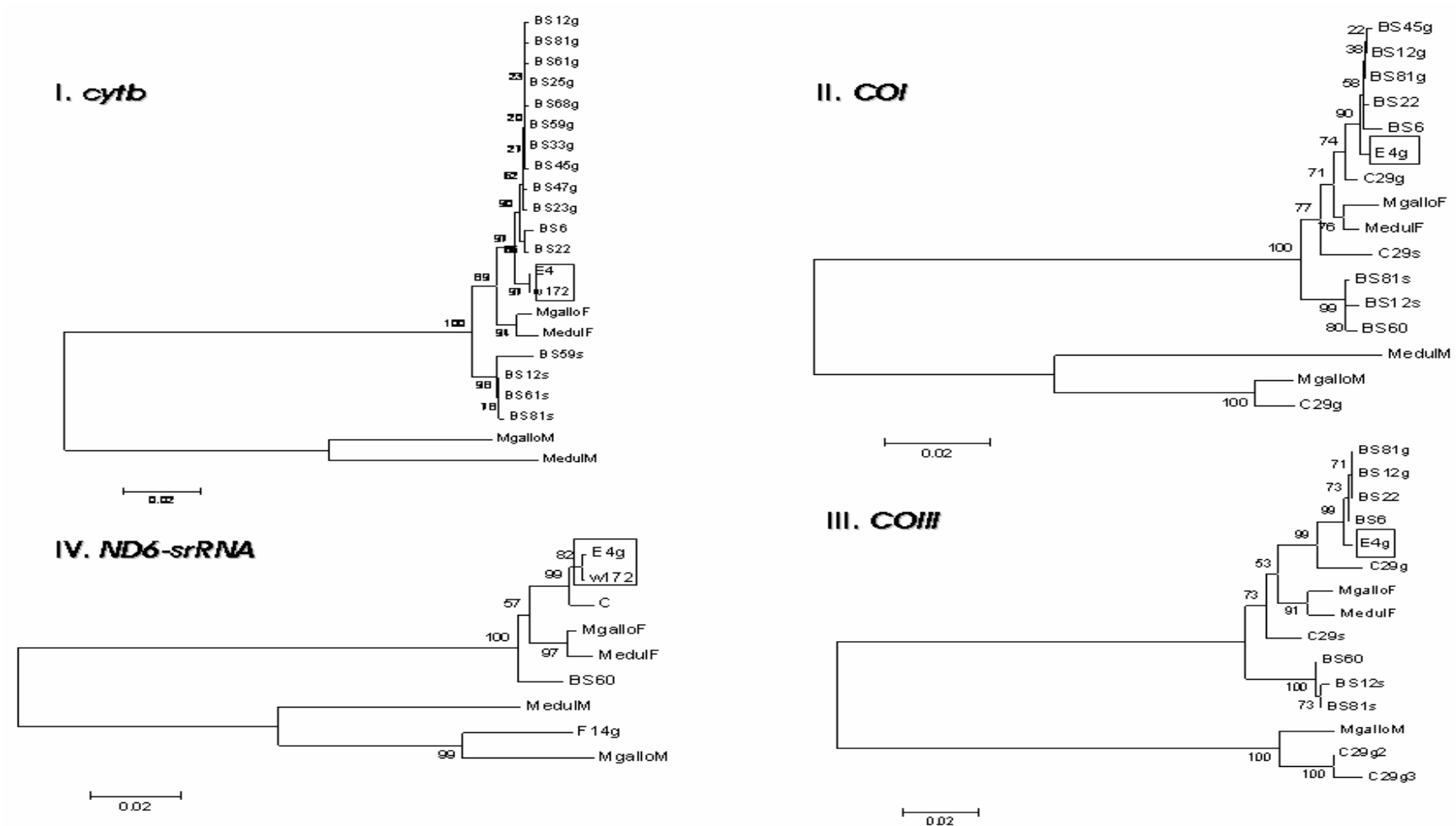
υποδεικνύοντας τελικά ότι ήταν τριπλασμικά. Τέτοια άτομα είχαν εντοπιστεί και στους πληθυσμούς *M. galloprovincialis* της Μαύρης Θάλασσας και της Μεσογείου.

Μετά από την περιοχή ελέγχου μελετήσαμε τέσσερις κωδικές αλληλουχίες αυτών των ατόμων για να ελέγξουμε αν η ομοιότητα των μορίων του Καναδά, της Μαύρης Θάλασσας και της Μεσογείου συνεχιζόταν και έξω από το σύνθετο CR. Η αλληλουχία του *Cytb* ανακτήθηκε από τον αντίστοιχο για κάθε άτομο «κλώνο CL3», ενώ για τις υπόλοιπες (εκτός της *ND6-srRNA*) εφαρμόστηκε η μεθοδολογία που περιγράφηκε στην παράγραφο 2. 3. 2.

Η φυλογενετική ανάλυση όλων των κωδικών τμημάτων που ανακτήθηκαν από τα δύο αρσενικά άτομα του *M. edulis* υποστήριζε ισχυρά τη στενή συγγένεια του μορίου C της Μαύρης Θάλασσας και της Μεσογείου με το σύνθετο μόριο του Καναδά. Σε όλες τις περιπτώσεις τα μόρια αυτά ομαδοποιούνταν στον ίδιο κλάδο, τον κλάδο C, ο οποίος εμφανιζόταν μονοφυλετικός σε κάθε γενετικό τόπο (Εικόνα 3. 1. 16). Η μέγιστη διαφοροποίηση των μορίων του Καναδά με τα υπόλοιπα C ήταν 0.7% και αφορούσε στο *Cytb*. Η ίδια γενετική απόσταση υφίσταται μεταξύ του μορίου C της Μεσογείου (C29, Κεφαλονιά, Παράρτημα II) και των μορίων της Μαύρης Θάλασσας στο *COI*. Στις περιπτώσεις των γονιδίων *COI* και *COIII*, το μόριο της Μαύρης Θάλασσας φαινόταν πιο συγγενές με το μόριο του Καναδά, παρά με εκείνο της Μεσογείου. Τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι το μόριο C έχει παγκόσμια εξάπλωση μεταξύ των αδελφών ειδών *M. galloprovincialis* και *M. edulis*, υποδεικνύοντας, επιπλέον, ότι η «αρρενοποίηση» είναι γεγονός και ότι έχει πιθανότατα κοινή αφετηρία στα εν λόγω είδη.



**Εικόνα 3. 1. 15:** Η παγκόσμια εξάπλωση του γονιδιώματος C.



**Εικόνα 3. 1. 16:** N-J (Kimura 2-parameter, 1000 replicates) δενδρογράμματα που κατασκευάστηκαν από τμήματα των γονιδίων *Cytb* (I), *COI* (II), *COIII* (III) και *ND6-srRNA* (IV). Σε τετράγωνο πλαίσιο σημειώνονται τα δείγματα γονάδων *M. edulis* από τον Καναδά. MgallolF, MgallolM: Τα ομόλογα τμήματα από τα πλήρη F και M γονιδιώματα του *M. galloprovincialis* (GenBank AY497292 και AY363687, αντίστοιχα). MedulF, MedulM: Τα ομόλογα τμήματα από τα πλήρη F και M γονιδιώματα του *M. edulis* (GenBank AY484747 και AY823623, αντίστοιχα). BS12, BS23, BS25, BS33, BS45, BS59, BS58, BS61, BS68, BS81: Μη-τυπικά αρσενικά *M. galloprovincialis*. BS6, BS22, BS47, BS60: θηλυκά *M. galloprovincialis*. C29: Τριπλασμικό αρσενικό άτομο *M. galloprovincialis* από πληθυσμό της Κεφαλονιάς.

### 3. 1. 4. Έλλειψη ενδείξεων σύγκλισης μεταξύ των γονιδιωμάτων M και C

Κατά τη συγκριτική μελέτη των γονιδιωμάτων των *M. galloprovincialis* και *M. edulis* καθώς και του *M. trossulus* με το C παρατηρήσαμε ότι οι αμινοξικές αλληλουχίες των γονιδίων *ND6* και *Cytb* διέφεραν σε μέγεθος ανάμεσα στα μόρια. Συγκεκριμένα, στα μόρια C, *M. edulis* M και *M. trossulus* το γονίδιο *ND6* ήταν μικρότερο κατά 4 αμινοξέα, ενώ στα ίδια μόρια το γονίδιο *Cytb* ήταν μεγαλύτερο κατά 38 αμινοξέα σε σχέση με εκείνα των μορίων *M. galloprovincialis* F, M και *M. edulis* F (Εικόνα 3. 1. 17).

Η παρατήρηση ομαδοποιούσε τα μόρια που φαίνεται ότι κληρονομούνται από το σπέρμα (δηλαδή το M του *M. edulis*, το C και το πλήρες μόριο του *M. trossulus* που θεωρείται «αρρενοποιημένο») χωριστά από τα μητρικά μόρια (με εξαίρεση το M του *M. galloprovincialis*) και θύμιζε την περίπτωση του γονιδίου *COII* σε είδη με ΔΜΚ της υπεροικογένειας Unionoidea. Όλα τα M τύπου μόρια από είδη που έχουν μελετηθεί από τις οικογένειες Unionidae, Margaritiferidae και Hyriidae που ανήκουν στην υπεροικογένεια εμφανίζουν μία επέκταση μεγέθους 185 αμινοξέων στο αμινικό άκρο του γονιδίου *COII* συγκριτικά με τα F γονιδιώματά τους (Curole and Kocher 2002). Η επέκταση αυτή θεωρείται ότι συνέβη πολύ παλιά κατά την εξέλιξη των Unionoidea και πρόσφατα αποδείχτηκε η ύπαρξή της και στο επίπεδο της πρωτεΐνης (Chakrabarti et al. 2006). Ως εκ τούτου, εκφράζονται και ελέγχονται πλέον υποθέσεις σχετικά με τη λειτουργική σημασία που θα μπορούσε να έχει μια τέτοια επέκταση σε σχέση με τον «M χαρακτήρα» των πατρικώς κληρονομούμενων μορίων που τη φέρουν. Με άλλα λόγια, ελέγχεται το κατά πόσο ευνοούνται και εγκαθιδρύονται συγκεκριμένες αλλαγές στα πατρικώς κληρονομούμενα μόρια, τα οποία λειτουργούν στις αρσενικές γονάδες και στο σπέρμα, δεχόμενα θεωρητικά διαφορετικές εξελικτικές πιέσεις σε σχέση με τα μητρικά. Τέτοιες αλλαγές θα ήταν δυνατό να προκαλούν διαφοροποιήσεις στο μέγεθος των μιτοχονδριακών μετάγραφων ή ίσως σταθεροποίηση συγκεκριμένων αμινοξικών αντικαταστάσεων με αποτέλεσμα τη σύγκλιση των πατρικών μορίων.

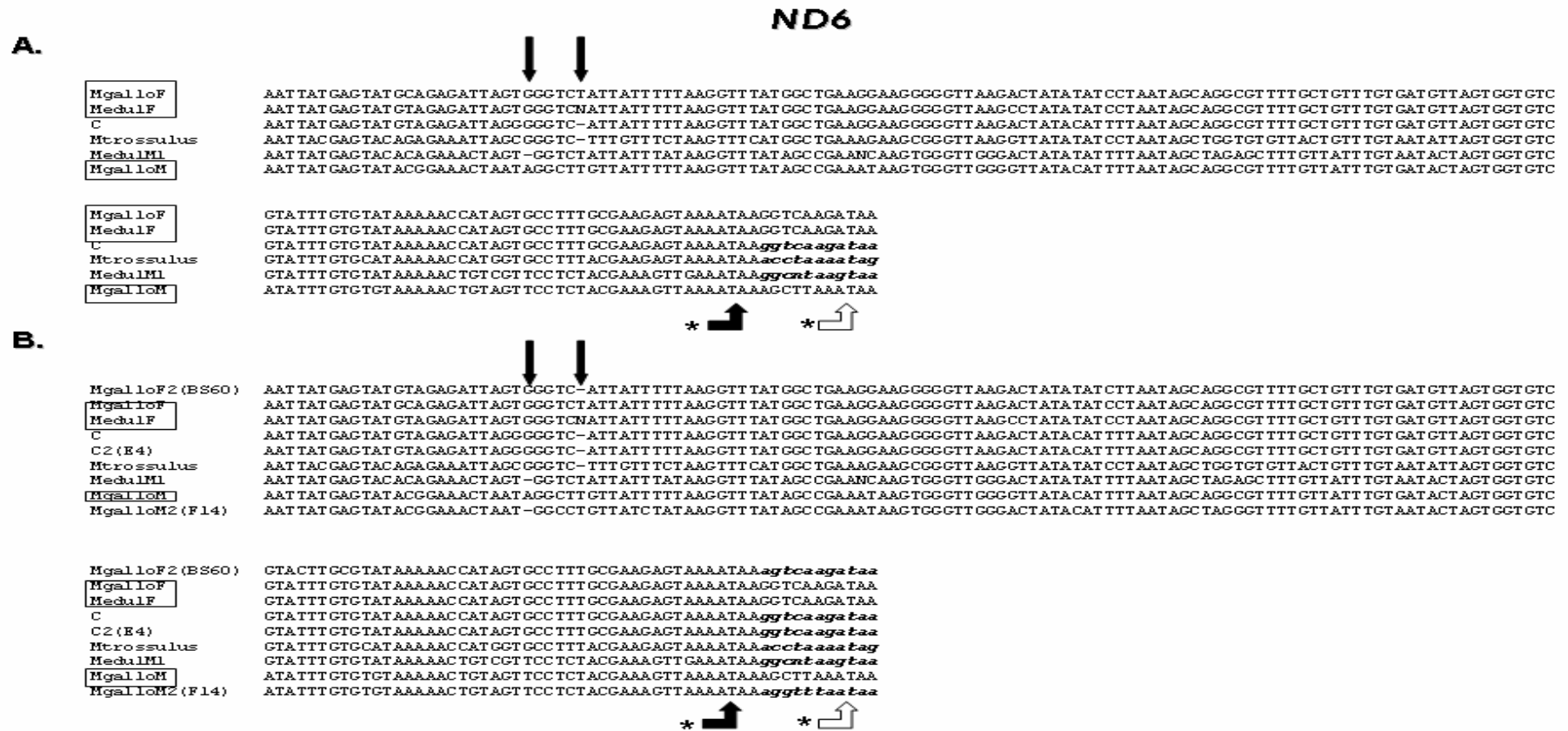
Για να ελέγξουμε την πιθανότητα μίας τέτοιας σύγκλισης μελετήσαμε τη νουκλεοτιδική στοίχιση των γονιδίων *ND6* και *Cytb* και τα πλαίσια ανάγνωσής τους.



Διαπιστώσαμε ότι οι αλλαγές στο μήκος των κωδικών περιοχών οφείλονταν σε δύο ελλείψεις ενός νουκλεοτιδίου, οι οποίες μετέβαλλαν το πλαίσιο ανάγνωσης. Η πρώτη αφορούσε στο γονίδιο *ND6* και βρισκόταν 330 νουκλεοτίδια μακριά από το σημείο έναρξης στο μόριο C και στο *M. trossulus* και 325 στο M του *M. edulis* (Εικόνα 3. 1. 18. A). Αντίθετα, σε εκείνη τη θέση τα F μόρια δεν εμφανίζουν έλλειψη. Ωστόσο, το νουκλεοτίδιο του *M. edulis* F είναι αβέβαιο και σημειώνεται με το γράμμα N. Η απαλοιφή αυτού του νουκλεοτιδίου οδηγούσε σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και στην εμφάνιση του σημείου λήξης της πρωτεΐνης 12 νουκλεοτίδια προς το 5', δηλαδή στο σημείο που κωδικοποιείται λήξη στα 3 μόρια που φαίνονταν βραχύτερα (το C, το M του *M. edulis* και το *M. trossulus*). Το ίδιο συνέβαινε όταν απαλειφόταν η θυμίνη στην ίδια θέση για το F του *M. galloprovincialis*. Θεωρήσαμε ότι η απάντηση στο πρόβλημα θα δινόταν με την απόκτηση περισσότερων αλληλουχιών για το συγκεκριμένο τμήμα και τη σύγκρισή τους με τις προηγούμενες. Ανακτήσαμε τις αλληλουχίες για τρία ακόμη μόρια: ένα C, ένα F και ένα M. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3. 1. 18. B, τα τρία νέα μόρια, ανεξάρτητα του τρόπου κληρονομιάς τους, είχαν την έλλειψη στη θέση 330 και συνεπώς διέθεταν τη βραχύτερη «έκδοση» του γονιδίου.

Στην περίπτωση του γονιδίου *Cytb* η εικόνα ήταν η αντίστροφη καθώς το C, το M του *M. edulis* και το *M. trossulus* ήταν τα μεγαλύτερα. Η διαφορά μεγέθους φάνηκε να οφείλεται σε μία έλλειψη, η οποία αυτή τη φορά εντοπιζόταν στη θέση 1101 της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *Cytb* των *M. galloprovincialis* F και M και *M. edulis* F (Εικόνα 3. 1. 19. A). Ανάλογα με την παραπάνω περίπτωση, η προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου στα βραχύτερα μόρια μετέφερε το σημείο λήξης του γονιδίου 38 θέσεις προς το 3' άκρο, εξομοιώνοντας τα με τα υπόλοιπα. Ακολουθήσαμε όμοια τακτική, όπως προηγουμένως, προσδιορίζοντας την αλληλουχία από ένα νέο F μόριο· ένα *M. edulis* (E4, Εικόνα 3. 1. 19. B). Η νέα αλληλουχία δεν εμφάνιζε την έλλειψη στη θέση 1101 υποδεικνύοντας ότι τουλάχιστον αυτό το F μόριο δεν διέφερε από τα πατρικώς κληρονομούμενα C και *M. edulis* M. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται περαιτέρω από το γεγονός ότι οι υποτιθέμενες μη κωδικές περιοχές μεγέθους 114 bp που ακολουθούσαν του *Cytb* στα βραχύτερα F μόρια δεν εμφάνιζαν καμία νουκλεοτιδική διαφορά από τις υπόλοιπες. Με δεδομένο ότι ανήκουν σε διαφορετικά είδη, τότε, αν δεν είχαν κάποια λειτουργική σημασία πιθανότατα θα είχαν συσσωρεύσει σημειακές μεταλλάξεις.



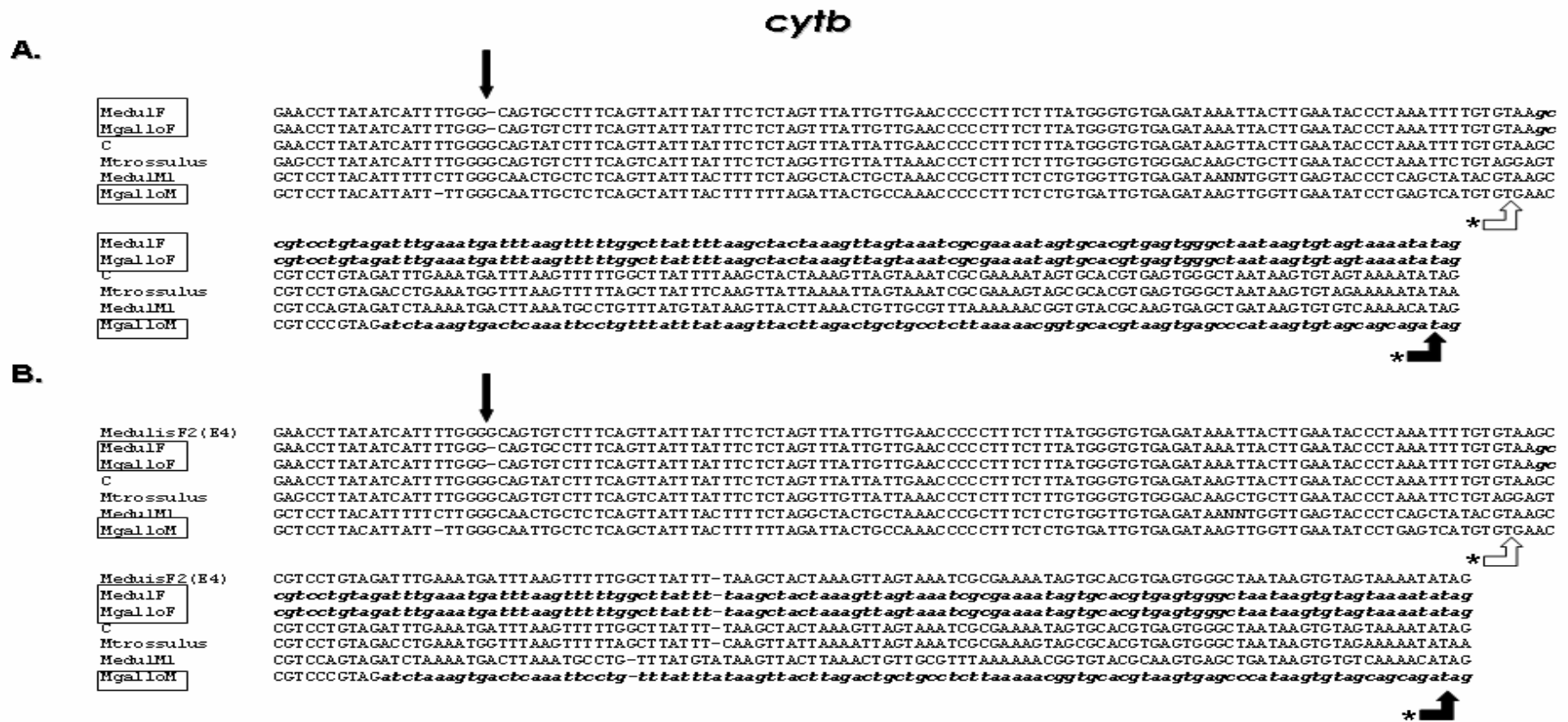


**Εικόνα 3. 1. 18:** Στοιχισή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του 3' άκρου του γονιδίου ND6. A: Πριν από την προσθήκη των νέων αλληλουχιών. B: Μετά την προσθήκη των αλληλουχιών MgallloF2 (θηλυκό BS60), C2 (E4) και MgallloM2 (αρσενικό άτομο F14). MgallloF: *M. galloprovincialis* F, MedulF: *M. edulis* F, C: μόριο C, MgallloM: *M. galloprovincialis* M, MedulM1: *M. edulis* M (haplotype 1). \*: Τα σημεία λήξης όπως ορίζονται από τους συγγραφείς. Λευκό βέλος: τα σημεία λήξης των μορίων MgallloF, MedulF και MgallloM. Μαύρο βέλος: τα σημεία λήξης των μορίων C, *M. trossulus* και MedulM1. Οι μη κωδικές περιοχές σημειώνονται με πλάγια, μικρά γράμματα.

Ο έλεγχος για την ανίχνευση σύγκλισης μεταξύ του μορίου C και άλλων πατρικώς κληρονομούμενων μορίων δεν έδωσε καμία θετική ένδειξη. Οι ελλείψεις και οι επεκτάσεις που είχαν αρχικά εντοπιστεί στο 3' των γονιδίων *ND6* και *Cytb* αντίστοιχα δεν έδειξαν να είναι συστηματικές μεταξύ των μορίων που κληρονομούνται μέσω του σπέρματος, αντίθετα με ό,τι συμβαίνει στα δίθυρα της υπερκοκογένειας *Unionoidea* στο γονίδιο *COII*. Στην περίπτωση των *Mytilidae*, οι αυξομειώσεις μεγέθους των κωδικών τμημάτων θα μπορούσαν να αποτελούν ιδιαιτερότητες των συγκεκριμένων μορίων που είχαν μελετηθεί παλαιότερα ή ίσως να οφείλονται σε πειραματικά σφάλματα κατά τον προσδιορισμό των αλληλουχιών ή κατά την ανάλυση και διόρθωσή τους.

Εκτός από την προσέγγιση που μόλις παρουσιάστηκε, ελέγξαμε και την πιθανότητα σύγκλισης των πατρικών γονιδιωμάτων στο επίπεδο των αμινοξέων. Η υπόθεση ήταν ότι στα πατρικά μόρια θα μπορούσαν να ευνοούνται και να σταθεροποιούνται συγκεκριμένες αμινοξικές αλλαγές, καθιστώντας ίσως τα μόρια αυτά και τα μιτοχόνδρια που τα φέρουν καταλληλότερα στο να λειτουργούν στην αρσενική γονάδα και στο σπέρμα. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης συγκρίναμε όλα τα διαθέσιμα πλήρη γονιδιώματα των ειδών *M. galloprovincialis* και *M. edulis* για κάθε πρωτεϊνικό γονίδιο. Προσδιορίσαμε τα συντηρητικά αμινοξέα μεταξύ των μητρικών μορίων και μεταξύ των πατρικών ξεχωριστά και κατόπιν εξετάσαμε ποια και πόσα από αυτά διατηρούνται στο μόριο C.

Εξετάσαμε όλα τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα του *Mytilus* (συνολικά 3613 αμινοξέα). Κανένα δεν εμφανιζόταν αποκλειστικά στα M και στο C, ενώ μόνο ένα αμινοξύ ( $L_{256}$ ) στο γονίδιο *ND2* ήταν συντηρητικό ανάμεσα στο C και σε ένα M μόριο, εκείνο του *M. galloprovincialis*. Φάνηκε τελικά ότι δεν υπάρχουν ενδείξεις σύγκλισης μεταξύ των μορίων C και M, ούτε στο επίπεδο των αμινοξικών αντικαταστάσεων.



**Εικόνα 3. 1. 19:** Στοιχισή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του 3' άκρου του γονιδίου *Cytb*. A: Πριν από την προσθήκη της νέας αλληλουχίας. B: Μετά την προσθήκη της αλληλουχίας MedulisF2. MgalloF: *M. galloprovincialis* F, MedulF: *M. edulis* F, C: μόριο C, MgalloM: *M. galloprovincialis* M, MedulM1: *M. edulis* M (haplotype 1). \*: Τα σημεία λήξης όπως ορίζονται από τους συγγραφείς. Λευκό βέλος: τα σημεία λήξης των μορίων MgalloF, MedulF και MgalloM. Μαύρο βέλος: τα σημεία λήξης των μορίων C, *M. trossulus* και MedulM1. Οι μη κωδικές περιοχές σημειώνονται με πλάγια, μικρά γράμματα.

### 3. 2. Η αναζήτηση της Διπλής Μονογονεϊκής Κληρονομικότητας (ΔΜΚ) σε άλλα είδη

#### 3. 2. 1. Η αποτυχία ανίχνευσης της ΔΜΚ στα είδη *Venerupis decussatus*, *Venus verrucosa*, *Callista chione* (Bivalvia: Veneridae) και *Arca noae* (Bivalvia: Arcidae)

Ελέγξαμε την πιθανότητα παρουσίας της ΔΜΚ στα δίθυρα *Venerupis decussatus*, *Venus verrucosa*, *Callista chione* και *Arca noae* (Bivalvia: Arcidae). Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε αφορούσε στον πολλαπλασιασμό δύο τμημάτων mtDNA από σωματικούς ιστούς και γονάδες αρσενικών και θηλυκών ατόμων και στην ανάλυση των περιοριστικών τους προτύπων, με στόχο την παρατήρηση περιπτώσεων ετεροπλασμίας που να σχετίζονται με το φύλο. Τέτοιου είδους παρατηρήσεις θα αποτελούσαν σοβαρή ένδειξη για τη ύπαρξη της ΔΜΚ σε κάποιο από τα εν λόγω είδη.

Οι περιοχές του mtDNA που αναλύθηκαν αντιστοιχούσαν σε τμήματα των γονιδίων *COI* και *lrRNA*. Για την ανάκτηση του τμήματος του γονιδίου *COI* μεγέθους 654 - 710 bp χρησιμοποιήσαμε το συνδυασμό των εκκινητών LCO1490 και HCO2198 (Folmer et al. 1994). Το τμήμα 510 bp του γονιδίου *lrRNA* πολλαπλασιάστηκε με το συνδυασμό των εκκινητών 16sar (Kocher et al. 1986) and 16sbr (Palumbi 1991). Τα προϊόντα υποβάλλονταν σε πέψεις με τέσσερα τουλάχιστο διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα. Αν και ο πολλαπλασιασμός των δύο τμημάτων ήταν επιτυχής σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, σε καμία από αυτές δεν παρατηρήθηκε ετεροπλασμία.

Η αποτυχία ανίχνευσης της ΔΜΚ δεν σημαίνει απαραίτητα και απουσία της από τα παραπάνω είδη. Όπως θα συζητηθεί αναλυτικότερα στην παράγραφο 4. 5, η προσέγγιση που εφαρμόστηκε μπορεί να επιβεβαιώσει την ύπαρξη, αλλά δεν μπορεί να αποδείξει την απουσία της ΔΜΚ. Ο προφανέστερος λόγος είναι ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλασίαζαν τα μητρικά, αλλά όχι και τα πατρικά τμήματα του μιτοχονδριακού DNA. Εναλλακτικά, η αδυναμία εντοπισμού της ΔΜΚ ίσως να οφειλόταν στην παρουσία πολύ πρόσφατης «αρρενοποίησης» και συνεπώς στη δυσκολία διάκρισης πολύ συγγενικών πατρικών και μητρικών μορίων μέσω της ανάλυσης των περιοριστικών τους προτύπων.

### 3. 2. 2. Η ανίχνευση της ΔΜΚ στο δίθυρο *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae)

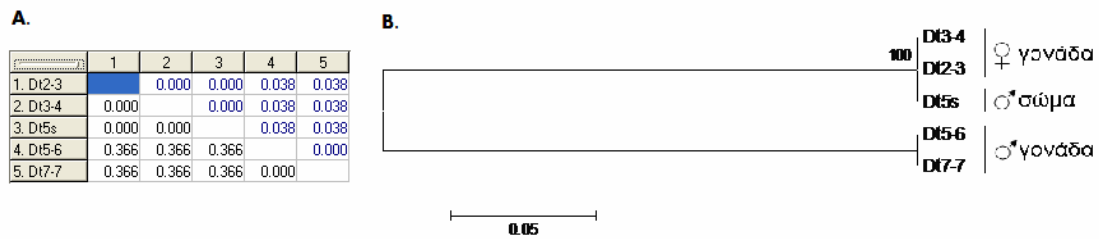
#### A. Η μελέτη του γονιδίου *lrRNA*.

Ελέγξαμε το περιεχόμενο των γονάδων και των σωματικών ιστών σε 10 αρσενικά και σε 10 θηλυκά άτομα του είδους *D. trunculus*, αναφορικά με το μιτοχονδριακό τους DNA. Αρχικά δοκιμάσαμε να πολλαπλασιάσουμε ένα τμήμα μεγέθους 510 bp του γονιδίου της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας (*lrRNA*) με τη χρήση των γενικευμένων - «universal» - εκκινητών 16sar (Kocher et al. 1986) και 16sbr (Palumbi 1991). Τα μόνα δείγματα που έδιναν το αναμενόμενο προϊόν ήταν εκείνα των αρσενικών γονάδων, γεγονός που αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη ΔΜΚ. Δύο από αυτά τα προϊόντα κλωνοποιήθηκαν (κλώνοι Dt5-6 και Dt7-7). Ακολούθησε προσδιορισμός των αλληλουχιών τους, οι οποίες συγκρίθηκαν με δημοσιευμένες αλληλουχίες *lrRNA* από άλλα είδη μαλακίων. Με βάση τις συντηρητικές περιοχές που αποκαλύφθηκαν από τις συγκρίσεις, σχεδιάσαμε ένα νέο ζεύγος εσωτερικών εκκινητών (Dt16s-f98 και Dt16s-r395, § 2. 3. 5, Πίνακας 2. 5), με σκοπό να πολλαπλασιάσουμε το τμήμα του γονιδίου στους υπόλοιπους ιστούς (αρσενικά σώματα, θηλυκές γονάδες και θηλυκά σώματα).

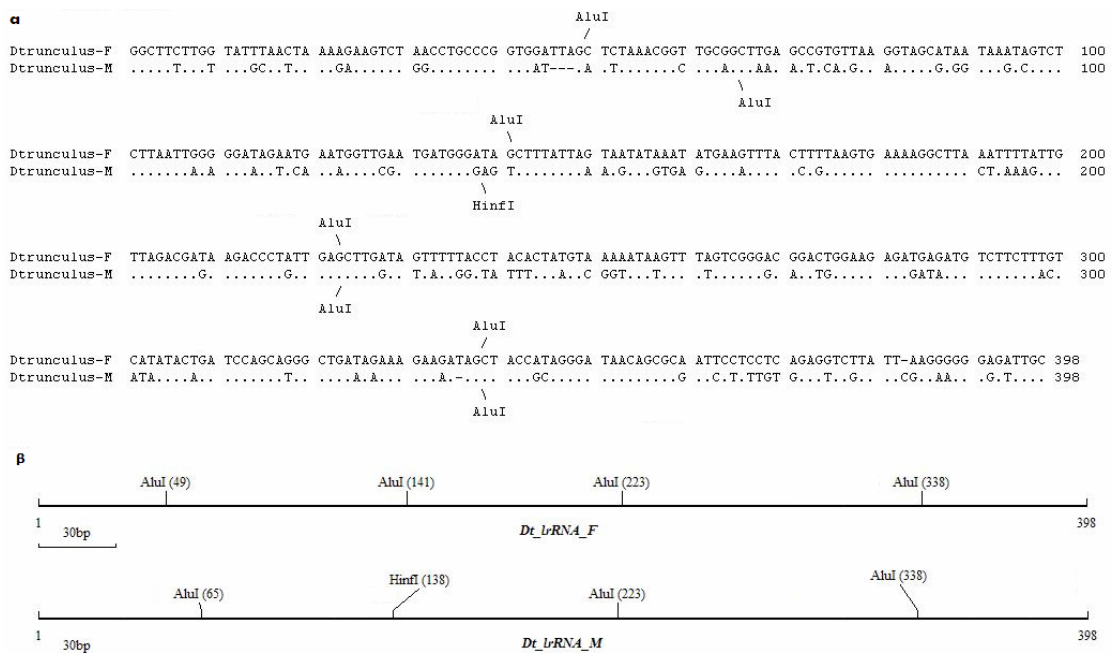
Ο συνδυασμός των εκκινητών 16sar και Dt16s-r395 έδωσε το αναμενόμενο προϊόν μεγέθους 447 bp και στις τέσσερις κατηγορίες δειγμάτων (αρσενικές γονάδες, αρσενικά σώματα, θηλυκές γονάδες και θηλυκά σώματα). Τα προϊόντα από δύο θηλυκές γονάδες (Dt2-3 και Dt3-4) και από ένα αρσενικό σώμα (Dt5s) κλωνοποιήθηκαν, προσδιορίστηκαν σε επίπεδο αλληλουχίας DNA και συγκρίθηκαν με τις δύο πρώτες των αρσενικών γονάδων (Εικόνα 3. 2. 1). Οι συγκρίσεις αυτές αποκάλυψαν ότι οι αλληλουχίες από τις δύο θηλυκές γονάδες και από το αρσενικό σώμα ήταν πανομοιότυπες και διέφεραν από εκείνες των αρσενικών γονάδων κατά 36.6% (K-distances, Kimura two-parameter model).

Οι παρατηρήσεις αυτές αποτέλεσαν σοβαρές ενδείξεις για την ύπαρξη εκτεταμένης ετεροπλασμίας του mtDNA που σχετίζεται με το φύλο και συνεπώς ΔΜΚ, στο είδος *D. trunculus*. Ακολουθώντας τη σχετική με τη ΔΜΚ σύμβαση, ονομάσαμε «F» τις αλληλουχίες που εντοπίσαμε στις θηλυκές γονάδες και στο αρσενικό σώμα (Dt2-3, Dt3-4 και Dt5s) και «M» τις αλληλουχίες που είχαν νωρίτερα εξαχθεί από τις αρσενικές γονάδες (Dt5-6 και Dt7-7, Εικόνα 3. 2. 2. α). Στη συνέχεια, με *in silico* ανάλυση, προσδιορίσαμε τα αναμενόμενα περιοριστικά πρότυπα των «F»

και «M» τύπων για διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες που είχαμε στη διάθεσή μας, ώστε να προχωρήσουμε σε πληθυσμιακό έλεγχο της υπόθεσης της ετεροπλάσμιας (Εικόνα 3. 2. 2β).



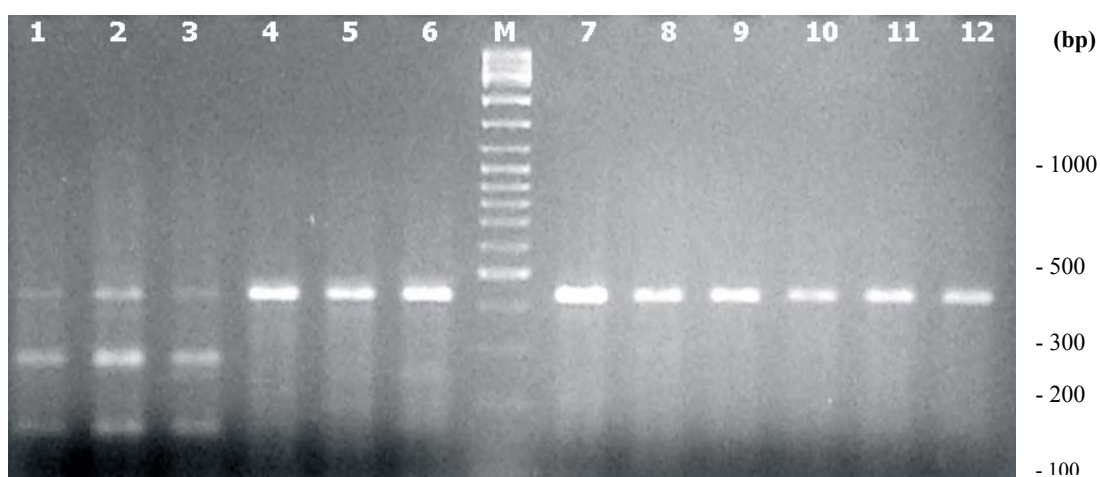
**Εικόνα 3. 2. 1:** A. Οι γενετικές αποστάσεις (κάτω από τη διαγώνιο, K-distances, Kimura 2-parameter) και το τυπικό τους σφάλμα (πάνω από τη διαγώνιο) μεταξύ τμημάτων μεγέθους 447 bp του γονιδίου *lrRNA* που απομονώθηκαν από αρσενικά και θηλυκά άτομα του δίθυρου *Donax trunculus*. B. Φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με τη μέθοδο της «σύνδεσης γειτόνων» (Neighbor Joining, N-J, Kimura 2-parameter, 1000 replicates) από τα παραπάνω τμήματα. Dt2-3, Dt2-4: Κλώνοι που απομονώθηκαν από δύο θηλυκές γονάδες. Dt5-6, Dt7-7: Κλώνοι που απομονώθηκαν από αρσενικές γονάδες. Dt5s: Κλώνος από τους σωματικούς ιστούς αρσενικού ατόμου.



**Εικόνα 3. 2. 2:** α: Στοιχισμός των δύο τύπων, F και M, τμημάτων του γονιδίου *lrRNA* από το είδος *D. trunculus*. Οι αλληλουχίες των εκκινήσεων έχουν αφαιρεθεί από τα άκρα, ελαττώνοντας το μήκος των τελικών προϊόντων από 447 σε 398 bp. β. Περιοριστικοί χάρτες των ίδιων τμημάτων για τα ένζυμα *AluI* και *HinfI*.

Για τον πληθυσμιακό έλεγχο, τα προϊόντα της αντίδρασης PCR 16sar/Dt16s-r395 από δείγματα 10 αρσενικών γονάδων, 10 αρσενικών σωμάτων, 10 θηλυκών

γονάδων και 10 θηλυκών σωμάτων υποβλήθηκαν σε πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *AluI* και *HinfI*. Τα περιοριστικά πρότυπα των προϊόντων συμφωνούσαν με τα προβλεπόμενα από την *in silico* ανάλυση και αποκάλυψαν ότι όλα τα αρσενικά άτομα ήταν ετεροπλασμικά, ενώ τα θηλυκά ήταν ομοπλασμικά για το συγκεκριμένο τμήμα του mtDNA (Εικόνα 3. 2. 3). Συγκεκριμένα, οι αρσενικές γονάδες κυριαρχούνταν από τον τύπο M (περιείχαν και τον τύπο F, Εικόνα 3. 2. 3, στήλες 1-3), ενώ τα αρσενικά σώματα περιείχαν μόνο τον τύπο F (Εικόνα 3. 2. 3, 4-6). Όλοι οι ιστοί των θηλυκών ατόμων εμφάνιζαν αποκλειστικά το πρότυπο F (Εικόνα 3. 2. 3, 7-12).

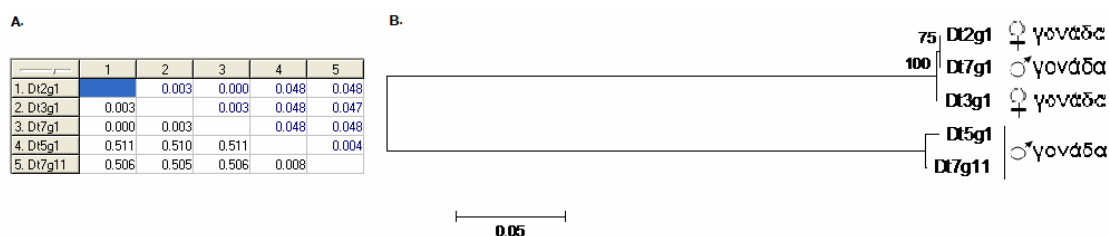


**Εικόνα 3. 2. 3:** Ετεροπλασμία που σχετίζεται με το φύλο στο mtDNA του *D. trunculus*, όπως προκύπτει από την πέψη τμήματος 447 bp του γονιδίου *lrRNA* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *HinfI*. Ο τύπος M κόβεται σε δύο επιμέρους τμήματα των 285 bp και 162 bp, ενώ ο τύπος F δεν περιέχει καμία περιοριστική θέση και παραμένει ανέπαφος (447 bp). 1-3: αρσενικές γονάδες. 4-6: αρσενικά σώματα. 7-9: θηλυκές γονάδες. 10-12: θηλυκά σώματα. M: Fermentas 1 kb Ladder Mix.

## B. Η μελέτη του γονιδίου *Cytb*

Για να επαληθεύσουμε τις παρατηρήσεις που αφορούσαν στην ετεροπλάσμια του mtDNA του *D. trunculus*, όπως προέκυπτε από τη μελέτη τμήματος του *IrRNA* προχωρήσαμε στη μελέτη μίας άλλης περιοχής του μορίου.

Χρησιμοποιήσαμε ένα ζευγάρι «universal» εκκινητών (Merritt et al. 1998), σχεδιασμένο έτσι ώστε να πολλαπλασιάζει με PCR ένα τμήμα 440 bp μέσα στο γονίδιο του κυτοχρώματος *b* (*Cytb*). Αυτή τη φορά η δοκιμή έδωσε τα αναμενόμενα προϊόντα σε όλα τα δείγματα (τα δείγματα ήταν ακριβώς αυτά που χρησιμοποιήθηκαν και στη μελέτη του *IrRNA*). Τα προϊόντα από 2 αρσενικές και δύο θηλυκές γονάδες κλωνοποιήθηκαν. Επιλέχθηκαν τελικά πέντε κλώνοι και προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες τους. Οι δύο πρώτες προέρχονταν από 2 θηλυκές γονάδες και οι υπόλοιπες τρεις από 2 αρσενικές γονάδες. Η στοίχιση και η σύγκριση των αλληλουχιών ανέδειξε ότι: οι δύο κλώνοι από τις θηλυκές γονάδες (Dt2g1 και Dt3g1) ήταν σχεδόν πανομοιότυποι και όμοιοι με τον έναν από τους τρεις που εντοπίστηκαν σε αρσενική γονάδα (Dt7g1). Οι υπόλοιποι δύο που είχαν εξαχθεί από αρσενικές γονάδες (Dt5g1 και Dt7g11) ήταν σχεδόν ίδιοι μεταξύ τους, αλλά διέφεραν σημαντικά (κατά 51%) από τους τρεις πρώτους (Εικόνα 3. 2. 4).

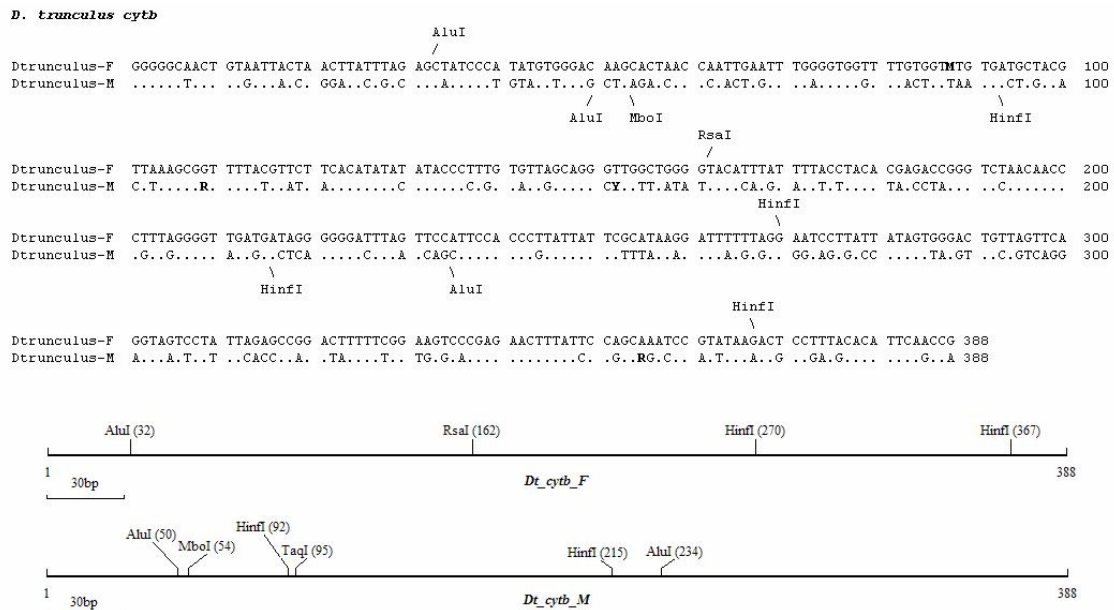


**Εικόνα 3. 2. 4:** A. Οι γενετικές αποστάσεις (κάτω από τη διαγώνιο, K-distances, Kimura 2-parameter) και το τυπικό τους σφάλμα (πάνω από τη διαγώνιο) μεταξύ τμημάτων μεγέθους 440 bp του γονιδίου *Cytb* που απομονώθηκαν από αρσενικά και θηλυκά άτομα του δίθυρου *Donax trunculus*. B. Φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με τη μέθοδο της σύνδεσης γειτόνων (Neighbor Joining, N-J, Kimura 2-parameter, 1000 replicates) από τα παραπάνω τμήματα. Dt2g1, Dt3g1: Κλώνοι που απομονώθηκαν από δύο θηλυκές γονάδες. Dt5g1, Dt7g1, Dt7g11: Κλώνοι που απομονώθηκαν από αρσενικές γονάδες.

Οι τρεις πρώτες αλληλουχίες ονομάστηκαν F, ενώ οι δύο τελευταίες M (Εικόνα 3. 2. 5α). Όλες οι αλληλουχίες είχαν ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που αντιστοιχούσε στο γονίδιο *Cytb*, όπως προέκυψε μετά από αναζήτηση μέσω του



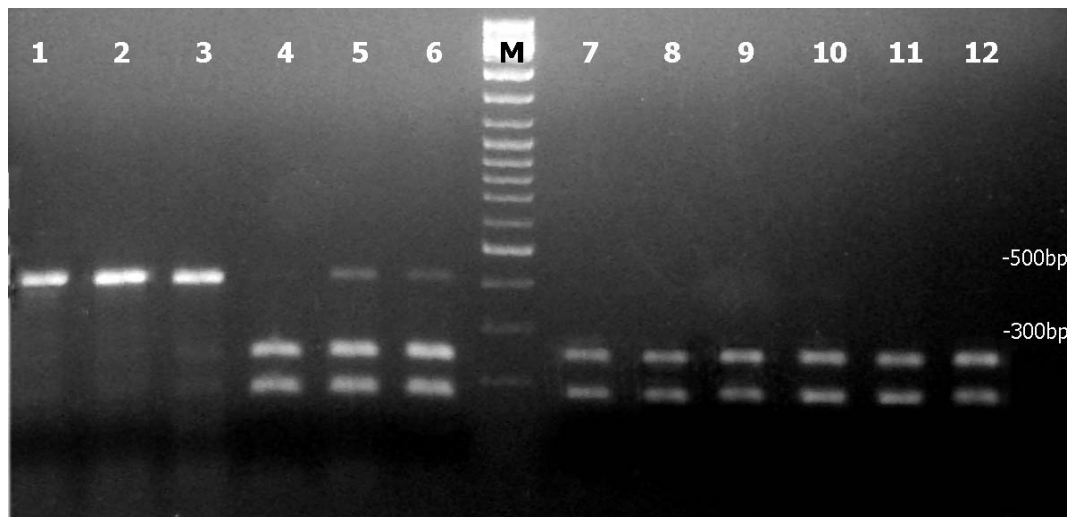
προγράμματος BLAST σε τράπεζα δεδομένων. Επίσης, όπως στην περίπτωση του *lrRNA*, προχωρήσαμε σε *in silico* ανάλυση των περιοριστικών προτύπων των αλληλουχιών του γονιδίου *Cytb* (Εικόνα 3. 2. 5β), ώστε να ελέγξουμε την υπόθεση της ετεροπλασμίας σε όλα τα δείγματα.



**Εικόνα 3. 2. 5: α:** Στοιχισή των δύο τύπων, F και M, τμημάτων του γονιδίου *Cytb* από το είδος *D. trunculus*. Οι εκκινητές έχουν αφαιρεθεί από τα άκρα, ελαττώνοντας το μήκος των τελικών προϊόντων από 440 σε 388 bp. **β:** Περιοριστικοί χάρτες των ίδιων τμημάτων για τα ένζυμα *RsaI*, *TaqI*, *AluI* και *HinfI*. **M:** Α ή C. **R:** Α ή G.

Για την πληθυσμιακή δοκιμή χρησιμοποιήσαμε ένα νέο ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκαν ειδικά για τις F και M αλληλουχίες του *D. trunculus*, διότι οι «universal» που χρησιμοποιήσαμε αρχικά για την ανάκτηση των F και M κλώνων δεν είχαν καλή απόδοση σε όλα τα δείγματα και ιδιαίτερα στις αρσενικές γονάδες. Οι νέοι εσωτερικοί εκκινητές (*Dtcytb-f* και *Dtcytb-r*), αντίθετα, ήταν επιτυχείς σε όλες τις περιπτώσεις. Τα προϊόντα της PCR είχαν μέγεθος 432 bp και υποβλήθηκαν σε πέψεις με τα ένζυμα *RsaI* και *TaqI*. Η ανάλυση των περιοριστικών τους προτύπων μαρτυρούσε ετεροπλασμία που σχετίζεται με το φύλο. Όλα τα αρσενικά άτομα ήταν ετεροπλασμικά, ενώ τα θηλυκά ήταν ομοπλασμικά (Εικόνα 3. 2. 6). Οι αρσενικές γονάδες περιείχαν κυρίως τον M τύπο (ο F τύπος εντοπιζόταν σε ίχνη) ενώ τα σώματα των αρσενικών καθώς και όλοι οι ιστοί των θηλυκών ατόμων κυριαρχούνταν από την παρουσία του τύπου F. Σε ορισμένα αρσενικά σώματα παρατηρήθηκε επίσης

σε μικρή ποσότητα και ο τύπος M, γεγονός που οφείλεται είτε σε μόλυνση των σωματικών δειγμάτων με υλικό της γονάδας, είτε σε «διαρροή» πατρικού mtDNA (Stewart et al. 1995, Garrido-Ramos et al. 1998, Dalziel and Stewart 2002).



**Εικόνα 3. 2. 6:** Ετεροπλασμία που σχετίζεται με το φύλο στο mtDNA του *D. trunculus*, όπως προκύπτει από την πέψη τμήματος 432 bp του γονιδίου *Cytb* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *RsaI*. Ο τύπος M δεν περιέχει καμία περιοριστική θέση και παραμένει ανέπαφος (432 bp), ενώ ο τύπος F κόβεται σε δύο επιμέρους τμήματα των 248 bp και 184 bp. 1-3: αρσενικές γονάδες. 4-6: αρσενικά σώματα. 7-9: θηλυκές γονάδες. 10-12: θηλυκά σώματα. M: Fermentas 1 kb Ladder Mix.

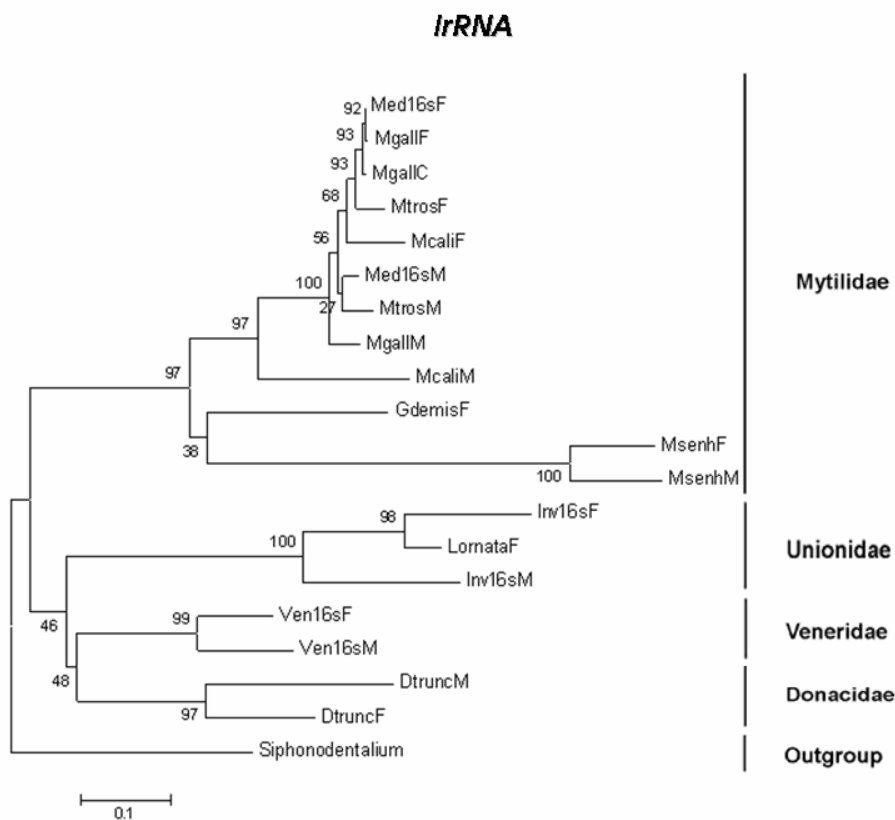
### 3. 3. Τα φυλογενετικά πρότυπα των μορίων F και M στα δίθυρα με Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα

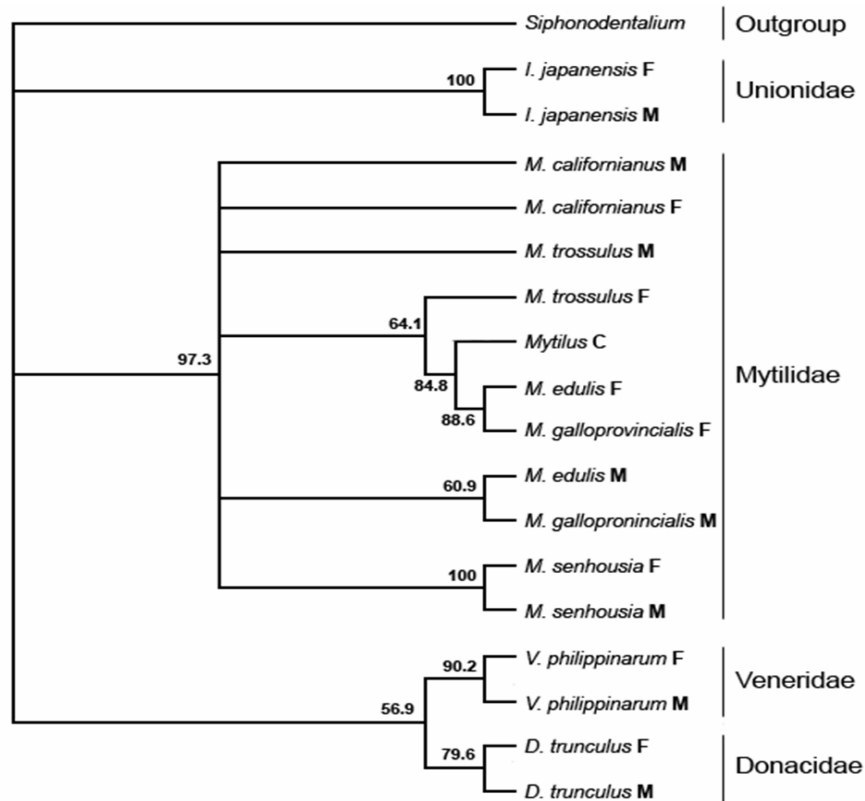
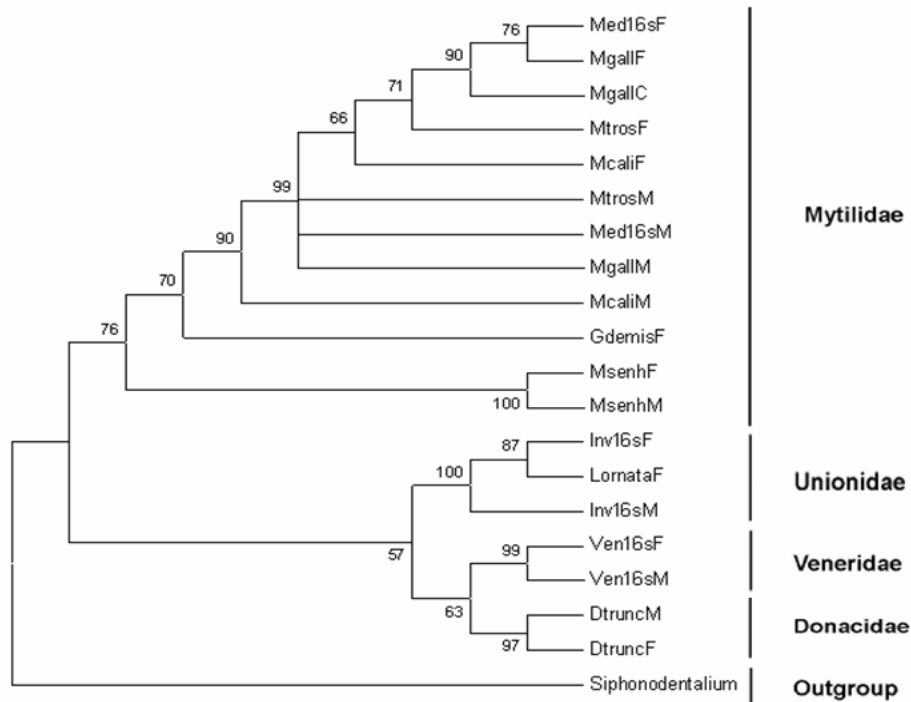
Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1. 2. 2, δύο είναι τα πιο αληθοφανή σενάρια για την εξέλιξη της ΔΜΚ με βάση την κατανομή της στις οικογένειες της ομοταξίας των δίθυρων: η μοναδική εμφάνιση (με ενδεχόμενες δευτερογενείς εξαφανίσεις σε κάποιους εξελικτικούς κλάδους) και οι πολλαπλές ανεξάρτητες εμφανίσεις. Ελέγξαμε τις δύο υποθέσεις μελετώντας τις φυλογενετικές σχέσεις των μητρικών και των πατρικών μορίων mtDNA από όλες τις γνωστές οικογένειες με ΔΜΚ. Αν και παρόμοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν (Stewart et al. 1995, Hoeh et al. 1996, 1997), κρίναμε ότι τα νέα δεδομένα σχετικά με την υπόθεση της «αρρενοποίησης» (§ 3. 1, 4. 1 και 4. 2), η ανακάλυψη μίας ακόμα οικογένειας που εμφανίζει το φαινόμενο (Donacidae, βλ. § 3. 2 και 4. 4), όπως επίσης και το πλήθος των νέων αλληλουχιών που έχει δημοσιευτεί από τότε, θα παρείχαν τη δυνατότητα για μία πληρέστερη θεώρηση του ζητήματος.

Συλλέξαμε τμήματα F και M αλληλουχιών από όλες τις οικογένειες δίθυρων και τις αναλύσαμε μαζί με τα ομόλογα τμήματα γονιδίων από τα πλήρη γονιδιώματα των ειδών *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Venerupis philippinarum* and *Inversidens japonensis*. Καταλήξαμε σε τρία τμήματα μιτοχονδριακών γονιδίων για τα οποία υπήρχε επαρκής πληροφορία. Το πρώτο ήταν από το *IrRNA* και είχε μέγεθος 348 bp, το επόμενο προερχόταν από το κυτόχρωμα b (383 bp) και το τρίτο ανήκε στο γονίδιο *COI* (601 bp). Εφαρμόσαμε τρεις μεθόδους φυλογένεσης, δύο που βασιζόταν στις γενετικές αποστάσεις (μέθοδος σύνδεσης γειτόνων – NJ και μέγιστης πιθανοφάνειας - ML) και μία άλλη που στηριζόταν στους χαρακτήρες (μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας – MP). Σαν παραομάδα (outgroup) χρησιμοποιήσαμε το σκαφόποδο *Siphonodentalium lobatum*.

### 3. 3. 1. Τα φυλογενετικά πρότυπα του γονιδίου *lrRNA* στα είδη με ΔΜΚ

Τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν από το *lrRNA* περιείχαν ένα είδος από κάθε μία εκ των οικογενειών Unionidae, Donacidae, και Veneridae και πέντε είδη από την οικογένεια Mytilidae (τέσσερα του γένους *Mytilus* και ένα του γένους *Musculista*). Τα μόρια ομαδοποιούνταν με βάση την οικογένεια από την οποία προέρχονταν και όχι με βάση τον τρόπο κληρονόμησής τους, με εξαίρεση την οικογένεια Mytilidae που παρουσίαζε μία ανάμικτη κατάσταση: σε ένα πρώτο επίπεδο, τα μόρια που ανήκαν σε διαφορετικά γένη (*Mytilus* και *Musculista*) ομαδοποιούνταν ξεχωριστά, ανεξάρτητα του τρόπου κληρονόμησής τους. Μέσα στο γένος *Mytilus* η ομαδοποίηση δεν είχε ισχυρή στατιστική υποστήριξη και ακολουθούσε σύνθετο πρότυπο, ενώ ιδιαίτερη αναφορά θα πρέπει να γίνει στο αρρενοποιημένο γονιδίωμα C που, αν και πατρικώς κληρονομούμενο, εμφανιζόταν να αποκλίνει πολύ πρόσφατα από τα F μόρια των συγγενών ειδών *M. edulis* και *M. galloprovincialis*. Το γενικό αυτό πρότυπο παρατηρήθηκε και στους τρεις τύπους ανάλυσης (Εικόνα 3. 3. 1. Α, Β, Γ).

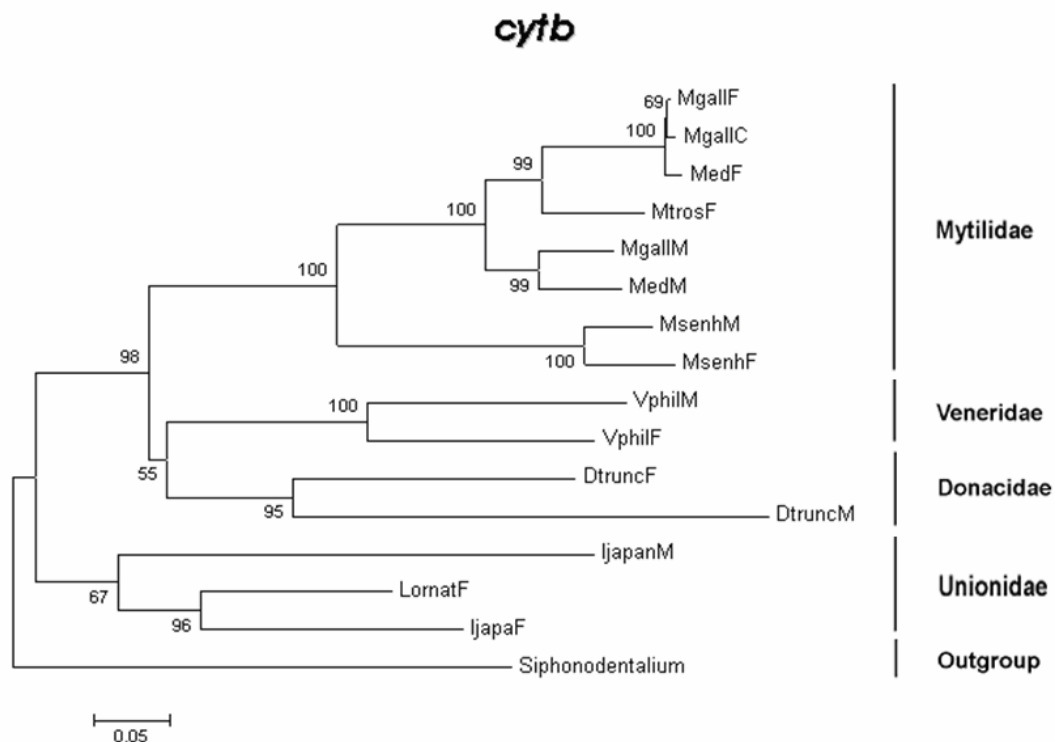




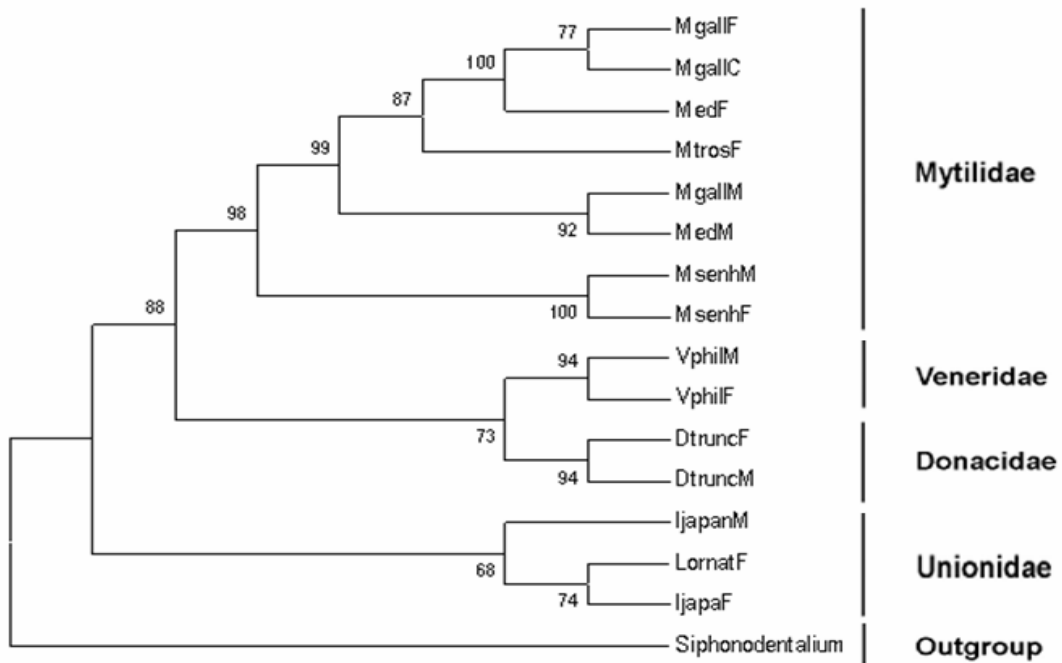
**Εικόνα 3. 3. 1:** Δενδρογράμματα που κατασκευάστηκαν από τμήμα 420 bp του γονιδίου *lrRNA*. A: Neighbor joining (Kimura 2-parameter, 1000 replicates). B: Maximum parsimony (bootstrap consensus tree, 500 replicates). Γ. Maximum likelihood (bootstrap consensus tree, 1000 replicates). Η κατασκευή του δέντρου έγινε με βάση το μοντέλο GTR+G (Guindon and Gascuel 2003), σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προγράμματος Modeltest.

### 3. 3. 2. Τα φυλογενετικά πρότυπα του γονιδίου *Cytb* στα είδη με ΔΜΚ

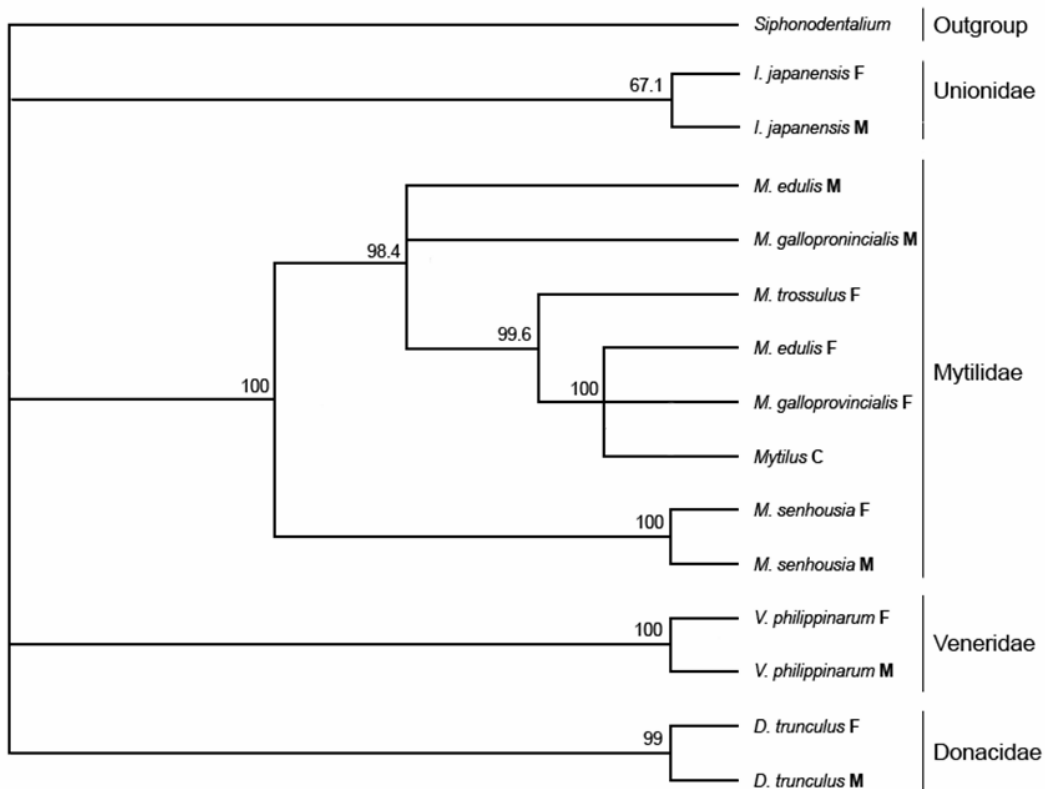
Η μελέτη του γονιδίου *Cytb* περιλάμβανε ένα είδος από κάθε μία εκ των οικογενειών Unionidae, Donacidae, και Veneridae και τρία είδη από την οικογένεια Mytilidae (δύο του γένους *Mytilus* και ένα του γένους *Musculista*). Σε γενικές γραμμές το γονίδιο *Cytb* παρουσιάζει τα ίδια πρότυπα με το *lrRNA* αναφορικά με τον τρόπο ομαδοποίησης των F και M μορίων στις οικογένειες. Μία διαφορά εντοπίζεται στην περίπτωση της τοποθέτησης του μορίου C πλησιέστερα προς το F του *M. galloprovincialis*. Τούτο μάλλον αποτελούσε ιδιαιτερότητα του τμήματος που αναλύθηκε διότι σε προηγούμενη ανάλυση μεγαλύτερου τμήματος του ίδιου γονιδίου (§ 3. 1. 1. B) το μόριο C τοποθετούνταν εκτός του κλάδου F των δύο αδελφών ειδών. Επιπλέον, μέσα στο γένος *Mytilus* η ομαδοποίηση των αλληλουχιών γινόταν σύμφωνα με τον τρόπο κληρονόμησης του μορίου και όχι σύμφωνα με το είδος από το οποίο προέρχονταν.



**A.**



**B.**



**Γ.**

**Εικόνα 3. 3. 2:** Δενδρογράμματα που κατασκευάστηκαν από τμήμα 379 bp του γονιδίου *Cytb*. A: Neighbor joining (Kimura 2-parameter, 1000 replicates). B: Maximum parsimony (bootstrap consensus tree, 500 replicates). Γ. Maximum likelihood (bootstrap consensus tree, 1000 replicates). Η κατασκευή του δέντρου έγινε με βάση το μοντέλο HKY+G (Hasegawa et al. 1985), σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προγράμματος Modeltest.

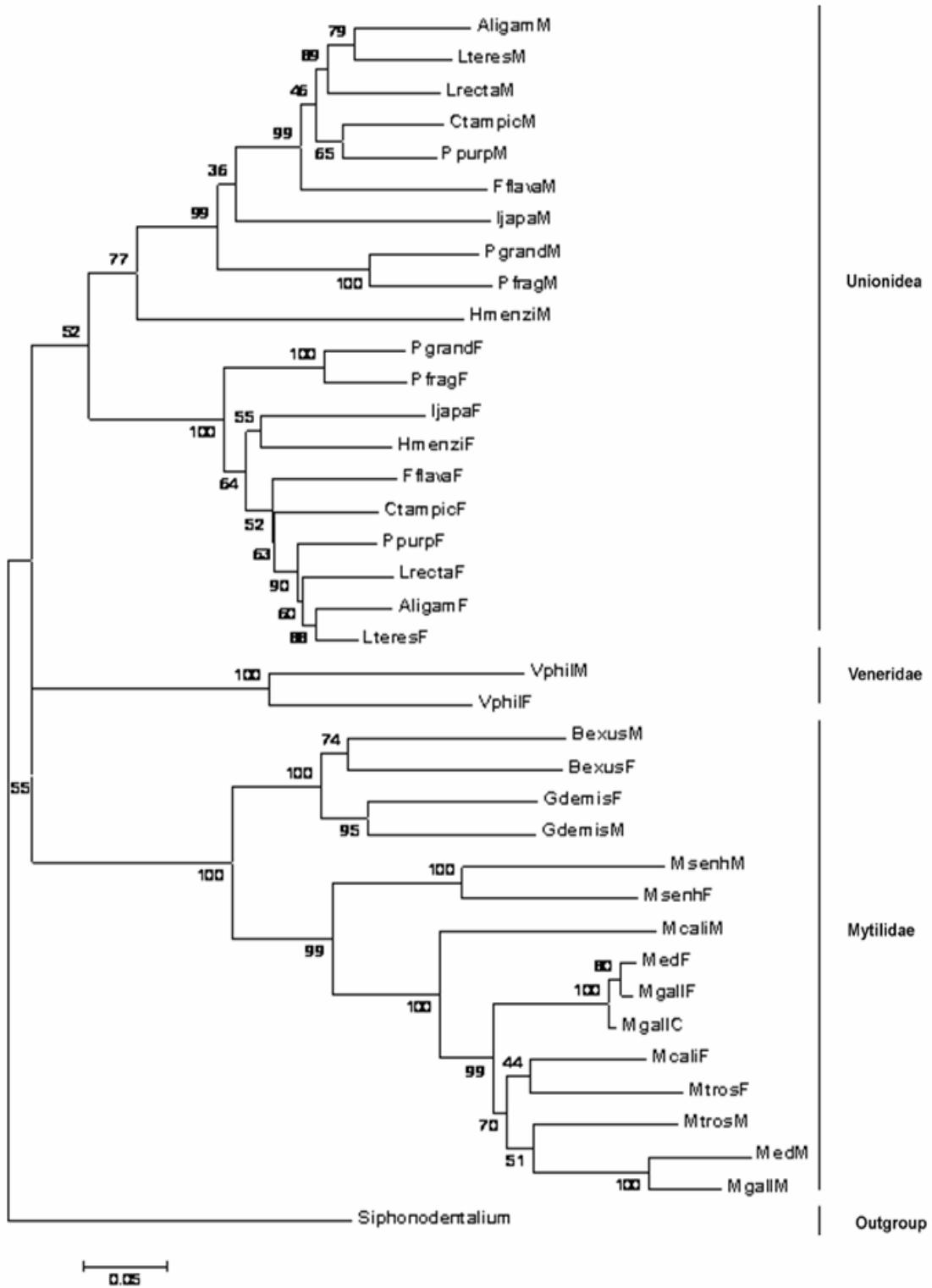
### 3. 3. 3. Τα φυλογενετικά πρότυπα του γονιδίου *COI* στα είδη με ΔΜΚ

Το φυλογενετικά δέντρα του γονιδίου *COI* κατασκευάστηκαν από περισσότερα δεδομένα, τόσο από την πλευρά του αριθμού των ειδών, όσο και από το μέγεθος της αλληλουχίας που αναλύθηκε. Περιλάμβαναν τα οκτώ είδη του δέντρου *lrRNA* εκτός του *Donax trunculus*, δύο επιπλέον είδη της οικογένειας Mytilidae (*Geukensia demissa* and *Brachidontes exustus*), εννέα είδη της οικογένειας Unionidae και ένα είδος από την οικογένεια Hyriidae. Οι δύο τελευταίες οικογένειες ανήκουν στην υπεριοκογένεια Unionoidea. Τα δέντρα περιείχαν τελικά 18 είδη δίθυρων, τα μισά δηλαδή από όσα εμφανίζουν, αποδεδειγμένα ως τώρα, το φαινόμενο της ΔΜΚ.

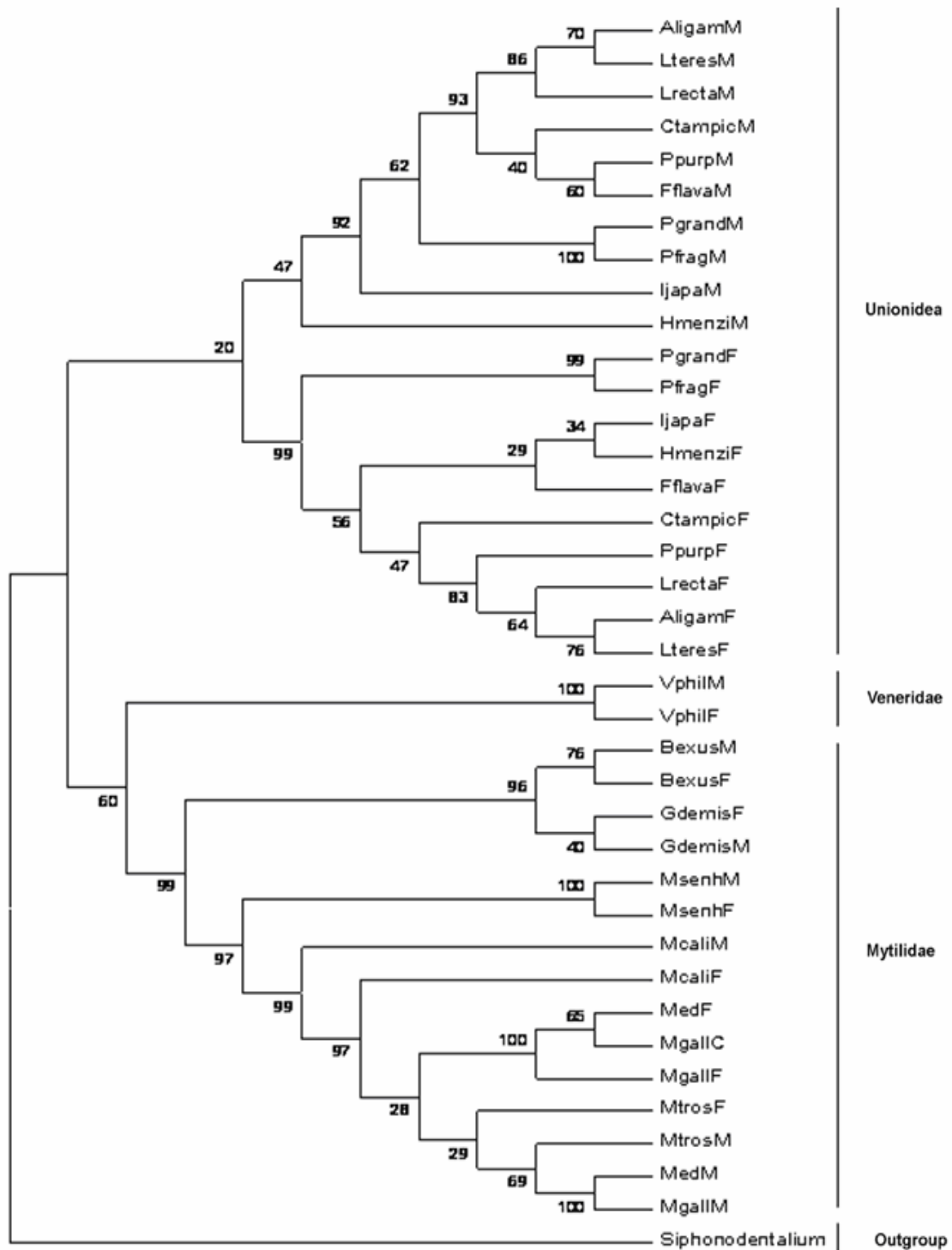
Η ομαδοποίηση των μορίων στο επίπεδο των οικογενειών Mytilidae, Veneridae και της υπεριοκογένειας Unionoidea γινόταν με βάση την ταξινομική ομάδα προέλευσής τους. Μέσα στην υπεριοκογένεια Unionoidea, αντίθετα, όλα τα F μόρια σχημάτιζαν ξεχωριστό κλάδο από τα M, ανεξάρτητα από τις οικογένειες και τα γένη προέλευσής τους. Στον κλάδο της οικογένειας Mytilidae, όπως και στην περίπτωση των δύο προηγούμενων γενετικών τόπων, το πρότυπο που παρατηρήθηκε ήταν ανάμικτο. Τα μόρια των γενών *Mytilus*, *Brachidontes*, *Musculista* και *Geukensia* ομαδοποιούνταν βάσει της ταξινομικής ομάδας προέλευσής τους. Μέσα στο γένος *Mytilus* η ομαδοποίηση σε γενικές γραμμές ακολουθούσε το πρότυπο της κληρονόμησης των μορίων, αν και μεταξύ των δύο δέντρων υπήρχαν διαφορές στην τοποθέτηση του *M. californianus* F και του αρρενοποιημένου C. Η προβληματική της τοποθέτησης του *M. californianus* είχε παρατηρηθεί και στο παρελθόν (Hoeh et al. 1997). Το μόριο C εμφανίζει στο *COI* μία παρόμοια «συμπεριφορά» με εκείνη που παρατηρήθηκε και στο γονίδιο *Cytb*. Στο δέντρο NJ το τμήμα από το C τοποθετήθηκε εκτός των δύο F μορίων του *M. edulis* και *M. galloprovincialis*, ενώ στο δέντρο MP βρισκόταν πλησιέστερα σε ένα από τα δύο προηγούμενα, αλλά αυτή τη φορά, σε αντίθεση με το *Cytb*, ήταν πιο συγγενές με το F του *M. edulis*. Στο δέντρο ML δημιουργείται πολυτομία εξαιτίας χαμηλής στατιστικής στήριξης. Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση του *Cytb*, όταν το μέγεθος της αλληλουχίας ήταν μεγαλύτερο και δεν συμπεριλαμβάνονταν στην ανάλυση πολύ διαφοροποιημένα μόρια, το C ομαδοποιούνταν έξω από τα δύο F γονιδιώματα, ανεξάρτητα της μεθόδου (§ 3. 1. 1. B).



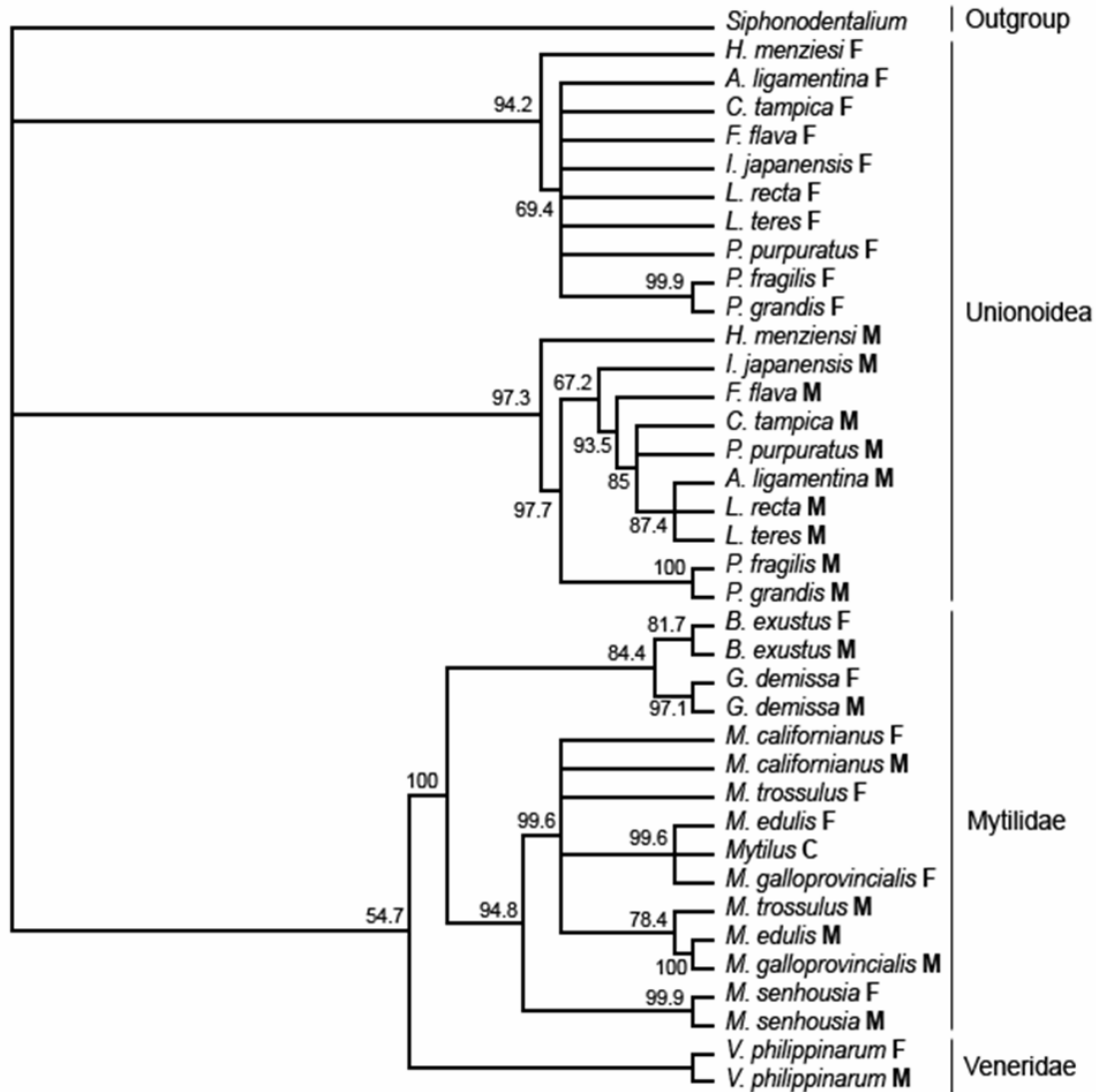
**COI**



**A.**



**B.**



Γ.

**Εικόνα 3. 3:** Δενδρογράμματα που κατασκευάστηκαν από τμήμα 622 bp του γονιδίου *COI*. A: Neighbor joining (Kimura 2-parameter, 1000 replicates). B: Maximum parsimony (bootstrap consensus tree, 500 replicates). Γ. Maximum likelihood (bootstrap consensus tree, 1000 replicates). Η κατασκευή του δέντρου έγινε με βάση το μοντέλο GTR+I+G (Rodriguez et al. 1990), σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προγράμματος Modeltest.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4. 1. Η υπόθεση της «αρρενοποίησης» και το νέο γονιδίωμα C

«Αρρενοποίηση» είναι ο όρος για την υπόθεση ότι σε μερικά είδη με ΔΜΚ, περιστασιακά και κάτω από άγνωστες ως τώρα συνθήκες, ένα μόριο τύπου F, το οποίο τυπικά μεταβιβάζεται μέσω του θηλυκού γαμέτη, αλλάζει ρόλο και μεταβιβάζεται μέσω του σπέρματος (Hoeh et al. 1996, Quesada et al. 1999). Οι παρατηρήσεις που οδήγησαν στην παραπάνω υπόθεση αφορούσαν σε αρσενικά άτομα των ειδών *M. galloprovincialis*, *M. edulis* και *M. trossulus* τα οποία στερούνταν mtDNA μορίου τύπου M. Αυτά τα μη-τυπικά αρσενικά άτομα εμφανίζονταν να περιέχουν ένα ή δύο μόρια τύπου F (Hoeh et al. 1997, Quesada et al. 1999, Ladoukakis et al. 2002). Τα δεδομένα που μέχρι πρόσφατα υποστήριζαν την υπόθεση της «αρρενοποίησης» στηρίζονταν κυρίως σε αναλύσεις των περιοριστικών προτύπων από τμήματα του mtDNA και σε λιγότες αλληλουχίες από τις κωδικές περιοχές του. Οι Ladoukakis and Zouros (2001a), μελετώντας αλληλουχίες που προέρχονταν από μη-τυπικά αρσενικά μύδια *M. galloprovincialis*, απέκτησαν άμεση απόδειξη για την ύπαρξη ομόλογου ανασυνδυασμού στο mtDNA. Οι ανασυνδυασμένοι τύποι που ανακτήθηκαν αποτελούσαν υβρίδια των δύο διαφορετικών F μορίων που εντοπίζονταν, αντίστοιχα, στις γονάδες και στους σωματικούς ιστούς αυτών των ατόμων. Οι περιοχές των μορίων που αναλύθηκαν αποτελούσαν και πάλι τμήματα κωδικών περιοχών. Αργότερα, δημοσιεύτηκαν και άλλες ανασυνδυασμένες αλληλουχίες mtDNA από μη-τυπικά αρσενικά *M. trossulus*, οι οποίες αυτή τη φορά προέρχονταν από τη μη-κωδική περιοχή του μορίου (Burzynski et al. 2003). Αμέσως μετά, δείχθηκε ότι η μη-κωδική περιοχή του mtDNA των μυδιών είναι πιθανότατα η κύρια περιοχή ελέγχου (CR) και ότι διαφέρει συστηματικά, τόσο ως προς το μέγεθος, όσο και ως προς τη νουκλεοτιδική του αλληλουχία μεταξύ των τυπικών F και M μορίων (Cao et al. 2004b).

Η μελέτη της υπόθεσης της «αρρενοποίησης» και των αρρενοποιημένων μορίων ήταν πλέον κομβικής σημασίας για τη βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών της κληρονομησης του mtDNA στα μύδια, καθώς άρχισε να εκφράζεται η υπόθεση ότι η μεταβίβαση των μορίων μέσω του σπέρματος μπορεί να συνδέεται με την

ενσωμάτωση τμημάτων από μόρια πατρικής προέλευσης σε μητρικά, μέσω ανασυνδυασμού (Burzynski et al. 2003, Cao et al. 2004b, Mizi et al. 2005).

Ελέγξαμε την υπόθεση της «αρρενοποίησης» προσπαθώντας να εντοπίσουμε και να ταυτοποιήσουμε τα αρρενοποιημένα μόρια. Ξεκινήσαμε μελετώντας και συγκρίνοντας την περιοχή ελέγχου (ή ρυθμιστική περιοχή, CR) των mtDNA μορίων που εντοπίζονταν στις γονάδες και στους σωματικούς ιστούς αρσενικών μυδιών *M. galloprovincialis* από πληθυσμούς της Μαύρης Θάλασσας. Τα άτομα αυτά είχαν χαρακτηριστεί από προηγούμενες μελέτες ως μη-τυπικά, διότι δεν φαίνονταν να περιέχουν το τυπικό M μόριο (Ladoukakis et al. 2002, Θεολογίδης 2002). Όλα τα μη-τυπικά αρσενικά μύδια που εξετάσαμε περιείχαν στις γονάδες τους ένα μόριο του οποίου η ρυθμιστική περιοχή (CR), αν και όμοια μεταξύ των μη-τυπικών, εμφάνιζε μία σύνθετη δομή σε σχέση με το τυπικό F των σωματικών τους ιστών και τα υπόλοιπα γνωστά F. Ήταν περίπου τριπλάσια σε μέγεθος και, ενώ τα 5' και 3' άκρα της ήταν σχεδόν όμοια με τις F αλληλουχίες, η κεντρική της περιοχή αποτελούνταν από επαναλαμβανόμενα, διατεταγμένα στη σειρά τμήματα CR τύπου M.

Δομές παρόμοιες με αυτήν που μόλις περιγράφηκε – από επαναλαμβανόμενα, διατεταγμένα στη σειρά τμήματα της περιοχής ελέγχου – έχουν εντοπιστεί στο mtDNA περισσότερων από 150 ειδών από ποικίλες ομοταξίες μεταζώων (Lunt et al. 1998, Townsend and Rand 2004). Η δημιουργία τους αποδίδεται κυρίως σε γλίστρημα των αλυσίδων κατά την αντιγραφή του DNA (replication slippage) (Wilkinson et al. 1997, Yamagata and Namikawa 1999, Mundy and Helbig 2004) και πιο σπάνια σε ενδομοριακό ανασυνδυασμό (Rokas et al. 2003). Ωστόσο, είναι πιθανό τέτοιες δομές να αποτελούν και παραπροϊόντα της PCR, ιδιαίτερα όταν παρατηρούνται πολλαπλοί πολυμορφισμοί μεγέθους (Campbell et al. 2001). Στην περίπτωση που μελετήσαμε, το μεγαλύτερο σύνθετο CR δεν είναι πιθανό να αποτελεί παραπροϊόν, καθώς δεν παρατηρήθηκαν σοβαροί πολυμορφισμοί μεγέθους μεταξύ των δειγμάτων που το περιείχαν, ενώ ταυτόχρονα οι αντιδράσεις PCR που στόχευαν στην ανάκτηση των επιμέρους τμημάτων του σύνθετου CR έδιναν, σε όλα τα δείγματα, προϊόντα του ίδιου μεγέθους.

Αναφορικά με τον τρόπο δημιουργίας του σύνθετου CR του *Mytilus*, θα πρέπει, εκτός από τα replication slippages (τα οποία πιθανότατα παρήγαγαν τα επαναλαμβανόμενα CR-M), να δεχτούμε ότι συνέβη τουλάχιστο ένα γεγονός διαμοριακού ανασυνδυασμού, μέσω του οποίου το τμήμα CR-M από ένα τυπικό M μόριο ενσωματώθηκε στο CR-F του υποθετικού προγονικού F μορίου (Venetis et al.

2007). Ο ανασυνδυασμός αυτός θα πρέπει να έλαβε χώρα στη γονάδα κάποιου αρσενικού ατόμου, όπου τα μόρια F και M συνυπάρχουν και κατόπιν το σύνθετο αυτό μόριο να προωθήθηκε προς το σπέρμα και τελικά προς τους αρσενικούς απογόνους του συγκεκριμένου ατόμου. Το αντίθετο σενάριο – η δημιουργία του υβριδικού CR μέσω ανασυνδυασμού σε θηλυκή γονάδα - μοιάζει σχεδόν απίθανο, διότι, αν και, όπως έχει δειχτεί, τα μόρια F και M μπορεί να συνυπάρχουν και στα θηλυκά άτομα (Obata and Komaru 2005), απαιτούνται πολύ περισσότερα και ίσως λιγότερο πιθανά βήματα ώστε να φτάσει αυτό το μόριο στο σπέρμα των αρσενικών απογόνων ενός θηλυκού μυδιού και από εκεί, τελικά, να εξαπλωθεί στον πληθυσμό.

Αν και από προηγούμενες μελέτες είχαμε σοβαρές ενδείξεις ότι το μόριο που περιείχε το σύνθετο CR ήταν F στο υπόλοιπο μήκος του (Ladoukakis et al. 2002, Θεολογίδης 2002), προχωρήσαμε στη μελέτη τριών κωδικών του περιοχών και τελικά στον προσδιορισμό της πλήρους πρωτοδιάταξής του. Το γονιδίωμα C – (compound), πήρε το όνομά του από τη σύνθετη δομή της ρυθμιστικής του περιοχής – ήταν ένα μόριο που, εκτός από την περιοχή ελέγχου, έμοιαζε πολύ με το τυπικό F του *M. galloprovincialis* και του *M. edulis* (η γενετική τους απόσταση ήταν ~2%, Παραρτήματα II & III). Η απόστασή του από τα M ήταν κατά μέσο όρο 23.5%. Η διάταξη και ο αριθμός των γονιδίων που περιείχε ήταν όμοια με των τυπικών F και M μορίων. Το μόριο C εντοπίστηκε στις γονάδες όλων των μη-τυπικών αρσενικών που εξετάστηκαν, γεγονός που υποδεικνύει ότι είναι ένα μόριο που κληρονομείται πατρικά. Ανιχνευόταν επίσης, σε συνύπαρξη με το τυπικό F, και σε σωματικούς ιστούς αρσενικών, καθώς και σε θηλυκά άτομα, με συχνότητα όχι διαφορετική από ότι το μόριο M.

#### **4. 2. Η «αρρενοποίηση» στα αδελφά είδη *M. galloprovincialis* και *M. edulis***

Είχε διατυπωθεί στο παρελθόν η υπόθεση ότι ένα γεγονός «αρρενοποίησης» θα μπορούσε να έχει σαν αφετηρία την αποτυχία εισόδου του μορίου M στην αρσενική γονάδα και την επακόλουθη αντικατάστασή του από ένα τυπικό F (Saavedra et al. 1997). Η υπόθεση στηρίχτηκε σε δεδομένα από παρατηρήσεις αρσενικών ατόμων ομοπλασμικών για ένα μόριο F σε φυσικούς πληθυσμούς του *M. galloprovincialis* και *M. trossulus* (Saavedra et al. 1997, Quesada et al. 1999, Ladoukakis et al. 2002). Η επανεξέταση όμως των ίδιων δειγμάτων *M. galloprovincialis* που χρησιμοποιήθηκαν από τους Saaverda et al. (1997) και

Ladoukakis et al. (2002) αντικρούει την παραπάνω υπόθεση, υποδεικνύοντας ότι η παρατήρηση ομοπλασμίας σε αυτά τα αρσενικά οφειλόταν, είτε στην αποτυχία εντοπισμού του μορίου M (Theologidis et al. 2007a), είτε στην αδυναμία διάκρισης δύο συγγενών F τύπου αλληλουχιών μέσω της ανάλυσης των περιοριστικών τους προτύπων (§ 3. 1. 2, A και B).

Ο προσδιορισμός του νέου γονιδιώματος C αποτελεί άμεση απόδειξη της υπόθεσης της «αρρενοποίησης» (Hoeh et al. 1996) ή της αναστροφής ρόλων (Quesada et al. 1999), σύμφωνα με την οποία ένα μητρικώς κληρονομούμενο μόριο μπορεί να μετατραπεί σε πατρικώς κληρονομούμενο. Η μετατροπή φαίνεται να συνδέεται με την ενσωμάτωση στοιχείων M τύπου στη ρυθμιστική περιοχή ενός τυπικού F μορίου. Η θέση αυτή ενισχύεται ιδιαίτερα μετά την παρατήρηση ότι το γονιδίωμα C (συνεπώς και η ρυθμιστική περιοχή του) ταυτίζεται όχι μόνο με το αρρενοποιημένο μόριο του *M. galloprovincialis* της Μεσογείου και της Μαύρης θάλασσας, αλλά και με το αρρενοποιημένο *M. edulis* από τις ακτές της Β. Αμερικής (§ 3. 1. 6). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν ότι και τα αρρενοποιημένα μόρια του *M. trossulus* περιέχουν στοιχεία τύπου M στη ρυθμιστική τους περιοχή (Burzynski et al. 2006).

Τα συμπεράσματα από τις παραπάνω παρατηρήσεις έχουν προεκτάσεις που αφορούν στη βαθύτερη κατανόηση της κληρονόμησης του mtDNA στο μύδι και της εξέλιξης της ΔΜΚ. Αν πραγματικά υπάρχει μία αιτιώδης σχέση ανάμεσα στην ενσωμάτωση συγκεκριμένων τμημάτων στο μόριο του mtDNA και στον τρόπο μεταβίβασής του, τότε οι προεκτάσεις θα είναι ακόμα ευρύτερες. Προς το παρόν, τα νέα δεδομένα υπονοούν ότι η «αρρενοποίηση» δεν πρέπει να είναι συχνό φαινόμενο στα δίθυρα, θέση που ενισχύεται - ακόμα και αν όντως δεν απαιτούνται συγκεκριμένες μοριακές ανακατατάξεις - από το γεγονός ότι όλα τα γεγονότα «αρρενοποίησης» στα είδη *M. galloprovincialis* και *M. edulis* μπορούν τελικά να αναχθούν σε ένα. Δεν αποκλείεται μάλιστα να αποδειχτεί ότι και το αρρενοποιημένο μόριο του *M. trossulus* της Βαλτικής έχει πολύ στενή συγγένεια με το C, όταν θα γίνει γνωστή η πλήρης πρωτοδιάταξή του. Η «αρρενοποίηση», μηδενίζοντας το χρόνο της διαφοροποίησης μεταξύ των μητρικώς και πατρικώς μεταβιβαζόμενων μορίων, μπορεί να αποτελέσει κομβικό σημείο στη θεώρηση της εξελικτικής ιστορίας του συστήματος της ΔΜΚ. Όπως θα συζητηθεί σε επόμενη παράγραφο, παρέχει ένα σταθερό πλαίσιο επιχειρημάτων για την αναθεώρηση της υπόθεσης των πολλαπλών εμφανίσεων της ΔΜΚ κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των δίθυρων (§ 4. 6).

#### 4. 3. Αναθεώρηση των μη-τυπικών αρσενικών και ερμηνεία της παρουσίας τριπλασματικών ατόμων στους φυσικούς πληθυσμούς

Σύμφωνα με τις προγενέστερες παρατηρήσεις υπήρχαν δύο κατηγορίες μη-τυπικών αρσενικών: (α) εκείνα που ήταν ομοπλασματικά για ένα F μόριο και (β) εκείνα που ήταν ετεροπλασματικά για δύο διαφορετικά F μόρια. Ο εντοπισμός ατόμων της κατηγορίας (α) θεωρούταν ότι αντικατόπτριζε την ανίχνευση γεγονότων «αρρενοποίησης εν τη γενέσει». Με βάση την ίδια λογική, τα μη-τυπικά της κατηγορίας (β) αντιπροσώπευαν περιπτώσεις στις οποίες η «αρρενοποίηση» είχε ήδη συμβεί και τα άτομα αυτά έφεραν στους ιστούς τους ένα μητρικό και ένα πατρικό F, διαφορετικό από το πρώτο, μόριο. Ο εντοπισμός του γονιδιώματος C, η μελέτη της κατανομής του και η επανεξέταση των αρσενικών ατόμων που είχαν μελετήσει οι Saavedra et al. (1997) επιβάλλουν την αναθεώρηση των παραπάνω υποθέσεων. Αποδεικνύεται πλέον ότι δεν υπάρχουν ομοπλασματικά αρσενικά ή ετεροπλασματικά για δύο F και συνεπώς φαίνεται ότι τα αρσενικά άτομα μεταβιβάζουν πάντοτε ένα μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

Επιπρόσθετα, φαίνεται να υπάρχουν τριπλασματικά άτομα στους πληθυσμούς του *M. galloprovincialis* και του *M. edulis* (§ 3. 1. 2. A), δηλαδή αρσενικά και θηλυκά μύδια που περιέχουν και τα τρία γνωστά γονιδιώματα (F, M, C). Τα τρία αυτά μόρια εντοπίζονται στους ιστούς των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων σύμφωνα με τα στοιχεία που παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

	Αρσενικά άτομα			Θηλυκά άτομα	
	Σώμα	Γονάδα	Σπέρμα <sup>1</sup>	Σώμα και γονάδα	Αυγά <sup>2</sup>
<b>F</b>	+	+	-	+	+
<b>M</b>	+	+	+	+	+
<b>C</b>	+	+	+	+	?

(+) Παρουσία μορίου. (-) Απουσία μορίου. (?) Απουσία δεδομένων

<sup>1</sup> Venetis et al. 2006, <sup>2</sup> Obata and Komaru 2005.

Αν θεωρήσουμε ότι το σπέρμα μεταφέρει μόνο πατρικά μόρια (το M ή/και το C) – θεώρηση που προβάλλει ως επιτακτική ώστε να διατηρείται η διαφοροποίηση ανάμεσα στα μητρικά και τα πατρικά μόρια και κατ' επέκταση το φαινόμενο της



ΔΜΚ, τότε δύο είναι οι πιθανές υποθέσεις για να εξηγηθεί η ύπαρξη τριπλασμικών ατόμων.

Η πρώτη θα δεχόταν ίσως, όπως άλλωστε προτείνουν και τα δεδομένα, ότι το σπέρμα μεταφέρει μόνο ένα από τα δύο πατρικά μόρια (ή το Μ ή το C, Venetis et al. 2006). Το τριπλασμικό άτομο δημιουργείται διότι στο αυγό εισέρχεται – πιθανώς στοχαστικά – μικρή ποσότητα πατρικού mtDNA που φέρει από πριν το θηλυκό άτομο. Τέτοια δεδομένα επίσης υπάρχουν από τη μελέτη του περιεχόμενου αυγών του *M. galloprovincialis* (Obata and Komaru 2005). Συνεπώς, το ζυγωτό θα περιέχει τρία μόρια. Το πατρικό (Μ ή C) από το σπέρμα, το μητρικό (F) και ένα πατρικό (Μ ή C) που μεταφέρθηκε μέσω του αυγού. Αν το ένα από τα πατρικά είναι το Μ και το άλλο είναι το C, τότε είναι δυνατή η παρατήρηση τριπλασμικών ατόμων. Η υπόθεση, όπως μόλις διατυπώθηκε, δεν αποκλείει και την ύπαρξη τριπλασμικών ατόμων για ένα F και δύο διαφορετικά Μ μόρια ή ακόμα και για δύο διαφορετικά C μόρια. Όμως οι περιπτώσεις τέτοιων τριπλασμικών ατόμων ίσως είναι πολύ δυσκολότερο να ανιχνευτούν, καθώς θα είναι δυσκολότερο να ανιχνευτούν με συμβατικές μεθόδους δύο διαφορετικά αλλά πολύ όμοια Μ (ή C) μόρια.

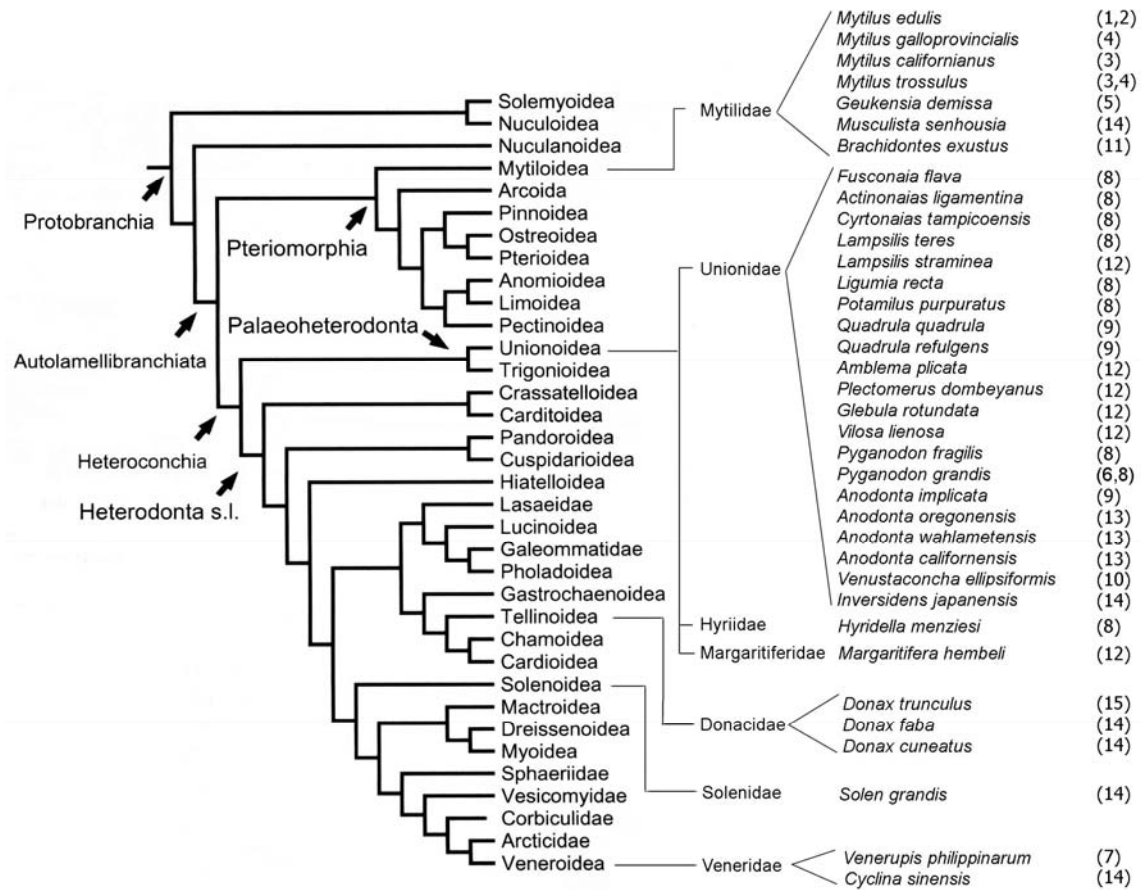
Η δεύτερη υπόθεση θα υποστήριζε ότι το σπέρμα μπορεί να μεταφέρει δύο διαφορετικά πατρικά μόρια. Αν επρόκειτο για ένα Μ και ένα C, τότε θα ήταν δυνατό να προκύψουν τριπλασμικά άτομα, τα οποία σχετικά εύκολα πλέον θα μπορούσαν να ανιχνευτούν. Εντούτοις, δεν έχει παρατηρηθεί μέχρι σήμερα σπέρμα που να περιέχει δύο διαφορετικά πατρικά γονιδιώματα. Επιπλέον, ο μηχανισμός της ΔΜΚ θα πρέπει να «απαιτεί» πολύ μεγαλύτερη αυστηρότητα σχετικά με το ποιο είναι το περιεχόμενο του σπέρματος, σε σχέση με το περιεχόμενο του αυγού, γεγονός που καθιστά σχεδόν απίθανη την παρουσία δύο διαφορετικών γονιδιωμάτων στο σπέρμα. Για να συμβεί κάτι τέτοιο, θα πρέπει στο σπέρμα του ενήλικου αρσενικού, εκτός από το πατρικό mtDNA, να εισχωρήσει ένα δεύτερο πατρικό που είχε «διαρρεύσει» σε προηγούμενη στιγμή στους ιστούς της μητέρας του (βλ. επίσης § 4. 7, Εικόνα 4. 4).

#### 4. 4. Η εξάπλωση της Διπλής Μονογονεϊκής Κληρονομικότητας του mtDNA στα δίθυρα

Η μελέτη του μιτοχονδριακού DNA του *Donax trunculus* αποκάλυψε εκτεταμένη ετεροπλασμία που σχετίζεται με το φύλο σε τμήματα των γονιδίων *IrRNA* και *Cytb*. Τα αρσενικά άτομα ήταν ετεροπλασμικά για δύο πολύ διαφοροποιημένους τύπους mtDNA, από τους οποίους ο ένας (ονομάστηκε M) κυριαρχούσε στη γονάδα ενώ ο δεύτερος στο σώμα (ονομάστηκε F). Τα θηλυκά άτομα, αντίθετα, περιείχαν έναν μόνο τύπο σε όλους τους ιστούς τους, ο οποίος ήταν πανομοιότυπος με εκείνον που κυριαρχούσε στα αρσενικά σώματα (τύπος F). Οι παραπάνω παρατηρήσεις μπορούν να γενικευτούν για ολόκληρο το μόριο του mtDNA και αποτελούν απόδειξη ότι η μεταβίβασή του στο εν λόγω είδος ακολουθεί το σύστημα της ΔΜΚ. Η οικογένεια Donacidae γίνεται η έκτη οικογένεια δίθυρων που εμφανίζει τη ΔΜΚ. Εκτός από το *D. trunculus*, είναι πολύ πιθανό ότι δύο ακόμα είδη του γένους *Donax*, τα *D. faba* και *D. cuneatus*, εμφανίζουν το φαινόμενο, καθώς υπάρχουν δημοσιευμένες mtDNA αλληλουχίες από γονάδες αρσενικών και θηλυκών ατόμων των παραπάνω ειδών, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους πάνω από 35% (GenBank: AB040841-5). Επιπλέον, βρέθηκαν δημοσιευμένες mtDNA αλληλουχίες που διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα σε δείγματα αρσενικών και θηλυκών γονάδων από δύο ακόμα είδη. Το πρώτο ανήκει στην οικογένεια Veneridae, η οποία είναι ήδη γνωστό ότι περιλαμβάνει ένα είδος με ΔΜΚ (*V. philippinarum*, Passamonti and Scali 2001) και είναι το *Cyclina sinensis*. Στο είδος αυτό, τμήμα του γονιδίου *COI* διαφέρει μεταξύ αρσενικών και θηλυκών γονάδων κατά 13% (GenBank: AB040833-5). Η ίδια διαφοροποίηση παρατηρείται για το ίδιο τμήμα mtDNA και μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών γονάδων του δίθυρου *Solen grandis* (GenBank: AB064983-5) που ανήκει στην οικογένεια Solenidae, για την οποία δεν υπάρχουν ως τώρα ενδείξεις παρουσίας της ΔΜΚ.

Στην Εικόνα 4. 1. παρουσιάζονται οι εξελικτικές σχέσεις 36 ειδών δίθυρων σύμφωνα με τη συστηματική κατάταξη των Giribet και Wheeler (2002), για τα οποία υπάρχουν στοιχεία παρουσίας της ΔΜΚ. Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, για τα τέσσερα από αυτά, τα στοιχεία αφορούν σε δεδομένα που συλλέχθηκαν από τράπεζες δεδομένων, ενώ για τα υπόλοιπα υπάρχουν δημοσιεύσεις. Τα 36 είδη διασπείρονται σε τρεις από τις τέσσερις υφομοταξίες των δίθυρων (Pteriomorpha, Palaeoheterodonta και Heterodonta), ανήκουν σε επτά οικογένειες και πέντε

υπεροικογένειες, οι οποίες δεν σχηματίζουν έναν διακριτό κλάδο μέσα στα δίθυρα. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν στοιχεία αναφορικά με την υφομοταξία Protobranchia που περιλαμβάνει και τα πιο πρωτόγονα δίθυρα.



- |                             |                               |                              |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| (1) Zouros et al. 1994b     | (6) Liu et al. 1996           | (11) Lee and O' Foighil 2004 |
| (2) Skibinski et al. 1994b  | (7) Passamonti and Scali 2001 | (12) Curole and Kocher 2005  |
| (3) Geller et al. 1993      | (8) Hoeh et al. 2002          | (13) Mock et al. 2004        |
| (4) Rawson and Hiblish 1995 | (9) Curole and Kocher 2002    | (14) GenBank *               |
| (5) Hoeh et al. 1996        | (10) Chakrabarti et al. 2006  | (15) This study              |

\* GenBank accession numbers:

*M. senhousia*: AY570019-51, AY614613-4701 and DQ141817-59, *I. japonensis*: AB055624-5, *S. grandis*: AB064983-5, *D. faba* and *D. cuneatus*: AB040841-45, *C. sinensis*: AB040833-5

**Εικόνα 4. 1:** Η εξάπλωση της ΔMK στα δίθυρα. (Από Theologidis et al. 2007b).

Αν υποθέσουμε ότι η ΔMK εμφανίστηκε μόνο μία φορά στην ομοταξία των δίθυρων, τότε σύμφωνα με την εξάπλωσή της στην Εικόνα 4. 1, φαίνεται ότι αποτελεί ένα πολύ παλιό φαινόμενο που προηγήθηκε του διαχωρισμού της ομοταξίας στις βασικές της υφομοταξίες, διαχωρισμός που θεωρείται ότι πραγματοποιήθηκε κατά το

μέσο Ορδοβίσιο (460 MYA, Harper et al. 2000). Άρα, η αφετηρία της ΔΜΚ θα μπορούσε να τοποθετηθεί στα όρια Κάμβριου – Ορδοβίσιου, πριν από περίπου 505 εκ. έτη. Αν μάλιστα το φαινόμενο εντοπιστεί μελλοντικά και στην υφομοταξία Protobranchia, η ηλικία της ΔΜΚ ίσως αποδειχτεί ακόμη μεγαλύτερη. Η απουσία της ΔΜΚ σε ορισμένα σύγχρονα είδη και οικογένειες θα μπορούσε να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα δευτερογενών εξαφανίσεων του φαινομένου κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ή σε αδυναμία ανίχνευσης του φαινομένου (βλ. § 4. 5). Εναλλακτικά, σύμφωνα με την Εικόνα 4. 1, η εξάπλωση της ΔΜΚ στα δίθυρα θα ήταν δυνατό να εξηγηθεί με την παραδοχή ότι είχε πολλαπλές και ανεξάρτητες εμφανίσεις. Οι δύο παραπάνω υποθέσεις ελέγχθηκαν με τη μελέτη της φυλογένεσης μητρικών και πατρικών γονιδιωμάτων από είδη με ΔΜΚ που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες, όπως παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο 3. 3, και θα συζητηθούν σε επόμενη παράγραφο, σε συνδυασμό με το φαινόμενο της «αρρενοποίησης» (§ 4. 6).

#### 4. 5. Το πρόβλημα του εντοπισμού της ΔΜΚ

Ένα κρίσιμο ερώτημα αφορά στο γιατί η ΔΜΚ δεν έχει εντοπιστεί, μέχρι σήμερα, σε περισσότερα δίθυρα. Το πρότυπο της κατανομής του φαινομένου στην εν λόγω ομοταξία, με τα ως τώρα δεδομένα, καθιστά το παραπάνω ερώτημα ακόμα πιο εύλογο. Μία από τις βασικές δυσκολίες για την ολοκληρωμένη κατανόηση του ζητήματος είναι το γεγονός ότι πολύ δύσκολα μπορεί να εκτιμηθεί ποια είδη έχουν εξεταστεί και μέσω ποιας μεθοδολογίας, καθώς οι αρνητικές απαντήσεις σπανίως κοινοποιούνται. Πριν από το είδος *Donax trunculus*, αναζητήσαμε το φαινόμενο σε μία σειρά ειδών (*Venus verrucosa*, *Callista chione*, *Venerupis decussatus*: οικ. Veneridae, *Arca noae*: οικ. Arcidae) χωρίς θετικό αποτέλεσμα. Η αποτυχία εντοπισμού της ΔΜΚ ειδικά στα Veneridae που δοκιμάστηκαν μας προκάλεσε ιδιαίτερη εντύπωση, καθώς ένα άλλο είδος Veneridae (*Venerupis philippinarum*) την εμφανίζει (Passamonti and Scali 2001). Η απουσία ΔΜΚ στο *Venerupis decussatus* είχε σημειωθεί με έμφαση και από τους ίδιους συγγραφείς που την εντόπισαν στο *Venerupis philippinarum*. Τέτοιου είδους παρατηρήσεις εγείρουν την υπόθεση ότι η ΔΜΚ μπορεί να είναι παρούσα σε πολλά είδη δίθυρων, αλλά δεν εντοπίζεται εξαιτίας τεχνικών δυσκολιών.

Σήμερα, μετά την προσθήκη και του *D. trunculus* στον κατάλογο των ειδών με ΔΜΚ, εδραιώνεται μάλλον η πεποίθηση ότι η πολύ μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των F και M μορίων είναι κανόνας. Τα είδη του γένους *Mytilus* φαίνεται να αποτελούν την εξαίρεση. Οι γενετικές αποστάσεις των F και M μορίων σε όλες τις οικογένειες με ΔΜΚ, εκτός των Mytilidae, φτάνουν και μερικές φορές ξεπερνούν το 50%, τιμές πολύ υψηλότερες από εκείνες που παρατηρούνται στο mtDNA μεταξύ των αμνιωτών και των αμφίβιων (Kumazawa et al. 2004). Είναι κατά συνέπεια πολύ πιθανό ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται αναγνωρίζουν μόνο το ένα από τα δύο γονιδιώματα. Αν τύχει να είναι το μητρικό, τότε το εξεταζόμενο είδος θα παρουσιαστεί σαν ομοπλασμικό και η παρουσία της ΔΜΚ πιθανότατα θα αποκλειστεί. Το αντίθετο θα συμβεί αν οι εκκινητές πολλαπλασιάσουν μόνο το πατρικό γονιδίωμα, όπως στην περίπτωση που περιγράφηκε για το *D. trunculus*, οπότε δημιουργούνται βάσιμες υποψίες για την ύπαρξη της ΔΜΚ.

Ένα άλλο ενδεχόμενο είναι ότι σε πολλά είδη που εξετάζονται, τα μητρικά από τα πατρικά μόρια είναι πολύ λίγο διαφοροποιημένα εξαιτίας πρόσφατων γεγονότων «αρρενοποίησης». Σε τέτοιες περιπτώσεις ο εντοπισμός της ΔΜΚ μπορεί να αποτύχει διότι τα τμήματα των δύο μορίων που θα εξεταστούν, θα παράγουν πιθανότατα όμοια περιοριστικά πρότυπα και τα είδη θα εμφανίζονται ομοπλασμικά.

Τα προβλήματα που αναφέρονται στον εντοπισμό της ΔΜΚ θα μπορούσαν ίσως να ξεπεραστούν αν οι μελέτες εστιαστούν σε δείγματα DNA από καθαρά γαμετικά κύτταρα των εκάστοτε ειδών. Αφού το σπέρμα περιέχει αποκλειστικά πατρικά μόρια (Venetis et al. 2006) και τα αυγά κυριαρχούνται από τα μητρικά σε μεγάλο ποσοστό (Obata and Komaru 2005), τότε ακόμα και η παρουσία ή η απουσία του αναμενόμενου προϊόντος σε δοκιμές PCR από καθαρά δείγματα των δύο αυτών κατηγοριών θα αποτελούσε σοβαρή ένδειξη για την ύπαρξη του φαινομένου. Επιπλέον, με τον τρόπο αυτό θα ήταν δυνατό να ελαχιστοποιηθεί και η πιθανότητα επιλεκτικού πολλαπλασιασμού του ενός εκ των δύο μορίων που σε πολλές περιπτώσεις συμβαίνει εξαιτίας της «προτίμησης» που δείχνουν οι εκκινητές προς τη μία εκ των δύο μήτρων DNA που συνυπάρχουν σε ένα ετεροπλασμικό δείγμα (Green et al. 2006). Εναλλακτικά, ή ακόμα και παράλληλα με την προηγούμενη μεθοδολογία, προτείνεται η απόκτηση πολύ καθαρών κλασμάτων mtDNA από ιστούς των υποψήφιων ειδών, η πέψη τους με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και η υβριδοποίησή τους με σημαντές (probes) από πολύ συντηρητικές περιοχές του mtDNA (παράδειγμα αποτελεί η κεντρική περιοχή της περιοχής ελέγχου του μορίου).

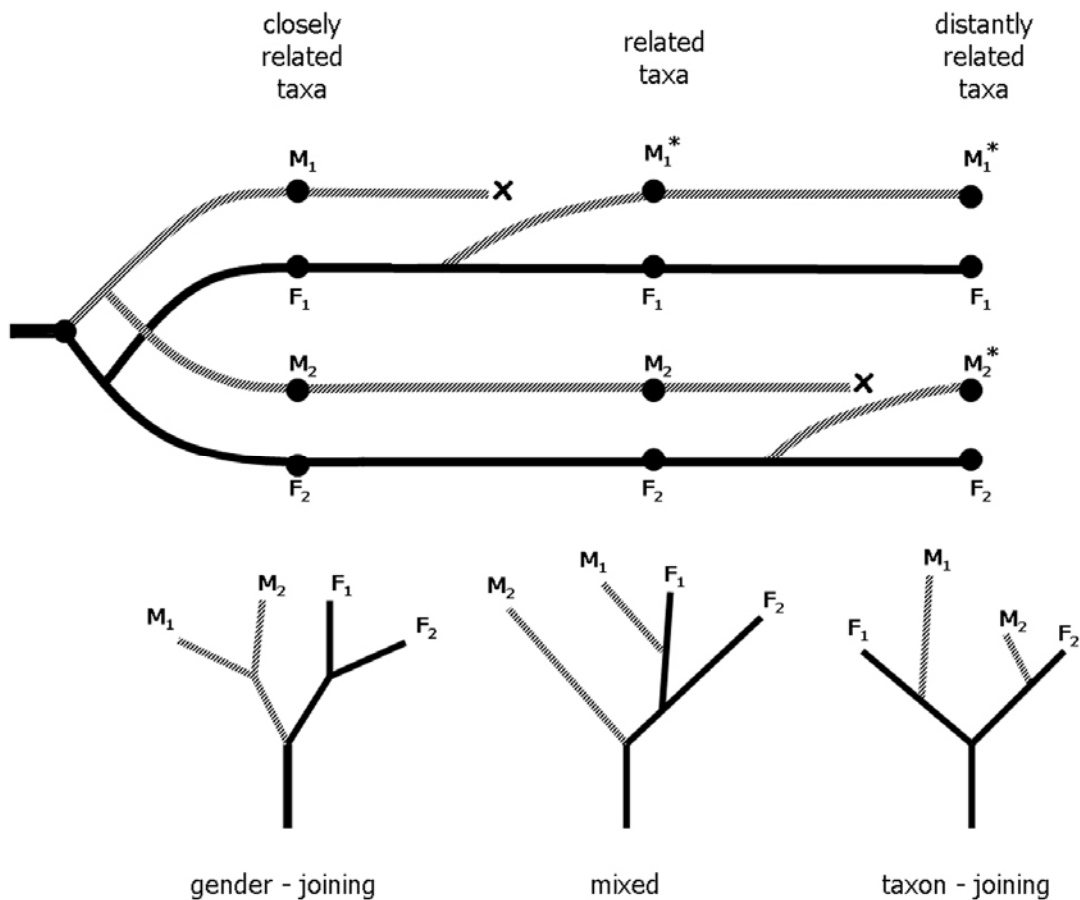
#### 4. 6. Ο ρόλος της «αρρενοποίησης» στην εμφάνιση και εξέλιξη της ΔΜΚ

Οι παρατηρήσεις σχετικά με την «αρρενοποίηση» και η ανεύρεση τουλάχιστο μίας ακόμη οικογένειας που εμφανίζει τη ΔΜΚ μας οδήγησαν στην επανεξέταση των υποθέσεων που έχουν διατυπωθεί σχετικά με την εξέλιξη του συστήματος της ΔΜΚ. Μελετήσαμε τις φυλογενετικές σχέσεις των F και M μορίων σε είδη από όλες τις γνωστές οικογένειες, για τις οποίες υπήρχε διαθέσιμη πληροφορία. Τα στοιχεία ήταν επαρκή για την ανάλυση τριών περιοχών του mtDNA, που αποτελούσαν τμήματα των γονιδίων *IrRNA*, *Cytb* και *COI*.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης, τα οποία σε γενικές γραμμές ήταν κοινά και για τους τρεις γενετικούς τύπους, μπορούν να εξηγηθούν μέσω δύο βασικών συλλογιστικών. Η πρώτη, η υπόθεση των πολλαπλών εμφανίσεων, δέχεται ότι η ΔΜΚ εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των δίθυρων κάθε φορά που διακλαδίζονται τα μόρια F και M μεταξύ οικογενειών ή γενών ή ακόμα και ειδών. Με βάση τα δέντρα που παράχθηκαν (§ 3. 3, Εικόνες 3. 3. 1-3), η υπόθεση απαιτεί μία εμφάνιση για ολόκληρη την υπεριογένεια Unionoidea, άλλη μία για καθεμιά εκ των οικογενειών Veneridae, Donacidae και Mytilidae, τέσσερις για καθένα από τα γένη της οικογένειας Mytilidae και δύο ή τρεις ακόμη για τα είδη του γένους *Mytilus* (δεν μπορούν να προσδιοριστούν ακριβώς, αν πριν δεν διαλευκανθούν οι σχέσεις μεταξύ των συγγενών ειδών του γένους με την απόκτηση περισσότερων αλληλουχιών, κυρίως από τα είδη *M. californianus* και *M. trossulus*). Θα πρέπει ενδεχομένως να προστίθενται συνεχώς και άλλες, κάθε φορά που θα εντοπίζεται στο μέλλον νέο είδος ή οικογένεια με ΔΜΚ και σε τελική ανάλυση θα απαιτείται ένας μεγάλος αριθμός εμφανίσεων για να εξηγηθεί η κατανομή της ΔΜΚ στα δίθυρα. Αν ο αριθμός των ανεξάρτητων εμφανίσεων είναι ανάλογος του εξελικτικού χρόνου, τότε, σύμφωνα με τη υπόθεση, ο χρόνος διάσχισης των οικογενειών Mytilidae, Veneridae και Donacidae θα πρέπει να είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με το χρόνο διάσχισης των τριών γενών μέσα στα Mytilidae και, επιπλέον, θα πρέπει ο αποχωρισμός των οικογενειών της υπεριογένειας Unionoidea να έγινε πιο πρόσφατα από τον αποχωρισμό των τριών γενών Mytilidae. Άλλο ένα επιχείρημα που καθιστά την υπόθεση των πολλαπλών εμφανίσεων ακόμα λιγότερο πιθανή είναι η μοριακή και η αναπτυξιακή πολυπλοκότητα που πιθανότατα κρύβονται πίσω από το φαινόμενο της ΔΜΚ και η σύνδεσή της με τον προκαθορισμό του φύλου στα δίθυρα (Zouros 2000). Η επαναλαμβανόμενη και ανεξάρτητη ανασυναρμολόγηση ενός τέτοιου μηχανισμού

θα προϋπέθετε ένα ισχυρό επιλεκτικό πλεονέκτημα της ΔΜΚ έναντι της τυπικής μητρικής κληρονομιάς. Σύμφωνα με την παρούσα κατανομή της, κάτι τέτοιο θα σήμαινε ότι αυτό το εξελικτικό πλεονέκτημα αναδύθηκε ανεξάρτητα μεταξύ απομακρυσμένων φυλογενετικά ειδών αλλά όχι και μεταξύ στενά συγγενικών.

Η εναλλακτική πρόταση, η μοναδική εμφάνιση της ΔΜΚ, δεν μπορεί από μόνη της εξηγήσει την κατανομή του φαινομένου και τις φυλογενετικές σχέσεις των μορίων F και M, εκτός αν συνδυαστεί με την υπόθεση της «αρρενοποίησης» (Εικόνα 4. 2). Δύο είναι τα στάδια που θα απαιτούνταν: α) δημιουργία ενός νέου πατρικά κληρονομούμενου γονιδιώματος από ένα μητρικό και β) αντικατάσταση του παλιού πατρικού μορίου από το νέο. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4. 2, ο τύπος του δέντρου που θα προκύψει από την ανάλυση της φυλογένεσης των μορίων εξαρτάται από το χρονικό διάστημα που θα έχει μεσολαβήσει μετά τη διάσχιση των ταξινομικών βαθμίδων από τον κοινό πρόγονο, όπως επίσης και από το βαθμό ολοκλήρωσης της διαδικασίας της «αρρενοποίησης» (δημιουργία και εγκαθίδρυση ενός νέου «M» μορίου).



**Εικόνα 4. 2:** Η διαφοροποίηση των μορίων F και M και η πιθανή επίδραση της «αρρενοποίησης». Βλ. κείμενο. (Από Theologidis et al. 2007b).

Η κατανομή της ΔΜΚ, σύμφωνα με την Εικόνα 4. 1 (§ 4. 4), υποδηλώνει ότι το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε μεταξύ της διάσχισης της υπεροικογένειας Unionoidea από τις υπόλοιπες τρεις οικογένειες ήταν αρκετό για να συμβούν τουλάχιστο δύο γεγονότα «αρρενοποίησης» στη γενεαλογική γραμμή που οδήγησε στη δημιουργία καθεμιάς από τις δύο αυτές ομάδες. Η υπεροικογένεια Unionoidea δεν φαίνεται να γνώρισε ποτέ την «αρρενοποίηση», είτε επειδή η συχνότητα εμφάνισης αρρενοποιημένων μορίων ήταν τόσο μικρή, είτε διότι τα αρρενοποιημένα μόρια δεν κατάφεραν να εξαπλωθούν στους πληθυσμούς (Hoeh et al. 1997). Το ίδιο μοιάζει να ισχύει και για τις οικογένειες Veneridae και Donacidae, κάτι που θα αποσαφηνιστεί περαιτέρω με την απόκτηση περισσότερων δεδομένων.

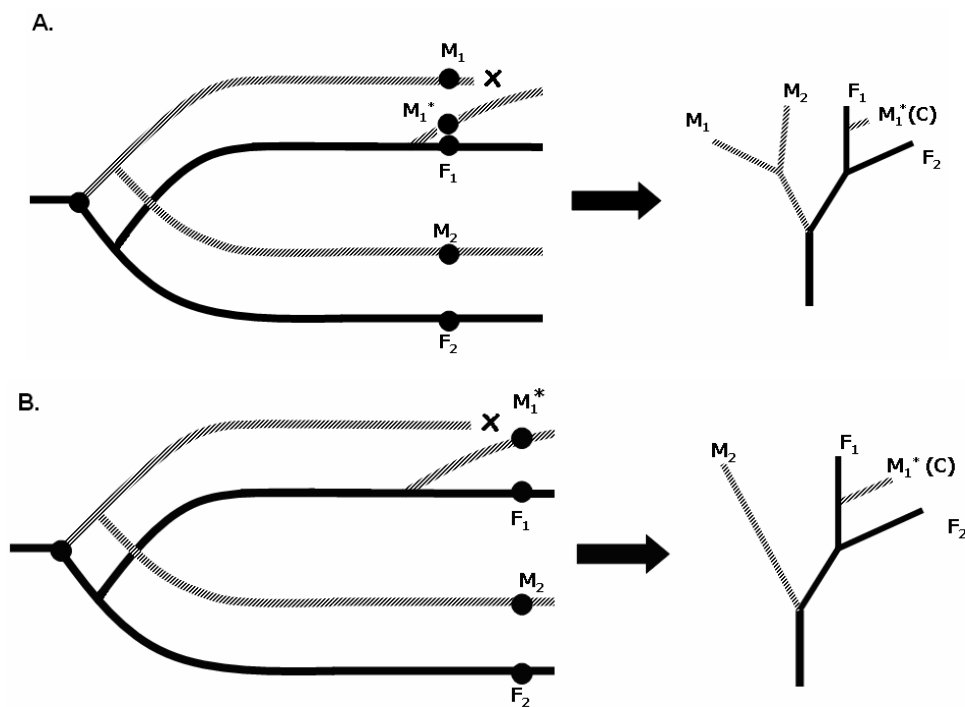
Τα Mytilidae, ωστόσο, φαίνεται να αποτελούν ειδική και ενδιαφέρουσα περίπτωση. Πρόκειται μάλλον για μία πολύ παλιά οικογένεια στην υφομοταξία Pteriomorpha. Θα ήταν δυνατό να διατυπωθεί ότι, σε σχέση με το χρόνο που απαιτείται για ένα γεγονός «αρρενοποίησης», τα γένη της οικογένειας Mytilidae είναι τόσο παλιά όσο οι οικογένειες της υφομοταξίας Heterodonta. Ενδεικτικά, στον πίνακα που ακολουθεί, παρατίθενται οι γενετικές αποστάσεις των F τύπων του κυτοχρώματος *b* για το *Mytilus edulis*, το *Musculista senhousia* (Pteriomorpha, Mytilidae), το *Venerupis philippinarum* (Heterodonta, Veneridae) και το *Donax trunculus* (Heterodonta, Donacidae):

Σύγκριση	Είδη	Απόσταση (K)	T. σφάλμα
Mytilidae - Mytilidae	<i>M. edulis</i> F – <i>M. senhousia</i> F	0.715	0.081
Mytilidae - Heterodonta	<i>M. edulis</i> F – <i>V. philippinarum</i> F	0.639	0.080
Mytilidae - Heterodonta	<i>M. edulis</i> F – <i>D. trunculus</i> F	0.694	0.082
Mytilidae - Heterodonta	<i>M. senhousia</i> F – <i>V. philippinarum</i> F	0.960	0.080
Mytilidae - Heterodonta	<i>M. senhousia</i> F – <i>D. trunculus</i> F	0.863	0.096
Heterodonta - Heterodonta	<i>D. trunculus</i> F - <i>V. philippinarum</i> F	0.565	0.065

Οι συγκρίσεις φανερώνουν ότι η γενετική απόσταση ανάμεσα σε δύο γένη της οικογένειας Mytilidae μπορεί να είναι της ίδιας τάξης, ή ακόμα και μεγαλύτερη από την απόσταση Mytilidae-Heterodonta ή Donacidae-Veneridae. Η εναλλακτική εξήγηση είναι ότι τα γεγονότα «αρρενοποίησης» συμβαίνουν πιο συχνά στα Mytilidae σε σχέση με τα υπόλοιπα δίθυρα, αλλά και πάλι όχι τόσο συχνά όσο είχε αρχικά υποτεθεί. Η παρουσία του γονιδιώματος C στα είδη *M. galloprovincialis* και *M. edulis*, αλλά και ο πρόσφατος εντοπισμός γονιδιωμάτων παρόμοιας δομής με το C



σε πληθυσμούς του *M. trossulus* από την Αμερική (Breton et al. 2006) και την Ευρώπη (Burzynski et al. 2006) είναι παρατηρήσεις που στηρίζουν την παραπάνω θέση. Συνεπώς, η εξήγηση της φυλογένεσης των F και M μορίων του γένους *Mytilus* μέσω της «αρρενοποίησης» μπορεί να συνοψίζεται στο ακόλουθο σενάριο: αποχωρισμός του *M. californianus* από το σύμπλεγμα *M. edulis* (*M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*) και ακολούθως «αρρενοποίηση» στον κοινό πρόγονο των τριών ειδών του συμπλέγματος. Όπως μάλιστα συζητήθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, η ανακάλυψη και ταυτοποίηση του γονιδιώματος C σηματοδοτεί ένα ακόμα πολύ πρόσφατο γεγονός «αρρενοποίησης» που αυτή τη στιγμή βρίσκεται εν εξελίξει και αφορά στα είδη *M. edulis* και *M. galloprovincialis*.



**Εικόνα 4. 3:** Το μοντέλο της εικόνας 4. 2 προσαρμοσμένο για τα είδη *M. trossulus* και *M. edulis/galloprovincialis*. **A.** Η σημερινή εικόνα, όπου στα είδη *M. edulis/galloprovincialis* συνυπάρχουν τα μόρια F, M και C. **B.** Πιθανή μελλοντική εικόνα που προϋποθέτει την εγκαθίδρυση του C έναντι του M στα αδελφά είδη *M. edulis/galloprovincialis*. M<sub>1</sub> και F<sub>1</sub>: Τα M και F μόρια του «είδους» *M. edulis/galloprovincialis*. M<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>: Τα M και F μόρια του *M. trossulus*. M<sub>1</sub>\*: Το μόριο C.

Η διαδικασία «αρρενοποίησης» φαίνεται ότι βρίσκεται στο δεύτερο βήμα, δηλαδή στο στάδιο της συνύπαρξης του παλιού γονιδιώματος M και του νέου (μόριο C) και της εξάπλωσης του τελευταίου στους πληθυσμούς των δύο ειδών (Εικόνα 4. 3, α). Αν τελικά το C εγκαθιδρυθεί εκτοπίζοντας τα M μόρια, τότε μελλοντικά οι

παλαιοί M κλάδοι των *M. edulis* και *M. galloprovincialis* θα έχουν εξαφανιστεί και τη θέση τους θα έχει πάρει ο κλάδος του μορίου C. Η γενεαλογική γραμμή του C θα καλείται πλέον «M» και θα τοποθετείται φυλογενετικά στη θέση που βρίσκεται το C σήμερα, δηλαδή εσωτερικά του κλάδου των F μορίων *M. edulis-galloprovincialis* και *M. trossulus* (Εικόνα 4. 3. β).

#### **4. 7. Επιστροφή στη Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα:**

##### **A. Σύγχρονη θεώρηση**

Η Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονομικότητα συνίσταται στην ύπαρξη δύο οδών μεταβίβασης του mtDNA, της μητρικής και της πατρικής. Η σταθερή μεταβίβαση μέσω των δύο διακριτών οδών έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των μορίων mtDNA που ακολουθούν καθεμία από αυτές. Η σύγχρονη έρευνα στο φαινόμενο της ΔΜΚ στρέφει την προσοχή στους μηχανισμούς που εξασφαλίζουν αυτήν τη σταθερότητα, αποτρέποντας την αλληλοεπικάλυψη των δύο οδών ή την κατάργηση της μίας από αυτές. Αν και έχουν παρατηρηθεί διαδικασίες που, κατά διαστήματα, μπορούν να προκαλούν ορισμένης έκτασης ομογενοποίηση και ανάμιξη των δύο τύπων γονιδιωμάτων, όπως είναι ο ανασυνδυασμός των μορίων mtDNA ή η αναστροφή του τρόπου κληρονόμησής τους, αυτές δεν φαίνεται παρά να αποτελούν απλούς ίσως παράγοντες ενός συνθετότερου μηχανισμού που η βασική του λειτουργία θα πρέπει να είναι ο έλεγχος της τύχης των μιτοχονδρίων του σπέρματος και του γονιδιώματός τους. Οι πρόσφατες παρατηρήσεις ομοπλασμικού σπέρματος (Venetis et al. 2006), ετεροπλασμικών αυγών (Obata and Komaru 2005), τριπλασμικών ατόμων και η αναθεώρηση της ερμηνείας των μη-τυπικών αρσενικών ατόμων ενισχύουν την παραπάνω θεώρηση και μαζί με τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις που αφορούν στην πορεία των μιτοχονδρίων σε αναπτυσσόμενα έμβρυα μυδιών καταλήγουν στη διάκριση δύο επιπέδων ελέγχου.

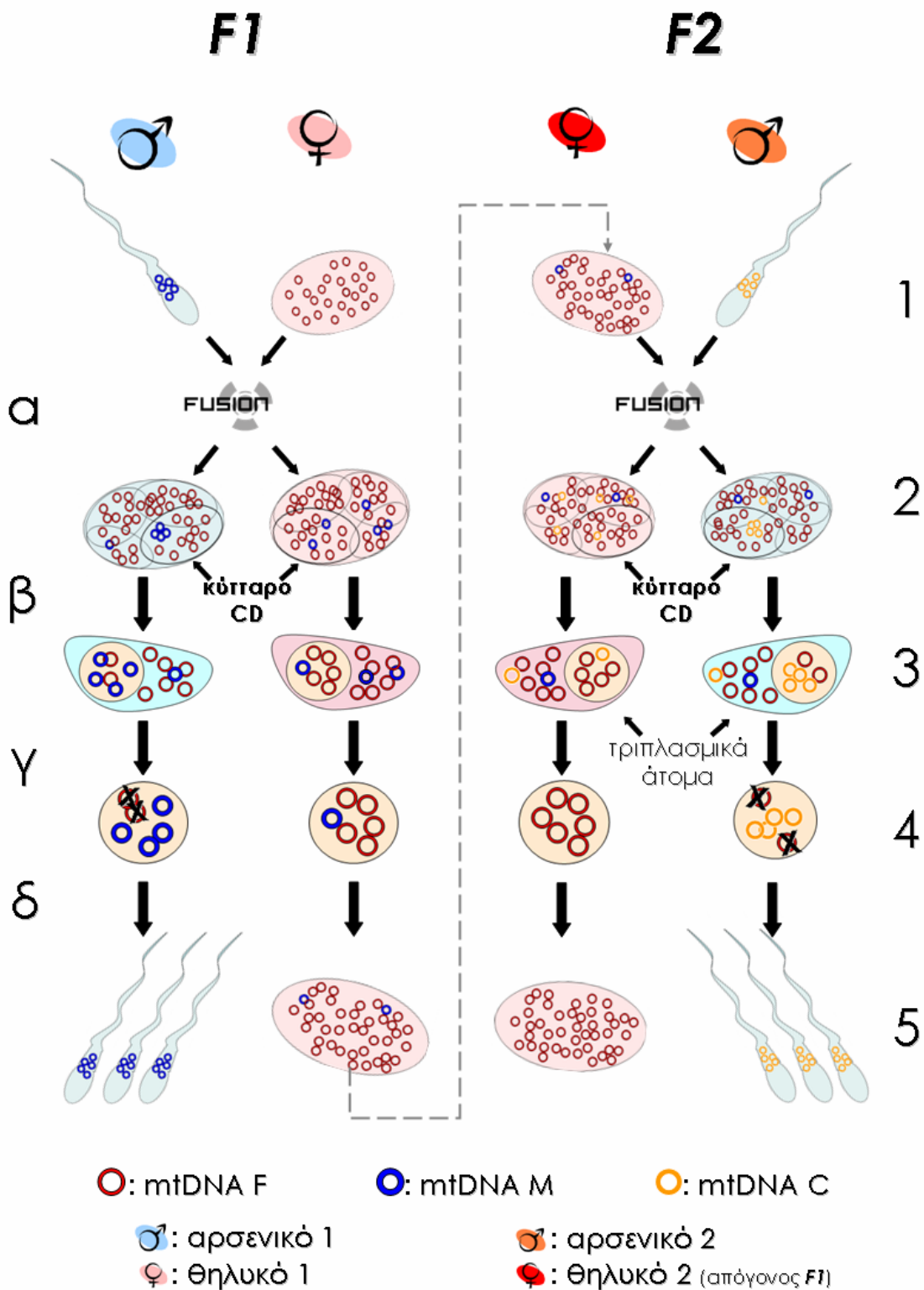
Το πρώτο επίπεδο ελέγχου φαίνεται να ασκείται κατά τη γονιμοποίηση και αναφέρεται στην τύχη των μιτοχονδρίων του σπέρματος στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Στα αρσενικά έμβρυα, σχεδόν όλα τα σπερματικά μιτοχόνδρια οδηγούνται με τη μορφή συσσωματώματος στα αρχέγονα κύτταρα της γαμετικής σειράς, ώστε να εγκατασταθούν αργότερα στη γονάδα. Αντίθετα, τα πατρικά μιτοχόνδρια διασπείρονται στοχαστικά ανάμεσα σε εκατοντάδες μητρικά μιτοχόνδρια στα

αναπτυσσόμενα θηλυκά έμβρυα, καταλαμβάνοντας πιθανότατα τυχαίες θέσεις, με αποτέλεσμα τα ίχνη τους να είναι δυνατό να εντοπιστούν αργότερα σε διάφορους ιστούς του θηλυκού ενήλικου.

Το επίπεδο ελέγχου που περιγράφηκε είναι απαραίτητο για να υπάρξει το επόμενο, το οποίο λαμβάνει χώρα κατά τη γαμετογένεση. Στα ενήλικα αρσενικά, τα πατρικά μιτοχόνδρια ή τουλάχιστο το μιτοχονδριακό τους γονιδίωμα βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στη γονάδα, σε συνύπαρξη με τα μητρικά μόρια. Η σποραδική παρουσία μορίων Μ τύπου στους σωματικούς ιστούς των ενήλικων αρσενικών πιθανότατα εξηγείται με βάση την παρατήρηση ότι ένα ή δύο πατρικά μιτοχόνδρια μπορούν ενίοτε να «αποκολληθούν» από το συσσωμάτωμα κατά την πορεία τους προς τα αρχέγονα κύτταρα της γονάδας και να διασπαρθούν τυχαία. Το κρίσιμο στάδιο για τη σταθερότητα της ΔΜΚ έγκειται στην απόρριψη όλων των μορίων μητρικής προέλευσης πριν ή κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και στην εξασφάλιση ομοπλασμικού σπέρματος για το πατρικό mtDNA. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου αυτό επιτυγχάνεται παραμένει άγνωστος. Μία υπόθεση που διατυπώνεται σχετικά με το θέμα δέχεται ότι τα πατρικά μόρια mtDNA αποκτούν ένα καθοριστικό αναπαραγωγικό πλεονέκτημα έναντι των μητρικών στο περιβάλλον των πρώιμων σπερματικών κυττάρων, με συνέπεια τα δεύτερα να εξαλείφονται. Η εναλλακτική πρόταση είναι η ύπαρξη ενός μηχανισμού ενεργούς απόρριψης των μητρικών μορίων.

Κατά την ωογένεση, ωστόσο, δεν φαίνεται να υπάρχει αντίστοιχος μηχανισμός «καταστροφής» των πατρικών μορίων. Το περιεχόμενο του αυγού σε mtDNA αποτελεί πιθανότατα το προϊόν μίας «τυφλής δειγματοληψίας» μορίων που τυγχάνει να βρίσκονται στα πρώιμα ωοκύτταρα. Ακόμα και αν δεχτούμε ότι όλα τα πατρικά μιτοχόνδρια ή, τουλάχιστο, τα μόριά τους έχουν διατηρηθεί ανέπαφα, η πιθανότητα να βρεθούν μερικά από αυτά σε σημαντικούς αριθμούς στα πρώιμα ωοκύτταρα θα είναι πολύ μικρή και συνεπώς η επακόλουθη αντιπροσώπευσή τους στα αυγά θα είναι απειροελάχιστη, ιδιαίτερα σε ό,τι αφορά στην πληθυσμιακή διάσταση του φαινομένου.

Στο πληθυσμιακό επίπεδο, η σύγχρονη θεώρηση περιλαμβάνει την εξήγηση της κατανομής της ΔΜΚ και της εξάπλωσής της στα δίθυρα σύμφωνα με την υπόθεση της μοναδικής εμφάνισης και των συνακόλουθων δευτερογενών εξαφανίσεων – ή ίσως και της αδυναμίας ανίχνευσης τους φαινομένου σε ορισμένους αντιπροσώπους – και το ρόλο της «αρρενοποίησης», όπως συζητήθηκε στις προηγούμενες παραγράφους.



**Εικόνα 4. 4:** Η σύγχρονη θεώρηση της ΔΜΚ, (βλ. κείμενο). **α:** γονιμοποίηση, **β:** ανάπτυξη, **γ:** γαμετογένεση, **δ:** απελευθέρωση γαμετών. **1:** γαμέτες **2:** έμβryo στο στάδιο των 4 κυττάρων, **3:** νεαρό άτομο, **4:** ώριμη γονάδα, **5:** γαμέτες, **CD:** πρόγονο κύτταρο του αρχέγονου κύτταρου γονάδας. Το σχήμα υποδεικνύει τον πιθανότερο τρόπο δημιουργίας τριπλασμικών ατόμων.

## B. Προοπτικές

Η μελέτη της ΔΜΚ έχει αποκαλύψει σημαντικές πτυχές της μεταβίβασης του μιτοχονδριακού DNA και της εξέλιξής του. Η συνεισφορά της στη διερεύνηση των λειτουργιών των μιτοχονδρίων και των γονιδιωμάτων τους αναμένεται ακόμα πιο σημαντική στο μέλλον, καθώς δύναται να συμβάλει στην κατανόηση των μηχανισμών εξάλειψης των πατρικών μιτοχονδρίων στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης ενός οργανισμού, ενώ φαίνεται ότι αποτελεί κατάλληλο μοντέλο για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης και συνεξέλιξης του πυρηνικού και του μιτοχονδριακού γονιδιώματος των οργανισμών.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αναστροφή του τρόπου κληρονομής του mtDNA σε μύδια του γένους *Mytilus*. Βάσει των αποτελεσμάτων προτάθηκε ότι το φαινόμενο αυτό ίσως σχετίζεται με την ενσωμάτωση τμημάτων της περιοχής ελέγχου από το μόριο που κληρονομείται πατρικά στην αντίστοιχη περιοχή του μορίου που κληρονομείται μητρικά, μεταβάλλοντας τις ιδιότητες μεταβίβασής του. Ο έλεγχος της πρότασης αυτής αποτελεί ένα σημαντικό αντικείμενο μελλοντικής έρευνας. Αν πραγματικά αποδειχτεί ότι **το mtDNA εμπεριέχει την πληροφορία για τον τρόπο μεταβίβασής του** στην πρωτοταγή δομή του, τότε θα ανοίξει ένα πολύ σημαντικό κεφάλαιο σχετικά με την κληρονομία και την εξέλιξη των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων.

Σχετικός με τα προηγούμενα θα ήταν και ο έλεγχος της υπόθεσης ότι **το μόριο C έχει επιλεκτικό πλεονέκτημα σε σχέση με το μόριο M**. Η υπόθεση στηρίζεται στην παρατήρηση ότι τα μόρια M μεταλλάσσονται με ταχύτερο ρυθμό από τα F (Stewart et al. 1995). Είναι κατά συνέπεια πιθανό ότι η αρμοστικότητα των πατρικών μορίων ελαττώνεται γρήγορα καθώς συσσωρεύουν περισσότερες μεταλλαγές με μικρή επιβλαβή δράση. Σε αυτήν την περίπτωση, η «αρρενοποίηση» εμφανίζεται σαν μία διαδικασία «εξαγνισμού» της πατρικής γραμμής κληρονομής αντικαθιστώντας τα παλαιά μόρια με νέα.

Σημαντικό ζήτημα στη μελέτη της ΔΜΚ θα αποτελούσε η προσπάθεια διαλεύκανσης του μηχανισμού της, όπως αυτός ορίζεται από την υπόθεση εργασίας (§ 1. 2. 6). Όπως έχει ήδη διατυπωθεί σαν υπόθεση με βάση τις παρατηρήσεις, είναι πιθανό ότι η ΔΜΚ ελέγχεται από έναν (ή περισσότερους) **παράγοντα που εκφράζεται στα γαμετικά κύτταρα των θηλυκών ατόμων**. Ο παράγοντας αυτός, αυτός, που σύμφωνα με την υπόθεση απαντά στα αυγά, θα πρέπει να αναγνωρίζει τα

πατρικά μιτοχόνδρια, να τα συγκρατεί με τη μορφή συσσωματώματος και να τα οδηγεί στα γαμετικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό, δεν αποκλείεται να αποτελεί κάποιο στοιχείο του κυτταροσκελετού. Τα θηλυκά άτομα που παράγουν σχεδόν αποκλειστικά κόρες δεν θα εκφράζουν αυτόν τον παράγοντα, με συνέπεια τα πατρικά μιτοχόνδρια να διασπείρονται τυχαία και να χάνονται στοχαστικά μέσα στους ιστούς των αναπτυσσόμενων θηλυκών ατόμων. Αντίθετα, τα θηλυκά άτομα που παράγουν αποκλειστικά γιους θα πρέπει να εκφράζουν τον υποθετικό παράγοντα. Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός αυτού του παράγοντα θα ήταν θεωρητικά εφικτός μέσω της σύγκρισης του πρωτεϊνικού περιεχόμενου αυγών από θηλεοτόκα και αρρενοτόκα θηλυκά μύδια.

Η ΔΜΚ συνοδεύεται από μια σειρά ιδιαίτερων χαρακτηριστικών, όπως είναι η «αρρενοποίηση» ή το γεγονός ότι **ο καθορισμός του φύλου ελέγχεται αποκλειστικά από τα θηλυκά άτομα**. Εντούτοις, δεν είναι ακόμα γνωστό εάν αυτές οι ιδιαιτερότητες είναι σταθερά γνωρίσματα που συνοδεύουν τη ΔΜΚ, ή αν η παρατήρησή τους στα *Mytilus* δεν αποτελεί παρά μία απλή σύμπτωση. Το ερώτημα μοιάζει ενδιαφέρον και ίσως πολλά υποσχόμενο και θα μπορούσε να απαντηθεί μέσω της πιο εκτεταμένης και συστηματικής συγκριτικής μελέτης δίθυρων που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες.

Τέτοιου είδους προσεγγίσεις θα ήταν επίσης δυνατό να εξηγήσουν την εξελικτική σημασία της ΔΜΚ. Δεν είναι γνωστό μέχρι σήμερα αν η ΔΜΚ **αποτελεί μια περίπτωση εγωιστικού DNA** ή είναι ένας χαρακτήρας που προσδίδει κάποιο εξελικτικό πλεονέκτημα στα είδη που την εμφανίζουν. Σύμφωνα με την πρώτη άποψη, η ΔΜΚ δεν προσδίδει κανένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στα είδη στα οποία απαντά, αλλά αποτελεί μια επιτυχημένη «ανταρσία» ενός πατρικού mtDNA ενάντια στο μηχανισμό εξάλειψής του - μηχανισμός που ελέγχεται από το πυρηνικό DNA. Τέτοιες ανταρσίες, κατά την υπόθεση, γίνονται ανά πάσα στιγμή αλλά έχουν απειροελάχιστη πιθανότητα επιτυχίας και συνεπώς παραμένουν απαρατήρητες. Η δεύτερη υπόθεση προσδίδει ένα **οργανισμικό πλεονέκτημα** στη ΔΜΚ, επιχειρώντας να τη συνδέσει με την αναπαραγωγική βιολογία των οργανισμών στους οποίους απαντάται. Σε ζωικούς οργανισμούς με τυπική μητρική κληρονομηση είναι πιθανό να εμφανίζονται μεταλλάξεις στο mtDNA που να είναι ελαφρώς δηλητηριώδεις για τη λειτουργία του σπέρματος. Τα μόρια που φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις δεν βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο της φυσικής επιλογής, διότι κληρονομούνται μόνο μέσω των θηλυκών ατόμων, στα οποία συν τοις άλλοις λειτουργούν κανονικά.

Εκφράζεται η υπόθεση ότι η ΔΜΚ αποτελεί έναν τρόπο απόκρισης σε τέτοιες πιέσεις, ιδιαίτερα μάλιστα σε οργανισμούς όπως είναι τα δίθυρα, στα οποία η γονιμοποίηση είναι εξωτερική. Εντούτοις, μελέτες που συγκρίνουν τους ρυθμούς των συνώνυμων και μη-συνώνυμων αντικαταστάσεων ή την πιθανότητα σύγκλισης των πατρικών mtDNA μορίων δεν έχουν ρίξει φως στην παραπάνω υπόθεση.

Ο τρόπος φυλοκαθορισμού στα δίθυρα δεν είναι γνωστός. Ωστόσο, η παρουσία ή η απουσία μορίων πατρικής προέλευσης στη γονάδα των οργανισμών αυτών εμφανίζει απόλυτη συσχέτιση με το φύλο τους. Η συσχέτιση της ΔΜΚ με το φυλοκαθορισμό στα δίθυρα ενισχύεται επίσης και από το γεγονός ότι η ΔΜΚ φαίνεται να απουσιάζει από τις οικογένειες που εμφανίζουν ερμαφρόδιτα άτομα (Hoeh et al. 2002). Με βάση τα σημερινά δεδομένα, η επικρατούσα άποψη είναι ότι το προεπιλεγμένο (default) φύλο στα δίθυρα είναι το θηλυκό. Η δημιουργία αρσενικών ατόμων θα μπορούσε να οφείλεται σε σημαντικό βαθμό σε κάποιον παράγοντα που εδράζεται στα πατρικά μιτοχόνδρια ή στο πατρικό mtDNA και του οποίου η συγκέντρωση στα πρώιμα κύτταρα της γονάδας θα είχε ως αποτέλεσμα να την κάνει αρσενική. Η προσπάθεια **ανίχνευσης αυτού του παράγοντα** θα αποτελέσει πιθανότατα ένα σημαντικό σημείο στην πορεία για την κατανόηση της ΔΜΚ αλλά και της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και του mtDNA.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Τα μη-τυπικά αρσενικά μύδια των ειδών *M. edulis* και *M. galloprovincialis* περιέχουν ένα νέο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (γονιδίωμα C).
2. Το γονιδίωμα C είναι ένα μόριο που, εκτός από την περιοχή ελέγχου, μοιάζει με το γονιδίωμα F. Η περιοχή ελέγχου, ωστόσο, είναι σύνθετη και περιέχει επαναλαμβανόμενα και διατεταγμένα στη σειρά στοιχεία τύπου M, τα οποία περιστοιχίζονται από στοιχεία τύπου F.
3. Η μοριακή προέλευση του γονιδιώματος C περιλαμβάνει μηχανισμούς διπλασιασμού και ανακατάταξης αλληλουχιών, καθώς και γεγονότα διαμοριακού ανασυνδυασμού στην περιοχή του CR, μεταξύ ενός τυπικού F και ενός τυπικού M μορίου.
4. Το γονιδίωμα C, σε ό,τι αφορά στον τρόπο κληρονομής, έχει τις ιδιότητες των M γονιδιωμάτων.
5. Το γονιδίωμα C έχει παγκόσμια εξάπλωση, γεγονός που υποδηλώνει πιθανώς ότι δημιουργήθηκε μία φορά.
6. Η ανακάλυψη του μορίου C επιβεβαιώνει, αλλά ταυτόχρονα τροποποιεί την υπόθεση της «αρρενοποίησης» ή αναστροφής του τρόπου μεταβίβασης του mtDNA: δεν πρόκειται για ένα μόριο F που έγινε πατρικώς κληρονομούμενο, αλλά για ένα νέο μόριο με σύνθετο CR.
7. Η επιβεβαίωση της «αρρενοποίησης» επιβάλλει την επανεξέταση των φυλογενετικών σχέσεων των μητρικών και πατρικών mtDNA μορίων και της κατανομής της ΔΜΚ στα δίθυρα.
8. Για το σκοπό αυτό αναζητήθηκε η ΔΜΚ και σε άλλα είδη. Η ύπαρξή της τεκμηριώθηκε σε ένα νέο είδος, το *Donax trunculus*, που ανήκει σε μία οικογένεια (Donacidae) για την οποία δεν είχε αναφερθεί η ανίχνευση του φαινομένου. Διαπιστώθηκε επιπλέον η αδυναμία τεκμηρίωσης για την ύπαρξη του φαινομένου σε μερικά ακόμα είδη των οικογενειών Veneridae και Arcidae.
9. Η μελέτη της φυλογένεσης υποδεικνύει:
  - i. τη σποραδική κατανομή της ΔΜΚ στα δίθυρα.
  - ii. ότι τα μητρικά και πατρικά μόρια από διαφορετικές οικογένειες ή γένη ομαδοποιούνται με βάση την ταξινομική βαθμίδα, ενώ αντίθετα η



ομαδοποίηση γίνεται σύμφωνα με τον τρόπο κληρονόμησης των μορίων όταν η ανάλυση περιλαμβάνει συγγενή είδη.

10. Οι παρατηρήσεις της παραγράφου 9 ερμηνεύονται:

- i. σαν το αποτέλεσμα της μοναδικής εμφάνισης της ΔΜΚ και συνακόλουθων επεισοδίων «αρρενοποίησης» με μεγάλη χρονική περιοδικότητα,
- ii. σαν το αποτέλεσμα δευτερογενών απωλειών από συγκεκριμένους εξελικτικούς κλάδους, ή,
- iii. σαν το αποτέλεσμα αδυναμίας στην ανίχνευση της ΔΜΚ.

11. Η μελέτη της κατανομής των τριών γονιδιωμάτων (F, M και C) σε πληθυσμούς *M. galloprovincialis* ανέδειξε την παρουσία τριπλασμικών αρσενικών και θηλυκών ατόμων.

12. Η παρουσία τριπλασμικών ατόμων ερμηνεύεται ως αποτέλεσμα:

- i. της περιορισμένης και περιστασιακής μεταβίβασης πατρικών μορίων από τα αυγά ή
- ii. της μεταφοράς δύο πατρικών μορίων (M και C) μέσω του σπέρματος.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and P. Walter, 2002. Molecular biology of the cell, 4<sup>th</sup> edition. Garland science, New York.
- Andersson, S. G. E., Karlberg, O., Canback, B., and C. G. Kurland, 2003. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*: **358 (1429)**: 165-177.
- Arunkumar, K. P., Metta, M., and J. Nagaraju, 2006. Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth, *Bombyx mori* from Chinese *B. mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. *Mol. Phyl. Evol.* **40**: 419-427
- Avise, J. C., 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York.
- Awadalla, P., Eyre-Walker, A., and J. M. Smith, 1999. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science* **286**: 2524–2525.
- Ballard, J. W. O., and M. C. Whitlock, 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology.* **10**: 729–744.
- Barr, C. M., Neiman, M., and D. R. Taylor, 2005. Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytol.* **168**: 39–50.
- Beagley, C. T., Taylor, K. A. and D. R. Wolstenholme, 1997. Gender-associated diverse mitochondrial DNA molecules of the mussel *Mytilus californianus*. *Curr. Genet.* **31**: 318-324.
- Bereiter-Hann, J., and M. Voth, 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy Research Techniques.* **27**: 198–219.
- Birky, C. W. Jr., 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu. Rev. Genet.* **35**:125-148.
- Birky, C. W. Jr. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11331–11338.
- Boore, J. L., Medina, M., and L. A. Rosenberg, 2004. Complete sequences of the highly rearranged molluscan mitochondrial genomes of the Scaphopod

- Graptacme eborea* and the bivalve *Mytilus edulis*. Mol. Biol. Evol. **21**: 1492-503.
- Breton, S., Burger, G., Stewart, D. T., and P. U. Blier, 2006. Comparative analysis of gender-associated complete mitochondrial genomes in marine mussels (*Mytilus* spp.). Genetics **172**:1107–1119.
- Bromham, L., Eyre-Walker, A., Smith, N. H., and J. Maynard Smith, 2003. Mitochondrial Steve: paternal inheritance of mitochondria in humans. Trends Ecol. Evol. **18**: 2–4.
- Brown, T. A., Cecconi, C., Tkachuk, A. N., Bustamante, C., and D. A. Clayton, 2005. Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. Genes Dev. **19(20)**: 2466–2476.
- Brown, W. M., George, M. Jr., and A. C. Wilson, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 1967-71.
- Burger, G., Gray, M. W., and B. F. Lang, 2003. Mitochondrial genomes: Anything goes. Trends Genet. **19**: 709–716.
- Burzynski, A., Zbawicka, M., Skibinski, D. O. F., and R. Wenne, 2003. Evidence for recombination of mtDNA in the marine mussel *Mytilus trossulus* from the Baltic. Mol. Biol. Evol. **20**: 388–392.
- Burzynski, A., Zbawicka, M., Skibinski, D. O. F., and R. Wenne, 2006. Doubly Uniparental Inheritance is Associated with High Polymorphism for Rearranged and Recombinant Control Region Haplotypes in Baltic *Mytilus trossulus*. Genetics **174**: 1081-1094.
- Campbell N. J. H., Sturm R. A., and S. C. Barker, 2001. Large mitochondrial repeats multiplied during the polymerase chain reaction. Mol. Ecol. Notes **1**: 336-340.
- Cao, L., Kenchington, E., and E. Zouros, 2004a. Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel (*Mytilus edulis*). Genetics **166**: 883–894.
- Cao, L., Kenchington, E., Zouros, E., and G. C. Rodakis, 2004b. Evidence that the large noncoding sequence is the main control region of maternally and paternally transmitted mitochondrial genomes of the marine mussel (*Mytilus* spp.). Genetics **167**: 835–850.
- Chakrabarti, R., Walker, J. M., Stewart, D. T., Trdan, R. J., Vijayaraghavan, S., Curole, J. P., and W. R. Hoeh, 2006. Presence of a unique male-specific

- extension of C-terminus to the cytochrome c oxidase subunit II protein coded by the male-transmitted mitochondrial genome of *Venustaconcha ellipsiformis* (Bivalvia: Unionoidea). *FEBS Lett.* **580(3)**: 862-6.
- Chan, K. W., Slotboom, D. J., Cox, S., Embley, T. M., Fabre, O., van der Giezen, M., Harding, M., Horner, D. S., Kunji, E. R., Leon-Avila, G., and J. Tovar, 2005. A novel ADP/ATP transporter in the mitosome of the microaerophilic human parasite *Entamoeba histolytica*. *Curr. Biol.* **15(8)**: 737-42.
- Chen X. J., and R. A. Butow, 2005. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 815–825.
- Clayton, D. A., 2003. Mitochondrial DNA replication: what we know. *IUBMB Life* **55**: 213–217.
- Clayton, D. A., 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**: 693-705.
- Coffey, T. J., Daniels, M., Enright, M. C., and B. G. Spratt, 1999. Serotype 14 variants of the Spanish penicillin-resistant serotype 9V clone of *Streptococcus pneumoniae* arose by large recombinational replacements of the *cpsA-pbpla* region. *Microbiology* **145**: 2023-2031.
- Cogswell, A. T., Kenchington, E., and E. Zouros, 2006. Segregation of sperm mitochondria in two and four cell embryos of the blue mussel *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome* **49(7)**: 799-807.
- Cosmides, L. M., and J. Tooby, 1981. Cytoplasmatic inheritance and intragenomic conflict. *J. Theor. Biol.* **89**: 83-129.
- Cullinane, C., Cutts, S.M., Panousis, C., and D. R. Phillips, 2000. Interstrand cross-linking by Adriamycin in nuclear and mitochondrial DNA of MCF-7 cells. *Nucl. Acids Res.* **28**: 1019–1025.
- Curole, J. P., and T. D. Kocher, 2005. Evolution of a unique mitotype-specific protein-coding extension of the cytochrome c oxidase II gene in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea). *J. Mol. Evol.* **61(3)**: 381-9.
- Curole, J. P., and T. D. Kocher, 2002. Ancient sex-specific extension of the cytochrome c oxidase II gene in bivalves and the fidelity of doubly-uniparental inheritance. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 1323–1328.
- Dalziel, A. C. and D. T. Stewart, 2002. Tissue-specific expression of male-transmitted mitochondrial DNA and its implications for rates of molecular evolution in *Mytilus* mussels (Bivalvia: Mytilidae). *Genome* **45**: 348–355.

- Dimmer, K. S., Jakobs, S., Vogel, F., Altmann, K., and B. Westermann, 2005. Mdm31 and Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape and stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast. *J. Cell Biol.* **168**(1): 103-115.
- Dowton, M., Castro, L. R., Campbell, S. L., Bargon S. D., and A. D. Austin, 2003. Frequent mitochondrial gene rearrangements at the hymenopteran nad3-nad5 junction. *J. Mol. Evol.* **56**: 517–526.
- Emelyanov V. V., 2001a. Evolutionary relationship of Rickettsiae and mitochondria. *FEBS Lett.* **501**: 11-18.
- Emelyanov V. V., 2001b. Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria. *Biosci Rep.* **21**(1): 1-17.
- Emelyanov V. V., 2003. Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell. *Eur. J. Biochem.* **270**(8): 1599-618.
- Fitzpatrick, D. A., Creevey, C. J., and J. O. McInerney, 2006. Genome phylogenies indicate a meaningful alpha-proteobacterial phylogeny and support a grouping of the mitochondria with the Rickettsiales. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 74-85.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and R. Vrijenhoek, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**: 294–299.
- Gantenbein, B., Fret, V., Gantenbein-Ritter I. A., and F. Balloux, 2004. Evidence for recombination in scorpion mitochondrial DNA (Scorpiones: Buthidae). *Proc. R. Soc. B.* **272**: 697-704.
- Garrido-Ramos, M. A., Stewart, D. T., Sutherland, B. W., and E. Zouros, 1998. The distribution of male-transmitted and female-transmitted mitochondrial DNA types in somatic tissues of blue mussels: implications for the operation of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome* **41**:818–824.
- Gaspar, M. B., Chicharo, L. M., Vasconcelos, P. Garcia, A., Santos, A. and C. C. Monteiro, 2002. Depth segregation phenomenon in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) populations of the Algarve coast (Southern Portugal). *Sci. Mar.* **66**(2): 111-121.
- Gaspar, M. B., Ferreira, R., and C. C. Monteiro, 1999. Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca: Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fisheries Research* **41**: 309-316.

- Geller, J. B., Carlton, J. T., and D. A. Powers, 1993. Interspecific and intrapopulation variation in mitochondrial ribosomal DNA sequences of *Mytilus spp.* (Bivalvia: Mollusca). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**: 44-50.
- Giribet, G., and W. C. Wheeler, 2002. On bivalve phylogeny: a high-level phylogeny of the mollusk class Bivalvia based on a combined analysis of morphology and DNA sequence data. *Inv. Biol* **121**: 271-324.
- Gossling, E., 1992. Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. Pp. 1–20 in E. Gossling, ed. *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and aquaculture*. Elsevier, Amsterdam.
- Gray, M. W., 1999. Evolution of organellar genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 678–687.
- Gray, M. W., 1989. The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.* **5**: 294–299.
- Gray, M. W., Burger G., and B. F. Lang, 1999. Mitochondrial evolution. *Science* **283** (5407): 1476 – 1481.
- Green, R. E., Krause, J., Ptak, S. E., Briggs, A. W., Ronan, M. T., Simons, J. F., Du, L., Egholm, M., Rothberg, J. M., Paunovic, M., and S. Pääbo. 2006. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature.* **444**: 330-336.
- Grun, P., 1976. *Cytoplasmic Genetics and Evolution*. Columbia University Press, New York.
- Guindon, S, and O. Gascuel, 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696–704.
- Gyllensten, U., Wharton, D., Josefsson, A., and A. C. Wilson, 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* **352**: 255–257.
- Harper, E. M., Taylor, J. D., and J. A. Crame, 2000. *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. London: The Geological Society.
- Hasegawa, M., Kishino, H., and T. Yano, 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**: 160–174.
- Hastings, I. M., 1992. Population genetic aspects of deleterious cytoplasmic genomes and their effects on the evolution of sexual reproduction. *Genet. Res.* **59**: 215–225.
- Hoarau, G., Holla, S., Lescasse, R., Stam, W. T., and J. L. Olsen, 2002. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus*. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 2261–2264.

- Hoeh, W. R., Stewart, D. T., and S. I. Guttman, 2002. High fidelity of mitochondrial genome transmission under the doubly uniparental mode of inheritance in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea). *Evol. Int. J. Org. Evol.* **56**: 2252–2261.
- Hoeh, W. R., D. T. Stewart, C. Saavedra, B. W. Sutherland, and E. Zouros, 1997. Phylogenetic evidence for role-reversals of gender-associated mitochondrial DNA in *Mytilus* (Bivalvia: Mytilidae). *Mol. Biol. Evol.* **14**: 959–967.
- Hoeh, W. R., Stewart, D. T., Sutherland, B. W., and E. Zouros, 1996. Multiple origins of gender – associated mitochondrial DNA lineages in bivalves (Mollusca: Bivalvia). *Evolution* **50**: 2276–2286.
- Hoekstra, R. F., 1990. Evolution of uniparental inheritance of cytoplasmic DNA. In: *Organisational Constraints on the Dynamics of Evolution* (J. Maynard Smith and J. Vida, eds). Manchester University Press, Manchester, UK.
- Hurst, L. D., and W. D. Hamilton, 1992. Cytoplasmic fusion and the nature of sexes. *Proc. R. Soc. B.* **247**: 189–194.
- Jaramillo-Correa, J. P., and J. Bousquet, 2005. Mitochondrial Genome Recombination in the Zone of Contact Between Two Hybridizing Conifers. *Genetics* **171**: 1951–1962.
- Jobb, G., von Haeseler, A., and K. Strimmer, 2004. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol. Biol.* **28(4)**: 18.
- Kajander, O. A., Karhunen, P. J., Holt, I. J., and H. T. Jacobs, 2001. Prominent mitochondrial DNA recombination intermediates in human heart muscle. *EMBO Rep* **2**: 1007–1012.
- Kaneda, H., Hayashi, J. I., Takahama, S., Taya, C., Fischer Lindahl, K. and H. Yonekawa, 1995. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**: 4542–4546.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:111–120.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., and A. C. Wilson, 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in

- animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 6196-6200.
- Kondo, R., Matsuura, E. T., and S. I. Chigusa, 1992. Further observation of paternal transmission of *Drosophila* mitochondrial DNA by PCR selective amplification method. Genet. Res. **59**: 81-84.
- Korpelainen, H., 2004. The evolutionary processes of mitochondrial and chloroplast genomes differ from those of nuclear genomes. Naturwissenschaften **91**: 505-518.
- Kraytsberg, Y., Schwartz, M., Brown, T. A., Ebraldise, K., Kunz, W. S., Clayton, D. A., Vissing, J., and K. Khrapko, 2004. Recombination of human mitochondrial DNA. Science **304**: 981.
- Kumar, S., Tamura, K., and M. Nei, 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform. **5**: 150-163.
- Kumazawa, Y., Azuma, Y., and M. Nishida. 2004. Tempo of mitochondrial gene evolution: Can mitochondrial DNA be used to date old divergence? Endocytobiosis and Cell Research, **15**: 136-142.
- Kurland, C. G. and S. G. E. Andersson, 2000. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. Microbiol. Mol. Biol **64**: 786-820.
- Kvist, L., Martens, J., Nazarenko, A. A., and M. Orell, 2003. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). Mol. Biol. Evol. **20**: 243–247.
- La Roche, J., Snyder, M., Cook, D. I., Fuller, K., and E. Zouros, 1990. Molecular characterization of a repeat element causing large-scale size variation in the mitochondrial DNA of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. Mol. Biol. Evol. **7**: 45–64.
- Ladoukakis, E. D., Saavedra, C., Magoulas, A., and E. Zouros, 2002. Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. Mol. Ecol. **11**: 755–769.
- Ladoukakis, E. D., and E. Zouros, 2001a. Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. Mol. Biol. Evol. **18**: 1168–1175.



- Ladoukakis, E. D., and E. Zouros, 2001b. Recombination in animal mitochondrial DNA: evidence from published sequences. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 2127–2131.
- Lamarck, [J. P. B. A de Monet] de, 1819. Histoire naturelle des animaux sans vertèbres, présentant les caractères généraux et particuliers de ces animaux, leur distribution, leurs classes, leurs familles, leurs genres, et la citation des principales espèces qui s'y rapportent; précédée d'une introduction offrant la détermination des caractères essentiels de l'animal, sa distinction du végétal et des autres corps naturels, enfin, l'exposition des principes fondamentaux de la zoologie. Tome sixième. Ire. partie. - pp. j-vj [= 1-6], 1-343. Paris.
- Lang, B. F., Gray M. W., and G. Burger, 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **33**: 351-97.
- Lansman, R. A., Avise, J. C., and M. D. Huettel, 1983. Critical experimental test of the possibility of 'paternal leakage' of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1969-1971.
- Law, R., and V. Hutson, 1992. Intracellular symbionts and the evolution of uniparental inheritance. *Proc. R. Soc. B.* **248**: 69 77.
- Lee, T. and D. Ó Foighil, 2004. Hidden Floridian biodiversity: mitochondrial and nuclear gene trees reveal four cryptic species within the scorched mussel, *Brachidontes exustus*, species complex. *Mol. Ecol.* **13**: 3527-3542.
- Lewin, B., 1997. *Genes VI*. Oxford University Press, New York.
- Linnaeus, C., 1758. *Systema naturae per regna tria naturae*. Laurentii Salvi, Stockholm.
- Liu, H.-P., J. B. Mitton, and S. K. Wu, 1996. Paternal mitochondrial DNA differentiation far exceeds maternal DNA and allozyme differentiation in the fresh water mussel *Anodonta grandis grandis*. *Evolution* **50**: 952–957.
- Lunt, D. H., and B. C. Hyman, 1997. Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature* **387**: 247.
- Lunt, D. H., Whipple, L. E., and B. C. Hyman, 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **7**: 1441–1455.
- Magoulas, A., and E. Zouros, 1993. Restriction-site heteroplasmy in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 319–325.

- Manchekar, M., Scissum-Gunn, K., Song, D., Khazi, F., McLean, S. L., and B. L. Nielsen, 2005. DNA recombination activity in soybean mitochondria. *J. Mol. Biol.* **356(2)**: 288-99.
- Margulis, L., 1991. *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis*. ed, The MIT Press.
- Margulis, L., 1970. *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press.
- Merritt, T. J., Shi, L., Chase, M. C., Rex, M. A., Etter, R. J., and J. M. Quattro, 1998. Universal cytochrome b primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Mol Mar Biol Biotechnol.* **7(1)**: 7-11.
- Meusel, M. S., and R. F. Moritz, 1993. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Curr. Genet.* **24**: 539-543.
- Mizi, A., Zouros, E., Moschonas, N., and G. C. Rodakis, 2005. The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: Implications for the doubly uniparental inheritance mode of mtDNA. *Mol Biol Evol* **22**: 952–967.
- Mock, K. E., Brim-Box, J. C., Miller, M. P., Downing, M. E., and W. R. Hoeh, 2004. Genetic diversity and divergence among freshwater mussel (*Anodonta*) populations in the Bonneville Basin of Utah. *Mol. Ecol.* **13**: 1085-1098.
- Mundi, N. I., and A. J. Helbig, 2004. Origin and Evolution of Tandem Repeats in the Mitochondrial DNA Control Region of Shrikes (*Lanius spp.*). *J. Mol. Evol.* **59**: 250–257.
- Nishimura, Y., Yoshinari, T., Naruse, K., Yamada, T., Sumi, K., Mitani, H., Higashiyama, T., and T. Kuroiwa, 2006. Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103(5)**: 1382-7.
- Obata, M., and A. Komaru, 2005. Specific location of sperm mitochondria in mussel *Mytilus galloprovincialis* zygotes stained by MitoTracker. *Dev. Growth Differ.* **47**: 255–263.
- Paabo, S., Irwin, D. M., and A. C. Wilson, 1990. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J. Biol. Chem.* **265**: 4718–4721.

- Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice L., and G. Grabowski, 1996. *The Simple Fool's Guide to PCR*. Kewalo Marine Laboratory and Univ. of Hawaii.
- Passamonti, M., Boore J. L., and V. Scali, 2003. Molecular evolution and recombination in gender-associated mitochondrial DNAs of the Manila clam *Tapes philippinarum*. *Genetics* **164**: 603–611.
- Passamonti, M. and V. Scali, 2001. Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Curr. Genet.* **39**: 117-124.
- Piganeau, G., Gardner, M., and A. Eyre-Walker, 2004. A broad survey of recombination in animal mitochondria. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 2319-2325.
- Posada, D., and K. A. Crandall, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14 (9)**: 817-818.
- Quesada, H., Stuckas, H. and D. O. F. Skibinski, 2003. Heteroplasmy suggests paternal co-transmission of multiple genomes and pervasive reversion of maternally into paternally transmitted genomes of mussel (*Mytilus*) mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **57**: Suppl 1:S138-47.
- Quesada, H., Wenne, R., and D. O. F. Skibinski, 1999. Interspecies transfer of female mitochondrial DNA is coupled with role-reversals and departure from neutrality in the mussel *Mytilus trossulus*. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 655–665.
- Rawson, P., D., 2005. Nonhomologous recombination between the large unassigned region of the male and female mitochondrial genomes in the mussel, *Mytilus trossulus*. *J. Mol. Evol.* **61(6)**: 717-32.
- Rawson, P. D., and T. J. Hilbish, 1995. Evolutionary relationships among the male and female mitochondrial DNA lineages in the *Mytilus edulis* species complex. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 893-901.
- Regoes, A., Zourmpanou, D., Leon-Avila, G., van der Giezen, M., Tovar, J., and A. B. Hehl, 2005. Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. *J. Biol. Chem.* **280(34)**: 30557-63.
- Riginos, C., Hickerson, M. J., Henzler, C. M., and C. W. Cunningham, 2004. Differential patterns of male and female mtDNA exchange across the Atlantic Ocean in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Evolution* **58**: 2438–51.
- Rodriguez, F., Oliver, J. F., Marin, A., and J. R. Medina, 1990. The general stochastic model of nucleotide substitutions. *J. Theor. Biol.* **142**: 485–501.

- Rokas, A., Ladoukakis, E. D., and E. Zorros, 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**: 411–417.
- Saavedra, C., M. I. Reyero, and E. Zouros, 1997. Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* **145**: 1073–1082.
- Saccone, S., Federico, C., Solovei, I., Croquette, M. F., Della Valle, G., and G. Bernardi, 1999. Identification of the gene-richest bands in human prometaphase chromosomes. *Chromosome Res.* **7**: 379–386.
- Sato, A., Nakada, K., Akimoto, M., Ishikawa, K., Shitara, H., Yonekawa, H. and J. – I., Hayashi, 2005. Rare creation of recombinant mtDNA haplotypes in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 6057-6062.
- Schneider, A., and D. Ebert, 2004. Covariation of mitochondrial genome size with gene lengths: evidence for gene length reduction during mitochondrial evolution. *J. Mol. Evol.* **59**: 90–96.
- Schwartz, M., and J. Vissing, 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* **347**: 576-580.
- Serb, J. M., and C. Lydeard, 2003. Complete mtDNA sequence of the North American freshwater mussel, *Lampsilis ornata* (Unionidae): an examination of the evolution and phylogenetic utility of mitochondrial genome organization in Bivalvia (Mollusca). *Mol. Biol. Evol.* **20**: 1854–1866.
- Shitara, H., Hayashi, J.I., Takahama, S., Kaneda, H., and H. Yonekawa, 1998. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics* **148**: 851-857.
- Skibinski, D. O. F., Gallagher, C. and C. M. Beynon, 1994a. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* **368**: 817–818.
- Skibinski, D. O. F., Gallagher, C. and C. M. Beynon, 1994b. Sex limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* **138**: 801–809.
- Slate, J., and H. Phua, 2003. Patterns of linkage disequilibrium in mitochondrial DNA of 16 ruminant populations. *Mol. Ecol.* **12**: 597–608.
- Steinborn, R., Zakhartchenko, V., Jelyazkov, J., Klein, D., Wolf, E., Muller, M. et al., 1998. Composition of parental mitochondrial DNA in cloned bovine embryos. *FEBS Lett.* **426**: 352-356.

- Stewart, D. T., Saavedra, C., Stanwood, R. R., Ball, A. O. and E. Zouros, 1995. Male and female mitochondrial DNA lineages in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 735–747.
- Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. and G. Schatten, 2000. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biology of Reproduction* **63**: 582–590.
- Swofford, D. L., 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4.0b.10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taanman J. W., 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**: 103-123.
- Tebble, N., 1966. British bivalve seashells. British Museum, London.
- Templeton, A. R., 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. *Evolution* **37**: 221-44.
- Theologidis, I., Saavedra, C., and E. Zouros, 2007a. No evidence for absence of paternal mtDNA in male progeny from crosses of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* doi: 10.1534/106.069930.
- Theologidis, I., Fodelianakis, S., Gaspar, M. B., and E. Zouros, 2007b. Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of sporadic detection of DUI in Bivalvia. (Submitted)
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and D. G. Higgins, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876–4882.
- Thyagarajan, B., Padua, R. A., and C. Campbell, 1996. Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *J. Biol. Chem.* **271**: 27536–27543.
- Toth, B., Hamari, Z., Ferenczy, L., Varga J., and F. Kevei, 1998. Recombination of mitochondrial DNA without selection pressure among compatible strains of the *Aspergillus niger* species aggregate. *Curr. Genet.* **33**: 199–205.

- Townsend, J. P., and D. M. Rand, 2004. Mitochondrial genome size variation in New World and Old World populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **93**: 98-103.
- Tsaousis, A. D., Martin, D. P., Ladoukakis, E. D., Posada, D., and E. Zouros, 2005. Widespread recombination in published animal mtDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **22**: 925–933.
- Venetis C., Theologidis I., Zouros E., and G. C. Rodakis, 2007. A mitochondrial genome with a reversed transmission route in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. (Submitted)
- Venetis C., Theologidis I., Zouros E., and G. C. Rodakis, 2006. No evidence for presence of maternal mitochondrial DNA in the sperm of *Mytilus galloprovincialis* males. *Proc. R. Soc. B.* **273(1600)**: 2483-9.
- Verdonk, N. H. and Van Den Biggelaar, J. A. M., 1983. Early development and the formation of the germ layers. In *The Mollusca Vol. 3: Development* (ed. N. H. Verdonk, J. A. M. Van Den Biggelaar & A. S. Tompa), pp. 91–122. Academic Press, New York.
- Wilkinson, G.S., Mayer, F., Kerth, G., and B. Petri, 1997. Evolution of repeated sequence arrays in the D-loop region of bat mitochondrial DNA. *Genetics*, **146**: 1035-1048.
- Wolstenholme, D. R., 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol* **141**: 173-216.
- Xu, J., 2005. The inheritance of organelle genes and genomes: patterns and mechanisms. *Genome*, **48(6)**: 951-958.
- Yamagata, T., and T. Namikawa, 1999. Sequence variation and evolution of the mitochondrial DNA control region in the musk shrew, *Suncus murinus*. *Genes Genet. Syst.* **74**: 257–266.
- Zbawicka M., Skibinski D. O. F., Wenne R., 2003. Doubly uniparental transmission of mitochondrial DNA length variants in the mussel *Mytilus trossulus*. *Mar. Biol.* **142**: 455–460.
- Zhao, X., Chu, M., Li, N., and C. Wu, 2001. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Sci China (Ser C)* **44**: 321-326.
- Zouros, E. 2000. The exceptional mitochondrial DNA system of the mussel family Mytilidae. *Genes Genet. Syst.* **75**: 313–318.

- Zouros, E., A. O. Ball, C. Saavedra, and K. R. Freeman, 1994a. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* **368**: 818.
- Zouros, E., A. O. Ball, C. Saavedra, and K. R. Freeman, 1994b. An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Sci. USA* **91**: 7463–7467.
- Zouros, E., K. R. Freeman, A. O. Ball and G. H. Pogson, 1992. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* **359**: 412-4.
- Zsurka, G., Kraytsberg, Y., Kudina, T., Kornblum, C., Elger, C. E., Khrapko, K., and W. S. Kunz, 2005. Recombination of mitochondrial DNA in skeletal muscle of individuals with multiple mitochondrial DNA heteroplasmy. *Nat. Genet.* **37**: 873–877.
- Θεολογίδης Ι., 2002. Οι επιπτώσεις του ανασυνδυασμού του μιτοχονδριακού DNA στη δυναμική του συστήματος της διπλής μονογονεϊκής κληρονόμησης (DUI) του μυδιού *M. galloprovincialis*. Μεταπτυχιακή διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης.

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ**



## Παράρτημα I

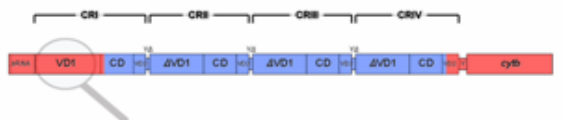
Συστοίχιση της περιοχής ελέγχου (CR) των γονιδιωμάτων C, F και M. Για να πραγματοποιηθεί η σύγκριση, οι τυπικές CR F και M αλληλουχίες επαναλαμβάνονται τέσσερις φορές, ώστε να καλύψουν τις επαναλαμβανόμενες περιοχές του γονιδιώματος C. Η συστοίχιση έγινε από το πρόγραμμα Clustal X v. 1.8 και διορθώθηκε με το χέρι. Παρουσιάζονται μόνο οι μεταβλητές θέσεις. Οι τελείες (.) υποδηλώνουν ομοιότητα με την αλληλουχία αναφοράς που βρίσκεται στην κορυφή. Οι παύλες (-) υποδηλώνουν τις ελλείψεις. Με πλαίσιο σημειώνονται οι αλληλουχίες του CR των μη τυπικών αρσενικών που είναι τύπου F. Με γκρι πλαίσιο σημειώνονται οι περιοχές όπου το σύνθετο CR μεταπίπτει από F σε M και αντίστροφα. 1, 2, 3, 4, 5, 6: Τα έξι νουκλεοτίδια που χαρακτηρίζουν τις αλληλουχίες τύπου M στο κεντρικό τμήμα (CD) του CR.

Δείγματα:

- **MedulM1:** *Mytilus edulis*, τύπος M, απλότυπος 1. (Breton et al. 2006)
- **MgallM:** *Mytilus galloprovincialis*, τύπος M. (Mizi et al. 2005)
- **BS12, BS23, BS25, BS33, BS59, BS61, BS68, BS81:** Δείγματα από τις γονάδες μη-τυπικών αρσενικών *Mytilus galloprovincialis* της Μαύρης Θάλασσας
- **BS6, BS22, BS47:** Δείγματα από τις γονάδες θηλυκών ατόμων *Mytilus galloprovincialis* της Μαύρης Θάλασσας
- **E4g, w172g:** Δείγματα από τις γονάδες μη-τυπικών αρσενικών *Mytilus edulis* του Καναδά
- **MgallF:** *Mytilus galloprovincialis*, τύπος F. (Mizi et al. 2005)
- **MedulF:** *Mytilus edulis*, τύπος F. (Boore et al. 2004)

**VD1<sup>1</sup>**

		111111	1111111111	1111111111	1111111111	Z22222222	222222222	222222222	222222222	2233333333	3333333333	
	1222244455	5666666677	7777788888	9999001111	1112222223	3333333444	4555779999	0000111122	2333334445	5666666788	8900000011	1222222333
	3156818946	9034567901	2368923679	3567010123	6780124560	2456789123	4479130245	2467015712	5146792347	9024569034	7023678978	9012479123
#MedulM1	AGCGATTCTA	CGGGACGGGC	CCTAAAAGCTA	TACCG-GGCT	TTT-TTGGTA	GGGGCTCGTT	CAC-CACATT	-G-GAT--TA	T-CTTAAA-A	AATAGCACCA	A-ATTGT-TA	CGGT-TTCAA
#MgallM	G.....CT	A..A.TATA	G.A.GT----	-----A.AG	..GA.CC...	..AA..C.ACC	TG.-.GG..C	-AA.G.--CG	..CG...A	G...A...T	.....AT	..T...T...
#BS12	.ATTG.AA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	CCGTGA.AGG	..ATACTT.C	T.TCTG.TCG	T.GAG.CTC	CCTCCGGCTG	.GCCA.G..G	GAGCA.GA.G	.AACTGG.CG
#BS23	.ATTG.AA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.ACC	GTTTAA.A.C	C.GTGA.AGG	..AT--T---	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#BS25	.ATTG.AA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA.AGG	A.ATACTT.C	T.TCTG.T.G	T.GAG.GTC	CCTCCGGCTG	.GCCA.G..G	GAGCA.GA.G	.AACTGG.CG
#BS33	.ATTG.AA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA.AGG	..ATACTT.C	T.TC-----	-----	-----	-----	-----	-----
#BS59	.ATTG.AA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA.AGG	..ATACTT.C	T.TC-----	-----	-----	-----	-----	-----
#BS61	.ATTG.AA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA.AGG	A.ATACTT.C	T.TCTG.T.G	T.GAG.GCC	CCTCCGGCTG	.GCCA.G..G	GAGCA.GA.G	.AACTGG.CG
#BS68	.ATTG.AA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA.AGG	A.ATACTT.C	T.TCTG.T.G	T.GAG.GTC	CCTCCGGCTG	.GCCA.G..G	GAGCA.GA.G	.AACTGG.CG
#BS81	.ATTG.AA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGT.T.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA.AGG	..ATACTT.C	T.TCTG.T.G	C.GAG.GTC	CCTCCGGCTG	.GCCA.G..G	GAGCA.GA.G	.AACTGG.CG
#BS6	.ATTG.AA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA.AGG	..ATACTT.C	T.TCTG.T.G	T.GAG.GTC	CC.CGGCTG	.GCCA.G..G	GAGCA.GA.G	.AACTGG.CG
#BS22	.ATTG.AA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA.AGG	..ATACTT.C	T.TCTG.T.G	T.GAG.GTC	CCTCCGGCTG	.GCCA.G..G	GAGCAAGA.G	.AACTGG.CG
#BS47	.ATTG.AA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA.AGG	..ATACTT.C	T.TCTG-	-----	-----	-----	-----	.AACTGG.CG
#E4g	.ATTGAAA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA.AGG	..ATACTT.C	T.TCTG.T.G	T.GAGCGTC	CCTCCGGCTG	.GCCA.G..G	GAGCA.GA.G	.AACTGG.CG
#w172g	.ATTGAAA.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA.AGG	..ATACTT.C	T.TCTG.T.G	T.GAGCGTC	CCTCCGGCTG	.GCCA.G..G	GAGCA.GA.G	.AACTGG.CG
#MgallF	.ATTG.CG.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA..GG	..ATACTT.C	T.TTGT.T.G	A.GAG.GTC	CT.CGGCTG	.GCCA.GT.G	GGCA.GGCG	.TACCGG.CG
#MedulF	.ACTG.CG.T	AGAAGTCTAT	GTCGGTA.CG	GTTTAA.A.C	C.GTGA..GG	..ATACTT.C	T.TCTG.T.G	A.GAG.GTC	CT.CGGCTG	.G.CACGT.G	GGCA.GAGC	.TACTGG.C-
	3333333333	3333333333	3344444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444445	5555555555	555555555	555555555	555555555	5666666666
	3344455555	7888889999	9900000011	1222233333	3344444444	4555556667	7777778880	0111111222	3333334444	4445556667	7777888999	9000112223
	4802803679	7137892356	7834678902	4017903567	8901234678	9345790580	2346790127	9024568238	1456890123	4690236050	2389349238	9239684560
#MedulM1	GAG-AAAAAA	AAAAA-ACAT	AACTAAAAAA	-GTTCACTAA	CTTCCCTCCA	CTTGACATGC	CCTTGCCCTT	ATCTAAATAC	TGCAATACGA	GGTATCCACA	ACCGGCCGTC	CATATTCAA
#MgallM	.....A-.G	..T.GGG...	-----G	AT....T...	TC..G..CA	..A.T...	C.....CC	.A.G.C.T.G	..CGCTT...	TAT....A.T	T....G...T	
#BS12	TGC-TGGCTG	GGGGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#BS23	-----	---GGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#BS25	TGCCCTGGCTG	GGGGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#BS33	-----	-----	-----	---CGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#BS59	-----	-----	-----	---CGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#BS61	TGCCCTGGCTG	GGGGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#BS68	TGCCCTGGCTG	GGGGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#BS81	TGCCCTGGCTG	GGGGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#BS6	TGCCCTGGCTG	GGGGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#BS22	TGCCCTGGCTG	GGGGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#BS47	TGCCCTGGCTG	GGGGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#E4g	TGCCCTGGCTG	GGGGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#w172g	TGCCCTGGCTG	GGGGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TT.TC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.
#MgallF	CGCTTGGCTG	GGGGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TTGTC	G..ATTTAAG	TGCTC..CTT.
#MedulF	CGCTTGGCTG	GGGGGGGTGC	GG.CG..GTC	ACGGGGCGCG	GCAGAGAGTC	..AATGCC.G	TGCATAATGC	TATCCCG..T	C.TGGCTAAT	AT...TTGTC	G..ATTTAAG	TGCTC..TT.





↗ CD<sup>II</sup>
↗ VD2<sup>II</sup>
↗ YΔ<sup>II</sup>
↗ VD1<sup>III</sup>

```

1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1112222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222
6666666666 6666666666 7777788888 8888899999 9990000000 0000000000 0111111111 1112222222 2222222222 2222222222 2222223333 3333333333
1122222233 3333357779 0135700012 3345780124 6880012233 3566777888 9055556779 9990011112 2222444566 6677777788 8889999001 1113333444
7801456912 3478934574 2142003649 2367936025 4073556923 4739367039 1023496372 4690146791 2367014903 5645678914 6890157570 3461348034
#MedulM1 CGATTTAGTT CCCCCGAATT ATACGGATTT GATTTCAGT TCATCAGAAC AGCGGAAC --ATTATACT AAAA-AAATA GGACCAAAAT T-TAGCGT-T TCAAGAGAAA AAA-AAAAAA
#Mgal1M .A..C...A .G...GTGC G.C.CATC.C A..... .AT.T.. AA-A.GG. --.CC..... .A.G... A...T..... --.AT... .T..... -.....
#BS12 .....C .TG..... .C.T..... .G.C.TCG.. A.CA..G.. AAA..... --.C..G..C C..... -..... -..... -..... -AT..TT.
#BS23 .....C .TG..... .C.T..... .G.C.TCG.. A.CA..G.. AA..... --.C..G..C C..... -..... -..... -..... -..... -TT.
#BS25 .....C .TG..T.... .C.T..... .G.C.TCG.. A.CA..G.. AA..... --.C..G..C C..... -..... -..... -..... -A...TT.
#BS33 .....C .TG..T.... .C.T..... .GCC.TCG.. A.CA..G.. AA..... --.C..G..C C..... -..... -..... -..... -..... -TT.
#BS59 .....C .TG..... .C.T..... .G.C.TCG.. A.CA..G.. AA..... --.C..G..C C..... -..... -..... -..... -..... -TT.
#BS61 .....C .TG..... .C.T..... .G.C.TCG.. A.CA..G.. AA..... --.C..G..C C..... -..... -..... -..... -..... -TT.
#BS68 .....C .TG..... .C.T...C.. .G.C.TCG.. A.CA..G.. AA..... --.C..G..C C..... -..... -..... -..... -A...TT.
#BS81 .....C .TG..... .C.T..... .G.C.TCG.. A.CA..G.. AA..... --.C..G..C C..... -..... -..... -..... -..... -TT.
#BS6 .....C .TG..... .C.T..... .G.C.TCG.. A.CA..G.. AA..... --.C..G..C C..... -..... -..... -..... -A...TT.
#BS22 .....C .TG..... .C.T..... .G.C.TCG.. A.CA..G.. AA..... --.C..G..C C..... -..... -..... -..... -..... -TT.
#BS47 .....C .TG..... .C.T..... .G.C.TCG.. A.CA..G.. AA..... --.CC.G..C C..... -..... -..... -..... -..... -TT.
#E4g .....C .TG..... .C.T..... .G.C.TCG.. A.CA..G.. AA..... --.C..G..C C..... -..... -..... -..... -A...TT.
#w172g .....C .TG..... .C.T..... .G.C.TCG.. A.CA..G.. AAA..... --.C..G..C C..... -..... -..... -..... -A...TT.
#Mgal1F TAGCC.GACA TTATT..... G..C...A .T.A.GA.C CAA.AGG.TC TGGACGCTT.. GGCTG.GCC A.GT.GGGCA GCGG.TACCG G.GCGCTGG GTGG.GGG.G
#MedulF TAGCC.GACA TTATT..... G..C...A .T.A..A..T .AA.AGG.TT CAGACGCTT.. GGCTG.G.C ACGT.GGGCA GAGG.TACTG G.G-CGCTGG GTGG.GGG.G

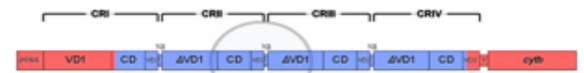
```

1 ↖
2 ↖
3 ↖
4 ↖
5 ↖
6 ↖

```

2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222
3333333333 3333333333 3333333333 3344444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 5555555555 5555555555 5555555555 5555555666
4444555556 6666666677 8889999999 9900000001 1111122223 3333333344 6666777778 8899999999 0000001111 2223334444 5556678888 8999999000
5679023450 1345679789 4670234567 8901345680 1246725790 1345678912 4679123590 5812356789 0136790357 2790560169 0569065123 7025689234
#MedulM1 A--ACATAAC TAAAAAAGTG TCACTAACTT CCCTCCACGT TGACATGCCC TTGTCCCTG TATCTAAATA CTGCAATACG AGGTATCCAA CAACCCGCCG TCCATATTCA AGCGGATTTA
#Mgal1M .A--.C...T .GGG..... .GAC..T...T.C ..G..CA... .A.T..... .C.....CC .A.G.C.T. G..CGCTT...TAT...A .TT...G... TA..A...C.
#BS12 .AA.....T .G.....A ..... .AC..... .C..... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G... TA..A...C.
#BS23 .AA.....T .G.....A ..... .AC..... .C..... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G...
#BS25 .AA.....T .G.....A ..... .AC..... .C..... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G...
#BS33 .AA.....T .G.....A ..... .AC..... .C..... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G...
#BS59 .AA.....T .G.....A ..... .AC..... .C..... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G...
#BS61 .AA.....T .G.....A ..... .AC...CT....C...G... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G...
#BS68 .AA.....T .G.....A ..... .AC..... .C..... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G...
#BS81 .AA.....T .G.....A ..... .AC..... .C..... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G...
#BS6 .AAC.....T .G.....A ..... .AC..... .C..... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G...
#BS22 .AA.....T .G.....A ..... .AC..... .C..... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G...
#BS47 .AA.....T .G.....A ..... .AC..... .C..... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G...
#E4g .AAC.....T .G.....A ..... .AC..... .C..... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G...
#w172g .AA..C...T .G.....A ..... .AC..... .C..... .T...T. G....T.G. ....A.A.T...G...
#Mgal1F GCGGTCCGG. CG..GTGCG. GCGCG.GCA GAGAGTG... AATGCC.GTG CAT.AATG.. GTATCCCG.. TC.TGGCTAA TAT...TT.G TCG..ATTTA AGTGCT.CTT ..TTAGCC.G
#MedulF GCGGTCCGG. CG..GTGCG. GCGCG.GCA GAGAGTG... AATGCC.GTG CAT.AATG.. GTATCCCG.. TC.TGGCTAA TAT...TT.G TCG..ATTTA AGTGCT..TT ..TTAGCC.G

```

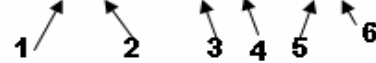


**CD<sup>III</sup>**                      **VD2<sup>III</sup>**                      **YΔ<sup>III</sup>** **VD1<sup>IV</sup>**

```

222222222 222222222 222222222 222222223 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333
666666666 666667777 778888888 899999999 000000000 000000011 111111111 111112222 222222222 222222222 222222223 333333333
0011111135 5578813478 8901123568 8024568890 0111344555 5556667733 3345577777 8999900000 1223344455 5555666666 7778889990 1111222222
7901256712 3520920881 4270145714 8032851334 7012517245 6792480912 3852613589 0356801256 9038924534 5678035789 0464692359 0379234568
#MedulM1 GTTCCCCCGA ATTATACGGA TTTGATTTC AACTTCATCAG AACACGGGAA AGAC---AT TATACTAAAA -AAATAGGAC CAAATTT-TA GCCT-TTCAA GAGAAAAAA -AAAAA--A
#Mgal1M .A.G.G.G TCGG.C.CAT C.CA. .... .AT. T.AA-A. G.G.----C C..... A.G..A.. T..... AT... T. .... -...A--
#BS12 .C.TG.... .C.T.... .G.C.TC G.A.CA... G.AA.G. .AGAC---C .G..CC... -----
#BS23 .C.TG.... .C.T.... .G.C.TC G.A.CA... G.AA. ....C .G..CC... -----
#BS25 .C.TG..T. .C.T.... .G.C.TC G.A.CA... G.AA. ....C .G..CC... -----G
#BS33 .C.TG..T. .C.T.... .GCC.TC G.A.CA... G.AA. ....C .G..CC... -----
#BS59 .C.TG.... .C.T.... .G.C.TC G.A.CA... G.AA. ....C .G..CC... -----
#BS61 .C.TG.... .C.T.... .G.C.TC G.A.CA... G.AA. ....C .G..CC... -----
#BS68 .C.TG.... .C.T.... .C.G.C.TC G.A.CA... G.AA. ....C .G..CC... -----
#BS81 .C.TG.... .C.T.... .G.C.TC G.A.CA... G.AA. ....C .G..CC... -----
#BS6 .C.TG.... .C.T.... .G.C.TC G.A.CA... G.AA. ....C .G..C... -----
#BS22 .C.TG.... .C.T.... .G.C.TC G.A.CA... G.AA. ....C .G..CC... -----G
#BS47 .C.TG.... .C.T.... .G.C.TC G.A.CA... G.AA. ....C .G..CC... -----
#E4g .C.TG.... .C.T.... .G.C.TC G.A.CA... G.AA. ....C .G..C... -----A
#w172g .C.TG.... .C.T.... .G.C.TC G.A.CA... G.AA. ....C .G..C... -----T
#Mgal1F ACATTATT...G.C.. .A.C.. .A.T.A.GA .C.CAA.A.G G.TTCTGGA CGCTT..GGC TG.GCCA.GT .GGCCAGCG .TACCG.GG CGCTGGGTGT GGGG.GGGC
#MedulF ACATTATT...G.C.. .A.C.. .AA.T.A.A .T.AA.A.G G.TTTCAGA CGCTT..GGC TG.G.CACCT .GGCCAGAG .TACTGG.G- CGCTGGGTGT GGGG.GGGC

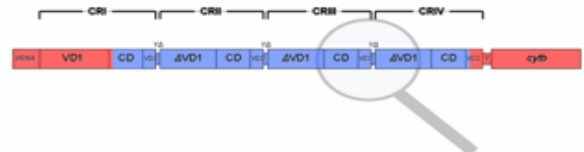
```



```

3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333
3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3334444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444445555 5555555555 5555555555 5555555555
2333334444 4444455566 6677777777 7888888899 9990000011 1111114445 5555666677 7777888888 8999990001 1112223333 4445666667 7777888889
9123490123 4568967835 6912345678 9023457901 3561468902 3456785780 2346016923 4678901247 8014683780 1671270167 0176123481 3679034580
#MedulM1 CATAACTTAA AAAA-CTGTC ACTAACTTCC CTCCACGTTG ACATGCCCTT GTCCCTTATC TAAACTGTC AATACGAGT ATCCAATAA CCGCCGTC ATATTCAAG CCGATTAGT
#Mgal1M .G...T..GG G..... .GAC... T...T.C.. G..CA...A .T.....C .....CC..A. G.C.T.G..C GCTT.....T AT....A.TT ...G...TA ..A...C...
#BS12 ....T..G. ....-A.. ....GAC... ..CA...A .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#BS23 ....T..G. ....-A.. ....A... ..A... .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#BS25 ....T..G. ....-A.. ....A... ..A... .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#BS33 ....T..G. ....-A.. ....A... ..A... .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#BS59 ....T..G. ....-A.. ....A... ..A... .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#BS61 ....T..G. ....-A.. ....A... ..A... .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#BS68 ....T..G. ....-A.. ....A... ..A... .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#BS81 ....T..G. ....-A.. ....A... ..A... .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#BS6 .C...T.AG. ....A.A. ....A... ..A... .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#BS22 ....T..G. ....A.A. ....A... ..A... .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#BS47 .C...T.AG. ....A.A. ....A... ..A... .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#E4g .C...T.AG. ....A.A. ....A... ..A... .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#w172g .C...T..G. ....A.A. ....A... ..A... .AC.....T ...T.G... .T.G.... .A.A.T. ...G.....
#Mgal1F TCCGG.C.G. .GTGTCG.GG CCGG.GCAGA GAGTC-.AA TGCC.GTGCA T.AATGGTAT CCGG..TC.T GCCTAATAT. .TT.GT.CG ..ATTTAAGT GCT..CTT.. TTAGCC.GAC
#MedulF TCCGG.C.G. .GTGTCG.GG CCGG.GCAGA GAGTC-.AA TGCC.GTGCA T.AATGGTAT CCGG..TC.T GCCTAATAT. .TT.GT.CG ..ATTTAAGT GCT...TT.. TTAGCC.GAC

```



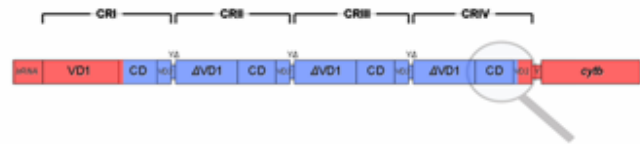
↗ CD<sup>IV</sup>
↗ VD2<sup>IV</sup>

```

3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3334444444 4444444444 4
5555556666 6666677777 7778888889 9999999999 9990000000 0000000011 1
9999991333 5567912566 8991346680 0234566788 9990112233 3333444511 1
1236787346 3810319925 8126825914 9396324458 1232362313 4578179801 2
#MedulM1 TCCCCTAAT TGATACGGAT TGATTCAAGT ATCAATCAGA ACATTGGGGA AAAAC---AT T
#MgallM A..G...GTG C.G.C.CATC CA.....AT..T.....AA.A..G.G.---.C C
#BS12 C.TG.....C.T.....GC.TCG..A.C.A...G...AA.AG GG..TCT-GA C
#BS23 C.TG.....C.T.....GC.TCG..A.C.A...G...AA.....---.C .
#BS25 C.TG.....C.T.....GC.TCG..A.C.A...G...AA.AG GG..TCT-GA C
#BS33 C.TG.....C.T.....GC.TCG..A.C.A...G...AA.AG GG..TCT-GA C
#BS59 C.TG.....C.T.....GC.TCG..A.C.A...G...AA.AG GG..TCT-GA C
#BS61 C.TG..C.....C.T.....GC.TCG..GA.C.A...G...AA.AG GG..TCT-GA C
#BS68 C.TG.....A.C.T.....GC.TCG..A.C.A...G...AA.AG GG..TCT-GA C
#BS81 C.TG.....C.T.....GC.TCG..A.C.A...G...AA.AG GG..TCT-GA C
#BS6 C.TG.....C.T.....GC.TCG..A.C.A...G...AA.AG GG..TCT-GA C
#BS22 C.TG.....C.T.....GC.TCG..A.CTA...G...AA.AG GG..TCT-GA C
#BS47 C.TG.....C.T.....GC.TCG..A.C.A...G...AA.AG GG..TCT-GA C
#E4g C.TG.....C.T.....GC.TCG..A.C.A...G...CA.AAG GGG.TCT-GA C
#w172g C.TG.....C.T.....GC.TCG..A.C.A...G...C.AA.AG GG..TCT-GA C
#MgallF ATTATT....G...C...A..C...A...T...A.GA.C.C...AA.A.GG..TCTGGA C
#MedulF ATTATT....G...C...A..C...AA...T...A..A..T...AA.A.GG..TTCAGA C

```

1 ↗
2 ↗
3 ↗
4 ↗
5 ↗
6 ↗



## Παράρτημα II

- A. Συστοίχιση των τμημάτων από πέντε κωδικές περιοχές (*Cytb*, *COIII*, *COI*, *ND5* και *ND6-srRNA*) του γονιδιώματος C με τα ομόλογα τμήματα των τυπικών F και M γονιδιωμάτων των ειδών *Mytilus galloprovincialis* και *Mytilus edulis*. Η συστοίχιση έγινε από το πρόγραμμα Clustal X v. 1.8. Οι τελείες υποδηλώνουν ομοιότητα με την αλληλουχία αναφοράς που βρίσκεται στην κορυφή.
- B. Οι γενετικές αποστάσεις (κάτω αριστερά, K-distances, Kimura 2-parameter) και το τυπικό τους σφάλμα (πάνω δεξιά) μεταξύ των τμημάτων που αναφέρονται παραπάνω.

Δείγματα:

- **MedulM1:** *Mytilus edulis*, τύπος M, απλότυπος 1. (Breton et al. 2006)
- **MgallM:** *Mytilus galloprovincialis*, τύπος M. (Mizi et al. 2005)
- **BS12, BS23, BS25, BS33, BS45, BS59, BS61, BS68, BS81:** Δείγματα μη-τυπικών αρσενικών *Mytilus galloprovincialis* της Μαύρης Θάλασσας. (g: γονάδα, s: σώμα)
- **F14:** Τυπικό αρσενικό *Mytilus galloprovincialis*
- **C29:** Αρσενικό τριπλασμικό άτομο *Mytilus galloprovincialis* από την Κεφαλονιά
- **BS6, BS22, BS47:** Δείγματα από τις γονάδες θηλυκών ατόμων *Mytilus galloprovincialis* της Μαύρης Θάλασσας
- **E4g, w172g:** Δείγματα από τις γονάδες μη-τυπικών αρσενικών *Mytilus edulis* του Καναδά
- **MgallF:** *Mytilus galloprovincialis*, τύπος F. (Mizi et al. 2005)
- **MedulF:** *Mytilus edulis*, τύπος F. (Boore et al. 2004)

## 1A. *Cytb*

[01]BS12g	GACACGCTAC	CGCGAGGTTG	CAATATAGAG	GTACGTGTGG	CACAGTTCTA	TGGTGGCTTT	TGAGACTCCG	CGAGGATGCA	TCAATTTTGG	CTTCCTCTT	[370]
[02]BS81g	.....	.....	.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	[370]
[03]BS61g	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[370]
[04]BS25g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[370]
[05]BS68g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	[370]
[06]BS33g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	[370]
[07]BS45g	.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	[370]
[08]BS47	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....	[370]
[09]BS59g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	[370]
[10]BS23g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....T.....	.....	[370]
[11]BS6	.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....	.....AG.....	.....	.....	.....	[370]
[12]BS22	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....	.....T.....	.....	[370]
[13]E4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	[370]
[14]w172	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	[370]
[15]MgalloF	.....	.....	.....C.....	.....A.....	.....C.....	.....A.....CC.....	.....T.....	.....	.....CT.....	.....	[370]
[16]MedulF	.....	.....	.....	.....A.....	.....C.....	.....A.....CC.....	.....T.....	.....	.....T.....	.....	[370]
[17]BS59s	.....	.....	.....	.....C.....A.....	.....C.....G.....	.....	.....T.....A.....	.....G.....T.....A.....GGC.....	.....	.....	[370]
[18]BS12s	.....	.....	.....	.....C.....A.....	.....C.....G.....	.....	.....T.....A.....	.....T.....G.....C.....	.....	.....	[370]
[19]BS61s	.....	.....	.....	.....C.....A.....	.....C.....G.....	.....	.....T.....A.....	.....N.....G.....C.....	.....	.....	[370]
[20]BS81s	.....	.....	.....	.....C.....A.....	.....C.....G.....	.....	.....T.....A.....	.....G.....T.....G.....C.....	.....	.....	[370]
[21]MgalloM	.GTTAATAGT	TCTAG.AG.T	AGG.GCCAGA	ACTT.C..AT	.GGTAAGTA	ATAC.AT..C	CAG.GTGTT	T..ATGC.TG	CA...CAC.T	T.CTG.CTCA	[370]
[22]MedulM	AGTTAATG..	TTTA.AAG.T	AG...GAGA	ACCT.CACAT	TGTAAGTA	ATAC.ATC.C	.AGA..GTTA	...ATGC.TG	CA.GC..C.T	T.CTG.CT.A	[370]
[01]BS12g	GGCGGACACC	GCGGTGTTGC	GGAGCGCCAT	AATCGATAAG	TATCCAGGTG	TGGAGCACTG	GGGCTGTATT	TTGGTTCTAA	AGGACAGTTC	AATGACTTTT	[754]
[02]BS81g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	[754]
[03]BS61g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	[754]
[04]BS25g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	[754]
[05]BS68g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	[754]
[06]BS33g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	[754]
[07]BS45g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	[754]
[08]BS47	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	[754]
[09]BS59g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	[754]
[10]BS23g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	[754]
[11]BS6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....G.....	.....	[754]
[12]BS22	.....	.....	.....	.....G.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....G.....	.....	[754]
[13]E4	.....	.....	.....A.....	.....	.....	.....G.....	.....T.....C.....	.....	.....AG.....	.....	[754]
[14]w172	.....	.....	.....A.....	.....	.....	.....G.....	.....T.....C.....	.....	.....AG.....	.....	[754]
[15]MgalloF	.....	.....C.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....G.....	.....	[754]
[16]MedulF	.....	.....C.....	.....A.....	.....GG.....	.....T.....	.....	.....T.....	.....GT.....	.....A.....	.....	[754]
[17]BS59s	.....	.....CT.....	.....A.....	.....	AN.NAN..G	N.....NN..	.....T.....	.....C.....	.....GT.....T.....	.....G.....	[754]
[18]BS12s	.....	.....CC.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....C.....	.....GT.....T.....	.....	[754]
[19]BS61s	.....	.....CC.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....C.....	.....GT.....T.....	.....	[754]
[20]BS81s	.....	.....CC.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....C.....	.....GT.....T.....	.....	[754]
[21]MgalloM	.AATATTGTT	ATAA.C.ATA	ATGT.AATGC	T...A.AGGT	...TTC.C.A	CTT..TGTCT	..TTCTCG..	.CAAG..CGG	CTAG..TCCT	TGCA.GC...	[754]
[22]MedulF	AAGTATT..T	A.AACACATA	ATGCTAA.GC	T...AGA..T	.GG..GA..A	.TT.TTGT.A	AATTATCGCC	CCAAGCTC.T	C.AGTCTC.T	.GCA.GCCGC	[754]



[01]BS12g	GGCTGTCATC TCGCTCACTC CT	[832]
[02]BS81g	..... ..	[832]
[03]BS61g	..... ..	[832]
[04]BS25g	..... ..	[832]
[05]BS68g	.....G... ..	[832]
[06]BS33g	..... ..	[832]
[07]BS45g	..... ..	[832]
[08]BS47	..... ..	[832]
[09]BS59g	..... ..	[832]
[10]BS23g	..... ..	[832]
[11]BS6	..... ..	[832]
[12]BS22	..... ..	[832]
[13]E4	..... ..	[832]
[14]w172	..... ..	[832]
[15]Mgall1oF	.....T...T... ..	[832]
[16]MedulF	.....T..... ..	[832]
[17]BS59s	.....G.. ..	[832]
[18]BS12s	.....G.. ..N ..	[832]
[19]BS61s	.....G.. ..	[832]
[20]BS81s	.....G.. ..	[832]
[21]Mgall1oM	TAT.A.TCAT GTC.CT.TAT T.	[832]
[22]MedulM	TATC.CTTAT GTCTCT.TA. NC	[832]

**1B. Cytb**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1.		0.002	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	0.004	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.020	0.021
2.	0.002		0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.020	0.021
3.	0.002	0.002		0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.020	0.021
4.	0.001	0.001	0.001		0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.002	0.002	0.003	0.003	0.004	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.019	0.021
5.	0.002	0.002	0.002	0.001		0.001	0.002	0.002	0.001	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	0.005	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.020	0.021
6.	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001		0.001	0.001	0.000	0.001	0.002	0.002	0.003	0.003	0.004	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.019	0.021
7.	0.002	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001		0.002	0.001	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	0.005	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.019	0.021
8.	0.002	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002		0.001	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	0.005	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.019	0.021
9.	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001		0.001	0.002	0.002	0.003	0.003	0.004	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.019	0.021
10.	0.002	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001		0.003	0.002	0.003	0.003	0.005	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.020	0.021
11.	0.006	0.006	0.006	0.005	0.006	0.005	0.006	0.006	0.005	0.006		0.002	0.003	0.003	0.005	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.020	0.021
12.	0.005	0.005	0.005	0.004	0.005	0.004	0.005	0.005	0.004	0.005	0.004		0.003	0.003	0.004	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.020	0.021
13.	0.007	0.007	0.007	0.006	0.007	0.006	0.007	0.007	0.006	0.007	0.009	0.007		0.000	0.004	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.019	0.020
14.	0.007	0.007	0.007	0.006	0.007	0.006	0.007	0.007	0.006	0.007	0.009	0.007	0.000		0.004	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.019	0.020
15.	0.018	0.018	0.018	0.016	0.018	0.016	0.018	0.018	0.016	0.018	0.019	0.018	0.018	0.018		0.003	0.006	0.005	0.005	0.006	0.020	0.021
16.	0.020	0.020	0.020	0.019	0.020	0.019	0.020	0.020	0.019	0.020	0.021	0.020	0.020	0.020	0.010		0.006	0.005	0.005	0.005	0.020	0.020
17.	0.030	0.030	0.030	0.029	0.030	0.029	0.030	0.030	0.029	0.028	0.032	0.030	0.033	0.033	0.034	0.033		0.003	0.003	0.004	0.020	0.021
18.	0.021	0.021	0.021	0.020	0.021	0.020	0.021	0.021	0.020	0.021	0.023	0.021	0.024	0.024	0.024	0.024	0.010		0.000	0.001	0.019	0.020
19.	0.021	0.021	0.021	0.020	0.021	0.020	0.021	0.021	0.020	0.021	0.023	0.021	0.024	0.024	0.024	0.024	0.010	0.000		0.001	0.019	0.020
20.	0.023	0.023	0.023	0.021	0.023	0.021	0.023	0.023	0.021	0.023	0.024	0.023	0.025	0.025	0.025	0.025	0.011	0.001	0.001		0.020	0.021
21.	0.233	0.233	0.233	0.231	0.233	0.231	0.229	0.231	0.231	0.233	0.235	0.233	0.229	0.229	0.234	0.233	0.236	0.224	0.224	0.226		0.012
22.	0.246	0.246	0.246	0.244	0.246	0.244	0.246	0.244	0.244	0.244	0.244	0.246	0.239	0.239	0.245	0.244	0.245	0.235	0.235	0.237	0.097	

## 2A. COIII

[01]	BS81g	GGGCACAAAC	GTCTGGCGTC	TATTTATTCG	GTCTTGCTTT	ACTTCTGTTT	CTTACACAGC	GCCGGATATC	ATTCTCACAA	GTCACAACGA	TTTCCAACGT	[397]	
[02]	BS12g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[397]	
[03]	BS22	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[397]	
[04]	BS6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[397]	
[05]	E4g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[397]	
[06]	C29_6	.....	..T.....	..C...C..	.....C.	.....	.....	.....A.C...	.....	..T.....	.....	[397]	
[07]	MgallF	.A.....	..T.A...	.....	..C.....	.....	.....	.....T...T...C...	.....G..G	..T.TG...	.....	[397]	
[08]	MedulF	.A.....	..T.A...	C.....	.....	.....	.....	.....T.T	..T...G...	..T.TG...	.....	[397]	
[09]	C29s	.A.....	..TC.A...	C.....	..T.....	.....	.....	.....T...T	..T...C...	.....	.....	[397]	
[10]	BS60	.A...T...	..T.A...	C...G....	.....	.....	.....	...G..T...	..T...C...	....CTGT..	..T.T....	.....T..	[397]
[11]	BS12s	.A..TT...G	..T.A.T..	C...G....	.....	.....	.....	...G..T...	..T...C...	....CTGT..	..T.T....	.....T..	[397]
[12]	BS81s	.A..TT...G	..T.A.T..	C...G....	.....	.....	.....	...G..T...	..T...C...	....CTGT..	..T.T....	.....T..	[397]
[13]	MgallM	AAAG.TCCT.	..CTCA.TA.G	.G.A..CGAC	AG.A.ATC.A	GGCCTGC..C	TCG.TGTG.A	ATAAAGCTCT	GCCT..C.G.	CGTTT.TTTT	CAGTTGGTTC	[397]	
[14]	C29_3	AAAG.TCCC.	ACTCA.TACG	CG.A.GCGAC	AGTA.ATC.A	GGCCTGC..C	TCG.TGTG.A	AT.AA..TCT	G.CT.TC.C.	C.TTT.T.TT	CCG.TGGTTC	[397]	
[15]	C29_5	AAAG.TCCC.	ACTCA.TACG	CG.A.GCGAC	AGTA.ATC.A	GGCCTGC..C	TCG.TGTG.A	AT.AA..TCT	G.CT.TC.C.	C.TTT.T.TT	CCG.TGGTTC	[397]	
[01]	BS81g	GGAGCTGGTG	AGGTCCGGTG	CGCGATGTCG	ACGATTATCT	TGTGTCGTTT	ACTATGGATT	TTCTGAGACA	CGCAATCTTT	CTAGGATGTG	CTAGCCGAATG	[754]	
[02]	BS12g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[754]	
[03]	BS22	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[754]	
[04]	BS6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[754]	
[05]	E4g	.....	..C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A...	.....	.....C.	[754]	
[06]	C29_6	.....	..C...C..	..T.....	.....	..C.....	.....	..C.....	.....	..C.....	..C.....	[754]	
[07]	MgallF	.....C.	..AC.T...	.....	.....	.....T..C	..T..C...	..CT.....	..T.C...	.....	..T.....	[754]	
[08]	MedulF	.....C.	..AC.T...	.....	.....	.....T..C	..T..C...	..C.....	..C.CT..C	.....	..T.....	[754]	
[09]	C29s	.....C.	..AC.T...	.....	.....	.....GC.	CC.....	.....	..T.....	.....	.....	[754]	
[10]	BS60	.....CT	..AC.T...	.....C..T.	.....C..	.....T..C.	.....	..C.C.....	..T.CT..	.....	.....	[754]	
[11]	BS12s	.....CT	..AC.T...	.....C..T.	.....C..	.....T..C.	.....	..C.C.....	..T.CT..	.....	.....	[754]	
[12]	BS81s	.....CT	..AC.T...	.....C..T.	.....C..	.....T..C.	.....	..C.C.....	..T.CT..	.....	.....	[754]	
[13]	MgallM	AAGATCAA.T	CCT.TTCA.A	TTTAG.ACTA	GGAGCCGCGG	CTCT.TA...	..TCT..AGC.	GCTCAGTCTG	TA.CC.T..C	TCGAAG.ACT	TGGA.AGGCA	[754]	
[14]	C29_3	AAGATCAA.T	CTT.TTCA.A	TTTAG.ACTA	GGAGC.GCGG	C.CT.TA...	..GTCG..AGC.	GCTCAGTCTG	TA.CC.TC.C	TCGAAG.ACT	TGGA.AGGCA	[754]	
[15]	C29_5	AAGATCAA.T	CTT.TTCA.A	TTTAG.TCTA	GGAGC.GCGG	C.CT.TA...	..GTCG.CAGC.	GCTCAGTCTG	TAGCC.TC.C	TCGAAG.ACT	TGGAGAGGCA	[754]	
[01]	BS81g	GGTGGCCCAT	TTGCCACCT	[817]								[817]	
[02]	BS12g	.....	.....	[817]								[817]	
[03]	BS22	.....	.....	[817]								[817]	
[04]	BS6	.....	C.....	[817]								[817]	
[05]	E4g	.....	C.....	[817]								[817]	
[06]	C29_6	.....	C.....	[817]								[817]	
[07]	MgallF	.....T...	C.....	[817]								[817]	
[08]	MedulF	.....T...	C.....	[817]								[817]	
[09]	C29s	..C..T...	.....	[817]								[817]	
[10]	BS60	..C..TT...	.....T...	[817]								[817]	
[11]	BS12s	..C..TT...	.....T...	[817]								[817]	
[12]	BS81s	..C..TT...	.....T...	[817]								[817]	
[13]	MiziM	AA.TAT.GCC	CCCTAGTT.	[817]								[817]	
[14]	C29_3	AACTAT.GCC	CCCTAGTT.	[817]								[817]	
[15]	C29_5	AACTAT.GCC	CCCTAGTTC	[817]								[817]	

**2B. COIII**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.		0.000	0.000	0.001	0.002	0.005	0.006	0.006	0.006	0.008	0.008	0.008	0.021	0.021	0.022
2.	0.000		0.000	0.001	0.002	0.005	0.006	0.006	0.006	0.008	0.008	0.008	0.021	0.021	0.022
3.	0.000	0.000		0.001	0.002	0.005	0.006	0.006	0.006	0.008	0.008	0.008	0.021	0.021	0.022
4.	0.001	0.001	0.001		0.002	0.005	0.006	0.006	0.006	0.008	0.008	0.008	0.021	0.021	0.022
5.	0.005	0.005	0.005	0.004		0.005	0.006	0.006	0.006	0.008	0.008	0.008	0.021	0.021	0.022
6.	0.021	0.021	0.021	0.020	0.021		0.007	0.007	0.007	0.008	0.008	0.008	0.021	0.022	0.022
7.	0.034	0.034	0.034	0.033	0.034	0.035		0.004	0.006	0.007	0.007	0.007	0.020	0.021	0.021
8.	0.034	0.034	0.034	0.033	0.034	0.038	0.014		0.006	0.007	0.007	0.007	0.020	0.020	0.021
9.	0.030	0.030	0.030	0.032	0.033	0.034	0.029	0.033		0.006	0.006	0.006	0.020	0.020	0.021
10.	0.047	0.047	0.047	0.049	0.050	0.051	0.035	0.037	0.032		0.002	0.001	0.021	0.021	0.021
11.	0.051	0.051	0.051	0.053	0.054	0.055	0.039	0.041	0.035	0.004		0.002	0.021	0.021	0.021
12.	0.049	0.049	0.049	0.050	0.051	0.053	0.037	0.038	0.033	0.001	0.002		0.021	0.021	0.021
13.	0.265	0.265	0.265	0.263	0.265	0.265	0.257	0.259	0.255	0.259	0.262	0.261		0.006	0.007
14.	0.266	0.266	0.266	0.264	0.266	0.270	0.262	0.256	0.252	0.252	0.255	0.254	0.029		0.003
15.	0.275	0.275	0.275	0.273	0.274	0.279	0.269	0.263	0.261	0.261	0.264	0.263	0.036	0.007	

### 3A. COI

[01]	BS45g	ATTAGTATCG	CATTTAGGAT	GATGTGTGTA	TTTTGGATTT	TCTGGTATCT	TGGTCTTATT	AGAATCCGTA	GTTCTATGTG	TAGTCTCTTG	TTAATTTAAG	[387]
[02]	BS12g	.....	.....	.....	.....	.....T.	.....	.....	.....	.....	.....	[387]
[03]	BS81g	.....	.....	.....	.....	.....T.	.....	.....	.....	.....	.....	[387]
[04]	BS22	.....	.....	.....C.....	.....	.....T.	.....	.....	.....	.....	.....	[387]
[05]	BS6	.....	.....	.....	.....	.....T.	.....	.....	.....	.....	.....	[387]
[06]	E4g	.....T.	.....	.....A	.....	.....T.	.....	.....	.....	.....	.....	[387]
[07]	C29g	.....T.	.....G.	.....	.....	.....T.	.....	.....	.....	.....	.....	[387]
[08]	MgallF	.....T.	.....	.....C.C.....	.....	.....T.	.....T.C...	.....	.....	.....	.....C.C...	[387]
[09]	MedulF	.....T.	.....	.....C.....	.....	.....T.	.....T.C...	.....C	.....	.....	.....	[387]
[10]	C29s	..C.....T.	..C.....	.....C.....	.....	.....T.	.....T.C...	.....A..	..G.....	C.....	.....	[387]
[11]	BS81s	.....T.T.	..GC....A.C	.....C.....	.....C.....	..T.....T.	.....T.C...	.....	.....	.....T.....	.....	[387]
[12]	BS12s	..T...T.	..GC....A.C	.....C.....	.....C.....	..T.....T.	.....T.C...	.....	.....	.....T.....	.....	[387]
[13]	BS60	.....T.	..GC....A.C	.....C.....	.....C.....	..T.....T.	.....T.C...	.....	.....	.....T.....	.....	[387]
[14]	Medul M	GCA.A.GA.A	TGCC.GA...	AGCTCACAGG	CGCAAAGC..	GTCTAG.GT.	CAAGT..GCC	GAGGC.TA.G	AC.ACCCTCA	C.AATCT.CA	CCGG.CCTGT	[387]
[15]	MgallM	..A.ACGA.A	TGCCCGA.GC	..GAC...AG.	..C.AAA.CC.	GGCTAGTATC	..AAA.G..C.	G.GG.TTA.G	..CCA.GCT..	..AATCTCCC	C.T...CTGT	[387]
[16]	C29g	..A.ACGA.A	TGCCCGA.GC	..GAC...AG.	CC.AAA.C..	GGCTAGTATC	..AAA.G..C.	G.GG.TTA.G	..CCA.GCT..	..AAT.TCCC	C.T...CTGT	[387]
[01]	BS45g	GTCCTGCCGG	CTTCTCTGTG	CGAAGTGGGT	AAGATTGGGT	CTAGTTTCTT	ATCCTAGAAC	GAATAAAGGT	CTGCCACCAC	GGATAGTGAA	T	[813]
[02]	BS12g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.	[813]
[03]	BS81g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.	[813]
[04]	BS22	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.	[813]
[05]	BS6	.....	.....	..G.....	..G.....	.....	.....	..G.....	.....	.....	.	[813]
[06]	E4g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.	[813]
[07]	C29g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.	[813]
[08]	MgallF	.....	..C...T.A..	..G.....	.....	.....	.....	..G...	.....	.....G	.	[813]
[09]	MedulF	.....	.....T...	..G.....	.....	.....T.	.....	.....	.....	.....G	.	[813]
[10]	C29s	.....	.....C.	.....T.	.....	.....	.....G..	.....	.....T	..G.....G	.	[813]
[11]	BS81s	.....A	.....T...	.....A	.....	.....	.....	.....G..	.....T	.....G	.	[813]
[12]	BS12s	.....A	.....T...	.....A	.....	.....	.....C.....	.....G..	.....T	.....G	.	[813]
[13]	BS60	A.....T..A	.....T...	.....A	.....	.....	.....	.....G..	.....T	.....G	.	[813]
[14]	MedulM	..GTTCA..AA	T.CT.T.A.A	TA.TT.TAA.	TG.G..AAAA	TCGAC..TCC	G.TAAGATG.	..G..G.GAAC	TAA.TG.TGG	AT..CACAGT	A	[813]
[15]	MgallM	..G.TCATTA	..CTCT.AA.	TA.CTGTA.	TGT.CCAA.A	..GA.GCT.C	..TAAG.TGT	AG.CGG.AAC	TAATTGTTTCG	A..CCT.AGC	G	[813]
[16]	C29g	..A.TCATTA	..CTCTCA..	TA.CTGTAAC	TG..CCA..A	..GA.GCT.C	..TAAG.TGT	AG.CGG.AAC	TAATTGTTTCG	A.GCCACAGC	G	[813]

**3B. COI**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1.		0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.003	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	0.006	0.020	0.018	0.018
2.	0.001		0.000	0.001	0.002	0.002	0.003	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	0.006	0.019	0.018	0.017
3.	0.001	0.000		0.001	0.002	0.002	0.003	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	0.006	0.019	0.018	0.017
4.	0.002	0.001	0.001		0.003	0.002	0.003	0.004	0.004	0.005	0.006	0.006	0.006	0.019	0.018	0.017
5.	0.005	0.004	0.004	0.005		0.003	0.004	0.004	0.004	0.005	0.006	0.006	0.006	0.019	0.018	0.018
6.	0.004	0.002	0.002	0.004	0.006		0.003	0.004	0.004	0.005	0.005	0.005	0.006	0.020	0.018	0.018
7.	0.007	0.006	0.006	0.007	0.010	0.006		0.004	0.003	0.004	0.005	0.005	0.005	0.020	0.018	0.018
8.	0.018	0.016	0.016	0.015	0.018	0.016	0.012		0.003	0.005	0.005	0.006	0.006	0.020	0.018	0.018
9.	0.012	0.011	0.011	0.012	0.012	0.011	0.007	0.010		0.005	0.005	0.005	0.005	0.020	0.018	0.018
10.	0.020	0.019	0.019	0.020	0.023	0.019	0.015	0.023	0.018		0.006	0.006	0.006	0.020	0.018	0.018
11.	0.024	0.023	0.023	0.024	0.026	0.023	0.019	0.024	0.019	0.024		0.002	0.002	0.019	0.018	0.018
12.	0.025	0.024	0.024	0.025	0.028	0.024	0.020	0.025	0.020	0.025	0.004		0.002	0.019	0.018	0.018
13.	0.025	0.024	0.024	0.025	0.028	0.024	0.020	0.025	0.020	0.025	0.004	0.005		0.019	0.018	0.018
14.	0.215	0.213	0.213	0.211	0.215	0.217	0.217	0.215	0.215	0.215	0.206	0.209	0.210		0.012	0.013
15.	0.195	0.194	0.194	0.195	0.199	0.197	0.197	0.199	0.199	0.197	0.194	0.197	0.194	0.108		0.004
16.	0.196	0.194	0.194	0.193	0.199	0.198	0.198	0.196	0.199	0.196	0.196	0.199	0.196	0.108	0.015	

#### 4A. ND5

[01]	BS45g	CTGCGATGCT	CCTCACCATC	ATAAAGCGGC	TATAGCGTTA	CGAGTCTGCG	TACCCTGCGG	TCTCGGTGTC	GGATGTGACT	GATGGTAACG	AGGGGGAATA	[376]
[02]	BS22	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G..	.....	.....	[376]
[03]	BS12g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[376]
[04]	BS81g	.....	.....	.....	.....	.....A..G...	.....	.....	.....	.....	.....	[376]
[05]	BS6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	.....	[376]
[06]	C29g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[376]
[07]	MgallF	...T.....	...A...	.....	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...TC.....	.....	.....	[376]
[08]	MedulF	...T.....	...A...	...T...	...C.....	...T.....	...T.....	...TC.....	.....	.....	.....	[376]
[09]	C29s	...T.....	...A...	.....	...C.....	...T.....	...T.....	CT.....	.....	.....	.....	[376]
[10]	BS60	T..T...AT.	T....A...	.....	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	.....	.....G..	...A....G	[376]
[11]	BS12s	T..T...AT.	T....A...	.....	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	.....C	.....G..	.....G	[376]
[12]	BS81s	T..T...AT.	T....A...	.....	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	.....	.....G..	.....G	[376]
[13]	C29g2	TGAT.GG.TC	T.GTGTGTCT	GGTGCCTAA.	AG.GTTAC.G	ATG.AT.ATT	CTTTTGATTT	.TCTAACCCCT	AAGCTAT.T.	AGGAACTC.A	GAAAAA.TC.	[376]
[14]	MgallM	TGAT.GG.TC	TTGTGTGTCT	GGT.TCTAAT	AG.GTTAC.G	ATG.AT.ATT	CTTTTGATTT	.TCTAAC.C.T	AAGCTAT.T.	AGGAACTCTA	GAAAAAGCC.	[376]
[01]	BS45g	GTTGGACCTG	GTTGAACAGG	CTATTTTCAG	ATTCTCTGTTT	GAACCATATA	AACGGCATAA	AATTGCGGAA	AAAGATGTAC	TATGATGGCT	CATATCCAGG	[756]
[02]	BS22	.....	.....	.....	.....	...C.....	...A.....	.....	.....	.....	.....	[756]
[03]	BS12g	.....	.....	.....	.....	.....	...A.....	.....	.....	.....	.....	[756]
[04]	BS81g	.....	.....	...C.....	.....	.....	...A.....	.....	.....	.....	.....	[756]
[05]	BS6	.....	.....	.....	.....	.....	...A.....	.....	.....	.....	.....	[756]
[06]	C29g	.....	.....	.....	.....	...T.....	...A.....	.....	.....	...A.....	...G.....	[756]
[07]	MgallF	.....C.	.....	T.....T.	.....C	.....	G...A.....	.....	...C..	...T...	.....	[756]
[08]	MedulF	...T...C.	.....	T.....T.	.....	.....	...A.....	.....	.....	.....	.....	[756]
[09]	C29s	.....	.....	.....	G.....	.....	...A.....	.....	.....	.....	.....	[756]
[10]	BS60	.....C.	.....A.	T.....	.....	.....	...A.G...	.....	GGG..C..G.	...C.....	.....	[756]
[11]	BS12s	.....C.	.....A.	T.....	.....	.....	...A.G...	.....	GG...C..G.	...C.....	.....	[756]
[12]	BS81s	.....C.	.....A.	T.....	.....	.....	...A.G...	.....	GG...C..G.	...C.....	...G..	[756]
[13]	C29g2	.CCTAGTT.T	.CAAGGT.TA	TCGCCCTGA	.AATCACC.	AC.GTGCCGC	.GTCAG.GGG	GCC.ATAAGG	.GTG.ACGT	GGGTG.TATA	TGC.GTT.AA	[756]
[14]	MgallM	ACCTAGTT.T	A.AAGGTCTA	TCGCCCTG.	.AATCACC.	AT.GTGCCGC	.GTCAG.GGG	GCCATAAGG	.GTG.ACGT	.GGTG.TCTA	T.C.GTT.AA	[756]
[01]	BS45g	AGTAAGCGGG	TTTGCGCCTT	AAGGCTATTG	GGTACCAAGG	CCGTTACACA	GGTACTCTCT	GCTGCTTGCG	CTA	[998]		
[02]	BS22	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..T	[998]		
[03]	BS12g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..T	[998]		
[04]	BS81g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..T	[998]		
[05]	BS6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..T	[998]		
[06]	C29g	.....	.....	.....	.....	.....	...C.....	.....	..T	[998]		
[07]	MgallF	.....	.CC..A...	.....	.....	...T.....	.....	.....	..T	[998]		
[08]	MedulF	..C.....	.C...A...	...T.....	...T.....	.....	.....	.....	..T	[998]		
[09]	C29s	.....	.C.....	.....	.....	...C.....	A...C....	.....	..T	[998]		
[10]	BS60	.....	.C.....	.....	...G.....	.....	.....	...T.....	..T	[998]		
[11]	BS12s	.....	.C.....	.....	...G.....	.....	...A.....	...T.....	..T	[998]		
[12]	BS81s	.....	.C.....	.....	...G.....	.....	...T.....	...T.....	..T	[998]		
[13]	C29g2	GCGCGTTCCT	CC.AT.TTGC	TGAAGCGCCT	AACT.TGGTT	TTC.GGT.GG	AC.GT.TCTA	CAAATGCATA	TCT	[998]		
[14]	MgallM	GCGCGTTCCT	CC.AT.TTGC	CGAAG.GCCT	AACT.TGGTT	TTC.GGTGGG	AC.GT.TCTA	CAAATGCATA	TCT	[998]		

4B. ND5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.		0.002	0.001	0.002	0.002	0.003	0.004	0.004	0.004	0.005	0.006	0.005	0.021	0.022
2.	0.004		0.001	0.002	0.002	0.003	0.004	0.004	0.004	0.006	0.006	0.005	0.022	0.022
3.	0.002	0.002		0.002	0.001	0.002	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.005	0.021	0.022
4.	0.005	0.005	0.003		0.002	0.003	0.004	0.005	0.004	0.006	0.006	0.005	0.021	0.022
5.	0.003	0.003	0.001	0.004		0.002	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.005	0.021	0.022
6.	0.007	0.007	0.005	0.008	0.006		0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.005	0.021	0.022
7.	0.019	0.019	0.017	0.020	0.018	0.020		0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.021	0.022
8.	0.018	0.018	0.016	0.019	0.017	0.019	0.013		0.005	0.005	0.006	0.005	0.021	0.022
9.	0.015	0.015	0.013	0.016	0.014	0.016	0.018	0.019		0.005	0.005	0.005	0.021	0.022
10.	0.028	0.028	0.026	0.029	0.027	0.029	0.029	0.028	0.027		0.002	0.002	0.021	0.021
11.	0.028	0.028	0.026	0.029	0.027	0.029	0.029	0.028	0.027	0.004		0.002	0.021	0.022
12.	0.027	0.027	0.025	0.028	0.026	0.028	0.028	0.027	0.026	0.003	0.003		0.021	0.022
13.	0.294	0.294	0.291	0.292	0.289	0.292	0.288	0.286	0.294	0.284	0.289	0.289		0.005
14.	0.298	0.298	0.295	0.297	0.294	0.297	0.292	0.291	0.299	0.289	0.294	0.294	0.023	



## 5A. ND6-srRNA

```

[01] E4G      AACGCAATTG AGGGTCAGAA TGAGGTTTGC GTTACTGCGC TCTTTGTCGG TGCTGAGGAA TAGAGCTTCA GCGGGGTAAT GTAGTGGGTC ATTGTGGGAA [304]
[02] w172     G..... [304]
[03] C         G..... [304]
[04] MgallF    .....T .....T.T.. .....G .....G. .C....T... [304]
[05] MedulF    .....C.. ...T.... ...T.T.. .....G .....G. ....T... [304]
[06] BS60      G.....T ....T..T.. CT....T.. .....G .T..... ....T... [304]
[07] Edu1M1    .TTATG.CCA GTACATG.GG .AGAAGA.TT AC.GTCATTG .T.AAAC.AA C.ACA..TCG G.TG.G..TT ATAAA....C AC.AC.T-. .AACNCTGG [304]
[08] F14g      GTT.TGGC.A GTA.ATCAGG CA.AA.G.T. ACCG..AT.G ..C.AA.TAC CAGCAGAT.G G.T.AGGGTC ATAAAT.... ACGACAT-C. GCAACATTGG [304]
[09] MgallM    GTT.T.GC.A GT..ATCAGG CA.AA.G.T. AC.GT.ATAG ..C..T.TAC CAACAGAT.G GGT..GGGTC .TAAATCC.. ACGACATACT G..ACATTGG [304]

[01] E4G      ACCTTAGCTC GGTGTGTTACA AGTGGAGAGT CAAGAAACGG TTGTGAATAG AGGTTGATTT GCGTGTAGGA CTAAACTCT [637]
[02] w172     ..... [637]
[03] C         .....C..... .T..... T.....C.. [637]
[04] MgallF    ..TCC..... [637]
[05] MedulF    C.TCC..... ..AC..... T.....T. [637]
[06] BS60      ..TC.....CC... ..A..... .C..... T..... [637]
[07] MedulM1   ..T..TAACT AAAC...TG CTCAAGTG.C NT.AGG.TAA CAA..T..T. GAAC..GCGA -G.C...AAG TC.GG...A [637]
[08] F14g      .....TAG.T AAACA..GTG .TCAAGT.AG TTTA..GTAA .AA..TG.T. GAAC..GCCA -G.CCC.AAG TC.CGT... [637]
[09] MgallM    GT.....T A.ACA..GTG .TCAAGT.AC TT.A..GT.A .AACATGCTA GAAC.AGCCA AG.CCCGAAG TCGCGT... [637]

```

## 5B. ND6-srRNA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.		0.001	0.004	0.006	0.007	0.006	0.021	0.022	0.023
2.	0.002		0.003	0.006	0.006	0.006	0.022	0.022	0.022
3.	0.010	0.008		0.006	0.007	0.006	0.022	0.022	0.022
4.	0.023	0.024	0.026		0.006	0.003	0.021	0.022	0.022
5.	0.028	0.026	0.028	0.021		0.006	0.021	0.021	0.022
6.	0.024	0.026	0.028	0.008	0.026		0.022	0.022	0.023
7.	0.233	0.236	0.238	0.229	0.229	0.240		0.014	0.016
8.	0.245	0.243	0.245	0.250	0.245	0.257	0.105		0.009
9.	0.249	0.246	0.249	0.247	0.244	0.252	0.136	0.053	

### **Παράρτημα III**

Στοιχίση του γονιδιώματος C (εκτός του CR) με τα F και M γονιδιώματα των ειδών *Mytilus galloprovincialis* και *Mytilus edulis*. Η στοιχίση έγινε από το πρόγραμμα Clustal X v. 1.8. Οι τελείες υποδηλώνουν ομοιότητα με την αλληλουχία αναφοράς που βρίσκεται στην κορυφή. Παρουσιάζονται μόνο οι μεταβλητές θέσεις.

**MedulF:** *Mytilus edulis*, τύπος F. (Boore et al. 2004)

**MgalloF:** *Mytilus galloprovincialis*, τύπος F. (Mizi et al. 2005)

**MedulM1, M2:** *Mytilus edulis*, τύπος M, απλότυποι 1 & 2. (Breton et al. 2006)

**MgalloM:** *Mytilus galloprovincialis*, τύπος M. (Mizi et al. 2005)

C	GCTTAACTAA	GGACACGCTA	CCGCGAGGTG	CAATATAGAG	GTAAGTCTTG	ACAGTTCTTG	GTGGCTTTTG	AGACTCCGCA	GGGATCATCA	TTTTTGCTCC	[ 412]
MedulF	.....	.....	.....	.....	.....A.	..C.....	..A..CC...	.....TG	A.....	.....T....	[ 412]
MgalloF	.....	.....	.....	.....C.....	.....A.	..C.....	..A..CC...	.....TG	A.....	.....CT....	[ 412]
MedulM_1	ATACGGTAGG	CAGTAAATG.	.TNNTA.AAGT	AG..N.GAGA	ACCTCACATT	GGTAAGTAAT	AC.ATC.C.A	GA.TGTTATG	AATGCTGCAG	C..C.TTCTG	[ 412]
MedulM_2	ATACGGTAGG	CAGTAAATG.	.TTTA.AAGT	AG...GAGA	ACCTCACATT	GGTAAGTAAT	AC.ATC.C.A	GA..GTTA.G	AATGCTGCAG	C..C.TTCTG	[ 412]
MgalloM	ATAC..T.GG	C.GTTAATAG	TTCTAG.AGT	AGG.GCCAGA	ACTTC..AT.	GGTAAGTAAT	AC.AT..CCA	G.GTGT.TG	AATGCTGCA.	.CAC.TTCTG	[ 412]
C	TCTTGGCGGA	CACCGCGGTG	TTCGGGAGCG	CCATATCGAT	AAGATCCAGG	GTGGGCACTG	GGGTGTATTT	TGGTTCTAAA	GGCAGGTTCA	ATGCTTTTGG	[ 824]
MedulF	.....	.....C	.....	A.....GG...	.....T...	.....	.....	.....	..T.....	..A.....	[ 824]
MgalloF	.....	.....C	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 824]
MedulM_1	CT.AAAGTAT	T..TA.AA.A	CCTAATGCTA	ATGCT..AGA	..TGGT.GA.	A.TTTTGT.A	AATATCGCCC	CAAGCTC.TC	.AT.ATC.T.	GCAGCC.CTA	[ 824]
MedulM_2	CT.AAAGTAT	T..TA.AACA	CATAATGCTA	A.GCT..AGA	..TGG..GA.	A.TTTTGT.A	AATATCGCCC	CAAGCTC.TC	.ATC.TC.T.	GCAGCCGCTA	[ 824]
MgalloM	CTCA.AATAT	TGTTATAA.C	.ATAATGT.A	ATGCT..A.A	GGT..TTC.C	ACTT.TGTCT	..TCTCG...	CAAG..CGGC	TA...TCCTT	GCAGC...TA	[ 824]
C	CTGTCATCTC	GCTCCTCCTC	TTATTTTCTT	GAATGCTCAC	ATACGCTCAC	TCAAAGGTGG	CTGAGTTTCC	ATGTTGTAAT	CATGGTATTT	TCCTTTATTG	[ 1208]
MedulF	.....	.T.....	..C.....	.....T.	G.....T	C..G.....	T.....	.....	.....GC..	.....G...	[ 1208]
MgalloF	.....	.T..T.....	..C.....	C.....	.....T	C..G.....	T.....	.....	.....G...	.....G...	[ 1208]
MedulM_1	T...TTATGT	CTCTTA..CT	GGGCC.CA..	CGCNATAT.T	.CGGCCGA.TN	.NGTGACAT	T.CTCCC.AT	NC.CGTGCTC	TTCTACTGC.	CT.GCCGC.A	[ 1208]
MedulM_2	TC.CTTATGT	CTCTTA.NCT	GGGCC.CA.C	CGNCATAT.T	.CGGCCGA.T.	.TGTGCACAT	T.CCCCC.AT	GCTNNTGCTC	NNCNACTGC.	CT.NCCGC.A	[ 1208]
MgalloM	T.A.TCATGT	C.CTTATT.T	G.G..CC.C.	TGT.A.ATG.	...GCATCT	CT.TGTAC.T	TCCTCCCCA.	G..C.T.CTC	T.-TA.TGCC	CTTA.CGCCA	[ 1208]
C	CTAGGGACAC	AATTTGTAGT	TGATTGTTTG	CTATTCAAGT	AGAAACGCGT	ACTGGTAAGT	AATATGCCTT	TGGGGGCCAC	GGTATGGAGC	TAACCTACGC	[ 1520]
MedulF	.....A....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A....	.....	.....	[ 1520]
MgalloF	.....A....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A....	.....	.....C.....	[ 1520]
MedulM_1	GCG.TNGGG.	CGC.AAC..A	CA.C.AGCCT	TATGATT.AC	GTGCGTTAAC	GTCAA.GGTC	..CGCAA.TC	GATAA..TGG	A.CTAA.GAG	.GGT..GTAT	[ 1520]
MedulM_2	NCG.T.GGG.	CGC.AAC..A	CA.C.AGCCT	TAT..TT.AC	GTGCGTTAAC	GTCAA.GGTC	..CGCAA.TC	G.TAA..TGG	A.CTAA.GAG	.GGT..GTAT	[ 1520]
MgalloM	.CGAT.GG.T	GG.CA..GAC	CAGCCA.CCT	TAT.ATTGAC	GCGCC.TTAC	G..AACC..C	GCGT.AATT.	GACAA.TTGG	AACC.AA.AG	.GGTCCGTAT	[ 1520]
C	TATTTCTCTA	GTAAGTGATG	TGGGGCCGTG	TTGAGCATCA	AAAAATCCCT	TCATTCTGGG	GCGGAGTTTC	AGAAGTGGGG	GGTCCGTTTC	GTAATAAGT	[ 1894]
MedulF	.....	.....	.....A...N...	.....T.....	.....	.....C.....	A.....	.....	.....C.....	.....	[ 1894]
MgalloF	.....	.....	.....A.....	.....T.....	.....	.....C.....	A.....	.....	.....C.....	.....	[ 1894]
MedulM_1	AGCGCT.C.G	AC.GT.AC.A	.ATTA.TTCA	CCAGAAC.TG	TT..GCTTTC	..TC.T.ATA	ATAAG..C..	CACCTCTAAA	TC.ATA.ATT	AGG.GCGGCG	[ 1894]
MedulM_2	AGCGCT.C.G	AC.GT.AC.A	.ATTATTTCA	CCAG.AC.TG	TT..GCTTTC	..TC.T.ATA	ATAAG..C..	CACCTCTAAA	TC.ATACATT	AGGGGCGGCG	[ 1894]
MgalloM	.GCGTCTCCG	ACGG.CACCA	CA.TATTT.A	C...AACCTG	CTGG.CTTTC	CTTCTT.ATA	ATAAGACCCT	TACCA.TAA.	CT..TA..TT	AGGGGCG..G	[ 1894]
C	TCGAGTTACT	TGCACTGCTG	ATTTGTATAA	GAATATGGGA	TGGGGCACGG	TTTCACGCTC	AATTTTCCAC	AGCTCTTCTT	AGCGACTTAT	GAGTATTATA	[ 2443]
MedulF	.....	.....	.....	.....G.....	C....T....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 2443]
MgalloF	.....	.....	.....C	.....	C....T....	.....	.....	.....T..	.....	.....	[ 2443]
MedulM_1	GTATACCGTC	CATCTC.TGA	..CCTAG...	AG.CGC.AA.	CA.TAT.TAT	C..TGT.ACT	GGCC..T.TT	.AACT.CTGC	GATCGTA..C	AGTA.GCG..	[ 2443]
MedulM_2	GTATACCGTC	CATCTC.TGA	..CCTAG...	AG.CG..AA.	CA.TAT.TAT	CA..GT.ACT	GGCC..T.TT	.AACT.CTGC	GATCGTAC..	AGTA.GCG..	[ 2443]
MgalloM	.TATA..GTC	.ATCTCCTGA	GCCCCA.CG.	AGGCG.AAAG	CAATATGTAT	C.C.GTAACT	GTC.CCTTCT	GAA.TCCTGC	GATC.TA.T.	AGTAGG..CG	[ 2443]
C	TTGTGAAGGG	TAGTACCAA	TAAGGAAAGT	GGTTCCCTCG	CGGGTGGGCA	AAAACCTCATT	CCTGCCGTGT	GGCCCCGCGC	TCGCGTTAGA	TATCGTGATC	[ 2780]
MedulF	.....A	.....T	.C.....	.C.....	.A.....	...T.....	.....	.....	.....	..C.....	[ 2780]
MgalloF	.....A	.....T	.C.....	.C.....	.A.....	...T.....	.....	.....	.....	..C.....	[ 2780]
MedulM_1	GCA.AGGATA	AT..GGGGG	CTGAAG.T.C	ATCCTTATCC	GCAAGTAAGG	GG...CTGA.	.TC..TACAC	AAGTTTATTA	GTATACCGA.	C..AAA.T.T	[ 2780]
MedulM_2	GCA.AGGATA	AT.GGGGG	CTGAAG.T.C	ATCCTTATCC	GCAAGTAAGG	GG...CTGAC	.TC..TACAC	AAGTTTATTA	GTATACCGA.	C..AAATTCT	[ 2780]
MgalloM	G.AAAGG.T.	GTTCGG.GGG	CTGAAGGTA.	.TCCTTATCA	G.AAGTAAG.	.GGG.CTGG.	AT.ATT.CAC	TAGTTTATAA	CTATAC.GAT	CG.AAG.TCT	[ 2780]

C	TTACACGCTC	TTGCGATAGG	GAGTTTAGCT	AGTAGCATA	GACGGGTTAC	TCTTAGCGTT	AGGTTGGTGT	TAAGACTCTT	CTATTAACCT	AAGTGAACCTA	[ 3154]
MedulF	.....A.	.....G...	.....A.....	.....A.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	[ 3154]
MgalloF	.....G.....	.....G.....	.....A.....	.....A.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	[ 3154]
MedulM_1	CCTGGTATC	CC.T.G.G.C	..ACC..AT.	GA.GATTCCGG	ACAAAC.CGT	ATCCGA.ACG	GCA.G.A.AA	..GG.GT.T.C	..GGCCTGG.G	GTACAG.TC.	[ 3154]
MedulM_2	CCTGGTATC	CC.T.G.G.C	..ACC...T.	GA.GATTCCGG	ACATAC.CGT	AT.CGA.ACG	GCA.G.A.AA	..GG..T.T.C	..GGCCT.G.G	GTACAG.TC.	[ 3154]
MgalloM	C.TTG.AT.T	.CATAGCG.C	AGACC...TC	GAGGATTCCGG	ATAAACC..T	GT..GA.AC.	GA.CGAACAA	CGGA.TCTC.	TGGCGT.GCA	GTACAGGT.C	[ 3154]
C	GCGAGGGTCC	AGTGTGCAAA	GCGCCGTACG	TAGTTGTCTA	AGTTTCCTGG	GTTTAATCCA	ATCTTAGGCT	TAGGGGGCCA	AGTACGTGGT	CGGGTTATGT	[ 3618]
MedulF	.....T.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	[ 3618]
MgalloF	.....T.....	.....A.....	.....G.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	[ 3618]
MedulM_1	ATAGAATGTT	CT..GAT..G	ATTTTCCGT.	..ACA.ATCG	TAC.GTTCTA	ACCGGTG.TG	.C.CATCATC	CGCAACTTT.	GACTTTCAA.	TAACCC.GTC	[ 3618]
MedulM_2	ATAGAATGTT	CT..GAT..G	ATTTTCCGT.	C.ACA.ATCG	TAC.GTTCTA	ACC.GTG.TG	GC.CATCATC	CGCAACTTTG	GACTTTCAA.	TAACCC.GTC	[ 3618]
MgalloM	ATAGAATGTT	.TCCAATTGG	ATT.TCC.TA	.GACGAGTCG	TAC.GTTCTA	ACCGGTGTTG	.CTCGTAAT.	.GCA.CTTT.	.ACTTTCA.C	TAAC.CGATC	[ 3618]
C	TATGGAGATG	CGCGAGGGAA	CCCCGTCGGT	GAGAGCATGG	CTGCTCCGAT	TAGGTACTTC	ATGGGGTCCT	TCTCGTAACG	TGCAGTCATG	ATTCTCGAAA	[ 3993]
MedulF	.....G.....	G.G.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	[ 3993]
MgalloF	.....G.....	G.G.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	.....A.....	[ 3993]
MedulM_1	.GAAA.AGA.	TATA.AAA.T	ATTT.CA.AA	ACACAGTC.A	.AATG.GTTC	CG.AA.TCAA	GGACAA..TG	CG..TCCGTC	G.TGAC.T.C	...CTAGGC	[ 3993]
MedulM_2	.GAAA.AGA.	TATA.AAA.T	ATTT.CA.AA	ACACAGTCTA	.AATG.GTTC	CG.AA.TCAA	GGACAA..TG	CG..TCCG.C	G..GAC.T.C	...CTAGGC	[ 3993]
MgalloM	C.AAAGA.AA	TATATAAAGT	G.TTA.AAAA	ATATAGTC..	T.A.GTGTGC	CGAAAG.CAG	G.ACTAC.TG	.TGT.CTGTC	AAG.A.TC..	.CGTCTAGTG	[ 3993]
C	GCTCCGAAAG	GATGAAATA	AAAAATGCTT	AGTTTGAACT	CTCGCACGCC	GCGTTGATAT	AAATCCACTT	TTAAAGGGTA	AAGTCCGGGA	TCGCCTCAGC	[ 4310]
MedulF	..C.T.....	.....C.....	..CA.....	..T.....T	..CC..C..	.....C...	.....C...	..G..T....	C....C....	.....C....	[ 4310]
MgalloF	..C.T.....	.....CA.....	..A.....	..T.....T	..C...C..	.....C...	.....C...	..G..T....	C....C....	.....C....	[ 4310]
MedulM_1	..CAA.GCGT	AGAAAGGGAG	.GCGG.A.CC	TA.GC.GTT.	TC...AATG	ATA..AT.GC	GGGC.TG.GC	AAGGGA.ACT	GC.G.TTAAT	.T.TT.TGAG	[ 4310]
MedulM_2	..AA.GCGT	AGAAAGGGAG	.GCGG.A.CC	TA.GCAGCT.	TC..T.AATG	ATA..ATCGC	GGGC.TG.GC	AAGGGA.ACT	GG.GGTTAAT	.T.TT.TGAG	[ 4310]
MgalloM	TTCAAAGTGT	.GCAAGGCGG	GGTGGC.T.C	TAC...G..C	TC.ATGAATG	ATAC.AC.GC	.GG.T.CTGC	AAGGG...CT	GCA..TTAAT	.TA...TGAG	[ 4310]
C	TTAGACGGCG	CATACATCAT	AGCCGCGGAT	TCGTTCTGTTG	ATTTTCAGTTT	GTGCGCATA	TTCTTTCTTG	TGCATGTGTC	CAAACACATT	CCGCTGTTCC	[ 4638]
MedulF	C.....T.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	[ 4638]
MgalloF	.....T.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	.....C.....	[ 4638]
MedulM_1	GCCAG.A.TA	.GAGTGG.GC	.ATTAGAAG.	..ACGT.C.A	TG..T.TC.C	AGTTTTGC.T	GC.AACGCAA	G.TGCTAT.T	AGTTT.TTCG	TTAT.A.C.A	[ 4638]
MedulM_2	ACCAG.A.TA	.GAGTGG.GC	.ATTAGAAG.	..ACGT.C.A	TG..T.TCCC	AGTTTTGC.T	GC.AACGCAA	G.TG.TAT.T	AGTTT.TTCG	TTAT.A.CTA	[ 4638]
MgalloM	GCTAGTAA.C	TGAG..GT..	GA.TAGAAGC	C.A...T...	.GCC.CT.C.	AGATTTGCGT	G.TAACGC.A	G..G.TATCT	AGT.T..CCG	TTAT.AC.TG	[ 4638]
C	GCAAGGACCT	ACTGGGCTCC	ATAGGCATCT	CATGGGAGGG	ATTACCGTTT	GTTGTCTGGC	CACTCATTTA	ATTTTTAGGG	TGCCAAATCT	GGCGACTCAT	[ 4973]
MedulF	..NN..G.T.	..C...C.T	.....C..	.....CC.	.....CC.	.....G	.....G	.....G	.....T.	..A...C...	[ 4973]
MgalloF	.....G.T.	..C...GC.T	.....C..	.....T	.....CCC	.....G	.....G	.....C...A	.....T.	..A...C...	[ 4973]
MedulM_1	AAGGAAGTTC	G.CAAAG.TT	G...CTT.TA	T..TAT.TTA	GGAGG.NCC	AGC.GTCT.A	.CTCTGCAC.	..CCC.G.AA	CAGTTT.CT.	AA.ACG.TGA	[ 4973]
MedulM_2	AAGGAAGTTC	GA.AAAG.TT	G...CTT.TA	T..TA..TTA	GGAGG.TCC	AGC.GTCT.A	.CTCT..AC.	..CCC...AA	CAGTTT.CT.	AA.ACG.TGA	[ 4973]
MgalloM	AAGGAAGT..	.T.AA.GCTT	GCGA.TT.TA	TCCTA.G.TA	G.AGGTTC..	AC.CGT.CAA	..T.T..AC.	GC...GAAA	.AGTCCTCTC	A.TA.G..GA	[ 4973]
C	TTTCGGTCTT	TGCTTGACTT	CTGTCTTCAC	AGCTCGCTCG	GATATTCATT	CTGACAAGTC	ATCAACGATT	TCTCAACGTG	GAGCTGGTTC	AGGTCCGGGC	[ 5355]
MedulF	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	[ 5355]
MgalloF	.....C.....	.....T.....	.....T.....	.....C.....	.....T.....	.....G..G..T	.....TG.....	.....C.....	.....C.....	.....AC.T....	[ 5355]
MedulM_1	CCCATAGTAC	CA...A.TC.	TGC.TC.TGT	G.ACTATCTA	A.CTCCTG..	TCTCTGGC.T	GCT..TTTCA	G.CT.G.T.A	A...CAAC.T	C.T.TTC.AT	[ 5355]
MedulM_2	CCCATAGTA.	CA...A..C.	TGCCFC.TGT	G.AC.AT.T.	A.CTCCTG..	TCTCTGGT.T	GCT..TTTCA	G.CT.G.T.A	A...CAA.CT	C.T.TTCAAT	[ 5355]
MgalloM	.CGACAG.A.	.ATCA.GGCC	TGCCCTGTGT	G.A..AT.AA	AGCT.CTGCC	T..C.G.CGT	T.T.TTTTCA	GT.TGGTTCA	AGATCAA..T	CCT.TTCAAT	[ 5355]

C	GCGAGTCGAC	GATTACTCTT	GTGCGTCTAT	GATTTTGTCT	GAGTTACACG	TAATCGTTCT	AGAGCATGTG	CTAGCGAAAA	TGTGGTGGCC	CATTGCCACC	[ 5711]
MedulF	.....	.....	...T.CT..C	...C.C....	.....	.C.CT..C..	.....	....T.....	.....T.....	.....	[ 5711]
MgalloF	.....	.....	...T.CT..C	...C..T...	.....	.T.C.....	.....	....T.....	.....T.....	.....	[ 5711]
MedulM_1	TTAGACTA.G	AG...TCGG.	.CT.A...G.	.GC.AATC..	A.CCCCTGTA	CCC.TTCCTC	GAGAGGC..T	TG.A.AGGG.	C.CAACTATT	G..CCTAG..	[ 5711]
MedulM_2	TTAGACTA.G	AG...TCGGC.	.CT.A...G.	.GC.AATC..	A.CCCCTGTA	CCC.TTCCTC	GA.AGGC..T	TG.A.AGGG.	C..AACTATT	G..CCTAG..	[ 5711]
MgalloM	TTAGACTAGG	AGCCG.CGGC	TCTTA.TCT.	AGC.GC..TC	AGT..CTGTA	.CC.T...CTC	GA.A.G.ACT	TGGA.A.G.G	CA.AA.TAT.	GCCCTAGTT	[ 5711]
C	TGTCAAGCTT	GTGCCATGAG	CT--ATGTTA	ACAGTCACGT	GTATTTGAGA	TTGGATTGAT	GGGCAATTAA	ACCCGGGAAA	AGCAGTGTCT	CTCCTGATCA	[ 6084]
MedulF	..CT.....	.C.....	..--.....	.....A.....	.....G.....	.....	...T.....	.....C...	.....	T.T.....	[ 6084]
MgalloF	..CT.....	.C.....	..--.....	.....A.....	.....G.....	.....	...T.....	.....C...	.....	T.....	[ 6084]
MedulM_1	C...G.TGCC	ACATTGA..T	GCACTAA.CG	.T.TA..TAA	A.T.CCA.T.	CCCATCCTGC	.TATGGCAGT	T.GTAAC.GG	GC.GAAA.TG	TGTTGAGATG	[ 6084]
MedulM_2	...G.TGCC	ACATTGA..T	GCGCTAA.CG	..TA..TAA	A.T.CCA.T.	.CCATCCTGC	.TATGGCAGT	T.GTAAC.GG	GT.GAAACTG	TG.TGAGATG	[ 6084]
MgalloM	.A.T.GTG..	A.A.TGAAGC	..ATTAACCG	G.GTATGTAA	AGTC.CAGT.	..AATCCTGC	TC.T...GGT	TTGTA.TGGG	G.TG..A.TG	.GT.AAGATG	[ 6084]
C	TGTTGCTAGA	TGGTGGAGCA	CGCATGGGCG	GGCAGCGTAC	GGGCATCGTT	CCCGGCATTC	GGATACCAG	TGGCCCCCTT	TGAACATCA	AGGAGTACGT	[ 6383]
MedulF	.....C...	.....G.....	.....T.....	.....	.....	T.....G...	.....	.....	.A.....	.....G..	[ 6383]
MgalloF	.....C...	.....G.....	.....T.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.A.....	.....G..	[ 6383]
MedulM_1	CTCCA..G..	.AAGATTTT.	G.TGAA.TTA	TAGTCTA.GT	ATATGCTAGC	G.TACA.CCT	TAGCGTTA.A	.TAGG.TTAG	.ACGTA...	GTAGTCTT..	[ 6383]
MedulM_2	CTCCAT.G..	.AAGATTTT.	G.TGAA.TTA	TAGTCTA.GT	ATA.GCTAGC	GTTACA.CCT	TAGCGTTA.A	.TAGGATTAG	.ACGTA.C..	GTAGTCTT..	[ 6383]
MgalloM	.CCCATCGTC	CA.GATTT.G	GATGAAATTA	TAATCTAGGT	..TG.TA..	G.TACA..CT	TA.CCTTAGA	.TAGG.TTAG	.AT.TAG.GG	.TAGT.TTAC	[ 6383]
C	TCGTGGTGGT	TCGTGGACTG	ATCTACAAAG	GCGATCACGT	AAGCCGCGTA	TAATATAAGT	ACCATGCTGC	GCGCTCCACG	ATGGGGGAAG	TTGGTGCACC	[ 6720]
MedulF	.....A..	..AC...C.	..T.....	...C.....	.....	..C.....	.....	..T...T...	.....	CC.....	[ 6720]
MgalloF	.....A..	C.AC...C.	..TCG...	...C.....	..A.....	..C.....	.....	..G...T...	.....	C.....	[ 6720]
MedulM_1	CTACA..AC.	.TACCT.T..	.G...TGCC	AT.G...ATC	CG.TTTTAC.	GGGCGCT.TG	GGTTATT.A.	T.TTATTG.A	TCATAA.G..	CCTA.ATG.T	[ 6720]
MedulM_2	CTACA..AC.	.TACCT...G.	..T.CCC	AT.G...ATC	CG.TTTTAC.	GGG.GCT.TG	GGTTATT.A.	T.T.ATTG.A	TCATAA.G..	CCTA.ATG.T	[ 6720]
MgalloM	CTA.ACCACC	.T.C.TGT.T	GGT..TGTC	ATAG.TGGT.	GG.TT..ACG	.G..GCCGTG	G.TCCTTGAT	T.CTGTGT.	G.ATA.AGGT	.CCACATGTT	[ 6720]
C	ACTATTTCCG	ATAACTTGTG	GTGTAAGCCC	TGAGCCGATT	GCATGCATAG	GGGCGCGAT	ATAAGTTTGT	AGGAGAACTA	GTTTCAGTCA	TTTCATATAA	[ 7068]
MedulF	.....	.....	.....T.....	.....	..A.....	.....	.....	.....T..	.....	.....	[ 7068]
MgalloF	.....	.....	.....T.....	.....	..A.....	.....	.....T..C	.....	.....T..	..C.....	[ 7068]
MedulM_1	CACGCACT.A	G..GTA.CCA	ACAAGGCTTT	AAGCTTTGAG	TT..CTT.GA	AT..T.TAGA	GCTTTAGAA.	GCATAG.GCG	TG.CT.AGT.	.GCTGC.CG.	[ 7068]
MedulM_2	CACGCACT.A	G.GGTA..CA	ACAAGGC.TT	AAGCTTTGAG	TTG.TTT.GA	AT..T.TAGA	GCTTTAGAA.	GCATAG.G.G	TG.CT.AGT.	.GCTGC.CG.	[ 7068]
MgalloM	CA.G.A..AA	.C.GTACTCA	ACAA.GCTTT	A.GCTTTGAG	.TGCTTTG.A	ATAA.ATAGC	.CTGT.GAAC	.TATATGG.G	TG...GAGTG	C.CTG.GCGG	[ 7068]
C	G-TTGGGACA	CTAGTCTTAG	GGCTTGCCCT	TAAGTAGAGG	ATTTTGGTCG	AGGAAAAAGG	TAGATGATAT	CCCTCCTTGT	GCGTTGGACC	AGATCCATTC	[ 7541]
MedulF	..-.....	.....	.....	.....	...C.....	.....	C...G...G.	.....C...	..T.....	.....C.	[ 7541]
MgalloF	..-.....	.....	.....	.....	...C.....	.....	...G...G.	.....	..T.....	.....C.	[ 7541]
MedulM_1	AT.CA.AGA.	TCT.AT.G.A	AATCC.TTCC	.GGTCC.GAA	G.ACGATCTA	GCTGGGTGAT	.GAGCAGCGC	TGTCTT.CA.	ATACCA.G..	GAGC.TGG..	[ 7541]
MedulM_2	AT.CA.AGA.	TCT.AT.G.A	AATCC.TTCC	.GGTCC.GAA	G.ACGATCTA	GCTGGGGGAT	.GAGCAGCGC	TGTCTT.CAC	ATACCA.G.T	GAG..TGG.T	[ 7541]
MgalloM	AGCCAAAGGT	TCTA..CGGA	AATC.TT.C.	CG.....G..	.A..C.....	.....G...	...G...G.	....T...A.	AT..CAAGGT	GAG.T.G..T	[ 7541]
C	ATGTCAACCC	CTCTGACATT	ACGGTTTACG	CGGAGTTATT	GTGATCTTCT	GAGGTAGCCA	TGGGGCCAAG	CCTGACGAAG	CTCACTGGGG	CGTTAGCATG	[ 7874]
MedulF	...T.....	.....C.....	.G.....A.	.....C.....	.....C.....	.....	.....T.....	.....G..	.C.....	.....C.	[ 7874]
MgalloF	...T.....	.....C.....	.G.....A.	.....C.....	.....C.....	.....	.....T.....	.....G..	.C.....	.....C.	[ 7874]
MedulM_1	.CAA.GTT.G	T.TGTCTGCC	GAAA.G-T.A	T..GACCCG.	..AGCT.CTG	T.TACCCATG	AAAATTA.TC	TGCACTAT-A	T.TG.AAAAA	TAGAGTT..T	[ 7874]
MedulM_2	.CAA.GTT.G	TCTCTCTGCC	GAAACG-T.A	T..G.CCGC.	.CAGCT.CTG	T.TA.CTGTG	AAAATTA.TC	TG.ACTAT-A	T.TG.AAAAA	TAGAGTT..T	[ 7874]
MgalloM	CCAATGT.TA	T.TCC.TGCC	GAAA.AAT..	TAAGAC.GC.	A.AGCTGCTG	TGTACCTAT.	A.AATTAGGC	TG.AC.AT-A	T.T.TAAAAA	TAGA.T.G.T	[ 7874]

C	GTTAAGAGTT	A-----	-C-TGA-A--	--AGAA--TC	T-----	----GGAAGG	GTACGGGGTT	GATAGTGGTT	TATTATTCAT	TGCTTCGTGG	[ 8248]
MedulF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 8248]
MgalloF	.C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 8248]
MedulM_1	AC.TGAGTGG	GTGAGCTAAA	T.GGTGTGTT	ACTAG.AACA	CCTTCAGCCT	ACGTAAGGAA	A.CTT.ATAG	CGCGACA..C	.T.CT.AAGC	.ATC.T.CCA	[ 8248]
MedulM_2	AC.TGAGTGG	GTGAGCTAAA	T.GGTGCGTT	ATTAG.AACA	CCTCCAGCCT	ACGTAAGGAA	A.CTT.ATAG	CGCGACA..C	.T.CTCAAGC	.ATC.T.CCA	[ 8248]
MgalloM	ACCTGAG.G.	GGAGCTGCGG	CAAGTGTGCC	GTTAGGGTCG	.TCCTGAATC	GGACACGGAA	ACCTCCACAG	CGCGA.AACC	CTC.C.AA.C	CATC.TACTA	[ 8248]
C	TAGTAAATTA	TAGTCCAAAC	TAGTCGATGT	TCAAGATAAT	TGTATCGCAT	TTAGATTGAT	GTGTGTATTT	TGGATTTCTG	GTATTTGGTC	TTATTAGAAT	[ 8680]
MedulF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 8680]
MgalloF	.....	C..T.....	..TC.....	C...T..G..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 8680]
MedulM_1	CTTCGGC.CC	CTAGTT.GGT	C.ACT.GCTC	GTGGAGCCGC	AA.GA.ATGC	C.GA..CA.C	TCA.AGGCGC	AAAGC.GTCT	AG.G.CAAGT	.GCCG.GGC	[ 8680]
MedulM_2	CTTCGGC.CC	CTAGTT.GGT	C.ACT.GCTC	GTGGAGCCGC	AA.GA.ATGC	C.GA...AGC	TCACAGCCGC	AAAGC.GTCT	AG.G.CAAGT	.GCCGAGGC	[ 8680]
MgalloM	CTTCGC.CCC	CTAGTTGGGT	.GACT.GCCC	CT.GAGCT..	AACGA.ATGC	CCGAGC..GA	C...AG..C	AAA.CCGGCT	AGTAC.AAA	G..C.G.GG.	[ 8680]
C	CCGTAGTTCT	ATGTGTGTCT	CTTGTTAATT	TAAGTCCTGC	CGGCTTCTCG	TGCGAAGTGG	GAAGATTGGG	TCTAGTTTCT	TACCTAGAAC	GATAAAGGTC	[ 9148]
MedulF	..C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 9148]
MgalloF	.....	.....	.....	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 9148]
MedulM_1	.ACGAC.AC	CCTCACAATC	T.CACCGG.C	CTGCGTTCAT	.AAT.CT.TA	.ATA.TT.TA	ATG.G..AAA	ATCGA..TC	CGTAAGATG.	.G.G.GAACT	[ 9148]
MedulM_2	.TA.GAC.AC	CCTCACAATC	T.CACCGG.C	CTGTGTTC.A	.AAT.CT.TA	.ATA.TT.TA	ATG.G..AAA	ATCGAC..TC	CGTAAGATG.	.G.G.GAACT	[ 9148]
MgalloM	TTA.G.CCA.	GCT...AATC	TCCCC.T...	CTGTG.TCAT	TAA..CTCTA	A.TA.CTGTA	ATGT.CCAA.	A..GA.GCT.	C.TAAG.TGT	AGCGG.AACT	[ 9148]
C	TGCCACCACG	GTAGTGAATC	TTGTTCCGCA	AAGGCATCGT	TTGTTTACTC	CCATTACCTC	CTGGGCGCTC	TTGGTTTATC	TTGATTGCC	GGGTATGTAC	[ 9598]
MedulF	.....	.....G.T	.....	.....CT..	.....C....	.T.....	TC...T...	.....	...T.....	.....	[ 9598]
MgalloF	.....	.....G.T	.....	.....C....	.....C.....	.....	TC...T....	.....	...T.C....	.....	[ 9598]
MedulM_1	AA.TG.TTGA	T.CACAGTAT	.CT.C.TT.G	GGATTG..TC	.CACCCCTCA	TTG.GGTTCT	TC.TA.ATCT	.CA.CA.TAG	CCTTC.ATTT	TAAGGCTCCA	[ 9598]
MedulM_2	AA.TG.TGGA	T.CACAGTAT	.CT.C.TT.G	GGATTG..TC	CCACCCCTCA	TTGCG.TTCT	TC.TA.ATCT	.CAACACTAG	CCTTC.ATTT	TAAGG.TCCA	[ 9598]
MgalloM	AATTGTTCGA	.CCT.AGCGT	C.TC.TTTTG	.G.TTG..T.	.....CCT.A	.TG.A.TT.T	T.CTA.AT.T	C.....TAA	CCTTC...TT	TAAG..TCTA	[ 9598]
C	GGCATGGAGT	TTTTATCTCG	GTTTATTTTG	TACCCCTTGT	AGGTGGCTGT	TAAAAGCTTT	TGATACGTGA	GGGACACTG	TCCGTACTTT	TTCGGATTAT	[ 9950]
MedulF	.....C....	.C.....	.....G...	.....	.....A....	.....	.....C.....	.....	.....	.....	[ 9950]
MgalloF	....CC....	.C.....	.....G...	.....	.....A.C..	.....	.....C.....	.....	.....	.....	[ 9950]
MedulM_1	.ATGC.TGA.	GC.A.CGCT.	CC.CGCG.CA	CCTGTTCAG	G..CA.T..G	CGTT.CTAAC	CCC.GTTGAG	TA.TGTG..A	C..ACT.CCC	CATC.GAA..	[ 9950]
MedulM_2	.ATGC.TGA.	GC.A.CGCT.	CC..GCGCA	CCTGTTCAA	G..CA.T..G	CGTT.CTAAC	CCC.GTTGA.	TACTGTGT.A	CT.ACT..GC	CATC.GAA..	[ 9950]
MgalloM	AATGCAT.AC	G.CAGCTCTC	.C.GCG.CA	CTTGT.CCAG	GAA.A.T.AA	CGTCG.TAAC	CCC..TTGA.	TA..GTGTCA	C.TACTT.C.	CA..AGGAGC	[ 9950]
C	TCTGTTGCCT	TAGTGTGCT	TTTGTAATTG	CTCAATCCAT	TGTTGTGCGA	TGTCCTAACT	GATATTCGGC	GGCTACAATG	GGCGTAAGAG	ATATGTAATT	[10349]
MedulF	.....	.....	.C.....	..T..CT..C	..C.....	.....	.....C.....	..T.....	.....	..A..G....	[10349]
MgalloF	.....	.....	.C.....	..T..CT..C	..C.....	.....	.....C.....	..T.....	.....	..G.....A.....	[10349]
MedulM_1	GGGT.CTAGC	CGACACCATG	C.CACTG.AA	T..TT.TTT.	GAC..AA.A.	..CTCGGTCA	TGCGC.TAT.	.ATATT.G.A	.AAAAGGATA	GAG.TCGGCC	[10349]
MedulM_2	GGGT.CTAGC	CGA.ACCATG	C.CACTG.AA	T..TT.TTT.	GA...AA.A.	..C.CGGTCA	TGCGC.TAT.	.ATATT.G.A	AAAAAG.ATA	GAG.TCG.CC	[10349]
MgalloM	AGG.G.TTG.	C.ACA..A.G	..A.TGC.A	TC..T.TTT.	GACCAATAG	CACTCGGT.A	.G..CCTATT	AATATTGGCA	.AAAGG.AT.	GAGCA.....	[10349]
C	GCAACTGACT	AGTCTTTCTC	TGTCTTGGAC	TCTCGCTAGC	GGTGCTGTTA	CGCTGGTATT	CGAGGGGTTA	CATAATGATC	ATCGTTATGT	ATTTCATTCG	[10739]
MedulF	...TC....	.....G	.....	.....T.....	.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....	.....	[10739]
MgalloF	...T.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	T.....C..	.....T.....	.....	.....	[10739]
MedulM_1	AGTGGGAGGC	.AATCC.TCG	CAC..CAA.T	CTAT.TCGAT	CAGTTGTA.G	..TCTACTCC	TAGAAAAGCT	TGCTTCTTAT	GCAT.CTCAC	GC.CGGGCAT	[10739]
MedulM_2	AGTGGGAGG.	.AATCCCTCG	CAC..CAA.T	CTAT.TCGAT	CAGTTGTA.G	..TCTACTCC	TAGAAAAGCT	TGCTTCTTAT	GCAT.CTCAC	GC.CGGGCAT	[10739]
MgalloM	AGTGAGAGG.	GAAT...TCG	CACTCCAAGT	.TATATCGAT	CAGTTG.AAG	GT..TACTCC	TAG.AAAGC.	.GCCTT.TCC.	GCATCCTCAC	GCACGGGCAT	[10739]

C	CCCTGACCGC	ATGCGTTTAC	GCTTTACGCC	TGCATTTACT	TTACTAGAGA	GGCGTACCTG	GCAATTGTTT	TATCTACATT	TTTGGGCAGT	CTAATACGGG	[11077]
MedulF	.....	.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....C.....	.....	.....	..G.C.....	[11077]
MgalloF	.....	.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....CC.....	.....	.....	..G.C.....	[11077]
MedulM_1	TTAGA.TA.T	.CATTGACT	CAA.C.T.TA	CATCC..GTC	GCCT.TAGTT	AAGCC.T.A	AAGG.CAAGG	.TATC.T.C.	GACATA.GAC	TCGGCGTTAA	[11077]
MedulM_2	TTAGA.TA.T	.CATTGACT	CAA.C.T.TA	CATCC..GTC	GGCT.TAGTT	AAGCC.T.A	AAGG.CAAGG	.TATC.T.C.	GACATA.GAC	TCGGCGTTAA	[11077]
MgalloM	TTT.AGTGAT	GCTATCGATT	TAACGGTATA	.ATGC.CGTC	GCCTGTAGTT	AAGA.GTTCA	AAGG.C.AGG	CTGTCTG.C	AA..TAT...	T.TGCGGTAA	[11077]
C	GTGGGTATCA	CGGTTCTGCT	CGACAGTCAC	CCAGCCCCGTG	TGTTTACTTC	AACACCCGGG	GTTTGGCCAA	TAGTATTGGA	AGAAGGCAGA	CATAAACTGT	[11457]
MedulF	.....T.	T.....T.	.C.T.....	.....	.....TT.....	.....	.....G.....	.A.....	..C.G.....	.....	[11457]
MgalloF	.....T.	T.....T.	.T.....	.....	.....TT.....	.....	.....C.....	.A.....	..C.G.....	.....	[11457]
MedulM_1	A.AAACGAAG	TAACATCA.C	T.G.TAC..T	TT.ATTTACA	CAC.CGT.G.	GTAGGTTAT.	A..CCA.TGG	C..GTG.AAG	.A.CAATGAG	TG.TG.GG.A	[11457]
MedulM_2	A.AAACGAAG	TAACATCA.C	T.G.TAC..T	TT.A.TTACA	CAC.CGT.G.	GTAGGTTAT.	A..CCA.TGG	C..GTG.AAG	.A.CAATGAG	TG.TG.GG.A	[11457]
MgalloM	.CAA.CGAAG	TAACATC.TC	T.GTTACTGG	TTGAT..ACA	CACA.TTCGT	.TAGG.TATA	ACCC.AT.GG	CGAATACA..	GAGC.ATGA.	TG.GGGGGAA	[11457]
C	ACATGCGACT	CTCCTCACCA	TCAAGTAAGC	GGCTAAGCCG	TTAACGATAC	GCGTACCCCT	GCGGCTTCGG	TGGCGTGATG	TGCGATGGTA	AACGAGGGGG	[11811]
MedulF	.....T...	.....A.	.....T	.....	.C.....	.T.....	...TC...	.....	.....	.....	[11811]
MgalloF	.....T...	.....A.	.....	.....	.C.....	.T.....	...T...	.....	.....	.....	[11811]
MedulM_1	CTGAAT.GTA	TCTTG.GTGT	CTGGAG.TCT	A.TAG..TTA	CC.GACGAG.	A.TCT.TTTG	.TTTTCTTA.	CCATACAG.T	ATTAGGAACC	TCT.GAAAAA	[11811]
MedulM_2	CTGAAT.GTA	TCTTG.GTGT	CTGGAG.TCT	A.TAG..TTA	CC.GGTGAG.	A.TCTTTTTG	.TTTTCTTA.	CCATACAG.T	ATTAGGAACC	TTT.GAAAAA	[11811]
MgalloM	.T.GAT.G.G	TCTTGTGTGT	CT.G.GTTC	AATFAGGTT.A	C.G.ATGA.T	ATTCT.TTTG	ATTTTC.TAA	CC.TA.AGCT	ATTAGGAAC.	TCTAGAAAAA	[11811]
C	AATGATTTGT	GATCCTGGTT	GAACAGGCTT	AATTTTCATT	CCTGTTTGAC	CATATATAAA	CGCTATTAAA	TTGCGGAAAA	GAGTGTACAT	GAGGCTTTCA	[12198]
MedulF	.....T.	.....C.....	.....T..	.....T...	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[12198]
MgalloF	.....T.	.....C.....	.....T..	.....T...	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[12198]
MedulM_1	.GC.G.CCCC	.CT..T.CA	AG..A.T.C	GG.CCCTG.A	ATCAC..ACT	T.CCGCC.GG	TCGGGCAGGC	..TAAG.GG	TGACTAGTGG	TGTATCACTG	[12198]
MedulM_2	.GC.G.CCCC	.CT..T.CA	AG..A.T.C	GG.CCCTG.A	ATCAC..ACT	TGCCGCC.GG	TCGGGCAGGC	..TAAG.GG	TGACTAGTGG	TGTATCACTG	[12198]
MgalloM	GCCA.CC.T.	AG.TT.TA.A	AGGTCTATC.	G.CCCCTGAA	ATCACC.ATG	TGCCGC...G	TCGGG..GGC	CCATAAGG.G	TGAC..GTGG	TGTCT.A.T.	[12198]
C	TTCCGGAGTA	AGCGGGTTTG	TCGCCTTAAA	TGGCATTGGG	TGACCTAACG	GCCGGTACAC	AGGACTCTCT	ATGCTCTGCT	TGCGCTCCTC	TTAGCCGAGC	[12501]
MedulF	.....C.	.....A.....	.....	.....T.....	.....T.....	.....	.....	.....T...	.....G..	.....	[12501]
MgalloF	.....	.....CC.	..A.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....T...	.....G..	.....	[12501]
MedulM_1	..TTAAGCGC	GTTC.T.C.A	CT.TTAC.G	AAAG.CCTAA	CAT.TCGGTT	TT.CAGGTG.	GACGACT.TA	GCCAATCATG	CATATCTTCG	G.TAGG.GCT	[12501]
MedulM_2	..TTAAGCGC	GCTC.T.C.A	.TATTAC.GG	AAAG.CCTAA	CAT.TCGGTT	TT.CAGGTG.	GACGACT.TA	GCCAATCATG	CATATCTT.G	G.TAGG.GCT	[12501]
MgalloM	CGTTAAGCGC	GTTCCCTCC.A	.T.TTGCCG.	.AAGGCCTAA	C.T.T.GG.T	TTTT.GGTGG	GACGT.TCTA	..CAA..ATG	CATATCTT.G	GCGAGTCT..	[12501]
C	GCTAGCTTTT	AAATGTATTG	GTAGCTGTGA	CTGCAATTGA	GGGTCAGAAT	GAGGTTTGCG	TACTGCGCCT	TTGTGCGTGC	TGAGGAATAG	ACTTCGGCGG	[12815]
MedulF	.T.....	.....A.	.....	.....	.....	.....C...	..T.....	..T.T....	.....	.....	[12815]
MgalloF	.T.....	.....A.	.....	.....	.....	.....T.	..T.....	..T.T....	.....	.....	[12815]
MedulM_1	CT.GTTC	G..CACGACA	C.GTT.AC	T.ATG.CCAG	TACATG.GG	AGAAGA.TTA	CGTCATTGT.	AAAC.AAC.A	CA..TCGG.T	GG..TTATAA	[12815]
MedulM_2	CT.GTTC	G..CACGACA	C.GTT.AC	TCATG.CCAG	TACATG.GG	AGAAGA.TTA	CGTCATTG..	AAAC.AAC.A	CA..TCGG.T	GGACTTATAA	[12815]
MgalloM	ATCG.TCC.C	.GGCACGA.A	.AG.TCA..T	T..T.GC.AG	T..ATCAGGC	A.AA.G.T.A	CGT.ATAG.C	..T.TACCAA	CAGAT.GGGT	.GGGTC.TAA	[12815]
C	GGTAATGTAG	TGGGTCATGT	GGGAAACCTT	AGCGTCGGGT	GACAAGTGGG	GAGTCAGAAA	CGGTTGTGAA	TAGAGGTCGA	TTTGTGTGTA	GGATAAACCA	[13221]
MedulF	...G.....	..T.....	.....C.TCC	.....	.....	.....	.....	.....T..	....CAC...	.....T.	[13221]
MgalloF	...G..C..	..T.....	.....TCC	.....	.....	.....	.....	.....T..	....C.C...	.....T.	[13221]
MedulM_1	A...CAC.A	C.T-...AAC	NCTGG..T..	TAA.CTAAAC	..TGCTCAAG	TG.CNTAGG.	TAACAA..T.	.T.GAACT.G	CGA-G.CA..	AAGC.GG.T.	[13221]
MedulM_2	A...CAC.A	C.T-...AAC	ACTGG.....	TAATCTAAAC	..TGCTCAAG	TG.CTTAGG.	TAACAA..T.	.T.GAACT.G	CGA-G.CA..	AAGC.GG.TG	[13221]
MgalloM	ATCC..ACGA	CATACTG.AC	ATTGGGT...	.....TA.AC	AGTG.TCAAG	T.ACTTA..G	T.A.AACATG	CTAGAACTAG	CCAAG.CCCC	AAGCGCGTT.	[13221]

C	CTTAGAGCTG	GGTAACTTT	GTGGATACGG	CTATCGTTGG	ATAGAGGGTT	ATATGAAGCG	GTTATCGAGG	GTTCCCCCTC	ATTGTATAAT	TGCTGTTATA	[13824]
MedulF	T.....	.....	.....	.....	.....	.....T.	.C.C.....	..T.A....	.....	.....	[13824]
MgalloF	T.....	.....	.....	.....	.....	.....A...T.	.C.C.....	..T.....	.....	.....	[13824]
MedulM_1	.AG.AGTTAA	AAGCTTT.A	ACC..C.TAA	..CT.C.AA	T.GTGACTCA	TCGC..GT--	--.T..TTTC	AGCA.--GCT	GCGAAGCGG	CATGA.AGCG	[13824]
MedulM_2	.AG.AGTTAA	AAGCTTT.A	ACC..C.TAA	..CT.CCAA	T.GTGACTCA	TCGC..GT--	--.T..TTTC	AGCA.--GCT	.CGAAGCGG	CATGA.AGCG	[13824]
MgalloM	.GGAGT.AA	AAGCTTTCCA	.GCAGCGTAA	TCGCTACCAA	CCGAGACTCA	T...GGC.A	AC.T.TATTC	AG.ATATGCT	.CGA.GCGGG	.ATGAAA..G	[13824]
C	CTGT-TCGTA	GAT-GCCGCC	CGCACTATAC	ATCTCTGCTC	ACTGGACTTG	GGGGCGCGAG	AAATCGTAGG	TAGAAATTGG	AGTGTGTGTA	ATGTATATTA	[14478]
MedulF	.....	.....	.....C....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.....	.....	[14478]
MgalloF	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	.....	.....	[14478]
MedulM_1	.C.ATCT.A.	.G.CATGAT.	TANNN.GAGT	GC.CNCA.CT	GG.AA.TA.A	AAAAT.TT.A	TG...ACGAA	CCAT.GACAA	GAAT.C...G	GCAC.CGA..	[14478]
MedulM_2	.AATCT.A.	.G.TATGAT.	TATGA.GAGT	GC.CTCA..T	GG.AA.TG.A	AAAAT.TT.A	TG...ACGAA	CCAT.GACAA	GAAT.C...G	GCAC.CGA..	[14478]
MgalloM	GCAA.TAAG	T.CTATGATT	.ATG...A.T	GCTCT.AT.T	GACAAG.GCA	AAA.TA.TGA	TGGCTA.GAA	CCAT.GCAAA	G.A.CCAC.G	G.A.GCGACG	[14478]
C	GTCTATATGT	TTAA-CGTGA	TGTACTGAAG	TTTATACAAT	TGGGGCAGGC	TAATCTCCG	TTTGGTTTTA	TTTCAGTTGT	TTGGACAAGA	TCATATCTAA	[14940]
MedulF	.....	.....	.....	.....CT..	.....	.....G.	.....	.....	.....G...	...C..T...	[14940]
MgalloF	.....	.....	.....	.....T...	.....	C.....	.....	.....	.....G.....	.....T...	[14940]
MedulM_1	AATCC...AG	CAG.CTACCC	AA.GT.A.TA	ACGG..T.GA	AAA.CTTAAA	CGTACTCATA	CC.TA.CCAC	AAAT.ACC.C	CAAT..C-A.	CTG..CT.TG	[14940]
MedulM_2	AATCC...AG	CAGCCTACCC	AA.GT.AGTA	ACGG..T.GA	AAA.CTTAAA	CGTACTCATA	CC.TA.CCAT	AAAT.ACC.C	CAAT..C-A.	CTG..CT.TG	[14940]
MgalloM	AAT.TATCAG	CA..TTACCC	AACGTCA.G.	A...C.TTGG	A.AAATTA.	.GTAC.CA.A	CCCTACCCAG	AAGTGACCAC	CAATGTTGAG	..G.GCTCT.	[14940]
C	AAAATAACGG	GTGTAATTT	ACTGTTTTGT	GTGCTAAAGG	TAGAAGGGTC	CGCGGCCTCG	CTCGCATGTC	ACTATTCACG	CTGAATCTTG	TGTGGTCTAA	[15698]
MedulF	..T.C.....	.....	.....	.C.....	.....	.....T.	.C.....	.....	.....G..	.....	[15698]
MgalloF	..T.C.....	.....	.....	.C.....	.....	.....T.	.C.....	.....	.....G.....	.....	[15698]
MedulM_1	G.TGCGGTTA	ACTAA.TGG.	GGCTACACAC	ACTTGTT.AC	C.A.TAACCT	TTTAAAN..TA	G...T..A.T	.ACGCAA.TA	TC.GG.T.CA	G.AAA.TGCG	[15698]
MedulM_2	G.TGCGGTTA	ACTAA.TGG.	GGCTACACAC	ACTTGTT.AC	C.A.TAACCT	T.TAAT..TA	G.T.T..A.T	.ACGCAA.TA	TC.GG.T.CA	G.AAN.TGCG	[15698]
MgalloM	.GT.CGG.TA	AC.AAGCGGC	GG.CACACAC	ACTTGTTGAC	CGAGTAACCT	T.TAATTATA	GCTCTTCA.T	GAC..AAGTA	.CAGGC..CA	GAAA.CTGCG	[15698]
C	ATCGGGGTAA	GTGCATAGTT	TGCTGAGTA	[15756]							
MedulF	.....	.G.T.....	.....G...	[15756]							
MgalloF	.....	..T.C....	.....G...	[15756]							
MedulM_1	CC.AAAACT.	A.A.GCGAC.	CATCA..CG	[15756]							
MedulM_2	CC.AAAACT.	A.A.GCGAC.	CATCA..CG	[15756]							
MgalloM	CCT.AAAC.G	T.A.GCGACG	.ATCA.ACG	[15756]							



## Παράρτημα IV

### **Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of sporadic detection of DUI in Bivalvia**

Ioannis Theologidis<sup>1</sup>, Stilianos Fodelianakis<sup>1</sup>, Miguel B. Gaspar<sup>2</sup> and Eleftherios Zouros<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> *Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Crete, Greece*

<sup>2</sup> *Instituto de Investigacao e do Mar (IPIMAR), Centro Regional de Investigacao Pesqueira do Sul (CRIPSul)*

\* Corresponding author: *Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Crete, Greece (zouros@biology.uoc.gr)*

Running title: DUI distribution in bivalves

Keywords: Bivalve mtDNA, biparental inheritance, reversal of transmission route, origin of DUI, Tellinoidea

No evidence for absence of paternal mtDNA in male progeny from pair-matings of  
the mussel *Mytilus galloprovincialis*

Ioannis Theologidis\*, Carlos Saavedra† and Eleftherios Zouros\*

\* *Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Crete, Greece*

† *Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ribera de Cabanes, E 12595, Castellón, Spain*

A mitochondrial genome with a reversed transmission route in the  
Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*

**Key words:** Bivalvia; Doubly uniparental inheritance; MtDNA replication slippage and recombination

*Constantinos Venetis<sup>a</sup>, Ioannis Theologidis<sup>b</sup>, Eleftherios Zouros<sup>b</sup> and George C. Rodakis<sup>a,\*</sup>*

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis, 15701 Athens, Greece.

<sup>b</sup> Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Crete, Greece.

Corresponding author. Tel.: +30 210 7274617; fax: +30 210 7274158.

E-mail address: [grodakis@biol.uoa.gr](mailto:grodakis@biol.uoa.gr)

## No evidence for presence of maternal mitochondrial DNA in the sperm of *Mytilus galloprovincialis* males

Constantinos Venetis<sup>1</sup>, Ioannis Theologidis<sup>2</sup>, Eleftherios Zouros<sup>2</sup>  
and George C. Rodakis<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Biochemistry and Molecular Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis, 15701 Athens, Greece*

<sup>2</sup>*Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Crete, Greece*

Species of the mussel family Mytilidae have a special mitochondrial DNA (mtDNA) transmission system, known as doubly uniparental inheritance (DUI), which consists of a maternally inherited (F) and a paternally inherited (M) mitochondrial genome. Females are normally homoplasmic for the F genome and males are heteroplasmic mosaics, with their somatic tissues dominated by the maternal and their gonads dominated by the paternal genome. Several studies have indicated that the maternal genome may often be present in the male germ line. Here we report the results from the examination of mtDNA in pure sperm from more than 30 males of *Mytilus galloprovincialis*. In all cases, except one, we detected only the M genome. In the sperm of one male, we detected a paternal genome with an F-like primary sequence that was different from the sequence of the maternal genome in the animal's somatic tissues. We conclude that the male germ line is protected against invasion by the maternal genome. This is important because fidelity of gamete-specific transmission of the two mitochondrial genomes is a basic requirement for the stability of DUI.

**Keywords:** mitochondrial DNA; heteroplasmy; *Mytilus*; doubly uniparental inheritance

### 1. INTRODUCTION

The mitochondrial genome of metazoans is a closed circular DNA encoding for two ribosomal RNAs, 22 tRNAs and 12 or 13 proteins, which are all components of the oxidative phosphorylation system that is essential for most cellular functions. One apparently universal feature of the mitochondrial genome in animals is that it is maternally inherited. A notable exception is the phenomenon of doubly uniparental inheritance (DUI) that has been found in species of the molluscan bivalve families Mytilidae (sea mussels—Skibinski *et al.* 1994*a,b*; Zouros *et al.* 1994*a,b*) and Unionidae (fresh water mussels—Hoeh *et al.* 1996; Liu *et al.* 1996; Curole & Kocher 2002; Hoeh *et al.* 2002; Serb & Lydeard 2003) and in at least one species of the family Veneridae (clams—Passamonti & Scali 2001). In these species two mitochondrial genomes exist, one that is transmitted through the eggs (the F genome) and one that is transmitted through the sperm (the M genome). Both female and male individuals start as heteroplasmic, i.e. they contain both genomes (Sutherland *et al.* 1998; Cao *et al.* 2004*a*; Obata & Komaru 2005), but females become homoplasmic for the F genome, whereas males become heteroplasmic mosaics, with the F genome dominating the somatic tissues and the M genome dominating the gonad.

The tissue distribution pattern of maternal and paternal genomes may have important implications for DUI. In mammals a mature sperm carries approximately 100 copies of mitochondrial DNA (mtDNA), which might be necessary to sustain the sperm's mitochondrial activity (Hecht *et al.* 1984). In contrast, the mammalian oocyte may contain  $10^2$ – $10^8$  copies of mtDNA, thus exceeding the sperm's mtDNA content by a factor of at least  $10^3$  (Jansen & de Boer 1998; Birky 2001). Recent observations during the first embryonic divisions in mussels of sperm mitochondria stained with mitotracker green, a fluorescent dye that binds non-destructively to the outer mitochondrial surface, suggested that the fate of these mitochondria is different depending on whether the embryo is destined to develop into a female or male individual (Cao *et al.* 2004*a*; Cogswell *et al.* in press). In female embryos the sperm mitochondria behave passively and are diluted within the much larger pool of egg mitochondria. In male embryos, most sperm mitochondria are found in the larger cell at the two-cell or the four-cell stage. This cell, designated 'CD' in the two-cell stage and 'D' in the four-cell stage (Conklin 1897), is the one that gives origin to the germ line (Verdonk & Van Den Biggelaar 1983). This controlled behaviour of sperm mitochondria in male embryos is, apparently, part of a developmental mechanism through which these mitochondria are delivered to the first germ cells.

It follows from these observations that the presence of a maternal genome in the sperm may have more serious consequences for the stability of DUI than the presence of a paternal genome in eggs. The M genome is either entirely absent from mature females or present as a tiny

\* Author for correspondence (grodakis@biol.uoa.gr).

The electronic supplementary material is available at <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2006.3607> or via <http://www.journals.royalsoc.ac.uk>.

