ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ ‘‘ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ’’

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΤΥΠΩΝ mtDNA ΠΟΥ ΜΕΤΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΣΠΕΡΜΑ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ ΜΟΝΟΓΟΝΙΚΗΣ ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥ mtDNA ΤΟΥ ΜΥΔΙΟΥ *Mytilus galloprovincialis*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΕΥΚΑΛΙΩΝ Π. ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε. ΖΟΥΡΟΣ

Β΄ ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΜΟΣΧΟΝΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2003

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΕΓΟΜΕΝΑ 2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 3
ABSTRACT 4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 5
1.1. ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA 5
1.1.1. Δομή και λειτουργία 5
1.1.2. Η κληρονόμηση του μιτοχονδριακού DNA 7
1.1.3. Η κληρονόμηση του mtDNA στο μύδι 7
1.2. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA 15
1.3. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ 16
1.4. Ο ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ 17
1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ 18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 19
2.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ 19
2.2. ΕΞΑΓΩΓΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA 21
2.3. ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ mtDNA ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΘΗΚΑΝ 22
2.4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR 27
2.4.1. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) 28
2.4.2. Κλωνοποίηση και έλεγχος θετικών κλώνων 29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 32
3.1. ΠΕΡΙΟΧΗ COIII 32
3.1.1. Περιοριστικά πρότυπα 32
3.1.2. Κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR της περιοχής COIII για το άτομο H19 35
3.2. ΔΙΑΦΟΡΑ ΜΕΓΕΘΟΥΣ F ΚΑΙ M ΜΟΡΙΩΝ ΤΗΣ LUR 36
3.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΥΛΟ-ΕΙΔΙΚΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ 39
3.3.1. Ανίχνευση M μορίων με χρήση φυλο-ειδικών εκκινητών 42
3.3.2. Ανίχνευση F μορίων με χρήση φυλο-ειδικών εκκινητών 43
3.3.3. Ανίχνευση ανασυνδυασμένων μορίων με χρήση φυλο-ειδικών εκκινητών 44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 52
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 53
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 60

ΠΡΟΛΕΓΟΜΕΝΑ

Είναι αρκετοί εκείνοι που με τον ένα ή άλλο τρόπο βοήθησαν στην πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής.

Αρχικά αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Ε. Ζούρο για την ανάθεση της διατριβής άλλα και για όλα όσα έμαθα από αυτόν. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την διαύγεια και το πνεύμα συνεργασίας που τον διέκρινε κατά τις συναντήσεις μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εξίσου θερμά τον Μανόλη Λαδουκάκη και τη Μαρία Δραμουντάνη. Η βοήθεια και η καθοδήγηση τους ήταν πολύτιμη. Ιδιαίτερα τον πρώτο καιρό στο εργαστήριο, όταν δεν ήμουν εξοικειωμένος με τις έννοιες ‘‘PCR’’, ‘‘RFLPs’’ και ‘‘κλωνοποίηση’’.

Παράλληλα θέλω να ευχαριστήσω τον Γιώργο Γουλιέλμο για την βοήθεια του. Δυστυχώς κατάφερα να καταχωρίσω λίγες μόνο από τις ομολογουμένως εντυπωσιακές επιστημονικές, και όχι μόνο, γνώσεις του.

Ευχαριστώ επίσης όλους εκείνους με τους οποίους είχαμε μία άψογη συνεργασία στο εργαστήριο. Τον Γιάννη Θεολογίδη, την Γεωργία Δημητρίου τον Τάσο Τσαούση και την Jelena Radojicic.

Τελειώνοντας θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους Γιάννη Ντελή, Γιάννη Χανιωτάκη, Δημήτρη Κομπιλίρη αλλά και όλους όσους βοήθησαν και πιθανώς αυτή τη στιγμή να μου διαφεύγουν.

Τσαγκαράκης Δευκαλίων

Ηράκλειο, Ιούνιος 2003

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Διπλή Μονογονική Κληρονομικότητα (ΔΜΚ) του μιτοχονδριακού DNA είναι ένα ασυνήθιστο φαινόμενο που έχει βρεθεί στα θαλάσσια μύδια και ορισμένα άλλα είδη δίθυρων. Αυτά τα είδη εμφανίζουν δύο τύπους μιτοχονδριακού DNA: ένα το οποίο μεταβιβάζεται από την μητέρα τόσο στους θηλυκούς όσο και στους αρσενικούς απογόνους (τύπος F) και ένα το οποίο μεταβιβάζεται από τον πατέρα στους αρσενικούς απογόνους μόνο (τύπος M). Τα δύο μόρια έχουν κατά συνέπεια διαφορετικές γραμμές μεταβίβασης, μία μέσω της θηλυκής και μία μέσω της αρσενικής γραμμής μεταβίβασης. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα δύο μόρια διαφέρουν περισσότερο από 20%, ωστόσο υπάρχουν εξαιρέσεις όπου το μόριο M είναι πολύ όμοιο με το μόριο F. Αυτό αναφέρεται ως ‘‘αρρενοποίηση’’ του μορίου F και ίσως προκύπτει μέσω μίας ‘‘αντιστροφής ρόλου’’ στην οποία ένα παλιό F μόριο εισέρχεται στην αρσενική γραμμή κληρονόμησης εκτοπίζοντας τα M τύπου μόρια και μηδενίζοντας το χρόνο διαφοροποίησης των δύο γραμμών κληρονόμησης.

Πρόσφατη ανακάλυψη έδειξε ότι το μιτοχονδριακό DNA υφίσταται ομόλογο ανασυνδυασμό. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι τα λεγόμενα ‘‘αρρενοποιημένα’’ F μόρια είναι στην πραγματικότητα ανασυνδυασμένα μόρια τα οποία συμπεριφέρονται ως M μόρια εφόσον αποκτήσουν ένα συγκεκριμένο τμήμα της αλληλουχίας του M μορίου, το οποίο προσδίδει την χαρακτηριστική συμπεριφορά του M μορίου.

Η παρούσα διατριβή προσπαθεί να εντοπίσει άμεσες αποδείξεις για το κατά πόσο F ή ανασυνδυασμένα μιτοχονδριακά μόρια μεταφέρονται μέσω του σπέρματος στην επόμενη γενιά, κατά πόσο ο ανασυνδυασμός του μιτοχονδριακού DNA είναι γενικό ή περιορισμένο φαινόμενο, και την σχέση του ανασυνδυασμού με το φαινόμενο της αρρενοποίησης. Εξετάσθηκε σπέρμα από 38 αρσενικά άτομα. Η ανάλυση εστιάστηκε κυρίως στην μεγάλη περιοχή αγνώστου λειτουργίας (LUR: Large Unassigned Region), η οποία είναι η πιο πιθανή να φέρει την χαρακτηριστική αλληλουχία η οποία τροποποιεί την συμπεριφορά των M μορίων.

Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την άποψη ότι υπάρχει ισχυρός μηχανισμός που αποκλείει την παρουσία των F μορίων από το σπέρμα. Επιπλέον φαίνεται ότι είτε υπάρχει ισχυρός μηχανισμός που εμποδίζει τον ανασυνδυασμό μεταξύ M και F μορίων στα τυπικά αρσενικά άτομα, ή τα ανασυνδυασμένα μόρια εάν παράγονται στην γονάδα δεν μπορούν να περάσουν στο σπέρμα.

ABSTRACT

Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA (mtDNA) is an unusual feature found in marine mussels and a few other bivalve species. These species have two types of mitochondrial DNA: one that is transmitted from mother to both female and male offspring (F type) and one that is transmitted from the father to sons only (M type). The two molecules have, therefore separate transmission routes, one through the female and the other through the male lineage. In most cases the two molecules differ by more than 20%. But there are exceptions in which the M genome is very similar with the F genome. This is referred to as ‘‘masculinization’’ of the F genome and might lead to a ‘‘role reversal’’ in which an old F genome enter the male lineage displacing M type molecules and setting the differentiation time of the two lineages to zero.

Recent evidence exists that mtDNA undergoes homologous recombination. This led to the hypothesis that the so called ‘‘masculinized’’ F genomes are actually recombined molecules that acquired those specific sequence from the M genome that specify the characteristic M behavior.

The present thesis tries to obtain direct evidence whether F or recombinant mtDNA molecules are transmitted via sperm to the next generations, whether mtDNA recombination is a general or restricted phenomenon, and the relation of recombination with the phenomenon of ‘‘masculinization’’. Sperm from 38 different male mussels was examined. The analysis was focused mainly on the large region of the mtDNA genome with no known function (LUR: Large Unassigned Region), which is suspected to carry the specific sequence that modify the behavior of M molecules.

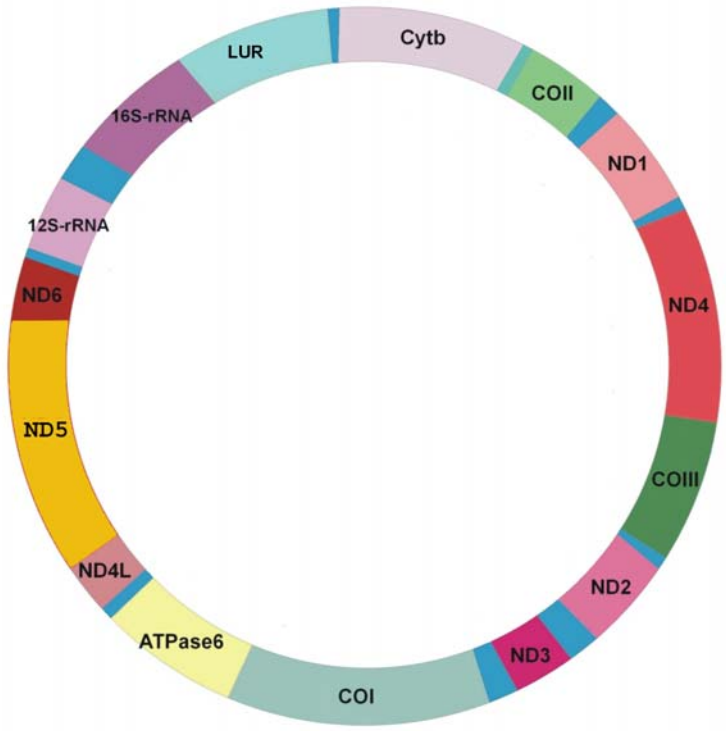
The results support the view that there is a strong mechanism that exclude the presence of F molecules in the sperm. In addition it seems that there is also a mechanism that either prohibit the recombination between F and M molecules in typical male individuals, either that recombinant molecules, in case they are produced in male gonad, can’t pass into sperm.

1.1. ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA

1.1.1. Δομή και λειτουργία

Τα μιτοχονδριακά DNA (mtDNA) των ζωικών οργανισμών εμφανίζουν ομοιότητες ως προς την δομή και την λειτουργία τους. Πρόκειται για κυκλικά δίκλωνα μόρια, με εξαίρεση κάποιους κατώτερους οργανισμούς, όπως το υδρόζωο *Hydra attenuata* το οποίο αποτελείται από δύο ευθύγραμμα μόρια DNA με μέγεθος 8 Kb το καθένα (Pont-Kingdon *et al*., 2000). Το μέγεθος του mtDNA των ζώων ποικίλει από 14 έως 42Kb, με μέσο μέγεθος τα 17Kb.

Ένα τυπικό ζωικό μόριο mtDNA δεν έχει εσώνια και φέρει γονίδια από τα οποία 13 κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 2 κωδικοποιούν ριβοσωμικό RNA και 22 κωδικοποιούν tRNA πρωτεΐνες. Μεταξύ των γονιδίων πολλές φορές δεν παρεμβάλλεται ούτε ένα νουκλεοτίδιο, κάτι που οδήγησε στο να χαρακτηριστεί το mtDNA ως πρότυπο οργάνωσης και οικονομίας γενετικού υλικού (Attardi, 1985). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το mtDNA συμμετέχουν όλες στην αναπνευστική αλυσίδα και είναι: τρεις υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI, COII, COIII), το κυτόχρωμα b, οι ATPάσες 6 και 8, οι υπομονάδες 1-6 της ND καθώς και η ND4L. Τα rRNA που έχουν εντοπιστεί στο mtDNA αποτελούν τα ομόλογα των 16S και 23S rRNA της *Escerichia coli* και ονομάζονται s-rRNA και 1-rRNA αντίστοιχα (Εικόνα 1). Ο γενετικός κώδικας των mtDNA διαφοροποιείται από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα. Διαφοροποιήσεις υπάρχουν και μεταξύ διαφορετικών οργανισμών που ανήκουν σε μεγάλες ταξινομικές ομάδες (Wolstenholme, 1992; Taanman, 1999). Ειδικά για το μύδι *Mytilus edulis* οι διαφορές από τον γενετικό κώδικα άλλων μεταζώων οφείλονται κυρίως στην ύπαρξη δύο $tRNA^{met}$ και στο ότι το κωδικόνιο ATT δεν φαίνεται να κωδικοποιεί έναρξη. Οι διαφορές από τον γενικευμένο γενετικό κώδικα οφείλονται στα κωδικόνια TGA που κωδικοποιεί τρυπτοφάνη αντί λήξης, ATA που κωδικοποιεί μεθειονίνη αντί ισολευκίνης, AGA και AGG που κωδικοποιούν σερίνη αντί αργινίνης (Hoffman *et al*. 1992). Πιο πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι οι ίδιες αλλαγές υπάρχουν και στο μιτοχονδριακό γενετικό κώδικα άλλων μαλακίων (Boore and Brown 1994; Terret *et al*., 1996; Lecanidou *et al*., 1994; Hatzoglou *et al*., 1995).



Εικόνα 1. Το mtDNA του μυδιού

Οι δύο αλυσίδες του mtDNA έχουν διαφορετικό περιεχόμενο σε C-G, με αποτέλεσμα όταν αποδιαταχτούν και φυγοκεντρηθούν σε CsCl να εμφανίζονται σε δύο ζώνες, από τις οποίες η μία είναι βαρύτερη της άλλης. Η βαριά αλυσίδα ονομάζεται H (heavy) και η ελαφριά L (light). Στο mtDNA έχει βρεθεί μια περιοχή πλούσια σε A-T, που αποτελεί την έναρξη της αντιγραφής του mtDNA και ονομάζεται replication origin ή D-loop. Η περιοχή αυτή διαφέρει τόσο σε μέγεθος όσο και σε αλληλουχία νουκλεοτιδίων μεταξύ των διαφόρων οργανισμών. Στο D-loop υπάρχει το σημείο της έναρξης της αντιγραφής της αλυσίδας H η οποία αντιγράφεται εκτοπίζοντας την αλυσίδα L η οποία μένει μονόκλονη έως ότου η αντιγραφή της αλυσίδας H προχωρήσει και αποκαλύψει το σημείο έναρξης αντιγραφής της L (Taanman, 1999). Στο mtDNA των μυδιών του γένους *Mytilus* έχει βρεθεί μία περιοχή (LUR: Large Unassigned Region), η οποία στα αρσενικά μόρια είναι μικρότερη από αυτή των θηλυκών μορίων. Δεν έχει διαπιστωθεί καμία λειτουργία για την περιοχή αυτή και θεωρείται ως η περιοχή από την οποία αρχίζει να αντιγράφεται το mtDNA η αντίστοιχη δηλαδή D-loop των θηλαστικών.

Σε μεγάλες ταξινομικές ομάδες τα γενικά χαρακτηριστικά του mtDNA διαφοροποιούνται στο γονιδιακό περιεχόμενο του μορίου και στη διάταξη των γονιδίων πάνω στο μόριο. Το mtDNA του μυδιού, για παράδειγμα, δεν περιέχει το

γονιδίο της ATPάσης 8, ενώ περιέχει ένα επιπλέον tRNA μεθειονίνης (Hoffmann *et al*., 1992) καθώς και ένα ψευδογονίδιο για το tRNA της σερίνης (Beagley *et al*., 1999).

1.1.2. Η κληρονόμηση του μιτοχονδριακού DNA

Η κληρονόμηση των κυτταροπλασματικών DNA στους οργανισμούς είναι μονογονική, δηλαδή το κυτταροπλασματικό DNA μεταβιβάζεται στους απογόνους μόνο από τον ένα γονέα (πάντα του ίδιου φύλου). Αυτό αποτελεί έναν από τους γενικότερους κανόνες στη φύση με ελάχιστες εξαιρέσεις. Μάλιστα το κυτταροπλασματικό DNA, μεταβιβάζεται συνήθως μέσω του θηλυκού γαμέτη (Birky, 1995). Εξαιρέσεις έχουν βρεθεί στη σεκόγια (Neale *et al*. 1989), τη μπανάνα (Faure *et al*., 1994), και το λάχανο (Erickson and Kemble, 1990) στα οποία το mtDNA μεταβιβάζεται μέσω της γύρης. Στους ζωικούς οργανισμούς το mtDNA μεταβιβάζεται μητρικά (Hutchison *et al*., 1974; Hayashi *et al*., 1978; Kroon *et al*., 1978; Shitara *et al*., 1998). Εξαίρεση αποτελούν τα μύδια των οικογενειών Mytilidae και Unionidae καθώς και το είδος *Tapes phillipinarium* της οικογένειας Veneridae (Passamonti and Scali 2001) για τα οποία θα γίνει εκτενής αναφορά στην συνέχεια.

Η γενικότητα της μονογονικής και μάλιστα μητρικής κληρονόμησης του mtDNA των ζωικών οργανισμών (Avise and Lansman, 1983) αμφισβητήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 90, όταν βρέθηκε με PCR ότι σε απογόνους υβριδίων τρωκτικών συνέβαινε «διαρροή» πατρικού mtDNA (Gyllensten *et al*., 1991). Παρόμοια φαινόμενα παρατηρήθηκαν στο γαύρο (Magoulas and Zouros, 1993) και σε υβρίδια δροσόφιλας (Kondo *et al*., 1990, Satta *et al*., 1988). Ωστόσο, η ποσότητα του πατρικού mtDNA που ανιχνευόταν και στις δύο περιπτώσεις ήταν πολύ μικρή και το φαινόμενο εξηγήθηκε σαν μία απλή διαρροή πατρικού μιτοχονδριακού γενετικού υλικού.

1.1.3. Η κληρονόμηση του mtDNA στο μύδι

Στα μύδια όμως του γένους *Mytilus* έχει βρεθεί εκτεταμένη ετεροπλασμία του mtDNA, η οποία μάλιστα συσχετίζεται με το φύλο (Fisher and Skibinski, 1990; Hoeh *et al*., 1991; Zouros *et al*.. 1992). Διαπιστώθηκε η ύπαρξη δύο διαφορετικών - ως προς την αλληλουχία τους - τύπων μορίου mtDNA, ένα που εμφανιζόταν στα θηλυκά και στα αρσενικά και ονομάστηκε F, και ένα που εμφανιζόταν κυρίως στα αρσενικά

και ονομάστηκε M (Fisher and Skibinski, 1990; Skibinski *et al*., 1994a,b; Zouros *et al*., 1994a,b).

Οι παρατηρήσεις στα μύδια συνηγορούσαν στην αμφιγονική κληρονόμηση του mtDNA, καθώς δεν ήταν δυνατό να εξηγηθεί με συσσώρευση μεταλλαγών η μεγάλη γενετική απόσταση των δύο μορίων που συνυπήρχαν στα ετεροπλασμικά άτομα.

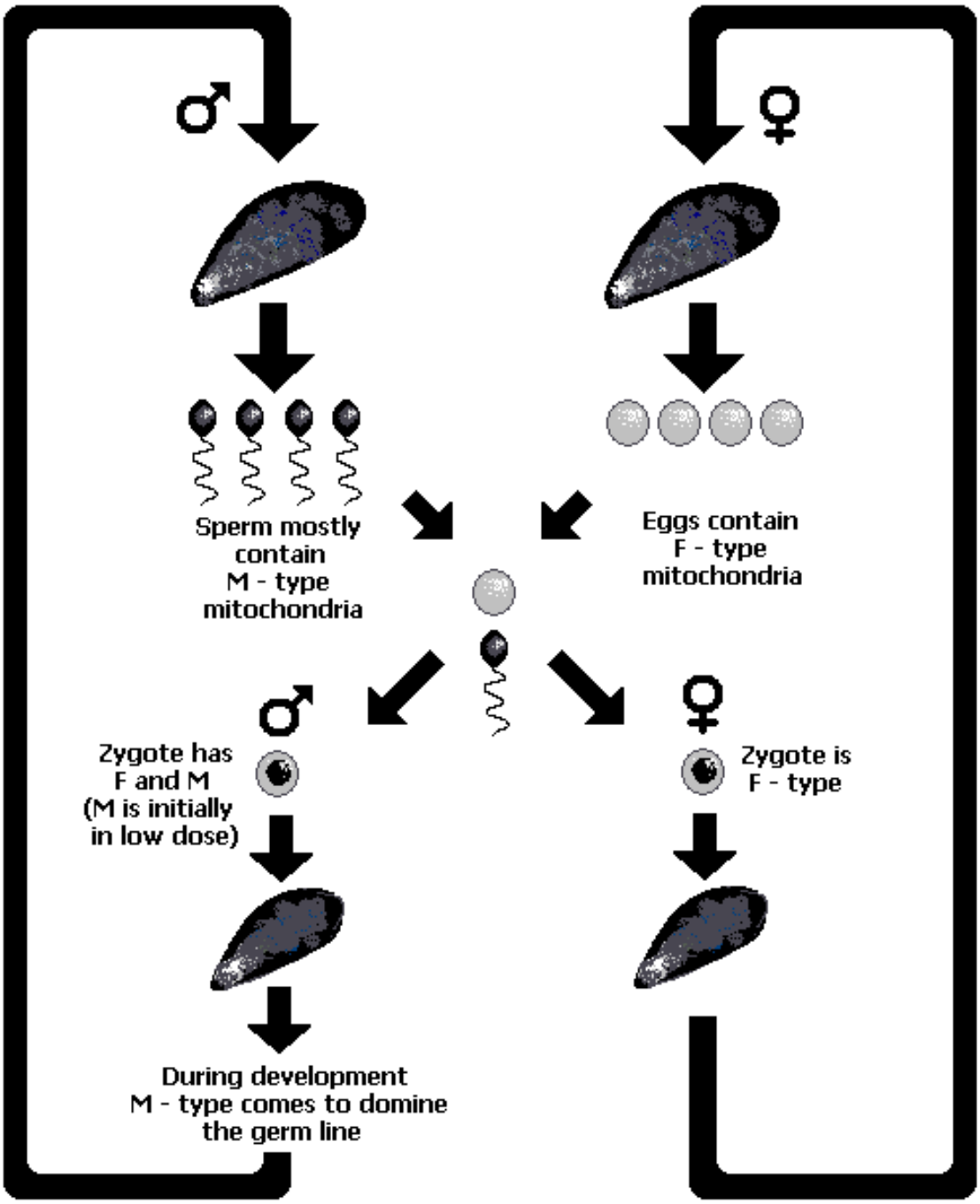
Περαιτέρω μελέτες και διασταυρώσεις που έγιναν στο εργαστήριο (Skibinski *et al*., 1994a,b; Zouros *et al*., 1994a,b) έφεραν στο φως ότι τα θηλυκά άτομα - τα οποία σε αντίθεση με τα αρσενικά εμφανίζονται ομοπλασμικά - μεταβιβάζουν το mtDNA τους (τύπου F) σε όλους τους απογόνους τους ανεξαρτήτως φύλου. 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 απόγονους. Μέσα στο ίδιο είδος λοιπόν συνυπάρχουν δύο εξελικτικές γραμμές mtDNA: εκείνη που μεταβιβάζεται μέσω των ωαρίων (γραμμή F) και εκείνη που μεταβιβάζεται μέσω των σπερματοζωαρίων (γραμμή M) (Εικόνα 2). Οι δύο γραμμές εμφανίζουν μικρή ενδογενή ετερογένεια, αλλά η μεταξύ τους γενετική απόσταση μπορεί να ξεπερνά το 20%.

Τα θηλυκά άτομα, τα οποία σε αντίθεση με τα αρσενικά εμφανίζονται ομοπλασμικά, 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.

Η παρουσία δύο ξεχωριστών εξελικτικών γραμμών που θεωρητικά δεν αναμειγνύονταν φαινόταν να μην παραβιάζει τον κανόνα της μονογονικής κληρονόμησης των κυτταροπλασματικών γονιδιωμάτων. Η μεταβίβαση του mtDNA του μυδιού εξακολουθούσε να είναι φυλο-εξαρτώμενη παρόλο που θύμιζε αμφιγονική κληρονόμηση. Για το λόγο αυτό ονομάστηκε Διπλή Μονογονική Κληρονόμηση (ΔΜΚ ή DUI: Doubly Uniparental Inheritance), σε αντίθεση με τη μονογονική κληρονόμηση που απαντάται στους υπόλοιπους οργανισμούς (Zouros *et al*., 1994a). Η παρουσία της DUI εντοπίστηκε και στα άλλα είδη του γένους *Mytilus*, δηλαδή στο *M. galloprivincialis* (Rawson and Hiblish, 1995; Quesada *et al*., 1996; Saavedra *et al*., 1997), στο *M. trossulus* (Geller *et al*., 1993; Zouros *et al*., 1994b; Rawson and Hilbish, 1995; Stewart *et al*., 1995) και στο *M. californianus* (Geller *et al*., 1993; Beagley, Taylor and Wolstenholme, 1997). Στη συνέχεια, ο ίδιος μηχανισμός

βρέθηκε όχι μόνο στα είδη του γένους *Mytilus* αλλά και σε άλλα μέλη της οικογένειας Mytilidae και συγκεκριμένα στο είδος *Geukensia demissa* (Hoeh *et al*., 1996). Το φαινόμενο επίσης εντοπίστηκε σε τρία είδη μυδιών του γλυκού νερού που ανήκουν στην οικογένεια Unionidae και απέχουν εξελικτικά από τα Mytilidae κατά 400 εκ.χρόνια (Allen, 1985; Waller, 1990). Πρόκειται για τα είδη *Pyganodon* (πρώην *Anodonda*) *grandis*, *Pyganodon* (πρώην *Anodonda*) *fragilis* και *Fusconaia flava* (Hoeh *et al*., 1996; Liu *et al*., 1996). Πρόσφατα διαπιστώθηκε η ύπαρξη της DUI και στο χτένι *Tapes philippinarum* υποδεικνύοντας την πιθανή εξάπλωση του φαινομένου σε όλα τα δίθυρα (Passamonti and Scali, 2001). Η ανακάλυψη της DUI στα είδη αυτά δεν έγινε άμεσα μέσω των διασταυρώσεων όπως στην περίπτωση των μυδιών. Στην περίπτωση αυτών των ειδών διαπιστώθηκε μέσα στον ίδιο πληθυσμό η ύπαρξη δύο εξελικτικών γραμμών mtDNA που απείχαν τόσο ώστε η διαφορά τους δεν μπορούσε να εξηγηθεί με απλή συσσώρευση μεταλλαγών μέσα σε μια γενιά.

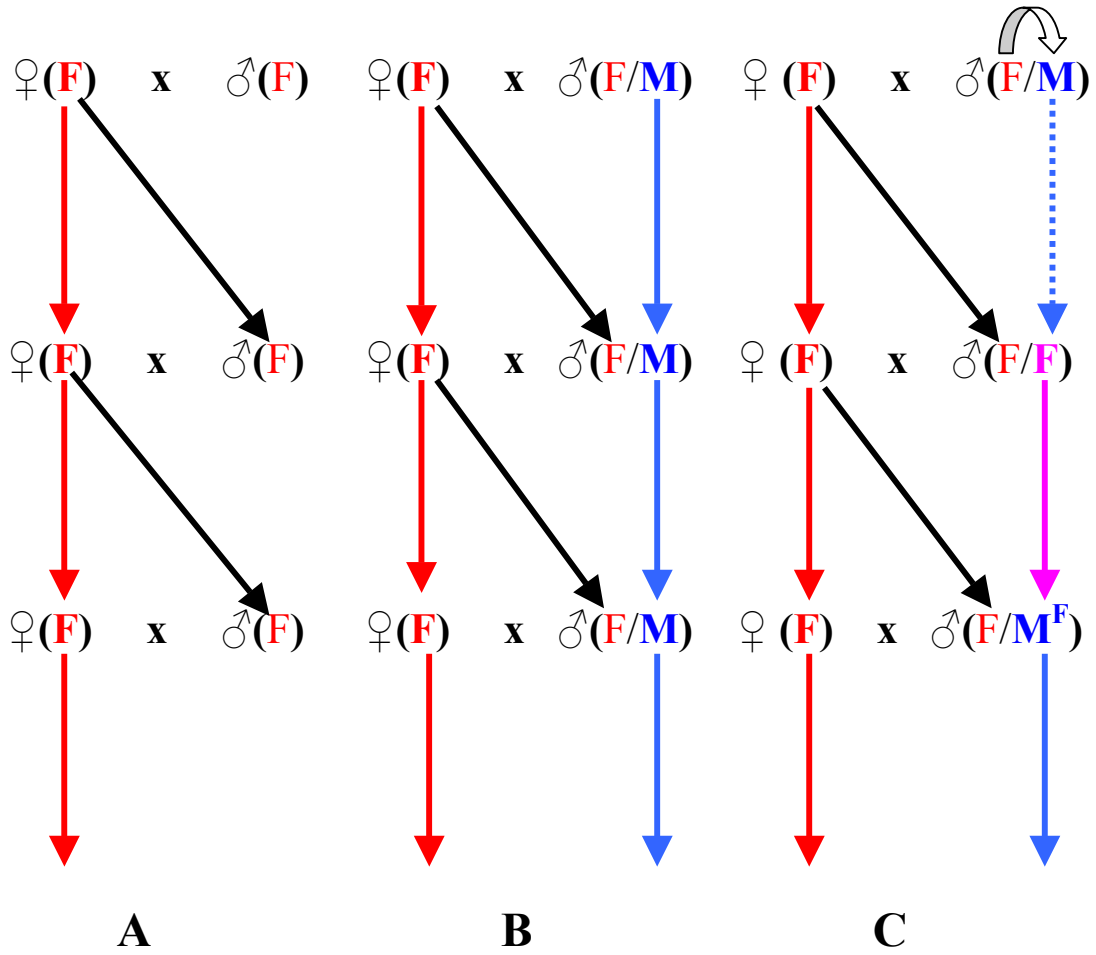
Ένα ερώτημα που τέθηκε μετά την ανακάλυψη της DUI αφορούσε την τύχη του mtDNA του σπέρματος κατά την γονιμοποίηση. Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στους άλλους οργανισμούς, τα μιτοχόνδρια του σπέρματος εισέρχονται στο ωάριο κατά την γονιμοποίηση και δεν παραμένουν εκτός ωαρίου. Το mtDNA του σπέρματος που εισέρχεται στο ωάριο κατά την γονιμοποίηση θα πρέπει στα έμβρυα που θα εξελιχθούν σε θηλυκά άτομα να αποβληθεί κάποια στιγμή στην αναπτυξιακή τους πορεία. Το χρονικό αυτό διάστημα έχει υπολογιστεί σε λιγότερο από 24 ώρες από την στιγμή της γονιμοποίησης (Sutherland *et al*., 1998). Αντίθετα στα ζυγωτά που θα εξελιχθούν σε αρσενικά άτομα το mtDNA του σπέρματος θα πρέπει να εγκατασταθεί και να επικρατήσει στην γονάδα Αυτό επιβεβαιώθηκε από την παρατήρηση ότι υπάρχουν θηλυκά άτομα τα οποία παράγουν στην συντριπτική πλειοψηφία θηλυκούς απογόνους (θηλεοτόκα), άλλα που δίνουν αρσενικούς απογόνους (αρρενοτόκα) και άλλα που δίνουν ενδιάμεση αναλογία φύλου ανεξάρτητη με το ποιος είναι ο πατέρας της διασταύρωσης (Saavedra *et al*., 1997). Σε έμβρυα που είχαν μάνες θηλεοτόκα θηλυκά βρέθηκε με PCR ότι το mtDNA του σπέρματος καταστρέφεται μέσα σε 24 ώρες από την γονιμοποίηση.



Εικόνα 2. Διπλή Μονογονική Κληρονόμηση (DUI, Zouros 1994a). Τα θηλυκά άτομα, τα οποία σε αντίθεση με τα αρσενικά εμφανίζονται ομοπλασμικά, 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 απόγονους.

Αρρενοποίηση

Σε πληθυσμιακή μελέτη που έγινε για τα F και τα M γονιδιώματα τα οποία μελετήθηκαν για συγκεκριμένες περιοχές, απομονώθηκαν από τις γονάδες αρσενικών ατόμων μόρια mtDNA τα οποία όταν τοποθετούνταν σε ένα φυλογενετικό δέντρο, ομαδοποιούνταν με τα F γονιδιώματα και όχι με τα M όπως συνέβαινε στα τυπικά αρσενικά (Hoeh *et al*., 1997). Ως τυπικά ορίζονται τα αρσενικά άτομα στις γονάδες των οποίων συνυπάρχουν M και F μόρια mtDNA ενώ στους σωματικούς τους ιστούς υπάρχουν μόνο μόρια F. Το ποσοστό των αρσενικών στην παραπάνω μελέτη των οποίων το mtDNA της γονάδας ομαδοποιούνταν με τα F γονιδιώματα κυμαινόταν στο 10%. Έμοιαζε δηλαδή σαν ένα μόριο F να έχει εισβάλει στην γραμμή μεταβίβασης του M γονιδιώματος. Έτσι ενώ από πλευράς αλληλουχίας το περιεχόμενο mtDNA του σπέρματος έμοιαζε με τα F γονιδιώματα, από πλευράς λειτουργίας έμοιαζε με τα M. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε «αρρενοποίηση» (masculinization) του F mtDNA (Εικόνα 3) και τα αρρενοποιημένα F μόρια ονομάστηκαν M^F (Ladoukakis and Zouros, 2001). Το φαινόμενο της αρρενοποίησης μορίων mtDNA αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ των δύο εξελικτικών γραμμών F και M που ακολουθούν παράλληλες πορείες και θεωρητικά δεν συναντώνται πουθενά. Κάθε φορά όμως που μια F εξελικτική γραμμή υποκαθιστά μια M εκτοπίζοντας την, μηδενίζεται ο χρόνος διαφοροποίησης των δύο μορίων M και F, τα οποία αρχίζουν να διαφοροποιούνται ξανά από το μηδέν. Επειδή ο εξελικτικός χρόνος μηδενίζεται κάθε φορά που συμβαίνει ένα φαινόμενο αρρενοποίησης δίδεται η εικόνα ότι η DUI έχει πολλαπλές, ανεξάρτητες εμφανίσεις στον εξελικτικό χρόνο όταν μελετούνται είδη τα οποία απέχουν μεγάλα χρονικά διαστήματα. Πρόσφατα ωστόσο δεδομένα που αφορούν το *M. trossulus* (Burzyński *et al.*, 2003; Zbawicka *et al.*, 2003) παρέχουν ενδείξεις ότι η αρρενοποίηση ενός μορίου F μπορεί να μην αφορά όλο το μόριο αλλά υπάρχει μία περιοχή τουλάχιστον η οποία πρέπει να περιέχεται στο mtDNA μόριο για την συμπεριφορά αυτού ως M. Η περιοχή αυτή φαίνεται να είναι ένα τμήμα της μεγάλης περιοχής αγνώστου λειτουργίας (LUR). Υπάρχουν δηλαδή σοβαρές ενδείξεις ότι το φαινόμενο της αρρενοποίησης είναι προϊόν ανασυνδυασμού.



Εικόνα 3. (A) Μονογονική μητρική κληρονόμηση, όλοι οι απόγονοι κληρονομούν το mtDNA μόνο από την μητέρα τους (B) DUI, τα θηλυκά άτομα κληρονομούν το mtDNA μόνο από την μητέρα, ενώ τα αρσενικά άτομα κληρονομούν δύο τύπους mtDNA, ένα από τη μητέρα τους και ένα από τον πατέρα τους, (C) Αρρενοποίηση (masculinization), κατάρρευση της DUI κατά την οποία ένα F μόριο mtDNA εισέρχεται στην γραμμή μεταβίβασης του M μορίου.

Θηλεοποίηση

Θεωρητικά, το φαινόμενο της αλλαγής των ρόλων των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων μπορεί να συμβαίνει και στα θηλυκά. Δηλαδή M γονιδιώματα να περνούν στη γραμμή μεταβίβασης του F και να κληρονομούνται μέσω των ωαρίων. Το φαινόμενο αυτό της "θηλεοποίησης" του M mtDNA (Ladoukakis *et al.*, 2002) αποτελεί προς το παρόν μία θεωρητική σύλληψη. Αν και έχουν διαπιστωθεί στη φύση θηλυκά άτομα ετεροπλασμικά για ένα F κι ένα M γονιδίωμα (Garrido-Ramos *et al.*, 1998), τα ετεροπλασμικά αυτά θηλυκά εμφανίζονται σε πολύ μικρή συχνότητα και δεν είναι γνωστό αν μεταβιβάζουν στους απογόνους τους το M mtDNA τους. Οι

Rawson and Hilbish (1995) παρατήρησαν ομοπλασμικά θηλυκά για ένα M γονιδίωμα. Οι παρατηρήσεις τους όμως αυτές δεν αποκλείουν την παρουσία του F στα ίδια αυτά θηλυκά επειδή οι εκκινητές που χρησιμοποίησαν πολλαπλασιάζουν επιλεκτικά το M γονιδίωμα.

Καθορισμός φύλου και mtDNA

Έχει διαπιστωθεί ότι στα είδη του γένους *Mytilus* το ποσοστό αρσενικών στο σύνολο των απογόνων μπορεί να είναι σημαντικά διαφορετικό από 50%. Το φαινόμενο αυτό έχει βρεθεί σε μία μεγάλη ποικιλία οργανισμών και έχει υπάρξει αντικείμενο πολλών εμπειρικών και θεωρητικών μελετών (π.χ., Maynard Smith, 1978; Bell, 1982; Karlin and Lessard, 1986). Η παρατήρηση στα μύδια έγινε αρχικά από τους Zouros *et al*. (1994a,b). Σε πιο πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι το ποσοστό των αρσενικών απογόνων μπορεί να ποικίλει από 0 έως 97% (Saavedra *et al*., 1997).

Όλες οι παρατηρήσεις που έχουν γίνει μέχρι σήμερα οδηγούν σε ένα γενικό μοντέλο για τον μηχανισμό της ΔΜΚ το οποίο όμως σε αρκετά του σημεία απομένει να αποδειχθεί (Zouros, 2000). Σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο στην διαδικασία της ΔΜΚ εμπλέκονται πέντε παράγοντες οι X, Z, W, Y και P (Εικόνα 4). Ο παράγοντας W κωδικοποιείται από το πυρηνικό DNA και εκφράζεται στην αρσενική γονάδα κατά την σπερματογένεση. Ο παράγοντας αυτός εφοδιάζει τα μιτοχόνδρια του σπέρματος με μια ουσία που επιτρέπει την αναγνώριση τους από το ωάριο. Ο παράγοντας αυτός δεν περιέχεται στα μιτοχόνδρια του ωαρίου. Ο παράγοντας X παράγεται κατά την ωογένεση, αλληλεπιδρά με τον παράγοντα W και καταστρέφει τα μιτοχόνδρια του σπέρματος. Το σύστημα W/X φαίνεται να είναι το επικρατές σύστημα στο ζωικό βασίλειο. και εξασφαλίζει την καταστροφή των μιτοχονδρίων του σπέρματος. Ο παράγοντας Z παράγεται κατά την ωογένεση μόνο στα ωάρια ειδών με ΔΜΚ του mtDNA τους. Κωδικοποιείται από ένα πυρηνικό γονίδιο και εμφανίζεται σε δύο αλληλόμορφα από τα οποία το Z παράγει τον παράγοντα ενώ το z δεν τον παράγει. Τα θηλυκά με γονότυπο ZZ παράγουν μεγάλες ποσότητες από τον παράγοντα Z, θηλυκά με γονότυπο zz δεν παράγουν καθόλου τον παράγοντα Z, ενώ θηλυκά με γονότυπο Zz παράγουν ενδιάμεσες ποσότητες. Ο παράγοντας Z απενεργοποιεί τον παράγοντα X (η εναλλακτικά αλληλεπιδρά με τον παράγοντα W) αποτρέποντας τον από το να καταστρέψει τα μιτοχόνδρια του σπέρματος.

Ο παράγοντας Y είναι υπεύθυνος για την αρρενοποίηση της γονάδας, βρίσκεται στα μιτοχόνδρια του σπέρματος και η παρουσία της στα πρώτα σπερματικά κύτταρα

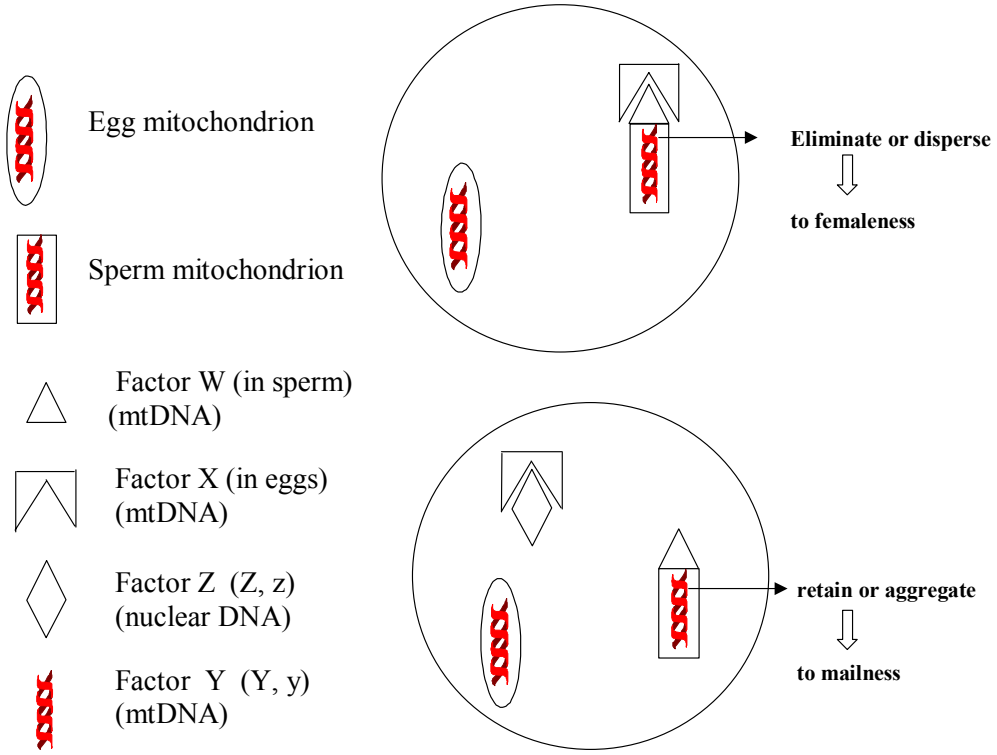
προκαλεί την αρρενοποίηση της γονάδας και την εξέλιξη του ατόμου ως αρσενικό. Εάν δεν εκφραστεί ο παράγοντας Y τότε το άτομο εξελίσσεται ως θηλυκό.

Ο παράγοντας P είναι αυτός που δίνει το πολλαπλασιαστικό πλεονέκτημα στο M γονιδίωμα έναντι του F. Κωδικοποιείται από το M mtDNA και βοηθάει στην εγκαθίδρυση του M στην αρσενική γονάδα σε βάρος του F μορίου το οποίο βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες στο ωάριο αμέσως μετά την γονιμοποίηση. Οι παράγοντες P και Y ίσως ταυτίζονται.

Σύμφωνα με το μοντέλο όλα τα ωάρια είναι προγραμματισμένα να εξελιχθούν σε θηλυκά άτομα, όμως η παρουσία του παράγοντα Y τα μετατρέπει σε αρσενικά. Τα ωάρια που έχουν μεγάλη συγκέντρωση του παράγοντα Z (γονότυπος ZZ) δεν καταστρέφουν τον παράγοντα Y και έτσι τα περισσότερα έμβρυα εξελίσσονται σε αρσενικά. Τα ωάρια που έχουν πολύ μικρή ή καθόλου ποσότητα από τον παράγοντα Z (γονότυπος zz) καταστρέφουν τα μιτοχόνδρια του σπέρματος και έτσι το έμβρυο εξελίσσεται σε θηλυκό άτομο. Τα ωάρια που έχουν ενδιάμεση ποσότητα του παράγοντα Z (γονότυπος Zz) παράγουν απογόνους με ενδιάμεση αναλογία φύλου.

Πρόσφατη δημοσίευση (Kenchington *et al*., 2002) παρουσιάζει αναλυτικότερα το παραπάνω μοντέλο. Οι αναλογίες φύλου από διάφορες διασταυρώσεις στο *Mytilus edulis* φαίνεται να επιβεβαιώνουν την υπόθεση σύμφωνα με την οποία τα θηλυκά άτομα με γονότυπο Zz δίνουν αρσενικούς απογόνους σε ποσοστό *k* και θηλυκούς απόγόνους σε ποσοστό *1-k*. Η τιμή του *k* υπολογίζεται περίπου 0.3. Με βάση την τιμή αυτή του *k* το μοντέλο υπολογίζει γονοτυπικές συχνότητες (ZZ, Zz, zz) που είναι πολύ κοντά σε αυτές που ισχύουν στους φυσικούς πληθυσμούς.

Το φαινόμενο της αρρενοποίησης μορίων F μπορεί να εξηγηθεί με την ύπαρξη ασθενών και ισχυρών μορφών M μορίων (Saavedra *et al*., 1997). Τα ισχυρά M μόρια μπορούν να μεταβιβάζονται στην επόμενη γενιά, ενώ τα ασθενή όχι. Τα ισχυρά και τα ασθενή μόρια M φαίνεται να αντιπροσωπεύουν διαφορετικές μορφές του παράγοντα P ο οποίος βρίσκεται στο mtDNA. Μια ασθενής μορφή M έχει αδυναμία να εξαλείψει από την γονάδα το F με αποτέλεσμα ένα μόριο F να εισέρχεται στη γονάδα και να αρρενοποιείται. Για να μπορέσει όμως να αρρενοποιηθεί ένα F μόριο θα πρέπει να περιέχει τον παράγοντα P ο οποίος θα του προσδίδει πολλαπλασιαστικό πλεονέκτημα έναντι των υπολοίπων μορίων F. Αυτό εξηγεί γιατί στον εξελικτικό χρόνο η αντικατάσταση ‘‘παλαιών’’ M από ‘‘νέα’’ M είναι σπάνια.



Εικόνα 4. Σχηματική παρουσίαση του προτεινόμενου μοντέλου για την εξήγηση της ΔΜΚ.

Το F mtDNA του μυδιού έχει αλληλουχηθεί πλήρως (Hoffman *et al*., 1992). Πάνω στο μόριο έχει βρεθεί μία περιοχή (LUR) η οποία στα αρσενικά μόρια είναι μικρότερη από αυτή των θηλυκών μορίων. Δεν έχει διαπιστωθεί καμία λειτουργία για την περιοχή αυτή και θεωρείται ως η περιοχή από την οποία αρχίζει να αντιγράφεται το mtDNA. Η περιοχή αυτή θεωρείται επίσης ως η πιθανότερη για την παρουσία του παράγοντα P. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η περιοχή αυτή μπορεί να καθορίζει τη συμπεριφορά των μορίων mtDNA του μυδιού, αν δηλαδή μεταβιβάζονται μέσω των ωαρίων ή αν μεταβιβάζονται μέσω των σπερματοζωαρίων (Ladoukakis et al. 2002), πρόσφατη μελέτη (Burzyński *et al.*, 2003) ενισχύει ακόμη περισσότερο την άποψη αυτή.

1.2. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA

Ανασυνδυασμός (recombination) ονομάζεται η ανταλλαγή γενετικού υλικού ανάμεσα σε δύο μόρια DNA με αποτέλεσμα την ανακατάταξη του γενετικού τους περιεχομένου. Διακρίνονται δύο μεγάλες κατηγορίες ανασυνδυασμού του DNA: ο ομόλογος (homologous) και ο μη-ομόλογος (site-specific) ανασυνδυασμός.

Ομόλογος ανασυνδυασμός

Πρόκειται για τον ανασυνδυασμό που συμβαίνει μεταξύ δύο μορίων DNA με μεγάλη ομολογία αλληλουχίας. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς τέτοιου είδους ανασυνδυασμός είναι αυτός που συμβαίνει κατά τη μείωση, γι'αυτό και ονομάζεται μειωτικός ανασυνδυασμός. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός μπορεί να χωριστεί 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.

Μη-ομόλογος ανασυνδυασμός

Πρόκειται για τον ανασυνδυασμό σε περιοχές DNA που εμφανίζουν μικρή ή καθόλου ομολογία. Δύο μη-ομόλογες αλληλουχίες είναι δυνατό να ανασυνδιαστούν όταν έχουν μικρές περιοχές που εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα. Αυτός ο τύπος ανασυνδυασμού εμπλέκεται στην εισαγωγή των φαγικών DNA στα βακτηριακά γονιδιώματα. Ένας άλλος τύπος μη-ομόλογου ανασυνδυασμού είναι η μετατόπιση DNA (transpositional recombination) κατά τον οποίο ένα μεταθετό στοιχείο μετακινείται μέσα στα χρωμοσώματα. Ο ανασυνδυασμός αυτός συμβαίνει χωρίς απαραίτητα να υπάρχει ομολογία ανάμεσα στα δύο μόρια DNA (Griffiths *et al*., 1996).

1.3. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ

Έχει αποδειχτεί ότι στα οργανιδιακά γονιδιώματα των φυτών, των πρωτίστων, και των μυκήτων συμβαίνει ανασυνδυασμός (Gray, 1989; Marshall, Newton and Ritland, 2001). Όσον αφορά το μιτοχονδιακό DNA των ζώων η άποψη που κυριαρχούσε μέχρι πρόσφατα ήταν ότι δεν ανασυνδυάζεται (Avise, 1994). Ορισμένες μελέτες, στηριζόμενες σε έμμεσες μεθόδους, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υφίσταται ανασυνδυασμός mtDNA στον άνθρωπο (Awadalla *et al*., 1999; Eyre-Walker *et al*., 1999). Οι μελέτες όμως αυτές αντιμετωπίστηκαν με έντονη κριτική τόσο ως προς τις μεθόδους που χρησιμοποίησαν, όσο και ως προς τα συμπεράσματα τους (Arctander, 1999; Merriweather and Kaestle, 1999; Jorde and Bamshad, 2000; Kivisild and Villems, 2000; Kumar *et al*., 2000; Parsons and Irwin, 2000).

Παράλληλα, μελέτες που αναφέρονταν σε ολόκληρο το mtDNA από μεγαλύτερο δείγμα, κατέληγαν στο συμπέρασμα ότι δεν υφίσταται ανασυνδυασμός στο mtDNA του ανθρώπου (Ingman *et al*., 2000; Elson *et al*., 2001). Η ανίχνευση πιθανού ανασυνδυασμού του mtDNA διευκολύνεται σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν ετεροπλασμικά άτομα και το mtDNA κληρονομείται τόσο μητρικά όσο και πατρικά (Eyre-Walker, 2000).

Σε πρόσφατη μελέτη (Ladoukakis and Zouros, 2001a), παρουσιάστηκαν άμεσες αποδείξεις για την ύπαρξη ομόλογου ανασυνδυασμού σε ζωικό mtDNA και συγκεκριμένα στο μύδι της Μεσογείου *Mytilus galloprovincialis*. Τα μύδια του είδους αυτού, όπως έχει ήδη αναφερθεί φέρουν συχνά περισσότερους από έναν τύπους μορίων mtDNA (κατά κανόνα τα αρσενικά άτομα) στους ιστούς τους. Αυτό δίνει τη δυνατότητα σε μόρια mtDNA, τα οποία διαφέρουν ως προς την αλληλουχία τους, να βρεθούν στον ίδιο οργανισμό. Σε περίπτωση που τέτοια μόρια αλληλεπιδράσουν και ανασυνδυαστούν, το προϊόν του ανασυνδυασμού μπορεί να ανιχνευτεί άμεσα. Σε άλλη μελέτη (Burzyński *et al*., 2003) παρουσιάζονται αποδείξεις ανασυνδυασμού σε άλλο είδος μυδιού, το *Mytilus trossulus* από την Βαλτική, και για διαφορετική περιοχή του mtDNA, την μεγάλη περιοχή άγνωστης λειτουργίας (LUR). Στην μελέτη αυτή παρουσιάζονται ενδείξεις ότι ανασυνδυασμένα μόρια μεταξύ M και F mtDNA έχουν εισβάλει στην πατρική γραμμή του *M. trossulus*, τα πατρικά αυτά πλέον μόρια φαίνεται να έχουν κοινό ένα συγκεκριμένο τμήμα της LUR, συγκεκριμένα το 1^{ο} τμήμα, κάτι που ενισχύει την υπόθεση για την σχέση μεταξύ ανασυνδυασμού, αρενοποίησης, θηλεοποίησης και DUI.

Σε πρόσφατες εργασίες παρουσιάζονται σοβαρές ενδείξεις ανασυνδυασμού σε τέσσερα ακόμα γένη ζωικών οργανισμών που απέχουν με μεγάλο βαθμό μεταξύ τους φυλογενετικά: ένα αρθρόποδο του γένους *Gammarus,* ένα αμφίβιο του γένους *Rana,* ένα θηλαστικό του γένους *Apodemus* (Ladoukakis and Zouros 2001b) και στο ψάρι *Platychthys flesus* (Hoarau *et al*., 2002).

1.4. Ο ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ

Το είδος *Mytilus galloprovincialis* είναι το γνωστό εδώδιμο μύδι της Μεσογείου. Ανήκει στο γένος *Mytilus* (Linnaeus 1758) της οικογένειας Mytilidae, η οποία περιλαμβάνει επίσης τα είδη *M. edulis, M. trossulus, M. californianus, M. desolasionis* και πιθανόν το *M. corsicus*. Ο παραπάνω διαχωρισμός δεν είναι απόλυτος αφού α) δεν υπάρχει τουλάχιστον ένας μορφολογικός ή ηλεκτροφορητικός

χαρακτήρας που να κατατάσσει ξεκάθαρα κάθε άτομο σε ένα είδος β) τα διάφορα είδη υβριδίζονται μεταξύ τους, κάτι που δείχνει ότι δεν υπάρχει μεγάλη γενετική ασυμβατότητα

Το είδος *Mytilus galloprovincialis* αναφέρεται και ως μύδι της Μεσογείου γιατί ως κοιτίδα εξάπλωσης του θεωρείται η Μεσόγειος, απ'όπου εξαπλώθηκε στη Μαύρη Θάλασσα, στις ευρωπαϊκές ακτές του Ατλαντικού, στην Ιαπωνία, στην Κίνα, στην Ωκεανία και στην Νότιο Αφρική.

Είναι ευρύαλος και ευρύθερμος οργανισμός. Προτιμά σχετικά αβαθείς θάλασσες, όπου υπάρχουν ισχυρά θαλάσσια ρεύματα ή εναιωρήματα οργανικών ουσιών. Είναι ένα από τα πιο γνωστά δίθυρα. Καλλιεργείται συστηματικά και έχει μεγάλη οικονομική σημασία.

Είναι διηθηματοφάγος οργανισμός και μπορεί να διηθήσει μεγάλες ποσότητες νερού, για το λόγο αυτό θεωρείται κατάλληλος βιολογικός δείκτης για την ύπαρξη βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον.

Το είδος *Mytilus galloprovincialis* είναι γονοχωριστικό, έχουν αναφερθεί όμως και ερμαφρόδιτα άτομα. Ωστόσο, ο τρόπος καθορισμού του φύλου στο μύδι δεν έχει διευκρινιστεί. Η γονιμοποίηση είναι εξωτερική. Η πλαγκτονική προνύμφη που δημιουργείται αρχικά, εδραιώνεται αργότερα σε σταθερό υπόστρωμα με τη βοήθεια «νημάτων» (βύσσος), όπου και παραμένει για το υπόλοιπο της ζωής της. Οι κυριότεροι ιστοί του μυδιού είναι η γονάδα (σε περίοδο της αναπαραγωγής φτάνει και το 90% της μάζας του οργανισμού), τα βράγχια, ο μανδύας, ο πεπτικός ιστός, οι μύες και το πόδι (Gosling, 1992).

1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η άποψη ότι το mtDNA των ζώων δεν ανασυνδυάζεται. Σε αυτή την αρχή είχε στηριχθεί μεγάλος αριθμός μελετών που αφορούσε την φυλογένεση καθώς και στην συσχέτιση του mtDNA με διάφορες ασθένειες. Πρόσφατες μελέτες ανακάλυψαν την ύπαρξη ομόλογου ανασυνδυασμού στα μύδια και σε άλλους οργανισμούς. Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση των τύπων μιτοχονδριακού DNA που μεταφέρονται μέσω του σπέρματος του μυδιού και συγκεκριμένα τυχόν μεταφορά F ή ανασυνδυασμένων μορίων mtDNA μέσω του σπέρματος και η πιθανή σχέση της μεταφοράς αυτής με τα φαινόμενα αρρενοποίησης και θηλεοποίησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Δύο διαφορετικά δείγματα, 19 αρσενικών ατόμων το κάθε ένα, χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη. Για να ξεχωρίζονται, τα άτομα αυτά κωδικοποιήθηκαν ως Η1-19 και Α1-19 αντίστοιχα.

Αρσενικά άτομα Η1-19

Τα άτομα αυτά προήλθαν από το λιμάνι του Ηρακλείου ή από την αγορά του Ηρακλείου τα οποία είχαν προέλευση την Βόρειο Ελλάδα. Όλα τα άτομα ανήκαν στο είδος *Mytilus galloprovincialis*. Ποσότητες ατόμων συλλέχθηκαν μεταξύ 15/11/2000 και 15/12/2000. Τα άτομα, αφού καθαρίζονταν εξωτερικά, τοποθετούνταν σε σταθερή θερμοκρασία 12°C σε ατομικά δοχεία με νερό αλατότητας 30‰ και με καθημερινή αλλαγή νερού και παροχή τροφής (καλλιέργεια *Chlorella minutissima*) η οποία μεταφερόταν από τις εγκαταστάσεις του Ι.ΘΑ.ΒΙ.Κ.

Στην συνέχεια ακολουθούσε η διαδικασία πρόκλησης απελευθέρωσης γαμετών: Δύο μέρες περίπου μετά την αρχική συλλογή των ατόμων, τα μύδια υφίστατο θερμικό σοκ (απότομη προσθήκη σε νερό θερμοκρασίας 28°C) για 15-30΄ και στην συνέχεια τα μύδια τοποθετούνταν ατομικά σε φιλτραρισμένο νερό αλατότητας 30‰ και θερμοκρασίας 21-23°C, απουσία φωτός. Κάθε 15΄ το νερό στα ατομικά δοχεία ανανεώνονταν με καθαρό νερό. Η διαδικασία αυτή συνεχιζόταν για 5 περίπου ώρες, και επαναλαμβανόταν κάθε μέρα έως ότου τα μύδια εξαπολύσουν γαμέτες ή απομακρυνθούν από την διαδικασία. Το ποσοστό επιτυχίας για την πρόσληψη γαμετών ήταν περίπου 5%. Για να μεγιστοποιηθεί η καθαρότητα του σπέρματος από σωματικές προσμήξεις, μετά την αρχική εξαπόλυση των αρσενικών γαμετών ακολουθούσε απόρριψη της αρχικής ποσότητας σπέρματος, και μεταφορά του ατόμου σε νέο δοχείο με καθαρό νερό. Οι γαμέτες που εξαπολύονταν μετά από αυτό συλλέγονταν μαζί με το νερό. Ακολουθούσε φιλτράρισμα σε πλαγκτονικό δίκτυ ανοίγματος 20μ για την απομάκρυνση τυχόν κυτταρικών συσσωμάτων τα οποία εκρίνονταν μαζί με το σπέρμα. Στην συνέχεια το σπέρμα μεταφερόταν σε Falcon για διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Στο τέλος της διαδικασίας, το υποκείμενο υψηλής συγκέντρωσης σε σπέρμα κλάσμα της φυγοκέντρησης φυλασσόταν σε σωλήνες

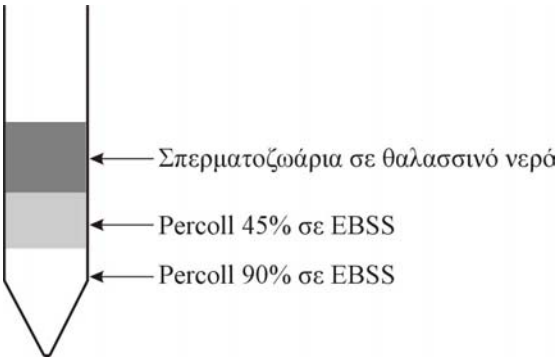
eppendorf στους -80°C. Οι συνθήκες και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν βασίστηκαν σε βιβλιογραφικές αναφορές (Satuito *et al*., 1994; Bayne, 1962) και προσωπικές παρατηρήσεις από προηγούμενες διαδικασίες. Τα άτομα από τα οποία έγινε επιτυχώς πρόσληψη γαμετών, κωδικοποιούταν και στην συνέχεια λαμβάνονταν τεμάχια από τους εξής ιστούς: Βράγχια, Μανδύας, Πόδι και Προσαγωγός μυς. Τα τεμάχια των ιστών τοποθετούνταν σε σωληνάκια eppendorf των 1,5 ml και τα αποθηκεύονταν στους –80°C.

Αρσενικά άτομα Α1-19

Από συνεργαζόμενη ερευνητική ομάδα (Γ. Ροδάκη) του τμήματος Βιολογίας του Π.Α. στάλθηκαν δείγματα DNA από 19 αρσενικά άτομα, στα οποία η διαδικασία πρόσληψης γαμετών ήταν παρόμοια με αυτή με αυτή των ατόμων Η1-19. Η διαφορά αυτού του δείγματος με το προηγούμενο ήταν ότι, ο καθαρισμός του σπέρματος από τυχόν σωματικές προσμείξεις πραγματοποιήθηκε με κλασμάτωση με περκόλη με την εξής διαδικασία:

Διαδικασία κλασμάτωσης με περκόλη

Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται ποσότητα σπέρματος και κάτω από αυτό δύο συγκεντρώσεις περκόλης [(45% περκόλη σε EBSS (θρεπτικό) και 90% περκόλη σε EBSS (θρεπτικό)] (Εικόνα 5). Στη συνέχεια πραγματοποιείτε φυγοκέντριση σε 500 g για 20 min και συλλέγεται ποσότητα σπέρματος από: τη ζώνη επαφής ανάμεσα στο δείγμα που τοποθετήσαμε και την περκόλη 45% (ζώνη Α) και από τη ζώνη επαφής της περκόλη 45% με την περκόλη 90% (ζώνη Β). Μόνο τα ενεργά σπερματοζωάρια καταφέρνουν να περάσουν από το δείγμα στην ζώνη Β αφήνοντας τις σωματικές προσμίξεις στο δείγμα (Βενέτης, 2003 προσ. επικ.).



Εικόνα 5. Κλασμάτωση με περκόλη

2.2. ΕΞΑΓΩΓΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Αν και το υλικό εργασίας ήταν το σπέρμα, ωστόσο πραγματοποιήθηκαν εξαγωγές DNA και από σωματικούς ιστούς που χρησιμοποιήθηκαν για σύγκριση των βασικών αποτελεσμάτων. Η εξαγωγή ολικού DNA από σωματικούς ιστούς έγινε με τη μέθοδο της πρωτεϊνάσης Κ όπως περιγράφεται από τους Miller *et al*. (1988) και τροποποιήθηκε από τους Zouros *et al*. (1992). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μικρή ποσότητα σωματικού ιστού τοποθετούνταν σε πορσελάνινο γουδί με υγρό άζωτο. Στην συνέχεια ο ιστός θρυματιζόταν και ο λειοτριβημένος ιστός αδειαζόταν σε σωλήνες eppendorf 1,5 ml που ο καθένας περιείχε 442μl extraction buffer (400μl lysis buffer, 10μl proteinase K 20mg/l, 32μl SDS 10%). Το lysis buffer αποτελείτο από 10mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 400mM NaCl. Οι σωλήνες επωάζονταν στους 55°C σε υδατόλουτρο για 4 ώρες. Ακολουθούσε η προσθήκη 280μl κορεσμένου διαλύματος NaCl (6M), ανακίνηση σε Vortex για 15min και φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές/min για 30 min για να απομακρυνθούν τα περισσεύματα των ιστών. Το υπερκείμενο μεταφερόταν με πιπέτες σε νέα σειρά σωλήνων eppendorf όπου και προσθέτονταν 500 μl χλωλοφορμίου για τον καθαρισμό από ουσίες διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες (π.χ. λίπη). Ακολουθούσε ελαφριά ανακίνηση των σωλήνων και νέα φυγοκέντριση στις 13000 στροφές/min για 5 min ώστε να διαχωριστεί η υδατική από την οργανική φάση. Στην συνέχεια το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέα σειρά σωλήνων eppendorf, προσθέτονταν 600 μl παγωμένης ισοπροπανόλης και αφού ανακινούνταν οι σωλήνες με το χέρι, αφήνονταν για 30 min για την κατακρήμνιση του DNA. Ακολουθούσε φυγοκέντριση στις 13000 στροφές/min για 15 min. Στην συνέχεια απομακρυνόταν η υπερκείμενη υγρή φάση και στον κάθε σωλήνα έμενε το ίζημα (πελέτα του DNA), το οποίο και ξεπλένονταν με 200μl αιθανόλης 70%. Αφού απομακρυνόταν η αιθανόλη, οι σωλήνες μεταφερόταν ανοιχτοί σε θάλαμο θερμοκρασίας 37 ^{o}C για να στεγνώσει το ίζημα. Το DNA επαναδιαλυόταν σε 100μl νερό (nanopure) για 16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια φυλασσόταν στους –20 ^{o}C. Από αυτό το DNA μικρή ποσότητα 2-3μl ηλεκτροφορούνταν σε πηκτή αγαρόζης 1% για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της εξαγωγής. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εξαγωγή DNA από σπέρμα ήταν αντίστοιχη με μόνες διαφορές: α) την απευθείας εισαγωγή του υλικού στο extraction buffer, χωρίς να υποστεί λειοτρίβηση σε υγρό άζωτο β) την μικρότερη διάρκεια επώασης, που ήταν 2-2,5 ώρες.

Το DNA που εξαγόταν με αυτή τη μέθοδο ήταν ολικό στο οποίο περιέχονταν τόσο πυρηνικό όσο και μιτοχονδριακό DNA.

2.3. ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ mtDNA ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΘΗΚΑΝ

Το mtDNA του μυδιού παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 1. Οι περιοχές που εξετάστηκαν ήταν α) ένα τμήμα της κυτοχρωμικής οξειδάσης ΙΙΙ (COIII) και β) δέκα τμήματα, μίας ευρύτερης περιοχής του mtDNA (περιλαμβάνει τμήμα της 16sRNA και του Cytb και ολόκληρη την LUR), τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις είχαν κοινά κομμάτια (Εικόνα 11). Έγινε προσπάθεια πολλαπλασιασμού των τμημάτων αυτών με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Με την χρήση της PCR τεχνολογίας, το DNA μιας συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί δισεκατομμύρια φορές, αρκεί να είναι γνωστή η σειρά των νουκλεοτιδίων στα άκρα της περιοχής για τον σχεδιασμό δύο ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) συμπληρωματικών με τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Ένας πλήρης κύκλος μίας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια: 1. Την αποδιάταξη του DNA (denaturation), 2. Την πρόσδεση των εκκινητών στο DNA (annealing), 3. Την επιμήκυνση των εκκινητών (extension).

Στην παρούσα μελέτη έγινε χρήση γενικών και φυλο-ειδικών (εξειδικευμένων για το Μ ή το F μόριο) εκκινητών (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Όνομα εκκινητή	Περιοχή προσκόλησης	Ειδικότητα
482	COIII	Γενικός
1301	COIII	Γενικός
Pr18	16sRNA	M-spesific
Pr17	τέλος 16sRNA	M-spesific
UAR2F	τέλος 16sRNA	Γενικός
cytBED	αρχή Cytb	Γενικός
ssMdl1	αρχή LUR Π1	M-spesific
ssMdl2	LUR Π1	M-spesific
ssFdl1	αρχή LUR Π1	F-spesific
ssFdl2	LUR Π1	F-spesific
cytbM	αρχή Cytb	M-spesific
cytbF	αρχή Cytb	F-spesific

Ορισμένοι από τους εκκινητές σχεδιάστηκαν για τις ανάγκες της μελέτης ενώ ορισμένοι άλλοι ελήφθησαν από βιβλιογραφικές αναφορές (σε παρένθεση οι κωδικοί των εκκινητών):

α) Περιοχή COIII (κυτοχρωμική οξειδάση, υπομονάδα III)

Ένα τμήμα της COIII, 860 bp, πολλαπλασιαζόταν με τη μέθοδο της PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν FOR 5΄-TAT GTA CCA GGT CCA AGT CCG TG-3΄ (482) και REV 5΄-ATG CTC TTC TTG AAT ATA AGC GTA CC-3΄ (1301) (Steward et al., 1996), που αντιστοιχούν στις θέσεις 460-482 και 1326-1301 του τεμαχίου 5 από την αλληλουχία του mtDNA του M. edulis. Αυτοί οι εκκινητές πολυμέριζαν τόσο το M όσο και το F mtDNA, γι'αυτό και ονομάζονται γενικοί εκκινητές. Η αντίδραση PCR γινόταν στα 10-20 μl και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR ήταν: $MgCl_2$ 3 mM, dNTP's 0.2 mM, εκκινητές 0.5 pmol/μl για τον καθένα, *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech) 0.03 u/μl. Η ποσότητα του DNA μήτρα ήταν 200-1000 ng ολικού DNA.

Οι συνθήκες της PCR ήταν: αρχικά 2min στους 94°C για αποδιάταξη του DNA, μετά ακολουθούσαν 32 κύκλοι. Ο κάθε κύκλος ξεκινούσε με 1 min στους 94°C για αποδιάταξη, 30 sec στους 52°C για πρόσδεση των εκκινητών στο DNA μήτρα, 1 min στους 72°C για να γίνει ο πολυμερισμός. Στο τέλος των 32 κύκλων αφήναμε για 4 min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση.

β) Περιοχή 16sRNA

Ένα τμήμα της 16sRNA, 418 bp, πολλαπλασιαζόταν με τη μέθοδο της PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εξειδικευμένοι για το M μόριο AR:5'-CTG CCC (AT) (AG) T GCA ACT AAA TTA AC-3' (Pr 18) και BR:5'-GCT TCT ACA CCT CTA GGA CAC-3' (Pr 17)

Η αντίδραση PCR γινόταν στα 10-20 μl και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR ήταν: $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTP's 0.2 mM, εκκινητές 0.5 pmol/μl για τον καθένα, *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech) 0.03 u/μl. Η ποσότητα του DNA μήτρα ήταν 200-1000 ng ολικού DNA.

Οι συνθήκες της PCR ήταν: αρχικά 3 min στους 94°C για αποδιάταξη του DNA, μετά ακολουθούσαν 30 κύκλοι. Ο κάθε κύκλος ξεκινούσε με 20 sec στους 94°C για αποδιάταξη, 20 sec στους 58°C για πρόσδεση των εκκινητών στο DNA μήτρα, 45 sec στους 72°C για να γίνει ο πολυμερισμός. Στο τέλος των 30 κύκλων αφήναμε για 5 min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση.

γ) Μεγάλη περιοχή άγνωστης λειτουργίας (LUR:Large Unassigned Region)

γ1) Το μήκος της LUR ποικίλει από 900 bp για το M μόριο έως 1200 bp για το F μόριο. Η περιοχή που πολλαπλασιάστηκε με τη μέθοδο της PCR συμπεριλάμβανε και μικρά τμήματα της 16sRNA και του Cytb. Έτσι η περιοχή που πολλαπλασιάστηκε είχε μήκος 1300 bp για το M μόριο και 1500 bp για το F μόριο. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν γενικοί AR:5'-CGA AAG GAC TTT TTC GCT AAA G-3' (UAR2F) και BR:5'-ATA AAT GCA AAT AAA GAA CAT AGA-3' (cytBED)

Η αντίδραση PCR γινόταν στα 10-20 μl και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR ήταν: MgCl2 3 mM, dNTP's 0.2 mM, εκκινητές 0.5 pmol/μl για τον καθένα, *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech) 0.03 u/μl. Η ποσότητα του DNA μήτρα ήταν 200-1000 ng ολικού DNA.

Οι συνθήκες της PCR ήταν: αρχικά 3 min στους 94°C για αποδιάταξη του DNA, μετά ακολουθούσαν 30 κύκλοι. Ο κάθε κύκλος ξεκινούσε με 1 min στους 94°C για αποδιάταξη, 45 sec στους 48°C για πρόσδεση των εκκινητών στο DNA μήτρα, 1 min στους 72°C για να γίνει ο πολυμερισμός. Στο τέλος των 30 κύκλων αφήναμε για 5 min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση.

γ2) Ένα τμήμα της LUR, 152 bp, πολλαπλασιαζόταν με τη μέθοδο της PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν M: AR:5'-TAA (AG) TG AGG TTG GCT ATA (AC) GT GT-3' (ssMdl1) και BR:5'-GTA TAC ACA CG (CT) TAC ACA CC-3'(ssMdl2)

Η αντίδραση PCR γινόταν στα 10-20 μl και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR ήταν: $MgCl_2$ 3 mM, dNTP's 0.2 mM, εκκινητές 0.5 pmol/μl για τον καθένα, *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech) 0.03 u/μl. Η ποσότητα του DNA μήτρα ήταν 200-1000 ng ολικού DNA.

Οι συνθήκες της PCR ήταν: αρχικά 3 min στους 94°C για αποδιάταξη του DNA, μετά ακολουθούσαν 30 κύκλοι. Ο κάθε κύκλος ξεκινούσε με 15 sec στους 94°C για αποδιάταξη, 20 sec στους 54°C για πρόσδεση των εκκινητών στο DNA μήτρα, 30 sec στους 72°C για να γίνει ο πολυμερισμός. Στο τέλος των 30 κύκλων αφήναμε για 5 min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση.

γ3) Ένα άλλο τμήμα της UAR, 227 bp, πολλαπλασιαζόταν με τη μέθοδο της PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν F: AR:5'-GGT GAT AGG TTG TTA AG (CT) GTG G-3' (ssFdl1) και BR:5'-CAC CGT C (AG) C CTT CTC C (AT) C CC-3'(ssFdl2)

Η αντίδραση PCR γινόταν στα 10-20 μl και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR ήταν: $MgCl_2$ 3 mM, dNTP's 0.2 mM, εκκινητές 0.5 pmol/μl για τον καθένα, *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech) 0.03 u/μl. Η ποσότητα του DNA μήτρα ήταν 200-1000 ng ολικού DNA.

Οι συνθήκες της PCR ήταν: αρχικά 3 min στους 94°C για αποδιάταξη του DNA, μετά ακολουθούσαν 30 κύκλοι. Ο κάθε κύκλος ξεκινούσε με 15 sec στους 94°C για αποδιάταξη, 20 sec στους 57°C για πρόσδεση των εκκινητών στο DNA μήτρα, 30 sec στους 72°C για να γίνει ο πολυμερισμός. Στο τέλος των 30 κύκλων αφήναμε για 5 min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση.

δ) Περιοχή που περιλαμβάνει μέρος της 16s και μέρος της LUR

δ1) Μία περιοχή που περιλαμβάνει μέρος της 16s και μέρος της LUR, 808 bp, πολλαπλασιαζόταν με τη μέθοδο της PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν M: AR:5'-CTG CCC (AT) (AG) T GCA ACT AAA TTA AC-3' (Pr 18) και BR:5'-GTA TAC ACA CG (CT) TAC ACA CC-3' (ssMdl2)

Η αντίδραση PCR γινόταν στα 10-20 μl και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR ήταν: $MgCl_2$ 3 mM, dNTP's 0.2 mM, εκκινητές 0.5 pmol/μl για τον καθένα, *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech) 0.03 u/μl. Η ποσότητα του DNA μήτρα ήταν 200-1000 ng ολικού DNA.

Οι συνθήκες της PCR ήταν: αρχικά 5 min στους 94°C για αποδιάταξη του DNA, μετά ακολουθούσαν 30 κύκλοι. Ο κάθε κύκλος ξεκινούσε με 1 min στους 94°C για αποδιάταξη, 1 min στους 54°C για πρόσδεση των εκκινητών στο DNA μήτρα, 1 min στους 72°C για να γίνει ο πολυμερισμός. Στο τέλος των 30 κύκλων αφήναμε για 5 min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση.

δ2) Για τον πολλαπλασιασμό πιθανού ανασυνδυασμένου μορίου μεταξύ 16s και LUR, με τη μέθοδο της PCR. Χρησιμοποιήθηκαν δύο εκκινητές: ένας M: AR:5'-CTG CCC (AT) (AG) T GCA ACT AAA TTA AC-3' (Pr 18) που πιάνει στο 16s και ένας F BR:5'-CAC CGT C (AG) C CTT CTC C (AT) C CC-3' (ssFdl2) που πιάνει στο LUR.

Η αντίδραση PCR γινόταν στα 10-20 μl και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR ήταν: $MgCl_2$ 3 mM, dNTP's 0.2 mM, εκκινητές 0.5 pmol/μl για τον καθένα, *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech) 0.03 u/μl. Η ποσότητα του DNA μήτρα ήταν 200-1000 ng ολικού DNA.

Οι συνθήκες της PCR ήταν: αρχικά 5 min στους 94°C για αποδιάταξη του DNA, μετά ακολουθούσαν 30 κύκλοι. Ο κάθε κύκλος ξεκινούσε με 1 min στους 94°C

για αποδιάταξη, 1 min στους 57°C για πρόσδεση των εκκινητών στο DNA μήτρα, 1 min στους 72°C για να γίνει ο πολυμερισμός. Στο τέλος των 30 κύκλων αφήναμε για 5 min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση.

ε) Περιοχή που περιλαμβάνει μέρος της LUR και μέρος του cytb

ε1) Μία περιοχή που περιλαμβάνει μέρος της LUR και μέρος του cytb, περίπου 1300 bp, πολλαπλασιαζόταν με τη μέθοδο της PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν M: AR:5'-TAA (AG) TG AGG TTG GCT ATA (AC) GT GT-3' (ssMdl1) και BR:5'-GGC AGT ATA GTG GAT TGA CAG-3' (rcytbM)

Η αντίδραση PCR γινόταν στα 10-20 μl και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR ήταν: $MgCl_2$ 3 mM, dNTP's 0.2 mM, εκκινητές 0.5 pmol/μl για τον καθένα, *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech) 0.03 u/μl. Η ποσότητα του DNA μήτρα ήταν 200-1000 ng ολικού DNA.

Οι συνθήκες της PCR ήταν: αρχικά 5 min στους 94°C για αποδιάταξη του DNA, μετά ακολουθούσαν 30 κύκλοι. Ο κάθε κύκλος ξεκινούσε με 1 min στους 94°C για αποδιάταξη, 1 min στους 54°C για πρόσδεση των εκκινητών στο DNA μήτρα, 1 min στους 72°C για να γίνει ο πολυμερισμός. Στο τέλος των 30 κύκλων αφήναμε για 5 min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση.

ε2) Μία άλλη που περιλαμβάνει μέρος της LUR και μέρος του cytb, περίπου 1450 bp, πολλαπλασιαζόταν με τη μέθοδο της PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν F: AR:5'-GGT GAT AGG TTG TTA AG (CT) GTG G-3' (ssFdl1) και BR:5'-TCT TCA TGA GCA GTG TAG TGG GC-3' (rcytbF)

Η αντίδραση PCR γινόταν στα 10-20 μl και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR ήταν: $MgCl_2$ 3 mM, dNTP's 0.2 mM, εκκινητές 0.5 pmol/μl για τον καθένα, *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech) 0.03 u/μl. Η ποσότητα του DNA μήτρα ήταν 200-1000 ng ολικού DNA.

Οι συνθήκες της PCR ήταν: αρχικά 5 min στους 94°C για αποδιάταξη του DNA, μετά ακολουθούσαν 30 κύκλοι. Ο κάθε κύκλος ξεκινούσε με 1 min στους 94°C για αποδιάταξη, 1 min στους 57°C για πρόσδεση των εκκινητών στο DNA μήτρα, 1 min στους 72°C για να γίνει ο πολυμερισμός. Στο τέλος των 30 κύκλων αφήναμε για 5 min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση.

ε3) Για τον πολλαπλασιασμό πιθανού ανασυνδυασμένου μορίου μεταξύ LUR και cytb, με τη μέθοδο της PCR. Χρησιμοποιήθηκαν δύο εκκινητές: ένας M: AR:5'-TAA (AG) TG AGG TTG GCT ATA (AC) GT GT-3' (ssMdl1) που πιάνει στο LUR

και ένας F: BR:5'-TCT TCA TGA GCA GTG TAG TGG GC-3' (rcytbF) που πιάνει στο rcytb.

Η αντίδραση PCR γινόταν στα 10-20 μl και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR ήταν: $MgCl_2$ 3 mM, dNTP's 0.2 mM, εκκινητές 0.5 pmol/μl για τον καθένα, *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech) 0.03 u/μl. Η ποσότητα του DNA μήτρα ήταν 200-1000 ng ολικού DNA.

Οι συνθήκες της PCR ήταν: αρχικά 5 min στους 94°C για αποδιάταξη του DNA, μετά ακολουθούσαν 30 κύκλοι. Ο κάθε κύκλος ξεκινούσε με 1 min στους 94°C για αποδιάταξη, 1 min στους 55°C για πρόσδεση των εκκινητών στο DNA μήτρα, 1 min στους 72°C για να γίνει ο πολυμερισμός. Στο τέλος των 30 κύκλων αφήναμε για 5 min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση.

ε4) Για τον πολλαπλασιασμό πιθανού ανασυνδυασμένου μορίου μεταξύ LUR και cytb, με τη μέθοδο της PCR. Χρησιμοποιήθηκαν δύο εκκινητές: ένας F: AR:5'-GGT GAT AGG TTG TTA AG (CT) GTG G-3' (ssFdl1) που πιάνει στο LUR και ένας M: BR:5'-GGC AGT ATA GTG GAT TGA CAG-3' (rcytbM) που πιάνει στο cytb.

Η αντίδραση PCR γινόταν στα 10-20 μl και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR ήταν: $MgCl_2$ 3 mM, dNTP's 0.2 mM, εκκινητές 0.5 pmol/μl για τον καθένα, *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech) 0.03 u/μl. Η ποσότητα του DNA μήτρα ήταν 200-1000 ng ολικού DNA.

Οι συνθήκες της PCR ήταν: αρχικά 5 min στους 94°C για αποδιάταξη του DNA, μετά ακολουθούσαν 30 κύκλοι. Ο κάθε κύκλος ξεκινούσε με 1 min στους 94°C για αποδιάταξη, 1 min στους 56°C για πρόσδεση των εκκινητών στο DNA μήτρα, 1 min στους 72°C για να γίνει ο πολυμερισμός. Στο τέλος των 30 κύκλων αφήναμε για 5 min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση.

Μετά από κάθε PCR ακολουθούσε έλεγχος του προϊόντος της, ώστε να διαπιστωθεί η απόδοση της. Αυτό γινόταν με ηλεκτροφόρηση 3-10μl του προϊόντος της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο και εμφάνιση - φωτογράφηση του ηλεκτροφορήματος κάτω από έκθεση του σε UV ακτινοβολία.

2.4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Στην περίπτωση της περιοχής COIII η ανίχνευση τυχόν πολυμορφισμών έγινε μέσω RFLPs και κλωνοποίησης ενώ σε όλες τις άλλες περιπτώσεις

πραγματοποιήθηκε απλά ηλεκτροφόρηση 3-10μl του προϊόντος της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο και εμφάνιση - φωτογράφηση του ηλεκτροφορήματος κάτω από έκθεση του σε UV ακτινοβολία.

2.4.1. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

Η μέθοδος μελέτης που δίνει την μεγαλύτερη δυνατή πληροφορία είναι η ανάγνωση της αλληλουχίας του προϊόντος της PCR, που όμως είναι ακριβή και χρονοβόρος διαδικασία. Μια εναλλακτική μέθοδος η οποία προηγήθηκε της ανάγνωσης αλληλουχίας του DNA, είναι η μέθοδος RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Η τεχνική των RFLPs (Botstein et al. 1980) περιλαμβάνει την πέψη του DNA με ένα ή περισσότερα περιοριστικά ένζυμα, διαχωρισμό των τμημάτων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμίδης και ανάγνωση του περιοριστικού προτύπου.

Οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των περιοριστικών προτύπων διαφορετικών αλληλουχιών μπορεί να οφείλλονται σε αντικαταστάσεις βάσεων, σε ενθέσεις ή σε ελλείματα τμημάτων DNA ή σε ανακατατάξεις αλληλουχιών DNA. Η κάθε περίπτωση δίνει τις δικές της χαρακτηριστικές αλλαγές στο περιοριστικό πρότυπο, αποκαλύπτωντας πολυμορφισμούς.

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένζυμα που απομονώνονται από βακτήρια και έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές-περιοριστικές θέσεις (συνήθως 4-6 βάσεων) πάνω στο δίκλωνο μόριο του DNA και να το κόβουν. Από τις κοπές παράγονται κομμάτια ή θραύσματα DNA διαφορετικού μήκους τα οποία μπορούν να διαχωριστούν σε μια πηκτή ηλεκτροφόρησης με βάση την αρχή ότι τα μικρότερα κομμάτια κινούνται πιο γρήγορα μέσα στην πηκτή από ότι τα μεγαλύτερα. Αν μάλιστα ‘‘τρέξουμε’’ μαζί με τα δείγματα και ένα δείκτη (marker) με θραύσματα DNA γνωστού μεγέθους, μπορούμε να προσδιορίσουμε με ακρίβεια τα άγνωστα μεγέθη των θραυσμάτων των δειγμάτων μας. Επειδή τα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA το κάθε ένα, διαφορετικά μόρια DNA που θα έχουν και διαφορετικές αλληλουχίες θα κόβονται σε διαφορετικά σημεία. Η εικόνα που εμφανίζει το DNA μετά την πέψη του με περιοριστικά ένζυμα και τον διαχωρισμό σε πηκτή ηλεκτροφόρησης ονομάζεται ‘‘πρότυπο περιοριστικών θραυσμάτων’’. Κάνοντας διαδοχικές πέψεις του ίδιου μορίου, είτε χωριστά το καθένα είτε σε συνδυασμό, και παίρνοντας αλληλοεπικαλυπτόμενα θραύσματα μπορούμε να

προσδιορίσουμε την τοπολογία των περιοριστικών θέσεων πάνω στο μόριο του DNA. Η σχηματική αναπαράσταση αυτής της τοπολογίας ονομάζεται ‘‘περιοριστικός χάρτης’’ του μορίου.

Ο δείκτης (marker) που χρησιμοποιήθηκε κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR ήταν ο lambda DNA/EcoRI/HindIII, ο οποίος προκύπτει μετά από υδρόλυση του DNA του φάγου λ με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και HindIII. Αυτό αποδίδει δεκατρείς ζώνες (bands) με μέγεθος από 125 bp έως 21.227 bp. Η συγκέντρωση του δείκτη ήταν 250 ng/ml και κάθε φορά φορτώνονταν 3 μl.

Το ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε για την COIII ήταν το HaeIII (Λαδουκάκης, 1998) το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία GGCC/CCGG. Επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις (προϊόντα κλώνων) χρησιμοποιήθηκε και το RsaI το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία GTCA/ACTG.

Κάθε αντίδραση γινόταν συνήθως σε τελικό όγκο 25μl. Από αυτά, τα 12.3 ήταν H_2O, τα 2.5 ήταν buffer (10x), τα 0.2 ένζυμο (10 units/λ) και τα 10 ήταν DNA από το προϊόν της PCR. Τα επωάζαμε για 3-5 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια τα δείγματα τρέχονταν σε πηκτή αγαρόζης 1.5 ή 2% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφίζαμε την πηκτή.

2.4.2. Κλωνοποίηση και έλεγχος θετικών κλώνων

Προετοιμασία του προϊόντος της PCR για κλωνοποίηση

Πριν κλωνοποιηθεί το προϊόν της PCR γινόταν καθαρισμός του από τα περισσεύματα των dNTPs και των εκκινητών καθώς και καθαρισμός από τα άλατα ($MgCl_2$) για να είναι απρόσκοπτη η δράση της λιγάσης. Ο καθαρισμός γινόταν με ιζηματοποιήση του DNA με αιθανόλη (Maniatis et al. 1982). Στο προϊόν της PCR προσθέτονταν 12μl 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 ^{o}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 O/N (overnight) για να εξατμισθεί η αιθανόλη, επαναδιαλυόταν σε 10-20μl H2O και φυλασσόταν στους -20°C. Ακολουθούσε ποσοτικοποίηση του καθαρού προϊόντος της PCR με οπτικό προσδιορισμό αφού είχε τρέξει σε πήκτωμα αγαρόζης μαζί με ένα μάρτυρα DNA γνωστής συγκέντρωσης.

Κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR

Η κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR γινόταν σε φορέα κλωνοποίησης ειδικό για την κλωνοποίηση προϊόντων PCR. Ο φορέας αυτός ήταν ο pGEM T vector της Promega. Ο φορέας είχε γίνει γραμμικός και στα 3' άκρα του είχε προστεθεί ένα επιπλέον T νουκλεοτίδιο (θυμίνη). Είναι γνωστό ότι η *Taq* πολυμεράση αφήνει στο 5' άκρο του DNA που παράγει ένα προεξέχον A νουκλεοτίδιο (Αδενίνη). Η αδενίνη ενώνεται με τη συμπληρωματική της θυμίνη που υπάρχει στα 3' άκρα του φορέα και η κλωνοποίηση γίνεται ευκολότερα. Επιπλέον, με το να υπάρχει ένα προεξέχον νουκλεοτίδιο στα 3' άκρα του φορέα, αυτός παραμένει γραμμικός ακόμα και με την παρουσία της λιγάσης και η απόδοση της κλωνοποίησης είναι μεγαλύτερη. Το μίγμα της αντίδρασης της λιγάσης γινόταν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή σε τελικό όγκο 10μl και περιείχε:

5μl ligation buffer (2X)

1 μl pGEM - T vector (50ng)

1 μl T4 ligase (που συνόδευε το φορέα)

3 μl καθαρού προϊόντος PCR

Το ligation buffer περιείχε ATP. Το ligation mix επωαζόταν στους 4°C O/N και αποθηκευόταν στους -20°C.

Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των προϊόντων PCR ήταν το στέλεχος DH5α του βακτηρίου *Escherichia coli*. Τα κύτταρα αυτά γίνονταν δεκτικά μετασχηματισμού (competent) και αποθηκεύονταν στους -80°C. Ένας σωλήνας eppendorf 1,5ml για κάθε προϊόν PCR που επρόκειτο να κλωνοποιηθεί και περιείχε περίπου 250 μl κυττάρων αφηνόταν να ξεπαγώσει μέσα σε πάγο. Στα κύτταρα αυτά προσθέτονταν 4-5 μl από προϊόν της ligation και ανακινούνταν ελαφρά με το χέρι χωρίς να μείνουν τα κύτταρα για πολύ χρόνο εκτός πάγου. Μετά την ανακίνηση παρέμεναν ακίνητα στον πάγο για 20 min και στη συνέχεια δέχονταν θερμικό σοκ στους 42°C για 45sec. Μετά το θερμικό σοκ τοποθετούνταν αμέσως στον πάγο για 2 min και ακολουθούσε προσθήκη 800 μl θρεπτικού μέσου (LB) σε κάθε σωλήνα. Οι σωλήνες με τα μετασχηματισμένα κύτταρα επωάζονταν υπό ανακίνηση στους 37°C για 45 min με 1 h. Φυγονεντρούνταν στις 3000 στροφές για 5 min και απλώνονταν σε τριβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό (LB + άγαρ) μαζί με αμπικιλίνη ως επιλεκτικό παράγοντα. Ο φορέας κλωνοποίησης (pGEM T vectror) εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη εμπεριέχει και το γονίδιο

μεταβολισμού της λακτόζης το οποίο διακόπτεται από το ένθεμα. Γι' αυτό στα ίδια τριβλία είχε επιστρωθεί X-gal (Sigma) 40μl (20%). Αυτό δίνει τη δυνατότητα να ελεγχθούν οι αποικίες που περιέχουν το ένθεμα από αυτές που περιέχουν μόνο το φορέα. Τα βακτήρια αφήνονταν να αναπτυχθούν O/N και ακολουθούσε η συλλογή των λευκών αποικιών.

Η συλλογή των αποικιών γινόταν με αποστειρωμένα tips. Η κάθε λευκή αποικία μεταφερόταν σε αριθμημένη θέση ενός τριβλίου που περιείχε LB, άγαρ και αμπικιλίνη. Το νέο τριβλίο με τις αριθμημένες αποικίες επωαζόταν O/N στους 37°C.

Έλεγχος θετικών κλώνων

Ελάχιστη ποσότητα από την κάθε αριθμημένη αποικία μεταφερόταν σε αποστειρωμένο eppendorf 0,5 ml που περιείχε 20-100 μl STE buffer (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8). Αφού ανακινούνταν ισχυρά με πιπέτα Gilson για να διασπαστεί η μάζα των κυττάρων, οι σωλήνες τοποθετούνταν στους 94°C για 15-30 min. Στη συνέχεια αφήνονταν να κρυώσουν. 1μl από αυτό το μίγμα αποτελούσε το DNA μήτρα για την PCR που θα ακολουθούσε. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά καθώς και οι συνθήκες της PCR ήταν ίδιες με αυτές που είχαν χρησιμοποιηθεί για να πολλαπλασιαστεί το ένθεμα με PCR από το ολικό DNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10 μl. 3 μl από το προϊόν ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% για να διαπιστωθεί ποιοι από τους κλώνους περιείχαν το σωστό ένθεμα. Το προϊόν ελέγχονταν για την ύπαρξη τυχόν πολυμορφισμών με την μέθοδο των περιοριστικών ενζύμων *RsaI* και *HaeIII* όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Για να μελετηθούν οι τύποι mtDNA οι οποίοι μεταφέρονται με το σπέρμα μελετήθηκαν 38 διαφορετικά αρσενικά άτομα στα μισά από τα οποία το δείγμα του σπέρματος είχε υποστεί κλασμάτωση με περκόλη (άτομα A1-19) ενώ στα άλλα απλό φιλτράρισμα από πλαγκτονικό δίχτυ (άτομα H1-19). Σε δέκα από τα τελευταία άτομα μελετήθηκαν και σωματικοί ιστοί (βράγχια). Συνολικά πραγματοποιήθηκε PCR για έντεκα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Από τα οποία δύο ήταν με γενικούς εκκινητές (για τις περιοχές COIII και LUR), και εννέα με φυλο-ειδικούς εκκινητές (για εννέα τμήματα μεταξύ 16sRNA και του Cytb). Η σχετική θέση των περιοχών που μελετήθηκαν φαίνονται στην εικόνα 1 (βλ. Εισαγωγή). Η ταυτοποίηση του προϊόντος της PCR της COIII ως M ή F έγινε με την μέθοδο RFLP, ενώ στην περίπτωση της LUR (με χρήση γενικών εκκινητών) η διάκριση γινόταν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, καθώς το M και το F μόριο έχουν διαφορετικό μέγεθος για την περιοχή αυτή. Στην περίπτωση των φυλο-ειδικών εκκινητών το προϊόν χαρακτηριζόταν ως F ή M με βάση τον τύπο των φυλο-ειδικών εκκινητών που είχαν χρησιμοποιηθεί, εφόσον η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επιβεβαίωνε το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR.

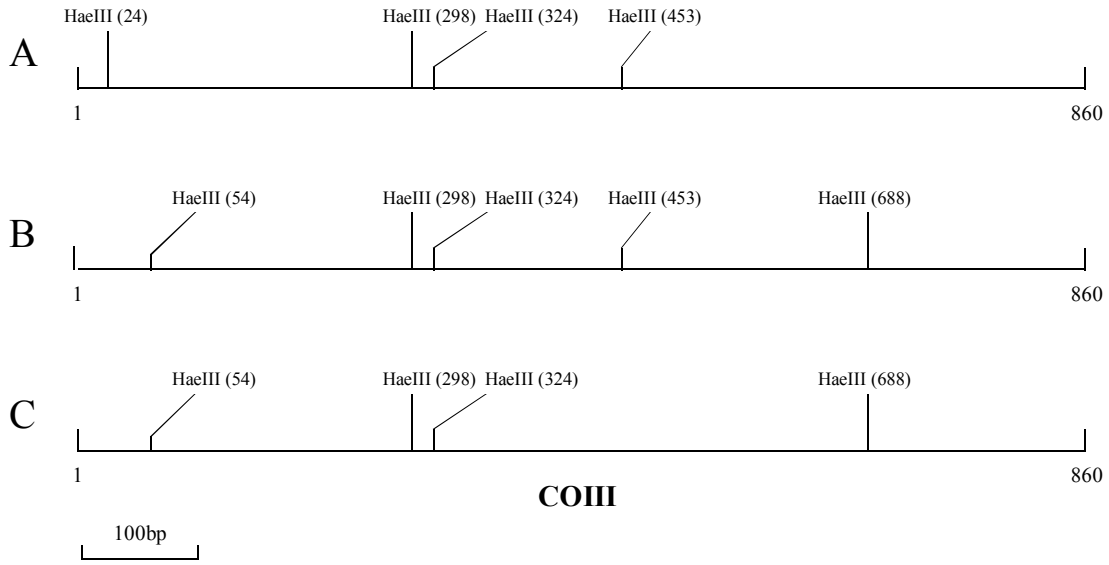
3.1. ΠΕΡΙΟΧΗ COIII

Αρχικά επιλέχτηκε να μελετηθεί ένα τμήμα 860 bp του γονιδίου COIII, για το οποίο ήταν γνωστά τα πρότυπα κοπής και η περιοριστικοί χάρτες από προηγούμενες μελέτες (Λαδουκάκης, 1998; Ladoukakis *et al*., 2002, Τσαγκαράκης, 2002). Εξετάστηκαν 38 δείγματα από σπέρμα και 10 από σωματικούς ιστούς. Το τμήμα της COIII πολλαπλασιαζόταν με τη μέθοδο της PCR με την χρήση γενικών εκκινητών (πολλαπλασίαζαν τόσο το M όσο και το F μόριο), και το προϊόν υποβαλλόταν σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HaeIII.

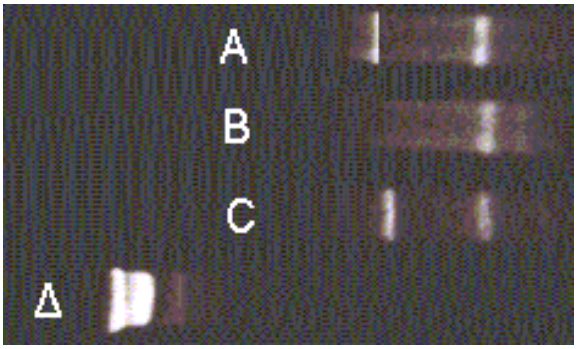
3.1.1. Περιοριστικά πρότυπα

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, της πέψης με HaeIII των προϊόντων της PCR για την περιοχή της COIII, έδωσε τρία διαφορετικά πρότυπα κοπής (Πίνακας 2) τα οποία ονομάσαμε A, B και C. Από παράλληλες μελέτες (Λαδουκάκης, 1998; Ladoukakis *et al*., 2002, Τσαγκαράκης, 2002) έχουν εντοπιστεί τα πρότυπα κοπής και οι περιοριστικοί χάρτες της COIII, για πληθυσμούς μυδιών από την

Μεσόγειο, τον Ατλαντικό και την Μαύρη Θάλασσα. Από τις μελέτες αυτές προκύπτει ότι ο τύπος Α είναι χαρακτηριστικός των F μορίων, ενώ οι τύποι Β και C είναι χαρακτηριστικοί των M μορίων. Οι περιοριστικοί χάρτες των τύπων Α, Β και C δίνονται από την εικόνα 6. Τα περιοριστικά πρότυπα των τύπων αυτών μετά από ηλεκτροφόρηση παρουσιάζονται στην εικόνα 7.



Εικόνα 6. Περιοριστικοί χάρτες του γονιδίου COIII για το ένζυμο περιορισμού HaeIII. Ο τύπος Α αντιστοιχεί στο F μόριο, ενώ οι τύποι Β και C αντιστοιχούν στο M μόριο.



Εικόνα 7. Περιοριστικά πρότυπα του M μορίου τμήματος COIII του mtDNA μετά από πέψη με το ένζυμο HaeIII. Το Α είναι τύπος F μορίου. Β και C είναι οι δύο τύποι M μορίου και Δ είναι ο δείκτης (Marker). Το DNA έχει διαχωρισθεί σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Τα θραύσματα έχουν βαφεί με βρωμιούχο αιθίδιο.

Πίνακας 2. Απλότυποι για το COIII που εντοπίστηκαν στην παρούσα μελέτη. Σε παρένθεση ο χαρακτηρισμός του μορίου ως M ή F.

Άτομο	Πρότυπα κοπής και χαρακτηρισμός μορίων	
	βράγχια	σπέρμα
H1	A (F)	C (M)
H2	A (F)	C (M)
H3	*N.T.* (-)	B (M)
H4	A (F)	C (M)
H5	A (F)	B (M)
H6	*N.T.* (-)	B (M)
H7	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
H8	A (F)	B (M)
H9	*N.T.* (-)	B (M)
H10	*N.T.* (-)	B (M)
H11	A (F)	B (M)
H12	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
H13	A (F)	C (M)
H14	A (F)	*N.P.* (-)
H15	A (F)	B (M)
H16	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
H17	*N.T.* (-)	B (M)
H18	*N.T.* (-)	B (M)
H19	A (F)	B (M)
A1	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
A2	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
A3	*N.T.* (-)	B (M)
A4	*N.T.* (-)	B (M)
A5	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
A6	*N.T.* (-)	C (M)
A7	*N.T.* (-)	B (M)
A8	*N.T.* (-)	B (M)
A9	*N.T.* (-)	B (M)
A10	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
A11	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
A12	*N.T.* (-)	B (M)
A13	*N.T.* (-)	B (M)
A14	*N.T.* (-)	B (M)
A15	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
A16	*N.T.* (-)	C (M)
A17	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
A18	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
A19	*N.T.* (-)	C (M)

**N.T.: not tested, **N.P.: no product*

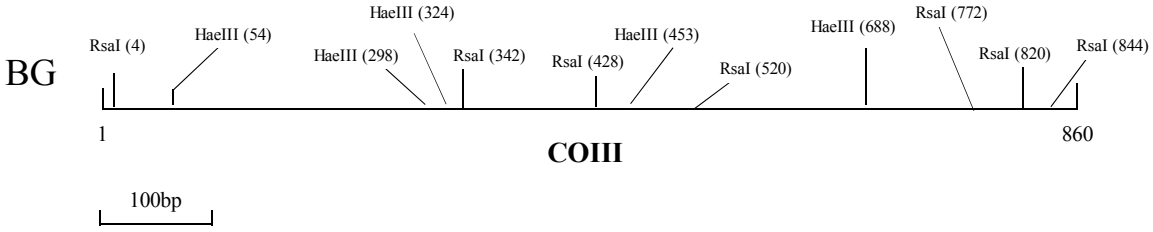
Οι σωματικοί ιστοί και από τα δέκα άτομα που μελετήθηκαν φέρουν τον απλότυπο Α ο οποίος είναι χαρακτηριστικός του F μορίου (Λαδουκάκης, 1998; Ladoukakis *et al*., 2002, Τσαγκαράκης, 2002). Όσον αφορά τους απλότυπους οι οποίοι εμφανίζονται στο σπέρμα, από τα 26 άτομα από τα οποία πήραμε προϊόν τα 19 εμφανίζουν τον απλότυπο Β (ποσοστό 73,1%), και τα υπόλοιπα 7 τον απλότυπο C (ποσοστό 26,9%). Και οι δύο αυτοί απλότυποι είναι χαρακτηριστικοί του M μορίου (Λαδουκάκης, 1998; Ladoukakis *et al*., 2002, Τσαγκαράκης, 2002). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το σπέρμα και οι σωματικοί ιστοί φαίνεται να περιέχουν ένα μόνο τύπο mtDNA, ο οποίος στο σπέρμα είναι M τύπου και στους σωματικούς ιστούς F τύπου. Οι γενικοί εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την COIII δεν ανίχνευσαν προσμίξεις M μορίων mtDNA στους σωματικούς ιστούς ή F μορίων mtDNA στο σπέρμα.

Η μελέτη για τους σωματικούς ιστούς ήταν απλή καθώς η PCR έδινε προϊόν. Αντίθετα στο σπέρμα το προϊόν ήταν πάντα σε μικρή ποσότητα με επακόλουθο την δυσκολία στην ταυτοποίηση των απλοτύπων. Σ'αυτό οφείλεται το υψηλό ποσοστό ατόμων για τα οποία δεν ανιχνεύτηκε ο απλότυπος. Το ποσοστό αυτό είναι υψηλότερο στα άτομα τα οποία είχαν υποστεί κλασμάτωση με περκόλη (A1-19), λόγω του ότι για τα άτομα αυτά δεν υπήρχε διαθέσιμη ποσότητα σπέρματος για εξαγωγή DNA. Αρνητικές *N.P.* (*Non Product*) χαρακτηριζόταν οι προσπάθειες για μετά από δύο τουλάχιστον μη θετικές προσπάθειες πολλαπλασιασμού.

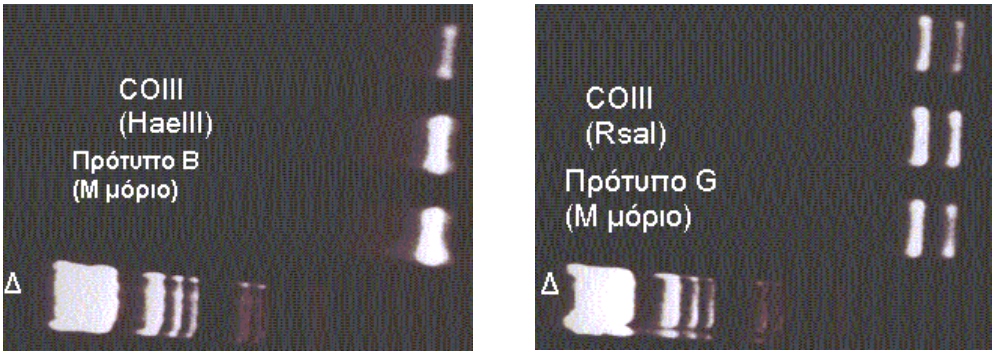
3.1.2. Κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR της περιοχής COIII για το άτομο H19.

Πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα του προϊόντος της PCR από σπέρμα του ατόμου H19. Το άτομο επιλέχθηκε τυχαία με σκοπό να εντοπιστούν μόρια τα οποία να εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα κοπής μεταξύ τους. Στην περίπτωση των κλώνων πραγματοποιήθηκαν δύο πέψεις με δύο διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα (με HaeIII και RsaI) ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα για την ανίχνευση ενός διαφορετικού - από το κυρίαρχο στο σπέρμα – μορίου. Έξι θετικοί κλώνοι βρέθηκαν οι οποίοι μετά από πέψη του προϊόντος (με HaeIII και RsaI) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης έδωσαν όλοι κοινό πρότυπο κοπής. Στην περίπτωση του HaeIII το πρότυπο ήταν το ίδιο που είχε εμφανιστεί μετά από την απευθείας πέψη του προϊόντος από το σπέρμα του ατόμου 19 (πρότυπο B) και ήταν M τύπου. Η πέψη με RsaI έδωσε επίσης πρότυπο κοπής (πρότυπο G), χαρακτηριστικό

του Μ μορίου όπως προκύπτει μετά από σύγκριση του προτύπου κοπής με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (Λαδουκάκης, 1998; Ladoukakis *et al*., 2002, Τσαγκαράκης, 2002). Ο περιοριστικός χάρτης BG που προκύπτει για τους κλώνους με την πέψη από τα δύο ένζυμα HaeIII και RsaI, δίνεται από την εικόνα 8. Τα περιοριστικά πρότυπα των πέψεων των θετικών κλώνων μετά από ηλεκτροφόρηση παρουσιάζονται στην εικόνα 9.



Εικόνα 8. Περιοριστικός χάρτης του γονιδίου COIII για τα ένζυμα περιορισμού HaeIII και RsaI. Ο τύπος BG αντιστοιχεί στο Μ μόριο.

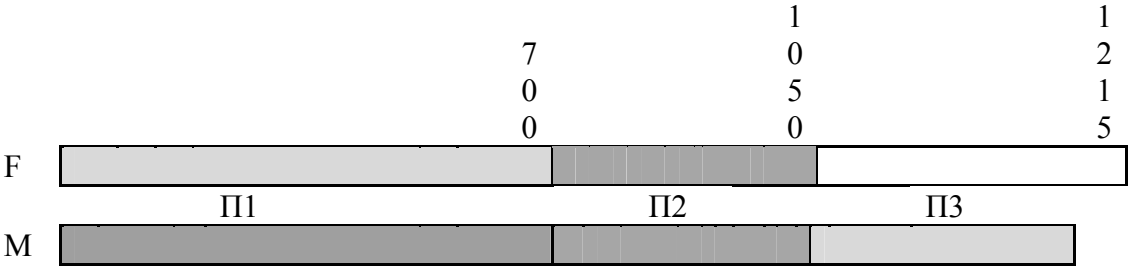


Εικόνα 9. Περιοριστικά πρότυπα τριών θετικών κλώνων από σπέρμα του ατόμου H19 μετά από πέψη με το ένζυμο HaeIII και RsaI. Το DNA έχει διαχωρισθεί σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Τα θραύσματα έχουν βαφεί με βρωμιούχο αιθίδιο.

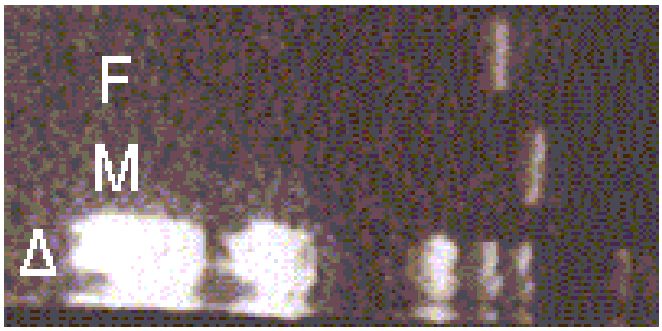
3.2. ΔΙΑΦΟΡΑ ΜΕΓΕΘΟΥΣ F ΚΑΙ Μ ΜΟΡΙΩΝ ΤΗΣ LUR

Η μεγάλη περιοχή αγνώστου λειτουργίας (LUR) δεν έχει αποδειχθεί ότι επιτελεί κάποιο συγκεκριμένο ρόλο, παρόλο που έχει συσχετιστεί με την περιοχή έναρξης της αντιγραφής του mtDNA (Hoffman *et al*., 1992). Πραγματοποιήθηκε PCR με γενικούς εκκινητές για την LUR σε δείγματα από σπέρμα και σωματικούς ιστούς (βράγχια). Η LUR είναι ένα τμήμα του mtDNA του μυδιού με μήκος που ποικίλει από 900 bp για το Μ μόριο έως 1200 bp για το F μόριο (Εικόνα 9) (Hoffman *et al*., 1992), αυτό καθιστά εύκολη την ταυτοποίηση ενός προϊόντος PCR ως Μ ή F μετά από

ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην παρούσα μελέτη η περιοχή που πολλαπλασιάστηκε είχε μήκος 1300 bp για το M μόριο και 1500 bp για το F μόριο, επειδή οι εκκινητές προσκολλούνταν λίγο έξω από τα όρια της LUR. Το προϊόν της PCR ‘‘έτρεξε’’ (Εικόνα 10) με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση της μεγάλης περιοχής άγνωστης λειτουργίας (LUR) του mtDNA του μυδιού. Τα μόρια F και M έχουν διαφορετικό μήκος. Οι περιοχές Π1 και Π3 διαφοροποιούνται μεταξύ των μορίων F και M. Η περιοχή Π2 είναι συντηρημένη.



Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR για την περιοχή UAR σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. M είναι το προϊόν της PCR από DNA σπέρματος (M μόριο), και F είναι το προϊόν από σωματικό ιστό του ίδιου ατόμου (F μόριο), Δ είναι ο δείκτης (Marker).

Οι σωματικοί ιστοί έδωσαν προϊόν της PCR για την UAR στα 7 από τα 10 άτομα που μελετήθηκαν. Το προϊόν της PCR είχε και στις επτά περιπτώσεις το χαρακτηριστικό μέγεθος του F μορίου. Στο σπέρμα πήραμε προϊόν στα 35 από τα 38 άτομα, το οποίο σε όλες τις περιπτώσεις είχε το χαρακτηριστικό μέγεθος του M μορίου (Πίνακας 3). Και σε αυτή την περίπτωση δεν ανιχνεύθηκαν προσμίξεις M μορίων mtDNA στους σωματικούς ιστούς ή F μορίων mtDNA στο σπέρμα.

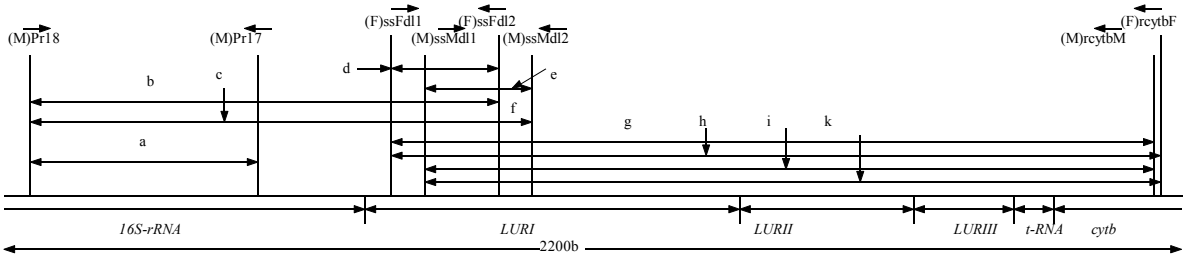
Πίνακας 3. Απλότυποι για την μεγάλη περιοχή αγνώστου λειτουργίας (LUR) που εντοπίστηκαν στην παρούσα μελέτη

Άτομο	Απλότυποι	
	βράγχια	σπέρμα
H1	F	M
H2	F	M
H3	*N.T.* (-)	M
H4	*N.P.* (-)	M
H5	*N.P.* (-)	M
H6	*N.T.* (-)	M
H7	*N.T.* (-)	M
H8	F	M
H9	*N.T.* (-)	M
H10	*N.T.* (-)	M
H11	*N.P.* (-)	M
H12	*N.T.* (-)	M
H13	F	M
H14	F	M
H15	F	M
H16	*N.T.* (-)	M
H17	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
H18	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
H19	F	M
A1	*N.T.* (-)	M
A2	*N.T.* (-)	*N.P.* (-)
A3	*N.T.* (-)	M
A4	*N.T.* (-)	M
A5	*N.T.* (-)	M
A6	*N.T.* (-)	M
A7	*N.T.* (-)	M
A8	*N.T.* (-)	M
A9	*N.T.* (-)	M
A10	*N.T.* (-)	M
A11	*N.T.* (-)	M
A12	*N.T.* (-)	M
A13	*N.T.* (-)	M
A14	*N.T.* (-)	M
A15	*N.T.* (-)	M
A16	*N.T.* (-)	M
A17	*N.T.* (-)	M
A18	*N.T.* (-)	M
A19	*N.T.* (-)	M

**N.T.: not tested, **N.P.: no product*

3.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΥΛΟ-ΕΙΔΙΚΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Για να γίνει δυνατή η ανίχνευση mtDNA μορίων που πιθανότατα βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση μέσα στη μήτρα του DNA, πραγματοποιήθηκε PCR με εξειδικευμένους φυλο-ειδικούς εκκινητές οι οποίοι προσκολλώνται αποκλειστικά σε M ή F μόρια. Οι φυλο-ειδικοί εκκινητές παρουσιάζονται στον πίνακα 1 (βλ Υλικά και Μέθοδοι). Με την χρήση των φυλο-ειδικών εκκινητών έγινε προσπάθεια για τον πολλαπλασιασμό εννέα περιοχών οι οποίες εντοπίζονται μεταξύ της 16sRNA και του Cytb, όπου περιλαμβάνεται και η μεγάλη περιοχή αγνώστου λειτουργίας (LUR). Η περιοχή αυτή μελετήθηκε γιατί υπάρχουν ενδείξεις ότι η LUR καθορίζει την συμπεριφορά ενός μορίου ως M ή F και ότι σχετίζεται με το φαινόμενο της αρρενοποίησης (βλ Εισαγωγή παρ. 1.1.3). Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: α) τέσσερα ζεύγη με M φυλο-ειδικούς εκκινητές (Msp) για τις περιοχές 16sRNA (περιοχή a), UAR (περιοχή e), 16sRNA-UAR (περιοχή f) και UAR-cytb (περιοχή i) β) δύο ζεύγη με F φυλο-ειδικούς εκκινητές (Fsp) για τις περιοχές UAR (περιοχή d) και UAR-cytb (περιοχή h) γ) τρία ζεύγη τα οποία είχαν ένα M και ένα F φυλο-ειδικό εκκινητή για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων μορίων (Msp/Fsp) για τις περιοχές 16sRNA-UAR (περιοχή b) και UAR-cytb (περιοχές g και k). Οι περιοχές που πολλαπλασιάστηκαν με φυλοειδικούς εκκινητές παρουσιάζονται στην εικόνα 11. Εξετάστηκαν δείγματα από βράγχια (Πίνακας 4) και σπέρμα (Πίνακες 5 & 6). Η ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο και η εμφάνιση - φωτογράφηση του ηλεκτροφορήματος κάτω από έκθεση του σε UV ακτινοβολία, προσδιόριζε την ανίχνευση ή όχι ενός τύπου μορίου. Εξετάστηκαν δείγματα από σπέρμα και σωματικούς ιστούς (βράγχια).



Εικόνα 11. Τα τμήματα του mtDNA που πολλαπλασιάστηκαν με φυλο-ειδικούς εκκινητές. Στο σχήμα αναφέρονται οι κωδικοί των εκκινητών και σε παρένθεση σημειώνεται εάν είναι εξειδικευμένοι για το M ή το F μόριο. Τα βέλη πάνω από τους εκκινητές δείχνουν την κατεύθυνση προς την οποία πολλαπλασιάζουν οι εκκινητές

Πίνακας 4. Αποτελέσματα των PCR από τους σωματικούς ιστούς (βράγχια) με χρήση φυλο-ειδικών εκκινητών.

Ειδικότητα εκκινητών	*Msp*	*Msp*	*Msp*	*Msp*	*Fsp*	*Fsp*	*Msp/Fsp*	*Msp/Fsp*	*Fsp/Msp*
Περιοχή	a	e	f	i	d	h	b	k	g
Άτομο	χαρακτηρισμός μορίων								
H1	M	M	M	*N.P.*	F	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H2	*N.P.*	*N.T.*	M	M	F	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H4	M	*N.T.*	M	M	F	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H5	*N.P.*	*N.T.*	M	M	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H8	M	*N.T.*	M	M	F	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H11	M	*N.T.*	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H13	*N.P.*	*N.T.*	M	M	F	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H14	M	*N.T.*	M	M	F	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H15	M	*N.T.*	M	M	F	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H19	*N.P.*	*N.T.*	M	M	F	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*

**N.T.: not tested, **N.P.: no product*

Πίνακας 5. Αποτελέσματα των PCR από το σπέρμα των ατόμων H1-19. με χρήση φυλο-ειδικών εκκινητών.

Ειδικότητα εκκινητών	*Msp*	*Msp*	*Msp*	*Msp*	*Fsp*	*Fsp*	*Msp/Fsp*	*Msp/Fsp*	*Fsp/Msp*
Περιοχή	a	e	f	i	d	h	b	k	g
Άτομο	χαρακτηρισμός μορίων								
H1	M	*N.P.*	M	M	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H2	M	M	M	M	F	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H3	M	M	M	M	N.P.	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H4	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H5	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H6	M	M	M	M	F	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H7	M	M	M	M	*N.P.*	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H8	M	M	M	M	F	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H9	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H10	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H11	M	M	M	M	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H12	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H13	M	M	M	M	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H14	M	M	M	*N.P.*	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H15	M	M	M	M	F	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H16	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H17	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H18	M	*N.P.*	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
H19	M	M	M	M	F	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*

**N.P.: no product*

Πίνακας 6. Αποτελέσματα των PCR από το σπέρμα των ατόμων A1-19 (σπέρμα το οποίο έχει υποστεί κλασμάτωση με περκόλη). με χρήση φυλο-ειδικών εκκινητών.

Ειδικότητα εκκινητών	*Msp*	*Msp*	*Msp*	*Msp*	*Fsp*	*Fsp*	*Msp/Fsp*	*Msp/Fsp*	*Fsp/Msp*
Περιοχή	a	e	f	i	d	h	b	k	g
Άτομο	χαρακτηρισμός μορίων								
A1	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A2	M	M	*N.P.*	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A3	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A4	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A5	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A6	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A7	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A8	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A9	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A10	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A11	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A12	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A13	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A14	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A15	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A16	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A17	M	*M*	*N.P.*	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A18	M	*M*	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*
A19	M	M	M	M	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*	*N.P.*

**N.P.: no product*

3.3.1. Ανίχνευση M μορίων με χρήση φυλο-ειδικών εκκινητών

Η χρήση M φυλο-ειδικών εκκινητών έδωσε θετική αντίδραση στο DNA από το σπέρμα και για τα 38 άτομα που μελετήθηκαν, για ένα τουλάχιστον ζεύγος εκκινητών κάτι που επιβεβαιώνει την ύπαρξη του M μορίου σε όλα τα άτομα για τις περιοχές τουλάχιστον όπου πολλαπλασιάστηκαν. Αναλυτικά στο σπέρμα των 38 δειγμάτων: η περιοχή a (τμήμα της 16sRNA με χρήση Msp εκκινητών) ανιχνεύτηκε και στα 38 άτομα, η περιοχή e (τμήμα της LURI με χρήση Msp εκκινητών) ανιχνεύτηκε σε 35 άτομα (δεν ανιχνεύτηκε στα άτομα H1,H17,H18), η περιοχή f (τμήμα από τέλος 16sRNA έως αρχή LURI με χρήση Msp εκκινητών) ανιχνεύτηκε σε 35 άτομα (δεν ανιχνεύτηκε στα άτομα H17,A2,A17), τέλος η περιοχή i (τμήμα από αρχή LURI μέχρι αρχή cytb με χρήση Msp εκκινητών) το μόριο M ανιχνεύτηκε επίσης σε 35 άτομα (δεν ανιχνεύτηκε στα άτομα H14,H17,H18). Φαίνεται ότι όλα τα άτομα που εξετάστηκαν φέρουν στην γονάδα τους το μόριο M τόσο για την COIII όσο και για τις περιοχές μεταξύ 16sRNA και cytb. Με βάση αυτό φαίνεται ότι τα άτομα που

εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη είναι όλα τυπικά αρσενικά (βλ. Εισαγωγή παρ. 1.3.1). Στα βράγχια των δέκα ατόμων που μελετήθηκαν, ανιχνεύτηκαν επίσης M μόρια και για τις τέσσερις περιοχές οι οποίες πολλαπλασιάστηκαν. Στην περιοχή a, το μόριο M ανιχνεύτηκε στα 6 από τα 10 άτομα, στην περιοχή f ανιχνεύτηκε και στα 10 άτομα, στην περιοχή i ανιχνεύτηκε στα 9 από τα 10, ενώ στην περιοχή e μελετήθηκε μόνο ένα άτομο όπου και ανιχνεύτηκε το M μόριο. Επειδή το M μόριο ανιχνεύθηκε και στα 10 άτομα για την περιοχή f, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι στα άτομα υπήρχε το M μόριο και για την περιοχή a. Για το λόγο αυτό δεν έγινε περισσότερη προσπάθεια για την ανίχνευση του στα 4 άτομα που δεν ανιχνεύθηκε αρχικά. Η ανίχνευση των M μορίων στα βράγχια είναι συνηθισμένο φαινόμενο και εξηγείται ως διαρροή των M μορίων στους παράπλευρους με την γονάδα ιστούς (Garrido-Ramos *et al*., 1998).

3.3.2. Ανίχνευση F μορίων με χρήση φυλο-ειδικών εκκινητών

Η χρήση F φυλο-ειδικών εκκινητών έδωσε θετική αντίδραση στα 10 από τα 19 άτομα της ομάδας H (δείγματα σπέρματος που είχαν υποστεί καθαρισμό με φίλτρο) για ένα τουλάχιστον από τα δύο ζεύγη F εκκινητών. Συγκεκριμένα 9 στα 19 δείγματα έδωσαν θετική αντίδραση για την περιοχή d (τμήμα της LURI με χρήση Fsp εκκινητών) και 5 στα 19 δείγματα έδωσαν θετική αντίδραση για την περιοχή h (τμήμα από αρχή LURI μέχρι αρχή cytb με χρήση Fsp εκκινητών). Η χρήση των γενικών εκκινητών για την COIII και την UAR, δεν είχε ανιχνεύσει την παρουσία F μορίων σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκε. Αυτό πιθανότατα οφειλόταν στην πολύ μικρή συγκέντρωσης των F μορίων σε σχέση με το M που ήταν αυτά που πολλαπλασιάζονταν κυρίως κατά την διάρκεια της PCR, αυτό όμως δεν συνέβη με τους F φυλο-ειδικούς εκκινητές οι οποίοι έβρισκαν και πολλαπλασίαζαν επιλεκτικά το F μόριο.

Το ερώτημα όμως που τέθηκε ήταν: Κατά πόσο τα F μόρια που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα περιέχονταν πράγματι μέσα στο σπέρμα ή ήταν αποτέλεσμα σωματικών προσμίξεων που δεν απομακρύνθηκαν με το φιλτράρισμα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη τα 19 άτομα στο σπέρμα των οποίων πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση με περκόλη (A1-19). Τα άτομα αυτά δεν έδωσαν προϊόν για καμία από τις δύο περιοχές (d και h) οι οποίες μελετήθηκαν. Φαίνεται δηλαδή ότι το σπέρμα των ατόμων αυτών δεν περιείχε F μόρια. Τα θετικά αποτελέσματα από τους Fsp εκκινητές στα άτομα της πρώτης ομάδας, εξηγούνται

πιθανότατα από την ύπαρξη μόλυνσης από θραύσματα σωματικών κυττάρων τα οποία πέρασαν από το φίλτρο κατά τον καθαρισμό του σπέρματος και που όμως δεν περνάνε από την κλασμάτωση με περκόλη.

3.3.3. Ανίχνευση ανασυνδυασμένων μορίων με χρήση φυλο-ειδικών εκκινητών

Τα αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης (Burzyński *et. al.*, 2003) ενισχύουν την υπόθεση ότι ένα συγκεκριμένο τμήμα της LUR, είναι αυτό που καθορίζει την συμπεριφορά ενός μορίου mtDNA ως M και την διατήρηση του στην πατρική γραμμή. Είναι πολύ πιθανό λοιπόν μόρια mtDNA που έχουν προκύψει με ανασυνδυασμό και φέρουν την συγκεκριμένη περιοχή να χαρακτηρίζονται ως M από το σύστημα της ΔMK και να περνάνε στο σπέρμα του μυδιού. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η περιοχή μεταξύ 16s-RNA και cytb η οποία περιλαμβάνει την LUR εμφανίζει υψηλή πιθανότητα για την δημιουργία ανασυνδυασμένων μορίων ανάμεσα σε αυτή. Η υπόθεση ενισχύεται από την ύπαρξη της συντηρημένης περιοχής Π2 της LUR, καθώς για δύο πατρικές αλληλουχίες η πιθανότητα να αρχίσει ή να τελειώσει ένας ανασυνδυασμός σε ένα σημείο με αλληλουχική ταύτιση είναι πολύ μεγαλύτερος από ότι σε μία περιοχή με χαμηλή ομολογία. Ωστόσο, δεν ανιχνεύτηκε καμία ανασυνδυασμένη περιοχή με κανένα από τα τρία διαφορετικά ζεύγη Msp και Fsp εκκινητών που δοκιμάστηκαν για τις περιοχές b, g και k. Φαίνεται ότι στα δείγματα που μελετήθηκαν δεν υπήρχαν ανασυνδυασμένα μόρια για την συγκεκριμένη περιοχή ή τουλάχιστον δεν υπήρχαν στο βαθμό που να μπορούν να ανιχνευθούν από την PCR.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στο ερώτημα: τι μόρια mtDNA περνούν από τη μία γενιά στην άλλη μέσω του σπέρματος στα μύδια του γένους *Mytilus*; Τρεις παρατηρήσεις καθιστούν το ερώτημα αυτό σημαντικό:

α) Γνωρίζουμε ότι τα αρσενικά άτομα έχουν F και M μόρια mtDNA και ότι η γονάδα αποτελείται κυρίως από M. Όμως σε προηγούμενες μελέτες έχουν αναφερθεί και F μόρια στη γονάδα (Zouros *et al*., 1994a,b; Saavedra *et al*., 1997; Garrido-Ramos *et al*., 1998).

β) Στην αρσενική γονάδα είναι δυνατός ο ανασυνδυασμός (Ladoukakis and Zouros, 2001a), επομένως δυνητικά μπορεί να προκύψει μια μεγάλη δεξαμενή μωσαϊκών μορίων (δηλαδή μορίων με F και M νησίδες).

γ) Σε πολλά αρσενικά έχει βρεθεί ότι το πατρικό μόριο είναι F για ορισμένες περιοχές που έχει ελεγχθεί. Εν αγνοία της ύπαρξης ανασυνδυασμού στο mtDNA, η ανίχνευση του F μορίου για μία περιοχή γενικεύθηκε σε ολόκληρο το μόριο και οδήγησε στην υπόθεση της ‘‘αρρενοποίηση’’ (masculinization) του F mtDNA (Ladoukakis and Zouros, 2001) σύμφωνα με την οποία ένα F μόριο mtDNA εισέρχεται στην γραμμή μεταβίβασης του M μορίου μηδενίζοντας τον χρόνο διαφοροποίησης των δύο μορίων. Όμως η ανακάλυψη του ανασυνδυασμού στα μύδια του γένους *Mytilus* επανέφερε το ζήτημα της εξήγησης του φαινομένου της αρρενοποίησης. Με βάση τα νέα δεδομένα δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι τα ‘‘αρρενοποιημένα’’ μόρια μπορεί να είναι αποτέλεσμα ανασυνδυασμού. Τα δύο μόρια M και F φέρονται να έχουν χαρακτηριστικές διαφορές στην αλληλουχία τους που χαρακτηρίζει την διαφορετική συμπεριφορά τους Σε αυτή την περίπτωση δεν μπορεί κάθε F μόριο να αναλάβει το ρόλο του M, εκτός εάν έχει αποκτήσει αυτές τις χαρακτηριστικές αλληλουχίες από ένα M μόριο (Zouros, 2000).

Για την συλλογή δεδομένων που θα μπορούσαν να διαφωτίσουν το θέμα, επιχειρήσαμε μέσω PCR την ανίχνευση mtDNA μορίων, όχι σε αρσενικές γονάδες, αλλά σε σπέρμα. Ο λόγος είναι ότι οι γονάδες μολύνονται από τους σωματικούς ιστούς με αποτέλεσμα να μην είναι ξεκάθαρο εάν ένα μόριο που ανιχνεύεται στην γονάδα εισέρχεται στο σπέρμα. Για τις ανάγκες της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δύο κατηγορίες σπέρματος:

α) σπέρμα που ο καθαρισμός του έγινε με φίλτρο

β) σπέρμα που ο καθαρισμός του έγινε με κλασμάτωση περκόλης

Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με σωματικό ιστό. Δύο περιοχές του mtDNA μελετήθηκαν με την χρήση γενικών και φυλο-ειδικών εκκινητών: Αρχικά πολλαπλασιάστηκε μέσω PCR ένα τμήμα 860 bp της COIII (κυτοχρωμική οξειδάση, υπομονάδα III) με την χρήση γενικών εκκινητών. Η πέψη των προϊόντων της PCR με το ένζυμο περιορισμού HaeIII έδωσε τα εξής αποτελέσματα: σε κάθε άτομο ανιχνεύτηκε στο σπέρμα ένας απλότυπος της COIII ο οποίος ήταν χαρακτηριστικός για το M μόριο, ενώ στο σώμα (για τα άτομα που μελετήθηκαν) ανιχνεύτηκε ένας άλλος απλότυπος της COIII ο οποίος ήταν χαρακτηριστικός για το F μόριο. Στη συνέχεια η μελέτη εντοπίστηκε κυρίως σε μία περιοχή 2200 bp στην οποία περιέχεται η μεγάλη περιοχή αγνώστου λειτουργίας (LUR: Large Unassigned Region) η οποία στα αρσενικά μόρια είναι μικρότερη από αυτή των θηλυκών μορίων. Προς το παρόν δεν έχει διαπιστωθεί καμία λειτουργία για την περιοχή αυτή αν και θεωρείται ως η περιοχή από την οποία αρχίζει να αντιγράφεται το mtDNA, η αντίστοιχη δηλαδή D-loop των θηλαστικών. Υπάρχουν επί πλέον ενδείξεις ότι η περιοχή αυτή μπορεί να καθορίζει τη συμπεριφορά των μορίων mtDNA του μυδιού, αν δηλαδή μεταβιβάζονται μέσω των ωαρίων ή αν μεταβιβάζονται μέσω των σπερματοζωαρίων (Burzyński *et al.*, 2003). Ωστόσο η υπόθεση αυτή παραμένει προς απόδειξη. Από την περιοχή αυτή έγινε προσπάθεια για πολλαπλασιασμό μέσω PCR δέκα διαφορετικών περιοχών: μία με γενικούς εκκινητές, τέσσερις με M φυλο-ειδικούς εκκινητές (Msp), δύο με F φυλο-ειδικούς εκκινητές (Fsp) και τέλος τρεις πιθανές ανασυνδυασμένες περιοχές με την χρήση ενός M και ενός F φυλο-ειδικού εκκινητή.

Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

- Οι σωματικοί ιστοί έδωσαν θετικό σήμα για το M μόριο με την χρήση των M φυλο-ειδικών εκκινητών αλλά όχι με την χρήση των γενικών εκκινητών.
- Η πρώτη κατηγορία του σπέρματος (καθαρισμός με φίλτρο) έδωσε σε ορισμένες περιπτώσεις F μόρια μόνο εάν χρησιμοποιούνται F φυλο-ειδικοί εκκινητές. Αυτή η αντίδραση εξαφανίζεται όταν το σπέρμα περνάει από περκόλη.
- Σε καμία περιοχή του μορίου, από αυτές που εξετάστηκαν, δεν εντοπίστηκαν ανασυνδυασμένα μόρια τόσο στους σωματικούς ιστούς όσο και στο σπέρμα.

Η μόλυνση των σωματικών ιστών με Μ μόρια mtDNA είναι συχνό φαινόμενο σύμφωνα με δημοσιευμένες εργασίες (Garrido-Ramos *et al*., 1998). Τα αποτελέσματα της ανίχνευσης Μ μορίων στους σωματικούς ιστούς εξηγούνται με δύο τρόπους: είτε οι σωματικοί ιστοί των αρσενικών ατόμων περιέχουν σε μικρό ποσοστό και Μ μόρια, είτε ότι η ανίχνευση των μορίων αυτών είναι αποτέλεσμα πρόσμιξης του σπέρματος στους σωματικούς ιστούς κατά την διαδικασία διαχωρισμού τους, λόγω της ρευστής υφής που εμφανίζει η γονάδα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι συμβαίνουν και τα δύο.

Σε πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για το *Mytilus edulis* (Cao *et al*., 2003) βρέθηκε με μικροσκοπικές παρατηρήσεις ότι αμέσως μετά την γονιμοποίηση, στα αρσενικά έμβρυα, τα μιτοχόνδρια του σπέρματος τα οποία περιέχουν τα Μ μόρια του πατέρα, εμφανίζουν την τάση να έρχονται κοντά και να δημιουργούν συσσωματώματα, ενώ αντίθετα στα θηλυκά έμβρυα τα μιτοχόνδρια κατανέμονται τυχαία στο έμβρυο. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δεν υποστηρίζουν την υπόθεση σύμφωνα με την οποία υπάρχει κάποιο πρώιμο πολλαπλασιαστικό πλεονέκτημα του Μ μορίου στα αρσενικά έμβρυα αμέσως μετά την γονιμοποίηση (Skibinski et al., 1994b; Zouros et al., 1994b; Zouros, 2000). Ωστόσο παρατηρήθηκε μικροσκοπικά ότι η συσσωμάτωση των Μ μορίων του σπέρματος που πραγματοποιείται αμέσως μετά την γονιμοποίηση στα αρσενικά έμβρυα μπορεί να μην είναι ολική. Αν μερικά μιτοχόνδρια του σπέρματος δεν αποτελέσουν μέρος του συσσωματώματος, τότε αυτά καταλήγουν στους σωματικούς ιστούς.

Πρόσφατα αδημοσίευτα δεδομένα (Βενέτης, 2003 προσ. επικ.) έδειξαν ότι το Μ μόριο δεν εντοπίζεται στους σωματικούς ιστούς εάν έχει προηγηθεί θερμική κατεργασία (βράσιμο) του οργανισμού πριν την απομόνωση των ιστών. Με αυτό τον τρόπο η γονάδα γίνεται πιο συνεκτική και ελαχιστοποιείται η πιθανότητα πρόσμιξης του σπέρματος στους σωματικούς ιστούς.

Η παρατήρηση ότι τα αρσενικά μύδια κληρονομούν μόνο το Μ μόριο στους αρσενικούς τους απογόνους οδήγησε αρχικά σε δύο εκδοχές. Είτε το σπέρμα περιέχει μόνο Μ μόρια είτε ότι τα F μόρια του σπέρματος εμποδίζονται από το να πολλαπλασιαστούν στη γονάδα (Zouros *et al*., 1994b). Η παρουσία F μορίων mtDNA στο σπέρμα έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες (Skibinski *et al*., 1994; Zouros *et al*., 1994b; Saavedra *et al*., 1997). Ωστόσο το ερώτημα που τέθηκε ήταν κατά πόσο η ‘‘διαρροή’’ των μορίων F στο σπέρμα ήταν πραγματική ή τεχνητή οφειλόμενη σε σωματικά κύτταρα τα οποία απελευθερώνονται μαζί με το σπέρμα.

Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη (Cao *et al*., 2003) δεν υπάρχει μηχανισμός που να καταστρέφει τα μιτοχόνδρια του σπέρματος στα έμβρυα στο *Mytilus edulis*. Αυτή η παρατήρηση δεν υποστηρίζει την προηγούμενη υπόθεση (Zouros et al., 1994b; Zouros, 2000).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης στο σπέρμα είναι συμβατά με την υπόθεση ότι το σπέρμα περιέχει μόνο M μόρια για τις περιοχές που εξετάσθηκαν. Φαίνεται ότι η ‘‘διαρροή’’ των μορίων F που ανιχνεύτηκε στο σπέρμα που έχει καθαριστεί με φίλτρο, αλλά και αυτή που έχει εντοπιστεί σε προηγούμενες εργασίες (Skibinski *et al*., 1994; Zouros *et al*., 1994b; Saavedra *et al*., 1997) δεν είναι πραγματική αλλά τεχνητή, οφειλόμενη σε σωματικά κύτταρα τα οποία απελευθερώνονται μαζί με το σπέρμα.

Ποιος είναι όμως ο πιθανός μηχανισμός που εμποδίζει την παρουσία των F μορίων mtDNA στο σπέρμα;

α) Μία υπόθεση είναι ότι τα μιτοχόνδρια με F ή M μόρια απομονώνονται ταχέως σε διαφορετικά κύτταρα, έτσι αποτρέπεται η συνύπαρξη τους και είναι δυνατό να υπάρχει μηχανισμός ο οποίος εντοπίζει και καταστρέφει τα μιτοχόνδρια που περιέχουν F μόρια στο στάδιο των σπερματικών κυττάρων (Birky, 1994). Η στόχευση για την καταστροφή των μιτοχονδρίων αυτών, μπορεί να προκαλείται από πρωτεΐνες οδηγούς οι οποίες κωδικοποιούνται από μη αναγνωρισμένα ακόμη γονίδια του F mtDNA και βρίσκονται στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων (Beagley *et al*., 1997).

β) Μια άλλη υπόθεση είναι ότι στο στάδιο των σπερματικών κυττάρων μία ειδική νουκλεάση, η οποία κωδικοποιείται από το πυρηνικό DNA αναγνωρίζει και καταστρέφει τις F τύπου αλληλουχίες, ή μπορεί να παρεμποδίζεται η αντιγραφή των μιτοχονδριακών μορίων F τύπου (Beagley *et al*., 1997).

Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις αρσενικών ατόμων ομοπλασμικών για ένα τύπο F μιτοχονδριακού DNA, ωσάν να μην έλαβαν mtDNA από τον πατέρα τους. Η διατάραξη αυτή του φαινομένου της ΔΜΚ έχει παρατηρηθεί ιδιαίτερα σε περιπτώσεις υβριδισμού μεταξύ διαφορετικών ειδών του γένους *Mytilus* (*M. edulis* x *M trossulus* & *M. edulis* x *M galloprovincialis*), και αφορά και τους θηλυκούς απογόνους οι οποίοι αντίστοιχα εμφανίζουν υψηλά ποσοστά ετεροπλασμίας (Zouros *et al*., 1994; Rawson *et al*., 1996). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι τα κυρίως θηλεοτόκα μύδια παράγουν αρσενικά τα οποία επίσης δεν φέρουν το M μόριο, ενώ παράλληλα

συγκεκριμένα αρσενικά είναι δυνατόν να παράγουν αρσενικούς απογόνους οι οποίοι δεν φέρουν το M ανεξάρτητα από το θηλυκό με το οποίο διασταυρώνονται. Η υπόθεση η οποία εξηγεί αυτές τις παρατηρήσεις είναι ότι η παρουσία ενός παράγοντα Y στα πρώτα σπερματικά κύτταρα είναι αρκετή για να προκαλέσει την αρρενοποίηση της γονάδας και την εξέλιξη του ατόμου ως αρσενικό, χωρίς να είναι απαραίτητη η συνέχιση της παρουσίας του παράγοντα αυτού (Saavedra *et al*., 1997). Σύμφωνα με την υπόθεση ο παράγοντας Y κωδικοποιείται από το M mtDNA (βλ. Εισαγωγή παρ. 1.1.3).

Η απώλεια του M από τις γονάδες των ατόμων αυτών είναι ίσως πιθανό να οδηγεί στην παρουσία μορίων F στο σπέρμα αυτών των ατόμων, κάτι που μπορεί να θεωρηθεί ως εξήγηση του φαινομένου της αρρενοποίησης. Ωστόσο δεν είναι γνωστό εάν τα άτομα αυτά είναι γόνιμα, ή ακόμη και εάν αυτό ισχύει, κατά πόσο αυτά τα άτομα παράγουν αρσενικούς απογόνους (Hoeh *et al*., 1997). Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις εξάλλου ότι τα αρρενοποιημένα μόρια είναι στην πραγματικότητα μόρια F τα οποία εξ ανασυνδυασμού περιέχουν την περιοχή εκείνη του M μορίου, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα Y, που τα μετατρέπει λειτουργικά σε M μόρια (Burzyński *et al.*, 2003).

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι μια διαδικασία που συμβαίνει αυστηρά σε ομόλογες περιοχές δύο μορίων DNA. Για να γίνει ομόλογος ανασυνδυασμός θα πρέπει οι δύο αλληλουχίες να είναι ταυτόσημες στα σημεία που θα αρχίσει και θα τελειώσει ο ανασυνδυασμός και να εμφανίζει υψηλή ομολογία στην υπόλοιπη περιοχή τους. Η ανακάλυψη του ανασυνδυασμού στα μύδια του γένους *Mytilus* επανέφερε το ζήτημα της εξήγησης του φαινομένου της αρρενοποίησης. Είναι τελικά τα καλούμενα ως αρρενοποιημένα μόρια στο σύνολο τους F μόρια ή είναι αποτέλεσμα ανασυνδυασμού; Τα δύο μόρια M και F φέρονται να έχουν χαρακτηριστικές διαφορές στην αλληλουχία τους που χαρακτηρίζει την διαφορετική συμπεριφορά τους. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση δεν μπορεί κάθε F μόριο να αναλάβει το ρόλο του M, εκτός εάν έχει αποκτήσει αυτές τις χαρακτηριστικές αλληλουχίες από ένα M μόριο (Zouros, 2000). Ο πιθανότερος τρόπος για την μεταφορά αυτών των χαρακτηριστικών αλληλουχιών από ένα M σε ένα F μόριο είναι μέσω ανασυνδυασμού. Η περιοχή που διαφοροποιεί λειτουργικά τα δύο μόρια φαίνεται να είναι η μεγάλη περιοχή αγνώστου λειτουργίας (LUR). Πράγματι σε πρόσφατη μελέτη για το *Mytilus trossulus* από την Βαλτική (Burzyński *et al.*, 2003) παρουσιάζονται σοβαρές ενδείξεις ότι ανασυνδυασμένα μόρια μεταξύ M και F

mtDNA έχουν εισβάλει στην πατρική γραμμή του *M. trossulus*, τα πατρικά αυτά πλέον μόρια φαίνεται να έχουν κοινό ένα συγκεκριμένο τμήμα της LUR, συγκεκριμένα το τμήμα Π1, κάτι που ενισχύει την υπόθεση για την σχέση μεταξύ ανασυνδιασμού και αρρενοποίησης.

Από αδημοσίευτες αλληλουχίες (βλ. παράρτημα) του *M. galloprovincialis*, υπολογίστηκε, με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού προγράμματος Clustal-X, η απόσταση p-distance των μορίων M και F (άτομο gm.12). Η απόσταση αυτή βρέθηκε να παίρνει την τιμή 27,1%.

Η LUR δεν έχει αποδειχθεί ότι επιτελεί κάποιο συγκεκριμένο ρόλο, παρόλο που έχει συσχετιστεί με την περιοχή έναρξης της αντιγραφής του mtDNA (Hoffman *et al*., 1992). Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από μελέτη που έγινε στο F mtDNA του *M. edulis*. Ωστόσο, σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο για την εξήγηση της ΔΜΚ (βλ Εισαγωγή), φαίνεται ότι το M φέρει μία χαρακτηριστική αλληλουχία στην περιοχή της LUR η οποία διαφοροποιεί λειτουργικά το M από το F μόριο. Για την ανίχνευση τυχόν κωδικοποιούσας περιοχής στην περιοχή LUR του M μορίου, έγινε προσπάθεια να βρεθούν, με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού προγράμματος DNAMAN, πιθανά ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs: open reading frames) για την LUR του M μόριο του *M. galloprovincialis*. (άτομο gm.12 βλ Παράρτημα). Από τα ORFs που προέκυψαν από το πρόγραμμα, ως πιθανότερο κρίνεται αυτό που βρίσκεται μεταξύ των θέσεων 2694-2933 (βλ. Παράρτημα).

Strand	RF	AANum	Position	Sequence
Plus	2	64	218-412	gtatacaagtATAcgcaa...acttaTAAactaa

Σε αυτό εντοπίζεται ο μεγαλύτερος αριθμός αμινοξέων από τα άλλα πιθανά ORFs. Επίσης τα κωδικόνιο έναρξης και λήξης αυτής της περιοχής δεν διαφοροποιούνται για τα M μόρια τόσο του *M. galloprovincialis* όσο και του *M. edulis* (βλέπε Παράρτημα). Το πιθανό αυτό πλαίσιο ανάγνωσης βρίσκεται στην Π1 της LUR στην οποία με βάση τα μέχρι τώρα δεδομένα φέρεται να βρίσκεται η χαρακτηριστική M αλληλουχία η οποία διαφοροποιεί λειτουργικά το M μόριο. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την πλήρη ανίχνευση της χαρακτηριστικής M περιοχής στην LUR εφόσον αυτή υπάρχει.

Στην παρούσα μελέτη δεν ανακαλύφθηκαν ανασυνδυασμένα μόρια για τις περιοχές που μελετήθηκαν. Η απουσία ανασυνδυασμού μεταξύ των μορίων M και F είχε αρχικά εξηγηθεί ως αποτέλεσμα ταχείας απομόνωσης των μορίων M και F σε διαφορετικά μιτοχόνδρια και κύτταρα ή στην απουσία του κατάλληλου ενζυμικού

μονοπατιού (Beagley *et al*., 1997). Πρόσφατη μελέτη (Ladoukakis and Zouros, 2001a), παρουσιάζει άμεσες αποδείξεις για την ύπαρξη ομόλογου ανασυνδυασμού στο μύδι *Mytilus galloprovincialis*. Ωστόσο στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύτηκαν ανασυνδυασμένα μόρια στο σπέρμα των μυδιών. Ίσως τα ανασυνδυασμένα μόρια να υπάρχουν στην γονάδα αλλά να μην ‘‘περνούν’’ στο σπέρμα λόγω του ίδιου μηχανισμού ο οποίος αποτρέπει την είσοδο των F μορίων στο σπέρμα.

Η παρούσα μελέτη δεν δίνει απάντηση στο ερώτημα για το τι συμβαίνει στα αρρενοποιημένα αρσενικά. Όμως για τα ‘‘τυπικά’’ αρσενικά (άτομα στις γονάδες των οποίων συνυπάρχουν M και F μόρια ενώ στους σωματικούς τους ιστούς υπάρχουν μόνο F μόρια) παράγει χρήσιμα συμπεράσματα καθόσον καθιστά φανερό ότι τα ευρήματα F μορίων στο σπέρμα είναι μάλλον από τεχνική αλλοίωση και καθιστά ισχυρότερο ένα σημαντικό σκέλος της ΔΜΚ, ότι δηλαδή ο πατέρας δίνει στους γιούς μόνο M μόρια mtDNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR για να μελετηθούν οι τύποι μιτοχονδριακού DNA οι οποίοι μεταφέρονται με το σπέρμα του μυδιού *Mytilus galloprovincialis,* ένα είδος που το μιτοχονδριακό DNA μεταβιβάζεται με βάση τον κανόνα της Διπλής Μονογονικής Κληρονομικότητας (ΔΜΚ). Μετά από ανάλυση των περιοχών COIII, και μίας ευρείας περιοχής μεταξύ 16S rRNA και cytb καταλήξαμε στα παρακάτω συμπεράσματα.

- Φαίνεται να υπάρχει ισχυρός μηχανισμός που αποκλείει την παρουσία των F μορίων από το σπέρμα καθώς οι περιπτώσεις όπου ανιχνεύτηκε παρουσία του F μορίου στο σπέρμα φαίνεται να είναι αποτέλεσμα μόλυνσης των γαμετών από σωματικά κύτταρα, καθώς σε καμία περίπτωση δεν ανιχνεύτηκε το F μόριο στα δείγματα που είχαν υποστεί κλασμάτωση με περκόλη.
- Επιπλέον φαίνεται είτε ότι υπάρχει ισχυρός μηχανισμός που εμποδίζει τον ανασυνδυασμό μεταξύ M και F μορίων στα τυπικά αρσενικά άτομα, ή τα ανασυνδυασμένα μόρια εάν παράγονται στην γονάδα δεν μπορούν να περάσουν στο σπέρμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Arctander, P., Mitochondrial recombination? 1999. Science 284: 2090– 2091.

Attardi, G., 1985. Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. Int. Rev. Cytol. 93: 93-145.

Avise, J. C., 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, London.

Avise, J. C., and Lansman, R. A., 1983. Evolution of genes and proteins. Eds. Nei, M., and Koehn, R. K., 147-164. Sinauer, Sunderland, Mass.

Awadalla, P., A. Eyre-Walker, and J. Maynard Smith, 1999. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA Science 286: 2524-2525.

Bayne, B. L., 1965. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). Ophelia 2(1): 1-47.

Beagley, C. T., K. A. Taylor, and D. R. Wolstenholme, 1997. Gender-associated diverse mitochondrial DNA molecules of the mussel *Mytilus californicus*. Curr Genet 31: 318-324.

Beagley, C. T., R. Okimoto, and D. R. Wolstenholme, 1999. Mytilus mitochondrial DNA contains a functional gene for a tRNASer(UCN) with a dihydrouridine arm-replacement loop and a pseudo- tRNASer(UCN) gene. Genetics 152: 641-652.

Bell, G., 1982. The masterpiece of nature: The evolution and genetics of sexuality. Croom Helm, London.

Birky, C. W. Jr., 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11331-11338.

Birky, C. W., 1994. Relaxed and stringent genomes: why cytoplasmic genes don't obey Mendel's laws. J Hered 85: 355-365.

Boore, J. L., and M. W. Brown, 1994 Mitochondrial genomes and the phylogeny of mollusks. The nautilus 2: 61-78.

Burzyński, A., M. Zbawicka, D. O. F. Skibinski, and R. Wenne, 2003. Evidence for Recombination of mtDNA in the Marine Mussel *Mytilus trossulus* from the Baltic. Mol. Biol. Evol. 20(3): 388-392.

Cao, L., E. Kenchington, and E., Zouros, 2003. Sex-spesific segregation patternsb of sperm mitochondria in embryos of the Blue mussel (*Mytilus edulis*). In press.

Elson, J. L., R. M. Andrews, P. F. Chinnery, R. N. Lightowlers, D. M. Turnbull, and N. Howell, 2001. Analysis of European mtDNAs for recombination. Am. J. Hum. Genet 68: 145-153.

Erickson, L., and R. Kemble, 1990. Paternal inheritance of mitochondria in rapeseed (*Brassica napus*). Mol. Gen. Genet. 222: 135-139.

Eyre-Walker, A., N. H. Smith, and J. Maynard Smith. 1999. How clonal are human mitochondria? Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 266: 477-483.

Eyre-Walker, A., 2000. Do mitochondria recombine in humans? Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 355: 1573-1580.

Faure, S., J. L. Noyer, F. Carreel, J. P. Horry, F. Bakry, and C. Lanaud, 1994. Maternal inheritance of chloroplast genome and paternal inheritance of mitochondrial genome in bananas (*Musa acuminata*) Curr. Genet 25: 265-269.

Fisher, C., and D. O. F. Skibinski, 1990. Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus*. Proc. R. Soc. Lond. 242: 149-156.

Geller, J. B., J. T. Carlton 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.

Gosling, E., (Editor), 1992. The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Development in Aquaculture and Fisheries Science, vol. 25. Elsevier, Amsterdam.

Gray, M. W., 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. Annu Rev Cell Biol 5: 25-50.

Griffiths, A. J., J. H. Miller, T. D. Suzuki, R. C. Lewontin and W. M. Gelbart, 1996. An introduction to genetic analysis. Freeman, W. H., New York.

Grrido-Ramos M. A., D. T. Steward, B. Sutherland, 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.

Gyllensten, U., D. Wharton, A. Josefsson, and A. C. Wilson, 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. Nature 352: 255-257.

Hatzoglou, E., G.C. Rodakis, and R. Lecanidou, 1995. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail Albinaria coerulea. Genetics 140: 1353-1366.

Hayashi, J. I., H. Yonekawa, O. Gotoh, J. Watanabe and Y. Tagashira, 1978. Strictly maternal inheritance of rat mitochondrial DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 83: 1032-1038.

Hoarau, G., S. Holla, R. Lescasse, W. T. Stam, and J. L. Olsen, 2002. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platychthys flesus*. Mol. Biol. Evol. 19(12): 2261-2264.

Hoeh, R. W., T. D. Stewart, , W. B. Sutherland, and E. Zouros, 1996. Cytochrome c oxidase sequence comparisons suggest an unusually high rate of mitochondrial DNA evolution in *Mytilus* (Bivalvia: Mollusca). Mol. Biol. Evol. 13: 418-421.

Hoeh, R. W., T. D. Stewart, C. Saavedra, W. B. 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, R. W., T. D. Stewart, W. B. Sutherland, and E. Zouros, 1991. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of Mytilus mitochondrial DNA. Science 251: 1488-1490.

Hoffmann, R. J., J. L. Boore, W. M. Brown, 1992. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis.* Genetics 131: 397-412.

Hutchison, C. A. D., J. E. Newbold, S. S. Potter, and M. H. Edgell, 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. Nature 251: 536-538.

Ingman M., H. Kaessmann, S. Paabo, and U. Gyllensten, 2000. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. Nature 408: 708-713.

Jorde, L. B., and M. Bamshad, 2000. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. Science 288: 1931.

Karlin, S., and S. Lessard, 1986. Theoretical studies on sex ratio evolution. Monographs in Population Biology. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Kenchington, E., B. MacDonald, L. Cao, D. Tsagkarakis, and E. Zouros, 2002. Genetics of Mother-Dependent Sex Ratio in Blue Mussels (Mytilus spp.) and Implications for Doubly Uniparental Inheritance of Mitochondrial DNA. Genetics 161: 1579-1588.

Kivisild, T., and R. Villems, 2000. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. Science 288: 1931.

Kondo, R., Y. Satta, E. T. Matsura, H. Ishiwa, N. Takahata, and S. I. Chigousa, 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in Drosophila. Genetics 126: 657-663.

Kroon, A. M., W. M. de Vos, and H. Bakker, 1978. The herogeneity of rat-liver mitochondrial DNA. Biochem. Biophys. Acta 519: 269-273.

Kumar, S., P. Hedrick, T. Dowling and M. Stoneking, 2000. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. Science 288: 1931.

Ladoukakis, E. D., and E. Zouros, 2001a. Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. Mol. Biol. Evol. 18(7): 1168-1175.

Ladoukakis, E. D., and E. Zouros, 2001b. Recombination in animal mitochondrial DNA: Evidence from published sequences. Mol. Biol. Evol. 18(11): 2127-2131.

Ladoukakis, E. D., Saavedra, A., Magoulas, and E. Zouros, 2002. Mitochondrial DNA variation in species with two mitochondrial genomes: The case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. Molecular Ecology, 11(4): 775.

Lecanidou, R., Douris, V. and G. C. Rodakis, 1994. Novel features of metazoan mtDNA revealed from sequence analysis of three mitochondrial DNA segments of the land snail Albinaria turrita (Gastropoda: Clausiliidae). Journal of Molecular Evolution 38: 369-382.

Liu, H. P., J. B. Mitton, and S. K. Wu, 1996. Paternal mitochondrial DNA differentiation far exceeds maternal DNA and allozyme differentiation in the freshwater mussel *Anodonda grandis grandis.* Evolution 50: 952-957.

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.

Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook, 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. New York.

Marshall, H. D., C. Newton, and K. Ritland, 2001. Sequence-repeat polymorphisms exhibit the signature of recombination in lodgepole pine chloroplast DNA. Mol. Biol. Evol. 18: 2136-2138.

Maynard Smith, J., 1978. The evolution of sex. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Merriweather, A., and A. F. Kaestle, 1999 Mitochondrial recombination (continued)? Science 285: 835.

Parsons, T. L., and J. A. Irwin, 2000. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. Science 288: 1931.

Passamonti, M., and V. Scali. 2001. Gender-associated mtDNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia). Curr. Genet. 39: 117-124.

Pont-Kingdon, G., C. G. Vassort, R. Warrior, R. Okimoto, C. T. Beagley and R. Wolstenholme, 2000. Mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* (Cnidaria): a sequence that includes an end of one linear molecule and the genes for I-rRNA, tRNA(f-met), tRNA(Trp), COII, and ATPase8. J. Mol. Evol. 51: 404-415.

Quesada, H., D. A. Skibinski and D. O. Skibinski, 1996. Sex-biased heteroplasmy and mitochondrial DNA inheritance in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Lmk. R. Curr. Genet. 29: 423-426.

Quesada, H., R. Wenne, 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(5): 655-665.

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.

Rawson, P. D., C. L. Secor, and T. J. Hilbish, 1996. The effects of natural hybridization on the regulation of doubly uniparental mtDNA inheritance in blue mussel (*Mytilus* spp.). Genetics. 144: 241-248.

Rayssiguier, C., D. S. Thaler and M. Radman, 1989. The barrier to recombination between Escerichia coli and Salmonella typhimurium is disrupted in mismatch-repair mutants. Nature 342: 396-401.

Saavedra, C., M. I. Reyero, and E. Zouros, 1997. Male-depended doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis.* Genetics 145: 1073-1082.

Satta, Y., Toyohara, N., Ohtaka, C., Tatsuno, Y., Watanabe, T.K., Matsuura, E.T., Chigusa, S.I. and Takahata, N., (1988). Dubious maternal inheritance of mitochondrial DNA in *D. simulins* and evolution of *D. mauritiana*. Genet. Res., 52: 1-6.

Satuito, C. G., K. Natoyama, M. Yamazaki, and N. Fusetani, 1994. Larval development of the mussel *Mytilus edulis galloprovincialis* cultured under laboratory conditions. Fisheries Science 60(1): 65-68.

Selva, E. M., L. New, G. F. Crouse and R. S. Lahue, 1995. Mismatch cerrection acts as a barrier to homeologous recombination in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 139: 1175-1188.

Shitara, H., J. I. Hayashi, S. Takahama, H. Kaneda, and H. Yonekawa, 1998. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the subsequent paternal leakage. Genetics 148: 851-857.

Skibinski, D. O. F., C. Gallagher, and C. M. Beynon, 1994a. Mitochondrial DNA inheritance Nature 368: 817-818.

Skibinski, D. O. F., C. Gallagher, and C. M. Beynon. 1994b. Sex-limited mitochondrial-DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. Genetics 138:801-809.

Stewart, D. T., C. Saavedra, R. R. Stanwood, R. R. Ball, and E. Zouros. 1995. Male and female mitochondrial DNA lineages in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group. Mol. Biol. Evol. 12:735-747.

Stewart, D. T., E. R. Kenchington, R.K. Singh, and E. Zouros, 1996. Degree of selective constraint as an explanation of the different rates of evolution of gender spesific mitochondrial DNA lineages in the mussel *Mytilus*. Genetics 143: 1349-1357.

Sutherland, B., D. Steward, E. R. Kenchington, and E. Zouros, 1998. The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels *Mytilus edulis*: Implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondria Ldna. Genetics 148: 341-347.

Taanman, J. W., 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochim. Biophys. Acta. 1410: 103-123.

Terret, J.A., Miles, S. And Thomas, R.H., (1996). Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: Pulmonata). J. Mol. Evol. 42: 160-168.

Wolstenholme, D. R., 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. Int. Rev. Cytol. 141: 173-216.

Zbawicka, M., D. O. F. Skibinski, and R. Wenne 2003. Doubly uniparental trabsnission of mitochondrial DNA length variants in the mussel *Mytilus trossulus*. Marine Biology 142: 455-460.

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. Acad. Sci. USA 91:7463-7467.

Βενέτης, Κ., 2003. Προσωπική επικοινωνία.

Λαδουκάκης, Ε. Δ., 1998. Μία φυλογεωγραφική μελέτη του μυδιού της Μεσογείου Mytilus galloprovincialis. Διατριβή για το Μεταπτυχιακό Τίτλο Ειδίκευσης. Τμήμα Βιολογία. Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τσαγκαράκης, Δ. Π., 2002. Ανίχνευση πολυμορφισμών στο mtDNA των μυδιών με την μέθοδο RFLP. Εργαστηριακή Άσκηση (Rotation) για Μεταπτυχιακό Τίτλο Ειδίκευσης. Τμήμα Βιολογία. Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

M83756: Accesion No. of Hoffmanns' sequence. Sequence in alignment corresponds to bases 1154-5297 of M83756.

```
Gene            ...--> 12S-rRNA
Positions of alingment: 10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120
                         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TATCCATAGTTTAAAACAGAAGTTCCTCTTAACTAAACATTTGGTTGTCAAAGAGAAATAAATAGGCGGTGTCTGAGATAGAAAACAGGGGATCCTGGGTGTTAAAGGATAACCCACCTA 120
ef.w22-F        TATCCATAGTTTAAAACAGAAGTTCCTCTTAACTAAACATTTGGTTGTCAAAGAGAAATAAATAGGCGGTGTCTGAGATAGAAAACAGGGGATCCTGGGTGTTAAAGGATAACCCACCTA 120
em.w143-M       TATCCATAGTTTAAAATAAAAATTCCTCTTAACTAAACATTTGGTTGTCAAAGAGAAATAAATAGGCGGTGTCTGAGATA-AAAACAGGGGATCCTGGGTGTTAAAGGACAATCCACCTA 119

                                  150                                       200                                       240
                         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        CATTTGAGCCTTGTCTTATTAGTGCGTGTGTATGGTTGTTTACTCTAATATGGTGAGTGTCCGGGTAAAAATTTTGGTTATTGCTAAAGTTAGGGTTTATTTTATTGGTTAAGTTTGGTA 240
ef.w22-F        CATTTGAGCCTTGTCTTATTAGTGCGTGTGTATGGTTGTTTACTCTAATATGGTGAGTGTCCGGGTAAAAATTTTGGTTATTGCTAAAGTTAGGGTTTATTTTATTGGTTAAGTTTGGTA 240
em.w143-M       CATTTGAGCCCTGTCTTATTAATGCGTGTGTATGGTTGTTTACTCTAATATGGTAAGTGTCCGGGTAAAATTTTTGGTTGTTTCTAAGGTTAACTTCATCTTTGCTGGTT---------- 229

                                                          300                                       350       360
                         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        AAATAAGTTAGCTTTAGCTAGATGCAGCTAGTAGAAGGGGTTTATTCACCTTTGTAGCACAGCTTCAAAAATAATTCAGATTGACATGCAGCTTATGATAAGGTTAATCTGGGATACAGT 360
ef.w22-F        AAATAAGTTAGCTTTAGCTAGATGCAGCTAGTAGAAGGGGTTTATTCCCCTTTGTAGCACAGCTTCAAAAATAATTCAGATTGACATGCAGCTTATGATAAGGTTAATCTGGGATACAGT 360
em.w143-M       -----AGTTAG-TTT-----GATGTAGCTA-TTGTAGTCAATCAT--ACGTCTGTAGTACAGCCGCAAAAATAATTCAGATTAACATGCAGCTAATGGCAGGGTCAATCTGGGATACAGT 335

                                            400                                       450                                       480
                         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TGCAGCTTAAGCAATAGTTT-AAATTTAAACTATTAAGTAGTAT---AAATAATCTAACGAATAAGGTAAGAAAACTTGACTTTGAAGAAGGACTTGTAAGTAAGGGTT-GAAAATAAAA 475
ef.w22-F        TGCAGCTTAAGCAATAGTTTTAAATTTAAACTATTAAGTAGTAT---AAATAATCTAACGAATAAGGTAAGAAAACTTGACTTTGAAGAAGGACTTGTAAGTAAGGGTT-GAAAATAAAA 476
em.w143-M       TGCAATGTAAGCAATAATTTAAAGCTTGAACTACTAAAAAGTATTTCAAACAATTTAACGAATAAGGAAAGAAAACTTGACTTTGAAGAAGGGCTTGTAAGTAAGGGTTTAAAAATAAAA 455

                                                                                                                 12S-rRNA -->||--> tRNA-Gly
                                 500                                       550                                       ||       600
                         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        CCGCCCTGAATACAATCAGATGAGTACTAATCGCCCGTCGCTCGCGGGGAAACCTGTGAAAAGTCGTAACAAGGTAGCAGTAACGGAAGTTGTTGCTAGGCCATAATATGCATATATAGT 595
ef.w22-F        CCGCCCTGAATACAATCAGATGAGTACTAATCGCCCGTCGCTCGCGGGGAAACCTGTGAAAAGTCGTAACAAGGTAGCAGTAACGGAAGTTGTTGCTAGGCTATAATATGCATATATAGT 596
em.w143-M       TGATCCTGAATATAATCAGATGAGTACTAATCGCCCGTCGCTCGCGAGGAAACTTGTGAAAAGTCGTAACAAGGTAGCGGTAACGGAAGTTGTTGCTAGGATATAGAGTGTGTACATAGT 575

                                                 tRNA-Gly -->||--> tRNA-Asn                                                  -->|
                                                      650    ||                                  700                           720
                         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        AAACAATATTATATTTGCCTTCCAAGCAAAAGTCCTAATAAAATTAGTGTATGCTGGCCAAATAGTTTAACTTAAAACGTTGAGCTGTTAATTCAAAATTGCAGTAATTTGCTTTGGCTT 715
ef.w22-F        AAACAATATTATATTTGCCTTCCAAGCAAAAGTCCTAATAAAATTAGTGTATGCTGGCCAAATAGTTTAACTTAAAACGTTGAGCTGTTAATTCAAAATTGCAGTAATTTGCTTTGGCTT 716
em.w143-M       AAACAACATTATATTTGCCTTCCAAGCAAAAGTTCTAATAAAATTAGTGTACACTGGCTAGATAGTTTAAGTTAAAACATTGGACTGTTAATTCAAAATTGTAGTAAGTTGCTTTAGCTT 695

                |--> tRNA-Glu                                          -->| |--> tRNA-Cys
                |                         750                              |          800                                       840
                         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        GCTTAAGTAGTTTAGGGAAAACATAAGATTTTCATTCTTAAGTCAGAAAGCAGTTCTCTTAAGTTGTGCTTAGTAGTTAATGTTAATATAACTAAGAACTGCAAATTCTTCATAGTCTAG 835
ef.w22-F        GCTTAAGTAGTTTAGGGAAAACATAAGATTTTCATTCTTAAGTCAGAAAGCAGTTCTCTTAAGTTGTGCTTAGTAGTTAATGTTAATATAACTAAGAACTGCAAATTCTTCATAGTCTAG 836
em.w143-M       GCTTAAGTAGTTTAAAAAAAACATAAAATTTTCATTTTTAAGTCAGAAAGTATTTCTCTTAAGTTGTGCTTAGTAGTTAATATTTGTATAACTAAGAACTGCAAATTCTTCATAGTCTAA 815
```

```
                    -->||--> tRNA-Ile                                                  -->|                |--> tRNA-Gln
                 850   ||                                        900                    |                |          950       960
                        .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TTAGACCTAAGCTTAGTGCCACGTGGGGGATGATCCAGTTGCTTTGATGAAGCAGAGCTCAAAATTAGATTTTTGGCACTTAGAGTTTTGGAGTGTTATAAAGAAGTATTGTGGTACGTA 955
ef.w22-F        TTAGACCTAAGCTTAGTGCCACGTGGGGAATGATCCAGTTGCTTTGATGAAGCAGAGCTCAAAATTAGATTTTTGGCACTTAGAGTTTTGGAGTGTTATAAAGAAGTATTGTAGTACGTA 956
em.w143-M       CTAGACCTGAGCTTAGTGCCACGTGGGGAATGATCCAGTTGCTTTGATGAAGCAAAGCTCAAAACTAGCTTTTTGACACTTTAGGACTCAAGAATTTATAAAGAAGTATCATAGTACGTG 935

                                                  -->|     |--> tRNA-Asp                                                  -->||--> 16S-rRNA
                                             1000   |     |                         1050                                   ||  1080
                        .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        GGACTTTGATCCCTAAAGAGAAAGTTAAAGCTTTTCTTTATAATTATCTTAAAAGTAGTTAATATATAACTTAGAATTGTCAGTTCTAGATTCCTTTTACTAAGGCTTTTTATAAGTTAT 1075
ef.w22-F        GGACTTTGATCCCTAAAGAGAAAGTTAAAGCTTTTCTTTATAATTATCTTAAAAGTAGTTAATATATAACTTAGAATTGTCAGTTCTAGATTCCTTTTACTAAGGCTTTTTATAAGTTAT 1076
em.w143-M       GGGCTTTGATCCCCAAAGAAAAAGTCAAAGCTTTTCTTTATAACTGACTTAAAAGTAGTTAATATATAACTTAGAATTGTCAGTTCTAAATACCTTTTATCCGGGCTTTTTATAAAGCAT 1055

                                1100                                                1150                                                1200
                        .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        CTTTACTA-AAAAGACGTGCATAATTGTTTTGTGAAAAGTGGACTTGAACAAAGTTAGTATAAATAAATTTTAGTACCTTTTGCATAAGGGTTTTTCAAGATCAATTTAAGAATTTAATT 1194
ef.w22-F        CTTTACTA-AAAAGACGTGCATAATTGTTTTGTGAAAAGTGGACTTGAACAAAGTTAGTATAAATAAATTTTAGTACCTTTTGCATAAGGGTTTTTCAAGATAAATTTAAGAATTTAATT 1195
em.w143-M       --TAGCTACAAAAGATACCCCTAAATGTTTTGTAAAAAGTGGGTTTAAGGAATAACAGTATAAGTAAAGTTTAGTACCTTTTGCATAAGGGTTTTTCGAGATAAATTTAAGAATTTAATT 1173

                                                    1250                                                1300                    1320
                        .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TTCCCGAATAAAAGAGAGTTATTTTTTTGAGTTAGGAAATCGTGGTAGAGATTTGATTAAACTAAAGAATGGCGGCTAGATACTATTCGCGCTTTTAGATATCTGGNNGGCTTAAAAAAA 1314
ef.w22-F        TTCCCGAATAAAAGAGAGTTATTTTTTTGAGTTAGGAAATCGTGGTAGAGATTTGATTAAACTAAAGAATGGCGGCTAGATACTATTCGCGCTTTTAGATATCTGGTTGGCTTAAAAAAA 1315
em.w143-M       TTCCCGAATGAAAGAGAGTTATTTTATAAAGTTAA-AAATCGTGGTAGAGATTTCATTAAATTATAAAATAGAGGCTAGATACTATTCGCGCTTTCAGATATCTGGTTGGCTTAGAAATA 1292

                                    1350                                                1400                                    1440
                        .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TGTGTAAGCATTTTCTTTAACTAGTTAAGGGGTAAAATTTTTTGGGTTAAGCTGAAAAATGGTGAAATTGATGTTTAAAAA-TTTTTGGTTTCTATCAGGCTTTAAACTGGCTATTAGGT 1433
ef.w22-F        TGTGTAAGCATTTTCTTTAACTACTTAAGGGGTAAAATTTTTTGGGTTAAGCTGAAAAATGGTGAAATTGATGTTTAAAAAATTTTTGGTTTCTAT-AGGCTTTAAACTGGCTATTAGGT 1434
em.w143-M       TGTGTAAGCATTACTCTTAAATATTTAAGGAGCAAAATTCTTTGGGTTAAGCTGAAAAATGTTAAAATTGATGCCAATAAAAAAATTGGTTTTTAT-AGGCTTTAAACTAGCCACTAGGC 1411

                      1450                                                1500                                                1550      1560
                        .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        ATTAGTGTATTTTAACTAAAACCAAACGGAGAAAAAGATTAATT-GGGGTCATCATCTATTTAAAAATAAGCCTATGATCGGAGGGTCAGTAATTATGATAAAAACGAGTAAAAATATTA 1552
ef.w22-F        ATTAGTGTATTTTAACTAAAACCAAACGGAGAAAAAGATTAATT-GGGGTCATCATTTATTTAAAAATAAGCCCATGATCGGAGGGTCAGTAATTATGATAAAAACGAGTAAAAATATTA 1553
em.w143-M       ACAAATTTATTTTAACTAAAACCAAACGGTGAAAAA-ATTAATTAGGGGCTGTCATTTACTTTGGAATAGGCCTGTGGTTGTAGAACTAAAAATTATGATAAAAACGAGTAAAAATATTT 1530

                                    1600                                                1650                                    1680
                        .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TTTTTTTGGTATCACTGTTTTGTTTTACCTTAAAAGATTGACGGCTAAATAAAGGTTTTTAAATGAACTCGGCAAACTAAACTTCTCGACTGTTTAACAAAAACATTTCCTTTTGATGTA 1672
ef.w22-F        TTTTTTTGGTATCACTGTTTTGTTTTACCTTAAAAGATTGACGGCTAAATAAAGGTTTTTAAATGAACTCGGCAAACTAAACTTCTCGACTGTTTAACAAAAACATTTCCTTTTGATGTA 1673
em.w143-M       TTTGGTTGGTGTGACCTTACTGTTACACCTTAAAAAACTAACTGTATTATAAAACTTTTTAAACGAACTCGGCAAACTAAACTTCTCGACTGTTTAACAAAAACATTTCCTTTTGATATA 1650

                                1700                                                1750                                                1800
                        .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        AGTAAAAGGTAGTCCCTGCCCAGTGCAACTAGAGTAATGTCTGTTGTAAACGGCGGCGTTAACGTGAGCGTCCTAAGGTAGCGCGATAATTTGCTTTTCAATTGAAGGATGGTATGAAAG 1792
ef.w22-F        AGTAAAAGGTAGTCCCTGCCCAGTGCAACTAGAGTAATGTCTGTTGTAAACGGCGGCGTTAACGTGAGCGTCCTAAGGTAGCGCGATAATTTGCTTTTCAATTGAAGGATGGTATGAAAG 1793
em.w143-M       AGTAAAAGGTAGTCCCTGCCCTATGCAACTAAACTAACGTTTGTTGTAAATGGCGGCGTTAACGTGAGCGTCCTAAGGTAGCGCGATAATTTGCTCTTTAATTGAAGGATGGTATGAAAG 1770
```

```
                                                              1850                                              1900                1920
                         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        GGTTAACGAAGAAGGTGCTGTGTCTAAAAATTCAATTTAAACTAACTTTAAGGTGAAGAGGCCTTTATGTAAAAGAAGGACGACAAGACCCTATGAAGCTTTATCTTAATTGGAGCTCTC 1912
ef.w22-F        GGTTAACGAAGAAGGTGCTGTGTTTAAAAATTCAATTTAAACTAACTTTAAGGTGAAGAGGCCTTTATGTAAAAGAAGGACGACAAGACCCTATGAAGCTTTATCTTAATTGGAGCTCTC 1913
em.w143-M       GGTTAACGAAGAAGATGCTGTATCTAAAAATTTAATTTAAACTAACTTTAAGGTGAGGAGGCCTTTATGTAAAAGAAGGACGACAAGACCCTATGAAGCTTTATCTTAATTGAAGGTTTT 1890

                                          1950                                              2000                                    2040
                         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        AGGCTCTTATACGATTTTGATGGGAGATCAGTAGAAATAAGTCTTCTACTATCATATTAATCTTACTAGTATTTCCTAACTTTATATGTGTGGCTAGCTACTCTAGGGATAACAGCGCAA 2032
ef.w22-F        AGGCTCTTATACGATTTTGATGGGAGATCAGTAGAAATAAGTCTTCTACTATCATATTAATCTTACTAGTATTTCCTAACTTTATATGTGTGGCTAGCTACTCTAGGGATAACAGCGCAA 2033
em.w143-M       AGGCTTTTATACGATTTTGATGGGAGATCAGTAAAAATAAGTCTTTTACTATAACGTCAATCTTACTAGAATTTACTAATTTTATATGTGTGATTAGCTACTCTAGGGATAACAGCGCAA 2010

                      2050                                              2100                                              2150      2160
                         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TTTCTCCCGAAAGATGGTATTGGAGGGGAAGATTGCGACCTCGATGTTGGCTTTAGATATCCTAGAGGCGGAGAAGCTTCTGATGGTGGGTCTGTTCGCCCTTTAAAATCTAACATGAGC 2152
ef.w22-F        TTTCTCCCGAAAGATGGTATTGGAGGGGAAGATTGCGACCTCGATGTTGGCTTTAGATATCCTAGAGGCGTAGAAGCTTCTGATGGTGGGTCTGTTCGCCCTTTAAAATCTAACATGAGC 2153
ef.w24-F                                                          ...TAGATATCCTAGAGGCGTAGAAGCTTCTGATGGTGGGTCTGTTCGCCCTTTAAAATCTAACATGAGC 67
em.143-F                                                          ...TAGATATCCTAGAGGCGTAGAAGCTTCTGATGGTGGGTCTGTTCGCCCTTTAAAATCTAACATGAGC 67
em.w128-F                                                         ...TAGATATCCTAGAGGCGTAGAAGCTTCTGATGGTGGGTCTGTTCGCCCTTTAAAATCTAACATGAGC 67
gf.1-F                                                            ...TAGATATCCTAGAGGCGTAGAAGCTTCTGATGGTGGGTCTGTTCGCCCTTTAAAATCTAACATGAGC 67
gm.6-F                                                            ...TAGATACCCTAGAGGCGTAGAAGCTTCTGATGGTGGGTCTGTTCGCCCTTTAAAATCTAACATGAGC 67
gm.12-F                                                           ...TAGATATCCTAGAGGCGTAGAAGCTTCTGATGGTGGGTCTGTTCGCCCTTTAAAATCTAACATGAGC 67
em.w143-M       TTTCCCCCGAAAGATGGTATTGGAGGGGAAGATTGCGACCTCGATGTTGGCTTTAGGTGTCCTAGAGGTGTAGAAGCCTCTAAGGGTAGGTCTGTTCGCCCTTTAAAATCTAACATGAGC 2130
em.w128-M                                                         ...TAGGTGTCCTAGAGGTGTAGAAGCCTCTAAGGGTAGGTCTGTTCGCCCTTTAAAATCTAACATGAGC 67
gm.6-M                                                            ...TAGGTGTCCTAGAGGTGTAGAAGCCTCTAAGGGTAGGTCTGTTCGCCCTTTAAAATCTAACATGAGC 67
gm.12-M                                                           ...TAGGTGTCCTAGAGGTGTAGAAGCCTCTAAGGGTAGGTCTGTTCGCCCTTTAAAATCTAACATGAGC 67
                                                                     *** *  ******** * ****** *** * *** ********************************

                                                    2200                                              2250                          2280
                         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TGAGTTCAGAACGGCGTGAGCTAGTTCAGTTTCTATCCTCTTTTTGAAA-TGAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTTTTTCGCTAAAGCAATGCTTTGTCACAAATCTGTGGTTGCATAAA 2271
ef.w22-F        TGAGTTCAGAACGGCGTGAGCTAGTTCAGTTTCTATCCTCTTTTTGAAA-TGAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTTTTTCGCTAAAGCAATGCTTTGTCACAAATCTGTGGTTGCATAAA 2272
ef.w24-F        TGAGTTCAGAACGGCGTGAGCTAGTTCAGTTTCTATCCTCTTTTTGAAA-TGAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTTTTTCGCTAAAGCAATGCTTTGTCACAAATCTGTGTTTGCATGAA 186
em.143-F        TGAGTTCAGAACGGCGTGAGCTAGTTCAGTTTCTATCCTCTTTTTGAAA-TGAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTTTTTCGCTAAAGCAATGCTTTGTCACAAATCTGTGGTTGCATAAA 186
em.w128-F       TGAGTTCAGAACGGCGTGAGCTAGTTCAGTTTCTATCCTCTTTTTGAAA-TGAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTTTTTCGCTAAAGCAATGCTTTGTCACAAATCTGTGGTTGCATAAA 186
gf.1-F          TGAGTTCAGAACGGCGTGAGCTAGTTCAGTTTCTATCCTCTTTTTGAAA-TGAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTTTTTCGCTAAAGCAATGCTTTGTCACAAATCTGTGGTTGCATAAA 186
gm.6-F          TGAGTTCAGAACGGCGTGAGCTAGTTCAGTTTCTATCCTCTTTTTAAAA-TGAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTTTTTCGCTAAAGCAATGCTTTGTCACAAATCTGTGGTTGCATAAA 186
gm.12-F         TGAGTTCAGAACGGCGTGAGCTAGTTCAGTTTCTATCCTCTTTTTGAAA-TGAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTTTTTCGCTAAAGCAATGCTTTGTCACAAATCTGTGTTTGCATGAA 186
em.w143-M       TGAGTTCAGAACGGCGTGAGCTAGTTCAGTTTCTATCCTCTTTTAAAAA-TAAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTTTTTCGCTAAAGTAATGCTTTGGCCCAGCCCTATAATTACACAAA 2249
em.w128-M       TGAGTTCAGAACGGCGTGAGCTAGTTCAGTTTCTATCCTCTTTTAAAAAATAAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTTTTTCGCTAAAGTAATGCTTTGGCCCAGCCCTATAATTACACAAA 187
gm.6-M          TGAGTTCAGAACGGCGTGAGCTAGTTCAGTTTCTATCCTCTTTTAAAAA-TAAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTTTTTCGCTAAAGTAATGCTTTGGCCCAGCCCTATAATTACACAAA 186
gm.12-M         TGAGTTCAGAACGGCGTGAGCTAGTTCAGTTTCTATCCTCTTTTAAAAA-TAAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTTTTTCGCTAAAGTAATGCTTTGGCCCAGCCCTATAATTACACAAA 186
                ********************************************  *** * *********************************** ********* * **   ** *  ** **
```

```
                                        16S-rRNA -->||--> UAR - REGION-1
                                 2300                   ||                      2350                                                  2400
                          .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TAATAGGGTATAATAGGTTGATTAGCCTATAGGAAGGGTTACCTTTTATGTAAATGAGCATATTGCTTGGTGATAGGTTGTTAAGTGTGGTAGATT-TTA----GAGAAGTCCTATGTAG 2386
ef.w22-F        TAATAGTGTATAATAGGCTGATTAGCCTATAGGAAGGGTTACCTTTTATGTAAATGAGCATATTGTTTGGTGATAGGTTGTTAAGTGTGGTAGATT-TTA----GAGAAGTCCTATGTAG 2387
ef.w24-F        TAATAGTGTGTAATAGGTTGATTAGCTTATAGAAAGGGTTACCTTTTATGTAAATGAGCATATTGTTTGGTGATAGGTTGTTAAGTGTGGTAGATT-TTA----GAGAAGTCCTATGTAG 301
em.143-F        TAATAGTGTATAATAGGTTGATTAGCCTATAGGAAGGGTTACCTTTTATGTAAATGAGCATATTGTTTGGTGATATGTTGTTAAGTGTGGTAGATT-TTA----GAGAAGTCCTATGTAG 301
em.w128-F       TAATAGTGTATAATAGGTTGATTAGCCTATAGGAAGGGTTACCTTTTATGTAAATGAGCATATTGTTTGGTGATATGTTGTTAAGTGTGGTAGATT-TTA----GAGAAGTCCTATGTAG 301
gf.1-F          TAATAGGGTATAATAGGTTGATTAGCCTATAGGAAGGGTTACCTTTTATGTAAATGAGCATATTGTTTGGTGATAGGTTGTTAAGTGTGGTAGATT-TTA----GAGAAGTCCTATGTAG 301
gm.6-F          TAATAGTGTATAACAGGTTGATTAGCCTATAGGAAGGGTTACCTTTTATGTAAATGAACATATTGTTTGGTGATAGGTTGTTAAGCGTGGTAGATT-TTA----GAGGAGTCCTATGTAG 301
gm.12-F         TAATAGTGTATAATAGGTTGATTAGCCTATAGAAAGGGTCACCTTTTATGTAAATGAGCATATTGTTTGGTGATAGGTTGTTAAGTGTGGTAGATT-TTA----GAGAAGTCCTATGTAG 301
em.w143-M       TATTAATACATGACGAGCTGATCAACTCATAAAAAGGGCTGCCTTTTATGTAAAT-AG------GTT--------GGCTAT-AAGTGTTCTAGATTACTGCAGGGAGGGGTCC-----AG 2348
em.w128-M       TATTAATACATGACGAGCTGATCAACTCATAAAAAGGGCTGCCTTTTATGTAAAT-AG------GTT--------GGCTAT-AAGTGTTCTAGATTACTACAGGGAGGGGCCC-----AG 286
gm.6-M          TATTAATACATGACGAGCTGATCAACTCATAAAAAGGGCTGCCTTTTATGTAAAT-AG------GTT--------GGCTAT-AAGTGTTCTAGATTACTGCAGGGAGGGGTCC-----AG 285
gm.12-M         TATTGGTACATGACGGGCTGATCAACTCATAAAAAGGGCTGCCTTTTGTGTAAA-GAA------GTT--------GTCTAT-AAGTGTTCTAGACTTCTATAGGGAGGGGCTC-----AG 285
                ** *      * *   * **** * *  ***  *****   ****** ******  *       * *           * * *** **  **** *  *     ***  *  *     **

                                                        2450                                                  2500              2520
                          .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        CTGGTTTAAAGCAGGCTTTTTAG-TAAAAAAAGACCTGCTGT-TGAGGGGAGTGTGAGATACTT-TTCTTTCACATAAA--AATTCCATGTTTGGAATAGATGCAGGAGATGGGGGCTTA 2501
ef.w22-F        CTGGTTTAAAGCAGGCTTTTTAG-TAAAAAAAGACCTACTGT-TGAGGGGAGTGTGAGATACTT-TTCTTTCACATAAA--AATTCCATGTTTGGAATAGATGCAGGAGATGGGGGCTTA 2502
ef.w24-F        CTGGTTTAAAGCAGGCTTTTTAG-TAAAAAAAGACCTGCTGT-TGAGGAGAGCGTGAGATACTT-TTTTTTCACATAAA--AATTCCATGTTTGGAATAGATGCAGGAGATGGGGGCTTA 416
em.143-F        CTGGTTTAAAGCAGGCTTTTTAG-TAAAAAAAGACCTGCTGT-TGAGGGGAGTGTGAGATACTT-TTCTTTCACATAAA--AATTCCATGTTTGGAATAGATGCAGGAGATGGGGGCTTA 416
em.w128-F       CTGGTTTAAAGCAGGCTTTTTAG-TAAAAAAAGACCTGCTGT-TGAGGGGAGTGTGAGATACTT-TTCTTTCACATAAA--AATTCCATGTTTGGAATAGATGCAGGAGATGGGGGCTTA 416
gf.1-F          CTGGTTTAAAGCAGGCTTTTTAG-TAAAAAAAGACCTGCTGT-TGAGGGGAGTGTGAGATACTT-TTCTTTCACATAAA--AATTCCATGTTTGGAATAGATGCAGGAGATGGGGGCTTA 416
gm.6-F          CTGGTTTAAAGCAGGCTTTTTAG-TAAAAAAAGACCTGCTGT-TGAGGAGGGTGTGAGATACTT-TTCTTTCGCATAAA--AATTCCATGTTTGGAATAGATGCAGGAGATGGGGGCTTA 416
gm.12-F         CTGGTTTAAAGCAGGCTTTTTAG-TAAAAAAAGACCTGCTGT-TGAGGAGAGTGTGAGATACTT-TTCTTTCACATAAA--AATTCCATGTTTGGAATAGATGCAGGAGATGGAGGCTTA 416
em.w143-M       TTAATTAGAAGTAA--TTCTCACCTTGAAAAGG-CTTGTTTTTTGGGTA---TATGAGGGGTTTGTTCAAACA-ACAAACTAATTCC-GGG--GGGAGAGATGTA--AG-T-----CTTT 2450
em.w128-M       TTAATTAGAAGTAA--TCCTCACCTTGAAAAGG-CCTGGTCTTTGGGTA---TACGAGGGGTTTGTTCAAACA-ACAAACTAATTCCAGGG--GGGAGAGATGTG--AG-T-----CTTT 389
gm.6-M          TTAATTAGAAGTAA--TTCTCACCTTGAAAAGG-CTTGTTTTTTGGGTA---TATGAGGGGTTTGTTCAAACA-ACAAACTAATTCC-GGG--GGGAGAGATGTA--AG-T-----CTTT 387
gm.12-M         TTAATTAGAAGTAA--CCC-CACCTTGAAAAGG-CCTATCTTTTGAGTA---TATGGGGGGTTTGTTCAAACA-ATAAACTAATTTTAGGA--GGAAAAAGTGTG--AG-T-----CTTT 387
                 *  **  *** *        *  *  **** * * *    * ** *        * *    ** *     *  * ***  ****    *   ** * *  **    ** *     ***

                                 2550                                                  2600                                          2640
                          .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TGCCAGGGAGGAGAAGGTGACGGTGCCCAAGCACGTGTTACTCCTGAAGCTGTATGGGGTGGTGGAGATACACCTGTAAATGCGGGCGCCGAAGCCGCTCCTGATAATGCGGAGGA---- 2617
ef.w22-F        TGCCAGGGAGGAGAAGGTGACGGTGCCCAAGTACGTGTTACTCCTGAAGCTGTATGGGTTGGTGGAGACACAGCTGTAAATGCGGGCGCCGAAGCCGCTCCTGATAATGCGGAGGG---- 2618
ef.w24-F        TGCCAGGGTGGAGAAGGTGACGGTGCCCAAGTACGTGTTACTCCTGAAGCTGTATGGGGTGGTGGAGACACAGCTGTAAATGCGGGCGCCGAAGCCGCTCCTGATAATGCGGAGGA---- 532
em.143-F        TGCCAGGGAGGAGAAGGTGACGGTGCCCAAGTACGTGTTACTCCTGAAGCTGTATGGGGTGGTGGAGACACAGCTGTAAATGCGGGCGCCGAAGCCGCTCCTGATAATGCGGAGGG---- 532
em.w128-F       TGCCAGGGAGGAGAAGGTGACGGTGCCCAAGTACGTGTTACTCCTGAAGCCGTATGGGGTGGTGGAGACACAGCTGTAAATGCGGGCGCCGAAGCCGCTCCTGATAATGCGGAGGG---- 532
gf.1-F          TGCCAGGGAGGAGAAGGTGACGGTGCCCAAGTACGTGTTACTCCTGAAGCTGTATGGGGTGGTGGAGATACACCTGTAAATGCGGGCGCCGAAGCCGCTCCTGATAATGCGGAGGA---- 532
gm.6-F          TGTCAGGGTGGAGAAGGCGACGGTGCCCAAGCACGTGTTATTCCTGAAGCTGTAGGGGGTGGTGGAGACACAGCTGTAAATGCGGGCGCCGAAGCCGCTCCTGATAATGCGGAGGATGCG 536
gm.12-F         TGCCAAGGTGGAGAAGGTGACGGTGCCCAAGTACGTGTTACTCCTGAAGCTGTATGGGGTGGTGGAGACACAGCTGTAAATGCGGGCGCCGAAGCCGCTCCTGATAATGCGGAGGA---- 532
em.w143-M       T----------AATAA-TAG--------AAATAAG-GCTAC-CCAAAAA--ATATGG--TG-TGTAG---CG--TGTGTATAC--------AAGT--------ATA-CGCAAAAAA---- 2518
em.w128-M       T----------AAAAA-TAG--------AAATAAG-GCTAC-CCAAAAA--ATATGG--TG-TGTAG---CG--TGTGTATAC--------AAGT--------ATA-CGCAAAAAA---- 457
gm.6-M          T----------AATAA-TAG--------AAATAAG-GCTAC-CCAAAAA--ATATGG--TG-TGTAG---CG--TGTGTATAC--------AAGT--------ATA-CGCAAAAAA---- 455
gm.12-M         T----------AAAAAATAA--------AAACAAG-GCTAC-CCAAAAA--ATATGG--TG-TGTAG---CG--TGTGTATAC--------AAGT--------ATA-CGCAAAAAA---- 456
```

```
                 *          *  *             **  * * * **  **  **    ** **  ** ** **   *   ***  ** *        ***         ***  **  *

                       2650                                          2700                                                  2750      2760
                                .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F         ---------------------------------GGCGGGGGGGTACGTTGGAGACG-CTATGCCCTTCCGTTAGAAGAAGTAGGTTGTAGTTCAGTTGAAGAAAGAGAAAGGGCTGTCGCG 2704
ef.w22-F         ---------------------------------GGCGGGGCGGTACGTTGGAGACGGCTATGCCCTTCCGTTAGAAGAAGTAGGTTGTAGTTCAGTTGAAGAAAGAGAAAGGGCTGTCGCG 2706
ef.w24-F         ---------------------------------GGCGGGGTGGAACGTTGGAGACGGCTATGCCCTTCCGTTAGAAGAAGTAGGTTGTAGTTCAGTTGAAGAAAGAGAAAGGGCTGTCGCG 620
em.143-F         ---------------------------------GGCGGGGCGGTACGTTGGAGACGGCTATGCCCTTCCGTTAGAAGAAGTAGGTTGTAGTTCAGTTGAAGAAAGAGAAAGGGCTGTCGCG 620
em.w128-F        ---------------------------------GGCGGGGCGGTACGTTGGAGACGGCTATGCCCTTCCGTTAGAAGAAGTAGGTTGTAGTTCAGTTGAAGAAAGAGAAAGGGCTGTCGCG 620
gf.1-F           ---------------------------------GGCGGGGCGGTACGTTGGAGACGGCTATGCCCTTCCGCTAGAAGAAGTAGGTTGTAGTTCAGTTGAAGAAAGAGAAAGGGCTGTCGCG 620
gm.6-F           GGCGCCGAAGCCGCTCCTGATAATGTGGAGGTGGCGGGGTGGAACGTTGGAGACGGCTATGCCCTTCCGGTAGAAGAAGTAGGTTGTAGTTCAGTTGAAGAAAGAGAAAGGGCTGTCGCG 656
gm.12-F          ---------------------------------GGCGGGGTGGAACGTTGGAGACGGCTATGCCCTTCCGTTGGAAGAAGTAGGTTGTAGTTCAGTTGAAGAAAGAGAAAGGGCTGTCGCG 620
em.w143-M        ---------------------------------AA-AAAATAAAAAA-------------------------AAAAAAAATA--CCATAAAT--GCTTAAAAAT----AAGG--TGTT--- 2567
em.w128-M        ---------------------------------AA-AAAA-AAAAAA-------------------------AAAAAAAATA--CCATAAAT--GTTTAAAAAT----AAGG--TGTT--- 505
gm.6-M           ---------------------------------AA-AAA-TAAAAAA-------------------------AAAAAAA-TA--CCATAAAT--GCTTAAAAAT----AAGG--TGTT--- 502
gm.12-M          ---------------------------------AA-AAAA-AAAAAA--AAAAAAAAAA-------------AAAAAAAATA--CCATAAAT--GTTTGAAAAT----AAGG--TATT--- 514
                                                            *                             ** ** **     **  *  * *  * **     ****  * *
```

NOTE: The long insertion in gm.6-F is an almost perfect repeat of the preceding sequence.

```
       Alignment positions:    2601 TGCGGGCGCCGAAGCCGCTCCTGATAATGCGGAGGA 2636
                               ||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
                               2637 TGCGGGCGCCGAAGCCGCTCCTGATAATGTGGAGGT 2672
```

```
                                                 2800                                                  2850                          2880
                                .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F         GAGCCTG-AAGTTGTATCTAGCGGTTTCGAGCCGGTCGAGCAGAGAGGTGTGCTAATTAGCGAAGCTAGTGGTGCCATTAATGCTGGCAAAGAAAGGTTTAGTGATTGTTA-ATGCCCAG 2822
ef.w22-F         GAGCCTG-AAGTTGTATCTAGCGGTTTCGAGCCGGTCGAGCAGAGAGGTGTGCTAATTAGCGAAGCTAGTGGTGCCATTAATGCTGGCAAAGAAAGGTTTAGTGATTGTTA-ATGCCCAG 2824
ef.w24-F         GAGCCTG-AAGTTGTATCTAGCGGTTCCGAGCCGGTCGAGCAGAGAGGTGTGCTAATTAGCGAAGCTAGTGGTGCCATTAATGCTGGCAAAGAAAGGTTTAGTGATTGTTA-ATGCCCAG 738
em.143-F         GAGCCTG-AAGTTGTATCTAGCGGTTTCGAGCCGGTCGAGCAGAGAGGTGTGCTAATTAGCGAAGCTAGTGGTGCCATTAATGCTGGCAAAGAAAGGTTTAGTGATTGTTA-ATGCCCAG 738
em.w128-F        GAGCCTG-AAGTTGTATCTAGCGGTTTCGAGCCGGTCGAGCAGAGAGGTGTGCTAATTAGCGAAGCTAGTGGTGCCATTAATGCTGGCAAAGAAAGGTTTAGTGATTGTTA-ATGCCCAG 738
gf.1-F           GAGCCTG-AAGTTGTATCTAGCGGTTTCGAGCCGGTCGAGCAGAGAGGTGTGCTAATTAGCGAAGCTAGTGGTGCCATTAATGCTGGCAAAGAAAGGTTTAGTGATTGTTA-ATGCCCAG 738
gm.6-F           GAGCCTG-AAGCTGTATCTAGCGGTTCCGAGCCGGTCGAGCAGAGAGGTGTGCTAATTAGCGAAGCTAGTGGTGCCATTAATGCTGGCAAAGAAAGGTTTAGTGATTGTTA-ATGCCCAG 774
gm.12-F          GAGCCTG-AAGTTGTATCTAGCGGTTCCGAGCCGGTCGAGCAGAGAGGTGTGCTAATTAGCGAAGCTAGTGGTGCCATTAATGCTGGCAAAGAAAGGTTTAGTGATTGTTA-ATGCCCAG 738
em.w143-M        ---TCTACACGCT-----TAAC--TTCCCTGCCACT---GC-------T-TG-TAAC-AG--AAG-TAGT--CGCC-TCTGTCCCCCT--------GTTT-----TT-TTATACGTAAAA 2644
em.w128-M        ---TCTACACGCT-----TAAC--TTCCCTGCCACT---GC-------T-TG-TAAC-AG--AAG-TAGT--CGCC-TCTGTCCCCCT--------GTTT-----TT-TTATACGTAAAA 582
gm.6-M           ---TCTACACGCT-----TAAC--TTCCCTGCCACT---GC-------T-TG-TAAC-AG--AAG-TAGT--CGCC-TCTGTCCCCCT--------GTTT-----TT-TTATACGTAAAA 579
gm.12-M          ---TCTACAAGCT-----TAAC--TTTCCTGCCACT---GC-------T-TG-TAAC-AG--AAG-TAGT--CGCC-TCTGTCCCCCT--------GTTT-----TT-TTATACGTAAAA 591
                     **  * * *     ** *  ** *  ***  *   **       * ** ***  **  *** ****   *** *   * *            ****     ** *** * *   *
```

END OF **REGION-1** -->||--> **REGION-2** [NOTE: NEW STARTING POINT: starts imediately after gap length<of 2 positions -Dec.02]

```
                                 ||        2900                                          2950                                          3000
                                .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F         GTCTAAAGGTTGCTGGTGCGC-TAATAATCGTACTTTATTAAGATAATTTATCAGCTAAGCAAAATTACACTTAAATAGTGTTTGCTAGGCTTTACTATATTTTATTTTAAAATTGGTCC 2941
ef.w22-F         GTCTAAAGGTTGCTGGTGCGC-TAATAATCGTACTTTATTAAGATAATTTATCAGCTAAGCAAAATTACACTTAAATAGTGTTTGCTAGGCTTTACTATATTTTATTTTAAAATTGGTCC 2943
ef.w24-F         GTCTAAAGGTTGCTGGTGCGC-TAATAATTGTACTTTATTAAGATAATTTATCAGCTAAGCAAAATTACACTTAAATAGTGTTTGCTAGGCTTTACTATATTTTATTTTAAAATTGGTCC 857
em.143-F         GTCTAAAGGTTGCTGGTGCGC-TAATAATCGTACTTTATTAAGATAATTTATCAGCTAAGCAAAATTACACTTAAATAGTGTTTGCTAGGCTTTACTATATTTTATTTTAAAATTGGTCC 857
em.w128-F        GTCTAAAGGTTGCTGGTGCGC-TAATAATCGTACTTTATTAAGATAATTTATCAGCTAAGCAAAATTACACTTAAATAGTGTTTGCTAGGCTTTACTATATTTTATTTTAAAATTGGTCC 857
gf.1-F           GTCTAAAGGTTGCTGGTGCGC-TAATAATCGTACTTTATTAAGATAATTTATCAGCTAAGCAAAATTACACTTAAATAGTGTTTGCTAGGCTTTACTATATTTTATTTTAAAATTGGTCC 857
```

```
gm.6-F          GTCTAAAGGTTGCTGGTGCGT-TAATAATCGTACTTTATTAAGATAATTTATCAGCTAAGCAAAATTACACTTAAATAGTGTTTGCTAGGCTTTACTATACTTTATTTTAAAATTGGTCC 893
gm.12-F         GTCTAAAGGTTGCTGGTGCGC-TAATAATTGTACTTTATTAAGATAATTTATCAGCTAAGCAAAATTACACTTAAATAGTGTTTGCTAGGCTTTACTATATTTTATTTTAAAATTGGTCC 857
em.w143-M       GTCTA----CTGTTGGCACATACGAGAGC--TACTCTACTAAAATAACTTATAAACTAAGCGAAAGCACACCTAGTTAGTCCTTATTAGGCATT--TATATTTTATTCAAAAATTGGGCC 2756
em.w128-M       GTCTA----CTGTTGGCACATACGAGAGC--TACTCTACTAAAATAACTTATAAACTAAGCGAAAGCACACCTAGTTAGTCCTTATTAGGCATT--TATATTTTATTCAAAAATTGGGCC 694
gm.6-M          GTCTA----CTGTTGGCACATACGAGAGC--TACTCTACTAGAATAACTTATAAACTAAGCGAAAGCACACCTAGTTAGTCCCTATTAGGCATT--TATATTTTATTCAAAAATTGGGCC 691
gm.12-M         GTCTA----CTGTTGGCACATATGGGAGC--TACTTTACTGAAATAACTTATAAACTAAGCGAAAGCACACCTAATTAGTTCTTATTAGGCATT--TATACTTTATTCAAAAATTGGGCC 703
                *****     ** ***  *       *    **** ** *   **** **** * ****** ***  **** **  ****   *  ***** **  **** ******  ******** **

                     END OF REGION-2 -->||--> REGION-3
                                        ||                  3050                                        3100            3120
                          .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TATGCGGCTGCAAACATTTAATTA-ACCTCGTTTTAG-TTATGCTCTATAGCCTGTAAAATATAAAGCTGCAAAGCTTTACAGCTGATAAGCATTTGTCAGAGTCATGTGAGACTTAACC 3059
ef.w22-F        TATTCGGCTGCAAACATTTAATTA-ACCTCGTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGTAAAATATAAAGCTGCAAAGCTTTACAGCTGATAAGCATTTGTCAGAGTCATGTGAGACTTAACC 3062
ef.w24-F        TATGCGGCTGCAAACATTTAATTA-ACCTCGTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGTAAAATATAAAGCTGCAAAGCTTTACAGCTGATAAGCATTTGTCAGAGTCATGTGAGACTTAACC 976
em.143-F        TATGCGGCTGCAAACATTTAATTA-ACCTCGTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGTAAAATATAAAGCTGCAAAGCTTTACAGCTGATAAGCATTTGTCAGAGTCATGTGAGACTTAACC 976
em.w128-F       TATGCGGCTGCAAACATTTAATTA-ACCTCGTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGTAAAATATAAAGCTGCAAAGCTTTACAGCTGATAAGCATTTGTCAGAGTCATGTGAGACTTAACC 976
gf.1-F          TATGCGGCTGCAAACATTTAATTA-ACCTCGTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGTAAAATATAAAGCTGCAAAGCTTTACAGCTGATAAGCATTTGTCAGAGTCATGTGAGACTTAACC 976
gm.6-F          TATGCGGCTGTAAACATTTAATTA-ACCTCGTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGTAAAATATAAAGCTGCAAAGCTTTACAGCTAATAAGCATTTGTCAGAGTCATGTGAGACTTAACC 1012
gm.12-F         TATGCGGCTGCAAACATTTAATTA-ACCTCGTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGTAAAATATAAAGCTGCAAAGCTTTACAGCTGATAAGCATTTGTCAGAGTCATGTGAGACTTAACC 976
em.w143-M       CGTATG-TTACAGATTCCTACCCATACCTCGTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGT-AAATATAAAGCTGCAAAGCTTTACAGCTAATAAGCATTTGTCAGAGTCATGTGAGACTTAACC 2874
em.w128-M       CGTATG-TTACAGATTCCTACCCATACCTCGTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGTAAAATATAAAGCTGCAAAGCTTTACAGCTAATAAGCATTTGTCAGAGTCATGTGAGACTTAACC 813
gm.6-M          CGTATG-TTACAGATTCCTACCCATACCTCGTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGT-AAATATAAAGCTGCAAAGCTTTACAGCTAATAAGCATTTGTCAGAGTCATGTGAGACTTAACC 809
gm.12-M         CGTATG-TTACAGATCCCTAGCCATACCTCGTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGTAAAATATAAAGCTGCAAAGCTTTACAGCTAATAAGCATTTGTCAGAGTCATGTGAGATTTAACC 822
                  *  *  *  * *    **   * ************ ****************** ***************************** ************************** ******

                                  3150                                        3200                                        3240
                          .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TAATTAGTAAAAAAACAAGCGGAAATTTAAAGCCTCAAATCCTAGAGTTATCGAATTTTTATGGTAAATTGTAAACTGTAAAA-TGGGATTTGGAAAGGTCTAATTTTTCTCGTTTGACT 3178
ef.w22-F        TAATTAGTAAAAAAACAAGCGGAAATTTAAAGCCTCAAATCCTAGAGTTATCGAATTTTTATGGTAAATTGTAAACTGTAAAA-TGGGATTTGGAAGGGTCTAATTTTTCTCGTTTGACT 3181
ef.w24-F        TAATTAGTAAAAAAACAAGCGGAAATTTAAAGCCTCAAATCCTAGAGTTATCGAATTTTTATGGTAAATTGTAAACTGTAAAA-TGGGATTTGGAAAGGTCTAATTTTTCTCGTTTGACT 1095
em.143-F        TAATTAGTAAAAAAACAAGCGGAAATTTAAAGCCTCAAATCCTAGAGTTATCGAATTTTTATGGTAAATTGTAAACTGTAAAA-TGGGATTTGGAAAGGTCTAATTTTTCTCGTTTGACT 1095
em.w128-F       TAATTAGTAAAAAAACAAGCGGAAATTTAAAGCCTCAAATCCTAGAGTTATCGAATTTTTATGGTAAATTGTAAACTGTAAAA-TGGGATTTGGAAAGGTCTAATTTTTCTCGTTTGACT 1095
gf.1-F          TAATTAGTAAAAAAACAAGCGGAAATTTAAAGCCTCAAATCCTAGAGTTATCGAATTTTTATGGTAAATTGTAAACTGTAAAA-TGGGATTTGGAAAGGTCTAATTTTTCTCGTTTGACT 1095
gm.6-F          TAATTAGTAAAAAAACAAGCGGAAATTTAAAGGCTCAAATCCCAGAGTTATCGAATTTTTATGGTAAATTGTAAACTGTAAAAATGGGATTTGGGA-GGTCTAATTTTTCTCGTTTGACT 1131
gm.12-F         TAATTAGTAAAAAAACAAGCGGAAATTTAAAGCCTCAAATCCTAGAGTTATCGAATTTTTATGGTAAATTGTGAACTGTAAAA-TGGGATTTGGAAGGGTCTAATTTTTCTCGTTTGACT 1095
em.w143-M       TAATTAGTAAAAAAACAAGCGGAAATTTAAAGGCTCAAATCCTAGAGTTATCGAATTTTTATGGTAAATTGTAAACTGTAAAAATGGGATTTGGAA-GGTCTAATTTTTCTCGTTTGACT 2993
em.w128-M       TAATTAGTAAAAAAACAAGCGGAAATTTAAAGGCTCAAATCCTAGAGTTATCGAATTTTTATGGTAAATTGTAAACTGTAAAAATGGGATTTGGAA-GGTCTAATTTTTCTCGTTTGACT 932
gm.6-M          TAATTAGTAAAAAAACAAGCGGAAATTTAAAGGCTCAAATCCTAGAGTTATCGAATTTTTATGGTAAATTGTAAACTGTAAAAATGGGATTTGGAA-GGTCTAATTTTTCTCGTTTGACT 928
gm.12-M         TAATTAGTAAAAAAACAAGCGGAAATTTAAAGGCTCAAATCCTAGAGTTATCGAATTTTTATGGTAAATTGTAAACTGTAAAAATGGGATTTGGAAAG-TCTAATTTTTCTCGTTTGACT 941
                ******************************** ********* ***************************** ********** *** ****** * * *********************

                      3250                                        3300                                        3350      3360
                          .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TAATTCTGGTTGCTCACGTGACTTACCTGGGTTTGAAAACTAGACTATATCTATCTTAAAATCAAAATATATATATAAATCAAGGTTAAAAAAAATTCCCAAAGCGTAAATTATCGGTTG 3298
ef.w22-F        TAATTCTGGTTGCTCACGTGACTTACCTGGGTTTGAAAACTAGACTATATCTATCTTAAAATCAGAATATATATATAAATCAAGGTTAAAAAAAATTCCCAAAGCGTAAATTATCGGTTG 3301
ef.w24-F        TAATTCTGGTTGCTCACGTGATTTACCTGGGTTTGAAAACTAGACTATATCTATCTTAAAATCAGAATATATATA--AATCAAGGTTAAAAAAAATTCCCAAAGCGTAAATTATCGGTTG 1213
em.143-F        TAATTCTGGTTGCTCACGTGATTTACCTGGGTTTGAAAACTAGACTATATCTATCTTAAAATCAGAATATATATATAAATCAAGGTTAAAAAAAATTCCCAAAGCGTAAATTATCGGTTG 1215
```

```
em.w128-F       TAATTCTGGTTGCTCACGTGATTTACCTGGGTTTGAAAACTAGACTATATCTATCTTAAAATCAGAATATATATATAAATCAAGGTTAAAAAAAATTCCCAAAGCGTAAATTATCGGTTG 1215
gf.1-F          TAATTCTGGTTGCTCACGTGACTTACCTGGGTTTGAAAACTAGACTATATCTATCTTAAAATCAGAATATATATATAAATCAAGGTTAAAAAAAATTCCCAAAGCGTAAATTATCGGTTG 1215
gm.6-F          TAATTCTGGTTGCTCACGTGATTTACCTGGGTTTGAAAACTAGACTATATCTATCTTAAAATCAGAATATATATATAAATCAAGGTTTAAAAAAATTCCCAAAGCGTAAATTATCGGTTG 1251
gm.12-F         TAATTCTGGTTGCTCACGTGATTTACCTGGGTTTGAAAACTAGACTATATCTATCTTAAAATCAGAATATATATACAAATCAAGGTTAAAAAAAATTCCCAAAGCGTAAATTATCGGTTG 1215
em.w143-M       TAATTCTGGTTGCTCACGTGATTTACCTGGGTTTGAAAACTAGACTATATCTATCTTAAAATCAGAATATATATATAAATCAAGGTTTAAAAAAATTCCCAAAGCGTAAATTATCGGTTG 3113
em.w128-M       TAATTCTGGTTGCTCACGTGATTTACCTGGGTTTGAAAACTAGACTATATCTATCTTAAAATCAGAATATATATATAAATCAAGGTTTAAAAAAATTCCCAAAGCGTAAATTATCGGTTG 1052
gm.6-M          TAATTCTGGTTGCTCACGTGATTTGCCTGGGTTTGAAAACTAGACTATATCTATCTTAATATCAGAATATATATATAAATCAAGGTTTAAAAAAATTCCCAAAGCGTAAATTATCGGTTG 1048
gm.12-M         TAATTCTGGTTGCTCACGTGATTTACCTGGGTTTGAAAACTAGACTATATCTATCTTAAAATCAGAATATATATATAAATCAAGGTTTAAAAAAATTCCCAAAGCGTAAATTATCGGTTG 1061
                ********************* ** ********************************** **** **********  ********** ************************* ******

      REGION-3 -->||--> REGION-4 [NOTE: NEW STARTING POINT (Dec 02): purine rich area]
                  ||                    3400                                    3450                                    3480
                          .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        TTTAAAGAAATAACTAATAAAGGCTAACAAAAAA--GGAAAAAAAAAAAA-AGTA----ACATACTAATGCCTGGGGGGGGG-CTGACCGGAGGGGGG-AAAAGGGAAAATATAGGTCCAC 3409
ef.w22-F        TTTAAAGAAATAACTAATAAAGGCTAACAAAAAA--GGAAAAAAAAAAAA-AGTA----ACATACTAATGCCTGGGGGGG---CTGACCGGAGGGGGGAAAAAGGGAAAATATAGGCCTAC 3411
ef.w24-F        TTTAAAGAAATAACTAATAAAGGCTAACAAAAAA--GGAAAAAAAAAAA--AGTA----ACACACTAATGCCTGGGGGGG---CTGACCGGAGGGGGGAAAAAGGGAAAATATAGGCTTAC 1322
em.143-F        TTTAAAGAAATAACTAATAAAGGCTAACAAAAAA--GGAAAAAAAAAAAA-AGTA----ACACACTAATGCCTGGGGGGG---CTGACCGGAGGGGGGAAAAAGGGAAAATATAGGCCTAC 1325
em.w128-F       TTTAAAGAAATAACTAATAAAGGCTAACAAAAAA--GGAAAAAAAAAAAA-AGTA----ACACACTAATGCCTGGGGGGG---CTGACCGGAGGGGGGAAAAAGGGAAAATATAGGCCTAC 1325
gf.1-F          TTTAAAGAAATAACTAATAAAGGCTAACAAAAAA--GGAAAAAAAAAAAAAAGTA----ACATACTAATGCCTGGGGGGG---CTGACCGGAGGGGGGAAAAAGGGAAAATATAGGCCTAC 1326
gm.6-F          TTCAAAGAACTAACTAATAAAGGCTAACAAAAAA--AAAAAAAAAAAA--AGAA----ACACACTAATGCCTGGGGGGG---CTGACCGGAGGGGGGGAAAAGGGAAAATATAGGCCCAC 1360
gm.12-F         TTTAAAGAAATAACTAATAAAGGCTAACAAAAAA--GGAAAAAAAAAAAA-AGTA----ACACACTAATGCCTGGGGGGG---CTGACCGGAGGGGGGGAAAAGGGAAAATATAGGCCTAC 1325
em.w143-M       TTCAAAGAAATAACTAATAAAGGCTTACAAAAAA--GGAAAAAAAA----GGTAACACACACACTAATGCCTGGGGGGG---CTGGCC-TGGGGGGGGAGAAAAGAAAACA--------- 3214
em.w128-M       TTCAAAGAAATAACTAATAAAGGCTAACAAAAAAAAGGAAAAAAAAA---GGTA----ACACACTAATGCCTGGGGGGG---CTGGCC-TGGGGGGGGAGAAAAGAAAACA--------- 1152
gm.6-M          TTCAAAGAAATAACTAATAAAGGCTTACAAAAAA--GGAAAAAAA-----GGTAACACACACACTAATGCCTGGGGGGG----TAGCC-TGGGGGGGGAGAAAAGAAAACA--------- 1147
gm.12-M         TTCAAAGAACTAACTAATAAAGGCTAACAAAAAA--GGAAAAAAAAA---GGTA----ACACACTAATGCCTGGGGGGGGGACTGACC-TGGGGGG--AAAAAAGAAAATA--------- 1160
                ** ****** *************** ********    *******      * *    *** *****************    *  **   *****  * *   ***** *

                                        END OF UAR and REGION-4 -->||--> tRNA-Tyr
                          3500                                      ||   3550                                    3600
                          .         .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
M83756-F        GCGTAGAAAAAAAAAATGTGGTGTGTAAGGGACGTATAGCTATATATACAAAAAAAAAGAC-CATAGGATGGCCGAGGAATAGGTGGTGAGCTGTAAACTCATAAACAAGGCGTAAGC-C 3527
ef.w22-F        GCGTAGAAAAAAAAAATGTGGTGTGTAAGGGACGTATAGCTATATATACAAAAAAAAAGAC-CATAGGATGGCCGAGGAATAGGTGGTGAGCTGTAAACTCATAAACAAGGCGTAAGC-C 3529
ef.w24-F        GCGTAGAAAAAAAAAATGTGGTGTGTGAGGGACGTATAGCTATATATATAAAAAAAAAGAC-CATAGGATGGCC...                                           1395
em.143-F        GCGTAGAAAAAAAAAATGTGGTGTGTAAGGGACGTATAGCTATATATACAAAAAAAAAGAC-CATAGGATGGCC...                                           1398
em.w128-F       GCGTAGAAAAAAAAAA-TGTGGTGTGTAAGGGACGTATAGCTATATATACAAAAAAAAAGAC-CATAGGATGGCCGAGGAATAGGTGGTGAGCTGTAAACTCATATACAAGGCGTAAGC-C 1442
gf.1-F          GCGTAGAAAAAAAAAATGTGGTGTGTAAGGGACGTATAGCTATATATACAAAAAAAAAGAC-CATAGGATGGCC...                                           1399
gm.6-F          GCGTAGAAAAAAAAAATGTGGTGTGTAAGGGACGTATAGCTATATATATAAAAAAAAAGAC-CATAGGATGGCC...                                           1433
gm.12-F         GCGTAGAAAAAAAAAA-TGTGGTGTGTAAGGGACGTATAGCTATATATATAAAAAAAAAGAC-CATAGGATGGCC...                                           1397
em.w143-M       ------------------------------------------------------------AATTCATAAGATGGCTGAGGAAAAGGCGGTGAGCTGTAAACTCATGGACAAGG--TAGGCCC 3274
em.w128-M       ------------------------------------------------------------AACTCATAAGATGGCTGAGGAAAAGGCGGTGAGCTGTAAACTCATGGACAAGG--TAGGCCC 1212
gm.6-M          ------------------------------------------------------------AATTCATAAGATGGCT...                                           1163
gm.12-M         ------------------------------------------------------------AACTCATAAGATGGCT...                                           1176
                                                                             *  **** ******
```

```
                     tRNA-Tyr -->| |--> cytb
                                 | |                                                  3650                                                3700               3720
M83756-F        TTTCTTATGAGATGGTTGGTAACAATACTGCATATAAC---ACTAACGCGCCTAAAAGGGTTGGTCCGTGACGAAGTACAAATAAACTGGTAAAGATTATGAATGATAGATTCTATGATT 3644
ef.w22-F        TTTCTTATGAGATGGTTGGTAACAATACTGCATATAAC---ACTAACGCGCCTAAAAGGGTTGGTCCGTGACGAAGTACAAATAAACTGGTAAAGATTATGAATGATAGATTCTATGATT 3646
em.w128-F       TTTCTTATGAGATGGTTGGTAACAATA...                                                                                          1469
em.w143-M       TTTCTTATGAGATGGTCAGTAGTAATTATATAGATAACAATACTAATTTACCTAAAAAAGGTGTTACGTGGCGAAGTACGAATAAACTGGTGAAAGTTATAAACAACAGCTTTTATGACT 3394
em.w128-M       TTTCTTATGAGATGGTTGGTAGTAATTATATAGATAACAATACTAATTTACCTAAAAAAGGTGTTACGTGGCGAAGTACAAATAAACTGGTGAAAGTTATAAATAACAGCTTTTATGACT 1332

                                          3750                                              3800                                     3840
M83756-F        TGCCTTGTCCTGTAAACTTAAACGCCTGGTGAAGGTTTGGCTCTATACTAGGCTTGTGTCTGGTTATCCAACTTTTGAGGGGTCTTTTATTATCAGCCCACTACACTGCTCATGAAGACA 3764
ef.w22-F        TGCCTTGTCCTGTAAACTTAAACGCCTGGTGAAGGTTTGGCTCTATACTAGGCTTGTGTCTGGTTATCCAACTTTTGAGGGGTCTTTTATTATCAGCCCACTACACTGCTCATGAAGACA 3766
em.w143-M       TACCCTGTCCTATTAACTTAAATGCCTGGTGGAGGTTTGGGTCTATACTAGGTTTAAGGTTGGTAATCCAACTTATTAGAGGTCTTTTACTGTCAATCCACTATACTGCCCATGAAAGCA 3514
em.w128-M       TACCCTGTCCTATTAACTTAAATGCCTGGTGGAGGTTTGGGTCTATACTAGGTTTAAGGTTGGTAATCCAACTTATTAGAGGTCTTTTACTGTCAATCCACTATACTGCCCATGAAAGCA 1452

                      3850                                             3900                                             3950       3960
M83756-F        TGGCATTTGACTCTGTAGTCCACATTATGCGTAATGTGGAAAAGGGGTGAATATTGCGCAATATCCATGCAAATGGGTCTTCTATGTTCTTTATTTGCATTTATGCTCACATTGCTCGTG 3884
ef.w22-F        TGGCATTTGATTCTGTAGTCCACATTATGCGTAATGTGGAAAAGGGGTGAATATTGCGCAATATCCATGCAAATGGGTCTTCTATGTTCTTTATTGGCATTTATGCTCACATTGCTCGTG 3886
em.w143-M       TAGCATTTGATTCGGTAGTTCATATTATACGTAATGTGGAAAAAGGTTGAATGCTGCGTAATGCACATGCGAACGGGTCTTCTATGTTCTTCATTTGTATTTATGCCCATATTGGTCGTG 3634
em.w128-M       TAGCATTTGATTCGGTAGTTCATATTATACGTAATGTGGAAAAAGGTTGAATGCTGCGTAATGCACATGCGAACGGGTCTTCTATGTTCTTCATTTGTATTTATGCCCATATTGGTCGTG 1572

                                                     4000                                             4050                               4080
M83756-F        GGTTGTACTATGGGTCTTATTTGGATAAGACCGTGTGGTACTTTGGGGTACACCTGTTCTTGTTGACTATGGCTGAGGCTTTTCTCGGCTATACTCTGCCTTGGGGGCAGATATCGTACT 4004
ef.w22-F        GGTTGTACTATGGGTCTTATTTGGATAAGACCGTGTGGTACTTTGGGGTACACCTGTTCTTGTTGACTATGGCTGAGGCTTTTCTCGGCTATACTCTGCCTTGGGGGCAGATATCGTACT 4006
em.w143-M       GGCTGTATTATGGGTCTTATATAGATAAAACGGTTTGATTTTTTGGGGTACACTTATTCTTGTTAACTATGGCTGAAGCTTTTCTAGGCTACACATTACCTTGAGGTCAGATGTCCTATT 3754
em.w128-M       GGCTGTATTATGGGTCTTATATAGATAAAACGGTTTGATTTTTTGGGGTACACTTATTCTTGTTAACTATGGCTGAAGCTTTTCTAGGCTACACATTACCTTGAGGTCAGATGTCCTACT 1692

                                  4100                                             4150                                            4200
M83756-F        GGGGGGCTACTGTAATCACTAATATACTTAGAGTAAKSCCTGTGGTAGGTGAAAGGATACTTCGCTATGTATGAGGGGGGNGGACTGTGTGTAATGCAACGTTAAAGCGGTTTTACACAC 4124
ef.w22-F        GGGGGGCTACTGTAATCACTAATATACTTAGAGTAATCCCTGTGGTAGGTGAAAGGATACTTCGCTACGTATGAGGGGGGTGGACTGTGTGTAATGCAACGTTAAAGCGGTTTTACACAC 4126
em.w143-M       GAGGGGCTACTGTAATTACTAATATGCTCAGAGTTATCCCTGTAGTGGGAGAAAGTATGCTGCGTTACGTGTGAGGAGGGTGAACTGTGTGTAATTCAACTTTAAAGCGTTTTTATACGC 3874
em.w128-M       GAGGGGCTACTGTAATTACTAATATGCTCAGAGTTATCCCTGTAGTGGGAGAAAGTATGCTGCGTTACGTGTGAGGAGGGTGAACTGTGTGTAATTCAACTTTAAAGCGTTTTTATACGC 1812

                                                                      4250                                                4300               4320
M83756-F        TTCACTTCCTTTTACCGTTT---------------------------------------------------------------------------------------------------- 4144
ef.w22-F        TTCACTTCCTTTTACCGTTTGTAATAGTGGCGGTTGTTTTTTTGCACTTATTTTTTTTACATGAGAAGGGTAGTAATAACCCTTTAGGAATTGAAAGGGGCACTATATGTGTGCCTTTTC 4246
em.w143-M       TTCATTTCCTTTTACCATTTGTAATAGTAGCATTTGTTTTTATTCACCTGTTCTTCCTACACGAAAAAGGGAGCAATAATCCCTTAGGTATTGACAGGAGTACTATATGTGTTCCTTTTC 3994
em.w128-M       TTCATTTCCTTTTACCATTTGTAATAGTAGCATTTGTTTTTATTCACCTGTTCTTCCTACACGAAAAAGGGAGCAATAATCCCTTAGGTATTGACAGGAGTACTATATGTGTTCCTTTTC 1932

                                          4350                                              4400                                     4440
ef.w22-F        ATCCTTTCTATACTATTAAGGACCTCTTTGGTTATGTTTGCTTTAGGTTCTTTTTTATGTATTTAGTGTGCGTAGACCCTGAGCTTCTAGGGAATCATCTAAACTACTGGCCTGCTAACC 4366
em.w143-M       ACCCTTTTTATACTGTCAAAGACCTGTTTGGCTACGTTTGCTTCATATTTTTTTTTATGTATTTAGTGTGTGTTGACCCAGAGTTGTTAGGCAATCACTTAAACTATTGGCCTGCAAACC 4114
```

```
em.w128-M       ACCCTTTTTATACTGTCAAAGACCTGTTTGGCTACGTTTGCTTCATATTTTTTTTTATGTATTTAGTGTGTGTTGACCCAGAGTTGTTAGGCAATCACTTAAACTATTGGCCTGCAAACC 2052

                      4450         4463
                         .            .  .
ef.w22-F        CTATAAAAACGCCTATTCACGTT 4389
em.w143-M       CCATAAAAACGCCCATTCATGTG 4137
em.w128-M       CCATAAAAACACCTATTCATGTG 2075
```

M mtDNA LUR
Possible Open Reading Frame in DNAMAN1(1-936)
Insect mitochodrial code

Strand	RF	AANum	Position	Sequence
Plus	2	64	218-412	gtatacaagtATAcgcaa...acttaTAAactaa
Plus	1	54	103-267	tcttttgagtATAtgggg...taccaTAAatgtt
Plus	1	35	562-669	tttacagctaATAagcat...aattgTAAactgt
Plus	3	29	192-281	cccaaaaaatATGgtgtg...gaaaaTAAggtat
Plus	1	28	454-540	ttaggcatttATActtta...aaataTAAagctg
Plus	3	22	783-851	aaatcagaatATAtatat...ctaacTAAtaaag
Plus	2	20	761-823	aaactagactATAtctat...aagcgTAAattat
Plus	3	19	3-62	...tcagtTAAttaga
Plus	3	18	537-593	cctgtaaaatATAaagct...agattTAAcctaa
Plus	1	16	355-405	ctgtttttttATAcgtaa...tgaaaTAActtat
Plus	1	15	892-939	taacacactaATGcctgg...
Plus	2	14	2-46	...ttctaTAGggagg
Plus	2	13	851-892	gaactaactaATAaaggc...cacacTAAtgcct
Plus	1	12	679-717	aactgtaaaaATGggatt...tgactTAAttctg
Plus	3	11	402-437	ctttactgaaATAactta...ctaatTAGttctt
Plus	2	11	167-202	cttttaaaaaATAaaaac...gtgtgTAGcgtgt
Plus	1	10	268-300	aataccataaATGtttga...aagctTAActttc
Plus	3	10	480-512	ttgggcccgtATGttaca...cgtttTAGattat
Minus	2	37	527-640	cgcttagtttATAagtta...aaagtTAAgcttg
Minus	3	35	651-758	gcttgtagaaATAcctta...ttgggTAGccttg
Minus	3	28	3-89	...tttatTAGttagt
Minus	2	28	368-454	actctgacaaATGcttat...atctgTAAcatac
Minus	2	25	2-79	...tttgtTAGccttt
Minus	1	24	109-183	tgaacaaccgATAattta...tagtcTAGttttc
Minus	1	23	844-915	tactcaaaagATAggcct...acttaTAGacaac
Minus	1	19	718-777	ttttttgcgtATActtgt...tttttTAAaagac
Minus	1	15	1-48	...ggcatTAGtgtgt
Minus	3	15	831-878	caaacccccccATAtactc...ctaatTAActgag
Minus	3	15	291-338	taaaaattcgATAactct...tttacTAAttagg
Minus	1	10	475-507	caatttttgaATAaagta...ctaatTAGgtgtg
Minus	3	9	456-485	gatctgtaacATAcgggc...aagtaTAAatgcc
Minus	3	8	912-939	tagaacacttATAgacaa...