

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ηχοεντοπισμός: Μελέτη ανίχνευσης πολυμορφισμών με
βιοπληροφορική ανάλυση»**

Βασίλειος Ζουρνατζής

ΒΟΛΟΣ 2024

**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC
ENVIRONMENT**

POSTGRADUATE MASTER'S THESIS

**«Echolocation: Detection of Polymorphisms using Bioinformatic
Analysis»**

Vasileios Zournatzis

VOLOS 2024

**«Ηχοεντοπισμός: Μελέτη ανίχνευσης πολυμορφισμών με βιοπληροφορική
ανάλυση»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. **Γεώργιος Γκάφας**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυοαποθεμάτων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
2. **Εξαδάκτυλος Αθανάσιος**, Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
3. **Αμούτζιας Γρηγόριος**, Καθηγητής, Βιοπληροφορική με έμφαση στην Μικροβιολογία, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

*Στους γονείς μου
Χρήστο και Κατερίνα,
στα αγαπημένα μου αδέρφια,
Κωνσταντίνο και Ηλία,
στους ανθρώπους που με στήριξαν,
Ευδοκία και Θανάση,
και στη Luna
ως ελάχιστο ευχαριστώ
για την ανιδιοτελή τους υποστήριξη.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε ορισμένους ανθρώπους, η συμβολή και η συμπαράσταση των οποίων ήταν πολύτιμη και καθοριστική στην εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες, οφείλω, πρωτίστως, στον καθηγητή μου και επιβλέποντα της πτυχιακής μου διατριβής, κύριο Γεώργιο Γκάφα, Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυοαποθεμάτων για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εκπόνηση αυτής της εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους Αθανάσιο Εξαδάκτυλο και Γρηγόριο Αμούτζια για τις πολύτιμες συμβουλές και την επιστημονική τους καθοδήγηση.

Κρίνω, επίσης, απαραίτητο να εκφράσω εκ των προτέρων την αληθινή μου εκτίμηση προς τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής, για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου, για τις πολύτιμες υποδείξεις και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους στο σύνολό της.

Ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω σε όλους τους καθηγητές και όλες τις καθηγήτριες του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ευχαριστώ ειλικρινά τους γονείς μου για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Είμαι ευγνώμων απέναντι στην οικογένειά μου που στέκεται πάντα δίπλα μου και στηρίζει τις επιλογές και τις αποφάσεις μου, δίνοντάς μου ελπίδα και δύναμη να προσπαθώ για το καλύτερο. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για τη στήριξη και την παρουσία τους στη ζωή μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ηχοεντοπισμός (Echolocation) ή βιοσόναρ (biosonar) είναι μια φυσιολογική διαδικασία, κατά την οποία ορισμένα είδη έχουν την ικανότητα να παράγουν ηχητικά κύματα και να αντιλαμβάνονται το περιβάλλον με την ηχώ που αντανακλάται και επιστρέφει. Χρησιμοποιείται από πληθώρα διαφορετικών ειδών όπως όλα τα οδοντοκτητώδη και τις μικρές νυχτερίδες, μερικές μυγαλές και ορισμένα πτηνά, όταν η όραση είναι περιορισμένη ή ανεπαρκής. Εκτιμάται ότι στα είδη που έχουν αναπτύξει τον ηχοεντοπισμό εμφανίζεται συγκλίνουσα εξέλιξη δηλαδή οι οργανισμοί αυτοί που δεν έχουν κοντινή συσχέτιση έχουν αναπτύξει ανεξάρτητα κοινά χαρακτηριστικά για να προσαρμοστούν σε παρόμοιες ανάγκες. Στην παρούσα εργασία γίνεται η προσπάθεια ανίχνευσης μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) μεταξύ διάφορων σπονδυλωτών με βάση την ανάπτυξη ή όχι του ηχοεντοπισμού ως εξελικτικό χαρακτηριστικό με βιοπληροφορική ανάλυση. Σκοπός είναι η διερεύνηση της εξελικτικής πορείας του μηχανισμού αλλά και η διεύρυνση της γονιδιωματικής βιβλιογραφικής πληροφορίας για τον ηχοεντοπισμό. Από βάσεις δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα γονιδιώματα διαφόρων νυχτερίδων, κητωδών και ευλιπότυφων και έγινε η ευθυγράμμιση ως προς τον ιπποπόταμο. Με Γενικευμένα Γραμμικά Μοντέλα και αλγόριθμους πρόβλεψης βρέθηκαν σε ποιες θέσεις στο γονιδίωμα εμφανίζονται μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, αν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και αν αλλάζουν τα αμινοξέα ώστε να εκτιμηθεί και η πιθανή επίδραση των μεταλλάξεων στα γονίδια, ενώ με το πρόγραμμα Blast ελέγχθηκαν εάν τα παραπάνω SNPs εμφανίζονται και σε άλλα τυχαία είδη. Τα αποτελέσματα έδειξαν σταθερές διαφορές ως προς την εμφάνιση του ηχοεντοπισμού ως μηχανισμού, υποδηλώνοντας έτσι πιθανή συγκλίνουσα εξέλιξη στα είδη με ηχοεντοπισμό. Πολλοί από τους μη συνώνυμους

πολυμορφισμούς βρέθηκαν σε γονίδια που έχουν οπτικοακουστικές λειτουργίες και θα μπορούσαν δηλαδή να συσχετιστούν με την μηχανισμό του ηχοεντοπισμού, όπως τα *SLC24A1*, *NOD1* και το *SERPING1*. Τα είδη με ηχοεντοπισμό φάνηκαν να έχουν αναπτύξει καλύτερους αμυντικούς μηχανισμούς (*SASH1*, *NOD1*) και μηχανισμούς ρύθμισης (*SERPING1*, *G6PD*, *CREB3L2*, *MYO1A*). Επιπλέον, εμφανίζουν και μια κοινή συσχέτιση στην ανάπτυξη και λειτουργία νευρολογικών μηχανισμών (*PAIP1*) και δραστηριοτήτων ATP (*MAP3K19*, *GABRQ*). Οι μεταλλάξεις δείχνουν ότι τα είδη που δεν έχουν ηχοεντοπισμό ίσως να σταμάτησαν κάποτε να έχουν τόση πολύ ανάγκη τα συγκεκριμένα γονίδια για την ακοή και την όραση και να εξελίχθηκαν διαφορετικά. Αντίθετα, τα είδη χωρίς ηχοεντοπισμό έχουν κρατήσει την καλύτερη προσαρμογή στο φως (*SLC24A1*). Ο ηχοεντοπισμός αποτελεί ένας αρκετά χρήσιμος μηχανισμός για διάφορα είδη που ζουν σε απαιτητικά και μοναδικά ενδιαιτήματα. Στην παρούσα έρευνα βρέθηκαν πολυμορφισμοί σε μερικά νέα οπτικοακουστικά γονίδια που δεν έχουν παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες με ηχοεντοπισμό, αν και η ακριβής λειτουργία τους στον μηχανισμό χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, ώστε να εκτιμηθεί καλύτερα η εξελικτική πορεία του.

Λέξεις κλειδιά: Ηχοεντοπισμός, μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), συγκλίνουσα εξέλιξη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Ηχοεντοπισμός	1
1.2. Είδη με ηχοεντοπισμό	2
1.2.1. Κητώδη.....	2
1.2.2. Νυχτερίδες.....	4
1.2.3. Σκαντζόχοιροι και μυγαλές	5
1.2.4. Πτηνά	6
1.3. Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί (SNPs)	7
1.4. Συγκλίνουσα εξέλιξη.....	8
1.5. Σκοπός της εργασίας	10
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	11
2.1. Επιλογή ειδών και βάση δεδομένων	11
2.2. Ευθυγράμμιση αλληλουχιών (Alignment)	12
2.3. Bcftools	14
2.4. Επεξεργασία VCF	15
2.5. Glm ανάλυση (General linear model)	16
2.6. Πρόβλεψη γενετικών παραλλαγών SnpEff	18
2.7. Blast.....	18
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	21
3.1. Χαρακτηρισμός SNPs	21
3.2. Μη συνώνυμες μεταλλάξεις	27
3.3. Blast για άλλα είδη.....	30
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	31
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	39
Ξενόγλωσση	39
ABSTRACT	50
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	52

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ηχοεντοπισμός

Ο ηχοεντοπισμός (Echolocation) ή βιοσόναρ (biosonar) είναι μια φυσιολογική διαδικασία, κατά την οποία ορισμένα είδη έχουν την ικανότητα να αντιλαμβάνονται το περιβάλλον με τον ήχο όταν η όραση είναι περιορισμένη ή ανεπαρκής, όπως σε θολά νερά ή τη νύχτα αντίστοιχα (Jones, 2005). Τα είδη αυτά παράγουν ηχητικά κύματα που ονομάζονται κλικ (click) και μέσω του αντίλαλου (echo) μπορούν να αντιλαμβάνονται θηράματα, εμπόδια και να προσανατολίζονται στο χώρο ακόμα και χωρίς την όραση σε σκοτεινούς βιοτόπους (Parker et al., 2013; Wei, 2021).

Τα ζώα με ηχοεντοπισμό μπορούν να αντιληφθούν πόσο μακριά βρίσκονται τα αντικείμενα, μετρώντας τις χρονικές καθυστερήσεις μεταξύ της εκπομπής ήχου και της επιστροφής τους (Jones, 2005). Η κύρια λειτουργία του ηχοεντοπισμού είναι ο προσανατολισμός και ο υπολογισμός της θέσης του ατόμου σε σχέση με το περιβάλλον, αν και πολλές νυχτερίδες και δελφίνια χρησιμοποιούν επίσης τον μηχανισμό για τον εντοπισμό δυσδιάκριτων οργανισμών, την αναγνώριση του είδους καθώς και την ταχύτητα ή και την κατεύθυνση του θηράματος (Fraser et al., 2020; Jones, 2005).

Σε κατάσταση ηρεμίας οι οργανισμοί χρησιμοποιούν συνήθως το βιοσόναρ για την αναγνώριση του περιβάλλοντος, την προστασία από εχθρούς και για την αναζήτηση τροφής σε μακρινή απόσταση (Ladegaard et al., 2019). Οι δραστήριοι θηρευτές με αυτή την ιδιότητα ανιχνεύουν και πλησιάζουν το θήραμα, αυξάνοντας τον ρυθμό παραγωγής ήχου όσο πλησιάζουν, ώστε να έχουν καλύτερη εικόνα (Fraser et al., 2020). Ο ηχοεντοπισμός είναι μία ενεργειακά απαιτητική διαδικασία, με την απόσταση και το μέγεθος του αντικειμένου να παίζουν σημαντικό ρόλο (Brinkløn et al., 2022).

Έχει ειπωθεί ότι ο ηχοεντοπισμός θα μπορούσε να είναι ευρέως διαδεδομένος μεταξύ των ζώων, πιθανόν λόγω της ανάγκης πολλών ειδών στην προσαρμογή σε βιοτόπους με μειωμένη όραση (Jones, 2005), με τα ζώα συνήθως να εντοπίζονται με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά όπως μικρά μάτια, διευρυμένο εξωτερικό αυτί και παραγωγή ήχων υψηλής συχνότητας (Liu et al., 2023) αλλά και ασυμμετρία σε μερικές περιπτώσεις (Lanzetti et al., 2022). Αν και υπάρχουν αρκετά είδη που παράγουν γενικά ήχους υψηλής συχνότητας, δεν έχουν όλα την ιδιότητα του ηχοεντοπισμού (Jones, 2005).

1.2. Είδη με ηχοεντοπισμό

Ο ηχοεντοπισμός έχει εξελιχθεί σε πολλαπλές γενεές σπονδυλωτών με την μεγαλύτερη πολυπλοκότητά του στις νυχτερίδες και τις οδοντωτές φάλαινες, αν και σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, απλές μορφές ηχοεντοπισμού χρησιμοποιούνται επίσης από πολλά νυκτόβια είδη όπως σπηλαιοπούλια (cave swiflets) και ελαιοπούλια (oilbirds) (Brinkløn et al., 2013), και από μικρά νυκτόβια θηλαστικά όπως οι μυγαλές (Gould et al., 1964), τρωκτικά (He et al., 2021, p. 20), ενώ έχει εντοπιστεί ακόμα και σε μερικούς σκαντζόχοιρους (Gould, 1965; Olson, 2013). Μερικοί τυφλοί άνθρωποι, μετά από πολύχρονη εξάσκηση, αποκτούν μια μορφή ηχοεντοπισμού παράγοντας ήχους με το στόμα, ενώ παρατηρήθηκαν κατά την διαδικασία βιοσόναρ ενεργές εγκεφαλικές περιοχές που χρησιμοποιούνται φυσιολογικά για την όραση (Thaler et al., 2011; Thaler and Goodale, 2016). Εξελικτικά μπορεί να υπάρχουν διαφορές στον τρόπο χρήσης μεταξύ των ειδών λόγω των διαφορετικών ενδιαιτημάτων αλλά και εξαιτίας του μέσου διάδοσης ήχου (αέρας ή νερό) (Brinkløn et al., 2022).

1.2.1. Κητώδη

Από τα θαλάσσια θηλαστικά μόνο τα οδοντοκητώδη (Odontoceti) όπως δελφίνια, φουσητήρας, φώκαινες, μπελούγκα και φάλαινα μονόκερος χρησιμοποιούν βιοσόναρ (Au,

2012). Πρώτη σημαντική απόδειξη ηχοεντοπισμού στα οδοντοκητώδη έγινε το 1960 σε έρευνα κατά την οποία δελφίνια προσανατολίστηκαν και απέφυγαν τεχνητά εμπόδια με τυλιγμένα τα μάτια τους, χωρίς δηλαδή να χρησιμοποιήσουν την όραση τους (Au, 2012). Σύγχρονες μελέτες έχουν δείξει ότι τα δελφίνια μπορούν να χρησιμοποιήσουν ηχοεντοπισμό σε στόχους εμβέλειας πολύ πέραν των 100m (Ladegaard et al., 2019)

Ο ηχοεντοπισμός επιτρέπει στις οδοντωτές φάλαινες να προσανατολιστούν σε μεγάλη βάθος όπου η όραση είναι δύσκολη (Liu et al., 2018) και να προσαρμόσουν τη συχνότητα του βιοσόναρ για τον κατάλληλο οργανισμό στόχο στο κυνήγι (Madsen et al., 2013). Ο ρυθμός μειώνεται με την αύξηση της απόστασης και του αριθμού θηλαστικών του γκρουπ, καθώς εκτιμάται ότι προσπαθούν να μην τρομάζουν το θήραμα και ανταλλάζουν πληροφορίες μεταξύ τους αντίστοιχα κοινωνικοποιώντας (Barrett-Lennard et al., 1996). Στα ζώα αυτά παρατηρούνται οι μέγιστοι ρυθμοί ηχοεντοπισμού στο κυνήγι ώστε να καταφέρνουν να ακολουθήσουν τον στόχο (Johnson et al., 2006; Verfuß et al., 2009), ενώ είναι ένας πολύ σημαντικός μηχανισμός για την αναζήτηση τροφής, προσφέροντας μεγάλη ακρίβεια πληροφορίας (Wright et al., 2021).

Λόγω αντικρουόμενων ερμηνειών των απολιθωμάτων αρχαιοκίτων παραμένει ασαφής πότε και πώς εξέλιξαν ακριβώς οι φάλαινες την ακοή υψηλής συχνότητας που σχετίζεται με τον ηχοεντοπισμό, αν και εκτιμάται μια συγκλίνουσα εξέλιξη στα γονίδια ακοής και της σχετικής πρωτεΐνης prestin (Liu et al., 2018).

Η ακοή των κητωδών είναι πολύ ευαίσθητη και έχουν στο μεγάλο κεφάλι τους το “melon“, ένα βιοακουστικό λιπώδες όργανο και μέσο εστίασης - αναγνώρισης των ήχων που χρησιμοποιείται στον ηχοεντοπισμό, συμβάλλοντας ώστε η ακουστική ενέργεια να ρέει από το κεφάλι, στο περιβάλλον με τη μικρότερη απώλεια (Liu et al., 2018).

Όλοι οι οδοντοκίτες παράγουν σήματα ηχοεντοπισμού χρησιμοποιώντας ένα ή δύο ζεύγη φωνικών χειλιών που βρίσκονται στις ρινικές διόδους. Κατά τη διάρκεια του ηχοεντοπισμού εμφανίζονται έντονες δονήσεις στις ρινικές θύλακες, κυρίως στο δεξί μέρος (Brinkløn et al., 2022). Κάθε κλικ προβάλλεται από τους θύλακες μέσω μιας οδού χαμηλής πυκνότητας στο πεπόνι και από εκεί στο νερό (Thomas et al., 2004).

1.2.2. Νυχτερίδες

Σύμφωνα με έρευνες αποκλειστικά οι μικρές νυχτερίδες (Microchiroptera) χρησιμοποιούν ηχοεντοπισμό (περίπου 1200 είδη), παράγοντας ήχο μέσω του λάρυγγα, ενώ το γένος *Rousettus* από τις μεγάλες νυχτερίδες (Megachiroptera) και κάποια άλλα συγγενικά είδη χρησιμοποιούν ένα είδος μεταγενέστερου εξελικτικά ηχοεντοπισμού μέσω της γλώσσας ή των φτερών τους αντίστοιχα (Boonman et al., 2014; Brinkløn et al., 2022; Jones and Holderied, 2007).

Η διάκριση των νυχτεριδών γίνεται είτε μορφολογικά ή από τις διαφορετικές συχνότητες που εκπέμπουν οι νυχτερίδες, εμφανίζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ένταση μεταξύ των διαφορετικών ειδών (Fraser et al., 2020; Gannon et al., 2001; Gruden et al., 2016).

Οι νυχτερίδες κινούν τα αυτιά τους πάνω κάτω ανεξάρτητα και μπορούν να υπολογίσουν την ανύψωση από τις διαφορές έντασης που λαμβάνουν σε κάθε αυτί (Jones, 2005). Καθορίζουν την οριζόντια και κατακόρυφη γωνία των στόχων από τις διαφορές στην ένταση του ήχου που λαμβάνεται σε κάθε αφτί, ενώ και ενδείξεις σχετικά με το μέγεθος του στόχου και την υφή της επιφάνειας από τις κορυφές κοιλίες στο φάσμα συχνοτήτων της ηχούς (Brinkløn et al., 2022).

Αν και οι νυχτερίδες εκπέμπουν συνεχόμενους ήχους για την μετακίνησή τους, η διάρκεια της εκπομπής μειώνεται στο κυνήγι, παράγοντας προσαρμοσμένα γρήγορα, συχνά και σύντομα ηχητικά κύματα (Pollak and Casseday, 2012). Οι νυχτερίδες παράγουν διαφορετικές συχνότητες για τα διαφορετικά είδη-στόχοι του κυνηγιού, ενώ χρησιμοποιούν τον ηχοεντοπισμό για να βρουν μικρά έντομα και είναι ικανές να ανιχνεύσουν διαφορές στο εύρος στόχου σε 10–12 νανοδευτερόλεπτα (Jones, 2005).

Ο ήχος ταξιδεύει με 340 μέτρα ανά δευτερόλεπτο στον αέρα προς το αντικείμενο και πάλι πίσω, επομένως μια καθυστέρηση 2 χιλιοστών του δευτερολέπτου αντιστοιχεί σε εύρος 34 εκατοστών (Jones, 2005), με την τοποθεσία του αντικειμένου να προσδιορίζεται σε κάθετο και οριζόντιο επίπεδο (Pollak and Casseday, 2012). Πολλές νυχτερίδες καθορίζουν την κατακόρυφη γωνία (ανύψωση) των στόχων ερμηνεύοντας τα μοτίβα που προκαλούνται από τους ήχους που δημιουργούνται από τον τρανό (tragus), ένα κομμάτι δέρματος στο εξωτερικό αυτί (Jones, 2005). Σε σύγκριση με τις νυχτερίδες που δεν έχουν ηχοεντοπισμό, ο κοχλίας είναι σημαντικά μεγαλύτερος σε σχέση με το μέγεθος του κρανίου και η βασική μεμβράνη, όπου λαμβάνει χώρα η κωδικοποίηση συχνότητας, είναι μεγαλύτερη για τις νυχτερίδες ηχοεντοπισμού σε σύγκριση με όλα τα άλλα θηλαστικά (Kössl and Vater, 1995).

1.2.3. Σκαντζόχοιροι και μυγαλές

Διάφορα είδη μυγαλής και σκαντζόχοιρου έχουν παρατηρηθεί να χρησιμοποιούν ένα σύστημα προσανατολισμού που βασίζεται στην ηχώ για τη λήψη πρόσθετων ακουστικών πληροφοριών κατά την έρευνα του περιβάλλοντος τους (Brinkløn et al., 2022; von Merten and Siemers, 2020). Αυτό το σύστημα έχει υποστηριχθεί από αλλαγές στους ρυθμούς φωνητικών εκπομπών όταν συναντούν νέους οικοτόπους διαφορετικής πολυπλοκότητας (Sanchez et al., 2019).

Έχει προταθεί μέσα από έρευνες με μυγαλές ότι ο ήχος που παράγουν χρησιμοποιείται για μια γρήγορη και κοντινή μόνο χαρτογράφηση του περιβάλλοντος που συνοδεύεται από την μυρωδιά για περαιτέρω πληροφόρηση (Gleason et al., 2023; Sanchez et al., 2019; Siemers et al., 2009; Tomasi, 1979; von Merten and Siemers, 2020).

Μέσα από έρευνα έχουν βρεθεί για διάφορα είδη της υποοικογένειας μυγαλών *Uropsilinae* όπως το είδος *Uropsilus gracilis*, ότι χρησιμοποιούν ηχοεντοπισμό με παραγωγή υπερηχητικών ήχων με την γλώσσα (Liu et al., 2023), επιβεβαιώνοντας τις αρχικές υποθέσεις βιοσόναρ για διάφορες μυγαλές από το γένος *Sorex* (*S. vagrans*, *S. cinereus*, *S. palustris*) και *Blarina brevicauda* (Gleason et al., 2023; Gould et al., 1964).

Για τους σκαντζόχοιρους το κύριο είδος που έχει αποδειχθεί να παράγει ήχους μεγάλης συχνότητας και να θεωρείται ότι χρησιμοποιεί ηχοεντοπισμό είναι ο σκαντζόχοιρος της Μαδαγασκάρης (*Echinops telfairi*) (Gould, 1965; Krubitzer et al., 1997), που χρησιμοποιεί τον ηχοεντοπισμό για την κατανόηση του περιβάλλοντος, τον προσανατολισμό στο σκοτάδι (Olson, 2013) αλλά και την προστασία από εχθρούς και αρσενικών σκαντζόχοιρων κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου (Sebeok, 1977). Σε άλλα ευλυπότυφα όπως ο Σωληνόδοντας (*Solenodon paradoxus*), έχει βρεθεί συμπεριφορά ηχοεντοπισμού για εύρεση τροφής (Derbridge et al., 2015; Eisenberg and Gould, 1966).

1.2.4. Πτηνά

Οι μόνοι ηχοεντοπιστές που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα και δεν είναι θηλαστικά είναι δύο ομάδες πτηνών: το ελαιόπουλο (*Steatornithidae*, *Caprimulgiformes*) και αρκετά είδη swiftlet (*Apodiformes*, *Apodidae*, *Collocaliini*, *Aerodramus* spp. και *Collocalia troglodytes*) (Brinkløn et al., 2013), εντοπίζεται βιοσόναρ σε περίπου 20 υπάρχοντα είδη

πτηνών (Brinkløn and Warrant, 2017) και έχει εξελιχθεί τουλάχιστον 2-3 φορές στις γενεαλογίες των πτηνών ανεξάρτητα από άλλα είδη (Price et al., 2005; Thomassen et al., 2005).

Ο ηχοεντοπισμός των πτηνών περιορίζεται σε χαμηλότερες συχνότητες που ακούγονται από τον άνθρωπο, υποδηλώνοντας ένα σύστημα φτωχότερης ανάλυσης (Brinkløn et al., 2013). Τα πουλιά χρησιμοποιούν τις σύριγγες τους για να παράγουν ευρυζωνικά σήματα βιοσόναρ, τύπου κλικ, που τους επιτρέπουν να φωλιάζουν σε σκοτεινές σπηλιές και σήραγγες, με λιγότερη πίεση αρπακτικών (Brinkløn et al., 2013).

Σε έρευνες κάποια είδη όπως *A. hirundinacea* και *Steatornis caripensis* έπαψαν να χρησιμοποιούν ηχοεντοπισμό καθώς έβγαιναν από τη σπηλιά τους στις πιο φωτεινές συνθήκες του ανοιχτού ουρανού, υποδηλώνοντας ότι ο ηχοεντοπισμός συμπληρώνει την όραση αντί να την υποκαθιστά (Brinkløn et al., 2017; Fenton, 1975).

Τα ελαιοπούλια έχουν μια ασύμμετρη βρογχική σύριγγα (το δεξί μέρος επιτρέπει περισσότερη ροή αέρα στην παραγωγή ήχου) με την οποία παράγουν ηχοεντοπιστικά κλικ και ξεκινούν με τη σύσπαση των στερνοτραχειακών μυών που τεντώνουν την τραχεία, προκαλώντας τους χόνδρινους βρογχικούς ημι-δακτυλίους που υποστηρίζουν τις κρανιακές άκρες των εξωτερικών τυμπανικών μεμβρανών να αρθρώνονται (Suthers and Hector, 1985). Οι δυνάμεις Bernoulli που δημιουργούνται από τον αέρα που ρέει μέσω ανοίγματος της σύριγγας πιθανώς προκαλούν δόνηση των εσωτερικών και εξωτερικών τυμπανικών μεμβρανών (Brinkløn et al., 2022).

1.3. Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί (SNPs)

Ένας πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism- SNP) είναι μια διαφορά μεμονωμένης βάσης νουκλεοτιδίου μεταξύ δύο αλληλουχιών DNA

(Yang et al., 2020). Τα SNP μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την υποκατάσταση νουκλεοτιδίων είτε ως μεταπτώσεις (C/T ή G/A) είτε ως μεταστροφές (C/G, A/T, C/A ή T/G) (Edwards et al., 2007).

Καθώς η νουκλεοτιδική βάση είναι η μικρότερη μονάδα κληρονομικότητας, τα SNP παρέχουν μια σημαντική πηγή μοριακών δεικτών που είναι χρήσιμοι στη γενετική χαρτογράφηση, την κλωνοποίηση θέσης βάσει χάρτη, την ανίχνευση συσχετίσεων γονιδίων, την αξιολόγηση των γενετικών σχέσεων μεταξύ ατόμων και την εξέλιξη του γονιδιώματος (Syrjänen, 2001).

Τα SNPs μπορούν να αλλάξουν τα κωδικοποιημένα αμινοξέα (μη συνώνυμα : Missense- παραγωγή διαφορετικού αμινοξέος, Nonsense - δημιουργία ενός πρόωρου κωδικονίου τερματισμού) ή μπορεί να είναι σιωπηλά χωρίς να αλλάξουν το αμινοξύ (συνώνυμα) ή απλώς να εμφανίζονται στις μη κωδικοποιητικές περιοχές. Μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα του προαγωγέα (έκφραση γονιδίου), το αγγελιαφόρο RNA (mRNA), τη διαμόρφωση (σταθερότητα) και τον υποκυτταρικό εντοπισμό των mRNA και/ή πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση των φαινότυπων και διαφόρων λειτουργιών στον οργανισμό και στην εξελικτική πορεία τους (Shastry, 2009).

1.4 Συγκλίνουσα εξέλιξη

Η εξέλιξη θεωρείται συνήθως ότι προχωρά μέσω αποκλίσεων γονιδίων, πρωτεϊνών και τελικά φαινοτύπων (Clark et al., 2007; Hughes et al., 2010; Soskine and Tawfik, 2010), ωστόσο, παρόμοια χαρακτηριστικά μπορεί επίσης να εξελιχθούν συγκλίνοντα σε άσχετες ταξινομήσεις λόγω παρόμοιων πιέσεων φυσικής επιλογής (Grant et al., 2004; Hoy, 2012). Η προσαρμοστική φαινοτυπική σύγκλιση είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση, και πρόσφατα αποτελέσματα από διάφορα γονίδια έχουν προτείνει ότι αυτό το

φαινόμενο είναι αρκετά ισχυρό ώστε να οδηγεί επίσης σε επαναλαμβανόμενη εξέλιξη σε επίπεδο αλληλουχίας (Parker et al., 2013).

Στην εξελικτική βιολογία, η συγκλίνουσα εξέλιξη ορίζεται ως η διαδικασία κατά την οποία οργανισμοί που δεν έχουν κοντινή συσχέτιση αναπτύσσουν ανεξάρτητα παρόμοια χαρακτηριστικά για να προσαρμοστούν σε παρόμοιες ανάγκες (Kasahara, 2010). Οι μοριακές μελέτες για την εύρεση ηχοεντοπισμού χρησιμοποιούν μια συγκριτική προσέγγιση και μελετούν σχετικά γονίδια όπως για την πρωτεΐνη prestin (Li et al., 2010, 2017; Liu et al., 2022; Ren et al., 2018) ή αναζήτηση προσαρμογών σε όργανα που σχετίζονται με την ακοή όπως ο κοχλίας (Davies et al., 2013; Gabora, 2013).

Έχει προταθεί ότι η συγκλίνουσα μορφολογική εξέλιξη αποδίδεται σε συγκλίνουσα υποκατάσταση στο στρώμα αμινοξέων (Wierer et al., 2012; Zakon, 2002). Οι συγκλίνουσες υποκαταστάσεις αμινοξέων αναφέρονται σε αλλαγές από διαφορετικές προγονικές καταστάσεις στο ίδιο καταγωγικό αμινοξύ μέσα σε ένα ζεύγος κλάδων, ενώ οι παράλληλες υποκαταστάσεις ορίζονται ως ανεξάρτητες αλλαγές από το ίδιο προγονικό αμινοξύ. Η διάγνωση αντικατάστασης αμινοξέων μέσω δοκιμών ριζικών φυσικοχημικών αλλαγών έχει προταθεί ως μια ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση επιλογής σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Chai et al., 2020)

Ο ηχοεντοπισμός έχει εξελιχθεί ανεξάρτητα τουλάχιστον πέντε φορές στα θηλαστικά, με την προέλευσή του να προέρχεται ενδεχομένως από τους τελευταίους κοινούς προγόνους των νυχτερίδων και των οδοντωτών φαλαινών, καθιστώντας το ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα της εξελικτικής επαναληψιμότητας των φαινοτύπων (Liu et al., 2023). Έρευνες δείχνουν ότι η σύγκλιση δεν είναι μια σπάνια διαδικασία που περιορίζεται σε πολλούς τρόπους, αλλά αντίθετα είναι ευρέως διαδεδομένη, συνεχώς

κατανεμημένη και συνήθως καθοδηγείται από τη φυσική επιλογή που δρα σε μικρό αριθμό θέσεων ανά τόπο (Chai et al., 2020; Parker et al., 2013; Thomas and Hahn, 2015).

1.5. Σκοπός της εργασίας

Ο ηχοεντοπισμός είναι ένας σημαντικός μηχανισμός που προσφέρει τη δυνατότητα αντίληψης του περιβάλλοντος χωρίς την όραση (Jones, 2005). Προτάθηκε πριν από περισσότερα από 60 χρόνια ότι είναι ευρέως διαδεδομένος στα ζώα (Griffin, 1958), ωστόσο έχει βρεθεί ότι εξελίσσεται ανεξάρτητα σε αρκετές γενεαλογίες θηλαστικών (Liu et al., 2022, 2018). Αυτή η υπόθεση για τα περισσότερα είδη παραμένει σε μεγάλο βαθμό μη δοκιμασμένη λόγω της δυσκολίας προσδιορισμού της παρουσίας ή μη του ηχοεντοπισμού (Liu et al., 2023).

Βιβλιογραφικά οι μελέτες ολόκληρου γονιδιώματος είναι ελάχιστες για τον μηχανισμό του ηχοεντοπισμού. Στην παρούσα εργασία γίνεται η προσπάθεια ανίχνευσης πολυμορφισμών μεταξύ διάφορων σπονδυλωτών με βάση την ανάπτυξη ή όχι του ηχοεντοπισμού ως εξελικτικό χαρακτηριστικό, με την υπόθεση ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι μεταλλάξεις. Γίνεται έρευνα για τις μεταλλαγές στα ολόκληρα γονιδιώματα των ειδών, σε ποιες θέσεις εμφανίζονται μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, αν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και αν αλλάζουν τα αμινοξέα ώστε να εκτιμηθεί και η πιθανή επίδραση τους στα γονίδια. Σκοπός είναι η διερεύνηση της εξελικτικής πορείας του μηχανισμού αλλά και η διεύρυνση της γονιδιωματικής βιβλιογραφικής πληροφορίας για τα γονίδια του ηχοεντοπισμού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Επιλογή ειδών και βάση δεδομένων

Για την εύρεση των πολυμορφισμών χρησιμοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση με αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole genome sequencing – WGS). Οι αναλύσεις επιτελέστηκαν σε λειτουργικό σύστημα Linux (Ubuntu 20.04.6 LTS, 64 -bit), με διάφορα ειδικά προγράμματα γενετικής ανάλυσης.

Στην έρευνα χρησιμοποιήθηκαν διπλού διαβάσματος (paired) αλληλουχίες από γονιδιώματα, ενδεικτικά για 10 είδη με ηχοεντοπισμό (3 ευλιπότυφλα, 4 νυχτερίδες, 3 θαλάσσια θηλαστικά) και 11 (4 ευλιπότυφλα, 4 νυχτερίδες, 3 θαλάσσια θηλαστικά) αντίστοιχα συγγενικά χωρίς τον μηχανισμό. Από βάσεις δεδομένων όπως του NCBI (National Center for Biotechnology Information) και το ENA (European Nucleotide Archive) του Ευρωπαϊκού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής (EMBL-EBI), λήφθηκαν τα αρχεία από πειράματα (SRA) σε μορφή FASTQ με τις ακατέργαστες πληροφορίες. Το SRA είναι μια ευρεία συλλογή πειραματικών αλληλουχιών DNA και RNA που αντιπροσωπεύουν την ποικιλομορφία του γονιδιώματος σε όλο το δέντρο της ζωής. Μέσω αυτής της βάσης δεδομένων, οι ερευνητές μπορούν να αναζητήσουν μεταδεδομένα για αυτές τις αλληλουχίες για να εντοπίσουν τις αναγνώσεις της ακολουθίας για περαιτέρω αναλύσεις (Leinonen et al., 2011). Τα περισσότερα δείγματα που λήφθηκαν δημιουργήθηκαν από αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS), illumina.

Από τα είδη με ηχοεντοπισμό χρησιμοποιήθηκαν από ευλιπότυφλα τα *Solenodon paradoxus* (SRX10914697), *Sorex Araneus* (SRX041636), *Echinops telfairi* (SRX044029), από τις νυχτερίδες τα *Craseonycteris thonglongyai* (SRX4501349), *Rhinolophus affinis* (SRX24498502), *Murina aurata* (SRX4562095) *Megaderma lyra* (SRX317135) και τέλος από τα οδοντοκτητώδη *Physeter macrocephalus* (SRX3230009),

Orcinus orca (SRX188930), *Tursiops truncatus* (SRX200685) (Arnason et al., 2000; Di Palma et al., 2005; Johnson et al., 2018; Li, 2023; Parker et al., 2013).

Τα είδη χωρίς εντοπισμό που επιλέχτηκαν ήταν τα *Talpa europaea* (ERX11888255) *Scalopus aquaticus* (SRX4562103) *Suncus murinus* (DRX024929) *Erinaceus europaeus* (SRX110140) για τα ευλιπότυπφλα, *Pteropus giganteus* (ERX3372620), *Pteropus pselaphon* (DRX240240), *Pteropus vampyrus* (SRX708163), *Cynopterus sphinx* (SRX14404631) για τις νυχτερίδες, *Balaenoptera musculus* (SRX21471882), *Megaptera novaeangliae* (SRX2901266), *Balaenoptera physalus* (SRX11624434) για τα θαλάσσια θηλαστικά (Di Palma et al., 2005; Fouret et al., 2020; Gnerre et al., 2008; Johnson et al., 2018; Nakajima et al., 2020; Strüder-Kypke and Lynn, 2010; Wolf et al., 2022).

2.2. Ευθυγράμμιση αλληλουχιών (Alignment)

Πρώτο βήμα της ανάλυσης ήταν η ευθυγράμμιση (alignment) των αλληλουχιών των αρχείων FASTQ με το γονιδίωμα αναφοράς που έγινε μέσω του bwa mem αλγορίθμου. Το bwa mem είναι μία από τους βασικούς αλγόριθμους του προγράμματος BWA (Burrows-Wheeler Aligner, (Li and Durbin, 2009)), που χρησιμοποιείται για την ευθυγράμμιση και χαρτογράφηση (mapping) αλληλουχιών DNA σε ένα γονιδίωμα αναφοράς. Συγκεκριμένα, το mem της BWA είναι ένας γρήγορος, ακριβής αλγόριθμος για τη χαρτογράφηση αλληλουχίας DNA που διαβάζει σε ένα γονιδίωμα αναφοράς, εκτελώντας τοπική στοίχιση, παράγοντας ευθυγράμμιση για διαφορετικά μέρη της αλληλουχίας προσπαθώντας να βρει τη θέση κάθε αλληλουχίας στο γονιδίωμα αναφοράς. Προτιμάται για τη χαρτογράφηση αλληλουχιών μικρού μήκους (short reads), όπως αυτές που προκύπτουν από τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενιάς, όπως το Illumina και το αποτέλεσμα είναι ένα αρχείο SAM (Sequence Alignment/Map), το οποίο περιέχει τις

ακριβείς θέσεις των αλληλουχιών που βρέθηκαν στο γονιδίωμα και άλλες σημαντικές πληροφορίες (Houtgast et al., 2018; Vasimuddin et al., 2019).

Ως γονιδίωμα αναφοράς (reference genome) χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το γονιδίωμα του ιπποπόταμου (*Hippopotamus amphibius kiboko*, GCF_030028045.1 (Ursing and Arnason, 1998). Το πρώτο απαραίτητο βήμα ήταν η αντιστοίχιση (δημιουργία ευρετηρίου) του γονιδιώματος αναφοράς (reference.fa) που ήταν σε μορφή FASTA σε κατάλληλη μορφή αναγνώρισης (prefix) του προγράμματος (reference_indexed) με την εντολή:

```
$ bwa index -p reference_indexed -a bwtsw reference.fa
```

Η επιλογή -a bwtsw είναι η συνιστώμενη για μεγάλα γονιδιώματα, επειδή επιτρέπει στη BWA να χειριστεί γρήγορα και αποδοτικά τη μεγάλη ποσότητα δεδομένων που εμπεριέχεται στο γονιδίωμα (Lam et al., 2008).

```
$ bwa mem -t 15 -aM reference_indexed 1.fastq.gz 2.fastq.gz | samtools view -h -b -q 30 @ 10 | samtools sort --threads 10 > file.above.mapQ30.bam
```

Η παραπάνω εντολή χρησιμοποιήθηκε με το bwa mem για την ευθυγράμμιση αλληλουχιών DNA (από αρχεία FASTQ σε ζευγάρια) σε ένα γονιδίωμα αναφοράς και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν τα αποτελέσματα με το εργαλείο SAMtools για να δημιουργηθεί ένα αρχείο BAM (Binary Alignment Map) που περιέχει μόνο υψηλής ποιότητας ευθυγραμμίσεις ($\text{mapQ} \geq 30$). Η MAPQ είναι μια βαθμολογία που δείχνει πόσο αξιόπιστα μια ανάγνωση (read) έχει ευθυγραμμιστεί σε μια συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα. Υψηλότερη τιμή MAPQ σημαίνει μεγαλύτερη εμπιστοσύνη στην ακρίβεια της ευθυγράμμισης. Η -t είναι η επιλογή που καθορίζει πόσα threads θα χρησιμοποιήσει το πρόγραμμα. Τα threads είναι υπολογιστικές μονάδες που επιτρέπουν την ταυτόχρονη

εκτέλεση πολλαπλών εργασιών. Χρησιμοποιώντας περισσότερα threads, επιτυγχάνεται ταχύτερα η ευθυγράμμιση σε έναν υπολογιστή με πολλούς επεξεργαστές ή πυρήνες. Το `bwa mem` παράγει αρχεία σε μορφή SAM και το `-aM` συμβάλει στην αποφυγή λανθασμένων διπλών ευθυγραμμίσεων και στην διατήρηση των επικεφαλίδων.

Η πρώτη εντολή του samtools μετέτρεψε τα αρχεία SAM σε δυαδικά αρχεία BAM (Binary Alignment Map), διατηρώντας τις επικεφαλίδες και φιλτράροντας ποιοτικά τις αξιόπιστες χαρτογραφήσεις με $\text{score} \geq 30$, απορρίπτοντας δηλαδή τις χαμηλής ποιότητας ευθυγραμμίσεις. Το SAMtools είναι ένα πακέτο λογισμικού για την ανάλυση και το χειρισμό ευθυγραμμίσεων και είναι σε θέση να μετατρέπει σε άλλες μορφές, να ταξινομεί και να συγχωνεύει ευθυγραμμίσεις, να αφαιρεί διπλότυπα PCR, να δημιουργεί πληροφορίες ανά θέση σε μορφή `pileup`, να καλεί SNP και σύντομες παραλλαγές και να εμφανίζει τις ευθυγραμμίσεις σε κείμενο (Li et al., 2009). Η δεύτερη εντολή SAMtools ταξινόμησε τα αποτελέσματα ανά χρωμόσωμα και θέση, προετοιμάζοντας τα αρχεία για περαιτέρω επεξεργασία, όταν τελειώσουν οι μετατροπές για όλα τα είδη.

2.3. Bcftools

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα bcftools (Danecek et al., 2021) για την δημιουργία ενός αρχείου BCF (binary call format) που περιέχει τις γενετικές παραλλαγές (SNPs και τις μικρές εισαγωγές/διαγραφές - indels) από όλες τις ευθυγραμμίσεις των αναλύσεων:

```
$ bcftools mpileup -f reference_indexed -v listH | bcftools call -mv -Ob -o all_H.bcf
```

Το bcftools mpileup, διαβάζει τις ευθυγραμμίσεις από τα αρχεία BAM για κάθε θέση του γονιδιώματος και δημιουργεί μια συλλογή δεδομένων βάσει της ευθυγράμμισης για κάθε βάση στο γονιδίωμα. Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι πιθανότητες γονότυπου,

αντιπροσωπεύοντας πόσο συνεπή είναι τα παρατηρούμενα δεδομένα με τους πιθανούς διπλοειδείς γονότυπους. Ο υπολογισμός λαμβάνει υπόψη τις ιδιότητες χαρτογράφησης των αναγνώσεων, τις ποιότητες των βάσεων και την πιθανότητα τοπικής εσφαλμένης ευθυγράμμισης. Το δεύτερο βήμα, bcftools call αξιολόγησε τον πιο πιθανό γονότυπο υπό την παραδοχή της ισορροπίας Hardy-Weinberg χρησιμοποιώντας συχνότητες αλληλόμορφων που υπολογίζονται από τα δεδομένα (Danecek et al., 2021).

Το listH αναφέρεται σε αρχείο .txt με την μορφή λίστας όλων των ειδών (path file name), ενώ το -v χρησιμοποιείται για το φιλτράρισμα μόνο των θέσεων με παραλλαγές (SNPs και indels), απορρίπτοντας τις βάσεις που δεν παρουσιάζουν παραλλαγές (matches). Η επεξεργασία αυτή γίνεται στο BCF που είναι μικρότερο σε μέγεθος και έτσι βελτιώνεται η απόδοση της ανάλυσης σε σχέση με την VCF μορφή.

Τέλος, εκτελέστηκε η κατάλληλη εντολή για την μετατροπή του αρχείου από BCF σε VCF (Variant Calling Format):

```
$ bcftools view all_H.bcf > all_H.vcf
```

2.4. Επεξεργασία VCF

Στη συνέχεια, το αρχείο VCF φιλτραρίστηκε αφαιρώντας όλες τις παραλλαγές που ήταν εισαγωγές και διαγραφές (indels), κρατώντας μόνο τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς με ακριβή δεδομένα σε κάθε παραλλαγή (τουλάχιστον 80% πληροφoρίας) και έτσι δημιουργήθηκε το αρχείο all.biallelic.08.maf.recode.vcf:

```
$ vcftools --vcf all_H.vcf --remove-Indels --max-missing 0.8 --max 0.05 --recode --recode-INFO-all --out all.biallelic.08.maf
```

Τα αρχεία VCF είναι χρήσιμα για οπτική επιθεώρηση, επεξεργασία με προσαρμοσμένα σενάρια και ως μορφή ανταλλαγής δεδομένων, ενώ αποτελούν μια

μορφή ευρέως χρήσης από διάφορα λογισμικά προγράμματα βιοπληροφορικής (Zheng et al., 2017). Ο αριθμός των SNPs υπολογίζεται με την εντολή :

```
$ grep -cv "#" file.vcf
```

2.5. Glm ανάλυση (General linear model)

Δημιουργήθηκε ένα αρχείο .txt για την ομαδοποίηση των ειδών με βάση την χρήση ή όχι του ηχοεντοπισμού χωρισμένο με tab (trait.txt) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα TASSEL (Bradbury et al., 2007)

Το TASSEL (Trait Analysis by aSSociation, Evolution, and Linkage) είναι ένα λογισμικό που χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση συσχετίσεων (association analysis), την ανάλυση εξελικτικών σχέσεων (evolutionary relationships) και τη γενετική σύνδεση (linkage) και αναπτύχθηκε για την διευκόλυνση της ανάλυσης γενετικών δεδομένων, όπως SNPs, και τον εντοπισμό συσχετίσεων μεταξύ γενετικών δεικτών και φαινοτύπων (Bradbury et al., 2007). Το TASSEL είναι ένα από τα πιο δημοφιλή εργαλεία για την πραγματοποίηση GWAS (Genome-Wide Association Studies), όπου ανιχνεύονται SNPs που σχετίζονται με φαινοτυπικές παραλλαγές (Leamy et al., 2017). Αρχικά χρησιμοποιήθηκε εντολή για να ταξινομηθούν τα SNPs του VCF ανά θέση (POS ή χρωμόσωμα):

```
$ /tassel-5-standalone/run_pipeline.pl -Xmx50g -SortGenotypeFilePlugin inputFile  
file.vcf -outputFile file_sort -fileType VCF
```

Η Γενικευμένη Γραμμική Μοντελοποίηση GLM χρησιμοποιείται συχνά σε μελέτες συσχέτισης σε όλο το γονιδίωμα για να βρεθούν οι παραλλαγές DNA που σχετίζονται με συγκεκριμένους φαινοτύπους (Clayton and Leung, 2007; Hilbe, 2011). Η γραμμική εντολή του tassel που ακολούθησε συνδύασε (combine3) τα γενετικά δεδομένα από το

αρχείο VCF (input1) με τα φαινοτυπικά δεδομένα από το αρχείο trait.txt (input2), περιέχοντας μόνο τα κοινά δεδομένα (intersect), για την ανίχνευση αυτών των συσχετίσεων με γραμμικά μοντέλα (FixedEffectLMPlugin). Έκανε 1000 μεταθέσεις για να εκτιμήσει τη σημαντικότητα των αποτελεσμάτων (nperm 1000) και φίλτραρε τα αποτελέσματα με p-value μεγαλύτερο από 0.05:

```
$ /tassel-5-standalone/run_pipeline.pl -Xmx50g -fork1 -vcf file_sort.vcf -fork2 -
importGuess trait.txt -combine3 -input1 -input2 -intersect -FixedEffectLMPlugin -
permute true -nperm 1000 -maxP 0.05 -endPlugin -export file_sort_GLM.txt -runfork1 -
runfork2
```

Μία ακόμα εντολή του TASSEL έγινε για το φιλτράρισμα του VCF αρχείου ώστε να περιέχει τα ID των μεταλλάξεων

```
$ /tassel-5-standalone/run_pipeline.pl -Xmx50g -vcf file.vcf -includesSiteNamesInFile
outliersList -export file_outlier -exportType VCF
```

Πραγματοποιήθηκε και η διόρθωση bonferroni, που χρησιμοποιείται συχνά σε GWAS (έρευνες συσχέτισης φαινοτύπων με τεράστιο αριθμό SNPs) και συντελεί στη μείωση των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Type I errors) (Emerson, 2020; Gao et al., 2010). Ο συντελεστής bonferroni α υπολογίζεται διαιρώντας το επίπεδο σημαντικότητας (με την εντολή ορίσαμε $p=0,05$) διά τα συνολικά SNPs που βρεθήκαν (Napierala, 2012). Η εντολή δημιούργησε ένα νέο αρχείο VCF περιέχοντας μόνο SNPs με επίπεδο σημαντικότητας μικρότερου του α και έγινε με αρχείο δέσμης εντολών (script) μέσω της γλώσσας προγραμματισμού Python 3.12 ([Παρ. 7.1](#)).

2.6. Πρόβλεψη γενετικών παραλλαγών SnpEff

Το SnpEff είναι ένα βιοπληροφορικό πρόγραμμα για την ανάλυση και την πρόβλεψη των επιπτώσεων γενετικών παραλλαγών στα SNPs, σχολιάζοντας με βάση τις γονιδιωματικές τους θέσεις και τα προβλεπόμενα αποτελέσματα αφορούν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, με τους αντίστοιχους γονότυπους να προσδιορίζονται, όποτε είναι διαθέσιμες οι πληροφορίες. (Cingolani et al., 2012).

Δημιουργήθηκε μια βάση δεδομένων με το γονιδίωμα αναφοράς του ιπποπόταμου:

```
$ java -jar snpeff.jar build -gff3 -v reference
```

Το τελικό VCF με τις πληροφορίες, τους σχολιασμούς για τα SNPs και τα γονίδια δημιουργήθηκε με την παρακάτω εντολή:

```
$ java -jar snpeff -jar ann reference file.vcf > annotated.vcf
```

Για την εύρεση των ιδιοτήτων των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων NCBI (Sayers et al., 2022), genecards (Stelzer et al., 2016) και uniprot (Coudert et al., 2023), ώστε να βρεθούν οι επιδράσεις τους και η διαφορετικότητα στους δύο μηχανισμούς που μελετήθηκαν.

2.7. Blast

Το BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) του NCBI χρησιμοποιείται για τη σύγκριση αλληλουχιών νουκλεοτιδίων ή πρωτεϊνών με βάσεις δεδομένων γνωστών αλληλουχιών, ώστε να βρεθούν οι πιο παρόμοιες ή σχετικές αλληλουχίες. Αναζητά περιοχές ομοιότητας ανάμεσα σε μια αλληλουχία εισόδου (query) και αλληλουχίες αναφοράς σε μια βάση δεδομένων, ενώ ανιχνεύει τοπικές ομοιότητες αντί για συνολική ταύτιση, επιτρέποντας τη σύγκριση αλληλουχιών με μικρά κοινά τμήματα ή μοτίβα (Korf

et al., 2003). Το Blast 2.16.0+ (Camacho et al., 2009) χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση SNPs στις ίδιες θέσεις που βρέθηκαν οι μη συνώνυμοι πολυμορφισμοί των γονιδίων.

Τα κομμάτια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 100 βάσεις νουκλεοτιδίων πριν και μετά αντίστοιχα από τις μη συνώνυμες μεταλλαγές και συγκρίθηκαν με τα γονιδιώματα 2 πτηνών, τα *Steatornis caripensis* (ηχοεντοπισμός) (GCA_013398225.1), *Nyctibius grandis* (χωρίς ηχοεντοπισμό) (GCF_013368605.1) (Feng et al., 2020; Gilbert et al., 2020). Επιπλέον, συγκρίθηκαν και τα είδη με ηχοεντοπισμό *Typhlomys cinereus* (GCA_023101885.1), *Sorex fumeus* (GCF_029834395.1), το *Stenella coeruleoalba* (GCA_951394435.1), *Phocoena Phocoena* (GCF_963924675.1) (Cossette et al., 2023; He et al., 2021; Steward et al., 2010) και τα είδη χωρίς ηχοεντοπισμό *Balaenoptera acutorostrata* (GCF_949987535.1), *Mus musculus* (GCF_000001635.27), *Eschrichtius robustus* (GCF_028021215.1) και *Balaenoptera ricei* (GCF_028023285.1) (Bayona-Bafaluy et al., 2003; Morin et al., 2023). Το κόψιμο των αλληλουχιών (δημιουργία query) έγινε με την χρήση του λογισμικού bedtools 2.28.0 (Quinlan and Hall, 2010) δημιουργώντας νέα αρχεία FASTA, με γονιδίωμα αναφοράς (reference.fa) τον υποπόταμο και τα σημεία των SNPs που βρέθηκαν από το snpeff (bed.txt):

```
$ bedtools getfasta -fi reference.fa -bed bed.txt -fo bedresults.fa
```

Τα γονιδιώματα των ειδών (file.fna) ετοιμάστηκαν ως βιβλιοθήκες (database) για να διαβαστούν από το BLAST με την εκτέλεση της ακόλουθης εντολής:

```
$ makeblastdb -in file.fna -dbtype nucl -parse_seqids -out database
```

Εν συνεχεία, η εντολή του BLAST σύγκρινε τις αλληλουχίες του κάθε είδους με τις κομμένες αλληλουχίες των γονιδίων και από τα αποτελέσματα της ανάλυσης βρέθηκαν τυχόν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στις μελετώμενες θέσεις:

```
$ blastn -query bedresults.fa -db database -task blastn -dust no -reward 1 -penalty -3 -  
gapopen 5 -gapextend 2 -evaluate 0.00001 > results.txt
```

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με την δημιουργία του VCF αρχείου, υπολογίστηκαν τα συνολικά SNPs από όλα τα είδη. Τα SNPs στο σύνολο ήταν 20.252.446, άρα για το bonferroni correction το α υπολογίστηκε $0,05/20.252.446 = 2,46883759 \times 10^{-9}$. Έτσι, κρατήθηκαν μόνο τα SNPs με επίπεδο σημαντικότητας μικρότερο από το α , δηλαδή υπολογίστηκαν 232 SNPs με στατιστικώς σημαντική διαφορά.

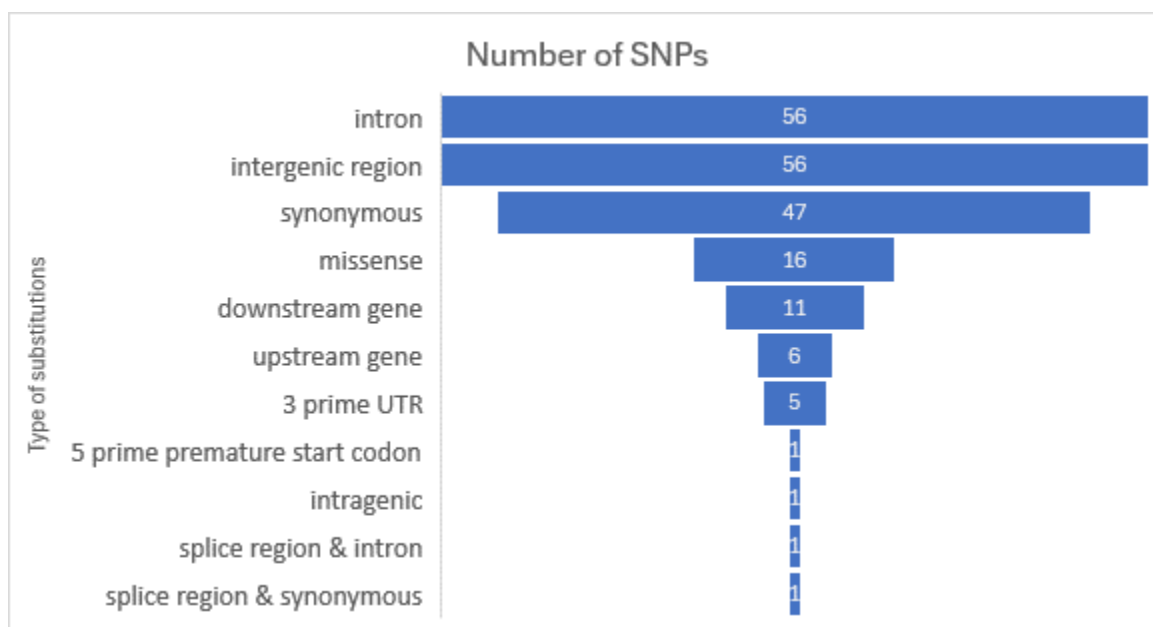
3.1. Χαρακτηρισμός SNPs

Η ανάλυση GLM έδωσε πληροφορίες για τα SNPs των ειδών ως προς την θέση και το χρωμόσωμα αλλαγής, το είδος της μετάλλαξης, καθώς και την συγκεκριμένη παραλλαγή του νουκλεοτιδίου (ALT) σε σχέση με το αντίστοιχο του γονιδιώματος του ιπποπόταμου (REF). Το SnpEff έδωσε και περαιτέρω πληροφορίες την θέση των SNPs στο γονιδίωμα και για τα γονίδια που επηρεάζουν οι πολυμορφισμοί αυτοί των νουκλεοτιδίων, την ποιότητα και την κωδικοποίηση τους.

Στην παρούσα έρευνα εντοπίστηκαν 12 τύποι/θέσεις μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών. Συγκεκριμένα, από τα 232 SNPs βρέθηκαν 47 συνώνυμες (23,27%) και 16 μη συνώνυμες (16%) μεταλλάξεις. Τα περισσότερα ήταν στα ιντρόνια και στις διαγονιδιακές περιοχές με 56 μεταλλαγές για τον κάθε τύπο (55,44% σύνολο). Λιγότεροι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί εμφανίστηκαν σε ανάντη γονίδια (2,97%) και σε αμετάφραστη περιοχή από θέση 3 (2,48%), με τα τελευταία SNPs να μοιράζονται σε άλλες ποίκιλες θέσεις (2,5% σύνολο) όπως ενδογονιδιακά, αμετάφραστη περιοχή 5 στην οποία δημιουργήθηκε κωδικόνιο έναρξης, και σε περιοχές συρραφής, όπως παρουσιάζονται στον [Πίνακα 1](#) και στο [Σχήμα 1](#).

Πίνακας 1: Συχνότητες για τους τύπους και το σύνολο των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών που βρέθηκαν στην έρευνα.

Συχνότητες μεταλλάγων		
Τύπος/Περιοχή SNPs	% ποσοστό του συνόλου	Αριθμός SNPs
Ιντρόνιο (intron)	27,72 %	56
Συνώνυμο (synonymous)	23,27 %	47
Κατάντη γονίδιο (downstream gene)	5,45 %	11
Διαγονιδιακή περιοχή (intergenic region)	27,72 %	56
Αμετάφραστη περιοχή 5 (5 prime UTR)	0,50 %	1
Μη συνώνυμο (missense)	7,92 %	16
Αμετάφραστη περιοχή 3 (3 prime UTR)	2,48 %	5
Ανάντη γονίδιο (upstream gene)	2,97 %	6
Αμετάφραστη περιοχή 5, εμφάνιση κωδικονίου έναρξης (5 prime UTR premature start codon gain)	0,50 %	1
Ενδογονιδιακό (intragenic)	0,50 %	1
Περιοχή συρραφής & ιντρόνιο (splice region & intron)	0,50 %	1
Περιοχή συρραφής & συνώνυμο (splice region & synonymous)	0,50 %	1

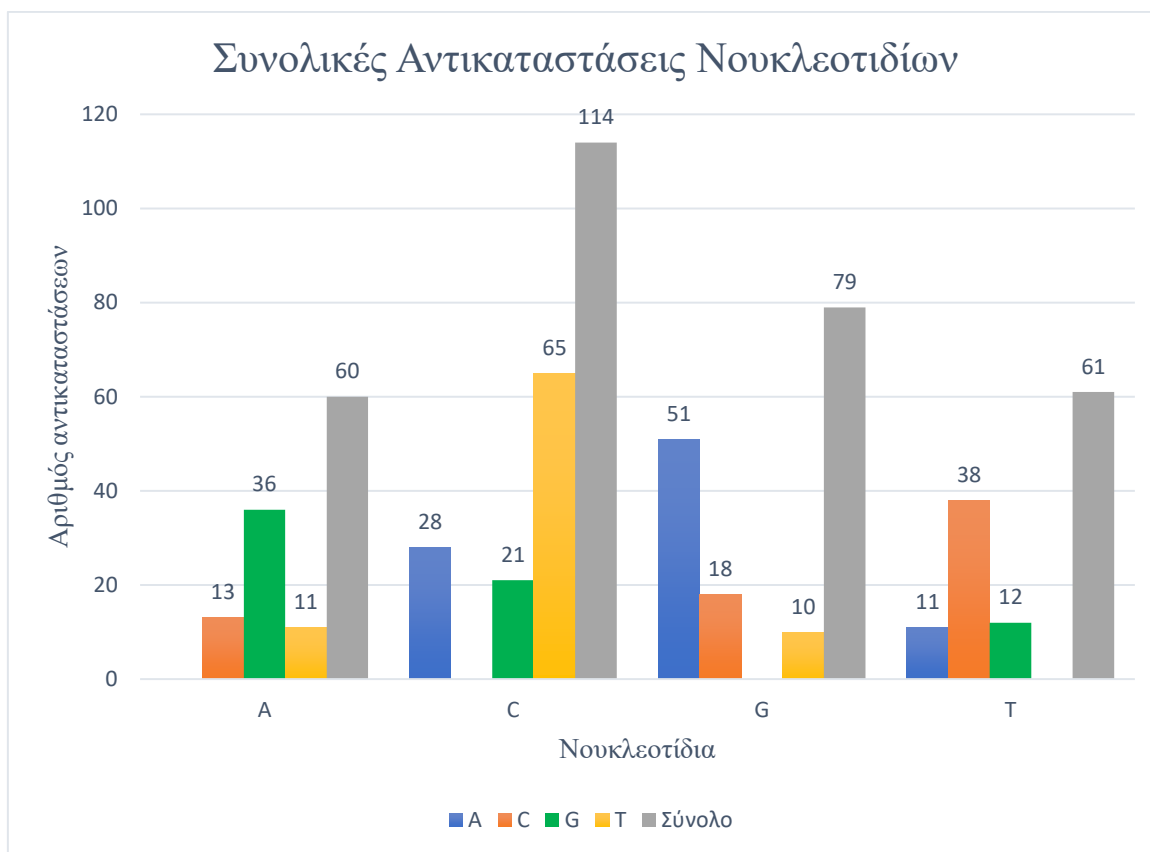


Σχήμα 1. Διαγραμματική ομαδοποίηση του συνόλου των τύπων SNPs της ανάλυσης.

Μετρήθηκαν και οι διαφορετικές μονονουκλεοτιδικές παραλλαγές ανά τις διαφορετικές βάσεις για τα 232 SNPs μαζί με τις περιπτώσεις που εντοπίστηκε δεύτερος εναλλακτικός πολυμορφισμός στις ίδιες θέσεις (112 εμφάνισαν δεύτερο πολυμορφισμό). Από τις 314 αντικαταστάσεις που υπολογίστηκαν, παρατηρήθηκαν συνολικά οι περισσότερες από κυτοσίνη (C) (114 σύνολο) και συγκεκριμένα οι περισσότερες ήταν από κυτοσίνη σε θυμίνη (T), 65 σε αριθμό, ενώ αντίστοιχα αποτελέσματα εμφάνισαν και οι παραλλαγές από την γουανίνη (G) (79 σύνολο) σε αδερίνη (A) με 51 αντικαταστάσεις, με τις υπόλοιπες μεταλλάξεις να βρίσκονται σε σχετικά χαμηλά ποσοστά. Η θυμίνη (61 σύνολο) και η αδερίνη (60 σύνολο) εμφάνισαν ακριβώς τα αντίστροφα αποτελέσματα με αυτά της κυτοσίνης και της γουανίνης αντίστοιχα, με την θυμίνη να μετατρέπεται 38 φορές από κυτοσίνη και η αδερίνη 36 φορές από γουανίνη ([Πίν. 2](#)). Οι αντικαταστάσεις των βάσεων ήταν πιο συχνές μεταξύ των ίδιων ομάδων αζωτούχων βάσεων δηλαδή των πουρινών (A, G) και των πυριμιδινών (T, C), με τις αντικαταστάσεις των διαφορετικών ομάδων να κυμαίνονται περίπου από 11-20 ([Σχ. 2](#)).

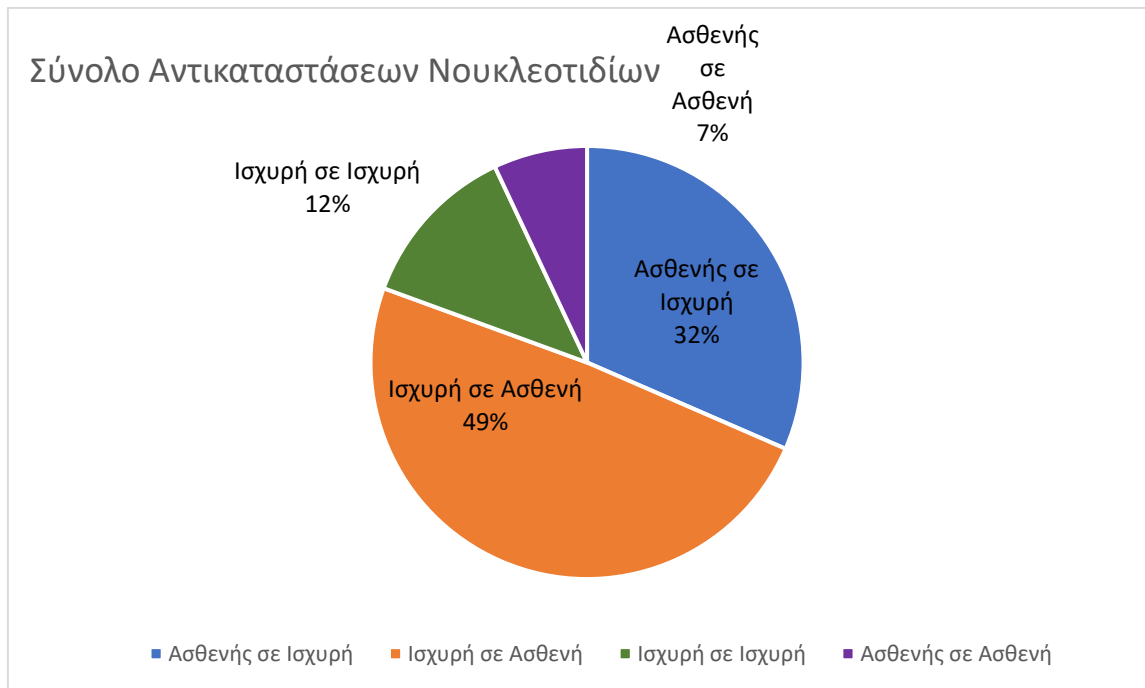
Πίνακας 2: Σύνολο αντικαταστάσεων των νουκλεοτιδικών βάσεων για όλα τα SNPs. Από αριστερά προς τα δεξιά φαίνονται για κάθε νουκλεοτίδιο ξεχωριστά οι αντικαταστάσεις και στο τέλος το σύνολο για την κάθε βάση. Με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι περισσότερες παραλλαγές.

→	A	C	G	T	Σύνολο
A	-	13	36	11	60
C	28	-	21	65	114
G	51	18	-	10	79
T	11	38	12	-	61

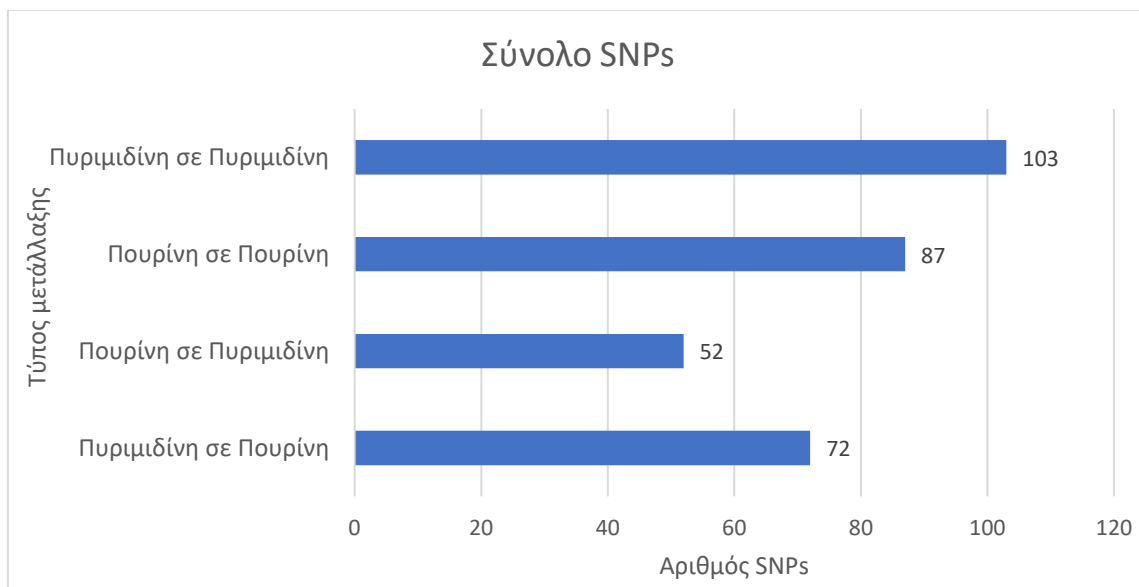


Σχήμα 2: Διαγραμματική απεικόνιση του συνολικού αριθμού των αντικαταστάσεων των νουκλεοτιδίων και του κάθε συνόλου. Με μπλε απεικονίζεται η Αδενίνη, η κυτοσίνη με πορτοκαλί, η γουανίνη με πράσινο, η θυμίνη με κίτρινο και το σύνολο με γκρι.

Από αυτά τα δεδομένα σχετικά με τους δεσμούς υδρογόνου, φαίνεται ότι εμφανίστηκαν περισσότερες περιπτώσεις αντικατάστασης από G, C σε A ή T, δηλαδή υπήρχαν 154 από ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου σε ασθενείς (49%). Αντίθετα, 99 περιπτώσεις υπήρχαν από ασθενείς προς ισχυρούς (32%). Από ισχυρούς σε ισχυρούς δηλαδή από G σε C ή το αντίστροφο υπολογίστηκαν 39 (12%) και από ασθενείς σε ασθενείς δηλαδή 22 από A σε T ή το αντίθετο (7%) ([Σχ. 3](#)). Στο [Σχήμα 4](#) χωρίζονται τα SNPs με βάση των δύο τύπων ετεροκυκλικής αρωματικής οργανικής ένωσης, πουρίνες (A,G) και πυριμιδίνες (T,C).

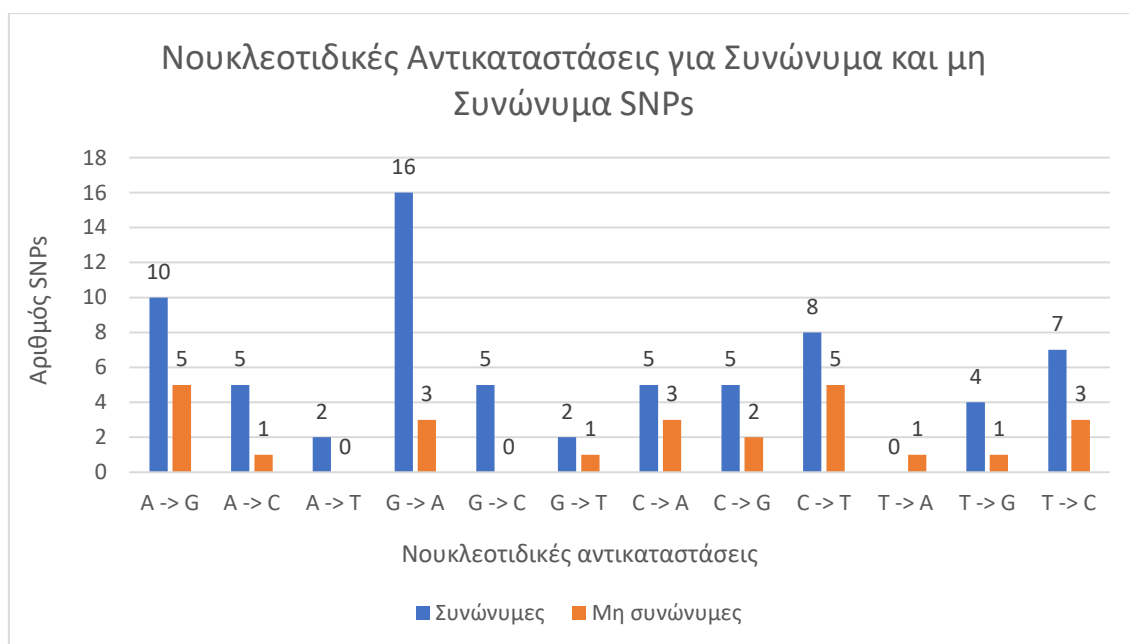


Σχήμα 3: Ποσοστά αντικατάστασης συνόλου νουκλεοτιδίων σχετικά με την αλλαγή των δεσμών υδρογόνου. Οι μεταλλαγές από τους ισχυρούς προς ασθενείς δεσμούς υδρογόνου (G,C σε A,T) φαίνονται με πορτοκαλί χρώμα, ασθενείς σε ισχυρούς (A,T σε G,C) με μπλε, ισχυροί προς ισχυρούς (G-C) με πράσινο και ισχυροί προς ασθενείς (A-T) με μωβ.

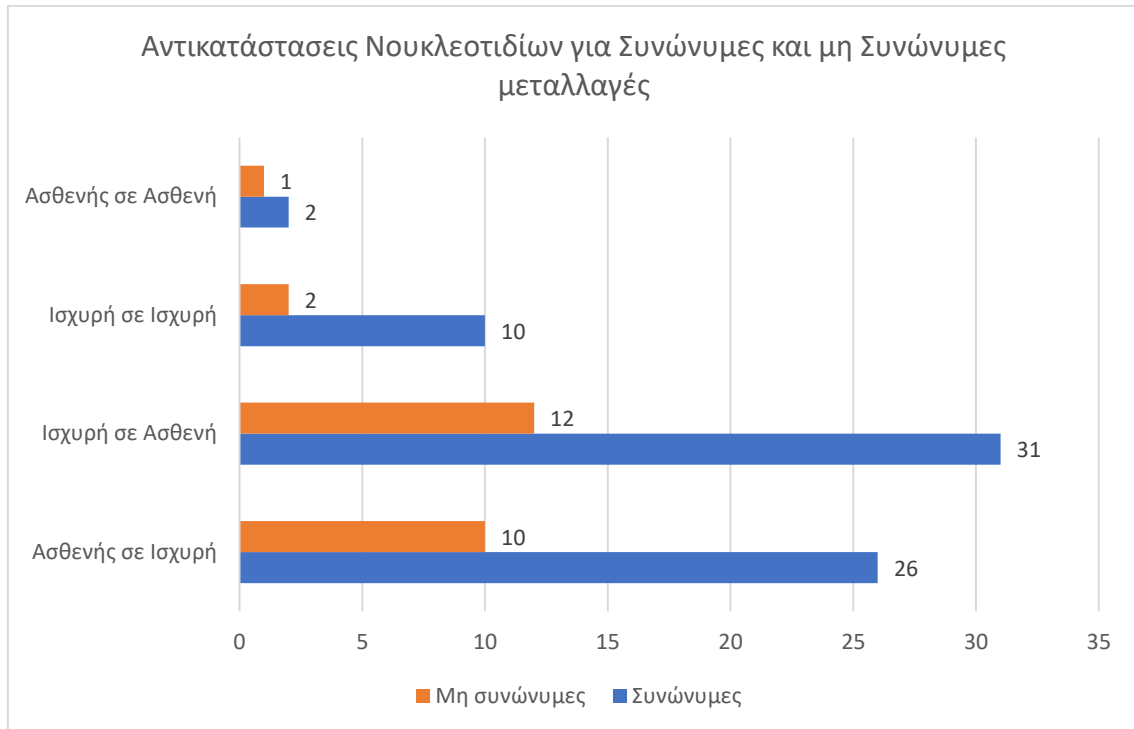


Σχήμα 4: Συνολικά SNPs με βάση με βάση των δύο τύπων ετεροκυκλικής αρωματικής οργανικής ένωσης, πουρίνες (A,G) και πυριμιδίνες (T,C).

Οι αντικαταστάσεις των πυριμιδινών και των πουρινών σε ίδιους τύπους εμφανίστηκαν σε μεγαλύτερο αριθμό, 103 και 87 αντίστοιχα, ενώ οι υποκαταστάσεις από πυριμιδίνες σε πουρίνες ήταν μεγαλύτερες, 72 συνολικά από το αντίστροφο που είχε 52 πολυμορφισμούς. Στο [Σχήμα 5](#) παρουσιάζεται αναλυτικά ο αριθμός των SNPs για τις συνώνυμες και μη μεταλλάξεις. Τα περισσότερα για τις συνώνυμες μεταλλάξεις εντοπίστηκαν από αλλαγές πουρίνης σε πουρίνη, δηλαδή 16 από γουανίνη σε αδενίνη και 10 στην αντίστροφη περίπτωση. Παρομοίως, κοντά σε αριθμό ήταν οι πυριμιδίνες σε ίδια αρωματική ένωση, δηλαδή από κυτοσίνη σε θυμίνη 8 και με τον ανάποδο συνδυασμό 7 SNPs. Στις μη συνώνυμες, οι αντικαταστάσεις ήταν όλες χαμηλές σε αριθμό. Αμφότερα εντοπίστηκαν περισσότερες αλλαγές από ισχυρούς σε ασθενείς δεσμούς υδρογόνου ([Σχ. 6](#)).



Σχήμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση για τις νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις για τα συνώνυμα (μπλε χρώμα) και μη συνώνυμα (πορτοκαλί χρώμα) μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Φαίνεται ο αριθμός των SNPs που εντοπίστηκαν στις αναλύσεις και οι συγκεκριμένες αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων για τις δύο κατηγορίες.



Σχήμα 6: Αντικατάσταση νουκλεοτιδίων σχετικά με την αλλαγή των δεσμών υδρογόνου, δηλαδή μεταλλάξεις από τους ισχυρούς προς ασθενείς δεσμούς υδρογόνου (G,C σε A,T), ασθενείς σε ισχυρούς (A,T σε G,C) και ο συνδυασμός τους. Με πορτοκαλί οι μη συνώνυμες και με μπλε οι συνώνυμες μεταλλάξεις.

3.2. Μη συνώνυμες μεταλλάξεις

Οι 16 μη συνώνυμες μεταλλάξεις παρουσιάζονται στον [Πίνακα 3](#). Εμφανίζονται το χρωμόσωμα (CHROM) και η θέση μετάλλαξης (Position of change) σε σχέση με το αρχικό γονίδιο του ιπποπόταμου (Ref), και το νέο αμινοξύ που δημιουργήθηκε (Amino acid change). Όλα τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες και όλες οι παραλλαγές χαρακτηρίστηκαν "MODERATE" ως προς την σοβαρότητα επίδρασης από το SnpEff, δηλαδή ενδέχεται να αλλάξουν την λειτουργία της πρωτεΐνης, αλλά όχι τόσο καταστροφικά, όπως κάποιες πιο σοβαρές ("HIGH") που θα διέκοπταν την πρωτεϊνική αλληλουχία. Στον [Πίνακα 4](#) παρουσιάζονται αναλυτικά για το κάθε είδος τα συγκεκριμένα μη συνώνυμα SNPs σε αυτές τις θέσεις και γονίδια.

Πίνακας 3: Μη συνώνυμες μεταλλαγές με τα 16 εντοπισμένα γονίδια από το snpeff. Φαίνεται το χρωμόσωμα, ID, επίπεδο σημαντικότητας p, γονίδια, αρχικό νουκλεοτίδιο αναφοράς ιπποπόταμου και τα εντοπισμένα SNPs με την θέση παραλλαγής και το νέο αμινοξύ.

CHROM	ID	P – values	REF	ALT	Genes	Position of change 1	Am Acid change 1	Position of change 2	Am Acid change 2
NC_080186.1	SNC_080186.1_239684603	0	C	A,T	PAIP1	c.1022C>A	p.Thr341Asn	c.1022C>T	p.Thr341Ile
NC_080187.1	SNC_080187.1_206900504	0	A	G	SLC24A1	c.1844A>G	p.Lys615Arg	c.1844A>G	p.Lys615Arg
NC_080188.1	SNC_080188.1_112831188	0	C	T,A	SERPING1	c.1179C>A	p.Asn393Lys		
NC_080189.1	SNC_080189.1_16487508	0	T	C	CREB3L2	c.1399T>C	p.Ser467Pro		
NC_080189.1	SNC_080189.1_47207190	0	G	A	NOD1	c.1088G>A	p.Arg363Lys	c.1088G>A	p.Arg363Lys
NC_080191.1	SNC_080191.1_52585619	0	A	G	SASH1	c.1456A>G	p.Met486Val	c.1378A>G	p.Met460Val
NC_080192.1	SNC_080192.1_18116966	0	T	C,A	TDG	c.1039A>G	p.Thr347Ala	c.1039A>T	p.Thr347Ser
NC_080193.1	SNC_080193.1_53171072	0	A	G,T	MAP3K19	c.2742T>A	p.Asn914Lys		
NC_080193.1	SNC_080193.1_87582884	0	T	C,G	INHA	c.759A>C	p.Glu253Asp		
NC_080193.1	SNC_080193.1_90315322	1.47E-99	C	T,G	SMARCAL1	c.1021G>A	p.Val341Met	c.1021G>C	p.Val341Leu
NC_080197.1	SNC_080197.1_99355381	2.12E-103	C	T,G	MYO1A	c.2873G>A	p.Ser958Asn	c.2873G>C	p.Ser958Thr
NC_080201.1	SNC_080201.1_45203642	0	C	A,T	WDR88	c.1164C>A	p.Asn388Lys		
NC_080201.1	SNC_080201.1_46950818	0	G	A	LOC130838835	c.196G>A	p.Val66Ile		
NC_080201.1	SNC_080201.1_57070476	1.7E-112	G	A,T	BICRA	c.460G>A	p.Ala154Thr	c.460G>T	p.Ala154Ser
NC_080203.1	SNC_080203.1_2518343	0	A	C,G	G6PD	c.364A>C	p.Lys122Gln	c.364A>G	p.Lys122Glu
NC_080203.1	SNC_080203.1_4126462	0	A	G	GABRQ	c.364T>C	p.Tyr122His		

Πίνακας 4: Τα είδη που εντόπισε ο αλληλουχιστής, με κόκκινο τα είδη με ηχοεντοπισμό, με ροζ τα είδη χωρίς. Φαίνονται τα γονίδια και τα νουκλεοτίδια αναφοράς του ιπποπόταμου, συγκριτικά με τα νουκλεοτίδια στην ίδια θέση για τα διάφορα είδη. Με πορτοκαλί απεικονίζεται η κυτοσίνη, (C) με μπλε η αδενίνη (A), με πράσινο η γουανίνη (G) και με κίτρινο η θυμίνη (T). Το N (άσπρο) αναφέρεται σε νουκλεοτίδια που δεν εντοπίστηκαν στην αλληλούχηση, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις για είδη με 2 SNPs.

Genes	REF	S.paradoxus	C.thonglongyai	R.affinis	Maurata	P.macrocephalus	O.orca	T.truncatus	S.aquaticus	T.europaea	P.vampyrus	P.giganteus	P.pselaphon	C.sphinx	B.muscus	B.physalus	M.novaeangliae
PAIP1	C	C	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	A	N	T	T	T
SLC24A1	A	G	G	G	G	A	G	G	A	N	A	A	A	A	A	A	A
SERPING1	C	C	C	C	C	T	C	C	A	N	T	T	T	T	T	T	T
CREB3L2	T	T	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C
NOD1	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SASH1	A	A	A	A	A	A	A	A	N	G	G	G	G	G	G	G	G
TDG	T	C	C	C	C	T	AT	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T
MAP3K19	A	A	A	A	A	AG	AG	AG	G	G	G	G	G	G	T	T	T
INHA	T	G	C	C	C	T	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T
SMARCAL1	C	N	T	T	T	T	T	T	N	C,G	C	C	C	C	C	C	C
MYO1A	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
WDR88	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T	A	A	A	N	A	A	A
LOC130838835	G	G	G	G	AG	G	G	G	A	A	A	A	A	N	A	A	A
BICRA	G	A	A	A	T	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
G6PD	A	A	A	A	A	A	A	A	C	AC	C	C	C	C	G	G	G
GABRQ	A	A	A	A	A	A	A	A	N	N	G	G	G	G	G	G	G

Μόνο τα είδη στα οποία εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί μετά τις αντιστοιχίσεις του SnpEff κρατήθηκαν στο τέλος. Σχεδόν σε όλα τα γονίδια φάνηκε ένας διαχωρισμός στα νουκλεοτίδια ανάμεσα στα είδη με ηχοεντοπισμό και σε αυτά χωρίς για τις μη συνώνυμες μεταλλάξεις. Τα είδη με ηχοεντοπισμό είχαν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς στα γονίδια: *SLC241*, *TDG*, *INHA*, *SMARCAL1* και *BICRA*. Τα είδη χωρίς ηχοεντοπισμό είχαν στα γονίδια: *PAIP1*, *SERPING1*, *CREB3L2*, *NOD1*, *SASH1*, *MAP3K19*, *MYO1A*, *WDR88*, *LOC130838835*, *G6PD* και *GABRQ* (Πίν. 5).

Πίνακας 5: Εμφάνιση των γονιδίων με πολυμορφισμούς για τα είδη με ηχοεντοπισμό και χωρίς. Παρουσιάζονται με πορτοκαλί χρώμα τα γονίδια των ειδών που εμφάνισαν SNPs σε σχέση με το γονιδίωμα του ιπποπόταμου ενώ με πράσινο αυτά χωρίς ηχοεντοπισμό και με πολυμορφισμούς. Στην τελευταία στήλη φαίνεται και η βιοχημική ιδιότητα του γονιδίου στο κύτταρο.

Πολυμορφισμοί γονιδίων	Ηχοεντοπισμός	Χωρίς Ηχοεντοπισμό	Βιοχημική Ιδιότητα
PAIP1		✓	Μετάφραση - Βιοσύνθεση
SLC24A1	✓		Na/Ca
SERPING1		✓	Άμυνα
CREB3L2		✓	Μετάφραση
NOD1		✓	Άμυνα
SASH1		✓	Άμυνα
TDG	✓		Προστασία από μεταλλάξεις
MAP3K19		✓	Φωσφορυλίωση
INHA	✓		Ρυθμιστικό
SMARCAL1	✓		Ενέργεια
MYO1A		✓	Μοριακός κινητήρας
WDR88		✓	-
LOC130838835		✓	-
BICRA	✓		Μεταγραφή
G6PD		✓	Βιοσύνθεση- Φωσφορυλίωση
GABRQ		✓	Νευρικό σύστημα

Τα γονίδια των μη συνώνυμων μεταλλαγών χωρίστηκαν με βάση την βιοχημική τους ιδιότητα ή λειτουργία στο κύτταρο σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων NCBI, genecards και uniprot στον [Πίνακα 5](#).

3.3. Blast για άλλα είδη

Στον [Πίνακα 6](#) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του NCBI Blast για τα διάφορα είδη που μελετήθηκαν. Τα γονίδια *PAIP1*, *SLC24A1*, *SASH1*, *TDG*, *MAP3K19*, *INHA* εμφάνισαν ίδια νουκλεοτίδια στις μελετώμενες θέσεις ανεξάρτητα το είδος και τον ηχοεντοπισμό. Τα υπόλοιπα γονίδια παρουσίασαν παρόμοια αποτελέσματα του snpeff ([Πίν. 4](#)) ως προς τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς και την χρήση ή όχι του ηχοεντοπισμού.

Πίνακας 6: Πίνακας με τα είδη που εντόπισε το NCBI BLAST, με κόκκινο τα είδη με ηχοεντοπισμό, με ροζ τα είδη χωρίς. Φαίνονται τα γονίδια και τα νουκλεοτίδια αναφοράς του ιπποπόταμου, συγκριτικά με τα νουκλεοτίδια στην ίδια θέση για τα διάφορα είδη. Με πορτοκαλί απεικονίζεται η κυτοσίνη (C) με μπλε η αδενίνη (A), με πράσινο η γουανίνη (G) και με κίτρινο η θυμίνη (T). Το N (άσπρο) αναφέρεται σε νουκλεοτίδια που δεν εντοπίστηκαν στην αλληλούχιση, με κόκκινα γράμματα είναι νουκλεοτίδια διαφορετικά από τα αντίστοιχα αποτελέσματα του SnpEff (κεντρικό ανοιχτό μπλε με βιοσόναρ) ως προς τα SNPs των γονιδίων, για τα μη συνώνυμα SNPs.

Genes	REF	<i>S. caripensis</i>	<i>P. phocoena</i>	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>T. cireneus</i>	<i>S. fumeus</i>	<i>T. truncatus</i>	<i>N. grandis</i>	<i>B. acutorostrata</i>	<i>B. ricei</i>	<i>E. robustus</i>	<i>M. musculus</i>
PAIP1	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C
SLC24A1	A	A	A	A	G	A	G	A	A	A	C	A
SERPING1	C	N	N	N	N	N	C	N	N	N	N	N
CREB3L2	T	C	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C
NOD1	G	G	G	G	T	T	G	T	T	T	T	T
SASH1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
TDG	T	T	T	T	T	T	A	T	T	T	T	T
MAP3K19	A	A	A	A	A	A	AG	A	A	A	A	A
INHA	T	T	T	T	T	T	G	T	T	T	T	T
SMARCA1	C	T	T	T	T	T	T	C	T	C	C	C
MYO1A	C	C	C	C	C	C	C	T	T	T	T	T
WDR88	C	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	C
LOC130838835	G	G	G	A	G	A	G	G	A	A	A	A
BICRA	G	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G
G6PD	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	A	A
GABRQ	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	A	A

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μερικά από τα SNPs εμφανίζονται σε μη κωδικοποιημένες περιοχές, ενώ άλλα συμβαίνουν στις περιοχές κωδικοποίησης (Hagmann, 1999). Τα ιντρόνια και οι διαγονιδιακές περιοχές δεν κωδικοποιούν άμεσα πρωτεΐνες, αλλά μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση του γονιδίου, τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και να μεταβάλλουν την μεταγραφή ή ακόμα έχουν παρατηρηθεί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε αυτές τις περιοχές που προκαλούν ασθένειες (Chen and Tian, 2016; Jo and Choi, 2015; Yadav and Mohapatra, 2017). Στην έρευνα εντοπίστηκαν οι περισσότεροι πολυμορφισμοί στα ιντρόνια και στις διαγονιδιακές περιοχές, 56 σε αριθμό για κάθε περιοχή. Πολλές σε αριθμό ήταν και οι συνώνυμες μεταλλάξεις (47 SNPs), οι οποίες δεν επηρεάζουν το γονιδιακό προϊόν, δηλαδή η πρωτεϊνική αλληλουχία και τα νουκλεϊκά οξέα δεν μεταβάλλονται (Shastry, 2009). Οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις προκαλούν αλλαγή στην αλληλουχία των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης μέσω αντικατάστασης ενός κωδικονίου με κάποιο που κωδικοποιεί διαφορετική πρωτεΐνη και είναι οι πιο σημαντικές για την εξέλιξη των ειδών και την διερεύνηση των διαφοροποιήσεων στα γονίδια (DePristo et al., 2005; Zhang et al., 2012). Για τα είδη που μελετήθηκαν βρέθηκαν 16 μη συνώνυμοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, τα περισσότερα SNPs που εντοπίστηκαν στο σύνολο προήρθαν από μεταπτώσεις δηλαδή από μετατροπές μεταξύ πουρινών και πυριμιδινών. Οι μεταπτώσεις στα θηλαστικά και ιδιαίτερα στις κωδικοποιημένες περιοχές, σε ενδογονιδιακές περιοχές και σε ιντρόνια είναι περισσότερο συχνές (Rosenberg et al., 2003) λόγω των βιοχημικών ιδιοτήτων των βάσεων και την χαμηλότερη απαίτηση σε ενέργεια για την γονιδιακή μεταλλαγή (Ray, 2022), ενώ έχουν και λιγότερη επίδραση στο γονίδιο σε σχέση με τις μεταστροφές, επιτρέποντας έτσι την

διατήρηση σε πολλές γενιές (Guo et al., 2017; Lynch et al., 2023). Η απαμίνωση της κυτοσίνης της αδενίνης και της γουανίνης (οξειδωση), είναι από τις πιο κοινές και αυθόρμητες μεταλλάξεις του γονιδιώματος στον σύγχρονο κόσμο (Lewis et al., 2016; Nguyen et al., 1992; Tolosa et al., 2019). Οι ίδιες αναλογίες βρέθηκαν στις συνώνυμες και στις μη συνώνυμες μεταλλαγές. Παρομοίως, το ποσοστό μεταλλαγής από νουκλεοτίδια με ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου (GC) 49% σε νουκλεοτίδια με πιο ασθενείς δεσμούς (AT) ήταν μεγαλύτερο λόγω των ίδιων βιοχημικών μηχανισμών, κάτι που ήταν αναμενόμενο βιβλιογραφικά για αυτές τις συγκεκριμένες περιοχές οι οποίες είναι πιο πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη (Bergman and Heide Schierup, 2021; Ellegren et al., 2003; Galtier et al., 2001; Khrustalev et al., 2012; Pozzoli et al., 2008; Webster et al., 2006).

Εκτιμάται ότι τα διάφορα είδη με ηχοεντοπισμό έχουν εξελίξει διαφορετικά ορισμένα οπτικοακουστικά γονίδια που τους επιτρέπουν την πιο αποτελεσματική, ποιοτική και ταχύτερη πληροφόρηση για το περιβάλλον και το οικοσυστήμα διαβίωσης του κάθε είδους που έχει διαφορετικές απαιτήσεις (Jones and Holderied, 2007).

Στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε ένας διαχωρισμός των γονιδίων ανάμεσα στα είδη που χρησιμοποιούν ηχοεντοπισμό και σε αυτά χωρίς, εμφανίζοντας δηλαδή κοινούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς στα γονίδια κατά την σύγκριση των δύο ιδιοτήτων ([Πίν.4](#), [Πίν. 6](#)). Τα γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή ήχου, την ακοή ή την όραση βοηθούν περισσότερο στην διερεύνηση και την εξήγηση αυτής της παραλλακτικότητας.

Το γονίδιο *SLC24A1* κωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών εναλλαγής νατρίου/ασβεστίου και που εξαρτάται από το κάλιο σύμφωνα με το NCBI, με την

κωδικοποιημένη πρωτεΐνη να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανταλλαγή νατρίου/ασβεστίου στους φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδούς χιτώνα, μεσολαβώντας στην εξώθηση ενός ιόντος ασβεστίου και ενός ιόντος καλίου σε αντάλλαγμα για τέσσερα ιόντα νατρίου. Αποτελεί κρίσιμο συστατικό του καταρράκτη και της οπτικής μεταγωγής, που ελέγχει τη συγκέντρωση ασβεστίου των εξωτερικών τμημάτων κατά τη διάρκεια του φωτός και του σκότους, ενώ ταυτόχρονα παίζει βασικό ρόλο στη διαδικασία προσαρμογής στο φως. Μερικές έρευνες έχουν αποδείξει ότι μεταλλάξεις σε αυτό γονίδιο σχετίζονται άμεσα με την ασθένεια συγγενούς νυχτερινής τύφλωσης (Congenital Stationary Night Blindness) (Neuillé et al., 2016; Riazuddin et al., 2010; Vinberg et al., 2015), η οποία είναι μια αυτοσωμική πάθηση στον αμφιβληστροειδή χιτώνα που δυσκολεύει την όραση τη νύχτα (Riazuddin et al., 2010). Από τις αναλύσεις παρατηρήθηκε ότι όλα τα είδη με ηχοεντοπισμό, εκτός από την φάλαινα *P.macrocephalus*, εμφάνιζαν πολυμορφισμό και βρέθηκαν μη συνώνυμες μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο. Είναι λογικό να βρεθεί αυτή η μεταλλαγή γονιδίου σε αυτά τα είδη που στα σκοτάδια δεν χρησιμοποιούν σχεδόν καθόλου την όραση τους (Thiagavel et al., 2018). Για τον φουσητήρα η μη μετάλλαξη ίσως να οφείλεται στην διαφορετική δομή του αμφιβληστροειδή χιτώνα δηλαδή στον σχηματισμό πολλαπλών στρωμάτων με γιγάντια γαγγλιακά κύτταρα κάτι που δεν εμφανίζεται στα άλλα κητώδη με αυτή τη μορφή (Bjergager et al., 2003).

Το *SERPING1* εμπλέκεται με την ρύθμιση του καταρράκτη και η έλλειψη οδηγεί σε κληρονομικό αγγειονευρωτικό οίδημα, σύμφωνα με το NCBI. Σε έρευνα βρέθηκε ότι, γενετική παραλλαγή στο *SERPING1* μεταβάλλει σημαντικά την ευαισθησία στην εκφύλιση της ωχράς κηλίδας που σχετίζεται με την ηλικία στον άνθρωπο (Ennis et al., 2008), αλλά και σε άλλα παράλογα του *SERPIN* έχουν εντοπιστεί συσχετίσεις με βλάβες ματιών όπως το *SERPINF2* του οποίου οι μεταλλάξεις προκαλούν γλαύκωμα

(Kodeboyina et al., 2020). Τα είδη με ηχοεντοπισμό εκτός του φυσητήρα είχαν τα ίδια νουκλεοτίδια με τον ιπποπόταμο, σε αντίθεση με τα είδη χωρίς βιοσόναρ που δεν είχαν μεταλλαγή, υποδεικνύοντας μια πιθανή διαφορετική εξέλιξη ματιών για κάθε ομάδα και ότι ο φυσητήρας ίσως έχει διαφορετικό φαινότυπο ως προς τα μάτια. Ένα ακόμα γονίδιο που βοηθάει στην ακοή είναι το *G6PD*, του οποίου η υπερέκφραση προστατεύει από το οξειδωτικό στρες και την απώλεια ακοής που σχετίζεται με την ηλικία (Bermúdez-Muñoz et al., 2020; Caroça et al., 2017).

Το γονίδιο *CREB3L2* παίζει σημαντικό μεταγραφικό ρόλο στην ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων και την προστασία τους από το περιβαλλοντικό στρες (Sampieri et al., 2021). Πολυμορφισμοί σε αυτό δεν βρέθηκαν στα είδη με ηχοεντοπισμό. Έχει παρατηρηθεί ότι οι πρωτεΐνες CREB γενικά πολλαπλασιάζονται στο κύτταρο όταν ο οργανισμός διεγείρεται με ήχο (Chaudhury and Wadhwa, 2009; Tan et al., 2008), ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκμάθηση και απομνημόνευση των διαφόρων ήχων σε θηλαστικά και πτηνά (Abe et al., 2015; Han et al., 2008). Παρομοίως, το *MYO1A* κωδικοποιεί ένα μέλος της υπεροικογένειας μυοσίνης και λειτουργούν ως μοριακοί κινητήρες. Μερικές πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει συσχετισμούς των μεταλλάξεων των γονιδίων μυοσίνης με αυτοσωματική επικρατούσα κώφωση όπως και δυσλειτουργία του αμφιβληστροειδούς χιτώνα (Dosé et al., 2003; Friedman et al., 2020; McGowen et al., 2020; Miyoshi et al., 2024; Sharma et al., 2023). Ένα άλλο παράλογο το *MYO7A* σχετίζεται με την καλύτερη όραση στο σκοτάδι στα θαλάσσια θηλαστικά (Williams and Lopes, 2011; Yuan et al., 2021), ωστόσο έρευνα έχει δείξει ότι στην αντίθετη περίπτωση τα γονίδια της όρασης για το φως δεν διαφέρουν τόσο για τα μυστακοκητώδη και τα οδοντοκητώδη που κάνουν βαθιές βουτιές και έχουν αχρωματοψία, ενώ τα γονίδια χαρακτηρίστηκαν ως ψευδογονίδια (McGowen et al., 2020). Ο φυσητήρας που φτάνει σε

μεγάλα βάθη, στην παρούσα έρευνα εμφάνισε παρόμοια νουκλεοτίδια με τα είδη χωρίς ηχοεντοπισμό και όχι πολυμορφισμούς όπως τα υπόλοιπα οδοντοκτητώδη στα παραπάνω γονίδια όρασης *SLC24A1* και *SERPING1*.

Τα γονίδια *NOD1* και το παράλογο του *NOD2* εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση σε ιογενείς, βακτηριακές και παρασιτικές λοιμώξεις. Μεταλλάξεις των γονιδίων μπορεί να προκαλέσουν διάφορες γενετικές ασθένειες αφτιών όπως χολοστεάτωμα (Leichtle et al., 2015) και ματιών όπως σύνδρομο Blau (Kurokawa et al., 2003). Το γονίδιο *SASH1* συμβάλει στην άμυνα από παθογόνα και είναι ένας πιθανός ογκοκατασταλτικός μηχανισμός (Yu et al., 2022). Και για τους δύο αμυντικούς μηχανισμούς βρέθηκαν SNPs στα είδη χωρίς ηχοεντοπισμό. Αντίθετα, για το γονίδιο *TGD* που αφαιρεί τη θυμίνη από εσφαλμένες ζευγαρώσεις C/T και T/T (Cortázar et al., 2007), βρέθηκε ότι όλα τα είδη με ηχοεντοπισμό εμφάνισαν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, με τα θαλάσσια θηλαστικά με ηχοεντοπισμό να έχουν διαφορετικούς πολυμορφισμούς από τους υπόλοιπους οργανισμούς.

Μία από τις ιδιότητες του παραλόγου του *WDR88*, δηλαδή το *DAW1* εκτιμάται ότι σχετίζεται με την συμμετρία αριστερά/δεξιά των οργάνων (Coudert et al., 2023; Lesko and Rouhana, 2020; Stelzer et al., 2016). Στα είδη με ηχοεντοπισμό εντοπίζεται ασυμμετρία αριστερής και δεξιάς πλευράς, ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερα η παραγωγή ήχου και η λήψη της επιστρεφόμενης πληροφορίας (Kanwal, 2012; Laeta et al., 2023; Lanzetti et al., 2022; Ramalho et al., 2015).

Ο πρωταρχικός ρόλος του γονιδίου *PAIP1* είναι στη ρύθμιση της μετάφρασης αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες που δεσμεύουν poly(A), επηρεάζοντας έτσι τη σταθερότητα του mRNA και την έναρξη μετάφρασης. Αυτό το γονίδιο και η πρωτεΐνη

του συνδέονται περισσότερο με κυτταρικές διεργασίες όπως η βιοσύνθεση πρωτεϊνών, παρά με αισθητηριακές λειτουργίες όπως η ακοή ή η όραση (Armengol et al., 2010), αν και μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο μπορεί να προκαλέσουν αναπτυξιακές νευρολογικές δυσκολίες που μπορεί να συσχετιστούν με οπτικοακουστικές λειτουργίες (Wegler et al., 2022).

Το γονίδιο *MAP3K19* ενεργοποιεί τις δραστηριότητες δέσμευσης ATP, κινάσης και φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών (Hoang et al., 2020). Ο ηχοεντοπισμός έχει βρεθεί ότι είναι ένας αρκετά δαπανηρός μηχανισμός ενεργειακά για τα διάφορα είδη που τον αξιοποιούν, καθώς απαιτείται η συνεχής παραγωγή πολλών ηχητικών κυμάτων ειδικά στο κυνήγι ή ακόμα και στην ηρεμία όταν κοινωνικοποιούνται μεταξύ τους (Currie et al., 2020; Dechmann et al., 2013; Noren et al., 2017; Voigt and Lewanzik, 2012). Ανάλογα με το είδος, αλλά κυρίως οι οδοντωτές φάλαινες, εκτιμάται ότι έχουν την ικανότητα να προσαρμόσουν και να μειώσουν από μόνες τους αρκετά το μεταβολικό ενεργειακό κόστος μειώνοντας την παραγωγή οξυγόνου (Noren et al., 2017). Στην έρευνα βρέθηκαν πολυμορφισμοί για όλα τα κητώδη για το συγκεκριμένο γονίδιο. Το παράλογο του *MAP3K1*, είναι απαραίτητο για την ακοή (Faridi et al., 2023) και την ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς χιτώνα (Mongan et al., 2011).

Τα ακόλουθα γονίδια που εμφάνισαν πολυμορφισμό στα είδη με ηχοεντοπισμό και τα άμεσα ομόλογα τους, δηλαδή: τα *INHA* που παράγουν πολλαπλά πεπτιδικά προϊόντα, *SMARCAL1* που συνεισφέρουν στις δραστηριότητες ελικάσης και ATPάσης και *BICRA* τα οποία ενεργοποιούν τον ρυθμιστή της μεταγραφής, δεν φάνηκαν να έχουν κάποια άμεση συσχέτιση με οπτικοακουστικούς μηχανισμούς. Η λειτουργία του *GABRQ* περιλαμβάνει την ταχύτερη ανασταλτική μετάδοση στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ενώ μικροελλείψεις των παραλόγων *GABRA1* και *GABRG2* προκαλούν επιληψία και οπτική

αναπηρία, λόγω της αλλοιωμένης μυελίνωσης των νευραξόνων και της επακόλουθης ατροφίας του οπτικού νεύρου (Zhang et al., 2023).

Τα είδη με ηχοεντοπισμό φάνηκαν να έχουν αναπτύξει καλύτερους αμυντικούς μηχανισμούς (*SASH1*, *NOD1*) και μηχανισμούς ρύθμισης (*SERPING1*, *G6PD*, *CREB3L2*, *MYO1A*) που σχετίζονται κυρίως με τους οφθαλμούς και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα αλλά και τα αφτιά. Επιπλέον, εμφανίζουν και μια κοινή συσχέτιση στην ανάπτυξη και λειτουργία νευρολογικών μηχανισμών (*PAIP1*) και δραστηριοτήτων ATP (*MAP3K19*, *GABRQ*), έλλειψη των οποίων ίσως να προκαλέσουν προβλήματα στην όραση και την ακοή. Η ακοή είναι απαραίτητη για τον ηχοεντοπισμό, ενώ φαίνεται ότι ακόμα και τα μάτια ίσως να είναι πιο σημαντικά στο περιβάλλον διαβίωσης τους γιατί έχουν εξελίξει ορισμένα διαφορετικά γονίδια προστασίας και ανάπτυξης από τα είδη χωρίς βιοσόναρ. Οι μεταλλάξεις δείχνουν ότι τα είδη που δεν έχουν ηχοεντοπισμό ίσως να σταμάτησαν κάποτε να έχουν τόσο πολύ ανάγκη τα συγκεκριμένα γονίδια για την ακοή και την όραση και να εξελίχθηκαν διαφορετικά. Αντίθετα, τα είδη χωρίς ηχοεντοπισμό έχουν κρατήσει την καλύτερη προσαρμογή στο φως (*SLC24A1*) κάτι που είναι λογικό αφού ζούν σε οικοσυστήματα που υπάρχει αρκετό.

Συμπερασματικά, εντοπίστηκαν αρκετοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε γονίδια που είχαν κάποια συσχέτιση με οπτικοακουστικές λειτουργίες. Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα είδη από διαφορετικά οικοσυστήματα είχαν παρόμοιες νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις ως προς την χρήση ή όχι του μηχανισμού του ηχοεντοπισμού, μας έδειξε ότι πιθανόν να υπάρχει συγκλίνουσα εξέλιξη για τα είδη που χρησιμοποιούν ηχοεντοπισμό και για αυτά που δεν τον χρησιμοποιούν. Τα ευρήματα της έρευνας επιβεβαιώνονται από άλλους ερευνητές που εκτιμούν ότι υπάρχει συγκλίνουσα εξέλιξη για αυτά τα διάφορα είδη σε ορισμένα γονίδια και προέκυψαν από την φυσική επιλογή,

αν και είναι ακόμα αμφιλεγόμενο το πότε ακριβώς έγιναν οι διαφοροποιήσεις και πότε εμφανίστηκε το βιοσόναρ (Jones and Holderied, 2007; Li et al., 2017; Liu et al., 2018; Marcovitz et al., 2019; Parker et al., 2013; Shen et al., 2012; Thomas and Hahn, 2015). Ο ηχοεντοπισμός αποτελεί χαρακτηριστικό «καλού σχεδιασμού» της φυσικής εξέλιξης και είναι ένας αρκετά χρήσιμος μηχανισμός για διάφορα είδη που ζουν σε απαιτητικά και μοναδικά ενδιαιτήματα (Jones and Holderied, 2007). Στην παρούσα έρευνα βρέθηκαν πολυμορφισμοί σε μερικά νέα οπτικοακουστικά γονίδια που δεν έχουν παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες με ηχοεντοπισμό, αν και η ακριβής λειτουργία τους στον μηχανισμό χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, ώστε να εκτιμηθεί καλύτερα η εξελικτική πορεία του.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση

- Abe, K., Matsui, S., Watanabe, D., 2015. Transgenic songbirds with suppressed or enhanced activity of CREB transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 7599–7604. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413484112>
- Armengol, G., Knuutila, S., Lozano, J.-J., Madrigal, I., Caballín, M.-R., 2010. Identification of human specific gene duplications relative to other primates by array CGH and quantitative PCR. *Genomics* 95, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.02.003>
- Arnason, U., Gullberg, A., Gretarsdottir, S., Ursing, B., Janke, A., 2000. The mitochondrial genome of the sperm whale and a new molecular reference for estimating eutherian divergence dates. *J. Mol. Evol.* 50, 569–578. <https://doi.org/10.1007/s002390010060>
- Au, W.W., 2012. The sonar of dolphins. Springer Science & Business Media.
- Barrett-Lennard, L.G., Ford, J.K.B., Heise, K.A., 1996. The mixed blessing of echolocation: differences in sonar use by fish-eating and mammal-eating killer whales. *Anim. Behav.* 51, 553–565. <https://doi.org/10.1006/anbe.1996.0059>
- Bayona-Bafaluy, M.P., Acín-Pérez, R., Mullikin, J.C., Park, J.S., Moreno-Loshuertos, R., Hu, P., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Bai, Y., Enríquez, J.A., 2003. Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 31, 5349–5355. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg739>
- Bergman, J., Heide Schierup, M., 2021. Population dynamics of GC-changing mutations in humans and great apes. *Genetics* 218, iyab083. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab083>
- Bermúdez-Muñoz, J.M., Celaya, A.M., Hijazo-Pechero, S., Wang, J., Serrano, M., Varela-Nieto, I., 2020. G6PD overexpression protects from oxidative stress and age-related hearing loss. *Aging Cell* 19, e13275. <https://doi.org/10.1111/accel.13275>
- Bjergager, P., Heegard, S., Tougaard, J., 2003. Anatomy of the eye of the sperm whale (*Physeter macrocephalus* L.). *Aquat. Mamm.* 29, 31–36. <https://doi.org/10.1578/016754203101024059>
- Boonman, A., Bumrungsri, S., Yovel, Y., 2014. Nonecholocating Fruit Bats Produce Biosonar Clicks with Their Wings. *Curr. Biol.* 24, 2962–2967. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.077>
- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., Buckler, E.S., 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23, 2633–2635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>
- Brinkløv, S., Elemans, C., Ratcliffe, J., 2017. Oilbirds produce echolocation signals beyond their best hearing range and adjust signal design to natural light conditions. *R. Soc. Open Sci.* 4, 170255. <https://doi.org/10.1098/rsos.170255>
- Brinkløv, S., Fenton, M.B., Ratcliffe, J.M., 2013. Echolocation in Oilbirds and swiftlets. *Front. Physiol.* 4.
- Brinkløv, S., Warrant, E., 2017. Oilbirds. *Curr. Biol.* 27, R1145–R1147. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.071>
- Brinkløv, S.M., Jakobsen, L., Miller, L.A., 2022. Echolocation in bats, odontocetes, birds, and insectivores. *Explor. Anim. Behav. Sound Vol.* 419.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

- Caroça, C., Campelo, P., Caria, H., Paço, J., Silva, S., 2017. *G6PD* variants, malaria and sensorineural hearing loss in São Tomé and Príncipe: a case-control study. *Int. J. Med. Res. Health Sci.*
- Chai, S., Tian, R., Rong, X., Li, G., Chen, B., Ren, W., Xu, S., Yang, G., 2020. Evidence of Echolocation in the Common Shrew from Molecular Convergence with Other Echolocating Mammals. *Zool. Stud.* 59, e4. <https://doi.org/10.6620/ZS.2020.59-4>
- Chaudhury, S., Wadhwa, S., 2009. Prenatal auditory stimulation alters the levels of CREB mRNA, p-CREB and BDNF expression in chick hippocampus. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 583–590. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.06.004>
- Chen, J., Tian, W., 2016. Explaining the disease phenotype of intergenic SNP through predicted long range regulation. *Nucleic Acids Res.* 44, 8641–8654. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw519>
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L.L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S.J., Lu, X., Ruden, D.M., 2012. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 6, 80–92. <https://doi.org/10.4161/fly.19695>
- Clark, A.G., Eisen, M.B., Smith, D.R., Bergman, C.M., Oliver, B., Markow, T.A., Kaufman, T.C., Kellis, M., Gelbart, W., Iyer, V.N., 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450, 203–18.
- Clayton, D., Leung, H.-T., 2007. An R package for analysis of whole-genome association studies. *Hum. Hered.* 64, 45–51.
- Cortázar, D., Kunz, C., Saito, Y., Steinacher, R., Schär, P., 2007. The enigmatic thymine DNA glycosylase. Repair Small Base Lesions DNA—from Mol. Biol. Phenotype 6, 489–504. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.013>
- Cossette, M.-L., Stewart, D.T., Haghani, A., Zoller, J.A., Shafer, A.B.A., Horvath, S., 2023. Epigenetics and island-mainland divergence in an insectivorous small mammal. *Mol. Ecol.* 32, 152–166. <https://doi.org/10.1111/mec.16735>
- Coudert, E., Gehant, S., de Castro, E., Pozzato, M., Baratin, D., Neto, T., Sigrist, C.J.A., Redaschi, N., Bridge, A., The UniProt Consortium, 2023. Annotation of biologically relevant ligands in UniProtKB using ChEBI. *Bioinformatics* 39, btac793. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac793>
- Currie, S.E., Boonman, A., Troxell, S., Yovel, Y., Voigt, C.C., 2020. Echolocation at high intensity imposes metabolic costs on flying bats. *Nat. Ecol. Evol.* 4, 1174–1177. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1249-8>
- Danecek, P., Bonfield, J.K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M.O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S.A., Davies, R.M., Li, H., 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience* 10, giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- Davies, K.T., Maryanto, I., Rossiter, S.J., 2013. Evolutionary origins of ultrasonic hearing and laryngeal echolocation in bats inferred from morphological analyses of the inner ear. *Front. Zool.* 10, 1–15.
- Dechmann, D.K., Wikelski, M., van Noordwijk, H.J., Voigt, C.C., Voigt-Heucke, S.L., 2013. Metabolic costs of bat echolocation in a non-foraging context support a role in communication. *Front. Physiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00066>
- DePristo, M.A., Weinreich, D.M., Hartl, D.L., 2005. Missense meanderings in sequence space: a biophysical view of protein evolution. *Nat. Rev. Genet.* 6, 678–687. <https://doi.org/10.1038/nrg1672>
- Derbridge, J.J., Posthumus, E.E., Chen, H.L., Koprowski, J.L., 2015. *Solenodon paradoxus* (Soricomorpha: Solenodontidae). *Mamm. Species* 47, 100–106. <https://doi.org/10.1093/mspecies/sev010>

- Di Palma, F., Alfoldi, J., Johnson, J., Berlin, A., Gnerre, S., Jaffe, D., MacCallum, I., Young, S., Walker, B.J., Lindblad-Toh, K., 2005. The Draft Genome of *Sorex araneus* and *Erinaceus europaeus*. Submitt. 28-OCT-2005 Broad Inst. MIT Harv. 320 Charles Str. Camb. MA 02141 USA.
- Dosé, A.C., Hillman, D.W., Wong, C., Sohlberg, L., Lin-Jones, J., Burnside, B., 2003. Myo3A, One of Two Class III Myosin Genes Expressed in Vertebrate Retina, Is Localized to the Calycal Processes of Rod and Cone Photoreceptors and Is Expressed in the Sacculus. Mol. Biol. Cell 14, 1058–1073. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-06-0317>
- Edwards, D., Forster, J.W., Chagné, D., Batley, J., 2007. What Are SNPs?, in: Oraguzie, N.C., Rikkerink, E.H.A., Gardiner, S.E., De Silva, H.N. (Eds.), Association Mapping in Plants. Springer, New York, NY, pp. 41–52. https://doi.org/10.1007/978-0-387-36011-9_3
- Eisenberg, J.F., Gould, E., 1966. The Behavior of *Solenodon paradoxus* in Captivity with Comments on the Behavior of Other Insectivora.
- Ellegren, H., Smith, N.G., Webster, M.T., 2003. Mutation rate variation in the mammalian genome. Curr. Opin. Genet. Dev. 13, 562–568. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.10.008>
- Emerson, R.W., 2020. Bonferroni correction and type I error. J. Vis. Impair. Blind. 114, 77–78.
- Ennis, S., Jomary, C., Mullins, R., Cree, A., Chen, X., MacLeod, A., Jones, S., Collins, A., Stone, E., Lotery, A., 2008. Association between the *SERPING1* gene and age-related macular degeneration: a two-stage case-control study. The Lancet 372, 1828–1834. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61348-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61348-3)
- Faridi, R., Yousaf, R., Inagaki, S., Olszewski, R., Gu, S., Morell, R.J., Wilson, E., Xia, Y., Qaiser, T.A., Rashid, M., Fenollar-Ferrer, C., Hoa, M., Riazuddin, S., Friedman, T.B., 2023. Deafness *DFNB110* associated with a human *MAP3K1* recessive variant recapitulates hearing loss of Map3k1 kinase deficient mice. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3310464/v1>
- Feng, S., Stiller, J., Deng, Y., Armstrong, J., Fang, Q., Reeve, A.H., Xie, D., Chen, G., Guo, C., Faircloth, B.C., Petersen, B., Wang, Z., Zhou, Q., Diekhans, M., Chen, W., Andreu-Sánchez, S., Margaryan, A., Howard, J.T., Parent, C., Pacheco, G., Sinding, M.-H.S., Puetz, L., Cavill, E., Ribeiro, Â.M., Eckhart, L., Fjeldsø, J., Hosner, P.A., Brumfield, R.T., Christidis, L., Bertelsen, M.F., Sicheritz-Ponten, T., Tietze, D.T., Robertson, B.C., Song, G., Borgia, G., Claramunt, S., Lovette, I.J., Cowen, S.J., Njoroge, P., Dumbacher, J.P., Ryder, O.A., Fuchs, J., Bunce, M., Burt, D.W., Cracraft, J., Meng, G., Hackett, S.J., Ryan, P.G., Jönsson, K.A., Jamieson, I.G., da Fonseca, R.R., Braun, E.L., Houde, P., Mirarab, S., Suh, A., Hansson, B., Ponnikas, S., Sigeman, H., Stervander, M., Frandsen, P.B., van der Zwan, H., van der Sluis, R., Visser, C., Balakrishnan, C.N., Clark, A.G., Fitzpatrick, J.W., Bowman, R., Chen, N., Cloutier, A., Sackton, T.B., Edwards, S.V., Foote, D.J., Shakya, S.B., Sheldon, F.H., Vignal, A., Soares, A.E.R., Shapiro, B., González-Solís, J., Ferrer-Obiol, J., Rozas, J., Riutort, M., Tigano, A., Friesen, V., Dalén, L., Urrutia, A.O., Székely, T., Liu, Y., Campana, M.G., Corvelo, A., Fleischer, R.C., Rutherford, K.M., Gemmell, N.J., Dussex, N., Mouritsen, H., Thiele, N., Delmore, K., Liedvogel, M., Franke, A., Hoepfner, M.P., Krone, O., Fudickar, A.M., Milá, B., Ketterson, E.D., Fidler, A.E., Friis, G., Parody-Merino, Á.M., Battley, P.F., Cox, M.P., Lima, N.C.B., Prosdociimi, F., Parchman, T.L., Schlinger, B.A., Loiselle, B.A., Blake, J.G., Lim, H.C., Day, L.B., Fuxjager, M.J., Baldwin, M.W., Braun, M.J., Wirthlin, M., Dikow, R.B., Ryder, T.B., Camenisch, G., Keller, L.F., DaCosta, J.M., Hauber, M.E., Louder, M.I.M., Witt, C.C., McGuire, J.A., Mudge, J., Megna, L.C., Carling, M.D., Wang, B., Taylor, S.A., Del-Rio, G., Aleixo, A., Vasconcelos, A.T.R., Mello, C.V., Weir, J.T., Haussler, D., Li, Q., Yang, H., Wang, J., Lei, F., Rahbek, C., Gilbert, M.T.P., Graves, G.R., Jarvis, E.D., Paten, B., Zhang, G., 2020. Dense sampling of bird diversity increases power of comparative genomics. Nature 587, 252–257. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2873-9>

- Fenton, M.B., 1975. Acuity of echolocation in *Collocalia hirundinacea* (Aves: Apodidae), with comments on the distributions of echolocating swiftlets and molossid bats. *Biotropica* 1–7.
- Fouret, J., Brunet, F.G., Binet, M., Aurine, N., Enchéry, F., Croze, S., Guinier, M., Goumaidi, A., Preininger, D., Volff, J.-N., Bailly-Bechet, M., Lachuer, J., Horvat, B., Legras-Lachuer, C., 2020. Sequencing the Genome of Indian Flying Fox, Natural Reservoir of Nipah Virus, Using Hybrid Assembly and Conservative Secondary Scaffolding. *Front. Microbiol.* 11, 1807. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01807>
- Fraser, E., Silvis, A., Brigham, R., Czenze, Z., Adams, A., Bas, Y., Blakey, R., Briones-Salas, M., Britzke, E., Chaverri, G., Clement, M., Coleman, L., Dobony, C., Dzal, Y., B.M., F., Flanders, J., Ford, W., Frick, W., Friedrich, M., Zamora Gutierrez, V., 2020. Bat Echolocation Research: A handbook for planning and conducting acoustic studies.
- Friedman, T.B., Belyantseva, I.A., Frolenkov, G.I., 2020. Myosins and Hearing, in: Coluccio, L.M. (Ed.), *Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*. Springer International Publishing, Cham, pp. 317–330. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38062-5_13
- Gabora, L., 2013. Convergent Evolution, in: Maloy, S., Hughes, K. (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Second Edition). Academic Press, San Diego, pp. 178–180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00336-3>
- Galtier, N., Piganeau, G., Mouchiroud, D., Duret, L., 2001. GC-Content Evolution in Mammalian Genomes: The Biased Gene Conversion Hypothesis. *Genetics* 159, 907–911. <https://doi.org/10.1093/genetics/159.2.907>
- Gannon, W., Sherwin, R., Decarvalho, T., Farrell, 2001. Pinnae and echolocation call differences between *Myotis californicus* and *M. ciliolabrum* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Acta Chiropterologica* 3, 77–91.
- Gao, X., Becker, L.C., Becker, D.M., Starmer, J.D., Province, M.A., 2010. Avoiding the high Bonferroni penalty in genome-wide association studies. *Genet. Epidemiol.* 34, 100–105. <https://doi.org/10.1002/gepi.20430>
- Gilbert, M.T.P., Carrasco, T., Uliano Da Silva, M., Formenti, G., Mountcastle, J., Haase, B., Balacco, J., Graves, G., O'Shea, B., Collins, J., Wood, J., Fedrigo, O., Jarvis, E.D., 2020. *Nyctibius grandis* isolate bNycGra1, whole genome shotgun sequencing project. Submitt. 07-JUN-2020 Vertebr. Genomes Proj. G10K 1230 York Ave. N. Y. NY 10065 USA.
- Gleason, M.E., Eddington, V.M., Kloepper, L.N., 2023. Acoustic behavior in the northern short-tailed shrew (*Blarina brevicauda*): Ultrasonic click production in a novel environment. *J. Acoust. Soc. Am.* 154, 411–417. <https://doi.org/10.1121/10.0020071>
- Gnerre, S., Heiman, D., Young, S., Muzny, D.M., Nazareth, L., Weinstock, G., Gibbs, R., 2008. *Pteropus vampyrus* whole genome shotgun (WGS) project. Submitt. 03-SEP-2008 Broad Inst. MIT Harv. 7 Camb. Cent. Camb. MA 02142 USA.
- Gould, E., 1965. Evidence for echolocation in the Tenrecidae of Madagascar. *Proc. Am. Philos. Soc.* 109, 352–360.
- Gould, E., Negus, N.C., Novick, A., 1964. Evidence for echolocation in shrews. *J. Exp. Zool.* 156, 19–37.
- Grant, P.R., Grant, B.R., Markert, J.A., Keller, L.F., Petren, K., 2004. Convergent evolution of Darwin's finches caused by introgressive hybridization and selection. *Evolution* 58, 1588–1599.
- Griffin, D.R., 1958. Listening in the dark: the acoustic orientation of bats and men.
- Gruden, P., White, P.R., Oswald, J.N., Barkley, Y., Cerchio, S., Lammers, M., Baumann-Pickering, S., 2016. Differences in oscillatory whistles produced by spinner (*Stenella longirostris*) and pantropical spotted (*Stenella attenuata*) dolphins. *Mar. Mammal Sci.* 32, 520–534. <https://doi.org/10.1111/mms.12280>

- Guo, C., McDowell, I.C., Nodzenski, M., Scholtens, D.M., Allen, A.S., Lowe, W.L., Reddy, T.E., 2017. Transversions have larger regulatory effects than transitions. *BMC Genomics* 18, 394. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3785-4>
- Hagmann, M., 1999. A good SNP may be hard to find.
- Han, J.-H., Yiu, A.P., Cole, C.J., Hsiang, H.-L., Neve, R.L., Josselyn, S.A., 2008. Increasing CREB in the auditory thalamus enhances memory and generalization of auditory conditioned fear. *Learn. Mem.* 15, 443–453. <https://doi.org/10.1101/lm.993608>
- He, K., Liu, Q., Xu, D.-M., Qi, F.-Y., Bai, J., He, S.-W., Chen, P., Zhou, X., Cai, W.-Z., Chen, Z.-Z., Liu, Z., Jiang, X.-L., Shi, P., 2021. Echolocation in soft-furred tree mice. *Science* 372, eaay1513. <https://doi.org/10.1126/science.aay1513>
- Hilbe, J.M., 2011. Logistic regression. *Int. Encycl. Stat. Sci.* 1, 15–32.
- Hoang, V.T., Nyswaner, K., Torres-Ayuso, P., Brognard, J., 2020. The protein kinase MAP3K19 phosphorylates MAP2Ks and thereby activates ERK and JNK kinases and increases viability of KRAS-mutant lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* 295, 8470–8479. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012365>
- Houtgast, E.J., Sima, V.-M., Bertels, K., Al-Ars, Z., 2018. Hardware acceleration of BWA-MEM genomic short read mapping for longer read lengths. *Comput. Biol. Chem.* 75, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.03.024>
- Hoy, R.R., 2012. Convergent evolution of hearing. *Science* 338, 894–895.
- Hughes, J.F., Skaletsky, H., Pyntikova, T., Graves, T.A., Van Daalen, S.K., Minx, P.J., Fulton, R.S., McGrath, S.D., Locke, D.P., Friedman, C., 2010. Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content. *Nature* 463, 536–539.
- Jo, B.-S., Choi, S.S., 2015. Introns: The Functional Benefits of Introns in Genomes. *Genomics Inform.* 13, 112–118. <https://doi.org/10.5808/GI.2015.13.4.112>
- Johnson, J., Muren, E., Swofford, R., Turner-Maier, J., Marinescu, V., Genereux, D., Lindblad-Toh, K., 2018. The 200 mammals project: sequencing genomes by a novel cost-effective method, yielding a high-resolution annotation of the human genome. Unpubl. Available <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbi/povib/0000000001>
- Johnson, M., Madsen, P.T., Zimmer, W.M.X., de Soto, N.A., Tyack, P.L., 2006. Foraging Blainville's beaked whales (*Mesoplodon densirostris*) produce distinct click types matched to different phases of echolocation. *J. Exp. Biol.* 209, 5038–5050. <https://doi.org/10.1242/jeb.02596>
- Jones, G., 2005. Echolocation. *Curr. Biol.* 15, R484–R488.
- Jones, G., Holderied, M.W., 2007. Bat echolocation calls: adaptation and convergent evolution. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 905–912. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.0200>
- Kanwal, J.S., 2012. Right-left asymmetry in the cortical processing of sounds for social communication vs. navigation in mustached bats. *Eur. J. Neurosci.* 35, 257–270. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07951.x>
- Kasahara, M., 2010. Genome Duplication and T Cell Immunity, in: Liston, A. (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Academic Press, pp. 7–36. [https://doi.org/10.1016/S1877-1173\(10\)92002-4](https://doi.org/10.1016/S1877-1173(10)92002-4)
- Khrustalev, V.V., Arjomandzadegan, M., Barkovsky, E.V., Titov, L.P., 2012. Low rates of synonymous mutations in sequences of *Mycobacterium tuberculosis* GyrA and KatG genes. *Tuberculosis* 92, 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2012.03.004>
- Kodeboyina, S.K., Lee, T., Bollinger, K.E., Ulrich, L., Bogorad, D., Estes, A., Zhi, W., Sharma, S., Sharma, A., 2020. Aqueous Humor Proteomic Changes Associated with Visual Field Index Parameters in Glaucoma Suspects and Patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 61, 1979.
- Korf, I., Yandell, M., Bedell, J., 2003. *Blast*. O'Reilly Media, Inc.
- Kössl, M., Vater, M., 1995. Cochlear structure and function in bats, in: *Hearing by Bats*. Springer, pp. 191–234.

- Krubitzer, L., Künzle, H., Kaas, J., 1997. Organization of sensory cortex in a Madagascan insectivore, the tenrec (*Echinops telfairi*). *J. Comp. Neurol.* 379, 399–414. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970317\)379:3<399::AID-CNE6>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970317)379:3<399::AID-CNE6>3.0.CO;2-Z)
- Kurokawa, T., Kikuchi, T., Ohta, K., Imai, H., Yoshimura, N., 2003. Ocular manifestations in Blau syndrome associated with a *CARD15/Nod2* mutation. *Ophthalmology* 110, 2040–2044. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(03\)00717-6](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(03)00717-6)
- Ladegaard, M., Mulsow, J., Houser, D.S., Jensen, F.H., Johnson, M., Madsen, P.T., Finneran, J.J., 2019. Dolphin echolocation behaviour during active long-range target approaches. *J. Exp. Biol.* 222, jeb189217. <https://doi.org/10.1242/jeb.189217>
- Laeta, M., Oliveira, J.A., Siciliano, S., Lambert, O., Jensen, F.H., Galatius, A., 2023. Cranial asymmetry in odontocetes: a facilitator of sonic exploration? *Zoology* 160, 126108. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2023.126108>
- Lam, T.W., Sung, W.K., Tam, S.L., Wong, C.K., Yiu, S.M., 2008. Compressed indexing and local alignment of DNA. *Bioinformatics* 24, 791–797. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn032>
- Lanzetti, A., Coombs, E.J., Portela Miguez, R., Fernandez, V., Goswami, A., 2022. The ontogeny of asymmetry in echolocating whales. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 289, 20221090. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.1090>
- Leamy, L.J., Zhang, H., Li, C., Chen, C.Y., Song, B.-H., 2017. A genome-wide association study of seed composition traits in wild soybean (*Glycine soja*). *BMC Genomics* 18, 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3397-4>
- Leichtle, A., Klenke, C., Ebmeyer, J., Daerr, M., Bruchhage, K.-L., Hoffmann, A.S., Ryan, A.F., Wollenberg, B., Sudhoff, H., 2015. NOD-Like Receptor Signaling in Cholesteatoma. *BioMed Res. Int.* 2015, 408169. <https://doi.org/10.1155/2015/408169>
- Leinonen, R., Sugawara, H., Shumway, M., on behalf of the International Nucleotide Sequence Database Collaboration, 2011. The Sequence Read Archive. *Nucleic Acids Res.* 39, D19–D21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1019>
- Lesko, S.L., Rouhana, L., 2020. Dynein assembly factor with WD repeat domains 1 (DAW1) is required for the function of motile cilia in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Dev. Growth Differ.* 62, 423–437. <https://doi.org/10.1111/dgd.12669>
- Lewis, C.A., Crayle, J., Zhou, S., Swanstrom, R., Wolfenden, R., 2016. Cytosine deamination and the precipitous decline of spontaneous mutation during Earth's history. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 8194–8199. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607580113>
- Li, G., 2023. High-Quality *Rhinolophus affinis* Genome Reveals the Virus Adaptation and Subspecies Differentiation. Submitt. 12-JUL-2023 Coll. Life Sci. Shaanxi Norm. Univ. West Chang. Ave. Chang. Dist. Xian 710119 China.
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, Y., Liu, Z., Shi, P., Zhang, J., 2010. The hearing gene *Prestin* unites echolocating bats and whales. *Curr. Biol.* 20, R55–R56.
- Li, Y.-Y., Liu, Z., Qi, F.-Y., Zhou, X., Shi, P., 2017. Functional Effects of a Retained Ancestral Polymorphism in *Prestin*. *Mol. Biol. Evol.* 34, 88–92. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw222>
- Liu, Q., Hua, Q.-Y., Sun, R., He, S.-W., Li, M.-C., Shi, L.-Y., Chen, P., Ma, Y.-S., Zhang, Q., Jiang, X.-L., Wang, Y., Shi, P., 2023. Evolutionary prediction for new echolocators. <https://doi.org/10.1101/2023.09.13.556757>

- Liu, Z., Chen, P., Xu, D.-M., Qi, F.-Y., Guo, Y.-T., Liu, Q., Bai, J., Zhou, X., Shi, P., 2022. Molecular convergence and transgenic evidence suggest a single origin of laryngeal echolocation in bats. *Iscience* 25.
- Liu, Z., Qi, F.-Y., Xu, D.-M., Zhou, X., Shi, P., 2018. Genomic and functional evidence reveals molecular insights into the origin of echolocation in whales. *Sci. Adv.* 4, eaat8821.
- Lynch, M., Ali, F., Lin, T., Wang, Y., Ni, J., Long, H., 2023. The divergence of mutation rates and spectra across the Tree of Life. *EMBO Rep.* 24, e57561. <https://doi.org/10.15252/embr.202357561>
- Madsen, P.T., de Soto, N.A., Arranz, P., Johnson, M., 2013. Echolocation in Blainville's beaked whales (*Mesoplodon densirostris*). *J. Comp. Physiol. A* 199, 451–469. <https://doi.org/10.1007/s00359-013-0824-8>
- Marcovitz, A., Turakhia, Y., Chen, H.I., Gloude-mans, M., Braun, B.A., Wang, H., Bejerano, G., 2019. A functional enrichment test for molecular convergent evolution finds a clear protein-coding signal in echolocating bats and whales. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 21094–21103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818532116>
- McGowen, M.R., Tsagkogeorga, G., Williamson, J., Morin, P.A., Rossiter, S.J., 2020. Positive Selection and Inactivation in the Vision and Hearing Genes of Cetaceans. *Mol. Biol. Evol.* 37, 2069–2083. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa070>
- Miyoshi, T., Belyantseva, I.A., Sajeeradathan, M., Friedman, T.B., 2024. Pathophysiology of human hearing loss associated with variants in myosins. *Front. Physiol.* 15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1374901>
- Mongan, M., Wang, J., Liu, H., Fan, Y., Jin, C., Kao, W.Y.-W., Xia, Y., 2011. Loss of *MAP3K1* enhances proliferation and apoptosis during retinal development. *Development* 138, 4001–4012. <https://doi.org/10.1242/dev.065003>
- Morin, P., Jacobsen, J.K., Meyer, S., Frozen Zoo Cell Culture Team, U., Balacco, J., Absolon, D., Sims, Y., Abueg, L., Aiden, E.-L., Formenti, G., Fedrigo, O., Jarvis, E.D., 2023. *Eschrichtius robustus* (grey whale) for VGP reference genome, mEscRob2, primary haplotype, *Balaenoptera ricei* (Rice's whale) for VGP genome, mBalRic1, haplotype 2. Submitt. 07-JAN-2023 Vertebr. Genomes Proj. G10K 1230 York Ave. N. Y. NY 10065 USA.
- Nakajima, N., Onuma, M., Endoh, D., Nagamine, T., Nakaya, Y., 2020. Draft genome sequence of Bonin flying fox. Submitt. 20-AUG-2020 Contact Nobuyoshi Nakajima Natl. Inst. Environ. Stud. Cent. Environ. Biol. Ecosyst. Stud. Onogawa 16-2 Tsukuba Ibaraki 305-8506 Jpn.
- Napierala, M.A., 2012. What is the Bonferroni correction? *Aos Now* 40–41.
- Neuillé, M., Malaichamy, S., Vadalà, M., Michiels, C., Condroyer, C., Sachidanandam, R., Srilekha, S., Arokiasamy, T., Letexier, M., Démontant, V., Sahel, J.-A., Sen, P., Audo, I., Soumittra, N., Zeitz, C., 2016. Next-generation sequencing confirms the implication of in autosomal-recessive congenital stationary night blindness. *Clin. Genet.* 89, 690–699. <https://doi.org/10.1111/cge.12746>
- Nguyen, T., Brunson, D., Crespi, C.L., Penman, B.W., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1992. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 3030–3034. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.3030>
- Noren, D.P., Holt, M.M., Dunkin, R.C., Williams, T.M., 2017. Echolocation is cheap for some mammals: Dolphins conserve oxygen while producing high-intensity clicks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 495, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.07.002>
- Olson, L.E., 2013. Tenrecs. *Curr. Biol.* 23, R5–R8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.015>
- Parker, J., Tsagkogeorga, G., Cotton, J.A., Liu, Y., Provero, P., Stupka, E., Rossiter, S.J., 2013. Genome-wide signatures of convergent evolution in echolocating mammals. *Nature* 502, 228–231. <https://doi.org/10.1038/nature12511>
- Pollak, G.D., Casseday, J.H., 2012. *The Neural Basis of Echolocation in Bats*. Springer Science & Business Media.

- Pozzoli, U., Menozzi, G., Fumagalli, M., Cereda, M., Comi, G.P., Cagliani, R., Bresolin, N., Sironi, M., 2008. Both selective and neutral processes drive GC content evolution in the human genome. *BMC Evol. Biol.* 8, 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-99>
- Price, J.J., Johnson, K.P., Bush, S.E., Clayton, D.H., 2005. Phylogenetic relationships of the Papuan Swiftlet *Aerodramus papuensis* and implications for the evolution of avian echolocation. *Ibis* 147, 790–796. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2005.00467.x>
- Quinlan, A.R., Hall, I.M., 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Ramalho, D., Miller, B., Leal, E., Leal, B., Montes, M., Montes, A., 2015. Fluctuating asymmetry in populations of bats: species adapted to urban environments are not hampered by habitat degradation. *Chiropt. Neotropical* 21, 2015.
- Ray, A., 2022. DNA Mutation, Repair, and Recombination, in: Kar, D., Sarkar, S. (Eds.), *Genetics Fundamentals Notes*. Springer Nature, Singapore, pp. 433–490. https://doi.org/10.1007/978-981-16-7041-1_9
- Ren, M., Sun, H., Shunqi, B., Zhang, S., Hua, P., 2018. Parallel amino acid deletions of prestin protein in two dramatically divergent bat lineages suggest the complexity of the evolution of echolocation in bats. *Acta Chiropterologica* 20, 311–317.
- Riazuddin, S.A., Shahzadi, A., Zeitz, C., Ahmed, Z.M., Ayyagari, R., Chavali, V.R.M., Ponferrada, V.G., Audo, I., Michiels, C., Lancelot, M.-E., Nasir, I.A., Zafar, A.U., Khan, S.N., Husnain, T., Jiao, X., MacDonald, I.M., Riazuddin, S., Sieving, P.A., Katsanis, N., Hejtmancik, J.F., 2010. A Mutation in *SLC24A1* Implicated in Autosomal-Recessive Congenital Stationary Night Blindness. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.08.013>
- Rosenberg, M.S., Subramanian, S., Kumar, S., 2003. Patterns of Transitional Mutation Biases Within and Among Mammalian Genomes. *Mol. Biol. Evol.* 20, 988–993. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg113>
- Sampieri, L., Funes Chabán, M., Di Giusto, P., Rozés-Salvador, V., Alvarez, C., 2021. CREB3L2 Modulates Nerve Growth Factor-Induced Cell Differentiation. *Front. Mol. Neurosci.* 14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.650338>
- Sanchez, L., Ohdachi, S.D., Kawahara, A., Echenique-Diaz, L.M., Maruyama, S., Kawata, M., 2019. Acoustic emissions of *Sorex unguiculatus* (Mammalia: Soricidae): Assessing the echo-based orientation hypothesis. *Ecol. Evol.* 9, 2629–2639. <https://doi.org/10.1002/ece3.4930>
- Sayers, E.W., Bolton, E.E., Brister, J.R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D.C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., Tse, T., Wang, J., Williams, R., Trawick, B.W., Pruitt, K.D., Sherry, S.T., 2022. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* 50, D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab112>
- Sebeok, T.A., 1977. Insectivore Communication, in: *How Animals Communicate*. Indiana University Press, pp. 600–633.
- Sharma, R.K., Drusin, M., Hostyk, J., Baugh, E.H., Aggarwal, V.S., Goldstein, D., Kim, A.H., 2023. Myosin Mutations and Sudden Sensorineural Hearing Loss: Results of Whole Exome Sequencing. *Otol. Neurotol.* 44, 16. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000003756>
- Shastri, B.S., 2009. SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype, in: Komar, A.A. (Ed.), *Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_1

- Shen, Y.-Y., Liang, L., Li, G.-S., Murphy, R.W., Zhang, Y.-P., 2012. Parallel Evolution of Auditory Genes for Echolocation in Bats and Toothed Whales. *PLOS Genet.* 8, e1002788. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002788>
- Siemers, B.M., Schauermaier, G., Turni, H., von Merten, S., 2009. Why do shrews twitter? Communication or simple echo-based orientation. *Biol. Lett.* 5, 593–596. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0378>
- Soskine, M., Tawfik, D.S., 2010. Mutational effects and the evolution of new protein functions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 572–582.
- Stelzer, Rosen R, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Iny Stein T, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan - Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, Lancet D, 2016. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses [WWW Document]. GeneCards – Hum. Gene Database. URL <https://www.genecards.org/> (accessed 10.6.24).
- Steward, C.A., Humphray, S., Plumb, B., Jones, M.C., Quail, M.A., Rice, S., Cox, T., Davies, R., Bonfield, J., Keane, T.M., Nefedov, M., de Jong, P.J., Lyons, P., Wicker, L., Todd, J., Hayashizaki, Y., Gulban, O., Danska, J., Harrow, J., Hubbard, T., Rogers, J., Adams, D.J., 2010. Genome-wide end-sequenced BAC resources for the *NOD/MrkTac()* and *NOD/ShiLtJ()* mouse genomes. *Genomics* 95, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.10.004>
- Strüder-Kypke, M.C., Lynn, D.H., 2010. Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker. *Syst. Biodivers.* 8, 131–148. <https://doi.org/10.1080/14772000903507744>
- Suthers, R.A., Hector, D.H., 1985. The physiology of vocalization by the echolocating oilbird, *Steatornis caripensis*. *J. Comp. Physiol. A* 156, 243–266. <https://doi.org/10.1007/BF00610867>
- Syvänen, A.C., 2001. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat. Rev. Genet.* 2, 930–942. <https://doi.org/10.1038/35103535>
- Tan, J., Widjaja, S., Xu, J., Shepherd, R.K., 2008. Cochlear Implants Stimulate Activity-Dependent CREB Pathway in the Deaf Auditory Cortex: Implications for Molecular Plasticity Induced by Neural Prosthetic Devices. *Cereb. Cortex* 18, 1799–1813. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm206>
- Thaler, L., Arnott, S.R., Goodale, M.A., 2011. Neural Correlates of Natural Human Echolocation in Early and Late Blind Echolocation Experts. *PLOS ONE* 6, e20162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020162>
- Thaler, L., Goodale, M.A., 2016. Echolocation in humans: an overview. *WIREs Cogn. Sci.* 7, 382–393. <https://doi.org/10.1002/wcs.1408>
- Thiagavel, J., Cechetto, C., Santana, S.E., Jakobsen, L., Warrant, E.J., Ratcliffe, J.M., 2018. Auditory opportunity and visual constraint enabled the evolution of echolocation in bats. *Nat. Commun.* 9, 98. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02532-x>
- Thomas, G.W.C., Hahn, M.W., 2015. Determining the Null Model for Detecting Adaptive Convergence from Genomic Data: A Case Study using Echolocating Mammals. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1232–1236. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv013>
- Thomas, J.A., Moss, C.F., Vater, M., 2004. Echolocation in Bats and Dolphins. University of Chicago Press.
- Thomassen, H.A., den Tex, R.-J., de Bakker, M.A.G., Povel, G.D.E., 2005. Phylogenetic relationships amongst swifts and swiftlets: A multi locus approach. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 264–277. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.05.010>

- Tolosa, S., Sansón, J.A., Hidalgo, A., 2019. Theoretical Study of Adenine to Guanine Transition Assisted by Water and Formic Acid Using Steered Molecular Dynamic Simulations. *Front. Chem.* 7, 414. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00414>
- Tomasi, T.E., 1979. Echolocation by the Short-Tailed Shrew *Blarina brevicauda*. *J. Mammal.* 60, 751–759. <https://doi.org/10.2307/1380190>
- Ursing, B.M., Arnason, U., 1998. Analyses of mitochondrial genomes strongly support a hippopotamus-whale clade. *Proc. Biol. Sci.* 265, 2251–2255. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0567>
- Vasimuddin, Md., Misra, S., Li, H., Aluru, S., 2019. Efficient Architecture-Aware Acceleration of BWA-MEM for Multicore Systems, in: 2019 IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium (IPDPS). Presented at the 2019 IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium (IPDPS), pp. 314–324. <https://doi.org/10.1109/IPDPS.2019.00041>
- Verfuß, U.K., Miller, L.A., Pilz, P.K.D., Schnitzler, H.-U., 2009. Echolocation by two foraging harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *J. Exp. Biol.* 212, 823–834. <https://doi.org/10.1242/jeb.022137>
- Vinberg, F., Wang, T., Molday, R.S., Chen, J., Kefalov, V.J., 2015. A new mouse model for stationary night blindness with mutant *Slc24a1* explains the pathophysiology of the associated human disease. *Hum. Mol. Genet.* 24, 5915–5929. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv319>
- Voigt, C.C., Lewanzik, D., 2012. ‘No cost of echolocation for flying bats’ revisited. *J. Comp. Physiol. B* 182, 831–840. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0663-x>
- von Merten, S., Siemers, B.M., 2020. Shrew twittering call rate is high in novel environments—a lab-study. *Mammal Res.* 65, 469–479. <https://doi.org/10.1007/s13364-020-00488-w>
- Webster, M.T., Axelsson, E., Ellegren, H., 2006. Strong Regional Biases in Nucleotide Substitution in the Chicken Genome. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1203–1216. <https://doi.org/10.1093/molbev/msk008>
- Wegler, M., Jia, X., Alders, M., Bouman, A., Chen, J., Duan, X., Lauzon, J.L., Mathijssen, I.B., Sticht, H., Syrbe, S., Tan, S., Guo, H., Abou Jamra, R., 2022. De novo variants in the *PABP* domain of *PABPC1* lead to developmental delay. *Genet. Med.* 24, 1761–1773. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2022.04.013>
- Wei, C., 2021. Chapter 17 - Sound production and propagation in cetaceans, in: Rosenfeld, C.S., Hoffmann, F. (Eds.), *Neuroendocrine Regulation of Animal Vocalization*. Academic Press, pp. 267–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815160-0.00013-X>
- Wierer, M., Schrey, A.K., Kühne, R., Ulbrich, S.E., Meyer, H.H.D., 2012. A Single Glycine-Alanine Exchange Directs Ligand Specificity of the Elephant Progesterone Receptor. *PLOS ONE* 7, e50350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050350>
- Williams, D.S., Lopes, V.S., 2011. The many different cellular functions of *MYO7A* in the retina. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1207–1210. <https://doi.org/10.1042/BST0391207>
- Wolf, M., de Jong, M., Halldórsson, S.D., Árnason, Ú., Janke, A., 2022. Genomic Impact of Whaling in North Atlantic Fin Whales. *Mol. Biol. Evol.* 39, msac094. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac094>
- Wright, B.M., Deecke, V.B., Ellis, G.M., Trites, A.W., Ford, J.K.B., 2021. Behavioral context of echolocation and prey-handling sounds produced by killer whales (*Orcinus orca*) during pursuit and capture of Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.). *Mar. Mammal Sci.* 37, 1428–1453. <https://doi.org/10.1111/mms.12836>
- Yadav, M., Mohapatra, B., 2017. Intergenic. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_64-1
- Yang, S., Gill, R.A., Zaman, Q.U., Ulhassan, Z., Zhou, W., 2020. Insights on SNP types, detection methods and their utilization in Brassica species: Recent progress and future perspectives. *J. Biotechnol.* 324, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.09.018>

- Yu, X., Cong, N., Liu, X., Wang, R., Li, D., 2022. *SASH1* knockdown suppresses *TRAF6* ubiquitination to regulate hemangioma progression by mediating *EZH2* degradation. *Exp. Cell Res.* 418, 113270. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113270>
- Yuan, Y., Zhang, Y., Zhang, P., Liu, C., Wang, J., Gao, Haiyu, Hoelzel, A.R., Seim, I., Lv, M., Lin, M., Dong, L., Gao, Haoyang, Yang, Z., Caruso, F., Lin, W., da Fonseca, R.R., Wang, D., Wang, X., Rasmussen, M.H., Liu, M., Zheng, J., Zhao, L., Campos, P.F., Kang, H., Iversen, M., Song, Y., Guo, X., Guo, J., Qin, Y., Pan, S., Xu, Q., Meng, L., A, Y., Liu, S., Lee, S.M.-Y., Liu, X., Xu, X., Yang, H., Fan, G., Wang, K., Li, S., 2021. Comparative genomics provides insights into the aquatic adaptations of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2106080118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106080118>
- Zakon, H.H., 2002. Convergent evolution on the molecular level. *Brain. Behav. Evol.* 59, 250–261. <https://doi.org/10.1159/000063562>
- Zhang, Q., Forster-Gibson, C., Bercovici, E., Bernardo, A., Ding, F., Shen, W., Langer, K., Rex, T., Kang, J.-Q., 2023. Epilepsy plus blindness in microdeletion of *GABRA1* and *GABRG2* in mouse and human. *Exp. Neurol.* 369, 114537. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2023.114537>
- Zhang, Z., Miteva, M.A., Wang, L., Alexov, E., 2012. Analyzing Effects of Naturally Occurring Missense Mutations. *Comput. Math. Methods Med.* 2012, 805827. <https://doi.org/10.1155/2012/805827>
- Zheng, X., Gogarten, S.M., Lawrence, M., Stilp, A., Conomos, M.P., Weir, B.S., Laurie, C., Levine, D., 2017. SeqArray—a storage-efficient high-performance data format for WGS variant calls. *Bioinformatics* 33, 2251–2257. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx145>

ABSTRACT

Echolocation or biosonar is a physiological process in which certain species have the ability to produce sound waves and perceive their environment through the echoes that are reflected back to them. It is used by a wide range of species, such as all toothed whales and small bats, some shrews, and certain birds, when vision is limited or inadequate. It is estimated that species which have developed echolocation exhibit convergent evolution—meaning that these organisms, which are not closely related, have independently developed common characteristics to adapt to similar needs. In this study, we attempt to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs) among various vertebrates based on the development or absence of echolocation as an evolutionary trait, using bioinformatic analysis. The aim is to investigate the evolutionary pathway of this mechanism, as well as to expand the genomic literature regarding echolocation. Databases were used to extract whole genomes of various bats, cetaceans, and insectivores, and these were aligned with the genome of the hippopotamus. Through GLM analysis and prediction algorithms, we identified the positions in the genome where single nucleotide polymorphisms appear, whether they code for proteins, and if they result in amino acid changes, allowing us to assess the possible impact of mutations on genes. Additionally, some other species were compared at the end using Blast. The results indicated a separation of mutations based on whether or not echolocation is used, thus suggesting potential convergent evolution in species that use echolocation. Many of the nonsynonymous polymorphisms were found in genes associated with audiovisual functions, and thus could be related to the mechanism of echolocation, such as *SLC24A1*, *NOD1* and *SERPING1*. Species with echolocation appear to have developed enhanced defensive mechanisms (*SASH1*, *NOD1*) and regulatory mechanisms (*SERPING1*, *G6PD*,

CREB3L2, *MYO1A*). Additionally, they show a shared association with the development and functioning of neurological mechanisms (*PAIP1*) and ATP-related activities (*MAP3K19*, *GABRQ*). Mutations suggest that species lacking echolocation may have gradually lost the need for these specific genes for hearing and vision, evolving in a different direction. In contrast, species without echolocation have retained an optimal adaptation to light (*SLC24A1*). Echolocation is a particularly useful mechanism for various species that inhabit challenging and unique environments. In the current study, polymorphisms were identified in some novel audio-visual genes that have not been observed in previous echolocation studies, although their precise role in the mechanism requires further investigation to better assess its evolutionary trajectory.

Keywords: Echolocation, Single nucleotide polymorphisms (SNPs), convergent evolution

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

7.1. Python script για την εύρεση των SNPs με το ζητούμενο p

```
threshold = 0.05 / 20252446

input_file = ballelic_sort_GLM1.txt'

output_file = filtered_output.txt'

with open(input_file, 'r') as infile, open(output_file, 'w') as outfile:

    header = infile.readline()

    outfile.write(header)

    header_columns = header.strip().split('\t')

    p_value_index = header_columns.index('p')

    for line in infile:

        columns = line.strip().split('\t')

        if len(columns) == len(header_columns):

            p_value = float(columns[p_value_index])

            if p_value < threshold:

                outfile.write(line)

    print(f"Filtered data has been written to {output_file}")
```

7.2. Αλλαγή στο VCF των νουκλεοτιδίων για κάθε είδος από αριθμούς σε γράμματα σε σχέση με το νουκλεοτίδιο αναφοράς (από 0,1,2 σε A,T,G,C)

```
def process_vcf(input_file, output_file):

    with open(input_file, 'r') as vcf_file, open(output_file, 'w') as out_vcf:

        for line in vcf_file:

            if line.startswith("#"):

                # Write header lines as they are

                out_vcf.write(line)

                continue

            # Split the line into columns

            columns = line.strip().split('\t')

            ref = columns[3] # Third column (reference allele)

            alt = columns[4].split(',') # Fourth column (alternate allele(s))

            # Process each genotype in the row

            genotypes = columns[9:] # if Genotypes start from the 10th column

            new_genotypes = []

            for genotype in genotypes:

                gt = genotype.split(':')[0] # Get the genotype part (before the first ':')

                alleles = gt.split('/')
```

```

translated_alleles = []

for allele in alleles:

    if allele == '0':

        translated_alleles.append(ref)

    elif allele == '1':

        translated_alleles.append(alt[0])

    elif allele == '2' and len(alt) > 1:

        translated_alleles.append(alt[1])

    else:

        # Handle missing or unexpected allele values

        translated_alleles.append('.')

    # Join the translated alleles with a slash

    translated = ''.join(translated_alleles)

    new_genotypes.append(translated)

# Create the result line with translated genotypes

result = '\t'.join(columns[:9] + new_genotypes)

out_vcf.write(result + '\n')

# Input and output file paths

input_vcf = biallelic_sort_outlier.vcf'

```

```
output_vcf = processed_biallelic_sort_outlier.vcf'
```

```
# Process the VCF file
```

```
process_vcf(input_vcf, output_vcf)
```