



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ	
Αρ. Πρωτοκ. ....	1286
Ημερομηνία: ....	7-9-09

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

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μοριακή – γενοτυπική ταυτοποίηση ειδών καρχαριών στον  
Ελλαδικό χώρο»**

**ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

**ΒΟΛΟΣ 2009**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 7804/1  
Ημερ. Εισ.: 25-11-2009  
Δωρεά: Συγγραφέας  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΙΥΠ  
2009  
ΟΙΚ

**«Μοριακή – γενοτυπική ταυτοποίηση ειδών καρχαριών στον Ελλαδικό χώρο»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :**

1) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*,

2) **Δημήτριος Βαφείδης**, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση - έμμεση χρησιμότητά τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*,

3) **Ελένη Μεντέ**, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια, Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.



## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή .....	6
1.1 Χονδριχθύες στον Ελλαδικό χώρο.....	6
1.1.1 <i>Scyliorhinus stellaris</i> .....	7
1.1.2 <i>Scyliorhinus canicula</i> .....	7
1.1.3 <i>Galeus melastomus</i> .....	7
1.1.4 <i>Raja naevus</i> .....	7
1.1.5 <i>Raja miraletus</i> .....	7
1.1.6 <i>Prionacea glauca</i> .....	8
1.1.7 <i>Squalus acanthias</i> .....	8
1.1.8 <i>Squalus blainvillei</i> .....	8
1.2 Σκοπός εργασίας .....	9
2. Υλικά και Μέθοδοι .....	9
2.1 Δειγματοληψία .....	9
2.2 Απομόνωση DNA .....	10
2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA.....	12
2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) .....	13
2.5 Αλληλούχιση .....	15
2.6 Ανάλυση δεδομένων .....	15
3. Αποτελέσματα .....	17
3.1 Εύρεση ομολογίας και νουκλεοτιδική ευθυγράμμιση αλληλουχιών ....	17
3.2 Φυλογενετικά δένδρα.....	18
3.3 Στατιστικά.....	20
3.3.1 Συνολική μέση γενετική απόσταση.....	20
3.3.2 Ανά ζεύγος γενετική απόσταση .....	20

3.3.3	Ανάλυση ομοιογένειας με βάση το πρότυπο υποκαταστάσεων .....	21
3.3.4	Γενετική απόσταση με βάση τη σύσταση σε βάσεις.....	21
3.3.5	Πρότυπο υποκατάστασης 4Χ4.....	21
4.	Συζήτηση.....	26
5.	Συμπεράσματα .....	28
6.	Βιβλιογραφία .....	29
7.	Παράρτημα.....	30

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Χονδριχθύες στον Ελλαδικό χώρο.

Οι Χονδριχθύες (Chondrichthyes) διαχωρίζονται σε 2 υποκλάσεις, στους Ολοκέφαλους και στα Ελασμοβράγχια, από τις οποίες η 2<sup>η</sup> υποκλάση αποτελείται από τους καρχαρίες και τις ράγιες. Οι καρχαρίες χωρίζονται σε 8 τάξεις οι οποίες είναι: Carcharhiniiformes, Heterodontiformes, Hexanchiformes, Lamniformes, Orectolobiformes, Pristiophoriformes, Squaliformes και Squatiniformes. Η μεγαλύτερη και πιο σημαντική τάξη είναι η Carcharhiniiformes, η οποία περιλαμβάνει περίπου 200 είδη τα οποία χωρίζονται σε 8 οικογένειες: Carcharhinidae, Proscylliidae, Scyliorhinidae, Leptochariidae, Pseudotriakidae, Trikidae, Hemigaleidae και Sphyrnidae. Η κυριότερη οικογένεια της τάξης Carcharhiniiformes είναι η Carcharinidae, η οποία περιλαμβάνει 50 είδη. Οι ράγιες, αποτελούνται από 600 είδη τα οποία ανήκουν σε 18 οικογένειες και σχηματίζουν 5 τάξεις, Rajiformes, Myliobatiformes, Rhinobatiformes, Torpedini και Pristiformes. Η πιο σημαντική είναι η τάξη Rajiformes η οποία περιλαμβάνει περίπου το 44% των ειδών από τις ράγιες. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν είδη Χονδριχθύων από τον Ελλαδικό χώρο τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1. Είδη Χονδριχθύων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Είδος	Τάξη	Οικογένεια
<i>Scyliorhinus stellaris</i>	Carcharhiniiformes	Scyliorhinidae
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniiformes	Scyliorhinidae
<i>Galeus melastomus</i>	Carcharhiniiformes	Scyliorhinidae
<i>Raja naevus</i>	Rajiformes	Rajidae
<i>Raja miraletus</i>	Rajiformes	Rajidae
<i>Prionacea glauca</i>	Carcharhiniiformes	Carcharhinidae
<i>Squalus acanthias</i>	Squaliformes	Squalidae
<i>Squalus blainvillei</i>	Squaliformes	Squalidae

### 1.1.1 *Scyliorhinus stellaris*

Το είδος *S. stellaris* ανήκει στην οικογένεια Scyliorhinidae, ζει σε θαλάσσιο περιβάλλον και προτιμά τους υφάλους. Το συναντάμε σε υποτροπικό κλίμα και σε εύρος βάθους 1 – 400 m. Η εξελικτική ελαστικότητα του είδους είναι μικρή με ελάχιστο χρόνο πληθυσμιακού διπλασιασμού 4,5 – 14 έτη. Το διαιτολόγιό του αποτελείται από βενθικά ψάρια και από ασπόνδυλα, όπως μαλάκια και οστρακόδερμα. Το μέγιστο μήκος που έχει αναφερθεί για το είδος αυτό είναι 170 cm.

### 1.1.2 *Scyliorhinus canicula*

Το είδος *S. canicula* ανήκει επίσης στην οικογένεια Scyliorhinidae. Είναι βενθικό είδος και συναντάται σε βάθη από 10 έως 780 m σε υποτροπικό κλίμα. Τρέφεται κυρίως με μαλάκια, οστρακόδερμα, μικρά κεφαλόποδα, πολύχαιτους και μικρά ψάρια. Το μέγιστο μήκος που έχει καταγραφεί είναι 100 cm.

### 1.1.3 *Galeus melastomus*

Άλλο ένα είδος μέλος της οικογένειας Scyliorhinidae είναι το *G. melastomus*. Είναι βαθύβιο είδος και απαντάται σε εύρος βάθους 55 – 1873 m. Τρέφεται κυρίως στον βυθό με ασπόνδυλα, όπως γαρίδες και κεφαλόποδα, με μικρά πελαγικά ψάρια καθώς και με άλλα μικρά ελασμοβράγχια. Είναι ωτόκο και αποθέτει περισσότερα από 13 αυγά την φορά. Το μέγιστο μήκος που έχει καταγραφεί για αρσενικό και για θηλυκό είναι 75 cm και 90 cm αντίστοιχα.

### 1.1.4 *Raja naevus*

Το είδος *R. naevus* είναι σαλάχι που ανήκει στην οικογένεια Rajidae. Είναι βενθικό θαλασσινό είδος, διαβιεί σε βάθος εύρους 20 – 500 m και εμφανίζεται σε υποτροπικά κλίματα. Είναι ωτόκο με απόθεση 70 – 150 αυγών το χρόνο και η τροφή του αποτελείται από διάφορα βενθικά είδη. Το μέγιστο μήκος που έχει αναφερθεί είναι 71 cm για τα αρσενικά και 68 cm για τα θηλυκά.

### 1.1.5 *Raja miraletus*

Αυτό το είδος ράγιας ανήκει επίσης στην οικογένεια Rajidae και είναι βενθικός οργανισμός. Συναντάται σε θαλασσινά και υφάλμυρα νερά με υποτροπικό κλίμα, το

εύρος βάθους εξάπλωσης του είδους είναι 17 – 462 m. Τρέφεται με σχεδόν όλους τους βενθικούς οργανισμούς, είναι ωτοκό και γεννάει 40 – 72 αυγά το χρόνο. Για τη *R. miraletus* έχουν αναφερθεί μέγιστα μήκη, 63 cm για τα αρσενικά και 59,7 cm για τα θηλυκά.

#### 1.1.6 *Prionacea glauca*

Ο μπλε καρχαρίας (*P. glauca*) ανήκει στην οικογένεια Carcharhinidae. Είναι ωκεανόδρομο είδος με εύρος εξάπλωσης 1 – 350 m. Η εξελικτική ελαστικότητα του είδους αυτού είναι πολύ μικρή, με τον ελάχιστο χρόνο διπλασιασμού του πληθυσμού να είναι >14 έτη. Είναι ζωοτόκο είδος και κάθε θηλυκό γεννάει μέχρι 80 μικρά μήκους 40 cm. Η κυοφορία του διαρκεί περίπου ένα έτος. Η τροφή του αποτελείται κυρίως από ψάρια, μικρούς καρχαρίες, καλαμάρια και πελαγικά κόκκινα καβούρια. Το μέγιστο μήκος που έχει αναφερθεί είναι 400 cm, το μέγιστο βάρος 205,9 kg και η μέγιστη ηλικία 20 έτη.

#### 1.1.7 *Squalus acanthias*

Ο καρχαρίας αυτός ανήκει στην οικογένεια των Squalidae, είναι βενθοπελαγικό ωκεανόδρομο είδος που μπορούμε να το συναντίσουμε σε θαλασσινά και υφάλμυρα νερά, σε βάθη 0 – 1.460 m. Η εξελικτική ελαστικότητα του *S. Acanthias* είναι πολύ χαμηλή, με ελάχιστο χρόνο διπλασιασμού του πληθυσμού >14 έτη. Είναι ωζωοτόκο είδος, η κυοφορία του διαρκεί 2 χρόνια και γεννάει 1 – 20 μικρά τη φορά. Το μέγιστο μήκος που έχει αναφερθεί είναι 160 cm για τα αρσενικά και 120 cm για τα θηλυκά, το μέγιστο βάρος που έχει βρεθεί είναι 9.100 g, ενώ η μέγιστη ηλικία ανέρχεται στα 75 έτη.

#### 1.1.8 *Squalus blainvillei*

Και το είδος αυτό ανήκει στην οικογένεια των Squalidae. Ζει στο βυθό υφάλμυρων ή θαλασσινών νερών, κυρίως υποτροπικών κλιμάτων, σε εύρος βάθους 16 – 780 m. Είναι ωζωοτόκο είδος και γεννάει 3 – 4 μικρά τη φορά. Η τροφή του αποτελείται κυρίως από ψάρια, αλλά τρέφεται επίσης και με καβούρια, αστακούς και

χαπαόδια. Μέχρι σήμερα τα μέγιστα μήκη που έχουν αναφερθεί για το *S. Blainvillei* είναι: 100 cm για τα αρσενικά και 64 cm για τα θηλυκά ([www.fishbase.com](http://www.fishbase.com)).

## 1.2 Σκοπός εργασίας

Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ελασμοβράγχων είναι ασαφής και η συστηματική τους κατάταξη με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τα απολιθώματα δεν δίνουν ξεκάθαρα αποτελέσματα (Dosay-Akbulut, 2008). Ο σκοπός της παρούσας εργασίας, σε πρώτη φάση ήταν η ανάλυση-ταυτοποίηση, μέσω μοριακών τεχνικών, των 17 δειγμάτων χονδριχθύων με προέλευση από τον ελλαδικό χώρο, προκειμένου να προσδιοριστεί σε πιο είδος ανήκει το καθένα και με τη βοήθεια ειδικών λογισμικών, να βρεθεί η φυλογένεια μεταξύ των ειδών. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την περάτωση της εργασίας ήταν η δημιουργία φυλογενετικών δένδρων. Για την μέθοδο αυτή ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα: απομόνωση του γενομικού DNA από τα δείγματα, ενίσχυση γενετικών τόπων του DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), αλληλούχιση των προϊόντων PCR, ταυτοποίηση των αλληλουχιών μέσω ενός λογισμικού προγράμματος Blast, κατασκευή (σχεδιασμό) φυλογενετικών δένδρων και υπολογισμός γενετικών αποστάσεων και άλλων γενετικών παραμέτρων μέσω ειδικών προγραμμάτων.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Δειγματοληψία

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία είναι 17 από τα οποία τα 7 αλιεύθηκαν στην περιοχή της Λέσβου, ένα στην περιοχή της Λήμνου και τα υπόλοιπα 9 μας χορηγήθηκαν από την Λέκτορα του Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Κα. Μεγαλοφώνου Περσεφόνη. Τα είδη δίνονται αναλυτικά στο Πίνακα 2.1 που ακολουθεί.

Πίνακας 2.1. Είδη και τοποθεσία δειγματοληψίας

Είδος	Περιοχή Αλίευσης / Χορήγηση
1. <i>Scyliorhinus stellaris</i>	Λέσβος
2. <i>Scyliorhinus stellaris</i>	Λέσβος
3. <i>Scyliorhinus canicula</i>	Λέσβος
4. <i>Scyliorhinus canicula</i>	Λέσβος
5. <i>Galeus melastomus</i>	Λέσβος
6. <i>Raja naevus</i>	Λέσβος
7. <i>Raja miraletus</i>	Λέσβος
8. <i>Prionacea glauca</i>	Λήμνος
9. <i>Squalus acanthias</i>	ΕΚΠΑ
10. <i>Squalus acanthias</i>	ΕΚΠΑ
11. <i>Squalus acanthias</i>	ΕΚΠΑ
12. <i>Squalus acanthias</i>	ΕΚΠΑ
13. <i>Squalus acanthias</i>	ΕΚΠΑ
14. <i>Squalus acanthias</i>	ΕΚΠΑ
15. <i>Squalus acanthias</i>	ΕΚΠΑ
16. <i>Squalus blainvillei</i>	ΕΚΠΑ
17. <i>Squalus blainvillei</i>	ΕΚΠΑ

Από το κάθε δείγμα πάρθηκε λευκός ιστός ο οποίος τοποθετήθηκε σε 80% EtOH και αποθηκεύτηκε στους -24° C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

## 2.2 Απομόνωση DNA

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

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι:

1. Μικρό κομμάτι ιστού (~0,01 g) τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο Eppendorf (Biologix, BMT-15N).



2. Στο Eppendorf προστέθηκαν:
  - 500 μl TNE (10 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8)
  - 70 μl SDS περιεκτικότητας 10 %
  - 20 μl Πρωτεϊνάση K (Proteinase K) συγκέντρωσης 10 mg/l
3. Έγινε λιοτρίβιση του ιστού με έμβολο μέσα στο μείγμα.
4. Τοποθετήθηκε το δείγμα για επώαση σε υδατόλουτρο, στους 55° C, για τουλάχιστον 2 ώρες (για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών).
5. Μετά την επώαση προστέθηκαν 600μl φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1.
6. Ανακινήθηκαν ελαφρώς για 10 λεπτά σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα (rotator) στους 40 κύκλους/min και ακολούθησε φυγοκέντριση για 10 λεπτά σε 13.000 στροφές σε θερμοκρασία 4° C για να διαχωριστούν σε 2 φάσεις.
7. Μετά την φυγοκέντριση απομακρύνθηκε η υπερκείμενη φάση με την βοήθεια πιπέτας και τοποθετήθηκε σε καινούριο Eppendorf (το αρχικό Eppendorf με την κάτω φάση πετάχτηκε).
8. Στο νέο Eppendorf προστέθηκαν 400 μl χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1.
9. Ακολούθησε ανάδευση για 10 λεπτά σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα (rotator) στους 40 κύκλους/min και φυγοκέντριση για 10 λεπτά σε 13.000 στροφές σε θερμοκρασία 4° C.
10. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης αφαιρέθηκε ξανά το υπερκείμενο και τοποθετήθηκε σε τρίτο Eppendorff στο οποίο προστέθηκε ποσότητα οξικού νατρίου (Sodium acetate) συγκέντρωσης 3M, ίση με το 10% της ποσότητας του υπερκείμενου και ίσος όγκος ισοπροπανόλης με το υπερκείμενο που αφαιρέθηκε.
11. Το Eppendorff τοποθετήθηκε στους -20° C για 30 min (για την δέσμευση του DNA σε στερεά μορφή).
12. Έγινε φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές, στους 4° C.
13. Μετά την φυγοκέντριση σχηματίστηκε λευκό ίζημα (pellet) (στο κάτω μέρος του Eppendorff).
14. Αφαιρέθηκε προσεκτικά η αλκοόλη (χωρίς να πέσει η πελέτα) και προστέθηκε 1 ml αιθανόλη.



15. Στο δείγμα έγινε ξανά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές, στους 4° C.
16. Η αιθανόλη αφαιρέθηκε τελείως και το Eppendorf τοποθετήθηκε με ανοικτό το πώμα στον κλίβανο επώασης για περίπου 20 λεπτά στους 40° C για να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης.
17. Έπειτα διαλύθηκε η πελέτα σε 50 μl TE και αποθηκεύτηκε σε καταψύκτη στους -20° C, μέχρι να αναλυθεί.

### 2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA

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

Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν:

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

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

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

## 2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Από το γενομικό DNA, για το σκοπό της εργασίας, επιλέχθηκαν για ενίσχυση οι περιοχές COI, COII (Normark et al., 1991) και ITS2 (Dosay-Akbulut, 2008), με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η ενίσχυση έγινε με τους εκκινητές που φαίνονται στον Πίνακα 2.2, χρησιμοποιώντας ένα θερμοκυκλοποιητή MJ Research, PTC-0150.

Πίνακας 2.2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του DNA.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Πηγή
COI	L 5950	5'-ACAATCACAAAGA(CT)AT(CT)GG-3'	(Normark et al., 1991)
	H 7196	5'-AGAAAATGTTG(AT)GGGAA(AG)AA-3'	
COII	L 7450	5'-AAAGGAAGGAATCGAACCCCC-3'	(Normark et al., 1991)
	H 8055	5'-GCTCATGAGTGGAGGACGTCTT-3'	
ITS2	ITS2F L	CTACGCCTGTCTGAGTGTC	Dosay-Akbulut
	ITS2R H	ATATGCTTAAATTCAGCGGG	M., 2008

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

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

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

$$T_a(^{\circ}C) = T_m(^{\circ}C) - 5(^{\circ}C)$$

Οι συνθήκες θερμοκρασιακών κύκλων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του DNA είναι οι ακόλουθες: Μετά από μια δεκάλεπτη αποδιάταξη στους  $95^{\circ}C$ , ακολουθούν 35 κύκλοι: αποδιάταξης (denaturation) στους  $95^{\circ}C$  για 45 sec, υβριδισμού (annealing) στους  $50^{\circ}C$  για COI,  $55^{\circ}C$  για COII ή  $53^{\circ}C$  για ITS2 για 45

sec και επιμήκυνσης (extention) στους 72° C για 1 min. Τέλος ακολουθεί η τελική επιμήκυνση στους 72° C για 10 min.

Τα προγράμματα συνθηκών θερμοκρασιακών κύκλων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR δίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3. Προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

<i>Προγραμματισμός</i>			
<b>Βήμα</b>	<b>COI</b>	<b>COII</b>	<b>ITS2</b>
<b>1</b>	95° C / 10 min	95° C / 10 min	95° C / 10 min
<b>2</b>	95° C / 45 sec	95° C / 45 sec	95° C / 45 sec
<b>3</b>	50° C / 45 sec	55° C / 45 sec	53° C / 45 sec
<b>4</b>	72° C / 1 min	72° C / 1 min	72° C / 1 min
<b>5</b>	Go to 2, 34 times	Go to 2, 34 times	Go to 2, 34 times
<b>6</b>	72° C / 10 min	72° C / 10 min	72° C / 10 min
<b>7</b>	4° C / 0	4° C / 0	4° C / 0
<b>8</b>	END	END	END

Η αντίδραση της PCR έγινε σε συνολικό όγκο 50 μl και αποτελούταν από 5 μl PCR buffer (10X), 2 μl MgCl<sub>2</sub>, 1 μl dNTPs (10 mM από κάθε νουκλεοτίδιο: dATP, dCTP, dGTP και dTTP), 2 μl από κάθε εκκινητή (forward-reverse), 0,5 μl Taq DNA πολυμεράση και 1 μl DNA. Ο υπόλοιπος όγκος μέχρι τα 50 μl συμπληρώθηκε με υπερκάθαρο νερό. Στον Πίνακα 2.4 δίνονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR. Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν σε ηλεκτροφόρηση με πηκτή αγαρόζης που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο, χρησιμοποιώντας 5 μl από το προϊόν.

Πίνακας 2.4. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για τελικό όγκο PCR 50  $\mu$ l.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Συγκέντρωση (<math>\mu</math>l)</i>
10X PCR Buffer	5
MgCl <sub>2</sub>	2
dNTPs	1
Εκκινητής Forward	2
Εκκινητής Reverse	2
Taq DNA πολυμεράση	0,5
DNA	1
H <sub>2</sub> O	36,5
Σύνολο	50

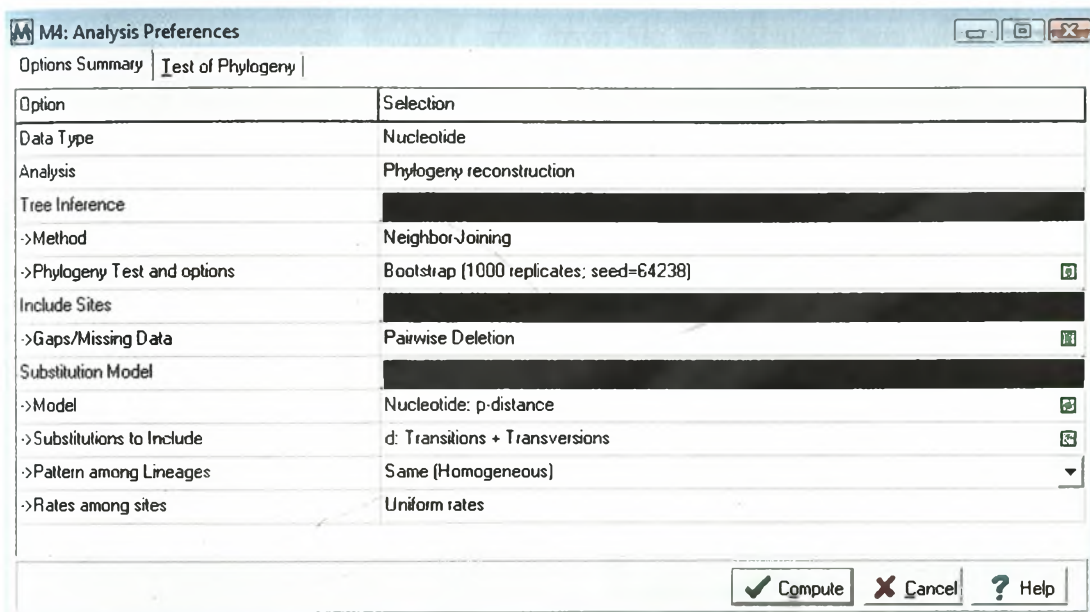
## 2.5 Αλληλούχιση

Προκειμένου να γίνει η αλληλούχιση του προϊόντων PCR, καθαρίστηκαν με το NucleoSpin Extract Kit (Macherey Nagel, Duren, Germany) προκειμένου να απομακρυνθούν τα δευτερεύοντα προϊόντα. Το 5' άκρο του κάθε προϊόντος αλληλουχήθηκε χρησιμοποιώντας τους forward εκκινητές L5950, L7450 και ITS2F L, ενώ το 3' άκρο αλληλουχήθηκε με τους reverse εκκινητές H7196, H8055 και ITS2R H. Η αλληλούχιση έγινε με τον αλληλουχιτή ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

## 2.6 Ανάλυση δεδομένων

Τα αποτελέσματα των αλληλουχήσεων αρχικά ελέγχθηκαν για τυχόν λάθη από τα χρωματογραφήματά τους με τη βοήθεια του προγράμματος ChromasPro Version 1.49 (Technelysium Pty Ltd) και διορθώθηκαν στο πρόγραμμα BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Με το ίδιο λογισμικό έγινε και η ευθυγράμμιση των τελικών αλληλουχιών χρησιμοποιώντας την επιλογή ClustalW Multiple alignment (Thompson, 1994), με παραμέτρους: Full Multiple alignment και Bootstrap NJ Tree – Number of bootstraps 1000. Για την ταυτοποίηση των αλληλουχιών έγινε έλεγχος ομολογίας, με λογισμικό BLAST, σε σύγκριση με την βάση δεδομένων GenBank ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Η φυλογενετική και μοριακή ανάλυση έγινε με την

χρήση του λογισμικού MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Για τη δημιουργία των φυλογενετικών δένδρων ακολουθήθηκε η μέθοδος Neighbor - Joining με το μοντέλο p-distance και με τις επαναλήψεις (Bootstrap) να ορίζονται στις 1000 (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1. Παράμετροι της μεθόδου Neighbor-Joining.

Ο υπολογισμός των γενετικών αποστάσεων έγινε επίσης με το λογισμικό MEGA4 συνολικά για όλες τις αλληλουχίες. Μετρήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι: Ανά ζεύγος γενετική απόσταση (Pairwise distance), συνολική μέση γενετική απόσταση (Overall mean distance), ανάλυση ομοιογένειας με βάση το πρότυπο υποκαταστάσεων (Substitution Pattern homogeneity test), γενετική απόσταση με βάση τη σύσταση σε βάσεις (Composition distance), πρότυπο υποκατάστασης (Substitution Pattern 4X4). Οι θέσεις όπου υπήρχαν κενά στις αλληλουχίες δεν λήφθηκαν υπόψη για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Εύρεση ομολογίας και νουκλεοτιδική ευθυγράμμιση αλληλουχιών

Από την ταυτοποίηση BLAST που έγινε για τα δείγματα που μελετήθηκαν, προέκυψαν τα είδη που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ομολογία με τις αλληλουχίες των δειγμάτων μας, τα αποτελέσματα αυτά δίνονται στον Πίνακα 3.1:

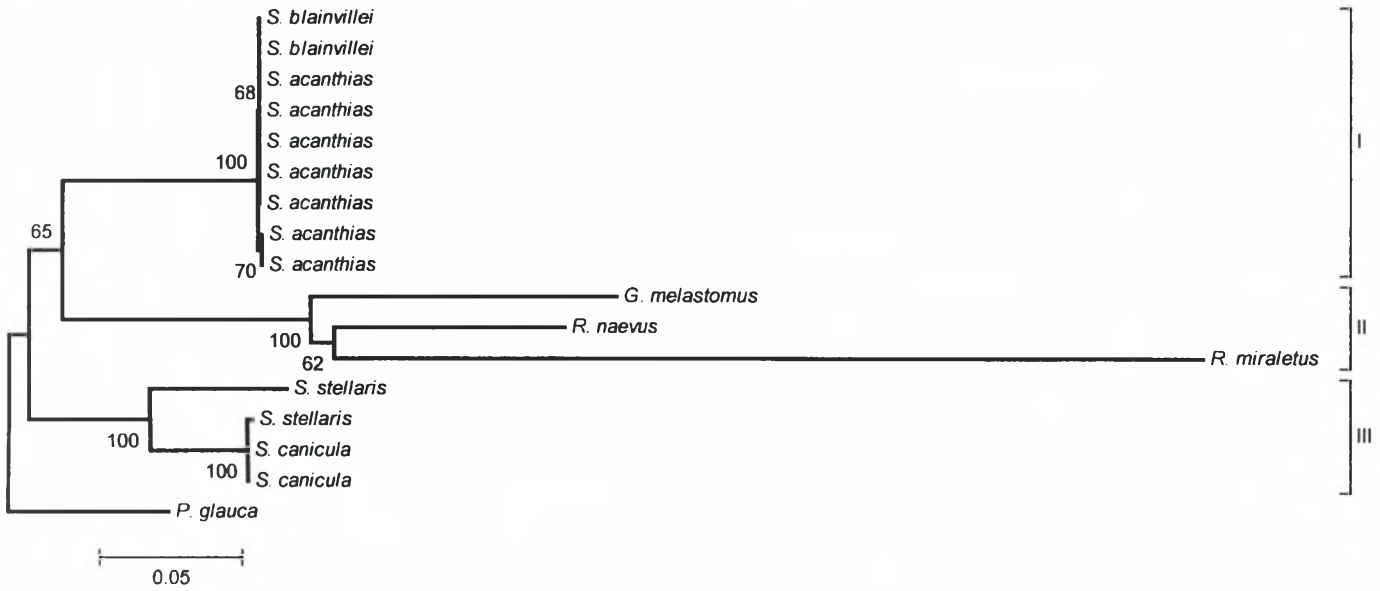
Πίνακας 3.1. Είδη που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ταυτοποίηση με τις αλληλουχίες των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

Δείγμα	Είδος που εμφάνισε την μεγαλύτερη ταυτοποίηση
1	<i>Scyliorhinus stellaris</i>
2	<i>Scyliorhinus stellaris</i>
3	<i>Scyliorhinus canicula</i>
4	<i>Scyliorhinus canicula</i>
5	<i>Galeus melastomus</i>
6	<i>Raja naevus</i>
7	<i>Raja miraletus</i>
8	<i>Prionacea glauca</i>
9	<i>Squalus acanthias</i>
10	<i>Squalus acanthias</i>
11	<i>Squalus acanthias</i>
12	<i>Squalus acanthias</i>
13	<i>Squalus acanthias</i>
14	<i>Squalus acanthias</i>
15	<i>Squalus acanthias</i>
16	<i>Squalus blainvillei</i>
17	<i>Squalus blainvillei</i>

Τα αποτελέσματα των ευθυγραμμίσεων των αλληλουχιών (κάθε γονιδίου ξεχωριστά αλλά και συνολικά για όλες τις αλληλουχίες) δίνονται στο Παράρτημα (Appendix).

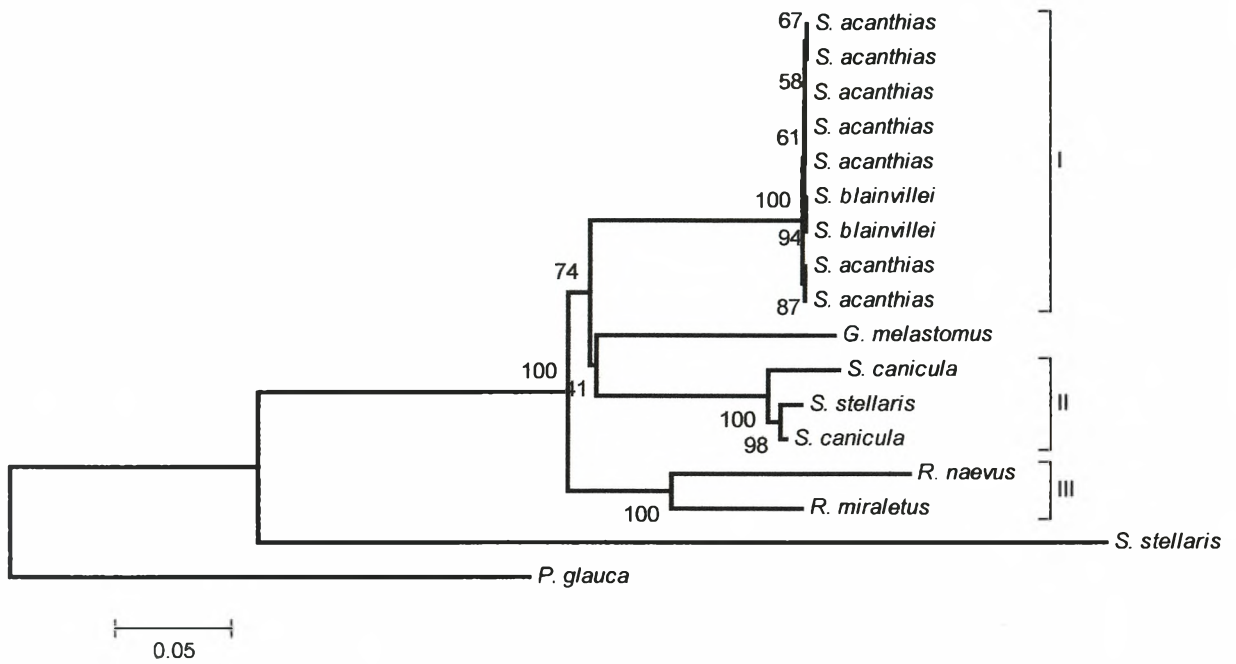
### 3.2 Φυλογενετικά δένδρα

Τα φυλογενετικά δένδρα που προέκυψαν από την επεξεργασία των αλληλουχιών φαίνονται παρακάτω. Για το γενετικό τόπο COII – Εικόνα 3.1, για τον COI – Εικόνα 3.2, για τον ITS2 – Εικόνα 3.3 και για το σύνολο των αλληλουχιών – Εικόνα 3.4.

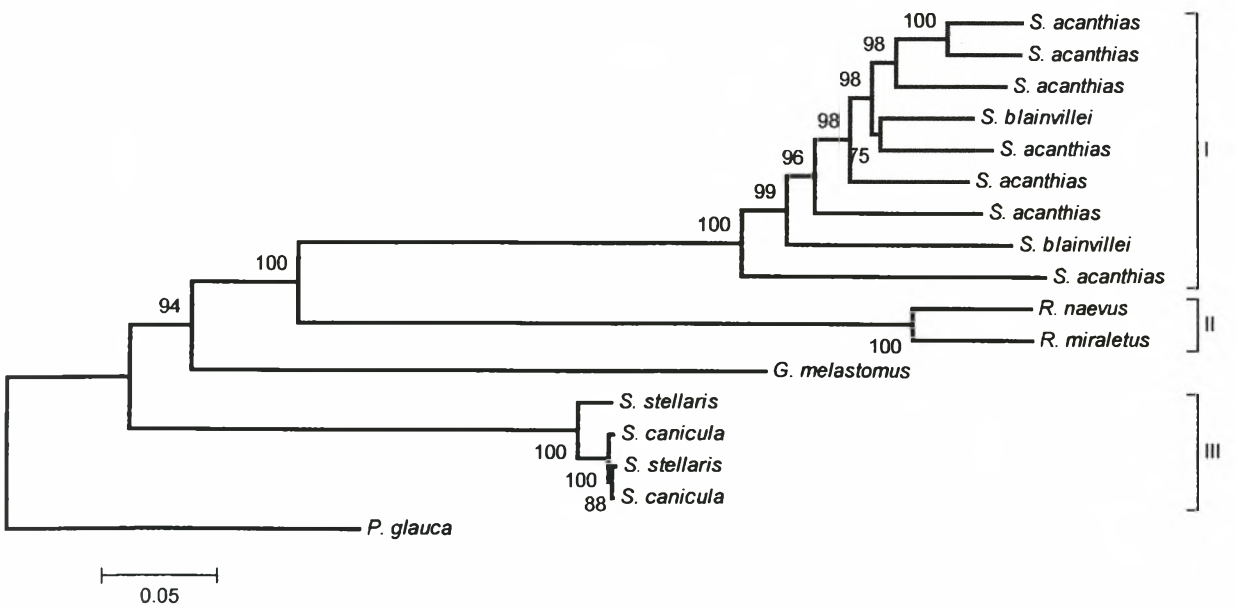


Εικόνα 3.1. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης με την χρήση του αλγόριθμου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) για τον εκκινητή COII.



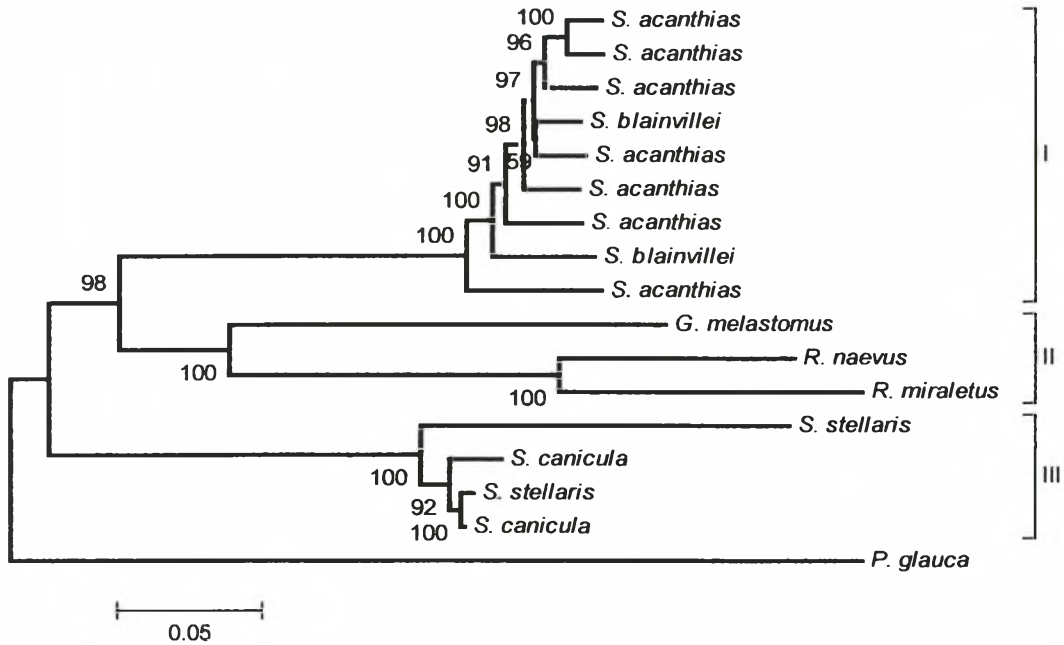


Εικόνα 3.2. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης με την χρήση του αλγόριθμου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) για τον εκκινητή COI.



Εικόνα 3.3. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης με την χρήση του αλγόριθμου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) για τον εκκινητή ITS2.





Εικόνα 3.4. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης με την χρήση του αλγόριθμου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) για το σύνολο των αλληλουχιών.

### 3.3 Στατιστικά

Τα αποτελέσματα από τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων συνολικά για όλες τις αλληλουχίες είναι:

#### 3.3.1 Συνολική μέση γενετική απόσταση

Τα αποτελέσματα βασίζονται στην ανάλυση ανά ζεύγος των 17 αλληλουχιών. Το σφάλμα μέσου όρου υπολογίστηκε με μια αυτόνομη διαδικασία 1.000 επαναλήψεων (bootstrap: 1000 replicates). Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Tamura-Nei στο πρόγραμμα MEGA4 (Tamura & Nei, 1993). Η τιμή μέσης γενετικής απόστασης βρέθηκε  $d = 0.651 \pm 0.014$ .

#### 3.3.2 Ανά ζεύγος γενετική απόσταση

Ο αριθμός των βάσεων που υποκαταστάθηκαν σε κάθε τόπο από την ανάλυση μεταξύ των αλληλουχιών φαίνεται στον Πίνακα 3.2. Τα αποτελέσματα βασίζονται στην ανάλυση ανά ζεύγος των 17 αλληλουχιών. Το σφάλμα μέσου όρου παρουσιάζεται στο πάνω μέρος από την διαγώνιο και υπολογίστηκε από μια αυτοδύναμη διαδικασία 1000 επαναλήψεων (bootstrap: 1000 replicates). Η ανάλυση

έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Tamura-Nei στο πρόγραμμα MEGA4 (Tamura & Nei, 1993).

### **3.3.3 Ανάλυση ομοιογένειας με βάση το πρότυπο υποκαταστάσεων**

Μελετήθηκε η πιθανότητα απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης, δηλαδή ότι οι αλληλουχίες έχουν εξελιχθεί με την ίδια μέθοδο υποκατάστασης, με βάση το μέγεθος των διαφορών στην σύσταση σε βάσεις που διαφοροποιείται μεταξύ των αλληλουχιών (Display index test). Χρησιμοποιήθηκε το τεστ Monte Carlo (1000 επαναλήψεις) για να υπολογιστούν οι τιμές των πιθανοτήτων, οι οποίες φαίνονται στον Πίνακα 3.3 κάτω από την διαγώνιο. Οι τιμές των πιθανοτήτων που είναι μικρότερες από 0.05 είναι στατιστικώς σημαντικές και είναι μαρκαρισμένες με κίτρινο. Η εκτίμηση του δείκτη ομοιογένειας συγκεντρωτικά για κάθε τόπο φαίνεται για κάθε ζεύγος αλληλουχιών στον πίνακα, στο πάνω μέρος από την διαγώνιο (Kumar & Gadagkar, 2001).

### **3.3.4 Γενετική απόσταση με βάση τη σύσταση σε βάσεις**

Η διαφορά σε σύσταση σε βάσεις που αποκλίνει για κάθε τόπο παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.4. Ακόμα και όταν υπάρχει ομοιογένεια στον τρόπο υποκατάστασης μεταξύ των κλάδων, οι γενετικές αποστάσεις με βάση τη σύσταση σε βάσεις συσχετίζονται με τον αριθμό των διαφορών μεταξύ των αλληλουχιών (Tamura & Nei, 1993).

### **3.3.5 Πρότυπο υποκατάστασης 4Χ4**

Οι ρυθμοί υποκατάστασης από πουρίνες σε πουρίνες και από πυριμιδίνες σε πυριμιδίνες φαίνονται με έντονα γράμματα και οι υποκαταστάσεις από πουρίνες σε πυριμιδίνες και από πυριμιδίνες σε πουρίνες φαίνονται με πλάγια γράμματα στον Πίνακα 3.5. Οι συχνότητες των νουκλεοτιδίων είναι 0.23 (A), 0.292 (T), 0.259 (C) και 0.22 (G). Οι αναλογίες των ρυθμών transition/trasversion είναι  $k1 = 1.368$  (πουρίνες) και  $k2 = 1.84$  (πυριμιδίνες). Η ολική απόκλιση transition/trasversion είναι  $R = 0.828$ , όπου  $R = [A * G * k1 + T * C * k2] / [(A + G) * (T + C)]$  (Tamura et al, 2004).

Πίνακας 3.2. Εκτίμηση της εξελικτικής απόστασης μεταξύ των αλληλουχιών (Tamura & Nei, 1993).

	<i>S. blainvillei</i>	<i>S. blainvillei</i> (2)	<i>S. stellaris</i>	<i>S. stellaris</i> (2)	<i>S. canicula</i>	<i>S. canicula</i> (2)	<i>G. melastomus</i>	<i>R. naevus</i>	<i>R. miraletus</i>	<i>P. glauca</i>	<i>S. acanthias</i>	<i>S. acanthias</i> (2)	<i>S. acanthias</i> (3)	<i>S. acanthias</i> (4)	<i>S. acanthias</i> (5)	<i>S. acanthias</i> (6)	<i>S. acanthias</i> (7)
<i>S. blainvillei</i>		0.005	0.015	0.031	0.014	0.014	0.017	0.018	0.021	0.033	0.015	0.015	0.015	0.015	0.016	0.016	0.018
<i>S. blainvillei</i> (2)*	0.061		0.015	0.033	0.014	0.015	0.016	0.018	0.020	0.033	0.016	0.016	0.016	0.016	0.017	0.015	0.016
<i>S. stellaris</i>	0.395	0.409		0.010	0.001	0.002	0.016	0.020	0.020	0.026	0.034	0.033	0.035	0.036	0.035	0.034	0.037
<i>S. stellaris</i> (2)	0.712	0.745	0.215		0.009	0.009	0.033	0.039	0.064	0.026	0.036	0.036	0.038	0.038	0.037	0.035	0.040
<i>S. canicula</i>	0.388	0.402	0.006	0.213		0.002	0.016	0.020	0.020	0.026	0.034	0.033	0.035	0.036	0.035	0.034	0.037
<i>S. canicula</i> (2)	0.408	0.423	0.019	0.214	0.016		0.017	0.021	0.022	0.026	0.035	0.034	0.035	0.037	0.036	0.035	0.037
<i>G. melastomus</i>	0.438	0.437	0.383	0.714	0.383	0.403		0.019	0.022	0.032	0.040	0.040	0.040	0.041	0.042	0.041	0.043
<i>R. naevus</i>	0.533	0.535	0.525	0.842	0.526	0.531	0.492		0.010	0.046	0.046	0.047	0.045	0.048	0.044	0.046	0.046
<i>R. miraletus</i>	0.599	0.601	0.609	1.148	0.600	0.628	0.556	0.215		0.059	0.062	0.066	0.063	0.065	0.065	0.066	0.069
<i>P. glauca</i>	0.691	0.696	0.600	0.662	0.598	0.599	0.692	0.895	1.134		0.033	0.035	0.035	0.033	0.033	0.034	0.033
<i>S. acanthias</i>	0.459	0.521	0.967	0.843	0.968	0.964	1.072	1.114	1.396	0.799		0.003	0.004	0.003	0.005	0.004	0.005
<i>S. acanthias</i> (2)	0.460	0.535	0.959	0.836	0.960	0.957	1.068	1.106	1.411	0.805	0.036		0.003	0.004	0.005	0.005	0.006
<i>S. acanthias</i> (3)	0.449	0.517	0.979	0.859	0.980	0.977	1.071	1.096	1.389	0.807	0.040	0.036		0.004	0.005	0.005	0.006
<i>S. acanthias</i> (4)	0.467	0.517	0.969	0.845	0.970	0.967	1.085	1.124	1.403	0.795	0.021	0.041	0.046		0.005	0.004	0.005
<i>S. acanthias</i> (5)	0.479	0.514	0.996	0.872	0.997	0.993	1.083	1.113	1.427	0.808	0.056	0.056	0.051	0.060		0.005	0.006
<i>S. acanthias</i> (6)	0.485	0.516	0.961	0.841	0.962	0.959	1.065	1.106	1.404	0.808	0.047	0.051	0.053	0.047	0.059		0.006
<i>S. acanthias</i> (7)	0.560	0.571	1.007	0.888	1.008	1.003	1.079	1.144	1.455	0.819	0.071	0.088	0.092	0.075	0.086	0.080	

\*Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αναφέρονται στο διαφορετικό άτομο του ίδιου είδους.

Πίνακας 3.3. Τεστ ομοιογένειας της μεθόδου υποκατάστασης μεταξύ των αλληλουχιών (Kumar & Gadagkar, 2001).

	<i>S. blainvillei</i>	<i>S. blainvillei</i> (2)	<i>S. stellaris</i>	<i>S. stellaris</i> (2)	<i>S. canicula</i>	<i>S. canicula</i> (2)	<i>G. melastomus</i>	<i>R. naevus</i>	<i>R. miraletus</i>	<i>P. glauca</i>	<i>S. acanthias</i>	<i>S. acanthias</i> (2)	<i>S. acanthias</i> (3)	<i>S. acanthias</i> (4)	<i>S. acanthias</i> (5)	<i>S. acanthias</i> (6)	<i>S. acanthias</i> (7)
<i>S. blainvillei</i>		0.054	0.301	5.175	0.280	0.168	0.000	6.927	6.571	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.097
<i>S. blainvillei</i> (2)	0.135		0.736	6.609	0.708	0.476	0.340	7.935	8.243	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>S. stellaris</i>	0.103	0.010		1.820	0.000	0.015	0.000	3.835	3.186	1.032	0.000	0.517	0.270	0.001	0.452	0.111	0.703
<i>S. stellaris</i> (2)	0.000	0.000	0.000		1.809	1.852	1.973	1.456	0.269	5.273	3.998	5.974	5.438	4.450	6.277	4.780	6.899
<i>S. canicula</i>	0.120	0.020	1.000	0.000		0.020	0.000	3.733	3.066	1.109	0.000	0.467	0.224	0.000	0.419	0.079	0.676
<i>S. canicula</i> (2)	0.205	0.047	0.132	0.000	0.080		0.000	4.053	3.736	1.109	0.000	0.341	0.112	0.000	0.148	0.000	0.315
<i>G. melastomus</i>	1.000	0.122	1.000	0.000	1.000	1.000		3.139	3.418	1.533	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.538
<i>R. naevus</i>	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000		0.037	7.162	5.887	8.009	7.277	6.618	7.554	7.140	8.700
<i>R. miraletus</i>	0.000	0.000	0.000	0.229	0.000	0.000	0.000	0.323		7.371	6.118	8.107	7.476	6.968	7.925	7.477	9.505
<i>P. glauca</i>	1.000	1.000	0.014	0.000	0.014	0.016	0.004	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>S. acanthias</i>	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000		0.135	0.062	0.009	0.017	0.000	0.384
<i>S. acanthias</i> (2)	1.000	1.000	0.108	0.000	0.128	0.186	1.000	0.000	0.000	1.000	0.001		0.000	0.056	0.050	0.085	0.461
<i>S. acanthias</i> (3)	1.000	1.000	0.198	0.000	0.254	0.334	1.000	0.000	0.000	1.000	0.041	1.000		0.014	0.000	0.017	0.242
<i>S. acanthias</i> (4)	1.000	1.000	0.394	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.232	0.078	0.263		0.000	0.000	0.291
<i>S. acanthias</i> (5)	1.000	1.000	0.136	0.000	0.151	0.292	1.000	0.000	0.000	1.000	0.270	0.110	1.000	1.000		0.000	0.166
<i>S. acanthias</i> (6)	1.000	1.000	0.308	0.000	0.313	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.048	0.257	1.000	1.000		0.226
<i>S. acanthias</i> (7)	0.278	1.000	0.079	0.000	0.104	0.189	0.139	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.011	0.001	0.020	0.002	

Πίνακας 3.4. Εκτίμηση των διαφορών της σύνθεσης βάσεων που αποκλίνουν μεταξύ των αλληλουχιών (Tamura & Nei, 1993).

	<i>S. blainvillei</i>	<i>S. blainvillei</i> (2)	<i>S. stellaris</i>	<i>S. stellaris</i> (2)	<i>S. canicula</i>	<i>S. canicula</i> (2)	<i>G. melastomus</i>	<i>R. naevus</i>	<i>R. miraletus</i>	<i>P. glauca</i>	<i>S. acanthias</i>	<i>S. acanthias</i> (2)	<i>S. acanthias</i> (3)	<i>S. acanthias</i> (4)	<i>S. acanthias</i> (5)	<i>S. acanthias</i> (6)	<i>S. acanthias</i> (7)
<i>S. blainvillei</i>																	
<i>S. blainvillei</i> (2)	0.113																
<i>S. stellaris</i>	0.603	1.046															
<i>S. stellaris</i> (2)	5.629	7.074	2.005														
<i>S. canicula</i>	0.578	1.013	0.001	1.993													
<i>S. canicula</i> (2)	0.477	0.793	0.034	2.037	0.035												
<i>G. melastomus</i>	0.306	0.666	0.064	2.425	0.054	0.170											
<i>R. naevus</i>	7.302	8.311	4.205	1.952	4.103	4.425	3.493										
<i>R. miraletus</i>	6.977	8.650	3.597	0.842	3.472	4.155	3.804	0.222									
<i>P. glauca</i>	0.255	0.303	1.436	5.702	1.511	1.512	1.979	7.673	7.944								
<i>S. acanthias</i>	0.080	0.192	0.400	4.501	0.374	0.297	0.244	6.460	6.747	0.258							
<i>S. acanthias</i> (2)	0.080	0.210	1.054	6.474	1.004	0.877	0.466	8.582	8.738	0.260	0.170						
<i>S. acanthias</i> (3)	0.012	0.096	0.812	5.945	0.767	0.654	0.317	7.847	8.104	0.330	0.101	0.030					
<i>S. acanthias</i> (4)	0.073	0.115	0.540	4.953	0.513	0.381	0.305	7.192	7.598	0.134	0.030	0.096	0.058				
<i>S. acanthias</i> (5)	0.059	0.025	0.999	6.789	0.966	0.695	0.556	8.129	8.559	0.112	0.071	0.104	0.028	0.043			
<i>S. acanthias</i> (6)	0.061	0.077	0.648	5.282	0.617	0.475	0.350	7.713	8.106	0.161	0.016	0.134	0.069	0.009	0.050		
<i>S. acanthias</i> (7)	0.490	0.143	1.252	7.415	1.225	0.863	1.105	9.281	10.143	0.332	0.451	0.543	0.329	0.362	0.247	0.302	

Πίνακας 3.5. Υπολογισμός τιμών υποκατάστασης (Tamura et al., 2004).

	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>
<b>A</b>	-	8.04	7.13	<b>8.3</b>
<b>T</b>	6.34	-	<b>13.12</b>	6.06
<b>C</b>	6.34	<b>14.79</b>	-	6.06
<b>G</b>	<b>8.67</b>	8.04	7.13	-





## 4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να γίνει σε διάφορα είδη χονδριχθών ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους, μέσω άμεσης αλληλούχισης και να βρεθούν οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ τους. Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε ενίσχυση (PCR) του DNA που είχε απομονωθεί από τα δείγματα και προέκυψε ένα προϊόν για κάθε δείγμα. Τα προϊόντα αυτά των PCR μας έδειξαν από μόνα τους πολυμορφισμό σε επίπεδο είδους, καθώς είχαν διαφορετικό μήκος βάσεων, ο οποίος ήταν ικανός να διαχωρίσει σε κάποιο βαθμό ορισμένα από τα είδη. Από την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών που έγινε με το πρόγραμμα BioEdit, όπως φαίνεται στο Παράρτημα, βλέπουμε ότι σε πολλές περιοχές των ευθυγραμμισμένων αλληλουχιών παρατηρείται μεγάλη συντηρητικότητα των βάσεων. Η μεγαλύτερη ομολογία παρατηρείται στις αλληλουχίες του γονιδίου COII καθώς επίσης και στις αλληλουχίες του γονιδίου ITS2. Η μεγαλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ των αλληλουχιών παρατηρείται στο γονίδιο COI, η οποία μας δείχνει ότι το γονίδιο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ενδοπληθυσμιακή και διαειδική ανάλυση.

Στα φυλογενετικά δένδρα που δημιουργήθηκαν από την επεξεργασία των αλληλουχιών και φαίνονται στις εικόνες 3.1, 3.2, 3.3 και 3.4 χρησιμοποιήθηκε ως είδος αναφοράς ο μπλε καρχαρίας (*P. glauca*). Σε όλα τα δένδρα δημιουργήθηκαν 3 ομάδες ειδών με βάση τις γενετικές τους αποστάσεις. Και στα 4 δένδρα παρατηρούμε ότι τα είδη *S. acanthias* και *S. blainvillei* αποτελούν την πρώτη ομάδα. Οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των δένδρων, οφείλονται στον τρόπο σχηματισμού των άλλων δύο ομάδων από τα υπόλοιπα είδη. Στο πρώτο δένδρο, που σχηματίστηκε με βάση το γενετικό τόπο COII, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1, η δεύτερη ομάδα σχηματίζεται από τα είδη *G. melastomus*, *R. naevus* και *R. miraletus* και η τρίτη ομάδα αποτελείται από τα είδη *S. stellaris* και *S. canicula*. Στο δεύτερο δένδρο που δημιουργήθηκε με βάση το γενετικό τόπο COI, βλέπουμε ότι η δεύτερη ομάδα αποτελείται από δύο άτομα του είδους *S. canicula* και ένα άτομο του είδους *S. stellaris* και η 3<sup>η</sup> ομάδα σχηματίζεται από τα δύο είδη, *R. naevus* και *R. miraletus*. Το είδος *G. melastomus* φαίνεται να διαφέρει εξελικτικά με τα υπόλοιπα καθώς δεν εντάσσεται σε καμία ομάδα, καθώς επίσης και ένα άτομο του είδους *S. stellaris* φαίνεται να αποκλίνει εξελικτικά από τα υπόλοιπα σε αυτό το γονίδιο. Στο τρίτο

δένδρο, που προέκυψε από το γενετικό τόπο ITS2, οι ράγιες και πάλι σχημάτισαν μια ομάδα μόνες τους και η τρίτη ομάδα σχηματίστηκε από τα είδη *S. stellaris* και *S. canicula*, ενώ η διαφοροποίηση που παρατηρείται είναι για το είδος *G. melastomus* το οποίο δεν συμπεριλαμβάνεται σε καμία ομάδα και φαίνεται ότι διαφέρει εξελικτικά περισσότερο από τα άλλα είδη σε αυτό το γονίδιο. Τέλος για το δενδρόγραμμα που προέκυψε συνολικά από όλες τις αλληλουχίες η δεύτερη ομάδα σχηματίστηκε από τα είδη *G. melastomus*, *R. naevus* και *R. miraletus* και τα άτομα των ειδών *S. stellaris* και *S. canicula* ομαδοποιήθηκαν όλα μαζί σε μια τρίτη ομάδα. Από τα φυλογενετικά δένδρα αυτά που προέκυψαν παρατηρούμε ότι όλα τα δείγματά μας ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με την οικογένεια στην οποία ανήκαν. Το μόνο είδος το οποίο παρέκλινε από την οικογένεια στην οποία ανήκει είναι το *G. melastomus* το οποίο ομαδοποιήθηκε με την οικογένεια Rajidae.

Η μέση εξελικτική απόσταση που προέκυψε από τις αλληλουχίες είναι  $0.651 \pm 0.014$ , η τιμή αυτή δείχνει ότι διαφοροποιούνται επιτυχώς τα είδη μέσω των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων. Από τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων που έγινε ανά ζεύγος, τα είδη που φαίνεται ότι αποκλίνουν περισσότερο είναι οι ράγιες, *R. naevus* και *R. miraletus*, και τα είδη *P. glauca* και *G. melastomus*. Συγκεκριμένα όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2, οι ράγιες παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις από τα άλλα είδη με τη μέγιστη απόσταση να φτάνει το  $1.455 \pm 0.069$  για το είδος *R. miraletus* με το ένα άτομο του είδους *S. acanthias*. Επίσης μπορεί να διαπιστωθεί ότι όλα τα άτομα του κάθε είδους παρουσίαζαν πολύ μικρή εξελικτική απόσταση ενδοειδικά, καθώς το ίδιο συμβαίνει και μεταξύ των ειδών που ανήκουν στην ίδια οικογένεια. Τέλος παρατηρείται ότι όλα τα άτομα του είδους *S. acanthias* εμφανίζουν πολύ μεγάλες εξελικτικές αποκλίσεις σε σχέση με όλα τα είδη που ανήκουν σε διαφορετική οικογένεια, με τις τιμές απόκλισης να ξεκινάνε από  $0.843 \pm 0.036$  σε σχέση με το είδος *S. stellaris* και να φτάνουν την τιμή  $1.455 \pm 0.069$  σε σχέση με το είδος *R. miraletus*.

Όλες οι στατιστικές επεξεργασίες ανάλυσης γενετικών αποστάσεων βασίζονται στην υπόθεση ότι οι αλληλουχίες έχουν εξελιχθεί με την ίδια μέθοδο υποκατάστασης, έτσι για να δούμε αν ισχύει η υπόθεση αυτή έγινε ανάλυση ομοιογένειας με βάση το πρότυπο υποκαταστάσεων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.3. Όπου δεν υπήρχε ομοιογένεια στην υποκατάσταση των βάσεων η ανάλυση παίρνει τιμές μεγαλύτερες του 1 και οι πιθανότητες ομοιογένειας παρουσιάζονται στο κάτω μέρος του πίνακα,



με τις τιμές που είναι στατιστικώς σημαντικές ( $P < 0.05$ ) να φαίνονται με κίτρινο χρώμα. Όπως παρατηρείται τη μεγαλύτερη ανομοιογένεια στον τρόπο υποκατάστασης των βάσεων παρουσίασαν κυρίως οι ράγιες *R. naevus* (1.456 – 8.700) και *R. miraletus* (3.066 – 9.505) και ένα άτομο του είδους *S. stellaris* (1.809 – 6.899). Ο υπολογισμός της γενετικής απόστασης με βάση τη σύσταση σε βάσεις (Πίνακας 3.4) μας κατέδειξε ότι τα τρία είδη που αναφέρθηκαν και προηγουμένως φαίνονται να διαφέρουν σημαντικά από τα υπόλοιπα. Τέλος από τον υπολογισμό των τιμών υποκατάστασης των βάσεων, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5, βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη πιθανότητα υποκατάστασης υπήρξε ανάμεσα στις βάσεις T – C με πιθανότητα 27.91 %, ενώ οι υποκαταστάσεις με την μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης ήταν ανάμεσα στις βάσεις G – T και G – C με τιμή 13.19 %.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν τα δύο είδη της οικογένειας Rajidae, *R. naevus* και *R. miraletus*, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά με βάση τις γενετικές αποστάσεις και την φυλογένεια, από τα υπόλοιπα είδη χονδριχθύων, όπως αναμενόταν, καθώς ανήκουν σε διαφορετική τάξη από τα υπόλοιπα δείγματά μας. Το ένα δείγμα του είδους *S. stellaris* δεν παρουσίασε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, καθώς εμφανίζει μεγάλη γενετική απόσταση από τα άλλα είδη, ακόμα και από άτομα της ίδιας οικογένειας (Scyliorhinidae). Η παραπάνω διαπίστωση θα μπορούσε να αποδοθεί και σε κάποιο λάθος κατά τη μέθοδο της δειγματοληψίας ή σε πραγματική εξελικτική παρέκκλιση.

## 5. Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα στα οποία καταλήξαμε από τα αποτελέσματα της εργασίας είναι ότι:

- i) Είναι εφικτή η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους μέσω μοριακών τεχνικών
- ii) Μπορούν τα είδη να ταξινομηθούν με βάση τις αλληλουχίες των γονιδίων τους, και
- iii) Με τα φυλογενετικά δένδρα μπορούμε να προσδιορίσουμε σε μεγάλο βαθμό τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των διαφορετικών ειδών.

## 6. Βιβλιογραφία

- [http:// www.ncbi. nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
- Dosay-Akbulut M., 2008. The phylogenetic relationship within the genus *Carcharhinus*. *C. R. Biologies* 331: 500-509.
- Hall T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Kumar S. & Gadagkar SR., 2001. Disparity Index: A simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences. *Genetics* 158:1321-1327.
- Normark B.B., McCune A.R. and Harrison R.G., 1991. Phylogenetic Relationships of Neopterygian Fishes, Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 8(6):819-834.
- Miller S.A, Dykes D.D. and Polesky H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Tajima F., 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tamura K. & Nei M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tamura K., Nei M. and Kumar S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J., 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*.
- [www.fishbase.com](http://www.fishbase.com)









S. stellaris	ATCACCCATCCGAGTTC	TAGTATCAGCAGAAGACGTCCTCC	---
S. stellaris	ATCCCCATCCGGTTTT	TAGTATCAGCAGAAGACGTCCTCC	---
S. canicula	ATCACCCATCCGAGTTC	TAGTATCAGCAGAAGACGTCCTCC	---
S. canicula	ATCACCCATCCGAGTTC	TAGTATCAGCAGAAGACGTCCTCC	---
G. melastomus	ATCCCCATCCGAGTTC	TAGTATCAGCTGAAGACGTCCTCC	---
R. naevus	ATCCCCATCCGGTTTT	TAGTATCAGCCGAAGACGTCCTCC	---
R. miraletus	CCCCCTTCCTTCGGTCTAATTC	TAGTATCAGCCGACGACGTCCTCC	---
P. glauca	ATCACCTATCCGAGTCC	TAGTATCAGCAGAAGACGTCCTCC	---
S. acanthias	GTCCCCATTCGTGTTTT	TAGTATCCGCAGAAGACGTCCTCC	---
S. acanthias	GTCCCCATTCGTGTTTT	TAGTATCCGCAGAAGACGTCCTCC	---
S. acanthias	GTCCCCATTCGTGTTTT	TAGTATCCGCAGAAGACGTCCTCC	---
S. acanthias	GTCCCCATTCGTGTTTT	TAGTATCCGCAGAAGACGTCCTCC	---
S. acanthias	GTCCCCATTCGTGTTTT	TAGTATCCGCAGAAGACGTCCTCC	---
S. acanthias	GTCCCCATTCGTGTTTT	TAGTATCCGCAGAAGACGTCCTCC	---
S. acanthias	GTCCCCATTCGTGTTTT	TAGTATCCGCAGAAGACGTCCTCC	---







P. glauca TGACTCCACGCTGC CGGTGACCG TGTG TCCCTCCCTTCGG TCCCTCCCTTCGAACTCT TGTGCGATTGT  
 S. acanthias CGTCAGTGTGGGAC TGTGAGCCTCGCCCAAGGCATTAACCGCCCTCGGGGCAGGGTTGTCTCTC TGAGCGATTGGA  
 S. acanthias CGTCAGTGTGGGAC TGTGAGCCTCGCCCAAGGCATTAACCGCCCTCGGGGCAGGGTTGTCTCTC TGAGCGATTGGA  
 S. acanthias CGTCAGTGTGGGAC TGTGAGCCTCGCCCAAGGCATTAACCGCCCTCGGGGCAGGGTTGTCTCTC TGAGCGATTGGA  
 S. acanthias CGTCAGTGTGGGAC TGTGAGCCTCGCCCAAGGCATTAACCGCCCTCGGGGCAGGGTTGTCTCTC TGAGCGATTGGA  
 S. acanthias CGTCAGTGTGGGAC TGTGAGCCTCGCCCAAGGCATTAACCGCCCTCGGGGCAGGGTTGTCTCTC TGAGCGATTGGA  
 S. acanthias CGTCAGTGTGGGAC TGTGAGCCTCGCCCAAGGCATTAACCGCCCTCGGGGCAGGGTTGTCTCTC TGAGCGATTGGA

330 340 350 360 370 380 390 400

S. blainvillei CACAGAGAGAGA GAGAG CGTACAGAGAGAAACGTTGGC AGATAGAGGTGAGGTCGGACGCTTTG GCGG  
 S. blainvillei GAGAGAGAGAGA GAGCG CAGAGAGAAAACGTTG GGATATAGATGAGGGGGACATCTTTTGGGG  
 S. stellaris CCGTCCGCGCGC GTGTG CG GTGGGTGGTCCACCC AGCGAGAGTTTGGC TGACGTGCTCCGGCACGGA  
 S. stellaris GTGTG TGTG CG GTGGGTGGTCCACCC AGCGAGAGTTTGGC TGATGTGCTCCGGCACGGA  
 S. canicula CCGTCCGCGCGC GTGTG CG GTGGGTGGTCCACCC AGCGAGAGTTTGGC TGACGTGCTCCGGCACGGA  
 S. canicula CCGTCCGCGCGC GTGTG CG GTGGGTGGTCCACCC AGCGAGAGTTTGGC TGACGTGCTCCGGCACGGA  
 G. melastomus GCCTTGTCGCGC TTGT CA TCGGCAAGGA ATTGCC AGTGTGCGCCGCTCTGCCCGCACCGTGTGAG  
 R. naevus TTCCGCGACTGCTGCTCG CCTCCCTCCGGGACTGCCCTACGGTTGCCCTGCCCTGACTGCCCTGCCCTGGGA  
 R. miraletus TTACGGGACTGCTGCTCG CCTCCGCTCGGGACTGCGGTACGGTTGCCCTGCCCTGACTGCCCTGCCCTGGGA  
 P. glauca G GC ATCCT CC ACGGGAGG ATCCGC AGTGTGGAACGTT TCGGGTCCCGGCACATAA  
 S. acanthias GAGAGAGAGAGA G CGTACAGAGAGAAACGTTGGC AGATAGAGGTGAGGTCGGACGCTTTG GCGG  
 S. acanthias GAGAGAGAGAGA GAGAG CGTACAGAGAGAAACGTTGGC AGATAGAGGTGAGGTCGGACGCTTTG GCGG  
 S. acanthias GAGAGAGAGAGA G CAGAGAGAGAAACGTTGGC AGATAGAGGTGAGGTCGGACGCTTTG GCGG  
 S. acanthias GAGAGAGAGAGA GAGCGGAGCACACAGAGAAAACGTTGAC ATATAGAGGAGAGGTCACATCTCTTTG GGGG  
 S. acanthias GAGAGAGAGAGA GAG CGCACAGAGAGAAACGTTGGC AGATAGAGGTGAGGTCGGACGCTTTG GGGG  
 S. acanthias GAGAGAGAGAGA GAGAGAGAGCACACAGAGAGAAACGTTGAC ATATAGAGGAGAGGATACATCTCTTTGGGACG

410 420 430 440 450 460 470 480

S. blainvillei CAGTTTTGTTGGTTGGAGCGAGAAATTTGCTTGACGTGTAG CG ATGGGCCCTT GATGTGCTG TG  
 S. blainvillei GTTTTTTTTTTTGTTGATAGAGAGAAAATTTTTGAGACGTGTGCG AGAGGCCCTC GATGTGTGC TG  
 S. stellaris CGAGAGAG GAAAATAACAAGAGAGAGAAAAGAAACCCAGAGGG AACGAGAGCGACTGTTTC TG  
 S. stellaris CGAGAGAG GAAA AAACATGAGAGAGAAAAG AACCCAGAGGG AACGAGAGCGACTGTT GC TG  
 S. canicula CGAGAGAG GAAAATAACAAGAGAGAGAAAAGAAACCCAGAGGG AACGAGAGCGACTGTTTGC TG  
 S. canicula CGAGAGAG GAAAATAACAAGAGAGAGAAAAGAAACCCAGAGGG AACGAGAGCGACTGTTTAC TG  
 G. melastomus TTCTGTGA GCCTAGAGCG AGAGTGAGAAAGAGAGATGG AGACAATGTCGGAGAGCG ACTGTCT  
 R. naevus CGGCTGCAGGTGTGCGGAAAGAGCGGGTGGAAAAAACAGAA ACCTCTCTTGGGAAGGCCCA TCCA  
 R. miraletus CGGCTGCAGGTGTGCGGAAAGAGCGGGTGGAAAAAACAGAA ACCTCTCTTGGGAAGGCCCA TCCA  
 P. glauca AGACTGTCT GAGAAAGAGAGTGGAGCGACTGCTTCCCTGGTT GCGGTTGTGTGTTGCTTGCCT GAAGGTG  
 S. acanthias CAGTTTTGTTGGTTGGAGCGAGAAATTTGCTTGACGTGTAG CG ATGGGCCCTT GATGTGCTG TG  
 S. acanthias CAGTTTTGTTGGTTGGAGCGAGAAATTTGCTTGACGTGTAG CG ATGGGCCCTT GATGTGCTG TG  
 S. acanthias CAGTTTTGTTGGTTGGAGAGGAAATTTGCTTGACGTGTAG CG ATGGGCCCTT GATGTGCTG TG  
 S. acanthias CAGTTTTGTTGGTTGGAGCGAGAAATTTGCTTGACGTGTAG CG ATGGGCCCTT GATGTGCTG TG  
 S. acanthias CTTTTGCTGTTGTTGGAGAGAAAATTTGCTTGACGTGTAG AG ATGGGCCCTT GATGTGCTG TG  
 S. acanthias GAGTTTTGTTGGTTGGAGAGAAAATTTTTGCTTGACGTGTAG CG ATGGGCCCTT GATGTGCTG TG  
 S. acanthias CTGTTGCTGTTGTTGGAGAGAAAATTTGCTTGACGTGTAG CG GTCCGCTTTT GAGTCTG TG

490 500 510 520 530 540 550 560

S. blainvillei CATGGCT TT TTGCGTGC GTTTTGTGGTGGCGG TTTGC TAAGT GAC CCTGC GGTGCTC  
 S. blainvillei CCGTCT TT TTGTCGCG GTCTTGTGGGTGGGGGTGCGC AAAGA CAC CCTGC GGCCTC  
 S. stellaris GTCGAGCTGG GTGAAGCGGGCC GTCTTGCCTCGTCGG TGGC CGCTT TGTGTT GATGATC  
 S. stellaris GTCGAGCTGG GCGAAGCGGGCC GTCTTGCCTCGTCGG TGGC CGCTT TGTGGA GAT C  
 S. canicula GTCGAGCTGG GTGAAGCGGGCC GTCTTGCCTCGTCGG TGGC CGCTT TGTGTT GATGATC  
 S. canicula GTCGAGCTGG GCGAAGCGGGCC GTCTTGCCTCGTCGG TGGC CGCTT TGTGTT GATGATC  
 G. melastomus GCCGGTGGC TCGTCGTTGTTG GTGCCCCCGGTTG CCTGTGG GGA GTCTGT CATGGCT  
 R. naevus TCCAATCTCCCTGCCCTGCCCTG GTTCATCTTTCGCCCG CGGGGGCGGTCG GTAGGACGGCTCACTCTC  
 R. miraletus CCCAATCTCCCTGCCCTGCCCTG GTTCATCTTTCGCCCG CGGGGGCGGTCG GTAGGACGGCTCACTCTC  
 P. glauca GTTGGCCCC TGGCTGTGTTCA GTGCCCTCGTGGAG GACGTG CAGCTTGA CGCGTGTGGA GGCTTCA  
 S. acanthias CATGGCT TT TTGCGTGC GTTTTGTGGATGGCGG TTTGC TAAGT GA CCCTGC GGTGCTC  
 S. acanthias CATGGCT TT TTGTCGCG GTTTTGTGGGTGGCGG TTTGC TAAGT GA CCCTGC GGTGCTC  
 S. acanthias CATGGCT TT TTGCGTGC GTTTTGTGGGTGGCGG TTTGC TAAGT GA CCCTGC GGTGCTC  
 S. acanthias CCGTCT TT TTGCGTGC GTTTTGTGGGTGGCGG TTTGC TAAGT GA CCCTGC GGTGCTC  
 S. acanthias TGTGGCT TTTTGGGTTG GTTTGGGGGGTGGGG TTTGA TAAGA GA CTGTGC TCGCTC  
 S. acanthias TAAGCT TTTTGGGGG GTTTTGGGGGGTGGGG TTTGC TAAG GA CCCTGC GGGGCC  
 S. acanthias ATG TTTTGTGTGGG CTTTTGGCGGGGAAT TTTAA CACA GA GTCCGTC CCGTTC

570 580 590 600 610 620 630 640

S. blainvillei CTTTGTG TTTG GCTTGACCTCGATGTC CT TCCACACAAT TG GACCCGTTT GG  
 S. blainvillei TTTGTTG TTTG GTTGCATCTCTGTCTCT CTA CACAAAATG TA CACCCGTG GG  
 S. stellaris CACGTGTTCTCTGGG TG G TTTGTTT GGCTCCGGCCACGGGCTGCTGCGTGGAGGAC GGAGAAAG  
 S. stellaris CACTGTGCTCTGGG TG GTTGTGTTT GGCTCCGGCCACGGGCTGCTGCGCGGAGGAC GGAGAAAG







```

S. blainvillei -CGC TGAATCGGGACTCT GGAACG GTGTAAAGCCGAGCCCGGGCTCCA GCCTA TAGACACTC TGCTG
S. blainvillei -CTC TGAATCAGGACTCT GGAACG GASTAAAGCCGAGCCCGAGGCTCCA GCCTA TAGACACTC TGCTG
S. stellaris CGTCC GTGCTTCATCCGAGCAA CT TGTCTGGCCGAGC GTGGCCTGTGACCTCGTAG CCTCGCGC
S. stellaris CGTCC GTGCTTCATCCGAGCAA CT TGTCTGGCCGAGC GTGGCCTGTGACCTCGTAG CCTCGCGC
S. canicula CGTCC GTGCTTCATCCGAGCAA CT TGTCTGGCCGAGC GTGGCCTGTGACCTCGTAG CCTCGCGC
S. canicula CGTCC GTGCTTCATCCGAGCAA CT TGTCTGGCCGAGC GTGGCCTGTGACCTCGTAG CCTCGCGC
G. melastomus GCCGCTGTGCTGCACACGTCAGA GCG TGGATGGTTTGGCC GGTGCATCCGCTCCGCGAAAG CATTCCTC
R. naevus CCCCGACTTGCATECTGCCCGTCGCAG TGGTCCGCTCGGTT TCTGCTCCGCGTCTGTGT CGTGTGCT
R. miraletus CCCCGCTTGCATGCTCGCCGTCGCGG TGGTCCGCTCGGTT TCTGCTCCGCGTCTGTGT CCTGTGCT
P. glauca TGTCAAGTCCCTCTCGGTGTGAAG GTGC TGTCCAGTCCATT GTGC CTCCACCTTTTTCGACT CTTGGCT
S. acanthias -CGCTGAATCCGGAGTAT GGAGCG TTGTAAACCGAGCCCGGGATCCA GGGGA TCCAGCATT TGGA C
S. acanthias -TGATTG ATTCGTGAGTAGGAAGTG TGGAGGCGA CCGG TGCTCCC GGGTA TTCAGCCTTT TGG
S. acanthias -TGATTG ATGATGATTTGCGGCG TAAGAAGCGGCGCCGCTGCTCCA GAGTA TACAACATT TGC
S. acanthias -T TCTGA ATCCGGAGTTG GGAACG GAGTAAAGCAGCCCGGGCTCCACCGGGTA GCCAGTGTGT TGGT C
S. acanthias -C TGAATCCGGATTGT G AACG GAGTACCAGACCC GGTCCCA GCCTA TCGACACT T G
S. acanthias -TCGGTGT ATCCGGAGTCT GGAACG GAGTAAAGCCGAGCCCGGGCTCCA GCCTA TAGACACT TGGT G
S. acanthias -TTTTTGA ATCCGGAGTAT GGAGCG TTGTAAAGCGAGTAAAGGGATCCC GGGTA CCAGCATT TAGT C

```

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

```

S. blainvillei CTCTGCTAGGCAT ATGCCACAC AGCTATC GTCGTCCGC TCGT ACTAACCT CGCCGGC
S. blainvillei GTCATTCTAGGCAT ATGCCACAC AGGCTAC ATAGTATC TAGT ACTAACCT CGCCAAC
S. stellaris CGGTGCCTTGCCGC ACGTCTCTC CGTGACCTGACTT TCGAGGCTCCGCGC CGCGCGC AAGCTGC
S. stellaris CGGTGCCTTGCCGCACGTCCTC CGTGACCTGACTT TCGAGGCTCCGCGC TCGCGCGC AAGCTGC
S. canicula CGGTGCCTTGCCGCACGTCCTC CGTGACCTGACTT TCGAGGCTCCGCGC CGCGCGC AAGCTGC
S. canicula CGGTGCCTTGCCGCACGTCCTC CGTGACCTGACTT TCGAGGCTCCGCGC CGCGCGC AAGCTGC
G. melastomus CCCACGTTTGTGCGTGTGTGACGCGCGCGTCAGCA CGAGTCCGAGC TCCGACCG GGCAGAA
R. naevus TGCCATCCA GCAAGCTTGCT TCCGCAAGGTT TGACGCTGCTTTCGTG TGTGTTGT GGTTTGT
R. miraletus TGCCATCCAAGCAAGCTTGCT TCCAGCAAGGTT TGCCC TGACCTCCG CCTACCTT CCGTCT
P. glauca CAGTCCCTAGCGTCTGCTCTTTGCTCTGCGGACTT TTC TCCCTCAC TCTGTGT ACCTCTT
S. acanthias ATTCTGCTAGGCAT ATGCCACAC ATGCCTC GTAGTCCGC TTGG TCCGACCT TGCCGGC
S. acanthias -TGCTTCTAGGCAT GTGCCACAC AGCCTAC GTTGTCCGC TCGT ACTAACCT ACCCGGC
S. acanthias -TGCTGCTAGGCAT ATGCCACAC AGCTATC GTCGTCCGC TCGT ACTAACCT CGCCGGC
S. acanthias -CTTCTAGGCAT ATGCCACAC ATGCCTC GTAGTATC TTGG TCCGACCT TACCGAC
S. acanthias CTCTGCTAGGCAT ATGCCACAC AGCTATC GTCGTCCGC TCGT ACTAACCT CGCCGGC
S. acanthias ATTT TAGGCAT ATGCCACAC AGCTATC GTGGTCCGC TCGT ACTAACCT CGCCGGG
S. acanthias ATTCTGCTAGGCAT ATTAGCAC ATGCCTC ACAGTCATGTCGT CCAATCTACTAACCTCGCCGG

```

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120

```

S. blainvillei GGGGCTGCTTTTGTGGACGTGGTTGCTG TCGTGGTCCGTTGCCGTGGCATGCAATGCAAGTTTGTATTATGCTCG
S. blainvillei GGGGGAGGCTTTTCTAAATTTGGTTGACC TGGTGGGCGGTTCCGCTGGCTAGCATGCAAGTTTGTATTATGCTCG
S. stellaris TGCTCAAAACCTCGCCATCTGCCCTTGC ACCTTTGGTTCCGC CCAGCTTTTGGCTCGTTG TCACCC
S. stellaris TGCTCAAAACCTCGCCATCTGCCCTTGC ACCTTTGGTTCCGC CCAGCTTTTGGCTCGTTG TCACCC
S. canicula TGCTCAAAACCTCGCCATCTGCCCTTGC ACCTTTGGTTCCGC CCAGCTTTTGGCTCGTTG TCACCC
S. canicula TGCTCAAAACCTCGCCATCTGCCCTTGC ACCTTTGGTTCCGC CCAGCTTTTGGCTCGTTG TCACCC
G. melastomus AGCACTAAGC TCAGCA
R. naevus T TGGTCCGTCGACCG GCGATCGG TGGTGGCCAGCCAGCCACCAGCCGTTCTCAGCTTCAATCGCCCA
R. miraletus CACACACAACCGTCCGGCCGCTGACCAAGC CGCTGGCGACTTGTCCGCTGCCCGCTTCGCTCCCTCTTGT
P. glauca TGCATGCTTCCGCTCAGCCACTGCTTTCCG TTACCTGGGAGTGCAGTCAACCTCGCCACCTTTGGATTGCTGGAA
S. acanthias GGGGCGGGGGGGGTAGACGTGGTGGCTG TGGTGGTGGGTGGCGGCCCATGCAATGCAAGTTTGTATTATGCTCG
S. acanthias GGGGCGGGGGGGTGGTGGACGTGGTGGCTG TCGTGGTGGCTGGCGCTCGCATGCAATGCAAGTTTGTATTATGCTCG
S. acanthias GGGGCTGCTTTTGTGGACGTGGTGGCTG TCGTGGTGGCTGGCGCTGGCATGCAATGCAAGTTTGTATTATGCTCG
S. acanthias CTGGCGGGGGGGGTA ACGTGGTGGATG TGGTGGTGGGTGGCGGCCCATGCAATGCAAGTTTGTATTATGCTCG
S. acanthias GGGGCTGCTTTTGTGGACGTGGTGGCTG TCGTGGTGGCTGGCGCTGGCATGCAATGCAAGTTTGTATTATGCTCG
S. acanthias GGGGCTAGTTTGTGGACG TGGTGGCTGGTGGCTGGCTGGCATGCAATGCAAGTTTGTATTATGCTCG
S. acanthias GGGGGTAGTTTGTGGACG TGGTGGTGGGTGGCGGCCGCTCGCAATGCAAGTTTGTATTATGCTCG

```

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

```

S. blainvillei GAGCTAATGCCCGGC GCGCCCACTAAACCT CTGCTT GACGC
S. blainvillei GAGCTAATGCCCGGC GGGCCGACGTAACCT CTGC
S. stellaris TGCCCTCTT TCTGGCCTTTGGCTCACAC TTTCAC TCTGACTCGATCTCGCTCAGT ATCACCCTCTCTC
S. stellaris TGCCCTCTT TCTGGCCTTTGGCTCACAC TTTCAC TCTGACTCGATCTCGCTCAGA GTCTCTCTCTCTC
S. canicula TGCCCTCTT TCTGGCCTTTGGCTCACAC TTTCAC TCTGACTCGATCTCGCTCAGT ATCACCCTCTCTC
S. canicula TGCCCTCTT TCTGGCCTTTGGCTCACAC TTTCAC TCTGACTCGATCTCGCTCAGT ATCACCCTCTCTC
G. melastomus
R. naevus
R. miraletus GTCCTGCCGCTCCGCTCGGTCGGTGGGAAAGGAAGAGCTTTTGACGGTGCCTTCGTGGTGTGGCTGCTT
P. glauca GAGTTCATGTGCCGAG CCGCGTCTTTGGGTGTGGCGGACAGCGCTTTGGGGCGCACACAGTCCAGTGCCTCGTGT
S. acanthias GAGCTAATGCCCGGC CGGCCGACGTAAGCT CTGCCTAC
S. acanthias GAGCTAATGCCCGGC CGGCCGACGTAAGCT CTGCCTAC
S. acanthias GAGCTAATGCCCGGC CGGCCGACGTAAGCT CTGCCTAC
S. acanthias GAGCTAATGCCCGGC CGGCCGACGTAAGCT CTGCCTAC

```













*S. canicula* CGAAATCTTAATACAACATTCTTTGACCAGG - AGGAGG - AGGAGATCC - TATCTTTATCAGCACTTATTCGATT  
*S. canicula* CGAAATCTTAATACAACATTCTTTGACCAGG - AGGAGG - AGGAGATCC - TATCTTTATCAGCACTTATTCGATT  
*G. melastomus* CGCAACCTCAACACTACATTCTTTGATCCCG - AGGAGG - AGGGGACCC - AATCTCTATCAGCACTTATTTGATT  
*R. naevus* CGTAATCTCAACACAACATTTCTTTGACCCGY - TGGAGG - GGGCCACCC - CATCTATATCAACATTTATTCGATT  
*R. miraletus* CGCAATCTTAACACAACATTTCTTTGACCCG - TGGAGG - AGGAGACCC - AATCTATATCAACATTTATTCGATT  
*P. glauca* TTTAATGGTTAGTGTGGATTATTGATTTCTCTATGAGATATAAGATTCTAGTCATGGGAGGCGATTATAATGAGG  
*S. acanthias* CGTAATTTAAACACAACATTTTTTGATCCTGC - TGGAGGA - GGAGACCC - AATCTCTACCAACACTTATTTGATT  
*S. acanthias* CGTAATTTAAACACAACATTTTTTGATCCTGC - TGGAGGA - GGAGACCC - AATCTCTACCAACACTTATTTGATT  
*S. acanthias* CGTAATTTAAACACAACATTTTTTGATCCTGC - TGGAGGA - GGAGACCC - AATCTCTACCAACACTTATTTGATT  
*S. acanthias* CGTAATTTAAACACAACATTTTTTGATCCTGC - TGGAGGA - GGAGACCC - AATCTCTACCAACACTTATTTGATT  
*S. acanthias* CGTAATTTAAACACAACATTTTTTGATCCTGC - TGGAGGA - GGAGACCC - AATCTCTACCAACACTTATTTGATT  
*S. acanthias* CGTAATTTAAACACAACATTTTTTGATCCTGC - TGGAGGA - GGAGACCC - AATCTCTACCAACACTTATTTGATT

650 660 670 680 690 700 710 720

*S. blainvillei* CTTCGGTCATCCGGAAGTTTATATTTTAAATTTTACCCGGCTTCGGAATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*S. blainvillei* CTTCGGTCATCCGGAAGTTTATATTTTAAATTTTACCCGGCTTCGGAATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*S. stellaris* CTTTGGTCACCCAGAAGTCTATATTTTAAATTTTACCCGGTTTCGGTATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*S. stellaris* CCTCGAAAACCCCT - GCCCGTCCCGGTTATGTCAA - TTAACCCCAATCGC - CGTGAAAACCGATACAGGCCCA  
*S. canicula* CTTTGGTCACCCAGAAGTCTATATTTTAAATTTTACCCGGTTTCGGTATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*S. canicula* CTTTGGTCACCCAGAAGTCTATATTTTAAATTTTACCCGGTTTCGGTATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*G. melastomus* TTTTGGCCACCCAGAAGTCTATATTTTAAATTTTACCCGGTTTCGGTATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*R. naevus* CTTTCGGACCCCGAAGTCTATATTTTAAATTTTACCCGGTTTCGGTATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*R. miraletus* CTTTCGGACATCCGGAAGTCTATATTTTAAATTTTACCCGGTTTCGGTATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*P. glauca* AATAATAGCAGGTAAGTGTCTCAACAAATTTTCGATTT - CTTGGGAATCAATTGAACCACTTA - CCTGCATTATTCCTC  
*S. acanthias* CTTTCGGCATCCGGAAGTTTATATTTTAAATTTTACCCGGCTTCGGAATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*S. acanthias* CTTTCGGCATCCGGAAGTTTATATTTTAAATTTTACCCGGCTTCGGAATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*S. acanthias* CTTTCGGCATCCGGAAGTTTATATTTTAAATTTTACCCGGCTTCGGAATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*S. acanthias* CTTTCGGCATCCGGAAGTTTATATTTTAAATTTTACCCGGCTTCGGAATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*S. acanthias* CTTTCGGCATCCGGAAGTTTATATTTTAAATTTTACCCGGCTTCGGAATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA  
*S. acanthias* CTTTCGGCATCCGGAAGTTTATATTTTAAATTTTACCCGGCTTCGGAATAAATTTCCCATGTAGTAGCCTATTATTCAGGTA

730 740 750 760 770 780 790 800

*S. blainvillei* AAAAAGAACCTTTT - GGTATATAGGTATAGTTTGAGCAATAATAGCAATTTGGTCTACTTGGCTTTATTTGTGTGAGCT  
*S. blainvillei* AAAAAGAACCTTTT - GGTATATAGGTATAGTTTGAGCAATAATAGCAATTTGGTCTACTTGGCTTTATTTGTGTGAGCT  
*S. stellaris* AAAAAGAACCTTTT - GGTATATAGGAATAGTATGAGCAATAATAGCAATTCGGCTACTTGGTTTTATTTGTGTGAGCC  
*S. stellaris* AAGGCGTCTCTTAAAGAGGTTGGACGGGACCCGAGCCCGGAGCCCTGGTGGTATACGGGAATTCAGAGCTCCGCGAG  
*S. canicula* AAAAAGAACCTTTT - GGTATATAGGAATAGTATGAGCAATAATAGCAATTCGGCTACTTGGTTTTATTTGTGTGAGCC  
*S. canicula* AAAAAGAACCTTTT - GGTATATAGGAATAGTATGAGCAATAATAGCAATTCGGCTACTTGGTTTTATTTGTGTGAGCC  
*G. melastomus* AAAAAGAACCTTTT - GGTATATAGGTATAGTATGAGCAATAATAGCAATTTGGCTACTTGGTCTTATCTGATGTGAGCC  
*R. naevus* AAAAAGAACCAATTC - GGCTATATGGGTATAGTCTGAGCAATAATAGCAATTTGGTCTTTTATGGCTTCATCGTCTGAGCA  
*R. miraletus* AAAAAGAACCAATTT - GGTATATAGGCTATAGTCTGAGCAATAATAGCAATTCGGTCTTTTATGGCTTCATCGTCTGAGCC  
*P. glauca* ATTAATAATCGCTGT - AATAATATAGAGG - ATTAGGGTGTCAAT - TAACGAATACAATTA - TTAATGTGTGTTG  
*S. acanthias* AAAAAGAACCTTTT - GGTATATAGGTATAGTTTGAGCAATAATAGCAATTTGGTCTACTTGGCTTTATTTGTGTGAGCT  
*S. acanthias* AAAAAGAACCTTTT - GGTATATAGGCTATAGTTTGAGCAATAATAGCAATTTGGTCTACTTGGCTTTATTTGTGTGAGCT  
*S. acanthias* AAAAAGAACCTTTT - GGTATATAGGTATAGTTTGAGCAATAATAGCAATTTGGTCTACTTGGCTTTATTTGTGTGAGCT  
*S. acanthias* AAAAAGAACCTTTT - GGTATATAGGTATAGTTTGAGCAATAATAGCAATTTGGTCTACTTGGCTTTATTTGTGTGAGCT  
*S. acanthias* AAAAAGAACCTTTT - GGTATATAGGCTATAGTTTGAGCAATAATAGCAATTTGGTCTACTTGGCTTTATTTGTGTGAGCT  
*S. acanthias* AAAAAGAACCTTTT - GGTATATAGGCTATAGTTTGAGCAATAATAGCAATTTGGTCTACTTGGCTTTATTTGTGTGAGCT

810 820 830 840 850 860 870 880

*S. blainvillei* CA - CCACATATTTACAGTAGGA - ATGGACGTTGATACCCGAGCCTATTTCCACC - TCAGCAACAATAAATTTATGCTA  
*S. blainvillei* CA - CCACATATTTACAGTAGGA - ATGGACGTTGATACCCGAGCCTATTTCCACC - TCAGCAACAATAAATTTATGCTA  
*S. stellaris* CA - CCACATATTTACAGTAGGA - ATAGACGTAGACACGAGCTTACTTTACT - TCCGCTACAATAAATTTATGCTA  
*S. stellaris* CATGAGTCCCTCTGTGGACGAGGATT - CCGACCGCGGAGCGCGATGTTTATCCAGCAGTTTATCCGAGAGGCTCAGTCTCTC  
*S. canicula* CA - CCACATATTTACAGTAGGA - ATAGACGTAGACACGAGCTTACTTTACT - TCCGCTACAATAAATTTATGCTA  
*S. canicula* CA - CCACATATTTACAGTAGGA - ATAGACGTAGACACGAGCTTACTTTACT - TCCGCTACAATAAATTTATGCTA  
*G. melastomus* CA - TCACATATTTACAGTAGGT - ATAGACGTAGATACCTCGAGCCTATTTTACC - TTTGCAACAATAAATTTATGCCA  
*R. naevus* CA - TCACATATTTACAGTAGGA - ATAGACGTAGATACACGAGCATACTTCACA - TCCGCCACAATAATTCATCGCCA  
*R. miraletus* CA - TCACATATTTACAGTAGGA - ATAGATGATAGACACGAGCATACTTTACA - TCAGCTACAATAAATTTATGCCA  
*P. glauca* TG - AAAGTGAATTAAGTCTTCCATACACTGGGAGGATG - CATCTTGA - ATCCTAATGTAAGGGGTGTA  
*S. acanthias* CA - CCACATATTTACAGTAGGA - ATGGACGTTGATACCCGAGCCTATTTCCACC - TCAGCAACAATAAATTTATGCTA  
*S. acanthias* CA - CCACATATTTACAGTAGGA - ATGGACGTTGATACCCGAGCCTATTTCCACC - TCAGCAACAATAAATTTATGCTA  
*S. acanthias* CA - CCACATATTTACAGTAGGA - ATGGACGTTGATACCCGAGCCTATTTCCACC - TCAGCAACAATAAATTTATGCTA  
*S. acanthias* CA - CCACATATTTACAGTAGGA - ATGGACGTTGATACCCGAGCCTATTTCCACC - TCAGCAACAATAAATTTATGCTA  
*S. acanthias* CA - CCACATATTTACAGTAGGA - ATGGACGTTGATACCCGAGCCTATTTCCACC - TCAGCAACAATAAATTTATGCTA  
*S. acanthias* CA - CCACATATTTACAGTAGGA - ATGGACGTTGATACCCGAGCCTATTTCCACC - TCAGCAACAATAAATTTATGCTA  
*S. acanthias* CA - CCACATATTTACAGTAGGA - ATGGACGTTGATACCCGAGCCTATTTCCACC - TCAGCAACAATAAATTTATGCTA

890 900 910 920 930 940 950 960



S. blainvillei TCCCAACAGGTTGAAAAGTCTTCAGCTGACTAGCAACCCCTCCACGGGGGCTCCATTAAATGAGAAACACC CCTCCT C  
S. blainvillei TCCCAACAGGTTGAAAAGTCTTCAGCTGACTAGCAACCCCTCCACGGGGGCTCCATTAAATGAGAAACACC CCTCCT C  
S. stellaris TCCCTACTGGTGTCAAAGTATTTAGCTGACTAGCAACACTTCATGGAGGCTCTATTAAATGAGAAACACC ATTTGCT A  
S. stellaris CCCACACTCTCCAATAATTGCCGTAACCGCAAAACAACGGGGCA AATCCTCAGGAAATAAAGCCACC ACAGGT T  
S. canicula TCCCTACTGGTGTCAAAGTATTTAGCTGACTAGCAACACTTCATGGAGGCTCTATTAAATGAGAAACACC ATTTGCT A  
S. canicula TCCCTACTGGTGTCAAAGTATTTAGCTGACTAGCAACACTTCATGGAGGCTCTATTAAATGAGAAACACC ATTTGCT A  
G. melastomus TCCCAACAGGCTTAAAAGTCTTCAGCTGACTAGCAACCCCTCCACGGGGGCTCCATTAAATGAGAAACACC CCTACT C  
R. naevus TTCCAACAGGTTGAAAAGTCTTTAGCTGACTGGCCACCCTTCATGGGGGCTCCATTAAATGAGAAACACC TCTACT C  
R. miraletus TTCCAACAGGTTGAAAAGTCTTTAGCTGACTAGCCACCCTCCATGGAGGCTCCATTAAATGAGAAACACC ACTACT C  
P. glauca TTCCAACGTAATAAAGATACGTAGAGTTTAACTCCACAATTCCGACCCTCAAGGCAGTAAATATATTTTACTACTAC  
S. acanthias TCCCAACAGGTTGAAAAGTCTTCAGCTGACTAGCAACCCCTCCACGGGGGCTCCATTAAATGAGAAACACC CCTCCT C  
S. acanthias TCCCAACAGGTTGAAAAGTCTTCAGCTGACTAGCAACCCCTCCACGGGGGCTCCATTAAATGAGAAACACC CCTCCT C  
S. acanthias TCCCAACAGGTTGAAAAGTCTTCAGCTGACTAGCAACCCCTCCACGGGGGCTCCATTAAATGAGAAACACC CCTCCT C  
S. acanthias TCCCAACAGGTTGAAAAGTCTTCAGCTGACTAGCAACCCCTCCACGGGGGCTCCATTAAATGAGAAACACC CCTCCT C  
S. acanthias TCCCAACAGGTTGAAAAGTCTTCAGCTGACTAGCAACCCCTCCACGGGGGCTCCATTAAATGAGAAACACC CCTCCT C  
S. acanthias TCCCAACAGGTTGAAAAGTCTTCAGCTGACTAGCAACCCCTCCACGGGGGCTCCATTAAATGAGAAACACC CCTCCT C

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

S. blainvillei TGGGCCCTAGGTTTATTTTCTTATTTACAGTAGGAGGCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCCCTGGACATCGT  
S. blainvillei TGGGCCCTAGGTTTATTTTCTTATTTACAGTAGGAGGCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCCCTGGACATCGT  
S. stellaris TGAGCACTTGGTTTTATTTTCTTATTTACTGTGGAGGCCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCTTGGACATCGT  
S. stellaris CCAGCAGGGCAGTACT CAGAGGCAGAGTTGGAAGCCTAACAGGAATTGTTTGTAG  
S. canicula TGAGCACTTGGTTTTATTTTCTTATTTACTGTGGAGGCCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCTTGGACATCGT  
S. canicula TGAGCACTTGGTTTTATTTTCTTATTTACTGTGGAGGCCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCTTGGACATCGT  
G. melastomus TGAACCCCTAGGTTTATTTTCTTATTTACAGTAGGAGGACTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCTTGGACATCGT  
R. naevus TGAGCACTAGGCTTATTTTCTTATTTACAGTTGGGGCCCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCTTGGACATCGT  
R. miraletus TGAGCACTAGGCTTATTTTCTTATTTACAGTGGAGGCCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCTTGGACATCGT  
P. glauca TTATAAAT  
S. acanthias TGGGCCCTAGGTTTATTTTCTTATTTACAGTAGGAGGCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCCCTGGACATCGT  
S. acanthias TGGGCCCTAGGTTTATTTTCTTATTTACAGTAGGAGGCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCCCTGGACATCGT  
S. acanthias TGGGCCCTAGGTTTATTTTCTTATTTACAGTAGGAGGCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCCCTGGACATCGT  
S. acanthias TGGGCCCTAGGTTTATTTTCTTATTTACAGTAGGAGGCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCCCTGGACATCGT  
S. acanthias TGGGCCCTAGGTTTATTTTCTTATTTACAGTAGGAGGCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCCCTGGACATCGT  
S. acanthias TGGGCCCTAGGTTTATTTTCTTATTTACAGTAGGAGGCTAACAGGAATTGTTTGTAGCTAATCTTCCCTGGACATCGT

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120

S. blainvillei TCTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCAATTATAGCTGGT  
S. blainvillei TCTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCAATTATAGCTGGT  
S. stellaris CTTTCACCTACTATTTCTTAGTAGCCCTTCCACTATGTCTTCTTAGGAGCAGCTTTGCTTATATAGCAGGAT  
S. stellaris CTTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCAATTATAGCTGGT  
S. canicula CTTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCAATTATAGCAGGAT  
S. canicula CTTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCTTATATAGCAGGAT  
G. melastomus TCTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCAATTATAGCTGGT  
R. naevus CTTTCACCTACTATGTGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCTTATATAGCAGGAT  
R. miraletus CTTTCACCTACTATGTGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCTTATATAGCAGGAT  
P. glauca TCTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCAATTATAGCTGGT  
S. acanthias TCTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCAATTATAGCTGGT  
S. acanthias TCTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCAATTATAGCTGGT  
S. acanthias TCTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCAATTATAGCTGGT  
S. acanthias TCTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCAATTATAGCTGGT  
S. acanthias TCTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCAATTATAGCTGGT  
S. acanthias TCTTCAGCACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTATGTGTATCAATAGGAGCCGATTTGCAATTATAGCTGGT

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

S. blainvillei TTATTCACCTGATTC CCACCTATTTCCGGATACACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTC  
S. blainvillei TTATTCACCTGATTC CCACCTATTTCCGGATACACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTC  
S. stellaris TTATTCACCTGATTC CCACCTATTTCCGGATACACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTC  
S. stellaris TTATTCACCTGATTC CCACCTATTTCCGGATACACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTC  
S. canicula TTATTCACCTGATTC CCACCTATTTCCGGATACACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTC  
S. canicula TTATTCACCTGATTC CCACCTATTTCCGGATACACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTC  
G. melastomus TGATACAAATGATTC CCCTTAAATCTGTCTACACTATACACCGACCCTAGATACACAATG  
R. naevus TGTTCACCTCTTC CCGCTACTTACAGGGTA ACTTCAGTACCGCATGCGTCCATACTC  
R. miraletus TTGTCCACTGATTC CCACCTATTTCCAGGCTATACACTTCACTCTACTTGAACAAAAACTC  
P. glauca  
S. acanthias TTATTCACCTGATTC CCACCTATTTCCGGATACACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTC AATACC  
S. acanthias TTATTCACCTGATTC CCACCTATTTCCGGATACACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTC AATACC  
S. acanthias TTATTCACCTGATTC CCACCTATTTCCGGATACACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTC AATACC  
S. acanthias TTATTCACCTGATTC CCACCTATTTCCGGATACACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTC AATACC

S. acanthias  
S. acanthias  
S. acanthias

TTATTCAGTGGTTC CCACTATTTCCGGATA CACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTCAATACC  
TTATTCAGTGGTTC CCACTATTTCCGGATA TACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTCAATACC  
TTATTCAGTGGTTC CCACTATTTCCGGATA CACCCTTCACTCTACTTGAACAAAAACTCAATACC



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000102019

