

Μοριακές φυλογενετικές συσχετίσεις μεταξύ ειδών της υποκλάσης των Ελασμοβράγχιων στον Ελλαδικό χώρο

Γεώργιος Οικονόμου¹, Αντώνιος Ζαμπούνης¹, Περσεφόνη Μεγαλοφώνου², Γιάννης Μπατζάκας³, Γεώργιος Γκάφας¹, Εμμανουήλ Μαλανδράκης¹, Μενέλαος Κάβουρας¹, Πέτρος Μαρτσικάλης¹, Όλγα Ντανταλή¹, Παναγιώτα Παναγιωτάκη¹, Δημήτριος Βαφειδής¹, Αθανάσιος Εξαδάκτυλος¹

¹Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Βόλος
e-mail: exadact@uth.gr

²Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Ζωολογίας-Θαλάσσιας Βιολογίας, Αθήνα

³Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Σχολή Περιβάλλοντος, Τμήμα Επιστημών της Θάλασσας, Μυτιλήνη

Abstract

George Ekonomou¹, Antonios Zambounis¹, Persefoni Megalofonou², Gianni Batzakis³, George Gkafas¹, Emmanouil Malandrakis¹, Menelaos Kavouras¹, Petros Martsikalidis¹, Olga Dadali¹, Panagiota Panagiotaki¹, Dimitrios Vafidis¹, Athanasios Exadactylos¹: Molecular phylogenetic species-specific interrelations of the Elasmobranchii subclass in Hellas.

There are several hypotheses concerning phylogenetic interrelations of the rays and sharks grouped in the Elasmobranchii subclass. Molecular approaches such as direct sequence analysis are important for clarifying these phylogenetic interrelations of Mediterranean species within the Elasmobranchii subclass. Accordingly, partial direct sequencing of the ribosomal ITS2 regions and mitochondrial *COI* and *COII* genes was conducted for the subsequent construction of the corresponding phylogenetic trees. Three distinct clusters were revealed, where the higher divergence was observed at the *COI* gene sequences derived alignment. On the other hand, the *ITS2* and *COII* gene sequences derived alignments were quite conservative among all species with little informative output across the main lineages.

Keywords: DNA sequencing, molecular analysis, phylogenetic trees, elasmobranchii

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι Χονδριχθίες (Chondrichthyes) διαχωρίζονται σε 2 υποκλάσεις, στους Ολοκέφαλους και στα Ελασμοβράγχια, από τις οποίες η δεύτερη υποκλάση αποτελείται από τους καρχαρίες και τις ράγιες. Οι καρχαρίες χωρίζονται σε οκτώ τάξεις με πιο σημαντική την τάξη των Carcharhiniformes, η οποία περιλαμβάνει περίπου 200 είδη εκ των οποίων τα 50 αποτελούν την οικογένεια των Carcharinidae (Compagno 1988). Στις ράγιες ταξινομούνται 600 είδη από 18 οικογένειες και πέντε τάξεις με πιο σημαντική την Rajiformes η οποία περιλαμβάνει περίπου το 44% των ειδών (Dosay-Akbulut 2004).

Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των Ελασμοβράγχιων είναι αρκετά ασαφής και η συστηματική τους κατάταξη με βάση μορφο-φυσιολογικά χαρακτηριστικά δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί (Dosay-Akbulut 2008). Ο σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανάλυση-ταυτοποίηση, μέσω μοριακής τεχνικής, 17 δειγμάτων από οκτώ είδη Ελασμοβράγχιων με προέλευση τον Ελλαδικό χώρο, προκειμένου να εκτιμηθεί η φυλογενετική συσχέτιση μεταξύ των ειδών. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν περιελάμβαναν α) απομόνωση του συνολικού γενομικού DNA, β) ενίσχυση τριών γενετικών τόπων με PCR, γ) άμεση αλληλούχηση των PCR προϊόντων, δ) υπολογισμός αποστάσεων και κατασκευή αντίστοιχου φυλογενετικού δένδρου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα οκτώ από τα 17 δείγματα συλλέχθηκαν από το ευρύτερο αλιευτικό πεδίο της Λέσβου, και τα υπόλοιπα ήταν δείγματα αρχείου του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α. Το πρωτόκολλο απομόνωσης του συνολικού γενομικού DNA ήταν των Miller *et al.* (1988), με κάποιες τροποποιήσεις. Από το συνολικό γενομικό DNA, επιλέχθηκαν οι περιοχές των γονιδίων COI, COII (Normark *et al.* 1991) και τμήματα των ενδιάμεσων μεταγραφόμενων περιοχών του rRNA, ITS2 (Dosay-Akbulut 2008). Οι PCRs έγιναν με παγκόσμιους εκκινητές. Το 5' άκρο των PCR προϊόντων αλληλουχίστηκε χρησιμοποιώντας τους εμπρόσθιους εκκινητές L5950, L7450 και ITS2F L, ενώ το 3' άκρο αλληλουχίστηκε με τους ανάστροφους εκκινητές H7196, H8055 και ITS2R με τη χρήση του ABI PRISM 3700 DNA Analyzer στο εξωτερικό (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Παγκόσμιοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.
Table 1: Universal primers used in PCR reactions.

Γενετικός τύπος	Εκκινητής	Αλληλουχία	Πηγή
COI	L 5950	5'-ACAATCACAAAGA(CT)AT(CT)GG-3'	Normark <i>et al.</i> 1991
	H 7196	5'-AGAAAATGTTG(AT)GGGAA(AG)AA-3'	
COII	L 7450	5'-AAAAGGAAAGGAATCGAACCC-3'	Normark <i>et al.</i> 1991
	H 8055	5'-GCTCATGAGTGGAGGACGTCT-3'	
ITS2	ITS2F L	5'-CTACGCCTGTCTGAGTGT-3'	Dosay-Akbulut 2008
	ITS2R H	5'-ATATGCTTAAATTCAGCGGG-3'	

Τα αποτελέσματα των αλληλουχίσεων αρχικά ελέγχθηκαν με το λογισμικό ChromasPro (version 1.49, Technelysium Pty Ltd) και ακολούθησε η ανάλυση με το λογισμικό BioEdit (Hall 1999). Με το ίδιο λογισμικό έγινε και η ευθυγράμμιση των τελικών αλληλουχιών (Thompson *et al.* 1994). Για την ταυτοποίηση των αλληλουχιών έγινε έλεγχος ομολογίας σε σύγκριση με τη βάση δεδομένων NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Η φυλογενετική ανάλυση έγινε με την χρήση του λογισμικού MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007) ενώ για τη δημιουργία του φυλογενετικού δένδρου ακολουθήθηκε η μέθοδος Neighbor - Joining με το μοντέλο p-distance.

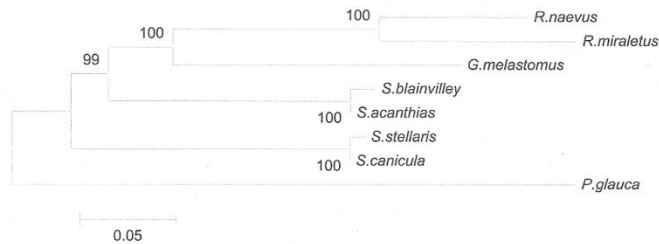
Ο υπολογισμός των αποστάσεων για όλες τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στους τρεις γενετικούς τύπους πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA 4. Υπολογίστηκαν οι παρακάτω παράμετροι: α) η ανά ζεύγος αποστάσεις (pairwise distances), β) η συνολική μέση απόσταση (overall mean distance), γ) η ανάλυση ομοιογένειας με βάση το πρότυπο υποκαταστάσεων (substitution pattern homogeneity test), δ) η απόσταση με βάση τη σύσταση αζωτούχων βάσεων (composition distance).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να γίνει ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους και εκτίμηση των φυλογενετικών σχέσεων σε διάφορα είδη Ελασμοβράγχιων, μέσω άμεσης αλληλούχησης. Τα PCR προϊόντα κατέδειξαν πολυμορφισμό σε επίπεδο είδους λόγω μεγέθους τους, ενώ από την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών τους παρατηρήθηκε υψηλή νουκλεοτιδική συντηρητικότητα σε αρκετές περιοχές των ευθυγραμμισμένων αυτών αλληλουχιών. Επίσης πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση όλων των αλληλουχιών, τα αποτελέσματα της οποίας επιβεβαίωσαν την φυλογενετική ταξινόμηση των ειδών. Πραγματοποιήθηκε έτσι για πρώτη φορά στον Ελλαδικό χώρο διερεύνηση των φυλογενετικών συσχετίσεων ειδών της υποκλάσης Ελασμοβράγχιων, συσχετίσεις που είναι βιβλιογραφικώς περιορισμένες ακόμη και σε επίπεδο οικογενειών της υποκλάσης (Corrigan & Beheregaray 2009).

Η υψηλότερη συντηρητικότητα παρατηρήθηκε στις αλληλουχίες των τόπων COII και ITS2. Αντιθέτως, η μεγαλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ των αλληλουχιών βρέθηκε στο COI τόπο, τόπος ο οποίος δύναται να χρησιμοποιηθεί για ενδοειδική πληθυσμιακή ανάλυση τους.

Στο φυλογενετικό δένδρο που προέκυψε από τη συνολική επεξεργασία των αλληλουχιών (Σχ. 1), χρησιμοποιήθηκε ως είδος αναφοράς το *Prionace glauca*. Παρατηρούμε ότι σχηματίστηκαν τέσσερις ευδιάκριτοι φυλογενετικοί κλάδοι με βάση τις αποστάσεις τους. Ο πρώτος κλάδος αποτελείται από τα είδη *Raja naevus*, *Raja miraletus*, ο δεύτερος από το είδος *Galeus melastomus*, ο τρίτος από τα είδη *Squalus blainvillei* και *Squalus acanthias* και ο τέταρτος από τα είδη *Scyliorhinus stellaris* και *Scyliorhinus canicula*.



Σχ. 1: Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης με τη χρήση του αλγόριθμου Neighbor-Joining.
Fig. 1: Neighbor-Joining dendrogram of genetic distances between species.

Η συνολική μέση απόσταση κατέδειξε την επαρκή διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών, όπως άλλωστε προκύπτει και σε άλλους γονιδιακούς τόπους κυρίως στα Scyliorhinids (Iglésias et al. 2005). Από τον υπολογισμό των ανά ζεύγος αποστάσεων, τα είδη που φαίνεται ότι αποκλίνουν περισσότερο είναι ο μπλε καρχαρίας *P. glauca* και οι ράγιες (*R. naevus* και *R. miraletus*), με τις μέγιστες αποστάσεις να εμφανίζονται ανάμεσα στο είδος *P. glauca* και *R. miraletus*. Αντιθέτως, οι χαμηλότερες εξελικτικές αποκλίσεις εμφανίστηκαν, όπως αναμενόταν, ανάμεσα στα είδη που ανήκουν στις ίδιες οικογένειες (*Squalus*, *Scyliorhinus*, *Raja*). Φαίνεται ότι η τάξη των Carcharhiniformes δεν είναι μονοφυλετική (Iglésias et al. 2005, Dosay-Akbulut 2008).

Όλες οι στατιστικές επεξεργασίες ανάλυσης αποστάσεων βασίζονται στην υπόθεση ότι οι αλληλουχίες έχουν εξελιχθεί με την ίδια μέθοδο υποκατάστασης. Ο έλεγχος της υπόθεσης αυτής πραγματοποιήθηκε με ανάλυση ομοιογένειας με βάση το πρότυπο υποκαταστάσεων. Την υψηλότερη ανομοιογένεια με βάση τα παραπάνω παρουσίασαν κυρίως οι ράγιες. Τέλος, από τον υπολογισμό των τιμών υποκατάστασης των βάσεων, η μεγαλύτερη πιθανότητα υποκατάστασης ήταν ανάμεσα στις βάσεις T-C με πιθανότητα 32,61%, ενώ οι υποκαταστάσεις με την μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης ήταν ανάμεσα στις βάσεις G-T και G-C με τιμή 10,9%. (Tamura et al. 2004)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Compagno L. J. V., 1988. Sharks of the Order Carcharhiniformes. *Princeton Univ. Press*. Princeton, New Jersey.
- Corrigan S., & Beheregaray L. B. 2009. A recent shark radiation: Molecular phylogeny, biogeography and speciation of wobbegong sharks (family: Orectolobidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52: 205-216.
- Dosay-Akbulut M., 2004. Specification of Phylogenetic Interrelations between Skate-Rays and Sharks. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 42(2):128-133.
- 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.
- Iglésias S. P., Lecointre G., Sellosa D. Y. 2005. Extensive paraphyly within sharks of the order Carcharhiniformes inferred from nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 569-583.
- Miller S.A, D.D. Dykes & H.F. Polesky, 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Normark B.B., A.R. McCune & R.G. Harrison, 1991. Phylogenetic Relationships of Neopterygian Fishes, Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 8(6):819-834.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599.
- Tamura K., M. Nei & S. Kumar, 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., D.G. Higgins & T.J. Gibson, 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673-4680.