

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI ECOLOGIA E SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

IN ECOLOGIA E GESTIONE DELLE RISORSE BIOLOGICHE - XX CICLO.

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

“Aspetti genetici ed ecologici della coevoluzione ospite-parassita:
l'esempio dei nematodi anisakidi parassiti di pinnipedi e i loro ospiti definitivi”.
SSD BIO/07

Coordinatore: Dott.ssa Roberta Cimmaruta

Tutor: Dott.ssa Simonetta Mattiucci

Dottorando: Dott.ssa Rossana Contadini

INDICE

Introduzione	3
1. Il ciclo biologico dei nematodi anisakidi appartenenti ai generi <i>Contracaecum</i>/ <i>Phocascaris</i> e <i>Pseudoterranova</i>	6
2. Odierna tassonomia delle specie dei generi <i>Contracaecum</i>, <i>Phocascaris</i> e <i>Pseudoterranova</i>	8
2.1. Odierna tassonomia delle specie del genere <i>Contracaecum</i>	8
2.1.1. Le specie gemelle del complesso <i>Contracaecum osculatum</i> (<i>sensu lato</i>)	9
2.1.2. Le specie gemelle del complesso <i>Contracaecum ogmorhini</i> (<i>sensu lato</i>)	11
2.2. Odierna tassonomia delle specie del genere <i>Phocascaris</i>	13
2.3. Odierna tassonomia delle specie del genere <i>Pseudoterranova</i>	16
2.3.1. Le specie gemelle del complesso <i>Pseudoterranova decipiens</i>	18
3. Dati ecologici sulle specie dei generi <i>Contracaecum</i>/ <i>Phocascaris</i> e <i>Pseudoterranova</i>	21
4. I Pinnipedi	25
4.1. Cenni di biologia e filogenesi	25
4.2. Caratteristiche e areali di distribuzione dei pinnipedi oggetto di studio	32
5. Coevoluzione ospite-parassita	43
5.1. Coevoluzione	43
5.2. Metodi analitici per lo studio co-filogenetico	47
6. Materiali e metodi	49
6.1. Materiale	49
6.2. Metodi	49
6.2.1. Sequenziamento del gene mitocondriale della citocromossidasi II (mtDNA <i>cox-2</i>)	49
6.2.2. Estrazione del DNA	52
6.2.3. Amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)	54
6.2.4. Sequenziamento	55
6.2.5. Analisi delle sequenze	56
6.3. Analisi statistiche e filogenetiche	59
7. Risultati	61
7.1. Analisi delle sequenze ottenute dal gene mtDNA <i>cox-2</i> in specie di <i>Contracaecum</i> / <i>Phocascaris</i>	61
7.2. Analisi delle sequenze del gene della mtDNA <i>cox-2</i> nelle specie di <i>Pseudoterranova</i>	64
7.3. Relazioni genetiche tra le specie dei generi <i>Contracaecum</i> e <i>Phocascaris</i> su base mitocondriale mtDNA (<i>cox-2</i>)	66
7.4. Relazioni genetiche tra le specie del genere <i>Pseudoterranova</i> su base mitocondriale mtDNA (<i>cox-2</i>)	71
7.5. Aspetti coevolutivi ospite-parassita tra le specie dei generi <i>Contracaecum</i> / <i>Phocascaris</i> e <i>Pseudoterranova</i> e i pinnipedi	75
7.5.1. Studi co-filogenetici in <i>Contracaecum</i> e <i>Phocascaris</i> spp. e i loro ospiti definitivi	75
7.5.2. Studio co-filogenetico in <i>Pseudoterranova</i> spp. e i loro ospiti definitivi	79

8. Considerazioni	81
8.1. Aspetti di sistematica molecolare e filogenesi nei nematodi anisakidi del genere <i>Contracaecum</i> / <i>Phocascaris</i>	81
8.2. Aspetti di sistematica molecolare e filogenesi nelle specie di <i>Pseudoterranova</i>	84
8.3. Aspetti coevolutivi ospite-parassita	86
APPENDICE A	88
APPENDICE B	99
Lavori consultati	106
Ringraziamenti	126

Introduzione

Le relazioni parassita-ospite rappresentano uno campo di ricerca molto interessante, che nel corso degli anni ha dato vita a vari studi, basati essenzialmente su metodiche genetico-molecolari (Mattiucci & Nascetti, 2008). Dalle conoscenze acquisite, emerge come le specie parassite siano molto utili come indicatori biologici della stabilità di reti trofiche, della biodiversità di un ecosistema, di inquinamento, di variabili ambientali, di distruzione ed alterazione dell'habitat, di migrazione dei loro ospiti e della biologia delle popolazioni ospiti (MacKenzie, 1990; 2002; Thomas *et al.*, 1996; Marcogliese, 2005; Mattiucci *et al.*, 2007; Mattiucci & Nascetti 2007). Il rapporto ospite-parassita costituisce anche un modello per stabilire e monitorare lo stato di salute di specie soggette a cali demografici, e quindi, anche a fare valutazioni sulla conservazione di specie ospiti. Nelle relazioni ospite-parassita la specie specificità è spesso molto sviluppata, infatti, non solo si verifica frequentemente la presenza di una specie di parassita in una sola specie di ospite, ma c'è anche una corrispondenza tra specifici genotipi di parassita e specifici genotipi di ospite che essi possono parassitare. Nella situazione più estrema si verifica una stretta corrispondenza biunivoca (“a uno a uno”) tra i geni che conferiscono patogenicità a un parassita e i geni che conferiscono resistenza ad un ospite (Bullini *et al.*, 1998).

Un campo di indagine molto affascinante nell'ambito delle relazioni interspecifiche tra due specie interagenti è la coevoluzione, ossia l'insieme di quei processi evolutivi che hanno portato una specie (il parassita) all'adattamento alla vita parassitaria in un'altra specie (l'ospite). Il concetto di co-evoluzione ospite-parassita, può essere inteso sia come influenza e patogenicità espressa dal parassita e meccanismi di difesa dell'ospite, sia come espressione del co-adattamento ospite-parassita, e ancora, come “co-speciazione” ospite-parassita.

Nell'ambito di relazioni ospite-parassita ci sono molti studi che riguardano i nematodi anisakidi dei generi *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Phocascaris*. A tal riguardo, bisogna ricordare che la maggior parte delle scoperte, si deve all'intenso lavoro di ricerca iniziato da tanti anni da parte di Ricercatori del Dipartimento DECOS dell'Università degli Studi di Viterbo (Prof. Nascetti) in collaborazione con Ricercatori dell'Università di Roma “La Sapienza” (Dott.ssa S. Mattiucci), che hanno contribuito notevolmente alla definizione di specie biologiche di questi parassiti e alla conoscenza delle loro relazioni genetiche.

I nematodi anisakidi dei generi *Anisakis*, *Contracaecum*, *Phocascaris* e *Pseudoterranova* sono ascaridi endoparassiti di organismi acquatici. Questi parassiti hanno un ciclo biologico (Figura 1.1) molto complesso che si svolge tra vari organismi marini a vari livelli di un sistema trofico, coinvolgendo crostacei come primi ospiti, pesci e cefalopodi come ospiti intermedi, ed infine mammiferi marini come ospiti definitivi. L'attuale sistematica di questi nematodi è stata resa possibile grazie all'analisi genetica condotta utilizzando diverse metodiche genetico-molecolari (allozimi, sequenziamento di geni mitocondriali e nucleari), che hanno consentito negli ultimi venti anni, di dimostrare l'esistenza di specie biologiche di questo gruppo di parassiti. Negli anni passati, per stabilire lo status tassonomico dei nematodi ascaridoidei, ci si basava essenzialmente su caratteri morfologici, e pertanto si definivano "morfospecie" piuttosto che "specie biologiche". Col trascorrere del tempo, l'approccio morfologico, si è rivelato insufficiente nel riconoscimento di specie biologiche e per stabilire le affinità tra specie o popolazioni. Infatti, a volte il carattere morfologico distintivo è di scarso interesse filogenetico; ciò può essere dovuto a diversi fenomeni come il fatto che l'adattamento alla vita parassitaria può aver portato a fenomeni di divergenza evolutiva, e/o parallelismo morfologico anche in presenza di isolamento riproduttivo, oppure che i processi di formazione delle specie non comportino necessariamente un cambiamento a livello morfologico, soprattutto nei casi in cui i segnali di riconoscimento non sono di natura visiva, ma olfattiva, chimica, ecc., o, ancora, che si possono verificare pressioni selettive, divergenti su alcuni caratteri che determinano un rapido differenziamento, ma che spesso non coinvolgono i meccanismi di isolamento riproduttivo. Per diversi motivi, quindi si è reso necessario affiancare allo studio morfologico anche studi di genetica molecolare. Con l'introduzione dell'approccio molecolare si è scoperta l'esistenza di "specie gemelle", ossia, popolazioni di individui morfologicamente molto simili o uguali fra loro, ma riproduttivamente isolate e perciò anche geneticamente differenti (Mayr 1942).

La genetica molecolare, oltre ad individuare diverse specie di questi ascaridi, ha reso possibile ottenere: 1) dati ecologici riguardanti la diversa distribuzione geografica, preferenze verso l'ospite definitivo, informazioni circa i cicli biologici; 2) dati di variabilità genetica di popolazioni anisakidi, e di correlare i valori di diversità genetica con i livelli di infestazione negli ospiti definitivi ed intermedi; 3) stime della divergenza genetica a livelli intra-e interspecifico; 4) l'identificazione degli stadi

larvali che mancano di caratteri morfologici; 5) utilizzare gli anisakidi come “biological tags” nell’identificazione degli stocks ittici, ecc. (Nascetti *et al.*, 1986; Mattiucci *et al.*, 2000; Valentini *et al.*, 2006; Mattiucci & Nascetti, 2006).

Negli ultimi decenni, l’utilizzo di marcatori genetici ha rivoluzionato anche la filogenesi dei parassiti. Questo lavoro, il cui scopo è stato quello di studiare aspetti genetici ed ecologici della coevoluzione ospite-parassita, si inserisce in questo contesto. Sono stati presi in esame i nematodi anisakidi, parassiti di pinnipedi, appartenenti ai generi *Contracaecum*, *Phocascaris* e *Pseudoterranova* (Nematoda: Anisakidae).

La presente ricerca ha avuto lo scopo di studiare la variazione genetica di specie di nematodi anisakidi appartenenti ai generi *Contracaecum*, *Phocascaris* e *Pseudoterranova*, parassite, allo stadio adulto, di pinnipedi, utilizzando marcatori mitocondriali (sequenze del gene della *cox-2*) al fine di: a) confermare l’esistenza delle specie biologiche di nematodi anisakidi precedentemente individuate mediante allozimi; b) quantificare la divergenza genetica e studiare le relazioni filogenetiche tra queste specie; c) analizzare aspetti ecologici di questi parassiti; d) studiare la congruenza tra la filogenesi delle specie di *Contracaecum*, e *Phocascaris* e quella di *Pseudoterranova* con quella dei pinnipedi, loro ospiti definitivi (*cophylogeny mapping*), al fine di individuare possibili fenomeni co-evolutivi ospite-parassita.

1. Il ciclo biologico dei nematodi anisakidi appartenenti ai generi *Contracaecum*/*Phocascaris* e *Pseudoterranova*

Il ciclo biologico delle specie di nematodi appartenenti ai generi *Contracaecum* e *Pseudoterranova* (famiglia Anisakidae), (Railliet & Henry A., 1912) è molto complesso e non è a tutt'oggi ben conosciuto (Figura 1.1). Esso si compie attraverso quattro stadi larvali, come in generale avviene per tutti i nematodi, secondo il seguente schema:- uovo-larva primo stadio- (I muta)- larva di secondo stadio- (II muta)-larva di terzo stadio -(III muta) -larva di quarto stadio o preadulto -(IV muta)- adulto. (Figura 1.1). Le uova eliminate dagli esemplari adulti vengono emesse con le feci di mammiferi marini, ospiti definitivi e diventano embrionate in mare. La prima muta avviene all'interno dell'uovo dal quale schiude una larva al secondo stadio, ancora inguainata nella cuticola della prima muta. Queste larve sono fornite di un dente larvale. Sono larve molto attive, planctotrofiche, e possono sopravvivere per alcune settimane. Il primo ospite intermedio è rappresentato da crostacei, nel cui intestino si liberano dalla guaina e penetrando nell'emocele, compiono la seconda muta, raggiungendo il terzo stadio larvale. Le larve non sono incapsulate ma libere nell'emocele. Le larve al terzo stadio vengono trasmesse ai teleostei mediante un rapporto preda-predatore. Sembrerebbe che nei pesci le larve non vadano incontro a mute successive. Queste larve si rinvencono generalmente nelle cavità viscerali dei pesci, nei mesenterici, incistate sulla superficie esterna del fegato, intestino, gonadi. Nello stomaco dei loro ospiti definitivi (pinnipedi), avviene lo sviluppo delle forme adulte, sessualmente mature (Figura 1.2).

Figura 1.1. Ciclo biologico schematico di nematodi anisakidi parassiti di pinnipedi

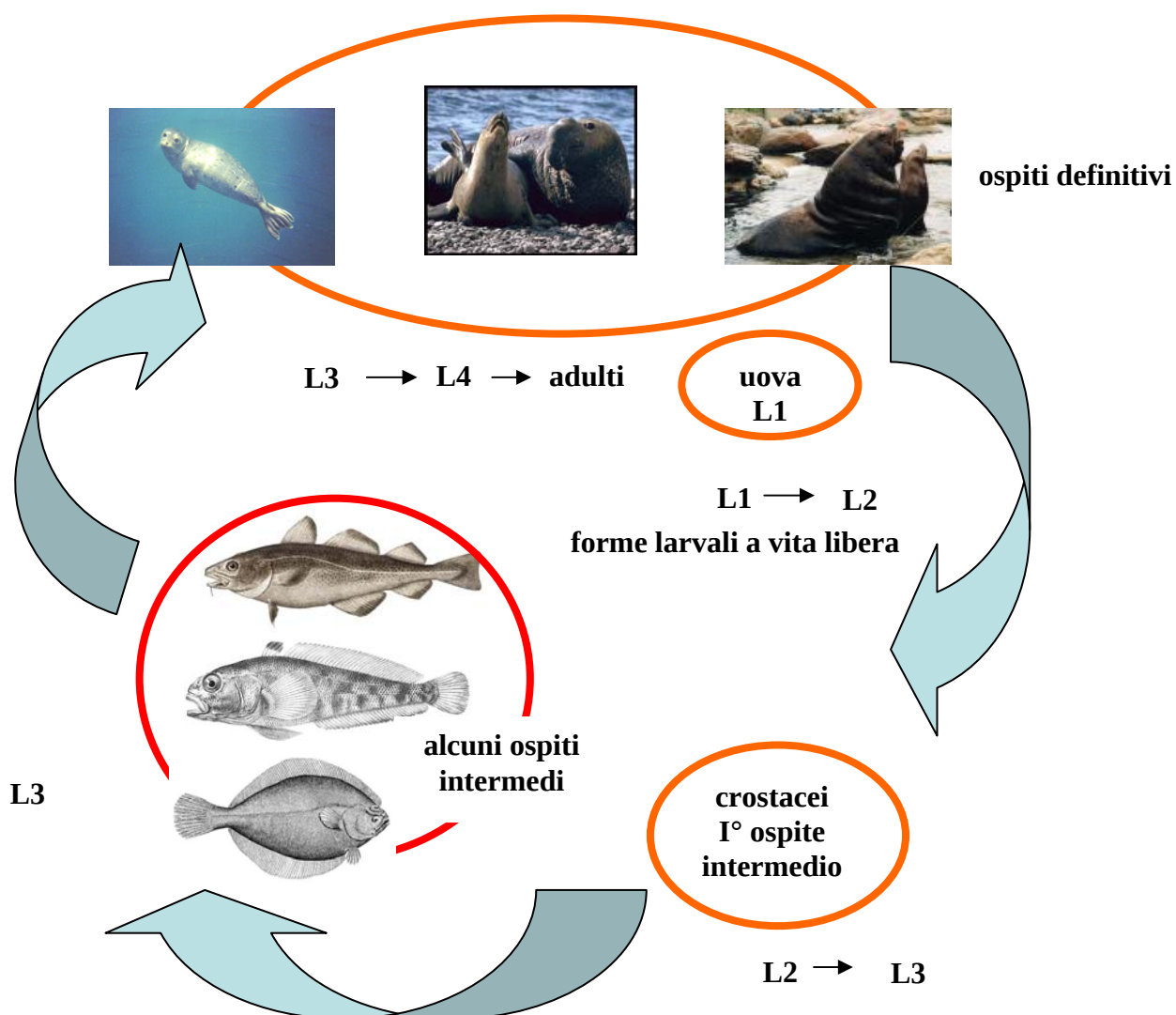


Figura 1.2. Adulti di *Contracaecum* spp. nella foca di Weddell



2. Odierna tassonomia delle specie dei generi *Contracaecum*, *Phocascaris* e *Pseudoterranova*

L'odierna tassonomia delle specie di nematodi appartenenti a questi generi si basa su risultati di sistematica molecolare conseguiti negli ultimi venti anni (Mattiucci & Nascetti, 2008).

2.1. Odierna tassonomia delle specie del genere *Contracaecum*

Il genere *Contracaecum*, Railliet *et* Henry, 1912 secondo Hartwich (1974), insieme a *Phocascaris* e *Galeiceps* appartiene alla sottofamiglia Contracaecinae della famiglia Anisakidae. I parassiti compresi in questo genere hanno cicli biologici a più ospiti, e per ospiti definitivi mammiferi marini (pinnipedi) o uccelli ittiofagi.

Il genere *Contracaecum*, di cui attualmente fanno parte più di cinquanta specie, fu definito per la prima volta da Railliet & Henry (1912), sulla base della morfologia della regione esofagea-intestinale. Mozgovoy (1951), divise il genere in tre sottogeneri ma tale suddivisione non fu mai accettata. Successivamente Berland (1964), descrivendo *P. cystophorae* dalla foca *Cystophora cristata*, suggerì che le specie di *Contracaecum* parassite di foche e quelle in passato descritte come *Phocascaris* dovevano essere tutte riferite allo stesso genere, *Phocascaris*. Questa proposta, basata soltanto sui cicli biologici di questi parassiti e dei loro rispettivi ospiti, non prendendo in considerazione i caratteri morfologici, manteneva nel genere *Contracaecum* soltanto le specie parassite uccelli ittiofagi. Proprio perché non considerava la morfologia, la proposta di Berland non fu accettata da diversi tassonomi tra cui Hartwich (1974), il quale, con la “Key of Ascaridoidea”, per distinguere le specie appartenenti ai generi *Contracaecum* e *Phocascaris* ritornò a considerare le caratteristiche morfologiche. Per Hartwich, i parassiti del genere *Contracaecum* erano caratterizzati dalla presenza di interlabia, contrariamente a quelli del genere *Phocascaris*, in cui queste strutture erano assenti o fortemente ridotte. Comunque, questa nuova classificazione, destava molte incertezze, infatti non si sapeva con sicurezza, se la presenza o l'assenza di queste strutture morfologiche avesse potuto tracciare distinte linee evolutive indipendenti per *Contracaecum* e *Phocascaris*, o se alcune specie di *Contracaecum* parassite di pinnipedi avessero

potuto condividere un più recente antenato comune a *Phocascaris*, piuttosto che ad altre specie di *Contracaecum* parassite di uccelli ittiofagi.

Infatti, anni più tardi, per individuare se il carattere morfologico presenza/ assenza interlabia fosse un carattere valido per differenziare i due gruppi di specie compresi nel genere *Contracaecum*, Orecchia *et al.*, (1986) e Nascetti *et al.*, (1990), intrapresero ricerche genetiche su specie di *Contracaecum* provenienti sia da foche che da uccelli ittiofagi, basandosi su dati allozimici (22 loci enzimatici). Questi studi dimostrarono che le specie del complesso *Contracaecum osculatum*, parassite di foche, a livello genetico erano geneticamente molto più affini alle specie di *Phocascaris* parassite di foche (*P. phocae* e *P. cystophorae*), piuttosto che alle specie dello stesso genere, ma parassiti di uccelli ittiofagi. Infatti le specie di *Contracaecum* provenienti da pinnipedi non dividevano nessun allele con le specie congeneriche provenienti da uccelli, evidenziando così alti livelli di divergenza genetica tra i due gruppi di specie. In aggiunta a ciò, metodi di clusterizzazione basati su marcatori allozimici avevano dimostrato che *P. phocae* e *P. cystophorae* formavano un clade con le specie di *Contracaecum* parassiti di foche. Anche le distanze genetiche indicavano che le specie del genere *Phocascaris* non solo erano più simili a quelle di *Contracaecum* parassite di foche (Nascetti *et al.*, 1993).

Nadler *et al.*, (2000), basandosi su sequenze di rDNA nucleare (LSUrDNA) di 17 taxa dei generi *Contracaecum* e *Phocascaris*, dimostrarono la validità dell'ipotesi evolutiva precedentemente suggerita con l'impiego di marcatori allozimici (Nascetti *et al.*, 1990). Inoltre, questi studi supportarono fortemente le ipotesi per cui le specie di *Phocascaris* clusterizzano con le specie di *Contracaecum* parassite di foche, dimostrando ancora una volta che le specie di *Phocascaris* sono più legate a quelle del complesso *Contracaecum osculatum* piuttosto che alle altre specie di *Contracaecum*. Queste analisi filogenetiche supportavano quindi la teoria di Berland (1964), secondo cui, le specie parassite dei pinnipedi dei generi *Contracaecum* e *Phocascaris*, dovessero appartenere ad un unico genere.

2.1.1. Le specie gemelle del complesso *Contracaecum osculatum* (sensu lato)

I nematodi anisakidi appartenenti alle specie di *Contracaecum osculatum* (Rudolphi, 1802), fino ad alcuni anni fa erano considerati parassiti ad ampia valenza ecologica (Delyamure 1955; Fagerholm 1988, 1989). Studi recenti basati sull'uso di

marcatori allozimici hanno invece dimostrato che la morfospécie *C. osculatum* (*sensu lato*) comprende cinque specie gemelle che hanno differenti preferenze di ospite e distribuzioni geografiche. Tre specie gemelle del complesso (*C. osculatum*, *C. osculatum* A, *C. osculatum* B e *C. osculatum* (s.s.)) sono state scoperte nella regione Boreale-Artica (Nascetti *et al.*, 1993). Mentre altre due, *C. osculatum* D e *C. osculatum* E, sono state scoperte nella regione Antartica (Orecchia *et al.*, 1994).

***C. osculatum* A** (di Nascetti *et al.*, 1993)

Questa specie è stata identificata per la prima volta nei mari di Barents e Norvegia, nell'Atlantico Canadese, nelle acque del Pacifico Islandese e Canadese, e nelle acque del Giappone, tra 40°N e 80°N (Figura 2.3a), inizialmente in due ospiti definitivi, e cioè nella foca barbata, *Erignathus barbatus*, ed occasionalmente nella foca grigia, *Halichoerus grypus*. La foca barbata, *Erignathus barbatus* che popola sia l'Atlantico orientale che quello occidentale, rappresenta il pinnipede in cui è stata trovata principalmente la specie *C. osculatum* A. Qualche anno più tardi la specie *C. osculatum* A venne rinvenuta anche in *Eumetopias jubatus*, del Mar del Giappone. (Mattiucci *et al.*, 1998; Paggi *et al.*, 1998b). Le larve di questa specie sono state identificate nel pesce gadiide *Theragra chalcogramma* del Mar del Giappone. (Mattiucci *et al.*, 1998).

***C. osculatum* B** (di Nascetti *et al.*, 1993)

Questa specie è presente nel Mare di Barents, nei mari di Groenlandia e Norvegia, nelle acque dell'Islanda e del Canada orientale (Figura 2.3a). *C. osculatum* B è l'unica specie ad essere rinvenuta nella foca della Groenlandia, *Phoca groenlandica*, che sembra essere il suo ospite principale, anche se è stato trovato anche nella foca grigia, *Halichoerus grypus*, e nella foca comune, *Phoca vitulina*, ed occasionalmente nella foca barbata, *Erignathus barbatus* ed in *Cystophora cristata*. Mediante l'impiego di marcatori allozimici, è stato dimostrato l'isolamento riproduttivo tra questa specie e gli altri due membri Artici del complesso *C. osculatum*. (Nascetti *et al.*, 1993). Successivamente, *C. osculatum* B, sempre mediante l'impiego di marcatori allozimici, è stato trovato nelle acque del Pacifico settentrionale, come parassita della foca comune, *Phoca vitulina* e dell'otaria, *Zalophus californianus* (Mattiucci *et al.*, 1998).

C. osculatum (Rudolphi, 1802) (*sensu stricto*) **C** (di Nascetti *et al.*, 1993)

Questa specie è stata nominata *C. osculatum* C in Nascetti *et al.*, (1993). La diffusione di questa specie è molto più limitata, infatti è stata trovata nel Mar Baltico, esclusivamente come parassita della foca grigia, *Halichoerus grypus*. *C. osculatum* C non è stato rinvenuto nell'Atlantico occidentale o nelle acque del Pacifico. È l'unica specie del complesso *C. osculatum* ad essere presente nel Mar Baltico (Figura 2.3a).

***C. osculatum* D e *C. osculatum* E** (Orecchia *et al.*, 1994)

Mediante l'impiego di marcatori allozimici è stato dimostrato che i membri Antartici del complesso *C. osculatum*, *C. osculatum* D e E sono isolati riproduttivamente. Queste due specie sono state trovate in sympatria, nei mari di Weddell e di Ross (Antartide) (Figura 2.3b), nello stesso ospite definitivo, la foca di Weddell, *Leptonychotes weddellii*. (Orecchia *et al.*, 1994). Gli stadi larvali delle due specie *C. osculatum* sp. D ed sp. E, sono state identificate, sempre mediante allozimi, in molte specie di pesci appartenenti alle famiglie: Channichthyidae, Bathydraconidae e Nototheniidae (Mattiucci e Nascetti, 2007, 2008).

2.1.2. Le specie gemelle del complesso *Contracaecum ogmorhini* (*sensu lato*)

Contracaecum ogmorhini (Johnston e Mawson, 1941) (*sensu lato*), è un comune parassita di pinnipedi appartenenti alla famiglia Otariidae. Per la prima volta questa morfospécie fu descritta nella foca leopardo, *Hydrurga leptonyx*, nelle acque australiane. A causa della sua somiglianza morfologica con altre specie del genere *Contracaecum*, *C. ogmorhini* (*sensu lato*) è stata talvolta considerata sinonimo di *C. osculatum*. (Johnston e Mawson, (1945) e Hartwich (1975). Fagerholm e Gibson ridescrissero *C. ogmorhini*, basandosi principalmente sulla differenza nella distribuzione delle papille pre e post cloacali e nella forma dell'estremità distale degli spicoli nei maschi. L'eterogeneità genetica tra popolazioni di *C. ogmorhini* (*sensu lato*) da regioni boreali e australi fu suggerita per la prima volta mediante l'impiego di marcatori allozimici (18 loci enzimatici) che indicavano l'esistenza di due taxa isolati riproduttivamente (specie gemelle) incluse dentro la morfospécie *C. ogmorhini* (*sensu lato*) (Mattiucci *et al.*, 2003). Questi Autori dettero una descrizione formale dei due taxa, nominandoli *C. ogmorhini* (Johnston e Mawson, 1941 (*sensu stricto*) e *C. margolisi* (Mattiucci *et al.*, 2003). *C. ogmorhini* s.s. è stato scoperto come adulto

nell'otaria *Zalophus californianus*, della regione Boreale, mentre *C. margolisi* in *Arctocephalus pusillus pusillus*, *A. pusillus doriferus* e *A. australis* della regione Australe (Figura 2.3(a e b)). La distribuzione allopatrica di queste due specie gemelle sembra essere correlata a quella dei loro principali ospiti definitivi, variando da 20°-55°N nelle acque del Pacifico Boreale, e da 20° - 50°S nelle acque del sud dell'Atlantico e del sud del Pacifico.

C. osculatum baicalensis (Moszgovoi & Ryzhykov, 1950)

C. osculatum baicalensis è un parassita allo stadio adulto della foca del Bajkal, *Phoca sibirica*, endemica del Lago Bajkal (Figura 2.3a). Lo stato specifico di *C. osculatum baicalensis* è stato stabilito geneticamente mediante marcatori allozimici (22 loci enzimatici) rispetto alle specie del complesso *C. osculatum* descritte precedentemente (D'Amelio *et al.*, 1995). È un parassita adulto della foca di Baikal, *Phoca sibirica*, endemica del Lago Bajkal. L'analisi ottenuta con gli allozimi, mostrava che *C. osculatum baicalensis* clusterizza con le specie del complesso *C. osculatum*. Le relazioni genetiche trovate tra *C. osculatum baicalensis* e i membri del complesso *C. osculatum* suggeriscono che la divergenza evoluzionistica di questo taxon probabilmente ebbe luogo seguendo l'isolamento del suo ospite durante il Pliocene-Pleistocene (Deméré *et al.*, 2003). Allo stadio larvale, *C. osculatum baicalensis*, mediante l'utilizzo di marcatori genetici, è stato trovato nelle specie di pesce endemico, *Cottomephorus grewinkii*, *C. inermis*, *Comephorus baicalensis*, *Coregonus lavaretus*, *C. autumnalis migratorius* e *Thymallus arcticus*.

C. radiatum (v. Linstow, 1907) Baylis, 1920

La variazione genetica di *C. radiatum* reperito in *Leptonychotes weddelli* dai mari di Ross e di Weddell (Antartico) (Figura 2.3b) è stata studiata sulla base di 24 loci enzimatici. (Arduino *et al.*, 1995). Grazie allo studio di diversi loci genetici, è stato dimostrato che *C. radiatum* e i cinque membri conosciuti del complesso *C. osculatum* sono isolati riproduttivamente. L'isolamento riproduttivo dai due membri Antartici *C. osculatum* D e *C. osculatum* E, dimostrato in simpatria e sintopia negli stessi ospiti definitivi (la foca di Weddell), è stato provato dalla mancanza di ibridi F1 e individui ricombinanti o introgressi tra i taxa antartici nelle aree simpatriche dei mari di Ross e di Weddell. (Arduino *et al.*, 1995). Le relazioni genetiche tra *C. radiatum* e gli altri taxa congenerici sono stati anche studiati più tardi mediante analisi

delle sequenze LSU rDNA. (Nadler *et al.*, 2000). Le larve di *C. radiatum* analizzate a livello genetico da Arduino *et al.*, (1995) sono state trovate nei cannictidi *Chionodraco hamatus* e *Cryodraco antarcticus*, questo a supporto degli studi di Klöser *et al.*, (1992), secondo cui *C. radiatum* è adattato a una rete trofica pelagica. Lo studio genetico dello stadio adulto delle specie di *Contracaecum radiatum* in Antartico è stato basato su materiale trovato nella foca di Weddell, *Leptonychotes weddellii*. Altri ospiti definitivi in cui sono stati trovati adulti di *C. radiatum* sono: la foca leopardo, *Hydrurga leptonyx* e la foca di Ross, *Ommatophoca rossi* (Baylis, 1937; Dailey, 1975). Ulteriori investigazioni genetiche su questo parassita nei mari Antartici sono necessarie per determinare ogni preferenza d'ospite di questa specie.

***C. mirounga* (Nikolskii, 1974)**

Questa specie è stata geneticamente identificata in *Mirounga leonina* e *Arctocephalus australis* (Mattiucci *et al.*, 2003). L'isolamento riproduttivo dai due membri Antartici del complesso *C. osculatum* (*C. osculatum* D e *C. osculatum* E), nello stesso ospite definitivo (la foca di Weddell), e da *C. ogmorhini* (*s.s.*) nello stesso ospite (*Arctocephalus australis*), è stata dimostrata da ibridi F1 e individui ricombinanti o introgressi. Le relazioni genetiche tra *C. mirounga* e gli altri taxa congenerici sono stati dedotti più tardi dalle sequenze LSU rDNA (Nadler *et al.*, 2000). Sugli ospiti intermedi di queste specie non è attualmente disponibile nessun dato.

2.2. Odierna tassonomia delle specie del genere *Phocascaris*

Questo genere fu definito da Höst (1932) per la specie *phocae*, in quanto i nematodi corrispondenti a questo taxon, secondo l'Autore non presentavano interlabia nella porzione cefalica. Il genere comprende attualmente due specie: *P. phocae* e *P. cystophorae*. *P. cystophorae* fu descritta da Berland nel 1964, rinvenuta come parassita della foca *Cystophora cristata*. Le specie di *Phocascaris* sono distinte da quelle di *Contracaecum* perché sono caratterizzate dalla assenza e/o forte riduzione di interlabia. Come già riportato, la prima caratterizzazione genetica delle specie di *Phocascaris* venne condotta da Nascetti *et al.* (1990).

Figura 2.3a. Aree di distribuzione di specie dei generi *Contracaecum* e *Phocascaris*.
(adattato da Mattiucci & Nascetti, 2008)

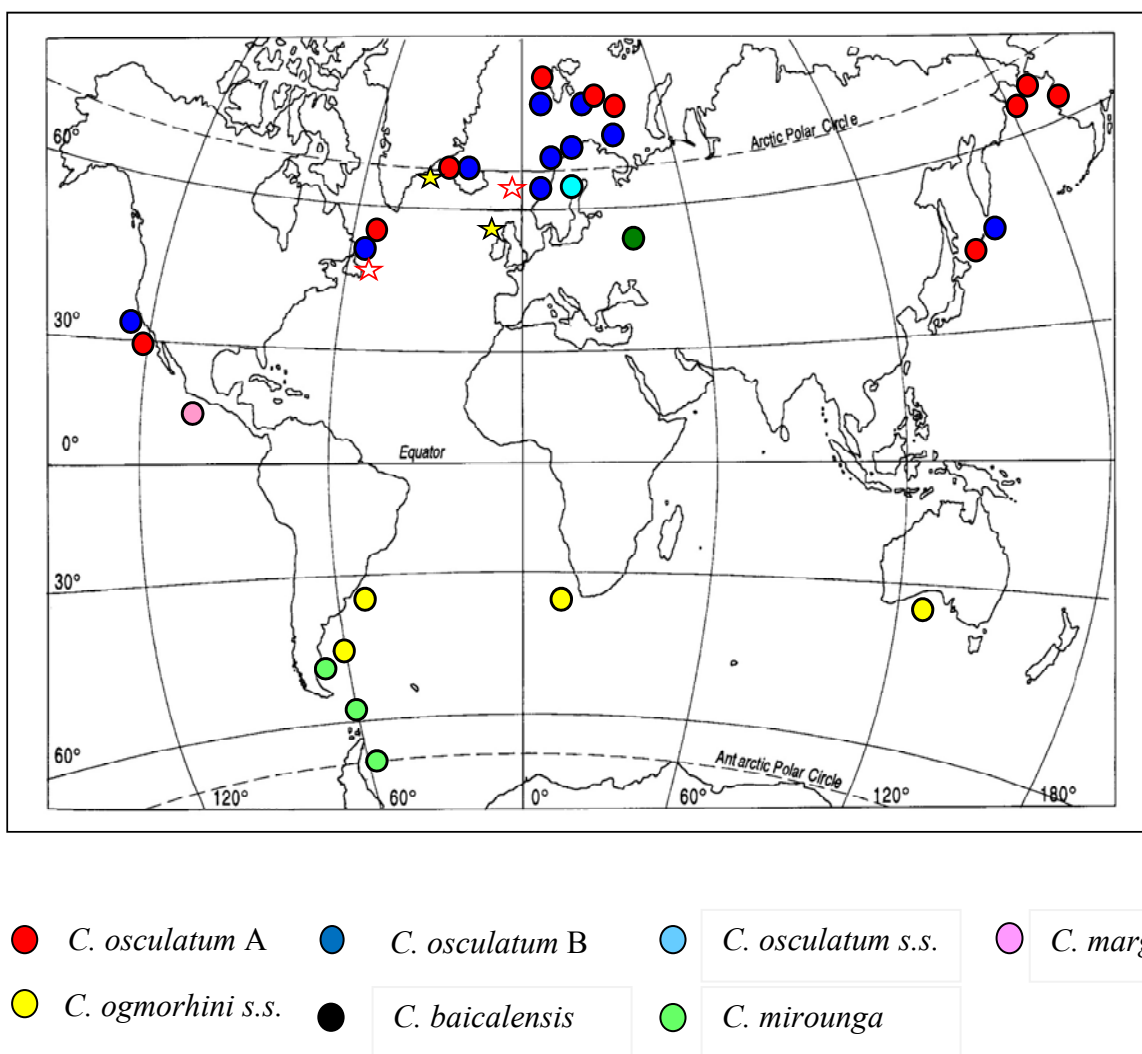
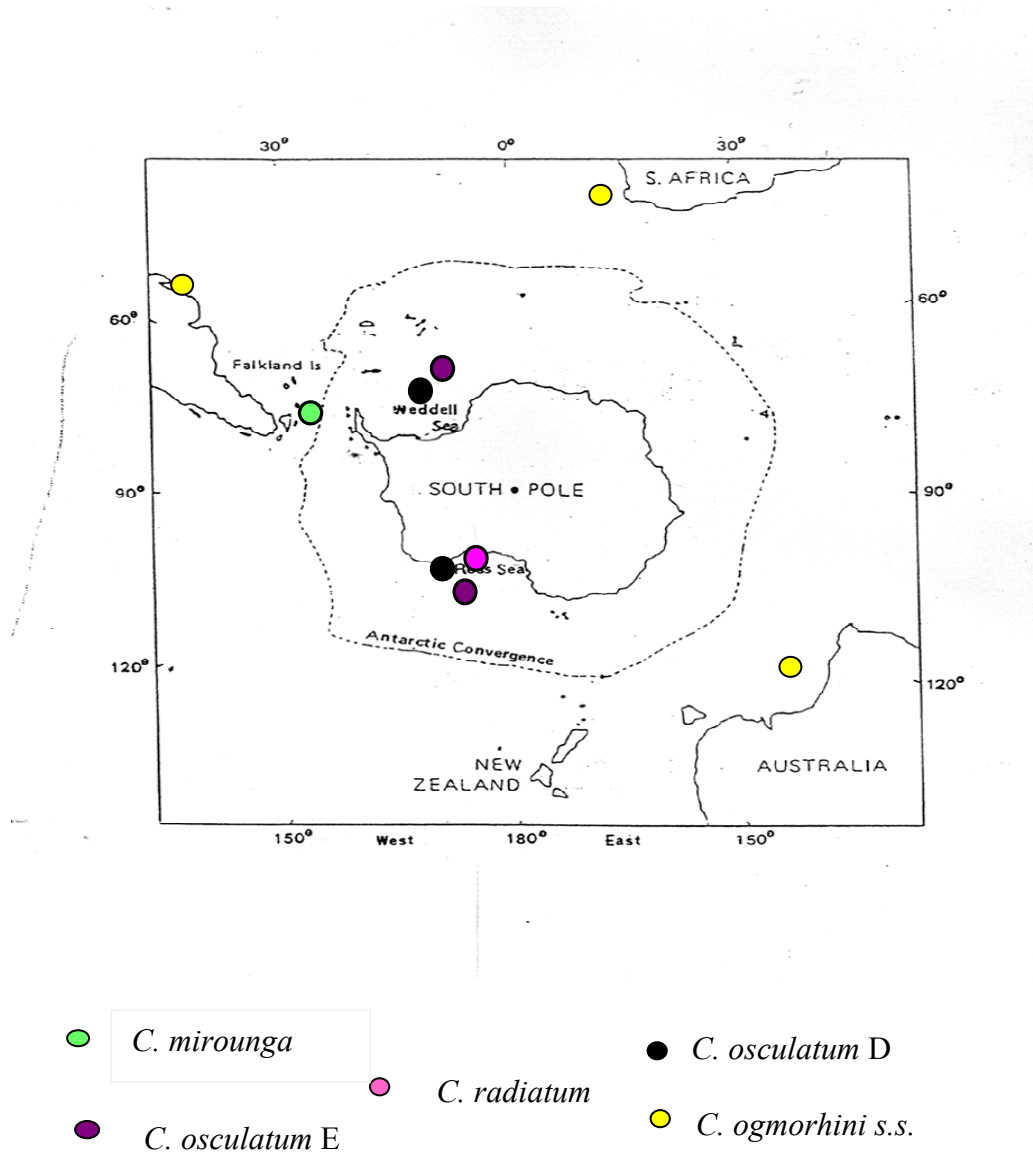


Figura 2.3b. Aree di distribuzione di specie anisakidi di *Contracaecum* in Antartide.
(adattato da Mattiucci & Nascetti, 2008)



2.3. Odierna tassonomia delle specie del genere *Pseudoterranova*

Il genere *Pseudoterranova*, insieme ad *Anisakis* appartiene alla sottofamiglia Anisakinae della famiglia Anisakidae (Hartwich, 1974). I parassiti di questo genere hanno cicli biologici acquatici ed ospiti definitivi omeotermi. La morfospécie *Pseudoterranova decipiens* (s.l.) (Krabbe, 1878) fu descritta la prima volta come *Ascaris decipiens* da Krabbe nel 1878. *Ascaris decipiens* più tardi venne legata al genere *Terranova* Leiper e Atkinson, 1914 (parassiti di elasmobranchi) da Baylis (1916), per la presenza di un cieco intestinale. Successivamente, sempre Baylis pose questa specie nel genere *Porracaecum* Railliet e Henry, 1912 (un gruppo di ascaridi adesso principalmente ristretti a parassiti di uccelli terrestri), considerando *Porracaecum* un vecchio sinonimo di *Terranova*. Il genere *Terranova* venne ristabilito da Johnston e Mawson (1945), in cui Karokhin (1946), pose la specie *decipiens* e fu il primo ad utilizzare la combinazione *Terranova decipiens*, la quale fu accettata da Mozgovoi (1951, 1953), Hartwich (1957) e Yamaguti (1961). Comunque, poiché *Terranova* includeva specie che raggiungevano lo stadio adulto in differenti ospiti definitivi (elasmobranchi, rettili, mammiferi marini), Myers (1959) eresse il genere *Phocanema* (con la specie *decipiens* come specie tipo ed unica specie del genere) per quelle specie fino ad allora erano state incluse nel genere *Terranova* e che erano parassite di mammiferi marini, sulla base di caratteristiche morfologiche all'estremità cefalica (struttura delle labia) e all'estremità caudale dei maschi. In accordo con ciò, le specie *decipiens* e *Terranova kogiae* Johnston e Mawson, 1945 (descritte nel fisiteride *Kogia breviceps*) vennero incluse in *Phocanema*. In seguito, Gibson (1983) considerò *Phocanema* come sinonimo di *Pseudoterranova*, che era stato eretto precedentemente da Mozgovoi per i parassiti dei fiseteridi, e la specie *decipiens* fu trasferita in questo genere (combinazione prima usata in Gibson e Colin, 1982). Secondo gli stessi Autori, il gruppo di specie di *Pseudoterranova* dai mammiferi marini incluse *P. kogiae* (Johnston e Mawson, 1945), *P. ceticola* (Deardoff and Overstreet, 1981). Questo è lo “status quo” che era stato largamente accettato. *Pseudoterranova decipiens* (e i suoi sinonimi) era stata repertata in diverse specie di pinnipedi. Questa specie sembrò avere una bassa specificità di ospite, con circa 18 specie di foche che erano state individuate come ospiti definitivi (e.g. Hartwich, 1975; King, 1983; Myers, 1959), e mostrava anche alcune variazioni morfologiche in popolazioni rinvenute in foche barbute, *Erignathus barbatus* nelle

acque del Canada (Baylis, 1916). L'analisi genetica di popolazione, effettuata con marcatori allozimici su campioni di *P. decipiens* (s.l.) prelevati da dieci specie di pesci, e da quattro specie diverse di foche, provenienti da diverse aree dell'Oceano Atlantico settentrionale, dall'Atlantico canadese al mare di Barents, dimostrò l'esistenza di una marcata eterogeneità genetica con considerevole variazione nelle frequenze alleliche tra i campioni (Paggi *et al.*, 1991). In verità, le frequenze genotipiche osservate a vari loci mostrarono significativamente deviazioni da quelle aspettate usando l'equilibrio di Hardy-Weinberg, con una completa assenza di vari eterozigoti nel materiale raccolto da diversi siti e anche tra parassiti raccolti da un ospite individuale. Da questi risultati fu possibile distinguere geneticamente tre taxa, che furono chiamati *P. decipiens* A, *P. decipiens* B e *P. decipiens* C (Paggi *et al.*, 1991). L'analisi morfologiche su esemplari maschi di *P. decipiens* A e *P. decipiens* B, già analizzati su base allozimica, portarono alla scoperta di differenze significative in alcuni caratteri morfologici tra i membri di queste due specie (Paggi *et al.*, 2000). I nomi *Pseudoterranova krabbei* (Paggi *et al.*, 2000) e *P. decipiens* (s.s.) furono proposti rispettivamente per le specie A e B e fu fornita una descrizione formale dei due taxa (Paggi *et al.*, 2000). Il nome *P. bulbosa* (Cobb, 1888) fu proposto per il taxon *P. decipiens* C (vedi Mattiucci *et al.*, 1998), proprio perché si è dimostrato che quest'ultimo taxon corrispondeva morfologicamente ad *Ascaris bulbosa* descritta da Cobb (1888), la quale precedentemente era stata considerata da Myers (1959) un sinonimo di *Phocanema decipiens*. Un altro taxon, precedentemente chiamato *P. decipiens* D (vedi Mattiucci *et al.*, 1998), fu più tardi incluso nel complesso *P. decipiens*. Questa nuova specie aveva molte differenze a livello di allozimi rispetto a *P. decipiens* A, *P. decipiens* B e *P. decipiens* C. *P. decipiens* D era stato trovato in simpatia con *P. bulbosa* nelle stesse aree geografiche (acque Giapponesi) e occasionalmente nello stesso ospite definitivo, la foca barbata *Erignathus barbatus*, dal quale venne dimostrato essere isolato riproduttivamente. (Mattiucci *et al.*, 1998). Questa nuova specie per alcuni caratteri morfologici corrispondeva a *Porrocaecum azarasi* Yamaguti and Arima, 1942, una specie descritta da Yamaguti e Arima (1942), in foca fasciata. Poiché questo taxon fu sinonimizzato da Margolis (1956) con "*Phocanema decipiens*", Mattiucci *et al.*, (1998), proposero per le specie di *P. decipiens* D il nome *Pseudoterranova azarasi* (Yamaguti and Arima, 1942).

Usando marcatori allozimici su stadi larvali e adulti di popolazioni di *P. decipiens* (s.l.) raccolte in quattro specie di pesci e in *Otaria flavescens*, dell'Oceano Pacifico

sud orientale, venne scoperto un nuovo membro del complesso *P. decipiens* (George-Nascimento and Llanos, 1995). Questo taxon fu nominato *P. cattani* George-Nascimento e Urrutia, 2000.

2.3.1. Le specie gemelle del complesso *Pseudoterranova decipiens*

P. decipiens (Krabbe, 1868) (*sensu stricto*) (= *P. decipiens* B)

Questa specie fu inizialmente identificata con il nome di *P. decipiens* B da Paggi *et al.*, (1991); soltanto più tardi venne fornita la sua descrizione formale basata su caratteristiche morfologiche considerate di valore diagnostico rispetto agli altri membri del complesso *P. decipiens* (vedi Paggi *et al.*, 2000). Questo taxon è distribuito principalmente nelle regioni Artiche e Sub-Artiche, includendo l'Atlantico Nord Orientale (Scozia, Norvegia, ecc.), l'Atlantico Canadese (Newfoundland e Golfo di S. Lorenzo) (Bratley and Stanson, 1993; Paggi *et al.*, 1991) e le acque del Pacifico Canadese (Mattiucci *et al.*, 1998; Nadler *et al.*, 2005; Paggi *et al.*, 1998c). Sono state scoperte aree di simpatria tra *P. decipiens* (s.s.) e altre specie del complesso *P. decipiens*; nelle acque dell'Atlantico Nord Orientale in infezioni miste sia con *P. krabbei* che con *P. bulbosa* e nelle acque dell'Atlantico Canadese con *P. bulbosa* (vedi Paggi *et al.*, 1991) (Figura 2.4). *P. decipiens* (s.s.) fu riconosciuto, usando marcatori genetici, come parassita allo stadio adulto della foca comune, *Phoca vitulina*, della foca grigia, *Halichoerus grypus*, nelle acque del nord e ovest Atlantico, e in *Phoca vitulina richardsii* e *Zalophus californianus* nelle acque del Pacifico settentrionale (Paggi *et al.*, 1998c). Le sue forme larvali sono state identificate in alcune specie di pesce gadoide dell'Oceano Atlantico del Nord (Mattiucci *et al.*, 1998; Paggi *et al.*, 1991).

P. krabbei Paggi, Mattiucci *et al.*, 2000.

Questa specie precedentemente era denominata *P. decipiens* A (Paggi *et al.*, 1991). È stata ritrovata soltanto nel Nord Est Atlantico (Scozia, Norvegia, ecc.) (Figura 2.4).

P. krabbei è principalmente un parassita allo stadio adulto della foca grigia, *Halichoerus grypus* e della foca comune, *Phoca vitulina*, spesso si ritrova in infezioni miste nello stesso ospite con *P. decipiens* (s.s.), anche se, nelle acque dell'Atlantico orientale, quando si trova in simpatria con *P. decipiens* (s.s.), *P. krabbei* prevale nella

foca grigia piuttosto che nella foca comune. Questa specie, allo stadio larvale è stata riconosciuta a livello genetico come parassita di *Gadus morhua*, *Melanogrammus aeglefinus* e *Pollachius virens* (vedi Paggi *et al.*, 1991).

P. bulbosa (Cobb, 1888).

Questa specie, che precedentemente corrispondeva a *P. decipiens* C (Paggi *et al.*, 1991) (vedi Mattiucci *et al.*, 1998), è stata trovata nei mari di Barents e Norvegia, nell'Atlantico Canadese e nel Mar del Giappone, tra 40°N e 80°N (Bratney and Stenson, 1993; Mattiucci *et al.*, 1998; Paggi *et al.*, 1991) (Figura 2.4). Il suo principale ospite definitivo, è la foca barbata, *Erignathus barbatus*. *P. bulbosa* è stata identificata in infezioni miste con *P. azarasi* (vedi Mattiucci *et al.*, 1998). I suoi ospiti intermedi sono i pesci piatti *Hippoglossoides platessoides* e *Reinhardtius hippoglossoides* (Paggi *et al.*, 1991).

P. azarasi (Yamaguti and Arima, 1942).

Questa specie precedentemente era riferita a *P. decipiens* D (vedi Mattiucci *et al.*, 1998). Il suo principale ospite definitivo è stato identificato nel leone marino di Steller, *Eumetopias jubatus*. La sua distribuzione geografica appare principalmente limitata alle acque Giapponesi dell'Oceano Pacifico del Nord (Mattiucci *et al.*, 1998) (Figura 1.4).

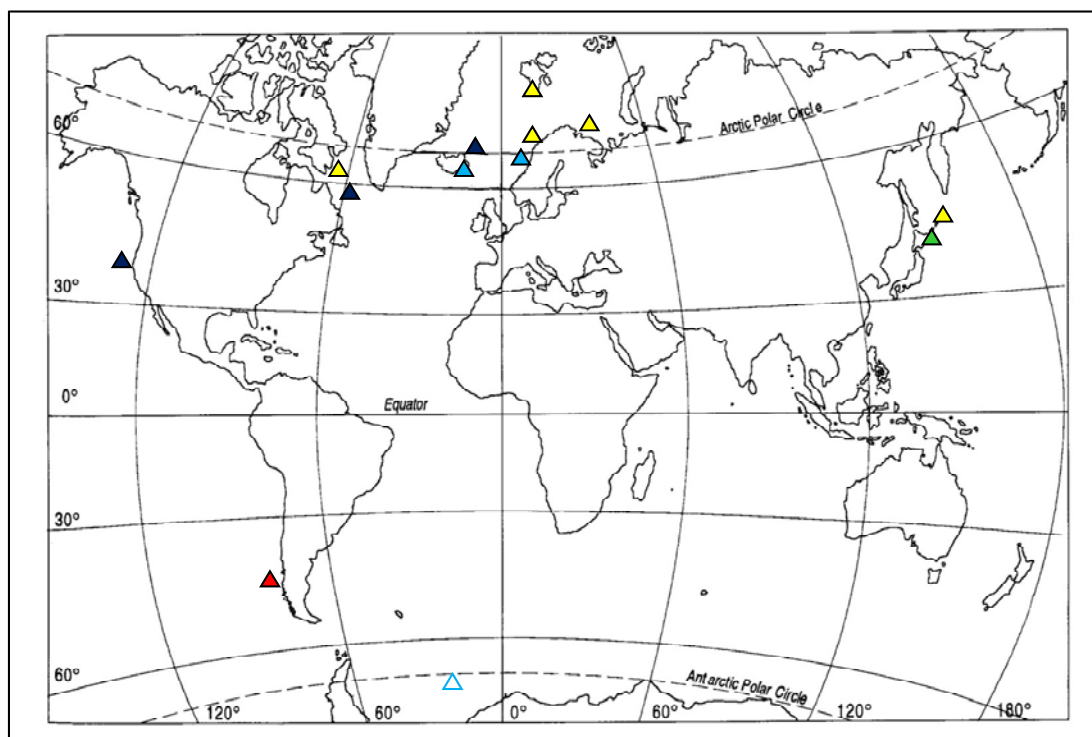
***P. decipiens* E** (di Bullini *et al.*, 1997).

Questo taxon fu scoperto geneticamente nella foca di Weddell (Antartide), *Leptonychotes weddellii* (vedi Bullini *et al.*, 1997) (Figura 2.4).

P. cattani George-Nascimento and Urrutia, 2000.

Questa specie è stata trovata come parassita allo stadio adulto in *Otaria flavesceus* nelle coste Cilene (Figura 2.4). Grazie all'impiego di marcatori molecolari in DNA ribosomiale (ITS- rDNA), si è visto recentemente che questa specie clusterizza con le altre specie gemelle del complesso *P. decipiens* (Zhu *et al.*, 2002).

Figura 2.4. Aree di distribuzione di specie anisakidi di *Pseudoterranova*
(adattato da Mattiucci & Nascetti, 2008)



- | | | |
|---------------------|------------------------------|-------------------------|
| ▲ <i>P. bulbosa</i> | ▲ <i>P. cattani</i> | ▲ <i>P. krabbei</i> |
| ▲ <i>P. azarasi</i> | ▲ <i>P. decipiens</i> (s.s.) | ▲ <i>P. decipiens</i> E |

3. Dati ecologici sulle specie dei generi *Contracaecum*/ *Phocascaris* e *Pseudoterranova*

Le analisi effettuate con marcatori genetici (allozimi) hanno caratterizzato geneticamente diverse specie di nematodi anisakidi, hanno fornito informazioni riguardanti diversi aspetti ecologici di questi parassiti, inclusi cicli biologici, preferenze d'ospite, suddivisione di nicchia e competizione interspecifica.

Ad esempio, sono state individuate marcate differenze nelle preferenze verso ospiti intermedi e definitivi tra tutte le specie appartenenti ai complessi *Pseudoterranova decipiens* e *Contracaecum osculatum* parassite di pinnipedi. Queste specie hanno mostrato diversa distribuzione in varie specie ospiti, con differente ecologia. Tali differenze nei nematodi anisakidi sembrano essere dovuti a diverso co-adattamento ospite-parassita e co-evoluzione, così come alla competizione intraspecifica. Ciò può promuovere un uso differente di risorse da parte di specie diverse di anisakidi in condizioni di simpatria. Alcuni esempi di questi processi ecologici, trovati in nematodi del complesso *Pseudoterranova decipiens* e del complesso *C. osculatum*, vengono descritti di seguito. *P. bulbosa* è l'unica specie presente nella foca barbata, *Erignathus barbatus*, sia nella parte orientale che occidentale dell'Oceano Atlantico, e nel Pacifico, al contrario, nell'Atlantico nord orientale, *P. decipiens* (s.s.) e *P. krabbei*, si trovano in simpatria come adulti e spesso anche in sintopia nello stesso individuo, la foca comune, *Phoca vitulina*, e nella foca grigia, *Halichoerus grypus* (Mattiucci *et al.*, 2008; Paggi *et al.*, 1991). Tuttavia, in questa area geografica *P. decipiens* (s.s.) predomina nella foca comune, rispetto a *P. krabbei*; quest'ultima invece è la specie prevalente nella foca grigia, *Halichoerus grypus*. D'altro canto, nell'Atlantico occidentale, dove *P. krabbei* è assente, *P. decipiens* (s.s.) si trova in uguale proporzione sia nella foca grigia che nella foca comune (Mattiucci & Nascetti, 2008) (Figura 3.1). Tali risultati fanno supporre che questi due parassiti si siano evoluti in allopatria. Dopo il loro contatto secondario, e, conseguentemente, la loro presenza in simpatria nelle foche del nord est Atlantico, la competizione interspecifica tra le due specie di *Pseudoterranova* può aver portato a una suddivisione della nicchia (Mattiucci & Nascetti 2008). Un altro esempio di suddivisione della nicchia è rappresentato dai due membri antartici del complesso *C. osculatum*, *C. osculatum* D e *C. osculatum* E. Le due specie gemelle condividono lo stesso ospite definitivo, la foca di Weddell, *Leptonychotes weddellii*, sia nel mare di Weddell che di Ross in

Antartide. Comunque, in condizioni di simpatia, le due specie utilizzano prevalentemente pesci pelagici o bentonici rispettivamente (Figura 3.2). Differenze nel ciclo biologico sono state evidenziate nelle specie del complesso *P. decipiens*. Nell'emisfero settentrionale, *P. bulbosa* è un parassita allo stadio adulto, nella foca barbata nell'Atlantico settentrionale e nell'Oceano Pacifico, e allo stadio larvale, nei pesci bentonici e nella specie bentipelagica *Gadus morhua microcephalus* (Paggi *et al.*, 1991, 1998c) (Brattey and Davidson, 1996, Bristow and Berland, 1992; Mattiucci *et al.*, 1998). Questo suggerisce che *P. decipiens* (s.l.), nell'emisfero settentrionale ha un ciclo biologico bentonico (Bristow and Berland, 1992). *P. azarasi* invece ha un ciclo biologico bentonico nelle acque del Pacifico. Questa specie è stata trovata come parassita allo stadio adulto in *Eumetopias jubatus* e anche in infezioni miste con *P. bulbosa* nella foca barbata, *Erignathus barbatus* (Mattiucci *et al.*, 1998; Paggi *et al.*, 1998c).

Berland (1964) ipotizzò che *C. osculatum* (s.l.) è parassita, con le specie di *Phocascaris*, nello stomaco delle foche *Pagophilus groenlandicus* e *Cystophora cristata*. Questo risultato fu più tardi confermato da dati allozimici su diversi esemplari identificati di *C. osculatum* B e *Phocascaris* spp.. È stato osservato che *C. osculatum* B è un competitore migliore rispetto a *P. cystophorae* e *P. phocae*, quando si trovano in sintopia nello stesso ospite, la foca *Pagophilus groenlandicus* e nella foca comune, *Phoca vitulina*. In questo caso, *C. osculatum* B occupa lo stomaco, mentre *Phocascaris* spp. occupano l'intestino. Infatti quando *P. cystophorae* e *P. phocae* si trovano nell'ospite definitivo proprio, *Cystophora cristata*, parassitano solo lo stomaco della foca.

Figura 3.1. Preferenza d'ospite dei complessi *Pseudoterranova decipiens* e *Contracaecum osculatum* nell'Oceano Atlantico settentrionale.
(adattato da Mattiucci & Nascetti, 2008)

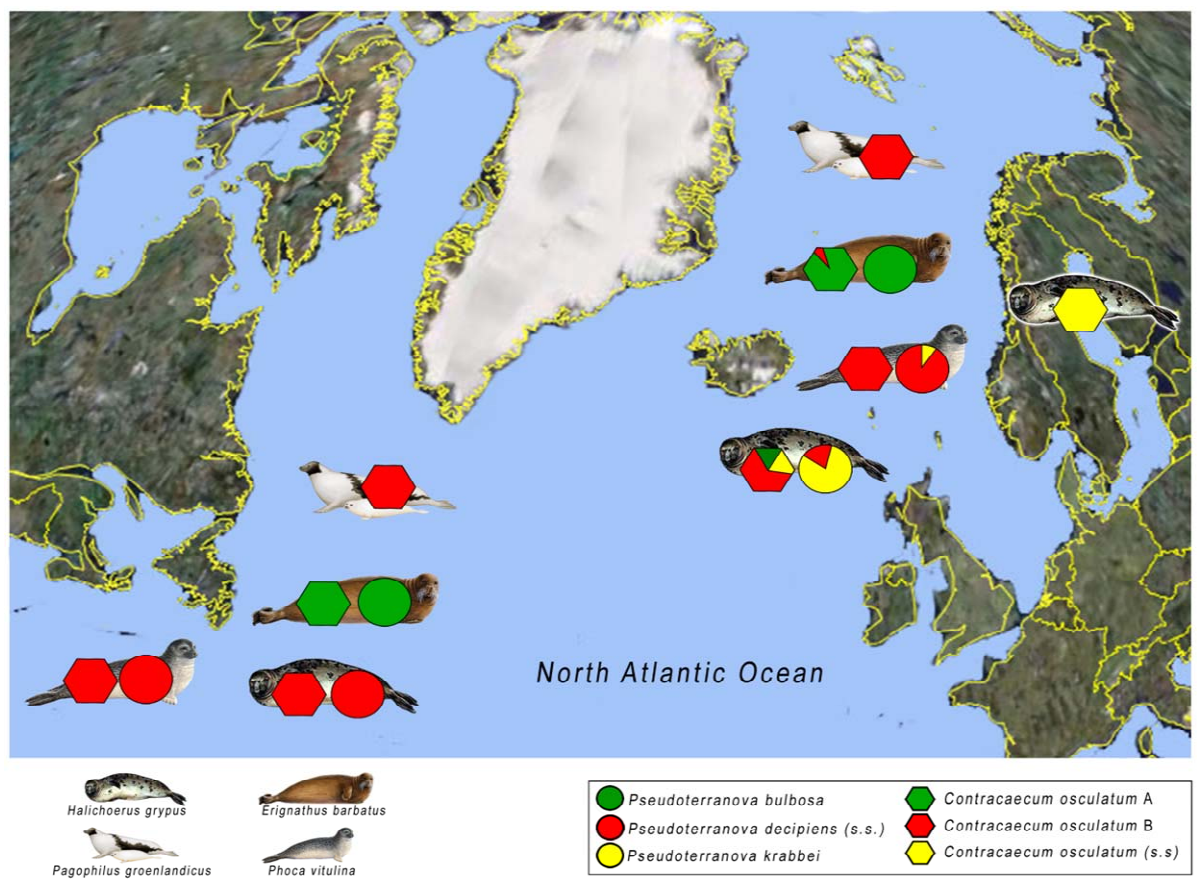
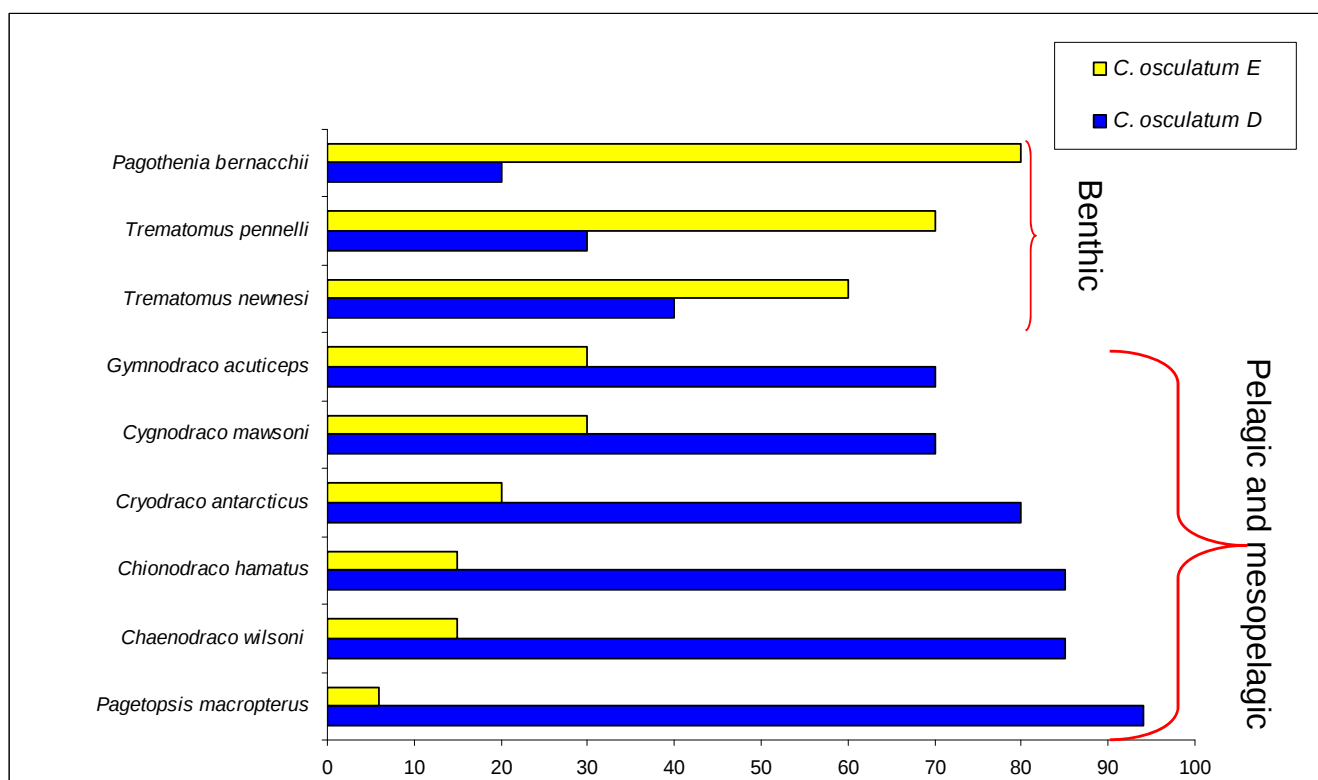


Figura 3.2. Proporzioni relative alla presenza di *C. osculatum* D e *C. osculatum* E in pesci della regione Antartica.
(adattato da Mattiucci & Nascetti, 2008)



4. I Pinnipedi

4.1 Cenni di biologia e filogenesi

Secondo Deméré (Deméré *et. al.*, 2003) i Pinnipedia comprendono 33-36 specie viventi (Rice, 1998) e almeno 51 specie fossili. Sono distribuiti in quasi tutti gli oceani del mondo tranne nell'Oceano Indiano.

Il clade dei Pinnipedia include: gli Otariidi (otarie, leoni marini), gli Odobenidi (trichechi) e i Focidi (foche). Negli anni passati, i tentativi di spiegare le distribuzioni biogeografiche dei pinnipedi si sono basati soprattutto su analisi di eventi storici (es. avvenimenti temporali e geografici nelle testimonianze fossili) o fattori geologici e climatici (es. eventi tettonici, oscillazioni glaciali/interglaciali, correnti oceaniche (percorsi di formazione o migrazione/dispersione e o barriere) senza considerare ipotesi di filogenesi come base per testare quadri di biogeografia. Infatti i più antichi tentativi di spiegare la biogeografia dei pinnipedi risalgono a vari Autori (Sclater, 1897, Von Boetticher, 1934, Davies, 1958a). Successivamente Repenning *et al.*, (1979) suggeriva che gli otaridi si originarono da un arctoide (urside) del Pacifico settentrionale, mentre i focidi da un antenato arctoide (mustelide) nell'Atlantico settentrionale. Questa origine difiletica è ancora sostenuta da alcuni lavori per interpretare modelli passati di distribuzione geografica (e.g., Bonner, 1990; Knox, 1994). Di contro, sono stati fatti molti tentativi per spiegare la distribuzione biogeografica dei pinnipedi basate su ipotesi filogenetiche; questi includono Muizon (1982), Arnason (1995) e Bininda-Emonds e Russel (1996) per i focidi, Kohno *et al.*, (1995a) per gli odobenidi, Berta e Deméré (1986) per gli otaridi. Attualmente, grazie ad analisi morfologiche e dati molecolari è possibile dare una visione più comprensiva della biogeografia storica dei pinnipedi. In questo contesto più moderno si inserisce il lavoro di Deméré (Deméré *et. al.*, 2003) (Figure 4.1 e 4.2). Questo studio si articola principalmente sulla distribuzione geografica e la costruzione di un albero filogenetico basato su dati morfologici e molecolari. Secondo questi Autori, per descrivere la distribuzione dei pinnipedi esistenti è utile considerare nove regioni oceaniche biogeografiche: regione dell'Oceano Artico, regione dell'Oceano Atlantico settentrionale, centrale e meridionale, regione dell'Oceano Pacifico settentrionale, centrale e meridionale, regione dell'Oceano Indiano, e regione dell'Oceano Australe. Queste regioni sono state a sua volta suddivise in 26 province. Questi ricercatori

hanno elencato diversi fattori che hanno influenzato la distribuzione dei pinnipedi, che possono essere raggruppati come segue: (1) fisici, includenti anche l'habitat, temperatura, salinità, modelli di corrente oceanica, e profondità dell'acqua; (2) ecologici, includenti la distribuzione e l'abbondanza delle prede, possibili predatori e competitori. Secondo Deméré *et. al.*, sebbene uno o più fattori possano influenzare una particolare distribuzione, di solito è una combinazione di fattori che ha influenzato i modelli di distribuzione osservati. Cambiamenti nella distribuzione attuale dei pinnipedi sono stati correlati, dal gruppo di Deméré, con fluttuazioni climatiche (periodi di alte temperature della superficie del mare con El Niño), cambiamenti di disponibilità della preda.

I risultati ottenuti da questa ricerca, ed anche supportati dalle più recenti ricerche filogenetiche su base molecolare condotte da Arnason *et. al.* (2006), fanno supporre che i pinnipedi abbiano avuto origine da un progenitore ancestrale comune (*Enaliarctos tedfordi*) originatosi nel Pacifico settentrionale (Figura 4.1). Successivamente sembra che sia avvenuta una separazione in due differenti aree; i focidi si sono evoluti nel Atlantico sud-orientale con una successiva dispersione nell'Atlantico settentrionale (Artico) ed in Antartico, mentre nel Pacifico nord-orientale si sono evoluti gli otaridi. (Figura 4.2). L'ipotesi biogeografica inerente all'origine dei pinnipedi implica che questi si originarono nel Pacifico nord-orientale durante l'Oligocene inferiore, coincidente con la glaciazione in Antartide. Durante il Miocene superiore rimasero in questo posto dove iniziarono a diversificarsi. Gli otaridi apparvero nel Miocene inferiore nel Pacifico settentrionale dove vi rimasero fino al Pliocene inferiore. Una dispersione transequatoriale nel Pacifico sud occidentale allo stesso tempo produsse una rapida diversificazione di questo gruppo che durante il Pleistocene si trovò nell'Oceano australe.

I focidi sono conosciuti come primi fossili del medio Miocene in aree orientali ed occidentali del Atlantico settentrionale. Sia le foche monachine che focine sono linee distinte che hanno avuto origine nel medio Miocene nelle province orientali e occidentali del nord Atlantico. Durante il Miocene inferiore, i focidi andarono incontro ad una drammatica diversificazione. La primissima storia biogeografia delle focine è centrata nell'Artico e nel nord Atlantico. La loro successiva dispersione nel Parateti e nel Pacifico avvenne nel Pleistocene. Le monachine, inclusi i lobodontini (es. *Leptonychotes weddellii*, *Hydrurga leptonyx*, ecc.) hanno avuto invece un centro di diversificazione nell'emisfero Australe.

Questa ipotesi filogenetica è supportata anche da dati più recenti di Arnason (Arnason *et al.*, 2006), conseguiti utilizzando diversi marcatori molecolari (Figura 4.3). Secondo questo Autore, contrariamente ai dati morfologici, i dati filogenetici mostrano i pinnipedi come un gruppo monofiletico, con una separazione basale tra Otariidae e Phocidae. Ulteriormente nell'albero proposto da Arnason (Figura 4.3), il gruppo delle Phocidae si diversifica in Monachinae (comprendenti a loro volta, monachini e lobodontini) e Phocinae (*Pagophilus groenlandicus*) (≈ 22 MYA). Lobodontini e miroungini si sono separati ≈ 16 MYA in aree meridionali delle coste del Pacifico Nord Orientale, con successiva diversificazione dei lobodontini in aree antartiche (Tabella 4.1 e Figura 4.3). I legami dei suddetti cladi risultano ben supportati (Figura 4.3). Secondo Arnason, la filogenesi delle Phocinae suggerisce che l' "ancestor" della *Cystophora cristata* e di altri Phocini (*Pagophilus groenlandicus*) possa essersi separato ≈ 12 MYA. Inoltre l'origine delle foche endemiche della *Phoca caspica* e *P. sibirica* potrebbe essere correlata con le glaciazioni del Pleistocene (Figura 4.3).

Tabella 4.1. Specie di pinnipedi comprese nelle famiglie delle Otariidae e delle Phocidae
(secondo Arnason *et. al.*, 2006)

Otariidae, sea lions, fur seals

Callorhinae

Callorhinus ursinus, northern fur seal

Otariinae/Arctocephalinae

Otaria flavescens, southern sea lion

Eumetopias jubatus, northern sea lion

Zalophus californianus, Californian sea lion

Arctocephalus pusillus, South African fur seal

Phocarctos hookeri, Hooker's sea lion

Neophoca cinerea, Australian sea lion

Arctocephalus townsendi, Guadalupe fur seal

A. forsteri, New Zealand fur seal

A. australis, South American fur seal

Phocidae, true seals

Monachinae, monk seals and southern true seals

Monachini

Monachus monachus, Mediterranean monk seal

M. schauinslandi, Hawaiian monk seal

Miroungini

Mirounga leonina, southern elephant seal

M. angustirostris, northern elephant seal

Lobodontini

Ommatophoca rossi, Ross seal

Lobodon carcinophagus, crabeater seal

Leptonychotes weddelli, Weddell seal

Hydrurga leptonyx, leopard seal

Phocinae, northern true seals

Erignathini

Erignathus barbatus, bearded seal

Cystophorini

Cystophora cristata, hooded seal

Phocini

Histriophocina

Histriophoca fasciata, ribbon seal

Pagophilus groenlandicus, harp seal

Phocina

Phoca largha, largha seal

P. vitulina, harbor seal, Icelandic specimen

P. vitulina, harbor seal, Baltic Sea specimen

P. caspica, Caspian seal

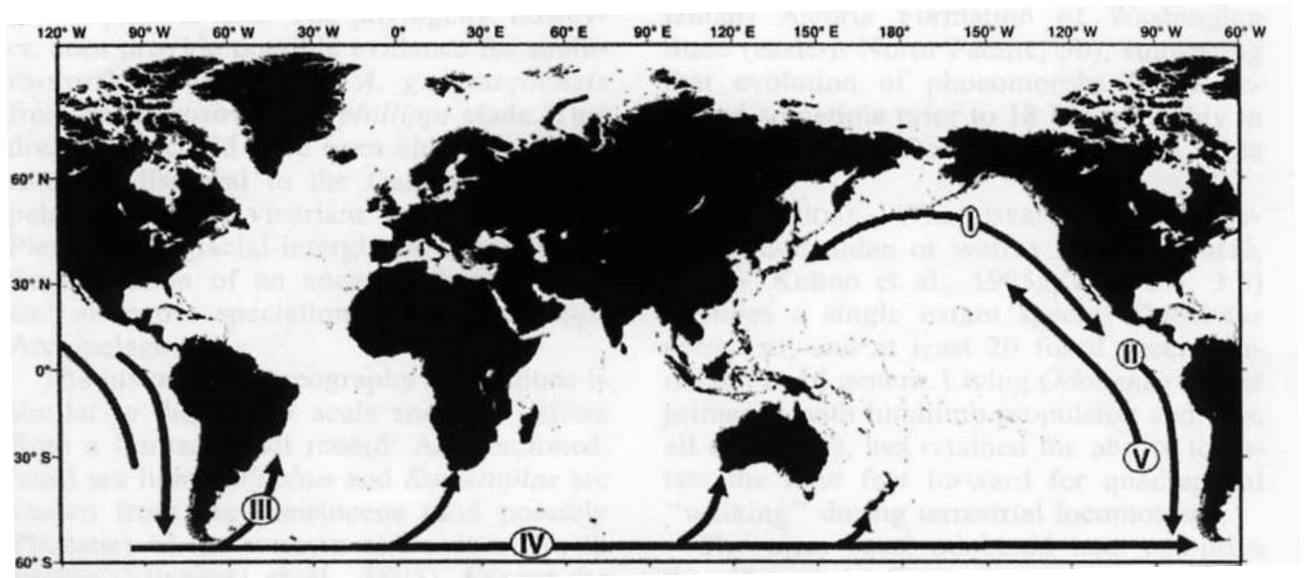
P. sibirica, Baikal seal

P. sibirica, Baikal seal

P. hispida, ringed seal, Baltic Sea specimen

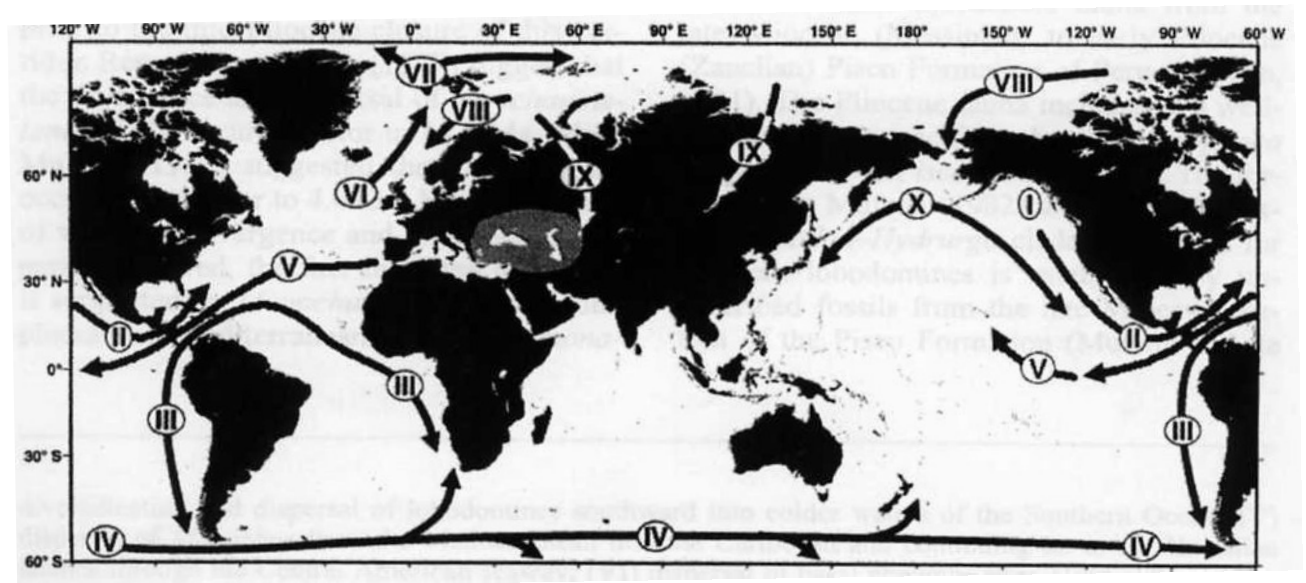
Halichoerus grypus (*Phoca grypa*), grey seal

Figura 4.1. Patterns di diversificazione degli Otaridi
(modificato da Deméré *et al.*, 2003)



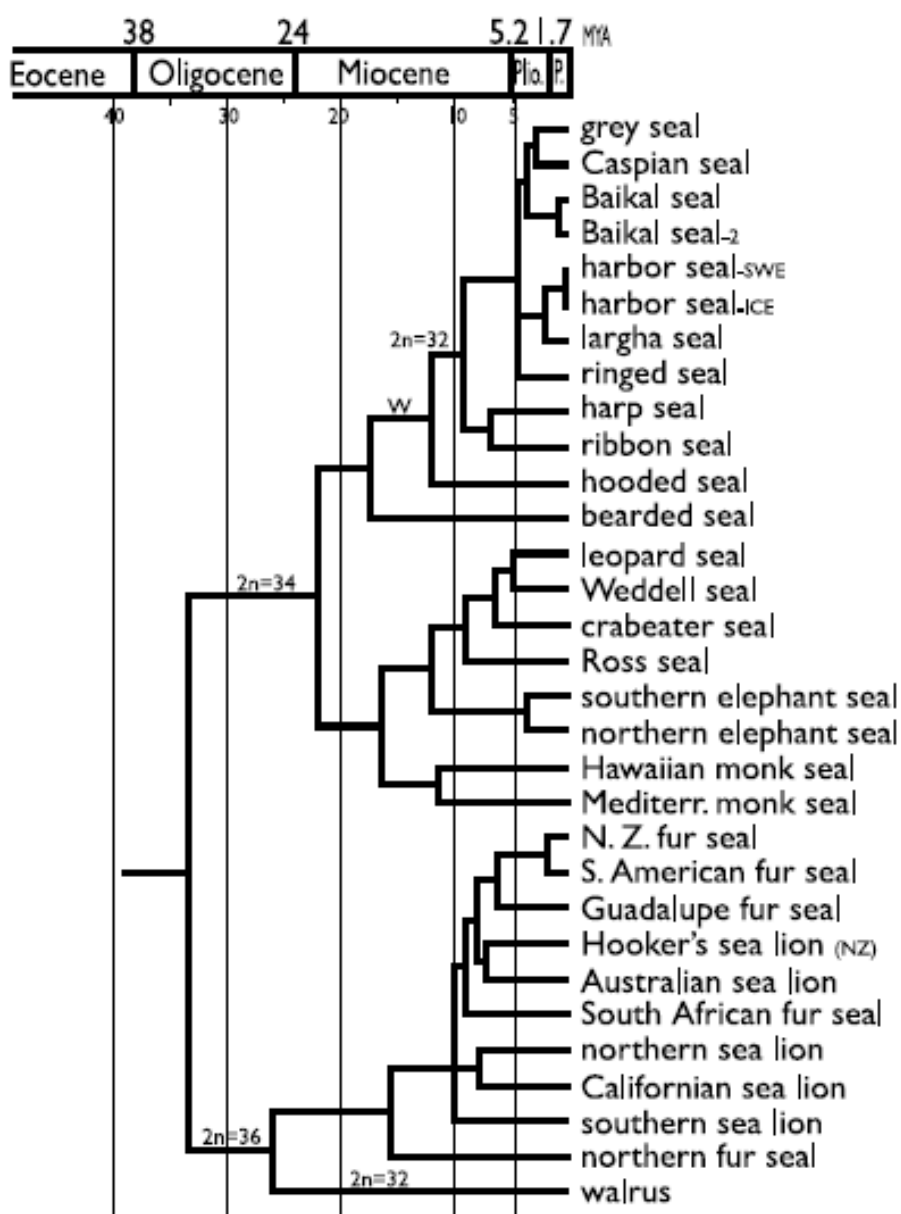
- | | |
|--|--|
| <p>(I) Otaridi nel Pacifico settentrionale;
Divergenza di <i>Arctocephalinae</i> e
<i>Otariinae</i> (11 MYA);</p> <p>(II) Dispersione da nord a sud
del Pacifico (2-3 MAY);</p> <p>(III) Speciazione del clade <i>Arctocephalus</i>;</p> | <p>(IV) Continua diversificazione e
dispersione delle <i>Arctocephalinae</i>;</p> <p>(V) Nuova invasione
nell'emisfero settentrionale nel Pleistocene.</p> |
|--|--|

Figura 4.2. Patterns di diversificazione dei Focidi (modificato da Deméré *et al.*, 2003)



- | | |
|--|---|
| | (IV) Dispersione delle Phocinae nel nord Atlantico; |
| (I) Primi focidi nel nord del Pacifico e diversificazione tra phocidi e desmatofocidi (estinti); | (VII) Diversificazione delle Phocinae; |
| (II) Successiva dispersione dei focidi e diversificazione di Monachinae e Phocinae nell'Atlantico settentrionale; | (VIII) <i>Histiophoca</i> entra nel Pacifico settentrionale
<i>Pagophilus</i> entra nell'Atlantico settentrionale,
<i>Halichoerus</i> si disperde dall'Artico all'Atlantico settentrionale; |
| (III) Dispersione di Monachinae (Miroungini e Lobodontini) nel Pacifico sud Orientale e/o Atlantico meridionale; | (IX) Speciazione di <i>Pusa</i> spp. (<i>Pusa hispida</i> ,
<i>Pusa caspica</i> , <i>Pusa siberica</i>); |
| (V) Diversificazione e dispersione di lobodontini nell'Oceano Meridionale; | (X) Vicarianza e diversificazione di <i>Phoca vitulina</i> e <i>Phoca largha</i> nel Pacifico settentrionale. |
| (VI) Dispersione di Monachine, dal Mediterraneo fino alle Hawaii; | |

Figura 4.3. Filogenesi dei pinnipedi (Phocidae e Otariidae)
(adattato da Arnason *et al.*, 2006)



4.2. Caratteristiche e areali di distribuzione dei pinnipedi oggetto di studio

Di seguito sono riportate delle informazioni riguardanti la biologia, la classificazione tassonomica, la distribuzione geografica delle specie di pinnipedi, ospiti definitivi dei nematodi anisakidi appartenenti alle specie dei generi *Contracaecum*, *Phocascaris* e *Pseudoterranova* studiate in questo lavoro.

- ***Mirounga leonina*** (Linnaeus, 1758)

(Phocidae: Monachinae: Miroungini)

Il mirunga o elefante marino del Sud (*Mirounga leonina*) è un mammifero carnivoro che vive nelle acque dell'Antartide e nelle zone meridionali dell'oceano Pacifico, Indiano e Atlantico, talvolta si spinge a Nord fino alle isole e agli arcipelaghi di Juan Fernández, Tristan de Cunha, Crozet, Kerguelen, Heard,, Macquarie, Chatam e Nassau (Figura 4.4). È il più grande dei pinnipedi conosciuti.

I maschi misurano 500-600 cm, in casi eccezionali anche 650 cm e più e pesano fino a 30 quintali. Il pelo è grigio azzurrino o marrone chiaro, nelle femmine bruno oliva scuro sul dorso, marrone giallo sui fianchi, giallo chiaro sul ventre; nei piccoli, fino ad un anno, scuro sul dorso, grigio-argento sui fianchi e bianco giallognolo sul ventre.



Figura 4.4. areale di distribuzione di *Mirounga leonina*

- ***Pagophilus groenlandicus*** (Erxleben, 1777)

(Phocidae: Phocinae)

La **foca dalla sella** o **foca della Groenlandia** è suddivisa in 3 tipi, popola la cintura del pack e degli iceberg intorno al Polo nord (Figura 4.5). Lunga 180-220 cm, pesa 150-175 kg. Il pelo può variare dal bianco grigio al bianco giallognolo, sul dorso ha una specie di «sella» a mezzaluna marrone scura o nera, presente per lo più nei maschi mentre nelle femmine si disperde in più macchie grigio-nere. Dello stesso colore della sella è la testa ad uovo che così scura spicca sul corpo chiaro.



Figura 4.5. areale di distribuzione di *P. groenlandicus*

- ***Halichoerus grypus*** (Fabricius, 1791)
(Phocidae: Phocinae)

La **foca grigia (*Halichoerus grypus*)** è un mammifero carnivoro che vive sulle coste dell'Atlantico settentrionale dal Mar Glaciale al Labrador, è più frequente a est che a ovest, è presente anche nel Mare del Nord e nel Mar Baltico (Figura 4.6).

Il maschio può misurare 250-300 cm, e pesare 200-250 kg. Il pelo varia dal grigio al grigio scuro, ed è irregolarmente macchiato di nero. È caratterizzata soprattutto dalla testa conica e dal muso allungato. La sua consistenza numerica è molto minacciata. La dieta consiste di una larga varietà di pesci e occasionalmente crostacei e molluschi. Ancora nel XIX la foca grigia era quella più frequente lungo le coste britanniche e scandinave ed era molto frequente anche nell'isola di Rügen. A settembre, a branchi di 300 o 600 individui, questa foca si recava nei luoghi aviti dove partoriva e si spingeva talmente all'interno da non poter essere scorta dal mare. Oggi i branchi invece come quelli sulla costa scozzese per esempio - contano appena 20 o 30 individui. Oggi si calcola che la loro consistenza numerica in tutta Europa non superi i 1000 esemplari.



Figura 4.6. areale di distribuzione di *H. grypus*

- ***Phoca sibirica* o *Pusa sibirica*** (Gmelin, 1788)

(Phocidae: Phocinae)

La ***Pusa sibirica***, detta più comunemente **Foca del Bajkal** o **Nerpa**, è un Focide endemico del grande Lago Bajkal, nella Siberia (da qui i suoi nomi) (Figura 4.7). È uno dei pinnipedi più piccoli al mondo e anche il più longevo dato che può arrivare a vivere addirittura 50 anni, è lunga circa 130/140 centimetri e pesa fino a 70 chili anche se i maschi sono leggermente più grandi. La pelliccia dell'animale ha un colore che varia di tonalità tra il nero e il bianco rimanendo però su un grigio scuro nella parte superiore e su un grigio chiaro in quella inferiore; il colore può comunque essere diversamente distribuito sul corpo da esemplare a esemplare. La Foca del Bajkal vive soltanto nelle acque del lago dal quale prende il nome, è infatti un mistero come, originalmente, abbia fatto a raggiungere il lago che è nel pieno del continente asiatico quando il mare più vicino artico, ove vivono i suoi più stretti parenti, dista centinaia di chilometri. Un'ipotesi è che in passato esistesse una qualche via di comunicazione tra il lago e l'Artico; altri invece ipotizzano che questa foca faccia parte della fauna del Terziario. La caccia di frodo soprattutto per la carne e la pelliccia e il costante inquinamento dell'ambiente rappresentano pericoli allarmanti per l'animale, tanto che se nel 1994 vi erano circa 104 mila esemplari, (nel 2000, erano già scesi a circa 55/65 mila). La Foca del Bajkal trascorre gran parte del suo tempo immersa in acqua e vi rimane immersa fino a 70 minuti grazie alla grande quantità di ossigeno presente nel lago e anche alla grande quantità di sangue che possiede. In inverno quando la superficie del lago gela, riesce a rompere il ghiaccio superficiale per avere vie di fuga in caso dell'arrivo di pericoli oppure, più comunemente, per respirare.

La Nerpa si nutre di pesci e invertebrati presenti nel lago. La sua dieta è composta principalmente da pesci dei generi *Comephorus* (golomyanka, endemismo del Lago) e *Cottocomephorus*; la maggior parte dei pesci dei quali si nutre non sono economicamente importanti per l'uomo.



Figura 4.7. areale di distribuzione di *Phoca sibirica*

- ***Erignathus barbatus*** (Erxleben, 1777).

(Phocidae: Phocinae)

La foca barbata (*Erignathus barbatus*) è una foca che abita nelle regioni dell'Oceano Artico. Popola il Canada ed è presente in tutto il Nord Europa (Figura 4.8).

La sua popolazione si aggira intorno ai 500000 individui.



Figura 4.8. areale di distribuzione di *Erignathus barbatus*

- ***Leptonychotes weddellii*** (Lesson, 1826)

(Phocidae: Monachinae: Lobodontini)

La **foca di Weddell** (*Leptonychotes weddellii*) è un mammifero carnivoro molto diffuso nella regione circumpolare dell'emisfero australe, lungo le coste dell'Antartide (e non solo nel mare di Weddell come si potrebbe supporre) e di diverse isole antartiche (Figura 4.9). La popolazione stimata è di 800.000 esemplari intorno alle coste antartiche, colonie minori sono presenti nella Georgia del Sud, sulle isole

Sandwich meridionali, sulle isole Shetland meridionali e sulle Isole Orcadi Meridionali. La foca di Weddell ha il pelo di colore grigio acciaio con macchie biancastre o giallognole diffuse su tutto il corpo. Nella stagione estiva i colori tendono a schiarirsi mentre in inverno si scuriscono. Gli individui giovani non presentano macchie. I maschi adulti misurano tra i 250 e i 290 cm di lunghezza, le femmine raggiungono i 330 cm. Il peso è compreso fra i 400 e i 600 kg. Le foche di Weddell sono cacciatori notturni, gran parte dei loro comportamenti (compresa l'attività riproduttiva e l'alimentazione) hanno luogo in acqua. Raggiungono una velocità compresa fra i 9 e i 13 kmh e profondità di circa 600 m, possono rimanere in immersione per oltre un'ora.

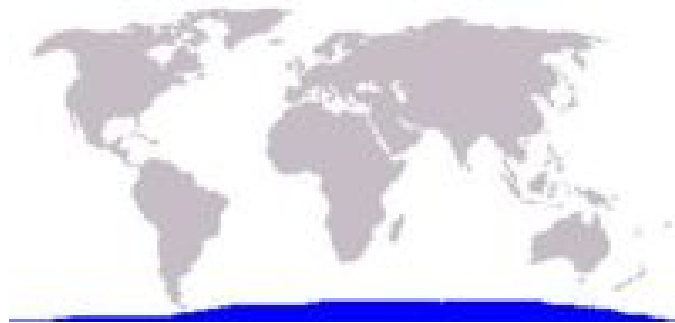


Figura 4.9. areale di distribuzione di *Leptonychotes weddellii*

- ***Cystophora cristata*** (Erxleben, 1777)
(Phocidae: Phocinae)

La **cistofora crestatà, foca dalla cresta** o **foca dal berretto** (*Cystophora cristata*) è un mammifero carnivoro che vive nei mari artici e nell'Atlantico settentrionale, dall'isola di Terranova, dalla Groenlandia e dall'Islanda al Mare di Jan Mayen fino all'Isola degli Orsi e le Spitzbergen. In primavera talvolta fa la sua comparsa lungo le coste dell'Europa settentrionale, ma solo raramente si spinge più a sud delle isole Lofoti. (Figura 4.10). I maschi misurano 330-350 cm, pesano 400-450 kg. Le femmine sono più piccole e pesano meno. Il pelo è grigio cenere, «annuvolato» o macchiato di nero opaco: le macchie scure sono molto diverse per forma e grandezza, grandi come nocciole sulla nuca, sul collo e sul ventre, come una mano sul petto e sul dorso. Negli individui giovani il pelo è grigio-azzurro o verdeoliva-azzurro sul dorso, grigio bianco giallognolo sui fianchi e sul ventre. Neri il muso e il naso.

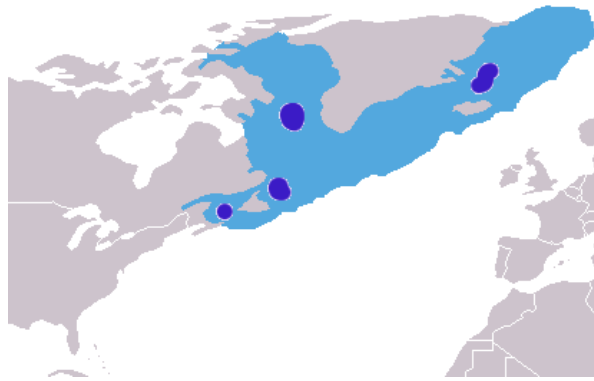


Figura 4.10. areale di distribuzione di *Cystophora cristata*

- ***Zalophus californianus*** (Lesson, 1828)
(Otariidae - Sott. Otariinae)

Lo *Zalophus californianus* è un'otaria che vive nelle coste dell'Oceano Pacifico settentrionale, nell'Oregon, Washington, in Colombia, Messico e isole Galapagos, ma principalmente in California (Figura 4.11). Questa specie era diffusa anche in Giappone, ma ora sembra che in questo luogo sia estinta.

È il pinnipede più comune che può adattarsi ad ambienti creati dall'uomo (viene comunemente impiegato in circhi, zoo, parchi marini, in operazioni militari, ecc.).

È una specie molto numerosa, la cui popolazione continua ad espandersi ad un tasso annuo di circa il 5.0%. I maschi pesano all'incirca 390 Kg e sono lunghi 2.4 metri, mentre le femmine, pesano 110 Kg e lunghe 2 metri. Il cibo preferito dallo *Zalophus californianus* è costituito da salmoni, naselli, ecc.

Ci sono tre sottospecie:

- *Zalophus californianus californianus*: si trova principalmente lungo le coste del Pacifico nel nord dell'America
- *Zalophus californianus wolfebaeki*: è diffuso nelle Galapagos.
- *Zalophus californianus japonicus*: adesso si ritiene estinto.



Figura 4.11. areale di distribuzione di *Zalophus californianus*

- ***Eumetopias jubatus*** (Schreber, 1776)

(Leone marino di Steller)

(Otariidae: Otariinae)

Il **leone marino di Steller** è un'otariidae che vive nelle acque costiere dell'Oceano Pacifico settentrionale, dalla Columbia britannica all'Alasca e al Giappone settentrionale. (Figura 4.12). È stato descritto per la prima volta dal naturalista tedesco Georg Wilhelm Steller da cui prende il nome.

Il maschio può arrivare a 4 m di lunghezza, con una circonferenza minima di 3 m, può pesare 700 Kg e oltre. Le femmine, come in tutti gli otaridi auricolati, sono decisamente più piccole e leggere. Il pelo nel maschio è molto variabile, per lo più nero o marrone rossiccio, ma anche grigio scuro o grigio chiaro, spesso screziato di bianco; nelle femmine è prevalentemente marrone chiaro, negli individui giovani dapprima color ardesia o grigio-nero, successivamente color noce, sempre duro e lucido e inferiormente privo di peluria. Le pinne sono rivestite di una ruvida e robusta pelle, le orecchie cilindriche sono finemente ricoperte di pelo.



Figura 4.12. areale di distribuzione di *Eumetopias jubatus*

- ***Otaria flavescens*** (Shaw, 1800)
(Leone marino sudamericano)
(Otariidae: Otariinae)

Il leone marino sudamericano o leone marino meridionale (*Otaria flavescens*, in passato *Otaria byronia*) è un'otaria che vive lungo le coste cilene, peruviane, uruguayane, e argentine. (Figura 4.13). Il suo nome scientifico è stato oggetto di notevoli controversie tra i tassonomisti che spingevano per *Otaria flavescens* e i sostenitori di *Otaria byronia*. Alla fine, ha prevalso il nome più antico. L'aspetto del leone marino sudamericano è forse l'archetipo del leone marino. I maschi hanno una testa molto grande ricoperta da una criniera ben sviluppata che rende questa specie la più leonina tra le otarie. Pesano il doppio delle femmine. Sia i maschi che le femmine sono di colore arancio ed hanno il muso rivolto verso l'alto. Le criniere dei maschi sono di colore più chiaro di quelle delle femmine, ma il pelo della testa e del collo, al contrario, è più chiaro in quest'ultime. I piccoli nascono neri o marroni scuri, ma successivamente, dopo la muta, divengono color cioccolato. Le dimensioni e il peso del leone marino sudamericano variano notevolmente. I maschi adulti possono raggiungere i 2,6 m di lunghezza e pesare fino a 300 kg. Le femmine, invece, raggiungono solamente gli 1,8-2 m di lunghezza e pesano circa la metà dei maschi, intorno ai 150 kg. Questi leoni marini presentano il dimorfismo sessuale più accentuato tra tutte e cinque le specie di leone marino. I leoni marini sudamericani si nutrono di una grande varietà di pesci, compresi naselli argentini e acciughe. Si nutrono anche di cefalopodi, come calamari pinnacorta, calamari della Patagonia e polpi. Cacciano generalmente in acque basse a non più di cinque chilometri dalla costa. Spesso si nutrono sul fondo alla ricerca di prede lente, ma sono stati visti cacciare anche in gruppo. Quando catturano una preda, la sbattono violentemente e la

divorano a parte. A loro volta, però, questi leoni marini vengono predati da orche, squali e puma.



Figura 4.13. areale di distribuzione di *Otaria flavescens*

- ***Arctocephalus pusillus*** (Schreber, 1775)
(Otariidae: Arctocephalinae)

Arctocephalus pusillus ha due sottospecie *Arctocephalus pusillus pusillus* e *Arctocephalus pusillus doriferus*

Gli esemplari di questa specie hanno un peso che va da 36 a 360 Kg.

Arctocephalus pusillus pusillus è diffuso nelle coste meridionali e sud occidentali dell'Africa (Figura 4.14).

Arctocephalus pusillus doriferus è diffuso nelle coste meridionali e sud orientali dell'Australia (Figura 4.14).

Le caratteristiche morfologiche di queste specie sono abbastanza simili. Una notevole differenza tra i due è la criniera tra il processo mastoide e il processo giugulare, che è proporzionalmente più larga in *A. pusillus pusillus*.

Le otarie del sud africa sono più abbondanti di quelle dell'Australia.



Figura 4.14. areale di distribuzione di *Arctocephalus pusillus*

- *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783)
(Otariidae: Arctocephalinae)

Arctocephalus australis è un'otaria diffusa sulle coste del Cile e dell'Argentina (Figura 4.15). È ricoperta di pelo grigio scuro.



Figura 4.15. areale di distribuzione di *Arctocephalus australis*

- *Arctocephalus gazella* (Peters, 1875)
(Otariidae: Arctocephalinae)

L'**otaria orsina antartica** (*Arctocephalus gazella*) è una delle sette otarie del genere *Arctocephalus*. Come suggerisce il nome, è diffusa nelle acque antartiche. Circa il 95% dell'intera popolazione si riproduce in Georgia Australe. Viene chiamata così in onore del vascello tedesco *SMS Gazelle* che raccolse il primo esemplare presso le isole Kerguelen. Per questo motivo è nota anche come **otaria orsina delle Kerguelen** (Figura 4.16). Rispetto agli altri membri della famiglia, questa otaria orsina ha il muso corto e largo. I maschi adulti sono di colore marrone scuro. Le femmine e i giovani tendono ad essere grigi, con le regioni inferiori più chiare. La colorazione è molto variabile e alcuni scienziati ritengono che talvolta siano avvenute ibridazioni con otarie orsine subantartiche. I cuccioli, quasi neri alla nascita, sono marroni scuri. Circa un esemplare ogni 1000 è di una variante «biondo» pallido. I maschi sono molto più grandi delle femmine: misurano 2 m di lunghezza e pesano tra i 91 ed i 209 kg. Vivono circa 15 anni, ma le femmine possono raggiungere i 25. Il loro nutrimento usuale è il krill, ed ogni esemplare di queste otarie ne consuma circa una tonnellata ogni anno. A causa delle enormi dimensioni della popolazione di questa specie, il cibo di questi animali costituisce una parte significativa dei banchi di krill della Georgia Australe.



Figura 4.16. areale di distribuzione di *Arctocephalus gazella*

5. Coevoluzione ospite-parassita

5.1. Coevoluzione

Con il termine co-evoluzione si intende l'insieme di quei processi evolutivi che hanno portato una specie (il parassita) all'adattamento alla vita parassitaria all'interno di un'altra specie (l'ospite). Secondo Ridley (1996), la "coevoluzione" è l'evoluzione interdipendente di due specie tra le quali esiste un'interazione ecologica. Lo studio del processo coevolutivo ospite-parassita comprende sia lo studio di fenomeni di coadattamento, di specificità dell'ospite, dell'influenza del genoma dell'ospite su quello del parassita (Toft & Carter, 1990), sia lo studio della co-filogenesi ospite-parassita, cioè lo studio di quanto la storia evolutiva di un parassita sia parallela a quella del suo ospite.

La co-evoluzione è quindi intesa sia come evoluzione dei pools genici delle specie interagenti che può portare al co-adattamento di tratti evolutivi sia dell'ospite che del parassita (resistenza dell'ospite e virulenza del parassita), sia in scala temporale, come cladogenesi dell'ospite e del parassita (cospeciazione). In questi ultimi anni sono stati sviluppati diversi aspetti del concetto di coevoluzione ospite-parassita, quali: l'influenza e la patogenicità espressa dal parassita e i relativi meccanismi di difesa dell'ospite, l'espressione del co-adattamento ospite-parassita e ancora la cospeciazione ospite-parassita.

In generale, si definiscono quattro tipi di eventi di relazioni coevolutive ospite-parassita, i quali possono aver accompagnato la storia evolutiva di parassiti e dei loro ospiti definitivi (Page, 1994; Page & Charleston, 1998): co-speciazione, colonizzazione o "host switching", duplicazione, estinzione. Alcuni autori definiscono più tipi di eventi (e.g. Paterson & Banks, 2001; Johnson *et al.*, 2003), i quali comunque vanno a ricadere all'interno dei quattro tipi descritti sopra.

Lo studio della coevoluzione è un argomento che ha attratto molti scienziati già dalla fine del diciannovesimo secolo (Klassen, 1992), ma lo sviluppo di metodi analitici dedicati allo studio della cofilogenesi, ossia del processo in cui la linea evolutiva dell'ospite risulta parallela a quella del parassita, ha avuto luogo soltanto negli ultimi trenta anni, prima con il lavoro di Dan Brooks (Brooks, 1979, 1981; Brooks & McLennan, 1991, 1993, 2002), poi, dieci anni più tardi, con quello di Hafner e Nadler, (Hafner & Nadler, 1988, 1990; Hafner *et al.*, 1994). Questo tipo di lavoro ha dato i

presupposti per metodi analitici più completi (Page, 1994, 2003, Ronquist, 1995, Legendre *et al.*, 2002). Gli ultimi studi sono quelli di Beveridge & Chilton, 2001; Desdevises *et al.* 2002, Legendre *et al.*, 2002, Mattiucci *et al.*, 2006).

Attualmente, per stabilire il grado di congruenza o meno del parallelismo tra le relazioni evolutive di gruppi di specie parassite e quella di taxa di ospiti correlati, si utilizza uno studio filogenetico ottenuto dall'utilizzo di marcatori nucleari e di opportune metodiche statistiche che prevedono la costruzione di alberi evolutivi.

Ci si basa necessariamente su due tipi di metodi: metodi basati sull'evento e metodi di adattamento globale. I metodi basati sull'evento, per mappare l'albero filogenetico del parassita su quello dell'ospite, fanno un mix di diversi tipi di eventi. Questo può essere fatto in Brooks Parsimony Analysis (BPA), (Brooks and McLennan, 1991) o nell'analisi di Riconciliazione che utilizza il programma TreeMap, Page, 1994; Page and Charleston, 1998).

I metodi sopra elencati sono stati ideati partendo dal presupposto che ad una specie ospite corrisponda una specie parassita. Questi metodi hanno come scopo la ricostruzione della storia dell'associazione ospite-parassita, mischiando i tipi di eventi che potrebbero avvenire e minimizzando il costo totale dello scenario evoluzionistico.

Un metodo di adattamento globale è, invece, quello messo a punto da Legendre *et al.*, nel 2002, è chiamato "ParaFit" e si basa sul fatto di stimare statisticamente se i dati concordano con un modello di cospeciazione degli ospiti e dei parassiti.

Quando avviene una convergenza nel parallelismo co-filogenetico, allora sarà avvenuta una co-speciazione o codivergenza. Se è avvenuta una co-speciazione i due alberi evolutivi dovrebbero essere congruenti (paralleli); infatti le relazioni filogenetiche sono congruenti quando i due alberi sono paralleli, ed incongruenti quando il parallelismo filogenetico non è evidente. È difficile che la topologia degli alberi che mostrano le relazioni filogenetiche tra le specie di parassiti e i loro ospiti sia perfettamente speculare; molto spesso siamo di fronte ad un insieme di fenomeni di "congruenze" e "incongruenze", (Paterson & Gray, 1997) ed è proprio questa la base su cui si basa l'approccio di Page (1990, 1994). Questo Autore usa gli alberi filogenetici come metri di comparazione per calcolare le coerenze, e usa queste coerenze, o congruenze, per valutare le associazioni tra ospite e parassita. Se la congruenza tra i due alberi non è consistente, i cambiamenti sono poco attendibili. Esistono comunque due problemi in questo tipo di approccio:

- 1) Le false "congruenze";

2) Le false “incongruenze”.

Le false congruenze o incongruenze sono comunque messe in luce dalle analisi molecolari condotte sia su ospiti che su parassiti, quindi è un problema di poca rilevanza, per questo motivo gli alberi filogenetici sono da considerarsi un valido mezzo per lo studio co-filogenetico ospite-parassita. È possibile avere una filogenesi congruente se la colonizzazione del parassita coincide con la radiazione dell'ospite (Brooks 1990), ovvero il parassita occupa l'ospite nel medesimo arco di tempo in cui questo sta speciando.

I possibili casi che possono dare “incongruenze” generando un non parallelismo tra linee evolutive dell'ospite e del parassita secondo il modello proposto da Paterson & Gray (1997) sono:

- 1) Un processo che potrebbe portare ad una “incongruenza” si può osservare nel caso in cui il parassita specia all'interno di un ospite e quindi le due nuove linee evolutive di parassita si creano all'interno di quello stesso ospite. Secondo questo modello questo processo prende il nome di “*duplicazione*”.
- 2) Il “*sorting event*”, in cui il parassita cerca di colonizzare l'ospite che ha speciato ma fallisce il suo intento. Possiamo distinguere tre tipi di sorting: nel primo l'estinzione del parassita avviene prima degli eventi di cospeciazione, nel secondo il parassita potrebbe essere assente quando una popolazione ospite sta speciando (evento stocastico), e nel terzo il parassita è numericamente talmente basso che ogni tentativo di colonizzare una popolazione ospite risulta fallace.
- 3) “*Host switching*”, una specie parassita occupa due ospiti filogeneticamente distinti, ma ecologicamente simili.

Uno schema della mappa filogenetica secondo il modello di Page viene riportato in Figura 5.1.

La linea dell'ospite che chiameremo per comodità A ed una linea evolutiva del parassita che chiameremo 1 subiscono entrambe un evento di co-speciazione; le possibili alternative delle due linee secondo il modello di Paterson sono quindi: “*Host switching*”; cioè quando una specie parassita, risulta specifica per due specie di ospiti, filogeneticamente ben distinte, ma ecologicamente simili; esso può essere legato ad eventi di colonizzazione secondaria da parte del parassita; “*Sorting event*”; in questo caso la linea del parassita non può occupare la nuova linea ospite; “*Duplication*”; la nuova linea di ospite è il luogo in cui il parassita specia e quindi si creano due nuove

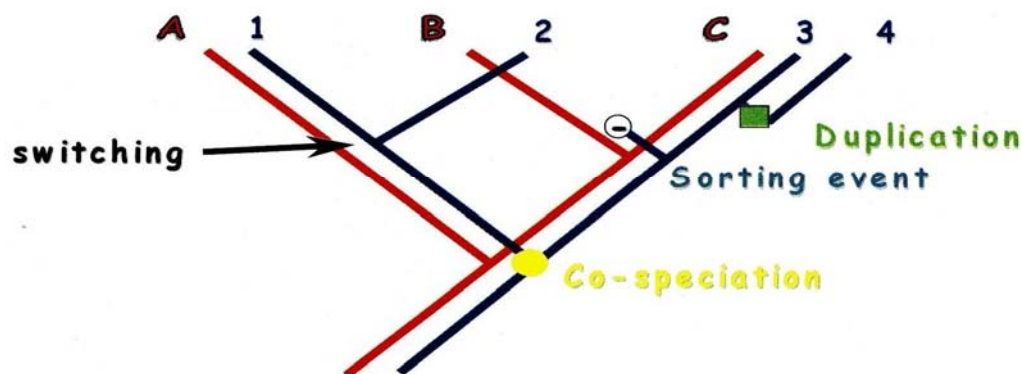
linee di parassita all'interno dello stesso ospite (il parassita subisce un evento di speciazione non seguito dalla linea dell'ospite).

Bisogna ricordare che, quando le associazioni ospite-parassita sono semplici (piccoli numeri di taxa sia di ospiti che di parassiti), il numero e la complessità di soluzioni può essere alta, ma è più facile trovare il metodo adatto. In questo caso si ricorre quasi sempre a metodi statistici basati sull'evento. Quando invece il sistema ospite-parassita diventa moderatamente complicato, la ricostruzione degli scenari diventa lunga e talvolta non quantificabile, e il numero di soluzioni ottimali aumenta enormemente rendendo difficile la scelta di quello giusto. È proprio per quest'ultimo tipo di situazione che fu creato ParaFit (Desdevices *et al.*, 2002; Legendre *et al.*, 2002).

Recentemente, per quanto riguarda la coevoluzione ospite-parassita, sono stati condotti anche studi sui nematodi anisakidi. È stata infatti suggerita l'esistenza di parallelismo tra la filogenesi dei nematodi appartenenti al genere *Anisakis* e quella dei loro ospiti definitivi (cetacei), su base nucleare e mitocondriale (Mattiucci & Nascetti, 2008).

Figura 5.1. Processi di coevoluzione-ospite parassita. Filogenesi di tre ospiti (A-C), mappata secondo l'evoluzione dei loro parassiti. Sono riportati gli eventi che influenzano le congruenze e l'incongruenze secondo il modello di Page.

In nero è rappresentato il parassita, in rosso, l'ospite



5.2. Metodi analitici per lo studio co-filogenetico

Uno studio ideale co-filogenetico si deve articolare su tre differenti livelli:

1. Costruzione di accurati alberi filogenetici per entrambi i gruppi di specie: quelli degli ospiti e quelli dei parassiti.
2. Comparazione della filogenesi usando metodi quantitativi o statistici per la ricerca di eventi di co-speciazione, come per esempio l'analisi di Brooks o "l'analisi sulla riconciliazione" tra gli alberi filogenetici.
3. Valutare la congruenza tra le relazioni filogenetiche tra il gruppo di parassiti e i loro ospiti mediante la statistica degli eventi.

Sono riportati di seguito i principali metodi analitici per lo studio della co-filogenesi ospite-parassita:

- L'analisi attualmente più usata è quella proposta da Page (1994) "**TreeMap**". TreeMap esamina tutti i possibili scenari di "host switching" (accompagnati dagli eventi di "sorting" e di duplicazione) e seleziona i risultati che massimizzano il numero degli eventi di cospeciazione tra gli alberi degli ospiti e dei parassiti. Il massimo numero di eventi di cospeciazione è quindi stimato per la significatività contro una distribuzione degli eventi di cospeciazione derivati da alberi random degli ospiti e dei parassiti.
- Tra i metodi analitici per la comparazione delle linee filogenetiche risulta ancora molto utilizzato il **BPA (Brook's Parsimony Analysis)**. L'algoritmo della BPA usa i parassiti come stati di carattere e usa la filogenesi dei parassiti come alberi di stati di carattere. Le informazioni sui parassiti sono trasformate in un codice binario, analizzato filogeneticamente e mappato sul cladogramma degli ospiti. I caratteri omoplacci, cioè quei caratteri che non si adattano all'albero degli ospiti, possono essere interpretati come essere il risultato sia di host switching che di speciazione all'interno dell'ospite.
- Il metodo messo a punto da Legendre *et al.*, nel 2002, chiamato **ParaFit**, si basa sul fatto di stimare statisticamente se i dati concordano con un modello di cospeciazione degli ospiti e dei parassiti.

ParaFit permette di:

1. Identificare eventi di co-speciazione tra ospiti e i parassiti;
2. Identificare eventi di "host switching" o eventi di "sorting" (estinzione del parassita in una linea di un ospite).

Il modello ParaFit permette di dare una risposta statistica alla domanda: “Il parassita tende ad utilizzare l’ospite che si trova nella posizione corrispondente nell’albero filogenetico?”. Il modello testa anche la significatività di ogni singolo collegamento tra ospite e parassita che contribuisce all’associazione, quindi identificando le specie coinvolte nella speciazione. Attraverso questo processo, è possibile identificare i legami tra ospiti e parassiti incongruenti. Un altro vantaggio di ParaFit risiede nel fatto che, qualora l’albero filogenetico del parassita e dell’ospite non siano disponibili nell’elaborazione, si possono usare direttamente le distanze filogenetiche tra i taxa. Questo è molto utile in quanto le distanze possono essere calcolate direttamente dai dati grezzi (sequenze, ecc.), senza dover ricostruire l’albero. La matrice delle distanze viene trasformata in una matrice rettangolare dall’analisi delle componenti principali, prima di essere introdotta nel programma ParaFit. Quando si hanno, invece, gli alberi filogenetici, essi possono essere espressi come una matrice delle distanze, calcolando le distanze patristiche, e poi trasformati attraverso l’analisi delle coordinate principali.

6. Materiali e metodi

6.1 Materiale

110 esemplari appartenenti a specie diverse dei generi *Contracaecum*, *Phocascaris* e *Pseudoterranova*, precedentemente caratterizzate mediante allozimi, sono stati analizzati per un frammento del gene della citocromossidasi II (*cox-2*) del mtDNA (519 bp). Nelle tabelle 6.1 e 6.2 vengono riportati il numero di esemplari analizzati e lo stadio del ciclo biologico, gli ospiti definitivi in cui sono stati raccolti, e la zona di provenienza.

6.2 Metodi

6.2.1 Sequenziamento del gene mitocondriale della citocromossidasi II (mtDNA *cox-2*)

L'utilizzo di questo marcatore è relativamente recente e risulta molto efficace per l'analisi della struttura e della variabilità genetica di popolazioni animali. Questa tecnica è particolarmente vantaggiosa nello studio degli eventi evolutivi recenti in quanto il mtDNA presenta caratteristiche particolari quali l'alto tasso di mutazione, l'assenza di ricombinazione, l'ereditarietà materna e l'assenza di introni. (Gyllesten *et al.*, 1985). In quasi tutti gli animali multicellulari, il mtDNA è una molecola circolare, solo i Cnidari delle classi Cubozoa, Scifozoa e Hydrozoa hanno un cromosoma mitocondriale lineare (Bridge *et al.*, 1992). I mitocondri giocano un ruolo centrale nel metabolismo (Brand, 1977), nelle malattie (Graeber e Muller, 1998), nell'invecchiamento (Wei, 1998). Sono il sito della fosforilazione ossidativa, essenziali per la produzione di ATP, come pure di una varietà di altre funzioni biochimiche. La molecola di DNA mitocondriale (mtDNA), localizzata negli organelli citoplasmatici deputati alla respirazione cellulare, è una molecola circolare chiusa, lunga circa 16Kb, piccola e semplice rispetto alle dimensioni ed alla complessità della struttura del DNA genomico. Nonostante le sue dimensioni enormemente ridotte rispetto a quelle del DNA nucleare (1/200.000 rispetto al corredo aploide costituito da 3 miliardi di coppie di basi), il DNA mitocondriale costituisce circa lo 0,5% del DNA cellulare a causa del gran numero di copie presenti nel citoplasma.

Il mtDNA risulta più simile al DNA dei batteri che alla cromatina degli eucarioti (non sono presenti proteine istoniche e non si conoscono meccanismi di compattamento); anche i meccanismi di trascrizione e di traduzione sono molto simili a quelli presenti nei procarioti fermo restando però che il genoma di questo organismo risulta molto più complesso rispetto a quello mitocondriale. La molecola di mtDNA può dunque essere facilmente sottoposta a tecniche quali clonaggio e/o amplificazione mediante PCR (polymerase chain reaction). In questo modo è possibile individuare anche le sostituzioni nucleotidiche silenti mediante il sequenziamento di specifici geni o sequenze spaziatrici. Tali sostituzioni, non essendo soggette a selezione, risultano essere degli ottimi marcatori genetici nell'analisi della variazione intraspecifica. Solo alcune delle proteine legate alla respirazione cellulare e gli RNA coinvolti nella sintesi proteica sono effettivamente codificanti nel mtDNA. Inoltre non essendo presenti gli introni, le regioni intrageniche sono di dimensioni ridotte; la regione più vasta non codificante è costituita dalla regione di controllo detta d-loop; oltre a tale regione, si possono riconoscere i geni per il citocromo b (cyt b), tre subunità della citocromo ossidasi (CO I; II; III), sette subunità del complesso NADH-deidrogenasi (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6) e due dell'ATPasi (ATP 6 e 8), due RNA ribosomali (12S e 16S) e 22 tRNA (Figura 6.1). Poiché il processo di duplicazione dei mitocondri (simile alla divisione batterica) è identico sia nella mitosi che nella meiosi, i gameti e le cellule somatiche possiedono mtDNA identico. In natura sono conosciute due metodologie di ereditarietà di tali organelli; quella biparentale, caratteristica dei lieviti e di alcune piante, secondo la quale i mitocondri di un individuo provengono da entrambi i gameti (maschile e femminile), e quella uniparentale, come negli animali superiori e nei vegetali, secondo la quale i mitocondri di un individuo provengono da un solo gamete. Tranne rare eccezioni, i mitocondri presenti negli zigoti dei metazoi, derivano totalmente da cellule uovo e di conseguenza il mtDNA è ereditato per via citoplasmatica materna. In rare occasioni si presentano differenti linee mitocondriali nelle cellule di un individuo (eteroplasmia) che sembrano essere legate a mutazioni avvenute lungo una linea materna, esistono tuttavia delle eccezioni in cui si riscontra un contributo paterno alla popolazione di mitocondri nello zigote, come ad esempio in *Mytilus edulis* (Steward *et al.*, 1995). L'eteroplasmia, essendo rara e di durata limitata, in mancanza di fenomeni di selezione è persa per deriva genetica (Chapman *et al.*, 1982), ed è difficilmente osservabile, ma rappresenta un passaggio obbligato nell'origine della diversità mitocondriale delle popolazioni naturali. L'utilizzo del

DNA mitocondriale nell'analisi della variabilità genetica è determinato dal fatto che esso evolve negli animali ad un tasso 5/10 volte maggiore rispetto al DNA nucleare (Brawn *et al.*, 1979); tale proprietà è dovuta a due fattori: 1) il limitato numero di geni presenti e il ruolo da loro svolto che sembrerebbe essere causa di una minore accuratezza nei meccanismi di replicazione; 2) l'ambiente particolarmente ricco di radicali dell'ossigeno originati dalla catena respiratoria. È quindi evidente che l'elevata frequenza di mutazione, unitamente alla ridotta pressione selettiva contro le mutazioni stesse, determina l'elevata variabilità del mtDNA.

Il mtDNA non è ricombinante, ogni clone rappresenta un singolo allele (aplotipo mitocondriale o mitotico) caratterizzato dalla combinazione di mutazioni, spesso numerose, associate tra loro. Sono state sviluppate numerose tecniche filogenetiche (Farris, 1972; Felstein, 1973; 1981; 1993; Fitch & Farris, 1974; Swofford *et al.* 1981) per inferire i meccanismi di origine ed evoluzione della diversità tra sequenze di DNA. La ricostruzione delle genealogie attraverso il mtDNA è più facile e attendibile rispetto alle ricostruzioni basate su geni nucleari, ovvero gli alberi che si ottengono sono maggiormente rappresentativi dei processi di separazione e isolamento riproduttivo tra individui. Infatti, per i marcatori nucleari, a causa della ricombinazione e dell'assortimento tra geni indipendenti, la genealogia di un gene può differire da quella di un altro ed entrambe da quella degli individui che li portano; la duplicazione e la perdita di geni rende, inoltre, difficile il riconoscimento delle reali omologie (identità per discendenza) dalle parologie (identità per duplicazione) (Page & Holmes, 1998). Inoltre, essendo il mtDNA trasmesso pressoché unicamente dalle femmine, le popolazioni dei geni mitocondriali sono più piccole e, quindi, maggiormente soggette a fenomeni stocastici rispetto ai geni nucleari presentando spesso pattern di distribuzione geografica meno omogenei. L'analisi del mtDNA è stata ulteriormente impiegata nello studio dei fenomeni di colonizzazione e demografia delle popolazioni (Avise & Saunders, 1984; Avise *et al.*, 1987) e in studi filogenetici.

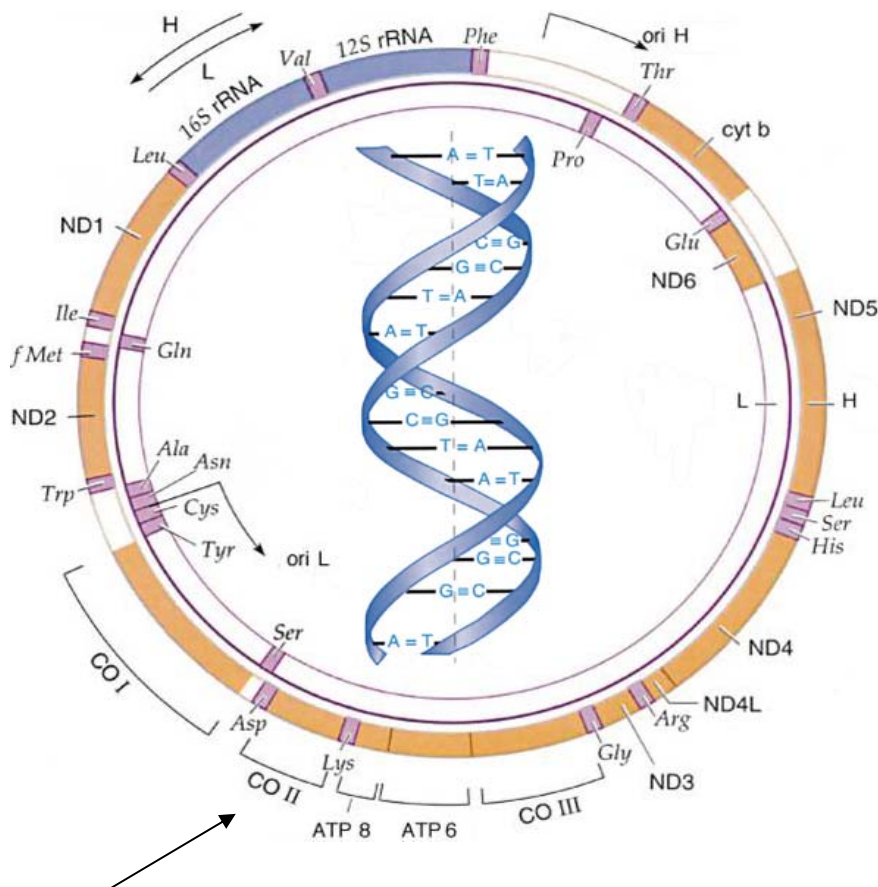


Figura 6.1. Rappresentazione grafica della molecola del mtDNA. In basso, a sinistra, indicata dalla freccia, si vede la posizione del gene della *cox-2*

6.2.2 Estrazione del DNA

Il DNA totale è stato estratto da frammenti degli individui conservati a -80°C . L'estrazione del DNA è stata effettuata secondo il metodo CTAB/fenolo-cloroformio modificato (Murray & Thomson, 1980), e risospeso in $50\mu\text{l}$ di TE (tris 10 mM e EDTA 1 mM , pH 8). Nelle metodiche di indagine non ha interferito l'eventuale presenza di RNA; non è stato, pertanto, necessario sottoporre la soluzione ottenuta a trattamento con RNAasi. Per ogni individuo è stata analizzata una quantità di circa 10 mg di tessuto; il protocollo di estrazione prevede che il tessuto venga omogeneizzato in $500\mu\text{l}$ di tampone di estrazione CTAB [tris-HCl 0.1 M , pH 8; NaCl 1.4 M ; EDTA 0.02 M ; CTAB (bromuro di hexadecyltrimetilammonio) 2% e digeriti con $5\mu\text{l}$ di proteinasi K ($20\mu\text{g/ml}$) a 56°C per 3-4 ore]. Al termine della "digestione", si aggiungono $500\mu\text{l}$ di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (in rapporto 25:24:1); i campioni vengono poi mantenuti in agitazione per $5'$ al fine di emulsionare le due fasi, acquosa e organica, e facilitare l'estrazione delle proteine e dei loro prodotti di

digestione. Centrifugando le provette per 15' a 13000 giri/minuto si provoca la precipitazione delle proteine e la separazione delle due fasi. La fase più pesante contenente i prodotti proteici della digestione si trova nella parte inferiore della provetta rispetto alla fase acquosa che, essendo più leggera, viene a trovarsi nella parte superiore e, di conseguenza, è facilmente prelevabile e viene quindi messa in tubi puliti. Per assicurare una separazione accurata tale passaggio si ripete due volte, prima con fenolo:cloroformio:alcol isoamilico e poi in cloroformio assoluto. Gli acidi nucleici (DNA e RNA) contenuti nella fase acquosa vengono fatti precipitare a -20°C con 1000 μl di etanolo assoluto in presenza di NaCl (20 μl , 5mM). Un'ulteriore centrifugazione (15' a 13000 giri/minuto) permette di far concentrare DNA ed RNA in fondo ai tubi a formare il pellet in modo da poter eliminare l'etanolo. A questo punto, un successivo step è costituito da un lavaggio mediante etanolo al 70% (500 μl) il quale permette di allontanare i sali residui. Si elimina quindi l'etanolo al 70%, il pellet viene asciugato all'aria per almeno 6 ore e successivamente risospeso in 50 μl di TE (tris 10mM e EDTA 1mM, pH 8). La soluzione di DNA così ottenuta viene conservata a -20°C fino al successivo utilizzo.

6.2.3 Amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)

La soluzione ottenuta attraverso il protocollo sopra descritto risulta molto eterogenea contenendo molecole sia di DNA che di RNA, di lunghezza e provenienza diverse (DNA nucleare e mitocondriale, RNA di varia natura), in un numero di copie variabile di alcuni ordini di grandezza (da alcune centinaia nel caso dei geni nucleari a molte migliaia per geni mitocondriali e RNA). Tale soluzione di acidi nucleici viene successivamente sottoposta alla tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction). In questo caso la reazione a catena della DNA polimerasi (PCR, Saiki *et al.*, 1988) ha un ruolo estremamente importante in quanto permette:

- i) l'amplificazione selettiva di porzioni specifiche di Dna mediante l'utilizzo di opportuni oligonucleotidi d'innescio (primers). Sono disponibili in letteratura collezioni di primers complementari al mtDNA (Simon *et al.*, 1994; Palumbi, 1996).
- ii) la produzione di un elevatissimo numero di copie del prodotto desiderato. La disponibilità di un alto numero di copie di un frammento rende possibile sia la sua visualizzazione mediante tecniche non specifiche (come il bromuro di

etidio o il Silver staining), molto più economiche e di più sicura manipolazione rispetto ai metodi basati su onde radioattive specifiche, sia il sequenziamento di tale frammento. La PCR costituisce pertanto una valida alternativa alle tecniche di clonaggio del DNA.

In questo studio è stato amplificato un frammento di mtDNA utilizzando due coppie di primers; in particolare, è stato amplificato un frammento interno del gene della *cox-2* ottenuto dalla combinazione dei due primers (Nadler & Hudspeth, 2000) 211F(5'-TTT TCT AGT TAT ATA GAT TGR TTY AT-3') e 210R (5'-CAC CAA CTC TTA AAA TTA TC-3'); l'amplificazione mediante PCR ha permesso di amplificare un frammento di DNA, compreso tra questi due primers, lungo 519 paia di basi. La reazione di PCR è stata realizzata utilizzando un "thermal cycler" Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) in 50 µl di soluzione (Master Mix) con: 10ng di DNA totale, 2,5 u di Taq polymerase (Promega) con il tampone di reazione fornito dal produttore, 0,2µM di ciascun primer, 10 µl di MgCl₂ 2,5 mM, 1µl di dNTP 0.2mM e 1µl di DMSO (dimetilsolfossido). Il programma di reazione per l'amplificazione del frammento di interesse consta di una fase iniziale di 3 minuti a 94°C (per garantire la completa denaturazione di tutto il DNA a doppio filamento inizialmente presente) seguita da 34 cicli costituiti da 30 secondi a 94°C (fase di denaturazione), 1 minuto a 45°C (annealing), 1 minuto e 30 secondi a 72°C (fase di estensione), e infine, un ciclo di 10 minuti a 72 °C (per permettere il completamento dell'attività di sintesi dei frammenti incompleti eventualmente ancora presenti) (Nadler & Hudspeth, 2000). Il prodotto di reazione è stato controllato sottoponendo 5µl dello stesso a migrazione elettroforetica su gel d'agarosio all'1.8% in TBE (0.045M tris-borato; 0.001M EDTA, pH 8) contenente 0.01% di bromuro di etidio. Quest'ultimo si intercala alle basi di DNA e risulta fluorescente quando è posto su una sorgente di luce ultravioletta di opportuna lunghezza d'onda. I frammenti di DNA appaiono, quindi, come bande luminose sullo sfondo scuro del gel (Figura 6.2); l'intensità luminosa, dipendendo dalla quantità di Bromuro di Etidio legata, è maggiore nei frammenti più lunghi. Le dimensioni del frammento possono essere stabilite in maniera approssimativa facendo migrare nello stesso gel un marcatore di peso, ovvero una miscela di frammenti di DNA di lunghezza nota (Figura 6.2).

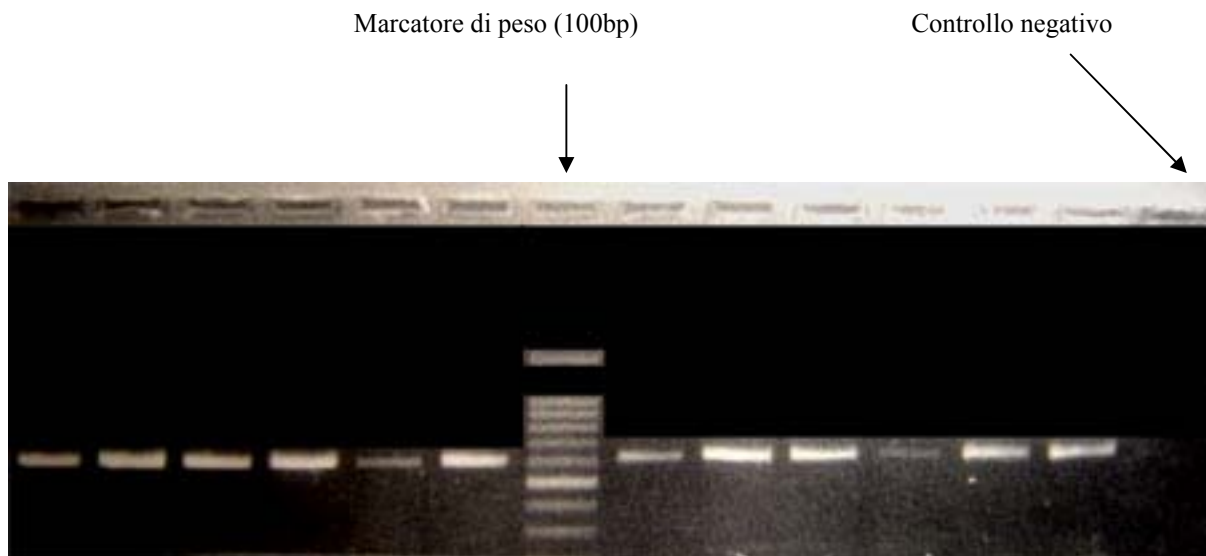


Figura 6.2. PCR della porzione del gene della *cox-2*; al centro del gel è stato posizionato il marcatore di peso (100bp), mentre nell'ultimo pozzetto è stato caricato il controllo negativo.

6.2.4 Sequenziamento

I prodotti di PCR degli individui saggiati sono stati successivamente spediti alla ditta Macrogen Inc. in Korea dove sono stati purificati e quindi sequenziati. In totale sono stati sequenziati 110 esemplari appartenenti a 18 specie diverse. Il principio del sequenziamento automatico è una modificazione del sequenziamento descritto da Sanger *et. al.* (1977), basato sulla terminazione controllata della replicazione enzimatica in vitro del DNA. La reazione risulta essere analoga alla PCR sopra descritta, ma con l'utilizzazione di un solo primer, viene sintetizzato un solo filamento usando l'altro come stampo (templato); di conseguenza non si verifica un aumento esponenziale del prodotto, caratteristico della PCR. Sono stati utilizzati gli stessi primers della reazione di PCR (211F e 210R per le sequenze del gene della *cox-2*). Per ogni campione entrambi i filamenti vengono sequenziati in modo da effettuare un accurato controllo della lettura della sequenza mediante la procedura dell'allineamento e del controllo reciproco da cromatogramma. In caso di ambiguità il campione è stato nuovamente sequenziato.

6.2.5 Analisi delle sequenze

Le sequenze sono state controllate direttamente dal cromatogramma per entrambi i filamenti mediante l'ausilio del programma CHROMAS versione 2.01 (McCarthy-Technelysium Pty. Ltd., 1998-2005) (Figura 6.3) e successivamente sono state allineate con il programma Clustal X versione 1.81 (Thompson *et. al.*, 1994, 1997).

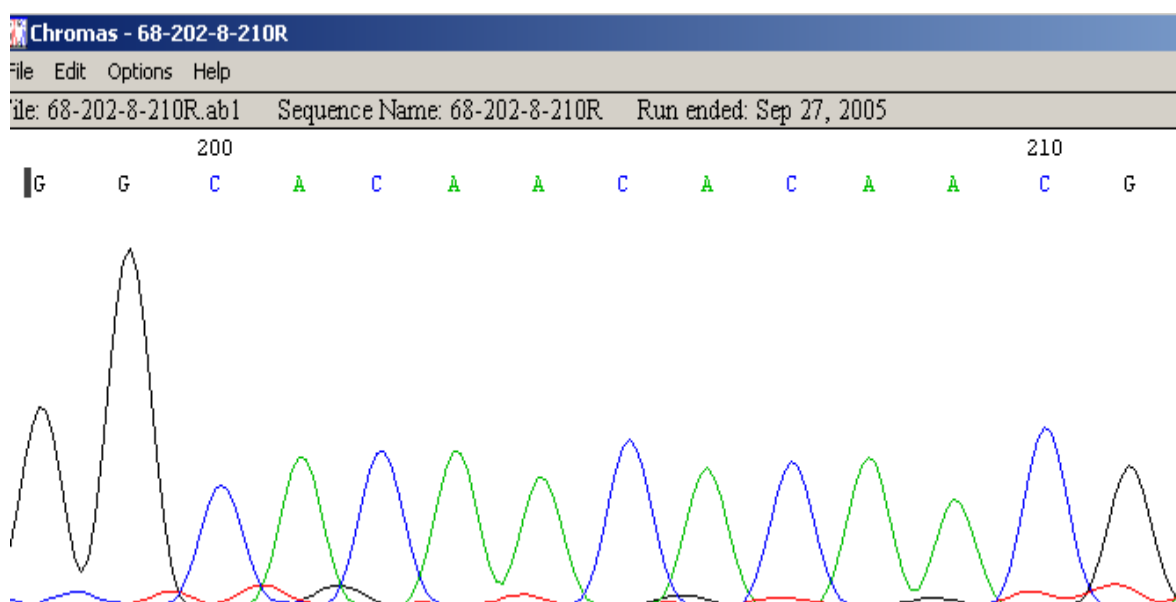


Figura 6.3. Cromatogramma per la visualizzazione e l'analisi delle sequenze

Tabella 6.1. Esemplici delle specie dei generi *Contracaecum* e *Phocascaris* sequenziati per il gene della mtDNA *cox-2*. N= n° di esemplari saggiati S= stadio di sviluppo

Ospite definitivo	Parassita	N	S	Località di campionamento
<i>Erignathus barbatus</i> (Phocidae: Phocinae)	<i>C. osculatum</i> A	3 (COSA1, COSA2, COSA3)	Adulto	New Foundland (Canada)
<i>Pagophilus groenlandicus</i> (Phocidae: Phocinae)	<i>C. osculatum</i> B	10 (COSB1, COSB2, COSB3, COSB4, COSB5, COSB6, COSB7, COSB8, COSB9, COSB10)	Adulto	“
<i>Cystophora cristata</i> (Phocidae: Phocinae)	<i>Phocascaris cystophorae</i>	2 (PCYS2, PCYS3)	Adulto	“
<i>Pagophilus groenlandicus</i> (Phocidae: Phocinae)	<i>Phocascaris phocae</i>	2 (PHOP6, PHOH7)	Adulto	Varanger (Norvegia)
<i>Halichoerus grypus</i> (Phocidae: Phocinae)	<i>C. osculatum</i> (s.s.)	3(COSC1, COSC2, COSC3)	Adulto	Bothnian Bay (Mar Baltico)
<i>Leptonychotes weddellii</i> (Phocidae: Monachinae)	<i>C. osculatum</i> D	3 (COSD1, COSD2, COSD3)	Adulto	Mare di Ross (Antartide)
<i>Leptonychotes weddellii</i> (Phocidae: Monachinae)	<i>C. osculatum</i> E	5 (COSE1, COSE2, COSE3, COSE4, COSE5)	Adulto	“
<i>Leptonychotes weddellii</i> (Phocidae: Monachinae)	<i>C. radiatum</i>	4 (CRAD1, CRAD2, CRAD3, CRAD4)	Adulto	Antartide
<i>Phoca sibirica</i> (Phocidae: Phocinae)	<i>C. baicalensis</i>	4 (CBAI1, CBAI2, CBAI3, CBAI4)	Adulto	Lago di Bajkal
<i>Mirounga leonina</i> (Phocidae: Monachinae)	<i>C. mirounga</i>	12 (CMIR1, CMIR2, CMIR 3, CMIR4, CMIR5, CMIR6, CMIR7, CMIR10, CMIR11, CMIR12, CMIR13, CMIR14)	Adulto	Antartide
<i>Mirounga leonina</i> (Phocidae: Monachinae)	<i>C. mirounga</i>	6 (CMIR8, CMIR9, CMIR15, CMIR16, CMIR17, CMIR18)	Adulto	Valdés (Argentina)
<i>Arctocephalus pusillus</i> (Otariidae: Arctocephalinae)	<i>C. ogmorhini</i> (s.s.)	3 (COGM1, COGM2, COGM3)	Adulto	Australia
<i>Arctocephalus australis</i> (Otariidae: Arctocephalinae)	<i>C. margolisi</i>	2 (CMAR7, CMAR8)	Adulto	Valdés (Argentina)
<i>Zalophus californianus</i> (Otariidae: Otariinae)	<i>C. margolisi</i>	10 (CMAR1, CMAR2, CMAR3, CMAR4, CMAR5, CMAR6, CMAR14, CMAR15, CMAR16, CMAR17)	Adulto	California
<i>Otaria flavescens</i> (Otariidae: Otariinae)	<i>C. margolisi</i>	1 (CMAR13)	Adulto	Conception (Cile)

Tabella 6.2. Esempari delle specie di *Pseudoterranova* sequenziati per il gene della mtDNA *cox-2*. N= n° di esemplari saggiati S= stadio del ciclo di sviluppo

Ospite definitivo	Parassita	N	S	Località di campionamento
<i>Erignathus barbatus</i> (Phocidae: Phocinae)	<i>P. bulbosa</i>	6 (PBU1,PBU2, PBU3, PBU4, PBU5, PBU6)	Adulto	New Foundland (Canada)
<i>Halichoerus grypus</i> (Phocidae: Phocinae)	<i>P. krabbei</i>	5 (PKR1, PKR2, PKR3, PKR4, PKR5)	Adulto	Islanda
<i>Phoca vitulina</i> (Phocidae: Phocinae)	<i>P. decipiens</i> (s.s.)	11(PDS1, PDS2, PDS3, PDS4, PDS5, PDS6, PDS7, PDS8, PDS9, PDS10, PDS11)	Adulto	Islanda
<i>Eumetopias jubatus</i> (Otariidae: Otariinae)	<i>P. azarasi</i>	10 (PAZ1, PAZ2, PAZ3, PAZ4, PAZ5, PAZ6, PAZ7, PAZ8, PAZ9, PAZ10)	Adulto	Mar del Giappone
<i>Otaria flavescens</i> (Otariidae: Otariinae)	<i>P. cattani</i>	5(PCA1, PCA2, PCA3, PCA4, PCA5)	Adulto	Conception (Cile)
<i>Arctocephalus gazella</i> (Otariidae: Otariinae)	<i>P. cattani</i>	1 (PCA6)	Adulto	Cile
<i>Notothenia coriiceps</i> (Nototheniidae)	<i>P. decipiens</i> E	2 (PDE1, PDE2)	larva L3	Antartide

6.3 Analisi statistiche e filogenetiche

La divergenza genetica per questi set di dati mitocondriali è stata analizzata con il programma MEGA 4.0 (Tamura, *et al.*, 2007), utilizzando i seguenti indici: la distanza Kimura-2parametri (i), K2P (Kimura, 1980) e la p-distance (ii), D_p (Nei & Kumar, 2000). Anche gli alberi filogenetici sono stati ottenuti utilizzando MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007); per le sequenze ottenute dall'amplificazione del gene della *cox-2* è stato realizzato un NJ, utilizzando Kimura-2parametri e la p-distance.

Per l'analisi filogenetica sono state effettuate diverse elaborazioni; la divergenza genetica, a livello interspecifico, è stata stimata utilizzando l'analisi della "massima parsimonia" (MP), sempre mediante l'utilizzo del programma MEGA 4.0 (Tamura, *et al.*, 2007). La veridicità delle relazioni genetiche è stata valutata utilizzando l'analisi di bootstrap non parametrica (Felsenstein, 1985), con 1000 repliche sia per la MP che per gli alberi filogenetici realizzati. I valori di bootstrap uguali o maggiori di 60 sono da considerarsi ben supportati (Hills & Bull, 1993). (Forster *et al.*, 2001).

Infine è stata effettuata una Analisi delle componenti principali (PCA), realizzata sulla base dei valori della matrice di distanza genetica Kimura-2parametri, utilizzando il programma SYN-TAX 2000 (Podani, 2005).

Per condurre gli studi co-filogenetici ospite-parassita è stato utilizzato il programma TreeMap (Page, 1994).

(i) Il modello Kimura-2parametri (Kimura, 1980; 1983) corretto per sostituzioni multiple allo stesso sito (multiple hits), tiene conto sia dei tassi di sostituzione transazionali e trasversionali, assumendo che le frequenze dei quattro nucleotidi siano le stesse e che i tassi di sostituzione non variano tra i siti. La matrice di sostituzione ha due parametri, uno per le transizioni e uno per le trasversioni. Le quattro basi azotate, quindi, non sono equivalenti, ma si distinguono sulla base della struttura chimica. Le transizioni sono le mutazioni che trasformano una purina in un'altra purina o una pirimidina in un'altra pirimidina ($A \leftrightarrow G$ e $C \leftrightarrow T$), mentre le trasversioni trasformano una purina in una pirimidina o viceversa ($A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $C \leftrightarrow G$, $C \leftrightarrow T$).

(ii) Questo modello di distanza è la proporzione (p) dei siti nucleotidici ai quali due sequenze sono differenti quando messe a confronto. Ciò è ottenuto dalla divisione del numero di nucleotidi differenti per il numero totale di nucleotidi confrontati. Questo modello non applica nessuna correzione per sostituzioni multiple allo stesso

sito (*multiple hits*), per tasso di sostituzione doppio (per esempio, differenze nei tassi transazionali e trasversionali) o differenze in tassi di evoluzione tra i siti.

7. Risultati

7.1. Analisi delle sequenze ottenute dal gene mtDNA *cox-2* in specie di *Contracaecum*/ *Phocascaris*

Gli esemplari appartenenti alle specie del genere *Contracaecum* e *Phocascaris* sono stati sequenziati per la regione del DNA mitocondriale del gene Citocromo Ossidasi II (mtDNA *cox-2*), in particolare, per un frammento di 519 paia di basi di questo gene.

Tale frammento è stato trovato ricco in A+T per tutte le specie analizzate, come osservato per altri nematodi (Thomas & Wilson, 1991; Hugall *et al.*, 1997, Blouin *et al.*, 1998, Valentini *et al.*, 2006, Mattiucci *et al.*, 2008) (Tabella 7.1). In questa porzione di gene sono stati identificati 332 siti conservati, 187 siti variabili e 158 siti informativi per la parsimonia. L'allineamento di tutte le sequenze degli individui saggiati in questo lavoro è riportato in appendice "A".

Dall'analisi di queste sequenze degli individui appartenenti alle diverse specie studiate, è stata calcolata la divergenza genetica su base mitocondriale. I valori di distanza genetica osservati tra le specie di *Contracaecum* e *Phocascaris*, calcolati utilizzando le distanze *Kimura-2parametri* (K2P) e *p-distance* (D_p), sono riportati in Tabella 7.2. Per quanto riguarda le specie gemelle del complesso *C. osculatum*, i valori di divergenza genetica variano da K2P = 0.05 (*C. osculatum* D versus *C. osculatum* E) a K2P = 0.11 (*C. osculatum* (s.s.) versus *C. osculatum* D). Valori più alti di K2P sono stati trovati tra le specie del complesso *C. osculatum* parassite di phocini rispetto a specie parassite di monachini (es. *C. radiatum*). Infatti, tra *C. radiatum* e le specie del complesso *C. osculatum*, K2P ≈ 0.14. Valori più elevati si osservano quando si confrontano specie di *Contracaecum* parassite di focidi rispetto alle specie parassite di otaridi. Infatti, tra il complesso *C. osculatum* e le specie del complesso *C. ogmorhini*, K2P ≈ 0.15. Inoltre, sebbene a livello morfologico le specie di *Phocascaris* e quelle del complesso *C. osculatum*, siano differenziate (assenza/ presenza di interlabia), le specie *P. cystophorae* e *P. phocae* sono strettamente correlate a questo complesso (K2P ≈ 0.10 rispetto a *C. osculatum* complex).

Tabella 7.1. Valori percentuali delle composizioni nucleotidiche per il gene della *cox-2* in 12 specie di *Contracaecum* e *Phocascaris*.

Specie	T	C	A	G
<i>C. osculatum</i> A	42.5	11.5	22.1	24.0
<i>C. osculatum</i> B	41.1	12.1	21.6	25.2
<i>C. osculatum</i> (s.s)	40.6	13.3	22.3	23.9
<i>C. osculatum</i> D	42.7	11.3	22.2	23.9
<i>C. osculatum</i> E	42.2	12.0	22.1	23.7
<i>C. mirounga</i>	44.5	11.2	20.7	23.6
<i>C. baicalensis</i>	42.0	12.3	21.0	24.7
<i>C. radiatum</i>	43.3	12.0	22.0	22.7
<i>C. ogmorhini</i> (s.s.)	42.6	11.9	21.7	23.8
<i>C. margolisi</i>	42.0	12.4	21.8	23.8
<i>P. phocae</i>	42.5	12.3	22.3	22.9
<i>P. cystophorae</i>	41.2	13.1	22.6	23.0

Tabella 7.2. Matrice dei valori medi di distanza genetica calcolata con *Kimura-2parametri* (sotto la diagonale) e *p-distance* (sopra la diagonale), sulla base del gene mtDNA *cox-2*, tra le specie di *Contracaecum* e *Phocascaris* studiate, parassite di pinnipedi. COSA: *C. osculatum* A; COSB: *C. osculatum* B; COSC: *C. osculatum* (s.s.); COSD: *C. osculatum* D; COSE: *C. osculatum* E; CMIR: *C. mirounga* ; CBAI: *C. baicalensis* ; CRAD: *C. radiatum*; COGM: *C. ogmorhini* (s.s.); CMAR: *C. margolisi*; PHOP: *P. phocae*; PCYS: *P. cystophorae*.

Specie		COSA	COSB	COSC	COSD	COSE	CMIR	CBAI	CRAD	COGM	CMAR	PHOP	PCYS
<i>C. osculatum</i> A	(COSA)	-	0.08	0.09	0.08	0.08	0.12	0.5	0.12	0.14	0.13	0.08	0.09
<i>C. osculatum</i> B	(COSB)	0.09	-	0.08	0.09	0.09	0.12	0.8	0.13	0.13	0.14	0.08	0.09
<i>C. osculatum</i> (s.s.)	(COSC)	0.10	0.09	-	0.10	0.10	0.13	0.9	0.14	0.13	0.13	0.06	0.07
<i>C. osculatum</i> D	(COSD)	0.09	0.10	0.11	-	0.05	0.12	0.9	0.12	0.14	0.14	0.10	0.10
<i>C. osculatum</i> E	(COSE)	0.09	0.10	0.10	0.05	-	0.12	0.9	0.12	0.13	0.13	0.10	0.10
<i>C. mirounga</i>	(CMIR)	0.14	0.13	0.14	0.13	0.13	-	0.11	0.08	0.13	0.14	0.12	0.15
<i>C. baicalensis</i>	(CBAI)	0.06	0.08	0.10	0.09	0.09	0.12	-	0.13	0.14	0.14	0.08	0.09
<i>C. radiatum</i>	(CRAD)	0.13	0.14	0.16	0.13	0.14	0.09	0.14	-	0.12	0.13	0.12	0.15
<i>C. ogmorhini</i> (s.s.)	(COGM)	0.16	0.15	0.14	0.16	0.14	0.14	0.15	0.14	-	0.05	0.13	0.16
<i>C. margolisi</i>	(CMAR)	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15	0.15	0.16	0.14	0.05	-	0.14	0.16
<i>P. phocae</i>	(PHOP)	0.09	0.09	0.07	0.10	0.11	0.13	0.08	0.13	0.15	0.15	-	0.03
<i>P. cystophorae</i>	(PCYS)	0.10	0.10	0.08	0.11	0.11	0.12	0.9	0.13	0.14	0.14	0.03	-

7.2 Analisi delle sequenze del gene della mtDNA *cox-2* nelle specie di *Pseudoterranova*

Il frammento di 519 paia di basi di questo gene è stato trovato ricco in A+T per tutte le specie analizzate, come osservato nelle specie del genere *Contracaecum* (Tabella 7.3). In questo gruppo di anisakidi questa stessa sequenza mostra 390 siti conservati, 129 siti variabili, e 76 siti informativi per la parsimonia. L'allineamento di tutte le sequenze degli individui saggiati in questo lavoro è riportato in appendice "B". Dall'analisi di queste sequenze degli individui appartenenti a 6 taxa di *Pseudoterranova*, è stata calcolata la divergenza genetica del gene *cox-2*.

I valori di distanza genetica osservati tra le specie di *Pseudoterranova*, calcolati utilizzando le distanze *Kimura-2parametri* (K2P) e *p-distance* (D_p), sono riportati in tabella 7.4. I valori di distanza genetica variano da un minimo di K2P=0.03 (osservato tra *P. decipiens* E *versus* *P. cattani*, e *P. azarasi* *versus* *P. krabbei*) ad un massimo di K2P= 0.06 (*P. decipiens* (s.s.) rispetto a tutte le altre specie gemelle del complesso *P. decipiens*).

Tabella 7.3. Valori percentuali delle composizioni nucleotidiche per il gene della *cox-2* in 6 specie di *Pseudoterranova*.

Specie	T	C	A	G
<i>P. decipiens</i> (s.s.)	42.4	12.1	22.2	23.3
<i>P. krabbei</i>	43.2	11.6	23.9	21.4
<i>P. bulbosa</i>	42.1	11.9	22.8	23.3
<i>P. azarasi</i>	42.5	12.2	23.7	21.6
<i>P. cattani</i>	42.8	11.9	23.9	21.4
<i>P. decipiens</i> E	43.4	11.3	23.0	22.3

Tabella 7.4. Matrice dei valori medi di distanza genetica calcolata con *Kimura-2parametri* (sotto la diagonale) e *p-distance* (sopra la diagonale), tra le specie di *Pseudoterranova* studiate, parassite di pinnipedi. PDS: *P. decipiens* (s.s.); PBU: *P. bulbosa*; PCA: *P. cattani*; PDE: *P. decipiens* E; PKR: *P. krabbei*; PAZ: *P. azarasi*.

Specie	PDS	PBU	PCA	PDE	PKR	PAZ
<i>P. decipiens</i> (s.s.) (PDS)	-	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05
<i>P. bulbosa</i> (PBU)	0.06	-	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>P. cattani</i> (PCA)	0.06	0.05	-	0.03	0.04	0.05
<i>P. decipiens</i> E (PDE)	0.06	0.05	0.03	-	0.04	0.05
<i>P. krabbei</i> (PKR)	0.06	0.05	0.04	0.05	-	0.03
<i>P. azarasi</i> (PAZ)	0.06	0.06	0.06	0.06	0.03	-

7.3 Relazioni genetiche tra le specie dei generi *Contracaecum* e *Phocascaris* su base mitocondriale mtDNA (*cox-2*)

L'analisi delle sequenze del mtDNA ottenute dall'amplificazione di 519 paia di basi della *cox-2*, ha permesso di studiare le relazioni genetiche tra le specie studiate. È stata eseguita una Massima Parsimonia (MP) sulle 70 sequenze ottenute mediante amplificazione del gene della *cox-2*. Questo tipo di analisi è di immediata applicazione poiché non ci sono opzioni (Morrison, 2005); ogni ramo dell'albero rappresenta un particolare cambiamento dello stato del "carattere". L'albero ottenuto con il programma MEGA 4.0 (Tamura, *et. al.*, 2007) è rappresentato in Figura 7.1. L'albero mostra l'esistenza di due clusters ben supportati dai valori di bootstrap: il cluster I include: le specie del complesso *C. osculatum*, *C. baicalensis*, *P. cystophorae* e *P. phocae*, *C. radiatum* e *C. mirounga*, con questi ultimi due taxa, strettamente legati geneticamente, e uniti in un subclade ben supportato; il cluster II comprende le specie *C. ogmorhini* (s.s.) e *C. margolisi*. In quest'ultimo clade si può osservare che due esemplari di *C. margolisi* raccolti in *Arctocephalus australis* clusterizzano con gli esemplari di *C. margolisi* reperiti in *Zalophus californianus*. Questo dato rappresenta il primo reperto della specie *C. margolisi* in simpatria con *C. ogmorhini* (s.s.); ciò conferma l'isolamento riproduttivo tra i due taxa, e supporta il loro status tassonomico.

Sulla base dei valori della distanza genetica (K2P), è stato realizzato un NJ, ottenuto anch'esso con il programma MEGA 4.0 (Tamura, *et al.*, 2007) (Figura 7.2). Anche questo albero mostra l'esistenza dei due grandi clusters ben supportati dai valori di bootstrap già definiti in MP. I due alberi filogenetici mostrano anche un'uguale topologia ben supportata, nel dimostrare che le specie del complesso *C. osculatum* plus *P. phocae* e *P. cystophorae* clusterizzano in un sottoclade appartenente al cluster I. In particolare *P. phocae* e *P. cystophorae* risultano filogeneticamente affini alla specie *C. osculatum* (s.s.). La specie *C. baicalensis* risulta essere più correlata alla specie gemella *C. osculatum* A, mentre le due specie gemelle *C. osculatum* D e *C. osculatum* E sono filogeneticamente affini tra loro. L'altro sottoclade, ugualmente ben supportato è quello formato da *C. radiatum* e *C. mirounga* che risultano filogeneticamente affini in tutte e due le elaborazioni filogenetiche (Figura 7.1 e 7.2).

Le relazioni genetiche tra le specie analizzate, sono state studiate anche mediante Analisi delle Componenti Principali (PCA) con il programma SYN-TAX 2000 (Podani, 2005), utilizzando la matrice di distanza calcolata in precedenza per la distanza genetica *K-2 parametri* (Figura 7.3). In figura 7.3, si può osservare come sia mantenuto ben definito il raggruppamento delle specie del complesso *C. osculatum*, *C. baicalensis*, *Phocascaris cystophorae* e *phocae*, che formano anche in questa analisi un cluster ben distinto dalle rimanenti specie analizzate, che formano un raggruppamento ben separato (Cluster II) (Figura 7.3). Le specie *C. radiatum* e *C. mirounga* formano un gruppo distaccato, rispetto alle altre specie del 1° grande raggruppamento, così come risulta anche dalla topologia ottenuta mediante NJ (Figura 7.3).

Figura 7.1. Massima Parsimonia (MP) (ottenuta mediante MEGA 4.0) sulla base delle sequenze (519 bp) del gene della mtDNA *cox-2* tra gli esemplari appartenenti alle specie del genere *Contracaecum* e *Phocascaris*; bootstrap su 1000 repliche; *P. decipiens* (s.s.) è stato incluso come outgroup.

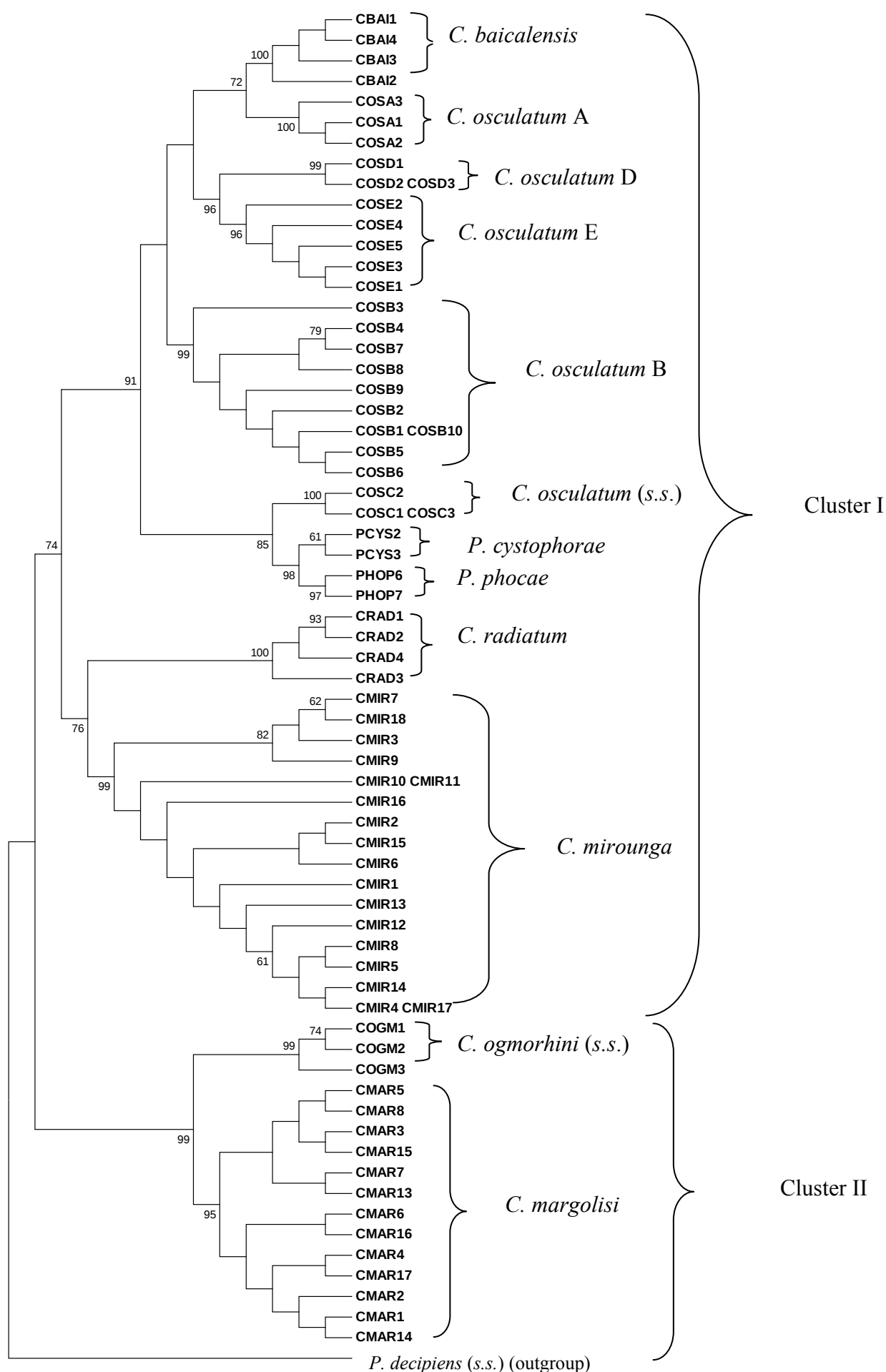


Figura 7.2. NJ realizzato sulla base delle sequenze (519 bp del gene della mtDNA *cox-2*) tra gli esemplari appartenenti alle specie *Contracaecum* e *Phocascaris*; bootstrap su 1000 repliche. *P. decipiens* (s.s.) è stato incluso come outgroup.

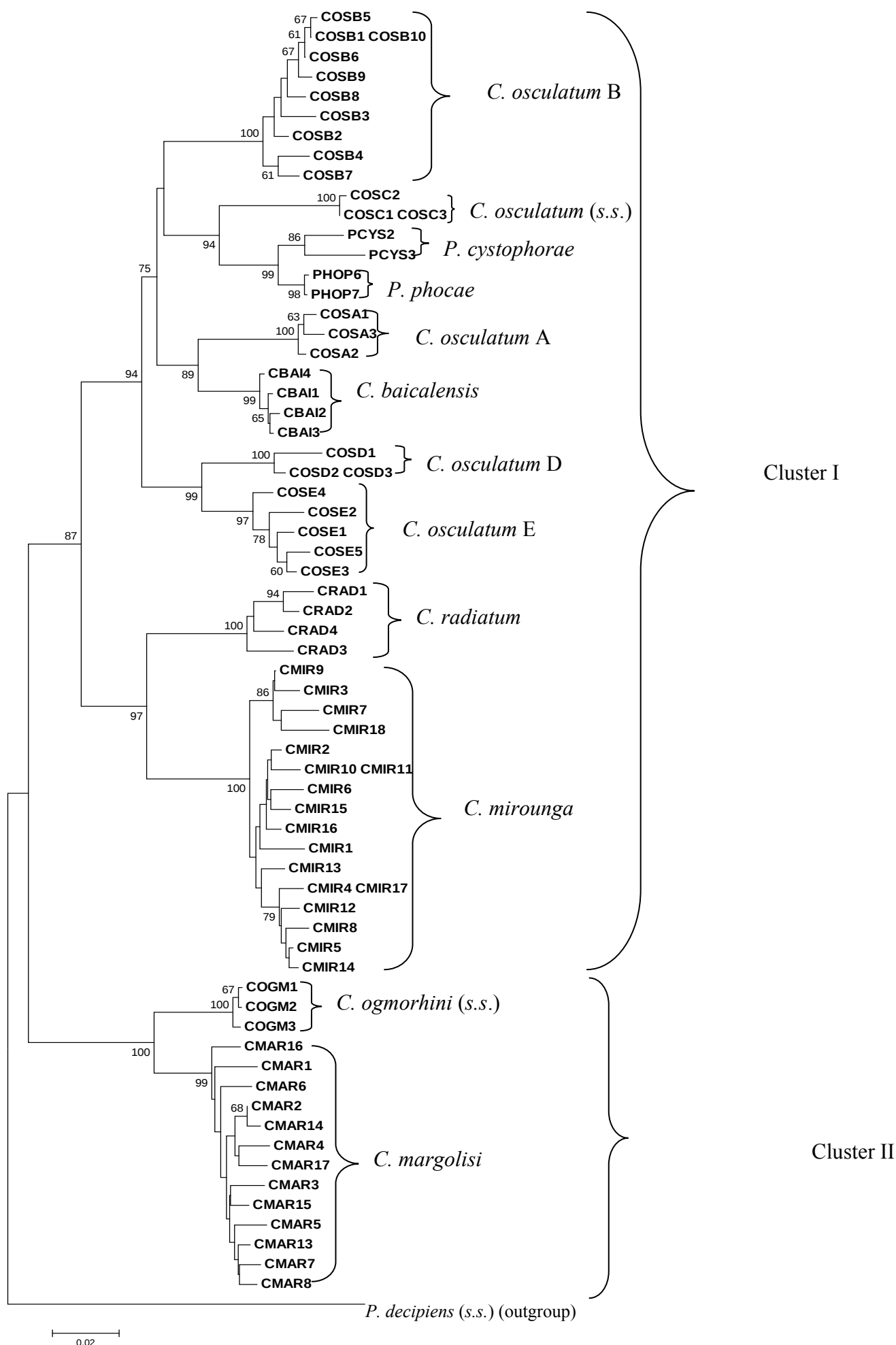
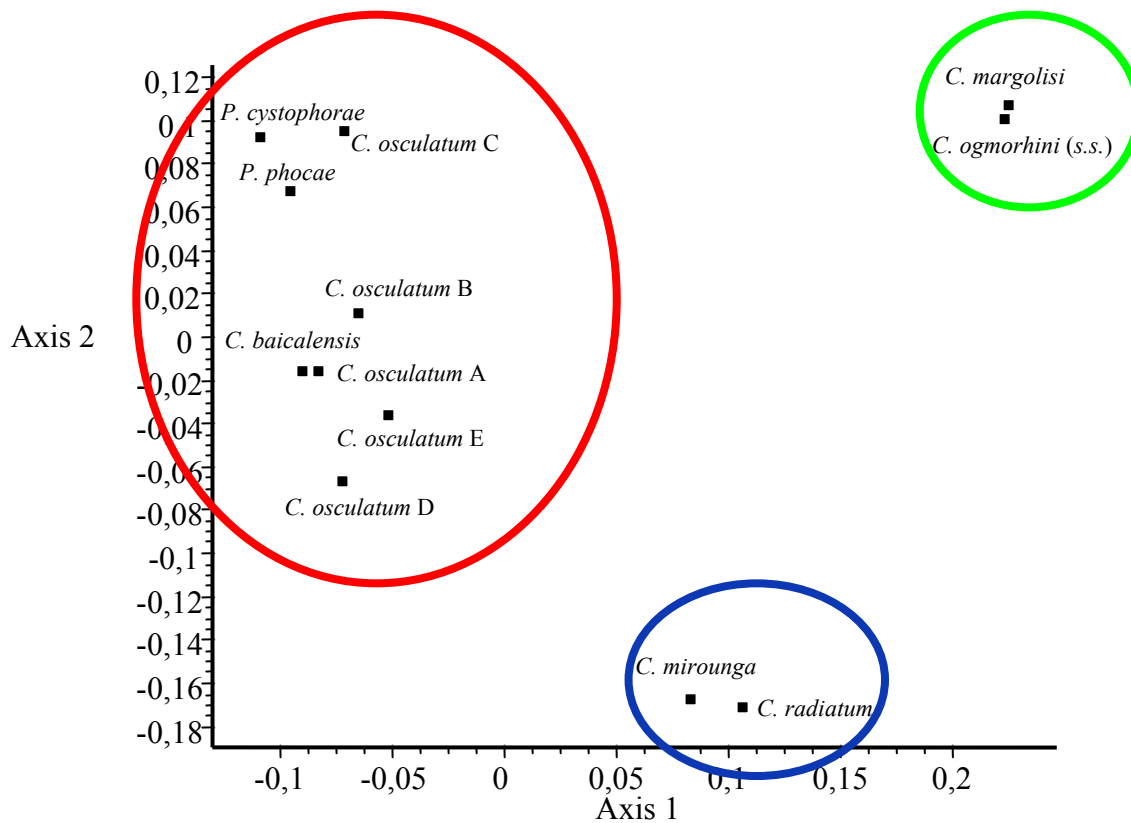
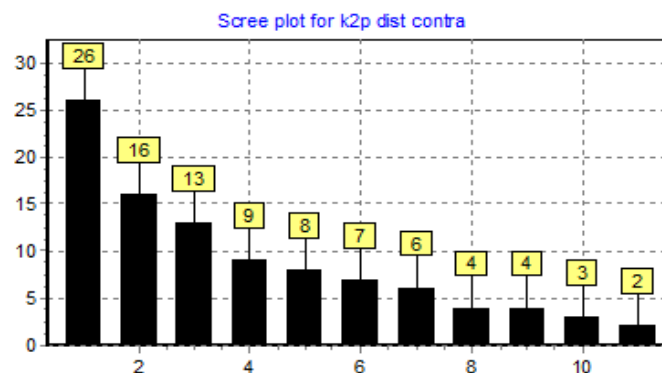


Figura 7.3. Analisi delle componenti principali (PCA) realizzata sulla base dei valori della matrice di distanza genetica Kimura-2parametri, ottenuta dall'analisi delle sequenze della mtDNA *cox-2* (519bp) tra le specie di *Contracaecum* e *Phocascaris* studiate.



Percentuale di significatività degli assi



7.4 Relazioni genetiche tra le specie del genere *Pseudoterranova* su base mitocondriale mtDNA (*cox-2*)

L'analisi delle sequenze del mtDNA ottenute dall'amplificazione di 519 paia di basi della *cox-2*, ha permesso di studiare le relazioni genetiche tra le specie studiate. È stata eseguita una Massima Parsimonia (MP) sulle 40 sequenze ottenute mediante amplificazione del gene della *cox-2*. L'albero ottenuto con il programma MEGA 4.0 (Tamura, *et. al.*, 2007) è rappresentato in Figura 7.4.

La topologia mostra che le specie *P. azarasi* e *P. krabbei* sono tra loro correlate, ma questa topologia non riceve un alto valore di bootstrap. Al contrario sembra essere più supportato il legame di affinità tra *P. decipiens* E e *P. cattani*, entrambe di origine australe. La specie più filogeneticamente distante sembra essere *P. decipiens* (s.s.).

Analoga topologia è quella risultata dall'analisi NJ, ottenuta sempre con il programma citato sopra, sulla base dei valori della distanza genetica (K2P) (Figura 7.5). Infatti gli stessi legami osservati in MP mostrano analoghi livelli di supporto all'analisi del bootstrap anche nell'elaborazione NJ. (Figura 7.5).

Le relazioni genetiche tra le specie analizzate, sono state studiate anche mediante Analisi delle Componenti Principali (PCA) grazie al programma SYN-TAX 2000 (Podani, 2005), utilizzando la matrice di distanza calcolata in precedenza per la distanza genetica *K-2 parametri* (Figura 7.6).

In figura 7.6, si può osservare come sia mantenuto ben definito il raggruppamento delle specie del complesso *P. bulbosa*, *P. decipiens* E, *P. cattani*, anche se *P. bulbosa*, si colloca un po' più distante rispetto alle altre due specie. *P. krabbei* e *P. azarasi* formano un gruppo distaccato. Infine *P. decipiens* (s.s.) si mostra ben distinto dagli altri taxa nel grafico.

Figura 7.4. Massima Parsimonia (MP) (mediante MEGA 4.0) sulla base delle sequenze (519 bp) del gene della mtDNA *cox-2* tra gli esemplari appartenenti alle specie del genere *Pseudoterranova*; bootstrap su 1000 repliche; *A. pegreffii* è stata inclusa come outgroup.

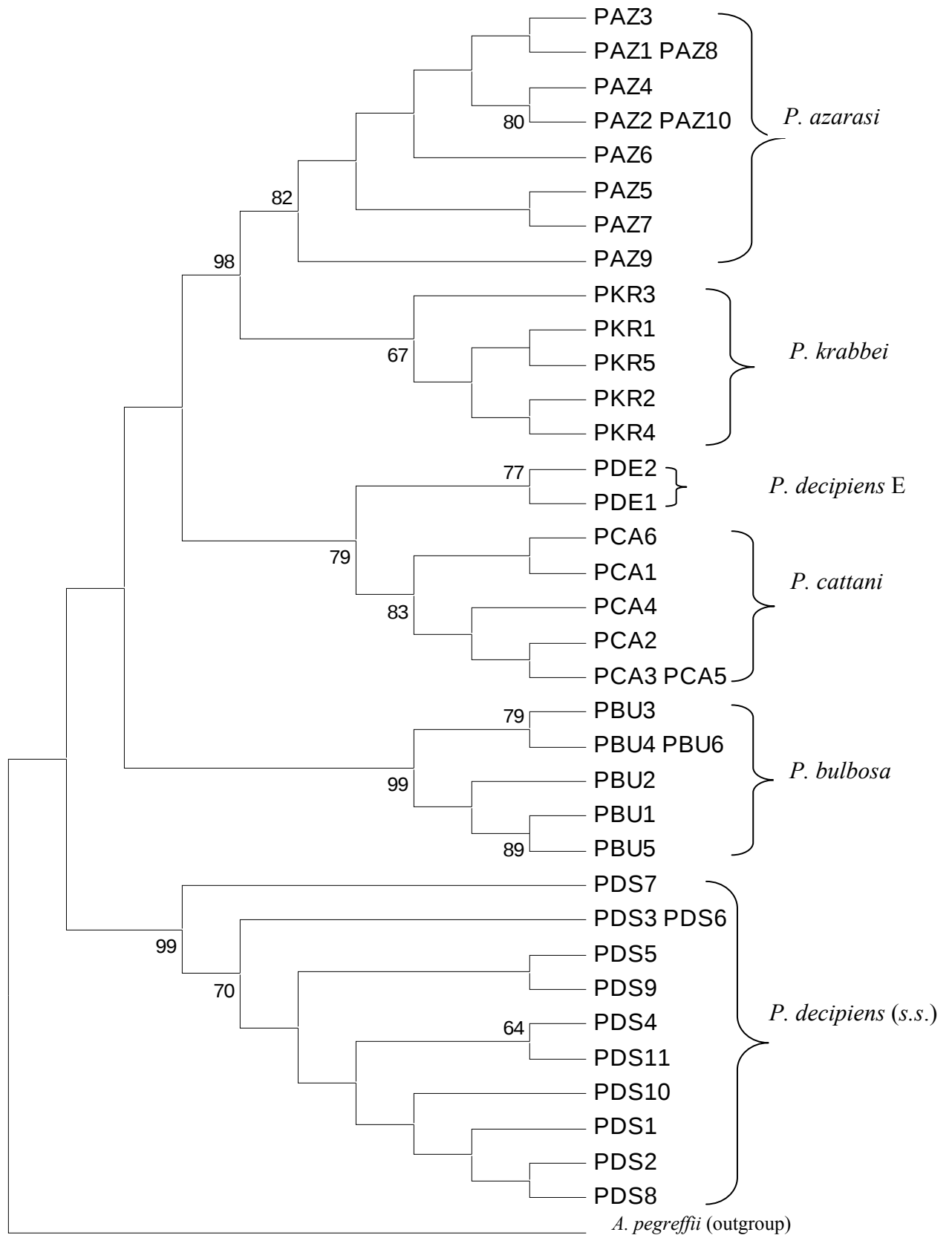


Figura 7.5. NJ realizzato sulla base delle sequenze (519 bp del gene della mtDNA *cox-2*) tra gli esemplari appartenenti alle specie del genere *Pseudoterranova*; bootstrap su 1000 repliche. *A. pegreffii* è stata inclusa come outgroup.

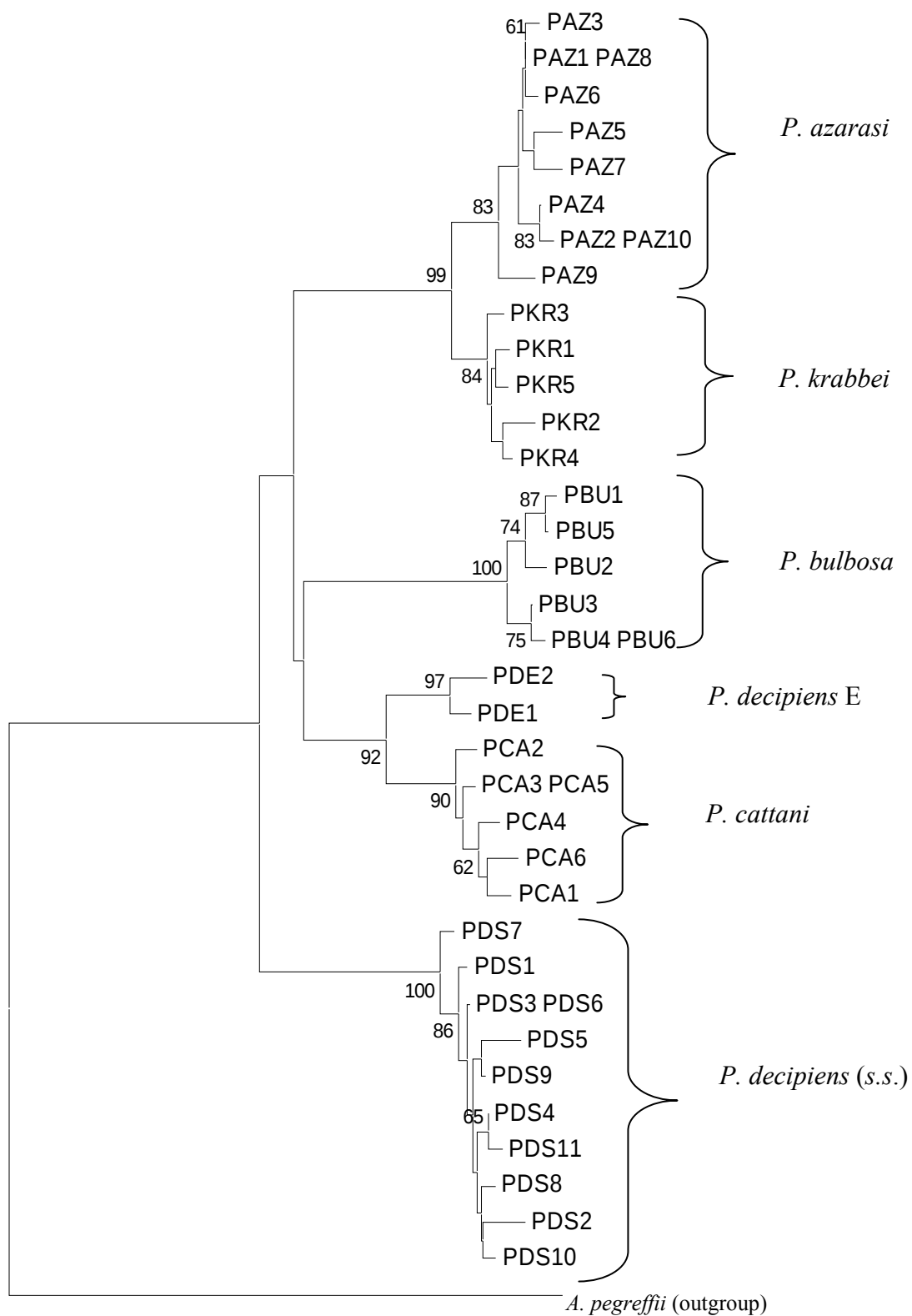
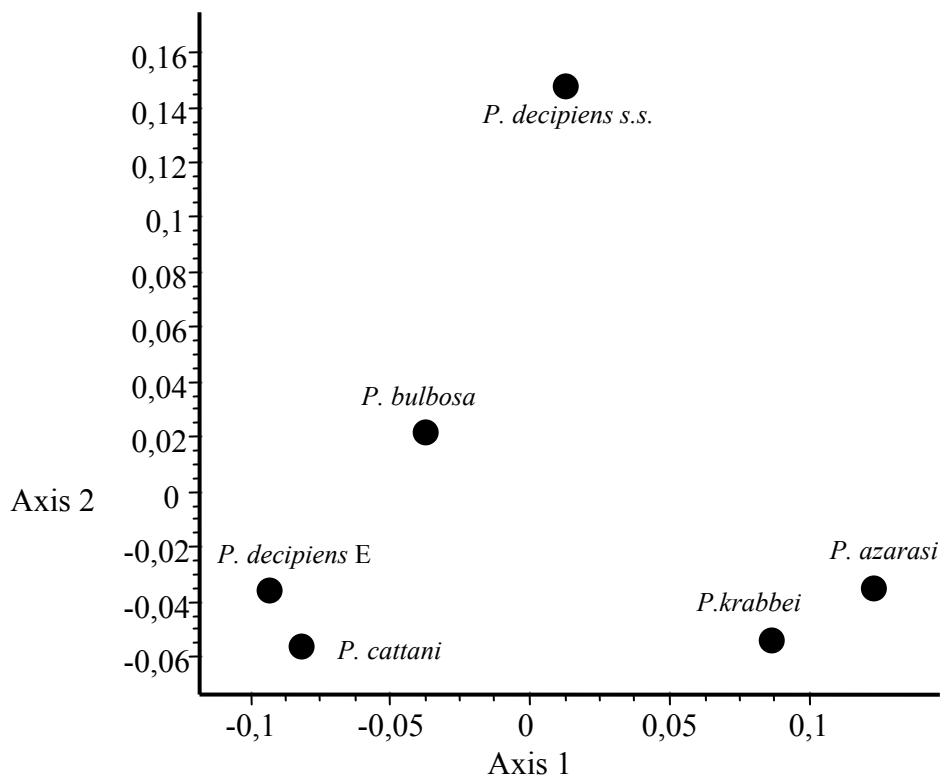
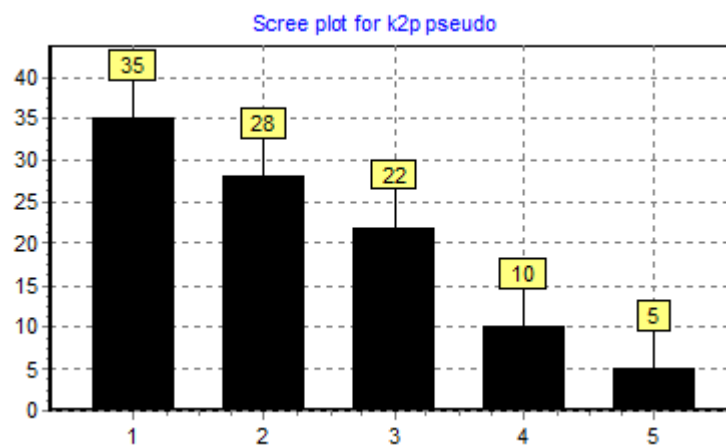


Figura 7.6. Analisi delle componenti principali (PCA) realizzata sulla base dei valori della matrice di distanza genetica Kimura-2parametri, ottenuta dall'analisi delle sequenze della mtDNA *cox-2* (519bp) tra le specie di *Pseudoterranova* studiate.



Percentuale di significatività degli assi



7.5. Aspetti coevolutivi ospite-parassita tra le specie dei generi *Contracaecum*/*Phocascaris* e *Pseudoterranova* e i pinnipedi.

7.5.1. Studi co-filogenetici in *Contracaecum* e *Phocascaris* spp. e i loro ospiti definitivi.

Uno degli obiettivi di questo lavoro è stato anche quello di studiare possibili fenomeni di co-evoluzione ospite-parassita tra le specie di *Contracaecum*/*Phocascaris* qui analizzate e i loro ospiti definitivi. È stato quindi indagato il possibile parallelismo tra le relazioni genetiche fra specie del genere *Contracaecum*/*Phocascaris* e le relazioni filogenetiche stabilite da altri Autori mediante marcatori molecolari, per i pinnipedi della famiglia delle Phocidae e Otariidae (Arnason *et al.*, 1996, 2006, Deméré *et al.*, 2003), ospiti definitivi delle specie di *Contracaecum*/*Phocascaris* qui studiate.

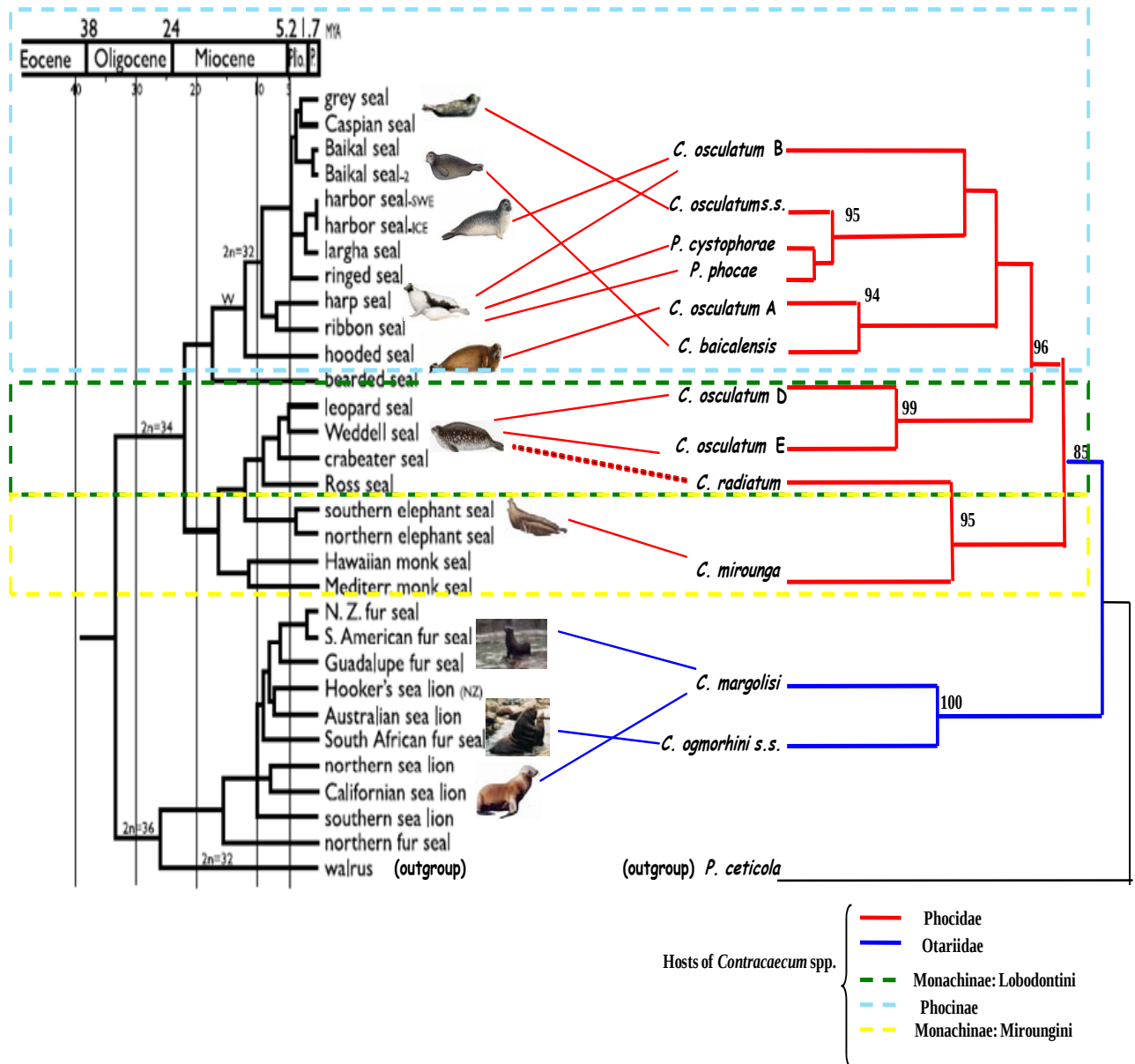
L'analisi filogenetica dei pinnipedi è stata recentemente suggerita da Arnason (2006) sulla base delle sequenze di 12 geni mitocondriali codificanti per proteine, le sequenze dei geni 12S, 16S rRNA e la "control region". L'albero filogenetico dei pinnipedi, proposto da Arnason *et al.* (2006) (riportato nel capitolo 4) sulla base di questi geni, è stato quindi posto a confronto con quello dei loro endoparassiti del genere *Contracaecum*/*Phocascaris*. In Figura 7.7 vengono riportati gli alberi filogenetici delle differenti specie di *Contracaecum*/*Phocascaris* ottenuti mediante NJ, utilizzando i dati forniti dall'analisi delle sequenze del gene della mtDNA *cox2*, a confronto con l'ipotesi di filogenesi proposta per i loro ospiti definitivi da Arnason *et al.* (2006).

La presenza di due clusters nella filogenesi delle specie di *Contracaecum*/*Phocascaris* è evidente anche nella loro associazione verso gli ospiti definitivi, che appartengono a due clusters ben distinti. Infatti nel primo cluster sono incluse le specie del complesso *C. osculatum*, parassiti di Phocinae, che formano un clade ben distinto dalle specie *C. mirounga* e *C. radiatum*, parassiti delle Monachinae. Analogamente, nella filogenesi riportata per i loro ospiti si nota la presenza del clade formato dalle Phocidae, che a sua volta include il sottoclade formato dalle Phocinae, ("true seals"), e il sottoclade formato dalle Monachinae (comprendente sia Miroungini che Lobodontini). Analogamente, la topologia dell'albero filogenetico dei parassiti mostra il gruppo basale indicato come cluster II formato dalle specie *C. ogmorhini*

(s.s.) e *C. margolisi* che sono i parassiti delle specie di Otariidae (“fur seals”) che, a loro volta, formano un clade ben distinto e basale nell’albero filogenetico dei pinnipedi (Arnason 1995, 2006) (Figura 7.7).

Questi dati indicano quindi l’esistenza di un parallelismo tra la storia evolutiva delle specie di *Contracaecum/ Phocascaris* e quella dei loro ospiti definitivi. Per valutare la consistenza del parallelismo osservato tra i due alberi filogenetici, quello dei parassiti e dei loro ospiti, è stato utilizzato il programma TreeMap (Page 1994). Tale analisi è stata condotta utilizzando le sequenze dello stesso gene mitocondriale *cox-2*, depositate in Gen Bank, di specie di pinnipedi ospiti definitivi delle specie di *Contracaecum/ Phocascaris* qui analizzate. I risultati riportati in Figura 7.8 mostrano che esiste un evento di co-divergenza tra le specie di *Contracaecum* parassite di Otariidae e quelle parassite di Phocidae. Un secondo evento di co-speciazione è quello che ha accompagnato la storia evolutiva di *C. osculatum* A con *E. barbatus* e *C. baicalensis* e *P. sibirica* (Figura 7.8). Un evento ulteriore di cospeciazione è indicato dalla co-divergenza di specie di *Contracaecum* parassite di otarie, *C. ognmorhini* (s.s.) con le specie di arctocefalini e *C. margolisi* rispetto allo *Zalophus californianus*. Altri parallelismi sono quelli riportati per le specie di *Contracaecum* parassiti di focini e di monachini. Al contrario la presenza di *C. radiatum* in *Leptonychotes weddellii* viene considerata come un evento di colonizzazione secondaria e la presenza delle due siblings antartiche *C. osculatum* D e *C. osculatum* E nella foca di Weddell, come evento di duplicazione.

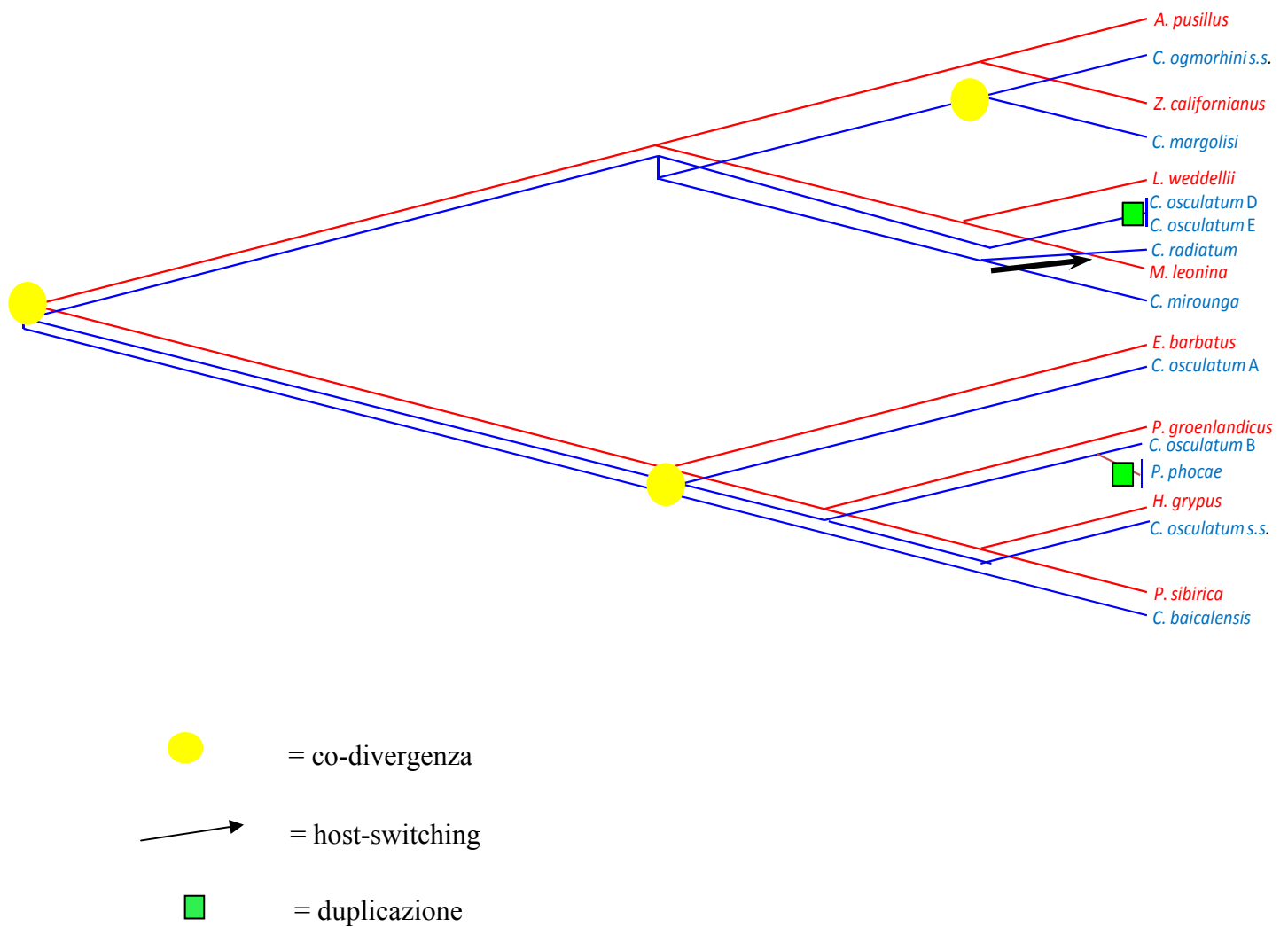
Figura 7.7. Filogenesi dei pinnipedi (secondo Arnason, 2006) a confronto con quella delle specie di *Contracaecum*/ *Phocascaris* studiate.



Filogenesi dei pinnipedi
(da Arnason *et al.*, 2006)

Filogenesi delle specie di *Contracaecum*/
Phocascaris studiate

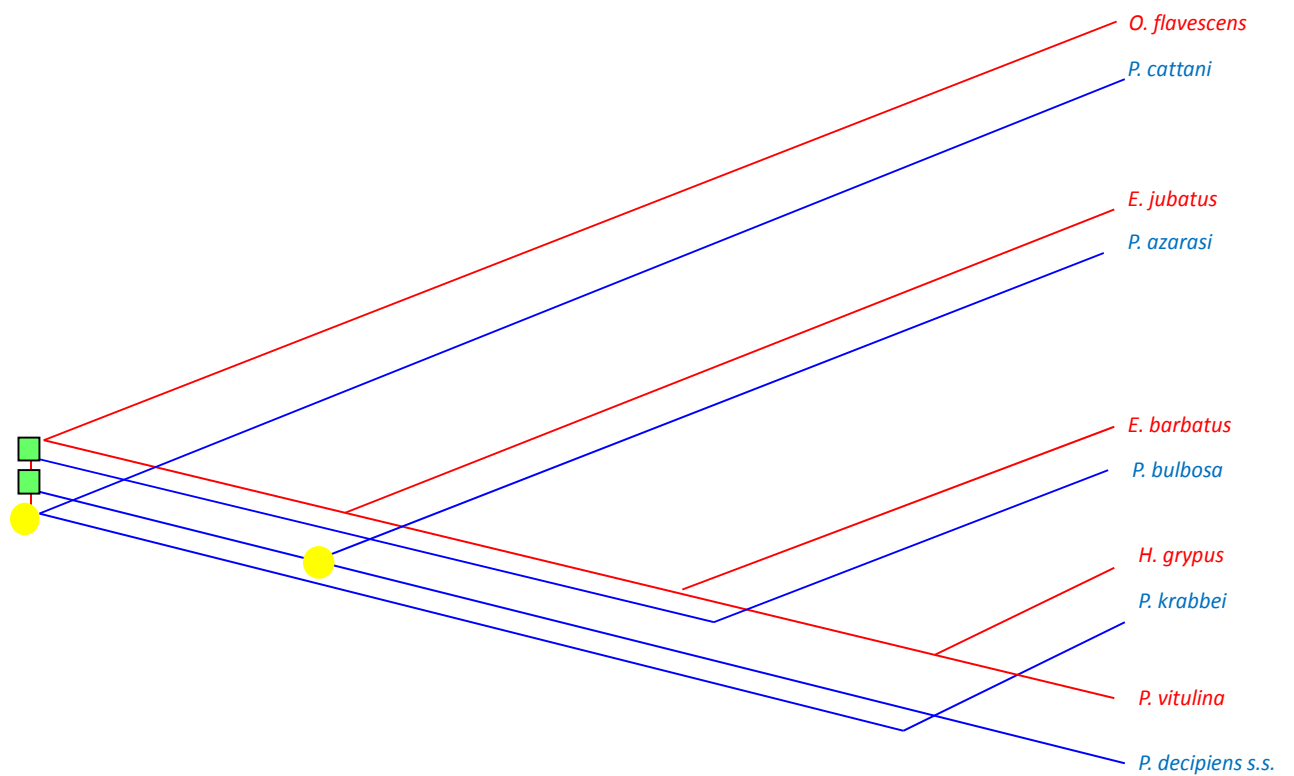
Figura 7.8 .“Reconciled tree” per la co-filogenesi delle specie parassita-ospite di *Contracaecum*/*Phocascaris* e quella dei loro ospiti definitivi. Analisi, mediante TreeMap (Page, 1994)



7.5.2. Studio co-filogenetico in *Pseudoterranova* spp. e i loro ospiti definitivi.

Anche nel caso delle specie di *Pseudoterranova* finora sequenziate per il gene mitocondriale della mtDNA *cox-2* è stato studiato il parallelismo tra la filogenesi di questi parassiti e quella dei loro ospiti, mediante il programma TreeMap (Page, 1994). Sebbene il confronto tra la topologia degli alberi ottenuta per le specie di *Pseudoterranova* con quella dei loro ospiti (secondo Arnason, 2006), non mostri evidenti parallelismi, tuttavia i risultati ottenuti mediante analisi TreeMap (Page, 1994) mostrano alcuni eventi di co-evoluzione. In particolare, tale analisi che è stata condotta utilizzando le sequenze dello stesso gene mitocondriale *cox-2* depositate in Gen Bank, dei pinnipedi, ospiti definitivi delle specie qui analizzate, mostra un possibile evento di co-speciazione nell'associazione *P. cattani* ed il suo ospite definitivo il leone marino meridionale, l'*Otaria flavescens*. Un altro evento è quello indicato nella specie *P. azarasi* con il suo ospite definitivo, il leone marino di Steller, *Eumetopias jubatus*. Mentre, eventi di duplicazione sembrerebbero essere all'origine della coevoluzione ospite-parassita tra la specie *P. bulbosa* e la foca barbata, *Erignathus barbatus* e tra la specie *P. decipiens* (s.s.) e la foca comune, *Phoca vitulina* (Figura 7.9).

Figura 7.9 “Reconciled tree” della co-filogenesi parassita-ospite in *Pseudoterranova* spp. e quella dei loro ospiti definitivi. Analisi mediante TreeMap (Page, 1994)



● = codivergenza

■ = duplicazione

8. Considerazioni

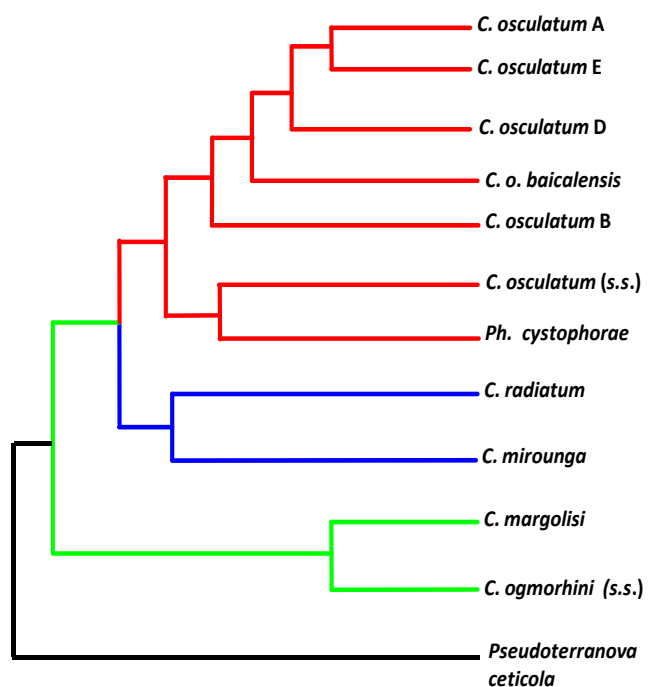
8.1 Aspetti di sistematica molecolare e filogenesi nei nematodi anisakidi del genere *Contracaecum*/ *Phocascaris*

In questo lavoro è stato evidenziato come il gene mitocondriale mtDNA *cox-2* sia estremamente efficace nel riconoscimento e distinzione di specie di anisakidi, anche a livello di specie gemelle. Lo status tassonomico delle specie precedentemente individuate mediante gli allozimi è stato qui confermato su base mitocondriale, mediante l'analisi della sequenza del gene mtDNA *cox-2*. È stato qui dimostrato che tutte le specie di anisakidi studiate all'analisi filogenetica, risultano essere linee evolutive ben distinte. Quindi le sequenze di mtDNA *cox-2* qui utilizzate, possono fornire utili markers per l'identificazione di specie di *Contracaecum*/ *Phocascaris*, a qualsiasi stadio di sviluppo. Altri Autori, utilizzando altri marcatori genetico/molecolari (Nadler *et al.*, 2005, Zhu *et al.*, 2000, 2001), non discriminano alcune delle specie del *Contracaecum* che erano state scoperte mediante allozimi, come, ad esempio, nel caso delle due specie gemelle, *C. osculatum* D e *C. osculatum* E. Tuttavia tale marcatore, presenta comunque delle limitazioni in quanto soggetto a saturazione di A+T (poiché, in generale, presenta un tasso di mutazione molto elevato) che lo rende non del tutto idoneo nell'evidenziare relazioni genetiche tra taxa al di sopra del livello specie (Blouin *et al.*, 1998). In questo lavoro di dottorato, il gene mitocondriale mtDNA *cox-2* ha permesso di: studiare le relazioni genetiche e stimare i livelli di differenziamento genetico tra le specie analizzate. Lo studio delle relazioni genetiche ottenuto dall'analisi delle sequenze di questo gene, ha evidenziato l'esistenza di due cladi ben distinti (Clade I e Clade II). Il primo comprendente le specie del complesso *C. osculatum* (s.l.) plus *P. cystophorae* e *P. phocae*, *C. radiatum*, *C. mirounga*, con gli ultimi due taxa strettamente formanti un subclade; il secondo comprendente: le specie *C. ogmorhini* (s.s.) e *C. margolisi*. Tutti questi legami sono ben supportati. L'esistenza di questi due cluster principali era stata già osservata mediante marcatori nucleari (allozimi); la stessa topologia, era ben supportata all'analisi NJ dai dati ottenuti su 20 loci enzimatici (Figura 8.1) (Mattiucci & Nascetti, 2008). Il confronto tra i due alberi ottenuto da diversi dati (nucleari e mitocondriali) è mostrato in Figura 8.1. Questo conferma che l'ipotesi filogenetica proposta dagli allozimi è suffragata da quella qui ottenuta su dati mitocondriali. Anche

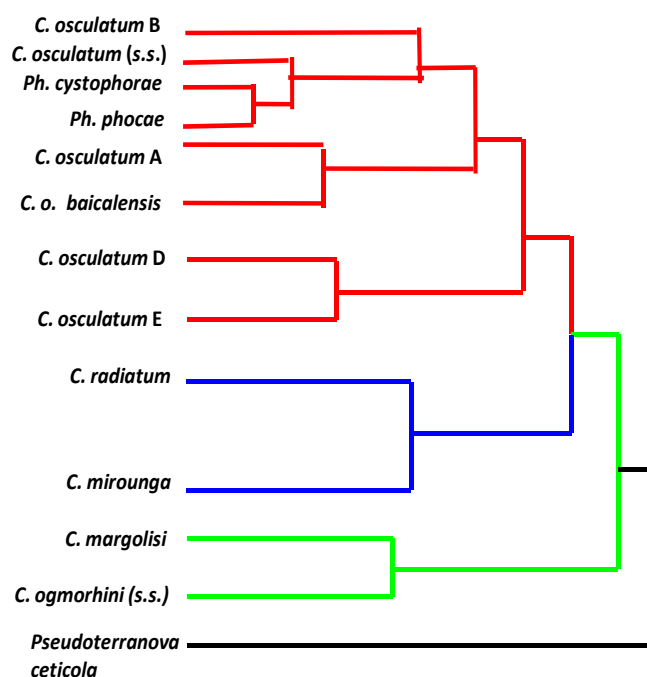
i dati mitocondriali supportano quanto già precedentemente osservato su base allozimica e cioè che le specie *phocae* e *cystophorae* sono geneticamente ben correlate alle altre specie del complesso *C. osculatum*. Ciò avvalorava ancora di più l'ipotesi di Berland (1964) ed inoltre evidenzia come il carattere presenza/assenza di interlabia non ha alcun valore tassonomico e risulta soltanto adattativo.

I livelli di differenziamento genetico ottenuti a livello mitocondriale, per le specie dei generi *Contracaecum* e *Phocascaris* studiate in questo lavoro, sono risultati confrontabili con quelli ottenuti per lo stesso gruppo di nematodi anisakidi mediante analisi allozimica (Mattiucci & Nascetti, 2008). Valori di divergenza genetica simili, ottenuti per le specie gemelle del complesso *C. osculatum* (es. *C. osculatum* A versus *C. osculatum* E K2P = 0.09; *C. osculatum* A versus *C. osculatum* B K2P = 0.09) sono stati osservati tra specie gemelle di altri nematodi anisakidi tra cui, per esempio, tra le specie del complesso *C. rudolphii* (es. *C. rudolphi* A versus *C. rudolphi* B K2P = 0.09), specie parassite allo stadio adulto di uccelli ittiofagi. (Mattiucci *et al.*, 2008).

Figura 8.1. Il confronto tra i due alberi ottenuti dai dati allozimici e dai dati mitocondriali.



NJ ottenuto dai valori di distanza genetica (chord distance) (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967) su dati allozimici



NJ ottenuto da valori diK2P su dati mitocondriali

8.2 Aspetti di sistematica molecolare e filogenesi nelle specie di *Pseudoterranova*

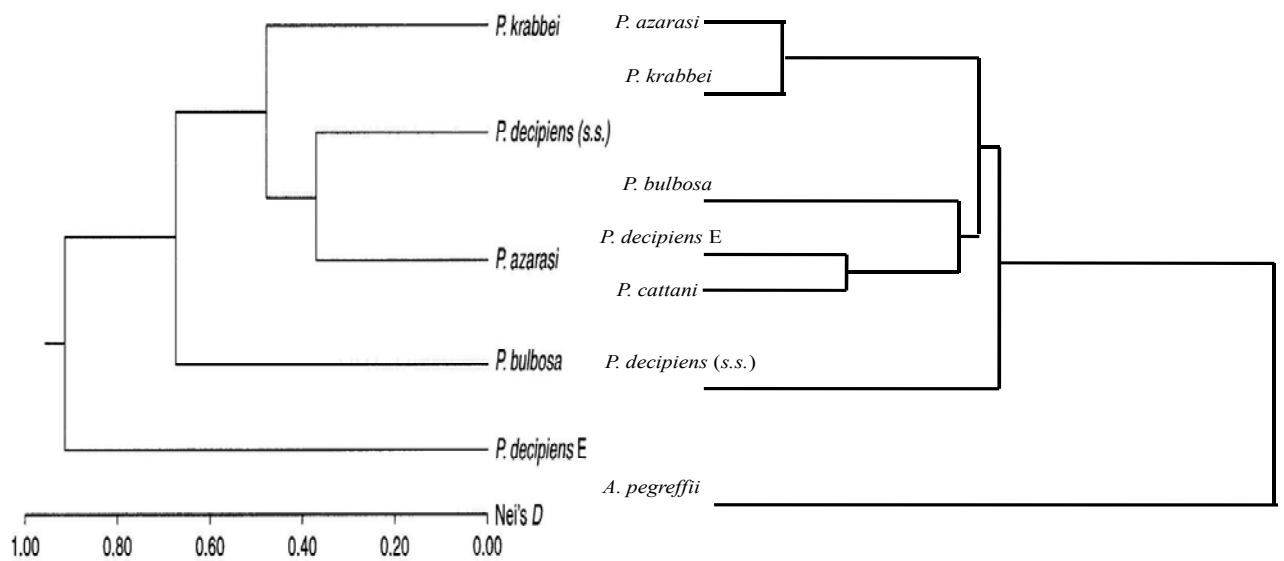
Le relazioni genetiche tra le specie di *Pseudoterranova*, erano state studiate precedentemente da altri Autori, mediante analisi degli allozimi (Bullini *et al.*, 1997, Paggi *et al.*, 1991, Mattiucci *et al.*, 1998) ed altri geni (DNA ribosomiale ITS-1, ITS-2) (Zhu *et al.*, 2002).

L'analisi fenetica ottenuta dai valori di distanza genetica (distanza di corda, Cavalli-Sforza and Edwards, 1967) (Bullini *et al.*, 1997) viene riportata a confronto con l'analisi filogenetica ottenuta su base mitocondriale (Figura 8.2). Come si può osservare non c'è esatta corrispondenza tra i legami. Inoltre, nel caso degli allozimi non esistono dati utilizzabili per la specie *P. cattani*. Congruenza tra la topologia prodotta dal fenogramma allozimico prodotto da Bullini *et al.* (1997) (eccetto per l'assenza di *P. cattani* nell'analisi allozimica) e quella ottenuta da MP e ML analisi di sequenze ITS rDNA effettuate da Nadler *et al.*, (2005) veniva osservata nel mostrare la stretta relazione tra *P. decipiens* (s.s.) e *P. azarasi*.

Il pattern filogenetico qui ottenuto dall'analisi mitocondriale (mtDNA *cox-2*) non è attualmente condiviso con quello di precedenti elaborazioni. Le incongruenze tra i dati ottenuti su base mitocondriale potrebbero essere dovute al fatto che questo gene nelle specie di *Pseudoterranova* si mostra poco variabile. Inoltre, i siti parsimoniosi sono risultati inferiori in *Pseudoterranova* spp., rispetto a quelli osservati in *Contracaecum* spp. Ulteriormente, i legami ottenuti sia dall'analisi della MP che NJ su base mitocondriale mtDNA *cox-2* non sono risultati tutti ben supportati. Analogamente, anche il fenogramma prodotto da Zhu *et al.* (2002) non forniva ipotesi filogenetiche ben supportate.

Ulteriori marcatori molecolari saranno utilizzati in questo gruppo di nematodi anisakidi per evidenziare ipotesi filogenetiche ben supportate.

Figura 8.2. Confronto tra i risultati ottenuti con le sequenze mtDNA e i dati allozimici per le specie di *Pseudoterranova*.



UPGMA ottenuto dai valori di distanza genetica di Nei su dati allozimici (da Bullini *et al.*, 1997)

NJ ottenuto da mtDNA cox-2 (valori di K2P)

8.3 Aspetti coevolutivi ospite-parassita

I risultati ottenuti dall'analisi della co-filogenesi ospite-parassita hanno evidenziato chiari patterns di co-speciazione tra gruppi di specie aniskidi appartenenti ai generi *Contracaecum*/ *Phocascaris* e *Pseudoterranova* con quello dei pinnipedi. Infatti esiste un pattern ben distinto per le specie di anisakidi, finora caratterizzate geneticamente, parassite di otarie (leoni marini ed otarie orsine) rispetto a quelle parassite di “true seals” ovvero di focidi (sia Phocinae che Monachinae). Sia le specie *Contracaecum ogmorhini* (s.s.) e *C. margolisi*, (parassiti rispettivamente di otarie orsine sudamericane ed australiane, e del leone marino californiano), che le specie gemelle *Pseudoterranova cattani* e *Pseudoterranova azarasi* (parassite del leone marino meridionale e del leone marino di Steller) hanno mostrato patterns evolutivi di co-speciazione rispetto ai loro ospiti definitivi (Otariidae).

Anche se i tempi di divergenza genetica tra le specie di nematodi anisakidi studiati, non sono attualmente ancora ben calibrati, tuttavia i patterns biogeografici finora evidenziati in questi nematodi, sembrerebbero supportare le ipotesi filogenetiche avanzate recentemente sia da Deméré *et al.* (2003) che da Arnason *et. al.* (2006). Infatti secondo questi Autori, la diversificazione degli otaridi dai focidi rappresenta l'evento basale della storia evolutiva dei pinnipedi (Figura 4.3), avvenuto ≈ 34 MYA. Successive diversificazioni degli otariidi hanno riguardato il clade delle Arctocephalinae e delle Otariinae che potrebbero aver colonizzato l'emisfero australe durante la glaciazione nel Pleistocene. In relazione a questi eventi, potrebbe aver avuto luogo la speciazione dei taxa australi sia del genere *Contracaecum* che di *Pseudoterranova* sopra menzionati, parassiti di Otariidae sia dell'emisfero australe e boreale (Figura 4.1).

Per quanto riguarda eventi di co-speciazione tra i focidi e i loro endoparassiti, eventi di codivergenza sembrano essere congruenti tra le specie parassite di monachine e i loro ospiti.

Nell'ambito dei focidi, il sottoclade delle Monachinae (Figura 4.2 e 4.3) si è diversificato dal clade delle phocinae, come indica Arnason (2006) ≈ 22 MYA. Analogamente, i loro nematodi, nelle specie *Contracaecum mirounga* e *Contracaecum radiatum* si sono diversificate dalle specie del complesso *C. osculatum* plus *P. phocae*/ *cystophorae*, parassite di focini.

Ulteriormente, in questo sottoclade, la diversificazione dei monachini e dei lobodontini è avvenuta ≈ 16 MYA secondo Arnason (2006), con la colonizzazione dei lobodontini dell'area Antartica (Figura 4.2 e 4.3). In relazione a questo fenomeno potrebbe essersi verificata anche la divergenza tra le specie *C. mirounga* e *C. radiatum*.

Un evento, altrettanto interessante di co-divergenza potrebbe essere quello che ha accompagnato la speciazione di *C. baicalensis* nella foca endemica del Bajkal, *Phoca sibirica*. Secondo Arnason *et. al.* (2006) la diversificazione di questo focide potrebbe essersi verificata nel Pleistocene da antenati presenti nell'Artico. Nell'albero filogenetico proposto per i nematodi del genere *Contracaecum*, la specie *C. baicalensis* risulta filogeneticamente correlata alla specie *C. osculatum* A, parassita della foca barbata, un focide (erignatini) diversificatosi dai focini/cistophorini.

Questi dati indicano che questi endoparassiti hanno seguito l'evoluzione dei loro ospiti definitivi con vari tipi di eventi. I patterns evolutivi di co-speciazione ospite-parassita supportano inoltre sia la distribuzione geografica delle specie di anisakidi finora caratterizzate geneticamente, sia le preferenze d'ospite di queste specie anisakidi, per le specie di pinnipedi, loro ospiti definitivi. Come è stato riportato, infatti, nel capitolo 3, le specie di nematodi anisakidi dei generi *Contracaecum*/*Phocascaris* e *Pseudoterranova*, in aree di simpatia, mostrano fenomeni di chiara distinzione di nicchia, fenomeni di competizione interspecifica, e meccanismi di preferenza verso ospiti diversi.

Ulteriori indagini, condotte con marcatori molecolari potranno ulteriormente supportare e/o chiarire le ipotesi evolutive finora avanzate su questi nematodi parassiti di organismi acquatici.

APPENDICE A

Allineamento delle sequenze ottenute dall'amplificazione del gene della *cox-2* degli individui di *Contracaecum* e *Phocascaris*, parassiti allo stadio adulto di pinnipedi.

```
COSA1      GTTTTTATTTCAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTGT
COSA3      GTTTTTATTTCAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGCTGTGTAGTGTGT
COSA2      GTTTTTATTTCAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTGT
CBAI1      GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTAT
CBAI3      GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTAT
CBAI2      GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTAT
CBAI4      GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTAT
COSB1      GTTTTTATTTTAAAAGGAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGTTGTGCAGTGT
COSB10     GTTTTTATTTTAAAAGGAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGTTGTGCAGTGT
COSB5      GTTTTTATTTTAAAAGGAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGTTGTGCAGTGT
COSB6      GTTTTTATTTTAAAAGGAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGT
COSB9      GTTTTTATTTTAAAAGGAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGTTGTGCAGTGT
COSB8      GTTTTTATTTTAAAAGGAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGT
COSB3      GTTTTTATTTTAAAAGGAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGTTGTGCAGTGT
COSB2      GTTTTTATTTTAAAAGGAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGTTGTGCAGTGT
COSB4      GTTTTTATTTTAAAAGGAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGT
COSB7      GTTTTTATTTTAAAAGGAAAAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGT
COSC1      GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATCGAGTATCAATTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGT
COSC3      GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATCGAGTATCAATTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGT
COSC2      GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATCGAGTATCAATTAGGGGAGCTTTTGTGTAGTGT
PCYS2      GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGCTTTTATGTAGTGT
PCYS3      GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGT
PHOP6      GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGCTTTTATGTAGTGT
PHOP7      GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGGGAGCTTTTATGTAGTGT
COSD2      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAATTTGGGGAGTTGTTATGTAGTGT
COSD3      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAATTTGGGGAGTTGTTATGTAGTGT
COSD1      GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAATTCGGGGAGTTGCTATGTAGTGT
COSE5      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATCGAGTACCAATTTGGGGAGTTGTTATGTAGTGT
COSE3      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAATTTGGGGAGTTGTTATGTAGTGT
COSE1      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAATTTGGGGAGTTGTTATGTAGTGT
COSE2      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAATTTGGGGAGTTGTTATGTAGTGT
COSE4      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAATTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGT
CMIR10     ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR11     ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR2      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR6      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR15     ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR16     ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR1      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR4      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR17     ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR5      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR14     ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR8      ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAACTTTTGTGCAGGGTT
CMIR12     ATTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR13     ATTTTTATTTTAAGAGAAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR9      ATTTTTATTTTAAGAGTAAAAAGATTGAGTACCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR3      ATTTTTATTTTAAGAGTAAAAAGATTGAGTACCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR7      ATTTTTATTTTAAGAGTAAAAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CMIR18     ATTTTTATTTTAAGAGTAAAAAGATTGAGTACCAGTTTGGAGAACTTTTGTGTAGGGTT
CRAD1      GTTTTTATTTTAAGAGCAAGAAGATTGAGTATCAGTTCGGAGAGCTTTTGTGCAGAGTT
CRAD2      GTTTTTATTTTAAGAGCAAGAAGATTGAGTATCAGTTCGGAGAGCTTTTGTGTAGAGTT
CRAD4      GTTTTTATTTTAAGAGCAAGAAGATTGAGTACCAGTTCGGAGAGCTTTTGTGTAGAGTT
CRAD3      GTTTTTATTTTAAGAGTAAAAAGATTGAGTATCAGTTCGGAGAGCTTTTGTGTAGAGTT
COGM1      GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGT
```

COGM2 GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
COGM3 GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR7 GTTTTTATTTCAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR13 GTTTTTATTTCAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR8 GTTTTTATTTCAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR5 GTTTTTATTTCAAAGTAAGAAGATCGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR3 GTTTTTATTTCAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR15 GTTTTTATTTCAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR2 GTTTTTATTTCAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR14 GTTTTTATTTCAAAGTAAGAAGATCGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR4 GTTTTTATTTCAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR17 GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATCGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR6 GTTTTTATTTCAAAGTAAGAAGATCGAGTATCAATTTGGGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR16 GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATCGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CMAR1 GTTTTTATTTCAAAGTAAGAAGATCGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGTGTTT

CMIR9 TTCCTACTTTAATTTTGGTTGTGCAGATGGTGCCTTCTTTGAGTTTGTTATATTATTATG
CMIR3 TTCCTACTTTAATTTTGGTTGTGCAGATGGTGCCTTCTTTGAGTTTGTTATATTATTATG
CMIR7 TTCCTACTTTGATTTTGGTTGTGCAGATGGTGCCTTCTTTGAGTTTGTTATATTATTATG
CMIR18 TTCCTACTTTAATTTTGGTTGTGCAGATGGTGCCTTCTTTGAGCTTGTTATATTATTATG
CRAD1 TTCCTACTTTGATTTTAGTTATACAGATGGTGCCTTCTTTGAGTCTGTTATATTACTATG
CRAD2 TTCCTACTTTGATTTTAGTTATACAGATGGTGCCTTCTTTGAGTTTGTTATATTACTATG
CRAD4 TTCCTACTTTGATTTTAGTTATACAGATGGTGCCTTCTTTGAGTTTGTTATATTACTATG
CRAD3 TTCCTACTTTGATTTTAGTTATACAGATGGTGCCTTCTTTGAGTTTGCTATATTACTATG
COGM1 TTCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCGTCTTTGAGTCTGCTTTATTATTATG
COGM2 TTCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCGTCTTTGAGTCTGCTTTATTATTATG
COGM3 TTCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCGTCTTTGAGTCTGCTTTATTATTATG
CMAR7 TTCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTATTATG
CMAR13 TTCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTATTATG
CMAR8 TTCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTATTATG
CMAR5 TTCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTATTATG
CMAR3 TTCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTACTATG
CMAR15 TTCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTACTATG
CMAR2 TCCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTACTATG
CMAR14 TCCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTACTATG
CMAR4 TCCCGACTTTAATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTACTATG
CMAR17 TCCCAACTTTAATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTACTATG
CMAR6 TCCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTATTATG
CMAR16 TCCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTATTATG
CMAR1 TCCCGACTTTGATTTTGGTTATGCAGATGATCCCATCTTTGAGTTTGCTTTATTACTATG
* *

COSA1 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAAGTTACTGGTCACCAATGGTATTGAA
COSA3 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAAGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
COSA2 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAAGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CBAI1 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAAGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CBAI3 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAAGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CBAI2 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAAGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CBAI4 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAAGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
COSB1 GTCTTATAAATTTGGATAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACGGGGCATCAATGGTATTGAA
COSB10 GTCTTATAAATTTGGATAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACGGGGCATCAATGGTATTGAA
COSB5 GTCTTATAAATTTGGATAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACGGGGCATCAATGGTATTGAA
COSB6 GTCTTATAAATTTGGATAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACGGGGCATCAATGGTATTGAA
COSB9 GTCTTATAAATTTGGATAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACAGGGCATCAATGGTATTGAA
COSB8 GTCTTATGAATTTGGATAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACAGGGCATCAATGGTATTGAA
COSB3 GTCTTATAAATTTGGACAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACAGGGCATCAATGGTATTGAA
COSB2 GTCTTATAAATTTGGATAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACGGGGCATCAATGGTATTGAA
COSB4 GTCTTATGAATTTGGATAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACGGGGCATCAATGGTATTGAA
COSB7 GTCTTATGAATTTGGATAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACGGGGCATCAATGGTATTGAA
COSC1 GTCTTATAAATCTTGACAGTAGCTTAACTGTAAAGGTAACGGTCACCAATGGTATTGAA
COSC3 GTCTTATAAATCTTGACAGTAGCTTAACTGTAAAGGTAACGGTCACCAATGGTATTGAA
COSC2 GTCTTATAAATCTTGACAGTAGCTTAACTGTAAAGGTAACGGTCACCAATGGTATTGAA
PCYS2 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACGGGCATCAATGGTATTGAA
PCYS3 GTCTTATAAATCTTGATAGCAGTTTAACTGTAAAGGTAACGGGCATCAGTGGTATTGAA
PHOP6 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACGGGCATCAGTGGTATTGAA
PHOP7 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGTTTAACTGTAAAGGTAACGGGCATCAGTGGTATTGAA
COSD2 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGTCTAACTGTAAAGGTTACAGGTCATCAATGGTATTGAA
COSD3 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGTCTAACTGTAAAGGTTACAGGTCATCAATGGTATTGAA
COSD1 GTCTTATAAATCTTGATAGTAGCTAACTGTAAAGGTTACAGGTCATCAATGGTATTGAA
COSE5 GTCTTATAAACCTTGATAGCAGTTTAACTGTAAAGTGACTGGTCATCAATGGTATTGAA
COSE3 GTCTTATAAACCTTGATAGCAGTTTAACTGTAAAGTGACTGGTCATCAATGGTATTGAA
COSE1 GTCTTATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTAAAGTGACTGGTCATCAATGGTATTGAA
COSE2 GTCTTATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTAAAGTGACTGGTCATCAATGGTATTGAA
COSE4 GTCTTATAAACCTTGATAGCAGTTTAACTGTAAAGTGACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CMIR10 GTCTTATGAATTTGGATAGCAGTTTAACTGTAAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMIR11 GTCTTATGAATTTGGATAGCAGTTTAACTGTAAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMIR2 GTCTTATGAATTTGGATAGCAGTTTAACTGTAAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMIR6 GCCTTATGAATTTGGATAGCAGTTTAACTGTAAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMIR15 GTCTTATGAATTTGGATAGCAGTTTAACTGTAAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA

CMIR16 GTCTTATGAATTTGGATAGCAGTTTGACTGTTAAAGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMIR1 GTCTTATGAATTTGGATAGCAGTTTAACTGTTAAAGTTACTGGTCATCAGTGGTACTGAA
CMIR4 GTCTTATGAATTTGGATAGTAGTTTGACTGTTAAAGTTACTGGCCATCAGTGGTACTGAA
CMIR17 GTCTTATGAATTTGGATAGTAGTTTGACTGTTAAAGTTACTGGCCATCAGTGGTACTGAA
CMIR5 GTCTTATGAATTTGGATAGTAGTTTGACTGTTAAAGTTACTGGCCATCAGTGGTACTGAA
CMIR14 GTCTTATGAATTTGGATAGTAGTTTGACTGTTAAAGTTACTGGCCATCAGTGGTACTGAA
CMIR8 GTCTTATGAATTTGGATAGTAGTTTGACTGTTAAAGTTACTGGTCATCAGTGGTACTGAA
CMIR12 GTCTTATGAATTTGGATAGCAGTTTGACTGTTAAAGTTACTGGCCATCAGTGGTACTGAA
CMIR13 GTCTTATGAATTTGGATAGCAGTTTAACTGTTAAAGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CMIR9 GTCTTATGAATTTGGATAGCAGTTTAACTGTTAAAGTTACTGGTCATCAGTGGTACTGAA
CMIR3 GCCTTATGAATTTGGATAGCAGTTTAACTGTTAAAGTTACTGGTCATCAGTGGTACTGAA
CMIR7 GTCTTATGAATTTGGATAGCAGTTTAACTGTTAAAGTTACTGGTCATCAGTGGTACTGAA
CMIR18 GTCTTATGAATTTGGATAGTAGTTTAACTGTTAAAGTTACTGGTCATCAGTGGTACTGAA
CRAD1 GCCTTATAAATTTGGATAGCAGTTTAAACAGTTAAAGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRAD2 GCCTTATAAATTTGGATAGCAGTTTAAACAGTTAAAGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRAD4 GCCTTATAAATTTGGATAGCAGTTTAAACAGTTAAAGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRAD3 GTCTTATAAATTTGGATAGCAGTTTAAACAGTTAAAGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
COGM1 GATTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTAAGTGGTCATCAATGGTATTGAA
COGM2 GATTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTAAGTGGTCATCAATGGTATTGAA
COGM3 GATTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTAAGTGGTCATCAATGGTATTGAA
CMAR7 GTTTAATAAACCTGGACAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACCGGTCATCAGTGGTATTGGA
CMAR13 GTTTAATAAACCTGGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACCGGTCATCAGTGGTATTGGA
CMAR8 GTTTAATAAACCTGGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACCGGTCATCAGTGGTATTGGA
CMAR5 GTTTAATAAACCTGGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACCGGTCATCAGTGGTATTGGA
CMAR3 GTTTAATAAACCTGGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACCGGTCATCAGTGGTATTGGA
CMAR15 GTTTAATAAACCTGGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACCGGTCATCAGTGGTATTGGA
CMAR2 GTTTAATAAACCTGGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACCGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMAR14 GTTTAATAAACCTGGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACCGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMAR4 GTTTAATAAACCTAGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACCGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMAR17 GTTTAATAAACCTGGACAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACCGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMAR6 GTTTAATAAACCTGGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACCGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMAR16 GTTTAATAAACCTAGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMAR1 GTTTAATAAACCTGGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACCGGTCATCAGTGGTATTGAA

* *

COSA1 GTTATGAGTTTAGAGATATTCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATC
COSA3 GTTATGAGTTTAGAGATATTCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTACATGAAGTCTTTGGATC
COSA2 GTTATGAGTTTAGAGATATTCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATC
CBAI1 GCTATGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATC
CBAI3 GCTATGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATC
CBAI2 GCTATGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATC
CBAI4 GCTATGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATC
COSB1 GTTACGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGACC
COSB10 GTTACGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGACC
COSB5 GTTACGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGACC
COSB6 GTTACGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGACC
COSB9 GTTACGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGACC
COSB8 GTTACGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGACC
COSB3 GTTACGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGACC
COSB2 GTTATGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGACC
COSB4 GTTACGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGACTCTTATATGAAGTCTTTGGATC
COSB7 GTTACGAGTTTAGTGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATC
COSC1 GTTATGAGTTTAGGGACATCCCTGGACTTGAGTTTGATTCTTATATGAAATCTCTGGATC
COSC3 GTTATGAGTTTAGGGACATCCCTGGACTTGAGTTTGATTCTTATATGAAATCTCTGGATC
COSC2 GTTATGAGTTTAGGGACATCCCTGGACTTGAGTTTGATTCTTATATGAAATCTCTGGATC
PCYS2 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAATCTTTGGATC
PCYS3 GCTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAATCTTTGGATC
PHOP6 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAATCTTTGGATC
PHOP7 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGGCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAATCTTTGGATC
COSD2 GTTATGAGTTTAGGGATATTCCTGGTCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAATCTTTGGATC
COSD3 GTTATGAGTTTAGGGATATTCCTGGTCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAATCTTTGGATC
COSD1 GTTATGAGTTTAGGGATATTCCTGGTCTTGAGTTTGATTCTTATATGAAATCTTTGGATC
COSE5 GTTACGAGTTTAGGGATATTCCTGGTCTCGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATC

C0SA1	ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTGATTCAATCTTGAGCTTTACCCA
C0SA3	ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTGATTCAATCTTGAGCTTTACCCA
C0SA2	ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTGATTCAATCTTGAGCTTTGCCCA
CBAI1	ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCCGGCGATGTGATTCAATCTTGGGCTTTGCCCA
CBAI3	ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCCGGCGATGTGATTCAATCTTGGGCTTTGCCCA
CBAI2	ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGCGATGTGATTCAATCTTGGGCTTTGCCCA
CBAI4	ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCCGGTGATGTGATTCAATCTTGGGCTTTGCCCA
C0SB1	ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
C0SB10	ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
C0SB5	ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA

COSB6 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
 COSB9 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
 COSB8 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
 COSB3 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
 COSB2 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
 COSB4 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
 COSB7 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
 COSC1 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCACTCTTGGGCTTTGCCCA
 COSC3 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCACTCTTGGGCTTTGCCCA
 COSC2 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATCCACTCTTGGGCTTTGCCCA
 PCYS2 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGTATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
 PCYS3 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGTATGTGATCCATTCTTGAGCTTTGCCCA
 PHOP6 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGCGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 PHOP7 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGCGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 COSD2 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGTATGTGATTCACTTCTTGGGCTTTACCTA
 COSD3 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGTATGTGATTCACTTCTTGGGCTTTACCTA
 COSD1 ATACTAATATCCGGTTTTGTATTACTTCTGGTATGTGATTCACTTCTTGGGCTTTACCTA
 COSE5 ATACTAATATCCGGTTCTGTATCACTTCTGGTATGTGATTCACTTCTTGGGCTTTGCCCA
 COSE3 ATACTAATATCCGGTTCTGTATCACTTCTGGTATGTGATTCACTTCTTGGGCTTTGCCCA
 COSE1 ATACTAATATCCGGTTTTGTATCACTTCTGGTATGTGATTCACTTCTTGGGCTTTACCCA
 COSE2 ATACTAATATCCGGTTCTGTATCACTTCTGGTATGTGATTCACTTCTTGGGCTTTGCCCA
 COSE4 ATACTAATATCCGGTTCTGTATCACTTCTGGTATGTGATTCACTTCTTGGGCTTTGCCCA
 CMIR10 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR11 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR2 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR6 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR15 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR16 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR1 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR4 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR17 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR5 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR14 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR8 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR12 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR13 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR9 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR3 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR7 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CMIR18 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTTATTCATTTCGTGGGCTTTGCCTA
 CRAD1 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTTGAGCTTTACCTA
 CRAD2 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTTGAGCTTTACCTA
 CRAD4 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTTGAGCTTTACCTA
 CRAD3 ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTGATTCACTTCGTTGAGCTTTACCTA
 COGM1 ATACAAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCTA
 COGM2 ATACAAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCTA
 COGM3 ATACAAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCTA
 CMAR7 ATACGAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
 CMAR13 ATACGAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
 CMAR8 ATACGAATATCCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGAGCTTTACCTA
 CMAR5 ATACGAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
 CMAR3 ATACGAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
 CMAR15 ATACGAATATCCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
 CMAR2 ATACGAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
 CMAR14 ATACGAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
 CMAR4 ATACGAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
 CMAR17 ATACGAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGAGCTTTGCCTA
 CMAR6 ATACGAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
 CMAR16 ATACGAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
 CMAR1 ATACGAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGGATGTTATCCATTCTTGAGCTTTGCCCA
 ***** ** ** ***** ***** ** ***** ** ** ** **

COSA1 GGTTGTCTATTAAGTTAGATGCTATGAGGGGATTTTTATCTACTTTGTCTTATAGCTTTC

COSA3	GGTTGTCTATTAAGTTAGATGCTATGAGGGGTATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSA2	GGTTGTCTATTAAGTTAGATGCTATGAGGGGTATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
CBAI1	GGTTGTCTATTAAGTTAGACGCTATGAGGGGCATCTTGCCACTCTGTCTTATAGTTTTC
CBAI3	GGTTGTCTATTAAGTTAGACGCTATGAGGGGCATCTTGCCACTCTGTCTTATAGTTTTC
CBAI2	GGTTGTCTATTAAGTTAGACGCTATGAGGGGCATCTTGCCACTCTGTCTTATAGTTTTC
CBAI4	GGTTGTCTATTAAGTTAGACGCTATGAGGGGCATCTTGCCACTCTGTCTTATAGTTTTC
COSB1	GGCTGTCTATTAAACTAGATGCTATGAGGGGCATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSB10	GGCTGTCTATTAAACTAGATGCTATGAGGGGCATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSB5	GGCTGTCTATTAAACTAGATGCTATGAGGGGCATTTTATCTACTCTGTCTTATAGTTTTC
COSB6	GGCTGTCTATTAAACTAGATGCTATGAGGGGCATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSB9	GGCTGTCTATTAAACTAGATGCTATGAGGGGCATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSB8	GGCTGTCTATTAAACTAGATGCTATGAGGGGTATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSB3	GGCTGTCTATTAAACTAGATGCTATGAGGGGTATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSB2	GGCTGTCTATTAAACTAGATGCTATGAGGGGCATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSB4	GGCTGTCTATTAAATTAGATGCTATGAGGGGTATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSB7	GGCTATCTATTAAACTAGATGCTATGAGGGGTATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSC1	GGCTATCTATTAAACTTAGATGCTATGAGGGGCATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSC3	GGCTATCTATTAAACTTAGATGCTATGAGGGGCATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSC2	GGCTATCTATTAAACTTAGATGCTATGAGGGGCATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
PCYS2	GGTTGTCTATTAAACTTGATGCTATGAGGGGCATCTATCTACTTTGTCTTACAGGTTCC
PCYS3	GTTTGTCTATTAAACTCGATGCTATGAGGGGCATCTATCTACTTTGTCTTACAGGTTCC
PHOP6	GTTTGTCTATTAAACTCGATGCTATGAGGGGCATCTTATCTACTTTGTCTTATAGGTTTC
PHOP7	GTTTGTCTATTAAACTCGATGCTATGAGGGGCATCTTATCTACTTTGTCTTATAGGTTTC
COSD2	GGTTGTCTATTAAATTAGATGCTATGAGGGGTATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSD3	GGTTGTCTATTAAATTAGATGCTATGAGGGGTATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSD1	GGTTGTCTATTAAATTAGATGCTATGAGGGGTATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSE5	GGCTATCTATTAAATTAGATGCTATGAGAGGTATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSE3	GGCTATCTATTAAATTAGATGCTATGAGAGGTATTTTATCTACTTTGTCTTACAGTTTTC
COSE1	GGCTGTCTATTAAATTAGATGCTATGAGAGGTATTTTATCTACTTTGTCTTACAGTTTTC
COSE2	GGTTATCTATTAAACTAGATGCTATGAGAGGTATTCTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
COSE4	GGCTATCTATTAAATTAGATGCTATGAGAGGTATTTTATCTACTTTGTCTTATAGTTTTC
CMIR10	GTTTATCTATTAAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR11	GTTTATCTATTAAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR2	GTTTATCTATTAAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR6	GTTTATCTATCAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR15	GTTTATCTATTAAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR16	GTTTATCTATTAAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR1	GTTTATCTATCAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR4	GTTTGTCTATTAAAGTTGGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR17	GTTTGTCTATTAAAGTTGGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR5	GTTTATCTATTAAAGTTGGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR14	GTTTATCTATTAAAGTTGGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR8	GTTTATCTATTAAAGTTGGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR12	GTTTATCTATTAAAGTTGGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR13	GTTTATCTATTAAAGTTGGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR9	GTTTATCTATTAAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR3	GTCTATCTATTAAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTGTCTGATAGTTTTC
CMIR7	GTCTATCTATTAAAGTTAGACGCTATGAGTGGTATTTTGTCTACTTTATCGTATAGTTTTC
CMIR18	GTTTATCTATTAAAGTTAGACGCTATGAGAGGTATTTAGTCTACTTTATCGTATAGTTTTC
CRAD1	GCTTGTCTATTAAATTGGATGCTATAAGAGGTATTTTATCTACCTTGTCTTATAGTTTTC
CRAD2	GCTTGTCTATTAAATTGGACGCTATAAGAGGTATTTTATCTACCTTGTCTTATAGTTTTC
CRAD4	GCTTGTCTATTAAATTGGATGCTATAAGAGGTATTTTATCTACCTTGTCTTATAGTTTTC
CRAD3	GCTTGTCTATTAAATTGGATGCTATAAGAGGTATTTTATCTACCTTGTCTTATAGTTTTC
COGM1	GTCTTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTATCTTATAGTTTTC
COGM2	GTCTTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTATCTTATAGTTTTC
COGM3	GTCTTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTATCTTATAGTTTTC
CMAR7	GGCTTTCTATTAAAGTTGGATGCTATAAGTGGTATTCTAAGTACTTTATCTTATAGTTTTC
CMAR13	GGCTTTCTATTAAAGTTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTATCTTATAGTTTTC
CMAR8	GGCTTTCTATTAAAGTTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTATCTTATAGTTTTC
CMAR5	GGCTTTCTATTAAAGTTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTATCTTATAGTTTTC
CMAR3	GTCTTTCTATTAAAGTTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTATCTTATAGTTTTC
CMAR15	GGCTTTCTATTAAAGTTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTGTCTTATAGTTTTC
CMAR2	GGCTTTCTATTAAAGTTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTATCTTATAGTTTTC

CMAR14	GGCTTTCTATCAAGTTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTAICTTATAGTTTTCC
CMAR4	GGCTTTCTATTAAGTTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTATCTTATAGTTTTCC
CMAR17	GGCTTTCTATTAAGTTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTATCTTATAGTTTTCC
CMAR6	GGCTTTCTATTAAGTTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTGTCTTATAGTTTTCC
CMAR16	GGCTTTCTATTAAGTTGGATGCTATAAGTGGTATTCTTAGTACTTTATCTTATAGTTTTCC
CMAR1	GGCTTTCTATTAAGTTGGATGCTATAAGCGGCATTCTTAGTACTTTATCTTATAGTTTTCC
	* * * * *

COSA1	CTGTGGTGGGGGTATTCTATGGTCAATGTTTCGGAAATTTGTGGTGCAAACCATAGTTTTA
COSA3	CTGTGGTGGGGGTATTCTATGGTCAATGTTTCGGAAATTTGTGGTGCAAACCATAGTTTTA
COSA2	CTGTGGTGGGGGTATTCTATGGTCAATGTTTCGGAAATTTGTGGTGCAAATCATAGTTTTA
CBAI1	CTGTGGTGGGGGTATTTTATGGTCAATGCTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CBAI3	CTGTGGTGGGGGTATTTTATGGTCAATGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CBAI2	CTGTGGTGGGGGTATTTTATGGTCAATGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CBAI4	CTGTGGTGGGGGTATTTTATGGTCAATGCTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
COSB1	CTGTGGTGGGAGTGTTCTATGGGCAGTGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
COSB10	CTGTGGTGGGAGTGTTCTATGGGCAGTGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
COSB5	CTGTGGTGGGAGTGTTCTATGGGCAGTGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
COSB6	CTGTGGTGGGAGTGTTCTATGGGCAGTGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
COSB9	CTGTGGTGGGAGTGTTCTATGGGCAGTGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
COSB8	CTGTGGTGGGAGTGTTCTATGGGCAGTGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
COSB3	CTGTGGTGGGAGTGTTCTATGGGCAGTGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
COSB2	CTGTGGTGGGAGTGTTCTATGGGCAGTGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
COSB4	CTGTGGTGGGAGTGTTCTATGGGCAGTGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
COSB7	CTGTGGTGGGAGTGTTCTATGGGCAGTGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
COSC1	CTGTGGTGGGCGTGTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
COSC3	CTGTGGTGGGCGTGTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
COSC2	CTGTGGTGGGCGTGTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
PCYS2	CTGTGGTAGGGGTATTTTATGGTCAATGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
PCYS3	CTGTGGTAGGTGTATTTTATGGTCAATGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
PHOP6	CTGTGGTAGGTGTATTTTATGGTCAATGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
PHOP7	CTGTGGTTGGTGATTTTATGGTCAATGTTTCGGAAATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
COSD2	CTGTGGTAGGAGTATTTTATGGGCAATGCTCTGAGATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
COSD3	CTGTGGTAGGAGTATTTTATGGGCAATGCTCTGAGATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
COSD1	CTGTGGTAGGAGTATTTTACGGGCAATGCTCTGAGATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
COSE5	CTGTGGTAGGAGTATTTTATGGGCAATGTTCTGAGATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
COSE3	CTGTGGTAGGAGTATTTTATGGGCAATGTTCTGAGATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
COSE1	CTGTGGTAGGAGTATTTTATGGGCAATGTTCTGAGATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
COSE2	CTGTGGTAGGAGTATTTTATGGGCAATGTTCTGAGATTTGCGGTGCTAATCATAGTTTTA
COSE4	CTGTGGTAGGAGTATTTTATGGGCAATGTTCTGAGATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
CMIR10	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAATGCTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR11	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAATGCTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR2	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR6	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR15	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR16	CTCTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR1	CTTTGGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
CMIR4	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR17	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR5	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR14	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR8	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGTGTTAACCATAGTTTTA
CMIR12	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR13	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR9	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGCCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CMIR3	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGCCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
CMIR7	CTTTGGTTGGGGTTTTTATGGCCAGTGTTCTGAAATTTGTGGGGCTAACCATAGTTTTA
CMIR18	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGCCAATGTTCTGAAATTTGTGGTGCCAACCATAGTTTTA
CRAD1	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
CRAD2	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
CRAD4	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGGGCTAACCATAGTTTTA
CRAD3	CTTTGGTTGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
COGM1	CTCTTGTGGGAGTTTTTATGGTCAGTGTTTCAGAAATCTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA

COGM2	CTCTTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAGTGTTGCGAAATCTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
COGM3	CTCTTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAGTGTTGAGAAATCTGTGGGGCTAACCATAGTTTTTA
CMAR7	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAACGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
CMAR13	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTTA
CMAR8	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
CMAR5	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
CMAR3	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
CMAR15	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
CMAR2	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
CMAR14	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
CMAR4	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMAR17	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
CMAR6	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMAR16	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
CMAR1	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTTA
	** * ** ** ** ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

COSA1	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSA3	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSA2	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
CBAI1	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
CBAI3	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
CBAI2	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
CBAI4	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSB1	TGCCTATCGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSB10	TGCCTATCGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSB5	TGCCTATCGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSB6	TGCCTATCGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSB9	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSB8	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSB3	TGCCTATTGCTTTAGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSB2	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSB4	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSB7	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSC1	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSC3	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSC2	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
PCYS2	TGCCTATCGCCTTTGGAGGTAACTTTGTTAGATAATTTTA
PCYS3	TGCCTATCGCCTTTGGAGGTAACTTTATTAGATAATTTTA
PHOP6	TGCCATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTAGATAATTTTA
PHOP7	TGCCATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTAGATAATTTTA
COSD2	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTGTTGGATAATTTTA
COSD3	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTGTTGGATAATTTTA
COSD1	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTTTGTTGGATAATTTTA
COSE5	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSE3	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSE1	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSE2	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
COSE4	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTTGGATAATTTTA
CMIR10	TACCTATTGCTTTAGAGGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR11	TACCTATTGCTTTAGAGGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR2	TGCCTATTGCTTTAGAGGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR6	TGCCTATTGCTTTAGAGGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR15	TGCCTATTGCTTTAGAGGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR16	TGCCTATTGCTTTAGAGGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR1	TGCCTATTGCTTTAGAAGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR4	TGCCTATTGCTTTAGAAGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR17	TGCCTATTGCTTTAGAAGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR5	TGCCTATTGCTTTAGAAGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR14	TGCCTATTGCTTTAGAAGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR8	TGCCTATTGCTTTAGAAGTGTCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR12	TGCCTATTGCTTTAGAAGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA
CMIR13	TGCCTATTGCTTTAGAAGTGGCTTTGTTAGATAATTTTA

CMIR9	TGCCTATTGCTTTAGAAGTGGCTTTGTTAGATAAATTTTA
CMIR3	TGCCTATTGCTTTAGAAGTGGCTTTGTTAGATAAATTTTA
CMIR7	TGCCTATTGCTTTAGAAGTGGCTTTGTTAGATAAATTTTA
CMIR18	TGCCTATTGCTTTAGAAGTGGCTTTGTTAGATAAATTTTA
CRAD1	TGCCTATTGCTTTGGAAGTGGCCTTGTTAGATAAATTTTA
CRAD2	TGCCTATTGCTTTGGAAGTGGCCTTGTTAGATAAATTTTA
CRAD4	TGCCCATTGCTTTGGAAGTGGCTTTGTTAGATAAATTTTA
CRAD3	TGCCTATTGCTCTGGAAGTGGCTTTGTTAGATAAATTTTA
COGM1	TACCTATTGCTTTGGAGGTGACTTTGTTGGATAAATTTTA
COGM2	TACCTATTGCTTTGGAGGTGACTTTGTTGGATAAATTTTA
COGM3	TACCTATTGCTTTGGAGGTGACTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR7	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR13	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR8	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR5	TGCCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR3	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR15	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR2	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR14	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR4	TGCCTATTGCTTTAGAGGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR17	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR6	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR16	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA
CMAR1	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTTGTTGGATAAATTTTA

* * * * *

APPENDICE B

Allineamento delle sequenze ottenute dall'amplificazione del gene della *cox-2* degli individui di *Pseudoterranova*, parassiti allo stadio adulto di pinnipedi.

PCA6	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAGTTGGGTGAACTTTTATGTAGTATTT
PCA1	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAGTTGGGTGAACTTTTATGTAGTATTT
PCA4	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAGTTGGGTGAACTTTTATGTAGTATTT
PCA3	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAGTTGGGTGAACTTTTATGTAGTATTT
PCA5	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAGTTGGGTGAACTTTTATGTAGTATTT
PCA2	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAGTTGGGTGAACTTTTATGTAGTATTT
PDE2	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAGATTGAGTATCAGTTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PDE1	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAGTTGGGTGAACTTTTATGTAGTATTT
PBU1	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAGATTGAGTATCAGTTAGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PBU5	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAGATTGAGTATCAGTTAGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PBU2	GTTTTTACTTCAAGAGGAAAAAGATTGAGTATCAGTTAGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PBU4	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAGATTGAGTATCAGTTAGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PBU6	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAGATTGAGTATCAGTTAGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PBU3	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAGATTGAGTATCAGTTAGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PAZ1	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PAZ8	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PAZ3	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PAZ6	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PAZ2	GTTTTTACTTTAAAAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PAZ10	GTTTTTACTTTAAAAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PAZ4	GTTTTTACTTTAAAAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PAZ5	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAGCTTTTGTGTAGTATTT
PAZ7	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PAZ9	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PKR1	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PKR5	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PKR2	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PKR4	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PKR3	GTTTTTACTTTAAGAGGAAAAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAACTTTTGTGTAGTATTT
PDS4	GATTTTATTTTAAGAGTAAGAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAGCTTTTGTGTAGTATTT
PDS11	GATTTTATTTTAAGAGTAAGAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAGCTTTTGTGTAGTATTT
PDS8	GATTTTATTTTAAGAGTAAGAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAGCTTTTGTGTAGTATTT
PDS10	GATTTTATTTTAAGAGTAAGAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAGCTTTTGTGTAGTATTT
PDS2	GATTTTATTTTAAGAGTAAGAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAGCTTTTGTGTAGTATTT
PDS5	GATTTTATTTTAAGAGTAAGAAAATTGAGTATCAATTAGGTGAGCTTTTGTGTAGTATTT
PDS9	GATTTTATTTTAAGAGTAAGAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAGCTTTTGTGTAGTATTT
PDS3	GATTTTATTTTAAGAGTAAGAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAGCTTTTGTGTAGTATTT
PDS6	GATTTTATTTTAAGAGTAAGAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAGCTTTTGTGTAGTATTT
PDS1	GATTTTATTTTAAGAGTAAGAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAGCTTTTGTGTAGTATTT
PDS7	GATTTTATTTTAAGAGTAAGAAAATTGAGTATCAATTGGGTGAGCTTTTGTGTAGTATTT

* * * * *

PCA6	TTCCTACTTTAATTTTGGTGGCTCAAATGGTGCCCTCTTTAAGTCTTCTTTATTATTATG
PCA1	TTCCCACTTTAATTTTGGTGGCTCAAATGGTACCCTCTTTAAGTCTTCTTTATTATTATG
PCA4	TTCCTACTTTAATTTTGGTGGCTCAAATGGTACCCTCTTTAAGTCTTCTTTATTATTATG
PCA3	TTCCTACTTTAATTTTGGTGGCTCAAATGGTACCCTCTTTAAGTCTTCTTTATTATTATG
PCA5	TTCCTACTTTAATTTTGGTGGCTCAAATGGTACCCTCTTTAAGTCTTCTTTATTATTATG
PCA2	TTCCTACTTTAATTTTGGTGGCTCAAATGGTACCCTCTTTAAGTCTTCTTTATTATTATG
PDE2	TTCCTACTTTAATTTTGGTGGCTCAAATGGTACCCTCTTTGAGTCTTCTTTATTATTATG
PDE1	TTCCTACTTTAATTTTGGTGGCTCAAATGGTACCCTCTTTGAGTCTTCTTTATTATTATG
PBU1	TTCCTACTTTGATTTTGGTGGCTCAGATGGTACCCTCTTTAAGTCTTCTTTATTATTATG
PBU5	TTCCTACTTTGATTTTGGTGGCTCAGATGGTACCCTCTTTAAGTCTTCTTTATTATTATG
PBU2	TTCCTACTTTGATTTTGGTGGCTCAGATGGTACCCTCTTTAAGTCTTCTTTATTATTATG
PBU4	TTCCTACTTTGATTTTGGTGGCTCAGATGGTACCCTCTTTAAGTCTTCTTTATTATTATG
PBU6	TTCCTACTTTGATTTTGGTGGCTCAGATGGTACCCTCTTTAAGTCTTCTTTATTATTATG
PBU3	TTCCTACTTTGATTTTGGTGGCTCAGATGGTACCCTCTTTAAGTCTTCTTTATTATTATG

PDS9 GTTTGATAAAATTTGGACAGTAACCTTAACCTGTTAAAGTCACTGGCCATCAGTGGTATTGGA
PDS3 GTTTGATAAAATTTGGACAGTAACCTTAACCTGTTAAAGTCACTGGCCATCAGTGGTATTGGA
PDS6 GTTTGATAAAATTTGGACAGTAACCTTAACCTGTTAAAGTCACTGGCCATCAGTGGTATTGGA
PDS1 GTTTGATAAAATTTGGACAGTAACCTTAACCTGTTAAAGTCACTGGCCATCAGTGGTATTGGA
PDS7 GTTTGATAAAATTTGGACAGTAACCTTAACCTGTTAAAGTTACTGGCCATCAGTGGTATTGGA
* *

[illegible]

PCA6	AATTAGAATTGGGGGAGCCACGTTTGTGGAGGTGGATAATCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PCA1	AATTAGAATTGGGGGAGCCACGTTTGTGGAGGTGGATAATCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PCA4	AATTAGAATTGGGGGAGCCACGTTTGTGGAGGTGGATAATCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PCA3	AATTAGAATTGGGGGAGCCACGTTTGTGGAGGTGGATAATCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PCA5	AATTAGAATTGGGGGAGCCACGTTTGTGGAGGTGGATAATCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PCA2	AATTAGAATTGGGGGAGCCACGTTTGTGGAGGTGGATAATCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PDE2	AATTAGAGTTGGGAGAGCCGCGTTTGTGGAGGTGGATAATCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PDE1	AATTAGAGTTGGGAGAGCCGCGTTTGTGGAGGTGGATAATCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PBU1	AATTAGAGTTGGGGGAGCCGCGTTTGTAGAGGTGGACAACCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PBU5	AATTAGAGTTGGGGGAGCCGCGTTTGTAGAGGTGGACAACCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PBU2	AATTAGAGTTGGGGGAGCCGCGTTTGTAGAGGTGGACAACCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PBU4	AATTAGAGTTGGGGGAGCCGCGTTTGTAGAGGTGGACAACCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PBU6	AATTAGAGTTGGGGGAGCCGCGTTTGTAGAGGTGGACAACCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG
PBU3	AATTAGAGTTGGGGGAGCCGCGTTTGTAGAGGTGGACAACCGTTGTGTTGTTCCCTTGTG

PDS9 ACACTAATATTTCGTTTTTGATTACTTCTGGTGATGTAATTCATTCTTTGGGCTTTGCCTA
PDS3 ACACTAATATTTCGTTTTTGATTACTTCTGGTGATGTAATTCATTCTTTGGGCTTTGCCTA
PDS6 ACACTAATATTTCGTTTTTGATTACTTCTGGTGATGTAATTCATTCTTTGGGCTTTGCCTA
PDS1 ACACTAATATTTCGTTTTTGATTACTTCTGGTGATGTAATTCATTCTTTGGGCTTTGCCTA
PDS7 ACACTAATATTTCGTTTTTGATTACTTCTGGTGATGTAATTCATTCTTTGGGCTTTGCCTA
 * * * * *

[illegible]

PCA6	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAACCATAGTTTTA
PCA1	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAACCATAGTTTTA
PCA4	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAACCATAGTTTTA
PCA3	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAACCATAGTTTTA
PCA5	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAACCATAGTTTTA
PCA2	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAACCATAGTTTTA
PDE2	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAACCATAGTTTTA
PDE1	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAACCATAGTTTTA
PBU1	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATCTGTGGGGCTAACCATAGGTTTA
PBU5	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATCTGTGGGGCTAATCATAGGTTTA
PBU2	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATCTGTGGGGCTAATCATAGGTTTA
PBU4	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATCTGCGGGGCTAATCACAGGTTTA
PBU6	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATCTGCGGGGCTAATCACAGGTTTA
PBU3	CTACTGTGGGTGTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATCTGCGGGGCTAATCACAGGTTTA

PAZ1 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PAZ8 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PAZ3 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PAZ6 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PAZ2 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PAZ10 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PAZ4 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PAZ5 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PAZ7 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PAZ9 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PKR1 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PKR5 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PKR2 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PKR4 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PKR3 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PDS4 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAATCATAGTTTTA
PDS11 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAATCATAGTTTTA
PDS8 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAGATTTGCGGGGCTAATCATAGTTTTA
PDS10 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAATCATAGTTTTA
PDS2 CTACTGGGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAATCATAGTTTTA
PDS5 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAATCATAGTTTTA
PDS9 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAATCATAGTTTTA
PDS3 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAATCATAGTTTTA
PDS6 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGCGGGGCTAATCATAGTTTTA
PDS1 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA
PDS7 CTACTGTGGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGATTTGTGGGGCTAATCATAGTTTTA

PCA6 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PCA1 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PCA4 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PCA3 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PCA5 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PCA2 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PDE2 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PDE1 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PBU1 TACCTATTGCTTTGGAAGTAACCTCTGCTTGATAATTTTA
PBU5 TACCTATTGCTTTGGAAGTAACCTCTGCTTGATAATTTTA
PBU2 TACCTATTGCTTTGGAAGTAACCTCTGCTTGATAATTTTA
PBU4 TACCTATTGCTTTGGAAGTAACCTCTGCTTGATAATTTTA
PBU6 TACCTATTGCTTTGGAAGTAACCTCTGCTTGATAATTTTA
PBU3 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTCTGCTTGATAATTTTA
PAZ1 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PAZ8 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PAZ3 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PAZ6 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PAZ2 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PAZ10 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PAZ4 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PAZ5 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PAZ7 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PAZ9 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PKR1 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PKR5 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PKR2 TACCTATTGCTTTACAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PKR4 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PKR3 TACCTATTGCTTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PDS4 TACCTATCGCCTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PDS11 TACCTATCGCCTTAGAAGTAACCTTTACTCGATAATTTTA
PDS8 TACCTATCGCCTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PDS10 TACCTATCGCCTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA
PDS2 TACCTATCGCCTTAGAAGTAACCTTTACTTGAAATTTTA
PDS5 TACCTATCGCCTTAGAAGTAACCTTTACTTGATAATTTTA

PDS9
PDS3
PDS6
PDS1
PDS7

TACCTATCGCCTTAGAAGTAACTTTACTTGATAATTTTA
TACCTATCGCCTTAGAAGTAACTTTACTTGATAATTTTA
TACCTATCGCCTTAGAAGTAACTTTACTTGATAATTTTA
TACCTATCGCCTTAGAAGTAACTTTACTTGATAATTTTA
TACCTATCGCCTTAGAAGTAACTTTACTTGATAATTTTA
***** ** ** ***** * ** ** * *****

LAVORI CONSULTATI

Arduino P., Nascetti G., Cianchi R., Plötz J., Mattiucci S., D'Amelio S., Paggi L., Orecchia P. and Bullini L. (1995). Isozyme variation and taxonomic rank of *Contracaecum radiatum* (v. Linstow, 1907) from the Antarctic Ocean (Nematoda, Ascaridoidea). *Syst. Parasitol.*, **30**: 1-9.

Arnason, U., Bodin, K., Gullberg, A., Ledje, C., Mouchaty, S. (1995). A molecular view of pinniped relationships with particular emphasis on the true seals. *J. Mol. Evol.*, **40**: 78–85.

Arnason, U., Gullberg A., Janke A., Kullberg M., Lehman N., Petrov E. A., Väinölä R. (2006). Pinniped phylogeny and a new hypothesis for their origin and dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution.*, **41**: 345–354.

Avise J.C., Saunders N.C. (1984). Hybridization and introgression among species of sunfish (genus *Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. *Genetics*, **108**: 237-255.

Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigl J.E., Reeb C.A., Saunders N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. and Syst.*, **18**: 489-522.

Baylis, H.A. (1916). Some ascarids in the British Museum (Nat. Hist.). *Parasitology* **8**: 360–378.

Baylis, H.A. (1937). On the Ascarids parasitic in seals, with special reference to the genus *Contracaecum*. *Parasitology.*, **24**: 121-130.

Berland B. (1961). Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia.*, **2**: 1-50.

Berland B. (1964). *Phocascaris cystophorae* sp. Nov. (Nematoda) from the hooded seal, with an emendation of the genus. *Årbok for Universitetet i Bergen, Mat.-naturv., Series* 1963, **17**: 1-21.

Berta, A., and. Deméré T.A. (1986). *Callorhinus gilmorei* n.sp. (Carnivora: Otariidae) from the San Diego Formation (Blancan) and its implications for otariid phylogeny. *Transactions of the San Diego Society of Natural History* **21(7)**: 111-126.

Beveridge I. & Chilton N.B. (2001). Coevolutionary relationships between the nematode subfamily Cloacininae and its macropoid marsupial hosts. *Int. J. Parasitol.*, **31(9)**: 976-996.

Bininda-Emonds, O., and Russell. A.P. (1996). A morphological perspective on the phylogenetic relationships of the extant phocid seals (Mammalia: Carnivora: Phocidae). *Bonner Zoologische Monographien.*, **41**: 1-256.

Blouin M.S., Yowell A.C., Courtney C.H., Dame J.B. (1998). Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. *Mol. Biol. And Evol.*, **15**: 1719-1727.

Bonner, W.N. (1990). The natural history of seals. *New York: Facts on File*.

Brand M.D. (1997) Regulation analysis of energy metabolism. *J. Exp. Biol.* **200**: 193-202.

Bratney, J., and Stenson, G. B. (1993). Host specificity and abundance of parasitic nematodes (Ascaridoidea) from the stomachs of five phocid species from Newfoundland and Labrador. *Can. J. Zool.*, **71**: 2156–2166.

Bratney, J., and Davidson, W.S. (1996). Genetic variation within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda: Ascaridoidea) from Canadian Atlantic marine fishes and seals: Characterization by RFLP analysis of genomic DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **53**: 333–341.

Brawn W.M., George M.Jr., Wilson A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 967-1971.

Bridge D., Cunningham C.W., Schierwater B., Desalle R., Buss L.W. (1992). Classlevel relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. *Proc. Natl Acad. Sci., USA* **89**: 8750-8753.

Bristow, G.A., and Berland, B. (1992). On the ecology and distribution of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda: Anisakidae) in an intermediate host, *Hippoglossoides platessoides*, in northern Norwegian waters. *Int. J. Parasitol.*, **22**: 203–208.

Brooks D.R. (1979). Testing the context and extent of host-parasite coevolution. *Syst Zool.*, **28**: 299-307.

Brooks D.R. (1981). Hennig's parasitological method: A proposed solution. *Syst Zool.*, **30**: 229-249.

Brooks D.R. (1990). Parsimony analysis in historical biogeography and coevolution: methodological and theoretical update. *Syst Zool.*, **39**: 14-30.

Brooks D.R., McLennan D.A. (1991). Phylogeny, ecology, and behavior. A research program in comparative biology. The University of Chicago Press, London.

Brooks D.R., McLennan D.A. (1993). Parascript. Smithsonian series in Comparative Evolutionary Biology, Washington and London.

Brooks D.R., McLennan D.A. (2002). The nature of diversity. The University of Chicago Press, London.

Bullini L., Arduino P., Cianchi R., Nascetti G., D'Amelio S., Mattiucci S., Paggi L., Orecchia P., Plotz J., Smith J.H., Brattey J. (1997). Genetic and ecological research on Anisakid endoparasites of fish and marine mammals in the Antarctic and

Arctic-Boreal regions. *Antar. Comm.: Species, Structure and Survival*. Edited by Battaglia, Valencia and Walton: 39-44.

Bullini L., Pignatti S., Virzo De Santo. (1998). *Ecologia generale*. Ed. UTET, Torino, 1998, p.p. 520.

Cavalli-Sforza, L. L., and Edwards, A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.*, **19**: 233–257.

Chapman R.W., Stephens J.C., Lansman R.A., Avise J.C. (1982). Models of mitochondrial DNA transmission genetics and evolution in higher eucaryotes. *Genet. Res.*, **40**: 41-57.

Charleston M.A. (1998). Jungles: a new solution to the host-parasite phylogeny reconciliation problem. *Math Biosh.*, **149**: 191-223.

Clayton D.H., Bush S.E., Goates B.M., Johnson K.P. (2003). Host defense reinforces host-parasite cospeciation. *Proc Natl Acad Sci., USA* **100**: 15694-99.

Criscione C.D., Poulin R., Blouin M.S. (2005). Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol. Ecol.*, **14**: 2247-2257.

D'Amelio S., Mattiucci S., Paggi L., Koie M., Podvyaznaya I., Pugachev O., Rusinek O., Timoskhkin O., and Nascetti G. (1995). Taxonomic rank and origin of *Contracaecum osculatum baicalensis* Mozgovoy and Ryjikov, 1950, parasite of *Phoca sibirica* from Lake Baikal, with data on its occurrence in fish hosts. "Abstracts, IVth International Symposium of Fish Parasitology, Munich", October 3-7 2005, "27.

Dailey, M.D. (1975). The distribution and intraspecific variation of helminth parasites in pinnipeds. *Rapport et process verbaux des Reunions-Conseil International pour l'exploration de la Mer.*, **169**: 338-352.

Davies, J.L. 1958a. The Pinnipedia: an essay in zoogeography. *Geographical Review.*, **48**: 474-493.

Deardorff T. L., and Overstreet R. M. (1981). *Terranova ceticola* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from the dwarf sperm whale; *Kogia simus* (Owen), in the Gulf of Mexico. *Syst. Parasitol.*, **3**: 25–28.

Deljamure S.L. (1955). *Helminthofauna of marine mammals (Ecology and Phylogeny)*, ed. Skrjabin, *Academy of Sciences U.S.S.R.* National Technical Information Service, U.S. Department of Commerce, Springfield.

Deméré T.A., Berta A., and Peter J. Adam (2003). Pinnipedimorph Evolutionary Biogeography. Chapter 3.

Desdèvises Y., Morand S., Jousson O., Legendre P. (2002). Coevolution between *Lamellodiscus* (Monogenea) and Sparidae (Teleostei): the study of a complex host-parasite system. *Evolution* **56**: 2459-2471.

Fagerholm H.P. & Gibson D.I. (1987). A redescription of the pinniped parasite *Contracaecum ogmorhini* (Nematoda, Ascaroidea) with an assessment of its antiboreal circumpolar distribution. *Zool. Scr.*, **16**:19-24.

Fagerholm, H.P. (1988) Patterns of caudal papillae in *Contracaecum osculatum* (Nematoda) and some related species from different regions of the world. *International Journal for Parasitology.*, **18**: 1039-1051.

Fagerholm, H.P. (1989) Intra-specific variability of the morphology in a single population of the seal parasite *Contracaecum osculatum* (Rudolphi) (Nematoda, Ascaridoidea), with a redescription of the species. *Zoologica Scripta.*, **16**: 19-24.

Farris J.S. (1972). Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Amer. Natural.*, **106**: 645-668.

Felsenstein J. (1973). Maximum Likelihood and Minimum-Steps Methods for Estimating Evolutionary Trees from Data on Discrete Characters. *Syst Zool.*, **22(3)**: 240-249.

Felsenstein J. (1981). Skepticism towards Santa Rosalia, or why are there so few kinds of animals? *Evolution.*, **35**: 124-138.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.*, **39**: 783-791.

Felsenstein J. & Kishino H. (1993). Is there something wrong with the bootstrap on phylogenies? A reply to Hills and Bull. *Sist. Biol.*, **42**: 193-200.

Fitch W.M. & Farris J.S. (1974). Evolutionary trees with minimum nucleotide replacements from amino acid sequences. *J. Mol. Evol.*, **3**: 263-278.

Forster P., Torroni A., Renfrew C., Röhl A. (2001). Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Mol Biol. Evol.*, **18**: 1864-1881.

George-Nascimento, M., and Llanos, A. (1995). Micro-evolutionary implications of allozymic and morphometric variations in sealworms *Pseudoterranova* sp. (Ascaridoidea: Anisakidae) among sympatric hosts from the southeastern Pacific Ocean. *Int. J. Parasitol.*, **25**: 1163–1171.

George-Nascimento M., and Urrutia X. (2000). *Pseudoterranova cattani* sp. nov. (Ascaridoidea: Anisakidae), a parasite of the South American sea lion *Otaria byronia* De Blainville from Chile. *Revta Chil. Hist. Nat.*, **73**: 93–98.

Gibson D. I., and Colin J. A. (1982). The Terranova enigma. *Parasitology* 85, XXXVI–XXXVII.

Gibson D. I. (1983). The systematics of ascaridoid nematodes: A current assessment. In “Concepts in Nematode Systematics” (A. R. Stone, H. M. Platt, and L. F. Khalil, eds.) pp. 321–338. Academic Press, New York.

Gyllesten U., Wharton D., Wilson A.C. (1985). Maternal inheritance of mitochondrial DNA during backcrossing of two species of mice. *J. Hered.*, **76**: 321-324.

Graeber M.B., Muller U. (1998). Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders. *J. Neurol. Sci.*, **153**: 251-263.

Hafner M.S., Nadler S.A. (1988). Phylogenetic trees support the coevolution of parasites and their hosts. *Nature.*, **332**: 258-59.

Hafner M.S., Nadler S.A. (1990). Cospeciation in host-parasite assemblages: comparative analysis of rates of evolution and timing of cospeciation event. *Syst Zoo.*, **139**: 192-204.

Hafner M.S., Sudman P.D., Villablanca F.X., Spradling T.A., Demastes J.W., Nadler S.A. (1994). Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science.*, **265**: 1087-90.

Hartwich G. (1957). Zur Systematik der Nematoden-Superfamilie Ascaridoidea. *Zool. Jb., Abteilung für Systematik, Jena.*, **85**: 211–252.

Hartwich G. (1974). Keys to genera of the Ascaridoidea. In “CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates” (R. C. Anderson, A. G. Chabaud, and S. Wilmott, eds.), p. 153. Farnham Royal, Commonwealth Agriculture Bureau, Richmond.

Hills D.M. & Bull J.J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, **42**: 182-192.

Hoberg E.P. (1992). Congruent and synchronic patterns in biogeography and speciation among seabirds, pinnipeds, and cestodes. *J. Parasitol.*, **78**: 601-15.

Höst, P. (1932). *Phocascaris phocae* n. gen. n. sp., eine neue Askaridenart aus *Phoca groenlandica*. *Fabr. Zbl. Bakt. 1Ab. Orig.*, **125**: 335-340.

Hugall A., Stanton J., Morotz C. (1997). Evolution on the AT-rich mitochondrial DNA of the root Knot nematode, *Meloidogyne hapla*. *Mol. Biol. Evol.*, **14**: 40-48.

Huyse T., Volckaert F.A. (2005). Comparing host and parasite phylogenies: *Gyrodactylus* flatworms jumping from goby to goby. *Syst. Biol.*, **54**: 710-8.

Humphery-Smith I. (1989). The evolution of phylogenetic specificity among parasitic organisms. *Parasitol Today.*, **5**: 385-87.

Jackson A.P., Charleston M.A. (2004). A cophylogenetic perspective of RNA-virus evolution. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 45-57.

Johnson K.P., Adams R.J., Page R.D.M., Clayton D.H. (2003). When do parasites fail to speciate in response to host speciation? *Syst. Biol.*, **52**: 37-47.

Johnston T.H. & Mawson P.M. (1941) Nematodes from Australian marine mammals. *Rec. S. Aust. Mus.*, **6**: 429-434.

Johnston, T.H. & Mawson, P.M. (1945) Parasitic nematodes. *Report of the British, Australia, and New Zealand Antarctic Research Expedition 1929-1931*, ser B., **5**: 73-159.

Karokhin, V. I. (1946). Two new species of *Porrocaecum* from Siberian birds of prey. In “Helminthological collection, Nauka, Moscow” (V. P. Pod’yanolskaya, ed.), pp. 132–141. In Russian.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J.Mol. Evol.*, **16**: 111-120.

Kimura M. (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, MA.

Klassen G.J. (1992). Coevolution: A history of the macroevolutionary approach to studying host parasite associations. *J. Parasitol.*, **78**: 573-587.

Klöser, H., Plötz, J. (1992), J., Palm, H., Bartsch, A. & Hubold, G. (1992) Adjustment of anisakid nematode life cycles to the high Antarctic food web as shown by *Contracaecum radiatum* and *C. osculatum* in the Weddell sea. *Antarctic Science.*, **4**: 171-178.

Klöser H. & Plötz J. (1992) Morphological distinction between adult (*Contracaecum osculatum* and *Contracaecum radiatum* (Nematoda, Anisakidae) from the Weddell Seal (*Leptonychotes weddelli*). *Zoologica scripta.*, **21**: 129-132.

Knox G.A. (1994). The biology of the southern ocean. Cambridge: Cambridge University Press.

Kohno N., L.G. Barnes, and K. Hirota. (1995a). Miocene fossil pinnipeds of the genera *Prototaria* and *Neotherium* (Carnivora; Otariidae; Imagotariinae) in the North Pacific Ocean: evolution, relationships and distribution. *Island Arc* **3(4)**: 285-308.

Legendre P., Desdevises Y., Bazin E. (2002). A statistical test for host-parasite coevolution. *Syst Biol.*, **51**: 217-234.

MacKenzie K. (1990). Cestode parasites as biological tags for mackerel (*Scomber scombrus* L.) in the Northeast Atlantic. *J. Cons. Int. pour l'Explor. La Mer.*, **46** :155-166.

MacKenzie K. (2002). Parasites as biological tags in population studies of marine organism: an update. *Parasitology.*, **124**: S153-S163.

Marcogliese D.J. (2005). Parasites of the superorganisms: are they indicators of ecosystem health? *Int J. Parasitol.*, **35(7)**: 705-716.

Mattiucci S., Nascetti G., Bullini L., Orecchia P., Paggi L. (1986). Genetic structure of *Anisakis physeteris* and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascarida: Anisakidae). *Parasitology*, **93**: 383-387.

Mattiucci S., Nascetti G., Cianchi R., Paggi L., Arduino P., Margolis L., Bratney J., Webb S.C., D'Amelio S., Orecchia P., Bullini L. (1997a). Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species. (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J. Parasitol.*, **83**: 401-416.

Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Ishikura H., Kikuchi K., Sato N., Cianchi R., Bullini L. (1998). Allozyme and morphological identification of *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda: Ascaridoidea). *Syst. Parasitol.*, **40**: 81-92.

Mattiucci S., Nascetti G., Santos C.P., Cianchi R., Di Benedetto C., Ramos R., Bullini L., Paggi L. (2000). *Anisakis typica* (Diesing, 1860) (Nematoda: Anisakidae): genetic variation and divergence from the other species of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845. *Parassitologia*, **42(Suppl. 1)**: 175.

Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Abollo E., Webb S.C., Pascual S., Cianchi R., Bullini L. (2001). Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physetheris* (Nematoda: Anisakidae). *Int. J. Parasitol.*, **31**: 9-14.

Mattiucci S., Turchetto M., Brigantini F., Nascetti G., (2002). On the occurrence of the sibling species of *Contracaecum rudolphii* complex (Nematoda: Anisakidae) in cormorants (*Phalacrocorax carbo sinensis*) from Venice and caorle lagoons: genetic markerse and ecological studies. *Parassitologia*, **44 (suppl. 1)**: 105.

Mattiucci S., Cianchi R., Nascetti G., Paggi L., Sardella N., Timi J., Webb S.C., Bastida R., Rodriguez D., Bullini L. (2003). Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson (1941) (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. *Syst. Parasitol.*, **54**:13-23.

Mattiucci S., Abaunza P., Ramadori L., Nascetti G. (2004). Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *J.Fish Biol.*, **65** (2): 495-510.

Mattiucci S., Nascetti G., Dailey M., Webb S.C., Barros N., Cianchi R., Bullini L. (2005). Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.*, **61**: 157-171.

Mattiucci S. & Nascetti G. (2006). Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasité.*, 13: in press.

Mattiucci S., Paoletti M., Contadini R., Nascetti G. (2006). “Relazioni genetiche tra specie del genere *Contracaecum* (Reyllet & Henry, 1912), parassiti di pinnipedi ed aspetti co-evolutivi ospite-parassita”. *XVI Congressi S.It.E.*, 19-22 Settembre 2006, Viterbo-Civitavecchia.

Mattiucci S., Abaunza P., Damiano S., Garcia A., Santos M. N., and Nascetti, G. (2007a). Distribution of *Anisakis* larvae identified by genetic markers and their use for stock characterization of demersal and pelagic fish from European waters: An update. *J. Helminthol.*, **81**: 117–127.

Mattiucci S., Paoletti M., De Angelis M., Sereno S., and Cancrini G. (2007b). Human Anisakidosis in Italy: Molecular and histological identification of two new cases. Abstracts of the VII International Symposium on Fish Parasites: *Parassitologia.*, **49(suppl. 2)**: 226.

Mattiucci S. and Nascetti G. (2008). Advances and Trends in the Molecular Systematics of Anisakid Nematodes, with Implications for their Evolutionary Ecology and Host–Parasite Co-evolutionary Processes. *Advances in Parasitology.*, Chapter 2.

Mattiucci S., Farina V., Campbell N., Mackenzie K., Ramos P., Pinto A.L., Abaunza P., and Nascetti, G. (2008a). *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock identification. *Fish. Res.*, **89**: 146–171.

Mattiucci S., Paoletti M., Webb S.C., Sardella N., Timi J. T., Berland B., and Nascetti G. (2008b). Genetic relationships among species of *Contracaecum* Railliet and Henry, 1912 and *Phocascaris* Höst, 1932 (Nematoda: Anisakidae) from pinnipeds based on mitochondrial *cox2* sequences, and congruence with allozyme data. *Parasite.*, **15**(3).

Mattiucci S., Paoletti M., Olivero-Verbel J., Baldiris R., Arroyo-Salgado B., Garbin L., Navone G., and Nascetti G. (2008c). *Contracaecum bioccai* n. sp. from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* (L.) in Colombia (Nematoda: Anisakidae): Morphology, molecular evidence and its genetic relationship with congeners from fish-eating birds. *Syst. Parasitol.*, 69, 101–121.

Mayr E. (1942). *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.

McCarthy C. (1998-2005). *Crhomas*; Technelysium Pty. Ltd.

Moravec F. (1994). *Parasitic Nematodes of freshwater fishes of Europe*. Kluwer Academic Publishers., 144-145.

Moravec F., Vivas-Rodriguez C., Sholz T., Vargas-Vazquez J., Mendoza-Franco E., Schmitter-Soto JJ., Gonzales-Solis D. (1995). Nematodes parasitic in fishes of cenotes (=sinkholes) of the Peninsula of Yucatan, Mexico. Part 2. Larvae. *F. Parasitol.*, **42**: 199-210.

Morrison D.A. (2005). Networks in phylogenetic analysis: new tools for population biology. *Int. J. Parasitol.*, **35**: 567-582.

Mozgovoi A.A. (1951). Ascarids of mammals of the U.S.S.R. (Anisakidae). *Trudy gel' mint. Lab., Akademiya Nauk SSR* **5** : 12-22.

Mozgovoi A. A. (1953). Ascaridata of animals and man, and the diseases caused by them. Osn. Nemat. II. Izdatielstvo AN SSSR, Moskva, 616.

Myers B. J. (1959). Phocanema, a new genus for the anisakid nematode of seals. *Can. J. Zool.*, **37**: 459–465.

Muizon C. de. (1982). Phocid phylogeny and dispersal. *Annals of the South African Museum* **89(2)**: 175-213.

Murray M.G. & Thompson W.F. (1980). Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nuc. Ac. Res.*, **8**: 4321-4325.

Nadler, S. A. (1995). Microevolution and genetic structure of parasite populations. *J. Parasitol.*, **81**: 395–403.

Nadler S.A. & Hudspeth D.S.S. (2000). Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *J. Parasitol.*, **86**: 380-393.

Nadler S. A., D'Amelio S., Dailey M. D., Paggi L., Siu S., and Sakanari J.A. (2005). Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from Northern Pacific marine mammals. *J. Parasitol.*, **91**: 1413–1429.

Nadler S.A. (2005). Speciation and species delimitation. In “Marine Parasitology” (K. Rhode, ed.), pp. 349-345. CABI Publishing, Oxon.

Nascetti G., Paggi L., Orecchia P., Smith J.W. Mattiucci S., Bullini L. (1986). Electrophoretic studies on *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North East Atlantic. *Int. J. Parasitol.*, **16**: 633-640.

Nascetti G., Bullini L., Cianchi R., Paggi L., Orecchia P., Mattiucci S., D'Amelio S., Berland B. (1990). Genetic relationship among anisakid species belonging to the genera *Contracaecum* and *Phocascaris*. *Bull. Soc. Franc. Parasitol.*, **8 (suppl. 1)**: 261.

Nascetti G., Ishikura H., Sato N., Kikuchi K., Margolis L., D'Amelio S., Mattiucci S., Paggi L., Orecchia P., Cianchi R., Bullini L. (1992). Electrophoretic studies of *Anisakis* parasite from Japanese waters. *Proc. VIth European Multicolloquium of Parasitology*, September 7-11, 1992, the Hague, the Netherlands.

Nascetti G., Cianchi R., Mattiucci S., D'Amelio S., Orecchia P., Paggi L., Bratney J., Berland B., Smith J.W., Bullini L. (1993). Three sibling species within *Contracaecum osculatum* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) from the Atlantic Arctic-boreal region: reproductive isolation and host preferences. *Int. J. Parasitol.*, **23**: 105-120.

Nei M. & Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University press, New York.

Noble E.R., Noble G.A., Schad G.A., MacInnes A.J. (1989). *Parasitology*. The biology of animal parasites. 6th Edition. Lea and Febiger, Philadelphia.

Orecchia P., Berland B., Paggi L., Nascetti G., Mattiucci S., Bullini L. (1986). Divergenza genetica di specie dei generi *Contracaecum* e *Phocascaris* (Ascaridida, Anisakidae) con diverso ciclo biologico. *Ann. Ist. Sup. San.*, **22**: 345-348.

Orecchia P., Mattiucci S., D'Amelio S., Paggi L., Plotz J., Cianchi R., Nascetti G., Arduino P., Bullini L. (1994). Two new members in the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda, Ascaridoidea) from the Antarctic. *Int. J. Parasitol.*, **24**: 367-377.

Page R.D.M. (1990). Temporal congruence and cladistic analysis of biogeography and cospeciation. *Syst. Zool.*, **39**: 205-226.

Page, R.D.M. (1994). Parallel phylogenies: Reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics*, **10**: 155-173.

Page R.D.M. (1994). Maps between trees and cladistic analysis of historical associations among genes, organisms, and areas. *Syst. Biol.*, **43**: 58-77.

Page R.D.M., Hafner M.S. (1996). Molecular phylogenies of host-parasite cospeciation: gophers and lice as a model system. In: New uses for new phylogenies (Harvey PH, Brown AJL, Maynard Smith J, Nee S, Eds). Oxford University Press, Oxford.

Page R.D.M., Charleston M.A. (1998). Trees within trees – phylogeny and historical associations. *Trends Ecol Evol.*, **13**: 356-359.

Page R.D.M. & Holmes E. (1998). *Molecular evolution. A phylogenetic approach*. Blackwell Science., Oxford, **346 (3)**: pp. 315-334.

Page R.D.M. (Ed). (2003). Tangled Trees: Phylogeny, cospeciation, and coevolution. The University of Chicago (Press).

Paggi L., Nascetti G., Cianchi R., Orecchia P., Mattiucci S., D'Amelio S., Berland B., Bratney J., Smith J.W., and Bullini L. (1991). Genetic evidence for three species within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) in the North Atlantic and Norwegian and Barents Seas. *Int. J. Parasitol.*, **21**: 195–212.

Paggi, L., Mattiucci, S., D'Amelio, S., and Nascetti, G. (1998a). Nematodi del genere *Anisakis* in pesci, cefalopodi e cetacei del Mar Mediterraneo e dell'Oceano Atlantico e Pacifico. *Biol. Mar. Mediterr.*, **5**: 1585–1592.

Paggi L., Nascetti G., Webb S. C., Mattiucci S., Cianchi R., and Bullini L. (1998b). A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) from beaked whale (Ziphiidae): Allozyme and morphological evidence. *Syst. Parasitol.*, **40**: 161–174.

Paggi L., Mattiucci S., Ishikura H., Kikuchi K., Sato N., Nascetti G., Cianchi R., and Bullini L. (1998c). Molecular genetics in anisakid nematodes from the Pacific Boreal Region. In “Host Response to International Parasitic Zoonoses” (H. Ishikura, M. Aikawa, H. Itakura, and K. Kikuchi, eds.), pp. 83–107. Springer-Verlag, Tokyo.

Paggi L., Mattiucci S., Nascetti G., Santos C.P., Ramos R., Di Benedetto A.P., Cianchi R., Bullini L. (1999). *Anisakis typica* (Nematoda: Anisakidae): morphological characters and genetic markers (allozymes) for its differentiation from other species of the genus *Anisakis*. 5th Int. Sym. Fish Parasitol., Ceske De Jovice, 9-13 August 1999, Abstract: 105.

Paggi L., Mattiucci S., Gibson D.I., Berland B., Nascetti G., Cianchi R., Bullini L. (2000). *Pseudoterranova decipiens* species A and B (Nematoda: Ascaridoidea): nomenclatural designation, morphological diagnostic characters and genetic markers. *Syst. Parasitol.*, **45**: 185-197.

Palumbi S.R. (1996). Nucleic acid II: The polymerase chain reaction. *Mol Syst.*, Eds. Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K., Sinauer, Ass. MA. U.S.A.: 205-247.

Paterson A.M., Gray R.D. (1997). Host-parasite cospeciation, host switching, and missing the boat. In “Host-parasite evolution: General principles and avian models” (D. H. Clayton and J Moore, Eds.), pp. 236-250, Oxford University Press, Oxford.

Paterson A.M., Banks J.B. (2001). Analytical approaches to measuring cospeciation to host and parasites: through a glass, darkly. *Int. J. Parasitol.* **31**: 1012-1022.

Podani J. (2005). Multivariate exploratory analysis of ordinal data in ecology: pitfalls, problems and solutions. *J. Veget. Sci.*, **15**: 497-510.

Raillet A., & Henry A. (1912). Quelques nematodes parasites des reptiles. *Bull. Soc. Phat. Exot.*, **5**: 251-259.

Repenning C.A., Ray C.E., and Grigorescu D. (1979). Pinniped. *In* J. Gray and A.J. Boucot (editors), Historical biogeography, plate tectonics, and the changing environment: 357-369. Corvallis: Oregon State University Press.

Rice D.W. (1998). Marine mammals of the world. Society for Marine Mammalogy, Special Publications **4**: 1-231.

Ridley M. (1996). *Evolution. 2nd ed. Blackwell Science*, Oxford.

Ronquist F. (1995). Reconstructing the history of host-parasite associations using generalised parsimony. *Cladistics.*, **11**: 73-89.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerase. *Science.*, **239**: 487-491.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **74**: 5463-5467.

Sato Jun J., Wolsan Mieczyslaw, Suzuki Hitoshi, Hosoda Tetsuji, Yamaguchi Yasunori, Hiyama Kozue, Kobayashi Mari and Minami Shinji. Evidence from Nuclear DNA Sequences Sheds Light on the Phylogenetic Relationships of Pinnipedia: Single Origin with Affinity to Musteloidea. *Zoological Science.*, **23**: 125-146 (2006).

Scheffer V.B. (1958). Seals, sea lions and walruses. Stanford: Stanford University Press.

Sclater P.L. (1897). On the distribution of marine mammals. Proceedings of the Zoological Society of London: 349-359.

Simon C., Frati., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. (1994). Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation

of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **87(6)**: 651-701.

Simková A., Morand S., Jobet E., Gelnar M., Verneau O. (2004). Molecular phylogeny of congeneric monogenean parasites (*Dactylogyrus*): a case of intrahost speciation. *Evolution.*, **58**: 1001–18.

Steward D.T., Saavedra C., Stanwood R.R., Ball A.O., Zouros E. (1995). Male and female mitochondrial DNA lineages in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group. *Mol. Biol. Evol.*, **12(5)**: 735-747.

Swofford D.L. & Selander R.B. (1981). Biosys-1: a Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J.Hered.*, **72**: 281-283.

Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.*, **24**:1596-1599.

Thomas W.K. & Wilson A.C. (1991). Mode and tempo of molecular evolution in the nematode *Caenorhabditis*: cytochrome oxidase II and calmodulin sequences. *Genetics.*, **128**: 269-279.

Thomas F., Verneau O., de Meeûs Y., Renaud F. (1996). Parasites as to host evolutionary prints: insights into host evolution from parasitological data. *Int. J. Parasitol.*, **26 (7)** : 677-686.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucl. Ac. Res.*, **22**: 4673-4680.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Ac. Res.*, **24**:4876-4882.

Toft C.A. & Carter A.J. (1990). Parasite-host coevolution. *Trends Ecol. Evol.*, **5**: 326-329.

Valentini A., Mattiucci, S., Bondanelli P., Webb S.C., Mignucci-Giannone A., Colom-Llavina M.M., and Nascetti G. (2006). Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial cox2 sequences, and comparison with allozyme data. *J. Parasitol.*, **92**: 156–166.

Verneau O., Bentz S., Sinnappah N.D., du Preez L., Whittington I., Combes C. (2002). A view of early vertebrate evolution inferred from the phylogeny of polystome parasites (Monogenea: Polystomatidae). *Proc. R. Soc. Lond., B* **269**: 535-543.

Villareal L.P., Defilippis V.R., Gottlieb K.A.. Acute and persistent viral life strategies and their relationship to emerging disease. *Virology.*, **272**: 1-6.

Von Boetticher H. (1934). Die geographische Verbreitung der Robben. *Zeitschrift für Säugetierkunde.*, **9**: 359-368.

Wei Y.H. (1998). Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **217**: 53-63.

Yamaguti S. (1961). “Systema Helminthum: The Nematodes of Vertebrates,” 679 pp. Interscience Publishers.

Zhu X. Q., Gasser R. B., Jacobs D.E., Hung, G.C., and Chilton N.B. (2000a). Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitol. Res.*, **86**: 738–744.

Zhu X.Q., D'Amelio S., Paggi L., and Gasser R.B. (2000b). Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Parasitol. Res.* **86**: 677– 683.

Zhu X., D'Amelio S., Hu M., Paggi L., and Gasser R.B. (2001). Electrophoretic detection of population variation within *Contracaecum ogmorhini* (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Electrophoresis.*, **22**: 1930-1934.

Zhu X. Q., D'Amelio S., Palm H.W., Paggi L., George-Nascimento M., and Gasser R.B. (2002). SSCP-based identification of members within the *Pseudoterranova decipiens* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) using genetic markers in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Parasitology.*, **124**: 615–623.

Ringraziamenti

Ringrazio la Prof. Simonetta Mattiucci per la disponibilità mostrata nel seguirmi durante la stesura dell'intera tesi, il Prof. Giuseppe Nascetti per avermi sostenuto e incoraggiato durante gli anni del dottorato, la dott.ssa Michela Paoletti, per avermi aiutato assiduamente e affettuosamente nei miei lavori di ricerca.

Infine ringrazio i Ricercatori di tutto il mondo che hanno fornito il materiale di analisi per la presente ricerca.