



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

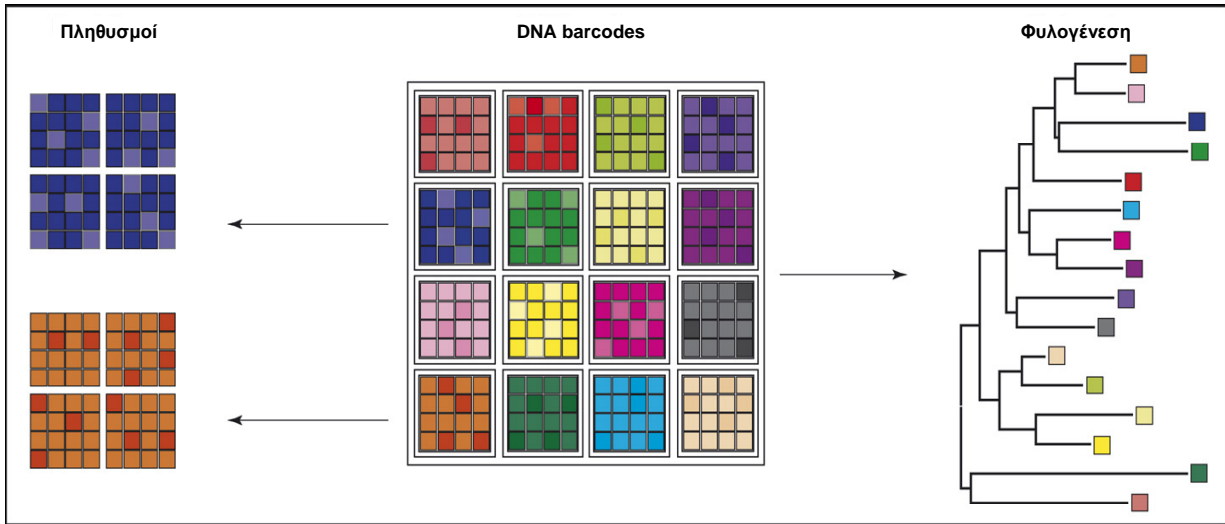
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

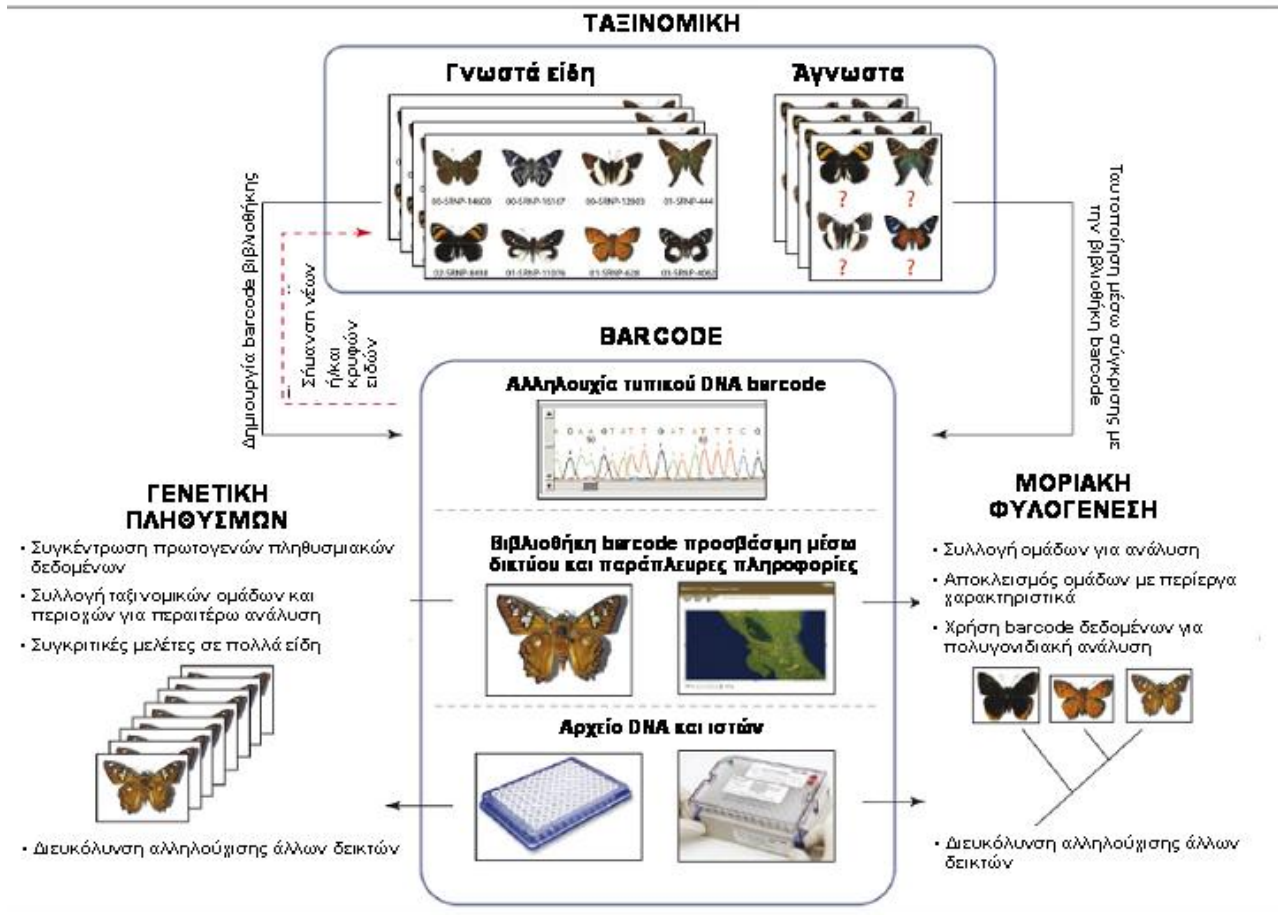
DNA BARCODING

Η πρόδος στην αλληλούχηση και στις υπολογιστικές τεχνολογίες, κατέστησαν τις αλληλουχίες του DNA ως την κύρια πηγή νέων πληροφοριών για την κατανόηση των εξελικτικών και γενετικών σχέσεων. Τα ίχνη της συγκριτικής ανάλυσης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών είναι πλέον εμφανή σε όλους σχεδόν τους τομείς των βιολογικών επιστημών, από την αναπτυξιακή βιολογία έως την επιδημιολογία (Tibayrenc, 2005). Ωστόσο, δύο κλάδοι της βιολογίας ανέπτυξαν τα εργαλεία και τις εφαρμογές που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των βιολογικών σχέσεων με αλληλουχίες DNA: η μοριακή φυλογένεση και η πληθυσμιακή γενετική. Οι δύο αυτοί τομείς επικεντρώνονται σε διαφορετικά επίπεδα οργάνωσης. Οι μελέτες της μοριακής φυλογένεσης συνήθως ασχολούνται με τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ βαθύτερων κλάδων, ενώ αυτές της πληθυσμιακής γενετικής στοχεύουν στις διαφορές εντός και μεταξύ των πληθυσμών σε ένα είδος. Συγκριτικά, το DNA barcoding καταλαμβάνει μια ενδιάμεση θέση, εφόσον επιδιώκει μια πλήρη κάλυψη των ειδών, αλλά εστιάζει περισσότερο στην οριοθέτηση τους αντί στις μεταξύ τους σχέσεις (Εικόνα 1).

Το DNA barcoding βασίζεται στην παραδοχή ότι μια μικρή τυποποιημένη ακολουθία μπορεί να διακρίνει τα άτομα ενός είδους διότι η γενετική ποικιλότητα μεταξύ των ειδών ξεπερνά την ποικιλότητα εντός των ειδών (Hebert et al. 2003). Διάφορες έρευνες έχουν πλέον διαπιστώσει την αποτελεσματικότητα αυτής της προσέγγισης σε αρκετές μεγάλες ομάδες ζώων, όπως τα πτηνά (Hebert et al. 2004), τα ψάρια (Ward et al. 2005), τα βοοειδή (Meyer & Paulay 2005), τις αράχνες (Barrett & Hebert 2005), και αρκετές σειρές λεπιδόπτερων (Hebert et al. 2004, Hajibabaei et al. 2006, Janzen et al. 2005). Επιπλέον, συστήματα DNA barcoding δημιουργούνται τώρα και για άλλες ομάδες οργανισμών, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται τα φυτά (Kress et al. 2005), τα μακροφύκη (Sauders 2005), οι μύκητες (Summerbel 2005), τα πρώτισα (Scicluna et al. 2006) και τα βακτήρια (Sogin et al. 2006). Οι σειρές των δεδομένων barcoding DNA ουσιαστικά αποτελούνται από σύντομες αλληλουχίες DNA από πολλά άτομα από ένα μεγάλο αριθμό ειδών (συνήθως πέντε έως δέκα άτομα ανά είδος, αλλά αυτοί οι αριθμοί θα αυξηθούν στο μέλλον) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Τα DNA barcodes βρίσκονται στην γκρίζα ζώνη μεταξύ της φυλογενετικής και της γενετικής πληθυσμών. Το διάγραμμα αυτό απεικονίζει τη θέση των δεδομένων του DNA barcode σε σχέση με αυτά της πληθυσμιακής γενετικής και της φυλογένεσης. Κάθε μικρό τετράγωνο αντιπροσωπεύει ένα άτομο. Διαφορετικά χρώματα χρησιμοποιήθηκαν για την αναπαράσταση διαφορετικών ειδών και η ενδοειδική ποικιλότητα αναπαριστάται με διαφορετικές αποχρώσεις.



Εικόνα 2. Τα κύρια συστατικά του προγράμματος Barcode of Life και η συμβολή τους στην ταξινομία, ανασύσταση μοριακών φυλογενέσεων και ερευνών γενετικής πληθυσμών. Το διάγραμμα αυτό δείχνει το πώς οι βιβλιοθήκες του DNA barcoding μπορούν να υποστηρίξουν τη συμβατική ροή εργασίας στην ταξινομική με τη μαζική ταυτοποίηση άγνωστων δειγμάτων και με τη βοήθεια στο να εντοπιστούν και να μελετηθούν περαιτέρω νέα ή κρυπτικά είδη. Οι αλληλουχίες Barcode και τα παράπλευρα δεδομένα για κάθε δείγμα είναι προσβάσιμα μέσω των βάσεων δεδομένων του διαδικτύου (π.χ. BOLD: <http://www.barcodinglife.org>). Αυτή η πληροφορία μπορεί να είναι χρήσιμη και σε άλλο πλαίσιο, όπως η φυλογένεση (πρόγραμμα του Δέντρου της Ζωής). Επιπλέον, αρχειοθετημένα δείγματα DNA και ιστών που συλλέχθηκαν για τα προγράμματα barcoding παρέχουν μια εξαιρετική πηγή πληροφοριών για άλλες ερευνητικά προγράμματα. Οι εικόνες των πεταλούδων προέρχονται από τη βάση δεδομένων των Daniel Janzen και Winnie Hallwachs (<http://janzen.sas.upenn.edu/>).

Μεθοδολογία του DNA barcoding

Η ταυτοποίηση των ειδών μέσω του barcoding συνήθως επιτυγχάνεται με την ανάκτηση μιας μικρής ακολουθίας DNA –του «Barcode»- από ένα τυποποιημένο μέρος του γονιδιώματος (δηλαδή μια περιοχή ενός συγκεκριμένου γονιδίου) από το δείγμα υπό μελέτη. Η αλληλουχία barcode από κάθε άγνωστο δείγμα συγκρίνεται στη συνέχεια με μια βιβλιοθήκη αναφοράς η οποία αποτελείται από αλληλουχίες του barcode, που προέρχονται από άτομα γνωστής ταυτότητας (Εικόνα 2). Ένα δείγμα προσδιορίζεται και ταυτοποιείται εάν η αλληλουχία του αντιστοιχεί πλήρως ή συγγενεύει μοριακά στενά με μια από αυτές της βιβλιοθήκης barcode. Σε περίπτωση που αλληλουχία δεν ταιριάζει με καμία, μπορεί να καταχωρηθεί ως μια νέα αλληλουχία barcode για ένα δεδομένο είδος (δηλ. ένας νέος απλότυπος ή γεωγραφική παραλλαγή), ή μπορεί να υποδηλώσει την ύπαρξη ενός νέου είδους (βλ. παρακάτω). Διάφορες περιοχές γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν σε επίπεδο βιοσυστηματικής για την ταυτοποίηση των ειδών (Πίνακας 1). Ωστόσο, το DNA barcoding κατέληξε στην υιοθέτηση ενός «παγκόσμιου προτύπου», που αντιστοιχεί σε ένα τμήμα 650 βάσεων από το τέλος 5' του μιτοχονδριακού γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (COI, *cox1*) (Hebert et al. 2003) και υποδείχθηκε ως η περιοχή barcode για τα ζώα. Αυτό το μέγεθος επιλέχτηκε έτσι ώστε μια αξιόπιστη ανάγνωση της αλληλουχίας να μπορεί να επιτευχθεί με ένα μόνο «διάβασμα» στις συμβατικές συσκευές αλληλούχισης. Παρόλα αυτά, και μικρότερα τμήματα COI έχουν επίσης αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικά για την ταυτοποίηση δειγμάτων με αλλοιωμένο DNA, όταν η αλληλουχία 650-βάσεων δεν είναι εύκολο να αποκτηθεί (Hajibabaei et al. 2006). Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα και η ακρίβεια των πληροφοριών σε μια τυποποιημένη, υψηλής παραγωγής barcoding ανάλυση έχουν εκτενώς αξιολογηθεί (Hajibabaei et al. 2005).

Κατά καιρούς έχουν προταθεί και διάφοροι άλλοι γονιδιακοί τύποι θα μπορούσαν επίσης εναλλακτικά να χρησιμεύσουν ως βάση για την ταυτοποίηση των ειδών. Για παράδειγμα, το 18S rDNA έχει χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό των νηματωδών του εδάφους και άλλων μικροοργανισμών στο πλαίσιο μιας προσέγγισης που είναι γνωστή (Blaxter 2004) ως «ταξινομία DNA». Η προσέγγιση αυτή διαφέρει από το DNA barcoding υπό την έννοια ότι δεν έχει ως στόχο τη σύνδεση των γενετικών οντοτήτων που

Πίνακας 1. Διαδεδομένοι μοριακοί δείκτες σε επίπεδο ειδών

Γονίδιο ^α	Γενωμική Τοποθεσία	Αριθμός Αλληλουχιών			
		Ζώα	Φυτά	Πρώτιστα	Fungi
COI-barcode ^β	Mitochondria	195 777	520	1931	410
16S-rDNA	Mitochondria	41 381	221	2059	285
cytb	Mitochondria	88 324	165	1920	1084
ITS1-rDNA	Nucleus	12 175	57 693	68 839	56 675
ITS2-rDNA	Nucleus	13 923	58 065	67 332	56 349
18S-rDNA	Nucleus	21 063	17 121	32 290	33 327
rbcl	Plastid	ΔΦ ^γ	30 663	37 328	ΔΦ

^αΣυνοτομογραφίες Γονιδίων: COI, κυτοχρωμική οξειδάση c I; cytb, κυτόχρωμα b; ITS, internal transcribed spacer; rbcl, μεγάλη υπομονάδα της ριβουλόζης.

^βCOI-barcode τα στατιστικά συλλέχθηκαν από το σύστημα Barcode of Life Data (<http://www.barcodinglife.org>). Τα στατιστικά για τα άλλα γονίδια συλλέχθηκαν από τη βάση GenBank.

^γΔΕ, δεν εφαρμόζεται.

αναγνωρίζονται μέσω της ανάλυσης των αλληλουχιών, με συμβατικά είδη. Ως εκ τούτου, είναι πιο χρήσιμη για ομάδες οργανισμών, για τους οποίους υπάρχει έλλειψη λεπτομερούς ταξινομικού συστήματος. Εναλλακτικοί δείκτες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί όταν αξιόπιστες αλληλουχίες COI δεν μπορούν να παραχθούν ή όταν αυτές φαίνονται να αποκλίνουν εντός των ειδών (Vences et al. 2005) ή ως περαιτέρω μοριακά στοιχεία για την αποκάλυψη ενός κρυπτικού είδους (Smith et al. 2006). Επιπλέον, σε ορισμένες ομάδες όπως τα φυτά, το COI (και τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα, γενικότερα) δεν εξελίσσονται αρκετά γρήγορα για να προσφέρουν επαρκή και αξιόπιστη ανάλυση σε επίπεδο διαχωρισμού των ειδών και επομένως εναλλακτικοί δείκτες είναι απαραίτητοι (Kress et al. 2005, Rubinoff et al. 2006). Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει την αποτελεσματικότητα του DNA barcoding σε διαφορετικές ομάδες των ζώων [(Hebert et al. 2003, 2004, Ward et al. 2005, Hebert et al. 2004, Hajibabaei et al. 2006, Smith et al. 2006, Hebert et al. 2003). Οι

έρευνες αυτές έχουν δείξει ότι > 95% των ειδών διαθέτουν μοναδικές COI αλληλουχίες barcode. Έτσι ταυτοποιήσεις σε επίπεδο ειδών επιτυγχάνονται τακτικά. Οι πρώτες μελέτες barcode δέχτηκαν επικριτικά σχόλια, κυρίως λόγω του περιορισμένου ταξινομικού και γεωγραφικού τους εύρους (Moritz & Cicero 2004). Ωστόσο, πιο πρόσφατες μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη στόχευση ομάδων πλούσιων σε είδη (δηλαδή εκείνων που περιέχουν πολλά στενά συγγενικά είδη) σε τροπικά περιβάλλοντα (Hajibabaei et al. 2006 [8]), και με ολοκληρωμένες αναλύσεις όλων των ειδών σε μια δεδομένη ταξινομική ομάδα (Meyer & Paulay 2005 [5]). Το σύστημα barcoding ενισχύθηκε περαιτέρω από τη σύσταση της Κοινοπραξίας για το Barcode of Life (CBOL, <http://barcoding.si.edu>) - μια διεθνούς σύμπραξης των ερευνητικών οργανισμών που στηρίζουν την ανάπτυξη του DNA barcoding ως διεθνούς προτύπου για την αναγνώριση ειδών (Marshall 2005) - και από την ανάπτυξη του Barcode of Life Data Systems (<http://www.barcodinglife.org>) - ενός παγκόσμιου online συστήματος διαχείρισης δεδομένων για το σύστημα DNA barcoding (Ratnasingham & Hebert 2007).

Ο σχεδιασμός του Barcoding περιλαμβάνει συνήθως τη συλλογή δειγμάτων μιας δεδομένης ταξινομικής ομάδας (που προσδιορίζεται από τις συμβατικές ταξινομικές μεθόδους, όπως η μορφολογία, βλ. παρακάτω), καταλογογράφηση τους μαζί με τα συναφή δεδομένα, όπως φωτογραφίες και πληροφορίες τοποθεσίας, καθώς και δημιουργία μιας βιβλιοθήκης barcode (Hajibabaei et al. 2005). Η ανάλυση των στοιχείων του DNA barcoding πραγματοποιείται συνήθως με μεθόδους ομαδοποίησης, που βασίζονται στις γενετικές αποστάσεις όπως η μέθοδος Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987), καθώς και από την αξιολόγηση των γενετικών αποστάσεων εντός και μεταξύ ειδών (π.χ. Hajibabaei et al. 2006). Πιο πολύπλοκες μεθοδολογίες για την ανάλυση των δεδομένων είναι υπό ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένων των στατιστικών ελέγχων για την καταχώρηση των ειδών (Nielsen & Matz 2006, Abdo & Golding 2007), που βασίζονται σε μεθόδους ομαδοποίησης χαρακτήρων (DeSalle et al. 2005).

DNA barcoding και ταξινόμηση

Αν και ο ρόλος του στην ταυτοποίηση δειγμάτων σε επίπεδο ειδών αποτελεί σημαντική βοήθεια στον τομέα της ταξινομικής (Εικόνα 2), το barcoding δεν μπορεί να αντικαταστήσει τη συνολική ταξινομική ανάλυση. Για παράδειγμα, όταν ένα άγνωστο δείγμα δεν έχει μια στενή αντιστοιχία με τα υπάρχοντα αρχεία στη βιβλιοθήκη barcode, η αλληλουχία barcode

δεν νομιμοποιεί τον χαρακτηρισμό του άγνωστου δείγματος ως ένα νέο είδος. Αντιθέτως, παρόμοια δείγματα αποτελούν στόχο για μια περαιτέρω διεξοδική ταξινομική ανάλυση.

Όταν αντιμετωπίζεται στο πλαίσιο της παραδοσιακής ταξινομικής ανάλυσης - η οποία συνήθως είναι πολύ πιο αργή από το barcoding - αυτή η υπόδειξη των άγνωστων δειγμάτων προς διερεύνηση ενισχύει σημαντικά την προσπάθεια ανακάλυψης νέων ειδών (Hajibabaei et al. 2006). Σε ελάχιστα μελετημένες ταξινομικές ομάδες, το DNA barcoding μπορεί να προηγηθεί των συμβατικών ταξινομικών αναλύσεων, προκειμένου να ομαδοποιήσει ταχύτατα δείγματα σε γενετικά διαφορετικές ομάδες. Για παράδειγμα, οι Smith et al. 2005 χρησιμοποίησαν το DNA barcoding για την ταχεία αξιολόγηση της βιοποικιλότητας των μυρμηγκιών στη Μαδαγασκάρη και η μέθοδος αυτή τώρα αποτελεί ένα στοιχείο ρουτίνας για μια μεγάλης κλίμακας απογραφή της βιοποικιλότητας στους οργανισμούς αυτούς.

Το DNA barcoding έχει χρησιμοποιηθεί επίσης σε καλά μελετημένες ομάδες, όπως τα Λεπιδόπτερα (Janzen et al. 2005). Για παράδειγμα, το barcoding χρησιμοποιείται σήμερα συστηματικά για την κατανόηση της βιοποικιλότητας της πανίδας της κάμπιας στη βορειοδυτική Κόστα Ρίκα. Το έργο αυτό, το οποίο ξεκίνησε εδώ και 25 χρόνια από τους Janzen, Hallwachs και τους συνεργάτες τους (Janzen et al. 2005, Janzen 2004, Janzen 2003), έχει, κατά τη διάρκεια των τριών τελευταίων ετών, χρησιμοποιήσει το barcoding, ώστε να δημιουργηθεί μια βιβλιοθήκη αλληλουχιών αναφοράς για περισσότερα από 25.000 δείγματα που αντιπροσωπεύουν >2000 είδη σκώρων και πεταλούδων και των παρασίτων τους (Hebert et al. 2004, Hajibabaei et al. 2006, Janzen et al. 2005, Smith et al. 2006). Αυτή η βιβλιοθήκη χρησιμοποιείται τώρα για να επιταχυνθεί η διαλογή και η ταυτοποίηση των δειγμάτων σε συνεργασία με την παραδοσιακή ταξινομική.

Αν και η αποστολή της ταυτοποίησης και της καταγραφής νέων ειδών επιτυγχάνεται εν τέλει μέσω μιας ολοκληρωμένης ταξινομικής ανάλυσης, τα DNA barcodes μπορούν να διευκολύνουν σημαντικά τη διαδικασία αυτή. Η συμβατική ταξινομική ανάλυση, η οποία συνήθως απαιτεί τη συλλογή μορφολογικών και οικολογικών δεδομένων, μπορεί να ποικίλει για διαφορετικές ταξινομικές ομάδες (δηλαδή η ταξινομική ταυτοποίηση των πτηνών και των ψαριών απαιτούν διαφορετικές μεθόδους και δεξιότητες), ενώ η ανάλυση barcode μπορεί να προσαρμοστεί σε έναν περισσότερο ή λιγότερο τυποποιημένο τρόπο σε όλες τις μεγάλες ομάδες των ζωντανών οργανισμών.

DNA barcoding και μοριακή φυλογένεση

Η μοριακή ροή εργασίας στη φυλογένεση

Η ενσωμάτωση των πληροφοριών των αλληλουχιών κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχει φέρει την επανάσταση στη φυλογενετική (Pagel 1999) και ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών ευρείας κλίμακας βρίσκονται σε εξέλιξη για την επίλυση διαφόρων προβλημάτων σε επιμέρους κλάδους του Δέντρου της Ζωής (<http://tolweb.org>). Μια τυπική μοριακή φυλογενετική μελέτη περιλαμβάνει μια πρωταρχική απόφαση σε σχέση με την ομάδα-στόχο για ανάλυση (π.χ. οικογένεια), τη συγκέντρωση των αντιπροσωπευτικών ταξινομικών ομάδων, την απόκτηση των πληροφοριών από τις αλληλουχίες, καθώς και την κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων με τη χρήση βέλτιστων κριτηρίων, όπως της Μέγιστης Πιθανοφάνειας, της Μέγιστης Φειδωλότητας, ή την Μπεϋσιανή ανάλυση. Αν και οι λεπτομέρειες αυτών των διαδικασιών έχουν συζητηθεί εκτενώς (Felsenstein 2004), είναι σημαντικό να τονιστεί ότι για να επιτευχθεί η βέλτιστη ανάκτηση ενός φυλογενετικού δέντρου με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια, η προσοχή πρέπει να εστιαστεί στην επιλογή τόσο των γονιδιακών τόπων όσο και των αντιπροσωπευτικών ειδών. Μέχρι πρόσφατα, η επιλογή του γονιδίου περιοριζόταν σε μεγάλο βαθμό από την ευκολία αλληλούχισης και στις «παγκόσμιες» αλληλουχίες στόχους, που ήταν εύκολο να ανακτηθούν, όπως τα ριβοσωματικά γονίδια. Ωστόσο, οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις επιτρέπουν την εφαρμογή ευρύτερων στρατηγικών. Έτσι, οι πλέον πρόσφατες φυλογενετικές αναλύσεις χρησιμοποιούν πληροφορίες αλληλουχιών από πολλαπλούς γονιδιακούς τόπους (που καλύπτουν διάφορες και αρκετά εκτεταμένες περιοχές του γονιδιώματος), οι οποίοι συχνά προέρχονται από διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα (δηλ. πυρήνα, μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες), προκειμένου να ενισχυθεί η ανάλυση στα διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα (Hajibabaei 2006) και να αποφευχθούν τα προβλήματα που εισάγονται από τη χρήση μόνο συγκεκριμένων γονιδίων (Foster & Hickey 1999). Ωστόσο, η πρόοδος στην αλληλούχιση ολόκληρων γονιδιωμάτων έχει δώσει τεράστια ώθηση στην εξαγωγή φυλογενετικών συμπερασμάτων.

Μια άλλη σημαντική παράμετρος, η δειγματοληψία των ταξινομικών μονάδων, τυχάνει μάλλον λιγότερης προσοχής από την επιλογή των τόπων. Είναι γενικά παραδεκτό ότι η αύξηση του αριθμού των ταξινομικών κατηγοριών βοηθά στην αποκατάσταση της σωστής φυλογένεσης, μειώνοντας τα μήκη των κλάδων και την ομοπλασία δύο παράγοντες που μπορούν να παράγουν παραπλανητικές φυλογενέσεις (Huelsenbeck 1995, Kolaczkowski &

Thornton 2004). Στην πραγματικότητα, ορισμένοι υποστηρίζουν ότι η προσθήκη επιπλέον ταξινομικών ομάδων είναι πιο πολύτιμη από την προσθήκη περισσότερων γονιδίων για τη βελτίωση μιας φυλογένεσης (Zwickl & Hillis 2002, Pollock et al. 2002). Αν και αναμφίβολα η προσθήκη περισσότερων ειδών είναι χρήσιμη, είναι επίσης σημαντικό η επιλογή αυτών των ταξινομικών ομάδων να γίνει με προσοχή, δεδομένου ότι οι υπολογιστικές παράμετροι μπορούν να περιορίσουν τον αριθμό των ταξινομικών ομάδων που μπορούν να αναλυθούν. Λόγω αυτού, οι ερευνητές χρησιμοποιούν απλουστευμένες μεθόδους ανάλυσης όταν πρόκειται για φυλογενέσεις με μεγάλο αριθμό ταξινομικών ομάδων (δηλ. εκατοντάδες είδη). Έτσι, η εξέταση πολλών ατόμων από ένα μόνο είδος, ή η ανάλυση μεγάλων συνόλων στενά συγγενικών ειδών δεν αποτελεί συνηθισμένο φαινόμενο.

Από τα barcodes στις φυλογενέσεις

Αν και οι barcode βιβλιοθήκες έχουν ομοιότητες με τα μοριακά φυλογενετικά δεδομένα (και τα δύο είναι πληροφορίες αλληλουχιών από σύνολα ειδών), τα DNA barcodes συνήθως δεν έχουν επαρκές φυλογενετικό σήμα για την επίλυση και την ανάδειξη των εξελικτικών σχέσεων, κυρίως σε βαθύτερα επίπεδα (Hajibabaei et al. 2006). Παρόλο που οι αλληλουχίες barcode αναλύονται κυρίως με τη χρήση φυλογενετικών δέντρων, των οποίων η κατασκευή βασίζεται σε μεθόδους όπως η Neighbor-Joining, τα δέντρα που βασίζονται στα barcodes δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται ως φυλογενετικά δέντρα (Hajibabaei et al. 2006). Εντούτοις, οι μελέτες του DNA barcoding μπορούν να βοηθήσουν την κατασκευή των φυλογενετικών σχέσεων, βοηθώντας στην επιλογή των ταξινομικών ομάδων (Εικόνες 1, 2). Επειδή τα DNA barcodes χρησιμοποιούνται τόσο για τον εντοπισμό των ειδών όσο και στο να επιστήσουν την προσοχή σε αγνοημένα και νέα είδη, μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό υποψηφίων πρότυπων ταξινομικών ομάδων για μεγάλου εύρους φυλογενετικές μελέτες (Εικόνα 1). Η σύμπραξη του Barcode of Life δημιουργεί ένα τέλειο περιβάλλον ταξινομικής δειγματοληψίας για τη διεξαγωγή φυλογενετικών μελετών για διάφορους κλάδους του Δέντρου της Ζωής (Εικόνα 2) και, όπως προαναφέρθηκε, τέτοιες δειγματοληψίες έχουν αποδειχθεί ότι είναι ένας βασικός παράγοντας για την κατασκευή μιας ακριβούς φυλογένεσης (Zwickl & Hillis 2002, Pollock et al. 2002). Κατά συνέπεια, φυλογενέσεις που αρχικά στηρίζονται σε βιβλιοθήκες barcode, ως προς μια δεδομένη ταξινομική ομάδα, είναι λιγότερο πιθανό να επηρεάζονται από ανεπαρκή ταξινομική δειγματοληψία. Επιπλέον, το barcoding ενισχύει την επισήμανση και επακόλουθη αντικατάσταση των ταξινομικών

κατηγοριών με ειδικά χαρακτηριστικά - όπως τα εξαιρετικά αυξημένα ποσοστά εξέλιξης ή ανακόλουθες νουκλεοτιδικές συνθέσεις (Felsenstein 2004) - που μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα στην ακριβή κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων.

DNA barcoding και πληθυσμιακή γενετική

Η ροή εργασίας στην πληθυσμιακή γενετική

Οι παραδοσιακές αναλυτικές προσεγγίσεις, όπως οι πολυμορφισμοί των αλλοενζύμων ή τα πρότυπα των ενζύμων περιορισμού, έχουν πλέον σε μεγάλο βαθμό αντικατασταθεί από τις αναλύσεις που βασίζονται στις αλληλουχίες. Εντούτοις, η επιλογή του κατάλληλου συστήματος δεικτών για μια μελέτη πληθυσμιακής γενετικής απαιτεί προσεκτική εξέταση διαφόρων θεμάτων όπως το πόσο ευαίσθητος είναι ο μοριακός δείκτης για το ερώτημα που τίθεται, καθώς και πρακτικά ζητήματα για την απόκτηση των πληροφοριών (π.χ. η ευκολία ενίσχυσης με PCR). Επειδή οι δείκτες του μιτοχονδριακού DNA είναι απλοειδείς με μητρική κυρίως κληρονομηση, χρησιμοποιούνται συχνά στις αναλύσεις και έχουν συνεισφέρει σημαντικά σε μελέτες σε επίπεδο πληθυσμού (Avisé 2004). Εντούτοις, οι πολυγονιδιακές αναλύσεις είναι περισσότερο αξιόπιστες, διότι είναι λιγότερο ευαίσθητες σε συγκεκριμένες γονιδιακές γενεαλογίες που μπορεί να μην αντανakλούν σωστά την ιστορία του πληθυσμού (Rosenberg & Nordborg 2002). Πιο πρόσφατα, με τη διαθεσιμότητα των τεχνολογιών αλληλούχησης υψηλής παραγωγικότητας, μέθοδοι ανάλυσης υψηλής πιστότητας, όπως οι πολυμορφισμοί μοναδικού νουκλεοτιδίου (SNP), έδωσαν μια νέα διάσταση στις μελέτες σε επίπεδο πληθυσμού (Brumfield et al. 2003). Η ευρείας κλίμακας αναλύσεις των εν λόγω δεικτών που βασίζονται σε αλληλουχίες βρίσκονται σε εξέλιξη στο πλαίσιο μελετών όπως η HarMap (<http://www.harmap.org>), που αποσκοπεί στο να προσδιορίσει τη γενετική παραλλακτικότητα που συνδέεται με ανθρώπινες ασθένειες (International HarMap Consortium 2005 [45]).

Αν και ένας μεγάλος αριθμός γενετικών δεικτών έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της δομής των πληθυσμών, ο αριθμός των ειδών που έχει μελετηθεί είναι πολύ λιγότερος. Τυπικές πληθυσμιακές γενετικές μελέτες εξετάζουν τη διακύμανση των πληθυσμών ενός είδους, και αυτό το είδος των αναλύσεων έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία σε γεωγραφικές μελέτες των πληθυσμών και για τη διερεύνηση θεμάτων όπως η μετανάστευση και η γενετική παρέκκλιση. Ωστόσο, λίγες ταξινομικές ομάδες έχουν μελετηθεί εκτενώς βάσει αλληλουχιών του DNA. Για παράδειγμα, από μια αναζήτηση στη βάση δεδομένων GenBank

προκύπτει ότι για τον άνθρωπο, το χιμπατζή και μερικούς άλλους οργανισμούς μοντέλα όπως το ποντίκι και η *Drosophila melanogaster* έχουν κατατεθεί περισσότερες από το ήμισυ του συνόλου των αλληλουχιών με βάση τις μελέτες γενετικής πληθυσμών.

Από τα barcodes στην ανάλυση του πληθυσμού

Αν και η τυπική πληροφορία των αλληλουχιών που συγκεντρώνεται από τη μέθοδο DNA barcoding δεν επαρκεί για την πλήρη απάντηση των ερωτημάτων σε επίπεδο πληθυσμού (Moritz & Cicero 2004, Bazin et al. 2006), μπορεί να αποτελέσει μια γρήγορη και έγκαιρη πηγή άντλησης πληροφοριών ως προς τη διαμόρφωση της γονιδιωματικής ποικιλομορφίας εντός του είδους. Επειδή το barcoding στοχεύει τυπικά σε ένα μεγάλο αριθμό ειδών, μπορεί να αποτελέσει ισχυρό εργαλείο για τη διευκόλυνση της συγκριτικής μελέτης της γενετικής ποικιλομορφίας στα διάφορα είδη ή τα οικολογικά ενδιαίτηματα (Εικόνα 2). Διάφορα μοντέλα πληθυσμιακής γενετικής, όπως είναι τα μοντέλα που βασίζονται στη σύμφυση, έχουν προταθεί για την καταχώρηση των ατόμων σε είδη στην ανάλυση του DNA barcode (Nielsen & Matz 2006, Abdo & Golding 2007). Θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί περαιτέρω η χρησιμότητα των δεδομένων barcode (και της επίδρασης του μεγέθους του δείγματος), στη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας των ειδών. Συμβατικές μετρήσεις όπως η απλοτυπική ποικιλομορφία (Li 1997) μπορούν ενδεχομένως να παράσχουν χρήσιμες πληροφορίες στο θέμα αυτό. Επιπλέον, με τη συσσώρευση μεγάλου αριθμού αλληλουχιών barcode και παράπλευρων βοηθητικών πληροφοριών, όπως οικολογικά και γεωγραφικά δεδομένα, είναι σημαντικό να διερευνηθεί το είδος των ερωτημάτων που μπορούν να αντιμετωπίσουν τα δεδομένα barcode. Για παράδειγμα, η συνέχεια του βιότοπου σε συνάρτηση με τη γενετική δομή των ειδών, μέσα σε μια ταξινομική ομάδα ή σε μια γεωγραφική περιοχή, θα μπορούσε δυνητικά να μελετηθεί με την επέκταση και της δειγματοληψίας των ατόμων, αλλά και την αύξηση των γενετικών δεικτών.

Η στρατηγική αξία του DNA και η αρχειοθέτηση ιστών

Το DNA barcoding απαιτεί τη συλλογή των δειγμάτων ιστού και την επακόλουθη απομόνωση και αρχειοθέτηση των γονιδιωματικών DNA. Αυτά τα αρχειοθετημένα δείγματα μπορεί να λειτουργήσουν ως χρήσιμη πηγή άντλησης πληροφοριών για μελέτες φυλογένεσης, πληθυσμιακής γενετικής και φυλογεωγραφίας. Δειγματοληψία, αρχειοθέτηση και απομόνωση του DNA αποτελούν ένα σημαντικό κόστος για κάθε μοριακή

μελέτη. Τεχνολογικές εξελίξεις, όπως η ενίσχυση με PCR ολόκληρου του γονιδιώματος (Hawkins et al. 2002), ή της αλληλούχησης με σύνθεση (Margulies et al. 2005), οι οποίες απαιτούν μικρές ποσότητες γενετικού υλικού για ανάλυση, μπορούν ενδεχομένως να διευκολύνουν ακόμη ευρύτερες εφαρμογές γονιδιωματικής στο γενετικό υλικό που έχει συγκεντρωθεί για μελέτες στο DNA barcode.

Τελικές παρατηρήσεις

Εν ολίγοις, το σύνολο των μεθοδολογιών και των αναλύσεων του barcoding DNA είναι έτοιμο να συμβάλει στην ταξινομική έρευνα και την πληθυσμιακή γενετική και φυλογενετική. Στην ταξινομία, το DNA barcoding μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη ταυτοποίηση ρουτίνας των δειγμάτων και μπορεί επίσης να επισημάνει άτυπα δείγματα για περαιτέρω συνολική ταξινομική έρευνα.

Σε φυλογενετικές μελέτες, το barcoding DNA μπορεί να αποτελέσει το σημείο εκκίνησης για τη βέλτιστη επιλογή των ταξινομικών μονάδων και οι αλληλουχίες barcode μπορούν να προστεθούν στο σύνολο των δεδομένων για τις φυλογενετικές αναλύσεις. Σε έρευνες πληθυσμιακής γενετικής, τα DNA barcodes μπορούν να παρέχουν μια πρώτη ένδειξη της έκτασης και της φύσης των αποκλίσεων του πληθυσμού που θα διευκολύνει τη συγκριτική μελέτη της ποικιλομορφίας των πληθυσμών σε πολλά είδη. Με βάση τις πρόσφατες εξελίξεις, αναμένουμε ότι οι πληροφορίες στις βάσεις δεδομένων barcode θα αυξηθούν ταχύτατα -σε μερικές εγκαταστάσεις ήδη επεξεργάζονται περισσότερα από 100000 άτομα ανά έτος. Κατά συνέπεια, οι Διεθνείς Βάσεις Δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (INSD: GenBank, EMBL, και DDBJ) έχουν υιοθετήσει μια μοναδική λέξη-κλειδί αναγνώρισης (BARCODE) να την καταχώρηση τυπικών αλληλουχιών barcode που καθορίζονται από την επιστημονική κοινότητα (δηλαδή της σύμπραξης CBOL).

Η εισαγωγή του barcoding DNA είναι μια φυσική προσθήκη στη μετα-γονιδιωματική «εποχή», κατά την οποία η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος απέφερε τεράστιες ποσότητες πληροφοριών από έναν περιορισμένο αριθμό ειδών. Τα DNA barcodes μπορούν να βοηθήσουν να διευρύνουμε τις γνώσεις μας με τη διερεύνηση πολλών άλλων ειδών γρήγορα και ανέξοδα. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις μελέτες DNA barcoding μπορούν στη συνέχεια να μας βοηθήσουν να εντοπίσουμε τα είδη που είναι αρκετά ευάλωτοι στόχοι για πιο λεπτομερείς γενετικές αναλύσεις.

Αναφορές

- 1 Tibayrenc, M. (2005) Bridging the gap between molecular epidemiologists and evolutionists. *Trends Microbiol.* 13, 575–580
- 2 Hebert, P.D.N. et al. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270, 313–321
- 3 Hebert, P.D.N. et al. (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* 2, e312
- 4 Ward, R.D. et al. (2005) DNA barcoding Australia’s fish species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 1847–1857
- 5 Meyer, C.P. and Paulay, G. (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol.* 3, e422
- 6 Barrett, R.D.H. and Hebert, P.D.N. (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Can. J. Zool.* 83, 481–491
- 7 Hebert, P.D.N. et al. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14812–14817
- 8 Hajibabaei, M. et al. (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 968–971
- 9 Janzen, D.H. et al. (2005) Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 1835–1845
- 10 Kress, W.J. et al. (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8369–8374
- 11 Saunders, G.W. (2005) Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 1879–1888
- 12 Summerbell, R.C. et al. (2005) Microcoding: the second step in DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 1897–1903
- 13 Scicluna, S.M. et al. (2006) DNA barcoding of blastocystis. *Protist* 157, 77–85
- 14 Sogin, M.L. et al. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored ‘rare biosphere’. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12115–12120
- 15 Hajibabaei, M. et al. (2006) A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol. Ecol. Notes* 6, 959–964

- 16 Hajibabaei, M. et al. (2005) Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 1959–1967
- 17 Blaxter, M.L. (2004) The promise of a DNA taxonomy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359, 669–679
- 18 Vences, M. et al. (2005) Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 1859–1868
- 19 Smith, M.A. et al. (2006) DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3657–3662
- 20 Rubinoff, D. et al. (2006) Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? *Trends Ecol. Evol.* 21, 1–2
- 21 Hebert, P.D.N. et al. (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270 (Suppl. 1), S96–S99
- 22 Moritz, C. and Cicero, C. (2004) DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol.* 2, e312
- 23 Marshall, E. (2005) Taxonomy. Will DNA bar codes breathe life into classification? *Science* 307, 1037
- 24 Ratnasingham, S. and Hebert, P.D.N. (2007) The Barcode of Life Data Systems (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes* DOI:10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x (www.blackwell-synergy.com)
- 25 Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425
- 26 Nielsen, R. and Matz, M. (2006) Statistical approaches for DNA barcoding. *Syst. Biol.* 55, 162–169
- 27 Abdo, Z. and Golding, G.B. (2007) A step toward barcoding life: a model based, decision theoretic method to assign genes to pre-existing species groups. *Systematic Biology* 56, 1–13
- 28 DeSalle, R. et al. (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 1905–1916
- 29 Smith, M.A. et al. (2005) DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 1825–1834

- 30 Janzen, D.H. (2004) Setting up tropical biodiversity for conservation through non-damaging use: participation by parataxonomists. *J. Appl. Ecol.* 41, 181–187
- 31 Janzen, D.H. (2003) Spatio-temporal dynamics and resource use in the canopy. In *Arthropods of Tropical Forests* (Basset, Y., Novotny, V., Miller, S.E. and Kitching, R.L., eds), pp. 369–379, Cambridge University Press
- 32 Pagel, M. (1999) Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* 401, 877–884
- 33 Felsenstein, J. (2004) *Inferring Phylogenies*, Sinauer Associates Inc.
- 34 Hajibabaei, M. et al. (2006) Seed plant phylogeny: gnetophytes are derived conifers and a sister group to Pinaceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40, 208–217
- 35 Foster, P.G. and Hickey, D.A. (1999) Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions. *J. Mol. Evol.* 48, 284–290
- 36 Murphy, W.J. et al. (2004) Mammalian phylogenomics comes of age. *Trends Genet.* 20, 631–639
- 37 Huelsenbeck, J.P. (1995) The performance of phylogenetic methods in simulation. *Syst. Biol.* 44, 17–48
- 38 Kolaczkowski, B. and Thornton, J.W. (2004) Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. *Nature* 431, 980–984
- 39 Zwickl, D.J. and Hillis, D.M. (2002) Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Syst. Biol.* 51, 588–598
- 40 Pollock, D.D. et al. (2002) Increased taxon sampling is advantageous for phylogenetic inference. *Syst. Biol.* 51, 664–671
- 41 Hajibabaei, M. et al. (2006) Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. *Genome* 49, 851–854
- 42 Avise, J.C. (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman and Hall
- 43 Rosenberg, N.A. and Nordborg, M. (2002) Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nat. Rev. Genet.* 3, 380–390
- 44 Brumfield, R.T. et al. (2003) The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends Ecol. Evol.* 18, 249–256
- 45 International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299–1320

- 46 Bazin, E. et al. (2006) Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312, 570–572
- 47 Li, W.H. (1997) DNA polymorphism in populations. In *Molecular Evolution* (Li, W.H., ed.), pp. 237–267, Sinauer Associates Inc.
- 48 Hawkins, T.L. et al. (2002) Whole genome amplification – applications and advances. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 65–67
- 49 Margulies, M. et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high density picolitre reactors. *Nature* 437, 376–380