



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΕΠΙΒΛΕΤΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: κ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

Φυλογένεση ειδών του γένους *Saga* με  
μοριακούς δείκτες

Μυρθιανού Ευσεβία



ΛΑΡΙΣΑ, 2010

# Φυλογένεση ειδών του γένους *Saga* με μοριακούς δείκτες

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαμούρης Ζήσης: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Μούτου Αικατερίνη: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών

Σαραφίδου Θεολογία: Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω που με δέχτηκε στο εργαστήριο του για τη διεξαγωγή αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, κ. Μούτου Αικατερίνη καθώς και την Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Σαραφίδου Θεολογία για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Σταμάτη Κώστα, τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Θεμιστοκλή Γιαννούλη καθώς και την υποψήφια διδάκτορα κ.Κουτσογιαννούλη Λία, για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και τις ιδιαίτερα χρήσιμες συμβουλές τους, αλλά και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που υπήρχε μέσα στο εργαστήριο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου τα οποία ήταν ιδιαίτερα συνεργάσιμα κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης των πειραμάτων.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Η εξελικτική Θεωρία.....	7
1.2 Μοριακή εξέλιξη.....	9
1.3 Μοριακή φυλογένεση.....	10
1.4 Φυλογενετικές σχέσεις και σχολές συστηματικής.....	11
1.5 Φυλογενετικά δέντρα.....	13
1.6 Μέθοδοι κατασκευής φυλογενετικών δέντρων.....	14
1.7 Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με μεθόδους αποστάσεων.....	15
1.8 Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με τη μέθοδο της μέγιστης φειδωλότητας.....	16
1.9 Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με τη μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας.....	17
1.10 Δοκιμασία bootstrap για την αξιοπιστία των δέντρων.....	17
1.11 Επιλογή χαρακτήρων για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.....	19
1.12 Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	20
1.13 Ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA.....	21
1.14 Τα μιτοχονδριακά γονίδια στη φυλογένεση.....	22
1.15 Γονίδιο υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI).....	23
1.16 Τα είδη του γένους Saga.....	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
2.1 Συλλογή δειγμάτων.....	31
2.2 Απομόνωση DNA.....	31
2.3 Ποσοτικοποίηση DNA.....	32
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	33
2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	38
2.6 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism).....	39
2.7 Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	42
2.8 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA (Sequencing).....	43
2.9 Φυλογενετική ανάλυση.....	43
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
3.1 Απομόνωση DNA.....	45
3.2 PCR.....	45
3.3 SSCP.....	46
3.4 Αλληλούχηση.....	49
3.5 Νουκλεοτιδική ανάλυση.....	51
3.6 Αμινοξική ανάλυση.....	52
3.7 Φυλογενετική ανάλυση.....	53
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	55

4.1 Νουκλεοτιδική ανάλυση αλληλουχιών.....	58
4.2 Αμινοξική ανάλυση αλληλουχιών .....	59
4.3 Γενετικές αποστάσεις απλοτύπων .....	59
Βιβλιογραφία .....	62

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Η εξελικτική θεωρία

Ο πρώτος γνήσιος υποστηρικτής της εξέλιξης ήταν ο Jean-Baptiste de Lamarck (1744-1829), του οποίου η θεωρία παρουσιάστηκε σε ολοκληρωμένη μορφή στο έργο του Philosophie Zoologique (1809). Η άποψη του Lamarck δεν ήταν ότι τα διάφορα είδη προκύπτουν από κοινά προγονικά είδη, αλλά ότι απλές μορφές ζωής γεννιούνται αυτομάτως από άψυχο υλικό, και εξελίσσονται σε πιο σύνθετες και τελειότερες μορφές, μέσω μιας εγγενούς τάσης για ανοδική πορεία. Ο Lamarck πίστευε ότι στον αναγκαστικό δρόμο για την άνοδο, ο οργανισμός χειραγωγείται από το περιβάλλον του, που με τις συνεχείς αλλαγές του τροποποιεί τις ανάγκες του οργανισμού. Στις ανάγκες αυτές ο οργανισμός ανταποκρίνεται με αντίστοιχες αλλαγές της συμπεριφοράς του και με χρήση ή αχρησία του ενός ή του άλλου οργάνου. Αυτή η χρήση ή αχρησία ενός οργάνου αλλάζει τη μορφολογία του ατόμου και οι αλλαγές αυτές μεταβιβάζονται στις επόμενες γενιές. Η ιδέα της κληρονομικότητας των επίκτητων χαρακτηριστικών πάνω στην οποία βάσιζε τη θεωρία του, δεν άρχισε από τον ίδιο. Ήταν ιδιαίτερα διαδεδομένη την εποχή εκείνη και ο ίδιος ο Δαρβίνος την ενσωμάτωσε στην «Προέλευση των Ειδών». Οι ιδέες του απορρίφθηκαν από όλους σχεδόν τους συγχρόνους του, όχι γιατί η κληρονομικότητα των επίκτητων χαρακτηριστικών ήταν γι' αυτούς λανθασμένη, αλλά γιατί οι κορυφαίοι φυσιοδίφες της εποχής δεν μπορούσαν ή δεν ήθελαν να παραδεχθούν τα επιχειρήματα του υπέρ της θεωρίας της εξέλιξης (Futuyma, 1995).

Η καριέρα του Charles Robert Darwin (Δαρβίνος) άρχισε με το ταξίδι του ως επίσημου φυσιοδίφη στο πλοίο Beagle. Οι παρατηρήσεις που έκανε στη διάρκεια των πέντε χρόνων του ταξιδιού αυτού (1831-1836), τον ώθησαν να αμφισβητήσει την ιδέα της αμεταβλητότητας του είδους (Πλάτωνας) και να επιδοθεί στη συλλογή στοιχείων για την απόδειξη της «μεταβλητότητας των ειδών». Δεν περιορίστηκε στο να συλλέξει και να προβάλλει μαρτυρίες για την εξέλιξη, αλλά και στο να συλλάβει ένα μηχανισμό που θα μπορούσε να την εξηγήσει. Η θεωρία της φυσικής επιλογής άρχισε να ωριμάζει στο μυαλό του το 1838. Συνέλαβε την ιδέα ότι κάτω από ορισμένες συνθήκες, μερικές διαφορές μεταξύ ατόμων θα είναι ευνοϊκές και θα τείνουν να διατηρηθούν μέσω αναπαραγωγής, ενώ άλλες θα είναι δυσμενείς και θα εξαφανίζονται (Futuyma, 1995).

Το κύριο πόνημα του, η Καταγωγή των Ειδών, δημοσιεύτηκε το 1859 και εμπεριέχει δύο βασικές θέσεις: (α) ότι όλα τα είδη προήλθαν, μέσω τροποποιήσεων, από κοινά προγονικά είδη και (β) ότι οι τροποποιήσεις αυτές οφείλονται στη φυσική επιλογή που δρα πάνω σε υπάρχουσες διαφορές μεταξύ των ατόμων ενός είδους. Η επιχειρηματολογία του ήταν πολύ ισχυρή, ωστόσο, η μεγαλόπνοη δαρβινική ιδέα της φυσικής επιλογής δεν έπεισε παρά

μόνο λίγους διορατικούς των ημερών του και ουσιαστικά περιήλθε σε αφάνεια μέχρι την τρίτη δεκαετία του 20ού αιώνα. Η θεμελιώδης σύλληψη του Δαρβίνου ήταν ότι οι μικροδιαφορές μεταξύ ατόμων ενός είδους δεν είναι ατέλειες, αλλά αντίθετα αποτελούν το υλικό με το οποίο η φυσική επιλογή «πλάθει» νέες μορφές ζωής (Futuyma, 1995).

Πολλοί ήταν οι κριτές της θεωρίας του Δαρβίνου. Οι νεομεντελιστές Hugo de Vries, William Bateson και Thomas Morgan ταύτισαν την έννοια του «είδους» με την έννοια της «ποικιλίας» και επειδή μια ποικιλία μπορεί να προκύψει από μια άλλη σαν αποτέλεσμα μιας μεταλλαγής, έφθασαν στο συμπέρασμα ότι μια ή δύο γενετικές αλλαγές αρκούν για τη δημιουργία ενός νέου είδους. Σε αυτό το σενάριο της εξέλιξης, η φυσική επιλογή δεν είχε θέση και η θεωρία του Δαρβίνου ήταν άχρηστη (Futuyma, 1995).

Η σημερινή θεωρία της εξέλιξης, γνωστή ως νεοδαρβινισμός, εξελικτική σύνθεση ή σύγχρονη σύνθεση ενώνει στοιχεία γενετικής, οικολογίας, συστηματικής και παλαιοντολογίας και μπορεί να θεωρηθεί σαν μια επιτυχημένη σύζευξη του δαρβινισμού με τα στοιχεία της γενετικής (Mayr and Provine, 1980).

Τα κύρια σημεία της εξελικτικής θεωρίας είναι: (1) Οι φυσικοί πληθυσμοί εμπεριέχουν μεγάλη γενετική ποικιλομορφία που γεννιέται μέσω των τυχαίων διαδικασιών της μεταλλαγής και του ανασυνδυασμού, δηλαδή η ποικιλομορφία δεν γεννιέται επειδή χρειάζεται. (2) Οι αλλαγές, που από γενιά σε γενιά λαμβάνουν χώρα μέσα στους πληθυσμούς, οφείλονται στις αλλαγές της συχνότητας των γονιδίων που περιέχουν οι πληθυσμοί και οι αλλαγές αυτές οφείλονται με τη σειρά τους, στην τυχαία παρέκκλιση, στην ανταλλαγή γονιδίων μεταξύ πληθυσμών και **κυρίως** στη φυσική επιλογή. (3) Το προσαρμοστικό πλεονέκτημα των περισσότερων αλληλομόρφων είναι πολύ μικρό, με αποτέλεσμα οι φαινοτυπικές αλλαγές που προκαλούν να είναι μικρές και βαθμιαίες. (4) Η διαφοροποίηση των μορφών της ζωής επιτυγχάνεται μέσω της ειδογένεσης, ενός μηχανισμού που συνήθως προϋποθέτει τη βαθμιαία αναπαραγωγική απομόνωση των πληθυσμών, και (5) Οι ίδιες αυτές διαδικασίες αν συνεχισθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα θα προκαλέσουν αλλαγές τέτοιου μεγέθους που να αιτιολογούν τη δημιουργία νέων κατηγοριών κατάταξης (όπως τα γένη, τις οικογένειες, κ.λ.π.) (Futuyma, 1995).



## 1.2 Μοριακή εξέλιξη

Η μοριακή εξέλιξη είναι η διαδικασία της εξέλιξης στο επίπεδο του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών. Εμφανίστηκε σαν επιστημονικό πεδίο στις αρχές του 1960 καθώς οι ερευνητές της μοριακής βιολογίας, της εξελικτικής βιολογίας και της πληθυσμιακής γενετικής άρχισαν να κατανοούν τις πρόσφατες ανακαλύψεις πάνω στη δομή και τη λειτουργία των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Πριν το 1960, οι περισσότερες έρευνες πάνω στους μηχανισμούς της εξέλιξης πραγματοποιούνταν χρησιμοποιώντας τη μεντελική μέθοδο. Η προσέγγιση αυτή όμως απαιτούσε χρονοβόρα πειράματα διασταυρώσεων για την αναγνώριση ομόλογων γονιδίων και συνεπώς οι έρευνες περιορίζονταν σε ενδοειδικές γενετικές αλλαγές. Με τη μοριακή προσέγγιση όμως, κατέστη δυνατή η μελέτη της εξελικτικής αλλαγής των γονιδίων, συγκρίνοντας οποιοδήποτε ζεύγος ειδών. Με αυτόν τον τρόπο οι ερευνητές μπόρεσαν να μελετήσουν τη μακροχρόνια εξέλιξη των γονιδίων. Ένας τρόπος μελέτης των εξελικτικών αλλαγών των γονιδίων, είναι εξετάζοντας τις αμινοξικές αλλαγές στις πρωτεΐνες, καθώς αυτές είναι προϊόντα της μεταγραφής και της μετάφρασης αυτών. Πολλοί ερευνητές συνέκριναν τις αμινοξικές ακολουθίες διάφορων πρωτεϊνών και κυρίως της αιμοσφαιρίνης, από ένα μεγάλο εύρος ειδών.

Από αυτές τις έρευνες και επιπλέον δεδομένα αποκαλύφθηκαν κάποιες βασικές αρχές της μοριακής εξέλιξης. Πρώτον, ο αριθμός των αμινοξικών αλλαγών μεταξύ δύο ειδών ήταν σχεδόν ανάλογος με το χρόνο από τον οποίο τα δύο αυτά είδη διαχωρίστηκαν. Δεύτερον, για κάθε πρωτεΐνη, ο ρυθμός της εξέλιξης, με την έννοια των υποκαταστάσεων αμινοξέων, είναι σχεδόν σταθερός/θέση/χρόνο, εφόσον η λειτουργία και η τεταρτοταγής δομή του μορίου παραμένουν अपαράλλακτες. Τρίτον, λειτουργικά λιγότερο σημαντικά μόρια ή τμήματα των μορίων, εξελίσσονται ταχύτερα από περισσότερο σημαντικά. Τέταρτον, οι υποκαταστάσεις αμινοξέων που διαταράσσουν λιγότερο τη δομή και τη λειτουργία ενός μορίου, συμβαίνουν πιο συχνά στην εξέλιξη, σε σχέση με αυτές που τη διαταράσσουν περισσότερο (Kimura and Ohta, 1974).

Οι ινωδοπρωτεΐνες έχοντας λιγότερο ειδικές λειτουργίες εξελίσσονται ταχύτερα από άλλες πρωτεΐνες. Για την αιμοσφαιρίνη όμως, που έχει τη συγκεκριμένη λειτουργία να μεταφέρει οξυγόνο, ο ρυθμός εξέλιξης είναι πολύ χαμηλότερος. Το κυτόχρωμα c που έχει πιο περιορισμένο λειτουργικό ρόλο εξελίσσεται ακόμα πιο αργά από τις αιμοσφαιρίνες και οι ιστόνες ακόμα περισσότερο. Ο εξελικτικός ρυθμός διαφέρει όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών μορίων αλλά και μεταξύ τμημάτων του ίδιου μορίου. Για παράδειγμα, το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου εξελίσσεται πιο αργά από το υπόλοιπο τμήμα του (Kimura and Ohta, 1974).

### 1.3 Μοριακή φυλογένεση

Στη βιολογία ο όρος **φυλογένεση**, ή **φυλογονία**, αφορά τη μελέτη της συγγένειας διαφορετικών οργανισμών, όπως αυτή αντικατοπτρίζεται στην εξελικτική ιστορία τους (King, 2006). Επί του παρόντος, ο όρος "φυλογένεση" χρησιμοποιείται για πολυάριθμες βιολογικές σχέσεις μεταξύ πληθυσμών, γονιδίων και ομάδων οργανισμών επίσης. Τα δεδομένα που περιλαμβάνουν φυλογενετικές πληροφορίες είναι αλληλουχίες, DNA ή πρωτεϊνών, ορθόλογων γονιδίων ή μορφολογικά χαρακτηριστικά που θεωρούνται ομόλογα. Η φυλογενετική ανάλυση που περιλαμβάνει συγκρίσεις μοριακών αλληλουχιών, έχει τουλάχιστον τέσσερις χρήσεις: (1) στην ταξινόμηση (Taxonomy), (2) στην ομαδοποίηση γονιδίων, πρωτεϊνών και άλλων μοριακών αλληλουχιών, συμπεριλαμβανομένου μη κωδικών αλληλουχιών, (3) σε επιδημιολογικές μελέτες που αφορούν κυρίως ιούς και (4) στην ανάλυση παράλληλης εξέλιξης παρασίτου και ξενιστή (Christensen, 2008). Ο στόχος των φυλογενετικών αναλύσεων είναι ο καθορισμός και η περιγραφή των εξελικτικών σχέσεων μιας ομάδας ειδών. Συγκεκριμένα, αυτό περιλαμβάνει τον καθορισμό της χρονικής στιγμής και της σειράς που έλαβαν χώρα τα γεγονότα της ειδογένεσης (Huson, 2010).

Οι πρώτες φυλογενετικές μελέτες διεξάγονταν χρησιμοποιώντας μορφολογικά δεδομένα από ζώντες οργανισμούς ή απολιθώματα. Πίσω από αυτή την πρακτική βρισκόταν η παραδοχή ότι αν οι φαινότυποι είχαν ομοιότητες μεταξύ τους το ίδιο θα ίσχυε και για τα γονίδια που ήταν υπεύθυνα για τους φαινοτύπους αυτούς. Αν ήταν διαφορετικοί τότε και τα γονίδια θα ήταν διαφορετικά. Η συγκεκριμένη προσέγγιση δεν ήταν πλήρως σωστή αλλά και καθόλου εύκολη. Ένα από τα προβλήματα της προσέγγισης αυτής, είναι το φαινόμενο της συγκλίνουσας εξέλιξης, μέσα από το οποίο μπορεί να προκύψουν οργανισμοί που να μοιάζουν φαινοτυπικά μεταξύ τους αλλά να μη συγγενεύουν καθόλου. Για περίπου 100 χρόνια, οι ερευνητές δε μπορούσαν να αποφασίσουν σε ποια οικογένεια ανήκει το γιγάντιο πάντα. Τα γιγάντια πάντα μοιάζουν με αρκούδες, αλλά έχουν κάποια χαρακτηριστικά σπάνια για τις αρκούδες και συνήθη για τα ρακούν. Το 1985, ο Steven O'Brien έλυσε το πρόβλημα της ταξινόμησης αυτού του ζώου, χρησιμοποιώντας αλληλουχίες DNA και αλγορίθμους (Huson, 2010).

Όταν ανακαλύφθηκε ο ρόλος του DNA το 1953, αναπτύχθηκε η ιδέα ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μοριακές αλληλουχίες, για τη διαλεύκανση φυλογενετικών σχέσεων. Αλληλουχίες DNA ή πρωτεϊνών είναι ομόλογες αν μοιράζονται κάποιον κοινό πρόγονο. Ακόμα γίνεται μια επιπλέον διάκριση μεταξύ ορθόλογων και παράλογων αλληλουχιών. Ορθόλογες είναι οι ομόλογες αλληλουχίες μεταξύ διαφορετικών ειδών, ενώ παράλογες είναι ομόλογες αλληλουχίες που έχουν προκύψει από διπλασιασμό κάποιου γονιδίου

(Huson, 2010). Όσο πιο πρόσφατα έχουν διαχωριστεί δύο είδη από τον κοινό τους πρόγονο, τόσο πιο κοινές θα είναι οι ομόλογες αλληλουχίες τους. Τα μοριακά δεδομένα είναι προσβάσιμα παγκοσμίως μέσω διαδικτύου και η χρήση τους θεωρείται ότι παρέχει πολύ πιο σωστά αποτελέσματα σε μελέτες φυλογένεσης σε σχέση με άλλου είδους δεδομένα (Christensen, 2008).

#### **1.4 Φυλογενετικές σχέσεις και σχολές συστηματικής**

Η μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων των οργανισμών αποτελεί παραδοσιακά ένα από τα επιστημονικά πεδία με τις περισσότερες και πιο έντονες διαμάχες ως προς τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται και την καταλληλότητά τους. Οι πρώτες προσπάθειες αποκάλυψης του φυλογενετικού ιστορικού των οργανισμών ξεκίνησαν στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα από τον ζωολόγο και ανατόμο E.Haeckel, όταν πια η εξέλιξη είχε ήδη αρχίσει να θεωρείται ως το πλέον αξιόπιστο θεωρητικό πλαίσιο για τη συστηματική κατάταξη των ειδών. Η σχολή που ξεκίνησε από τον Haeckel και κυριάρχησε ως τη δεκαετία του '60 είναι γνωστή και ως **εξελικτική ταξινομική** (evolutionary taxonomy). Η σχολή αυτή βασιζόταν αποκλειστικά στην 'επίκληση της αυθεντίας', καθώς ο ερευνητής μελετούσε για δεκαετίες μια συγκεκριμένη ομάδα οργανισμών μαθαίνοντας τα πάντα γύρω από τη βιολογία της και στη συνέχεια διατύπωνε υποθέσεις γύρω από τη φυλογένεσή της. Στις μέρες μας, η σχολή αυτή έχει παραμεριστεί εντελώς, διότι δεν ακολουθεί αντικειμενική μεθοδολογία και παράγει εντελώς υποκειμενικά και μη επαναλήψιμα αποτελέσματα (Mares *et al.* 2000).

Στις αρχές της δεκαετίας του '60 άρχισε να αναπτύσσεται η **σχολή της φαινετικής**. Οι οπαδοί της υποστηρίζουν ότι η κατάταξη πρέπει να στηρίζεται σε αντικειμενικά γνωρίσματα ή σε πειραματικά δεδομένα. Ο φαινετιστής κατατάσσει τους οργανισμούς σύμφωνα με μετρήσεις του φαινοτύπου, τη συμπεριφορά, τη βιοχημεία και τη φυσιολογία τους. Η αριθμητική ταξινόμηση και οι ηλεκτρονικοί υπολογιστές έχουν προσελκύσει πολλούς σύγχρονους ταξινομιστές στη Φαινετική σχολή. Η βασική παραδοχή της φαινετικής είναι ότι όσο περισσότεροι ανεξάρτητοι χαρακτήρες δύο οργανισμών μοιάζουν μεταξύ τους, τόσο πιο συγγενικοί θα είναι αυτοί, καθώς από στατιστική σκοπιά είναι απίθανο να έχει συμβεί σύγκλιση ή παράλληλη εξέλιξη σε πολλούς χαρακτήρες ταυτοχρόνως. Η χρησιμοποίηση των ηλεκτρονικών υπολογιστών, πανάκεια για τους φαινετιστές, εκτός από τη συγκράτηση και ταχύτατη επεξεργασία ένας μεγάλου αριθμού δεδομένων, συνοδεύεται από πολύ σοβαρά προβλήματα. Η ορθότητα των λύσεων που

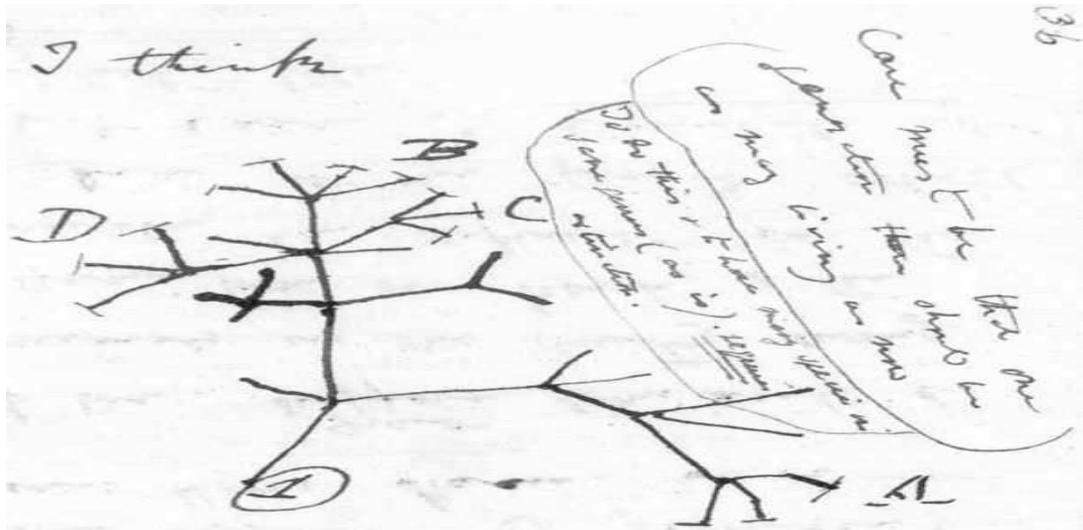
δίνει ένας υπολογιστής εξαρτάται από την αντικειμενικότητα των μετρήσεων που εγγράφονται καθώς και από το σωστό προγραμματισμό. Λάθη στις μετρήσεις ή στον προγραμματισμό έχουν αποδειγμένα οδηγήσει σε πολύ σοβαρά ταξινομικά λάθη. Οι Sokal και Michener από τους υποστηρικτές της φαινετικής παραδέχονται ότι «Στο σημερινό στάδιο ανάπτυξης της, η φαινετική, δεν έχει καταφέρει να προτείνει ένα σταθερό σύστημα κατάταξης». Με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στη φαινετική προσέγγιση, κατασκευάζονται φαινογράμματα, τα οποία απεικονίζουν πρότυπα ιεραρχικής, συνολικής ομοιότητας, χωρίς να δίνουν πληροφορία για πραγματικές εξελικτικές συγγένειες. Έτσι, αυτή η σχολή παραμερίστηκε σύντομα, καθώς διαπιστώθηκε ότι οι παραδοχές της δεν είναι βάσιμες από βιολογική σκοπιά.

Στα τέλη της δεκαετίας του '60 εμφανίστηκε η **κλαδιστική σχολή**, με βασικότερο σημείο αναφοράς το βιβλίο "Phylogenetic Systematics" του Γερμανού εντομολόγου W.Hennig. Στο βιβλίο αυτό ο Hennig προτείνει ότι για να εξαχθούν φυλογενετικά συμπεράσματα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο οι χαρακτήρες που είναι κοινοί για ορισμένα τάξα και διαφοροποιημένοι σε σχέση με το άμεσα προγονικό τους (Hennig, 1966). Η προσέγγιση του Hennig υιοθετήθηκε αμέσως από την πλειονότητα των επιστημόνων και σταδιακά παραμέρισε τη φαινετική προσέγγιση. Η ονομασία άλλωστε, Φυλογενετική Συστηματική που χρησιμοποιείται σήμερα κατά κόρον αντί της Κλαδιστικής, καταδεικνύει σε μεγάλο βαθμό την κοινή πεποίθηση ότι οι προηγούμενες προσεγγίσεις ήταν μη-φυλογενετικές (Lipscomb, 1985). Έχει μεγάλη σημασία για τη φυλογένεση, η επιλογή των κατάλληλων χαρακτήρων και η ακριβής και προσεκτική περιγραφή των καταστάσεων τους, καθώς σφάλματα στο επίπεδο αυτό μπορεί να οδηγήσουν σε παρερμηνεύσιμες φυλογενετικές σχέσεις. Για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων στην κλαδιστική, χρησιμοποιούνται χαρακτήρες είτε μορφολογικοί είτε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Χρήσιμοι στην κλαδιστική ανάλυση είναι μόνο οι ομόλογοι χαρακτήρες, αυτοί δηλαδή που έχουν κοινή εξελικτική προέλευση. Όλοι οι υπόλοιποι χαρακτήρες οι οποίοι, ενώ φαινομενικά είναι ίδιοι ή επιτελούν κοινή λειτουργία σε δύο τάξα τα οποία δε μοιράζονται τον ίδιο άμεσο πρόγονο, αποκαλούνται ομοπλασίες. Οι ομοπλασίες δημιουργούν θόρυβο στις φυλογενετικές αναλύσεις και πρέπει να αναγνωρίζονται και να απαλείφονται (Sober *et al.* 1988). Σύμφωνα με την κλαδιστική, ενδείξεις φυλογενετικής συγγένειας συνιστούν μόνο οι συναπομορφίες. Συναπομορφία έχουμε όταν δύο ή περισσότερα τάξα μοιράζονται μια κοινή κατάσταση χαρακτήρα η οποία όμως αποκλίνει από τον κοινό τους πρόγονο. Επίσης, η σύγχρονη φυλογενετική συστηματική δέχεται ως τάξα μόνο τις μονοφυλετικές ομάδες, αυτές δηλαδή που περιλαμβάνουν τον πιο πρόσφατο κοινό πρόγονο της ομάδας και όλους τους απογόνους αυτού του προγόνου. Τέλος, στην κλαδιστική υπάρχει μια σημαντική διαφορά ανάμεσα στο εξελικτικό δέντρο και

το κλαδόγραμμα. Στο κλαδόγραμμα, εν αντιθέσει με το εξελικτικό δέντρο, τα υπο μελέτη τάξα βρίσκονται πάντα στους ακραίους κλάδους χωρίς κάποιο να είναι προγονικό του άλλου, ενώ τα μήκη των κλάδων δεν προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με το χρόνο διάσπασης των διάφορων γενεαλογικών γραμμών, παρά μόνο αποκαλύπτουν το συνολικό πρότυπο των φυλογενετικών σχέσεων (Grant, 2003).

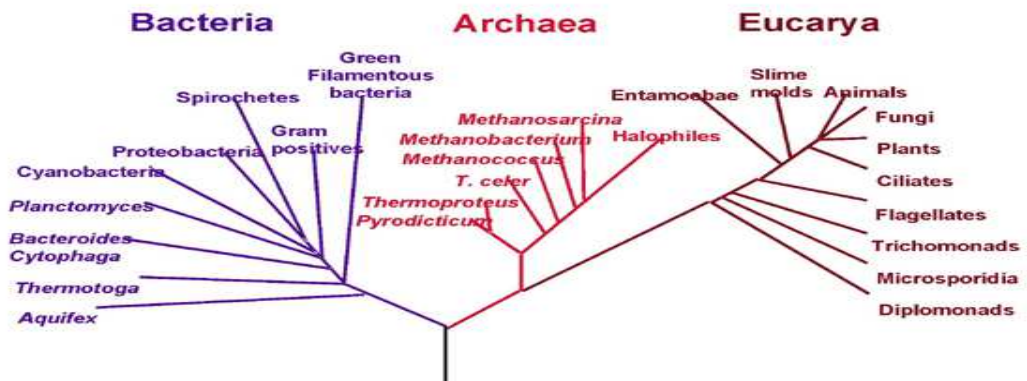
## **1.5 Φυλογενετικά δέντρα**

Το φυλογενετικό δέντρο είναι ένα διακλαδισμένο διάγραμμα που στόχο έχει να διευκρινίσει πως μία ομάδα αντικειμένων (συνήθως γονίδια ή οργανισμοί) συνδέονται μεταξύ τους και να οπτικοποιήσει τις εξελικτικές σχέσεις. Όλοι οι οργανισμοί που ζουν σήμερα, αλλά και αυτοί που έζησαν στο παρελθόν, έχουν ένα κοινό πρόγονο που έζησε πριν από περίπου τέσσερα δισεκατομμύρια χρόνια. Σε κάθε φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται τουλάχιστον ένα μέρος αυτής της γενεαλογίας με κλάδους (branches) που συνδέουν δυο (ορισμένες φορές και περισσότερους) γειτονικούς κόμβους (nodes). Οι τελικοί κόμβοι αντιστοιχούν στα taxa, για τα οποία διαθέτουμε δεδομένα από τη μοριακή ανάλυση. Οι εσωτερικοί κόμβοι αντιστοιχούν σε κοινούς προγόνους που υπήρχαν πριν από την απόκλιση των ειδών, από την οποία προέκυψαν δυο ξεχωριστές φυλογενετικές ομάδες οργανισμών. Τα μήκη των κλάδων σχεδιάζονται πολλές φορές σε κλίμακα, ώστε να φανερώνουν το βαθμό απόκλισης ανάμεσα στα taxa που συνδέουν. Όταν είναι δυνατόν να διακριθεί ένας κόμβος ως ο κοινός πρόγονος όλων των άλλων κόμβων του δέντρου, μπορούμε να φτιάξουμε ένα δέντρο με ρίζα (rooted tree). Τα δέντρα χωρίς ρίζα (unrooted trees) αναπαριστούν μόνο τη σχέση ανάμεσα στους κόμβους και δε μας δίνουν καμιά πληροφορία σχετικά με το εξελικτικό μονοπάτι που έχει ακολουθηθεί. Ωστόσο, ακόμα και στην περίπτωση των δέντρων χωρίς ρίζα, μπορεί συνήθως να προσδιοριστεί μια ρίζα χρησιμοποιώντας μια εξωομάδα (outgroup), ώστε να προκύψει ένα δέντρο με ρίζα (Αλαχιώτης, 2007). Τα πρώτα φυλογενετικά δέντρα εμφανίζονται στο βιβλίο του Edward Hitchcock "Elementary geology" (1840). Επίσης, ο Κάρολος Δαρβίνος το 1859 στο βιβλίο του "The origin of species", παρουσίασε μια μορφή εξελικτικού δέντρου (Εικ. 1 και 2).



Εικόνα 1: Εξελικτικό δέντρο (Κ.Δαρβίνος) (First Notebook on Transmutation of Species , 1837)

## Phylogenetic Tree of Life



Εικόνα 2: Το φυλογενετικό δέντρο της ζωής  
(<http://rst.gsfc.nasa.gov/Sect20/A12d.html>)

### 1.6 Μέθοδοι κατασκευής φυλογενετικών δέντρων

Υπάρχουν τρεις προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων από μοριακά δεδομένα. Στις μεθόδους αποστάσεων, αρχικά υπολογίζεται ένας πίνακας αποστάσεων από ένα σύνολο βιολογικών δεδομένων και στη συνέχεια κατασκευάζεται ένα δέντρο που αντιπροσωπεύει αυτές τις αποστάσεις όσο το δυνατόν πιο πιστά (Huson, 2010). Στις

προσεγγίσεις μέγιστης φειδωλότητας, η ομαδοποίηση των δεδομένων γίνεται με τέτοιο τρόπο ούτως ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός των πιθανολογούμενων αλλαγών που έχουν συμβεί από την εποχή του τελευταίου κοινού προγόνου δύο ειδών. Τέλος, οι μέθοδοι μέγιστης πιθανοφάνειας είναι εγγενώς πιθανολογικές στατιστικές μέθοδοι και μόνο πρόσφατα, καθώς αυξάνεται η ταχύτητα των υπολογιστών, έχουν καταστεί εφαρμόσιμες σε μεγάλα σύνολα δεδομένων (Αλαχιώτης, 2007).

### ***1.7 Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με μεθόδους αποστάσεων***

Μία από τις παλαιότερες και πιο απλές μεθόδους κατασκευής φυλογενετικών δέντρων με τη βοήθεια πινάκων αποστάσεων είναι η μέθοδος συσχέτισης μη σταθμισμένων ομάδων ανά ζεύγη με αριθμητικούς μέσους όρους (UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic averages). Η μέθοδος αυτή προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Sokal και Michener το 1958 για την ανάλυση τόσο μοριακών όσο και μορφολογικών δεδομένων. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται ομαδοποίηση των ταχα με τη βοήθεια ενός πίνακα αποστάσεων. Ο τρόπος υπολογισμού των αποστάσεων αυτών είναι πολύ απλός και το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός δέντρου με ρίζα που όλα τα ταχα ισαπέχουν από τη ρίζα αυτού του δέντρου. Αυτή η προσέγγιση είναι κατάλληλη για δεδομένα-αλληλουχίες που εξελίσσονται υπό την προϋπόθεση ότι ο ρυθμός των μεταλλάξεων είναι σταθερός με την πάροδο του χρόνου και ίδιος για όλες τις γενεαλογίες του δέντρου (μοριακό ρολόι). Για αυτόν το λόγο δεν μπορεί να εφαρμοστεί όταν ο ρυθμός εξέλιξης δεν είναι ίδιος για όλα τα ταχα, πράγμα που συμβαίνει στις περισσότερες περιπτώσεις (Huson, 2010). Διάφορες εναλλακτικές μέθοδοι που βασίζονται σε πίνακες αποστάσεων μπορούν να εφαρμοστούν, όταν ο ρυθμός εξέλιξης των γενεαλογικών γραμμών διαφέρει. Μια από αυτές τις μεθόδους, που είναι και η πιο δημοφιλής, είναι η μέθοδος συγχώνευσης γειτόνων (Neighbor Joining), η οποία προτάθηκε το 1987 από τους Saitou και Nei. Με τη μέθοδο αυτή υπολογίζονται οι αποστάσεις μεταξύ ζευγών δεδομένων και κατασκευάζεται ένα άρριζο δέντρο. Θεωρείται ότι παρέχει τα πιο σωστά αποτελέσματα και αν και είναι περισσότερο πολύπλοκη προτιμάται από άλλες μεθόδους. Γενικά, οι μέθοδοι κατασκευής φυλογενετικών δέντρων που βασίζονται σε πίνακες αποστάσεων, είναι πολύ γρήγορες και εύκολα εφαρμόσιμες καθώς επίσης χρησιμοποιούν και συνεχείς χαρακτήρες. Παρόλα αυτά, προβλήματα σε τέτοιες αναλύσεις μπορούν να προκύψουν από τον λάθος υπολογισμό των

αποστάσεων, λόγω κρυφών ή πολλαπλών υποκαταστάσεων στις αλληλουχίες (Saitou and Nei, 1987).

### **1.8 Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με τη μέθοδο της μέγιστης φειδωλότητας**

Η μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας είναι από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους κατασκευής φυλογενετικών δέντρων και χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τους Eck και Dayhoff το 1966. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην υπόθεση ότι «η εξέλιξη είναι φειδωλή» και ότι το καλύτερο εξελικτικό δέντρο είναι αυτό που ελαχιστοποιεί τον αριθμό των αλλαγών που έχουν συμβεί για να προκύψουν όλα τα υπό εξέταση taxa από έναν κοινό πρόγονο (Nakhleh *et al.* 2005).

Κατά την εξέταση των δεδομένων με την προσέγγιση που βασίζεται στη μέγιστη φειδωλότητα, δεν λαμβάνονται υπόψη όλες οι θέσεις με αντικαταστάσεις. Αντίθετα, εντοπίζονται και αξιολογούνται μόνο οι θέσεις μιας πολλαπλής στοίχισης που ευνοούν ένα συγκεκριμένο δέντρο έναντι ενός άλλου ως προς τον αριθμό των αντικαταστάσεων που επιτελούνται. Με κριτήριο την μέγιστη φειδωλότητα, δεν ευνοούν όλες οι θέσεις μιας πολλαπλής στοίχισης το ίδιο δέντρο σε σχέση με άλλα εναλλακτικά δέντρα. Για την κατασκευή των δέντρων μέγιστης φειδωλότητας αρχικά προσδιορίζονται όλες οι πληροφοριακές θέσεις μιας στοίχισης. Στη συνέχεια, καθορίζεται ποιο απ' όλα τα πιθανά δέντρα χωρίς ρίζα περιέχει τον ελάχιστο αριθμό μεταλλαγών σε αυτές τις θέσεις συνολικά. Το δέντρο ή τα δέντρα που περιέχουν το μικρότερο αριθμό μεταλλαγών όταν εξετάζονται όλες οι θέσεις μιας στοίχισης είναι το δέντρο ή τα δέντρα με τη μέγιστη φειδωλότητα.

Το γεγονός ότι μπορεί να προκύψουν πάνω από ένα δέντρα με την ίδια βαθμολογία φειδωλότητας θεωρείται ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου. Ένα πολύ χρήσιμο αποτέλεσμα που προκύπτει μέσω της προσέγγισης της φειδωλότητας είναι ο προσδιορισμός των προγονικών αλληλουχιών, οι οποίες εμφανίζονται στους κόμβους του δέντρου. Αυτές οι προγονικές αλληλουχίες δίνουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τους περίφημους «χαμένους κρίκους» του αρχείου των απολιθωμάτων και με προσεκτική ανάλυση μπορούν να μας δώσουν ιδιαίτερα σαφείς κατευθύνσεις σχετικά με τη φύση οργανισμών που έχουν εξαφανιστεί εδώ και πολύ καιρό, καθώς και για το περιβάλλον στο οποίο ζουν οι συγκεκριμένοι οργανισμοί.



## **1.9 Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με τη μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας**

Οι προσεγγίσεις μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) αποτελούν καθαρά στατιστικές μεθόδους κατασκευής φυλογενετικών δέντρων. Με τις μεθόδους αυτές εξετάζονται οι πιθανότητες για κάθε νουκλεοτιδική αντικατάσταση ξεχωριστά, σε ένα σύνολο στοιχίσεων αλληλουχίας. Για παράδειγμα, γνωρίζουμε ότι οι μεταπτώσεις συμβαίνουν με τριπλάσια περίπου συχνότητα σε σύγκριση με τις μεταστροφές. Σε μια στοίχιση τριών αλληλουχιών όπου διαπιστώνεται ότι σε μια θέση η μια στήλη περιέχει C, η άλλη T και η τρίτη A, είναι λογικό να θεωρηθεί πιθανότερο οι αλληλουχίες με τη C και T να συγγενεύουν στενότερα μεταξύ τους από ότι με τις αλληλουχίες που περιέχουν A. Η μέθοδος αυτή είναι πιο αποτελεσματική από τις μεθόδους που χρησιμοποιούν αποστάσεις όταν ο ρυθμός εξέλιξης δεν είναι σταθερός (Hasegawa *et al.* 1991). Είναι η πιο αργή καθώς απαιτεί μεγάλο υπολογιστικό χρόνο αλλά παρέχει καλύτερα αποτελέσματα και πιο ακριβή δέντρα σε σχέση με άλλες μεθόδους. Ένα γεγονός που περιπλέκει τους υπολογισμούς των πιθανοτήτων είναι ότι η αλληλουχία του κοινού προγόνου των αλληλουχιών που εξετάζονται συνήθως δεν είναι γνωστή. Αυτό όμως που τους κάνει ακόμη πιο περίπλοκους είναι ότι μπορεί να έχουν γίνει πολυάριθμες αντικαταστάσεις σε μια ή περισσότερες από τις θέσεις που εξετάζονται και ότι όλες οι θέσεις δεν είναι απαραίτητα ανεξάρτητες ή ισοδύναμες. Ωστόσο, είναι δυνατόν να εφαρμοστούν αντικειμενικά κριτήρια για τον υπολογισμό της πιθανότητας κάθε θέσης και κάθε πιθανού δέντρου που περιγράφει τη σχέση των αλληλουχιών σε μια πολλαπλή στοίχιση. Ο αριθμός των πιθανών δέντρων ακόμη και για ένα μέτριο αριθμό αλληλουχιών είναι πολύ μεγάλος με υψηλές υπολογιστικές απαιτήσεις. Παρόλα αυτά, το δέντρο με το ποιο υψηλό άθροισμα πιθανοτήτων είναι εξ ορισμού αυτό που πιθανότατα αντιπροσωπεύει το πραγματικό φυλογενετικό δέντρο. Η εντυπωσιακή αύξηση της ταχύτητας των υπολογιστών τα τελευταία χρόνια κατέστησε εφικτή την εφαρμογή των προσεγγίσεων μέγιστης πιθανοφάνειας. Δέντρα που προκύπτουν με την προσέγγιση αυτή εμφανίζονται στη βιβλιογραφία ολοένα συχνότερα.

## **1.10 Δοκιμασία *bootstrap* για την αξιοπιστία των δέντρων**

Όταν στα δεδομένα που θέλουμε να αναλύσουμε περιλαμβάνονται 30 ή περισσότερα είδη, ο αριθμός των πιθανών δέντρων είναι τόσο μεγάλος, που απλώς δεν είναι δυνατόν να εξεταστούν όλα τα πιθανά δέντρα και να

αξιολογηθεί η προσαρμογή των δεδομένων σε καθένα από αυτά. Όμως, τα διάφορα εναλλακτικά δέντρα δεν είναι ανεξάρτητα το ένα από το άλλο και έτσι πολλοί αλγόριθμοι φειδωλότητας χρησιμοποιούν σύντομους δρόμους ώστε να μην είναι απαραίτητη η εξαντλητική αναζήτηση όλων των περιπτώσεων. Εν τούτοις, καμία μέθοδος κατασκευής δέντρου δεν εγγυάται ότι θα δώσει το σωστό δέντρο. Έχουν προταθεί πολυάριθμες παραλλαγές κάθε προσέγγισης και έχουν γίνει εντατικές μελέτες προσομοίωσης προκειμένου να συγκριθεί η στατιστική αξιοπιστία των μεθόδων κατασκευής δέντρων. Τα αποτελέσματα αυτών των προσομοιώσεων δείχνουν ότι μια ομάδα δεδομένων επιτρέπουν να προσδιοριστεί με μια συγκεκριμένη μέθοδο η σωστή φυλογενετική σχέση των ταχα δίνουν συνήθως καλά αποτελέσματα και με όλες τις άλλες δημοφιλείς μεθόδους. Ωστόσο, αν έχουμε εισαγάγει μεγάλο αριθμό αντικαταστάσεων στις αλληλουχίες που απαρτίζουν την ομάδα δεδομένων που χρησιμοποιείται στην προσομοίωση ή αν ο αριθμός αντικαταστάσεων είναι διαφορετικός από κλάδο σε κλάδο, τότε καμία από τις μεθόδους δεν είναι πολύ αξιόπιστη. Ο γενικός κανόνας είναι ότι, αν από τη μια ομάδα δεδομένων προκύπτει το ίδιο δέντρο (ή πανομοιότυπα δέντρα) μετά από ανάλυση με δυο ή τρεις διαφορετικές μεθόδους κατασκευής δέντρων, τότε αυτό το δέντρο μπορεί να θεωρηθεί αρκετά αξιόπιστο. Είναι επίσης πιθανό διαφορετικά τμήματα των δέντρων να προσδιοριστούν με διαφορετικό βαθμό εμπιστοσύνης. Οι δοκιμασίες bootstrap επιτρέπουν την κατά προσέγγιση εκτίμηση αυτού του βαθμού εμπιστοσύνης με ποσοτικό τρόπο. Η διαδικασία μιας δοκιμασίας bootstrap είναι απλή: ένα υποσύνολο των αρχικών δεδομένων επιλέγεται με τυχαίο τρόπο από την αρχική ομάδα δεδομένων και κατασκευάζεται ένα δέντρο με τα δεδομένα αυτού του υποσυνόλου. Η διαδικασία της δειγματοληψίας επαναλαμβάνεται, ώστε να δημιουργηθούν εκατοντάδες ή χιλιάδες ομάδες δεδομένων από τα οποία προκύπτει ένας αντίστοιχα μεγάλος αριθμός δέντρων. Οι περιοχές των δέντρων που είναι κοινές σε πολλά από αυτά τα δέντρα αντιστοιχούν σε περιοχές υψηλού βαθμού εμπιστοσύνης, γεγονός που σημαίνει ότι η ομαδοποίηση των ταχα σε αυτές τις περιοχές του δέντρου υποστηρίζεται ιδιαίτερα ικανοποιητικά από ολόκληρη την αρχική ομάδα δεδομένων. Το ποσοστό των δέντρων που δίνουν την ίδια ομαδοποίηση συχνά σημειώνεται δίπλα στον αντίστοιχο κόμβο στο φυλογενετικό δέντρο και εκφράζει το σχετικό βαθμό εμπιστοσύνης τους συγκεκριμένου τμήματος του δέντρου. Η δοκιμασία bootstrap είναι ιδιαίτερα δημοφιλής στις φυλογενετικές αναλύσεις παρόλο που η εφαρμογή της σε συνδυασμό με ορισμένες μεθόδους δημιουργίας δέντρου είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα (Αλαχιώτης 2007, Holmes 2003).

### **1.11 Επιλογή χαρακτήρων για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων**

Μέχρι τη δεκαετία του '80, στις φυλογενετικές μελέτες χρησιμοποιούνταν σχεδόν αποκλειστικά μορφολογικοί χαρακτήρες. Το κυριότερο πλεονέκτημα των μορφολογικών χαρακτήρων είναι ότι συνιστούν φαινοτυπικές εκδηλώσεις πολλών, συνήθως, γονιδίων. Επομένως, συμπυκνώνουν ποσό πληροφορίας που αντιστοιχεί σε μεγάλο τμήμα του γενετικού υλικού. Ο φαινότυπος άλλωστε, είναι από εξελικτική σκοπιά εκείνος που υπόκειται πιο άμεσα στους νόμους της φυσικής επιλογής. Επιπλέον, είναι δυνατό να συμπεριληφθεί αρκετά μεγάλο δείγμα ατόμων στην ανάλυση, μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα σφαλμάτων. Η περιγραφή των μορφολογικών χαρακτήρων, όμως, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την υποκειμενικότητα του παρατηρητή, χωρίς να είναι πάντοτε δυνατή η σαφής διάκριση των καταστάσεών τους. Ακόμη, σε πολλές περιπτώσεις το πλήθος των διαθέσιμων χαρακτήρων είναι ανεπαρκές για τη εξαγωγή ασφαλών φυλογενετικών υποθέσεων και πολλές φορές οι χαρακτήρες εξαρτώνται από το στάδιο ανάπτυξης (Hebert *et al.* 2003). Το κυριότερο όμως μειονέκτημα που χαρακτηρίζει τους μορφολογικούς χαρακτήρες, είναι η αδυναμία στον εντοπισμό ομοπλασιών, δηλαδή ομοιοτήτων που δεν οφείλονται σε κοινή καταγωγή (Moore και Willmer, 1997).

Με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, όπως η PCR, κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός αλληλουχιών DNA σε μεγάλη κλίμακα και οι μοριακοί χαρακτήρες άρχισαν να χρησιμοποιούνται πλέον συστηματικά. Είναι αυτονόητο πως, αφού η φυλογένεση προσπαθεί να ερμηνεύσει όχι μόνο τα πρότυπα των εξελικτικών αλλαγών αλλά και τη ροή της κληρονομικότητας τους, οι γονιδιωματικές αλληλουχίες έχουν εξέχουσα θέση στις φυλογενετικές αναλύσεις. Οι μοριακοί χαρακτήρες προσφέρουν μεγάλο πλήθος δεδομένων και με διαρκώς μειούμενο κόστος. Επίσης, αποφεύγεται το υποκειμενικό στοιχείο της περιγραφής τους και παρέχεται ένα μέτρο γενετικής απόκλισης ακόμα και για πολύ απομακρυσμένες ομάδες οργανισμών (Wheelis *et al.* 1992).

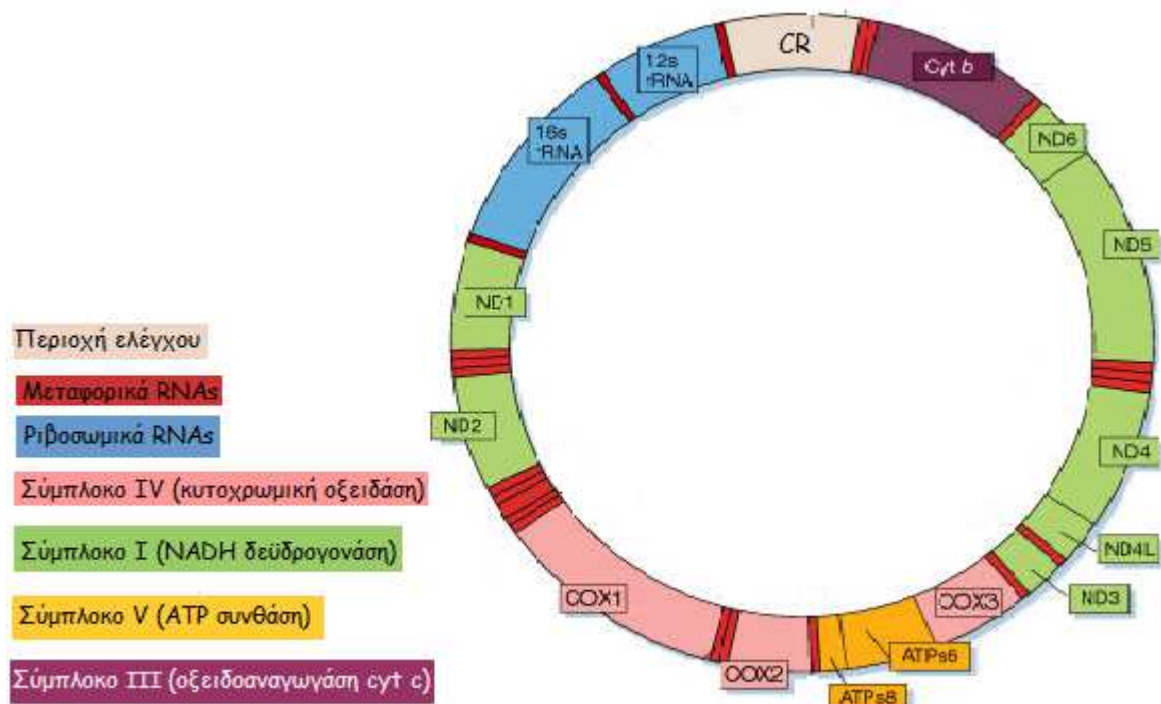
Οι μοριακοί χαρακτήρες που επιλέγονται συνήθως για τη διεξαγωγή φυλογενετικών αναλύσεων είναι τμήματα μιτοχονδριακών γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες αλλά και γονιδίων που κωδικοποιούν για rRNA.

## 1.12 Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε διάφορες βιοχημικές διαδικασίες όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Μέσα σε αυτά τα υποκυτταρικά οργανίδια εντοπίζεται το γονιδίωμα τους, διαχωρισμένο από την πυρηνική χρωματίνη, το οποίο καλείται μιτοχονδριακό DNA. Σε όλους σχεδόν τους πολυκύτταρους οργανισμούς το mtDNA είναι ένα κυκλικό, δίκλωνο, υπερελικωμένο μόριο (Εικ. 3). Μόνον οι τάξεις Cnbozoa, Scyphozoa και Hydrozoa των κνιδόζων έχουν γραμμικά μόρια mtDNA (Boore, 1999).

Το mtDNA των περισσότερων ζώων έχει μέγεθος ~15-17 kb και περιέχει τα ίδια 37 γονίδια για όλα σχεδόν τα είδη. Αν και αρκετά μεγαλύτερα μιτοχονδριακά γονιδιώματα έχουν βρεθεί, αυτά είναι προϊόντα διπλασιασμού τμημάτων του mtDNA παρά διαφοροποιήσεις στο περιεχόμενό του σε γονίδια. Τα γονίδια του mtDNA κωδικοποιούν για 13 πρωτεϊνικές υπομονάδες των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, για τα δύο rRNAs του μιτοχονδριακού ριβοσώματος και για τα 22 tRNAs που είναι απαραίτητα για τη μετάφραση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το mtDNA. Και τα 37 γονίδια που βρίσκονται σε ένα σύνθετο μιτοχονδριακό DNA έχουν ομόλογα γονίδια στο mtDNA των φυτών, των μυκήτων και των πρωτίστων. Υπάρχει επίσης μια μεγάλη μη κωδική περιοχή, η περιοχή ελέγχου (control region), η οποία είναι γνωστό ότι περιέχει στοιχεία ελέγχου της αντιγραφής και της μεταγραφής. Δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσο αυτές οι περιοχές ελέγχου είναι ομόλογες μεταξύ απόμακρων ζωικών ειδών, ή εναλλακτικά έχουν προκύψει από διαφορετικές μη κωδικές αλληλουχίες ανεξάρτητα σε ξεχωριστές εξελικτικές γενεαλογίες, δεδομένου ότι δε μοιράζονται κάποια ομολογία στις αλληλουχίες εκτός από τις περιπτώσεις που πρόκειται για στενά συγγενικά είδη (Boore, 1999).

Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων, μαζί με τα RNA και τις πρωτεΐνες που εισάγονται από το κυτταρόπλασμα, παρέχουν στο μιτοχόνδριο το δικό του σύστημα αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης. Η μελέτη αυτών των γονιδιωμάτων εξυπηρετεί ως μοντέλο για την γενωμική εξέλιξη. Επιπλέον, η σύγκριση της οργάνωσης των μιτοχονδριακών γονιδίων έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα πολύτιμη για την εξαγωγή αρχαίων εξελικτικών σχέσεων, αφού φαίνεται ότι η διάταξη των γονιδίων σε απόμακρες ταξινομικά ομάδες είναι μοναδική και έτσι είναι σχεδόν αδύνατο να συμβεί αυτό το γεγονός με τον ίδιο τρόπο σε ανεξάρτητες εξελικτικές γενεαλογίες (Boore, 1999).



Εικόνα 3: Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

(<http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6865/full/414807a.html>)

### 1.13 Ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA

Μια υπόθεση που θα μπορούσε να γίνει για τα γονίδια των μιτοχονδρίων, είναι ότι οι εξελικτικές αλλαγές σε αυτά συμβαίνουν πολύ αργά. Αυτή η υπόθεση βασίζεται σε μια ευρέως αποδεκτή γενικότητα, που αφορά τους ρυθμούς της μοριακής εξέλιξης: όσο πιο σημαντική είναι η λειτουργία ενός γονιδίου ή μιας πρωτεΐνης, τόσο πιο αργά υποβάλλεται σε εξελικτικές αλλαγές της πρωτοταγούς δομής. Τα μιτοχόνδρια έχουν εξαιρετικά σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Επειδή η ζωή των ζώων εξαρτάται από τις μιτοχονδριακές λειτουργίες, θα αναμενόταν η μιτοχονδριακή εξέλιξη να είναι ιδιαίτερα περιορισμένη. Παρόλα αυτά, πολλές εξελικτικές μελέτες έχουν δείξει ότι το μιτοχονδριακό DNA εξελίσσεται πολύ ταχύτερα από το πυρηνικό (Brown *et al.* 1979).

Το μικρό μέγεθος του mtDNA και ο εξαιρετικά υψηλός ρυθμός αντικαταστάσεων των βάσεων του έχουν εγείρει μεγάλο ενδιαφέρον σχετικά με την εξέλιξη του. Ο μέσος ρυθμός συνώνυμων μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια των θηλαστικών είναι περίπου  $5,7 \times 10^{-8}$  ανά θέση ανά έτος, είναι δηλαδή περίπου δεκαπλάσιος από το μέσο ρυθμό συνώνυμων μεταλλάξεων των γονιδίων του πυρήνα. Ο ρυθμός μη συνώνυμων

μεταλλάξεων ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των γονιδίων του μιτοχονδρίου αλλά σε κάθε περίπτωση είναι σημαντικά υψηλότερος από το μέσο ρυθμό συνώνυμων αντικαταστάσεων που παρατηρείται στα πυρηνικά γονίδια. Γενικά το mtDNA των θηλαστικών εξελίσσεται 5-10 φορές ταχύτερα από το πυρηνικό DNA, ίσως επειδή η πολυμεράση DNA, που αντιγράφει το μιτοχονδριακό DNA, στερείται της ικανότητας εντοπισμού και επιδιόρθωσης λαθών, ικανότητα την οποία διαθέτουν οι πολυμεράσες που αντιγράφουν το πυρηνικό γονιδίωμα (Futuyama, 1995). Επιπλέον, το mtDNA εκτίθεται διαρκώς στα τοξικά παραπροϊόντα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αφού δε διαθέτει το προστατευτικό περίβλημα ιστονών του πυρηνικού γονιδιώματος (Brown, 1983). Επίσης, είναι πιθανό, η πίεση της φυσικής επιλογής που φυσιολογικά εξαλείφει πολλές μεταλλαγές στα γονίδια του πυρήνα να είναι λιγότερο έντονη στα μιτοχόνδρια, επειδή τα περισσότερα κύτταρα περιέχουν πολλές δεκάδες μιτοχόνδρια καθένα από τα οποία περιέχει μέχρι και δώδεκα αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Τα παραπάνω εξηγούν γιατί το mtDNA παρουσιάζει 5-10 φορές υψηλότερο ρυθμό νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων από το πυρηνικό DNA.

Αν και είναι γνωστό ότι οι μιτοχονδριακές αλληλουχίες εξελίσσονται ταχύτατα, η οργάνωση των γονιδίων φαίνεται ότι παραμένει ίδια για μεγάλες περιόδους της εξελικτικής ιστορίας. Πχ. η γονιδιακή οργάνωση στα mtDNAs του ανθρώπου και της πέστροφας είναι όμοιες. Με μερικές εξαιρέσεις, η οργάνωση των γονιδίων είναι σχετικά σταθερή εντός μεγάλων ομάδων, αλλά ποικίλει μεταξύ αυτών. Συγκρίσεις αυτής της οργάνωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επίλυση των προβλημάτων που αφορούν στους βαθύτερους κλάδους της φυλογένεσης των μεταζώων (Boore, 1999).

### **1.14 Τα μιτοχονδριακά γονίδια στη φυλογένεση**

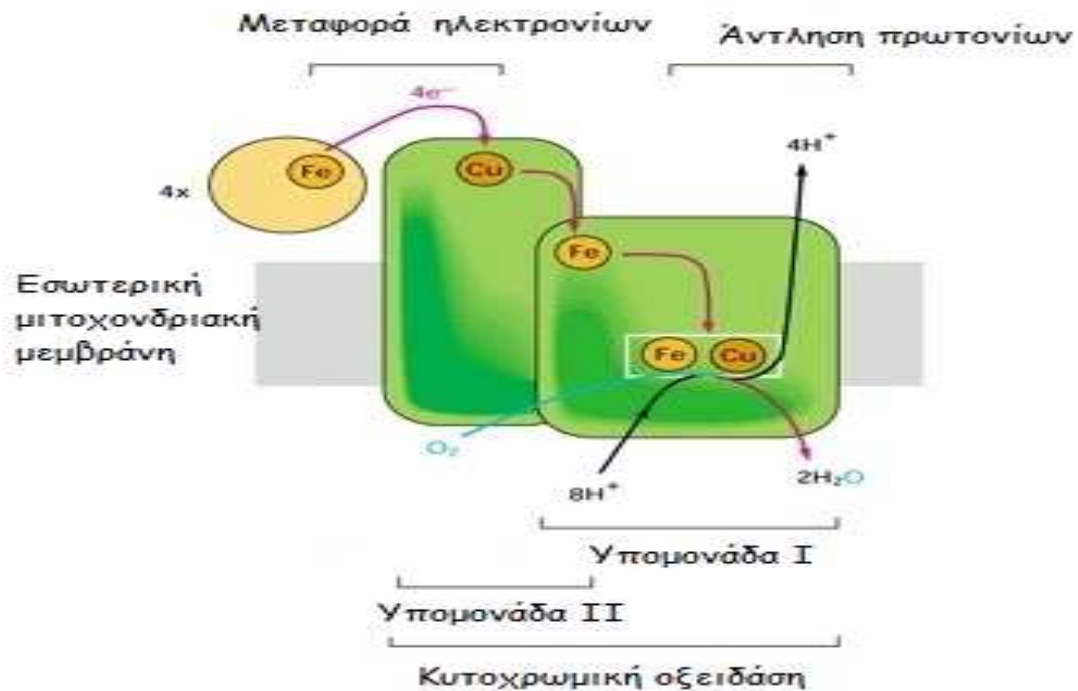
Το μιτοχονδριακό DNA χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια σε μελέτες φυλογένεσης και έχει αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμο και σε άλλες περιπτώσεις. Η ευρεία χρήση του οφείλεται σε κάποιες μοναδικές ιδιότητες του, που το καθιστούν πολύτιμο εξελικτικό εργαλείο. Κάποιες από αυτές τις ιδιότητες είναι το μικρό μέγεθος, ο υψηλός αριθμός αντιγράφων, η παρουσία γονιδίων ή διαφορετικών περιοχών του ίδιου γονιδίου που εξελίσσονται με διαφορετικό ρυθμό, η μητρική κληρονομικότητα, η έλλειψη ανασυνδυασμού, η ευκολία της απομόνωσης του και ο ιδιαίτερα υψηλός ρυθμός μεταλλάξεων (Gissi *et al.* 2008). Η αφθονία του στους ιστούς και ο εξωκυτταρικός εντοπισμός του mtDNA, καθιστούν την ανάλυση του ευκολότερη σε σχέση με το πυρηνικό (Pakendorf και Stoneking, 2005).

Από τα μιτοχονδριακά γονίδια, εκείνα που συνήθως επιλέγονται για φυλογενετικές αναλύσεις, είναι αυτά που κωδικοποιούν για πρωτεϊνικές υπομονάδες. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για τις υπομονάδες I, II και III της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI, COII, COIII αντίστοιχα), για το αποένζυμο του κυτοχρώματος b (Cytb), για τις υπομονάδες 1-6 και 4L της αφυδρογονάσης NADH (ND1-6 και 4L) και τέλος για τις υπομονάδες 6 και 8 της ATP συνθάσης (A6 και A8) (Boore, 1999). Επίσης, σε κάποιες μελέτες χρησιμοποιείται το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16s rRNA. Από όλα τα παραπάνω γονίδια, το γονίδιο της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) κατέχει κάποια χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο ως μοριακό δείκτη για εξελικτικές μελέτες (Hebert *et al.* 2003).

### **1.15 Γονίδιο υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI)**

Τα γονίδια του mtDNA, λόγω του πολύ γρήγορου ρυθμού εξέλιξης, χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή φυλογενετικών συμπερασμάτων που αφορούν πρόσφατες καταγωγές. Αντίθετα, τα πυρηνικά γονίδια χρησιμοποιούνται σε μελέτες, των οποίων στόχος είναι η επίλυση εξελικτικών σχέσεων μεταξύ ομάδων που έχουν μακρά ιστορία εξελικτικής απόκλισης. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, από τα 13 γονίδια του mtDNA που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, το γονίδιο της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) είναι ιδιαίτερα δημοφιλές στον καθορισμό των σχέσεων μεταξύ στενά συγγενικών taxa (Remigio and Hebert, 2003).

Η κυτοχρωμική οξειδάση είναι ένα μεγάλο διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτών και στα βακτήρια. Είναι το τελευταίο ένζυμο στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς  $e^-$ . Συνοπτικά, ο ρόλος του είναι να προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο από κάθε ένα από τα τέσσερα μόρια κυτοχρώματος c και να το μεταφέρει σε ένα μόριο οξυγόνου, μετατρέποντας αυτό σε δύο μόρια νερού ενώ παράλληλα δημιουργεί μια ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων (Εικ. 4) (Μαργαρίτης, 2004).



Εικόνα 4: Ρόλος της κυτοχρωμικής οξειδάσης στην αναπνευστική αλυσίδα (Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson J.D. *The Respiratory Chain and ATP Synthase*. 1994)

Το σύμπλεγμα της κυτοχρωμικής οξειδάσης αποτελείται από 11-13 πρωτεϊνικές υπομονάδες, εκ των οποίων οι τρεις κωδικοποιούνται από τα μιτοχονδριακά γονίδια *COI*, *COII* και *COIII* (Vygodina και Konstantinou, 2007). Το γονίδιο *COI* είναι από τα μεγαλύτερα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και προτιμάται σε φυλογενετικές αναλύσεις για τους παρακάτω λόγους.

Πρώτον, λόγω του μεγάλου μεγέθους του, επιτρέπεται η ενίσχυση και αλληλούχηση πολλών περισσότερων χαρακτήρων, δηλαδή περιέχει μεγαλύτερο φυλογενετικό σήμα σε σχέση με άλλα μιτοχονδριακά γονίδια (Lunt *et al.* 1996, Hebert *et al.* 2003).

Δεύτερον, περιέχει τόσο συντηρημένες όσο και πολυμορφικές αλληλουχίες. Οι περιοχές που αποτελούν το ενεργό κέντρο της υπομονάδας είναι πολύ πιο συντηρημένες από άλλες αλληλουχίες του ίδιου γονιδίου (Park *et al.* 2009).

Τρίτον, υπάρχουν πολλοί εκκινητές των οποίων οι αλληλουχίες είναι διαθέσιμες σε βάσεις δεδομένων. Οι εκκινητές αυτοί είναι εκφυλισμένοι και συνεπώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση του γονιδίου από οποιοδήποτε φύλο και αν προέρχεται αυτό (Pora *et al.* 2007, Folmer *et al.* 1994).



Πέμπτον, το νουκλεοτίδιο της 3<sup>ης</sup> θέσης του κωδικονίου έχει αυξημένο ρυθμό υποκαταστάσεων, οδηγώντας σε έναν εξελικτικό ρυθμό που είναι τρεις φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των 12S και 16S rDNA (Hebert *et al.* 2003).

Είναι γεγονός ότι η εξέλιξη αυτού του γονιδίου είναι αρκετά γρήγορη ώστε να μπορεί να διαχωρίσει όχι μόνο στενά συγγενικά είδη, αλλά και φυλογεωγραφικές ομάδες μέσα σε ένα είδος. Παρότι το COI πρέπει να μελετηθεί μαζί με άλλα μιτοχονδριακά γονίδια για τη διαλεύκανση τέτοιων περιπτώσεων πρόσφατου διαχωρισμού, αυτό το γονίδιο φαίνεται να παρέχει βαθύτερη φυλογενετική γνώση σε σχέση με εναλλακτικά όπως το *cytb*, επειδή οι αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία συμβαίνουν πιο αργά σε σχέση με τα υπόλοιπα μιτοχονδριακά γονίδια (Hebert *et al.* 2003).

### **1.16 Τα είδη του γένους *Saga***

Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε μια προσπάθεια για φυλογενετική ανάλυση των ειδών του γένους *Saga*. Τα είδη του γένους *Saga* ανήκουν στην οικογένεια των Tettigoniidae που αποτελείται από περισσότερα από 6400 είδη. Είναι έντομα που απαντώνται στην Αρμενία, Αυστρία, Αζερμπαϊτζάν, Βουλγαρία, Κίνα, Τσεχία, Γαλλία, Γεωργία, Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Τουρκία και πολλές άλλες χώρες. Στην καθομιλουμένη είναι γνωστά ως τριζόνια ή γρύλοι και κάποια είναι αρπακτικά έντομα, τρέφονται δηλαδή από άλλα μικρά έντομα. Διαθέτουν την ικανότητα του μιμητισμού και καμουφλάρονται παίρνοντας τα σχήματα και τα χρώματα των φύλλων. Κάποια από αυτά θεωρούνται ζιζάνια που καταστρέφουν σοδειές και για αυτόν τον λόγο ψεκάζονται. Τα είδη του γένους *Saga* μπορούν να φτάσουν σε μήκος μέχρι 12cm και είναι ικανά να καταφέρουν ένα επώδυνο τσίμπημα (Cunningham 2009, Cantrall 1972).

Υπάρχουν 19 είδη και υποείδη του γένους *Saga*, τα οποία είναι τα: *S. beieri*, *S. campbelli*, *S. campbelli campbelli*, *S. campbelli gracilis*, *S. cappadocica*, *S. ephippigera*, *S. ephippigera ephippigera*, *S. ephippigera syriaca*, *S. hellenica*, *S. ledereri*, *S. longicaudata*, *S. natoliae*, *S. ornata*, *S. pedo*, *S. pedo pedo*, *S. puella*, *S. quadrisignata*, *S. rammei* και *S. rhodiensis* (Εικ. 5). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη των ειδών που μελετήθηκαν.



*Saga pedo*



*Saga natoliae*



*Saga hellenica*



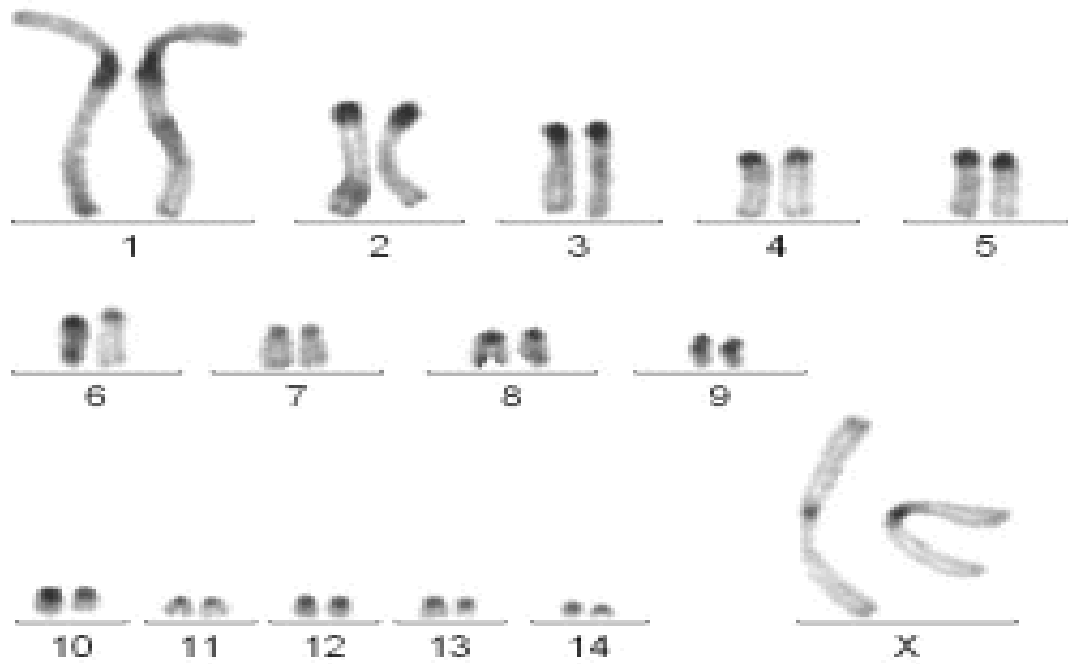
*Saga rhodiensis*

Εικόνα 5: Είδη του γένους *Saga* (<http://www.biolib.cz/en/image/id5775/>)

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη των ειδών που μελετήθηκαν

Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Arthropoda
Κλάση	Insecta
Τάξη	Orthoptera
Οικογένεια	Tettigoniidae
Υποοικογένεια	Saginae
Γένος	<i>Saga</i>
Είδος	<i>S. pedo</i> , <i>S. natoliae</i> , <i>S. rhodiensis</i> , <i>S. cambelli</i> , <i>S. rammei</i> , <i>S. hellenica</i>

Τρία από τα παραπάνω είδη (*S. hellenica*, *S. rhodiensis* και *S. natoliae*) έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες για ανάλυση του καρυότυπου. Αποδείχθηκε ότι τα αρσενικά φέρουν 29 χρωμοσώματα ( $2n=28+XO$ ) και τα θηλυκά 30 χρωμοσώματα ( $2n=28+XX$ ) (Elzbieta *et al.* 2007) (Εικ.6). Πρόσφατες όμως μελέτες αναφέρουν ένδειξη πολυπλοειδίας (Cunningham, 2009).



Εικόνα 6: Καρυότυπος θηλυκού ατόμου *Saga natoliae*  
(<http://geem06.free.fr/GR/etudesaga.html>)

## ΣΚΟΠΟΣ

Τα είδη του γένους *Saga* που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία μοιράζονται πολλά κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά, πράγμα το οποίο δυσκολεύει σε μεγάλο βαθμό το διαχωρισμό τους και την κατάταξη τους με χρήση μορφολογικών χαρακτήρων. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια διαχωρισμού των ειδών, χρησιμοποιώντας μοριακούς δείκτες. Συγκεκριμένα, αναλύθηκε ένα τμήμα ~400 ζευγών βάσεων του μιτοχονδριακού γονιδίου *COI* και ένα τμήμα ~ 200 ζευγών βάσεων του μιτοχονδριακού γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16s rRNA, προκειμένου να διαλευκανθούν οι φυλογενετικές σχέσεις αυτών των ειδών.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ</b>
Acetic Acid (Οξικό οξύ)
Acrylamide (Ακρυλαμίδη)
Agarose (Αγαρόζη)
Bis-Acrylamide (Δις-Ακρυλαμίδη)
Ammonium persulfate (Υπερθειικό αμμώνιο)
2-propanol (2-προπανόλη)
Bromophenol Blue (Μπλε βρωμοφαινόλη)
Boric acid (Βορικό οξύ)
Xylene Cyanol (Κυανό του ξυλενίου)
Chloroform (Χλωροφόρμιο)
NaCl (Χλωριούχο νάτριο)
SDS (Θειικό δωδεκακυλικό νάτριο)
dNTPs (Δεοξυριβονουκλεοτίδια)
EDTA (Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
Ethidium bromide (Βρωμιούχο αιθίδιο)
EtOH (Αιθανόλη)
Proteinase K (Πρωτεϊνάση K)
Glycerol (Γλυκερόλη)
HCl 37% (Υδροχλωρικό οξύ)
Formamide (Φορμαμίδιο)
NaOH (Υδροξείδιο του νατρίου)
Formaldehyde (Φορμαλδεΐδη)
MgCl <sub>2</sub> (Χλωριούχο μαγνήσιο)
NaBH <sub>4</sub> (Βοροϋδρίδιο του νατρίου)
Phenol (Φαινόλη)
TEMED (Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη)
Tris Base (Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο)
AgNO <sub>3</sub> (Νιτρικός άργυρος)
100bp Ladder ( Μάρτυρας μοριακού βάρους)
Καρα Ταq (Τaq πολυμεράση της εταιρίας Καρα)

## 2.1 Συλλογή δειγμάτων

Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 19 δείγματα του γένους *Saga*, τα οποία ανήκουν στα είδη *Saga pedo* (8 άτομα), *Saga cambelli* (3 άτομα), *Saga rhodiensis* (2 άτομα), *Saga rammei* (2 άτομα), *Saga natoliae* (1 άτομο) και *Saga hellenica* (3 άτομα).

## 2.2 Απομόνωση DNA

Το πρώτο βήμα που είναι απαραίτητο για την διεξαγωγή της φυλογενετικής ανάλυσης είναι η απομόνωση του γενετικού υλικού από τα κύτταρα των οργανισμών, το οποίο περιλαμβάνει τόσο το γενωμικό DNA όσο και το μιτοχονδριακό. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε είναι το εξής:

Για κάθε απομόνωση απαιτούνται 50-100 mg ιστού και ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

1. Τεμαχίζουμε τον ιστό και τον τοποθετούμε σε σωλήνα erpendorf του 1,5ml. Προσθέτουμε 500μl  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,2M, 50μl SDS 5% και 5μl πρωτεΐνάση K 20mg/ml.
2. Επωάζουμε τα δείγματα στους 55° C για μία ώρα.
3. Προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24V:1V). Αναδεύουμε έντονα τα δείγματα.
4. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10 λεπτά στους 4° C.
5. Μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 1ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη.
6. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 5 λεπτά στους 4° C.
7. Μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf του 1,5ml.
8. Προσθέτουμε 1ml παγωμένη ισοπροπανόλη και αναδεύουμε.
9. Επωάζουμε τα δείγματα στους -20° C για 20 λεπτά.
10. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 20 λεπτά στους 4° C.
11. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο υγρό προσεκτικά για να μείνει το ίζημα ανέπαφο.
12. Προσθέτουμε 1ml παγωμένη αιθανόλη 70% και αναδεύουμε.
13. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 5 λεπτά στους 4° C.
14. Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό.

15. Τοποθετούμε τα δείγματα στους 37° C ώστε να εξατμιστεί οποιοδήποτε υγρό υπόλειμμα.
16. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100μl ddH<sub>2</sub>O.
17. Αποθηκεύουμε τα δείγματα στους -20° C.

Το διάλυμα οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa) χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και για την ομογενοποίηση του ιστού. Η χρήση του απορρυπαντικού SDS συμβάλλει στην διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης και στην απελευθέρωση του γενετικού υλικού στο διάλυμα. Επίσης αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η πρωτεΐνάση K προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών συμβάλλοντας έτσι και αυτή στην προστασία του DNA από την δράση των νουκλεασών. Στην φαινόλη οφείλεται ο διαχωρισμός των φάσεων και η κατανομή του DNA στην υπερκείμενη υδατική φάση. Επίσης, διαχωρίζει λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα. Το χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται για τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων και την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαινόλης από την υδατική φάση, τα οποία αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα στην περαιτέρω χρήση του DNA. Η ισοαμυλική αλκοόλη χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της σταθερότητας του δείγματος και της υγρασίας καθώς τόσο η φαινόλη όσο και το χλωροφόρμιο συνιστούν ασταθείς, πτητικές χημικές ενώσεις. Η ισοπροπανόλη και η αιθανόλη χρησιμοποιούνται για την κατακρήμνιση του DNA καθώς αυτό είναι αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

### ***2.3 Ποσοτικοποίηση DNA***

Μετά την απομόνωση πραγματοποιείται ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του DNA με φωτομέτρηση των δειγμάτων και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v.

Αν η ποσότητα του DNA είναι πολύ μικρή τότε μπορεί να προσδιοριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου. Επίσης, η ηλεκτροφορητική εικόνα του δείγματος παρέχει στοιχεία για την καθαρότητά του.

Αν το διάλυμα του DNA είναι αρκετά καθαρό τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο φωτομετρικός προσδιορισμός, διαφορετικά το φωτόμετρο δεν θα μπορεί να προσδιορίσει με ακρίβεια την ποσότητα του DNA .



Για να πραγματοποιηθεί η φωτομέτρηση γίνεται αραιώση 1μl διαλύματος DNA σε 49μl ddH<sub>2</sub>O. Η ποσότητα του DNA υπολογίζεται αυτόματα από το φωτόμετρο λαμβάνοντας υπόψη τον συντελεστή αραιώσης.

Η συγκέντρωση του DNA ενδείκνυται να είναι πάνω από 150 ng/μl. Για την καθαρότητα του DNA υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης στα 260nm και στα 280nm (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>). Όταν ο λόγος αυτός είναι από 0,7-2,0 τότε το δείγμα θεωρείται καθαρό και είναι κατάλληλο για χρήση.

## **2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι μια *in vitro* ενζυμική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό μιας ειδικής αλληλουχίας DNA. Η τεχνική αυτή επινοήθηκε από τον Kary Mullis στα μέσα της δεκαετίας του 1980 και έφερε επανάσταση στη μοριακή γενετική. Με την PCR μπορούμε να παράγουμε τεράστιες ποσότητες μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA χωρίς να χρειαστεί να καταφύγουμε σε κλωνοποίηση. Στην PCR χρησιμοποιείται μια πολυμεράση DNA για τη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές, οι οποίοι χρειάζονται για την έναρξη της σύνθεσης του DNA. Επειδή κατά την τεχνική αυτή γίνεται πολλαπλασιασμός του DNA, η αρχική ποσότητα DNA που χρειάζεται είναι πολύ μικρή: ακόμη και ένα μόνο μόριο DNA αρκεί (Watson, 2007).

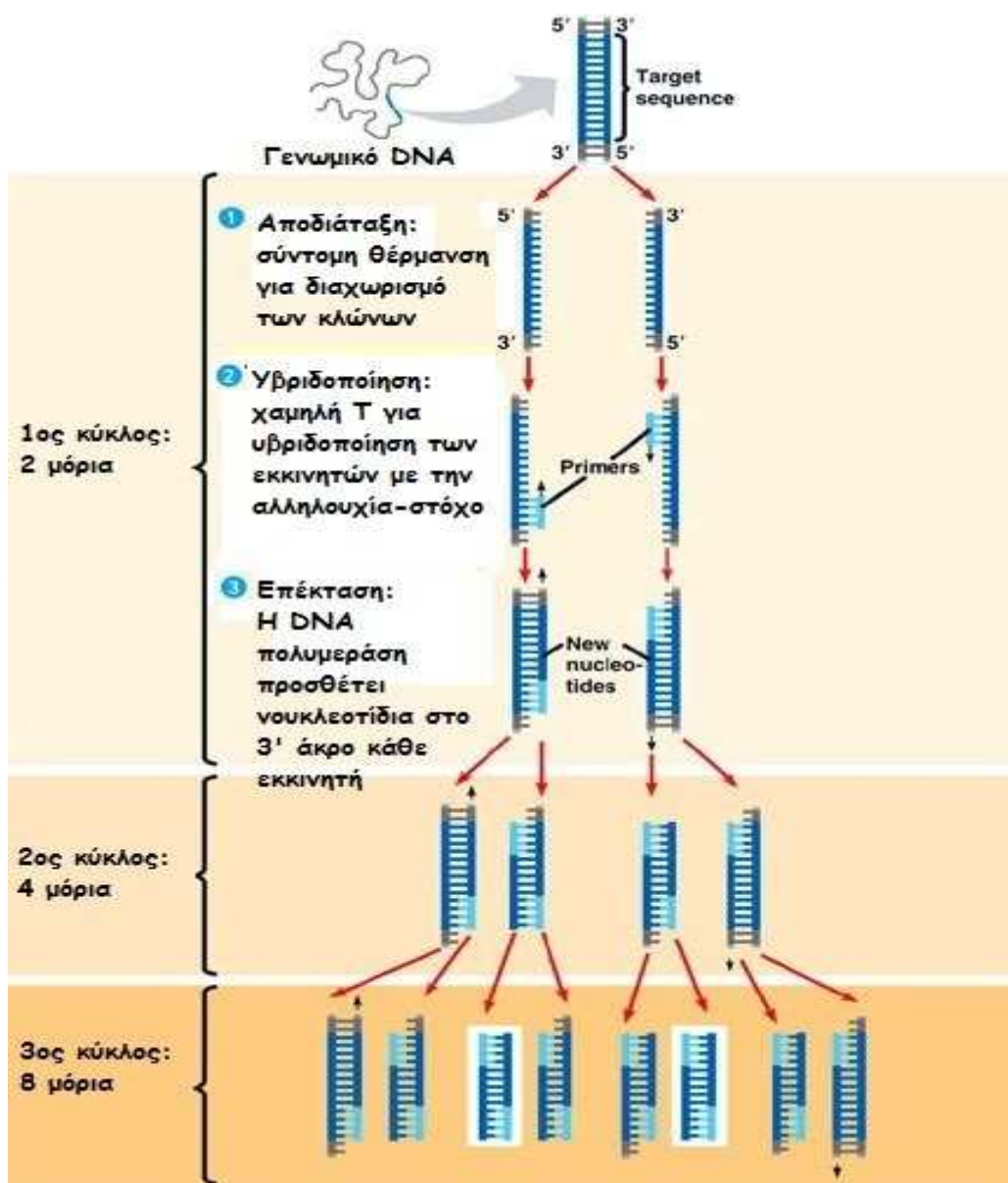
Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως μήτρα για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού νέου κλώνου. Για να προκύψει μονόκλωνο DNA, αρκεί η θέρμανση του δίκλωνου DNA σε θερμοκρασία που πλησιάζει το σημείο βρασμού. Και οι δύο κλώνοι της διπλής έλικας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων μορίων. Καθώς το ένζυμο χρειάζεται ένα τμήμα δίκλωνου DNA ώστε να ξεκινήσει (εκκινήσει) τη σύνθεση, προσθέτουμε στην αντίδραση δύο ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές. Καθένας από αυτούς είναι συμπληρωματικός με μία περιοχή του ενός από τους κλώνους της DNA-μήτρας, ώστε να υβριδοποιείται σε αυτή (Watson, 2007).

Οι εκκινητές επιλέγονται ούτως ώστε να υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Κάθε νέος κλώνος που συντίθεται από τον ένα εκκινητή περιλαμβάνει τη θέση στην οποία υβριδοποιείται ο άλλος εκκινητής. Δημιουργούνται λοιπόν νέες θέσεις πρόσδεσης εκκινητών σε κάθε νέο κλώνο DNA που συντίθεται. Το μείγμα της

αντίδρασης θερμαίνεται ξανά για να διαχωριστούν και τα νέα μόρια και να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές στις θέσεις τους (Watson, 2007).

Κατά την PCR επαναλαμβάνονται τα εξής βήματα (Εικ. 7):

- Αποδιάταξη DNA (διαχωρισμός κλώνων) στους 94° C
- Υβριδοποίηση εκκινητών με το DNA-στόχο στους 40-65° C
- Επέκταση νέων κλώνων από την πολυμεράση DNA στους 65-75° C



Εικόνα 7: Η διαδικασία της PCR

(<https://sites.google.com/a/luther.edu/genetics/students/tyler-foster-stavneak/pcr-amplification-of-the-region-of-interest>)

Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται 30-35 φορές (n), έτσι ώστε μετά από n κύκλους, το μείγμα της αντίδρασης να περιέχει θεωρητικά 2<sup>n</sup> δίκλινα μόρια DNA τα οποία φέρουν αντίγραφα της αλληλουχίας που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές (Watson, 2007).

Παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση της PCR είναι το μήκος και η αλληλουχία του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Συχνά η πολυμεράση DNA δυσκολεύεται να αντιγράψει αποτελεσματικά αλληλουχίες μεγάλου μήκους ή υψηλής περιεκτικότητας σε GC (Watson, 2007).

Μια από τις πιο σημαντικές παραμέτρους που πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν κατά τη διεξαγωγή της PCR, είναι η επιλογή της πολυμεράσης DNA που θα χρησιμοποιηθεί. Η βέλτιστη επιλογή θα ήταν η χρήση μιας πολυμεράσης DNA με ξεχωριστή ενεργότητα 3' → 5' εξωνουκλεάσης, έτσι ώστε να απομακρύνονται τα λάθη που προκύπτουν κατά τη διαδικασία. Υπάρχουν πολλά τέτοια ένζυμα διαθέσιμα στο εμπόριο, αλλά είναι πολύ ακριβά και έχουν μικρότερη απόδοση. Τα περισσότερα ένζυμα που χρησιμοποιούνται δε διαθέτουν επιδιορθωτική ικανότητα και επομένως είναι πολύ σημαντικό να ελέγχονται οι *in vitro* συνθήκες κατά τη διεξαγωγή της αντίδρασης. Για την αποφυγή εισαγωγής λαθών από τέτοια ένζυμα, προτιμούνται συνθήκες με μικρό χρόνο επέκτασης, χαμηλές συγκεντρώσεις dNTPs, χαμηλές συγκεντρώσεις ενζύμου και χαμηλές συγκεντρώσεις MgCl<sub>2</sub> (Eckert *et al.* 1991).

Υποθέτοντας ότι όλα τα συστατικά έχουν προστεθεί στις κατάλληλες συγκεντρώσεις, το μόνο που μένει είναι η επιλογή του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών. Η εξειδίκευση των εκκινητών καθορίζεται από το μήκος τους, την αλληλουχία τους και τη θερμοκρασία υβριδοποίησης. Για κάθε επιπλέον νουκλεοτίδιο στο μήκος ενός εκκινητή αυξάνεται η εξειδίκευση του κατά τέσσερις φορές καθώς αυξάνεται και η πιθανότητα η συμπληρωματική του αλληλουχία να συναντάται μία μόνο φορά στο DNA στόχο. Ολιγονουκλεοτίδια 18-24 βάσεων τείνουν να συνδέονται ειδικά εάν η θερμοκρασία υβριδοποίησης της αντίδρασης έχει ρυθμιστεί κοντά στο T<sub>m</sub> [T<sub>m</sub>=4(G+C)\*2(T+A)] των εκκινητών (Dieffenbach *et al.* 1993).

Τέλος, οι εκκινητές δε θα πρέπει να είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και ιδιαίτερα στα 3' άκρα τους. Η συμπληρωματικότητα μεταξύ των εκκινητών οδηγεί στο σχηματισμό διμερών εκκινητών, που αποτελούν υπόστρωμα για την πολυμεράση DNA και επομένως εμφανίζονται ως προϊόν σε ένα πήκτωμα αγαρόζης. Τα διμερή αυτά ανταγωνίζονται το υπόστρωμα με αποτέλεσμα να παράγεται σε χαμηλότερο βαθμό το επιθυμητό προϊόν (Dieffenbach *et al.* 1993).

Στη συγκεκριμένη μελέτη εφαρμόστηκε PCR για την ενίσχυση ενός τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) και ενός τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου του 16S rRNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Εκκινητές	Αλληλουχία
Tetti COI Fw	5' - TTG GTG ATG ATC AAA TTT ATA A - 3'
Tetti COI Rv	5' - ACA AAT AAA GGT GTT TGG TCT A - 3'

Εκκινητές	Αλληλουχία
16S rRNA Fw	5' - AYA AGA CGA GAA GAC CC - 3'
16S rRNA Rv	5' - GAT TGC GCT GTT ATC CC - 3'

- Όπου Y = C ή T
- Ο εκκινητής Tetti COI Fw υβριδοποιείται με το DNA στόχο στα νουκλεοτίδια 96 και 117 και ο εκκινητής Tetti COI Rv υβριδοποιείται στα νουκλεοτίδια 486 και 507 του γονιδίου COI. Οι εκκινητές αυτοί βρέθηκαν μέσω BLAST, έχουν κωδικό GU122340.1 και προέρχονται από το είδος *Anabrus simplex* που ανήκει στην οικογένεια Tettigoniidae.
- Ο εκκινητής 16S rRNA Fw υβριδοποιείται στα νουκλεοτίδια 207 και 221 και ο εκκινητής 16S rRNA Rv υβριδοποιείται στα νουκλεοτίδια 388 και 404 του γονιδίου 16S rRNA. Οι εκκινητές αυτοί βρέθηκαν μέσω BLAST, έχουν κωδικό HM856177 και προέρχονται από το είδος *Anterastes serbicus* που ανήκει στην οικογένεια Tettigoniidae.

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται τα υλικά που αναγράφονται στον Πίνακα 2 και οι συνθήκες ενίσχυσης που χρησιμοποιούνται αναφέρονται στους Πίνακες 3 και 4:

**Πίνακας 2: Υλικά που χρησιμοποιούνται στην PCR**

Υλικά	Αρχική Συγκέντρωση	Ποσότητα (μl)	Τελική Συγκέντρωση
DNA (~100ng/ul)		1	
Εκκινητής Fw	50pmol/μl	1	1pmol/μl
Εκκινητής Rv	50pmol/μl	1	1pmol/μl
dNTPs	10mM το καθένα	1	0.2mM το καθένα
MgCl <sub>2</sub>	50mM	2	2mM
Ρυθμιστικό διάλυμα	10x	5	1x
Taq DNA πολυμεράση	5U/μl	0,2	1 unit
ddH <sub>2</sub> O		38,8	
<b>Τελικός όγκος αντίδρασης</b>		<b>50</b>	

**Πίνακας 3: Συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου COI**

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	4 min	1
Αποδιάταξη	95 °C	40 sec	35
Υβριδοποίηση εκκινητή	55 °C	50 sec	35
Επέκταση	72 °C	40 sec	35
Τελική επέκταση	72 °C	10 min	1

**Πίνακας 4: Συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA**

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	4 min	1
Αποδιάταξη	95 °C	40 sec	35
Υβριδοποίηση εκκινητή	53 °C	50 sec	35
Επέκταση	72 °C	40 sec	35
Τελική επέκταση	72 °C	10 min	1

Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v.

## **2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης**

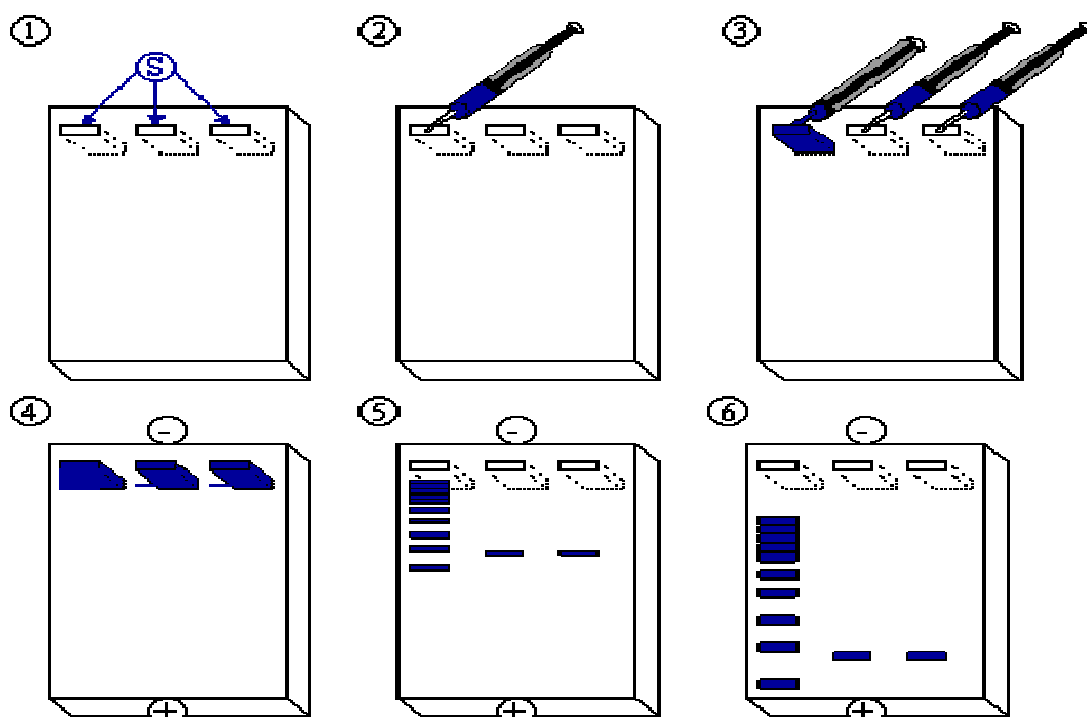
Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό τμημάτων DNA. Η βασική αρχή αυτής της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, τα μόρια του DNA λόγω του αρνητικού φορτίου του φωσφορικού σκελετού, θα μετακινηθούν προς το θετικό πόλο. Η απόσταση που θα διανύσουν τα τμήματα του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Μικρότερα τμήματα μετακινούνται πιο γρήγορα προς το θετικό πόλο γιατί διαπερνούν ευκολότερα τους πόρους της πηκτής, επομένως εμφανίζονται κάτω από τα μεγαλύτερα τμήματα. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην τεχνική αυτή είναι τα εξής:

- TAE 50x (Tris base 121g, Acetic acid 28,5ml, EDTA 0,5M 50ml  $C_{TEA}=0,05M$  , ddH<sub>2</sub>O ως τα 500ml)
- Loading buffer 6x (Glycerol 5ml, Bromophenol Blue 1ml, TBE 10x 1ml, ddH<sub>2</sub>O ως τα 10ml)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)
- TAE 1x (20ml TAE 50x + 980ml ddH<sub>2</sub>O)

. Για την παρασκευή του πηκτώματος διαλύουμε 0,6gr αγαρόζης σε 40ml διαλύματος TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v), θερμαίνουμε και προσθέτουμε 4μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Ένα μόριο DNA συγκεκριμένου μεγέθους μεταναστεύει με διαφορετικό ρυθμό σε πηκτώματα αγαρόζης διαφορετικής συγκέντρωσης. Το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται στο πήκτωμα προκειμένου να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA όταν το πήκτωμα παρατηρηθεί υπό υπεριώδες φως. Η ικανότητα του βρωμιούχου αιθιδίου να παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών ζευγών βάσεων και να διεγείρεται από την υπεριώδη ακτινοβολία με αποτέλεσμα να φθορίζει στο ορατό φάσμα (πορτοκαλί), το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο σε αυτήν την τεχνική. Μετά την προετοιμασία του, το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου πολυμερίζεται. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης απαιτεί την προσθήκη 6x loading buffer στα δείγματα. Συγκεκριμένα, σε 5μl προϊόντος PCR προστίθενται 3μl loading buffer.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts και ακολούθως το πήκτωμα παρατηρείται σε επιτραπέζια λάμπα υπεριώδους φωτός. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο των προϊόντων

της PCR που θα χρησιμοποιηθούν σε επόμενα πειράματα για την ανάλυση πολυμορφισμών (Εικ. 8).



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης ([http://www.chemistrydaily.com/chemistry/Agarose\\_gel\\_electrophoresis](http://www.chemistrydaily.com/chemistry/Agarose_gel_electrophoresis))

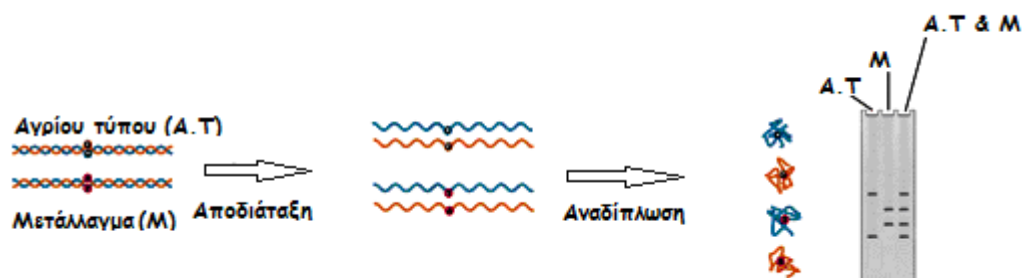
## 2.6 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (*Single Strand Conformation Polymorphism*)

Η ανάλυση SSCP είναι ο διαχωρισμός μονόκλωνων νουκλεϊνικών οξέων πανομοιότυπου μεγέθους βάσει μικρών διαφορών στη νουκλεοτιδική αλληλουχία τους. Οι διαφορές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη διαφορετική δευτεροταγή δομή των μορίων και παρέχουν μια μετρήσιμη διαφορά στην κινητικότητά τους πάνω σε ένα πήκτωμα κατά την ηλεκτροφόρησή τους. Η μέθοδος αυτή έχει διακριτική ικανότητα ενός νουκλεοτιδίου.

Η κινητικότητα του δίκλωνου DNA κατά την ηλεκτροφόρηση εξαρτάται από το μέγεθος των κλώνων αλλά είναι σχετικά ανεξάρτητη από τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Εντούτοις, η κινητικότητα μονόκλωνων τμημάτων επηρεάζεται σημαντικά από μικρές αλλαγές στη αλληλουχία τους. Απουσία συμπληρωματικού κλώνου, στο μονόκλωνο τμήμα μπορεί να συμβούν ζευγαρώματα βάσεων τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό πτυχών και βρόγχων δίνοντας στο τμήμα αυτό μία μοναδική τρισδιάστατη δομή. Η αλλαγή ενός

νουκλεοτιδίου μπορεί να επηρεάσει το σχηματισμό αυτών των ζευγών βάσεων και επομένως να αλλάξει τη τρισδιάστατη διαμόρφωση (Εικ. 9).

Στα περισσότερα πειράματα που εφαρμόζεται η συγκεκριμένη μέθοδος σκοπός είναι η εύρεση πολυμορφισμών με σύγκριση των αποτελεσμάτων διαφορετικών ατόμων.



Εικόνα 9: Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας ([http://nationaldiagnostics.com/article\\_info.php/articles\\_id/43](http://nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/43))

Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία στάδια: 1) αποδιάταξη των προϊόντων της PCR 2) ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και 3) χρώση της πηκτής για οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

### Αποδιάταξη προϊόντων PCR

Για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA χρησιμοποιήθηκε αποδιατακτικό διάλυμα, το οποίο έχει την εξής σύσταση:

#### Denaturation buffer

95% formamide

0,05% Bromophenol blue

0,05% Xylene Cyanol

10mM NaOH

Σε 5 ή 7μl προϊόντος PCR προστίθενται 10μl denaturation buffer. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται στους 99° C για 7 λεπτά ώστε το DNA να μετατραπεί σε μονόκλωνα τμήματα. Τέλος, τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο για να διατηρηθεί το DNA σε μονόκλωνη κατάσταση.



## Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

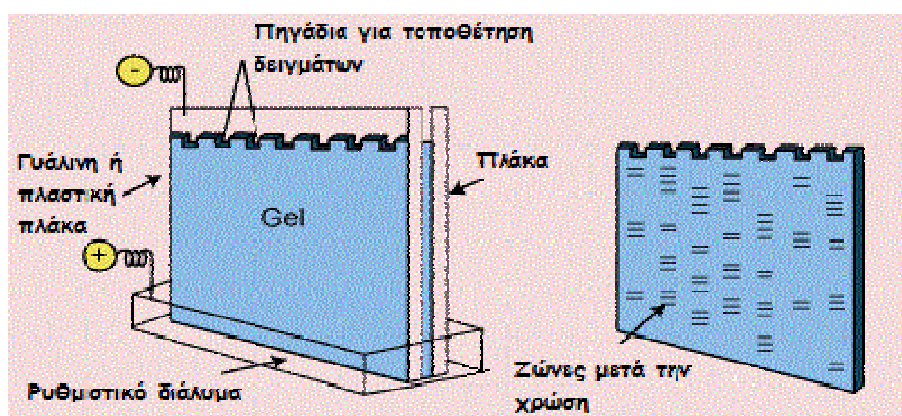
Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιούνται πηκτές πολυακρυλαμίδης με πυκνότητα 8% και 10%, για το γονίδιο COI και το γονίδιο του 16S rRNA αντίστοιχα. Για την παρασκευή των συγκεκριμένων πηκτών χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά που αναγράφονται στον Πίνακα 5:

Πίνακας 5: Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμίδης

	Πολυακρυλαμίδη 8%	Πολυακρυλαμίδη 10%
Ακρυλαμίδη	5gr	6,25gr
Δις ακρυλαμίδη	0,125gr	0,156gr
Γλυκερόλη 50%	5ml	6ml
TBE 10x	4ml	4ml
TEMED	62,5μl	62,5μl
APS 20%	325μl	325μl
ddH <sub>2</sub> O	Έως τα 63ml	Έως τα 63ml

- TBE 10x (Tris base 121g  $C_{TEA}=0,5M$ , Boric acid 61,7g  $C_{TEA}=0,5M$ , EDTA 0,5M 80ml  $C_{TEA}=0,02M$ , ddH<sub>2</sub>O ως τα 2L)
- APS 20% (APS 2g, ddH<sub>2</sub>O ως τα 10ml)

Αφού πολυμεριστεί η ακρυλαμίδη, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x, το οποίο προκύπτει από αραιώση του TBE 10x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 220 volts για περίπου 20 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Εικ. 10).



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης ([http://biotech.matcmadison.edu/resources/proteins/labManual/chapter\\_5/procedure5\\_3.htm](http://biotech.matcmadison.edu/resources/proteins/labManual/chapter_5/procedure5_3.htm))

## Χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης SSCP πραγματοποιήθηκε χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (silver staining). Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος ανάγεται αντιδρώντας με την φορμαλδεΐδη παρουσία βάσης. Στη συνέχεια δεσμεύεται στο DNA και προκαλεί την εμφάνιση ζωνών πάνω στην πηκτή (Anollés *et al.* 1994). Για την χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής τρία διαλύματα:

Διάλυμα 1	Διάλυμα 2	Διάλυμα 3
10ml αλκοόλη 100% (2,5% v/v)	1gr AgNO <sub>3</sub> (0,1% w/v)	3gr NaOH (1,5% w/v)
0,5ml acetic acid (0,125% v/v)	1lt ddH <sub>2</sub> O	0,01gr NaBH <sub>4</sub> (0,005% w/v)
ddH <sub>2</sub> O ως τα 400ml	Χρήση 200ml	1ml φορμαλδεΐδη (0,17% v/v)
		ddH <sub>2</sub> O ως τα 200ml

Στο πρώτο στάδιο, η πηκτή εμβαπτίζεται σε 200ml του διαλύματος 1 και αναδεύεται για 3 λεπτά. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται η διαδικασία. Ακολούθως, η πηκτή ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό για 1 λεπτό. Στο δεύτερο στάδιο, προστίθεται το διάλυμα 2 και ακολουθεί ανάδευση της πηκτής για 15-20 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται δύο πλύσεις της πηκτής με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1 λεπτού η κάθε μία. Στο τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και η πηκτή αναδεύεται έως ότου γίνουν εμφανείς οι ζώνες.

Μετά την εμφάνιση των ζωνών ακολουθεί παρατήρηση των πηκτών και σύγκριση των προτύπων διαφορετικών ατόμων. Αφού προσδιοριστούν τα άτομα με κοινά και διαφορετικά πρότυπα SSCP, επιλέγονται 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά δείγματα από το κάθε πρότυπο, τα οποία και αποστέλλονται σε εταιρία αλληλούχησης για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

## 2.7 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Πριν την αλληλούχηση τα προϊόντα της PCR πρέπει να καθαριστούν με χρήση kit της εταιρίας Invitrogen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ώστε να απαλλαγούν από υπάρχοντα παραπροϊόντα.

Για να δούμε εάν ο καθαρισμός των προϊόντων είναι επιτυχής, πραγματοποιούμε φωτομέτρηση όπως έχει ήδη περιγραφεί προηγουμένως.

## **2.8 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA (Sequencing)**

Προκειμένου να κατασκευαστεί ένα φυλογενετικό δέντρο, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε την αλληλουχία των γονιδίων των υπό μελέτη ατόμων. Για το λόγο αυτό, τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, αποστέλλονται σε εταιρίες προς αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα μετά την κυκλική αλληλούχηση λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος από το οποίο εξάγουμε την αλληλουχία και με χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής (Bioedit) προχωράμε στην ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων.

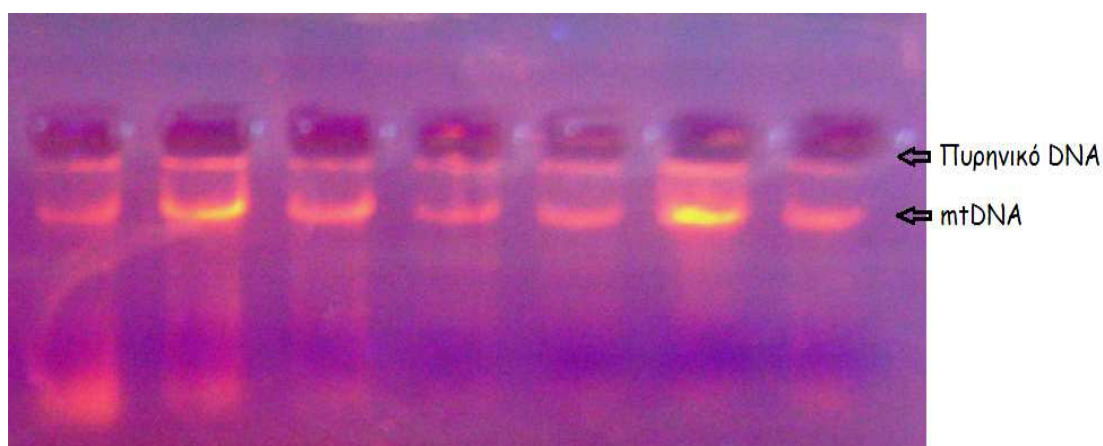
## **2.9 Φυλογενετική ανάλυση**

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από τις αναλύσεις αντιπροσωπεύουν τους διαφορετικούς απλοτύπους. Οι φυλογενετικές και μοριακές εξελικτικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από το πρόγραμμα MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Το πρόγραμμα αυτό επιτρέπει το γρήγορο υπολογισμό πολλών παραμέτρων. Πραγματοποιεί πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών, εύρεση συντηρημένων και πολυμορφικών θέσεων ανάμεσα στους απλοτύπους, εύρεση της επί τοις εκατό σύστασης σε νουκλεοτίδια της κάθε αλληλουχίας, προσδιορίζει τις αμινοξικές αλλαγές που υπάρχουν στις αλληλουχίες κ.λ.π. Χρησιμοποιώντας όλα αυτά τα δεδομένα, παρέχει τη δυνατότητα κατασκευής φυλογενετικών δέντρων με οποιοδήποτε από τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται (MP, neighbor joining, ML, UPGMA). Τέλος, μπορεί να πραγματοποιήσει τον έλεγχο bootstrap για την αξιοπιστία του κατασκευασμένου δέντρου (Tamura *et al.* 2007).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Απομόνωση DNA

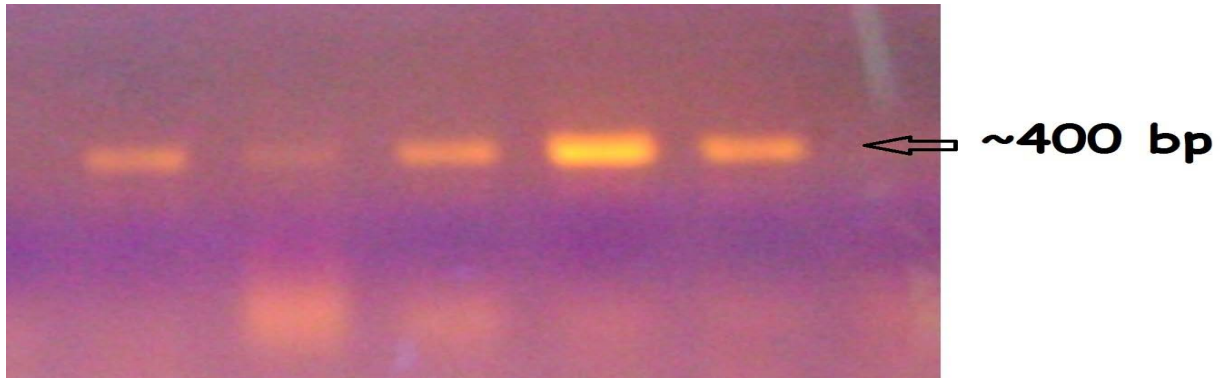
Η απομόνωση παρείχε υψηλής ποιότητας DNA, με τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 200ng/μl και τιμές  $A_{260}/A_{280}$  περίπου 2. Κατά την ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1% εμφανίστηκαν δύο διακριτές ζώνες. Η μία ζώνη είναι το πυρηνικό DNA και εμφανίζεται στην κορυφή του πηκτώματος λόγω μεγάλου μεγέθους. Η δεύτερη ζώνη είναι το μιτοχονδριακό DNA, το οποίο λόγω μικρότερου μεγέθους εμφανίζεται χαμηλότερα (Εικ. 11).



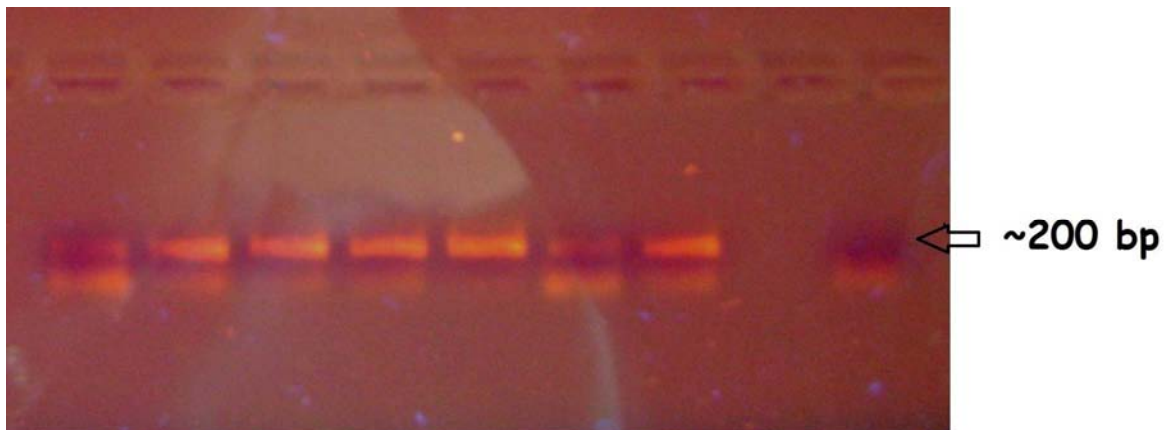
Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA

### 3.2 PCR

Χρησιμοποιώντας ζεύγη των κατάλληλων εκκινήτων, ενισχύθηκε ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) και ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA. Για να επαληθευτεί η επιτυχία της PCR, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκε και ένας μάρτυρας τμημάτων DNA γνωστού μοριακού βάρους, ώστε να εκτιμηθεί το μήκος των τμημάτων που ενισχύθηκαν. Σύμφωνα με το πρότυπο των ζωνών στο πήκτωμα, τα τμήματα που ενισχύθηκαν είχαν μήκος περίπου 420 ζευγών βάσεων για το γονίδιο COI (Εικ. 12) και περίπου 200 ζευγών βάσεων για το γονίδιο του 16S rRNA (Εικ. 13).



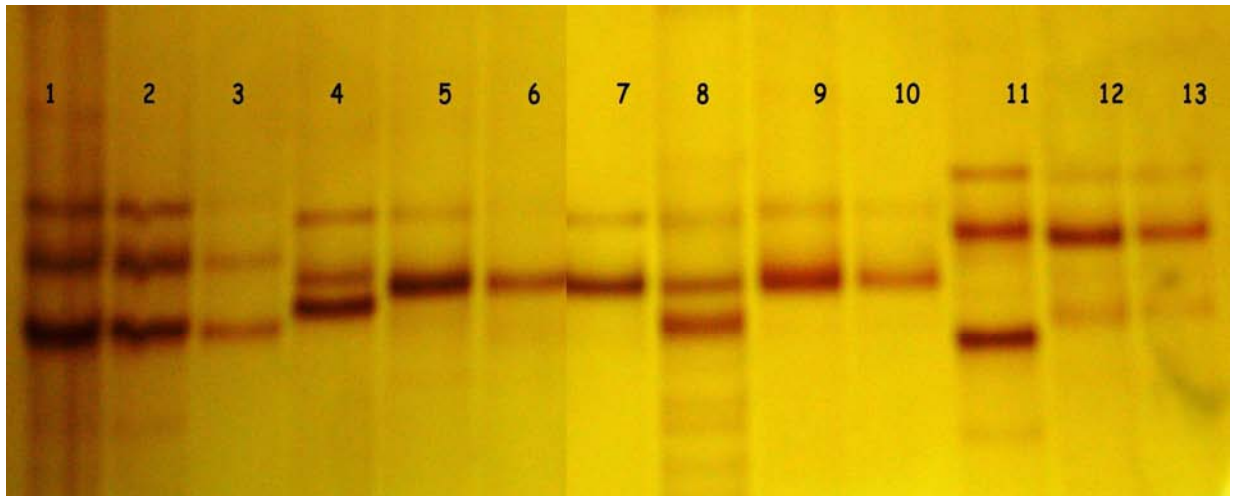
Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR (COI)



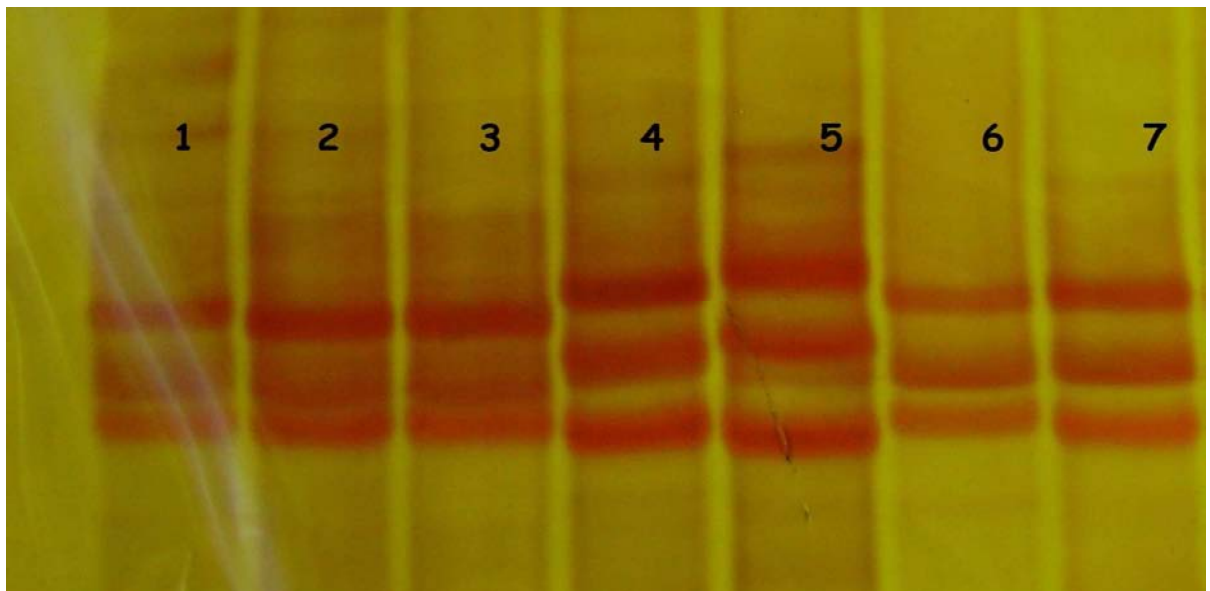
Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR (16S rRNA)

### 3.3 SSCP

Μετά την PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 8% και 10%, για το γονίδιο *COI* και το γονίδιο του 16S rRNA αντίστοιχα. Η εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο, αποκάλυψε εννέα διαφορετικά πρότυπα για το γονίδιο *COI* (Εικ. 14), τα οποία αναγράφονται στον Πίνακα 6, ενώ τα διαφορετικά πρότυπα για το γονίδιο του 16S rRNA ήταν οκτώ (Εικ. 15) και αναγράφονται επίσης στον Πίνακα 6.



**Εικόνα 14:** Ενδεικτικά πρότυπα ανάλυσης SSCP (COI). Οι διαδρομές 1,3,4,5,6,8,11 και 12 εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο και αντιστοιχούν σε διαφορετικό απλότυπο.



**Εικόνα 15:** Ενδεικτικά πρότυπα ανάλυσης SSCP (16S rRNA). Οι διαδρομές 1,3, 4 και 5 εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο.

Πίνακας 6: Πρότυπα SSCP

Δείγμα	Πρότυπο COI	Πρότυπο 16S rRNA
S.rammei 1	2	6
S.cambelli 1	1	7
S.cambelli 2	1	7
S.rammei 2	2	6
S.pedo 1 France	3	2
S.pedo 1 19/6/08	8	1
S.pedo kastoria	3	1
S.hellenica	4	8
S.rhodiensis 3	5	5
S.rhodiensis 4	5	5
S.natoliae	6	4
S.hellenica K 1	7	3
S.hellenica K 2	7	3
S.pedo 1 2009	8	1
S.pedo 2 2009	8	1
S.pedo 3 2009	8	1
S.pedo 5 2009	9	1
S.pedo 2 19/6/08	8	1
S.cambelli 3	1	7

Μετά το διαχωρισμό των ατόμων και τον καθορισμό των διαφορετικών προτύπων, επιλέχθηκαν 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά δείγματα από το κάθε πρότυπο και εστάλησαν για αλληλούχηση στην εταιρία Macrogen στην Κορέα. Επελέγησαν πρότυπα που προέκυψαν μόνο από την ανάλυση του γονιδίου COI, καθώς έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε πολλές φυλογενετικές μελέτες.



### 3.4 Αλληλούχηση

Η διαδικασία της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας και τους δύο εκκινητές της PCR και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με χρήση του προγράμματος BioEdit, οδηγώντας στην τελική αλληλουχία του κάθε δείγματος. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύθηκε, όπως προκύπτει από την αλληλούχηση όλων των δειγμάτων, ήταν 397 bp για το γονίδιο COI. Το γεγονός ότι το μέγεθος αυτό ήταν κοινό για όλα τα δείγματα υποδεικνύει ότι δεν έχουν συμβεί ελλείψεις ή προσθήκες στη νουκλεοτιδική αλληλουχία αυτών των ατόμων. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν αντιστοιχούν σε εννέα διαφορετικούς απλοτύπους, οι οποίοι αναγράφονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Διαφορετικοί απλότυποι

Πρότυπο	Απλότυπος
1	<i>Saga cambelli</i> 1
2	<i>Saga rammei</i> 2
3	<i>Saga pedo</i> 1 france
4	<i>Saga hellenica</i>
5	<i>Saga rhodiensis</i> 3
6	<i>Saga natoliae</i>
7	<i>Saga hellenica</i> K
8	<i>Saga pedo</i> 2
9	<i>Saga pedo</i> 5

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν είναι:

```

          10      20      30      40      50      60      70      80
Saga_campbelli_1  GATGATCAAATTTATAATGTTATCGTTACCGCTCATGCTTTCGTTATAAATTTCTTCATAGTTATGCCTATCATAATTGG
Saga_rammei_2     .....C.....A.....
Saga_pedo_1_france.....T.....
Saga_hellenica   .....C...C...C...C...T...A...T...C...
Saga_rhodiensis_3.....C...C...C...A...T...G...
Saga_natoliae    .....C..A.....A.....G..A..A..A..T.....
Saga_hellenica_K .....C...C...C...T...A...T...
Saga_pedo_2      .....T.....
Saga_pedo_5      .....A..C.....

          90      100     110     120     130     140     150     160
Saga_campbelli_1  AGGCTTTGGTAATTGACTAGTCCCTTTAATAAATGGTGCTCCAGATAAGCTTTCCCTCGAATAAAATAATATAAGATTCT
Saga_rammei_2     ...A.....
Saga_pedo_1_france.....
Saga_hellenica   T..G..C..A..C...T..T.....A...T.....C.....T...
Saga_rhodiensis_3 T..A...C...C...C...T...T.....A...C.....C.....T...
Saga_natoliae    T..A..C..C...G..T..A.....C..T...G..C.....C.....
Saga_hellenica_K T..G..C..A..C...T..T.....C..T...C...C.....C.....
Saga_pedo_2      ...A.....
Saga_pedo_5      ...A.....C.....

          170     180     190     200     210     220     230     240
Saga_campbelli_1  GACTTCTTCCCCCTCCCTCACCCTTTTATTAGCTAGAAGCTTAGTGGAAGCGGTGCTGGAACCGGCTGAACAGTTTAC
Saga_rammei_2     .....C.....A.....C.....T.....T.....
Saga_pedo_1_france.....T...A...T.....
Saga_hellenica   ..T..A..C..T..T.....CC.....C..A...A...T..G.....T...
Saga_rhodiensis_3 ..C..C..T...G...T..CC.CC.....C..T...T..G..T..A.....T...C..T...
Saga_natoliae    ...C...T..T...T..T..C..C...C...C..T..A...G...T...T...T...
Saga_hellenica_K ..A..C..T..T...T..CC.....C..A...A...T..G..C.....
Saga_pedo_2      .....T...A...T.....
Saga_pedo_5      .....T...A...T.....

          250     260     270     280     290     300     310     320
Saga_campbelli_1  CCTCCCTTATCTGCAGGTATTGCTCATGCCGGCGCTTCAGTTGATTTAGCAATTTTCTCTCTACACCTAGCAGGTATTC
Saga_rammei_2     .....C.....C.....T.....
Saga_pedo_1_france.....C.....T.....
Saga_hellenica   .....TC.....C..T..G.....C...C.....C..C.....C...
Saga_rhodiensis_3 .....AC..T..C..G...C..C..C..A..T.....C..C.....C..T...T...C...
Saga_natoliae    .....C.....C...T...C...C...C...T..C..T...T..TT...
Saga_hellenica_K ..C..AC..T.....C..T..G...C...C.....C..C.....
Saga_pedo_2      .....C.....T.....
Saga_pedo_5      .....C.....T.....

          330     340     350     360     370     380     390
Saga_campbelli_1  CTCCATCCTTGGAGCCGTTAATTTCACTACTACATTTATCAATATACGGGCACCTGGAATATCCTTAGACCAAACAC
Saga_rammei_2     .....C.....C.....
Saga_pedo_1_france.....G...C...
Saga_hellenica   T.....T..A.....C.....C...T...C...
Saga_rhodiensis_3 A...T...T...T...C...C...T...A...T...C...G...TC...
Saga_natoliae    ...T..T...G..T...C..T..C..C...T...AA...T...TC...
Saga_hellenica_K T.....T..A.....C.....C...T...C...C...
Saga_pedo_2      .....G...C...
Saga_pedo_5      .....T...C...

```

### 3.5 Νουκλεοτιδική ανάλυση

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA, ήταν δυνατός ο υπολογισμός των ποσοστών εμφάνισης των τεσσάρων νουκλεοτιδίων σε όλες τις αλληλουχίες. Κατά μέσο όρο το ποσοστό A+T ήταν 60% και το ποσοστό G+C ήταν 40%. Επίσης στην 3<sup>η</sup> θέση του κωδικονίου, η G εμφανίζεται σε πολύ χαμηλά ποσοστά ~ 2,5%, ενώ η T εμφανίζεται σε πολύ μεγάλα ποσοστά ~ 40%. Στις υπόλοιπες δύο θέσεις δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στα ποσοστά εμφάνισης των τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Συνολικά, οι μεταπτώσεις βρέθηκαν σε μεγαλύτερα ποσοστά από ότι οι μεταστροφές, με κύριο τύπο μετάπτωσης την αλλαγή της T σε C και το αντίστροφο (Εικ. 16).

	A	T	C	G
A	-	4.54	3.25	4.45
T	3.31	-	25.97	2.18
C	3.31	36.26	-	2.18
G	6.74	4.54	3.25	-

Εικόνα 16: Ποσοστά μεταπτώσεων και μεταστροφών

Μία άλλη παράμετρος που υπολογίστηκε με χρήση αυτού του προγράμματος, ήταν οι πολυμορφικές θέσεις ανάμεσα στις αλληλουχίες. Συνολικά, οι 103 από τις 397 θέσεις ήταν πολυμορφικές και από αυτές οι 64 βρέθηκαν πληροφοριακές για την φειδωλότητα (εμφανίζονται δηλαδή σε παραπάνω από έναν απλοτύπους). Αντίθετα, οι υπόλοιπες 39 εμφανίζονται μόνο σε έναν από τους εννέα απλοτύπους.

Τέλος, σε ότι αφορά τη νουκλεοτιδική ανάλυση, υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των διαφορετικών απλοτύπων, δηλαδή η επί τοις εκατό διαφοροποίηση που εμφανίζουν μεταξύ τους (Εικ. 17). Καθορίστηκαν τόσο οι ενδοειδικές όσο και οι διαειδικές γενετικές αποστάσεις. Η μέγιστη διαειδική διαφοροποίηση είναι 20,7% μεταξύ των απλοτύπων 4 και 6, ενώ η ελάχιστη είναι 2,1% μεταξύ των απλοτύπων 1 και 3. Η μέγιστη ενδοειδική διαφοροποίηση είναι 4,2% μεταξύ των απλοτύπων 4 και 7, ενώ η ελάχιστη είναι 0,3% μεταξύ των απλοτύπων 3 και 8. Οι μέσες τιμές των αποστάσεων ενδοειδικά είναι 1,2% για τα *S.pedo* και 4,3% για τα *S.hellenica*. Για τα υπόλοιπα 4 είδη προσδιορίστηκε μόνο ένας απλότυπος, οπότε δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός ενδοειδικών γενετικών αποστάσεων.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Saga campbelli 1									
2. Saga rammei 2	0.031								
3. Saga pedo 1 france	0.021	0.042							
4. Saga hellenica	0.139	0.151	0.132						
5. Saga rhodiensis 3	0.177	0.177	0.160	0.157					
6. Saga natoliae	0.177	0.180	0.186	0.207	0.204				
7. Saga hellenica K	0.142	0.155	0.136	0.042	0.162	0.198			
8. Saga pedo 2	0.023	0.039	0.003	0.132	0.156	0.182	0.136		
9. Saga pedo 5	0.029	0.039	0.018	0.131	0.156	0.176	0.128	0.015	

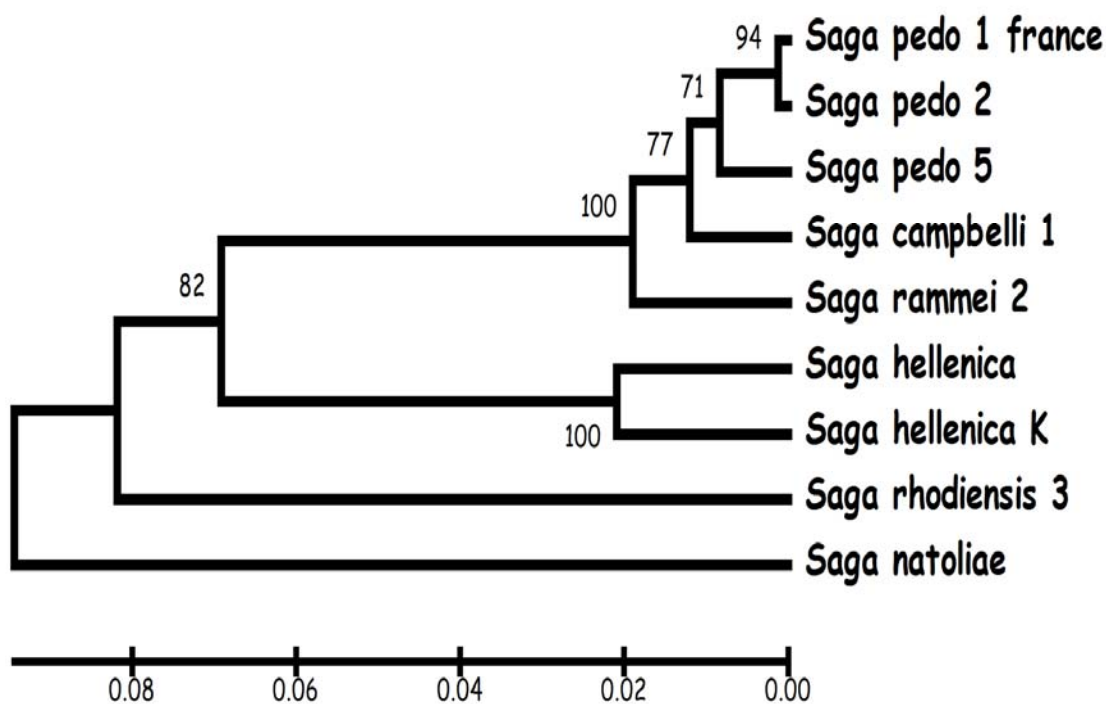
Εικόνα 17: Πίνακας γενετικών αποστάσεων των 9 απλοτύπων

### 3.6 Αμινοξική ανάλυση

Χρησιμοποιώντας το μιτοχονδριακό γενετικό κώδικα των ασπονδύλων έγινε μετάφραση των αλληλουχιών. Τα 397 νουκλεοτίδια κωδικοποιούν για 103 αμινοξέα και μόνο η 124<sup>η</sup> θέση είναι πολυμορφική. Σε αυτήν τη θέση, οκτώ αλληλουχίες εμφανίζουν το αμινοξύ αλανίνη (A) ενώ μία εμφανίζει το αμινοξύ Θρεονίνη (T). Η αλανίνη είναι το δεύτερο απλούστερο αμινοξύ και έχει ως πλευρική αλυσίδα μια μεθυλική ομάδα. Η Θρεονίνη έχει μια υδροξυλική ομάδα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον υδρόφιλο χαρακτήρα του αμινοξέος. Το μέγεθος τους δεν διαφέρει σημαντικά αλλά λόγω της υδροφιλικότητας, η Θρεονίνη μπορεί να αντιδρά πολύ πιο εύκολα σε σχέση με την αλανίνη. Συγκρίνοντας τα επίπεδα του πολυμορφισμού των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και των αμινοξικών αλληλουχιών (103 πολυμορφισμοί έναντι 1) συμπεραίνουμε ότι όλες σχεδόν οι μεταλλάξεις είναι συνώνυμες, δηλαδή τα κωδικόνια που προκύπτουν κωδικοποιούν για το ίδιο αμινοξύ.

### 3.7 Φυλογενετική ανάλυση

Για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων των απλοτύπων, άρα και των ειδών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, ήταν απαραίτητη η κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου, το οποίο θα απεικόνιζε τις σχέσεις αυτές. Για την κατασκευή του δέντρου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος UPGMA σε συνδυασμό με τη δοκιμασία bootstrap (500 επαναλήψεις). Η μέθοδος αυτή προτιμήθηκε από τις υπόλοιπες μεθόδους (MP, Neighbor joining και Minimum evolution) γιατί οι τιμές bootstrap ήταν καλύτερες σε σχέση με τις τιμές στα φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν από τις άλλες μεθόδους, άρα τα αποτελέσματα είχαν μεγαλύτερη αξιοπιστία (Εικ. 18).



Εικόνα 18: Φυλογενετικό δέντρο UPGMA. Δίπλα στους κλάδους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω δέντρο, τα διάφορα είδη διαχωρίζονται και εμφανίζονται έξι ευδιάκριτες ομάδες απλοτύπων, οι οποίες αντιστοιχούν στους απλοτύπους των διαφορετικών ειδών. Κάθε ομάδα περιλαμβάνει απλοτύπους του ίδιου είδους. Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται οι τρεις

απλότυποι του είδους *S.pedo* (*S.pedo 1 france*, *S.pedo 2* και *S.pedo 5*), στη δεύτερη ομάδα ανήκει το είδος *S.cambelli* με έναν απλότυπο (*S.cambelli 1*), στην τρίτη ομάδα το είδος *S.rammei*, στην τέταρτη ομάδα περιλαμβάνονται οι δύο απλότυποι του είδους *S.hellenica* (*S.hellenica* και *S.hellenica K*), στην πέμπτη ομάδα ανήκει το είδος *S.rhodiensis* και στην έκτη ομάδα το είδος *S.natoliae*. Από το φυλογενετικό δέντρο γίνεται εμφανές ότι τα *S.pedo* συγγενεύουν περισσότερο με το *S.cambelli*, ενώ συγγενεύουν λιγότερο με το *S.rammei*. Ο μέσος όρος των γενετικών αποστάσεων στην πρώτη περίπτωση είναι 0,024 (2,4%) και στην δεύτερη περίπτωση είναι 0,040 (4%). Το *S.natoliae* εμφανίζεται αρκετά απομακρυσμένο από τα υπόλοιπα είδη, πράγμα το οποίο φαίνεται και από τις γενετικές αποστάσεις. Η διαφοροποίηση του είναι 17,7% από το *S.cambelli*, 18% από το *S.rammei*, 18,1% από τα *S.pedo*, 20% από τα *S.hellenica* και 20,4% από το *S.rhodiensis*.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η φυλογενετική ανάλυση και ο καθορισμός των εξελικτικών σχέσεων είναι συχνά μια ιδιαίτερα δύσκολη διαδικασία. Η κατασκευή ενός σωστού φυλογενετικού δέντρου είναι υψίστης σημασίας σε όλων των ειδών τις εξελικτικές μελέτες. Από παλιά, τα μορφολογικά γνωρίσματα χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τις αρχές της κλαδιστικής για την διασαφήνιση των φυλογενετικών σχέσεων. Η αξιοποίηση, όμως, των μορφολογικών χαρακτήρων απαιτεί ειδικούς που μπορούν να ανιχνεύσουν πολύ μικρές διαφορές μεταξύ των διαφόρων ειδών και τέτοια ειδικευση προϋποθέτει χρόνια εξάσκησης (Arenalo *et al*, 2004). Αν και υπάρχει μια μοναδική εξελικτική ιστορία, οι προσπάθειες για αποκάλυψη φυλογενειών διαφέρουν μεταξύ των διάφορων ερευνητών, τεχνικών και συστημάτων χαρακτήρων που μελετώνται. Καμία τεχνική ή σύστημα χαρακτήρων από μόνα τους δεν μπορεί να εγγυηθεί ότι αποκαλύπτει τις πραγματικές σχέσεις των υπό μελέτη taxa. Στην πραγματικότητα, υπάρχουν συγκλίνουσες ομοιότητες (ομοπλασίες) σε όλα τα σύνολα δεδομένων. Τα δεδομένα από μοριακές αλληλουχίες, συχνά ανατρέπουν τα προηγούμενα συμπεράσματα που έχουν προκύψει από μορφολογικά γνωρίσματα, αλλά ταυτόχρονα μπορεί να είναι και παραπλανητικά εξαιτίας ανεπαρκούς δειγματοληψίας ή ακατάλληλης ανάλυσης (Cranston και Gullan, 2002). Οι πληροφορίες που λαμβάνουμε από αλληλουχίες νουκλεϊνικών οξέων, κυρίως από το μιτοχονδριακό DNA, μας επέτρεψαν να κάνουμε αλματώδη πρόοδο στον τομέα της εύρεσης των φυλογενετικών σχέσεων τα τελευταία 20 χρόνια. Αλλά ακόμα και αυτές οι αλληλουχίες έχουν το μειονέκτημα ότι δεν εξελίσσονται συχνά με τον επιθυμητό ρυθμό ώστε να καταδείξουν της ιστορίας των επιθυμητών χαρακτηριστικών. Επίσης, η εξέλιξη των μιτοχονδριακών γονιδίων μπορεί να μην ανταποκρίνεται απολύτως και στην διαδικασία της ειδογένεσης. Τα γονίδια του μιτοχονδριακού DNA είναι στην ουσία απλές ομάδες σύνδεσης και μπορεί να μην αντικατοπτρίζουν την πραγματική φυλογένεια ολόκληρου του οργανισμού (Arenalo *et al*, 2004).

Μελέτες που χρησιμοποιούν τμήματα DNA για τον καθορισμό των ειδών, είτε ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό με μορφολογικά και οικολογικά δεδομένα, έχουν αποκαλύψει μια ποικιλία μοριακών δεικτών. Η επιλογή του κατάλληλου δείκτη είναι το πιο σημαντικό βήμα στις φυλογενετικές αναλύσεις και επιλέγεται ανάλογα με την εξελικτική ερώτηση που τίθεται αλλά επίσης εξαρτάται από το σύνολο των taxa που μελετώνται. Τα γονίδια του μιτοχονδριακού DNA έχουν δυναμικά επικρατήσει στο πεδίο της μοριακής συστηματικής λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών τους, τα οποία έχουν αναφερθεί στην εισαγωγή (Roe και Sperling, 2007). Το πιο κρίσιμο χαρακτηριστικό στην επιλογή του δείκτη είναι ο ρυθμός υποκατάστασης της συγκεκριμένης περιοχής. Οι αλληλουχίες που εξελίσσονται πολύ γρήγορα φαίνεται να μην έχουν τη δυνατότητα να αποκαλύψουν την φυλογένεια των

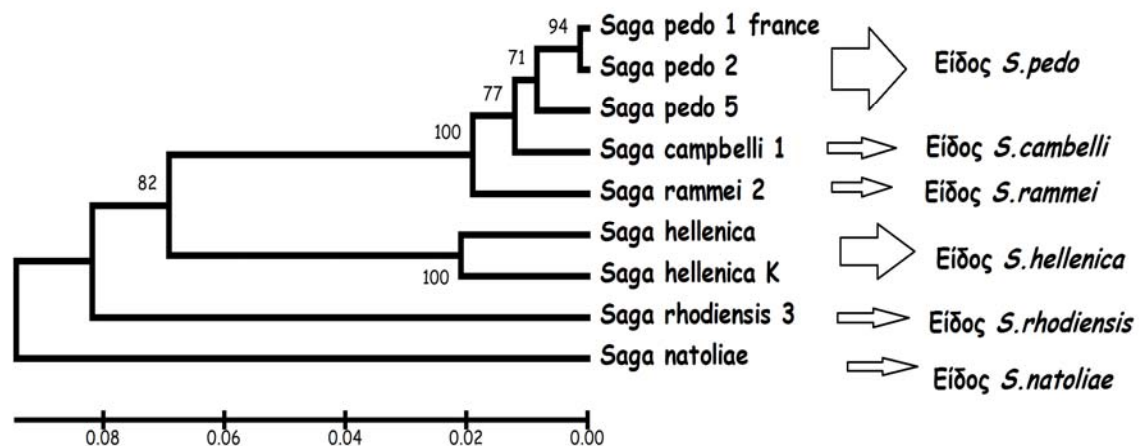


ταχα που διαχωρίστηκαν κατά το παρελθόν. Παρομοίως, η επιλογή μιας αλληλουχίας που είναι ιδιαίτερα συντηρημένη δε θα παρείχε τις απαραίτητες πληροφορίες για τη διαλεύκανση των εξελικτικών σχέσεων στενά συγγενικών ειδών. Έτσι, σε πολλές μελέτες η επιτυχία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την επιλογή μιας περιοχής που θα περιέχει το κατάλληλο επίπεδο ποικιλομορφίας (Lunt *et al*, 1996).

Για τους παραπάνω λόγους, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου COI, που κατέχει όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά καθώς επίσης έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε άλλες φυλογενετικές μελέτες στο παρελθόν. Οι Park *et al* (2008) χρησιμοποίησαν το COI για την αναγνώριση ειδών μύγας της υποοικογένειας Luciliinae σε ιατροδικαστικές έρευνες. Οι Arevalo *et al* (2004) προσπάθησαν να διαλευκάνουν τις φυλογενετικές σχέσεις εντόμων της υποοικογένειας Polistinae συνδυάζοντας το γονίδιο COI με μικροδορυφόρους και μορφολογικά χαρακτηριστικά. Οι Franck *et al* (2001) διερεύνησαν την γενετική ποικιλότητα στο είδος *Apis mellifera* χρησιμοποιώντας το γονίδιο COI σε συνδυασμό με μικροδορυφόρους. Οι Caterino *et al* (1999) χρησιμοποίησαν το COI σε συνδυασμό με το COII για τη μελέτη της φυλογένεσης ειδών πεταλούδας του γένους Papilio. Πρόσφατα, οι Mahendran *et al* (2006), χρησιμοποίησαν επίσης το γονίδιο COI σε συνδυασμό με το 16S rRNA για να διαλευκάνουν τις φυλογενετικές σχέσεις ειδών που παράγουν μετάξι. Στην πλειοψηφία τους, οι παραπάνω μελέτες επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα που είχαν προκύψει από μελέτη μορφολογικών χαρακτήρων.

Επίσης, στην παρούσα μελέτη έγινε ανάλυση SSCP χρησιμοποιώντας ως μοριακό δείκτη ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου του 16S rRNA. Η ανάλυση αποκάλυψε οκτώ διαφορετικά πρότυπα. Φαίνεται λοιπόν ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στη συγκεκριμένη φυλογενετική μελέτη. Γενικά όμως, το γονίδιο του 16S rRNA, ανήκει στην κατηγορία των μοριακών δεικτών των οποίων η αλληλουχία είναι ιδιαίτερα συντηρημένη και δεν βοηθάει στον καθορισμό εξελικτικών σχέσεων στενά συγγενικών ειδών. Επίσης, το φυλογενετικό σήμα που περιέχεται σε αυτό το γονίδιο είναι αρκετά χαμηλότερο από ότι αυτό στο γονίδιο COI. Αντίθετα, το γονίδιο αυτό χρησιμοποιείται σε φυλογενετικές μελέτες που σκοπό έχουν να διαλευκάνουν τις εξελικτικές σχέσεις των ταχα που ανήκουν σε υψηλότερα ταξινομικά επίπεδα, δηλαδή σε επίπεδα τάξης, οικογένειας και σπανιότερα γένους. Οι Costa *et al* (2003) χρησιμοποίησαν το γονίδιο του 16S rRNA για διεξαγωγή φυλογενετικής ανάλυσης των μελισσών που ανήκουν στην οικογένεια Apidae. Οι Dowton και Austin (1994) χρησιμοποίησαν το ίδιο γονίδιο για μοριακή φυλογένεση διαφορετικών ειδών εντόμων που ανήκουν στην τάξη Hymenoptera.

Όσον αφορά τα είδη του γένους *Saga*, τα οποία εξετάζονται στην συγκεκριμένη μελέτη, δεν μπορούμε να πούμε αν τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται, καθώς δεν έχουν πραγματοποιηθεί αντίστοιχες φυλογενετικές μελέτες στο παρελθόν. Στο φυλογενετικό δέντρο διαχωρίζονται ικανοποιητικά τα 6 είδη των οποίων οι σχέσεις μελετήθηκαν (Εικ. 19).



Εικόνα 19: Διαχωρισμός των 6 ειδών της μελέτης

#### 4.1 Νουκλεοτιδική ανάλυση αλληλουχιών

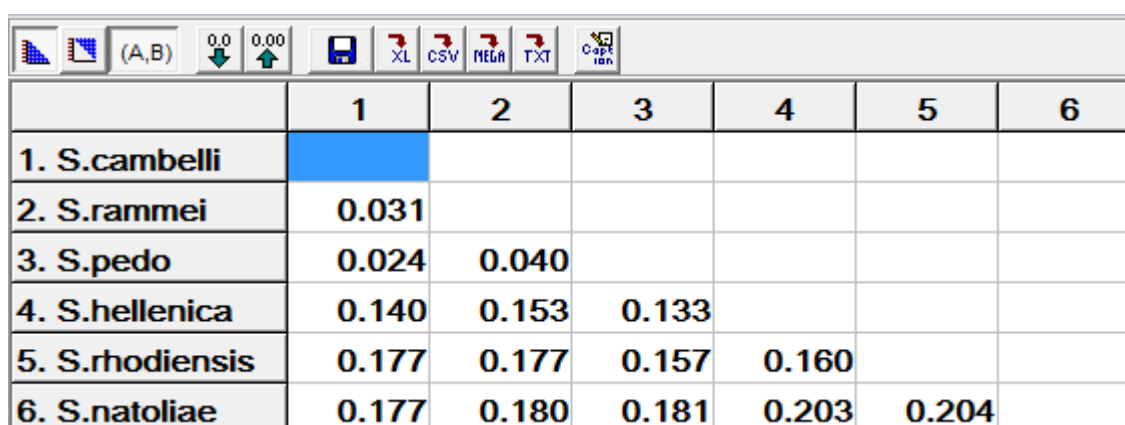
Η νουκλεοτιδική ανάλυση των αλληλουχιών με χρήση του προγράμματος MEGA αποκάλυψε κάποια σημαντικά στοιχεία. Πρώτον, το ποσοστό A+T ήταν πολύ υψηλό, ~60%. Η τιμή αυτή είναι μια συνηθισμένη τιμή για μιτοχονδριακά γονίδια εντόμων. Επίσης, τα ποσοστά εμφάνισης της G και της C στην τρίτη θέση του κωδικονίου ήταν πολύ χαμηλά. Δεύτερον, οι περισσότερες μεταλλάξεις εμφανίζονται στην τρίτη θέση του κωδικονίου, πράγμα το οποίο συμφωνεί με την υπόθεση ταλάντωσης της τρίτης θέσης (η αναγνώριση της τρίτης βάσης ενός κωδικονίου μπορεί να είναι λιγότερο ειδική από τις δυο πρώτες θέσεις), που έχει διατυπωθεί από τον Crick και σύμφωνα με την οποία εξηγείται ο εκφυλισμός του γενετικού κώδικα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από την παρατήρηση ότι στις αμινοξικές αλληλουχίες εμφανίζεται μόνο μια πολυμορφική θέση, καθώς από τις 103 πολυμορφικές νουκλεοτιδικές θέσεις, οι 102 οδηγούν στην κωδικοποίηση συνώνυμων αμινοξέων.

## 4.2 Αμινοξική ανάλυση αλληλουχιών

Η μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με τον μιτοχονδριακό γενετικό κώδικα των ασπόνδυλων αποκάλυψε την ύπαρξη ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της αλληλουχίας σε όλο το μήκος της. Τα επίπεδα του πολυμορφισμού ήταν πολύ χαμηλότερα από αυτά των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (1/132 έναντι 103/397), γεγονός το οποίο οφείλεται στον εκφυλισμό του γενετικού κώδικα. Τα πολύ χαμηλά επίπεδα πολυμορφισμού των αμινοξικών αλληλουχιών υποδεικνύουν την ακαταλληλότητα χρησιμοποίησης των πρωτεϊνών για την διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων, καθώς ένα μεγάλο μέρος του γενετικού πολυμορφισμού παραμένει «κρυφό» και δεν εμφανίζεται σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

## 4.3 Γενετικές αποστάσεις απλοτύπων

Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των απλοτύπων υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα MEGA και αποκαλύφθηκαν σημαντικά χαρακτηριστικά. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι ενδοειδική διαφοροποίηση ήταν μικρότερη από την διαειδική διαφοροποίηση. Οι ενδοειδικές αποστάσεις για τα *S.pedo* και τα *S.hellenica* είναι 1,2% και 4,2% αντίστοιχα. Οι διαειδικές αποστάσεις είναι αρκετά μεγαλύτερες (Εικ. 20).



	1	2	3	4	5	6
1. <i>S.cambelli</i>						
2. <i>S.rammei</i>	0.031					
3. <i>S.pedo</i>	0.024	0.040				
4. <i>S.hellenica</i>	0.140	0.153	0.133			
5. <i>S.rhodiensis</i>	0.177	0.177	0.157	0.160		
6. <i>S.natoliae</i>	0.177	0.180	0.181	0.203	0.204	

Εικόνα 20: Διαειδικές αποστάσεις

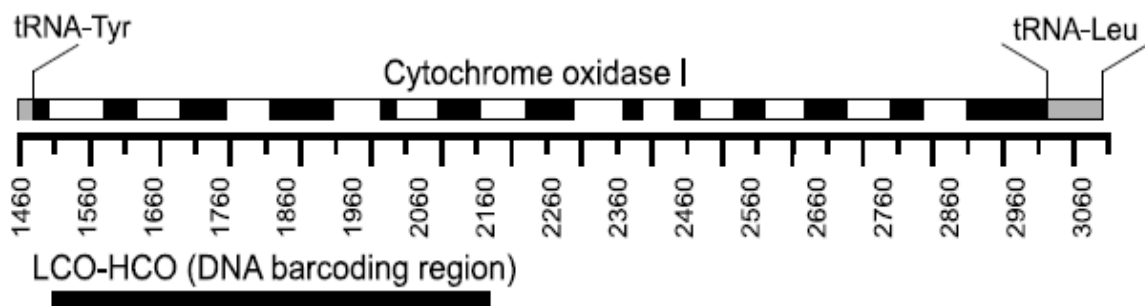
Η μέγιστη διαειδική διαφοροποίηση είναι ~ 20% μεταξύ των *S.natoliae* και *S.rhodiensis*. Οι χαμηλότερες τιμές διαειδικής διαφοροποίησης εμφανίζονται ανάμεσα στα *S.pedo* και *S.cambelli* (~2,5%) και στα *S.rammei* και *S.cambelli* (~3%).

Επειδή οι διαειδικές αποστάσεις είναι πολύ μεγαλύτερες των ενδοειδικών, μπορεί να γίνει χρήση των αλληλουχιών αυτών ως DNA barcodes.

Το DNA barcoding είναι ένα σύστημα που έχει σχεδιαστεί για να παρέχει γρήγορη, ακριβή και αυτοματοποιημένη αναγνώριση ειδών με χρήση μικρών περιοχών γονιδίων ως εσωτερικές ετικέτες (Hebert και Gregory, 2005). Από τους πρώτους που εστίασαν σε αυτό το θέμα ήταν οι Hebert *et al* (2003). Ύστερα από πολλές έρευνες κατάληξαν σε ένα σύστημα αναγνώρισης που βασίζεται στο DNA και βρίσκεται στο μιτοχονδριακό γονίδιο της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI), το οποίο στοχεύει στον διαχωρισμό των ειδών. Τα αποτελέσματα των ερευνών τους έδειξαν ότι η απόκλιση που παρατηρείται στην αλληλουχία του COI στα διάφορα είδη, μπορεί να οδηγήσει στον διαχωρισμό στενά συγγενικών ειδών που ανήκουν σε όλα τα φύλα των ζώων εκτός από αυτό των Κνιδόζωων.

Η διαδικασία του DNA barcoding ξεκινάει με την ανάκτηση μιας μικρής προκαθορισμένης αλληλουχίας DNA - το barcode - από το υπό μελέτη δείγμα. Στη συνέχεια, το barcode από το άγνωστο δείγμα συγκρίνεται με άλλα barcodes που έχουν ανακτηθεί από άτομα με γνωστή ταυτότητα και έχουν κατατεθεί σε βιβλιοθήκες. Το δείγμα αναγνωρίζεται εάν η αλληλουχία του ταιριάζει με κάποια άλλη από την βιβλιοθήκη (Hajibabaei *et al*, 2007). Η διαφορά του DNA barcoding από τις μεθόδους μοριακής φυλογένεσης είναι ότι δεν έχει ως στόχο τον καθορισμό ταξινόμησης αλλά την αναγνώριση αγνώστου δείγματος και την κατάταξη του σε ένα γνωστό είδος.

Για τα taxa των ζώων, οι περισσότεροι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει στις μελέτες τους ένα μικρό τμήμα mtDNA, δηλαδή τις πρώτες ~ 650 bp από το 5' άκρο του COI (Εικ. 21). Εντούτοις, ακόμα και μικρότερα τμήματα του COI έχουν χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την αναγνώριση δειγμάτων που η κατάσταση του DNA δεν επέτρεπε την ανάκτηση του τμήματος των 650bp (Dasmaharatra *et al*, 2009).



**Εικόνα 21:** Η περιοχή του COI που χρησιμοποιείται ως DNA barcode (Roe, A.D., Sperling, F.A. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding, 2007).

Δύο πρόσφατες μελέτες απέδειξαν την αποτελεσματικότητα του barcoding να αποκαλύπτει βιολογικά όμοια είδη ή ομάδες. Μέσα σε ένα είδος από πεταλούδες που είχαν ίδια μορφολογία, το DNA barcoding διαχώρισε 10 κρυφά είδη, τα οποία διέφεραν στην εμφάνιση της προνύμφης, της προτίμηση φαγητού και ενδιαιτήματος. Σε μια άλλη μελέτη, μορφολογικά αδιαχώριστες μύγες Tachinidae φάνηκε να διαχωρίζονται σε ξεχωριστές ομάδες που είχαν διαφορετικές προτιμήσεις ξενιστή (Dasgupta *et al*, 2006).

Είναι αναμενόμενο ότι ένα επιτυχημένο παγκόσμιο πρόγραμμα DNA barcoding θα παρέχει ένα ευρύ κατάλογο με δεδομένα για την πλειονότητα των καθορισμένων taxa στο εγγύς μέλλον, διευκολύνοντας την συστηματική ανακάλυψη των κρυπτικών ειδών. Πάντως, με το 85% ή και περισσότερο των ειδών να παραμένουν άγνωστα μέχρι τώρα στους επιστήμονες, μια ακόμα μεγαλύτερη πρόκληση υπάρχει στην πιθανή εφαρμογή των μεθόδων που βασίζονται στο DNA για την ανακάλυψη νέων ειδών σε taxa που δεν είναι επαρκώς χαρακτηρισμένα (Monaghan *et al*, 2006).

## Βιβλιογραφία

- Αλαχιώτης, Σ. Εισαγωγή στην Εξέλιξη (2007), 1<sup>η</sup> έκδοση
- Μαργαρίτης, Λ.Χ., Γαλανόπουλος, Β.Κ., Κεραμάρης, Κ.Ε., Μαρίνος, Ε.Σ., Παπασιδέρη, Ι.Σ., Στραβοπόδης, Δ.Ι., Τρουγκάκος, Ι.Π. Βιολογία κυττάρου (2004), 4<sup>η</sup> έκδοση
- Annoles, G., Gresshoff, P.M. Staining Nucleic Acids with Silver: An Alternative to Radioisotopic and Fluorescent Labeling. *Promega Notes Magazine* Number 45 (1994) 13
- Arevalo, E., Zhu, Y., Carpenter, J., Strassmann, J. The phylogeny of the social wasp subfamily Polistinae : evidence from microsattelite flanking sequences, mitochondrial COI sequence, and morphological characters. *BMC Evolutionary Biology* (2004) 4:8
- Boore, J.L. Animal Mitochondrial Genomes. *Nucleic Acids Research* (1999) vol27:1767
- Brown, W.M., George, M., Wilson, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) Vol76:1967
- Brown, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: Nei M, Koehn RK (eds) *Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland MA, (1983) pp 62-88
- Cantrall, I.J.. *Saga pedo* (Pallas) (Tettigoniidae: Saginae), an Old World katydid, new to Michigan. *The Great Lakes Entomologist* (1972) vol5 pp 103-106
- Caterino, M.S., Sperling F.H. Papilio Phylogeny Based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase I and II Genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* (1999) vol11 pp 122-137
- Christensen, H. Short introduction to phylogenetic analysis of molecular sequence data. *Copenhagen University* (2008)
- Costa, M.A., Del Lama, M.A., Melo, G.A., Sheppard, W.S. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. *Apidologie* (2003) vol34 pp 73-84
- Cranston, P.S., Gullan, P.J. *Phylogeny of Insects*. (2002) p883
- Cunningham, J. *The Saga Saga*. (2009)
- Dasmahapatra, K.K., Elias, M., Hill, R.I., Hoffman, J.I., Mallet, J. Mitochondrial DNA barcoding detects some species that are real, and some that are not. *Molecular Ecology Resources* (2010) vol10 pp 264-273
- Dasmahapatra, K.K., Mallet, J. DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity* (2006) vol97 pp 254-255

- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J., Dveksler, G.S. General Concepts for PCR Primer Design. *Genome Res.* (1993) vol3 pp 30-37
- Downton, M., Austin, A.D. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) vol91 pp 9911-9915
- Eckert, K.A., Kunkel, T.A. DNA Polymerase Fidelity and the Polymerase Chain Reaction. *Genome Res.* (1991) vol1 pp 17-24
- Elzbieta, W.S., Nadachowska, A.M., Heller, K.G. Cytogenetic variability of the genus *Saga* Charp. (Orthoptera, Tettigoniidae, Saginae): heterochromatin differentiation. *Caryologia* (2007) vol60 pp 29-36
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* (1994) vol3 pp 294-299
- Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B.P., Hepburn, H.R., Solignac, M., Cornuet, J.M. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* (2001) vol86 pp 420-430
- Futuyma, D.J. *Εξελικτική βιολογία* (1995), 2<sup>η</sup> έκδοση
- Gissi, C., Iannelli, F., Pesole, G. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* (2008) vol101 pp 301-320
- Grant, V. Incongruence between cladistic and taxonomic systems. *American Journal of Botany* (2003) vol90 pp 1263-1270
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N., Hickey, D.A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics* (2007) vol23
- Hasegawa, M., Kishino, H., Saitou, N. On the Maximum Likelihood Method in Molecular Phylogenetics. *J Mol Evol* (1991) vol32 pp 443-445
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., deWaard, J. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond B* (2003) vol270 pp 313-321
- Hebert, P., Ratnasingham, S., deWaard, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B* (2003) vol270 pp 96-99
- Hebert, P., Gregory, T.R. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Syst. Biol.* (2005) vol54 pp 852-859
- Hennig, W. *Phylogenetic Systematics* (1966)

- Holmes, S. Bootstrapping Phylogenetic Trees: Theory and Methods. *Statistical Science* (2003) vol18 pp 241-255
- Huson, D. *Phylogeny. Grundlagen der Bioinformatik* (2010)
- Kimura, M., Ohta, T. On Some Principles Governing Molecular Evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1974) vol71 pp 2848-2852
- King, R.C, Stansfield, W.D., Mulligan, P.K. *A dictionary of genetics* (2006)
- Lipscomb, D.L. The eukaryotic kingdoms. *Cladistics* (1985) vol1 pp 127-140
- Lunt, D.H., Zhang, D.X., Szymura, J.M., Hewitt, G.M. The insect cytochrome oxidase I gene : evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* (1996) vol5 pp 153-165
- Mahendran, B., Ghosh, S.K., Kundu, S.C. Molecular phylogeny of silk-producing insects based on 16S ribosomal RNA and cytochrome oxidase subunit I genes. *Journal of Genetics* (2006) vol85 pp 31-38
- Mares, M.A., Braun, J.K., Bárquez, R.B., Díaz, M. Two new genera and species of halophytic desert mammals from isolated salt flats in Argentina. *Ocas. Papers Mus.* (2000) vol203 pp 1-27
- Mayr, E., Provine, W. *The evolutionary synthesis: perspectives on the unification of biology.* Harvard University Press (1980)
- Monaghan, M.T., Balke, M., Gregory, T.R., Vogler, A.P. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2005) vol360 pp 1925-1933
- Moore, J., Willmer, P. Convergent evolution in invertebrates. *Biological reviews* (1997) vol72 pp 1-60
- Nakhleh, L., Jin, G., Zhao, F., Crummey, J.M. *Reconstructing Phylogenetic Networks Using Maximum Parsimony* (2005)
- Pakendorf, B., Stoneking, M. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* (2005) vol6 pp 165-183
- Park, S.H., Zhang, Y., Piao, H., Yu, D.H., Jeong, H.J., Yoo, G.Y., Chung, U., Jo, T.H., Hwang, J.J. Use of Cytochrome c Oxidase Subunit I (COI) Nucleotide Sequences for Identification of the Korean Luciliinae Fly Species (Diptera:Calliphoridae) in Forensic Investigations. *J Korean Med Sci* (2009) vol24 pp 1058-1063
- Remigio, E.A., Hebert, P.D.N. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* (2003) vol29 pp 641-647



- Roe, A.D., Sperling, F.A. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* (2007) vol44 pp 325-345
- Saitou, N., Nei, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* (1987) vol4 pp 406-425
- Sober, E. *Reconstructing the Past: Parsimony, Evolution, and Inference.* (1988)
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* (2007) vol24 pp 1596-1599
- Vygodina, T.V., Konstantinov, A.A. Peroxidase Activity of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase. *Biochemistry (Moscow)* (2007) vol72 pp 1056-1064
- Watson, J.D., Myers, R.M., Caudy, A.A., Witkowski, J.A. *Ανασυνδυσασμένο DNA* (2007), 1<sup>η</sup> έκδοση
- Wheelis, M.L., Kandler, O., Woese, C.R. On the nature of global classification. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* (1992) vol89 pp 2930-2934