

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Φυλογένεση στο σύμπλεγμα ειδών
Cyclocephala sp. της Γουαδελούπης

Θεμιστοκλής Γιαννούλης



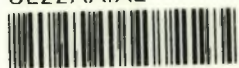
ΛΑΡΙΣΑ, 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8094/1
Ημερ. Εισ.: 10-03-2010
Δωρεά: _____
Ταξιδετικός Κωδικός: Δ
576.88
ΓΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087130

Φυλογένεση στο σύμπλεγμα ειδών *Cyclocephala* sp. της Γουαδελούπης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

	ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ: (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ:	Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ:	Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπο την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που έδειξε για άλλη μια φορά στο πρόσωπό μου, αναθέτοντας την εκτέλεση της συγκεκριμένης μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Βιολογίας Σπονδυλωτών, κ. Μούτου Αικατερίνη καθώς και τον αναπληρωτή καθηγητή Μοριακής Βιολογίας, κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο για την συμμετοχή στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Σταμάτη Κώστα, την Λέκτορα Μοριακής Γενετικής, κ. Θ. Σαραφίδου 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 όλο αυτό το διάστημα της πραγματοποίησης των πειραμάτων, αλλά και τους κ. Bernard και Anne Marie Dutrillaux για την παροχή των δειγμάτων και την βοήθεια τους σχετικά με το θέμα της έρευνας.

Πίνακας περιεχομένων

Εισαγωγή.....	7
Αρχικές μελέτες της μοριακής εξέλιξης.....	9
Μοριακή φυλογένεση	10
Φυλογενετικές Σχέσεις και Μοριακή Φυλογένεια.....	12
Η φαινετική, κλαδιστική και εξελικτική ταξινόμηση	13
Φυλογενετικά δέντρα	15
Γονιδιακά δέντρα και δέντρα ειδών.....	17
Μέθοδοι κατασκευής δέντρων.....	18
Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με τη βοήθεια πινάκων αποστάσεων.....	19
Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων σύμφωνα με την αρχή της μέγιστης φειδωλότητας.....	20
Προσεγγίσεις μέγιστης πιθανοφάνειας για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων	21
Δοκιμασία bootstrap και αξιοπιστία των δέντρων	22
Επιλογή χαρακτήρων για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.....	24
Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	26
Ροή πληροφοριών- Μεταγραφή και μετάφραση.....	27
Ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA	28
Μιτοχονδριακά γονίδια και φυλογένεση.....	30
Τα Dynastinae της Γουαδελούπης	34
Υλικά και μέθοδοι	36
Μέθοδοι.....	37
Απομόνωση του DNA.....	37
Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανα δείγμα	39
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	40
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη.....	41
Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)	42
Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining).....	44
Αλληλούχηση διαφορετικών προτύπων SSCP.....	46
Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης	46
Σύγκριση αλληλουχιών – Φυλογενετική ανάλυση.....	47
Αποτελέσματα	48
Απομόνωση DNA	48
PCR.....	48
SSCP	49

Αλληλούχηση	52
Νουκλεοτιδική ανάλυση	55
Αμινοξική ανάλυση	56
Φυλογενετική ανάλυση.....	57
Συζήτηση	59
Νουκλεοτιδική ανάλυση αλληλουχιών	66
Αμινοξική ανάλυση αλληλουχιών	67
Γενετικές αποστάσεις απλοτύπων	67
Βιβλιογραφία	71

Εισαγωγή

Στο βιβλίο του «Η προέλευση των ειδών», ο Δαρβίνος (Darwin, 1859) πρότεινε ότι όλοι οι οργανισμοί της Γης εξελίχθηκαν από ένα μοναδικό αρχέγονο οργανισμό με τροποποιήσεις. Επίσης, πρότεινε ότι η κύρια δύναμη της εξέλιξης είναι η φυσική επιλογή. Οι περισσότεροι βιολόγοι αποδέχθηκαν την πρώτη πρόταση σχεδόν αμέσως αλλά η δεύτερη ήταν αμφιλεγόμενη και κρίθηκε από πολλούς βιολόγους, όπως ο Thomas Huxley, ο Moritz Wagner και ο William Bateson. Αυτοί πρότειναν διάφορους εναλλακτικούς μηχανισμούς εξέλιξης, όπως η θεωρία της μεταστοιχείωσης, ο Λαμαρκισμός, η γεωγραφική απομόνωση και η μη προσαρμοστική εξέλιξη. Εξαιτίας αυτής της κριτικής, ο Δαρβίνος αργότερα άλλαξε τη θεωρία σχετικά με το μηχανισμό της εξέλιξης σε κάποιο βαθμό. Ήταν ένας πλουραλιστής άνθρωπος και δέχθηκε μια ταλαντευόμενη μορφή του Λαμαρκισμού και της μη προσαρμοστικής εξέλιξης. Ωστόσο, διατήρησε την άποψη ότι η φυσική επιλογή που δρα στην υπάρχουσα ποικιλομορφία είναι ο πρωταρχικός παράγοντας της εξέλιξης. Το κύριο ενδιαφέρον του ήταν οι εξελικτικές αλλαγές σε μορφολογικά ή φυσιολογικά χαρακτηριστικά και η ειδογένεση.

Ένας ακόμα κριτής της θεωρίας του ήταν ο μετα-Μεντελικός γενετιστής, Thomas Morgan. Απέρριψε τον Λαμαρκισμό και κάθε δημιουργική δύναμη της φυσικής επιλογής και διαφώνησε υποστηρίζοντας ότι ο πιο σημαντικός παράγοντας της εξέλιξης είναι η ύπαρξη μεταλλάξεων που προσφέρουν ένα πλεονέκτημα και ότι η φυσική επιλογή είναι μόνο ένα «κόσκινο» το οποίο διασώζει τις πλεονεκτικές μεταλλάξεις και απαλείφει τις δηλητηριώδεις. Γι' αυτό το λόγο, η άποψη του συχνά αναφέρεται και ως mutationism. Πάντως, αυτή η θεωρία δε πρέπει να συγχέεται με τη θεωρία της μεταλλαγής του Bateson ή με την μακρομεταλλακτική θεωρία του De Vries, στην οποία η φυσική επιλογή παίζει μικρό ρόλο. Στα χρόνια του Morgan, η γενετική βάση των μεταλλάξεων είχε αποσαφηνιστεί και η εξελικτική του θεωρία του ήταν ελκυστική σε πολλούς γενετιστές. Επίσης, πρότεινε ότι ένα μέρος της μορφολογικής εξέλιξης οφείλεται στις ουδέτερες μεταλλάξεις. Πάντως, η

θεωρία του περί μεταλλάξεων σταδιακά έγινε μη δημοφιλής, καθώς πολλοί νέο-Δαρβινικοί υποστηρικτές, όπως ο Fisher, ο Wright, ο Haldane και ο Dobzhansky, βρήκαν στήριξη από πολλούς ερευνητές της δεκαετίας του 1940. Στο νεοδαρβινισμό, η φυσική επιλογή φαίνεται να παίζει ένα σημαντικό ρόλο σε σχέση με τις μεταλλάξεις, πολλές φορές δημιουργώντας νέους χαρακτήρες με την παρουσία του γενετικού ανασυνδυασμού. Παρότι υπάρχουν πολλοί λόγοι για αυτή την αλλαγή, δυο είναι ιδιαίτερα σημαντικοί. Πρώτον, οι περισσότεροι γενετιστές αυτού του καιρού πίστευαν ότι το μέγεθος του γενετικού πολυμορφισμού που περιέχεται στους φυσικούς πληθυσμούς είναι τόσο μεγάλο ώστε κάθε γενετική αλλαγή μπορεί να υπάρξει μέσω της φυσικής επιλογής χωρίς να περιμένουμε για νέες μεταλλάξεις. Δεύτερον, οι μαθηματικοί γενετιστές έδειξαν ότι η συχνότητα αλλαγής γονιδίων λόγω μεταλλάξεων είναι αρκετά μικρότερη από την αλλαγή μέσω φυσικής επιλογής. Ο νεοδαρβινισμός έφτασε στο αποκορύφωμά του το 1950 και 1960 και αυτή την περίοδο κάθε μορφολογικό ή φυσιολογικό χαρακτηριστικό θεωρούνταν ότι έχει προκύψει μέσω της φυσικής επιλογής (Dobzhansky 1951, Mayr 1963).

Μια ακόμα πιο εκτεταμένη διαμάχη πάνω σε αυτό το ζήτημα άρχισε όταν η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έδειξε ότι η γενετική ποικιλομορφία μέσα στους πληθυσμούς ήταν αρκετά υψηλότερη απ' ό,τι αρχικά θεωρούνταν. Σε αυτή τη χρονική περίοδο, αρκετοί εξελικτικοί βιολόγοι πίστευαν ότι ο μεγάλος βαθμός της γενετικής ποικιλομορφίας μπορεί να διατηρηθεί μόνο μέσω κάποιας μορφής ισοζυγούσας επιλογής. Πάντως, αρκετοί ερευνητές συμφώνησαν ότι αυτή η ποικιλομορφία μπορεί να εξηγηθεί και μέσω των ουδέτερων μεταλλάξεων. Στην αρχή της δεκαετίας του 1980, η μελέτη της μοριακής εξέλιξης πραγματοποιήθηκε κυρίως στο επίπεδο του DNA, αλλά η διαμάχη συνεχιζόταν. Αυτή η μακροχρόνια διαμάχη της ουδετερότητας εναντίον της επιλογής καταδεικνύει ότι η κατανόηση του μηχανισμού της εξέλιξης είναι θεμελιώδης για τη βιολογία και ότι η επίλυση του προβλήματος είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη (Nei, 2005).

Αρχικές μελέτες της μοριακής εξέλιξης

Προτού ξεκινήσει η μοριακή μελέτη της εξέλιξης τη δεκαετία του 1960, οι περισσότερες έρευνες πάνω στο μηχανισμό της εξέλιξης πραγματοποιούνταν χρησιμοποιώντας τη μεντελική προσέγγιση. Επειδή αυτή η προσέγγιση απαιτούσε πειράματα διασταυρώσεων για την αναγνώριση ομόλογων γονιδίων, οι μελέτες περιορίζονταν σε ενδοειδικές γενετικές αλλαγές. Εξαιτίας αυτού, η εξελικτική μελέτη αφορούσε τις συχνότητες των αλληλομόρφων και τις αλλαγές τους ενδοειδικά. Ωστόσο, στην μοριακή προσέγγιση, η εξελικτική αλλαγή των γονιδίων μπορεί να μελετηθεί συγκρίνοντας οποιοδήποτε ζευγάρι ειδών στα οποία μπορούν να αναγνωριστούν τα ομόλογα γονίδια. Αυτή η υπερπήδηση του εμποδίου των ειδών εισήγαγε νέες γνώσεις που αφορούσαν την μακροχρόνια εξέλιξη των γονιδίων. Επιπλέον, επειδή οι πρωτεΐνες είναι προϊόντα της μεταγραφής και μετάφρασης των γονιδίων, μπορούμε να μελετήσουμε τις εξελικτικές αλλαγές των γονιδίων εξετάζοντας τις αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών. Γι' αυτό το λόγο πολλοί ερευνητές σύγκριναν τις αμινοξικές αλληλουχίες της αιμοσφαιρίνης, του κυτοχρώματος c και άλλων πρωτεϊνών από ένα μεγάλο εύρος ειδών. Πολλές από αυτές τις μελέτες παρουσιάστηκαν στο συνέδριο του Bryson και Vogel το 1965, με όνομα Εξελισσόμενα Γονίδια και Πρωτεΐνες.

Αυτές οι έρευνες αποκάλυψαν μερικές ενδιαφέρουσες ιδιότητες της μοριακής εξέλιξης. Πρώτον, ο αριθμός των αμινοξικών αλλαγών μεταξύ δυο ειδών ήταν σχεδόν ανάλογος με το χρόνο από τον οποίο τα δυο αυτά είδη διαχωρίστηκαν (Zuckerandl and Pauling 1962, 1965, Margoliash 1963, Doolittle and Blombach 1964). Δεύτερον, οι αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία συμβαίνουν λιγότερο συχνά στις πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά τμήματα με σημαντικό ρόλο σε σχέση με πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά τμήματα λιγότερο σημαντικά (Margoliash and Smith 1965; Zuckerandl and Pauling 1965). Έτσι ο ρυθμός των αλλαγών ήταν αρκετά υψηλότερος στις λιγότερο σημαντικές ινωδοπρωτεΐνες απ' ό τι στις απαραίτητες πρωτεΐνες, όπως η αιμοσφαιρίνη και το κυτόχρωμα c, και τα ενεργά κέντρα αυτών των πρωτεϊνών είχαν αρκετά χαμηλότερο ρυθμό εξέλιξης από τα

υπόλοιπα τμήματα της πρωτεΐνης. Ένα χρήσιμο συμπέρασμα από αυτές τις παρατηρήσεις ήταν ότι οι αμινοξικές αλλαγές στις μη συντηρημένες περιοχές των πρωτεϊνών είναι σχεδόν ουδέτερες ή ελαφρώς θετικά επιλεγόμενες και ότι τα αμινοξέα σε περιοχές σημαντικές για τη λειτουργία δεν αλλάζουν εύκολα ώστε οι πρωτεΐνες να διατηρούν τη λειτουργικότητά τους (Freese and Yoshida 1965, Margoliash and Smith 1965, Zuckerhandl and Pauling 1965).

Μοριακή φυλογένεση

Καθώς η εξέλιξη μπορεί να θεωρηθεί ως η γενετική αλλαγή που διέρχεται μέσα από το φίλτρο της φυσικής επιλογής, η ανάλυση των γενετικών σχέσεων είναι πρωταρχικής σημασίας για την αποκρυπτογράφηση των εξελικτικών σχέσεων. Η μεγαλύτερη προοπτική που δίνει στους επιστήμονες η υπόθεση του μοριακού ρολογιού είναι ότι τα μοριακά δεδομένα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να αποκρυπτογραφηθούν οι φυλογενετικές σχέσεις όλων των ζωντανών οργανισμών. Πολύ απλά, οι οργανισμοί με μεγάλο βαθμό ομοιότητας στο μοριακό επίπεδο αναμένεται να έχουν στενότερη συγγένεια μεταξύ τους απ' ό,τι οι οργανισμοί που διαφέρουν περισσότερο στο μοριακό επίπεδο. Πριν από την ανάπτυξη της τεχνολογίας της μοριακής βιολογίας που επιτρέπει τη συλλογή δεδομένων για τέτοιου είδους αναλύσεις, οι εξελικτικοί βιολόγοι βασίζονταν εξ ολοκλήρου στη σύγκριση των φαινοτύπων για την εκτίμηση της γενετικής ομοιότητας. Πίσω από την πρακτική αυτή βρισκόταν η παραδοχή ότι αν οι φαινότυποι είχαν ομοιότητες μεταξύ τους το ίδιο θα ίσχυε και για τα γονίδια που ήταν υπεύθυνα για τους φαινότυπους αυτούς. Αν οι φαινότυποι ήταν διαφορετικοί, θα ήταν διαφορετικά και τα αντίστοιχα γονίδια. Οι φαινότυποι που εξετάστηκαν αρχικά ήταν κυρίως γενικά ανατομικά χαρακτηριστικά. Αργότερα μελετήθηκαν η συμπεριφορά και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, καθώς και οι παρατηρήσεις μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Οι συγκρίσεις αυτών των γνωρισμάτων χρησιμοποιήθηκαν

με επιτυχία για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων πολλών ομάδων ειδών, τόσο φυτών όσο και ζώων, και εξακολουθούν να αποτελούν τη βάση πολλών εξελικτικών μελετών. Παρόλα αυτά, δε μπορούμε να βασιστούμε στη μελέτη των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, παρά μόνο μέχρι ενός σημείου. Ορισμένες φορές κατά την εξέλιξη μπορεί να εμφανιστούν, μέσα από μια διαδικασία που ονομάζεται συγκλίνουσα εξέλιξη (convergent evolution), παρόμοιοι φαινότυποι σε οργανισμούς που δε συγγενεύουν στενά μεταξύ τους.

Ένα άλλο πρόβλημα που αντιμετωπίζουμε όταν βασιζόμαστε στους φαινότυπους για να προσδιορίσουμε εξελικτικές σχέσεις είναι ότι πολλοί οργανισμοί δε διαθέτουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που να προσφέρονται για μελέτη και σύγκριση. Για παράδειγμα, η μελέτη των σχέσεων μεταξύ βακτηρίων παρουσίαζε πάντα προβλήματα, επειδή τα βακτήρια δεν έχουν πολλά εμφανή γνωρίσματα που να συσχετίζονται με το βαθμό της γενετικής τους συγγένειας. Ένα τρίτο πρόβλημα δημιουργείται όταν προσπαθούμε να συγκρίνουμε οργανισμούς με πολύ μακρινή συγγένεια. Ποια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά θα έπρεπε να συγκρίνουμε, για παράδειγμα, αναλύοντας βακτήρια και θηλαστικά, οργανισμούς που έχουν τόσα λίγα κοινά χαρακτηριστικά;

Ακόμη και αν ο σχετικός ρυθμός μοριακής εξέλιξης μπορεί να είναι διαφορετικός από κλάδο σε κλάδο και παρά το γεγονός ότι θα πρέπει να είμαστε επιφυλακτικοί απέναντι στους ρυθμούς απόκλισης που υπολογίζουμε με βάση τα μοριακά δεδομένα, οι μοριακές προσεγγίσεις μπορούν συνήθως να χρησιμοποιηθούν αξιόπιστα για τη φυλογενετική ταξινόμηση των οργανισμών. Πολλοί υποστηρίζουν ότι η μοριακή φυλογενετική ταξινόμηση είναι περισσότερο αξιόπιστη ακόμη και όταν υπάρχουν διαθέσιμες εναλλακτικές πηγές δεδομένων, επειδή η δράση της φυσικής επιλογής γενικά είναι λιγότερο έντονη στο επίπεδο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Όταν εντοπίζονται ασυμφωνίες ανάμεσα στη μοριακή και τη μορφολογική φυλογενετική ταξινόμηση, παρουσιάζονται πολύτιμες ευκαιρίες για την εξέταση της επίδρασης που έχει η φυσική επιλογή στο επίπεδο των φαινοτυπικών διαφορών (Αλαχιώτης, 2007).

Φυλογενετικές Σχέσεις και Μοριακή Φυλογένεια

Η ταξινομική αξιοποίηση των χαρακτήρων διάφορων φυλογενετικών ομάδων βασίζεται στην αρχή της φειδωλότητας, κατά την οποία μια φυλογενετική κατάταξη διαφόρων taxa είναι περισσότερο πειστική αν οι εξελικτικές αλλαγές των εξετασθέντων χαρακτήρων είναι οι λιγότερες μεταξύ των ειδών που κατατάσσουμε ως εκ τούτου συγγενέστερα. Στο μοριακό επίπεδο, μια τέτοια προσέγγιση βασίζεται στη γενική αρχή ότι η αλληλουχία του DNA των έμβιων όντων κρύβει την εξελικτική τους ιστορία, καθώς ο βαθμός συγγένειας δυο οργανισμών είναι ανάλογος του βαθμού ομοιότητας των γονιδιωμάτων τους ή των πληροφοριακών γενετικών στοιχείων τους. Η προσπάθεια ταξινόμησης των οργανισμών είναι πολύ παλιά, πριν ακόμα μάθουμε κάτι για την εξελικτική σχέση των οργανισμών. Η κατάταξη σε ομάδες με βάση τη μορφολογική ομοιότητα χρονολογείται από την εποχή του Αριστοτέλη και είναι γνωστή ως φυσικό σύστημα κατάταξης. Αργότερα, ο Λιναίος ανέπτυξε το πρώτο ολοκληρωμένο ταξινομικό σύστημα, που θεωρείται το σημείο έναρξης για τη σύγχρονη ταξινόμηση των ζώων. Η ταξινόμηση αυτή είναι η βάση πάνω στην οποία χτίστηκε η ανάπτυξη της εξελικτικής θεωρίας, η οποία οφείλει πολλά στις συστηματικές επιστήμες.

Με τη μοριακή μεθοδολογία, είναι σήμερα δυνατή η αναπαράσταση των κυριότερων χαρακτηριστικών του δέντρου της ζωής. Στο δέντρο αυτό, ένας πλήρης βραχίονας, που ονομάζεται κλάδος, αφορά μια ομάδα σχετιζόμενων ειδών, τα οποία έχουν έναν πολύ πρόσφατο κοινό πρόγονο. Οι κανόνες ταξινόμησης για τα ζώα και τα φυτά διαφέρουν λίγο μεταξύ τους, αλλά τα γενικά συστήματα είναι όμοια και ιεραρχικά. Στο πλαίσιο αυτό, είδη που μοιάζουν μεταξύ τους κατατάσσονται στο ίδιο γένος, γένη που μοιάζουν ταξινομούνται στην ίδια οικογένεια, οικογένειες που έχουν ομοιότητες μεταξύ τους κατατάσσονται στην ίδια τάξη, οι τάξεις σε κλάσεις, οι κλάσεις σε φύλα και τα φύλα σε βασιλεία. Κάθε είδος, οικογένεια ή άλλες ταξινομικές

ομάδες αναφέρονται ως taxon και κάθε επίπεδο της ιεραρχίας κατάταξης λέγεται ταξινομική κατηγορία. Η ιεραρχική ταξινόμηση στοχεύει στο να βρεθεί η αλυσίδα των ειδών και να κατασκευαστεί το γενεαλογικό δέντρο της ζωής (εικ1). Ωστόσο, είναι πολύ δύσκολο να βρεθεί η ακριβής εξελικτική αλληλουχία η οποία υπάρχει, αφού όλοι οι οργανισμοί πρέπει να έχουν προέλθει από έναν κοινό πρόγονο. Η εξελικτική αλληλουχία των οργανισμών, η ιστορία μιας ομάδας, ενός taxon ή διαφόρων taxa, που περιγράφεται με την μορφή εξελικτικού δέντρου με κοινό πρόγονο, λέγεται φυλογένεια(Αλαχιώτης,2007).

Η φαινετική, κλαδιστική και εξελικτική ταξινόμηση

Βασική αρχή της διερεύνησης των φυλογενειών είναι η αξιοποίηση κοινών χαρακτήρων στις υπό σύγκριση ομάδες, με την πρακτική της ταξινόμησης να στηρίζεται σε τρεις σχολές. Μια τέτοια σχολή, η φαινετική (phenetic) είναι αυτή που βασίζεται στην ομοιότητα των μορφολογικών και μοριακών χαρακτηριστικών με βάση την αρχή πως ότι μοιάζει περισσότερο είναι και εξελικτικά συγγενέστερο, ωστόσο ένα κοινό γνώρισμα μπορεί να έχει προέλθει με ανεξάρτητο τρόπο (π.χ μετάλλαξη) στα υπό εξέταση είδη ή να είναι αποτέλεσμα θορύβου από διεργασίες όπως η σύγκλιση και η απόκλιση. Για τους λόγους αυτούς, μεγάλη σημασία έχουν οι χαρακτήρες που συγκρίνονται και ο τρόπος που συγκρίνονται. Για παράδειγμα, η φώκια και το σελάχι ζουν στη θάλασσα και με τη φαινετική προσέγγιση θα κατατασσόταν στην ίδια φυλογενετική ομάδα σε σχέση με τον άνθρωπο, που θα τοποθετούνταν σε διαφορετική. Όμως, η φώκια και ο άνθρωπος ανήκουν στα Θηλαστικά και το σελάχι στα Ψάρια. Με τη φαινετική ταξινόμηση αγνοούνται οι εξελικτικές σχέσεις και τα είδη ταξινομούνται σύμφωνα με το πώς φαίνονται. Οι φαινετικοί χαρακτήρες μπορεί να ποσοτικοποιηθούν και να αναλυθούν, γι' αυτό και η φαινετική προσέγγιση αναφέρεται και ως αριθμητική ταξινόμηση.

Για τους λόγους αυτούς, χρησιμοποιείται πιο αποτελεσματικά η μεθοδολογία της κλαδιστικής (cladistics) ή φυλογενετικής σχολής, με την οποία αγνοούνται οι φαινετικές σχέσεις και ορισμένα είδη ταξινομούνται φυλογενετικά σε μια ομάδα επειδή έχουν τον πιο κοινό πρόγονο σε σχέση με είδη μιας άλλης ομάδας. Με την κλαδιστική ταξινόμηση επιδιώκεται η διάκριση αξιόπιστων και μη αξιόπιστων χαρακτήρων, μια προσπάθεια που βασίζεται στην κλαδογενετική εξέλιξη (κλαδογένεση), σύμφωνα με την οποία μια γραμμή θεωρείται ότι διασπάται σε δυο κλάδους και με τη χρησιμοποίηση μιας σειράς κανόνων και παραδοχών αξιοποιούνται ειδογενετικά οι υπό μελέτη χαρακτήρες. Για παράδειγμα, αν ένα χαρακτηριστικό υπάρχει σε ορισμένα υπό εξέταση taxa, τότε υποδηλώνει εξελικτική συγγένεια και τα taxa αυτά κατατάσσονται σε ένα κλάδο, σε μια ομάδα. Διευκρινίζεται ότι αξιόπιστοι χαρακτήρες είναι οι ομόλογοι (homologous) οι οποίοι είναι κοινοί σε ένα ή περισσότερα είδη και υπάρχουν και στον κοινό τους πρόγονο. Μη αξιόπιστοι χαρακτήρες είναι οι ανάλογοι (analogous) οι οποίοι είναι μεν κοινοί σε δύο είδη αλλά δεν υπάρχουν στον κοινό τους πρόγονο, καθώς είναι αποτέλεσμα συγκλίνουσας εξέλιξης.

Μια άλλη σχολή ταξινόμησης, η εξελικτική ταξινόμηση (evolutionary classification) αντιπροσώπευε την ορθόδοξη σχολή από τη δεκαετία του 1930 μέχρι πριν από 2 δεκαετίες. Η προσέγγιση αυτή συμπεριλάμβανε και φαινετικές και φυλογενετικές σχέσεις, περιορίζοντας τις ακραίες ιδιότητες της κλαδιστικής προσέγγισης αλλά επηρεαζόμενη ταυτόχρονα από τις φαινετικές παρεκκλίσεις.

Η εφαρμογή της κλαδιστικής προσέγγισης είναι ιδιαίτερα περίπλοκη και απαιτεί ειδικά λογισμικά και περίπλοκους αλγορίθμους, προγράμματα που περιέχουν συγκεκριμένες παραδοχές για να εξαχθεί ένα φυλογενετικό δέντρο. Στην κλαδιστική προσέγγιση τρεις παραδοχές παίζουν σημαντικό ρόλο: 1. Οι ομοιότητες ορισμένων χαρακτηριστικών δεν δίνουν την αναγκαία εξελικτική πληροφορία 2. Οι πληροφοριακοί χαρακτήρες είναι εκείνοι που θεωρούνται κοινοί εκ καταγωγής 3. Το τι θεωρούμε κοινό, παράγωγο και πληροφοριακό χαρακτήρα εξαρτάται εν πολλοίς από το περιεχόμενο του φυλογενετικού δέντρου, όπως και από το

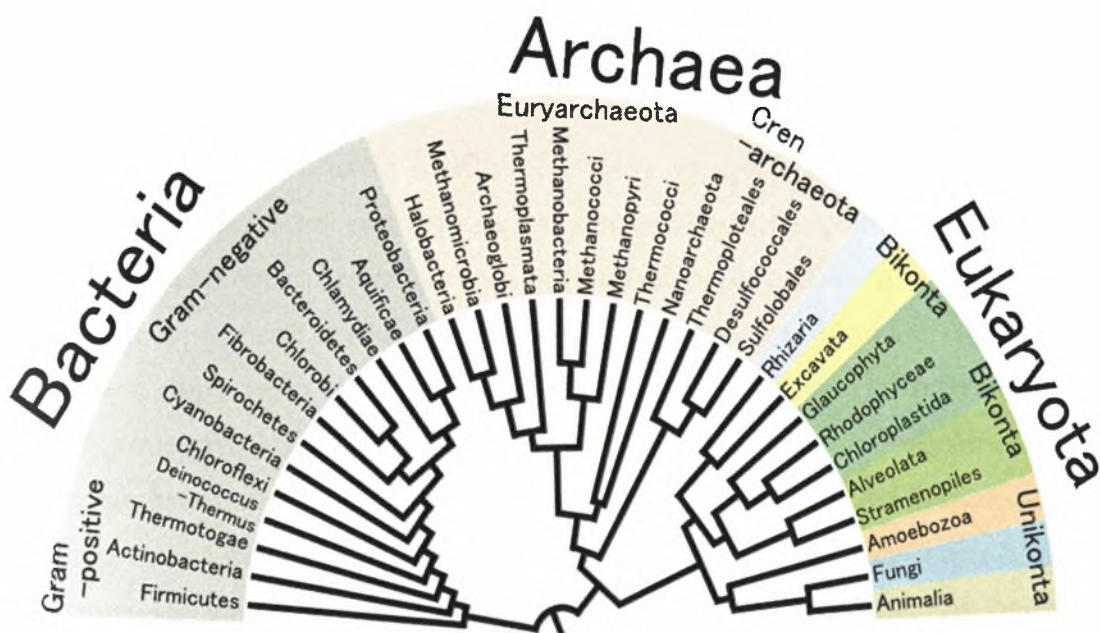
ποιο μέρος του διερευνούμε. Στο πλαίσιο αυτό χρησιμοποιούνται ορισμένοι όροι που έχουν ιδιαίτερη σημασία στην όλη προσέγγιση αντικειμενοποίησης της προσπάθειας κατασκευής ενός εξελικτικού δέντρου. Για παράδειγμα, μιλάμε για τη συναπομορφία (synapomorphy) όταν αναφερόμαστε σε έναν αναγενετικό, μονοφυλετικό χαρακτήρα που εμφανίστηκε σε έναν κοινό πρόγονο μιας ομάδας ειδών και υπάρχει στα υπό διερεύνηση είδη, τα οποία λόγω της συναπομορφίας κατατάσσονται στην ίδια ομάδα.

Στη συμπλησιομορφία (symplesiomorphy), ένας χαρακτήρας είναι κοινός στα είδη μιας σύγχρονης ομάδας ειδών, δεν διαφέρει από το αντίστοιχο προγονικό είδος αλλά υπάρχει και σε μέλη συγγενών ομάδων ειδών, σε περισσότερα του ενός δηλαδή taxa, όπως στα παραφυλετικά taxa. Η συμπλησιομορφία συμβάλλει στην ομαδοποίηση των taxa χωρίς να τη διαλευκάνει φυλογενετικά. Μιλάμε ακόμα για την απομορφία (apomorphy) σχετικά με ένα παράγωγο χαρακτηριστικό συγγενές με το προγονικό, που όμως άλλαξε με την πάροδο του χρόνου ή για πλησιομορφία (plesiomorphy) για ένα χαρακτηριστικό ενός taxon που δεν διαφέρει πολύ του προγονικού, πλησιάζοντας την απομορφία (Αλαχιώτης,2007).

Φυλογενετικά δέντρα

Λόγω της μακράς ιστορίας των εξελικτικών μελετών, οι γενικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών είχαν καθιερωθεί σε αρκετά μεγάλο βαθμό, ήδη πριν από την ανάπτυξη της τεχνολογίας μοριακής ανάλυσης. Κεντρική θέση κατέχει η έννοια του φυλογενετικού δέντρου (phylogenetic tree), το οποίο αναπαριστά τις εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στα διάφορα είδη. Όλοι οι οργανισμοί, τόσο αυτοί που ζουν σήμερα, όσο και αυτοί που έζησαν κατά το παρελθόν, έχουν ένα κοινό πρόγονο που έζησε πριν από τέσσερα δισεκατομμύρια χρόνια περίπου. 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, ώστε να προκύψει ένα δέντρο με ρίζα (Αλαχιώτης,2007).



Εικόνα 1 : Το φυλογενετικό δέντρο της ζωής

Γονιδιακά δέντρα και δέντρα ειδών

Ένα φυλογενετικό δέντρο, η δημιουργία του οποίου βασίζεται στην απόκλιση που παρατηρείται στην αλληλουχία ενός ομόλογου γονιδίου ονομάζεται γονιδιακό δέντρο (gene tree). Αυτός ο τύπος δέντρου μπορεί να εκφράζει την εξελικτική ιστορία ενός γονιδίου, όχι όμως απαραίτητα και του είδους στο οποίο αυτό συναντάται. Συνήθως ο καλύτερος τρόπος δημιουργίας ενός δέντρου ειδών (species tree) είναι η ανάλυση δεδομένων από πολλά γονίδια. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η απόκλιση των γονιδίων συνήθως προηγείται του φραγμού στη ροή του γενετικού υλικού, ο οποίος παρατηρείται ανάμεσα σε πληθυσμούς με αποκλίνουσες εξελικτικές πορείες κατά την ειδογένεση. Οι διαφορές μεταξύ γονιδιακών δέντρων και δέντρων ειδών είναι συνήθως ιδιαίτερα σημαντικές, στην περίπτωση που εξετάζουμε γενετικούς τόπους των οποίων η πολυμορφικότητα αποτελεί εξελικτικό πλεονέκτημα στους πληθυσμούς, όπως συμβαίνει στο γενετικό τόπο του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC). Αν χρησιμοποιούσαμε μόνο τα αλληλόμορφα του MHC για να προσδιορίσουμε τα δέντρα των ειδών, θα έπρεπε να τοποθετήσουμε πολλούς ανθρώπους στην ίδια ομάδα με τους γορίλες και όχι με άλλους ανθρώπους, επειδή ο πολυμορφισμός που φέρουν έχει εμφανιστεί πριν από την απόκλιση των γενεαλογικών γραμμών ανθρώπου – γορίλα.

Παρά τον τεράστιο αριθμό δέντρων με ρίζα και χωρίς ρίζα που μπορεί να προκύψουν ακόμη και στην περίπτωση μικρού αριθμού taxa, μόνο ένα από τα πιθανά δέντρα παρουσιάζει με απόλυτη ακρίβεια την πραγματική φυλογενετική ανάμεσα στα taxa που εξετάζονται. Αφού ποτέ δε γνωρίζουμε ποιο δέντρο είναι αυτό που στ' αλήθεια παριστάνει την πραγματικότητα (με εξαίρεση στην περίπτωση όπου χρησιμοποιούνται τεχνητά δεδομένα από προσομοιώσεις σε υπολογιστή), τα περισσότερα φυλογενετικά δέντρα που δημιουργούμε ονομάζονται συναχθέντα δέντρα (inferred trees). Ο προσδιορισμός, ανάμεσα σε όλα τα πιθανά δέντρα, εκείνου του δέντρου που είναι πιθανότερο να είναι το πραγματικό, είναι ένα τρομακτικά δύσκολο έργο στο οποίο χρησιμοποιούνται υπολογιστές

μεγάλης ισχύος. Στους αλγόριθμους που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις αναζητήσεις, ακολουθείται συνήθως μια από τις τρεις παρακάτω μεθόδους : υπολογισμός πίνακα αποστάσεων (distance matrix), μέγιστη φειδωλότητα (maximum parsimony) και μέγιστη πιθανοφάνεια (maximum likelihood) (Αλαχιώτης, 2007).

Μέθοδοι κατασκευής δέντρων

Υπάρχουν 3 διαφορετικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως για τον προσδιορισμό φυλογενετικών σχέσεων και για την κατασκευή δέντρων με βάση δεδομένα μοριακής ανάλυσης. Οι προσεγγίσεις που βασίζονται στην κατάρτιση πίνακα αποστάσεων εφαρμόζουν στατιστικές μεθόδους για την ομαδοποίηση των στοιχείων με βάση τη συνολική ομοιότητα που έχουν αυτά μεταξύ τους. Αυτή η στατιστική προσέγγιση χρησιμοποιείται, εκτός από τον τομέα της μοριακής εξέλιξης, και σε πολλές άλλες εφαρμογές ανάλυσης δεδομένων. Αντιθέτως, στις προσεγγίσεις μέγιστης φειδωλότητας, η ομαδοποίηση των οργανισμών αποβλέπει στην ελαχιστοποίηση του αριθμού των πιθανολογούμενων αντικαταστάσεων που θα πρέπει να έχουν συμβεί από την εποχή του τελευταίου κοινού προγόνου δυο ειδών. Οι προσεγγίσεις αυτές χρησιμοποιούνται αποκλειστικά σε μελέτες μοριακής εξέλιξης. 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).

Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με τη βοήθεια πινάκων αποστάσεων

Η παλαιότερη μέθοδος πίνακα αποστάσεων είναι και η απλούστερη από όλες τις μεθόδους κατασκευής ενός δέντρου. Η μέθοδος συσχέτισης μη σταθμισμένων ομάδων ανά ζεύγη με αριθμητικούς μέσους όρους (UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic averages) προτάθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1960 για την εξελικτική ανάλυση μορφολογικών χαρακτηριστικών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη στατιστική και απαιτεί δεδομένα που μπορούν να συμπυκνωθούν δίνοντας ένα μέτρο της γενετικής απόστασης ανάμεσα σε όλα τα taxa που εξετάζονται ανά ζεύγη. Ένα πλεονέκτημα των προσεγγίσεων που βασίζονται στους πίνακες αποστάσεων είναι ότι παράγονται εξίσου καλά αποτελέσματα τόσο με μορφολογικά όσο και με μοριακά δεδομένα, καθώς και με τον συνδυασμό των δύο. Στις προσεγγίσεις αυτές, όπως και στις αναλύσεις μέγιστης πιθανοφάνειας, λαμβάνονται υπόψη όλα τα διαθέσιμα δεδομένα, ενώ στις προσεγγίσεις μέγιστης φειδωλότητας απορρίπτονται όσα δεδομένα θεωρείται ότι δεν παρέχουν κάποια πληροφορία. Ένα μειονέκτημα της προσέγγισης UPGMA είναι ότι προϋποθέτει σταθερό ρυθμό εξέλιξης σε όλες τις γενεαλογικές γραμμές, κάτι που, όπως αποκαλύπτουν οι δοκιμασίες σχετικού ρυθμού, δεν ισχύει πάντα. Υπάρχουν διάφορες εναλλακτικές προσεγγίσεις που βασίζονται στον πίνακα αποστάσεων, όπως η μέθοδος μετασχηματισμένων αποστάσεων (transformed distance method) και η μέθοδος συνένωσης γειτόνων (neighbor-joining method) οι οποίες, αν και πιο πολύπλοκες, μπορούν να εφαρμοστούν σε περιπτώσεις που ο ρυθμός εξέλιξης δεν είναι σταθερός στις διάφορες γενεαλογικές γραμμές (Αλαχιώτης, 2007).

Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων σύμφωνα με την αρχή της μέγιστης φειδωλότητας.

Ενώ οι μέθοδοι κατασκευής φυλογενετικών δέντρων με βάση τους πίνακες απόστασης και τη μέγιστη πιθανοφάνεια στηρίζονται στις αρχές της στατιστικής, οι προσεγγίσεις φειδωλότητας στηρίζονται κυρίως στη σπανιότητα των μεταλλαγών. Η ίδια η λέξη φειδωλότητα, αναφέρεται στο ότι επιχειρείται να βρεθεί η καταλληλότερη γεωμετρία ενός δέντρου, ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός μεταλλαγών που θεωρούμε ότι θα πρέπει να έχουν συμβεί κατά την πορεία της εξέλιξης προκειμένου να προκύψουν οι αλληλουχίες όλων των taxa του φυλογενετικού δέντρου. Στις προσεγγίσεις αυτές θεωρείται δεδομένο ότι το βέλτιστο δέντρο θα προϋποθέτει να έχει συμβεί ο μικρότερος δυνατός αριθμός μεταλλαγών και γι' αυτό ονομάζεται δέντρο μέγιστης φειδωλότητας.

Κατά την εξέταση των δεδομένων με την προσέγγιση που βασίζεται στη μέγιστη φειδωλότητα, δε 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 επικαλούνται. 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 αντικαταστάσεων 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. 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.

Προσεγγίσεις μέγιστης πιθανοφάνειας για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων

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. 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 πιο 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.

Δοκιμασία bootstrap και αξιοπιστία των δέντρων

Προφανώς, όταν χρησιμοποιούνται προσεγγίσεις φειδωλότητας χρειάζεται περισσότερος χρόνος για την ανάλυση στοιχίσεων αλληλουχίας μεγαλύτερου μήκους απ' ότι για στοιχίσεις μικρότερου μήκους. Ωστόσο, εξαιτίας της σχέσης ανάμεσα στον αριθμό των taxon και τον αντίστοιχο αριθμό δέντρων χωρίς ρίζα, η προσθήκη περισσότερων αλληλουχιών αυξάνει κατά πολύ τον χρόνο που απαιτείται για την ανεύρεση του προτεινόμενου δέντρου. 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 taxa 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. Το ισοδύναμο της διαδικασίας αυτής θα ήταν να τυπώσουμε σε μια σελίδα μια πολλαπλή στοίχιση όπου οι αλληλουχίες βρίσκονται σε οριζόντιες γραμμές, να κόψουμε αυτή τη σελίδα σε κατακόρυφες λωρίδες, κάθε μια από τις οποίες να περιέχει μια διαφορετική στήλη της στοίχισης, να τοποθετήσουμε όλες αυτές τις λωρίδες σε ένα σάκο και να τραβήξουμε τυχαία από το σάκο μια λωρίδα. Στη συνέχεια θα έπρεπε να αντιγράψουμε την πληροφορία αυτής της λωρίδας και να την επιστρέψουμε στο σάκο και έπειτα να συνεχίσουμε να τραβάμε ξανά και ξανά από μια λωρίδα στην τύχη μέχρι να δημιουργήσουμε μια τεχνητή ομάδα δεδομένων που να έχει μήκος ίσο με την αρχική στοίχιση. Η διαδικασία της επαναδειγματοληψίας 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 taxa 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. Αν και τα αποτελέσματα των δοκιμασιών

bootstrap χρησιμοποιούνται συχνά στην επιστημονική βιβλιογραφία, θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με κάποια επιφύλαξη.

Πρώτον, τα αποτελέσματα που βασίζονται σε λιγότερες από μερικές εκατοντάδες επαναλήψεις είναι πιθανόν να είναι αναξιόπιστα, ιδίως όταν αναλύονται μεγάλοι αριθμοί αλληλουχιών. Οι μελέτες προσομοίωσης έχουν επίσης δείξει ότι οι δοκιμασίες bootstrap έχουν την τάση να υποτιμούν το βαθμό εμπιστοσύνης όταν οι τιμές είναι υψηλές και να τον υπερτιμούν όταν είναι χαμηλές. Επιπλέον, εφόσον πολλά δέντρα έχουν πολύ μεγάλο αριθμό κλάδων, υπάρχει συχνά σημαντικός κίνδυνος να παρασυρθεί κανείς από την «πλάνη των πολυαριθμών δοκιμασιών»-ορισμένα αποτελέσματα μπορεί να φαίνονται στατιστικά σημαντικά χωρίς πραγματικά να είναι, απλώς και μόνο επειδή εξετάζονται τόσες πολλές ομαδοποιήσεις. Ωστόσο, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι από τις λύσεις που δίνονται συνήθως σ' αυτά τα πιθανά προβλήματα προκύπτουν δέντρα που αποτελούν πλησιέστερες αναπαραστάσεις του πραγματικού δέντρου σε σύγκριση με το μοναδικό δέντρο μέγιστης φειδωλότητας (Αλαχιώτης,2007).

Επιλογή χαρακτήρων για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων

Πριν την ανάπτυξη των τεχνικών ανάλυσης του DNA, οι χαρακτήρες επιλογής περιορίζονταν στο μορφολογικό και πρωτεϊνικό επίπεδο. Έτσι, είχαν αναπτυχθεί κατάλληλα μορφολογικά κριτήρια που αφορούσαν διάφορες ομάδες οργανισμών, τα οποία θεωρούνταν ως κλειδιά για την αναγνώριση και τον διαχωρισμό των ειδών. Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μορφολογικής σύγκρισης είχαν κατασκευαστεί κατά το παρελθόν φυλογενετικά δέντρα που απεικόνιζαν τις φυλογενετικές σχέσεις των οργανισμών, άλλοτε με ικανοποιητικά και άλλοτε με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Η αδυναμία αυτής της μεθόδου ήταν ότι τα χαρακτηριστικά που εξετάζονταν δεν ήταν διαθέσιμα για όλα τα αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού, οπότε, για παράδειγμα, στα έντομα δε μπορούσε να γίνει αναγνώριση και διαχωρισμός των ειδών σε

προνυμφικό στάδιο για πολλά είδη. Επίσης, σε είδη πολύ συγγενικά, ήταν αδύνατος ο διαχωρισμός τους με βάση αυτά τα κριτήρια. Από την άλλη πλευρά, η χρήση των ισοενζύμων για τέτοιου είδους μελέτες ήταν μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος στις αρχές του 1980, καθώς εμβάθυνε την ανάλυση σε μοριακό επίπεδο. Η χρήση της μεθόδου αυτής έχει εγκαταλειφθεί στις μέρες μας, λόγω της διαπίστωσης ότι η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των ειδών δεν εκφράζεται πάντα στις πρωτεΐνες, κυρίως λόγω της ύπαρξης συνώνυμων μεταλλάξεων στην αλληλουχία του DNA, οι οποίες εμφανίζουν τον ίδιο φαινότυπο.

Στις μέρες μας, η ραγδαία εξέλιξη τόσο των τεχνικών ανάλυσης των αλληλουχιών DNA όσο και η εξέλιξη των υπολογιστών και των προγραμμάτων βιοπληροφορικής, έχει επιτρέψει την χρήση κατάλληλων τμημάτων DNA για την εύρεση των φυλογενετικών σχέσεων και τη διαλεύκανση ταξινομικών προβλημάτων που είχαν προκύψει όλα αυτά τα χρόνια από την ασυμφωνία των προηγούμενων μεθόδων. Οι τεράστιες βάσεις δεδομένων αλληλουχιών που έχουν δημιουργηθεί (π.χ. GenBank) από ανεξάρτητες μελέτες ερευνητικών ομάδων, προσφέρουν μια πληθώρα επιλογών για τον ερευνητή όσον αφορά την επιλογή του κατάλληλου τμήματος DNA, καθιστώντας πιο εύκολο το σχεδιασμό εκκινήτων για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος με τη χρήση της τεχνικής της PCR. Τα τμήματα που επιλέγονται συνήθως είναι τμήματα γονιδίων ή και σπανιότερα μικροδορυφόροι. Ιδιαίτερα τα τμήματα του μιτοχονδριακού DNA, που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, είναι αυτά που επιλέγονται συχνότερα για φυλογενετικές αναλύσεις. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης θα αναλυθούν παρακάτω.

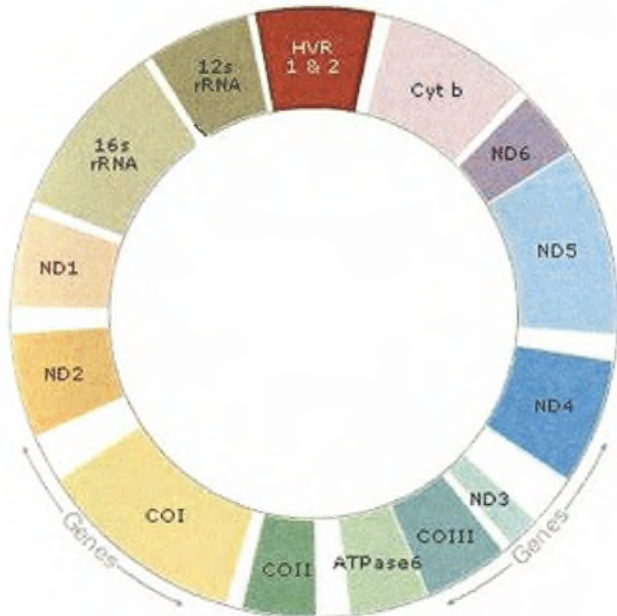
Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Πολλά μιτοχονδριακά γενώματα είναι κυκλικά, δίκλινα, υπερελικωμένα μόρια DNA (εικόνα 2). Γραμμικά μιτοχονδριακά γονιδιώματα εντοπίζονται σε μερικά πρωτόζωα και σε μερικούς μύκητες (π.χ. Cnophyta, Zygomycota και Hydrozoa). Σε πολλές περιπτώσεις, το περιεχόμενο του mtDNA σε GC διαφέρει αισθητά από το πυρηνικό και έτσι το μιτοχονδριακό DNA μπορεί να διαχωριστεί από το πυρηνικό με φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση πυκνότητας χλωριούχου καισίου. Το mtDNA δε συνδέεται με ιστόνες ή παρόμοιες πρωτεΐνες (Russell, 2006).

Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα διαφορετικών ειδών παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες ως προς τον αριθμό και τις λειτουργίες των γονιδίων τους. Το ζωικό μιτοχονδριακό DNA είναι ένα μικρό, εξωχρωμοσωμικό γονιδίωμα, που έχει συνήθως μέγεθος της τάξης των 16 kb. Με λίγες εξαιρέσεις, όλα τα ζωικά μιτοχονδριακά γενώματα περιέχουν τα ίδια 37 γονίδια: 2 για rRNAs, 13 για πρωτεΐνες και 22 για tRNAs. Και τα 37 γονίδια που βρίσκονται σε ένα σύνηθες μιτοχονδριακό DNA έχουν ομόλογα γονίδια στο mtDNA των φυτών, των μυκήτων και των πρωτίστων. Υπάρχει επίσης και μια μεγάλη μη κωδική περιοχή, η οποία είναι γνωστό ότι περιέχει στοιχεία ελέγχου για την αντιγραφή και τη μεταγραφή. (Krzywinski et al, 2006). 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 με το δικό του σύστημα αντιγραφής του DNA, της μεταγραφής και της μετάφρασης των πρωτεϊνών. Η μελέτη αυτών των γενωμάτων 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 εξελικτικά γενεαλογίες(Boore,1999).



Εικόνα 2 : Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Ροή πληροφοριών- Μεταγραφή και μετάφραση

Η μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή διαφέρει από την κυτταροπλασματική. Όπως είναι γνωστό, ο γενετικός κώδικας των μιτοχονδρίων διαφέρει από τον συνηθισμένο γενετικό κώδικα των πυρηνικών γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, η τριπλέτα UGA που είναι κωδικόνιο λήξης στο κυτταρόπλασμα, χρησιμεύει για κωδικοποίηση τρυπτοφάνης στα μιτοχόνδρια, οι τριπλέτες AGA και AGG, που στο κυτταρόπλασμα κωδικοποιούν την αργινίνη, στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών αποτελούν κωδικόνια λήξης, η τριπλέτα AUA που κωδικοποιεί για ισολευκίνη στο κυτταρόπλασμα, χρησιμοποιείται για την έναρξη της μετάφρασης και κωδικοποιεί για μεθειονίνη στα μιτοχόνδρια των ζωικών κυττάρων. Τα 22 μιτοχονδριακά tRNAs αναγνωρίζουν 4 διαφορετικούς κωδικόνια, που έχουν κοινά τα 2 πρώτα νουκλεοτίδια.

Τέλος, η έναρξη της μετάφρασης στα ευκαρυωτικά οργανίδια περιλαμβάνει το φορμυλ-μεθειονυλ-tRNA. (εικ.3) (Μαργαρίτης,2008).

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	Third letter
		UUC } Leu	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA Stop	UGA Trp	
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG Stop	UGG Trp	
C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg		
	CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg		
	CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg		
	CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg		
A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser		
	AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser		
	AUA } Met	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA Stop		
	AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG Stop		
G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly		
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly		
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly		
	GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly		

Εικόνα 3: Μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας

Ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA

Τα γονιδιώματα των οργανιδίων αντιγράφονται και κληρονομούνται με διαφορετικό τρόπο απ' ότι τα γονίδια του πυρήνα και ως εκ τούτου η δυναμική των αντικαταστάσεων τους είναι πολύ διαφορετική. 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 αντικαταστάσεων 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 αντικαταστάσεων 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. Αυτό είναι πιθανό να σχετίζεται με την χαμηλότερη αξιοπιστία του μηχανισμού αντιγραφής DNA και

επομένως με υψηλότερο ρυθμό εισαγωγής σφαλμάτων κατά την αντιγραφή και την επιδιόρθωση του mtDNA. Σε αντίθεση με τις πολυμεράσες DNA του πυρήνα, οι DNA πολυμεράσες του μιτοχονδρίου δεν έχουν ικανότητα διορθωτικού ελέγχου. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταλλαξιγόνων, όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες προκύπτουν από μεταβολικές διεργασίες που διεξάγονται στα μιτοχόνδρια, μπορεί επίσης να παίζουν κάποιο ρόλο στους υψηλότερους ρυθμούς αντικαταστάσεων. Επιπλέον, μπορεί 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. Τέλος, οι μεταλλαγές στις πρωτεΐνες, στα tRNA και στα rRNA που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα φαίνεται να μην επηρεάζουν τόσο αρνητικά την προσαρμοστικότητα του ατόμου όσο οι αντίστοιχες μεταλλαγές στα προϊόντα των πυρηνικών γονιδίων.

Παρότι είναι γνωστό ότι οι μιτοχονδριακές αλληλουχίες των ζώων εξελίσσονται ταχύτατα, η οργάνωση των γονιδίων φαίνεται να είναι अपαράλλακτη για μεγάλες χρονικές περιόδους της εξελικτικής ιστορίας. Με μερικές εξαιρέσεις, η οργάνωση των γονιδίων είναι σχετικά σταθερή μέσα στις κύριες ομάδες, αλλά διαφέρει μεταξύ αυτών, και η σύγκριση αυτής της οργάνωσης έχει μεγάλες δυνατότητες για την επίλυση προβλημάτων που αφορούν στους βαθύτερους κλάδους της φυλογένειας των μεταζώων. Ο μεγάλος αριθμός των πιθανών γονιδιακών διατάξεων καθιστά αδύνατο σχεδόν το να αποκτούν διαφορετικά taxa το ίδιο μοντέλο οργάνωσης. Η σύγκριση της οργάνωσης των μιτοχονδριακών γονιδίων παρείχε πειστικές φυλογένειες σε αρκετές περιπτώσεις όπου τα υπόλοιπα δεδομένα ήταν αμφίβολα, όπως έγινε με τις περιπτώσεις των μεγάλων ομάδων των εχινόδερμων και των αρθροπόδων.

Μιτοχονδριακά γονίδια και φυλογένεση

Η μελέτη των αλληλουχιών του μιτοχονδριακού DNA έχει καταστεί μια μέθοδος που επιλέγεται συχνά για την μελέτη ταξινομικών, πληθυσμιακών και εξελικτικών μελετών στα ζώα. Πολλές ιδιότητες της δομής και της εξέλιξης του mtDNA το έχουν κάνει πολύτιμο εξελικτικό εργαλείο. Μερικές από αυτές είναι η ευκολία της απομόνωσής του, ο υψηλός αριθμός των αντιγράφων του, η έλλειψη ανασυνδυασμού, η συντήρηση της αλληλουχίας και της δομής στα μετάζωα, και οι διαφορετικοί ρυθμοί εξέλιξης σε διαφορετικά τμήματα του μορίου (Jeong et al,2009).

Ανάμεσα στα μιτοχονδριακά γονίδια, εκείνα που επιλέγονται συνήθως για φυλογενετικές μελέτες είναι τα γονίδια 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 της αφυδρογονάσης NADH καθώς και για την 4L (ND1-6 και 4L) και τέλος για τις υπομονάδες 6 και 8 της ATP συνθάσης (A6 και A8) (Boore,1999). Το μιτοχονδριακό γονίδιο που κωδικοποιεί για την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) κατέχει κάποια επιπλέον χαρακτηριστικά τα οποία το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο ως μοριακό δείκτη για εξελικτικές μελέτες.

Πρώτον, το COI, ως ο τελικός καταλύτης της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, έχει μελετηθεί πολύ καλά σε βιοχημικό επίπεδο, και τόσο το μέγεθος του όσο και η δομή του φαίνεται να είναι συντηρημένα σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί. Μελέτες μεταλλαξιγένεσης έχουν χρησιμοποιηθεί για τη χαρτογράφηση των ενεργών κέντρων αυτής της υπομονάδας, και αυτές παρέχουν ένα υπόβαθρο το οποίο επιτρέπει την αποσαφήνιση των διαφορών στις αλληλουχίες όσον αφορά την γονιδιακή λειτουργία. Η κυτοχρωμική οξειδάση I εμπλέκεται τόσο στη μεταφορά ηλεκτρονίων όσο και στη μετατόπιση πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης και φαίνεται να περιέχει ένα μεγάλο εύρος από διαφορετικούς τύπους λειτουργικών

περιοχών οι οποίες περιλαμβάνουν περιοχές σύνδεσης προσδέτη, στοιχεία του καναλιού πρωτονίων, δομικές α- έλικες και διάσπαρτες υδροφιλικές θηλιές. Τα αμινοξικά κατάλοιπα στα ενεργά κέντρα, τα οποία είναι ιδιαίτερα συντηρημένα, δεν βρίσκονται ομοιόμορφα κατανεμημένα σε όλο το μόριο COI, αφήνοντας περιθώρια για κάποια διαφοροποίηση σε κάποιες περιοχές. Αυτός ο συνδυασμός των υψηλά συντηρημένων και πολυμορφικών περιοχών που σχετίζονται τόσο στενά σε ένα μιτοχονδριακό γονίδιο κάνει το γονίδιο COI τόσο χρήσιμο για εξελικτικές μελέτες. (Lunt et al,1996)

Δεύτερον, το γονίδιο του COI είναι το μεγαλύτερο από τα τρία γονίδια που κωδικοποιούν για υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης και είναι από τα μεγαλύτερα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα των μεταζώων. Αυτό επιτρέπει την ενίσχυση και αλληλούχηση πολλών περισσότερων χαρακτήρων (νουκλεοτιδίων), μέσα στο ίδιο λειτουργικό σύμπλοκο, απ' ότι στα περισσότερα από τα υπόλοιπα μιτοχονδριακά γονίδια. (Lunt et al,1996).

Επίσης , υπάρχουν διαθέσιμοι εκκινητές για την ενίσχυση τμημάτων που αντιπροσωπεύουν τα περισσότερα, αν όχι όλα, τα ζωικά φύλα. Επιπλέον, το COI φαίνεται να έχει μεγαλύτερο βαθμό φυλογενετικού σήματος σε σχέση με τα υπόλοιπα μιτοχονδριακά γονίδια (Hebert et al, 2003b). Όπως συμβαίνει και με άλλα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, τα νουκλεοτίδια της τρίτης θέσης του κωδικονίου εμφανίζουν μεγάλο βαθμό αλλαγών, οδηγώντας σε ένα εξελικτικό ρυθμό που είναι τρεις φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των 12S και 16S rDNA. 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. Ως αποτέλεσμα αυτού, εξετάζοντας την

αμινοξική αλληλουχία, μπορεί να είναι εφικτή η κατηγοριοποίηση ενός μη αναγνωρισμένου οργανισμού σε μια ανώτερη ταξινομική μονάδα (πχ φύλο ,τάξη), πριν εξεταστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία για την ένταξη του σε ένα συγκεκριμένο είδος (Hebert et al, 2003b).

Φυλογενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τις τελευταίες δεκαετίες έχουν χρησιμοποιήσει τμήματα του γονιδίου αυτού (Hebert et al,2003, Smith et al,2006 , Hajibabaei et al, 2006, Wang et al,2008, Desmyter et al,2008, Behere et al, 2007), αλλά και συνδυασμούς του με άλλα μιτοχονδριακά γονίδια (Sperling et al, 1994, Monaghan et al, 2005, Bruyndonckx et al, 2009, Giraldo et al,2008) αλλά και με πυρηνικά τμήματα (Carlini et al,2009).

ΣΚΟΠΟΣ

Τα είδη που μελετήθηκαν μοιράζονται πολλά κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά, και τόσο ο διαχωρισμός τους μέσω μορφολογικών κριτηρίων όσο και η συστηματική τους κατάταξης μέσω της σύγκρισης αυτής δεν είναι εφικτά, δημιουργώντας έτσι την ανάγκη για την ανάπτυξη μιας μεθόδου η οποία θα είναι ικανή να επιλύσει αυτά τα δυο προβλήματα. Η εργασία αυτή αποτελεί μια προσέγγιση κατά την οποία χρησιμοποιούνται μοριακοί δείκτες για το διαχωρισμό των ειδών και τη συστηματική τους κατάταξη. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση ενός τμήματος ~500bp του μιτοχονδριακού γονιδίου COI για τη διαλεύκανση των φυλογενετικών σχέσεων και το διαχωρισμό των ειδών. Η συστηματική κατάταξη των ειδών που μελετήθηκαν (πίνακας 1), καθώς και κάποιες πληροφορίες σχετικά με αυτά τα είδη παρουσιάζονται συνοπτικά.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ CYCLOCEPHALA

Πίνακας 1 : Συστηματική κατάταξη των ειδών που μελετήθηκαν

	<i>C.t.tridentata</i>	<i>C.t.dominicensis</i>	<i>C.m.rubiginosa</i>	<i>C.insulicola</i>	<i>C.maffafa</i>
Βασίλειο	Animalia	Animalia	Animalia	Animalia	Animalia
Φύλο	Arthropoda	Arthropoda	Arthropoda	Arthropoda	Arthropoda
Κλάση	Insecta	Insecta	Insecta	Insecta	Insecta
Τάξη	Coleoptera	Coleoptera	Coleoptera	Coleoptera	Coleoptera
Υπεροικογένεια	Scarabaeoidea	Scarabaeoidea	Scarabaeoidea	Scarabaeoidea	Scarabaeoidea
Οικογένεια	Dynastinae	Dynastinae	Dynastinae	Dynastinae	Dynastinae
Γένος	Cyclocephala	Cyclocephala	Cyclocephala	Cyclocephala	Cyclocephala
Είδος	C.tridentata	C.tridentata	C.melanocephala	C.tridentata	C.tridentata

Τα *Dynastinae* της Γουαδελούπης

Τα *Dynastinae* είναι μια μεγάλη υποοικογένεια των *Scarabaeidae*, με περισσότερα από 1300 είδη διασκορπισμένα σε θερμές και τροπικές περιοχές όλων των ηπείρων. Τα 121 γένη ομαδοποιούνται σε 8 φυλές, εκ των οποίων οι 6 αντιπροσωπεύονται στην Κεντρική και Νότια Αμερική και οι 5 στις Lesser Antilles. Τα *Dynastinae* της Καραϊβικής έχουν μελετηθεί κυτταρογενετικά για να γίνει κατανοητή η προέλευσή τους καθώς και οι σχέσεις μεταξύ τους. Έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις για την προέλευση της πανίδας της Καραϊβικής, αλλά δεν υπάρχουν καθόλου διαθέσιμα γενετικά δεδομένα. Ανάμεσα στα *Dynastinae* της Καραϊβικής, υπάρχουν είδη που εντοπίζονται τόσο στην Κεντρική όσο και στην Νότια Αμερική. Το γεγονός αυτό ενισχύει τη θεωρία ότι αυτά τα είδη προήλθαν από την ήπειρο αυτή και διασκορπίστηκαν πάνω από τον ωκεανό, η οποία διατυπώθηκε από τον Darlington το 1938. Από την άλλη πλευρά, ο υψηλός ρυθμός του ενδημισμού μπορεί να είναι ενδεικτικός από μια ενεργή διαδικασία ειδογένεσης ή υποειδογένεσης που συνέβη αργότερα (Dutrillaux et al, 2007).

Τα *Dynastinae* της Γουαδελούπης αποτελούνται από 13 είδη. Τρία από αυτά είναι ενδημικά : *Cyclocephala immaculata* (Olivier 1789), *C. insulicola* (Arrow 1937) και *Strategus sypfax* (Fabricius 1775). Ένα είδος, το *Epiphileurus laeviceps* (Arrow 1947) και ένα υποείδος, *D. h. hercules*, υπάρχουν τόσο στη Γουαδελούπη όσο και στην Δομινίκη. Τα υπόλοιπα είδη είναι πιο διαδεδομένα σε όλα τα νησιά της Καραϊβικής, αλλά και στην Κεντρική και Νότια Αμερική. Επιπρόσθετα με τα δυο ενδημικά είδη που αναφέρθηκαν, το γένος των *Cyclocephala* αντιπροσωπεύεται επίσης στη Γουαδελούπη από άλλα τρία υποείδη : *C. maffafa grandis* (Burmeister 1847), *C. tridentata tridentata* (Fabricius, 1801) και *C. melanocephala rubiginosa* (Burmeister 1847). Από μορφολογικές συγκρίσεις, τα *C. insulicola* και *C. t. tridentata*

θεωρούνται στενά συγγενικά είδη, και μάλιστα το πρώτο να αποτελεί μια πιθανή προγονική μορφή του δεύτερου (Chalumeau, 1983). Οι πληθυσμοί του *C. insulicola* περιορίζονται στο τροπικό δάσος του Basse-Terre, σε υψόμετρο μεγαλύτερο από 250 μέτρα ενώ τα *C. t. tridentata* απαντώνται σε υψόμετρο χαμηλότερο από τα 200 μέτρα, και διασκορπίζονται στα υπόλοιπα μέρη του νησιού, αλλά και σε άλλα νησιά, όπου υπάρχουν με τη μορφή άλλων υποειδών, όπως για παράδειγμα το *C. t. dominicensis* της Δομινίκης.

Υλικά και μέθοδοι

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Acetic Acid

Acrylamide

Agarose

Bis-Acrylamide

Ammonium persulfate

2-propanol

Bromophenol Blue

Boric acid

Xylene Cyanol

Chloroform

NaCl

SDS

dNTPs

EDTA

Ethidium bromide

EtOH

Proteinase K

Glycerol

HCl 37%

Formamide

NaOH

Formaldehyde

MgCl₂ × 6H₂O

NaBH₄

Phenol

Potassium Acetate

TEMED

Tris Base

AgNO₃

100bp Ladder

ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΕΣ DNA

Taq (Bioline)

Μέθοδοι

Δείγματα

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν **102** δείγματα του είδους *Cyclocephala tridentata*, τα οποία ανήκουν στα υποείδη *Cyclocephala tridentata tridentata* (85) και *Cyclocephala tridentata dominicensis* (17), **8** δείγματα του είδους *Cyclocephala rubiginosa*, **2** δείγματα του είδους *Cyclocephala mafaffa* και **1** άτομο *Cyclocephala insulicola*. Τα δείγματα των *C.t. tridentata*, *C. mafaffa*, *C. rubiginosa* και *C. insulicola* προέρχονται από το νησί της Γουαδελούπης και πιο συγκεκριμένα από τις περιοχές Duclos, Sofaia και Abymes. Τα δείγματα *C. t. dominicensis* προέρχονται από το νησί της Δομινίκης.

Απομόνωση του DNA

Για τη μελέτη των απλοτύπων του μιτοχονδριακού DNA, που χρησιμοποιήθηκαν για την φυλογενετική ανάλυση, είναι απαραίτητο σαν πρώτο βήμα να απομονωθεί από τα κύτταρα το γενετικό υλικό, το οποίο περιλαμβάνει το γενωμικό και το μιτοχονδριακό DNA. Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Budowle, (1990), με κατάλληλες τροποποιήσεις. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

CH₃COONa 0.5M (200ml)

- 8,20 gr CH₃COONa
- ddH₂O μέχρι τα 200 ml

Sodium Dodecyl Sulphate 5% (SDS)

- 5 gr SDS
- ddH₂O μέχρι τα 200 ml

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιούνται 50-100 mg ιστού και ακολουθήθηκαν οι εξής πειραματικές διαδικασίες :

1. Τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα erpendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 0,5ml CH_3COONa 0,5M, 20μl SDS 5% και 10 μl πρωτεΐνάση K 10mg/ml.
2. Επυλάζουμε τα δείγματα στους 55° C για μια ώρα.
3. Μετά την επύαση, προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24:1). Αναδεύουμε έντονα τα δείγματα.
4. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά
5. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf και προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη. Αναδεύουμε έντονα.
6. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
7. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf.
8. Προσθέτουμε 1ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη.
9. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
10. Μεταφέρουμε την επάνω υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf.
11. Προσθέτουμε 1ml παγωμένη ισοπροπανόλη, αναδεύουμε ήπια.
12. Τοποθετούμε τα δείγματα στους -20° C για 20 λεπτά.
13. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 20 λεπτά.
14. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσπαθώντας να διατηρήσουμε ανέπαφο το ίζημα που εμφανίζεται.
15. Προσθέτουμε 1ml αλκοόλη 70%, αναδεύουμε ήπια.
16. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10 λεπτά.
17. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα.
18. Τοποθετούμε τα δείγματα στους 37° C, ώστε να ξηρανθεί το ίζημα από τυχόν υπολείμματα διαλυμάτων.
19. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100μl ddH₂O και τοποθετούμε τα δείγματα είτε στο ψυγείο (4° C) είτε στην κατάψυξη (-20° C).

Μετά το βήμα 11, υπάρχει πιθανότητα να εμφανιστούν ινίδια DNA, τα οποία μπορούμε να τα συλλέξουμε με τη βοήθεια μιας λαβίδας και να συνεχίσουμε τη διαδικασία από το βήμα 15.

Το διάλυμα οξικού νατρίου χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων ρυθμίζοντας την ωσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ομογενοποίηση του ιστού. Το SDS είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό και συμβάλλει στη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης καθώς επίσης αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η proteinase K προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, καθώς επίσης και αυτή προστατεύει το DNA από τη δράση νουκλεασών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην επάνω υδάτινη φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλλει επίσης στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδάτινη φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη και η ακόλουθη πλύση του με αιθανόλη 70% βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανα δείγμα

Μετά το πέρας της απομόνωσης του DNA ελέγχεται ποιοτικά και ποσοτικά είτε με φωτομέτρηση είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1% w/v.

Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά από αραιώση 1μl διαλύματος DNA σε 49μl ddH₂O. Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA η οποία ενδείκνυται να είναι πάνω από

150ng/μl. Ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm είναι ένας δείκτης καθαρότητας του DNA που αναμένεται να έχει τιμή περίπου 2 σε κατάλληλα για χρήση δείγματα.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης θα περιγραφεί παρακάτω.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση του τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές (Simon et al,1994) :

Εκκινητής	Αλληλουχία
C1J 1718	5'-GGAGGATTTGGAGGTTGATTAGTTCC-3'
C1N 2191	5'-CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC -3'

Η σύσταση των διαλυμάτων των αντιδράσεων περιγράφεται στον πίνακα2.

Πίνακας 2 : Συστατικά αντίδρασης PCR

Εκμαγείο DNA	2μl
dNTPs (10mM each)	1 μl
MgCl ₂ (50mM)	2 μl
Buffer 10x	5 μl
Εκκινητής Fw 50pmol/μl	1 μl
Εκκινητής Rv 50pmol/μl	1 μl
Taq DNA Polymerase 5 U/μl	0,2 μl
ddH ₂ O	37,8 μl
Συνολικός όγκος	50 μl

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου COI είναι

Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 4 min

Αποδιάταξη: 95° C για 40 sec

Υβριδοποίηση: 52° C για 1min

Επιμήκυνση: 72° C για 1 min

} 35 κύκλοι

Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (ladder). Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή είναι τα εξής:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 121gr

Acetic Acid 28,5ml

EDTA 0,5M 50ml

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 1ml 1% w/v

TBE 20x 0,5ml

Glycerol 5ml

ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το διάλυμα stock 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την προετοιμασία της πηκτής διαλύουμε 0,6gr αγαρόζης σε 35ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 3ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr 10mg/ml). Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής υπό υπεριώδες φως. Η πηκτή τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου και πολυμερίζεται. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer σε αυτά. Σε 5μl PCR προϊόντος προστίθενται 3μl loading buffer.

Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης πραγματοποιείται για την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων PCR που χρησιμοποιούνται σε περαιτέρω πειράματα για την ανάλυση των πολυμορφισμών.

Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους στο πήκτωμα και έχει διακριτική ικανότητα ενός νουκλεοτιδίου. Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τη χρώση της πηκτής για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

Αποδιάταξη προϊόντων PCR

Για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε αποδιατακτικό διάλυμα (denaturation buffer), η σύσταση του οποίου είναι η εξής:

Denaturation buffer

95% formamide

0,05% Bromophenol blue

0,05% Xylene Cyanol

10mM NaOH

Σε 5-7μl προϊόντος PCR (ανάλογα με την συγκέντρωσή του) προστίθενται 10μl denaturation buffer και τα δείγματα επωάζονται για 7 min στους 99°C. Σκοπός της αποδιάταξης είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλιωνα. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλιωνα κατάσταση.

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα :

Διάλυμα ακουλαμίδης 38,5% (200ml)

Ακουλαμίδη 75gr

Bis-acrylamide 2gr

ddH₂O έως τα 200ml

TBE 10x (2lt)

Tris Base 121 gr

Boric acid 81,5gr

EDTA 0,5M 80ml

ddH₂O έως τα 2lt

Glycerol 50% v/v

APS 20% w/v

TEMED

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιείται πηκτή πολυακρυλαμίδης που έχει πυκνότητα 8%.

Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης 8% αναγράφονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3 : Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%

	8%
Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5%	10,6ml
Glycerol 50%	8ml
TBE 10x	5ml
TEMED	50μl
APS 20%	350μl
H ₂ O	Έως τα 50ml
Συνολικός όγκος	50ml

Μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, τα αποδιατεταγμένα δείγματα ηλεκτροφορούνται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με τάση 220 volts σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες περίπου.

Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΰδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο (Sambrook et al, 2000). Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα 1 (400ml)

EtOH 8ml

Acetic Acid 0,5ml

ddH₂O ως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml)

Διάλυμα AgNO₃ 1gr/lit

Διάλυμα 3 (200ml)

NaOH 3gr

NaBH₄ 0,01gr

Formaldehyde 1ml

ddH₂O έως τα 200ml

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτίζονται σε 200ml του διαλύματος 1 και αναδεύονται για 3 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί πλύση των πηκτών με απεσταγμένο νερό για 1min. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα AgNO₃ και οι πηκτές αναδεύονται για 20min. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1min η κάθε μια. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές.

Μετά την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα, συγκρίνονται τα πρότυπα των διαφορετικών ατόμων, ώστε να προσδιοριστούν ποια άτομα φέρουν κοινά πρότυπα και ποια διαφέρουν μεταξύ τους. Μετά την ομαδοποίηση των ατόμων, επιλέγονται 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κάθε ομάδας.

Αλληλούχηση διαφορετικών προτύπων SSCP

Για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου γονιδίων, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τις αλληλουχίες των γονιδίων των ατόμων των οποίων ερευνούμε τις φυλογενετικές σχέσεις. Γι' αυτό το λόγο, τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, καθαρίζονται με τη χρήση κατάλληλου kit ώστε να απαλλαχθούν από την παρουσία παραπροϊόντων, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε την επιθυμητή αλληλουχία και να ακολουθήσουμε με την περαιτέρω ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης

Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. Στο γράφημα, απεικονίζονται 4 καμπύλες με διαφορετικά χρώματα, το καθένα από τα οποία αντιστοιχεί και σε διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Έτσι, παρατηρώντας το χρώμα της κορυφής της καμπύλης σε κάθε διαφορετική θέση, μπορούμε να συμπεράνουμε ποιο νουκλεοτίδιο βρίσκεται στη θέση αυτή. Η αλληλούχηση γίνεται και για τις δυο αλυσίδες (με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μια) και στη συνέχεια οι δυο αλληλουχίες που προκύπτουν ομοπαράτιθενται με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής (ClustalX) για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή (Thompson et al, 1997). Μετά το τέλος και αυτής της διαδικασίας, έχουμε την πλήρη αλληλουχία του τμήματος που μας ενδιαφέρει.

Σύγκριση αλληλουχιών – Φυλογενετική ανάλυση

Οι αλληλουχίες που προκύπτουν αντιπροσωπεύουν τον καθένα από τους διαφορετικούς απλότυπους που προσδιορίσαμε με την ανάλυση SSCP. Για την εύρεση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των απλοτύπων και ειδικότερα των διαφορετικών ειδών της ανάλυσης, χρησιμοποιούμε το πρόγραμμα MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al, 2007). Με τη χρήση αυτού του προγράμματος, είναι δυνατή η πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών, η εύρεση των πολυμορφικών και συντηρημένων θέσεων ανάμεσα στους απλότυπους, η εύρεση της επί τοις εκατό σύστασης σε νουκλεοτίδια, καθώς και ο προσδιορισμός των αλλαγών στην αμινοξική αλληλουχία, με τη χρήση του κατάλληλου γενετικού κώδικα. Τέλος, το πρόγραμμα προσφέρει την δυνατότητα της κατασκευής φυλογενετικού δέντρου με το επιθυμητό μοντέλο (NJ,UPGMA,ML,MP), όπως και τον έλεγχο bootstrap για το κατασκευασμένο δέντρο, ο οποίος είναι ενδεικτικός για την αξιοπιστία των δέντρων που προκύπτουν.

Αποτελέσματα

Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA παρείχε υψηλής ποιότητας DNA, με τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 200ng/μl και τιμές A^{260}/A^{280} κοντά στο 2. Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% εμφάνισε 2 διακριτές ζώνες : η μια ζώνη βρίσκεται ψηλότερα και είναι το πυρηνικό DNA, το οποίο είναι μεγάλου μεγέθους και εμφανίζεται περίπου μέσα στο πηγάδι της πηκτής, και η δεύτερη ζώνη, εμφανίζεται χαμηλότερα και είναι το μιτοχονδριακό DNA (εικ 4).

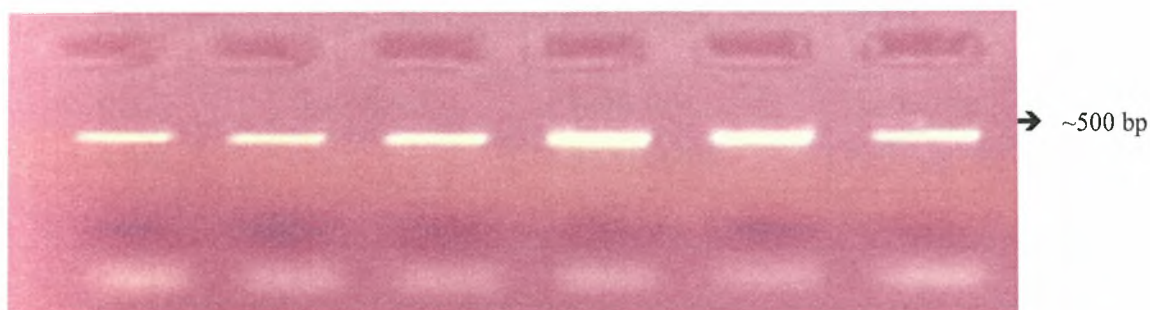


Πυρηνικό
mtDNA

Εικόνα 4: Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA

PCR

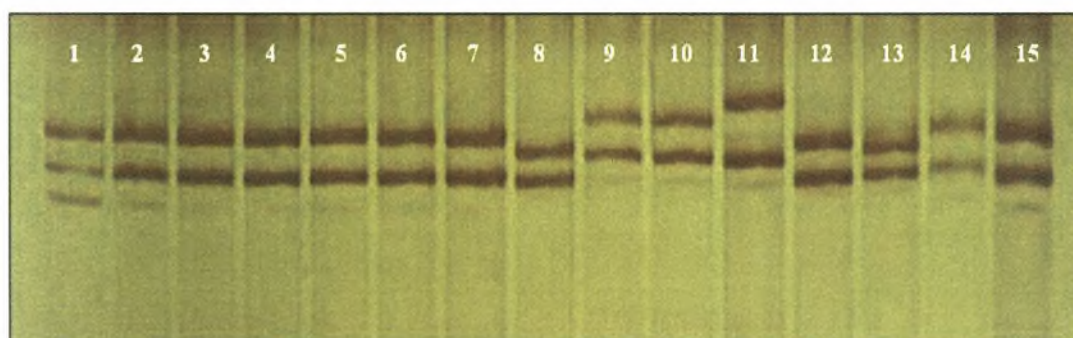
Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών, ενισχύθηκε ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου COI. Για την επαλήθευση της επιτυχίας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR παρουσία ενός μάρτυρα τμημάτων γνωστού μοριακού βάρους (ladder), για να υπολογιστεί το μήκος του τμήματος που ενισχύθηκε. Με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο, το τμήμα που ενισχύθηκε είχε μήκος περίπου 500 ζευγών βάσεων, και φαινόταν να έχει το ίδιο μέγεθος για όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση. (εικ 5)



Εικόνα 5: ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

SSCP

Τα προϊόντα PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης 8%, σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες. Η εμφάνιση των ζωνώσεων με χρώση με νιτρικό άργυρο αποκάλυψε 16 διαφορετικά πρότυπα. Ο πίνακας 3 περιέχει αναλυτικά τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το ηλεκτροφορητικό πρότυπο που εμφάνισαν (εικ6).



Εικόνα 6: Ενδεικτικά πρότυπα ανάλυσης SSCP. Οι διαδρομές 1,8,9,11,13,14 και 15 εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο ζωνώσεων και αντιστοιχούν σε διαφορετικό απλότυπο

Πίνακας 4: Πρότυπα ανάλησης SSCP των δειγμάτων

Κωδικός δείγματος	Πρότυπο	Κωδικός δείγματος	Πρότυπο
Ctt1	1	Ct17	5
Ctt2	1	Ct13	5
Ctt3	1	Ct15	5
Ctt4	1	Ct3	5
Ctt5	1	Ct6	5
Ctt6	2	Ct9	5
Ctt7	2	Ct18	6
Ctt8	1	Ct29	5
Ctt9	1	Ct1 Duclos	5
Ctt10	2	Ct2 Duclos	5
Ctt11	1	Ct3 Duclos	5
Ctt12	3	Ct4 Duclos	5
Ctt13	1	Ct5 Duclos	5
Ctt14	1	Ct7 Duclos	5
Ctt15	1	Ct10 Duclos	5
Ctt16	1	Ct12 Duclos	5
Ctt17	1	Ct14 Duclos	5
Ctt18	4	Ct19 Duclos	5
Ctt19	1	Ct21 Duclos	5
Ctt20	3	Ct23 Duclos	5
Ctt21	1	Ct25 Duclos	5
Ct8	5	Ct27 Duclos	5
Ct22	5	Ct28 Duclos	5
Κωδικός δείγματος	Πρότυπο	Κωδικός δείγματος	Πρότυπο
Ct29 Duclos	5	Ctt22 Duclos	16
Ct1 Sofaia	5	Ctt23 Duclos	16
Ct2 Sofaia	5	Ctt24 Duclos	16
Ct3 Sofaia	5	Ctt25 Duclos	16

Ct4 Sofaia	5	Ctt27 Duclos	16
Ct5 Sofaia	5	CR1	7
Ct6 Sofaia	5	CR2	8
Ct7 Sofaia	5	CR3	8
Ct8 Sofaia	5	CR4	9
Ct9 Sofaia	5	CR5	8
Ct10 Sofaia	5	CR6	7
Ct1 Abymes	1	CR7	9
Ctt1 Duclos	15	CR8	8
Ctt2 Duclos	16	CIns	10
Ctt3 Duclos	4	Cmaf1	11
Ctt4 Duclos	16	Cmaf2	11
Ctt5 Duclos	16	Ctd1	12
Ctt6 Duclos	16	Ctd2	12
Ctt7 Duclos	16	Ctd3	12
Ctt8 Duclos	16	Ctd4	12
Ctt9 Duclos	16	Ctd5	13
Ctt10 Duclos	16	Ctd6	13
Ctt11 Duclos	16	Ctd7	13
Ctt12 Duclos	16	Ctd8	13
Ctt13 Duclos	16	Ctd9	14
Ctt14 Duclos	16	Ctd10	13
Ctt15 Duclos	16	Ctd11	14
Ctt16 Duclos	16	Ctd12	13
Ctt17 Duclos	16	Ctd13	13
Ctt18 Duclos	5	Ctd14	13
Ctt19 Duclos	16	Ctd15	14
Ctt20 Duclos	5	Ctd16	13
Ctt21 Duclos	16	Ctd17	14

Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο για να σταλούν για αλληλούχηση, αφού πρώτα καθαρίστηκαν με τη βοήθεια κατάλληλου kit της Qiagen. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία MacroGen στην Κορέα.

Αλληλούχηση

Για να υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία για τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, χρησιμοποιήθηκαν και οι δυο εκκινητές για την αντίδραση του sequencing. Τα δυο χρωματογραφήματα που λήφθησαν για κάθε δείγμα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το πρόγραμμα ClustalX και τελικά προέκυψε η τελική αλληλουχία του κάθε δείγματος. Το συνολικό μέγεθος του τμήματος που ενισχύθηκε, όπως προκύπτει από την αλληλούχηση όλων των δειγμάτων, ήταν 525 bp. Αυτό το μέγεθος ήταν κοινό για όλα τα δείγματα, πράγμα που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχουν προσθήκες ή ελλείψεις (indels) στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των ατόμων αυτών. Οι αλληλουχίες που προκύπτουν αντιστοιχούν στους 16 διαφορετικούς απλότυπους και έχουν την ακόλουθη αντιστοιχία :

Πρότυπο	Απλότυπος
1	triden1
2	triden2
3	triden3
4	triden4
5	triden5
6	triden6
7	rubin1
8	rubin2
9	rubin3
10	insul1

11	mafaf1
12	domin1
13	domin2
14	domin3
15	triden7
16	triden8

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν είναι :

triden1	GGAGGATTTT	GAAATGATT	AGTTCCCCTA	ATACTTGGGG	CTCCTGATAT	AGCTTTCCCA	60
triden2	60
triden3GCC	60
triden4GCC	60
triden5G	60
triden6G	60
triden7GCC	60
triden8GT	60
rubig1GCCC	60
rubig2GCCC	60
rubig3GCCC	60
insullGCC	60
mafaf1GAC	60
domin1A	60
domin2GA	60
domin3GA	60
triden1	CGAATAAATA	ACATAAGATT	TTGACTTCTC	CCTCCCTCTT	TAACCTTACT	TTTATCTAGA	120
triden2	120
triden3TTCTC	120
triden4TTCTC	120
triden5	120
triden6	120
triden7TTCTC	120
triden8	120
rubig1TCTACACT	120
rubig2TCTACACT	120
rubig3TCTACACT	120
insullTTCT	120
mafaf1TTCCC	120
domin1GA	120
domin2GA	120
domin3GA	120
triden1	AGAATAGTAG	AAAATGGTGC	TGGGACAGGC	TGGACTGTTT	ACCCCCATT	ATCTTCTAAT	180
triden2	180
triden3CCATAT	180
triden4CCATAT	180
triden5	180
triden6	180
triden7CCATAT	180
triden8	180
rubig1TGCAGGA	180
rubig2TACAGGA	180
rubig3TGCAGGA	180
insullCCATAT	180
mafaf1TGAATAAA	180
domin1GAT	180
domin2AT	180
domin3GAT	180

triden1	ATTGCCATA	GAGGAGCCTC	AGTTGACTTA	GCTATTTTTA	GGCTACATCT	AGCTGGTATT	240	
triden2CT	G.....T	T..T..C	...A..A	240	
triden3CT	G.....T	T..T..C	...A..A	240	
triden4CT	G.....T	T..T..C	...A..A	240	
triden5CT	G.....T	T..T..C	...A..A	240	
triden6CT	G.....T	T..T..C	...A..A	240	
triden7CT	G.....T	T..T..C	...A..A	240	
triden8CT	G.....T	T..T..C	...A..A	240	
rubig1T	T..T..T	T.....T	..A.....	T..T..T	...C..A	240	
rubig2T	T..T..T	T.....T	..A.....	T..T..T	...C..A	240	
rubig3T	T..T..T	T.....T	..A.....	T..T..T	...C..A	240	
insu11CT	G.....T	T..T..C	...A..A	240	
mafaf1T	T..A..T	C..C..T	...A..A	240	
domin1TG	A..T.....	240	
domin2TG	A..T.....	240	
domin3TG	A..T.....	240	
triden1	TCCTCTATTT	TAGGAGCAGT	AAATTTTATT	ACCACAGTTA	TTAATATACG	ATCAACAGGA	300	
triden2CTT.....G.....	300	
triden3CTT.....G.....	300	
triden4CTT.....G.....	300	
triden5CTT.....G.....	300	
triden6CTT.....G.....	300	
triden7CTT.....G.....	300	
triden8CTT.....G.....	300	
rubig1	..T.....C	T..T..T	T.....T	..T.....AG	300	
rubig2	..T.....C	T..G..T	T.....T	..T.....A	300	
rubig3	..T.....C	T..T..T	T.....T	..T.....A	300	
insu11CTT.....	300	
mafaf1	..T.....A..TG	...TC..G	300	
domin1C..C	300	
domin2C..C	300	
domin3C..C	300	
triden1	ATAACATTTG	ATCGAATACC	TCTTTTTGTA	TGATCAGTCA	TACTAACTAC	CATTCTTCTT	360	
triden2G	360	
triden3TT	..T...GG	T.....	360	
triden4TT	..T...GG	T.....	360	
triden5G	360	
triden6G	360	
triden7TT	..T...GG	T.....	360	
triden8G	360	
rubig1TA.....T..TGG	T...T..A	360	
rubig2TA.....T..TGG	T...T..A	360	
rubig3TA.....T..TGG	T...T..A	360	
insu11TT	..T...GG	T.....	360	
mafaf1	..T.....TTTG	..T..T..G	T...T..AT..A	360	
domin1TTG	T.....	360	
domin2TTG	T.....	360	
domin3TTG	T.....	360	
triden1	TTACTATCTC	TACCTGTATT	AGCAGGAGCT	ATTACTATAT	TATTAAGTGA	TCGTAATATT	420	
triden2GTC	420	
triden3GTCGC	420	
triden4GTCGC	420	
triden5GTCGC	420	
triden6GTCGC	420	
triden7GTCGC	420	
triden8GTCGC	420	
rubig1T	..C..CTACA	..A..C	420
rubig2T	..C..CTACA	..A..C	420
rubig3T	..C..CTACA	..A..C	420
insu11GTCC	420
mafaf1	C..TT...A	..C..A..C	T..C..GCTA	420
domin1	420
domin2	420
domin3	420

triden1	AACACAACAT	TTTTTGATCC	TGCCGGAGGT	GGTGATCCTA	TCCTCTATCA	ACATCTATTT	480
triden2	480
triden3	..T.....C..	...T...C	...C...C	.T.A.C.	480
triden4	..T.....C..	...T.G.C	...C...C	.T.A.C.	480
triden5	480
triden6C...C	480
triden7	..T.....C..	...T...C	...C...C	.T.A.C.	480
triden8	480
rubig1	..T..T...	A..A..C..	..G...A.	.TT.A.C.	...CT....	480
rubig2	..T..T...	A..A..C..	..G...A.	.TT.A.C.	...CT....	480
rubig3	..T..T...	A..A..C..	..G...A.	.TT.A.C.	...CT....	480
insull	..T.....C..	...T...C	...C...C	.T.A.C.	480
mafaf1	..T..T...G...C	..G...A.	.T.A.C.	...C....	480
domin1T...C	..C...A.	480
domin2T...C	..C...A.	480
domin3T...C	..C...A.	480

triden1	TGATTTTTTG	GACATCCTGA	AGTTTATATT	TTAATTTTAC	CGGGA	525
triden2	525
triden3C...C	525
triden4C...C	525
triden5	525
triden6	525
triden7C...C	525
triden8	525
rubig1C..C..	525
rubig2C..C..	525
rubig3C..C..	525
insullC...C	525
mafaf1T...C..	525
domin1C...C	525
domin2C...C	525
domin3C...C	525

Νουκλεοτιδική ανάλυση

Με τη χρήση του προγράμματος MEGA, ήταν δυνατός ο υπολογισμός του ποσοστού εμφάνισης των τεσσάρων νουκλεοτιδίων στις αλληλουχίες. Το ποσοστό A+T ήταν 64% και το G+C ήταν 36% κατά μέσο όρο. Στην τρίτη θέση του κωδικονίου εμφανίζονται πολύ χαμηλά ποσοστά C και G (11,7 και 3,6%) αντίστοιχα, ενώ στις υπόλοιπες δυο θέσεις δεν εμφανίζονται τόσο μεγάλες διαφορές στη νουκλεοτιδική σύσταση.

Επίσης, προσδιορίστηκαν οι πολυμορφικές θέσεις ανάμεσα στις αλληλουχίες. Συνολικά, βρέθηκαν 132 πολυμορφικές θέσεις, εκ των οποίων οι 103 ήταν πληροφοριακές για τη φειδωλότητα (εμφανίζονται δηλαδή σε περισσότερους από έναν απλότυπους). Οι υπόλοιπες 29 εμφανίζονται μόνο σε ένα από τους 16 απλότυπους.

Μια ακόμη παράμετρος που υπολογίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος, ήταν η γενετική απόσταση μεταξύ των απλοτύπων,

δηλαδή η επί τοις εκατό διαφοροποίηση που εμφανίζουν μεταξύ τους (εικ 7). Η μέγιστη διαειδική διαφοροποίηση είναι 19,8% (μεταξύ των απλότυπων 14 και 6) και η μέγιστη ενδοειδική διαφοροποίηση είναι 8,9% (απλότυποι 1-3, 3-6, 1-4 και 4-6). Οι μέσες τιμές των αποστάσεων ενδοειδικά είναι 0,03% για τα *C. t. dominicensis*, 0,04% για τα *C. rubiginosa* και 5,7% για τα *C. t. tridentata*. Για τα υπόλοιπα δυο είδη, προσδιορίστηκε μόνο ένας απλότυπος οπότε δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός των ενδοειδικών γενετικών αποστάσεων.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1. domin1																	
2. domin2	0.003																
3. domin3	0.003	0.000															
4. insul1	0.018	0.015	0.015														
5. malaf1	0.043	0.039	0.039	0.043													
6. rubig1	0.042	0.039	0.039	0.036	0.056												
7. rubig2	0.042	0.039	0.039	0.036	0.056	0.000											
8. rubig3	0.042	0.039	0.039	0.036	0.056	0.000	0.000										
9. triden1	0.003	0.006	0.006	0.021	0.046	0.046	0.046	0.046									
10. triden2	0.000	0.003	0.003	0.018	0.043	0.042	0.042	0.042	0.003								
11. triden3	0.018	0.015	0.015	0.000	0.043	0.036	0.036	0.036	0.021	0.018							
12. triden4	0.018	0.015	0.015	0.000	0.043	0.036	0.036	0.036	0.021	0.018	0.000						
13. triden5	0.003	0.000	0.000	0.015	0.039	0.039	0.039	0.039	0.006	0.003	0.015	0.015					
14. triden6	0.009	0.006	0.006	0.020	0.046	0.045	0.045	0.045	0.012	0.009	0.020	0.020	0.006				
15. triden7	0.018	0.015	0.015	0.000	0.043	0.036	0.036	0.036	0.021	0.018	0.000	0.000	0.015	0.020			
16. triden8	0.003	0.000	0.000	0.015	0.039	0.039	0.039	0.039	0.006	0.003	0.015	0.015	0.000	0.006	0.015		

Εικόνα 7 : Γενετικές αποστάσεις των 16 απλότυπων

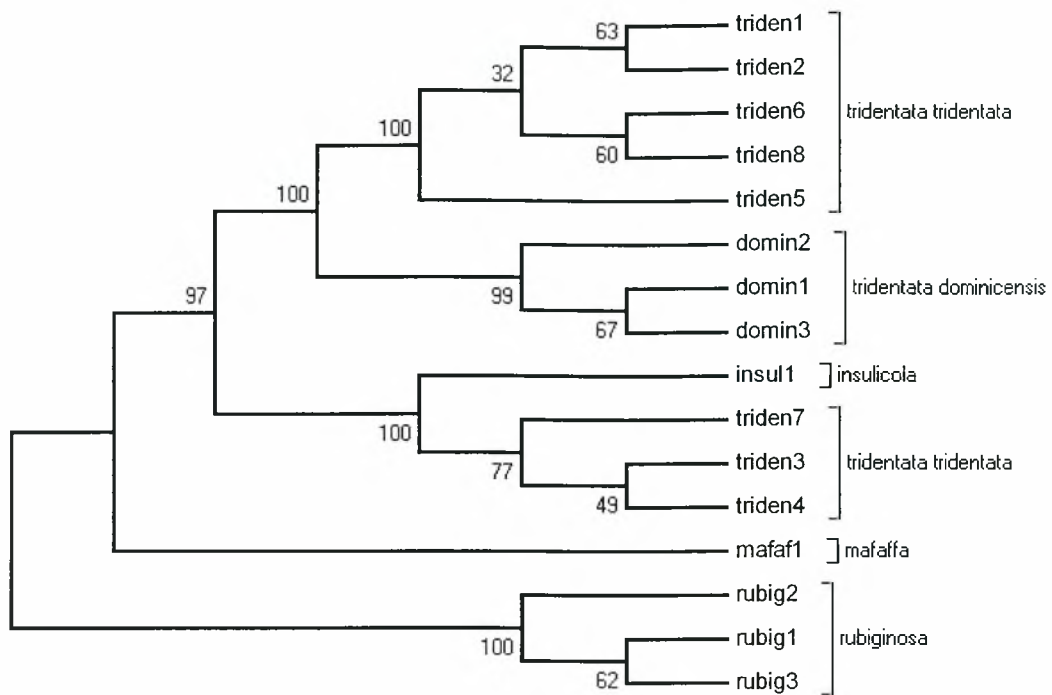
Αμινοξική ανάλυση

Η μετάφραση των αλληλουχιών με τη χρήση του κατάλληλου γενετικού κώδικα (μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας των ασπόνδυλων) δεν αποκάλυψε κωδικόνιο λήξης σε κάποια αλληλουχία, οπότε πράγματι η αλληλουχία μας είναι η λειτουργική μιτοχονδριακή και δεν ενισχύθηκε κάποιο πυρηνικό ψευδογονίδιο. Επίσης, εντοπίστηκαν οι πολυμορφικές θέσεις των αμινοξικών αλληλουχιών, οι οποίες ήταν 9, εκ των οποίων μόνο οι 2 εμφανίζονται σε

περισσότερους από έναν απλότυπους (4^ο και 59^ο αμινοξύ). Στην τέταρτη θέση, δεκατρείς αλληλουχίες εμφανίζουν το αμινοξύ γλυκίνη και οι υπόλοιποι τρεις το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Αυτή είναι μια ιδιαίτερα σημαντική αλλαγή, καθώς η γλυκίνη είναι ένα από τα μικρότερα αμινοξέα και η τρυπτοφάνη είναι το μεγαλύτερο αμινοξύ, οπότε ίσως παίζει κάποιο ρόλο στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Αντίθετα, και τα δυο αμινοξέα είναι μη πολικά και δεν έχουν φορτίο, οπότε δεν επηρεάζουν το ολικό φορτίο της πρωτεΐνης. Στη θέση 59, οι 13 αλληλουχίες εμφανίζουν το αμινοξύ σερίνη και οι υπόλοιποι τρεις αλανίνη. Το μέγεθος των δυο αυτών δε διαφέρει σημαντικά, και η μόνη τους διαφορά είναι η παρουσία ενός υδροξυλίου στην πλευρική ομάδα της σερίνης, γεγονός το οποίο αλλάζει την πολικότητα. Συγκρίνοντας τα επίπεδα της ποικιλομορφίας των νουκλεοτιδικών και των αμινοξικών αλληλουχιών (132 πολυμορφικές θέσεις έναντι 9), μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι συνώνυμες, δηλαδή τα κωδικόνια που προκύπτουν από τις καινούργιες τριπλέτες κωδικοποιούν για το ίδιο αμινοξύ.

Φυλογενετική ανάλυση

Για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων των απλοτύπων, και ειδικότερα των ειδών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, ήταν απαραίτητη η κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου αλληλουχιών, το οποίο θα απεικόνιζε αυτές τις σχέσεις. Για την κατασκευή του δέντρου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Neighbor-Joining σε συνδυασμό με τη δοκιμασία bootstrap (1000 επαναλήψεις). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε έναντι των υπόλοιπων μεθόδων (Maximum Parsimony, Minimum Evolution και UPGMA) γιατί εμφάνισε τις καλύτερες τιμές bootstrap σε σχέση με τα δέντρα που κατασκευάστηκαν με τις υπόλοιπες μεθόδους, άρα τα αποτελέσματα είχαν μεγαλύτερη αξιοπιστία (εικ 8).



Εικόνα 8: Φυλογενετικό δέντρο NJ. Δίπλα στους κλάδους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap

Γενικά, τα είδη φαίνονται να διαχωρίζονται με βάση το φυλογενετικό δέντρο. Εμφανίζονται 5 ευδιάκριτες ομάδες απλότυπων, τα οποία περιλαμβάνουν απλότυπους του ίδιου είδους, εκτός από μια ομάδα που περιλαμβάνει τον απλότυπο του *C. insulicola* και τρεις απλότυπους των *C. t. tridentata*. Επίσης, παρατηρείται ότι δεν υπάρχει μονοφυλία ανάμεσα σε αυτά τα είδη, καθώς τα *C. m. rubiginosa* διαχωρίζονται από τον κλάδο των υπολοίπων τεσσάρων ειδών. Τα *C. t. tridentata* και *C. t. dominicensis* εμφανίζονται πιο κοντά σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη, καθώς πρόκειται για υποείδη του ίδιου είδους. Επίσης, τα δύο αυτά υποείδη φαίνεται να έχουν στενότερη συγγένεια με το *C. insulicola* απ' ό,τι με τα υπόλοιπα 2 είδη, γεγονός το οποίο είναι αναμενόμενο, καθώς το *C. insulicola* θεωρείται μια προγονική μορφή των δύο αυτών ειδών.

Συζήτηση

Ο συνδυασμός των αλληλουχιών του DNA από μικροδορυφορικές επαναλήψεις με αλληλουχίες του μιτοχονδριακού γονιδίου και με μορφολογικά χαρακτηριστικά φαίνεται να είναι χρήσιμοι δείκτες για την εύρεση των φυλογενετικών σχέσεων των διάφορων ειδών. Ο συνδυασμός τους, όμως, δεν είναι πάντοτε δυνατός εφόσον δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για όλες τις κατηγορίες. (Arenal et al, 2004). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των φυλογενετικών σχέσεων αναπαριστώνται με τη μορφή ενός φυλογενετικού δέντρου. Ένα αξιόπιστο φυλογενετικό δέντρο έχει μεγάλη σημασία ως σημείο έναρξης για πολλά είδη σε εξελικτικές μελέτες. Παρόλα αυτά, ο προσδιορισμός των ακριβών φυλογενετικών σχέσεων μπορεί καμιά φορά να είναι δύσκολος. Ιστορικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιούνταν σε συνδυασμό με τις αρχές της κλαδιστικής για να εξακριβωθούν οι φυλογενετικές σχέσεις. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά απαιτούν ειδικούς που μπορούν να εντοπίσουν μικροδιαφορές που εμφανίζουν μεταξύ τους τα είδη, και αυτή η εξειδίκευση απαιτεί χρόνια εξάσκησης. Οι πληροφορίες που λαμβάνουμε από αλληλουχίες νουκλεϊκών 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. Από τον καιρό που ήταν διαθέσιμες οι αλληλουχίες του DNA, υπήρχε ένα μεγάλο δίλημμα για το είδος των δεδομένων, μορφολογικών ή μοριακών, που παρέχουν το πιο ακριβές αποτέλεσμα, όταν οι απεικονίσεις των φυλογενετικών σχέσεων που προέκυπταν από διαφορετικά δεδομένα ήταν αντικρουόμενες. Τα

μοριακά δεδομένα θεωρούνται χωρίς αμφιβολία ως πιο αξιόπιστα από τα μορφολογικά (δηλαδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή ενός πιο αξιόπιστου δέντρου). Είναι ξεκάθαρο ότι η αντίληψη των μορφολογικών δεδομένων ως κατώτερων από τα μοριακά εκτείνεται στην εκτίμηση της αξίας της ποιότητας της συγκεκριμένης μορφολογικής ανάλυσης που στηρίζεται στο πόσο καλά τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης συμφωνούν με τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης. Ο καλύτερος εκτιμητής για την φυλογένεια ενός είδους μπορεί να μη βασίζεται αποκλειστικά σε μια ομάδα χαρακτηριστικών (μορφολογικών ή μοριακών) αλλά σε ένα συνδυασμό διαφορετικών χαρακτήρων που μπορεί να αποδειχτεί καλύτερος εκτιμητής των δέντρων που περιλαμβάνουν είδη (Arealo et al, 2004).

Τα πυρηνικά γονίδια αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη αναξιοποίητη πηγή για μοριακή συστηματική. Πάντως, λίγα πυρηνικά γονίδια, εκτός από τα γονίδια του rDNA, έχουν χρησιμοποιηθεί σε φυλογενετικές αναλύσεις. Οι πρώτες μοριακές μελέτες στα Hymenoptera εστίασαν κυρίως στο 16S μιτοχονδριακό rDNA. Πιο πρόσφατα, το πυρηνικό γονίδιο 28S χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για ανάλυση σχέσεων μέσα σε υπεροικογένειες, αλλά με μικρότερη επιτυχία για ανώτερα ταξινομικά επίπεδα. Οι μικροδορυφορικοί τόποι είναι άφθονοι, είναι μοναδιαίοι και γενικά είναι ομοιόμορφα κατανεμημένοι σε όλο το γονιδίωμα. Λίγες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει μικροδορυφορικούς τόπους για την κατασκευή φυλογεντικών δέντρων παρότι έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε μελέτες πληθυσμιακής γενετικής. Παρότι οι αλληλουχίες είναι μικρού μήκους και οι επαναλαμβανόμενες περιοχές είναι ιδιαίτερα μεταβλητές, οι πληροφορίες της αλληλουχίας από διάφορους μικροδορυφόρους μπορούν να συνδυαστούν για αξιόπιστα, πληροφοριακά και ευκόλως στοιχισμένους χαρακτήρες και να βοηθήσουν στην διαλεύκανση προβλημάτων που αφορούν φυλογενετικές σχέσεις. Η μελέτη των αλληλουχιών του μιτοχονδριακού DNA έχει γίνει μια μέθοδος που επιλέγεται συχνά για την μελέτη ταξινομικών, πληθυσμιακών και εξελικτικών ερευνών στα ζώα. Πολλές ιδιότητες της δομής και της

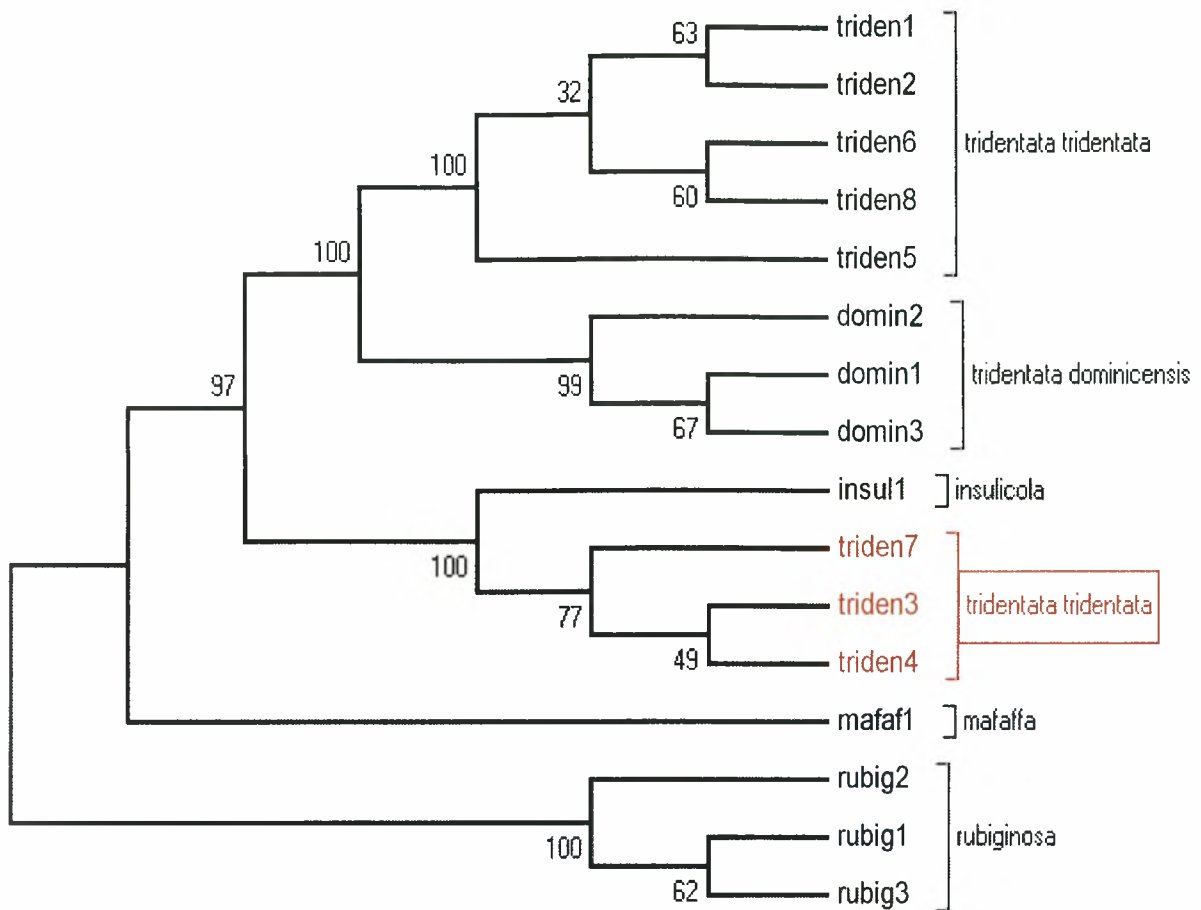
εξέλιξης του mtDNA το έχουν κάνει πολύτιμο εξελικτικό εργαλείο (Arevalo et al,2004) .

Από την πληθώρα των επιλογών που παρέχονται, αντιλαμβανόμαστε τις διαφορετικές κατευθύνσεις τις οποίες μπορεί να ακολουθήσει μια φυλογενετική μελέτη. Η επιλογή όμως του κατάλληλου δείκτη για κάθε μελέτη είναι ζωτικής σημασίας. Τα κρίσιμα χαρακτηριστικά στην επιλογή του δείκτη είναι ο ρυθμός υποκατάστασης της συγκεκριμένης περιοχής. Σε ένα μεγάλο βαθμό, το ευρύ φάσμα των ρυθμών υποκατάστασης είναι υπεύθυνο για την προτίμηση του μιτοχονδριακού DNA ως μοριακού εργαλείου, αφού επιτρέπει την ανάλυση των διαειδικών φυλογενειών και την συστηματική των ανώτερων επιπέδων των taxa που διαχωρίστηκαν κατά το παρελθόν. Είναι γνωστό ότι διαφορετικά γονίδια μπορεί να εξελιχθούν με διαφορετικούς ρυθμούς, και το ίδιο γονίδιο μπορεί να έχει διαφορετικούς ρυθμούς εξέλιξης σε διαφορετικές γενεαλογίες. Πάντως, η ενδογονιδιακή ετερογένεια στον εξελικτικό ρυθμό δεν έχει γίνει αντικείμενο μελέτης στο πεδίο των φυλογενετικών ερευνών των κατώτερων επιπέδων ταξινόμησης. Μπορεί να είναι παραπλανητικό για πολλές εφαρμογές να θεωρούν ένα γονίδιο ταχέως ή βραδέως εξελισσόμενο, επειδή αυτό προϋποθέτει μια ομοιογένεια στο ρυθμό εξέλιξης σε όλο το γονίδιο, το οποίο σπάνια συμβαίνει λόγω της συγκέντρωσης λειτουργικών περιοχών σε συγκεκριμένες περιοχές. Γι' αυτό το λόγο παρουσιάζεται μεγάλο πλεονέκτημα στο να υπάρχουν πληροφορίες που αφορούν το ρυθμό αλλαγών σε διαφορετικές περιοχές του γονιδίου, καθώς αυτό θα επιτρέψει μια πολύ πιο ενημερωμένη επιλογή αλληλουχίας για συγκεκριμένες φυλογενετικές μελέτες. Οι αλληλουχίες που εξελίσσονται πολύ γρήγορα φαίνεται να μην έχουν τη δυνατότητα να αποκαλύψουν την φυλογένεια των taxa που διαχωρίστηκαν κατά το παρελθόν. Παρομοίως, η επιλογή μιας αλληλουχίας που είναι ιδιαίτερα συντηρημένη για την επίλυση τέτοιων προβλημάτων διαειδικής φυλογεωγραφίας, δε θα παρείχε τις απαραίτητες πληροφορίες για τη διαλεύκανση των επιθυμητών σχέσεων. Έτσι, σε πολλές μελέτες η επιτυχία εξαρτάται σε

ένα μεγάλο βαθμό από την επιλογή μιας περιοχής που θα περιέχει το κατάλληλο επίπεδο ποικιλομορφίας (Lunt et al, 1996).

Γι αυτό το λόγο, στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε το τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου COI, που κατέχει όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά που έχουν αναφερθεί στην εισαγωγή και έχει εφαρμοστεί με αρκετά μεγάλη επιτυχία σε παρόμοιες μελέτες φυλογένεσης εντόμων. Οι Mohanty et al (2009), χρησιμοποίησαν το γονίδιο COI σε συνδυασμό με το COII και το ITS2 για να διαλευκάνουν τις φυλογενετικές σχέσεις των ειδών *Anopheles*. Οι Hundsdoerfer et al (2009) χρησιμοποίησαν επίσης το COI σε συνδυασμό με το COII για να αναλύσουν την φυλογένεια των εντόμων του γένους *Hyles*. Οι Wells et al. (2007) χρησιμοποίησαν ένα τμήμα του γονιδίου COI για την φυλογενετική ανάλυση ειδών που ανήκουν στο γένος *Lucilia*. Επίσης, οι Giraldo et al (2008) χρησιμοποίησαν τις αλληλουχίες τμημάτων των γονιδίων COI και COII για να αποκαλύψουν τις φυλογενετικές σχέσεις των πεταλούδων της οικογένειας *Heliconius*. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, τα αποτελέσματα της μοριακής φυλογένεσης συμφωνούν με την μορφολογική φυλογένεση. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις, όπως αυτή των Giraldo et al., που τα αποτελέσματα διαφέρουν και μάλιστα ανακαλύπτονται και «κρυφά» είδη μέσω της μοριακής φυλογένειας, τα οποία δεν είναι δυνατό να διακριθούν μορφολογικά.

Στην παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών επιβεβαίωσαν το διαχωρισμό των ειδών με βάση τα μορφολογικά κριτήρια (Dutrillaux et al, αδημοσίευτα), αλλά παράλληλα εμφανίστηκε και μια ασυμφωνία, όσον αφορά την κατάταξη κάποιων δειγμάτων που ανήκουν στα *C.t.tridentata*. Τα δείγματα Ctt12 και Ctt20 (απλότυπος triden3), Ctt18 (απλότυπος triden4) και Ctt1 Duclos (απλότυπος 15) ομαδοποιούνται στο φυλογενετικό δέντρο με το *C. insulicola* και όχι μαζί με τους υπόλοιπους απλότυπους του είδους *C. t. Tridentate* (εικ 9)



Εικόνα 9: Φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με τη χρήση των αλληλουχιών COI. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι απλότυποι που ανήκουν σε άτομα τα οποία είχαν αναγνωρισθεί ως *C. t. tridentata*

Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί με δυο εναλλακτικές θεωρίες:

Η πρώτη έχει να κάνει με την συγγενική σχέση των δυο ειδών και έχει περιγραφεί στην εισαγωγή, η οποία όμως δεν συγκεντρώνει πολλές πιθανότητες, καθώς οι υπόλοιποι απλότυποι του είδους *C. . tridentata* διαχωρίζονται εμφανώς από το *C. insulicola* στο φυλογενετικό δέντρο. Επίσης, οι γενετικές αποστάσεις των υπόλοιπων απλοτύπων με τον απλότυπο του *C. insulicola* είναι αρκετά μεγαλύτερες σε σχέση με τις αποστάσεις των τεσσάρων ατόμων αυτών πάλι σε σχέση με τον απλότυπο του *C. insulicola*. Πιο συγκεκριμένα, οι απλότυποι triden1, 2, 5, 6

και 8 εμφανίζουν μια διαφοροποίηση της τάξης του 10% κατά μέσο όρο με το *C. insulicola*, δηλαδή στα 500 περίπου νουκλεοτίδια που μελετήθηκαν εμφάνισαν κατά μέσο όρο 50 διαφορετικά νουκλεοτίδια έκαστο. Αντίθετα, οι τρεις απλότυποι triden3, 4 και 7 εμφανίζουν διαφοροποίηση της τάξης του 0,3% κατά μέσο όρο, δηλαδή περίπου 2 νουκλεοτίδια διαφορά με το *C. insulicola*.

Η δεύτερη πιθανή εξήγηση έχει να κάνει με την εμφάνιση υβριδισμού μεταξύ των δυο ειδών. Η μικρή συχνότητα των ατόμων αυτών στους πληθυσμούς ίσως είναι ενδεικτική για την ύπαρξη υβριδισμού. Επίσης, κυτταρογενετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από τους Dutrillaux et al (αδημοσίευτα αποτελέσματα) αποκάλυψαν ένα αξιοσημείωτο αποτέλεσμα. Τα άτομα αυτά εμφάνισαν καρύοτυπους ενδιάμεσους των δυο ειδών. Έτσι, ενώ το *C. insulicola* έχει τον προγονικό καρύοτυπο που αποτελείται κυρίως από υπομετακεντρικά χρωμοσώματα, ενώ τα *C. t. tridentata* εμφανίζουν καρύοτυπο με τα ακροκεντρικά χρωμοσώματα να είναι τα συχνότερα, τα τρία αυτά άτομα εμφάνισαν ένα πρότυπο ενδιάμεσο, που αποτελούνταν τόσο από υπομετακεντρικά όσο και από ακροκεντρικά χρωμοσώματα, παρατηρήθηκε δηλαδή μια χρωμοσωμική ετεροζυγωτία.

Η ετεροζυγωτία αυτή, είναι ισχυρή ένδειξη της ύπαρξης υβριδισμού ανάμεσα στα δύο είδη, και μάλιστα η κατεύθυνση της ετεροζυγωτίας μπορεί να αποκαλυφθεί με τη χρήση του μιτοχονδριακού DNA ως μάρτυρα. Επειδή το μιτοχονδριακό DNA έχει συνήθως μητρική κληρονομία, τα άτομα αυτά θα φέρουν το μιτοχονδριακό DNA των θηλυκών εντόμων της προηγούμενης γενιάς, οπότε αφού εμφανίζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με το *C. insulicola*, υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα τα θηλυκά άτομα που υβριδίζονται να ανήκουν σε αυτό το είδος και τα αρσενικά στο είδος *C. t. tridentata*.

Βέβαια, η προτίμηση διαφορετικών ενδιαιτημάτων ανάμεσα στα δύο είδη, και πιο συγκεκριμένα η υψομετρική προτίμηση (πάνω από 250 μέτρα για το ένα είδος, κάτω από τα 200 μέτρα για το άλλο) ίσως εγείρει κάποια ερωτήματα σχετικά με την εμφάνιση ζωνών υβριδισμού των δυο ειδών. Όμως, το γεγονός ότι πρόκειται για φτερωτά έντομα με ικανότητα

πτήσης και συνεπώς μεγαλύτερη ικανότητα διασποράς και μετακίνησης δίνει μια ικανοποιητική απάντηση στο ερώτημα αυτό. Για την πλήρη επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής, θα ήταν ενδεδειγμένη η ανάλυση πυρηνικών γενετικών δεικτών, οι οποίοι θα είχαν ενδοειδικό μονομορφισμό ενώ διαειδικά θα εμφανίζονταν ένα σημαντικό επίπεδο πολυμορφισμού. Η προϋπόθεση αυτή είναι σημαντική, καθώς η εμφάνιση ετεροζυγωτικών ατόμων που θα είχαν αλληλόμορφα και των δυο ειδών θα ήταν ακόμα μια σημαντική ένδειξη της ύπαρξης υβριδισμού. Τέτοιοι πυρηνικοί δείκτες θα μπορούσαν να είναι το 5,8S rDNA, οι δυο ITS περιοχές (internal transcribed spacers, ITS1 και 2) και άλλα γονίδια που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό. Παλαιότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνταν για την αποκάλυψη υβριδίων, όπως η μέθοδος αποδιάταξης και επανασύνδεσης με τη χρήση των πυρηνικών γενωμάτων, ο υβριδισμός με ανιχνευτές ειδικούς για κάθε είδος καθώς και η ενίσχυση τυχαίων πολυμορφικών τμημάτων (RAPD) έχουν ξεπεραστεί και δε χρησιμοποιούνται πλέον.

Όσον αφορά τα υπόλοιπα είδη, φαίνεται να διαχωρίζονται εμφανώς στο φυλογενετικό δέντρο. Οι 3 απλότυποι των *C. m. rubiginosa* εμφανίζουν μια ξεχωριστή παραφυλετική ομάδα, ενώ τα *C. mafaffa* ομαδοποιούνται στην μονοφυλετική ομάδα μαζί με τα υπόλοιπα είδη. Οι τιμές bootstrap στους κλάδους των *C. m. rubiginosa* είναι αρκετά μεγάλες, οπότε μπορούμε να ισχυριστούμε με αξιοπιστία ότι τα αποτελέσματα αυτά είναι σωστά. Επίσης, τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την στενή συγγενική σχέση των *C. insulicola* με τα *C. tridentata*, αφού ομαδοποιούνται σε ένα ξεχωριστό κλάδο από τα υπόλοιπα είδη.

Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης ίσως θα αποκτούσαν μεγαλύτερη αξιοπιστία, με αντιπροσωπευτικότερη δειγματοληψία, η οποία βρίσκεται σε εξέλιξη. Έτσι, θα μπορούσαμε πιθανόν να ανακτήσουμε περισσότερους απλότυπους από κάθε είδος, και η σύγκριση μεταξύ τους να είναι πιο εκτενής.

Νουκλεοτιδική ανάλυση αλληλουχιών

Η νουκλεοτιδική ανάλυση αποκάλυψε κάποια αξιοσημείωτα στοιχεία. Πρώτον, το υψηλό ποσοστό περιεκτικότητας σε A+T, το οποίο κατά μέσο όρο κυμαίνεται στο 65%. Η τιμή αυτή είναι μια συνηθισμένη τιμή για μιτοχονδριακά γονίδια εντόμων, ενώ έχουν παρατηρηθεί και τιμές πάνω από 70%. Επίσης, το μικρό ποσοστό εμφάνισης G και C στην τρίτη θέση του κωδικονίου έχει παρατηρηθεί στα μιτοχονδριακά γονίδια εντόμων. Δεύτερον, οι περισσότερες μεταλλάξεις (~90%) εμφανίζονται στην τρίτη θέση του κωδικονίου, κάτι που επιβεβαιώνει την υπόθεση ταλάντευσης (wobble hypothesis) του Crick, η οποία εξηγεί τον εκφυλισμό του γενετικού κώδικα, και σύμφωνα με αυτή η αναγνώριση της τρίτης βάσης ενός κωδικονίου μπορεί να είναι λιγότερο ειδική από τις δυο πρώτες θέσεις. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από την παρατήρηση ότι στις αμινοξικές αλληλουχίες εμφανίζονται συνολικά 9 πολυμορφικές θέσεις, οι οποίες είναι κατά πολύ λιγότερες από τις 132 πολυμορφικές θέσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, καθώς οι περισσότερες από αυτές αντιστοιχούν σε συνώνυμες μεταλλάξεις, δηλαδή τα νέα κωδικόνια κωδικοποιούν για το ίδιο αμινοξύ.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι ενισχύθηκε το τμήμα του γονιδίου COI και όχι κάποιο τμήμα ψευδογονιδίου, επιλέχθηκε τυχαία μια από τις αλληλουχίες που προσδιορίσαμε και ομοπαρατέθηκε με την εφαρμογή BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) για να εξακριβωθεί η ομολογία της με άλλα τμήματα COI γονιδίων. Πράγματι, η ομοπαράθεση επιβεβαίωσε ότι πρόκειται για τμήμα του γονιδίου COI, καθώς όλα τα αποτελέσματα της ομοπαράθεσης ήταν τμήματα μιτοχονδριακών γονιδίων COI από άλλα είδη. Μάλιστα, στην πρώτη θέση με τη μεγαλύτερη ομολογία εμφανίστηκε ένα τμήμα γονιδίου COI που ανήκει στο είδος *Aleochara bisolata*, που ανήκει στην τάξη των Coleoptera.

Επίσης, η απουσία προσθηκών ή ελλείψεων (indels) μαρτυρά ότι πρόκειται για το επιθυμητό τμήμα και όχι για κάποιο πυρηνικό ψευδογονίδιο.

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. Αυτό είναι ένα ακόμα στοιχείο που συνηγορεί στην μιτοχονδριακή προέλευση των αλληλουχιών. Τα επίπεδα του πολυμορφισμού ήταν σαφώς χαμηλότερα από αυτά των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (9/175 και 132/525 αντίστοιχα), γεγονός το οποίο οφείλεται στον εκφυλισμό του γενετικού κώδικα. Αυτή η παρατήρηση, δηλαδή τα πολύ χαμηλά επίπεδα πολυμορφισμού, σχετίζεται και με την ακαταλληλότητα χρησιμοποίησης των πρωτεϊνικών αλληλουχιών για την διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων, καθώς ένα μεγάλο μέρος του γενετικού πολυμορφισμού παραμένει «κρυφό» και δεν εμφανίζεται στο πρωτεϊνικό επίπεδο.

Γενετικές αποστάσεις απλοτύπων

Οι γενετικές αποστάσεις των απλοτύπων υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος MEGA και αποκάλυψαν κάποια σημαντικά χαρακτηριστικά. Όπως αναμενόταν, η ενδοειδική διαφοροποίηση είναι αρκετά μικρότερη από την διαειδική διαφοροποίηση. Αν κατατάξουμε τους απλότυπους triden3, 4 και 7 μαζί με τον απλότυπο του *C. insulicola*, μπορούμε να υπολογίσουμε ενδοειδικές αποστάσεις για 4 ομάδες : των *C. t. tridentata*, των *C. t. dominicensis*, των *C. insulicola* μαζί με τα πιθανά υβρίδια και των *C. m. rubiginosa*. Όλες οι ενδοειδικές αποστάσεις αυτών των ομάδων έχουν τιμές χαμηλότερες του 1%, όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και για άλλες ενδοειδικές γενετικές αποστάσεις που έχουν υπολογιστεί με τη χρήση του COI. Οι διαειδικές αποστάσεις, όμως, συμπεριλαμβανομένου και του είδους *C. maffafa*, εμφανίζουν αρκετά υψηλότερες τιμές. Οι τιμές της διαειδικής διαφοροποίησης φαίνονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 5: Διαειδικές γενετικές αποστάσεις

	<i>C.t.tridentata</i>	<i>C.insulicola</i>	<i>C.m.rubiginosa</i>	<i>C.maffafa</i>	<i>C.t.dominicensis</i>
<i>C.t.tridentata</i>	-				
<i>C.insulicola</i>	0.103	-			
<i>C.m.rubiginosa</i>	0.195	0.163	-		
<i>C.maffafa</i>	0.171	0.168	0.185	-	
<i>C.t.dominicensis</i>	0.041	0.096	0.185	0.176	-

Η μέγιστη διαειδική διαφοροποίηση εμφανίζεται ανάμεσα στα *C. t. tridentata* και *C. m. rubiginosa*, και αγγίζει τα όρια του 20%. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός της μικρής διαφοροποίησης ανάμεσα στα 2 υποείδη των *C. tridentata* που κυμαίνεται κοντά στο 4%, ενώ τις πιο χαμηλές τιμές διαειδικά εμφανίζουν τα συγγενικά είδη *C. tridentata* και *C. insulicola*.

Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι τιμές των διαειδικών αποστάσεων είναι τουλάχιστον δέκα φορές μεγαλύτερες από τις ενδοειδικές αποστάσεις (εκτός από την περίπτωση των υποειδών) οπότε προκύπτει η πιθανή χρήση των αλληλουχιών αυτών ως DNA barcodes.

Το DNA barcoding είναι μια τεχνική που χρησιμοποιεί ένα γενετικό δείκτη από το μιτοχονδριακό DNA του οργανισμού για να αναγνωριστεί αν ανήκει σε ένα συγκεκριμένο είδος. Οι Hebert et al (2003) εστίασαν σε αυτό το θέμα, προτείνοντας ότι το σύστημα διάκρισης των ειδών μπορεί να στηριχθεί στην ανάλυση της διαφοροποίησης της αλληλουχίας του γονιδίου COI. Αυτοί απέδειξαν ότι η διαφοροποίηση στην αμινοξική αλληλουχία που κωδικοποιείται από το 5' τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου ήταν αρκετή ώστε να κατηγοριοποιήσουμε τα είδη σε υψηλότερες ταξινομικές κατηγορίες (από τα φύλα ως τις τάξεις). Ο κύριος στόχος αυτών των ερευνών είναι το γονίδιο COI. Ακόμα και τμηματικές αλληλουχίες του γονιδίου έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα του διαχωρισμού των ειδών. Παρόλα αυτά μερικά είδη πολύ συγγενικά δε μπορούν να διαχωριστούν με βάση την ανάλυση του COI. Από αυτή τη μοναδική αλληλουχία του COI γονιδίου, είχαν αναγνωριστεί δείγματα στο επίπεδο του είδους με ένα ποσοστό επιτυχίας περίπου στο 98 με 100% σε πουλιά της Βόρειας Αμερικής, ψάρια της Αυστραλίας και πιο πρόσφατα σε

Λεπιδόπτερα (Dasmahapatra et al, 2006). Μαζί με την επιτυχή αναγνώριση των ήδη γνωστών ειδών, ένας αριθμός πιθανών κρυφών ειδών έχει ανακαλυφθεί τα οποία είχαν θεωρηθεί ως ένα είδος λόγω των μορφολογικών ομοιοτήτων τους (Monaghan et al, 2005). Αυτή η επιτυχία ενίσχυσε τον προβληματισμό καθώς θα ήταν δυνατή η αναγνώριση ειδών από οποιοδήποτε είχε πρόσβαση στις αλληλουχίες αυτές χωρίς να είναι ειδικευμένος στην ταξινόμηση. Δύο πρόσφατες μελέτες έδειξαν 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 ενδιαίτηματος. Σε μια άλλη μελέτη, μορφολογικά αδιαχώριστες μύγες Tachinidae φάνηκε να διαχωρίζονται σε ξεχωριστές ομάδες που είχαν διαφορετικές προτιμήσεις ξενιστή (Dasmahapatra et al, 2006). Σε αυτές τις μελέτες, η επιτυχία οφειλόταν στη στενή συσχέτιση των μοριακών δεδομένων με οικολογικά δεδομένα. Αν και χρειάζεται να γίνει περισσότερη μελέτη για να ποσοτικοποιηθούν τα επίπεδα της απόκλισης της αλληλουχίας του COI ανάμεσα στα ζωικά είδη, μια καλή αίσθηση των ορίων της διαειδικής απόκλισης των μιτοχονδριακών γονιδίων μπορεί να εξαχθεί από την φυλογεωγραφική ανάλυση (Hebert et al, 2003).

Το DNA barcoding έχει χρησιμοποιηθεί ως μια χρήσιμη προσέγγιση για τον χαρακτηρισμό ειδών, ιδίως αυτών που έχουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά, βοηθώντας έτσι στην διαλεύκανση των φυλογενετικών σχέσεων καθώς και την αποκάλυψη της εξελικτικής ιστορίας. (Wang et al, 2008) Η τεχνική του DNA barcoding έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην αναγνώριση ειδών που είχαν περιγραφεί πρωτίτερα και κατά την διαδικασία έχει αποκαλύψει πολλά κρυπτικά είδη. Έχει σημειωθεί επίσης ότι τέτοιες μέθοδοι μπορούν να βοηθήσουν στην ανακάλυψη κάποιων ειδών που δεν έχουν περιγραφεί σε ομάδες που δεν έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα, παρότι μέχρι τώρα η επιτευξιμότητα μιας τέτοιας προσέγγισης δεν έχει εξεταστεί εκτενέστερα (Monaghan et al, 2006).

Η ανακάλυψη νέων, κρυπτικών ειδών από υπάρχοντα, μορφολογικά διαχωρισμένες ομάδες χρησιμοποιώντας το DNA δεν είναι ούτε αμφιλεγόμενη ούτε καινούργια μέθοδος και οι πιθανές αναθεωρήσεις της ταξινόμησης που θα προκύψουν από το DNA barcoding έχουν ανατεθεί σε ειδικούς για να διαλευκανθεί και σε σχέση με μορφολογικά, ηθολογικά και άλλα κριτήρια. 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

- Abascal, F., Posada, D., Knight, R.D., Zardoya, R. Parallel evolution of the genetic code in arthropod mitochondrial genomes. PLoS Biol. (2006)
- Ames, C., Turner, B., Daniel, B. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowfly species – *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria*. Forensic science International (2006), 164:179
- Arevalo, E., Zhu, Y., Carpenter, J., Strassmann, J. The phylogeny of the social wasp subfamily Polistinae : evidence from microsatellite flanking sequences mitochondrial COI sequence and morphological characters. BMC Evolutionary Biology (2004) 4:8
- Boore, 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) Vol6:1967
- Budwole, B., Allen, RC.,. Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis of DNA fragments, Molecular Biology in Medicine(1990), Volume 7
- Chalumeau, F. Les coleopteres scarabaeudes des Petites Antilles (Guadeloupe a Martinique). Lechavalier, Paris (1983)
- Darwin, C., Murray. On the origin of species. (1859)
- Dasmahapatra, K., Mallet, J. DNA barcodes : recent successes and future prospects. Heredity (2006) 97:254
- Desmyter, S., Gosselin, M. COI sequence variability between Chrysomyinae of forensic interest. Forensic science international (2009) 3:89
- Dobzhansky, T., Genetics and the origin of species. (1951)
- Doolittle, R.F. , Blomback, B. Amino-acid sequence investigations of fibrinopeptides from various mammals : evolutionary implications. Nature (1964) 202:147

- Dusfour, I., Michaux, J., Harbach, R., Manguin, S. Speciation and phylogeography of the southeast Asian *Anopheles sundaicus* complex. *Infection, genetics and evolution* (2007) 7: 484-493
- Dutrillaux, A.M., Xie, H., Dutrillaux, B. High chromosomal polymorphism and heterozygosity in *Cyclocephala tridentata* from Guadeloupe : chromosome comparison with some other species of Dynastinae (Coleoptera:scarabaeidae). *Cytogenet Genome Res.* (2007) 119:248
- 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) 3:294
- Freese, E., Yoshida, A. The role of mutations in evolution. *Evolving genes and proteins* (1965) 341-355
- Gao, J., Watebe, H., Aotsuka, T., Pang, J., Zhang, Y. : Molecular phylogeny of the *Drosophila obscura* species group, with emphasis of the old world species. *BMC Evolutionary Biology*(2007) 7:87.
- Giraldo, N., Salazar, C., Jiggins, C., Bermingham, E., Linares, M. Two sisters in the same dress : *Heliconius* cryptic species. *BMC Evolutionary Biology* (2008), 8:324
- Hajibabaei, M., Janzen, D., Burns, J, Hallwachs, W., Hebert, P. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *PNAS* (2006) vol104:968
- Han, H.Y., Ro, K.E. : Molecular phylogeny of the family Tephritidae (Insecta:Diptera):New insight from combined analysis of the mitochondrial 12S,16S and COII genes. *Mol.Cells* (2009) 27,55:66
- Harvey, M.L., Mansell, M.W., Villet, M.H., Dadour, I.R.: Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. *Medical and Veterinary entomology* (2003) 17,363:369
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., deWaard, J. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc.R.SocLond B* (2003) 270:313

- Hebert, P., Ratnasingham, S., deWaard, J. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc R.Soc. Lond. B* (2003) 270:96
- Hua, J., Li, M., Dong, P., Cui, Y., Xie, Q., Bu, W. Phylogenetic analysis of the true water bugs (Insecta:Hemiptera:Heteroptera:Nepomorpha): evidence from mitochondrial genomes. *BMC Evolutionary Biology* (2009) 9:134
- Hundsdoerfer, A., Rubinoff, D., Attie, M., Wink, M., Kitching, I. A revised molecular phylogeny of the globally distributed hawkmoth genus *Hyles* (Lepidoptera:Sphingidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution* (2009) 52:852
- Jeong, H., Kim, J., Im, H., Jeong, H., Hong, M., Lee, J., Han, Y., Kim, I. Mitochondrial DNA sequence variation of the swallowtail butterfly, *Pappilus xuthus* and the cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Biochem Genet* (2009) 47:165
- Krzywinski, J., Grushko, O., Besansky, N. Analysis of the complete mitochondrial DNA from *Anopheles funestus* : an improved dipteran mitochondrial genome annotation and a temporal dimension of mosquito evolution. *Molecular phylogenetics and evolution* (2006) 39:417
- Kumar, N, Rajavel, A., Natarajan, R., Jambulingam, P. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera:Culicidae). *J Med Entomol* (2007) 44:1
- Lohman, D.J., Peggie, D, Pierce, N.E., Meier, R. Phylogeography and genetic diversity of a widespread old world butterfly, *Lampides boeticus* (Lepidoptera:Lycaenidae) *BMC Evolutionary Biology* (2008) 8:301
- Lunt, D., Zhang, D., Szymura, J, Hewitt, G. The insect cytochrome oxidase I gene : evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* (1996). 5:153
- Margoliash, E. Primary structure and evolution of cytochrome c. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* (1963) 50:672

- Margoliash, E., Smith, E.L. Structural and functional aspects of cytochrome c in relation to evolution. *Evolving genes and proteins* (1965) 221-242
- Maruyama, M., Steiner, F., Stauffer, C., Akino, T., Crozier, R., Schlick, B. A DNA and morphology based phylogenetic framework of the ant genus *Lasius* with hypotheses for the evolution of social parasitism and fungiculture. *BMC Evolutionary Biology* (2008) 8:237
- Mayr, E. *Animal species and evolution*, (1963)
- Mohanty, A., Swain, S., Kar, S., Hazra, R. Analysis of the phylogenetic relationship of *Anopheles* species subgenus *Cellia* (Diptera:Culicidae) and using it to define the relationship of morphologically similar species. *Infection, genetics, and evolution* (2009).
- Monaghan, M., Balke, M., Gregory, T., Vogler, A. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Phil.trans.R.soc.B.* (2005) 360:1925
- Nei, M. Selectionism and neutralism in molecular evolution. *Mol Biol Evol* (2005) 22:2318
- Nelson, L., Wallman, J., Dowton, M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and veterinary entomology* (2007) 21:44
- Paredes-Esquivel, C., Donnelly, M., Harbach, R., Townson, H. A molecular phylogeny of mosquitoes in the *Anopheles barbirostris* subgroup reveals cryptic species : implications for identification of disease vectors. *Molecular Phylogenetics and Evolution* (2009) 50:141
- Park, S., Zhang, Y., Piao, H., Yu, D., Jeong, H., Yoo, G., Chung, U., Jo, T., Hwang, J. Use of cytochrome c oxidase subunit I (COI) nucleotide sequences for identification of the Korean *Luciliinae* fly species (Diptera:Caliphoridae) in forensic investigations. *J. Korean Med.Sci.* (2009), 24:1058
- Ros, V.I.D., Breeuwer, A.J. Spider mite (Acari:Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. *Exp App*;

Acarol (2007) 42:239

- Russell, J. *iGenetics A Mendelian Approach* (2006)
- Sallum, M.A., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A., Wilkerson, R.C. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Systematic entomology* (2002) 27, 361:382
- Sambrook, J. *Molecular Cloning : Laboratory Manual* (third edition) (2000)
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P. Evolution, Weighting, and Phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* (1994) 87:651
- Smith, M., Woodley, N., Janzen, D., Hallwachs, W., Hebert, P. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagus members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *PNAS* (2006) vol103:3657
- Sorenson, M.D., Ast, J.C., Dimcheff, D.E. , Yuri, T., Mindell, D.P. Primers for a PCR based approach to mitochondrial genome sequencing in Birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* (1999), Vol12: 105-114
- Sperling, F., Hickey, D. Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (Chirostineura: Lepidoptera). *Mol. Biol. Evol.* (1994) 11:656
- Spicer, G. Phylogenetic utility of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase Gene: Molecular Evolution of the *Drosophila buzzati* Species complex. *J Mol evol* (1995) 41:749-759
- Stanger-Hall, K.F., Lloyd, G.E., Hillis, D.M.. Phylogeny of north American fireflies (Coleoptera: Lampyridae): implications for the evolution of light signals. *Molecular phylogenetics and evolution* (2007) 45: 33-49
- Tamura. K., Dudley, J., Nei, M, Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and evolution* (2007) 24:1596

- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. The CLUSTAL_X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acid research* (1997) Vol25: 4876
- Wang, W., Luo, Q., Guo, H., Bossier, P., Van Stappen, G., Sorgelos, P., Xin, N., Sun, Q., Hu, S., Yu, G. Phylogenetic analysis of Brine Shrimp (*Artemia*) in China using DNA barcoding. *Geno.Pro.Bioinfo*(2008) Vol.6
- Wells, J. , Wall, R., Stephens, J.R. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tail for species determination. *Int.J.Legal.Med*(2007) 121:229-233
- Zehner, R., Amendt, J., Schutt, S, Sauer, J., Krettek, R., Povolny, D. genetic identification of forensically important flesh flies (*Diptera:Sarcophgidae*). *Int.j.Legal Med.* (2004) 118:245
- Zuckerkandl, E. Evolutionary divergence and convergence in proteins. *Evolving genes and proteins* (1965) 97-166
- Zuckerkandl, E., Pauling, L. Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. *Horizons in biochemistry* (1962) 189-225
- Αλαχιώτης, Σ. Εισαγωγή στην Εξέλιξη (2007)
- Μαργαρίτης, Λ. Βιολογία Κυττάρου (2008)