

Διάλεξη 2

**Μοριακή ταυτοποίηση: είδος,
άτομο, φύλο**

(Κ. Ματθιόπουλος)

Μοριακή ταυτοποίηση: είδος, άτομο, φύλο

Τι είναι «είδος»;

- Πόσο αξίζει μια ομάδα οργανισμών τις προσπάθειες διατήρησής τους
- Δηλαδή: πόσο διαφορετικό είναι από ένα συγγενικό είδος;

Biological Species Concept

- Δίνουν γόνιμους απογόνους ή όχι;
- Όμως:
 - Αν οι πληθυσμοί δεν είναι συμπατρικοί;
 - Μήπως είναι χρήσιμη η διατήρηση σε επίπεδο υποείδους;

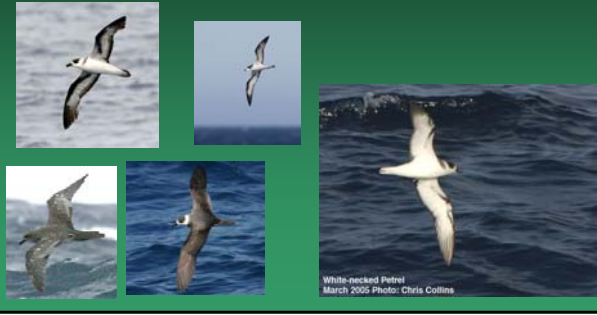
- Με ποια τεχνική εξετάζεται η γενετική διαφοροποίηση δύο οργανισμών;
 - Τα ισσένζυμα δεν κάνουν λεπτομερείς διαχωρισμούς
 - Οι μικροδορυφόροι διαχωρίζουν σε επίπεδο ατόμου
- Ομοιότητα σε επίπεδο mtDNA θα μπορούσε να είναι η βάση 'εξελικτικά σημαντικών μονάδων'
 - Αλλά: δεν είναι όλες οι περιοχές του mtDNA ίδιες

Το παράδειγμα των κοάλα

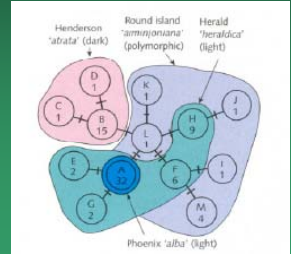


- Μορφολογικοί χαρακτήρες διαχωρίζουν τα κοάλα σε τρία υποείδη βάσει χρώματος και μεγέθους
- Μοριακοί δείκτες (multilocus minisatellites, mtDNA, microsatellites, RAPDs) δεν διαχωρίζουν υποείδη. Αντίθετα, συνηγορούν για μια συνεχή κλίση με μικροδιαφοροποιήσεις. Οι μορφολογικές διαφορές μάλλον έχουν περιβαλλοντική (και όχι γενετική) βάση.
- Κατά συνέπεια, είναι σημαντικότερη διατήρηση της συνεχούς κλίνης για τη διατήρηση της ποικιλομορφίας των κοάλα.

Pterodroma heraldica



- Παρά τις χρωματικές τους διαφορές, θεωρούνταν το ίδιο είδος
- Ανάλυση της συμπεριφοράς τους έδειξε ότι υπήρχε χρωματική προτίμηση στις συζεύξεις (assortative mating)
- Αλληλούχηση του κυτοχρώματος b του mtDNA αποκάλυψε πέντε διαφοροποιημένους απλοτύπους για τα ανοιχτόχρωμα πουλιά (A, E-H) και τρεις για τα σκουρόχρωμα (B, C, D)



Υβριδικές ζώνες

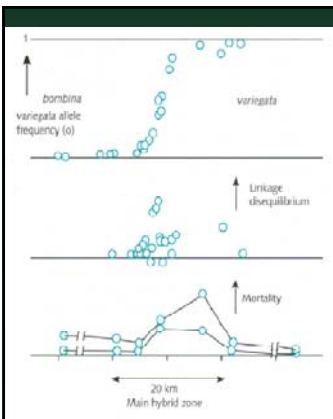
- Περιπλέκει την αντίληψη περί είδους ακόμη περισσότερο
- Συχνές στα φυτά



Bombina bombina

Bombina variegata

- Κοινός πρόγονος πριν από 4 εκατ χρόνια
- Μορφολογικές διαφορές
- Οικολογικές διαφορές
 - σταθερά ρηχά νερά
 - μικρότερα αυγά
 - αργότερη ανάπτυξη
- Ευρείες περιοχές υβριδποίησης: αλλά πόση ανταλλαγή γενετικού υλικού;
 - ορεινά, πολύ ρηχά νερά
 - μεγαλύτερα αυγά
 - γρηγορότερη ανάπτυξη



- Σε 5 αλληλόμορφα υπήρχαν φιλζαρισμένα στους δύο πληθυσμούς
- Η περιοχή υβριδποίησης πιστευόταν στα 20 km. Ήταν ~200 km
- Μοριακά δεδομένα έδειξαν ότι δεν υπήρχε γονιδιακή ροή πέρα από τη ζώνη υβριδποίησης

Το πρόβλημα της ταυτοποίησης των ατόμων

- Συχνό πρόβλημα της μοριακής οικολογίας είναι η αναγνώριση "μυστικών" ειδών (cryptic taxa)
- Οι σύγχρονες τεχνικές μοριακής βιολογίας έχουν βοηθήσει στην επίλυσή του

Ο ανταγωνισμός των φρύνων και το πρόβλημα των δυσδιάκριτων προνυμφών

- Συχνά ο ανταγωνισμός είναι εντονότερος σε συγγενικά είδη
- Πχ οι φρύνοι *Bufo bufo* και *Bufo calamita* ανταγωνίζονται στο ίδιο περιβάλλον
- Ενώ στο στάδιο των ενηλίκων διαχωρίζονται εύκολα, στο στάδιο των γυριών όχι



RAPD ταυτοποίηση των δύο ειδών. Αριστερά: *Bufo calamita*, Δεξιά: *Bufo bufo*

Γρήγορη ταυτοποίηση: διαγνωστικοί εκκινητές, Real Time PCR



Ταυτοποίηση προϊόντων PCR από δύο είδη χελιών με απλή παρατήρηση. Μόνο οι σωλήνες 1 και 4 φωσφορίζουν και, ως εκ τούτου, προέρχονται από το υπό μελέτη είδος

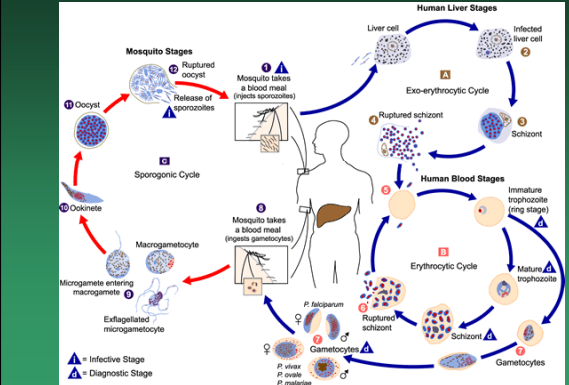
Παγκόσμια εξάπλωση της ελονοσίας



Ο κύκλος ζωής του ανωφελή κουνουπιού



Ο κύκλος της ελονοσίας

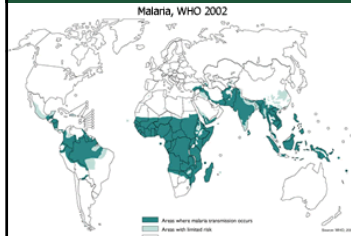


The diagram illustrates the life cycle of malaria, divided into Mosquito Stages and Human Stages. Mosquito stages include Oocyst, Sporozoites, Sporogonic Cycle, and Ookinete. Human stages include Liver cell (Infected liver cell, Exo-erythrocytic Cycle, Ruptured schizont, Schizont), Human Blood Stages (Immature trophozoite, Erythrocytic Cycle, Mature trophozoite, Ruptured schizont, Schizont), and Gametocytes (Microgamete entering macrogamete, Exflagellated microgametocyte, Gametocytes). The cycle is completed when a mosquito takes a blood meal from an infected human, ingesting gametocytes.

Μορφολογικός διαχωρισμός κουνουπιών



The malaria mosquito, *Anopheles gambiae*



Τα πολυταινικά χρωμοσώματα του ανωφελή κουνουπιού

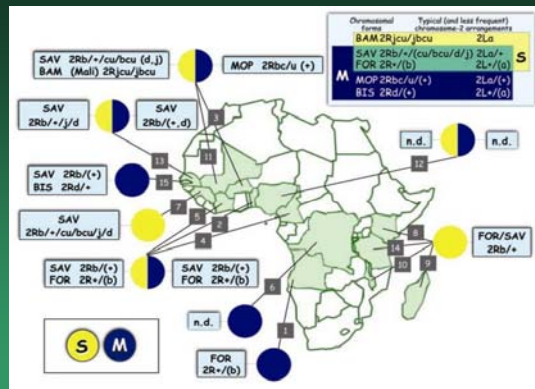
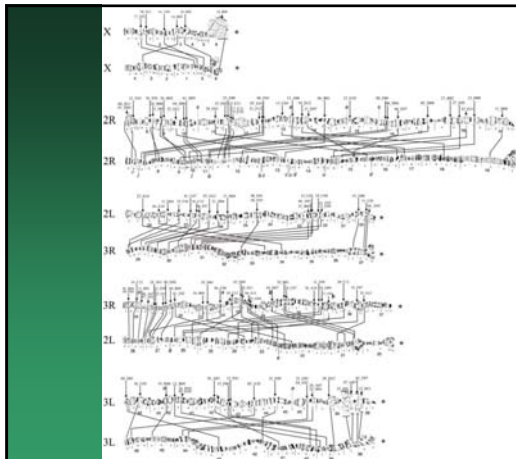
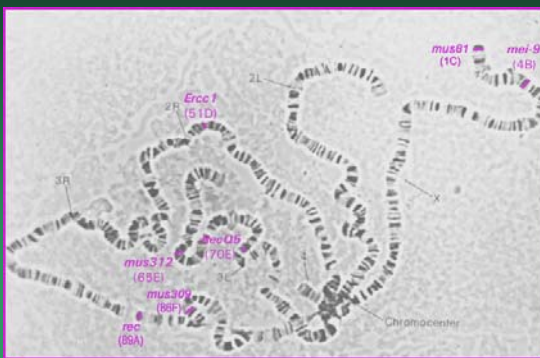
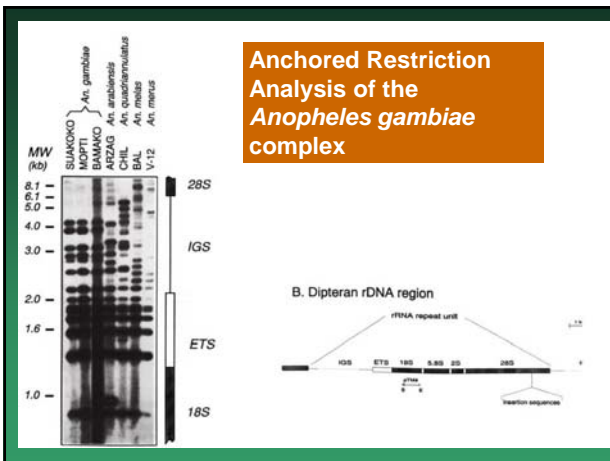


Table 1

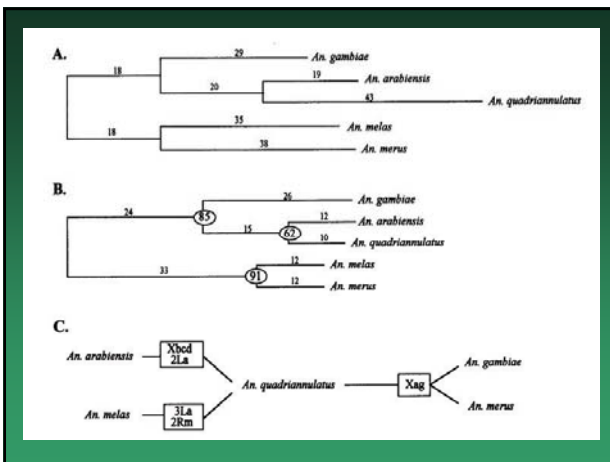
Mosquito Strains Used in the Study

Mosquito Strains	Karyotype ^a	Natural Origin	Source
<i>Anopheles gambiae</i> :			
SUAKOKO ...	Xag, 2R, 2La, 3R, 3L	Liberia, West Africa	M. Coluzzi, University of Rome, Italy
MOPFI ...	Xag, 2Rbc, 2La, 3R, 3L	Mali, West Africa	M. Coluzzi
BAMAKO ...	Xag, 2Rjcu, 2La, 3R, 3L	Mali, West Africa	M. Coluzzi
<i>A. arabiensis</i> :			
ARZAG ...	Xbed, 2Ra/+, b/+, c/+, d/+, 2La, 3Ra/+, 3L	Burkina Faso, West Africa	F. Collins, Centers for Disease Control, United States
<i>A. quadriannulatus</i> :			
CHIL ...	X, 2R, 2L, 3R, 3L	Zimbabwe, South Africa	F. Collins
<i>A. melas</i> :			
BAL ...	X, 2Rm, n/+, 2L, 3Rc/+, c/+, 3La	Gambia, West Africa	F. Collins
<i>A. merus</i> :			
V-12 ...	Xag, 2Rop, 2L, 3R, 3L	Kenya, East Africa	F. Collins

^a The karyotype formula for each strain represents the relationship of the particular strain to the standard chromosome sequence for the five polytene arms [X, 2R, 2L, 3R, 3L]. Letters appearing singly represent fixed inversions (e.g., 2La signifies that the strain is homozygous for inversion "a" on chromosomal arm 2L). Polymorphic inversions are indicated with the symbol of heterozygosity (e.g., a/+). (Coluzzi et al. 1979).



Species	rDNA	scnDNA	mtDNA
<i>An. gam.</i> (SUAKOKO)	+++++	?+-----	+++++?+-----
<i>An. gam.</i> (MOPTI)	+++++	+++++	+++++-----
<i>An. gam.</i> (BAMAKO)	+++++	-----	+++++?+-----
<i>An. arab.</i> (ARZAG)	+++++	-----	+++++-----
<i>An. quad.</i> (CHIL)	+++++	-----	+++++-----
<i>An. melas</i> (BAL)	+++++	-----	+++++-----
<i>An. merus</i> (V-12)	+++++	-----	+++++-----

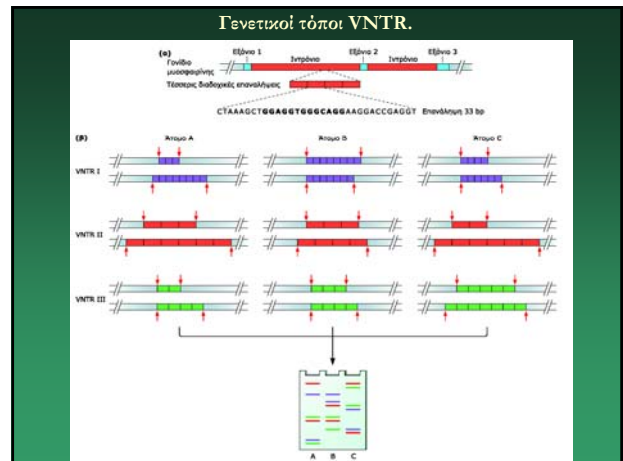


Χρήσεις Γενετικών Αποτυπωμάτων

- Διερεύνηση εγρήλατων
- Ανίχνευση πατρότητας
- Προσδιορισμός καταγωγής
- Αναγνώριση θυμάτων

Μοριακή βάση και τεχνικές προσδιορισμού των γενετικών αποτυπωμάτων

- Είκοσι χρόνια πριν: Το σύστημα ABO
- Σήμερα: υπερμεταβλητοί γενετικοί τόποι



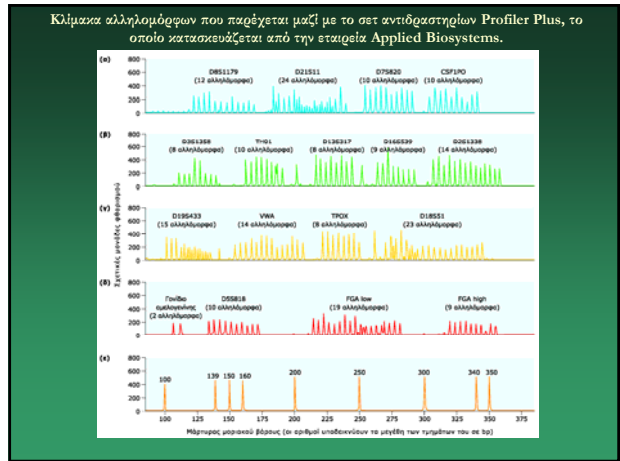
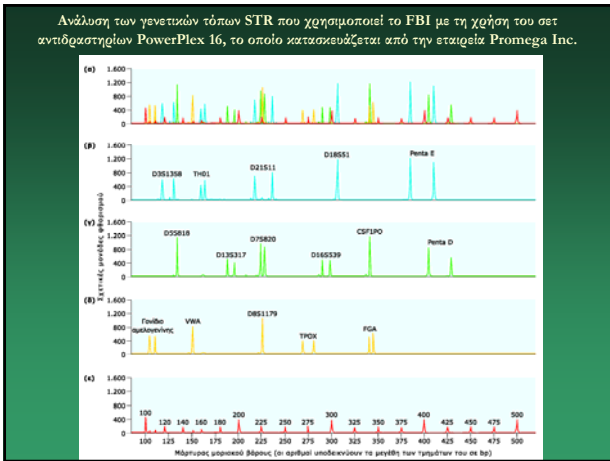
- ### Ταυτοποίηση ατόμων με ανάλυση STR
- Short Tandem Repeats
 - Επαναλήψεις 2-7 bp
 - Ιδιαίτερα μεταβλητοί τόποι
 - Δυνατότητα ενίσχυσης μέσω PCR

- Το FBI χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τα γενετικά αποτυπώματα το 1988
- Μέχρι το 1997 είχε επιλέξει 13 βασικούς γενετικούς τόπους STR
 - 12 αυτοσώματα
 - 5-30 επαναλήψεις
- αμελογενίνη: πρωτεΐνη του σμάλτου των δοντιών στο X χρωμόσωμα
 - έλλειμμα 6 bp στο πρώτο ιντρόνιο
 - στα αρσενικά άτομα δύο ζώνες, στα θηλυκά μόνο η μικρότερη

Οι βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις χρησιμοποιούνται για την ανάλυση του προφίλ του γονιδιαμιατικού DNA από τις δικαστικές αρχές σε ολόκληρο τον κόσμο.

Γενετικός τόπος	Επαναλήψη	Αριθμός αλληλομόρφων	FBI	FSS	Interpol
D2S1338	[TGC][TTCC]	20		✓	
D3S1358	[TCTG][TCTA]	10	✓	✓	✓
D5S818	AGAT	10	✓		
D7S820	GATA	11	✓		
D8S1179	[TCTA][TCTG]	10	✓	✓	✓
D13S317	TATC	8	✓		
D16S539	GATA	8	✓	✓	
D18S51	AGAA	15	✓	✓	✓
D19S433	AAGG	19	✓	✓	
D21S11	[TCTA][TCTG]	69	✓	✓	✓
CSF1P0	TAGA	15	✓		
FGA	CTTT	19	✓	✓	✓
TH01	TCAT	7	✓	✓	✓
TPOX	GAAT	7	✓	✓	✓
vWA	[TCTG][TCTA]	10	✓	✓	✓
Amelogenίνη	106 bp/112 bp	2	✓	✓	✓

- ### Οι ανάλυση των STRs γίνεται με PCR με πολλαπλούς εκκινητές
- Σε κάθε ζεύγος ο ένας εκκινητής είναι σημασμένος με μία από τις 4 φθορίζουσες ομάδες που χρησιμοποιούνται κατά την αλληλούχιση του DNA
 - Η ανίχνευση γίνεται με τη βοήθεια λέιζερ
 - Έτσι προσδιορίζεται το μήκος των προϊόντων



Οι συχνότητες των αλληλομόρφων χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της μοναδικότητας του αποτυπώματος

Ισορροπία Hardy-Weinberg

Αλληλόμορφα	Συχνότητες	Γονότυποι	Συχνότητες
A	p	AA	p^2
a	q	Aa	$2pq$
		aa	q^2

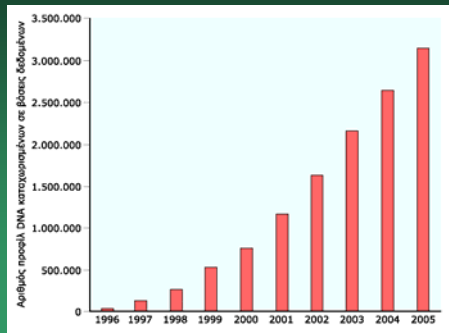
$p+q=1$

Υπολογισμός της συχνότητας με την οποία εμφανίζεται στο γενικό πληθυσμό ένα προφίλ 13 γενετικών τόπων STR.

Γενετικός τόπος	Συχνότητα αλληλομόρφων		Συχνότητα αλληλομόρφων (q)	Συχνότητα γονότυπου ($2pq$ ή p^2)	Αθροιστική συχνότητα	Αθροιστική πιθανότητα (1 στα πόσα άτομα)	
	Αλληλόμορφο (p)	Αλληλόμορφο					
D3S1358	16	0.2533	17	0.2152	0.1091	1.091×10^{-1}	9
vWA	17	0.2815	18	0.2003	0.1127	1.230×10^{-2}	81
FGA	21	0.1854	22	0.2185	0.081	9.963×10^{-4}	1.005
D8S1179	12	0.1854	14	0.1656	0.0614	6.117×10^{-5}	16.364
D21S11	28	0.1589	30	0.2782	0.0884	5.407×10^{-6}	184.922
D18S51	14	0.1374	16	0.1391	0.0382	2.086×10^{-7}	4.838.866
D5S818	12	0.3841	13	0.1407	0.1081	2.234×10^{-8}	44.762.757
D13S317	11	0.3394	14	0.0480	0.0326	7.282×10^{-10}	1.373.098.259
D7S820	9	0.1772		0.0314		2.286×10^{-11}	43.744.531.933
D16S539	9	0.1126	11	0.3212	0.0723	1.653×10^{-12}	6.05×10^{11}
TH01	6	0.2318		0.0537		8.876×10^{-14}	$11,3 \times 10^{13}$
TPOX	8	0.5348		0.2860		2.537×10^{-14}	$3,94 \times 10^{13}$
CSF1PO	10	0.2169		0.0470		1.192×10^{-15}	$8,39 \times 10^{14}$

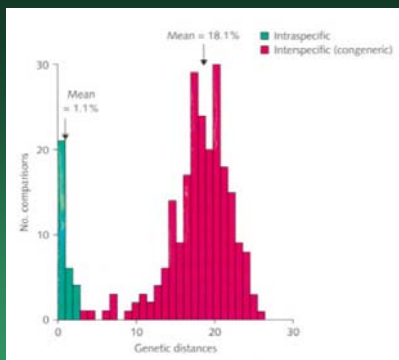
- ### Βάσεις δεδομένων DNA προφίλ
- FBI: CODIS, Combined DNA Index System
 - 3.275.000 profiles → 1% του USA πληθυσμού
 - FSS: NDNAD, National DNA Database
 - 3.500.000 profiles → 5,2% του UK πληθυσμού
 - Το CODIS έχει 5 βάσεις δεδομένων:
 - προφίλ εγκληματιών που έχουν καταδικαστεί
 - προφίλ δειγμάτων που βρέθηκαν σε τόπους εγκλήματος
 - προφίλ αγνοουμένων και δειγμάτων από λείψανα
 - προφίλ συγγενών αγνοουμένων
 - προφίλ ατόμων από γενικό πληθυσμό για υπολογισμό συχνότητας

Το μέγεθος των βάσεων δεδομένων που περιέχουν τα αποτελέσματα από αναλύσεις του προφίλ γονιδιωματικών DNA αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς.



DNA barcoding

- Global Taxonomic Initiative of the Convention on Biological Diversity
- Global Biodiversity Information Facility
- Επιλογή ενός ή μερικών 'κοινών' γονιδίων που παρουσιάζουν μεγάλη δια-ειδική αλλά μικρή ενδο-ειδική ποικιλομορφία: species-specific barcodes
- COI: 650 bp



- Inter- and intra-specific differences in COI sequences among mayflies. Genetic distances are based on the extent of nucleotide divergence

Ταυτοποίηση φύλου

- Συχνό πρόβλημα σε ανώριμα άτομα (immature stages of development)
- Το γονίδιο SRY του χρωμοσώματος Y
- Δυστυχώς τα φυλο-ειδικά γονίδια δεν είναι καλά διατηρημένα στα ζώα και τα φυτά
 - 50% των θηλυκών σαυρών *Calotes versicolor* έχουν αντίγραφο του SRY
 - Σε διάφορα είδη πτηνών και εντόμων το θηλυκό είναι το ετερογαμετικό είδος

SIT στα έντομα

The medfly, *Ceratitis capitata*



Controlling insects by SIT

- **Concept:**
 - Generate large amounts of male flies in the laboratory
 - Sterilize them by irradiation
 - Release them in the environment
 - Infertile matings
- **Advantages:**
 - Simplicity of biological principle
 - Lack of negative ecological effects
- **Successful applications:**
 - Pink bollworm in California
 - Screw-worm in Florida
 - Tsetse flies in Zanzibar
 - Tephritide flies around the world

Genetic sexing I

- Στελέχη γενετικού φυλο-διαχωρισμού στη Μεσογειακή μύγα (Genetic Sexing Strains, GSS)
 - Βάση διαχωρισμού φύλων:
 - Χρώμα οπίσθιο τραχειακού ανοίγματος της προνόμφης
 - Χρώμα νόμφης
 - Μέγεθος νόμφης
 - Μηχανική διαλογή φύλου
- Το στέλεχος T228
 - Βραδύτερη εμβρυονική ανάπτυξη: αυγά wt εντόμων εκκολάπτονται ύστερα από 36h στους 23°C, μεταλλαγμένα αυγά εκκολάπτονται μετά από 76h.
 - Μια χρωμοσωμική μετατόπιση έκανε σύνδεση του wt αλληλομόρφου του εμπλεκόμενου γονιδιακού τόπου με το Y χρωμόσωμα.
 - Κατά συνέπεια, τα αρσενικά άτομα είχαν φυσιολογική ανάπτυξη, ενώ τα θηλυκά ήταν μεταλλαγμένα (είχαν καθυστερημένη ανάπτυξη)
 - => Πρώιμος διαχωρισμός φύλων



Εγκαταστάσεις μαζικής εντροφής



Y-enriched and Y-specific DNA sequences from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*

Juan E. Anelmer and David S. Haymer

Department of Genetics and Molecular Biology, University of Hawaii-Manoa, Honolulu, HI 96822, USA

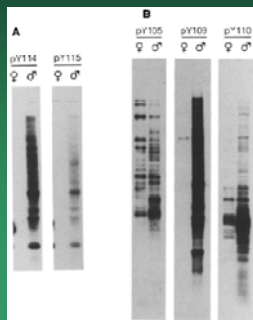


Fig. 2A, B. Genomic DNA of males and females digested with EcoRI and probed with selected EcoRI fragments all taken from pY105-1. Panel A shows two fragments for which no signal was detectable in DNA of females even after a 5-day exposure. Panel B shows examples of several male biased sequences also present in the same phage.