

# Εξελικτική Οικολογία - Διάλεξη 2

## Γονιδιώματα & δείκτες (τύποι και κατηγορίες)



Εισηγητής

Αναπλ. Καθ. Πουλακάκης Νίκος

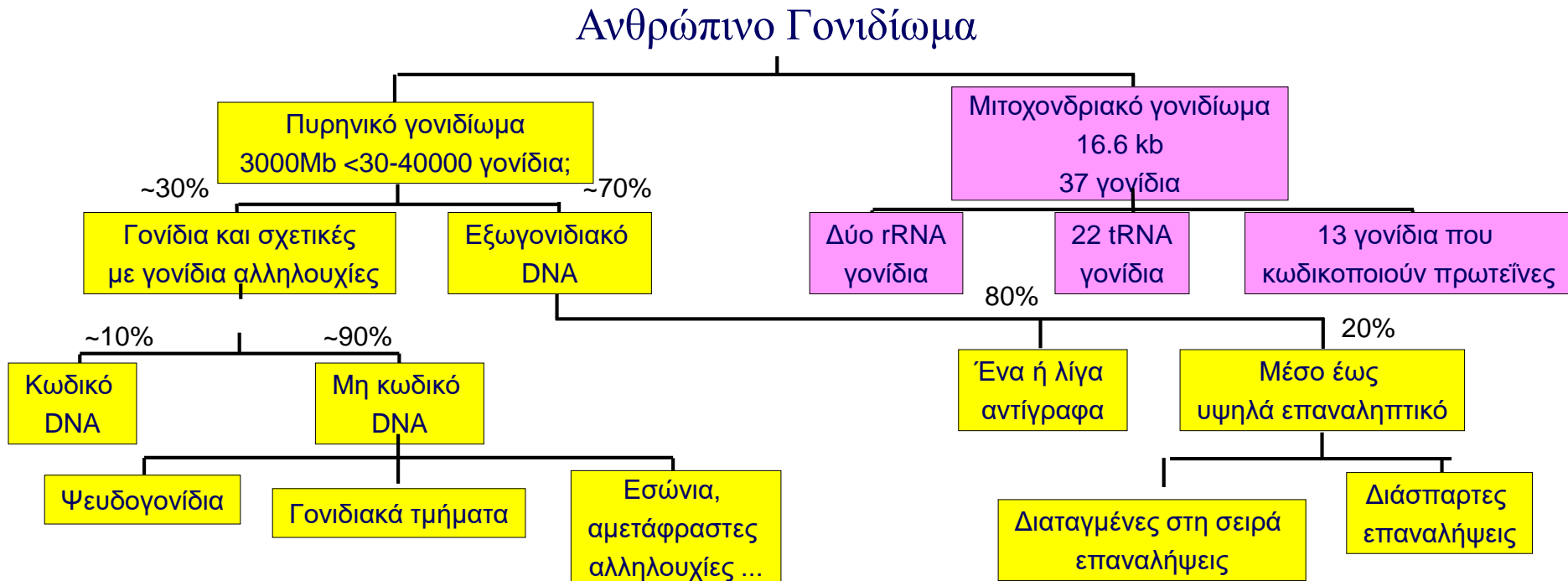
[roulakakis@nhmc.uoc.gr](mailto:roulakakis@nhmc.uoc.gr)

# Μέγεθος Γονιδιώματος



A digital representation of the human genome at the American Museum of Natural History in New York City. (Mario Tama/Getty Images)

# Οργάνωση Ανθρώπινου Γονιδιώματος



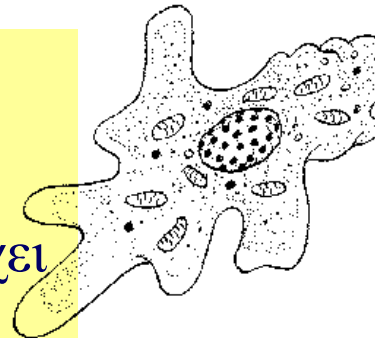
# Μέγεθος Γονιδιώματος

Το μέγεθος του γονιδιώματος ή «C-value» ενός οργανισμού καθορίζεται από την συνολική ποσότητα του DNA που περιέχεται σε ένα σύνολο απλοειδών χρωμοσωμάτων.

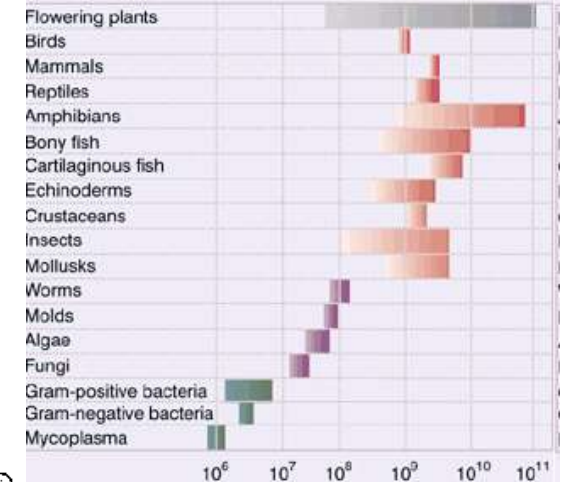
<i>H. sapiens</i>	~3 Gb
<i>M. musculus</i>	2,5 Gb
<i>D. melanogaster</i>	0,18 Gb
<i>C. elegans</i>	0,097 Gb
<i>S. cerevisiae</i>	0,012 Gb

Όμως

μία αμοιβάδα, από τους πιο απλούς μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, έχει ~670 Gb!



**Figure 3.1** DNA content of the haploid genome is related to the morphological complexity of lower eukaryotes, but varies extensively among the higher eukaryotes. The range of DNA values within a phylum is indicated by the shaded area.



Το ελάχιστο μέγεθος αυξάνει με το Φύλο (Phylum)!

Παραδείγματα ειδών και  
μεγέθη γονιδιωμάτων (σε bp)

*Polychaos dubium*  
670,000,000,000



*Amoeba proteus*  
290,000,000,000



*Bufo bufo*  
6,900,000,000



*Homo sapiens*  
2,900,000,000



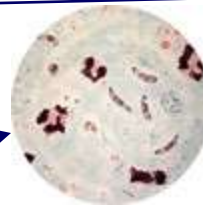
*Boa constrictor*  
2,100,000,000



*Rhinolophus ferrumequinum*  
1,929,400,000



*Plasmodium falciparum*  
25,000,000



Human immunodeficiency virus type 1  
19,750





# Το εύρος του μεγέθους του γονιδιώματος

All eukaryotes	8,800–686,000,000	77,955
Alveolata	23,500–201,000,000	8,553
Apicomplexans	9,400–201,000,000	21,383
Ciliates	23,500–8,620,000	367
Dinoflagellates	1,370,000–98,000,000	72
Diatoms	35,300–24,500,000	694
Amoebae	35,300–686,000,000	19,433
Euglenozoa	98,000–2,350,000	24
Fungi	8,800–1,470,000	167
Animals	49,000–139,000,000	2,837
Sponges	49,000–53,900	1
Cnidarians	323,000–715,000	2
Aschelminthes	80,000–2,450,000	31
Annelids	882,000–5,190,000	6
Mollusks	421,000–5,290,000	13
Crustaceans	686,000–22,100,000	32
Insects	98,000–7,350,000	75
Echinoderms	529,000–3,230,000	6
Non-vertebrate chordates	157,000–1,470,000	9
Agnathes	637,000–2,790,000	4
Elasmobranchs	1,470,000–15,800,000	11
Bony fishes	340,000–139,000,000	409
Amphibians	931,000–84,300,000	91
Reptiles	1,230,000–5,340,000	4
Birds	1,670,000–2,250,000	1
Mammals	1,700,000–6,700,000	4
Monotremes	3,470,000–3,700,000	1
Marsupials	3,470,000–4,560,000	1
Placentals	1,700,000–6,700,000	4
Plants	50,000–307,000,000	6,140
Algae	80,000–30,000,000	375
Pteridophytes	98,000–307,000,000	3,133
Gymnosperms	4,120,000–76,900,000	17
Angiosperms	50,000–125,000,000	2,500

Στους ευκαρυώτες, ο λόγος μεγέθους αγγίζει το 80,000!

*Graur & Li. Fundamentals of Molecular Evolution (1999)*

Το παράδοξο του μεγέθους του γονιδιώματος (C-value paradox): αδυναμία των C-values να αντιστοιχηθούν στη φυλογενετική (μορφολογική) πολυπλοκότητα των οργανισμών

Η μύγα ξυδιού

*Drosophila melanogaster*



180.000 bases

Η ακρίδα

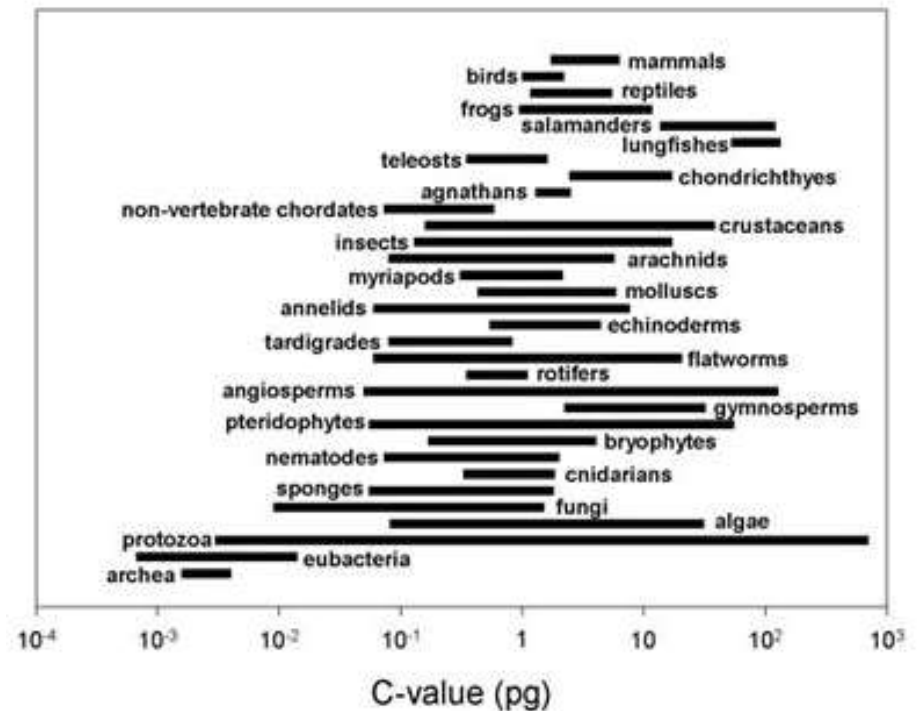
*Podisma pedestris*



18.000.000 bases

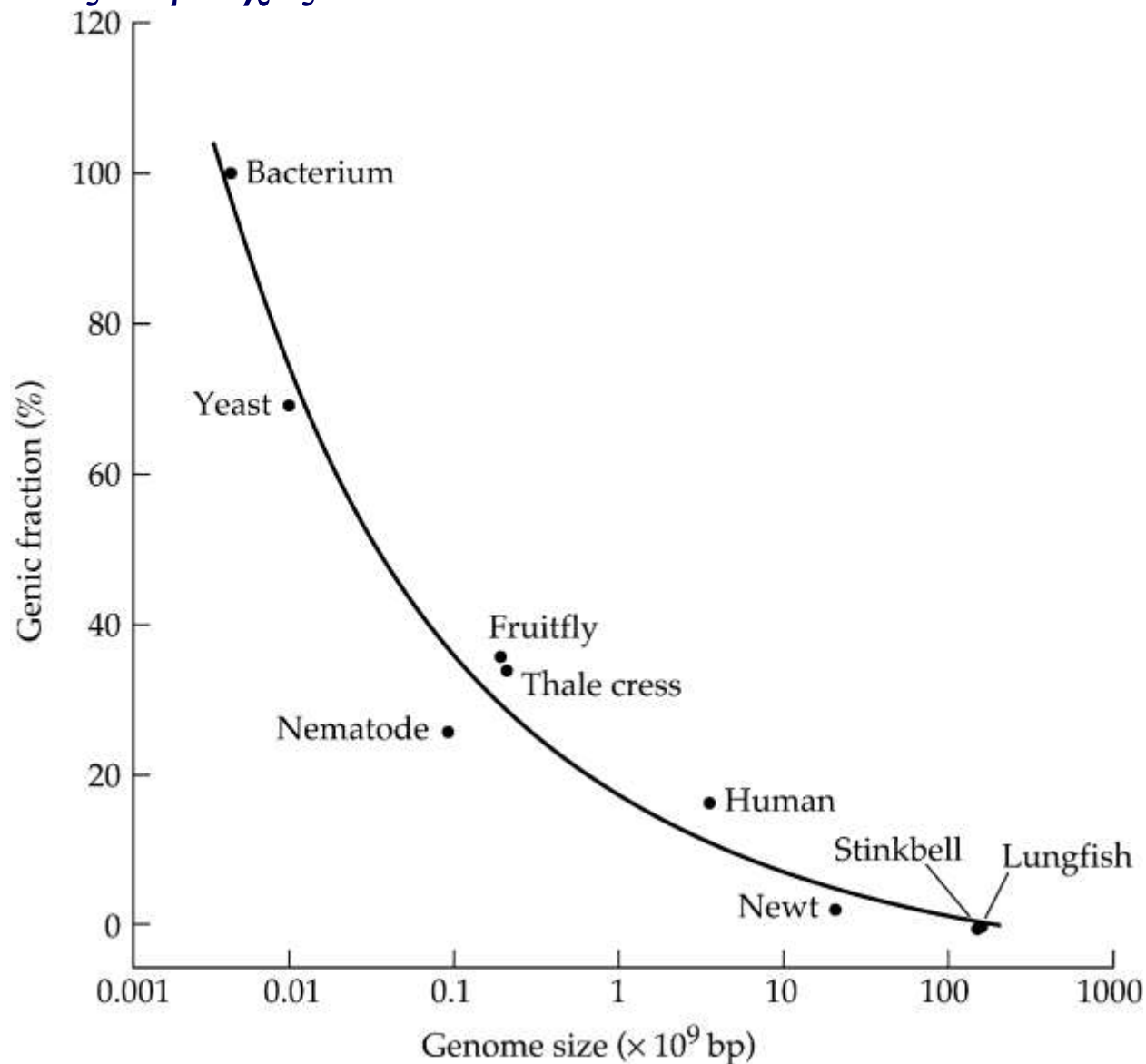
Αυτή η διαφορά (x100) είναι δύσκολο να εξηγηθεί υπό το πρίσμα των σχετικά όμοιων επιπέδων της εξελικτικής, αναπτυξιακής και ηθολογικής πολυπλοκότητας αυτών των οργανισμών

Ένα άλλο ακραίο παράδειγμα παρατηρείται στα αμφίβια, όπου το μικρότερο γονιδίωμα είναι της τάξης του  $10^9$  bp, ενώ το μεγαλύτερο αγγίζει τις  $10^{11}$  bp. Και εδώ είναι εξαιρετικά δύσκολο να πιστέψουμε ότι ο 100-πλάσιος αριθμός γονιδίων είναι απαραίτητος για τον καθορισμό των διαφορετικών ειδών αμφιβίων.



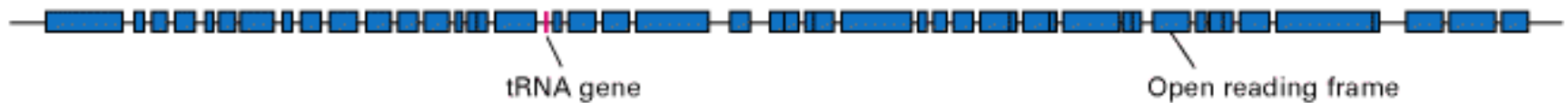


Το κλειδί για την ερμηνεία του C-value paradox βρίσκεται στις μη γονιδιακές περιοχές

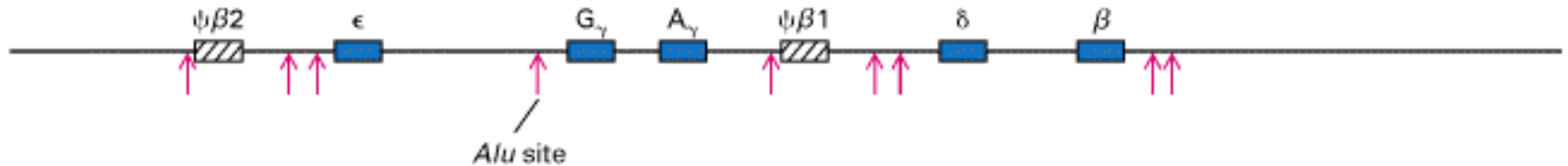


# Σύγκριση μιας περιοχής 80 kilobase στη ζύμη και τον άνθρωπο

(a) *S. cerevisiae* (chromosome III)



(b) Human  $\beta$ -globin gene cluster (chromosome 11)



500 genes  
Extracellular (parasitic)  
bacterium



1,500 genes  
Free-living bacterium



5,000 genes  
Unicellular eukaryote



13,000 genes  
Multicellular eukaryote



25,000 genes  
Higher plants



40,000 genes  
Mammals



Αριθμός γονιδίων  
αυξάνει με την  
αύξηση της  
φυλογενετικής  
πολυπλοκότητας

## Sequenced genomes vary from 470-40,000 genes

Species	Genome (Mb)	Genes	Lethal loci
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0.58	470	~300
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1.11	834	
<i>Haemophilus influenzae</i>	1.83	1,743	
<i>Methanococcus jannaschi</i>	1.66	1,738	
<i>B. subtilis</i>	4.2	4,100	
<i>E. coli</i>	4.6	4,288	1,800
<i>S. cerevisiae</i>	13.5	6,034	1,090
<i>S. pombe</i>	12.5	4,929	
<i>A. thaliana</i>	119	25,498	
<i>O. sativa</i> (rice)	466	~40,000	
<i>D. melanogaster</i>	165	13,601	3,100
<i>C. elegans</i>	97	18,424	
<i>H. sapiens</i>	3,300	<40,000	

Η παραδοξότητα λύθηκε με την ανακάλυψη του DNA που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες και το οποίο εμφανίζει συνήθως μεγάλη επαναληψιμότητα

## Γονιδιακό DNA

Γονίδια (κωδικοποίηση πρωτεϊνών ή RNA) (σε ένα ή πολλά αντίγραφα)

Μόλις το 1-2% του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί πρωτεΐνες

## Μη γονιδιακό DNA (περιοχές του γονιδιώματος χωρίς γνωστή λειτουργία)\*

Εξω-γονιδιακό DNA με μεγάλη επαναληψιμότητα

Satellite DNA (5-100bp) →  $> 10^6$  επαναλήψεις/ γονιδίωμα

Minisatellites (10-60bp) →  $> 10^3$  επαναλήψεις/ γονιδίωμα

Microsatellites (1-6 bp) →  $> 10^4$  επαναλήψεις/ γονιδίωμα

Telomeres (4-8bp)

Μεταθετά στοιχεία (SINEs: 100-300bp, LINEs: 1-5 kb)

Το μη γονιδιακό DNA είναι γνωστό ως *junk DNA*. Όμως κάποιες περιοχές είναι εξαιρετικά συντηρημένες «κρύβοντας» μια κρυμμένη λειτουργία (Koop & Hood 1994).

\* Τεράστιο εξελικτικό ενδιαφέρον αφού, εφόσον δεν είναι λειτουργικό, θα είναι ουδέτερο ως προς την φυσική επιλογή

# Πως μεταφέρεται το γονιδίωμα από τον έναν οργανισμό στον άλλο;

Το γενετικό υλικό μεταφέρεται από τους γονείς στους απογόνους με ένα προβλέψιμο τρόπο και για το λόγο αυτό οι γενετικοί δείκτες μας επιτρέπουν να βγάζουμε συμπεράσματα σχετικά με τις σχέσεις των οργανισμών.

Δεν κληρονομείται όλο το DNA με τον ίδιο τρόπο!

Η κατανόηση των διαφορετικών μεθόδων κληρονόμησης του DNA είναι κρίσιμη και απαραίτητη πριν την πρόβλεψή μας σχετικά με το πώς συμπεριφέρονται οι διαφορετικές περιοχές του γενετικού υλικού κάτω από πολυάριθμα οικολογικά και εξελικτικά σενάρια.

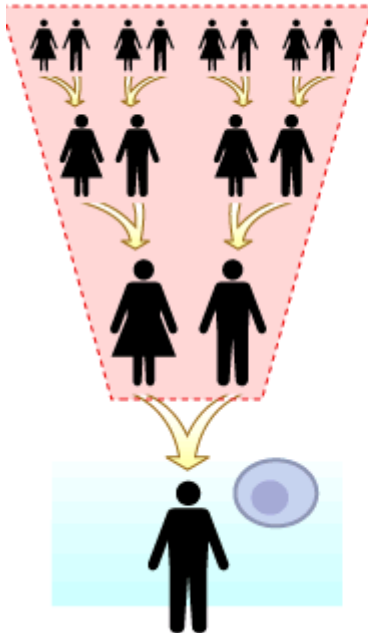


# Πυρηνικό DNA και DNA οργανιδίων κυττάρου

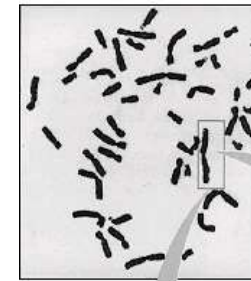
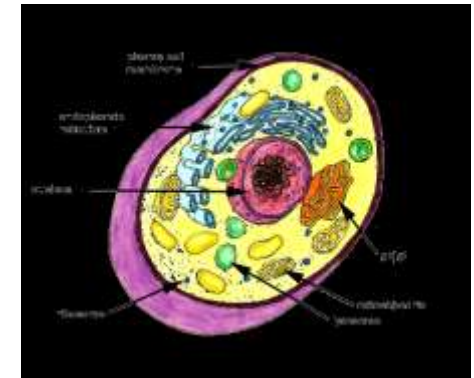
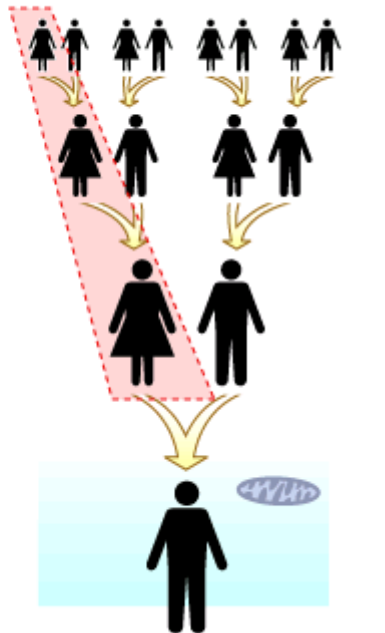
## 1) Διγονεϊκή κληρονομικότητα

π.χ. πυρηνικό DNA

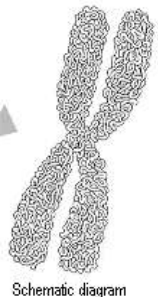
**A.** Nuclear DNA is inherited from all ancestors.



**B.** Mitochondrial DNA is inherited from a single lineage.



Electron microscope image enlarged 30,000 times



Schematic diagram

# Πυρηνικό DNA και DNA οργανιδίων κυττάρου

## 2) Μονογονική κληρονομικότητα

π.χ. Οργανιδιακό DNA

Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και  
Πλαστιδιακό DNA (χλωροπλαστικό DNA)

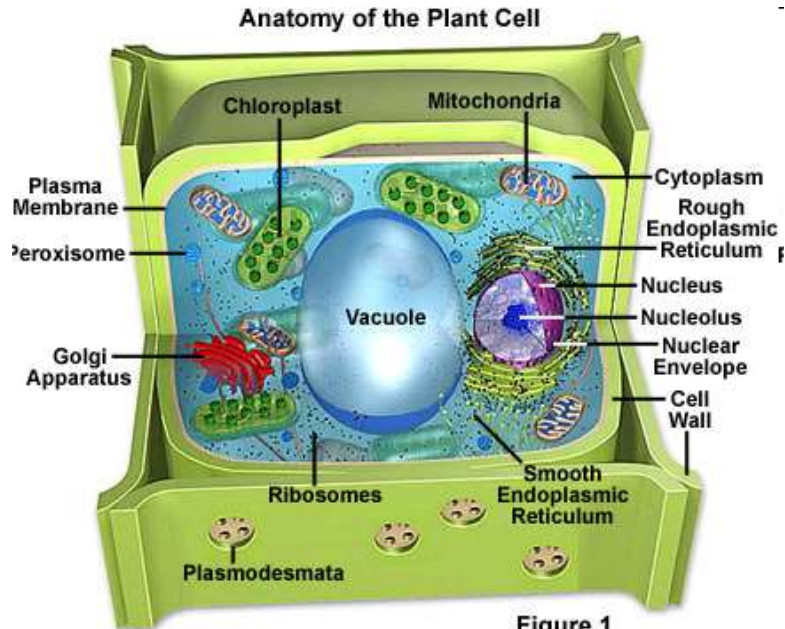
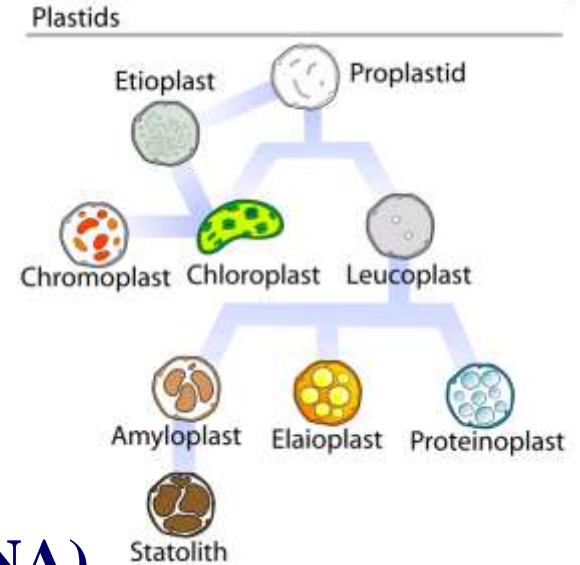
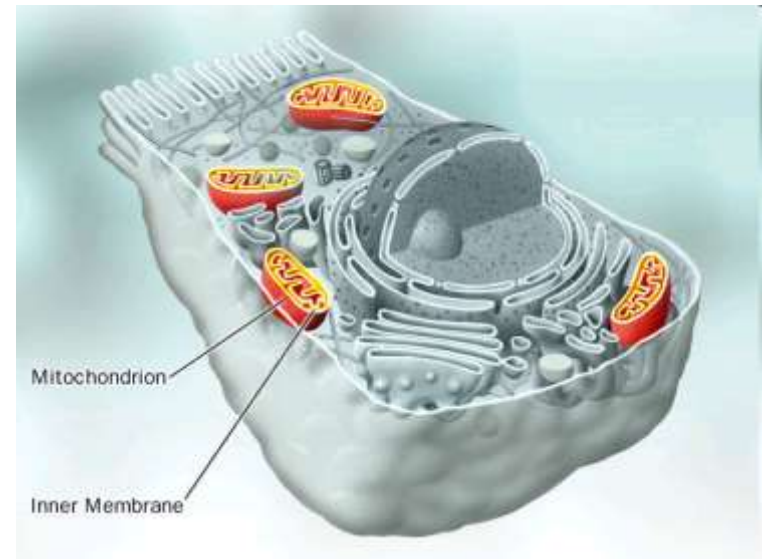


Figure 1



# Μιτοχόνδρια και Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

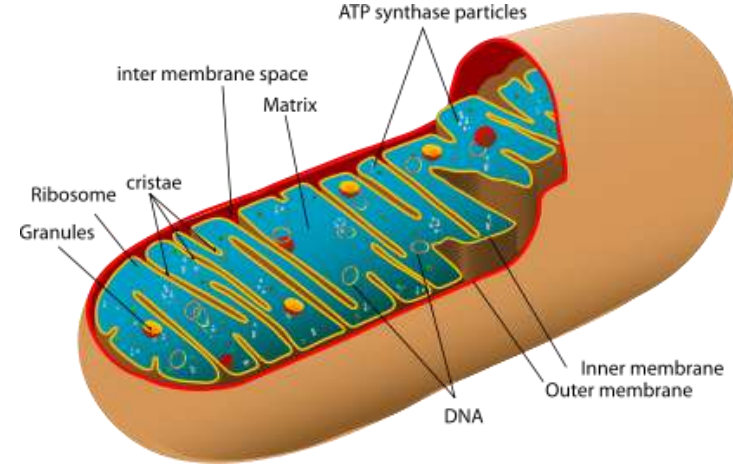


# Μιτοχόνδρια

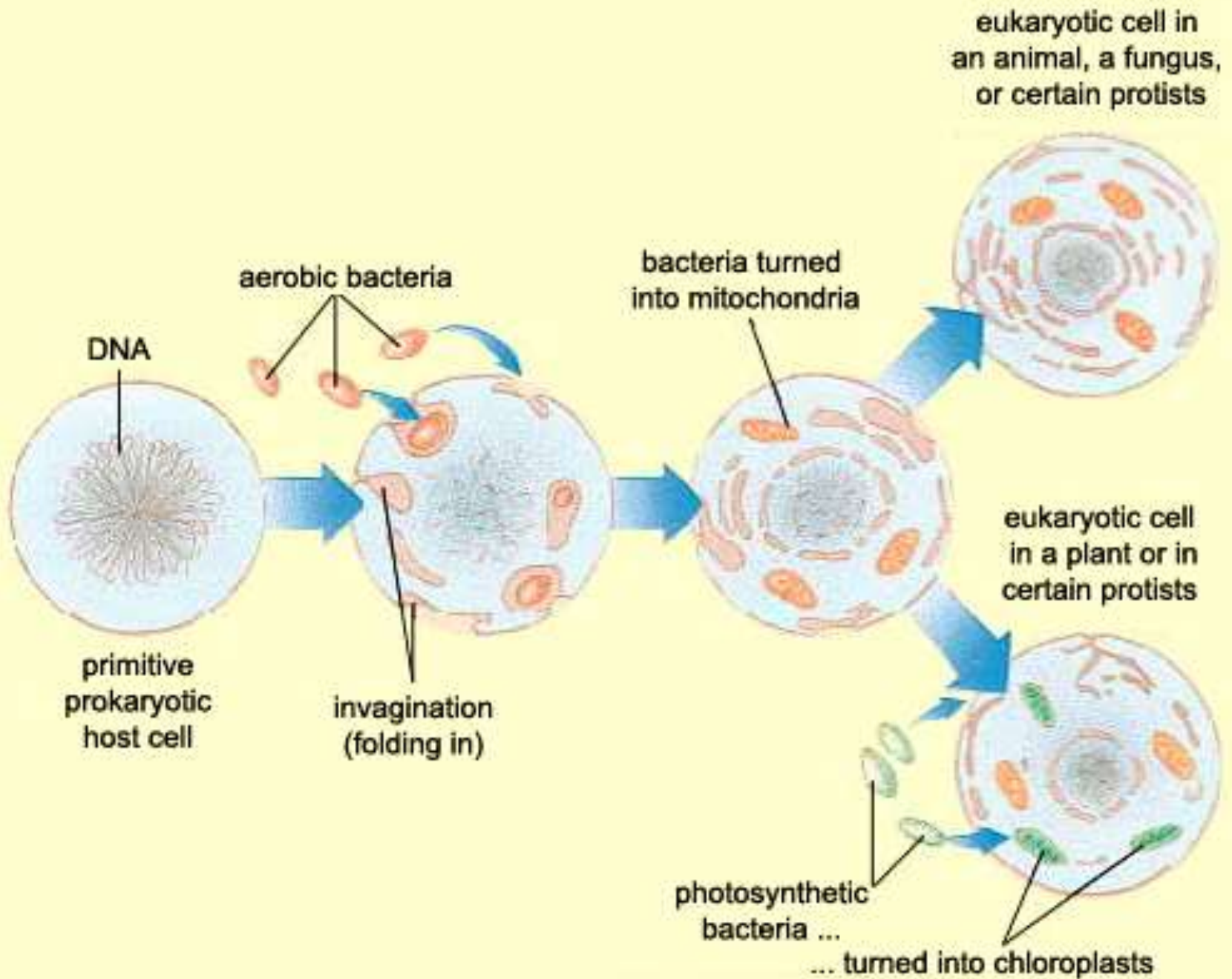
➤ Τα κέντρα παραγωγής ενέργειας

➤ Εκατοντάδες αντίγραφα ανά κύτταρο / σε όλα σχεδόν τα κύτταρα

➤ Ενδοσυμβιωτική θεωρία προέλευσης (θεωρία της Margulis 1970: ελεύθερων α-ροδοβακτηρίων σε αμοιβαδοειδή κύτταρα, προγονικά των σημερινών ευκαρυωτικών).



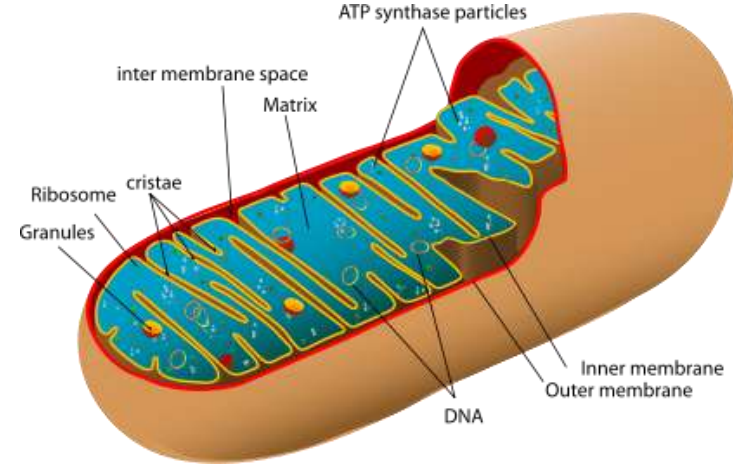






# Μιτοχόνδρια

- Τα κέντρα παραγωγής ενέργειας
- Εκατοντάδες αντίγραφα ανά κύτταρο / σε όλα σχεδόν τα κύτταρα
- Ενδοσυμβιωτική θεωρία προέλευσης (θεωρία της Margulis 1970: ελεύθερων α-ροδοβακτηρίων σε αμοιβαδοειδή κύτταρα, προγονικά των σημερινών ευκαρυωτικών).
- Συνεξέλιξη τα τελευταία 1 δις χρόνια

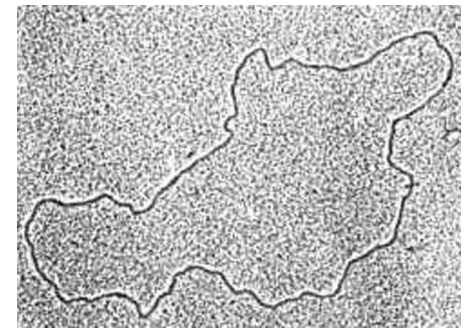


# Ζωικό μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)



**mtDNA: δίκλωνο, κυκλικό, υπερελικωμένο μόριο DNA**

# **Ζωικό mtDNA**



- 1) Κλειστό, κυκλικό μόριο DNA, 16-20Kb σε μήκος**
- 2) Δίκλωνο μόριο**
- 3) Απλοειδές**
- 4) Μονογονική κληρονόμηση**
- 5) Δεν ανασυνδυάζεται**
- 6) Δεν έχει μεταθετά στοιχεία, ψευδογονίδια, ιντρόνια, διαγονιδακές αλληλουχίες και επαναληπτικό DNA**
- 7) Έχει γρήγορο ρυθμό εξέλιξης (5-10 φορές ταχύτερα συγκρινόμενο με το μοναδικό (μη επαναλαμβανόμενο) πυρηνικό DNA)**

# Ζωικό mtDNA

κωδικοποιεί για

13 πρωτεΐνες

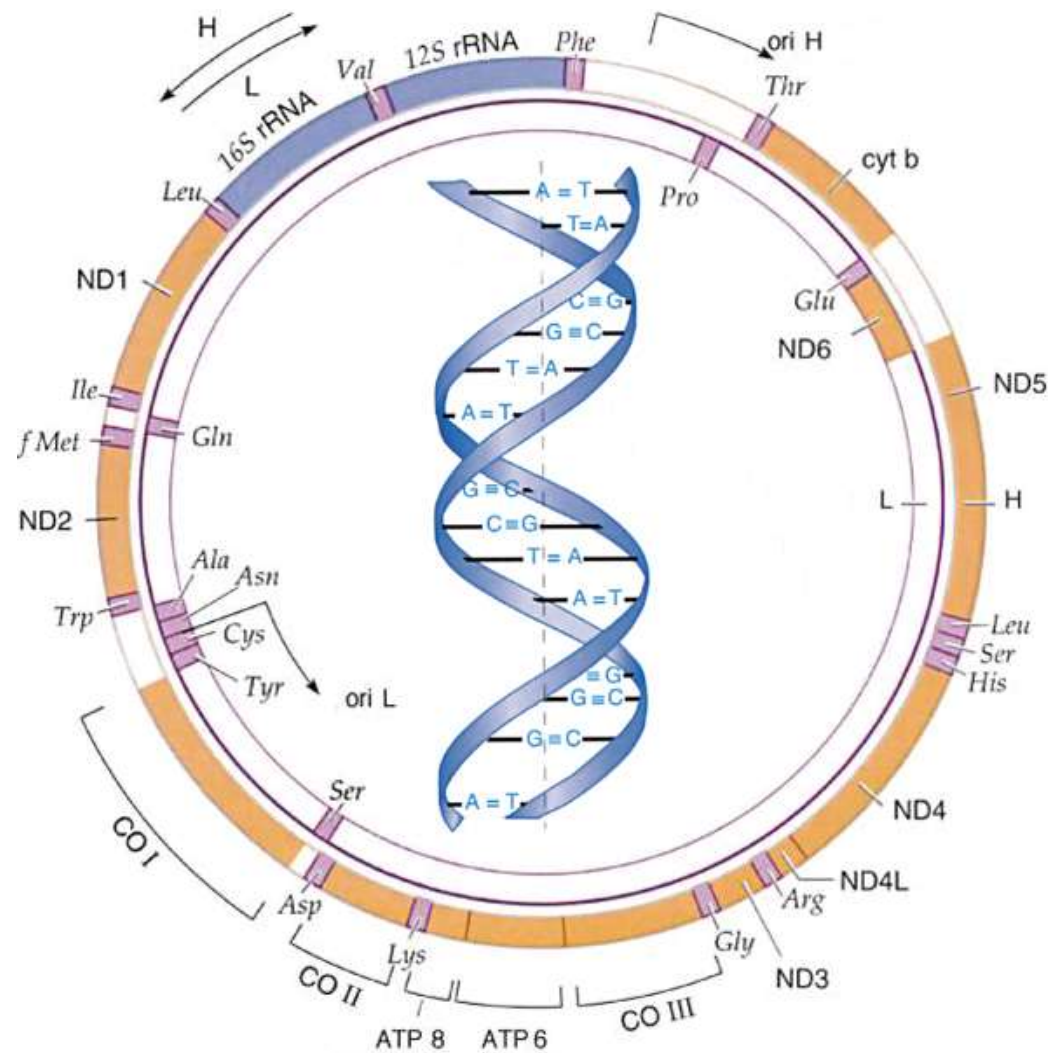
22 μεταφορικά RNAs

2 ριβοσωμικά RNAs

περιοχή ελέγχου

➤ Αλυσίδες mtDNA

Ελαφριά (L) και βαριά (H) αντικατοπτρίζουν τη διαφορά τους στο ποσοστό γουανίνης και θυμίνης (G+T) που περιέχουν



# Ιδιότητες ζωικού mtDNA

- 1) Γρήγορος ρυθμός εξέλιξης
- 2) Σταθερός αριθμός και διάταξη γονιδίων
- 3) Σχετικά σταθερό μήκος
- 4) Απουσία ανασυνδυασμού (ελάχιστες εξαιρέσεις, π.χ. μύδια)



# Ερμηνεία γρήγορου ρυθμού εξέλιξης

- 1) η απουσία ενζύμων διόρθωσης ή η ανικανότητα της μιτοχονδριακής πολυμεράσης να διορθώνει λάθη, επειδή το mtDNA δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του μορίου
- 2) η μεγαλύτερη έκθεση του mtDNA σε οξειδωτικούς παράγοντες, όπως ρίζες και υπεροξειδία
- 3) τα μιτοχόνδρια δεν έχουν αποτελεσματικούς παράγοντες απομάκρυνσης των διμερών πυριμιδίνης

# Φυτικό Μιτοχονδριακό DNA

Στα περισσότερα ανώτερα φυτά κληρονομείται μητρικά

Εξαιρέσεις: Κοκκινόξυλο είδος *Sequoia sempervirens* ⇒ πατρικά,  
Είδη του γένους *Pelargonium* ⇒ αμφότεροι γονείς

- Παρόμοια λειτουργία με το ζωικό, αλλά διαφορετική δομή
- Ανασυνδυάζεται (γρήγορη εξέλιξη μέσω γονιδιακών ανακατατάξεων και διπλασιασμών γονιδίων)
- Μεγάλη ποικιλία μεγέθους (από 40.000 έως 2.500.000bp)
- Αργός ρυθμός νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων (100 φορές πιο αργός από το ζωικό mtDNA)

π.χ. το mtDNA του βρυόφυτου *Marchantia polymorpha*

έχει

μήκος 186.608bp

περιέχει

3 ριβοσωμικά γονίδια (rRNA genes)

29 μεταφορικά RNA (tRNA genes)

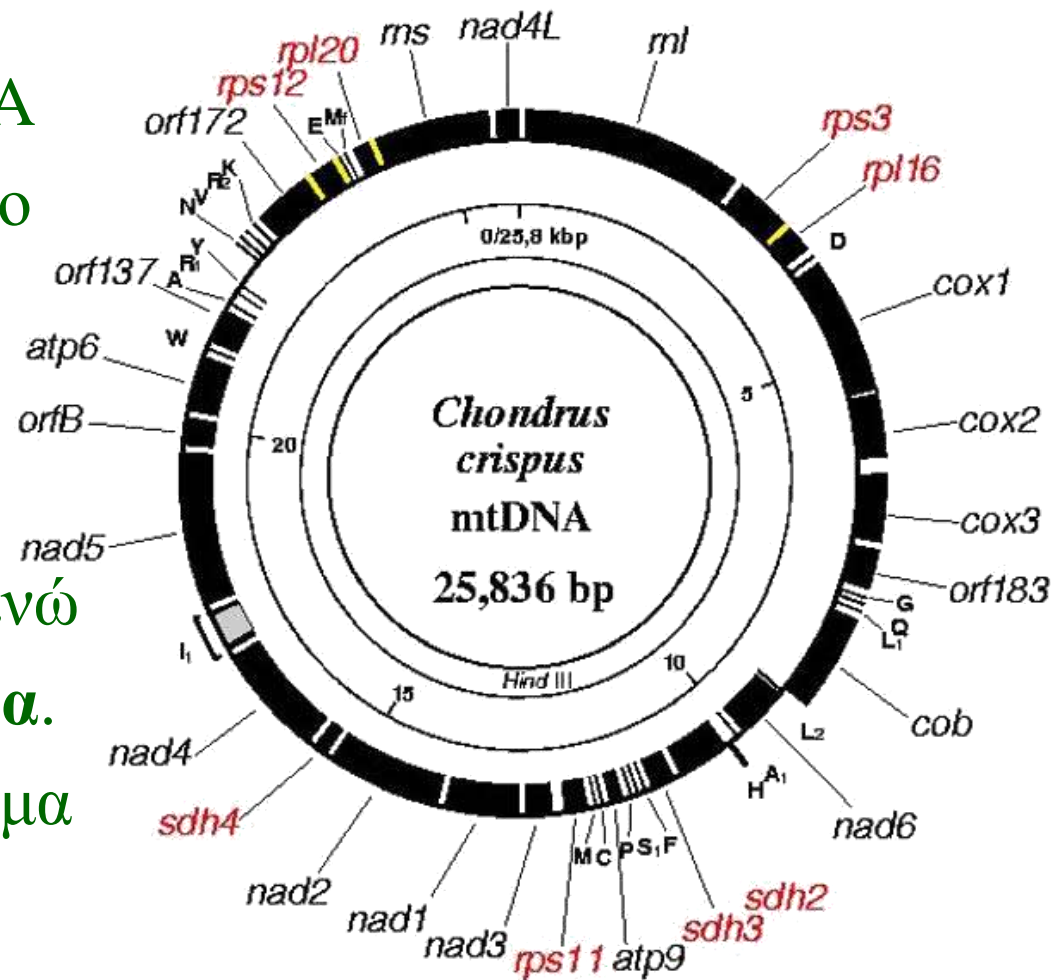
30 πρωτεϊνικά γονίδια με γνωστή λειτουργία και

32 γονίδια με άγνωστη λειτουργία



Γονιδιακή διάταξη του mtDNA στο *Chondrus crispus* (κόκκινο φύκος).

Ο εξωτερικός δακτύλιος μεταγράφεται δεξιόστροφα, ενώ ο εσωτερικός αριστερόστροφα. Τα γονίδια με το κόκκινο χρώμα δεν εντοπίζονται στο ζωικό mtDNA. Τα κίτρινα μεταγράφονται ως τμήματα δύο πρωτεϊνών.



Φυσικά αυτό δεν σημαίνει ότι δεν υπάρχουν χρήσιμες εφαρμογές του φυτικού mtDNA σε μελέτες μοριακής οικολογίας φυτών (π.χ. φυλογεωγραφία)

Διασπορά φυτών μέσω

1) καρπών (συνήθως μικρές αποστάσεις)

2) γύρης (μεγάλες αποστάσεις π.χ. άνεμος)

Μεγάλη διαφορά ως προς την έκταση που μπορούν να ταξιδέψουν (διασπαρθούν)



*Picea maritima*  
Μαύρο έλατο



Αφού το mtDNA είναι **μητρικά** κληρονομήσιμο, η γεωγραφική κατανομή των mtDNA αplotύπων θα αντανakλά τη διασπορά των **καρπών** και δεν θα επηρεάζεται από τη διασπορά της γύρης που περιέχει πατρικής προέλευσης γονότυπο.



*Picea maritima*

*Μαύρο έλατο*



Quebec

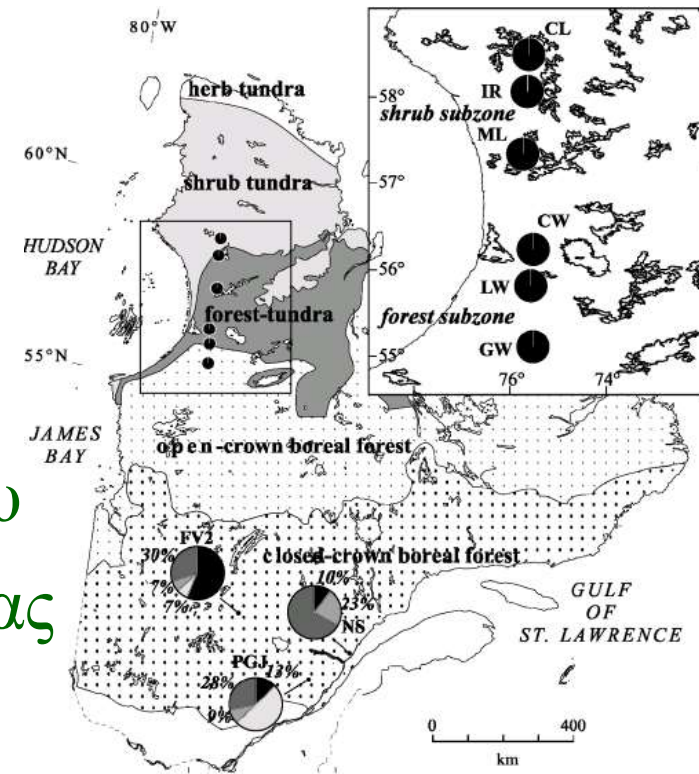
## Στόχος

Ανάλυση 9 πληθυσμών μαύρου έλατου στον Καναδά. Περιοχές δειγματοληψίας

- 1) βόρεια δάση (116 άτομα)
- 2) τούνδρα (124 άτομα)

Στοιχεία: ηλικία < 6.000 χρόνων (παγετώνας)

Δεδομένα: χρήση mtDNA (διασπορά μέσω καρπών) και πυρηνικού DNA

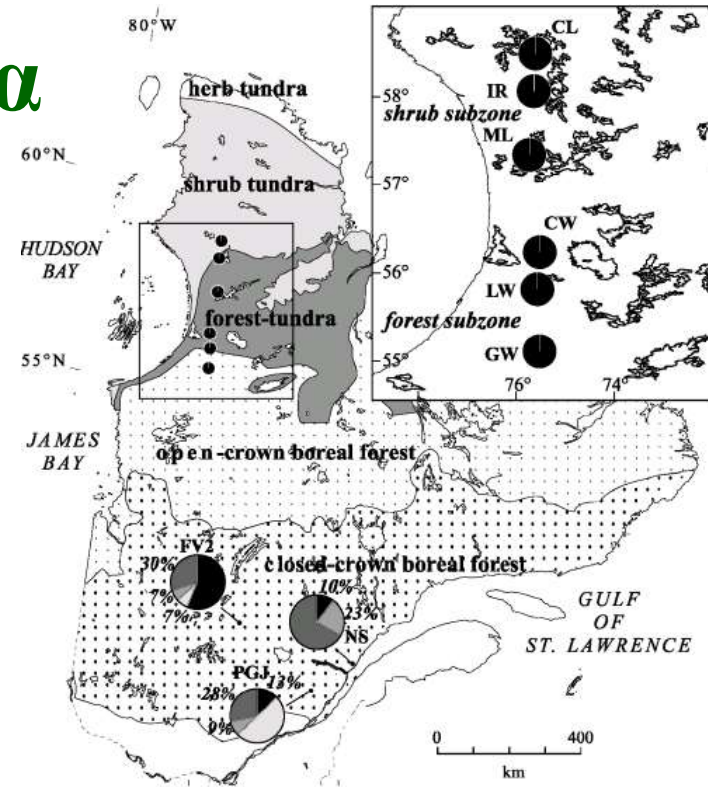


# Αποτελέσματα

**Πυρηνικό DNA:** οι πληθυσμοί από όλες τις ζώνες βλάστησης είναι σημαντικά διαφοροποιημένοι με μικρή ενδοπληθυσμιακή διαφοροποίηση

**Μιτοχονδριακό DNA:**

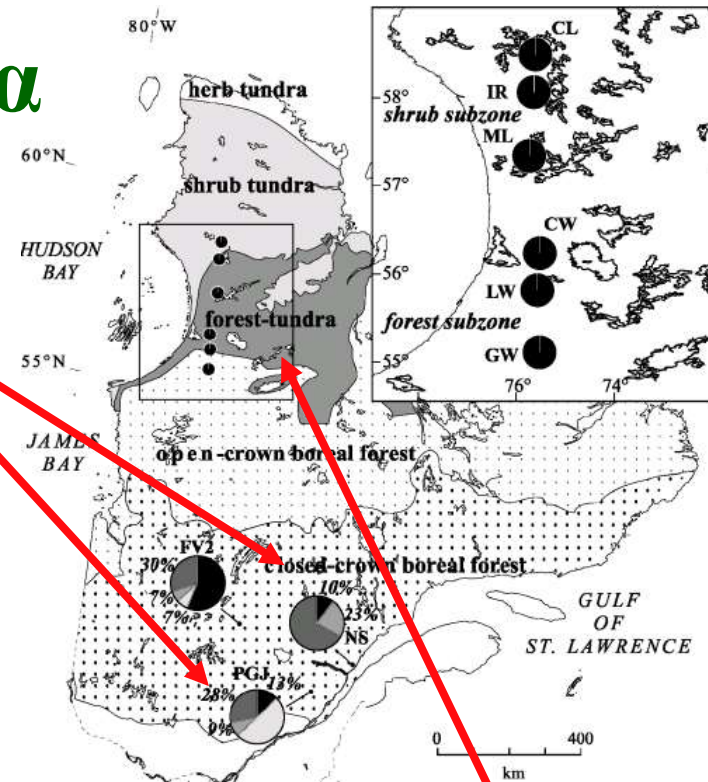
Τα πρότυπα του mtDNA είναι εντυπωσιακά διαφορετικά.



# Αποτελέσματα

➤ Υψηλή mtDNA διαφοροποίηση στους πληθυσμούς των βόρειων δασών

➤ Ένας μόνος απλότυπος για τους βορειότερους πληθυσμούς (τούνδρα)



Η έλλειψη mtDNA ποικιλότητας υποδεικνύει **φαινόμενο ιδρυτή** μέσω μεγάλης απόστασης εποίκησης από καρπούς μετά την παγετώδη, ενώ η αυξημένη πυρηνική διαφοροποίηση πιθανά οφείλεται σε διασπορά μέσω γύρης

# Πλαστίδια και χλωροπλαστικό DNA

Πώς τα φυτά διαφοροποιούνται από τα ζώα;

- 1) Είναι πράσινα
- 2) Πολλά είναι πολυπλοειδικά
- 3) Ο υβριδισμός είναι πολύ κοινός
- 4) Αναπαράγονται αμφιγονικά ή με αυτογονιμοποίηση
- 5) Τα φυτά είναι μόνιμα (δεν μετακινούνται ενεργητικά)
- 6) Το ζευγάριωμα είναι παθητικό (μέσω του ανέμου ή άλλων οργανισμών)
- 7) Παθητική διασπορά (μέσω του ανέμου ή άλλων οργανισμών)
- 8) Κάθε γενιά απογόνων έχει πολλούς πατεράδες



# Γονιδιώματα φυτών

3 τύποι γονιδιωμάτων

- πυρηνικό (nDNA)
- μιτοχονδριακό (mtDNA)
- χωροπλαστικό (cpDNA)

nDNA εξελίσσεται γρηγορότερα

cpDNA 2-4 φορές πιο αργό από το nDNA

mtDNA τουλάχιστον 5 πιο αργό από το nDNA

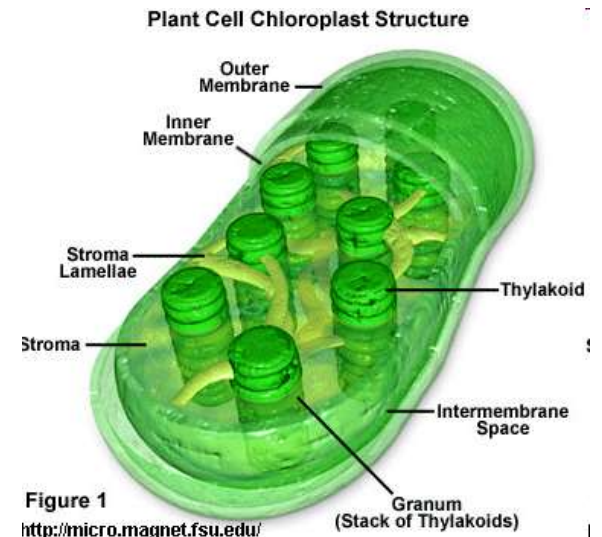
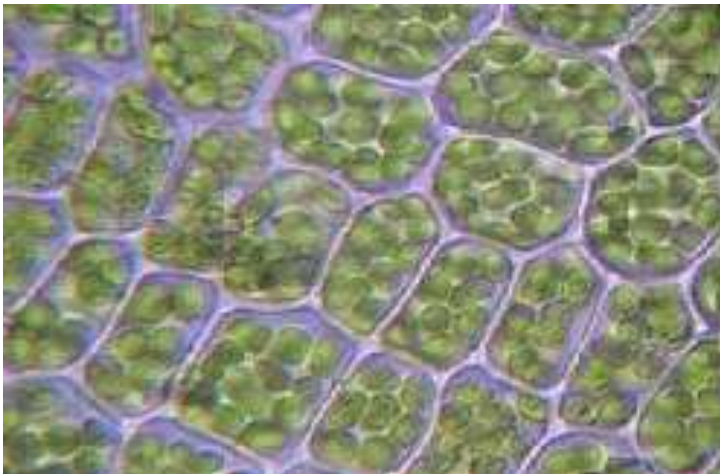
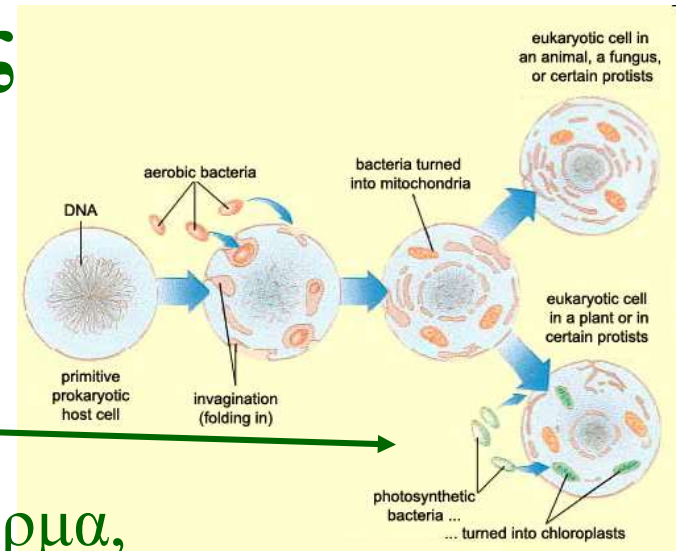
Εμφανίζει συχνές δομικές  
ανακατατάξεις και χαμηλό ρυθμό  
νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων





# Χλωροπλάστες

- 1) Οργανίδια όπου λαμβάνει χώρα η φωτοσύνθεση
- 2) Προέλευση μέσω ενδοσυμβίωσης
- 3) Μητρική κληρονότητα στα αγγειόσπερμα, πατρική στα γυμνόσπερμα
- 4) Σχετικά σταθερή δομή και οργάνωση γονιδίων σε όλα τα φυτά



# Χλωροπλαστικό DNA (cpDNA)

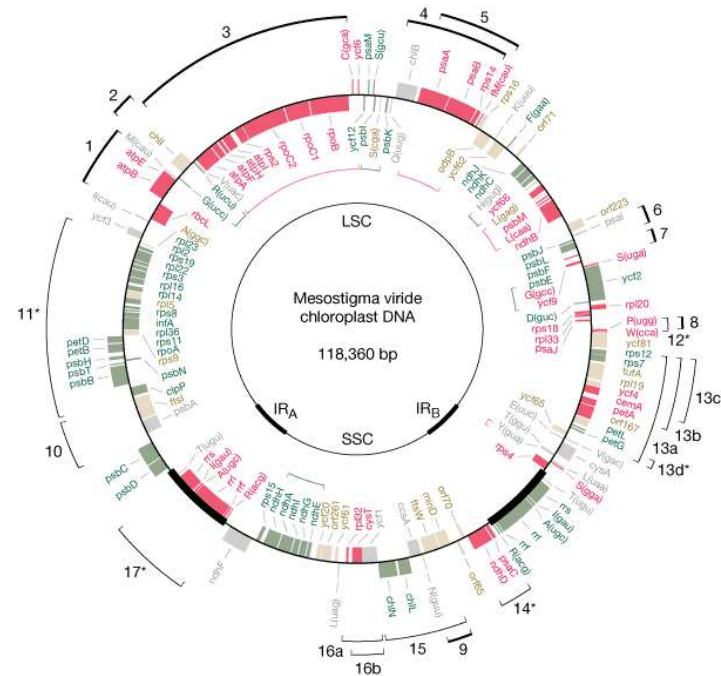
1) Δομικά σταθερό

2) Αργή εξέλιξη – περίπου 4 φορές πιο αργό από το πυρηνικό

- Οι μη κωδικές περιοχές έχουν αντίστοιχο ρυθμό με αυτόν των κωδικών περιοχών του πυρηνικού DNA

3) Απλοειδές

4) Ανασυνδυάζεται, πλήθος επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών



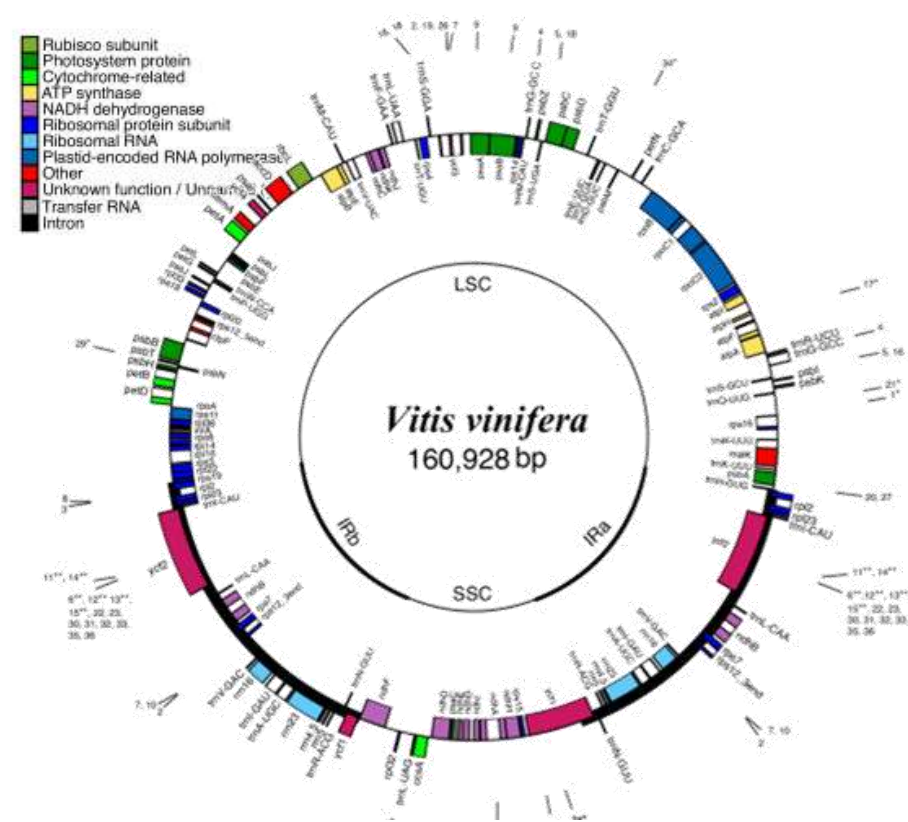
*Mesostigma viride*  
Πράσινο φύκος



Κυκλικό μόριο, ~120 – 220 kb

- 3 περιοχές διατηρούνται σε όλα τα φυτά

- 1) Large Single Copy (LSC)
- 2) Small Single copy (SSC)
- 3) Inverted repeat (IR)



→ Η πλειονότητα της ποικιλότητας παρατηρείται στην περιοχή IR, το μέγεθος της οποίας κυμαίνεται από 20-25 kb

→ Οι IR περιοχές εξελίσσονται πιο αργά – τουλάχιστον 3 φορές πιο αργά σε σχέση με το υπόλοιπο cpDNA

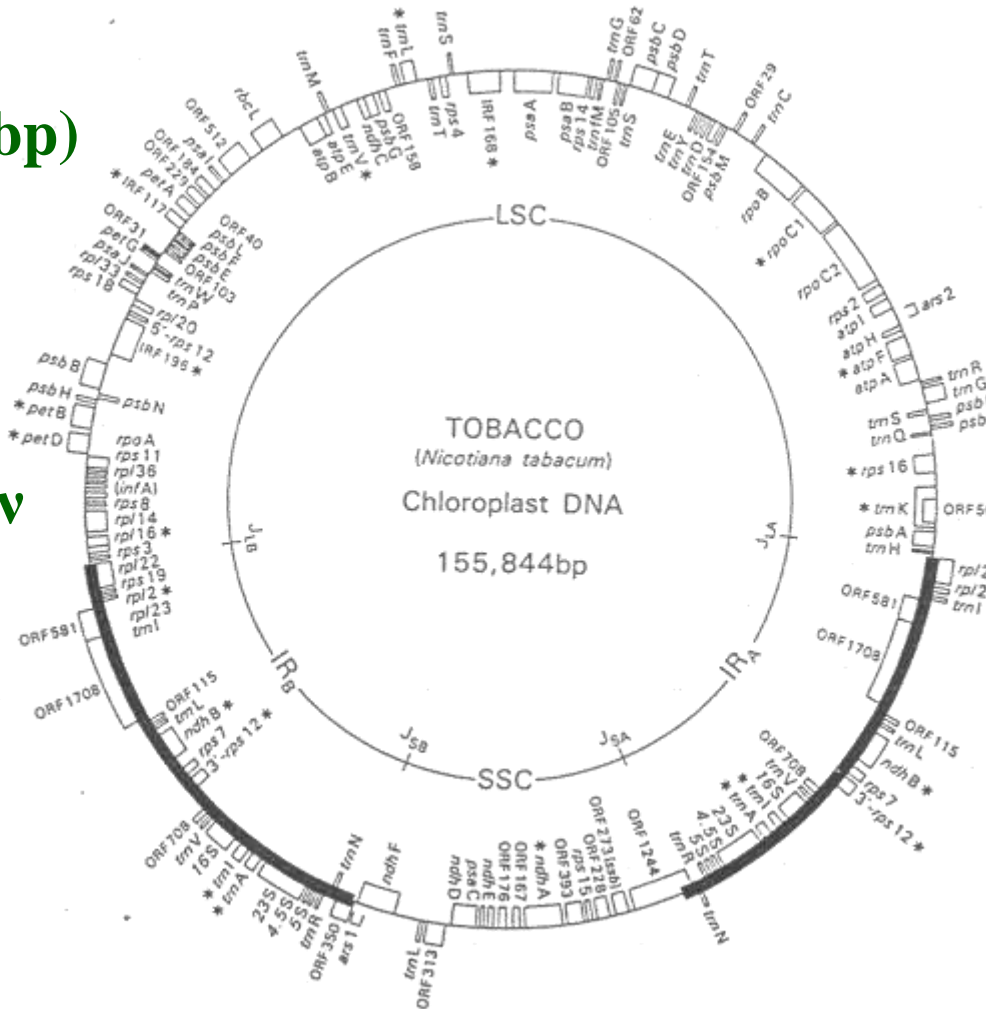
→ Η περιοχή LSC είναι η πιο καλά μελετημένη (φωτοσυνθετικές πρωτεΐνες, rubisco)

# Ο καπνός (*Nicotiana tabacum*)

# cpDNA

έχει 144 γονίδια (155.943bp)

- 98 γονίδια που κωδικοποιούν: ριβοσωμικές πρωτεΐνες, γονίδια φωτοσύνθεσης και αναπνοής των χλωροπλαστών
- 45 δομικά RNAs,
- 1 ψευδογονίδιο



Πηγή: GenBank

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=Retrieve&opt=Overview&list\\_uids=13349](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=Retrieve&opt=Overview&list_uids=13349)

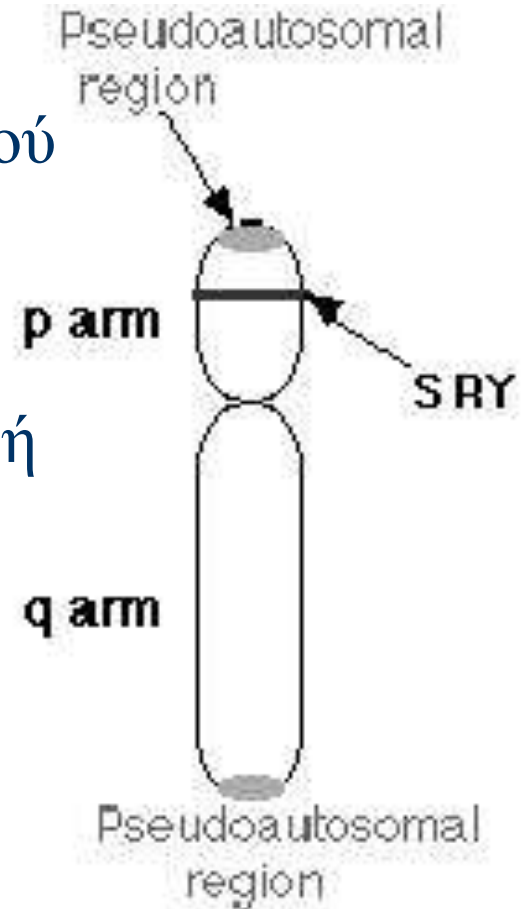
# Εφαρμογές του cpDNA

- 1) Φυλογενετικές αναλύσεις
- 2) Ανακάλυψη ζωνών υβριδισμού
- 3) Προσδιορισμός της προέλευσης των καλλιεργούμενων φυτών από τα άγρια είδη
- 4) Φυλογεωγραφία
- 5) Πληθυσμιακή γενετική



# Μονογονεϊκό πυρηνικό DNA

Το Y χρωμόσωμα μεταβιβάζεται πατρικά, αφού περνάει από τα αρσενικά άτομα **μόνο** στους αρσενικούς απογόνους και επιτρέπει στους ερευνητές να παρακολουθήσουν την μετάβασή του στους πατρικούς γονοτύπους των ζώων, όπως συμβαίνει με τους χλωροπλάστες στα Γυμνόσπερμα.



**Y Χρωμόσωμα των Θηλαστικών.**

**Y chromosome**

**Το γονίδιο SRY «μετατρέπει» το έμβρυο σε αρσενικό.**



Table 5

Evolutionary properties of different genomes and lineages<sup>a</sup>

Genome	Lineage	Inheritance	Point mutations	Size range	Rearrangements
mtDNA	Animals	Maternal	High	14– >30 kb	Very rare
mtDNA	Land plants	Maternal	Low	200–2,500 kb	Very frequent
mtDNA	Fungi	All <sup>b</sup>	Low	20–200 kb	Frequent
cpDNA	Land plants	All <sup>b</sup>	Low	120–217 kb	Rare
nDNA <sup>c</sup>	Animals	Biparental	Moderate	1–1000 × 10 <sup>5</sup> kb	Frequent
nDNA <sup>c</sup>	Land plants	Biparental	Moderate	1–1000 × 10 <sup>5</sup> kb	Frequent
nDNA <sup>c</sup>	Fungi	Biparental	Not known	0.1–10 × 10 <sup>5</sup> kb	Frequent

Data summarized from Cavalier-Smith, 1985; Palmer, 1985a,b; Moritz et al., 1987; Wolfe et al., 1987, 1989a,b; Palmer and Herbon, 1988; and Neale and Sederoff, 1988.

<sup>a</sup> For properties of hypervariable minisatellite and microsatellite loci, see text.

<sup>b</sup> The term “all” refers to maternal, paternal, and biparental modes of inheritance.

<sup>c</sup> nDNA = single-copy nuclear loci.

**Πίνακας 5, σελίδα. 267 από το βιβλίο**

**Dowling et al. 1996. Nucleic Acids III: Analysis of Fragments and Restriction Sites. In Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (eds.) *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA, pp. 249-320.**

# Μονογονεϊκοί γενετικοί δείκτες

## Μειονεκτήματα

1) Κάθε οργανίδιο (μιτοχόνδριο, χλωροπλάστης) συμπεριφέρεται σαν μία μονάδα και το γονιδίωμά του σαν ένας γενετικός τύπος....

*ιχνηλατούμε την ιστορία ενός γενετικού τύπου, που μπορεί να συμφωνεί ή όχι με την εξελικτική ιστορία του υπό εξέταση είδους*

# Μονογονεϊκοί γενετικοί δείκτες

## Μειονεκτήματα

2) Το μικρότερο δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος των mtDNA, cpDNA και Y χρωμόσωματος σε σχέση με το αυτοσωμικό DNA δείχνει ότι οι απλότυποι τους έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εξαφανιστούν.

Η εξαφάνιση απλοτύπων μπορεί να οδηγήσει τους ερευνητές στην υπεραπλούστευση της πληθυσμιακής ιστορίας ή στην υποεκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας.

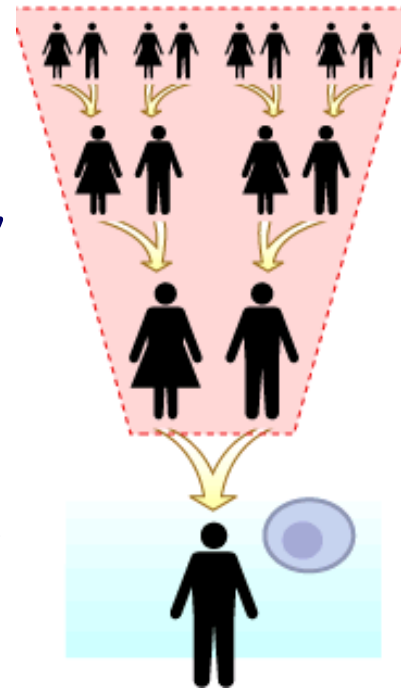
**Δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος:** «ο αριθμός των ενεργά αναπαραγόμενων ατόμων σε ένα ιδεατό πληθυσμό που εμφανίζουν την ίδια δυνατότητα διασποράς των αλληλομόρφων κάτω από τυχαία γενετική παρέκκλιση ή την ίδια πιθανότητα διασταύρωσης όπως όλος ο πληθυσμός».

Το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος (effective population size,  $N_e$ ) είναι συνήθως μικρότερο από το απόλυτο πληθυσμιακό μέγεθος.

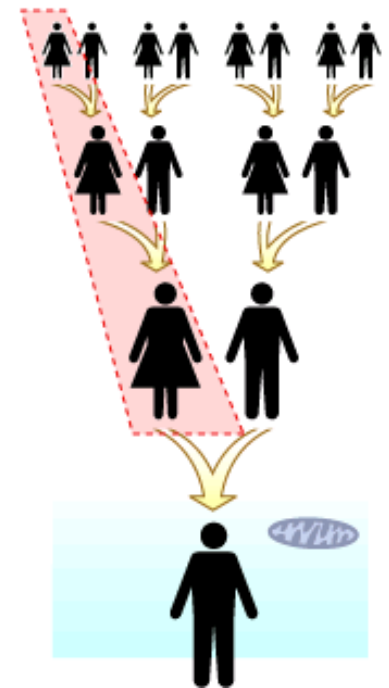
### Γενετική παρέκκλιση:

τυχαίες αλλαγές στις συχνότητες των αλληλομόρφων, συνήθως λόγω δειγματοληψίας από την γενετική δεξαμενή κατά τη μεταβίβαση από τη μια γενιά στην άλλη.

**A.** Nuclear DNA is inherited from all ancestors.



**B.** Mitochondrial DNA is inherited from a single lineage.



# Μειονεκτήματα

3) Οι μονογονικοί γενετικοί δείκτες μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτικοί ολόκληρου του πληθυσμού

π.χ. εάν η μετακίνηση γίνεται μόνο από τα αρσενικά άτομα (τα θηλυκά εμφανίζουν υψηλή φιλοπατρία), τότε τα δεδομένα του mtDNA θα μας οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα σχετικά με την ιστορία των ατόμων και των πληθυσμών



**Παράδειγμα μελέτης: Η φυλογεωγραφία της φάλαινας  
(humpback whale) στον Ειρηνικό ωκεανό.**



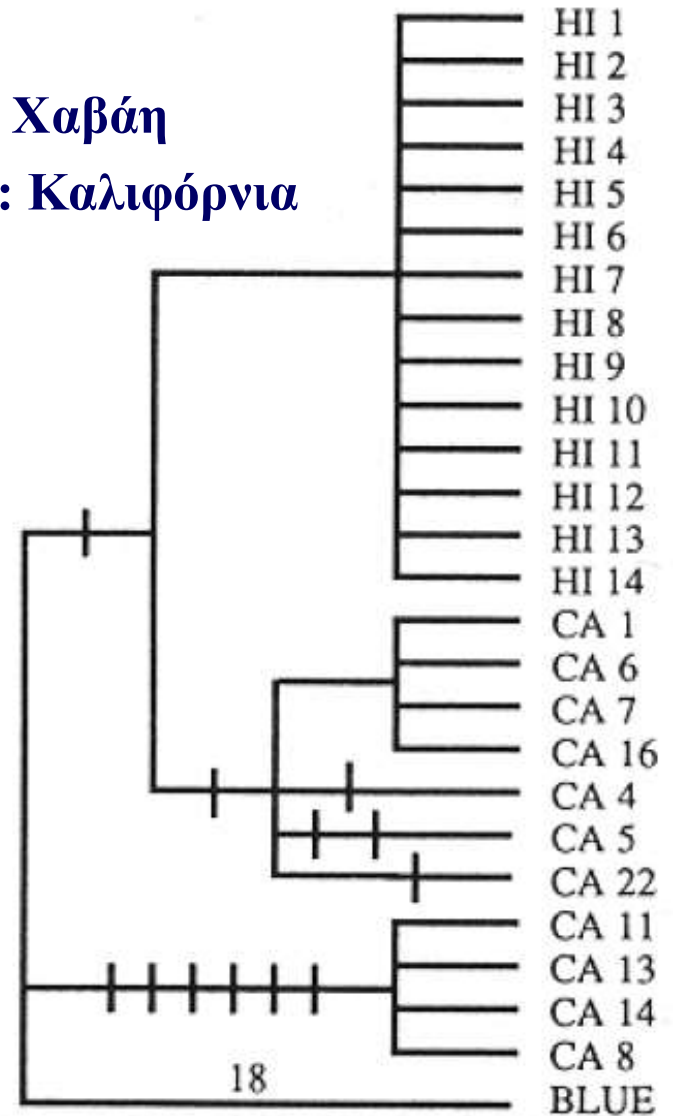
**Palumbi & Baker (1994) *Mol. Biol. Evol.***



➤ Το mtDNA **δεν** έδειξε γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών της Χαβάης και της Καλιφόρνιας

➤ **HI:** Χαβάη

➤ **CA:** Καλιφόρνια



➤ Η χρήση ενός πυρηνικού δείκτη ήταν απαραίτητη για σύγκριση και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων

```

-----ACT 1-----> G R P R H QI----->intron 1
CTGTTTTCACCGTTCATTTGGGAGCTCCCGRACATCAGGIGAGGAAATTTTCTCTGGHACAGAGGAAALRAGGCTRIMUATCTGGIUC
.....T.....
92
CTCTCTGCTCTCGGTACCCCGCTATGGGTATTCATAGATGTCTTTTGTCTCTCCGCCGGAATGATGTAACCATGTTAAAAATGTACCTC
.....T.....G.....
181
TGATGATTCAGCCTCTAGAAATAAGTGGCAATTTAATACACAATGTGTGATAGATTATCTATTGGGTGCTCATCAGATACAAGACTGACTC
.....G.....
271
TTTTCATAAAATCTTTT-GTCTAAATGTAATCACTGTCACTCAGCATCAGAATAATTATGAGTTTATGGGTTATCTGATGTTTCCATAGC
.....C.....T.....G.....
-----ACT 3----->
361
TACTCTTTGGAAAGAACAATAAAAGCCAGGTCACCTCACTCTCACAGAACCTAAATGTAGATGAAATAAACACTGTITACCAAATG
..G.G.....G.....T.....
451
TAAATTTACATCTGTGTAGCTGTCAACAAAATACATCTGGACAGCCACGTGATTAATTTACGTAGCATTATGTAGAAACAAAATGCTGATG
.....G.....A.....G.....A.....G.....T.....
541
GCAGCCACAGGGTAAAAAAGTGAAGATTTCACTCTCAGAAATCTCCCTTCACAGCAGAAACCTAATTTGCACATTGAGCCATATCTGATGAT
.....C.....
631
ATTTAAGCTTTCAATTTGGCATAGATTCACAGAACAATAACAGAAAGCTTTCCCCATGAATGAACTCTGGCCCTTTGTTGAACCTTTTG
.....A.....T.....C.....T.....A.....G.....
721
GGATGGAGATATTTTCATAAATCACTACTTATGGAACCTATAGTAGCC-----AAGTCACCTCCAGTGCATTTTAA
.....ACGACTGTTTTGCAATTTT.....ACGACTGTTTTGCAATTTT.....
911
ATTTTAGTAAATGAGATTTTCTCTTTTGGAAAGCTTCAATGATTAATAAATACGTCCTCCACTTAATGATTAATAAATACATCCCACTACT
.....C.....T.....A.....
901
TTGCGCGAGATCTGAAATCTTCATTTGGTATGAAATTTATATACAAAATCAAGCGACACTGATCAITTTGAGAAATAATCTTTTTCGTTAT
.....G.....G.....
991
AACCCCTACATATACTCTCCCTAGCTCAGAACTTGAAAACCTACACTTTAAAGCATTTFATACAGCCAAAATCCCAATTAACATAATATCT
.....A.....T.....C.....
1081
AAAAATTTTAAATATCCATTTCAGCAAAATAATGATTTAGTCC--CGAATATGTCGCCAGGCCAATTTGTCATAGTGGGCAACAGACAGATACA
.....A.....G.....C.....G.....
1171
ATCTTTGCCCTAAGAGAGCTCATCAAGGGATGTAGAAGATACATGACACBAAGTTCCTTACCCCCAGGGTCTCTGCTATTGAGAGAA
.....A.....
1261
CTAGTCAGGCCTGTTTCCAAATCAACTAAGACTGTTTCTTAAGAATCTTAGTGACGGTAGGATTCAGCATATCATTTGTTGGTACCGGAAGGA
.....A.....T.....T.....A..... |KpnI|
1351
ACTTTCTATCCCAATGATTTAAACCTTTTGTCTTGGACGTAATCAGTTCACAGTTTCTGAGAGAGCTGGCTGGTACCTGTTGAACCT
.....G.....C.....T.....A.....AC.....
<intron|G V <-----ACT 2-----
TTTTTAGGGGGTGTGTTGGTTCGGTATGGGCAGAGGAC Humpback whale
.....A..... Blue whale
.....G..... Bowhead whale

```

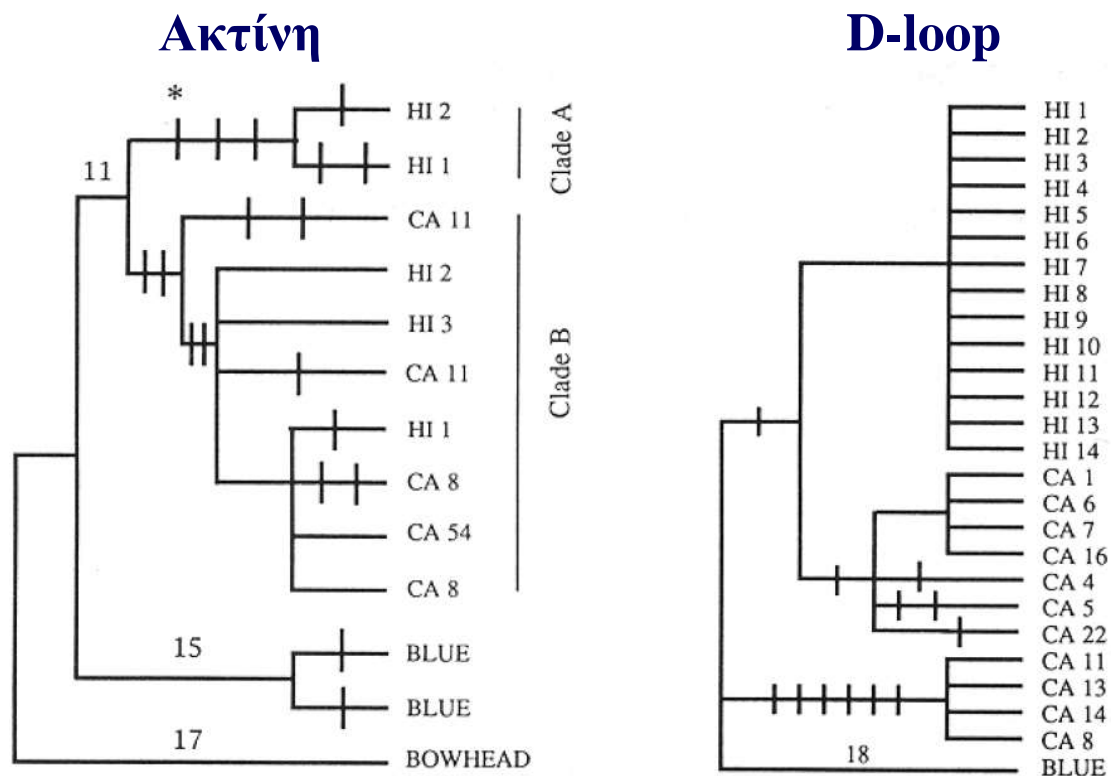
➤ Επέλεξαν την ακτίνη γιατί πρόκειται για γονίδιο με εξώνια (κωδικές περιοχές), που είναι σχετικά συντηρημένα σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών. Παράλληλα διαθέτει και εσώνια, των οποίων η θέση και το μήκος, είναι σχετικά σταθερά σε όλα τα είδη

➤ Σχεδίασαν εκκινήτες στις περιοχές των εξωνίων με στόχο να πολλαπλασιάσουν τις ενδιάμεσες περιοχές των εσωνίων

➤ Το εφάρμοσαν στις φάλαινες

FIG. 2.—Complete actin intron sequences for representative blue and humpback whales. The original primers, the flanking codons, and the intron/exon boundaries are shown above the sequence. A dash (-) represents a deletion.

- Πέντε άτομα από κάθε πληθυσμό αλληλουχήθηκαν για το εσώνιο της ακτίνης
- Οι δέκα αλληλουχίες αποκάλυψαν 8 διαφορετικά αλληλόμορφα (απλότυπους), όπου δημιουργούν ομάδες που δεν σχετίζονται με τη γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων.



- Η έλλειψη γεωγραφικού προτύπου είναι ένδειξη παρουσίας γονιδιακής ροής

## Όμως το mtDNA έδειξε δύο διακριτές ομάδες

Ωστόσο τα αντίθετα αποτελέσματα των δύο τύπων γονιδιωμάτων δεν είναι παράδοξο

Οι θηλυκές φάλαινες είναι λιγότερο κινητικές από τις αρσενικές και έτσι το μητρικά κληρονομήσιμο mtDNA δείχνει ισχυρό γεωγραφικό πρότυπο, ενώ το πυρηνικό όχι, υποδεικνύοντας γονιδιακή ροή μεταξύ των θηλυκών και ιδιαίτερα κινητικών αρσενικών ατόμων



# Μειονεκτήματα

## 4) Μιτοχονδριακά ψευδογονίδια ή numts (nuclear copies of mtDNA sequences)

αντίγραφα του mtDNA που μεταφέρονται στο πυρηνικό γονιδίωμα και συνεχίζουν (ως μη λειτουργικά) να εξελίσσονται ανεξάρτητα από το mtDNA. Το πρόβλημα εδώ δημιουργείται κατά τη διάρκεια της PCR, εάν οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών έχουν συντηρηθεί και στο ψευδογονίδιο, με αποτέλεσμα κατά την PCR θα πολλαπλασιαστεί και αυτό ή μόνο αυτό το γονίδιο, αντί του επιθυμητού γονιδίου μιτοχονδριακού γονιδίου.

## ➤ Αρχαίο DNA (aDNA)

### DNA Sequence from Cretaceous Period Bone Fragments

Scott R. Woodward,\* Nathan J. Weyand, Mark Bunnell

DNA was extracted from 80-million-year-old bone fragments found in strata of the Upper Cretaceous Blackhawk Formation in the roof of an underground coal mine in eastern Utah. This DNA was used as the template in a polymerase chain reaction that amplified and sequenced a portion of the gene encoding mitochondrial cytochrome b. These sequences differ from all other cytochrome b sequences investigated, including those in the GenBank and European Molecular Biology Laboratory databases. DNA isolated from these bone fragments and the resulting gene sequences demonstrate that small fragments of DNA may survive in bone for millions of years.

SCIENCE • VOL. 266 • 18 NOVEMBER 1994

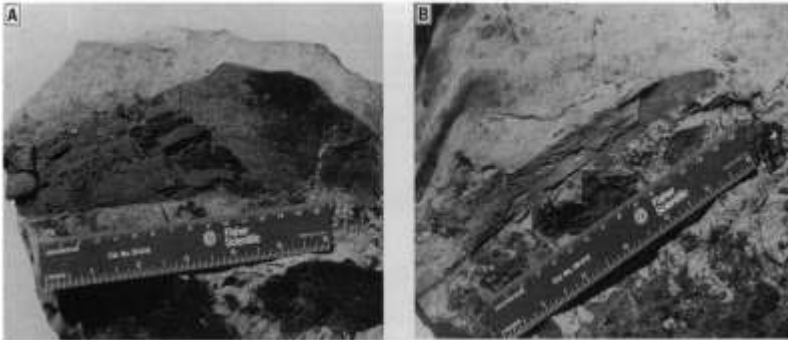
1229



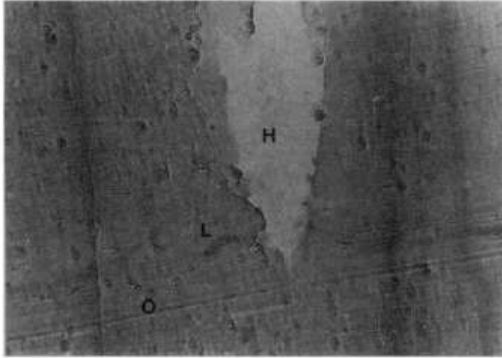
### ➤ Η κατάσταση του άνθρακα στο στρώμα που βρέθηκε υποδεικνύουν:

- ✓ ότι τα ιζήματα έχουν ενταφιαστεί σε βάθος **3 km** και
- ✓ έχουν υποβληθεί σε θερμοκρασίες **90 –95°C**

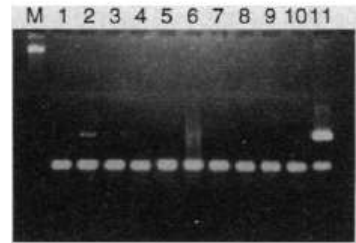
➤ **Επιβίωση = Απίθανη**



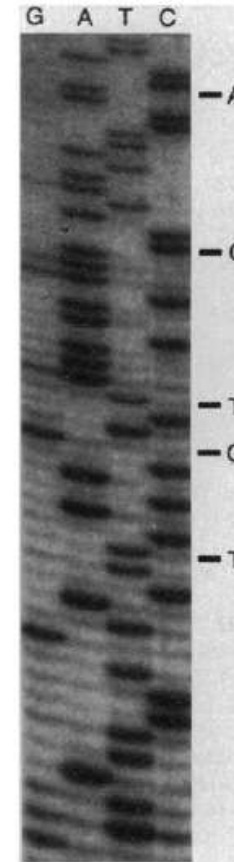
## ➤ Αρχαίο DNA (aDNA)



**Fig. 3.** Light microscope section of bone fragment number 1. The section was blocked in paraffin, decalcified, and stained with hematoxylin and eosin. A haversian canal is evident in the center (H). It is lined with possible cells with darkly staining nuclei. Other osteocytes are present in the matrix (O), also with possible nuclei. Numerous lacunae (L) are also present. An adjacent section stained with trichrome demonstrated the presence of collagen.



**Fig. 4.** Amplification product of DNA recovered from the bone fragments, showing the 174-bp fragment produced from primers designed for a conserved region of the gene encoding cytochrome b. Lanes representing negative controls are clean. M indicates the 123-bp marker. Lanes 1 to 3, ancient DNA amplifications with a positive result in lane 2. Lanes 4 to 6, extraction reagent controls. Lanes 7 to 10, amplification-negative controls (all amplification reagents with double-distilled H<sub>2</sub>O in place of ancient DNA). Lane 11, positive control.



**Fig. 5.** Sequencing gel of sequence 3-37, showing regions of polymorphisms compared with the consensus sequence.

Η αλληλουχία (cyt b) διέφερε εξίσου από αντίστοιχες αλληλουχίες πουλιών, ερπετών και θηλαστικών



Πιθανά έχει διατηρηθεί στο οστό, οπότε πρόκειται για DNA δεινοσαύρου.

## ➤ Αρχαίο DNA (aDNA)



➤ Τελικά: προϊόν μόλυνσης

# **Ανακεφαλαίωση**

**Σημαντικές θεωρήσεις για την επιλογή των  
γενετικών δεικτών**

**Ακρίβεια και ευαισθησία των γενετικών δεικτών**

**Συσχετισμένοι/ασυσχέτιστοι δείκτες**

**Multilocus/single locus**

**Παραγωγή γονιδιακών γενεαλογιών**

**Πυρηνικό/οργανιδιακό DNA**

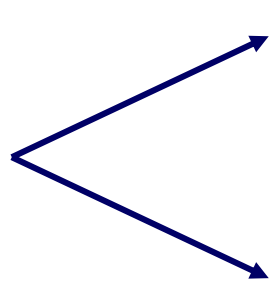
**Γρήγορη ανάπτυξη**

**Γρήγορο διάβασμα (παραγωγή δεδομένων)**



# Ποιους δείκτες χρησιμοποιούμε;

Οι γενετικοί δείκτες  
διακρίνονται σε δύο  
μεγάλες κατηγορίες



οι κυρίαρχοι (dominant)

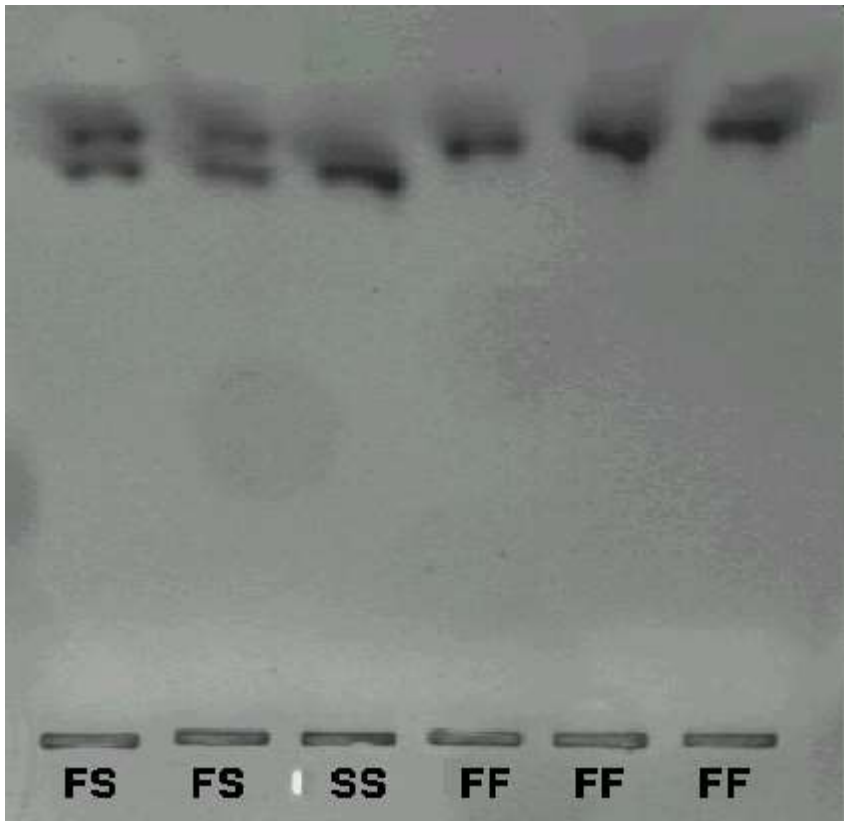
οι συγκυρίαρχοι (co-dominant)

Οι συγκυρίαρχοι δείκτες είναι αυτοί στους οποίους τα ομόζυγα και τα ετερόζυγα άτομα μπορούν να διακριθούν

Ουσιαστικά οι κυρίαρχοι δείκτες μας επιτρέπουν την ανάλυση πολλών γενετικών τόπων την ίδια στιγμή, ενώ οι συγκυρίαρχοι μόνο ενός.

# ΑΛΛΟΕΝΖΥΜΑ

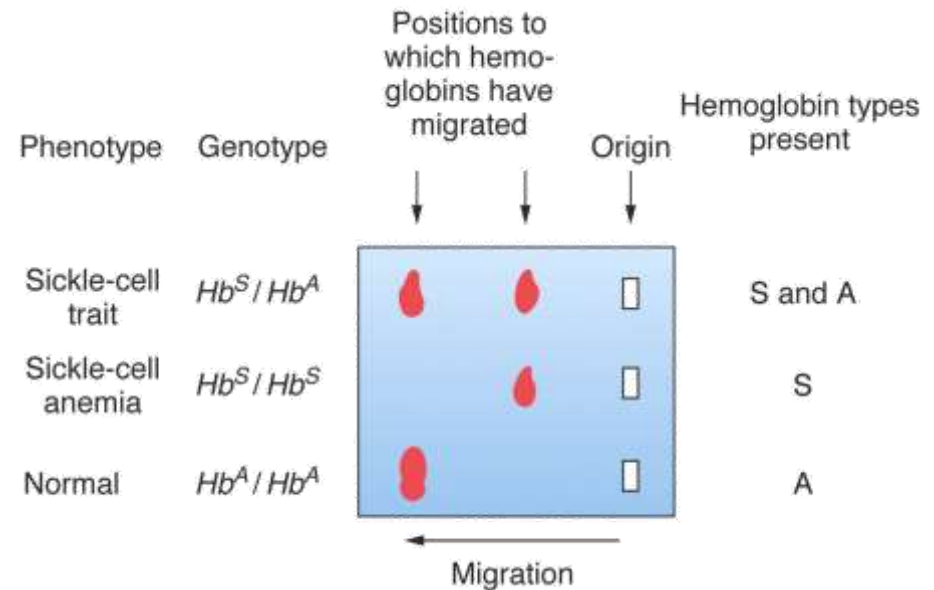
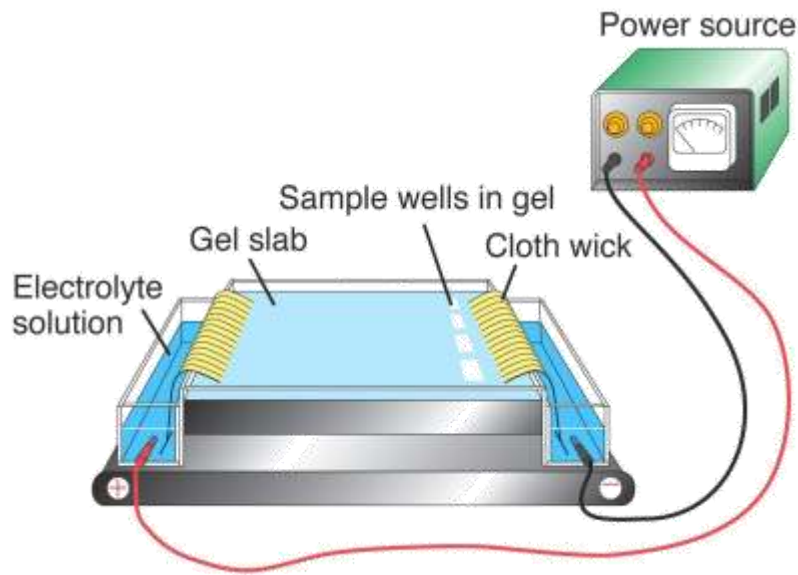
## Πολυμορφισμός σε επίπεδο πρωτεϊνών



Οι περισσότερες μελέτες στα πρώτα χρόνια της μοριακής οικολογίας βασίζονταν σε πολυμορφικότητα πρωτεϊνών.

Η πολυμορφικότητά τους καθορίζεται από την μετακίνηση των πρωτεϊνών μέσα σε ένα πήκτωμα (gel: που δρα ως μοριακό κόσκινο) υπό την δράση ηλεκτρικού πεδίου.

Διαφορετικά αλληλόμορφα του ίδιου γενετικού τόπου κινούνται σε διαφορετικές αποστάσεις μέσα στο πήκτωμα, επειδή τα αμινοξέα που συνθέτουν τις πρωτεΐνες έχουν διαφορετικό ηλεκτρικό φορτίο και μοριακό βάρος.



## **Κατηγορία**

- Συγκυρίαρχος γενετικός δείκτης με ανάλυση ενός τόπου κάθε φορά.
- Εκτίμηση πρωτεϊνικής ποικιλομορφίας που αντανακλά την ποικιλομορφία σε επίπεδο DNA (πυρηνικό DNA που κωδικοποιεί πρωτεΐνες)

## **Χαρακτηριστικά**

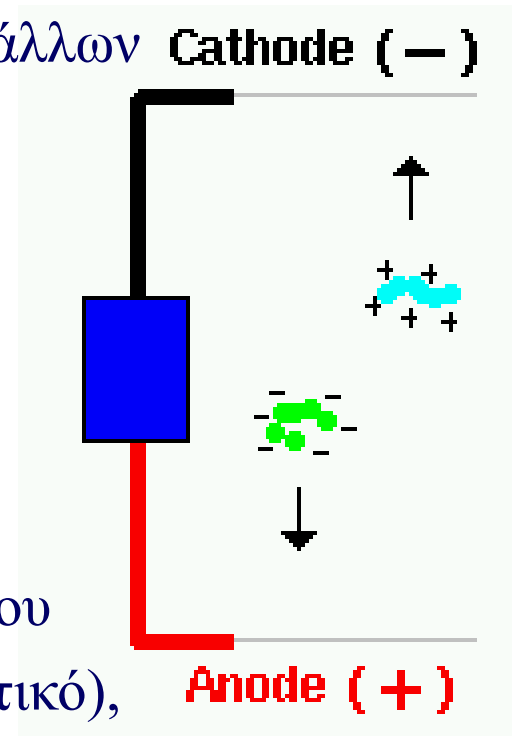
- Μικρή έως μέση ποικιλότητα
- Χαμηλό κόστος
- Εύκολη συσχέτιση (σύγκριση με άλλες μελέτες)

# Τι είναι ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα?

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (στερεό και κολλώδες) είναι η μέθοδος που **διαχωρίζει** μακρομόρια -νουκλεϊκά οξέα ή πρωτεΐνες- βάσει **μεγέθους, ηλεκτρικού φορτίου** και άλλων φυσικών ιδιοτήτων.

Ο όρος ηλεκτροφόρηση περιγράφει την μετακίνηση σωματιδίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Πολλά βιολογικά μακρομόρια έχουν ιοντικές ομάδες που τους προσδίδουν ένα ηλεκτρικό φορτίο (αρνητικό ή θετικό), βάσει του οποίου κινούνται προς την άνοδο ή την κάθοδο.

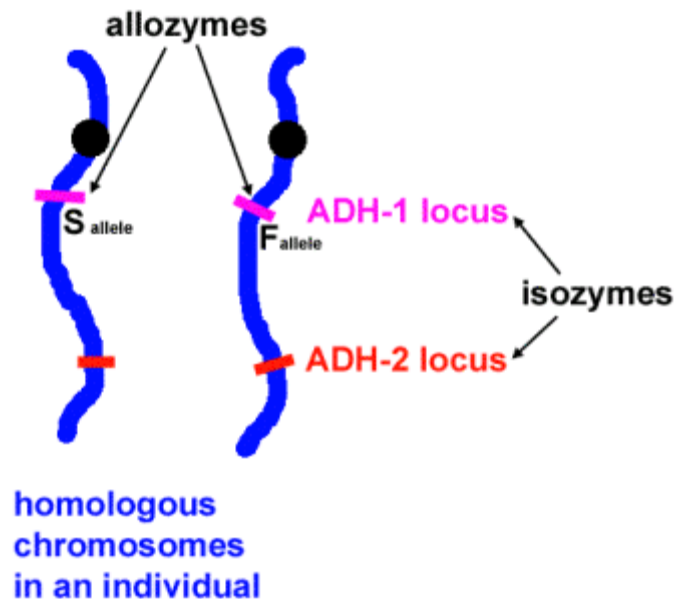




# Αλλοένζυμα και Ισοένζυμα

**Αλλοένζυμα** είναι ένζυμα (πρωτεΐνες) που κωδικοποιούνται από διαφορετικά αλληλόμορφα του ίδιου γενετικού τόπου.

**Ισοένζυμα** είναι λειτουργικά ισοδύναμες μορφές ενζύμων (επιτελούν την ίδια λειτουργία), αλλά κωδικοποιούνται από διαφορετικούς γενετικούς τόπους (γονίδια).



# Ένα προς ένα τα βήματα για τον έλεγχο ποικιλομορφίας σε αλλοένζυμα



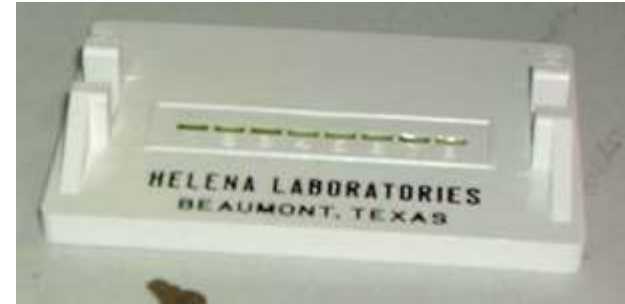
Φρέσκος ή βαθειά κατεψυγμένος ιστός



Λειοτρίβιση στον πάγο. Σε κάθε πηγαδάκι διαφορετικό άτομο.



Μεταφορά λίγων μl από κάθε πηγαδάκι



Τοποθέτησή τους σε ειδικές θέσεις (πηγαδάκια) του δοχείου φορτώματος (loading tray)



Χρήση του εφαρμογέα super Z για δέσμευση του δείγματος



Χρήση του πηκτώματος (λεπτό στρώμα κυτταρίνης) τοποθετημένο σε ένα πλαστικό φύλλο



Τοποθέτηση των δειγμάτων στην επιφάνεια του gel

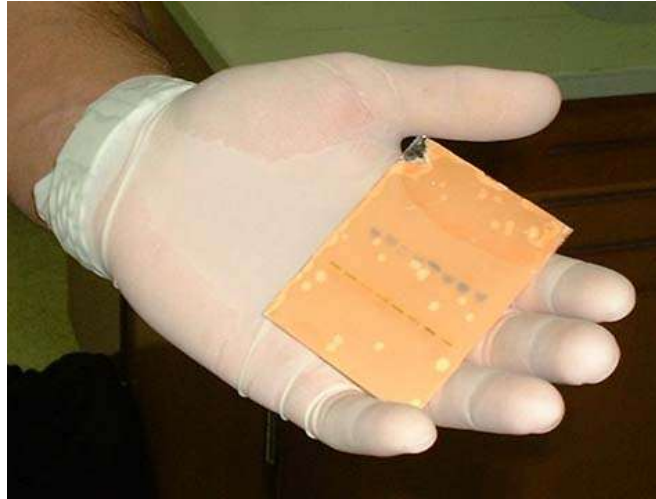


Εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου

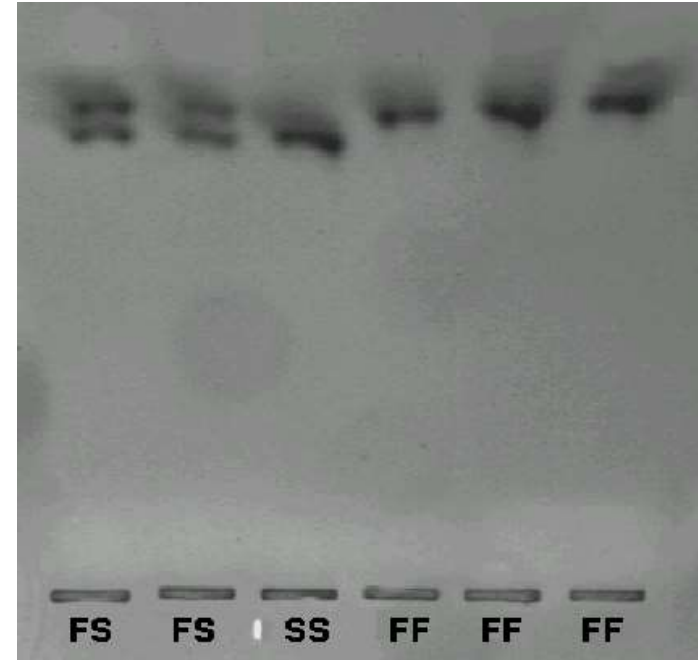
# Ένα προς ένα τα βήματα για τον έλεγχο ποικιλομορφίας σε αλλοένζυμα



Το gel βάφεται με ειδική χρωστική



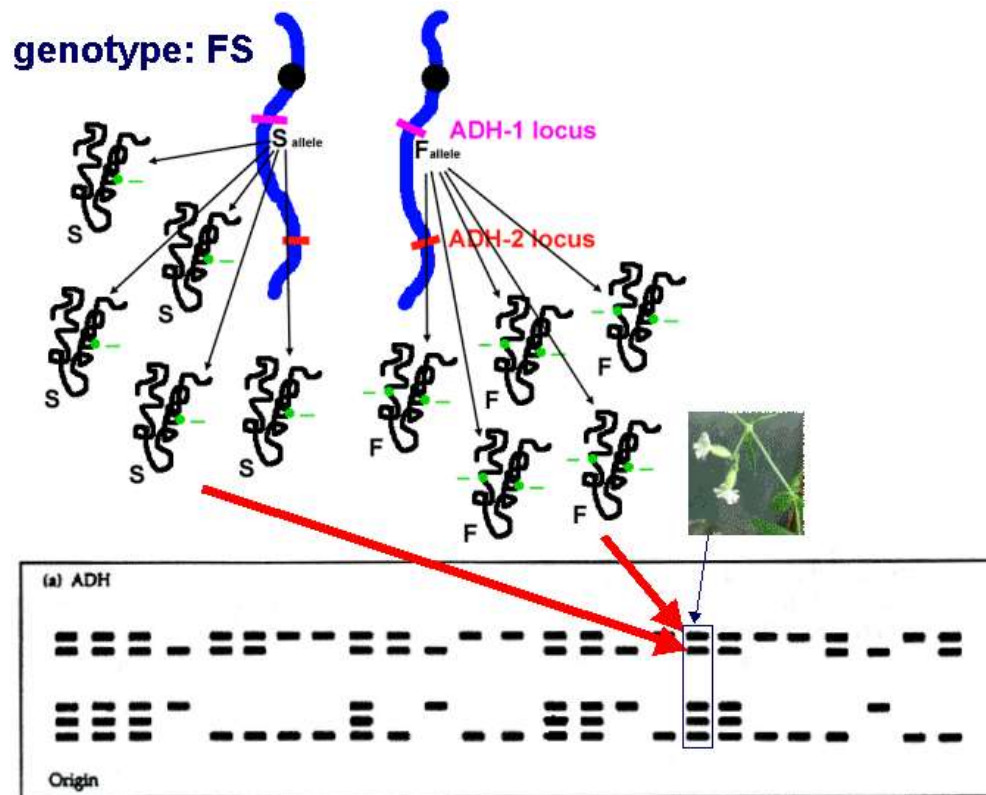
Σε σύντομο χρονικό διάστημα, η χρωστική θα αρχίσει να αποκαλύπτει την θέση των αλλοενζύμων



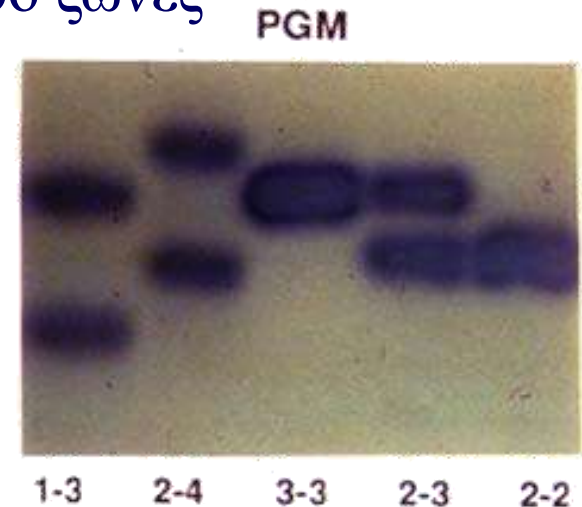
Έλεγχος της ποικιλότητας.  
Αναγνώριση και διάκριση ζωνών στο πήκτωμα

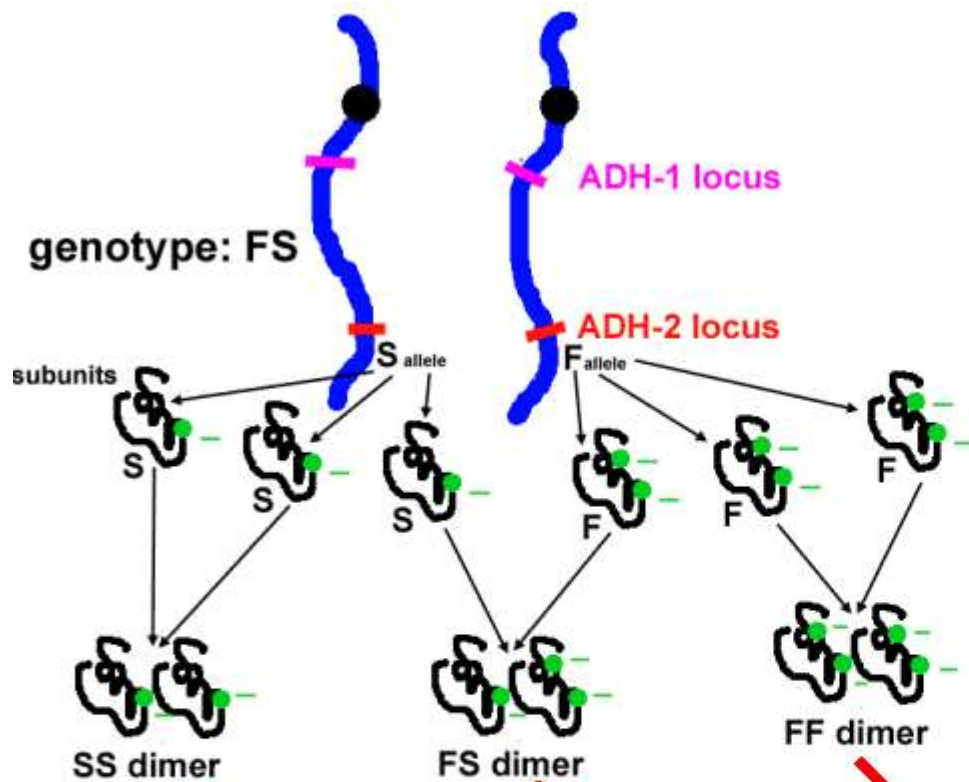
# Διάβασμα των ζωνών στο πήκτωμα

Οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν μία γνωστή τεταρτοταγή δομή, που καθορίζεται από τις υπομονάδες (πολυπεπίδια) από τις οποίες αποτελείται. Η δομή και αριθμός των υπομονάδων θα καθορίσει τον αριθμό των ζωνών σε κάθε τόπο.

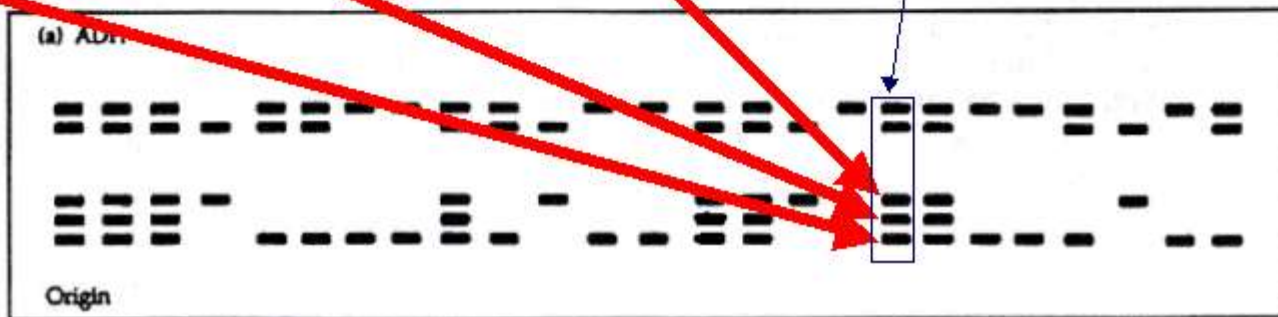


Μονομερής πρωτεΐνη,  
(μία υπομονάδα), το  
ετερόζυγο άτομο έχει  
δύο ζώνες





Διμερής πρωτεΐνη,  
(δύο υπομονάδες), το  
ετερόζυγο άτομο έχει 3  
ζώνες





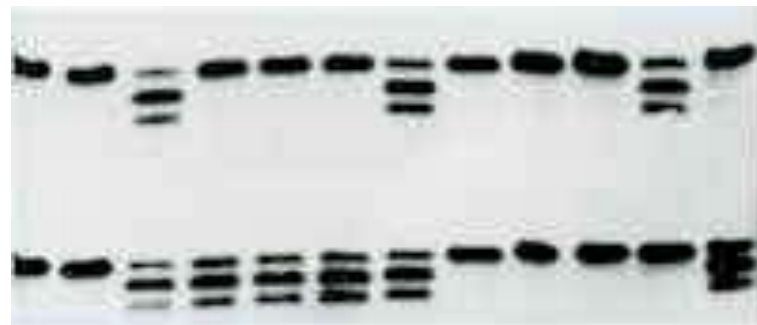
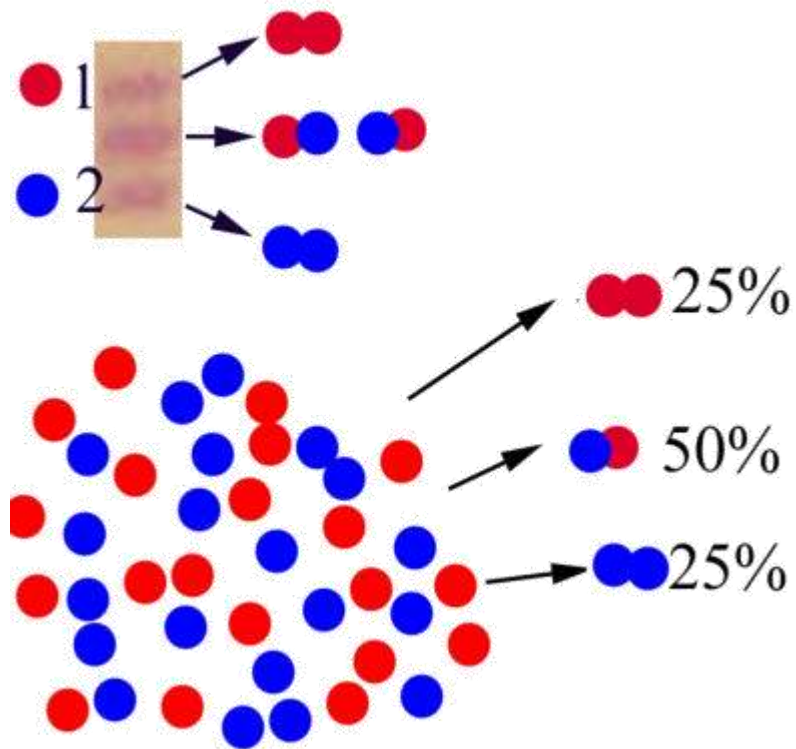
# Γιατί τα ετερόζυγα έχουν 3 ζώνες και γιατί η μεσαία είναι πιο έντονη;

➤ Έστω 2 αλληλόμορφα του τύπου GPI:

1-κόκκινο, 2-μπλε.

➤ Το κόκκινο έχει περισσότερο αρνητικό φορτίο και τρέχει πιο γρήγορα.

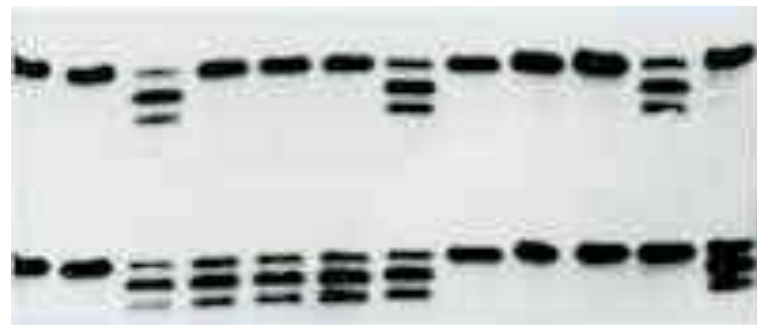
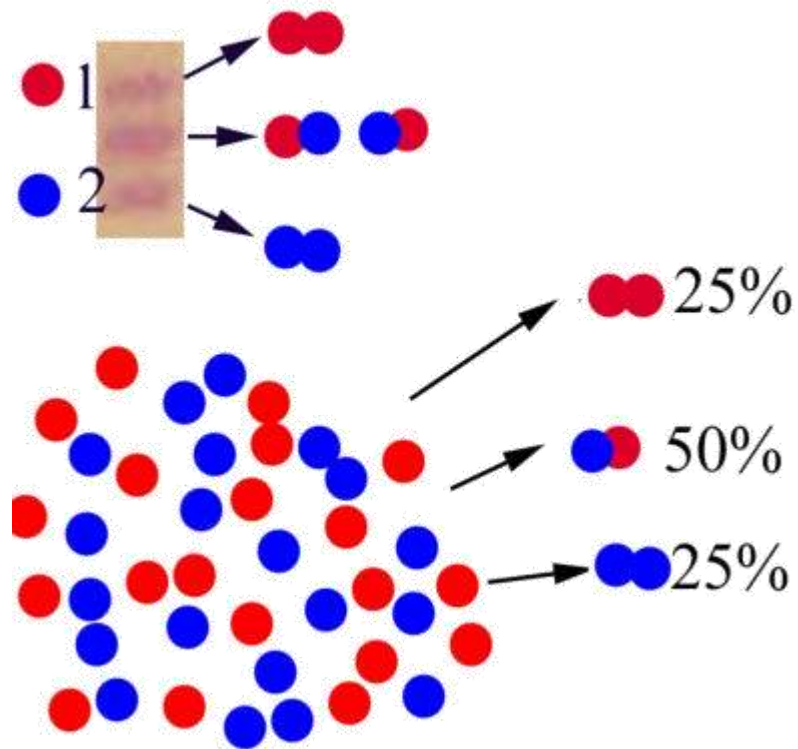
➤ Τα ομόζυγα άτομα έχουν είτε κόκκινο είτε μπλε αλληλόμορφο.



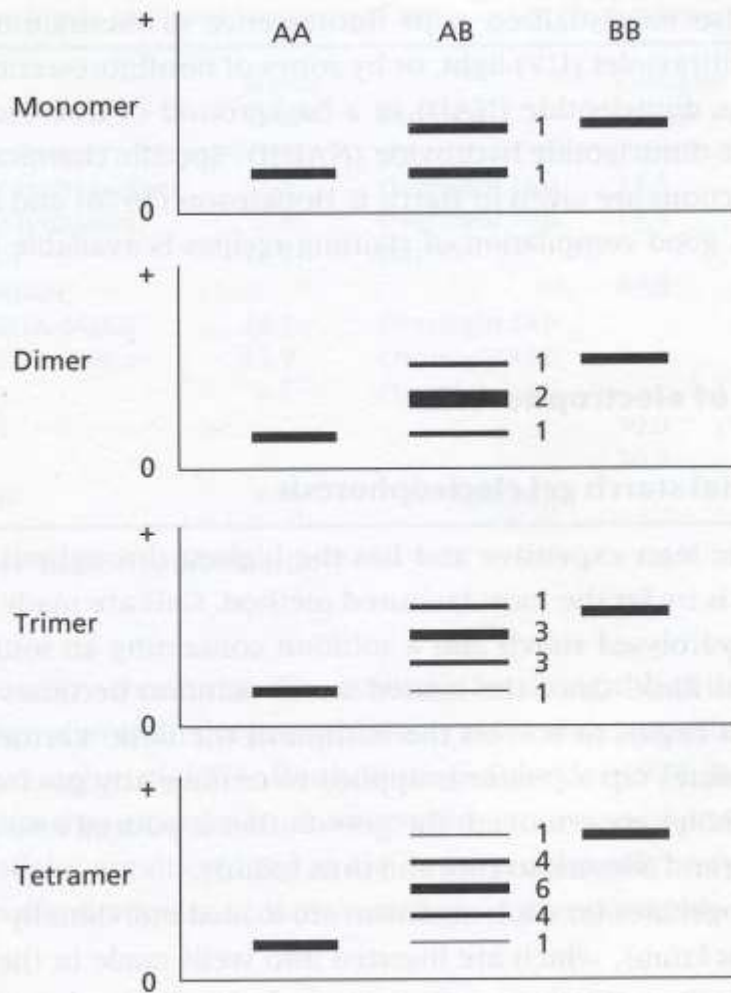
# Γιατί τα ετερόζυγα έχουν 3 ζώνες και γιατί η μεσαία είναι πιο έντονη;

➤ Τα ετερόζυγα παράγουν τον ίδιο αριθμό μπλε και κόκκινων υπομονάδων. Όταν αυτά ζευγαρώνουν για να φτιάξουν διμερή, **στατιστικά** έχουμε **25%** κόκκινο-κόκκινο, **25%** μπλε-μπλε, **25%** κόκκινο-μπλε και **25%** μπλε-κόκκινο.

➤ Τα δύο τελευταία έχουν ενδιάμεση κινητικότητα σε σχέση με τα πρώτα και επειδή είναι διπλάσια σε αριθμό έχουν πιο ισχυρή ζώνη.



# Τριμερής πρωτεΐνη, (3 υπομονάδες), το ετερόζυγο άτομο έχει 4 ζώνες



1 ⇒ ● ● ●

2 ⇒ ● ● ●

3 ⇒ ● ● ●

4 ⇒ ● ● ●

5 ⇒ ● ● ●

6 ⇒ ● ● ●

7 ⇒ ● ● ●

8 ⇒ ● ● ●

Ιδιος φαινότυπος

Ιδιος φαινότυπος

**Fig. 4.1** Diagram of isozyme banding patterns expected at a single locus for homozygotes and heterozygotes for proteins according to their subunit composition. Staining intensities expected under random association of subunits are indicated numerically alongside each band. Redrawn from Murphy *et al.* (1996).

In this study we made an attempt to clarify the systematics of *Ophelia bicornis sensu lato* in the western Mediterranean by analysing the morphological and genetic variation in samples collected at 15 localities (Fig. 2).

### MORPHOLOGICAL ANALYSIS:

Counting of the number of nephridiopores on both sides of the animals



### GENETIC ANALYSIS:

Allozyme electrophoresis (8 polymorphic loci)

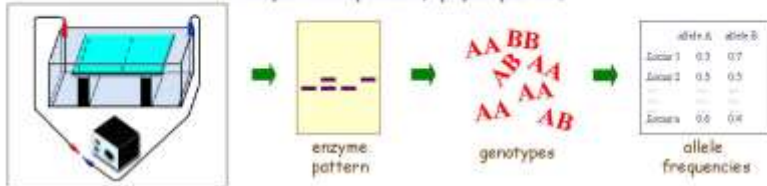
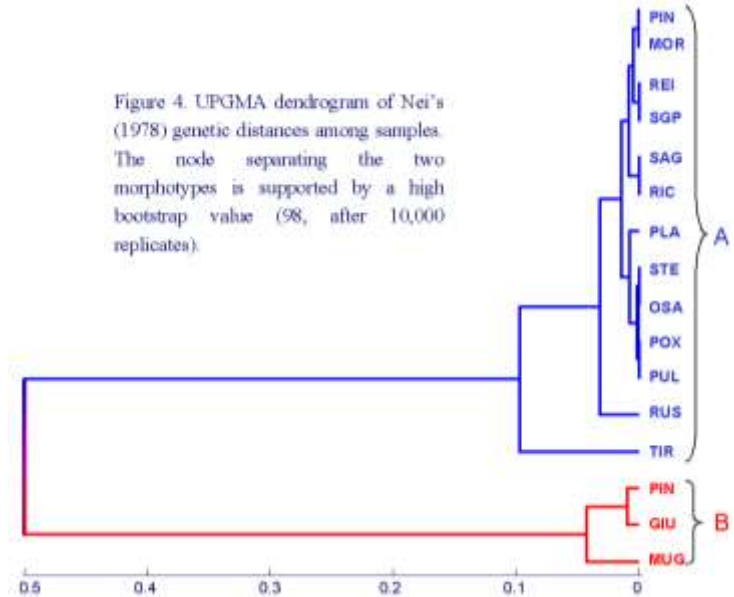


Figure 2. Location of the 15 sampling sites.

# Αποτελέσματα

Figure 4. UPGMA dendrogram of Nei's (1978) genetic distances among samples. The node separating the two morphotypes is supported by a high bootstrap value (98, after 10,000 replicates).



*Ophelia bicornis*

The polychaete *Ophelia bicornis sensu lato* in the western Mediterranean is not one highly variable species. The species formerly considered *Ophelia bicornis* s.l. is actually divided in two species:

***Ophelia bicornis* s.s. Savigny, 1818**  
(with 6 pairs of nephridiopores)

and

***Ophelia barquii* Fauvel, 1927**  
(with 5 pairs of nephridiopores)

They may occur in sympatry and maintain independent gene pools

Maltagliati et al. 2003. Allozymes and number of nephridiopores support the occurrence of two *Ophelia* species (Annelida, Polychaeta) in Western Mediterranean: is it a case of ecological speciation? Benthic Ecology Meeting

# ΑΛΛΟΕΝΖΥΜΑ

## Ο κυριότερος περιορισμός.....

Εύκολη και με χαμηλό κόστος μέθοδος, αλλά συνήθως χωρίς ποικιλομορφία

αφού.....

οι διαφορές σε επίπεδο DNA θα γίνουν ορατές στην πρωτεϊνική ηλεκτροφόρηση μόνο όταν προκαλούν αντικατάσταση αμινοξέων (μη συνώνυμες υποκαταστάσεις)





Τα αλλοένζυμα είναι σημαντικά στην ΜΟ, αλλά όπως θα δούμε το DNA έχει περισσότερα πλεονεκτήματα:

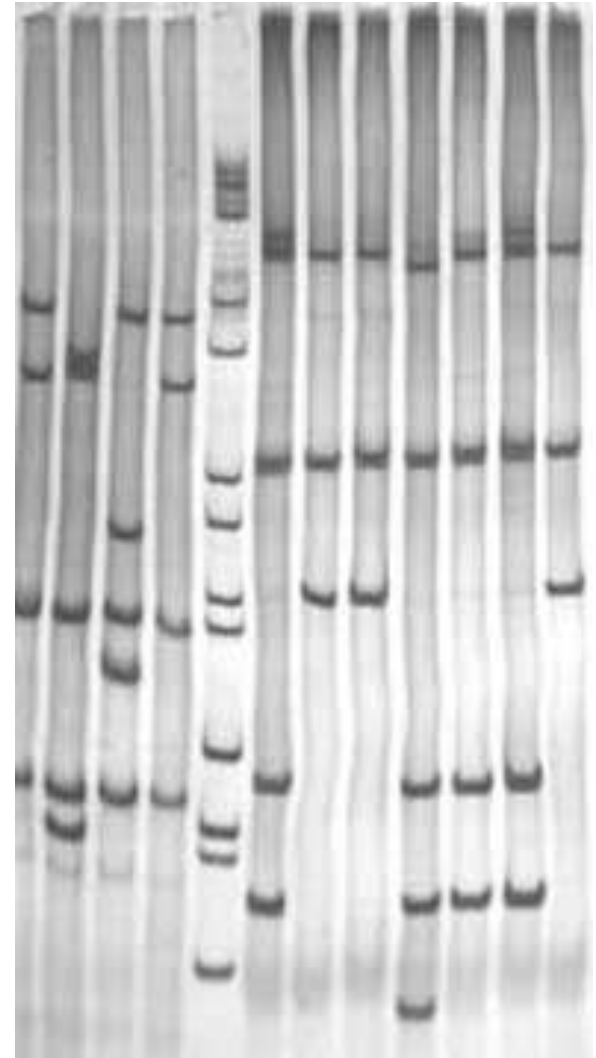
- DNA είναι γενικά πιο πολυμορφικό
- DNA πολλαπλασιάζεται μέσω της PCR και έτσι δείγματα σε μικρές ποσότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν
- DNA είναι πιο σταθερό, οπότε πιο εύκολο στη συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων
- DNA παράγει γονιδιακές γενεαλογίες

Όλοι οι δείκτες και οι τεχνικές που θα δούμε από τώρα και στο εξής βασίζονται στο DNA

# RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Πολυμορφισμός Μήκους των Θραυσμάτων DNA μετά από πέψη με Περιοριστικά ένζυμα

- Συγκυριάρχος δείκτης (στόχευση ενός τόπου)
- Πέψη σε mtDNA ή πυρηνικό DNA
- Μέση ποικιλότητα
- Εύκολη σύγκριση με άλλες μελέτες



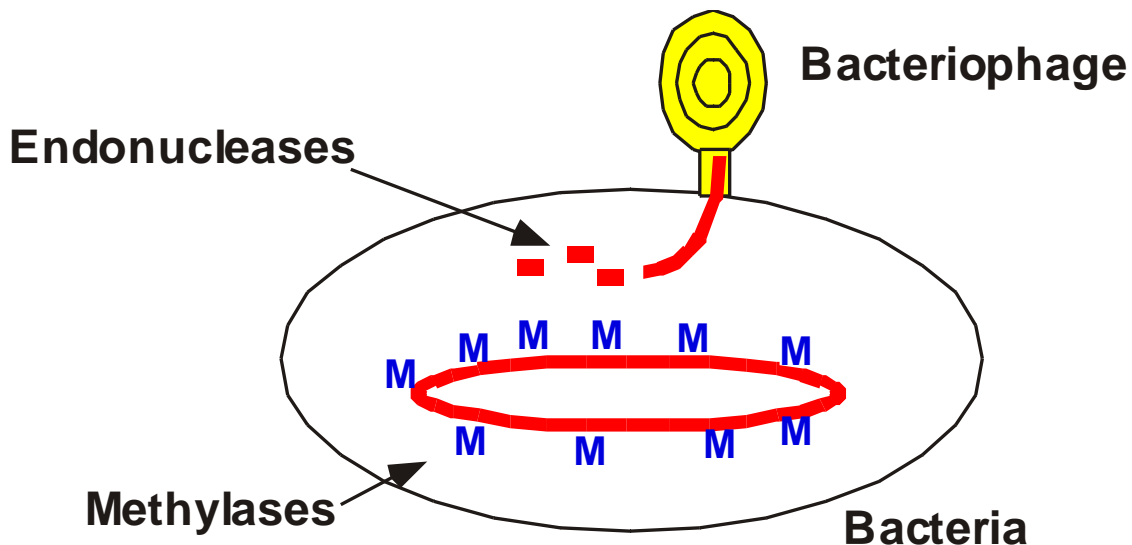


# Περιοριστικά ένζυμα

Περιοριστικά ένζυμα (ή ενδονουκλεάσες): «κόβουν» το DNA στα σημεία που συναντούν ειδικές αλληλουχίες μήκους 5-6 βάσεων, που είναι γνωστές ως περιοριστικές θέσεις.



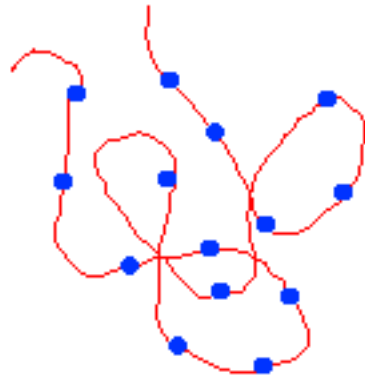
**Φυσιολογικά:** προστασία των βακτηρίων από ιούς (το κυτταρικό DNA είναι προστατευμένο μέσω μεθυλίωσης) (εμποδίζει τη δράση του ενζύμου).



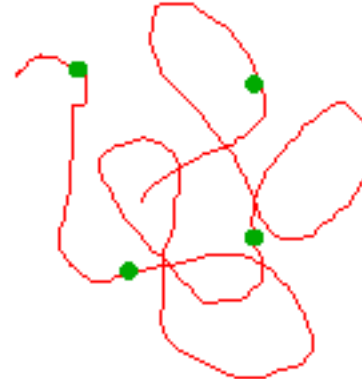
# Παραδείγματα περιοριστικών ενζύμων και αλληλουχιών που κόβουν

Μικροοργανισμός πηγή	Ένζυμο	Περιοριστική θέση	Άκρα που παράγει
<i>Arthrobacter luteus</i>	<i>AluI</i>	AG CT	Blunt Τυφλά άκρα
<i>Serratia marcesans</i>	<i>Sma I</i>	CCC GGG	Blunt
<i>Bacillus amyloiquefaciens</i>	<i>Bam HI</i>	G GATCC	Sticky
<i>Escherichia coli</i>	<i>Eco RI</i>	G AATTC	Sticky
<i>Haemophilus gallinarum</i>	<i>Hga I</i>	GACGC(N) <sub>5</sub>	Sticky
<i>Haemophilus infulenzae</i>	<i>Hind III</i>	A AGCTT	Sticky Κολώδη άκρα
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Pst I</i>	CTGCA G	Sticky
<i>Nocardia otitiscaviaruns</i>	<i>Not I</i>	GC GGCCGC	Sticky
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Sau 3A</i>	GATC	Sticky
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Taq I</i>	T CGA	Sticky

Η υδρόλυση του DNA με περιοριστικά ένζυμα παράγει ένα μίγμα θραυσμάτων



RESTRICTION ENZYME  
THAT RECOGNIZES  
FOUR NUCLEOTIDES

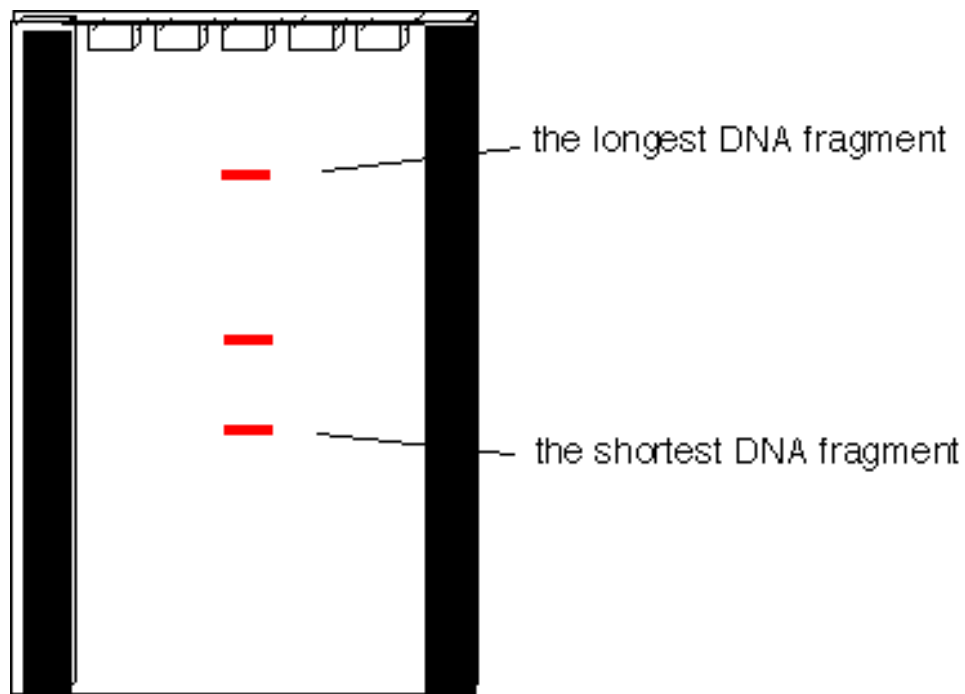


RESTRICTION ENZYME  
THAT RECOGNIZES  
SIX NUCLEOTIDES

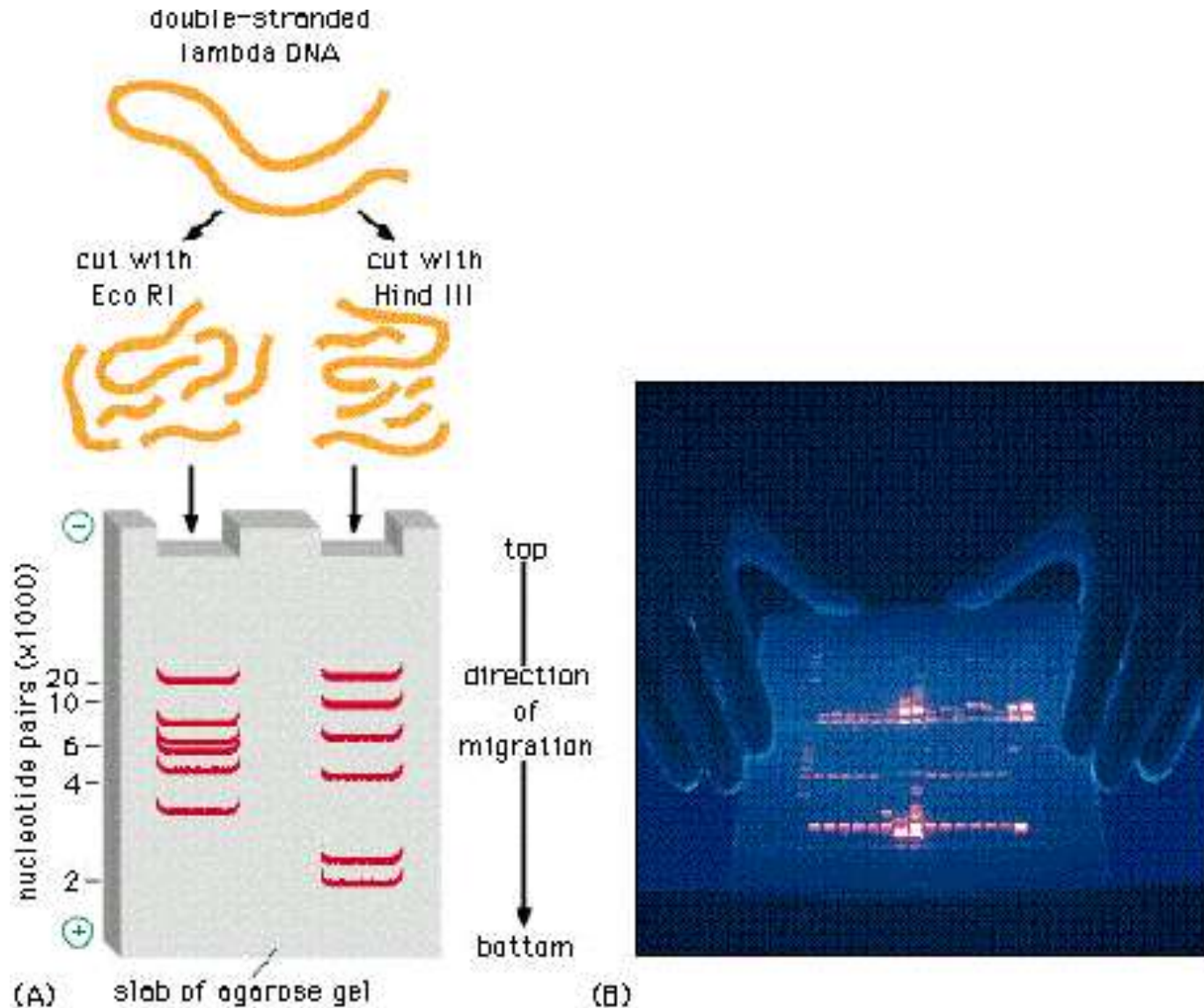




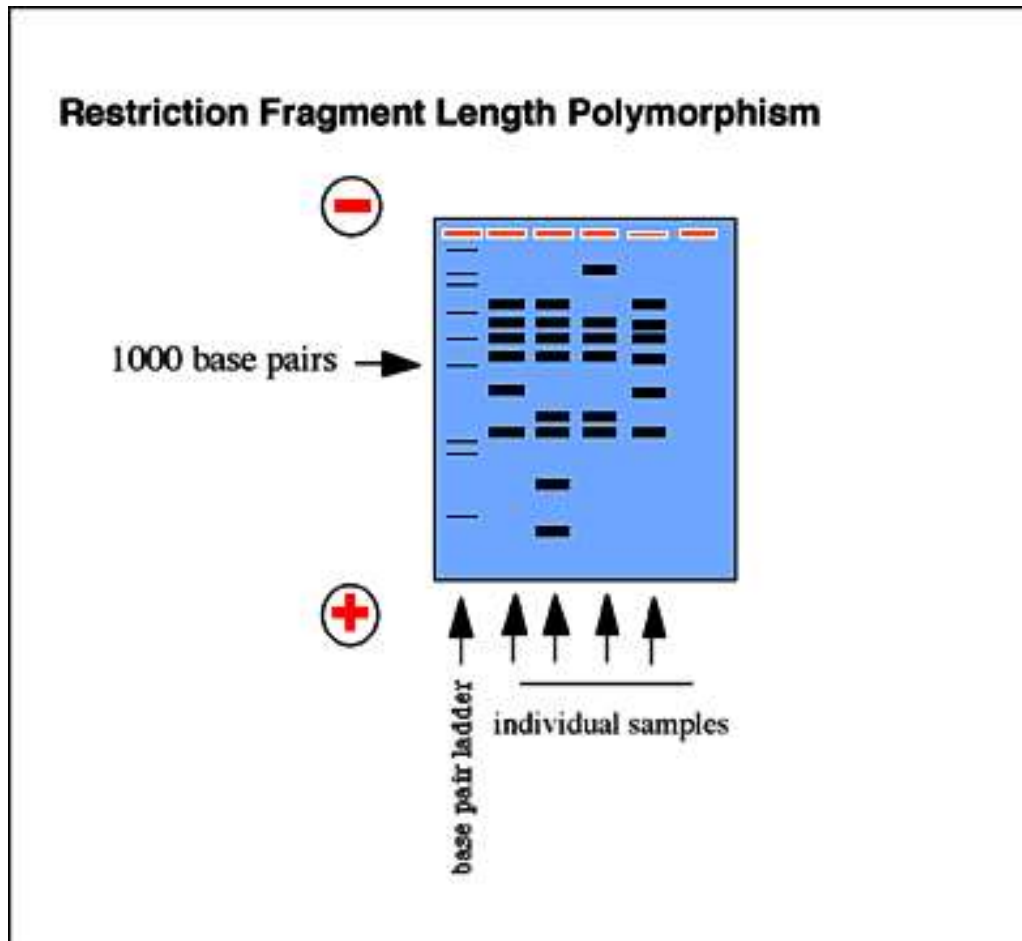
Τα μικρότερα θραύσματα κινούνται πιο γρήγορα σε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης

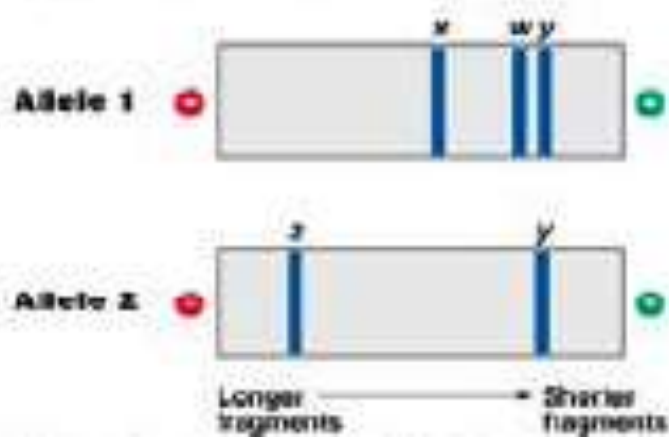
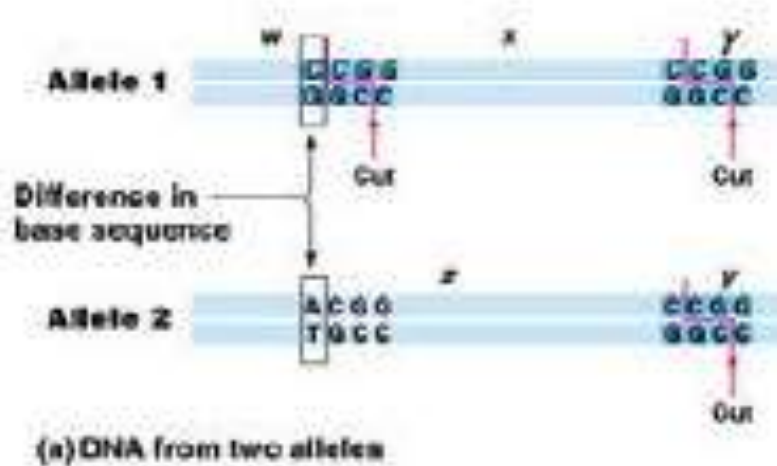


Κόβοντας το ίδιο DNA με διαφορετικά ένζυμα θα πάρουμε διαφορετικά πρότυπα ζωνών στο πήκτωμα



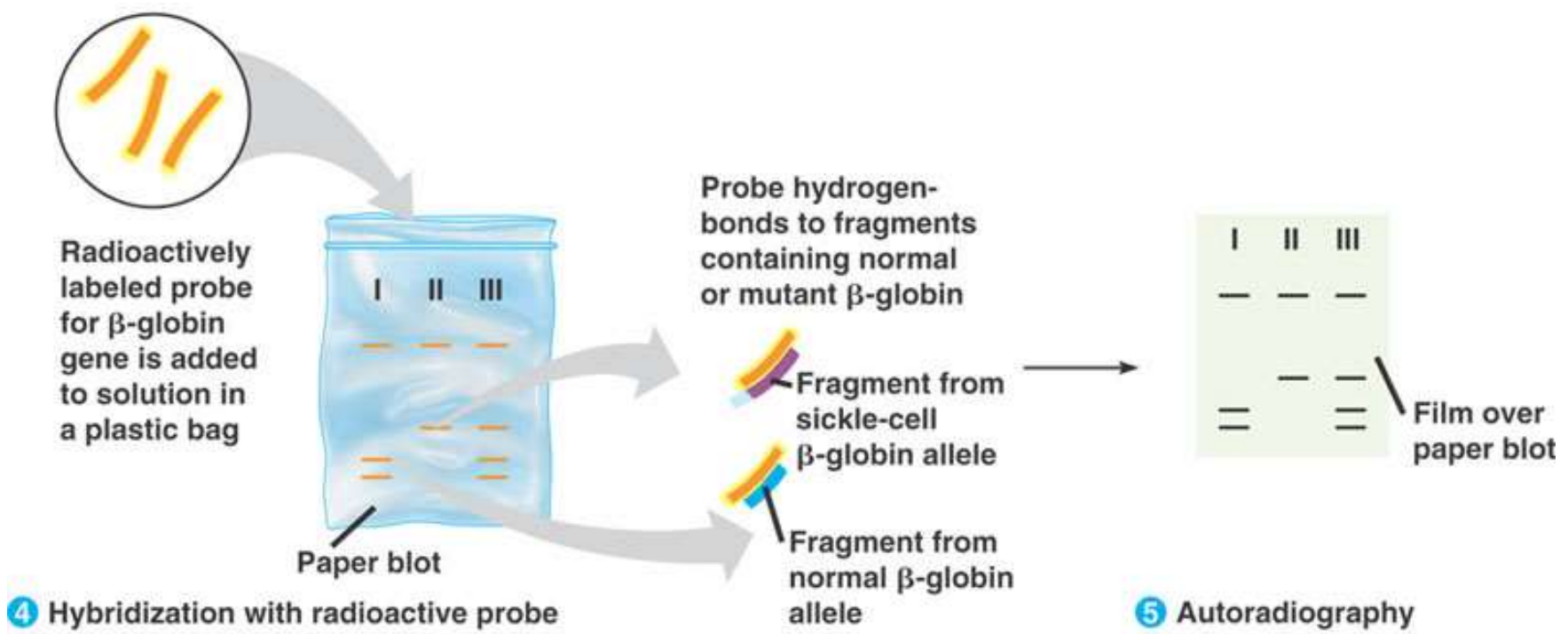
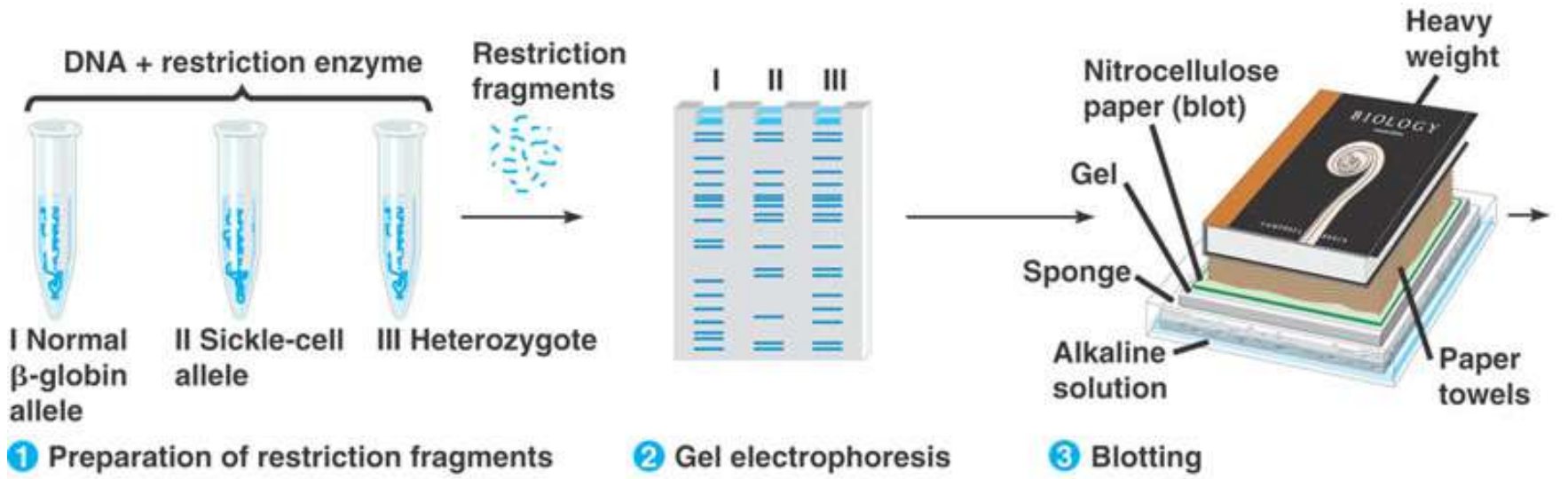
Κόβοντας το DNA διαφορετικών ατόμων με το ίδιο ένζυμο θα πάρουμε ένα διαφορετικό πρότυπο ζωνών στο πήκτωμα για κάθε άτομο, αν τα άτομα διαφέρουν ως προς τις αλληλουχίες DNA (περιοριστικές θέσεις)





➤ Μία σημειακή υποκατάσταση μπορεί να αλλάξει μια περιοριστική θέση, αλλάζοντας το πρότυπο των παραγόμενων θραυσμάτων.

➤ Αυτές τις αλλαγές στα περιοριστικά θραύσματα ονομάζουμε RFLPs και προσπαθούμε να τις ανιχνεύσουμε.





**Τα RFLPs ήταν το δεύτερο ουσιαστικά εργαλείο που αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε στην ΜΟ. Αν και συνεχίζουν να έχουν ενεργό ρόλο στην ΜΟ, η χρήση τους έχει περιοριστεί εξαιτίας κάποιων μειονεκτημάτων:**

- η μεγάλη ποσότητα DNA που απαιτούν,
- η δυσκίνητη τεχνολογία που χρησιμοποιούν,
- η αδυναμία ανάλυσης μεγάλου αριθμού ατόμων και τόπων,
- η δυσκολία αναγνώρισης και ο μικρός αριθμός διαθέσιμων πολυμορφικών τόπων
- όπως και στην ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών χάνεται ένα μεγάλο μέρος της γενετικής ποικιλότητας, αφού τυπικά μόνο ένα μικρό ποσοστό των νουκλεοτιδίων του DNA αποτιμάται ως προς την ποικιλομορφία του (το ποσοστό αυξάνει με την αύξηση των ενζύμων που χρησιμοποιούνται).

# Παράδειγμα μελέτης

Η πληθυσμιακή δομή των κοάλα στη νότια Αυστραλία.

[Taylor *et al.* 1997 *Genetical Research* (02)]



➤ Στα κοάλα της νότιας Αυστραλίας έχουν εφαρμοστεί διάφορα προγράμματα μεταφοράς ατόμων (translocation programs) για την διατήρηση του είδους.

➤ Η πληροφορία των γενετικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά (αλλοένζυμα) ήταν πολύ μικρή. Οι δείκτες είχαν μικρή διακριτική ικανότητα.

- Τα κοάλα της νότιας Αυστραλίας κινδύνευαν με εξαφάνιση λόγω κυνηγιού.
- Μετατοπίσεις (μεταφορές ατόμων) κυρίως από το νησί French
- Αριθμητικά ήταν επιτυχείς. Όμως ποιες ήταν οι γενετικές συνέπειες;



Παλιότερη  
κατανομή

Σύγχρονη  
κατανομή



➤ RFLPs σε mtDNA

➤ Η καλύτερη τότε (1997) διαθέσιμη τεχνική

➤ Απομόνωση mtDNA από κάθε άτομο

➤ Έλεγχος του προτύπου σε 91 άτομα με 23 περιοριστικά ένζυμα



Πολύ χαμηλή διαφοροποίηση. Μόνο ένα ένζυμο έδειξε πολυμορφισμό (2 απλότυποι)

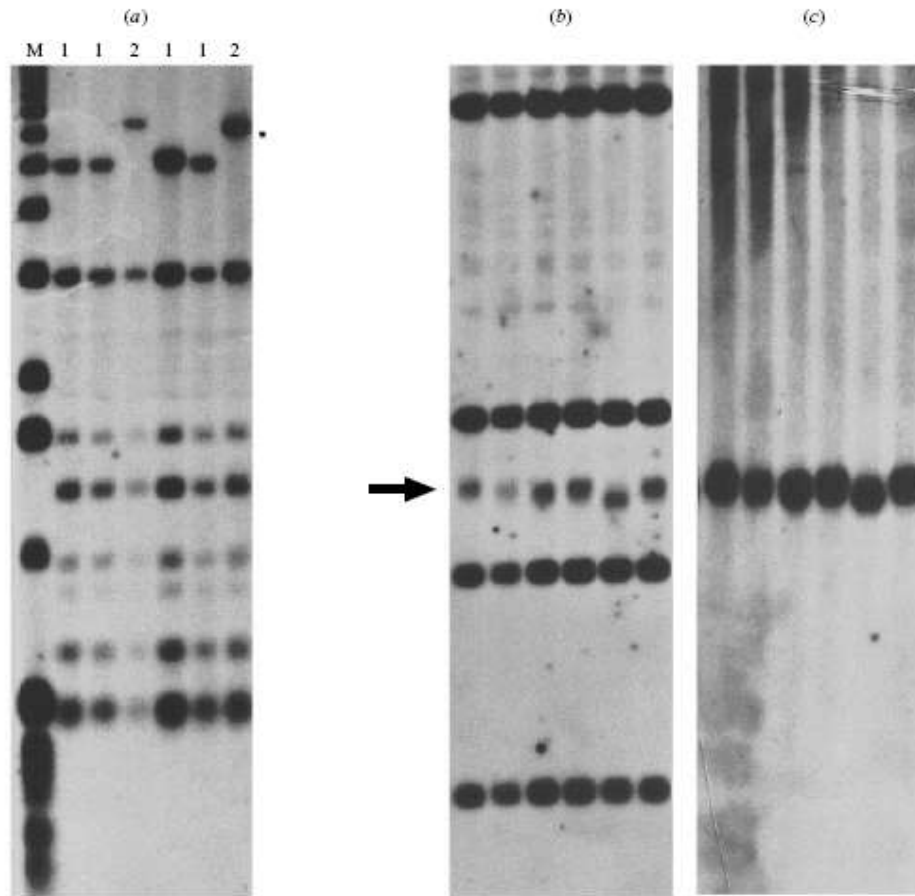


Fig. 2. Autoradiographs showing restriction fragment length polymorphisms observed in southern Australian koala populations. (a) The *TaqI* polymorphism defining two haplotypes (1 and 2). Lane M contains the molecular weight marker *Ad2-Bam HI/Eco RI*. (b) *XbaI* fragments probed with full-length mtDNA clone, with 'fuzzy' bands referred to in the text (representing putative length heteroplasmy) shown with an arrow. (c) *XbaI* fragments probed with D-loop polymerase chain reaction product.

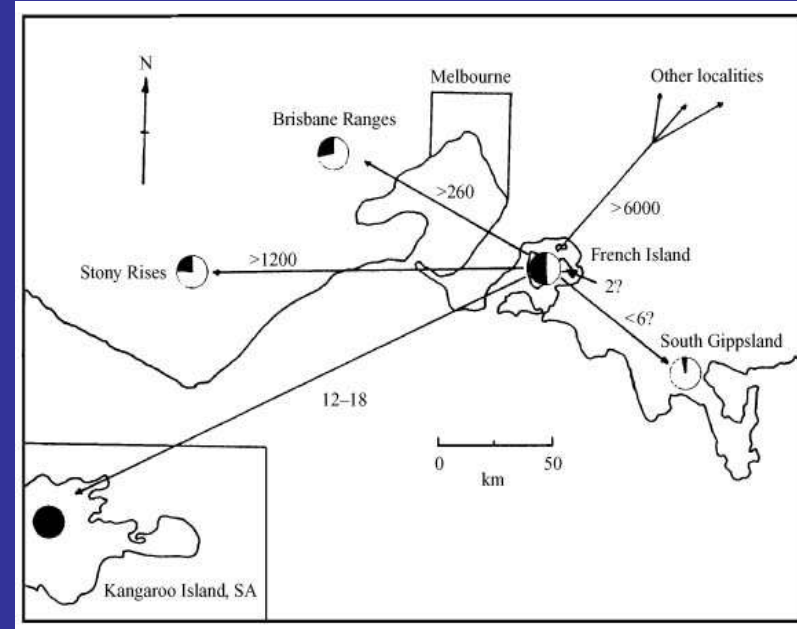


# Χωρικά πρότυπα

## MtDNA-RFLP ανάλυση

➤ Αποκάλυψε πολύ μικρή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών των κοάλα, που έχουν προέλθει από το νησί French μέσω μεγάλης κλίμακας μετατοπίσεων.

Αυτά τα ευρήματα είναι σύμφωνα με την πρόσφατη ιστορία των στενωπών (bottlenecks) και των μετατοπίσεων...

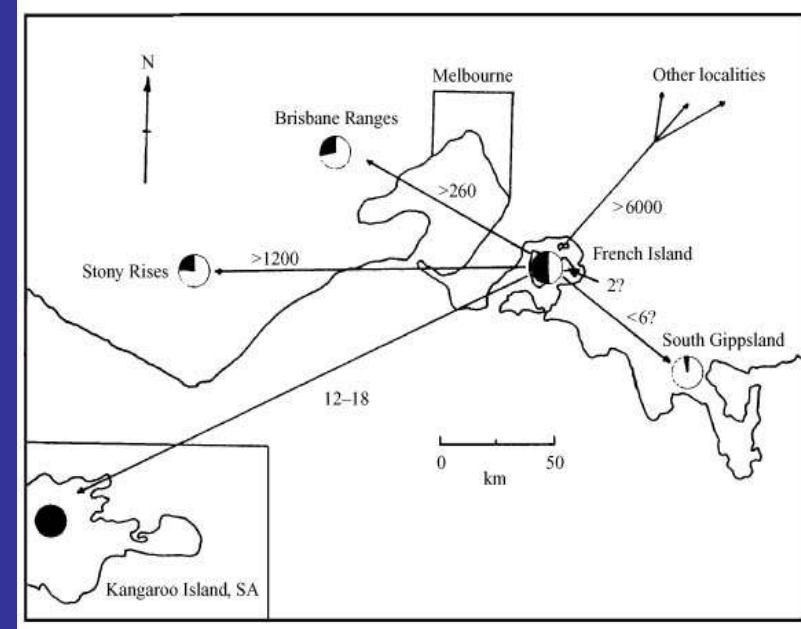


Τα κοάλα από το νησί French χρησιμοποιήθηκαν για την αποκατάσταση των πληθυσμών του στην περιοχή Victoria της νότιας Αυστραλίας.

# Χωρικά πρότυπα

Όμως.....

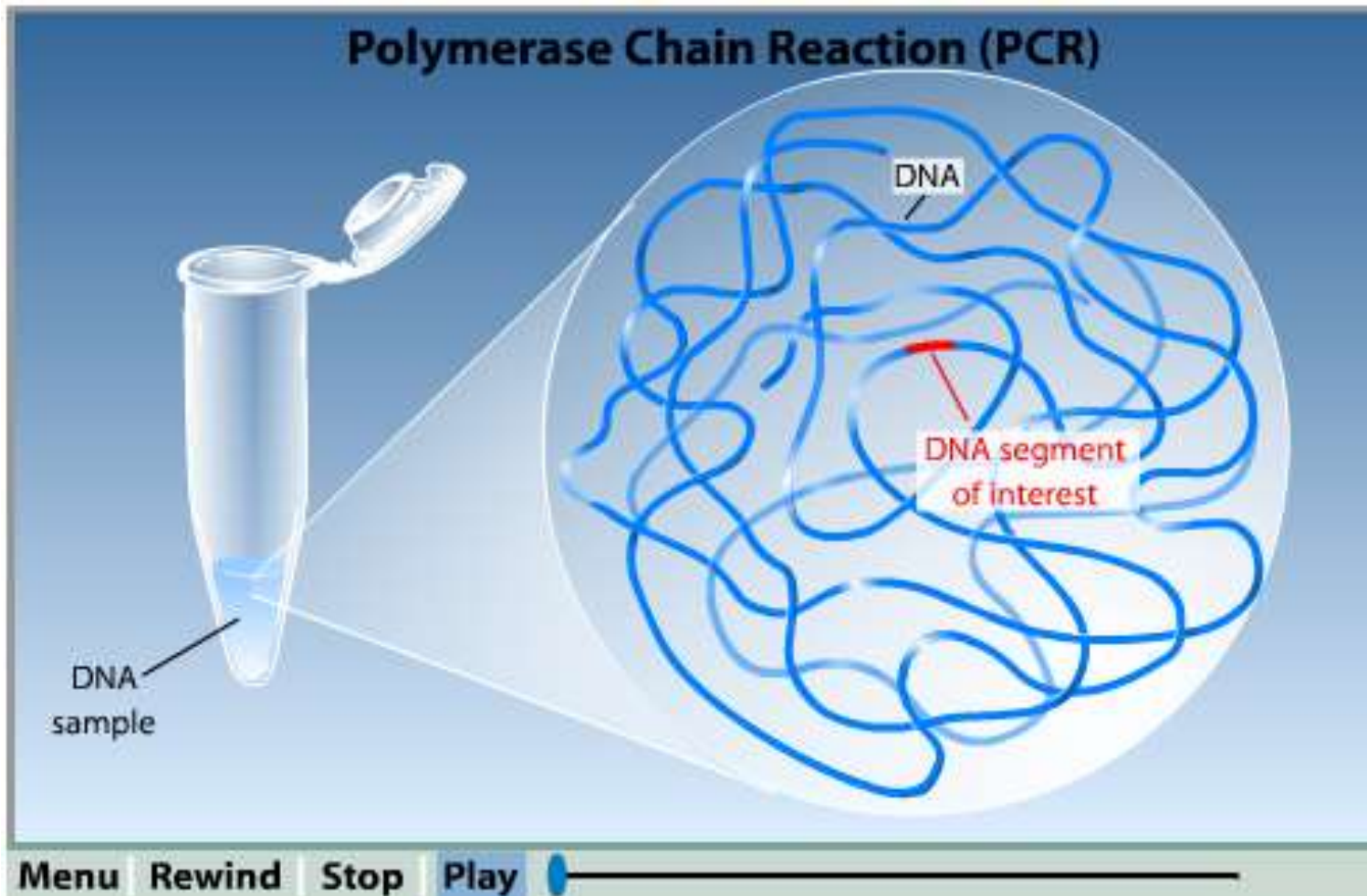
δεν μπορεί να εξηγήσει άλλες παρατηρήσεις, όπως τα παρόμοια επίπεδα mtDNA διαφοροποίησης σε δύο σχετικά ανεπηρέαστους από τον άνθρωπο πληθυσμούς της Queensland (BA Αυστραλία). Αυτό αυξάνει την πιθανότητα η χαμηλή mtDNA ποικιλότητα να είναι χαρακτηριστικό των κοάλα, που αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον στοιχείο που απαιτεί πιο εκτεταμένες δειγματοληψίες και χρήση δεικτών με υψηλότερη διακριτική ικανότητα (μικροδορυφορικά).



Τα κοάλα από το νησί French χρησιμοποιήθηκαν για την αποκατάσταση των πληθυσμών του στην περιοχή Victoria της νότιας Αυστραλίας.

# Ορόσημο...

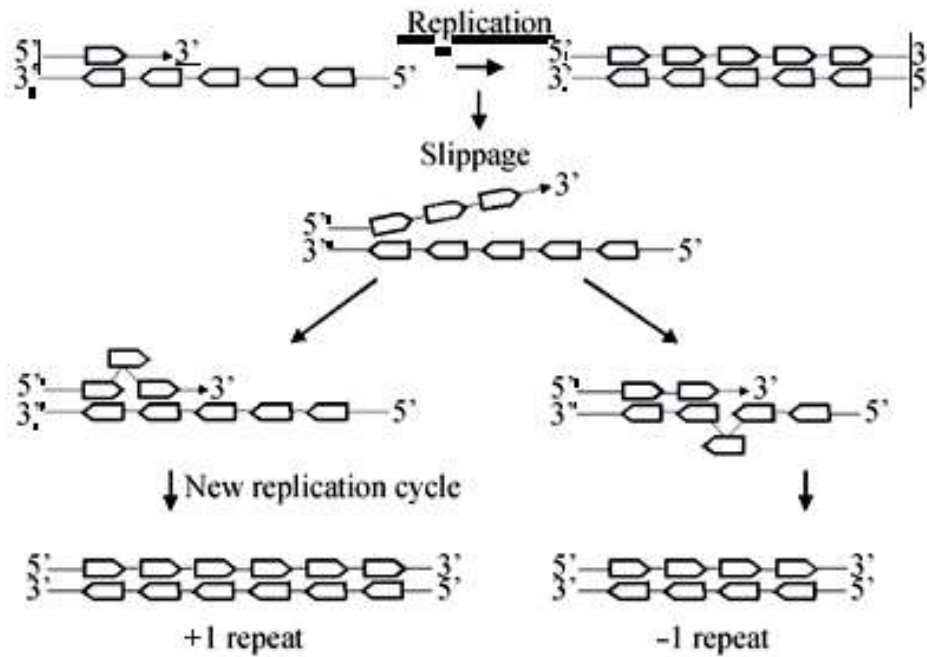
Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμερισμού (PCR) [Saiki et al. 1985]



[PCR song](#)



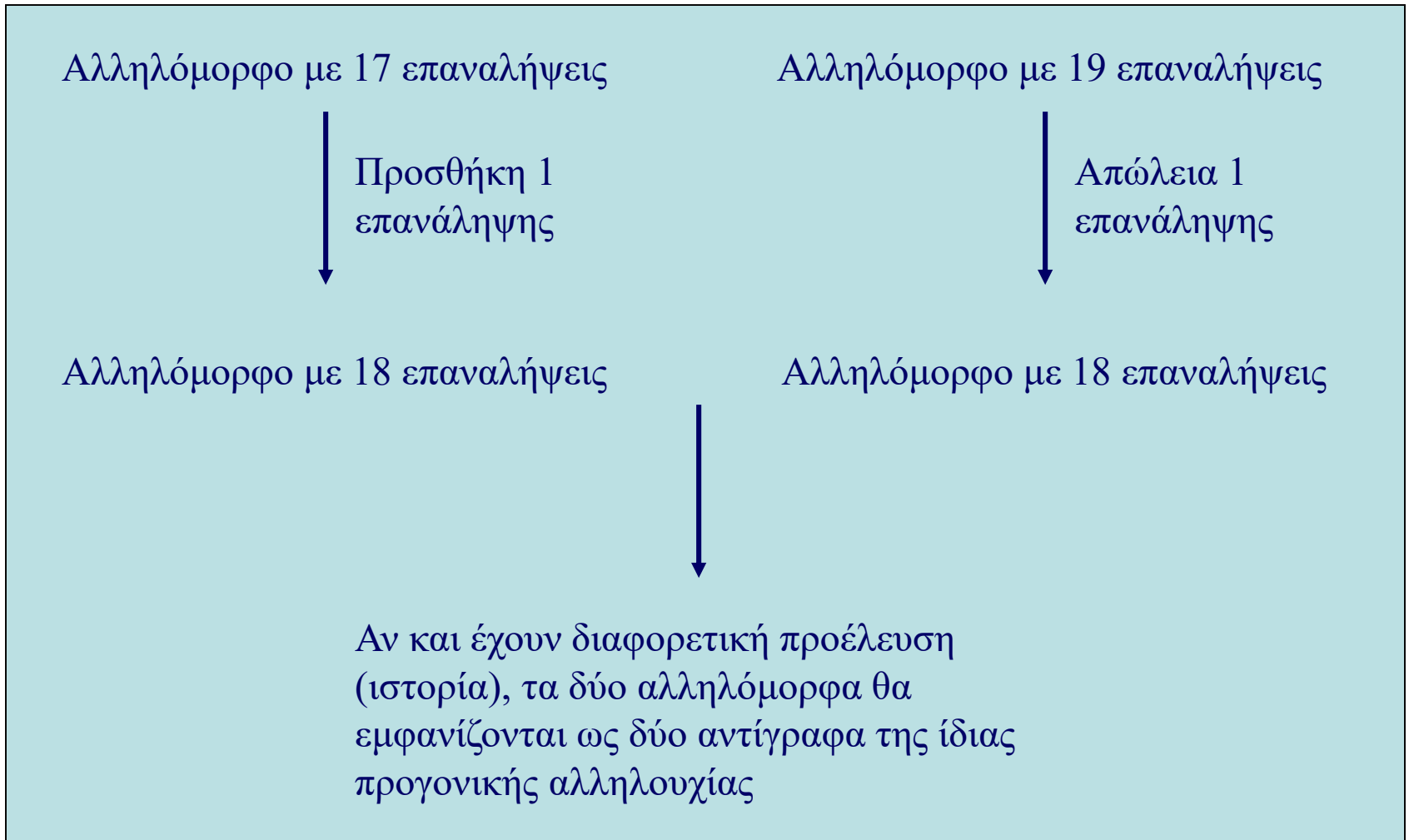
Τα μικροδορυφορικά οφείλουν την ποικιλότητά τους στον αυξημένο ρυθμό μεταλλαγής. Ο ρυθμός αυτός έχει εκτιμηθεί σε  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  μεταλλαγές ανά τόπο και ανά αντιγραφή στις ζύμες και  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  στα ποντίκια, που είναι κατά πολύ υψηλότερος από τον συνολικό ρυθμό μεταλλαγής του γονιδιώματος, που εκτιμάται στα  $10^{-9}$ - $10^{-10}$ .



Ο υψηλός μεταλλακτικός ρυθμός αποδίδεται στο «γλίστρημα» (slippage) της αλυσίδας DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Το φαινόμενο αυτό, επειδή μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια ή στην εμφάνιση μιας νέας επανάληψης, ονομάστηκε Stepwise Mutation Model (SMM, Kimura and Ohta 1978). Κάποια από τα λάθη που δημιουργούνται από το γλίστρημα μπορεί να διορθωθούν από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του πυρήνα, όμως πολλά «δραπετεύουν» από τη διόρθωση.



Τα μικροδορυφορικά **δεν** είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την εκτίμηση εξελικτικών γεγονότων που συνέβησαν στο μακρινό παρελθόν. Ο υψηλός ρυθμός μεταλλαγής και η τάση τους να αυξάνουν ή να μειώνονται σε μέγεθος σηματοδοτεί μεγάλη πιθανότητα **ομοπλασίας**, όπως η ομοπλασία μεγέθους.

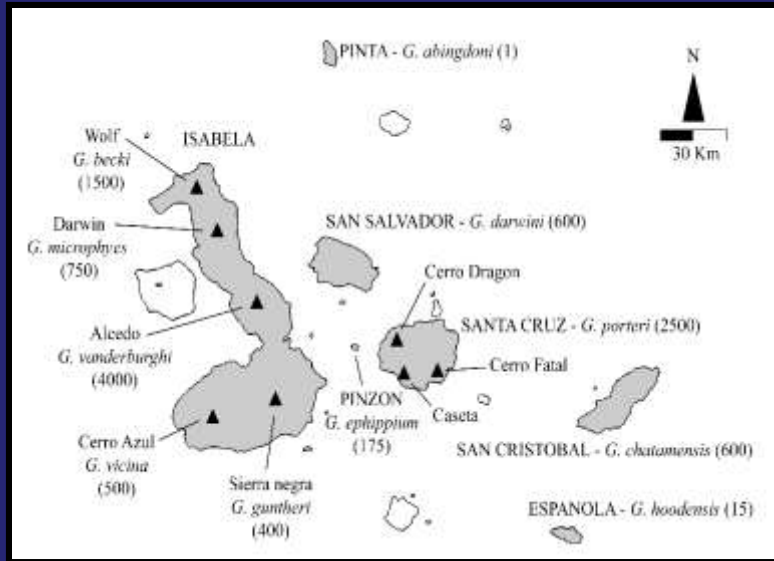


# Ένα θηλυκό για τον Μοναχικό Γιώργο (Lonesome George);

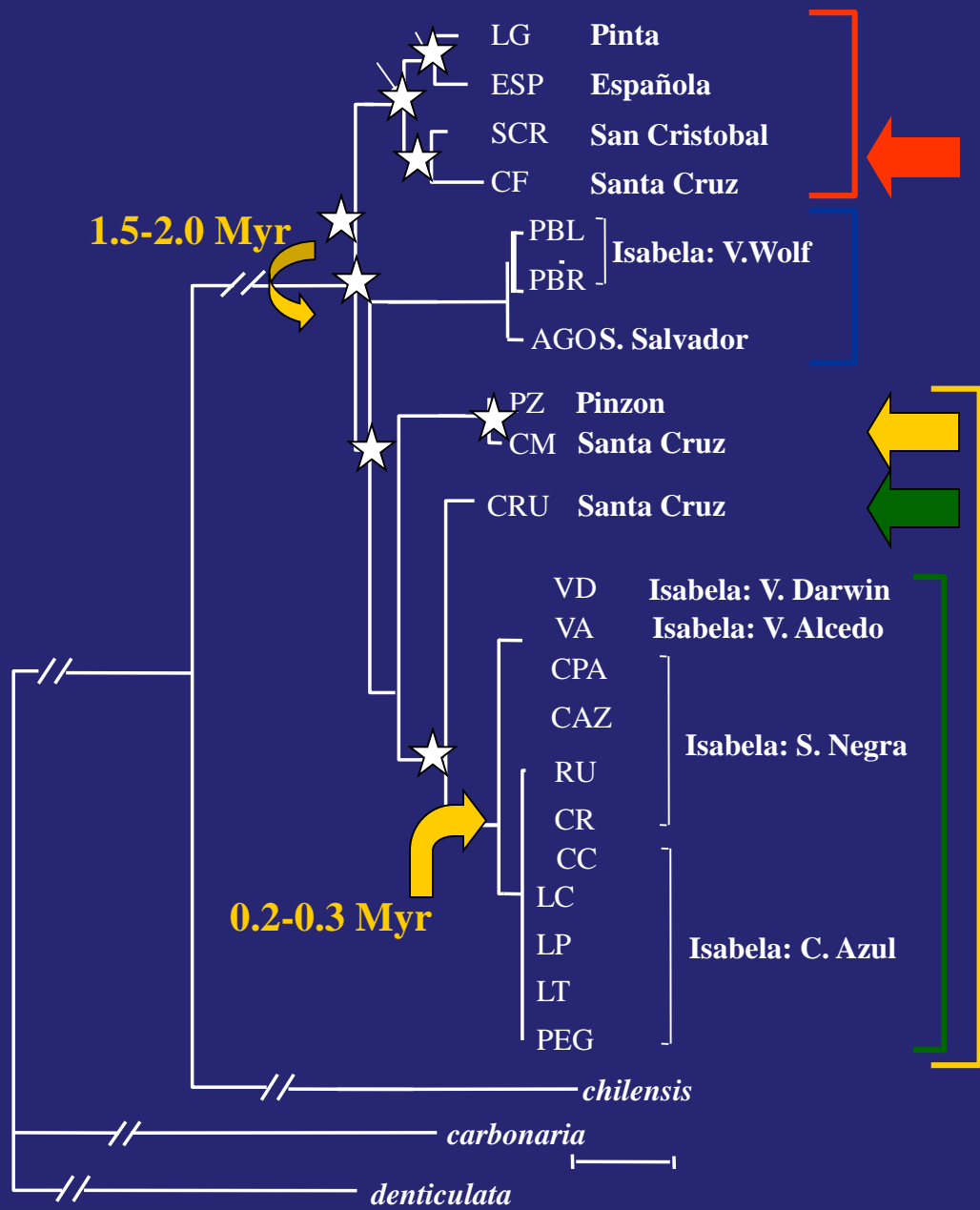


[Russello et al. 2007 *Current Biology* (04)]

# Η ιστορία του Lonesome George



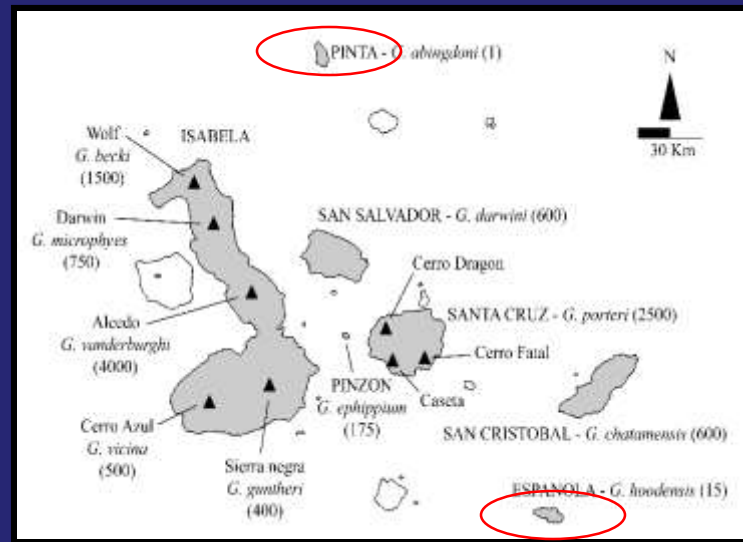
# mtDNA – Φυλογενετικό δέντρο



ML δέντρο  
4.5 Kb  
161 άτομα  
21 πληθυσμοί







Lonesome George



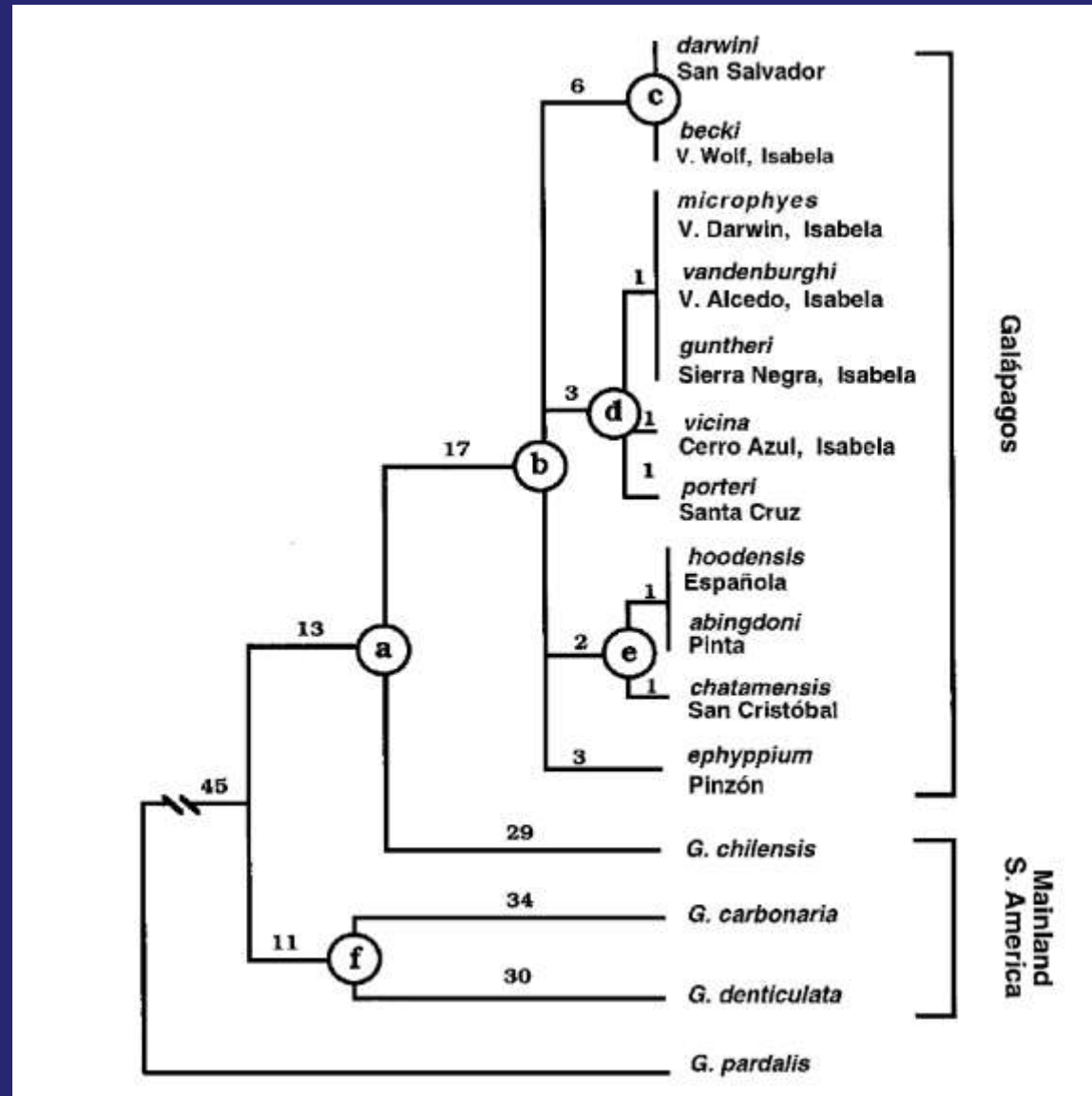
Espanola Male



# Χρησιμοποιώντας μουσειακά δείγματα έγινε προσπάθεια κατανόησης εάν ο LG ανήκει στο πληθυσμό της Pinta



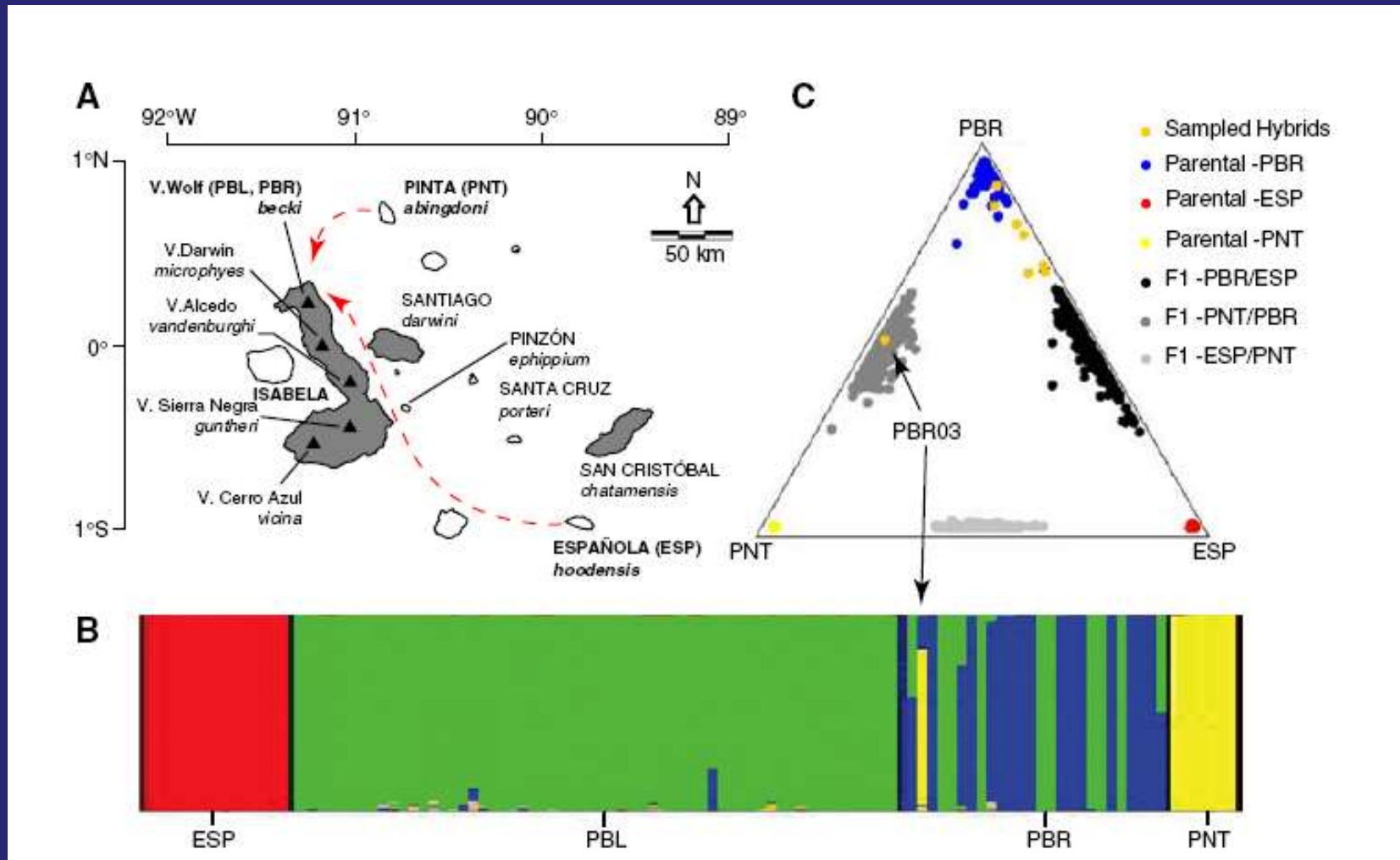
➤ 962 bp του 16S ribosomal και *cyt b* mtDNA





➤ 354 άτομα από όλους τους αρτίγονους πληθυσμούς των χελωνών

➤ 10 μικροδορυφορικούς τόπους



Η εύρεση ατόμων στο Volcano Wolf της Isabela με γενεαλογία του πληθυσμού της Pinta υπέδειξε ότι ο Μοναχικός Γιώργος δεν ήταν ο μόνος επιζών του είδους του (σήμερα *Chelonoidis abingdoni* μέχρι πρόσφατα *Geochelone abingdoni*).



Ίσως επιστρέψει το χαμόγελο στα χείλη του. Ίσως τελικά να καταφέρει να διαιωνιστεί και να μην παραμείνει στην ιστορία ως ο Μοναχικός Γιώργος.

Τελικά οι προσπάθειες δεν καρποφόρησαν αφού ο Μοναχικός Γιώργος πέθανε τον Ιούνιο του 2012. ([Lonesome-george at AMNH](#))

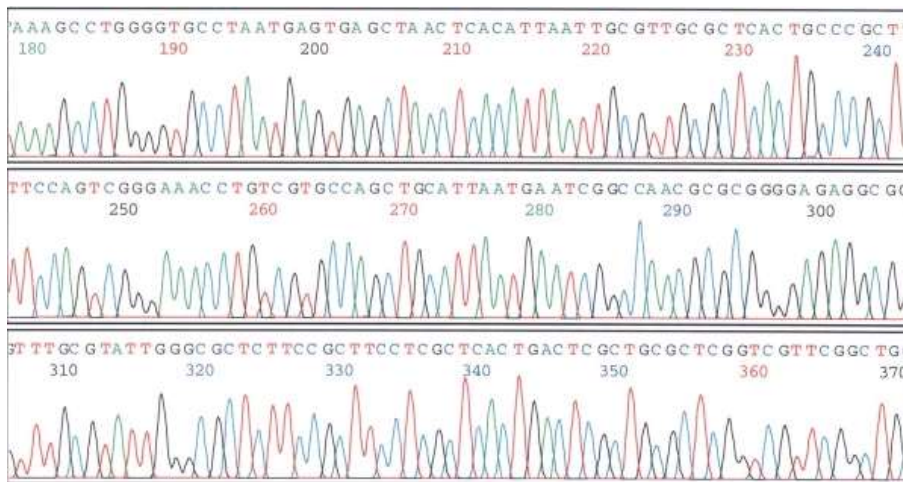
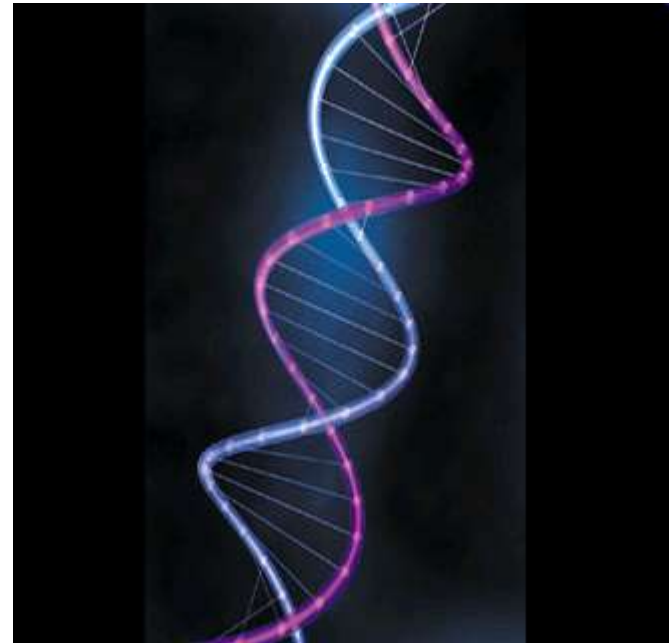


Απεβίωσε: αιτία βαθιά γεράματα

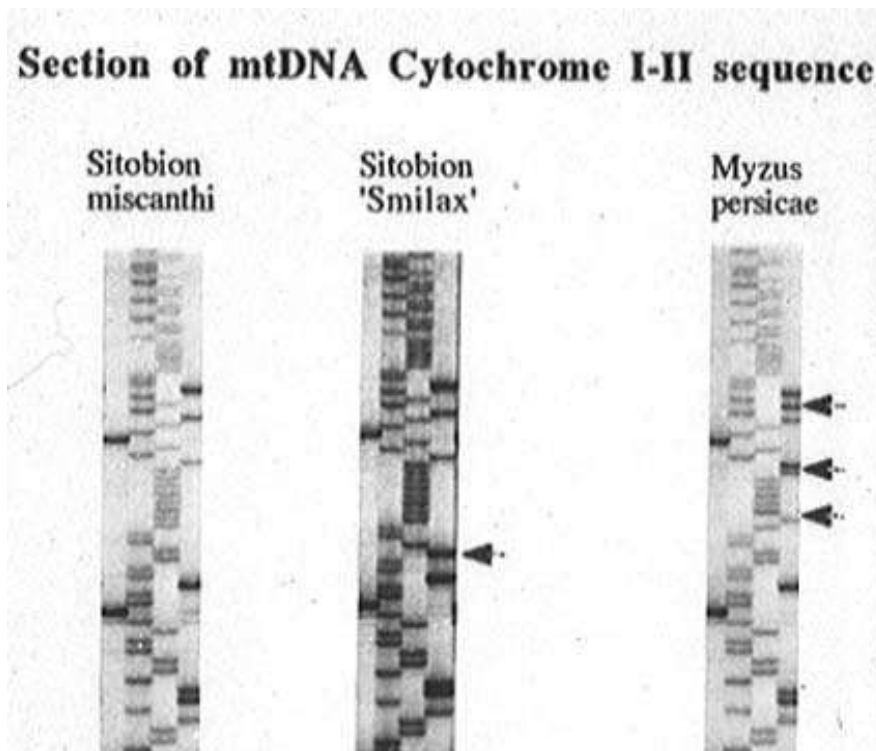


# Εκτίμηση της ποικιλότητας των αλληλουχιών DNA

## Αλληλούχιση DNA



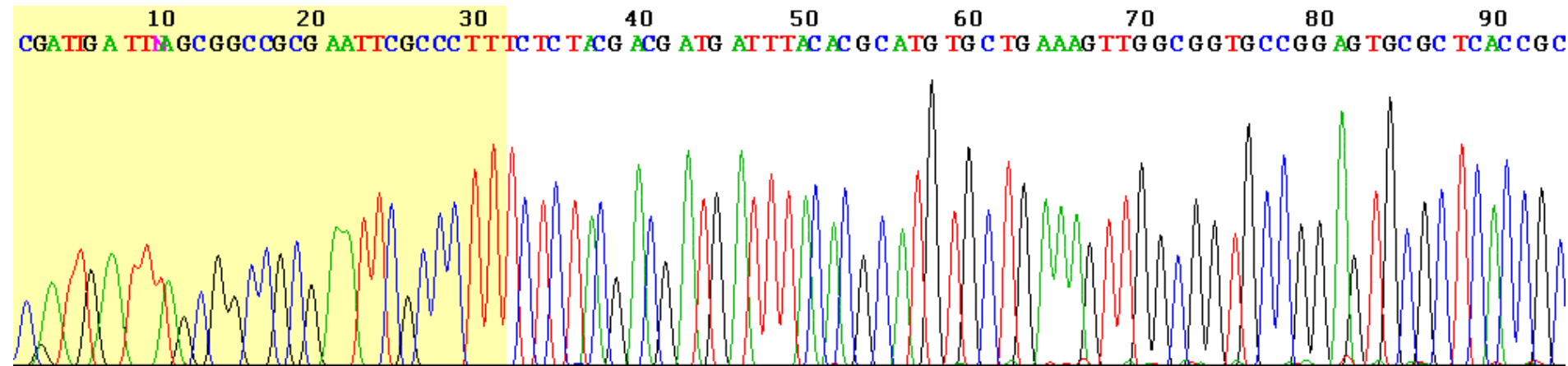
Αν και όλοι γενετικοί δείκτες ποσοτικοποιούν (άμεσα ή έμμεσα) την ποικιλότητα σε επίπεδο DNA, η αλληλούχιση είναι η μόνη μέθοδος που επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό των βάσεων που διαφέρουν μεταξύ των ατόμων.



Η πιο παλιά μέθοδος:  
ραδιοσημασμένες αντιδράσεις  
αλληλούχισης

Τα βέλη υποδεικνύουν διαφορές  
μεταξύ 3 αφίδων

# DNA sequencing



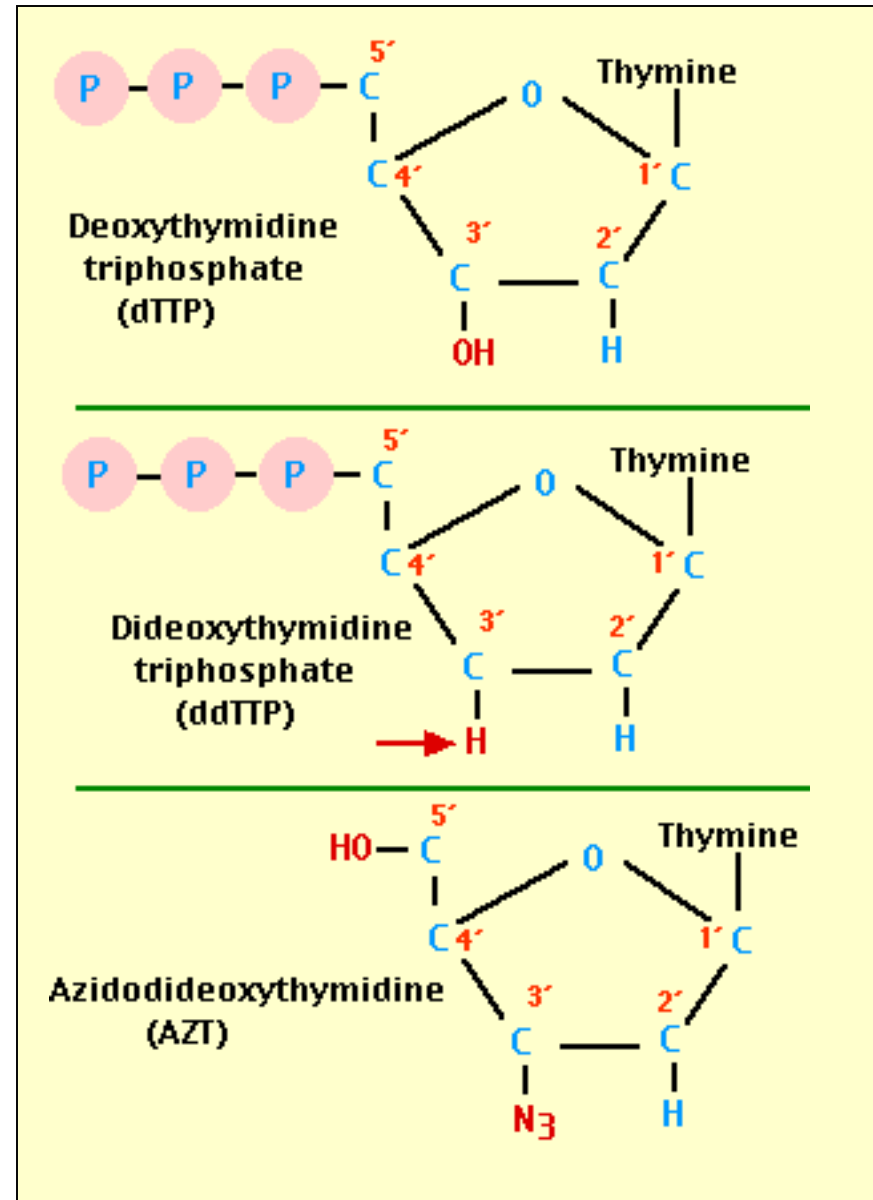
Αυτοματοποιημένη μέθοδος – πολύ κακό για τον προϋπολογισμό ενός εργαστηρίου



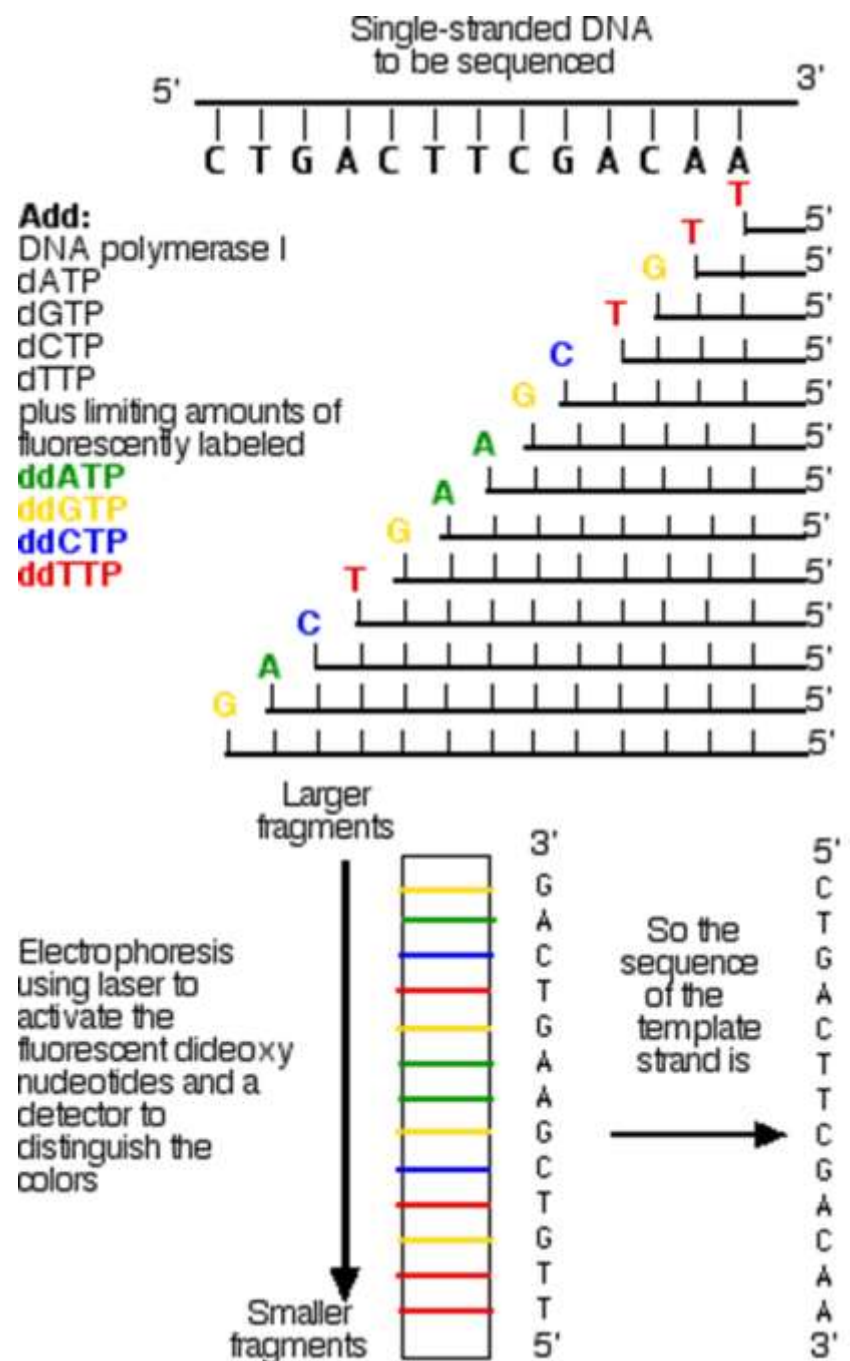
Η πιο δημοφιλής μέθοδος για την αλληλούχιση DNA είναι γνωστή ως **διδέοξυ μέθοδος ή μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας** (Sanger et al. 1977)

Το κλειδί της μεθόδου είναι η χρήση διδέοξυ-νουκλεοτιδίων (ddNTPs) για τον τερματισμό της αλυσίδας του DNA.

Τα ddNTPs στερούνται της 3'-OH που απαιτείται για το σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων



Εάν ο λόγος φυσιολογικών προς διδέοξυ νουκλεοτιδίων είναι αρκετά υψηλός, πολλές DNA αλυσίδες θα πετύχουν να προσθέσουν αρκετά νουκλεοτίδια πριν την προσθήκη ενός διδέοξυ που θα σταματήσει την διαδικασία



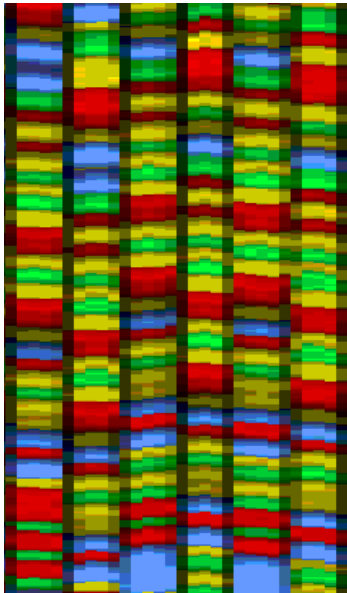
## Αυτοματοποιημένος αλληλουχητής -Automated sequencer



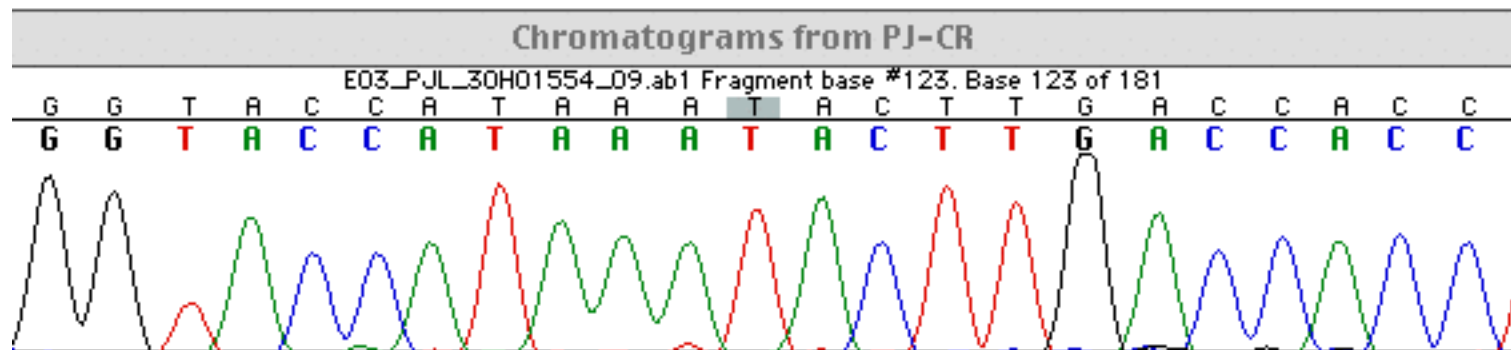
Ένα gel ή capillary μηχανήμα διαχωρίζει τα παραγόμενα θραύσματα βάσει μεγέθους.

Βάσει αυτών μπορούμε να «διαβάσουμε» την αλληλουχία από κάτω προς τα πάνω

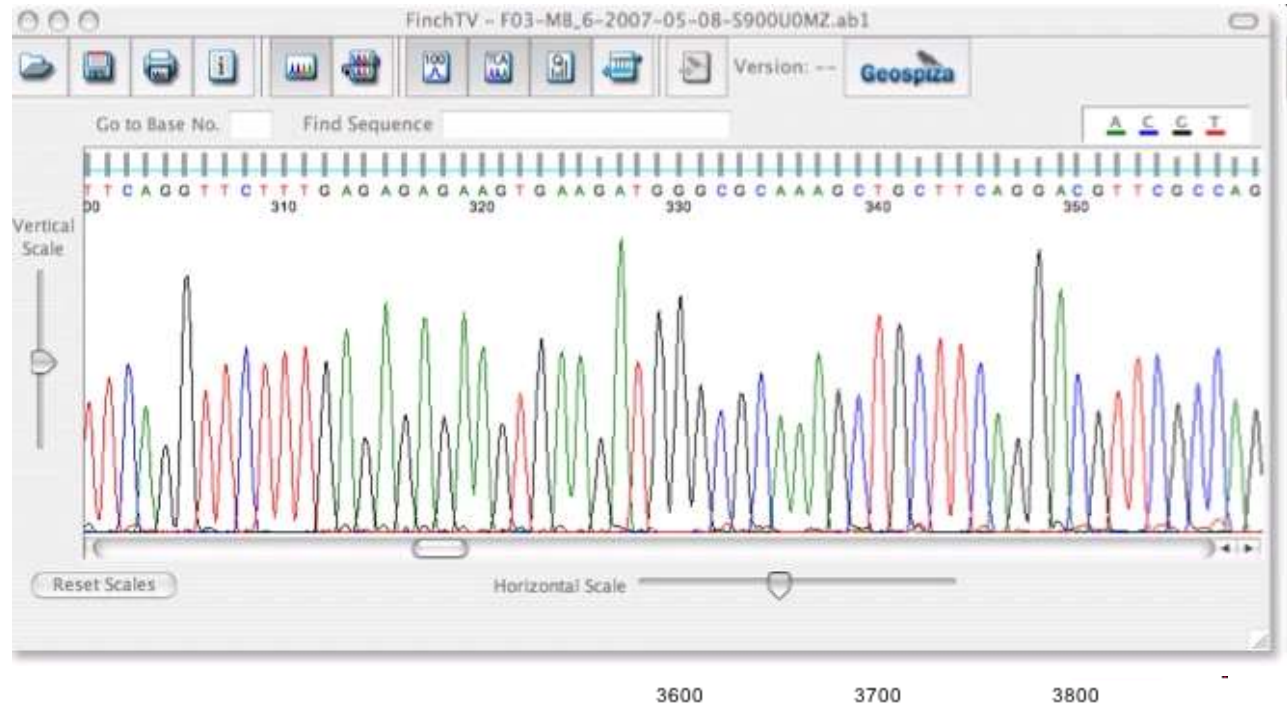
# Αυτό είναι μία ιδανική εικόνα αλληλούχισης από ένα αυτοματοποιημένο αλληλοχητή ABI 377



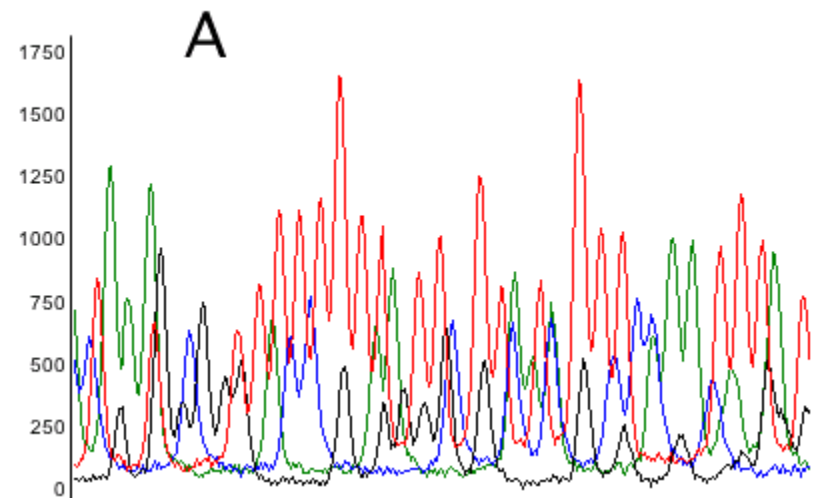
1. Τα trace files (dye signals) αναλύονται και οι καθορίζονται οι βάσεις (bases called) για την δημιουργία των χρωματογραφημάτων.
2. Χρωματογράματα από τις συμπληρωματικές αλυσίδες ευθυγραμμίζονται με την βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων.



## Καλής ποιότητας αλληλουχία



Χαρακτηριστικό πρόβλημα των αλληλουχιών που παράγονται είναι η **χαμηλή ποιότητα** των παραγόμενων αλληλουχιών στα πρώτα **40-50 νουκλεοτίδια** (εικόνα 12) και η χειροτέρευση της ποιότητάς της μετά τα **600-700 νουκλεοτίδια**.





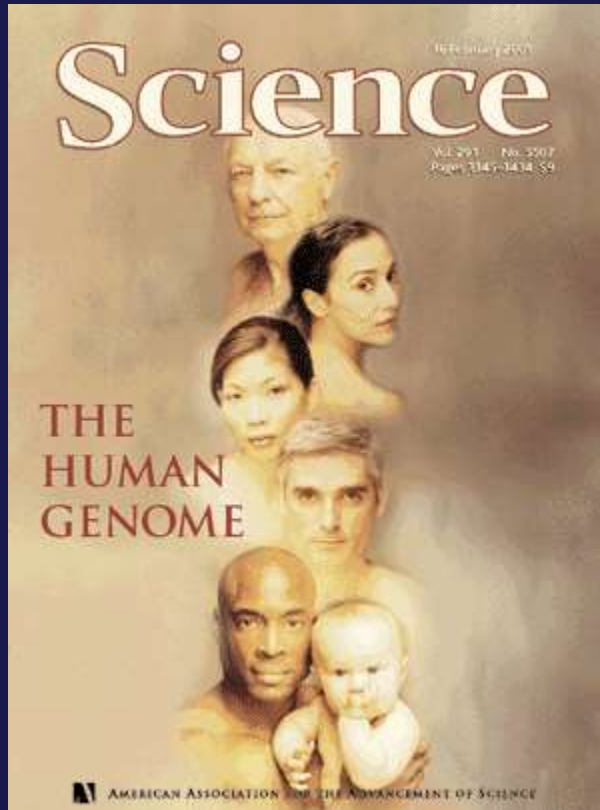


# Next Generation Sequencing





# Νέας Γενιάς Αλληλούχιση, ΝΓΑ



Χρόνος: 13 χρόνια!!!  
Κόστος: 3 δις USD!!!

## articles

# Initial sequencing and analysis of the human genome

International Human Genome Sequencing Consortium\*

\* A partial list of authors appears on the opposite page. Affiliations are listed at the end of the paper.

The human genome holds an extraordinary trove of information about human development, physiology, medicine and evolution. Here we report the results of an international collaboration to produce and make freely available a draft sequence of the human genome. We also present an initial analysis of the data, describing some of the insights that can be gleaned from the sequence.

860

© 2001 Macmillan Magazines Ltd

NATURE | VOL 409 | 15 FEBRUARY 2001 | www.nature.com

## articles

# Finishing the euchromatic sequence of the human genome

International Human Genome Sequencing Consortium\*

\* A list of authors and their affiliations appears in the Supplementary Information

The sequence of the human genome encodes the genetic instructions for human physiology, as well as rich information about human evolution. In 2001, the International Human Genome Sequencing Consortium reported a draft sequence of the euchromatic portion of the human genome. Since then, the international collaboration has worked to convert this draft into a genome sequence with high accuracy and nearly complete coverage. Here, we report the result of this finishing process. The current genome sequence (Build 35) contains 2.85 billion nucleotides interrupted by only 341 gaps. It covers ~99% of the euchromatic genome and is accurate to an error rate of ~1 event per 100,000 bases. Many of the remaining euchromatic gaps are associated with segmental duplications and will require focused work with new methods. The near-complete sequence, the first for a vertebrate, greatly improves the precision of biological analyses of the human genome including studies of gene number, birth and death. Notably, the human genome seems to encode only 20,000–25,000 protein-coding genes. The genome sequence reported here should serve as a firm foundation for biomedical research in the decades ahead.

NATURE | VOL 431 | 21 OCTOBER 2004 | www.nature.com/nature

©2004 Nature Publishing Group

931

# Νέας Γενιάς Αλληλούχιση, ΝΓΑ

Comparison of next-generation sequencing methods<sup>[53][54]</sup>

Method	Read length	Accuracy	Reads per run	Time per run	Cost per 1 million bases (in US\$)	Advantages	Disadvantages
Single-molecule real-time sequencing (Pacific Bio)	10,000 bp to 15,000 bp avg (14,000 bp N50); maximum read length >40,000 bases <sup>[55][56][57]</sup>	99.9999% consensus accuracy; 87% single-read accuracy <sup>[58]</sup>	50,000 per SMRT cell, or 500–1000 megabases <sup>[59][60]</sup>	30 minutes to 4 hours <sup>[61]</sup>	\$0.13–\$0.60	Longest read length. Fast. Detects 4mC, 5mC, 6mA. <sup>[62]</sup>	Moderate throughput. Equipment can be very expensive.
Ion semiconductor (Ion Torrent sequencing)	up to 400 bp	98%	up to 80 million	2 hours	\$1	Less expensive equipment. Fast.	Homopolymer errors.
Pyrosequencing (454)	700 bp	99.9%	1 million	24 hours	\$10	Long read size. Fast.	Runs are expensive. Homopolymer errors.
Sequencing by synthesis (Illumina)	50 to 300 bp	98%	up to 3 billion	1 to 10 days, depending upon sequencer and specified read length <sup>[63]</sup>	\$0.05 to \$0.15	Potential for high sequence yield, depending upon sequencer model and desired application.	Equipment can be very expensive. Requires high concentrations of DNA.
Sequencing by ligation (SOLID sequencing)	50+35 or 50+50 bp	99.9%	1.2 to 1.4 billion	1 to 2 weeks	\$0.13	Low cost per base.	Slower than other methods. Have issue sequencing palindromic sequence. <sup>[64]</sup>
Chain termination (Sanger sequencing)	400 to 900 bp	99.9%	N/A	20 minutes to 3 hours	\$2400	Long individual reads. Useful for many applications.	More expensive and impractical for larger sequencing projects.

Hindawi Publishing Corporation  
Journal of Biomedicine and Biotechnology  
Volume 2012, Article ID 251364, 11 pages  
doi:10.1155/2012/251364

Review Article

## Comparison of Next-Generation Sequencing Systems

Lin Liu, Yinhu Li, Siliang Li, Ni Hu, Yimin He, Ray Pong, Danni Lin, Lihua Lu, and Maggie Law

Quail et al. *BMC Genomics* 2012, **13**:341  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/341>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

## A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers

Michael A Quail\*, Miriam Smith, Paul Coupland, Thomas D Otto, Simon R Harris, Thomas R Connor, Anna Bertoni, Harold P Swerdlow and Yong Gu



# Νέας Γενιάς Αλληλούχιση, ΝΓΑ

Human whole-genome sequencing power.

HiSeqX<sub>five</sub>  HiSeqX<sub>25</sub>



Production-scale human whole-genome sequencing

GENOME S PER YEAR > 9000

[View the HiSeq X Series](#)

> 25 γονιδιώματα την ημέρα!

Human whole-genome sequencing power.

HiSeqX<sub>five</sub>  HiSeqX<sub>25</sub>



Population-scale human whole-genome sequencing

GENOME S PER YEAR > 18,000

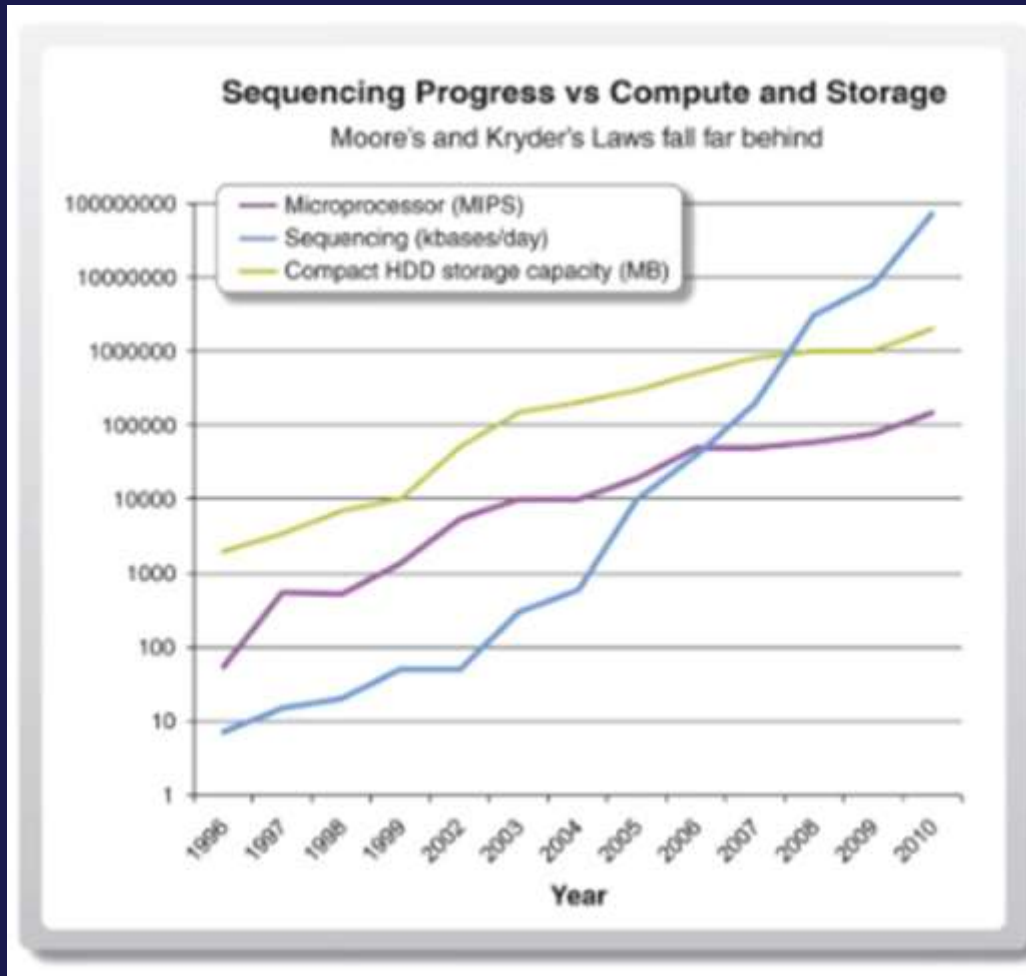
[View the HiSeq X Series](#)

> 50 γονιδιώματα την ημέρα!



# Νέας Γενιάς Αλληλούχιση, ΝΓΑ

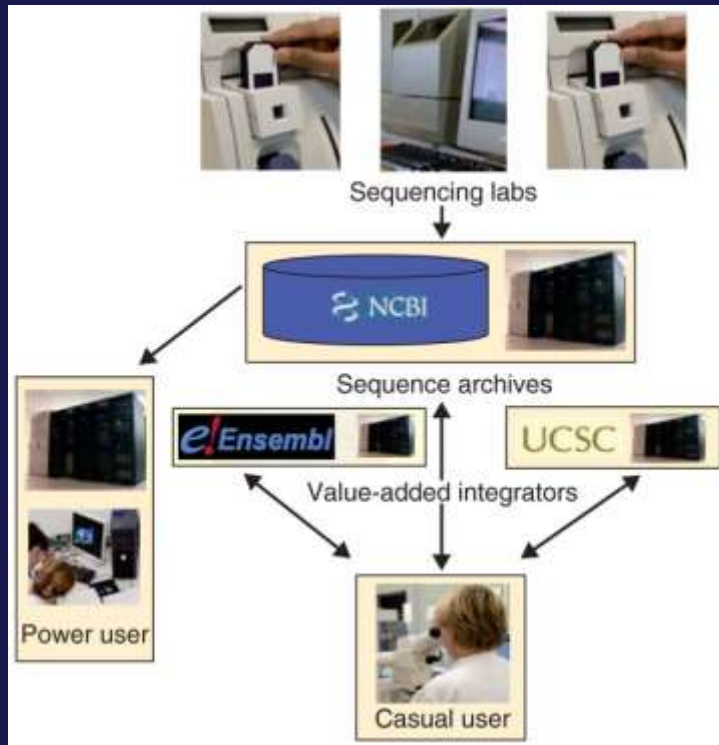
Τόσα πολλά γονιδιώματα σε τόσο λίγο χρόνο



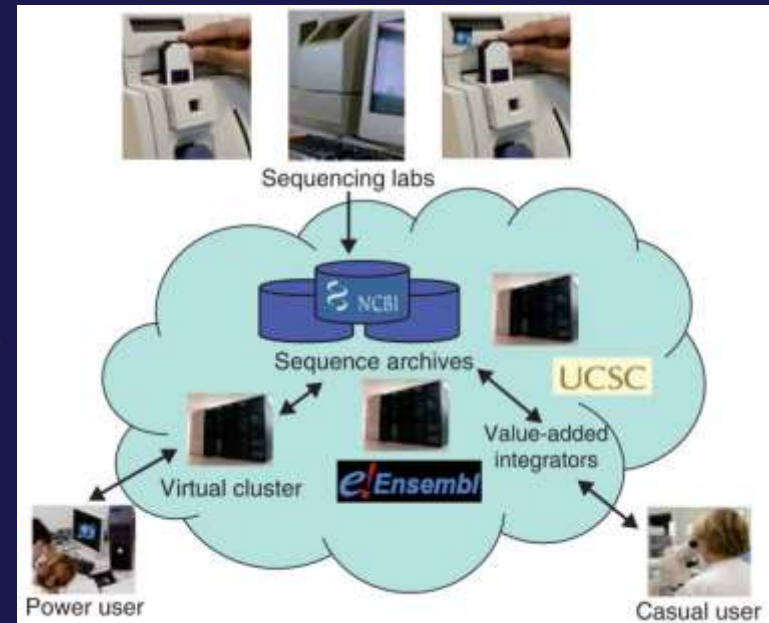
**Χάσμα**

δημιουργεί  
υπολογιστικά  
προβλήματα και  
προβλήματα στην  
αποθήκευση των  
δεδομένων

# Νέας Γενιάς Αλληλούχιση, ΝΓΑ

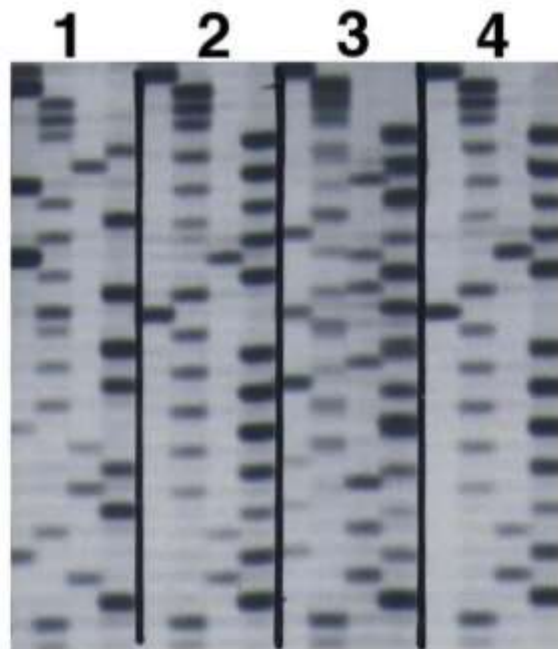


The old genome informatics ecosystem

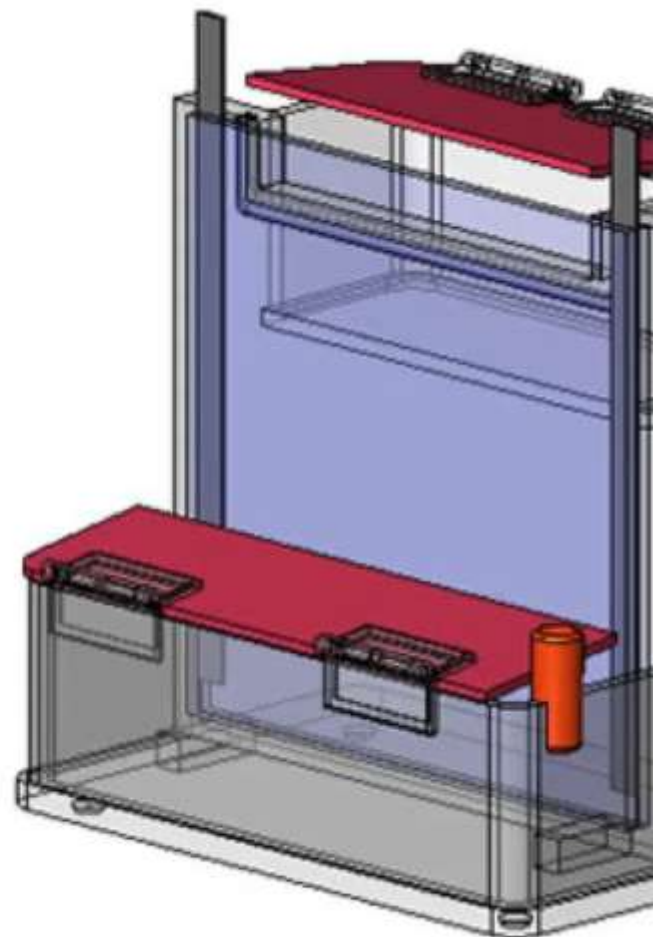


The 'new' genome informatics ecosystem based on cloud computing

Αρχικά με ραδιενέργεια...



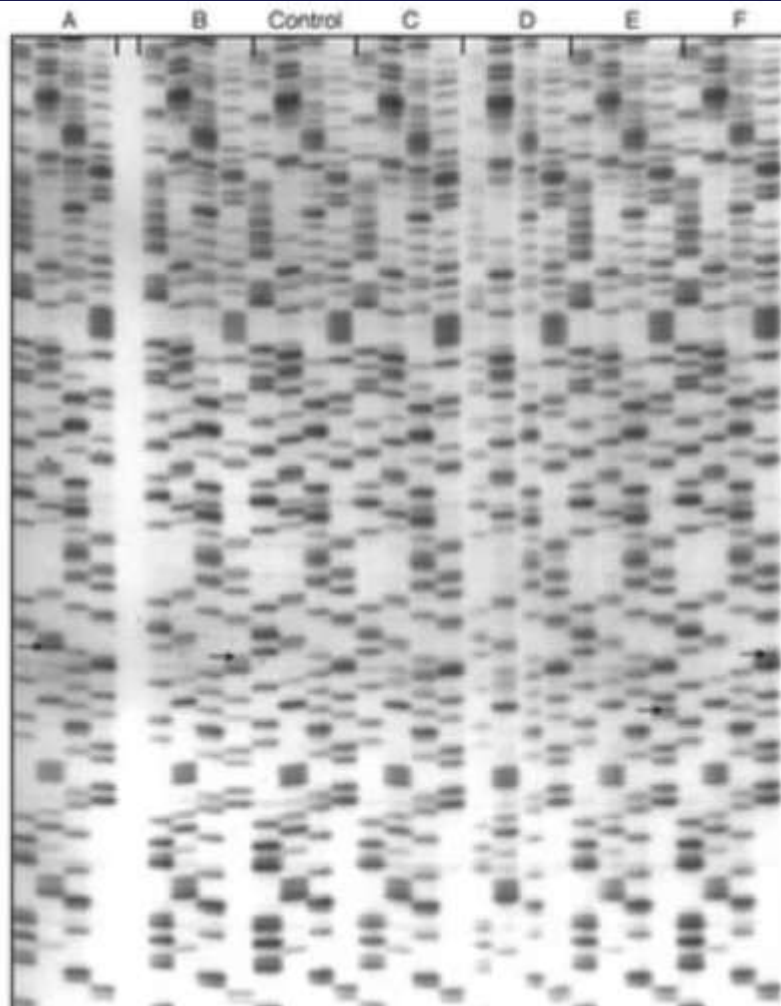
ctag







Αρχικά με ραδιενέργεια...



Control sequence is  
TCAAGAGAGTGAG...

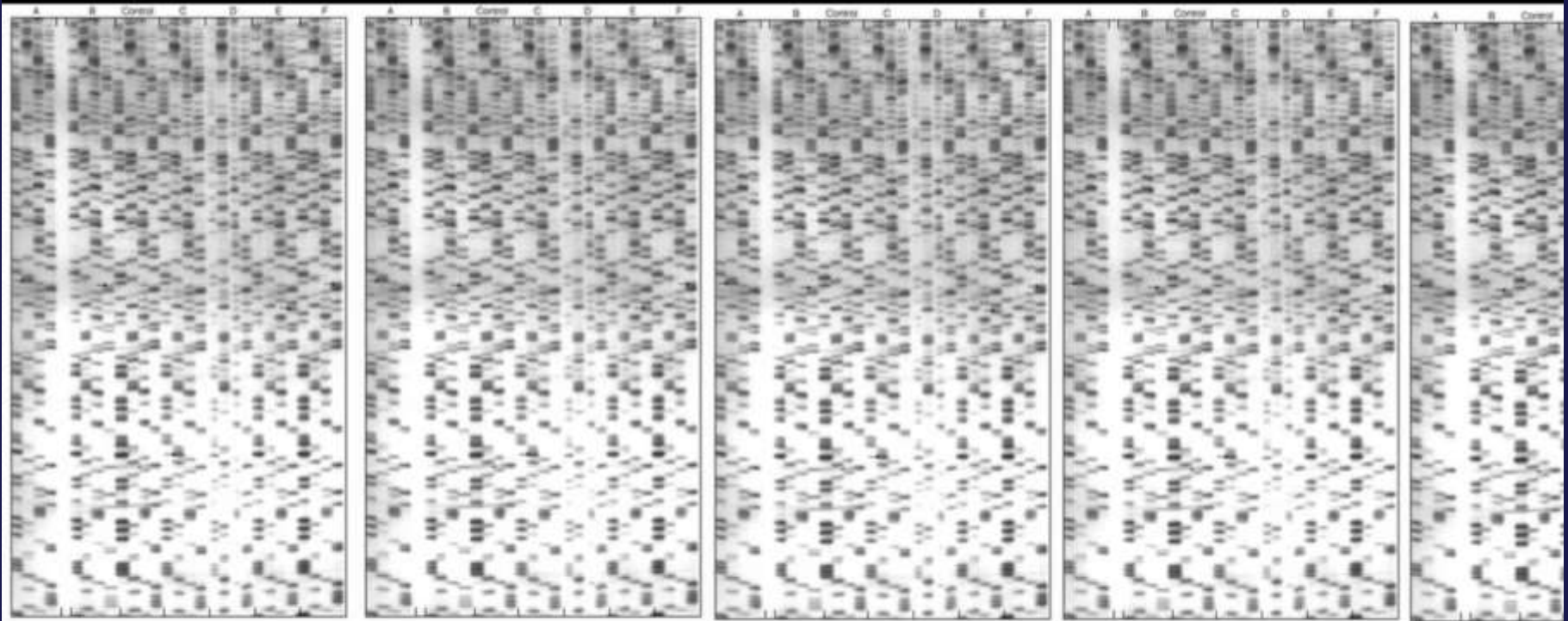
Length of read was about 150 bp.

On-the-job injury: I permanently  
lost my sense of humor reading  
sequencing films.

Χρειάζονταν 2 ημέρες για να διαβαστούν 200bp



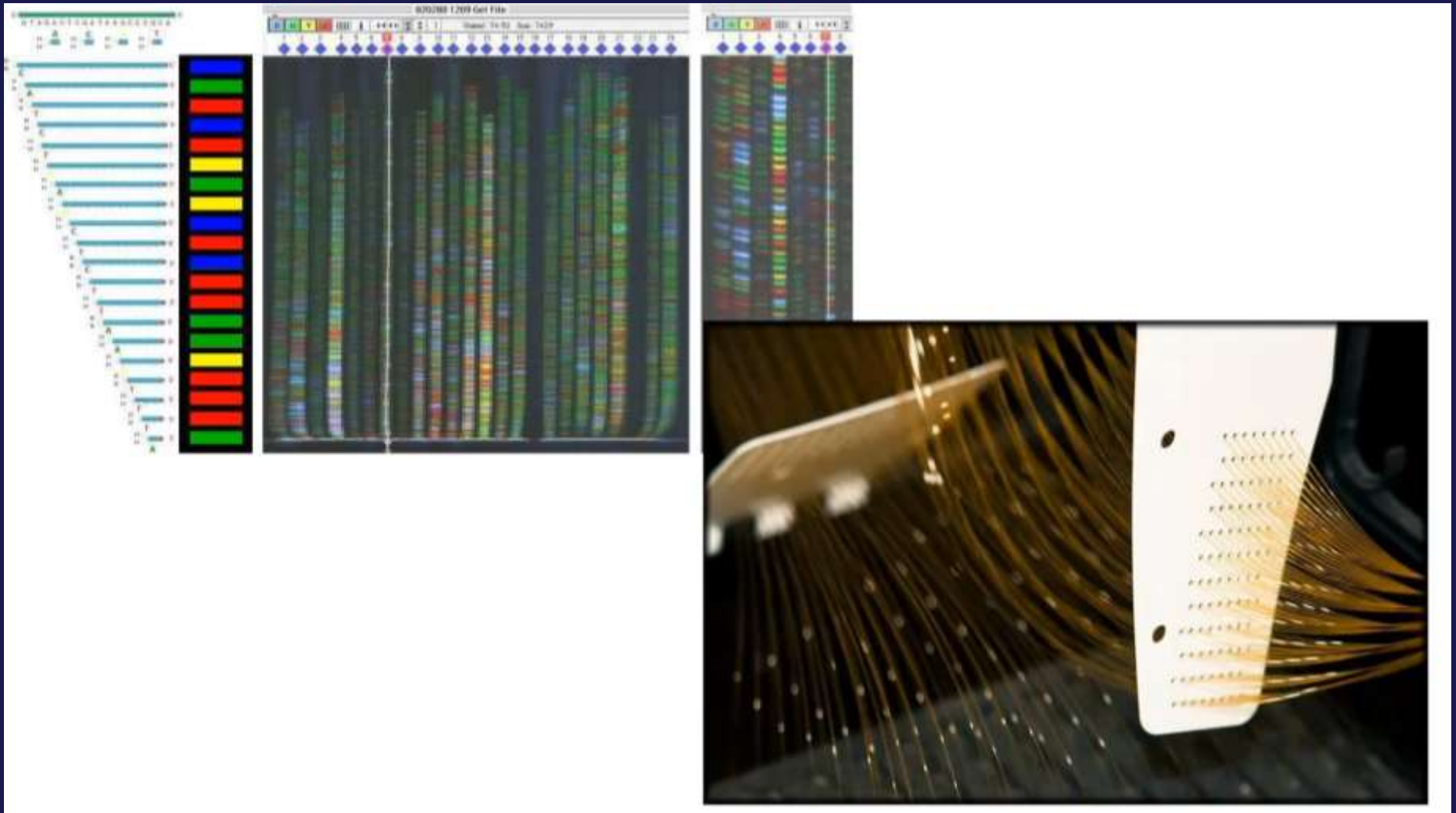
Αρχικά με ραδιενέργεια...



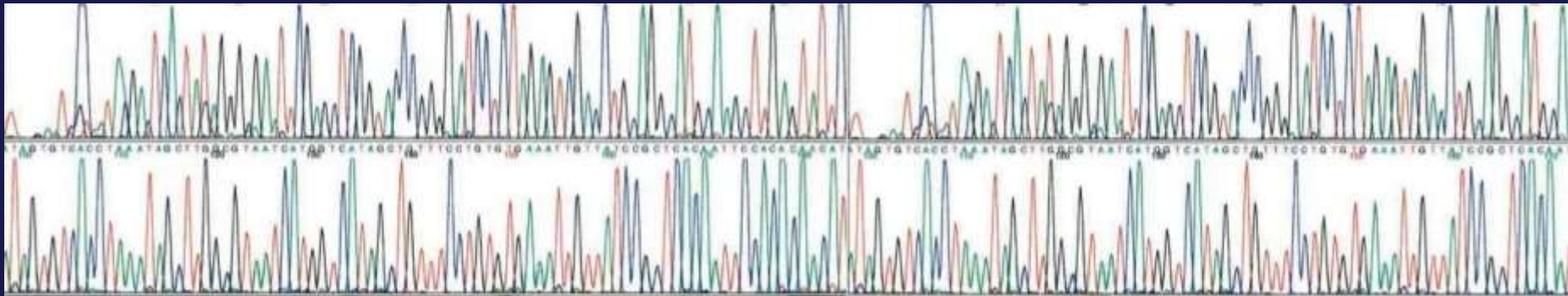
**3 billion bases / (200 bases x 8 sequences/gel) = 1.9 million gels.**

Δηλαδή περίπου 10.500 χρόνια...

Από τη ραδιενέργεια στον φθορισμό και από τα πηκτώματα στα τριχοειδή



# Από τη ραδιενέργεια στον φθορισσμό και από τα πηκτώματα στα τριχοειδή





Τα πρώτα συστήματα ηλεκτροφόρησης με τριχοειδή απέδιδαν 300bp ανά τρέξιμο και περίπου 4 τρεξίματα ανά φόρτωμα (shift).

Με 3 φορτώματα / ημέρα = 3600 bp/μηχάνημα/ημέρα

Αυτό αυξήθηκε κατά 10 φορές στα επόμενα 5 χρόνια



Δηλαδή περίπου 230 χρόνια...

# Next Generation Sequencing



**ABI SOLiD**



**454 FLX**

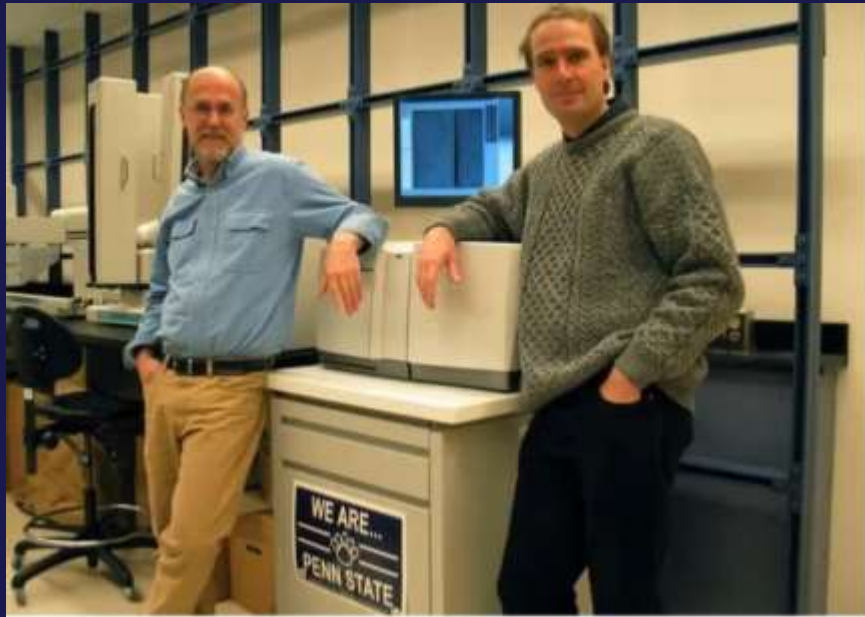


**Illumina Genome Analyzer**

**The current "next-gen" sequencing platforms**



# Next Generation Sequencing



Η πλατφόρμα 454-GS έχει την ικανότητα να διαβάζει 1 δις βάσεις/ημέρα.

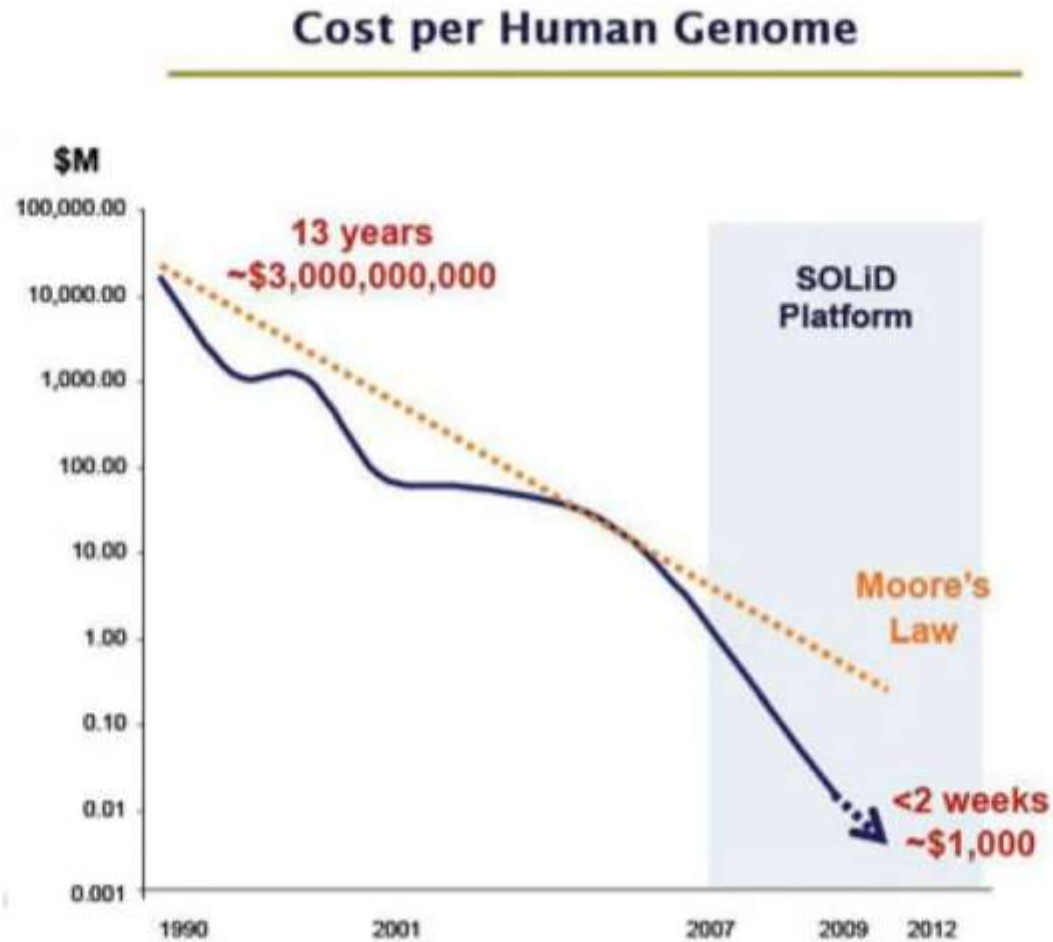
Συγκρίνετε αυτό με τις 200 βάσεις του 1995  
ή τις 3600 βάσεις του 2001



Χρειαζόμαστε απλά 3 συσκευές και 1 ημέρα ή 1 συσκευή και 3 ημέρες για την αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Κόστος: χιλιάδες αντί εκατομμύρια δολάρια

# Next Generation Sequencing



# Next Generation Sequencing

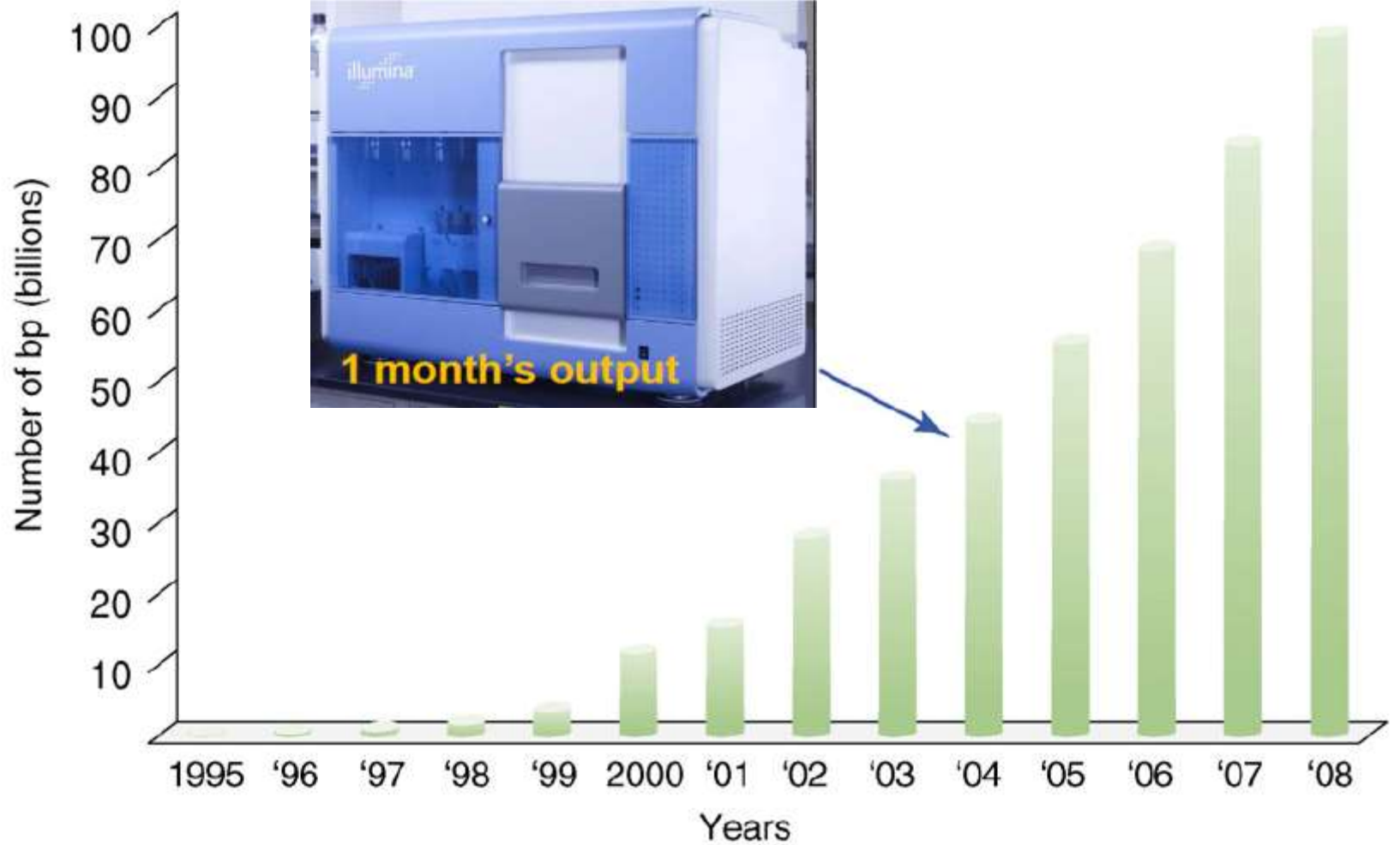


Κέντρο αλληλούχισης για την αλληλούχιση γονιδιωμάτων θηλαστικών το οποίο είναι σαν εργοστάσιο που απασχολεί πολυάριθμους ερευνητές.



Η τελευταίας γενιάς συσκευή αλληλούχισης μπορεί να παράγει σε 24 ώρες όσα δεδομένα παράγουν μερικές εκατοντάδες αλληλουχητές τύπου Sanger, με τη βοήθεια ενός μόνο ερευνητή..

# Next Generation Sequencing



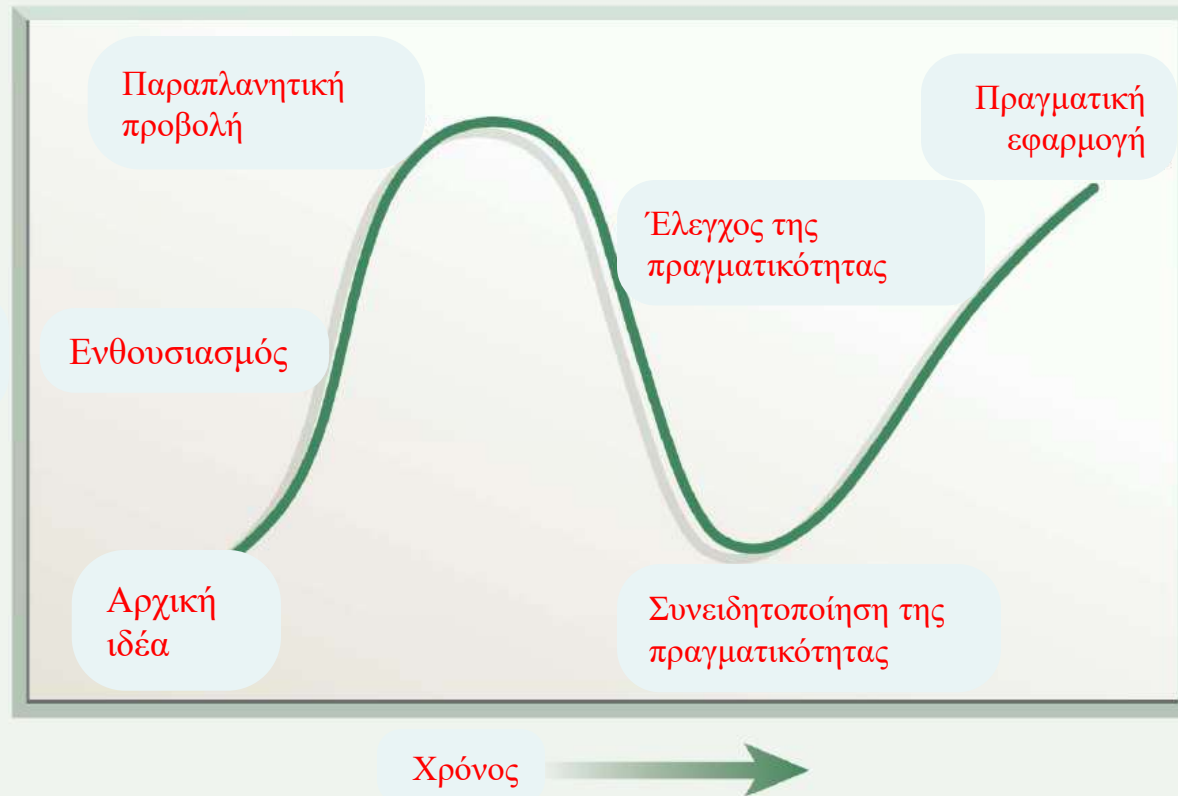
# Τρίτης γενιάς αλληλούχιση

- Helicos Heliscope™: αλληλούχιση ενός και μόνο μορίου DNA χωρίς αυτό να έχει προηγουμένως πολλαπλασιαστεί (π.χ. PCR)
- Pacific Biosciences SMRT: PacBio RS
- Life technologies: Semiconductor sequencing for life (Ion-torrent)





# Νέας γενιάς αλληλούχιση DNA



# RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

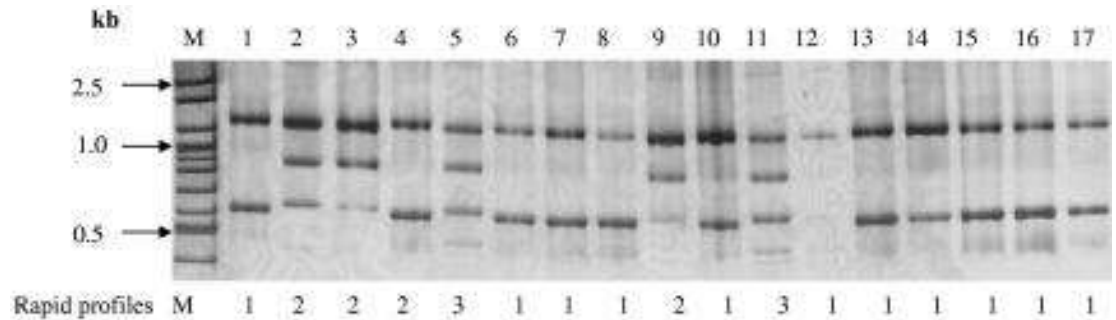
## Τυχαία πολλαπλασιασμένα πολυμορφικά τμήματα DNA

(Williams et al. 1990, Welsh & McClelland 1990)

➤ Κυρίαρχος δείκτης

➤ PCR based μέθοδος

➤ Επιτρέπει γενετικές αναλύσεις χωρίς να είναι γνωστή οποιαδήποτε πληροφορία σχετικά με το DNA του οργανισμού που μελετάται.



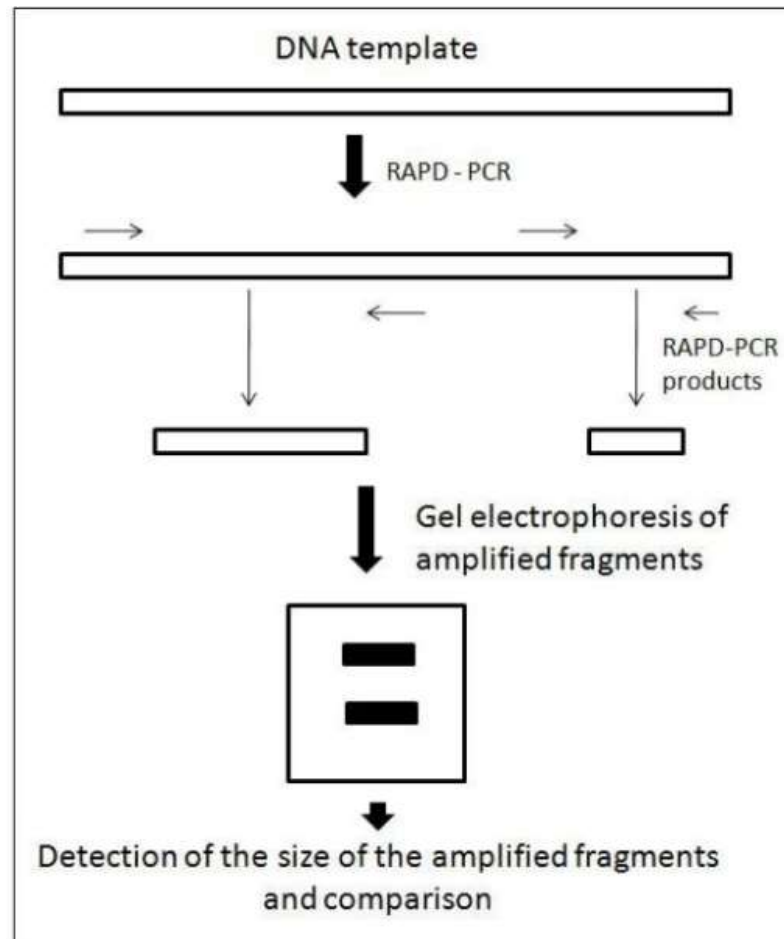
## Μειονεκτήματα

➤ Όχι καλή επαναληψιμότητα

➤ Επιμολύνσεις

# RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

Μικροί (συνήθως 10bp), τυχαίας αλληλουχίας εκκινητές, χρησιμοποιούνται στην PCR, παράγοντας προϊόντα που οπτικοποιούνται ως ζώνες σε gel ηλεκτροφόρησης



# RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)



Genetics and Molecular Biology, 28, 3, 479-484 (2005)  
Copyright by the Brazilian Society of Genetics. Printed in Brazil  
www.sbg.org.br

[Sofia et al. 2005 (04)]

Short Communication

## Genetic structure analysis of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern Brazilian Atlantic rainforest remnants

Silvia H. Sofia<sup>1</sup>, Francine M. de Paula<sup>1</sup>, Aline M. dos Santos<sup>2</sup>, Fernanda S. Almeida<sup>1</sup> and Leda M.K. Sodré<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Genética, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

### Abstract

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to analyze the genetic structure of *Eufriesea violacea* populations in three fragments (85.47, 832.58 and 2800 ha) of Atlantic rainforest located in the north of the Brazilian state of Paraná. A total of twelve primers produced 206 loci, of which 129 were polymorphic (95% criterion). The proportions of polymorphic loci in each population ranged from 57.28% to 59.2%, revealing very similar levels of genetic variability in the groups of bees from each fragment. Unbiased genetic distances between groups ranged from 0.0171 to 0.0284, the smallest genetic distance occurring between bees from the two larger fragments. These results suggest that the *E. violacea* populations from the three fragments have maintained themselves genetically similar to native populations of this species originally present in northern Paraná.

**Key words:** euglossine bees, euglossina, rainforest fragments, genetic variability, RAPD.

Received: June 7, 2004; Accepted: April 18, 2005.

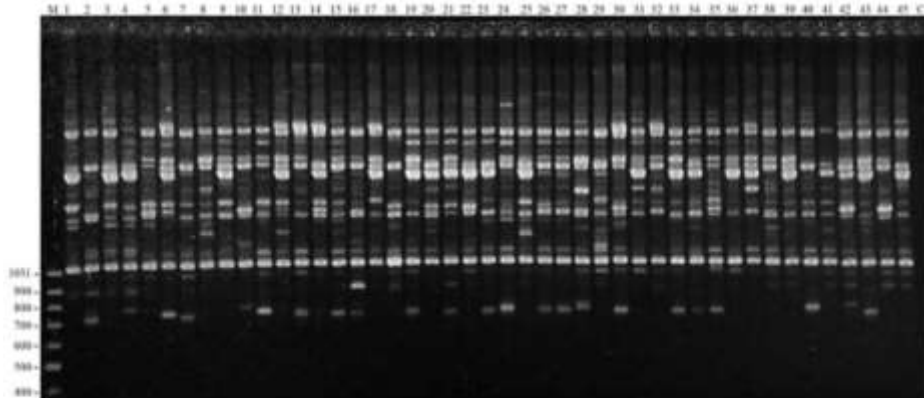


Figure 2 - DNA polymorphism (investigated using primer OPC9) of 45 *Eufriesea violacea* males from three rainforest fragments. Column M shows the 100 bp molecular weight marker (Biotools); columns 1 to 15 show the results for the São Francisco Park samples (SF); columns 16 to 30 show the results for the Godoy Forest samples (GF); columns 31 to 45 show the results for the Arthur Thomas Park samples (AT), and C = control.

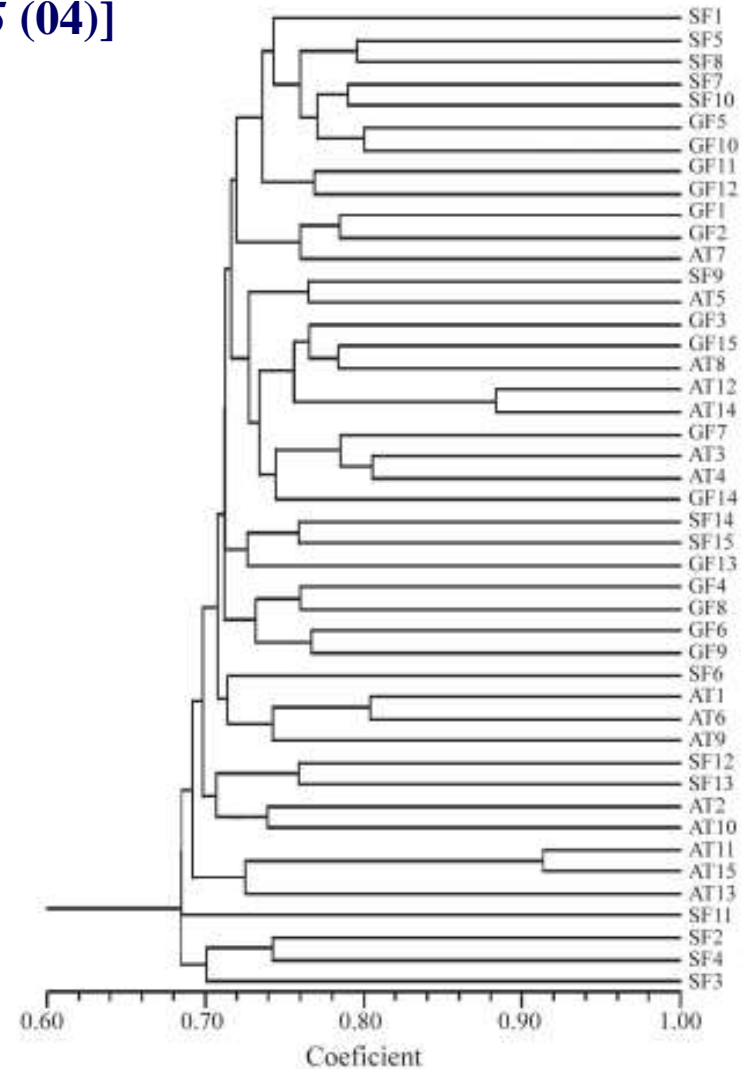
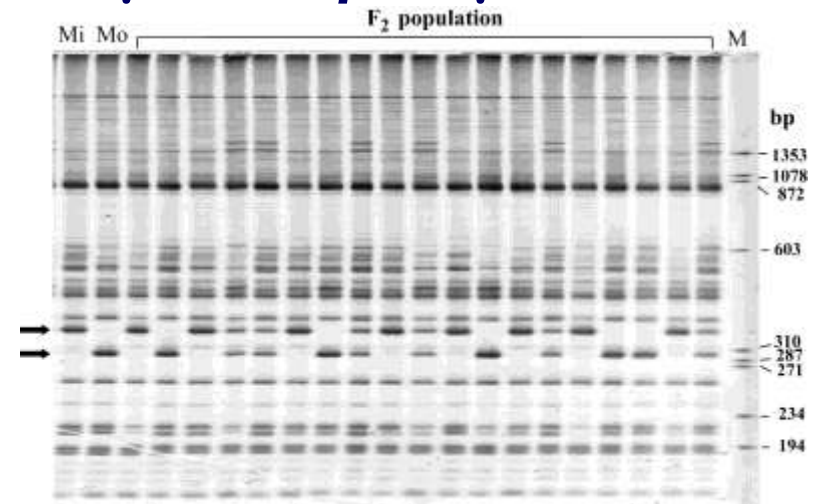


Figure 3 - Dendrogram constructed using the Jaccard coefficient and the unweighted pair group method with averages (UPGMA) method for *Eufriesea violacea* males from three forest remnants in northern Paraná, Brazil. SF = São Francisco State Park, GF = Godoy Forest, AT = Arthur Thomas Park.

# AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic)

## Πολυμορφισμός μήκους πολλαπλασιασμένων θραυσμάτων DNA

(Vos *et al.* 1995)



- Κυρίαρχος δείκτης
- PCR based μέθοδος
- Επιτρέπει γενετικές αναλύσεις χωρίς να είναι γνωστή οποιαδήποτε πληροφορία σχετικά με το DNA του οργανισμού που μελετάται.

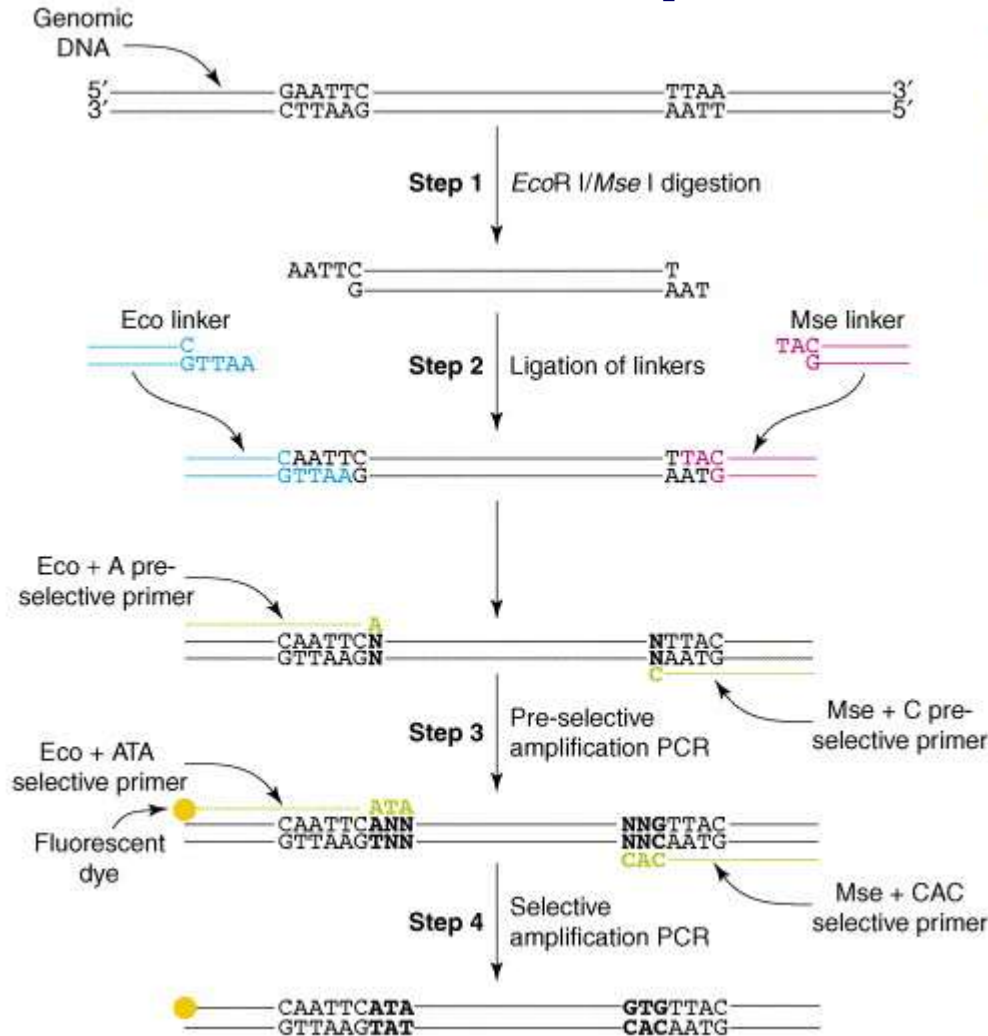
## Μειονεκτήματα

- δεν μπορούν να διακρίνουν ένα ομόγυζο από ένα ετερόζυγο άτομο, όπως όλοι οι κυρίαρχοι δείκτες



# AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic)

[Meudt & Clarke 2007 (05)]



## Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances

Heidi M. Meudt<sup>1,2</sup> and Andrew C. Clarke<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Allan Wilson Centre for Molecular Ecology and Evolution, Massey University, Private Bag 11222, Palmerston North 4442, New Zealand

<sup>2</sup>Museum of New Zealand, Te Papa Tongarewa, PO Box 467, Wellington 6140, New Zealand

<sup>3</sup>Institute of Molecular BioSciences, Massey University, Palmerston North, New Zealand

# AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic)

Vol 439|19 February 2006|doi:10.1038/nature04325

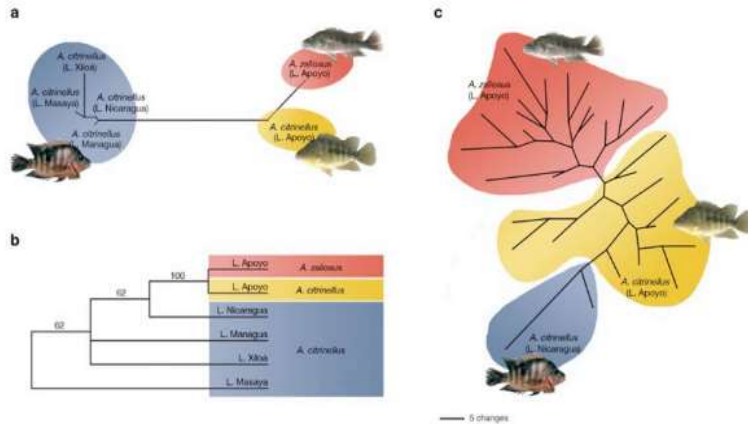
nature

LETTERS

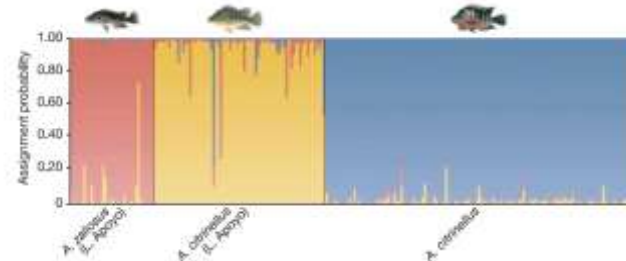
## Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish

Marta Barluenga<sup>1\*</sup>, Kai N. Stölting<sup>1\*</sup>, Walter Salzburger<sup>1,2\*</sup>, Moritz Muschick<sup>1</sup> & Axel Meyer<sup>1</sup>

**Supplementary Figure 3 | Nuclear marker phylogenies.** **a**, Microsatellite based population tree calculated with CONTML applying a Brownian motion approximation. **b**, Microsatellite based population tree calculated with POPULATIONS applying the Cavalli-Sforza and Edwards method. Numbers above the branches are bootstrap values (10,000 replicates). **c**, Neighbor-joining phylogeny based on AFLP data. All nuclear markers clearly support the monophyly of the Lake Apoyo Midas Cichlids. The Arrow Cichlid (*A. zaliusus*) is derived from Lake Apoyo's Midas Cichlid (*A. citrinellus*) fauna rendering the ancestral species *A. citrinellus* paraphyletic.

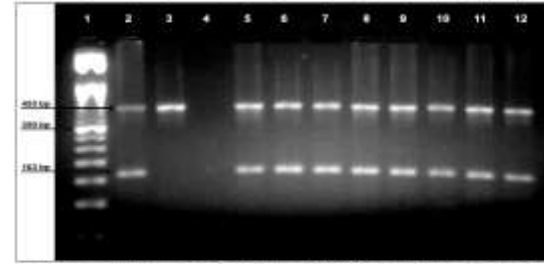


Sympatric speciation, the formation of species in the absence of geographical barriers, remains one of the most contentious concepts in evolutionary biology. Although speciation under sympatric conditions seems theoretically possible<sup>1-5</sup>, empirical studies are scarce and only a few credible examples of sympatric speciation exist<sup>6</sup>. Here we present a convincing case of sympatric speciation in the Midas cichlid species complex (*Amphilophus* sp.) in a young and small volcanic crater lake in Nicaragua. **Our study includes phylogeographic, population-genetic (based on mitochondrial DNA, microsatellites and amplified fragment length polymorphisms), morphometric and ecological analyses. We find, first, that crater Lake Apoyo was seeded only once by the ancestral high-bodied benthic species *Amphilophus citrinellus*, the most common cichlid species in the area; second, that a new elongated limnetic species (*Amphilophus zaliusus*) evolved in Lake Apoyo from the ancestral species (*A. citrinellus*) within less than ~10,000 yr; third, that the two species in Lake Apoyo are reproductively isolated; and fourth, that the two species are eco-morphologically distinct.**



**Figure 1 | The study area.** **a**, Map of the Pacific coast of Nicaragua and Costa Rica showing the large Nicaraguan lakes (Managua, Nicaragua), some of the volcanic crater lakes (Apoyo, Apoyeque, Masaya and Xilolá), Tisma Pond and the rivers Tipitapa and San Juan that are home to the Midas cichlid species complex (*Amphilophus* sp.). **b**, Satellite image showing Lake Apoyo and neighbouring Lake Masaya that has partially been overthrown by lava from a more recent eruption of the Masaya Volcano. Roman numerals indicate the four sampling localities. **c**, Photograph of Lake Apoyo showing its steep crater wall.

# Στο επόμενο ....



# Μοριακός προσδιορισμός – είδος, άτομο, φύλο