

Τα ευρήματα και οι δυσκολίες του DNA Barcoding μαζικής κλίμακας: Διερεύνηση της Οικογένειας Staphylinidae (Insecta: Coleoptera) στην Ελλάδα

ΧΑΤΖΗΚΑΛΛΙΝΙΚΙΔΗΣ Γεώργιος ^{1,*}, ΤΣΟΛΕΡΙΔΗΣ Κωνσταντίνος ^{1,*}, ΚΑΛΑΕΝΤΖΗΣ
Κωνσταντίνος ¹, ΑΒΤΖΗΣ Δημήτριος Ν. ², ΚΑΛΤΣΙΔΗΣ Αχιλλέας ^{2,3}, ΚΑΪΤΕΤΖΙΔΟΥ
Ελισάβετ ¹, ΚΟΚΚΑΡΗ Αναστασία ³, ΦΛΩΡΟΣ Γεώργιος ³, ΚΩΒΑΙΟΣ Δημήτριος ³,
ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΗΣ Αλέξανδρος ¹

(* ισότιμη συνεισφορά)

1. Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών
Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Ελλάδα
2. Ινστιτούτο Δασικών Ερευνών, Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός «ΔΗΜΗΤΡΑ», 57006 Βασιλικά,
Ελλάδα
3. Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Ζωολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Γεωπονίας, Αριστοτέλειο
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124 Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

Email επικοινωνίας: geochatzikal@gmail.com, ninotsol@gmail.com

Περίληψη

Η μοριακή ταυτοποίηση ειδών (DNA Barcoding) έχει συμβάλει στη μελέτη της βιοποικιλότητας, προσπερνώντας ορισμένα εμπόδια της παραδοσιακής μορφολογικής ταυτοποίησης. Σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη της Οικογένειας Staphylinidae (Insecta: Coleoptera) στην Ελλάδα, μέσω DNA Barcoding. Η συγκεκριμένη Οικογένεια αποτελεί μία από τις πολυπληθέστερες σε αριθμό ειδών και η μελέτη της στην Ελλάδα βασίζεται σε μορφολογικά κριτήρια. Με την εφαρμογή της μοριακής ταυτοποίησης μεγάλης κλίμακας, επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση 32 ειδών από 342 δείγματα, με 9 πρώτες καταγραφές για τη χώρα. Επιπλέον, διακρίθηκαν 25 MOTUs που αποτελούν υπογήφια είδη. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τις δυνατότητες του DNA-Barcoding αλλά και τα σημαντικά κενά εφαρμογής του.

Λέξεις-κλειδιά

DNA Barcoding, Ταξινομία, Βιοποικιλότητα, Staphylinidae

Εισαγωγή

Η οικογένεια Staphylinidae (Latreille, 1802) (Insecta: Coleoptera) είναι μία από τις πολυπληθέστερες Οικογένειες ζώων, (~67.000 είδη παγκοσμίως) (Irmeler, Klimaszewski & Betz 2018) με ποικιλία οικοθέσεων, ενδιαιτημάτων και διατροφής. Η παρουσία και ποικιλότητά της στην Ελλάδα μελετήθηκε από τον Assing (ενδεικτικά Assing 2015, Assing 2019) με ελάχιστα γενετικά δεδομένα. Η σταδιακή μείωση εξειδικευμένων ταξινόμων και η δυσκολία οριοθέτησης ειδών, οδήγησε στην εφαρμογή αξιόπιστων γενετικών μεθόδων (Krivosheeva et al. 2023). Η μοριακή ταυτοποίηση μέσω DNA barcoding στο ζωικό βασίλειο, βασίζεται στην ανάλυση κύριως του ειδο-ειδικού μιτοχονδριακού δείκτη COI (Υπομονάδα 1 της Οξειδάσης του Κυτοχρώματος C) και στη σύγκριση της αλληλουχίας του δείγματος με αλληλουχίες αναφοράς σε βάσεις δεδομένων (Hebert, Ratnasingham & deWaard 2003). Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μοριακή μελέτη της βιοποικιλικότητας της Οικογένειας Staphylinidae και η αξιολόγηση του DNA Barcoding στην διερεύνηση της. Η έρευνα, χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα Biodiversity Genomics Europe (BGE 2026).

Μεθοδολογία

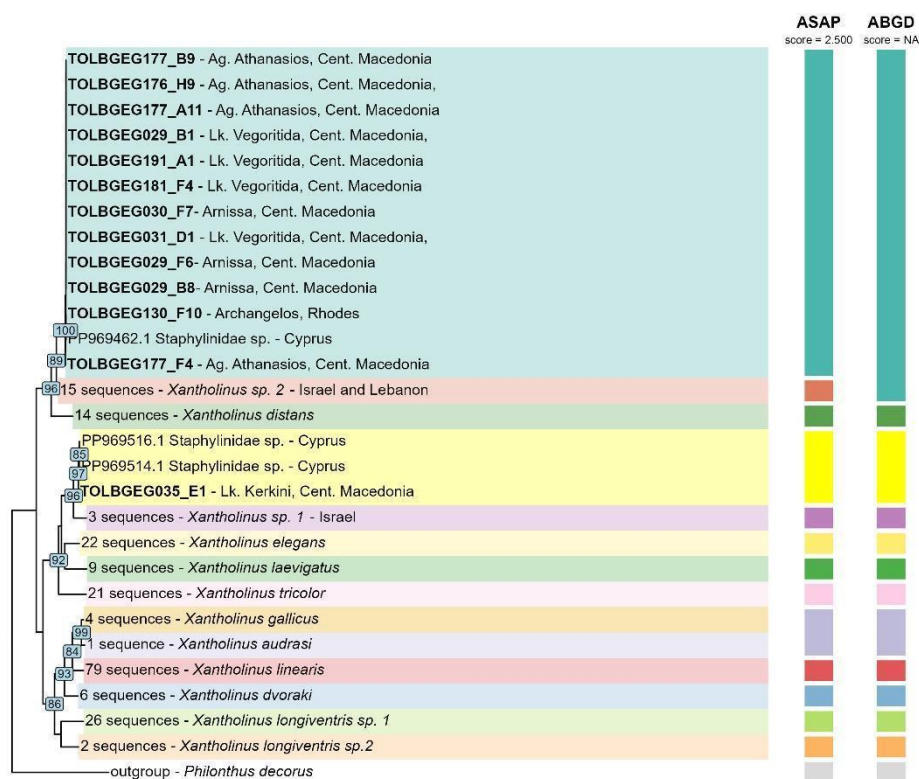
Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας, με ενεργή συλλογή και χρήση παγίδων τύπου pitfall, slot και malaise. Αλληλουχήθηκε η περιοχή COI-5P μέσω αλληλούχισης PacBio. Ακολούθησε αναζήτηση των παραγόμενων αλληλουχιών στις βάσεις δεδομένων BOLD και GenBank με τους αλγόριθμους BOLD-ID engine και BLAST αντίστοιχα. Κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα Maximum Likelihood ανά γένος μετά από πολλαπλή στοίχιση με τον αλγόριθμο MUSCLE στο λογισμικό MEGA (Kumar et al. 2024) και την εύρεση του βέλτιστου μοντέλου εξέλιξης (Posada et al. 2003). Εφαρμόστηκε η μέθοδος οριοθέτησης ειδών ABGD και ASAP (Puillandre et al. 2012, Puillandre, Brouillet & Achaz 2021). Η επεξεργασία και παρουσίαση των φυλογενετικών δέντρων έγινε στο RStudio 4.4.1 (Posit team 2025).

Αποτελέσματα

Από τις 358 παραγόμενες αλληλουχίες Staphylinidae μέσου μήκους 658bp, αποκλείστηκαν 16 λόγω χαμηλού αριθμού επαναλήψεων ή/και παρουσία indels στην πολλαπλή στοίχιση. Ταυτοποιήθηκαν 32 είδη και διακρίθηκαν ακόμη 23 υποψήφια είδη σε επίπεδο γένους (Εικ. 1), τα οποία απαιτούν μορφολογική αναγνώριση. Δύο δείγματα ταυτοποιήθηκαν μόνο σε επίπεδο υποοικογένειας. Συνολικά, διακρίθηκαν 9 υπο-οικογένειες, 30 γένη και 57 MOTUs, από τα οποία παράχθηκαν 223 μοναδικά barcodes για μελλοντική καταχώρηση στην BOLD. Σημειώθηκε ακόμη, η πρώτη καταγραφή εννέα ειδών στην Ελλάδα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Νέες καταγραφές ειδών για την Ελλάδα

Υποοικογένεια	Γένος	Είδος	Αριθμός δειγμάτων	Περιοχή
Aleocharinae	<i>Aleochara</i>	<i>A. sparsa</i>	10	Πέλλα, Σαμοθράκη, Τρίκαλα
	<i>Pella</i>	<i>P. humeralis</i>	1	Σαμοθράκη
	<i>Placusa</i>	<i>P. incompleta</i>	6	Πέλλα
		<i>P. pumilio</i>	1	Πέλλα
Mycetoporinae	<i>Mycetoporus</i>	<i>M. niger</i>	1	Ρόδος
Omalinae	<i>Anthobium</i>	<i>A. unicolor</i>	1	Λακωνία
Staphylininae	<i>Erymus</i>	<i>E. sp</i>	1	Θεσσαλονίκη
	<i>Quedius</i>	<i>Q. fuliginosus</i>	8	Αττική
		<i>Q. truncicola</i>	1	Τρίκαλα



Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο Maximum Likelihood του γένους *Xantholinus* με εφαρμογή του εξελικτικού μοντέλου GTR+G+I, 100 bootstrap επαναλήψεις και μεθόδους οριοθέτησης ειδών ASAP και ABGD. Τα δείγματα μας (έντονη γραφή) σχηματίζουν μονοφυλετικούς κλάδους με αλληλουχίες χωρίς τελική ταυτοποίηση είδους.

Συζήτηση

Η BOLD περιέχει αλληλουχίες για μόλις 3.847 είδη Staphylinidae ταυτοποιημένες σε επίπεδο ειδών, καθιστώντας αδύνατη την ταυτοποίηση πολλών ειδών με μοριακές μεθόδους, συμπεριλαμβανομένων των 25 MOTUs που βρέθηκαν. Συγκεκριμένα, κατά μέσο όρο μόλις

55% των ελληνικών ειδών που διερευνήθηκαν ανά γένος έχει καταχωρημένες αλληλουχίες. Συνεπώς, η έλλειψη αλληλουχιών αναφοράς καθιστά την αποκλειστικά μοριακή ταυτοποίηση ειδών αδύνατη. Έτσι, κρίνεται αναγκαίος ο περαιτέρω εμπλουτισμός των βάσεων με barcodes και η συνέργεια μορφολογικών και γενετικών μεθόδων ταυτοποίησης. Παράλληλα, είναι απαραίτητη η συνεχής αναθεώρηση των βάσεων, καθώς φυλογενετικές μελέτες όπως η παρούσα, αναδεικνύουν αλληλουχίες με λανθασμένες ταυτοποιήσεις, κακής ποιότητας αλληλούχιση αλλά και ευρήματα ενδιαφέροντος (πχ. κρυπτικά είδη).

Βιβλιογραφία

- Assing, V. (2015). On the Staphylinidae of the Greek island Chios (Insecta: Coleoptera). *Linzer Biologische Beiträge*, 47, 43–55.
- Assing, V. (2019). Monograph of the Staphylinidae of Crete (Greece). Part I. Diversity and endemism (Insecta: Coleoptera). *Beiträge zur Entomologie*, 69, 197–239.
- Biodiversity Genomics Europe (2026): <https://biodiversitygenomics.eu/project/bge-2023-2026/>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & deWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, S96–S99.
- Irmeler, U., Klimaszewski, J. & Betz, O. (2018). Introduction to the biology of rove beetles. Στο O. Betz, U. Irmeler & J. Klimaszewski (επιμ.), *Biology of Rove Beetles (Staphylinidae): Life History, Evolution, Ecology and Distribution*, 1–4. Cham: Springer.
- Krivosheeva, V., Solodovnikov, A., Shulepov, A., Semerikova, D., Ivanova, A. & Salnitska, M. (2023). Assessment of the DNA barcode libraries for the study of the poorly-known rove beetle (Staphylinidae) fauna of West Siberia. *Biodiversity Data Journal*, 11, e115477.
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S. & Tamura, K. (2024). MEGA12: Molecular evolutionary genetic analysis version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution*, 41, msae263.
- Posada, D. (2003). Selecting models of evolution. Στο P. Lemey, M. Salemi & A. M. Vandamme (επιμ.), *The phylogenetic handbook: A practical approach to DNA and protein phylogeny*, 256–282. Cambridge: Cambridge University Press.
- Posit team. (2025). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. Boston, MA: Posit Software, PBC.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21, 1864–1877.
- Puillandre, N., Brouillet, S. & Achaz, G. (2021). ASAP: Assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21, 609–620.