# ДНК-штрихкодирование – штангенциркуль биологической систематики

Елена Бадьева

На сегодняшний день науке известно около 1, 7 млн. видов живых организмов, в то время как по оценочным данным их существует не менее 10 млн. Таким образом, 80% видов еще не описано. Если бы изучение биоразнообразия продолжалось классическими методами, то на полную каталогизацию Природы понадобились бы многие десятилетия. Новый метод – ДНК-штрихкодирование – значительно ускоряет этот процесс. Международная программа «Штрихкод жизни» ставит своей целью создание библиотеки штрихкодов для всех видов на Земле. В идеале каждый штрихкод должен однозначно идентифицировать вид (так же, как штрихкод на упаковке товара).

Использование в биологической систематике нуклеотидных последовательностей – не новая концепция, и программа «Штрихкод Жизни» – отнюдь не первая в ряду молекулярно-биологических баз данных, созданных для решения в том числе и проблем биосистематики.

До 80-х годов ХХ века описание видов живых организмов, эволюционных взаимосвязей между ними, построение филогенетических (эволюционных) деревьев осуществлялись, как правило, на основе сравнительной эмбриологии, анатомии, морфологии и палеонтологических материалов. В 1982 г. была создана одна из первых международных открытых баз генетических данных, GenBank .

Анализ нуклеотидных последовательностей во многом меняет устоявшиеся представления о родстве видов и самой их идентичности, а иногда приводит к глобальному пересмотру крупных таксонов . Так, в результате исследования гена 16S рРНК в 1985 году американец Карл Вёзе разделил прокариотические организмы, которые ранее все назывались просто «бактериями», на два надцарства: эубактерии («настоящие» бактерии) и археи .

На страницах ЖОБ и на сайте «Элементы» ранее был опубликован ряд статей по реконструкции эволюционных связей таксонов на основе результатов молекулярно-биологических исследований (см., например: Шаталкин, 2004 ; Новые данные позволили уточнить родословную животного царства , «Элементы», 10.04.08).

В обсуждаемой обзорной работе, написанной сотрудницей Ботанического института им. В.Л. Комарова В.С. Шнеер, подробно рассказывается о ДНК-штрихкодировании, его истории, области применения и перспективах.

В 2003 году канадский ученый Пол Хеберт (Paul Hebert ) предложил использовать для видовой идентификации живых организмов короткие стандартные последовательности цепи ДНК (это и называется ДНК-штрихкодированием, DNA barcoding). В 2004 году был основан международный консорциум «Штрихкод жизни» («Consortium for the Barcode of Life, CBOL ). Россия присоединилась к этому проекту в 2005 году.

Программа «Штрихкод Жизни» особенный упор делает на стандартизацию и координирование работы. Информация о живых организмах, чьи штрихкоды вносятся в библиотеку, обязана быть максимально четкой.

«Штрихкод Жизни» предполагает создание библиотеки ДНК-штрихкодов (ДНК-ШК) для всех видов, живущих на планете, путем прочтения одного и того же участка генома каждого из них. Основные требования к эталонному участку ДНК:

1) небольшой размер (от 500 до 600-800 нуклеотидов);

2) последовательность нуклеотидов ДНК-ШК должна быть одинаковой у особей одного вида и достоверно различаться у особей разных видов;

3) во избежание ошибок последовательность нуклеотидов должна быть прочитана в обоих направлениях (с обеих цепочек ДНК);

4) необходимо знать прямой и обратный праймеры , чтобы можно было без труда выделить нужный участок ДНК из клеток исследуемого организма;

5) количество полиморфных (т.е. различающихся у разных особей одного и того же вида) позиций (нуклеотидов) в последовательности не должно превышать 1%.

По такому ДНК-ШК можно опознать живое существо даже по крошечному фрагменту любой ткани, практически не повреждая организм. Определение по штрихкоду особенно актуально в случаях, когда классические методы «не работают». Например, если имеются внешне неотличимые виды-двойники, или, наоборот, виду присущ половой диморфизм . Важно и то, что выбранные участки ДНК будут совпадать у особей на любой стадии развития: от яиц или семян до взрослых половозрелых организмов. ДНК-ШК упрощает определение мелких и морфологически вариабельных видов. Большую роль штрихкодирование играет в исследовании редких видов, которых нежелательно убивать даже в научных целях. Оно позволяет проводить так называемый неинвазивный анализ (без проникновения, не нарушающий телесную целостность): по зубам, перьям, меху, яичной скорлупе, сброшенной коже, по выделяемой слизи и слюне. Естественно, ДНК также можно выделить из музейных образцов: гербариев, скелетов, заспиртованных препаратов.

Создатели программы «Штрихкод Жизни» предполагают возможность существования универсального для всех организмов (или по крайней мере для эукариот) ДНК-ШК и предлагают в качестве эталона использовать 5'-фрагмент первой субъединицы митохондриального гена, кодирующего белок цитохром-С-оксидазу (СО1 ).

В группу каталогизируемых живых организмов не попадают пока прокариоты (по причине отсутствия у них митохондрий как таковых). Для растений фрагмент СО1 не подходит в качестве эталона в силу низкой и очень неравномерной вариабельности этой последовательности. Поэтому штрихкодирование растений осуществляют при помощи других фрагментов ДНК (ITS , ядерная рРНК, участки хлоропластного генома). У грибов длина СО1 существенно варьирует из-за присутствия интронов , поэтому в филогенетике грибов используют различные последовательности ядерной ДНК.

Однако у животных разных видов уровни внутри- и межвидовой вариабельности фрагмента СО1 различаются в среднем в 5-20 раз, и метод ДНК-ШК в целом неплохо работает.

В статье приведены интересные примеры выявления новых видов животных с помощью ДНК (не всегда митохондриальной). Жуков рода Rivacindela и бабочек рода Dioryctria сначала разбили на кластеры на основе анализа ДНК, а затем уже нашли морфологические и поведенческие отличия между полученными группировками. В пробах мелких донных пресноводных организмов была проведена идентификация последовательностей ДНК и на ее основе выявлены виды простейших, нематод, ракообразных и т.д. Ученые назвали такой метод «обратной таксономией». В.С. Шнеер описывает также результаты масштабного исследования ДНК китообразных.

Среди критических замечаний, высказываемых по поводу ДНК-штрихкодирования, преобладают предостережения о несводимости науки таксономии к данному методу. В.С. Шнеер подчеркивает, что ДНК-штрихкодирование – только инструмент таксономии, а вовсе не тождественное с ней понятие. Метод в данном случае не покушается на Большую Науку.

Высказываются и другие претензии к штрихкодированию (возможно, частично связанные с изначально завышенными ожиданиями). Так, в некоторых таксономических группах перекрываются интервалы внутри- и межвидовой вариабельности, молодые виды не всегда поддаются определению с помощью ДНК-ШК, внутриклеточные паразиты могут влиять на изменения митохондриальных генов. Много замечаний по неточности и неполноте исследования музейных коллекций, на базе которых строится библиотека штрихкодов.

В статье неоднократно подчеркивается принятое на сегодняшний день мнение о необходимости комплексной работы молекулярных биологов и специалистов по систематике рассматриваемых групп. Обнаружение в каком-то таксоне группы организмов, отличающихся только по ДНК-ШК, не означает автоматического присвоения этой группе нового видового статуса, а скорее подчеркивает необходимость дальнейшего изучения таксона. Безусловным преимуществом обсуждаемого метода является его демократичность. Во-первых, планируется возможность комментариев и критики внесенных данных не только самими авторами, но и третьими лицами. Во-вторых, стандартизированная библиотека штрихкодов находится в свободном сетевом доступе . В-третьих, появление миниатюрных компьютеризованных секвенаторов , разработке которых уделяется большое внимание, позволит практически на бытовом уровне определять живые организмы обыкновенным людям (не специалистам-систематикам), что значительно расширит описание биоразнообразия в местном и глобальном масштабе.

В.С. Шнеер также указывает области практического применения ДНК-штрихкодирования: экологический мониторинг, карантинные службы, медицина, ветеринария, криминалистика, судебно-медицинская экспертиза, контроль лекарственных средств и продуктов питания.

Интенсификация изучения биоразнообразия особенно актуальна в связи с тем, что по некоторым данным в результате негативного влияния хозяйственной деятельности человека каждый час с лица Земли исчезают три вида животных и четыре вида растений. Если эти данные верны, то за год биосфера нашей планеты теряет более 60 тысяч видов. Необходимость охраны природы не вызывает сомнений, но природоохранная деятельность предполагает предварительное этой природы каталогизирование.