

УДК 575.852'113:575.858:57.082.13

ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ – СПОСОБ ИХ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ИЗУЧЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ

© 2009 г. В. С. Шнеер

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН
197376 Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 2
e-mail: shneyer@VSI1044.spb.edu

Поступила в редакцию 21.11.2007 г.

ДНК-штрихкодирование было недавно предложено как метод видовой идентификации эукариот с помощью последовательности стандартного короткого фрагмента ДНК. Современные технологии позволяют секвенировать последовательность, выделив ДНК из крошечного фрагмента любой ткани организма на любой стадии онтогенеза, часто не повреждая его. В качестве стандартного участка для большинства групп животных была предложена переменная 5'-половина митохондриального гена CO1, для грибов и растений участок еще не выбран. Программа “Штрихкод жизни” предполагает создание библиотеки штрихкодов для всех видов на Земле, что позволит осуществлять отнесение особей к известным видам и обнаружение новых и криптических видов или, по крайней мере, их предварительное распознавание. Это имеет большое значение для описания мирового биоразнообразия, особенно в случае малоизученных таксономических групп и сред обитания. Программа предполагает также создание новой специальной электронной базы данных со строгими правилами для вводимой таксономической информации об образце и месте его хранения и стандартами секвенирования и ввода в базу последовательностей. В обзоре также рассмотрены критические замечания оппонентов ДНК-штрихкодирования, ограничения и факторы, которые нужно учитывать, области практического применения. Многочисленные работы, выполненные в последние годы на разных группах животных, подтвердили возможность и перспективность ДНК-штрихкодирования. Однако его эффективность зависит от наличия полной и точной референтной базы с учетом внутривидовой индивидуальной и географической изменчивости, поэтому оно может быть более успешным в сочетании с разносторонним таксономическим анализом изучаемых групп.

Ситуация с изучением биоразнообразия, сложившаяся к настоящему времени, вызывает тревогу. Науке известно около 1.7 млн. видов живых организмов, описанных преимущественно в последние 250 лет, тогда как по приблизительным подсчетам (по пищевым цепям и по выявляемости новых видов на контрольных участках с малоизученных территорий и ниш) на Земле существует не менее 10 млн. видов, 80% которых еще не обнаружено (May, 1988). Как следует из оценок разных авторов, к настоящему времени более или менее полно описаны только позвоночные животные (около 90% видов) и высшие растения (около 85% видов), в то время как членистоногих описано всего около 25% видов (в том числе 10% насекомых), по 5% грибов и диатомовых водорослей и т.д.

В результате человеческой деятельности видовое разнообразие катастрофически быстро сокращается, и есть серьезные опасения, что мы не успеем изучить и даже выявить большую часть его, если полагаться только на усилия имеющихся (во всех странах, вместе взятых) около 15 000 таксономистов, работающих традиционными методами. При этом существует множество видов, опреде-

лить которые сейчас могут лишь 1–2 специалиста во всем мире. По расчетам, даже если интенсифицировать усилия по выявлению новых видов в 30 раз, для описания существующего биоразнообразия понадобится 25 лет (Woodruff, 2001).

Были опубликованы призывы активнее использовать интернет-технологии для изучения биоразнообразия с целью обеспечения более широкого и полного доступа к таксономической информации (Bisby, 2000; Godfray, 2002). В ответ на это группа исследователей заявила, что считает более эффективным решение возникших проблем с помощью ДНК-систематики (Tautz et al., 2002, 2003). Следующим шагом стало предложение нового подхода (Hebert et al., 2003a,b), а затем глобальной международной программы, носящей условное название “Штрихкод жизни” (Barcode of Life Initiative), являющейся естественным продолжением программы “Геном человека” и направленной на раскрытие и молекулярную типификацию видового разнообразия всего животного и растительного мира Земли путем “прочтения” одного и того же участка генома у всех видов животных и растений. Программа предполагает, что можно найти уча-

сток генома, небольшой по размеру (до 600–800 нуклеотидов), эволюционирующий таким образом, что его последовательность будет одинакова у особей одного вида и разной у разных видов. Такой участок и называют ДНК-штрихкодом (ДНК-ШК – barcode). Определив последовательность этого участка ДНК у объекта и обратившись к специальной электронной базе данных (библиотеке ДНК-ШК), в которой будут содержаться сведения о последовательностях этого участка у всех видов (наподобие Генбанка, но более таксономически выверенной), любой пользователь сможет узнать, к какому виду относится объект. Если последовательность не совпадает ни с одной из имеющихся в базе, это может свидетельствовать об обнаружении нового, ранее не известного вида. Создание такой базы данных и должно быть результатом осуществления программы “Штрихкоды жизни”. Особенности программы на фоне уже проводившихся многочисленных молекулярно-филогенетических исследований – в видовой идентификации как главной цели, широкомасштабности планируемых работ, их солидной таксономической основе, использовании стандартного участка ДНК и создании специальной базы данных. ДНК-ШК (ДНК-штрихкодирование), по мнению инициаторов, избавит таксономистов от разного рода рутинной работы, и они смогут сосредоточить свои усилия на собственно таксономическом анализе, т.е. поиске и изучении новых видов.

ОБОСНОВАНИЯ ПРОГРАММЫ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ И НАЧАЛО РЕАЛИЗАЦИИ

Сторонниками инициативы стали в первую очередь представители областей биологии, связанных с необходимостью идентифицировать материал в больших количествах, – экологии, биогеографии, исследований биологического разнообразия, охраны природы и т.п. (Hebert et al., 2003b; Janzen, 2004; DeSalle, Amato, 2004). К ним присоединились геносистематики (впрочем не все – см. ниже), а также таксономисты, работающие с группами, где организм трудно или невозможно определить по морфологическим признакам, с очень мелкими организмами, где много криптических (морфологически очень сходных) видов. Было заявлено о желательности использования нового подхода для изучения нематод, губок, плоских червей, немертин, ракообразных, насекомых, ногохвосток, пауков, водорослей, мхов и многих других (Besansky et al., 2003; Proudlove, Wood, 2003; Blaxter et al., 2004, 2005; Paquin, Hedin, 2004; Schander, Willassen, 2005; Lefébure et al., 2006; Newmaster et al., 2006, и др.).

Предполагается, что ДНК-ШК может быть особенно эффективным в тех случаях, когда использование традиционных методов сопряжено с

большими трудностями, – если нужно идентифицировать особь по фрагменту, по любой особи в случаях полового диморфизма или социального полиморфизма, а также мелких и морфологически переменчивых организмов, особенно в такой среде, как водная (Dawson, 2005; Markmann, Tautz, 2005; Schander, Willassen, 2005; Gomez et al., 2007) или почва (Floyd et al., 2002; Blaxter et al., 2004). Можно также по ДНК идентифицировать неполовозрелых особей, личинок, проростки, растения без цветков или плодов, т.е. любые стадии развития организма.

Необходимый для ДНК-ШК массовый анализ образцов стал возможным благодаря ускорению и удешевлению такого рода исследований в результате технологического прогресса. Большую роль сыграл тот фактор, что в настоящее время с помощью ПЦР-реакций можно выделить ДНК из очень маленького количества биологического материала (Taberlet et al., 1996), а сам образец сохранить. Если нет возможности или нежелательно умертвить или даже поранить животное, разработаны методики так называемого неинвазивного анализа – из зубов, волос, меха (Vigilant, 1999), перьев (Leeton, Christidis, 1993), яичной скорлупы птиц (Strausberger, Ashley, 2001) и рептилий (Brown et al., 2006), навоза (Fernando et al., 2003), костей мелких позвоночных из погадок хищных птиц (Taberlet, Fumagalli, 1996), из слизи, выделяемой улитками (Kawai et al., 2004), кожи змей, сброшенной при линьке (Bricker et al., 1996), высушенного змеиного яда (Pook, McEwing, 2005) и других источников. Потенциальные области применения неинвазивных проб и факторы, которые необходимо при этом учитывать, особенно при изучении труднонаходимых и угрожаемых видов, рассмотрены в работах Таберле с соавт. (Taberlet et al., 1999), Пигго и Тейлора (Piggott, Taylor, 2003). ДНК можно выделять из музейных коллекционных образцов животных и растений – как высушенных, так и хранящихся в спирте (Cooper, 1994; Savolainen et al., 1995). Описано, как многократно использовали для выделения ДНК детали скелетов животных, представляющих музейные образцы, без их повреждения (Rohland et al., 2004; Asher, Hofreiter, 2006).

ДНК-ШК подразумевает использование материала достоверно установленного происхождения, определенного экспертами по данной таксономической группе, а также сохранение ваучерного образца, из которого выделена ДНК. Предусматривается создание новой, специальной базы данных для последовательностей, квалифицируемых как ДНК-ШК, с более строгими требованиями для вводимых данных. Одна из причин – многочисленные ошибки в существующих банках данных. Проблема ошибок и неточностей в основных геномных банках уже поднималась в литературе (Harris, 2003; Vilgalys, 2003). Случаются как ошибки секвенирования, так и определения таксономической при-

надлежасти источника ДНК – по небрежности (перепутанные этикетки, недостаточно проверенный материал) или в силу объективных причин – в случае переменных и плохо разграниченных видов. Неправильные определения для отдельных групп грибов, данные по которым содержатся в генных банках, могут составлять до 20% (Bridge et al., 2003; Nilsson et al., 2006). Четкая информация об образцах и сохранение их или их фрагментов для возможной проверки или повторного исследования также очень важны, этому пока уделялось мало внимания (Ruedas et al., 2000).

О необходимости стандартизации и координации исследований говорили и раньше. Авторы обзора, в котором рассматривали успехи молекулярной систематики такой огромной и слабоизученной группы, как насекомые (Caterino et al., 2000), сетовали, что из-за выбора разными авторами самых разных молекулярных маркеров, несмотря на многие достижения по отдельным группам (особенно на низких таксономических уровнях), результаты невозможно сравнивать и обобщать. Кроме того, не было строгих стандартов публикации данных – не все авторы четко указывали, какие именно локусы исследовали, праймеры, число исследованных особей и т.п.

Инициаторы ДНК-ШК исходили из того, что последовательности ДНК, выбираемые в качестве стандартных, должны быть: 1) короткими – не более 700–800 п.н. (пар нуклеотидов) для облегчения (и удешевления) выделения, амплификации и секвенирования; 2) достаточно консервативными, чтобы их можно было амплифицировать с широкоспецифичными праймерами (или иметь по бокам от себя консервативные участки для обеспечения работы универсальных праймеров), но достаточно дивергентными, чтобы различить близкородственные виды; 3) легко выравниваться, т.е. содержать мало инделей. В качестве стандартного был предложен 5'-фрагмент субъединицы 1 митохондриального белоккодирующего гена цитохром С оксидазы (CO1 или *cox1*), которая активно изучается уже более 20 лет, и ее переменность на низких таксономических уровнях была удовлетворительной во многих случаях (Moore, 1995).

Митохондриальные гены вообще по ряду причин пользуются популярностью в молекулярной систематике животных. Эти гены легче выделить, чем ядерные (особенно из поврежденного материала), так как в каждой клетке 100–10 000 митохондрий. Уровень различий последовательностей митохондриальной ДНК у животных в 5–10 раз больше, чем ядерной ДНК, т.е. можно использовать более короткие участки, что дешевле. Митохондриальные гены редко содержат некодирующие участки – интроны (исключение составляют грибы). Ген CO1 присутствует во всех исследованных митохондриальных геномах, включает около 1 540

нуклеотидов, для сравнительных исследований часто используется более переменная часть в 5'-области – около 650 п.н. Этот участок, как правило, легко амплифицируется с помощью стандартных праймеров (Folmer et al., 1994).

Сравнение фрагментов CO1 у 13 000 пар конгенеричных видов из разных групп животных выявило (Hebert et al., 2003b), что у особей разных видов они различаются не менее чем на 2% (в среднем 11.3%, что соответствует примерно 50 замещениям на 500 п.н. или 0.1 замещения на 1 сайт), тогда как у особей одного вида – не более чем на 1% (Hebert et al., 2003a). Уровни внутри- и межвидовой переменности (дивергенции) этой последовательности различаются в 5–20 раз. В большинстве исследованных в работе (Hebert et al., 2003b) групп доля правильно идентифицированных по CO1-фрагменту видов составляла 96–100%. В работе также были построены так называемые таксонные профили – совокупности последовательностей ДНК для достоверно определенных видов – представителей интересующей таксономической группы. Назначение профиля – характеризовать разнообразие в пределах группы, создать сетку, к которой можно будет “привязать” виды, определение которых по немоллекулярным признакам представляет трудность.

С целью внедрения и разворачивания ДНК-ШК предпринимали энергичные организационные усилия. В 2003 г. в Колд Спринг Харборе состоялись две конференции – в марте “Таксономия и ДНК”, в сентябре – “Таксономия, ДНК и штрихкоды жизни”, в которых приняли участие специалисты по таксономии микроорганизмов, животных и растений, молекулярной биологии и биоинформатике. В результате этих двух конференций и были начаты работы по программе “Штрихкоды жизни”. Для координации исследований в мае 2004 г. был организован международный Консорциум штрихкодов жизни (Consortium for the Barcode of Life – CBOL, <http://barcoding.si.edu>) с секретариатом в Национальном музее естественной истории в Вашингтоне, объединяющий организации и лиц, работающих в русле данного подхода. В прессе стали писать о том, что по масштабности (и по объемам финансирования) проект “ДНК-штрихкодирование” будет сопоставим с закончившимся проектом “Геном человека”.

Вскоре канадский биолог Хеберт и его соавторы опубликовали четыре работы, которые должны были продемонстрировать эффективность ДНК-ШК на основе фрагмента CO1 (Hebert et al., 2004a,b; Hogg, Hebert, 2004; Barrett, Hebert, 2005). Использованы данные, полученные авторами, и взятые из Генбанка. Дивергенцию последовательностей, как правило, определяли, рассчитывая расстояния с использованием двухпараметрической модели Кимуры (Nei, Kumar, 2000), и сравнивали

их внутри- и межвидовую вариабельность. Оценивали также долю успешных таксономических идентификаций. Работы были выполнены на разных группах животных. Различия между видами птиц Северной Америки по CO1-последовательностям оказались в 19–24 раза больше, чем внутри видов, 7.05–7.93% против 0.27–0.43% соответственно (Hebert et al., 2004a). Межвидовая дивергенция у 203 видов пауков из трех отрядов была в среднем 16% (6.5–23%), внутривидовая – 1.4% (от 0 до 3.6%) (Barrett, Hebert, 2005). Дивергенция у ногохвосток (отр. Collembola) канадской Арктики между видами одного рода составила 8–19%, тогда как между особями одного вида в большинстве случаев – менее 1% (Hogg, Hebert, 2004). Наконец, работа, вызвавшая наибольший резонанс в прессе, касалась одного вида бабочек, *Astraptes fulgerator* (Hebert et al., 2004b), описанного в 1775 г. на основе морфологии взрослых особей. Двое из соавторов статьи (супружеская пара D.H. Janzen и W. Hallwachs) изучали личинок этой бабочки в течение 25 лет в одном из охраняемых районов Коста-Рики и обнаружили внутри вида несколько групп, различающихся по морфологии личинок и их пищевым предпочтениям. Когда проанализировали последовательности фрагмента CO1 у 466 личинок, оказалось, что на филогенетическом древе они образовали более 10 кластеров, коррелирующих с различиями в названных выше морфологических и экологических признаках. Дивергенция последовательностей составила 0–8.0% (в среднем 2.8%), т.е. у многих особей выше, чем обычно бывает в популяциях, представляющих один вид. Был сделан вывод, что *Astraptes fulgerator* представляет собой комплекс, состоящий не менее чем из 10 видов.

Встретившиеся в этих работах немногочисленные исключения, когда внутривидовая дивергенция была более 3%, авторы сочли свидетельством наличия невыявленных видов-двойников.

В результате Хеберт и его соавторы пришли к заключению, что пригодность ДНК-ШК для идентификации видов и выявления новых, еще не описанных видов вполне доказана. Было предложено установить правило 10-кратных различий ($10 \times \text{SST-species-screening threshold}$) внутривидовой и межвидовой дивергенции по CO1-фрагменту или ориентировочно использовать 2–3%-ное различие последовательностей как пороговое для видов (Hebert et al., 2004a). Вторым критерием было наличие взаимной (реципрокной) монофилии видовых кластеров, т.е. отсутствие перекрывания последовательностей.

В университете г. Гуэльфа (Канада) был организован исследовательский центр под руководством Хеберта (www.dnabarcoding.ca), где проводят собственные и совместные работы по ДНК-ШК и занимаются разработкой и совершенствованием методов. Там же строится новый институт

изучения биоразнообразия, оборудованный для широкомасштабного ДНК-ШК. При SBOL было организовано 5 рабочих групп, включающих ученых из разных стран: 1) группа по анализу данных; 2) группа по разработке базы данных; 3) группа по работе с ДНК; 4) группа по работе с растениями; 5) группа по разработке технологии. Уже проведены две международные конференции по ДНК-ШК – в феврале 2005 г. в Лондоне и в сентябре 2007 г. в г. Тайбэй (Тайвань).

СТАНДАРТЫ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ

Подчеркивалось (Hebert, Gregory, 2005), что ДНК-штрихкодированием следует называть не любое использование последовательностей ДНК для выявления видов и их границ, а лишь последовательностей, признанных стандартами (хотя пока не все авторы следуют этому указанию).

Согласно стандартам, разработанным SBOL, последовательность должна включать не менее 500 смежных нуклеотидов, быть прочитана в двух направлениях, содержать не более 1% полиморфных (неоднозначных) позиций, включать последовательности прямого и обратного праймеров. В случае, когда последовательность собрана из нескольких ампликонов с использованием нескольких праймеров, вся информация о них должна быть представлена с указанием номенклатурных обозначений праймеров. Пока принят как штрихкод лишь один участок ДНК – фрагмент CO1, соответствующий участку гена митохондриальной ДНК мыши, длиной 648 пар оснований, позиции от 58 до 705.

Было также установлено, что последовательности для типовых экземпляров, палеообразцов или представителей очень редких видов могут быть короче (конкретные случаи согласовываются с SBOL). При исследовании ДНК музейных образцов из-за деградации не всегда удается амплифицировать участок нужной, стандартной длины, поэтому апробируется возможность идентификации по более короткому участку. Успешными оказались попытки, предпринятые на насекомых, – удавалось идентифицировать паразитоидных мух по участку длиной 500 п.н. (Smith et al., 2006), а более 90% взятых образцов ос – даже по участку в 100 п.н. (Hajibabaei et al., 2006b). Анализ данных из Генбанка по последовательностям CO1 грибов показал, что идентификация большинства взятых видов была возможна по фрагменту длиной 300 пн (Min, Hickey, 2007).

Рабочая группа по базе данных – DWG (Database Working Group), консультируясь с уже существующими крупнейшими генными банками, разрабатывает базу данных INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration), в том числе стандарты представления данных – BRI (Bar-

code Records in INSDC). Подчеркнем, что отдельным штрихкодом считается последовательность одной особи. Представляемые данные должны содержать проверенную и достоверную информацию о том, что касается последовательности ДНК – образца, из которого она получена, и его видового названия. ДНК-штрихкоды должны быть связаны с информацией о ваучерных образцах. Для ваучерных образцов должны быть указаны: время и место (широта и долгота) сбора, кто собрал и кто определил, где образец хранится. Желательно изображение образца (фотография), особенно в том случае, если его нельзя сохранить (при неинвазивных пробах). Данные об образце должны быть связаны с информацией о видовом названии (литературными источниками) и с информацией о виде. Если есть возможность, нужно исследовать не менее 5–10 особей (причем не являющихся братьями или сестрами) вида или популяции. Для видов с выраженной филогеографической структурой желательно представить разные популяции.

Предлагаемые CVOB стандарты занесения ДНК-штрихкодов в базу были согласованы с коллегами из основных международных таксономических организованных сообществ и организаций – Species2000, Integrated Taxonomic Information System (ITIS), The Global Biodiversity Information Facility (GBIF), International Plant Names Index (IPNI), The International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN), Natural History Museum, London; the Royal Botanic Gardens, Kew; the Smithsonian Institution и другими, а также с крупнейшими генными банками.

Важным моментом является то, что занесение каждого ДНК-ШК в базу не рассматривается как окончательный и необратимый акт. Не только сами исследователи или организации, предоставившие данные, могут их удалять или модифицировать (как сейчас происходит в генных банках). Планируется разработать возможность для третьих лиц комментировать помещенные данные и высказывать критические замечания, после рассмотрения которых Консорциумом с соответствующими данными может быть снята пометка “штрихкод”. Таким образом, эта база должна быть курируемой. Пока новая база данных не создана, последовательности, отвечающие стандартам ДНК-ШК, с пометкой “barcode” могут быть представлены в генные банки NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan). Если позже выяснится, что данные не отвечают стандартам ДНК-ШК, они остаются в генном банке как обычные данные. Для сбора, хранения и анализа необходимых данных в рамках осуществляемых проектов создана он-лайновая интегрированная информационная система Barcode of Life Data System (BOLD – www.barcodinglife.org), поддерживающая все этапы аналитического пути от сбора

коллекций до библиотеки штрихкодов (Ratnasingham, Hebert, 2007).

Судя по полученным в последние годы данным, последовательность фрагмента CO1 подходит в качестве ДНК-ШК для многих животных и, возможно, для некоторых водорослей и грибов (Saunders, 2005; Seifert et al., 2007). Однако у некоторых животных варибельность гена CO1 слишком низка, например у губок, коралловых полипов (Erpenbeck et al., 2006; Hellberg, 2006). У других она слишком высока (некоторые ракообразные, амфибии – Goetze, 2003; Vences et al., 2005a) или ген подвержен крупным перестройкам (нематоды, трематоды, тихоходки – Blaxter et al., 2005) – в обоих случаях невозможно использовать консервативные праймеры. Для таких групп в качестве стандартной последовательности предлагаются другие участки генома, например ядерные рибосомальные 18S (SSU) и 28S (LSU) рРНК (Floyd et al., 2002; Markmann, Tautz, 2005; Lefébure, 2006).

Пока не выявлено подходящего участка и для ДНК-ШК растений. Гены митохондриальной ДНК, в том числе и CO1, для большинства из них (исключение составляют некоторые водоросли) не годятся из-за низкой и очень неравномерной варибельности и частых структурных перестроек (Wolfe et al., 1987; Cho et al., 1998, 2004; Adams, Palmer, 2003). Внутривидовая варибельность различных участков хлоропластного генома растений исследована недостаточно, только в последние годы наблюдается заметный прирост работ. Кодированные участки хлоропластных генов недостаточно варибельны на видовом уровне, некодирующие интроны и спейсеры более варибельны, но среди использовавшихся пока нет подходящего на роль ДНК-ШК (Show et al., 2005, 2007; Mort et al., 2007). Использование популярных в филогенетических исследованиях растений высоковарибельных внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) ядерных генов рРНК имеет много сложностей и ограничений (Buckler et al., 1997; Alvarez, Wendel, 2003; Campbell et al., 2005), хотя пока вряд ли возможно без них обойтись (Gemeinholzer et al., 2006; Feliner, Rossello, 2007). По мнению многих авторов, для ДНК-ШК растений придется использовать мультилокусный (Chase et al., 2005; Kress et al., 2005; Savolainen et al., 2005; Rubinoff et al., 2006; Kress, Ericson, 2007) или двухэтапный (Chase et al., 2005; Newmaster et al., 2006) подход. Подробнее вопрос об участках ДНК, могущих служить видоспецифичными маркерами в разных группах организмов, рассмотрен нами ранее (Шнеер, 2007). Предусмотрена процедура рассмотрения и принятия Консорциумом CVOB поступающих от исследовательских групп обоснованных предложений конкретных участков каких-либо генов в качестве ДНК-ШК.

КРИТИКА ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ И ЕГО ОГРАНИЧЕНИЯ

Работы по ДНК-ШК и сам подход вызвали энтузиазм экологов и всех тех, кто заинтересован в быстром определении трудных видов, и тревогу таксономистов. Сразу возникла активная полемика (Tautz et al., 2003; Seberg et al., 2003; Lipscomb et al., 2003; Mallet, Willmot, 2003; Sperling, 2003; Blaxter, 2004; Moritz, Cicero, 2004; Will, Rubinoff, 2004; Prendini, 2005; Will et al., 2005; Brower, 2006, и др.). Критические аргументы носили как общий, так и частный, касающийся отдельных сторон, характер.

Прежде всего, программные заявления о ДНК-ШК были восприняты как претензия на то, чтобы заменить собой таксономию, что вызвало дружный протест. Критике подвергся сам термин “ДНК-штрихкодирование”, впрочем, его неточность признают и сторонники. В самом деле, штрихкоды товаров – присваиваемая условная маркировка, которая даже не характеризует однозначно товар, тогда как ДНК-штрихкоды – присущие организмам молекулярные признаки, которые нужно выявить. Кроме того, термин был сочтен неудачным с точки зрения эволюционной биологии, так как предполагает, что каждый вид имеет строго фиксированные и неизменные признаки, как товары в магазине. Однако это был удачный пиар-ход. Если бы авторы употребляли название “генная идентификация” или “молекулярная идентификация”, это привлекло бы внимание только специалистов, а ДНК-ШК активно обсуждается в прессе, что вызывает интерес и способствует увеличению финансирования.

Многие критически настроенные авторы сошлись на том, что программа по установлению ДНК-ШК без морфологической проработки материала снижает интеллектуальное содержание таксономии и сводит ее к идентификации (Lipscomb et al., 2003; Sperling, 2003; Moritz, Cicero, 2004; Will, Rubinoff, 2004). Высказывалось опасение, что скудное финансирование, получаемое сейчас систематикой, станет еще меньше из-за оттока средств в ДНК-ШК (Wheeler, 2004; Brower, 2006). Признавая его полезность для идентификации, многие высказывались против того, чтобы оно заменило собой систематику, настаивали, что это лишь инструмент, а не программа (Miller et al., 2005; Brower, 2006), которая должна, как минимум, включать полное определение варибельности у особей и в популяциях и соотноситься с таксономическими гипотезами (видами), сделанными на основании изучения целых организмов. Данные о последовательностях должны использоваться в первую очередь как основа для последующей разработки диагностики, а не для принятия немедленных решений по разграничению видов.

Было отмечено, что термином ДНК-ШК обозначили две не вполне совпадающие задачи: 1) идентификация особей относительно ранее описанных (и достаточно хорошо изученных) таксонов; 2) выявление новых таксонов и получение информации для совершенствования таксономических классификаций (Moritz, Cicero, 2004). Многие предпочитают второе называть ДНК-таксономией (Lefébure et al., 2006; Pons et al., 2006). Однако разделить их на практике можно далеко не всегда, так как достаточно полно изученных групп еще очень мало, и даже в случае давно и, казалось бы, хорошо изученных таксонов сплошь и рядом обнаруживаются неожиданности, требующие дополнительного изучения. Можно сказать, что термин ДНК-ШК *sensu lato* прижился и все чаще встречается в заглавиях молекулярно-систематических работ, выполненных на видовом уровне.

Один из главных обсуждавшихся вопросов – может ли ДНК-ШК быть эффективным в тех случаях, в которых оно нужнее всего – для близких видов. Можно ли через ДНК-ШК различать близкие виды, можно ли их разграничить? Некоторые авторы с самого начала отвечали на эти вопросы отрицательно (Mallet, Willmot, 2003; Sperling, 2003). Надо сказать, что под близкими видами при этом обычно подразумевают морфологически сходные. Между тем каждое описание вида – это лишь гипотеза о прерывистом распределении комбинаций признаков (Nixon, Wheeler, 1990), и структурирование отдельных молекулярных и отдельных морфологических признаков может быть разным. В самом деле, все чаще выявляются так называемые криптические виды, неразличимые по морфологическим признакам, но имеющие кариологические, поведенческие и другие, в том числе молекулярные, различия. После внедрения метода ПЦР количество описываемых криптических видов увеличивается экспоненциально (Bickford et al., 2007). Оказалось, что они встречаются гораздо чаще, чем это ранее предполагали; их много у беспозвоночных животных (Blaxter et al., 2004; Witt et al., 2006), у амфибий, где часто встречается гомоплазия морфологических признаков (Wiens et al., 2003; Боркин и др., 2004; Vences et al., 2005a), и даже в таких, лучше других изученных группах, как млекопитающие (включающие сейчас более 5 000 видов), их может обнаружиться до 2 000 (Baker, Bradley, 2006). С другой стороны, бывают и случаи, когда виды, обладающие заметными морфологическими отличиями, очень мало различаются по CO1 (Burns et al., 2007; Elias et al., 2007).

Методология разграничения видов вообще недостаточно разработана, а на основе молекулярных признаков – особенно (Wiens, Penkrot, 2002). Этот вопрос уже рассматривался ранее на других генах. Авторы, проводившие анализ дивергенции по гену цитохрома *c* в некоторых группах млекопитающих, пришли к выводу, что, если руководство

ваться генетической концепцией вида, 2% различий характерны для внутривидовой дивергенции, 2–11% – для видов и подвидов, требующих дальнейшего изучения с целью выявления заслуживающих видового статуса, а дивергенция более 11% может рассматриваться как свидетельствующая о том, что это разные виды (Bradley, Baker, 2001). Высказывались и возражения против того, чтобы использовать степень генетической дивергенции для выделения видов (Ferguson, 2002), и мнение, согласно которому высокое значение дивергенции есть показатель активного процесса видообразования в исследуемой группе, но само по себе не может служить основанием для суждения о видовом статусе таксона (Ананьева и др., 2006).

Оппоненты указывают, что ДНК-ШК было бы легко осуществлять, если бы штрихкоды одного вида всегда были идентичны и отличны от штрихкодов всех других видов, чего на деле нет. Насколько распространено перекрывание интервалов дивергенции последовательностей между видами? Как сказано выше, Хеберт и его соавторы предложили делать разграничения на основе дивергенции последовательностей CO1 с пороговым значением 2–3%. Значения внутривидовой дивергенции CO1 фрагмента, укладывающиеся в предложенные 3%, были найдены при изучении животных из разных групп – инфузорий (Barth et al., 2006; Lynn, Struder-Курке, 2006), ракообразных (Lefebure et al., 2006), насекомых (Hebert et al., 2004b; Ball et al., 2005; Cywinska et al., 2006), птиц (Hebert, Gregory, 2005), рыб (Ward et al., 2005) и других. В этих случаях не было перекрывания изменчивости, и >95% исследованных видов можно было с большой долей уверенности идентифицировать. Впрочем, иногда сообщения о высоком проценте успешно идентифицированных образцов, например 96% для птиц (Hebert, Gregory, 2005), воспринимались компетентными людьми с некоторым скепсисом (Baker, Bradley, 2006).

В то же время у других групп перекрывание было выявлено – у моллюсков (Meyer, Paulay, 2005), амфибий (Vences et al., 2005a), насекомых (Meier et al., 2006; Wiemers, Fiedler, 2007) и других. Встречалась ситуация, когда внутривидовое расстояние было больше порогового, хотя последовательности отдельных видов образовывали монофилетические видовые клады (Ekrem et al., 2007). Найдено и обратное, когда уровень средней межвидовой дивергенции превышал 2%, но последовательности CO1 видов не образовали монофилетических клад, т.е. перекрывались, что могло быть вызвано недавней дивергенцией видов и наличием потока генов между ними (Gray et al., 2006).

Многие авторы полагают, что наблюдаемый “штрихкодový разрыв” часто может отражать недостаточную представительность выборки (Moritz, Cicero, 2004; Meyer, Paulay, 2005; Ekrem et

al., 2007; Wiemers, Fiedler, 2007), и предупреждают, что результаты ДНК-ШК можно считать убедительными, только если подробно исследована внутривидовая изменчивость – индивидуальная и географическая, включая сестринские виды. О том, что оценки дивергенции ДНК могут быть завышены, если взятая для анализа группа не включает имеющихся сестринских таксонов, предупреждали и раньше (Bradley, Baker, 2001). Дивергенция, накопленная двумя видами за время, прошедшее после их расхождения, зависит от времени и скорости накопления замен в последовательности. Поскольку сестринские виды, как правило, молодые, их трудно выявлять и по ним недостаточно данных, чтобы делать какие-либо обобщения.

Было предпринято несколько работ по идентификации *in silico* – брали последовательности из Генбанка и проводили поиск: ассоциируется ли каждая с соответствующим видом. Идентификация около 450 видов насекомых отряда Diptera по CO1 фрагменту оказалась малоэффективной (< 70% успешных определений) из-за широкого перекрывания внутри- и межвидовой изменчивости (Meier et al., 2006). Когда последовательности были идентичны, в 6% случаев они принадлежали разным видам. Если имелось несколько последовательностей одного вида и строились консенсусные последовательности, не удалось выявить уникальных ДНК-ШК для 21% видов. При попарном сравнении было найдено несколько видовых триплетов, когда расстояние между видами в двух случаях было ниже порогового значения (3%), а в третьем – выше его, что не позволяло с уверенностью разграничить виды. Однако виды в Генбанке были представлены скорее всего неполно и неравномерно, и авторы сделали вывод, что если ДНК-ШК возможно, то только при наличии таксономически полных баз данных. Когнато (Cognato, 2006) сделал попарные сравнения имеющихся в Генбанке последовательностей митохондриальных и ядерных ДНК сестринских видов насекомых, важных в экономическом аспекте, т.е. сравнительно хорошо изученных. И здесь в 28 случаях из 62 было обнаружено существенное перекрывание интервалов внутривидовой и межвидовой дивергенции. При использовании рекомендуемых для штрихкодирования пороговых значений дивергенции в 45% этих попарных сравнений нельзя было диагностировать вид. Автор допускал, что некоторые из сравнивавшихся таксонов немонофилетичны, что и послужило причиной такой картины. Наиболее впечатляющими были интервалы дивергенции CO1, обнаруженные у птичьих блох из рода *Columbicola* – 0.26–26% внутривидовая и 1.0–30.7% межвидовая. Позже было показано, что у 7 видов этого рода внутривидовая дивергенция CO1 составляет 5–20%, и это широко распространенные виды, которые могут обитать и были собраны на нескольких видах-хозяевах (Johnson et al., 2007). Для образцов,

живущих на одном хозяине, дивергенция не превышала 1%. Авторы работы предположили, что популяции, обитающие на разных хозяевах, представляют собой специализированные криптические виды, такого же рода результаты были получены и на паразитоидных мухах рода *Belvosia* (Smith et al., 2006, 2007). И в других случаях при обнаружении очень высоких значений внутривидовой дивергенции CO1, например до 19% у паука *Aoraki denticulata* (Boyer et al., 2007) и более 14% – у морской нематоды *Geomonhystera disjuncta* (Derycke et al., 2007), авторы предположили наличие криптических видов.

Сторонники ДНК-ШК все же признают, что оно может быть неэффективным для молодых видов (Hebert, Gregory, 2005). Такие недавно дивергировавшие виды часто еще могут гибридизировать между собой и составлять группы, называемые видовыми комплексами или супервидами. В этом случае последовательности их ДНК (в том числе и CO1) могут быть очень сходными. Сотрудники Хеберта считают, что ДНК-ШК по крайней мере может помочь определить границы видовых комплексов. Показано, что, когда группа недостаточно таксономически изучена и исследуется в географически ограниченном районе, 10-кратный уровень различий – это консервативный фильтр для видов, малоэффективный для недавно дивергировавших видов, но помогающий избежать выделения внутривидовых вариаций в качестве видов (Witt et al., 2006).

В то же время были проведены расчеты (использовали данные по CO1 и *cytb* у насекомых, морских ежей, амфибий, рыб и птиц), согласно которым вероятность достижения реципрокной монофилии и 10-кратного различия в уровнях дивергенции возрастает с увеличением времени, прошедшего после изоляции популяций, причем первая достигается гораздо быстрее, чем второе (Hickerson et al., 2006). 10-кратное пороговое различие устойчиво и с приемлемой ошибкой (<10%) дифференцирует виды только когда после репродуктивной изоляции популяций сменилось не менее 4 млн. поколений. Авторы этой работы не считают такой порог ни достаточным, ни необходимым и приходят к выводу, что при исследовании разных таксономических групп могут потребоваться разные пороговые различия уровней меж- и внутривидовой дивергенции.

Можно заключить, что проводить идентификацию, основываясь только на предлагаемых стандартных значениях дивергенции, нельзя, и последовательности ДНК следует использовать, включая в филогенетический анализ с последующей скрупулезной таксономической экспертизой.

Высказывались и опасения по поводу использования одного маркера. Впрочем, этот вопрос уже давно и активно обсуждался в связи с молекулярной систематикой в целом (Антонов, 2000), и это в

полной мере относится к видовому уровню. Предлагалось использовать в дополнение к фрагменту CO1 какой-либо участок ядерной ДНК, например для амфибий – рибосомального гена 16S рРНК (Vences et al., 2005b); да и в работе, выполненной на насекомых в лаборатории Хеберта, для уточнения важных результатов использовали ядерные последовательности ITS 1.2 и 28S рРНК (Smith et al., 2007).

Свои опасности таятся в использовании только митохондриального маркера (Funk, Omland, 2003). Потенциальные ограничения – сохранение предкового полиморфизма, отбор какого-либо нуклеотида (так как весь геном митохондрии – одна группа сцепления), поток генов и интрогрессия, а также паралогичные гены в результате переноса копий генов митохондриальной ДНК в ядро. Интрогрессия митохондриальной ДНК может приводить к тому, что ее дивергенция будет не соответствовать ядерной, что и было обнаружено, например, у североамериканской охраняемой бабочки *Lycaeides melissa* (Gompert et al., 2006). К тому же у многих животных и растений есть ядерные псевдогены митохондриального происхождения (*numt*), которые, коамплифицируясь вместе с митохондриальными последовательностями, могут существенно исказить топологию филогенетических деревьев (Lopez et al., 1994; Zhang, Hewitt, 1996) и повысить выявляемый уровень дивергенции (см. Cywinska et al., 2006). При этом распространены *numt* неравномерно, по их наличию и обилию могут различаться близкие виды. Если в работе наряду с митохондриальными последовательностями будут проанализированы неопознанные *numt*, это может привести к ложным филогениям с хорошим разрешением и высокой поддержкой; чтобы избежать этого, необходимо использовать известные способы выявления псевдогенов (Bensasson et al., 2001; Bailey et al., 2003).

Еще один источник возможных ошибок при ДНК-ШК связан с тем, что у многих животных (их список все расширяется), обнаружены внутриклеточные симбионты или паразиты – бактерии (*Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Cardinium*, *Androcidium*, *Rickettsia*), живущие в цитоплазме и передаваемые по материнской линии. Они оказывают очень существенное влияние на размножение хозяев (см. Захаров, 1999; Горячева, 2004) и изменяют эволюцию их митохондриальных геномов, что иногда искажает картину видовых отношений, выявляемую с помощью митохондриальных маркеров (Hurst, Jiggins, 2005; Whitworth et al., 2007).

Обращалось внимание и на то, что при выделении и амплификации ДНК с использованием универсальных праймеров необходимо учитывать широкое распространение очень мелких паразитических и симбиотических организмов, последовательности которых могут амплифицироваться вместе с

последовательностями более крупных изучаемых объектов (De Ley et al., 2005). Это особенно касается малоизученных групп мелких беспозвоночных животных.

Едва ли не самый важный фактор, на который указывали как оппоненты, так и сторонники, – референтная база. Эффективность ДНК-ШК будет напрямую зависеть от ее полноты и точности. Одна из заявленных целей программы – исследование ДНК образцов музейных коллекций и использование их как референтного материала. Однако, по мнению ряда авторитетных авторов, некоторые музейные коллекции плохо определены, и их нельзя использовать автоматически (Wheeler, 2004; Armstrong, Ball, 2005), этому должно быть уделено самое пристальное внимание.

Как бы то ни было, несмотря на все вышеперечисленные факторы и ограничения, можно констатировать, что резко скептических высказываний относительно ДНК-ШК становится меньше. Результаты, полученные к настоящему времени, свидетельствуют о том, что для отнесения особей к известным видам оно во многих случаях оказывается эффективным.

ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ, КРИТЕРИИ ВИДОВ И ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ВИДОВ

Один из главных аргументов необходимости ДНК-ШК – возможность выявления с его помощью новых видов, и это также активно обсуждалось (Mallet, Willmot, 2003; Ebach, Holdrege, 2005; Brower, 2006). Указывалось, что нахождение их через обнаружение уровня дивергенции штрихкодов, значительно превышающего средний внутривидовой, может быть применено только для групп, таксономически хорошо проработанных, так как если в группе много необнаруженных видов, значения внутривидовой дивергенции могут оказаться завышенными. Кроме того, высказывалась тревога, связанная с тем, что Зоологический и Ботанический Кодексы устанавливают лишь правила для номенклатуры таксонов, но не определяют, какие признаки используются для описания новых таксонов, таким образом, ДНК-признаки могут быть действительными, и может быть создано много новых ДНК-видов, которые никогда не будут формально описаны (Mallet, Willmot, 2003; Ebach, Holdrege, 2005). Указывалось также, что если по последовательности приписать образец к новой группе, это не значит, что группа заслуживает конкретного таксономического статуса, в частности видового (Brower, 2006). Выявление новых видов через нахождение корреляции между уровнем дивергенции штрихкодов и какими-либо другими (немолекулярными) признаками более приемлемо для систематиков. Было предложено экзemplяры, чьи ДНК-ШК сильно отличаются от других того же (известного) вида, помечать как провизорные ви-

ды (provisional species; PS), что будет подчеркивать необходимость их дальнейшего изучения (Hebert et al., 2004b; Smith et al., 2007). Признаки, по которым виды идентифицируют, не всегда те же самые, по которым их описывают, и ДНК-ШК, четко отличающийся от других, сам по себе не достаточен для описания нового вида, но вкупе с другой информацией может быть его базисом (Hebert, Gregory, 2005). Наконец, Хеберт и коллеги уточнили, что ДНК-ШК как подход разрабатывает метод легкого распознавания описанных видов и предварительного выявления еще не описанных, а не описания их (Hajibabaei et al., 2006a; Witt et al., 2006). При обнаружении синглетонов – единичных особей, последовательности которых слегка отличаются от остальных особей вида, рекомендовано эти данные отложить в запасник, так как невозможно определить, представляют ли они собой проявление внутривидовой варибельности или редкий экземпляр другого вида (Janzen et al., 2005).

Даже самые активные критики ДНК-ШК согласны, что он может работать и дать потенциально полезную информацию в случае уже хорошо изученных групп (Rubinoff et al., 2006). Авторы обзора по молекулярным исследованиям насекомых (Caterino et al., 2000) констатировали, что в большинстве работ, где изучали отношения подвидов, видов и групп видов, удавалось если не полностью разрешить их, то значительно прояснить, если была взята достаточная выборка. Но и судить, достаточна ли она, можно только если группа хорошо изучена. Исследователи китообразных допускают, что молекулярная таксономия может работать даже в “морфологическом вакууме” (как нередко происходит при открытии новых микроорганизмов), но только при наличии солидной и выверенной референтной базы данных (Dalebout et al., 2004). Однако для множества таксономических групп пока нельзя создать такую базу, потому что для нее нет таксономической основы – группы слабо изучены. По оценке Крисчи (Crisci, 2006), лишь для 1% из 1.7 млн. видов, описанных к настоящему времени, известно что-то более, чем географическая точка, в которой найдены вид, его среда местообитания и диагностические морфологические признаки. Впрочем, полагают, что при ДНК-ШК отсутствие каких-то видов в базе данных скорее приведет к тому, что материал не будет идентифицирован, чем к его неверной идентификации – “неизвестный” образец будет представлен “длинной ветвью” с низкой поддержкой (Armstrong, Ball, 2005).

При обсуждении ДНК-ШК большое внимание было уделено проблемам видовых критериев. Заявлялось, что ДНК-ШК претендует на то, чтобы дать универсальный критерий вида, не учитывая, что разные виды могут быть выделены на основе разных критериев (Lee, 2004; Rubinoff, 2006). К настоящему времени предложено более 20 концеп-

ций вида и много критериев (Mayden, 1997 – цит. по: Ней, 2001). Наряду с морфолого-географическим подходом наиболее известными и употребляемыми на практике для рецентных организмов концепциями являются биологическая (Mayr, 1942, 1963), считающая основным критерием репродуктивную изоляцию, и филогенетическая (Cracraft, 1983), основанная на монофилии: все члены вида должны происходить от одного общего предка; в последнее время получает распространение генетическая (Baker, Bradley, 2006), ставящая во главу угла генетическую изоляцию. Следование разным концепциям часто дает разные разбиения группы организмов на виды. Так, следование филогенетической концепции может увеличить число видов почти на 50% по сравнению с морфологической или биологической, а биологическая иногда его уменьшает по сравнению с морфологической (Agarow et al., 2004). Поскольку создание баз ДНК-ШК опирается на существующие системы, оно неизбежно в той или иной степени должно соотноситься с концепциями, положенными в основу этих систем. Некоторые сторонники ДНК-ШК допускают, что для практических нужд целесообразно принять широкую концепцию вида – возможность идентификации до вида в широком смысле, группы видов, границы между которыми не ясны, или до комплекса видов скорее, чем до отдельного вида (Chase et al., 2005). Большая точность не всегда нужна.

Было также предложено (Meyer, Paulay, 2005) осуществлять ДНК-ШК на основе эволюционно значимых единиц (ESU – evolutionary significant unit) – популяций организмов, представляющих важный компонент в эволюционном наследии вида. ESU были предложены и получили развитие в ходе разработки природоохранных мероприятий (Ryder, 1986; Moritz, 1994; Ефремов, 2007). Для их выделения учитывают адаптивность, репродуктивную изоляцию и монофилетичность по локусам митохондриальной ДНК. Выявляемые ESU могут совпадать или не совпадать с видами, это зависит и от степени изученности группы. Так, в хорошо изученной группе моллюсков сем. *Succinea*, включавшей 233 вида и 56 подвидов, было выделено 265 ESU, тогда как в пределах двух сложных видов из малоизученных семейств *Lottidae* и *Turbinidae* было выделено соответственно 12 и 30 ESU (Kirkendale, Meyer, 2004; Meyer et al., 2005). При использовании CO1-фрагмента как маркера тестируемые особи моллюсков идентифицировались относительно ESU гораздо легче и успешнее, чем относительно морфологических видов (Meyer, Paulay, 2005). Группировки, выделяемые по молекулярным штрихкодам, можно обозначать и как MOTU – молекулярные операциональные таксономические единицы – так поступали при изучении 18S рРНК нематод и тихоходок (Blaxter, Floyd, 2003; Smith et al., 2005). Таким образом, в ответ на упреки, что

ДНК-штрихкодирование не учитывает некоторую неопределенность понятия “вид”, предлагают использовать другие, “суррогатные” градации биоразнообразия, относя к ним наборы особей, которые обособлены от других по молекулярным признакам, даже если их не удастся выделить в качестве видов по каким-либо критериям (Blaxter et al., 2005).

Некоторые авторы видят опасность в том, что использование “геновидов” или MOTU может быть принято биологами-нетаксономистами и создать у них ложное ощущение, что биоразнообразие описано (Will et al., 2005). Тем не менее такой подход заслуживает внимательного рассмотрения на фоне так называемой таксономической инфляции, когда большая часть новых видов – это результат не новых находок, а повышения в ранге внутривидовых таксонов из-за применения филогенетической концепции вида, в первую очередь с использованием молекулярных маркеров (Isaak et al., 2004). Использование дополнительных категорий группирования организмов может помочь в первоначальном исследовании малоизученных групп и избежать лишних и преждевременных видовых названий.

Результативность исследования ДНК на начальном этапе изучения группы видов была уже неоднократно продемонстрирована. Жуки рода *Rivacindela* являются малоизученной группой из-за труднодоступности (живут на берегах периодически пересыхающих озер пустынь Центральной Австралии) и низкой варибельности морфологических признаков. Анализ трех митохондриальных генов 500 особей, представлявших 65 точек и множество морфологически различимых вариантов, позволил разбить выборку на 46–47 кластеров, для которых были выявлены диагностические молекулярные, а затем и морфологические признаки (Pons et al., 2006). На основе полученных данных был построен каркас системы рода. Во время следующей экспедиции участникам этого исследования было уже гораздо легче идентифицировать найденные экземпляры как известные и относящиеся к одной из групп (видов) или как новые. Авторы пришли к выводу, что такой подход быстрее, экономичнее и в целом эффективнее традиционного. В этой работе исследовали три гена, но успех может быть получен и с одним. Анализируя фрагмент CO1 бабочек из рода *Dioryctria*, трудноидентифицируемых вредителей хвойных культур, выделили 8 групп (Roe et al., 2006). Последующее внимательное рассмотрение морфологических и поведенческих признаков позволило облегчить идентификацию этих видов, в том числе на стадии личинок.

Подобный подход был применен при изучении гораздо более разнообразной и еще менее изученной сборной группы – пресноводного мейобентоса

(преимущественно простейших, нематод, ракообразных, личинок насекомых), обитающего в озерах юга Германии (Markmann, Tautz, 2005). Анализировали фрагмент 28S рРНК. В пробе объемом 200 мл было обнаружено около 265 уникальных последовательностей, большинство которых можно было отнести к какому-либо таксономическому классу беспозвоночных животных. Авторы назвали такой подход “обратной таксономией”, считая его перспективным для изучения таксономического разнообразия в целях экологического мониторинга (разнообразие, например, нематод резко падает при загрязнении).

В то же время надо учитывать, что используемые в ДНК-ШК филогенетические деревья, построенные по коротким последовательностям ДНК, как правило, имеют низкую поддержку большинства внутренних узлов, т.е. весьма приблизительно отражают отношения в группе. Анализ ДНК может быть первым этапом таксономической работы, за которым должны последовать морфологическое и эмбриологическое изучение. Если данные не будут согласовываться, нужно привлекать больше молекулярных маркеров, т.е. применять, как это называют, реципрокное прояснение таксономии группы.

Неоднократно отмечалось (Coomans, 2002; Wheeler, 2004), что в связи с быстрым развитием молекулярных методов и информатики множатся филогенетические исследования и снижается число собственно таксономических. Известный систематик-энтомолог К. Уилер, относящийся к числу самых активных противников ДНК-ШК, в статье (Wheeler, 2004), написанной красноречиво и страстно, пишет, что благодаря технологическим достижениям (цифровая техника и интернет) XXI век может стать золотым веком сравнительной морфологии и порой ренессанса в таксономии, и основным препятствием на пути к этому он считает отвлечение финансовых и интеллектуальных средств на ДНК-таксономию. Однако, как можно убедиться, в некоторых группах наибольший успех сулит сочетание обоих этих подходов, и хорошим примером здесь может быть опыт изучения микроскопических нематод. У некоторых нематод имеются четыре личиночные стадии, по которым их трудно определить, некоторые виды можно определить только по мужской или только по женской особи. При этом разные виды нематод часто сходны внешне, а различия выявляются только при рассмотрении их при большом увеличении микроскопа – светового или электронного. Кроме того, варибельность признаков у ряда видов влечет необходимость исследовать множество особей для определения вида. Все это приводит к тому, что нередко мелких нематод определяют только до рода. Еще одна трудность состоит в том, что невозможно сохранить препараты типовых образцов – они хранятся не более 5–15 лет. Для преодоления этой

ситуации были использованы цифровая фотография особи и ее диагностических деталей под большим увеличением микроскопа с последующим выделением ДНК из фрагмента той же особи и секвенированием последовательностей варибельных районов 28S рРНК (De Ley et al., 2005). Таким образом, практически одновременно фиксировали важные характеристики. Большая часть известных к настоящему времени видов нематод описана зоологами лишь по нескольким экземплярам из одной точки или небольшого числа точек, поэтому варибельность изучена крайне слабо, что еще больше усложняет и так доступный только квалифицированному эксперту процесс идентификации. Так как экспертов не хватает, специалисты видят выход в реципрокном прояснении таксономии этой группы (Coomans, 2002; De Ley et al., 2005).

ОБЛАСТИ И ПРАКТИКА ПРИМЕНЕНИЯ ДНК-ШТРИХКОДОВ

Области применения ДНК-ШК многочисленны: охрана природы, экологический мониторинг, карантинные службы, медицина, ветеринария, криминалистика и судебно-медицинская экспертиза, контроль лекарственного сырья и продуктов и др. Почти во всех областях работы такого рода уже проводили, и есть успехи и впечатляющие примеры.

Даже критики ДНК-ШК признают его потенциальную полезность для тех групп, где морфологические признаки скудны или трудны для непосредственного (без микроскопа) наблюдения, относя к ним простейших, нематод и другие организмы. Однако перечень таких групп может быть существенно расширен. Нередко, чтобы установить видовую принадлежность животного, необходимо исследовать его внутреннюю анатомию, т.е. умертвить, что крайне нежелательно для тех видов, численность которых и без того сокращается. При этом нередко из-за малого количества коллекционных образцов трудно установить, какие признаки являются диагностическими для вида, а какие – проявлением внутривидовой варибельности. Это в полной мере относится к группе китообразных. Многие из них – объекты промысла, значение которого велико (как важна и борьба с браконьерством), а число видов сравнительно мало (около 80). Работы по созданию системы молекулярной идентификации китообразных начались раньше, чем по другим группам животных. При этом использовали не CO1-ген, а последовательности контрольного района митохондриальной ДНК и гена цитохрома *b*, но накопленный опыт ценен для организации ДНК-ШК.

Была создана компьютерная система “DNA Surveillance” (Ross et al., 2003), использующая стандартные филогенетические методы для идентификации последовательностей ДНК китов и дельфи-

нов. Идентификация основана на сравнении с базой данных, содержащей курируемый набор реперных последовательностей. Материал для них был получен из музейных коллекций (скелетов), найденных останков погибших животных, а также тканей свободноплавающих животных, взятых методом биопсии (кусочки кожи). Имеющиеся в базе последовательности отражают родовое, видовое и популяционное разнообразие китообразных с учетом географического фактора. Отнесение последовательности к определенному виду китообразных квалифицируется как “валидированное”, только если материал, из которого выделена ДНК, был определен экспертом – специалистом по данной таксономической группе и имеются диагностические детали скелета или их фотографии. Для получения ДНК использовали и образцы, представляющие собой голотипы (индивидуумы, по которым вид был описан автором). Согласно правилам номенклатурных кодексов, если голотип утерян, следует выбрать неотип. Было предложено в тех случаях, когда нет возможности выделить ДНК из голотипа, описать “ДНК-неотип” (Tautz et al., 2003). Это предложение вызвало возражения противников ДНК-ШК как потенциальный источник путаницы (Seberg et al., 2003), однако оно было поддержано исследователями китообразных (Dalebout et al., 2004).

Попытки использовать молекулярные маркеры для идентификации музейных типовых экземпляров, особенно старых, например синтип комара *Anopheles gambiae*, хранившийся 93 года (Townson et al., 1999), поначалу воспринимались скептически (Caterino et al., 2000). Однако уже есть примеры, когда молекулярный подход позволил убедительно идентифицировать коллекционные образцы в тех случаях, когда это нельзя было сделать по другим признакам. Первый пример касается клюворылых китов (сем. Ziphiidae) рода *Mesoplodon*. В разное время (1872, 1950 и 1986 гг.) в разных местах были собраны выброшенные на берег останки трех черепов, по которым были описаны три разных вида, хотя у двух из этих черепов не хватало некоторых важных для диагностики деталей. Анализ ДНК показал, что все три черепа принадлежат одному виду, *M. traversii*, редчайшему из ныне живущих китообразных, для которого пока нет других находок, и его внешний вид остается неизвестным для науки (Helden et al., 2002). Для другого вида кита, *Indopacetus pacificus* (из того же семейства), благодаря последовательностям ДНК удалось соотнести музейный материал (детали черепа, собранные в Австралии и в Сомали) с выброшенными на берег Южной Африки целыми неполовозрелыми особями и таким образом впервые получить точное представление о том, как выглядят животные этого вида (Dalebout et al., 2003), которое можно было сравнить с изображениями “неизвестных китообразных”, ранее виденных в Индийском и Тихом

океанах. Под впечатлением от этих работ руководство Национального музея естественной истории США разрешило провести анализ ДНК всех голотипов китообразных, находящихся в коллекции этого музея (Dalebout et al., 2004).

Возможности ДНК-ШК демонстрируют работы, выполненные и на, казалось бы, хорошо изученных объектах. Один из самых известных представителей беспозвоночных – медицинские пиявки из рода *Hirudo* – давно (со II в.н.э.) и очень широко используется для лечения. Однако разные авторы в этом небольшом роде насчитывали от 1 до 7 видов. Исследование фрагментов CO1 образцов *Hirudo medicinalis*, взятых в крупных коммерческих компаниях США, показало, что по уровню дивергенции они могут представлять четыре разных вида (Trontelj, Utevsky, 2005). Морфологический анализ у некоторых выявил отличия, у других – нет.

Другой род пиявок – *Helobdella* – традиционный экспериментальный объект в лабораториях, изучающих биологию развития. Долгие годы использовали особей, происходивших от одного изолята. В последние годы произошла некоторая диверсификация лабораторных культур за счет других изолятов, взятых из разных мест. Анализ фрагмента CO1 показал (Bely, Weisblat, 2006), что один из этих изолятов, считавшийся видом *H. robusta*, возможно, представляет комплекс трех видов, а два других изолята – комплекс видов *H. triserialis* и инвазивный вид *H. europaea*, найденный в Европе, но, по-видимому, занесенный из Южной Америки, так как по последовательностям он близок к этой кладе.

Важным преимуществом ДНК-ШК является определение неполовозрелых форм, которое успешно осуществлялось по фрагменту CO1 у рыб (Richardson, 2007), пауков (Paquin, Hedin, 2004), насекомых (Miller et al., 2005; Wells et al., 2001; Wells, Sperling, 2001) и других животных. Определение личинок насекомых, особенно мух, часто бывает важно для судебной медицины, так как это помогает уточнить время и место смерти человека или животного и другие детали. Однако эти личинки часто бывает сложно определить даже до рода. Сравнение последовательностей CO1 показало возможность молекулярной идентификации мух из семейств Sarcophagidae (Wells et al., 2001) и Calliphoridae (Wells, Sperling, 2001).

Очевидно, что эффективная идентификация видов – одно из главных условий успешной борьбы с вредителями, особенно с инвазивными видами. Желательно как можно более раннее их обнаружение (яйца и ранние личиночные стадии), в том числе по поврежденному материалу, часто вне связи с их естественными субстратами или хозяевами – на автомобилях, кораблях, таре, оборудовании и др. Здесь насущно важно различение с близкими

(особенно криптическими) видами. Признают, что недостаток квалифицированных экспертов можно восполнить применением ДНК-ШК (Roe et al., 2006). Успешность применения стандартного участка CO1 для идентификации насекомых-вредителей была показана на видах сем. Lymantriidae (Ball, Armstrong, 2006), а также на плодовых мушках сем. Tephritidae (Armstrong, Ball, 2005). Вид *Vactrocera dorsalis* долго считали единственным злостным вредителем из этого рода, представленным в Азии, однако в нем было выявлено не менее 50 родственных видов (Drew, Hancock, 1994 – цит. по Armstrong, Ball, 2005). ДНК-ШК в этом случае имело преимущества перед такими методами молекулярной диагностики, как видоспецифичная ПЦР и ПЦР-RFLP. Результаты ДНК-ШК могут помочь составлению морфотаксономических ключей для основных известных вредителей, что уже и делается по некоторым из них (Martin et al., 2000).

Видовая идентификация часто важна для экспертизы сырья и продуктов. Хотя стандартный участок для ДНК-ШК растений еще не выбран, удалось амплифицировать ДНК вариабельного хлоропластного интрона *trnL* и идентифицировать ее видовую принадлежность в пищевых продуктах – сахаре, вареном картофеле, макаронах, замороженном овощном супе (Taberlet et al., 2007).

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИК ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ

Энтузиасты ДНК-ШК много занимаются разработкой стандартизации сбора и хранения материала, а также приемов, позволяющих повысить успешность работы на всех этапах, в том числе с так называемыми архивными (коллекционными) образцами, в наибольшей степени автоматизировать работу и понизить стоимость получения данных, что очень важно при массовых анализах (Hajibabaei et al., 2005; Janzen et al., 2005; Ivanova et al., 2006; Richardson et al., 2007). Почеркивается важность подбора праймеров и тщательная оптимизации условий ПЦР, особенно в ответственных случаях (редкие виды).

Также уделяется много внимания совершенствованию методик – выбору маркеров, алгоритмов выравнивания, способов сравнения последовательностей (основанных на дистанционных оценках или на состоянии признаков), методов идентификации (через построение деревьев или анализ агрегации популяций), усредненных параметров, способов графического представления результатов и др. (DeSalle et al., 2005; Show et al., 2005; Nielsen, Matz, 2006; Abdo, Golding, 2007; Little, Stevenson, 2007; Taberlet et al., 2007). Хотя одним из аргументов выбора фрагмента CO1 гена в качестве штрихкода было отсутствие инделей, некоторые авторы считают наличие инделей преимуществом, так как они дают дополнительную таксономическую ин-

формацию, которая может использоваться для идентификации (Kress et al., 2005; Chase et al., 2005). Хеберт и его соавторы использовали преимущественно дистанционный метод NJ, который был выбран из-за быстроты вычислений при большой выборке и того, что он хорошо работает, когда дивергенция последовательностей невелика, последнее диктовало и выбор двухпараметрической модели Кимуры K2P (Hebert et al., 2003a,b, 2004b, и др.). Для идентификации видов может быть использована и специфическая комбинация признаков – нуклеотидов в определенных позициях (Sarkar et al., 2002; DeSalle et al., 2005). Таким образом, могут быть использованы следующие способы идентификации: 1) оценка сходства (расстояния) по всем или только по информативным позициям, как это обычно делается в филогенетическом анализе; 2) оценка сходства (расстояния) или описание признака по инделям; 3) описание признака по аутопоморфиям; 4) описание признака по комбинации редких замен.

Надежды на будущее ускорение получения результатов связывают с внедрением пиросеквенирования и ПЦР при комнатной температуре. Пиросеквенирование – метод, основанный на детекции пирофосфата, высвобождающегося при синтезе ДНК, осуществляемого с помощью каскада энзиматических реакций, генерирующих видимый свет в количестве, пропорциональном числу включенных нуклеотидов (Ronaghi, 2001). Читаемые последовательности весьма короткие (до 200 нуклеотидов), однако производительность велика, и ведется работа по удешевлению пока дорогой аппаратуры. При проведении ПЦР при комнатной температуре (HDA – helicase-dependent amplification) в пробирке создаются условия, похожие на те, в которых происходит репликация ДНК *in vivo* с участием фермента хеликазы, расплетающей двойную спираль, и белков, дестабилизирующих спираль (Vincent et al., 2004).

В скором времени ожидается создание портативного идентификатора – прибора, с помощью которого можно будет прямо в поле выделить ДНК, определить последовательность заданного фрагмента, сравнить ее с имеющимися в специальной базе данных, связавшись с нею через спутник и таким образом осуществить идентификацию. Как известил GenomeWeb News reporter (www.genomeweb.com), ведется финансирование разработки портативного ДНК-секвенатора размером с грейпфрут. По сообщению разработчиков, секвенирование ДНК будет происходить за секунды без ее амплифицирования и вообще использования ПЦР. Работа прибора будет основана на квантово-механическом электронном туннельном эффекте – так называемой неэластичной туннельной спектроскопии. Параллельно ведутся работы и над приборами, основанными на других принципах. Так или иначе, судя по высказываниям некоторых официальных лиц в США, они

ожидают, что прибор будет создан в течение 3–5 лет (т.е. гораздо раньше, чем будет накоплена соответствующая база данных).

ПЕРСПЕКТИВЫ

Программа “Штрихкод жизни” была предложена сразу, как только технически возникла такая возможность (стало доступным секвенировать гены не только отдельных особей, представляющих вид или внутривидовой таксон, но и более или менее репрезентативной выборки). Три-четыре года, прошедшие после этого, показали, что она привлекла очень многих исследователей, работающих с разными таксономическими группами, и активизировала молекулярные исследования на видовом уровне. К настоящему времени CBOL включает более 130 организаций из 45 стран и планирует в течение 20 лет создать библиотеку штрихкодов для всех видов эукариот. Впрочем, эта цифра отражает лишь технологические возможности. По расчетам Хеберта и его коллег 50 специальных лабораторий с 2 секвенаторами в каждой, производящих по 200 000 штрихкодов в год, могли бы секвенировать более 100 млн. штрихкодов (по 10 на каждый из 10 млн. видов) за 10 лет, затратив около 2 млрд. долларов (Najibabaei et al., 2005). Однако оппоненты быстро подсчитали, что на самом деле понадобится гораздо больше и времени и средств, учитывая, что для многих таксонов десяти образцов окажется недостаточно, не говоря о необходимости сопутствующего таксономического анализа многих групп, который и окажется главным лимитирующим фактором (Will et al., 2005).

В настоящее время ведется работа по большим проектам “Все птицы” (около 10 000 видов), “Рыбы” (около 30 000 видов), “Все бабочки” (пока по двум семействам и четырем регионам, уже исследовано около 10 000 видов), проекты по насекомым-вредителям – плодовым мушкам (около 2 000 видов) и комарам (около 3 000 видов), а также по нескольким региональным проектам. На момент сдачи статьи в печать сообщалось, что подано более 350 000 ДНК-штрихкодов для более 35 тыс. видов (<http://www.boldsystems.org>).

Инициаторы ДНК-ШК в первых публикациях, по-видимому, намеренно заостряли тему, описывая, как в недалеком будущем любой человек с помощью портативного прибора сможет идентифицировать организм по одной короткой последовательности ДНК, хотя полезность такой возможности также оспаривалась (Will et al., 2005). Постепенно они отступили, на, возможно, заранее подготовленные позиции, признавая, что на первых порах ДНК-ШК дает больше новых загадок, чем ответов на существовавшие раньше, и что одного участка ДНК может быть недостаточно (Janzen et al., 2005; Smith et al., 2007). Главное, они соглашались, что ДНК-ШК в целом может быть успешным лишь в

сочетании с анализом других признаков, т.е. составляя часть интегративной систематики (Najibabaei et al., 2007), как и настаивали оппоненты. Даже лаборатория, которой руководит Хеберт в университете г. Гуэльф, называется Отдел интегративной биологии (а не ДНК-штрихкодирования или молекулярной систематики), и неоднократно подчеркивалось, что большая часть средств, расходующихся по программе “Штрихкоды жизни”, будет идти не на собственно определение последовательностей ДНК, а на сопутствующую таксономическую проработку исследуемых групп организмов, включая их сбор. Если новая программа будет способствовать широкой интеграции классической и молекулярной систематики (без чего невозможно ее выполнение), это будет иметь самое большое значение для науки и практики.

Автор приносит благодарность А.В. Родионову, а также рецензенту рукописи за ценные замечания. Обзор был подготовлен в соответствии с исследованиями, проводимыми по программе “Динамика генофондов” и поддержанными Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 06-04-48399).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ананьева Н.Б., Орлов Н.Л., Калябина-Хауф С.А., 2006. Криптическое таксономическое разнообразие тропических агамовых ящериц (Acanthosaura, Agamidae, Sauria) // Успехи соврем. биологии. Т. 126. № 5. С. 502–512.
- Антонов А.С., 2000. Основы геносистематики высших растений. М.: МАИК “Наука/Интерпериодика”. 135 с.
- Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Скоринев Д.В., 2004. О криптическом видообразовании (на примере амфибий) // Зоол. журн. Т. 83. № 8. С. 936–960.
- Горячева И.И., 2004. Бактерии рода *Wolbachia* – репродуктивные паразиты членистоногих // Успехи соврем. биологии. Т. 124. № 3. С. 246–259.
- Захаров И.А., 1999. Бактерии управляют половым размножением насекомых // Природа. № 5. С. 28–34.
- Ефремов В.В., 2007. Популяция как природоохранная единица и единица природоиспользования у позвоночных животных // Журн. общ. биологии. Т. 68. № 3. С. 205–220.
- Шнеер В.С., 2007. О видоспецифичности ДНК: 50 лет спустя // Биохимия. Т. 72. № 12. С. 1690–1699.
- Abdo Z., Golding G.B., 2007. A step toward barcoding life: a model-based, decision theoretic method to assign genes to pre-existing species groups // Syst. Biol. V. 56. № 1. P. 1–13.
- Adams K.L., Palmer J.D., 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus // Mol. Phylogenet. Evol. V. 29. № 3. P. 380–395.
- Agapow P.-M., Bininda-Emonds O.R.P., Crandall K.A., Gittleman J.L., Mace G.M., Marshall J.C., Purvis A., 2004.

- The impact of species concept on biodiversity studies // *Quart. Rev. Biol.* V. 79. № 2. P. 161–179.
- Alvarez I., Wendel J.F., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 29. № 3. P. 417–434.
- Armstrong K.F., Ball S.L., 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification // *Phil. Trans. R. Soc. B.* V. 360. № 1462. P. 1813–1823.
- Asher R. J., Hofreiter M., 2006. Tenrec phylogeny and the noninvasive extraction of nuclear DNA // *Syst. Biol.* V. 55. № 2. P. 181–194.
- Bailey C.D., Carr T.G., Harris S.A., Hughes C.E., 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 29. № 3. P. 435–455.
- Baker R.J., Bradley R.D., 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept // *J. Mammalogy.* V. 87. № 4. P. 643–662.
- Ball S.L., Armstrong K.F., 2006. DNA barcodes for insect pest identification: a test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae) // *Can. J. For. Res.* V. 36. № 2. P. 337–350.
- Ball S.L., Hebert P.D.N., Burian S.K., Webb J.M., 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes // *J. N. Amer. Benthol. Soc.* V. 24. № 3. P. 508–524.
- Barrett R.D.H., Hebert P.D.N., 2005. Identifying spiders through DNA barcodes // *Can. J. Zool.* V. 83. № 3. P. 481–491.
- Barth D., Krenek S., Fokin S.I., Berendonk T.U., 2006. Intraspecific genetic variation in *Paramecium* revealed by mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences // *J. Eukaryot. Microbiol.* V. 53. № 1. P. 20–25.
- Bely A.E., Weisblat D.A., 2006. Lessons from leeches: a call for DNA barcoding in the lab // *Evolution and Development.* V. 8. № 6. P. 491–501.
- Bensasson D., Zhang D.-X., Hartl D.L., Hewitt G.M., 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses // *Trends Ecol. Evol.* V. 16. № 6. P. 314–321.
- Besansky N.J., Severson D.W., Ferdig M.T., 2003. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you // *Trends Parasitol.* V. 19. № 12. P. 545–546.
- Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N. S., Ng P.K.L., Meier R., Winker K., Ingram K.K., Das I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation // *Trends Ecol. Evol.* V. 22. № 3. P. 148–155.
- Bisby F.A., 2000. The quiet revolution: biodiversity informatics and the Internet // *Science.* V. 289. № 5488. P. 2309–2312.
- Blaxter M.L., 2004. The promise of a DNA taxonomy // *Phil. Trans. R. Soc. B.* V. 359. № 1444. P. 669–679.
- Blaxter M., Floyd R., 2003. Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality // *Trends Ecol. Evol.* V. 18. № 6. P. 268–269.
- Blaxter M., Elsworth B., Daub J., 2004. DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an unexpected diversity of tardigrades // *Proc. R. Soc. Lond. B.* V. 271. P. 189–192.
- Blaxter M., Mann J., Chapman T., Thomas F., Whitton C., Floyd R., Abebe E., 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data // *Phil. Trans. R. Soc. B.* V. 360. № 1462. P. 1935–1943.
- Boyer S.L., Baker J.M., Giribet G., 2007. Deep genetic divergences in *Aoraki denticulata* (Arachnida, Opiliones, Cyphophthalmi): a widespread “mite harvestman” defies DNA taxonomy // *Mol. Ecol.* V. 16. № 23. P. 4999–5016.
- Bradley R. D., Baker R. J., 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome *b* sequences and mammals // *J. Mammal.* V. 82. № 4. P. 960–973.
- Bricker J., Bushar L.M., Reinert H.K., Gelbert L., 1996. Purification of high quality DNA from shed skin // *Herpetol. Rev.* V. 27. P. 133.
- Bridge P.D., Spooner B.M., Roberts P.J., Panchal G., 2003. On the unreliability of published DNA sequences // *New Phytologist.* № 160. P. 43–48.
- Brower A.V.Z., 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: ‘ten species’ of *Astraptus fulgurator* reassessed (Lepidoptera: Hesperidae) // *Systematics and Biodiversity.* V. 4. № 2. P. 127–132.
- Brown A.D., Brunjes J.H., Phillips R.S., Ballard W.B., Wallace M.C., Baker R.J., 2006. Eggshell remains as a non-invasive source of genetic material in wild turkeys (*Meleagris gallopavo*) // *Occasional Papers* № 256. Museum of Texas Tech University. P. 1–11.
- Buckler E.S. IV, Ippolito A., Holtsford T.P., 1997. The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications // *Genetics.* V. 145. № 3. P. 821–835.
- Burns J.M., Janzen D.H., Hajibabaei M., Hallwachs W., Hebert P.D.N., 2007. DNA barcodes of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of skipper butterflies (Hesperidae) can differ by only one to three nucleotides // *J. Lepid. Soc.* V. 61. № 3. P. 138–153.
- Campbell C.S., Wright W.A., Cox M., Vining T.F., Major C.S., Arsenault M.P., 2005. Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 (ITS1) in *Picea* (Pinaceae): sequence divergence and structure // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 35. № 1. P. 165–185.
- Caterino M.S., Cho S., Sperling F.A.H., 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel // *Annu. Rev. Entomol.* V. 45. P. 1–54.
- Chase M.W., Salamin N., Wilkinson M., Dunwell J.M., Kesanakurthi R.P., Haidar N., Savolainen V., 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals // *Phil. Trans. R. Soc. B.* V. 360. № 1462. P. 1889–1895.
- Cho Y., Qiu Y.-L., Kuhlman P., Palmer J.D., 1998. Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 95. № 24. P. 14244–14249.
- Cho Y., Mower J.P., Qiu Y.-L., Palmer J.D., 2004. Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 101. № 51. P. 17741–17746.
- Cognato A.I., 2006. Standard percent DNA sequence difference for insects does not predict species boundaries // *J. Econ. Entomol.* V. 99. № 4. P. 1037–1045.
- Coomans A., 2002. Present status and future of nematode systematics // *Nematology.* V. 4. № 5. P. 573–582.
- Cooper A., 1994. DNA from museum specimens // *Ancient DNA. Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and fo-*

- rensic specimens / Eds Herrmann B., Hummel S. N.Y.: Springer-Verlag. P. 149–165.
- Cracraft J., 1983. Species concepts and speciation analysis // *Curr. Ornithol.* V. 1. P. 159–187.
- Crisci J.V., 2006. One-dimensional systematist: perils in a time of steady progress // *Syst. Bot.* V. 31. № 1. P. 217–221.
- Cywinska A., Hunter F.F., Hebert P.D.N., 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes // *Med. Vet. Entomol.* V. 20. № 4. P. 413–424.
- Dalebout M.L., Baker C.S., Mead J.G., Cockcroft V.G., Yamada T.K., 2004. A comprehensive and validated molecular taxonomy of beaked whales, family Ziphiidae // *J. Hered.* V. 95. № 6. P. 459–473.
- Dalebout M.L., Ross G.J.B., Baker C.S., Anderson R.C., Best P.B., Cockcroft V.G., Hinsz H.L., Peddemors V., Pitman R.L., 2003. Appearance, distribution and genetic distinctiveness of Longman's beaked whale, *Indopacetus pacificus* // *Mar. Mam. Sci.* V. 19. № 3. P. 421–461.
- Dawson M.N., 2005. Renaissance taxonomy: integrative evolutionary analyses in the classification of Scyphozoa // *J. Mar. Biol. Ass. UK.* V. 85. № 3. P. 733–739.
- De Ley P., De Ley I.T., Morris K., Eyualem A., Mundo-Ocampo M., Yoder M., Heras J., Waumann D., Rocha-Olivares A., Burr A.H.J., Baldwin J.G., Thomas W.K., 2005. An integrated approach to fast and informative morphological vouchers of nematodes for applications in molecular barcoding // *Phil. Trans. R. Soc. B.* V. 360. № 1462. P. 1945–1958.
- Derycke S., Backeljau T., Vlaeminck C., Vierstraete A., Vanfleteren J., Vincx M., Moens T., 2007. Spatiotemporal analysis of population genetic structure in *Geomonhystera disjuncta* (Nematoda, Monhysteridae) reveals high levels of molecular diversity // *Mar. Biol.* V. 151. № 5. P. 1799–1812.
- DeSalle R., Amato G., 2004. The expansion of conservation genetics // *Nat. Rev. Genet.* V. 5. № 9. P. 702–712.
- DeSalle R., Egan M.G., Siddall M., 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding // *Phil. Trans. R. Soc. B.* V. 360. № 1462. P. 1905–1916.
- Ebach M.C., Holdrege C., 2005. DNA barcoding is no substitute for taxonomy // *Nature.* V. 434. № 734. P. 697.
- Ekrem T., Willassen E., Stur E., 2007. A comprehensive DNA library is essential for identification with DNA barcodes // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 43. № 2. P. 530–542.
- Elias M., Hill R.I., Willmott K.R., Dasmahapatra K.K., Brower A.V.Z., Mallet J., Jiggins C.D., 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies // *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* V. 274. № 1627. P. 2881–2889.
- Erpenbeck D., Hooper J.N.A., Worheide G., 2006. COI phylogenies in diploblasts and the “Barcoding of life” – are we sequencing a suboptimal partition? // *Mol. Ecol. Notes.* V. 6. № 2. P. 550–553.
- Feliner G.N., Rosselló J.A., 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 44. № 2. P. 911–919.
- Ferguson J.W.H., 2002. On the use of genetic divergence for identifying species // *Biol. J. Linn. Soc.* V. 75. № 3. P. 509–516.
- Fernando P., Vidya T.N.C., Rajapakse C., Dangolla A., Melnick D.J., 2003. Reliable non-invasive genotyping: Fantasy or reality? // *J. Hered.* V. 94. № 2. P. 115–123.
- Floyd R., Eyualem A., Papert A., Blaxter M., 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification // *Mol. Ecol.* V. 11. № 4. P. 839–850.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vriegenhoek R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* V. 3. P. 294–299.
- Funk D.J., Omland K.E., 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* V. 34. P. 397–423.
- Gemeinholzer B., Oberprieler C., Bachmann K., 2006. Using GenBank data for plant identification: possibilities and limitations using the ITS1 of Asteraceae species belonging to the tribes Lactuceae and Anthemideae // *Taxon.* V. 55. № 1. P. 173–187.
- Goetze E., 2003. Cryptic speciation on the high seas; global phylogenetics of the copepod family Eucalanidae // *Proc. R. Soc. Lond. B.* V. 270. № 1531. P. 2321–2331.
- Godfray H.C.J., 2002. Challenges for taxonomy // *Nature.* V. 417. № 6884. P. 17–19.
- Gomez A., Wright P.J., Lunt D.H., Cancino J.M., Carvalho G.R., Hughes R.N., 2007. Mating trials validate the use of DNA barcoding to reveal cryptic speciation of a marine bryozoan taxon // *Proc. R. Soc. Lond. B.* V. 274. № 1607. P. 199–207.
- Gompert Z., Nice C.C., Foryce J.A., Forister M.L., Shapiro A.M., 2006. Identifying units for conservation using molecular systematics: the cautionary tale of the Karner blue butterfly // *Mol. Ecol.* V. 15. № 7. P. 1759–1768.
- Gray D.A., Barnfield P., Seifried M., Richards M.H., 2006. Molecular divergence between *Gryllus rubens* and *Gryllus texensis*, sister species of field crickets (Orthoptera: Gryllidae) // *Can. Entomol.* V. 138. № 3. P. 305–313.
- Hajibabaei M., Singer G., Hickey D., 2006a. Benchmarking DNA barcodes // *Genome.* V. 49. № 7. P. 851–854.
- Hajibabaei M., Singer G.A.C., Hebert P.D.N., Hickey D.A., 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics // *Trends Genet.* V. 23. № 4. P. 167–172.
- Hajibabaei M.D., Smith M.A., Janzen D.H., J.J. Rodriguez M.A., Whitfield J.B., Hebert P.D.N., 2006b. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded // *Mol. Ecol. Notes.* V. 6. № 4. P. 959–964.
- Hajibabaei M., deWaard J.R., Ivanova N.V., Ratnasingham S., Dooph R.T., Kirk S.L., Mackie P.M., Hebert P.D.N., 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes // *Phil. Trans. R. Soc. B.* V. 360. № 1462. P. 1959–1967.
- Harris D.J., 2003. Can you bank on GenBank? // *Trends Ecol. Evol.* V. 18. № 7. P. 317–319.
- Hebert P.D.N., Gregory T.R., 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy // *Syst. Biol.* V. 54. № 5. P. 852–859.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., de Waard J.R., 2003a. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species // *Proc. R. Soc. Lond. B.* V. 27. P. 96–99.

- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R., 2003b. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. R. Soc. Lond. B. V. 270. № 1512. P. 313–321.
- Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W., 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 101. № 41. P. 14812–14817.
- Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S., Francis C.M., 2004b. Identification of birds through DNA barcodes // PLoS Biology. V. 2. № 10. P. 1657–1663.
- Helden A.L. van, Baker A.N., Dalebout M.L., Reyes J.C., Waerebeek K., van, Baker C.S., 2002. Resurrection of *Mesoplodon traversii* (Gray, 1874), senior synonym of *M. bahamondi* Reyes, Van Waerebeek, Cardenas and Yañez, 1995 (Cetacea: Ziphiidae) // Mar. Mamm. Sci. V. 18. № 3. P. 609–621.
- Hellberg M.E., 2006. No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation // BMC Evol. Biol. V. 6: 24. doi: 10.1186 / 1471-2148-6-24.
- Hey J., 2001. The mind of the species problem // Trends Ecol. Evol. V. 16. № 7. P. 326–329.
- Hickerson M.J., Meyer C.P., Moritz C., 2006. DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space // Syst. Biol. V. 55. № 5. P. 729–739.
- Hogg I.D., Hebert P.D.N., 2004. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes // Can. J. Zool. V. 82. № 5. P. 749–754.
- Hurst G.D.D., Jiggins F.M., 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts // Proc. R. Soc. Lond. B. V. 272. № 1572. P. 1525–1534.
- Isaac N.J.B., Mallet J., Mace G.M., 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation // Trends Ecol. Evol. V. 19. № 9. P. 464–469.
- Ivanova N.V., Waard J.R., de, Hebert P.D.N., 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // Mol. Ecol. Notes. V. 6. № 4. P. 998–1002.
- Janzen D.H., 2004. Now is the time // Phil. Trans. R. Soc. B. V. 359. № 1444. P. 731–732.
- Janzen D.H., Hajibabaei M., Burns J.M., Hallwachs W., Remigio E., Hebert P.D.N., 2005. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding // Phil. Trans. R. Soc. B. V. 360. № 1462. P. 1835–1845.
- Johnson K.P., Reed D.L., Parker S.L., Kim D., Clayton D.H., 2007. Phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial genes supports species groups for *Columbicola* (Insecta: Phthiraptera) // Mol. Phylogenet. Evol. V. 45. № 2. P. 506–518.
- Kawai K., Shimizu M., Hughes R.N., Takenaka O., 2004. A non-invasive technique for obtaining DNA from marine intertidal snails // J. Mar. Biol. Ass. UK. V. 84. № 4. P. 773–774.
- Kirkendale L.A., Meyer C.P., 2004. Phylogeography of the *Patelloida profunda* group (Gastropoda: Lottidae): Diversification in a dispersal-driven marine system // Mol. Ecol. V. 13. № 9. P. 2749–2762.
- Kress W.J., Erickson D.L., 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region // PLoS ONE. V. 6: e508.
- Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H., 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 102. № 23. P. 8369–8374.
- Lee M.S.Y., 2004. The molecularisation of taxonomy // Invertebr. Syst. V. 18. № 1. P. 1–6.
- Leeton P., Christidis L., 1993. Feathers from museum bird skins – a good source of DNA for phylogenetic studies // Condor. V. 95. № 2. P. 465–466.
- Lefebvre T., Douady C.J., Gouy M., Gibert J., 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation // Mol. Phylogenet. Evol. V. 40. № 2. P. 435–447.
- Lipscomb D., Platnick N., Wheeler Q., 2003. The intellectual content of taxonomy: A comment on DNA taxonomy // Trends Ecol. Evol. V. 18. № 2. P. 65–66.
- Little D.P., Stevenson D.W., 2007. A comparison of algorithms for the identification of specimens using DNA barcodes: examples from gymnosperms // Cladistics. V. 23. № 1. P. 1–21.
- Lopez J.V., Yuhki N., Masuda R., Modi W., O'Brien S.J., 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat // J. Mol. Evol. V. 39. P. 174–190.
- Lynn D. H., Strüder-Kypke M.C., 2006. Species of *Tetrahymena* identical by small subunit rRNA gene sequences are discriminated by mitochondrial cytochrome *c* oxidase 1 gene sequences // J. Eukaryot. Microbiol. V. 53. № 5. P. 385–387.
- Mallet J., Willmott K., 2003. Taxonomy: renaissance or tower of Babel? // Trends Ecol. Evol. V. 18. № 2. P. 57–59.
- Markmann M., Tautz D., 2005. Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences // Phil. Trans. R. Soc. B. V. 360. № 1462. P. 1917–1924.
- Martin R.R., James D., Lévesque C. A., 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management // Annu. Rev. Phytopathol. V. 38. P. 207–239.
- May R.M., 1988. How many species are there on earth? // Science V. 241. № 4872. P. 1441–1449.
- Mayr E., 1942. Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist. N.Y.: Columbia Univ. Press. 334 p. (Русский перевод: Э. Майр. Систематика и происхождение видов. М.: Изд-во иностр. лит., 1947.)
- Mayr E., 1963. Animal Species and Evolution. Cambridge, Mass.: Belknap Press, Harvard Univ. Press. 797 p. (Русский перевод: Э. Майр. Зоологический вид и эволюция. М.: Мир, 1968.)
- Meier R., Shiyang K., Vaidya G., Ng P.K.L., 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success // Syst. Biol. V. 55. № 5. P. 715–728.
- Meyer C.P., Paulay G., 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling // PLoS Biology. V. 3. № 12. P. 2229–2238.

- Meyer C.P., Geller J.B., Paulay G., 2005. Fine scale endemism on coral reefs: Archipelagic differentiation in turbinid gastropods // *Evolution*. V. 59. № 1. P. 113–125.
- Miller K.B., Alarie Y., Wolfe G.W., Whiting M.F., 2005. Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philodytes umbrinus* (Motschulsky) (Coleoptera: Dytiscidae) // *Syst. Entomol.* V. 30. № 4. P. 499–509.
- Min X.J., Hickey D.A., 2007. Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi // *Mol. Ecol. Notes*. V. 7. № 3. P. 365–373.
- Moore W.S., 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees // *Evolution*. V. 49. № 4. P. 718–726.
- Moritz C., 1994. Defining 'evolutionary significant units' for conservation // *Trends Ecol. Evol.* V. 9. № 10. P. 373–375.
- Moritz C., Cicero C., 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls // *PLOS Biology*. V. 2. № 10. P. 1529–1531.
- Mort M.E., Archibald J.K., Randle C.P., Levens N.D., O'Leary T.R., Topalov K., Wiegand C.M., Crawford D.J., 2007. Inferring phylogeny at low taxonomic levels: utility of rapidly evolving cpDNA and nuclear ITS loci // *Amer. J. Bot.* V. 94. № 2. P. 173–183.
- Nei M., Kumar S., 2000. Molecular evolution and phylogenetics. N. Y.: Oxford Univ. Press. 333 p. (Русский перевод: Ней М., Кумар С. Молекулярная эволюция и филогенетика. Киев: КВИЦ. 2004. 418 с.)
- Newmaster S.G., Fazecas A.J., Ragupathy S., 2006. DNA barcoding in plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach // *Can. J. Bot.* V. 84. № 3. P. 335–341.
- Nielsen R., Matz M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding // *Syst. Biol.* V. 55. № 1. P. 162–169.
- Nixon K.C., Wheeler Q.D., 1990. An amplification of the phylogenetic species concept // *Cladistics*. V. 6. № 1. P. 211–223.
- Nilsson R.H., Ryberg M., Kristiansson E., Abarenkov K., Larsson K., Koljalg U., 2006. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: A fungal perspective // *PLoS ONE*. V. 1. № 1: e59. doi: 10.1186/1471-2148-6-24.
- Paquin P., Hedín M., 2004. The power and perils of 'molecular taxonomy': a case study of eyeless and endangered *Cicurina* (Araneae: Dictynidae) from Texas caves // *Mol. Ecol.* V. 13. № 10. P. 3239–3255.
- Piggott M.P., Taylor A.C., 2003. Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species // *Wildlife Research*. V. 30. № 1. P. 1–13.
- Pons J., Barraclough T.G., Gomez-Zurita J., Cardoso A., Duran D.P., Hazell S., Kamoun S., Sumlin W.D., Vogler A.P., 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects // *Syst. Biol.* V. 55. № 4. P. 595–609.
- Pook C.E., McEwing R., 2005. Mitochondrial DNA sequences from dried snake venom: a DNA barcoding approach to the identification of venom samples // *Toxicon*. V. 46. № 7. P. 711–715.
- Prendini L., 2005. Comment on "Identifying spiders" through DNA barcodes // *Can. J. Zool.* V. 83. № 3. P. 481–491.
- Proudlove G., Wood P.J., 2003. The blind leading the blind: cryptic subterranean species and DNA taxonomy // *Trends Ecol. Evol.* V. 18. № 6. P. 272.
- Ratnasingham S., Hebert P.D.N., 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org) // *Mol. Ecol. Notes*. V. 7. № 3. P. 355–364.
- Richardson D.E., Vanwye J.D., Exum A.M., Cowen R.K., Crawford D.L., 2007. High-throughput species identification: from DNA isolation to bioinformatics // *Mol. Ecol. Notes*. V. 7. № 2. P. 199–207.
- Roe A.D., Stein J.D., Gillette N.E., Sperling F.A.H., 2006. Identification of *Dioryctria* (Lepidoptera: Pyralidae) in a seed orchard at Chico, California // *Ann. Entomol. Soc. Am.* V. 99. № 3. P. 433–448.
- Rohland N., Siedel H., Hofreiter M., 2004. Non-destructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens // *Biotechniques*. V. 36. № 5. P. 814–821.
- Ronaghi M., 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing // *Genome Res.* V. 11. № 1. P. 3–11.
- Ross H.A., Lento G.M., Dalebout M.L., Goode M., Ewing G., McLaren P., Rodrigo A.G., Lavery S., Baker C.S., 2003. DNA Surveillance: Web-based molecular identification of whales, dolphins, and porpoises // *J. Hered.* V. 94. № 2. P. 111–114.
- Rubinoff D., 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation // *Conserv. Biol.* V. 20. № 4. P. 1026–1033.
- Rubinoff D., Cameron S., Will K., 2006. Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? // *Trends Ecol. Evol.* V. 21. № 1. P. 1–2.
- Ruedas L.A., Salazar-Bravo J., Dragoo J.W., Yates T.L., 2000. The importance of being earnest: what, if anything, constitutes a "specimen examined?" // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 17. № 1. P. 129–132.
- Ryder O.A., 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies // *Trends Ecol. Evol.* V. 1. № 1. P. 9–10.
- Sarkar I.N., Thornton J.W., Planet P.J., Figurski D.H., Schierwater B., DeSalle R., 2002. An automated phylogenetic key for classifying homeoboxes // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 24. № 2. P. 388–399.
- Saunders G.W., 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future application // *Phil. Trans. R. Soc. B*. V. 360. № 1462. P. 1879–1888.
- Savolainen V., Cowan R. S., Vogler A. P., Roderick G.K., Lane R., 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding // *Phil. Trans. R. Soc. B*. V. 360. № 1462. P. 1805–1811.
- Savolainen V., Cuenoud P., Spichiger R., Martinez M. D. P., Crèvecoeur M., Manen J.-F., 1995. The use of herbarium specimens in DNA phylogenetics: Evaluation and improvement // *Plant Syst. Evol.* V. 197. № 1–4. P. 87–98.
- Schander C., Willassen E., 2005. What can biological barcoding do for marine biology? // *Mar. Biol. Research*. V. 1. № 1. P. 79–83.
- Seberg O., Humphries C.J., Knapp S., Stevenson D.W., Petersen G., Scharff N., Andersen N.M., 2003. Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy // *Trends Ecol. Evol.* V. 18. № 2. P. 63–65.

- Seifert K.A., Samson R.A., Waard J.R., de, Houbraken J., Lévesque C.A., Moncalvo J.-M., Louis-Seize G., Hebert P.D.N., 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 104. № 10. P. 3901–3906.
- Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E., Small R.L., 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III // Amer. J. Bot. V. 94. № 3. P. 275–288.
- Show J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Chow S.K., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L., 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis // Amer. J. Bot. V. 92. № 1. P. 142–166.
- Smith M.A., Fisher B.L., Hebert P.D.N., 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar // Phil. Trans. R. Soc. B. V. 360. № 1462. P. 1825–1834.
- Smith M.A., Woodley N.E., Janzen D.H., Hallwachs W., Hebert P.D.N., 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 103. № 10. P. 3657–3662.
- Smith M.A., Wood D.M., Janzen D.H., Hallwachs W., Hebert P.D.N., 2007. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalist // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 104. № 12. P. 4967–4972.
- Sperling F., 2003. DNA barcoding: Deus ex machina // Newslett. Biol. Surv. Can. (Terrestrial Arthropods). № 2. P. 50–53.
- Strausberger B.M., Ashley M.V., 2001. Eggs yield nuclear DNA from egg-laying female cowbirds, their embryos and offspring // Conserv. Genet. V. 2. № 4. P. 385–390.
- Taberlet P., Fumagalli L., 1996. Owl pellets as a source of DNA for genetic studies of small mammals // Mol. Ecol. V. 5. № 1. P. 301–305.
- Taberlet P., Waits L.P., Luikart G., 1999. Noninvasive genetic sampling: Look before you leap // Trends Ecol. Evol. V. 14. № 8. P. 323–327.
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P., Bouvet J., 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR // Nucl. Acids Res. V. 24. № 16. P. 3189–3194.
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Miquel C., Valentini A., Vermet T., Cortier G., Brochmann C., Willerslev E., 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding // Nucl. Acids Res. V. 35. № 3. e14. doi:10.1093 / nar / gk1938
- Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R.H., Vogler A.P., 2002. DNA points the way ahead in taxonomy – in assessing new approaches, it's time for DNA's unique contribution to take a central role // Nature. V. 418. № 6897. P. 479.
- Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R.H., Vogler A.P., 2003. A plea for DNA taxonomy // Trends Ecol. Evol. V. 18. № 2. P. 70–74.
- Townson H., Harbach R.E., Callan T.A., 1999. DNA identification of museum specimens of the *Anopheles gambiae* complex: an evaluation of PCR as a tool for resolving the formal taxonomy of sibling species complexes // Syst. Entomol. V. 24. № 1. P. 95–100.
- Trontelj P., Utevsky S.Y., 2005. Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech (genus *Hirudo*) // Mol. Phylogenet. Evol. V. 34. № 3. P. 616–624.
- Vences M., Thomas M., Bonett R.M., Vieites D.R., 2005a. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges // Phil. Trans. R. Soc. B. V. 360. № 1462. P. 1859–1868.
- Vences M., Thomas M., Meijden A. van der, Chiari Y., Vieites D.R., 2005b. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians // Front. Zool. V. 2: e5. doi: 10.1186 / 1742-9994-2-5.
- Vigilant L., 1999. An evaluation of techniques for the extraction and amplification of DNA from naturally shed hairs // Biol. Chemistry. V. 380. P. 1329–1331.
- Vilgalis R., 2003. Taxonomic misidentification in public databases // New Phytologist. № 160. P. 1–19.
- Vincent M., Xu Y., Kong H., 2004. Helicase-dependent isothermal DNA amplification // EMBO reports. V. 5. № 8. P. 795–800.
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species // Phil. Trans. R. Soc. B. V. 360. № 1462. P. 1847–1857.
- Wells J.D., Sperling F.A.H., 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) // Forensic Sci. Int. V. 120. № 1. P. 110–115.
- Wells J.D., Pape T., Sperling F.A.H., 2001. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera) // J. Forensic Sci. V. 46. № 5. P. 1098–1102.
- Wheeler Q.D., 2004. Taxonomic triage and the poverty of phylogeny // Phil. Trans. R. Soc. B. V. 359. № 1444. P. 571–583.
- Wiemers M., Fiedler K., 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae) // Front. Zool. V. 4:e8. doi:10.1186 / 1742-9994-4-8.
- Wiens J.J., Penkrot T.A., 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*) // Syst. Biol. V. 51. № 1. P. 69–91.
- Wiens J.J., Chippindale P.T., Hillis D.M., 2003. When are phylogenetic analyses misled by convergence? A case study in Texas cave salamanders // Syst. Biol. V. 52. № 4. P. 501–514.
- Will K.W., Rubinoff D., 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification // Cladistics. V. 20. № 1. P. 47–55.
- Will K., Mishler B., Wheeler Q., 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy // Syst. Biol. V. 54. № 5. P. 844–851.
- Witt J.D.S., Threlloff D.L., Hebert P.D.N., 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation // Mol. Ecol. V. 15. № 10. P. 3073–3082.
- Whitworth T.L., Dawson R.D., Magalon H., Baudry E., 2007. DNA barcoding cannot reliably identify species of the

- blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae) // Proc. R. Soc. Lond. B. V. 274. № 1619. P. 1731–1739.
- Wolfe K.H., Li W.-H., Sharp P.M., 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 84. № 24. P. 9054–9058.
- Woodruff D.S., 2001. Declines of biomes and biotas and the future of evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 98. № 12. P. 5471–5476.
- Zhang D.-X., Hewitt G. M., 1996. Nuclear integrations: Challenges for mitochondrial DNA markers // Trends Ecol. Evol. V. 11. № 6. P. 247–251.

DNA barcoding of animal and plant species as an approach for their molecular identification and describing of diversity

V. S. Shneyer

*Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences
197376 St. Petersburg, ul. prof. Popova, 2
e-mail: shneyer@VS11044.spb.edu*

DNA barcoding was recently developed as a method of species identification across a broad range of eucaryotes taxa by sequencing a standardized short DNA fragment. Due to modern technologies, it is possible to do this with a tiny piece of any tissue taken from an organism at any developmental phase, often without damaging it. A variable 5' half of mitochondrial gene CO1 is suggested as a standard region for most of animals; it is not identified yet for fungi and plants. "The Barcode of Life Initiative" implies creating and developing the barcode library for all the species on Earth to facilitate both assigning of newly obtained specimens to the known species and for discovering new and cryptic species or at least their provisional recognition. This approach has a great potential for the use in global biodiversity studies, especially in the case of poorly investigated taxa and environments. The initiative in question involves accomplish of a new web-based sequence database with rigorous rules for taxonomic information on the specimens and records of their storage as well as for standards of sequence quality and their entry. Critical objections of opponents to DNA barcoding are reviewed as well as limitations of the approach, the problems to be taken into consideration, and the fields where it can be used. Numerous recent studies on different animal groups convincingly demonstrate the efficacy of DNA barcoding and its potentials. The latter depends on availability of comprehensive and unbiased reference database implying correct identification of the source specimens and adequate knowledge of intraspecies variation, so the Barcode Initiative would be more successful as a part of the integrative analysis of the taxa being barcoded.