


CANLILIĞI BARKODLAMA VE BİLİMSEL UYGULAMA ALANLARI

Zübeyde UĞURLU AYDIN^{a*}

¹ *Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Bitki
Sistematigi Laboratuvarı (MOBİS), Ankara, Türkiye*

**Corresponding Author:
E-mail: zubeydeugurlu@hacettepe.edu.tr*

(Received 10th March 2024; accepted 18th May 2024)

a:  ORCID 0000-0002-1113-3074

ÖZET. Canlılığın keşfinde DNA barkodlama yöntemi, özellikle geniş ölçekli morfolojiye dayalı örnek setlerinin, kriptik, mikroskopik, eksik yada hasarlı örneklerin tanımlanması için alternatif moleküler bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntem, moleküler teknikleri ve biyoinformatik analizleri kullanarak önceden bilinen örneklerin doğru teşhis edilmesini, henüz keşfedilmemiş örneklerin tanımlanmasını, doğru, hızlı ve güvenilir biçimde gerçekleştirmeyi amaç edinmiştir. Uygun DNA barkod bölgesi kullanılarak farklı canlıların tür sınırlarının belirlenmesi, komünite ekolojisi ve biyoçeşitliliğin korunması alanlarında kullanışlı olduğuna dair bilimsel çalışmalar hızla artmaktadır. Özellikle Yeni Nesil DNA Dizilime teknolojilerinin hızlı gelişimi DNA barkod kullanılarak Canlılığı Barkodlama yöntemine önemli veri sağlayabilme potansiyeline sahiptir.

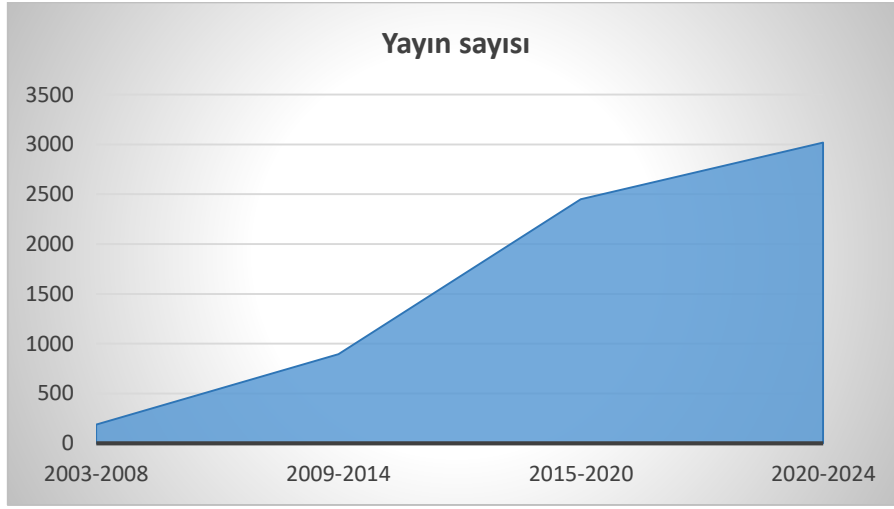
Anahtar kelimeler: *DNA Barkodlama, Biyoçeşitlilik, Ekoloji, Koruma, Taksonomi*

ABSTRACT. Specimen identification by DNA barcoding provides an attractive alternative to morphological examination in large-scale studies and works on cryptic, microscopic or digested materials. By combining the strengths of molecular biology and bioinformatics, DNA barcoding was aimed at a quick and accurate means to recognize previously known, described, and named species. The appropriate DNA barcode markers applied to specific taxonomic groups of organisms are proving valuable knowledge for understanding species boundaries, community ecology, and the conservation of biodiversity. Specifically, the rapid development of next-generation sequencing technology have great potential to support the versatility of the Life Barcoding.

Key words: *DNA Barcoding, Biodiversity, Conservation, Ecology, Taxonomy*

GİRİŞ

Yeryüzündeki canlı çeşitliliğini araştıran bilim insanları bitki ve hayvan türlerini tanımlamak için morfolojik karakterleri çok uzun zamandır kullanmaktadır. Bu yöntemle yüzyıldan fazla süredir gerçekleşen çalışmalar olsa da, var olan canlı çeşitliliğinin sadece %20'si bilimsel olarak tanımlanabilmiştir [1]. Bu sebeple canlı keşfi için bilim dünyasının daha hızlı ve güvenilir bir yöntem ihtiyacı olduğu çok açıktır. Son zamanlarda, kısa ve standart DNA gen bölgesine dayalı tür tanımlama yöntemlerinde biri olan DNA barkodlama, hızlı, güvenilir ve uygulanabilir bir metod olarak bilim dünyasına tanıtılmıştır [2]. Moleküler metodlara dayalı tür tanımlama daha önce Arnot vd. [3] tarafından kullanılmış, sonrasında mikrobiyal organizmalarda denenmiş olmasına rağmen [4]), DNA kullanılarak canlılığı barkodlama çerçevesindeki çalışmalar 2003 yılından sonra hızla artmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. DNA kullanılarak canlılığı barkodlama yönteminin 2003 yılında ortaya çıkmasından bu yana konuyla ilgili yapılan yayın sayısı. Anahtar kelime “DNA barcoding” olarak google akademik veritabanında aratılmıştır (Erişim tarihi: 26 Şubat 2024).

DNA barkodlama yöntemi 400-800 baz çifti (bç) arasındaki bir gen bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılarak dizilenmesini ve sonrasında farklı biyoinformatik analizleri sonucu tür keşfini içeren bir yaklaşımdır. Morfolojik olarak birbirinden çok farklı iki yakın türün bu yöntemle ihtiyacı olmayabilir ancak alttür, kültür formu, eksik ya da tahrip edilmiş örnek, morfo- yada ekotipler, mutantlar, tür kompleksine sahip canlıların DNA barkodlamayla doğru keşfi mümkün olabilmektedir.

Bu derlemenin amacı, güncel moleküler bir metod olarak tanıtılan bir yöntemin iş akışını genel olarak tanıtmaktır. Ayrıca bu yöntem kullanılarak taksonomi, biyoçeşitlilik ve koruma biyolojisi ile ekoloji alanlarında farklı canlı organizmalar üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları paylaşılmıştır. Ortaya çıkışından bu yana bilim insanlarının çok ilgisini çeken bu yöntemin zayıf yönleri ve bu zayıflıkları iyileştirebilecek gelecekteki olası gelişmeler de ayrıca derlenmiştir.

Canlılığı Barkodlama Yöntemi İş Akışı

Taksonomik çalışmalarda DNA ya da protein dizisinin kullanılmasının klasik yöntemlere göre daha etkili olduğu bilinmektedir [5]. Canlılığı barkodlama yönteminde ise “barkod” olarak kullanılabilir kısa (<1000 baz çifti) gen bölgesinin hızlı biçimde tür seviyesinde ayırım yapabilmesi gerekmektedir [6]. Örneğe ait barkod DNA dizisinin referans DNA kütüphanesinde eşleşmesi sonucunda taksonomik teşhis yapılmaktadır (Şekil 2). Yöntemin sonuçlarını değerlendirilirken primerin her canlıda kullanılabilmesi başarısı, PZR’de pozitif ürün başarısı, DNA dizilim kalitesi ve ayırım gücü gibi önemli kriterler de hesaplanmaktadır [7]. Bu yöntemin genel iş akışı düşünüldüğünde potansiyel DNA barkod bölgelerinin başarısının test edilmesi, DNA dizilimin elde edilmesi ve referans kütüphanede karşılaştırılması önemli işlem aşamalarıdır.

Potansiyel DNA barkod bölgeleri

Canlılığı barkodlama çalışmalarının başlangıcından bu yana araştırmacılar sıklıkla hedef canlı grubunu tür seviyesine kadar ayırabilecek yeterlilikte gen bölgesi arayışına girmiştir. Bir gen bölgesinin DNA barkod bölgesi olarak kullanışlı olabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler: Tür seviyesinde belirgin bir genetik varyasyon ve ayırım gücüne sahip olması, uygun evrensel primerler ile çoğaltılabilmesi, DNA ekstraksiyonu ve PZR sırasında sorun yaratmayacak kısa dizi uzunluğuna sahip olması şeklinde sıralanabilir [8]. Mitokondri genomunda yer alan sitokrom c oksidaz subunit 1 geni (*cox1*, *COI* yada *COI-5P*) bu özelliklere sahip, birçok hayvan grubunda standart, pratik ve tür seviyesinde kullanılabilen bir DNA barkod bölgesidir [9], (Tablo 2). Bir çok hayvan grubunda başarılı olarak çalışan bu bölge, bitki ve mantarlar için bilgi verici değildir. Mitokondri genomun yavaş evriminden kaynaklanan bu durumun çözümü için araştırmacılar kloroplast ve çekirdek genomuna yönelmiştir.

Kloroplast DNA, 120–217 kilo baz (kb) büyüklüğünde halkasal yapıya sahiptir. Kloroplast genomunun yapısal organizasyonu oldukça korunmuş olduğundan filogenetik çalışmalarda bilgi vericidir. Bu amaçla yapılan ilk çalışmalar plastomda yer alan kod bölgeleri (*matK*, *rbcL*, *rpoB*, and *rpoC1*), ile üç tane kodlamayan gen arası bölge (*atpF–atpH*, *trnH–psbA* ve *psbK–psbI*) üzerinde yoğunlaşmıştır. Farklı araştırmacılar bu lokusların değişik kombinasyonlarını bitki barkod bölgeleri olarak tercih etselerde, fikir birliği oluşmamıştır [10-16]. Bu nedenle, 445 kapalı tohumlu, 38 açıktohumlu ve 67 kriptomgam türleri üzerinde denenen bu yedi potansiyel barkod bölgesinden ribuloz–bifosfat karboksilaz (*rbcL*) ve maturase K (*matK*) dizilimlerini birlikte standart barkod bölgeleri olarak önerilirken, geriye kalan bazı bölgeleri ikincil barkod olarak önerilmiştir [17], Tablo 1. Bu bölgelerin bitki barkod bölgesi olarak seçilmesinde primer dizilimlerinin evrenselliği, dizilim kalitesi ve ayırım gücü kriterleri gözetilmiştir.

Makroalglerden kahverengi ve kırmızı algler için *rbcL* ve *COI* bölgesi DNA barkodlama çalışmalarında kullanılmıştır [18-19]. Bunun yanı sıra bu makroalgler için çekirdek ribozomal büyük altünite (LSU-D2/D3) ikincil barkod bölgesi olarak kullanılmaktadır [18, 20, 21]. Yeşil algler içinse *COI* bölgesinin başarılı olmadığı gösterilmiştir [22, 23, 24]. Bu alg grubu için *rbcL* bölgesi de kullanılsada en iyi barkod bölgesinin bu olduğu söylenemez. Saunders and Kucera [24] plastoma ait *rbcL* ve Tu geni (*tufA*), *UPA*, LSU-D2/D3 ve çekirdek ITS dizilimlerinin barkod bölgesi olarak yeşil algler için başarılı olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu gen bölgeleri içinde *tufA* bölgesinin tek bir sınıf hariç tüm yeşil algler için kullanılabilirliğini vurgulamışlardır. DNA

barkodlama yöntemi morfolojik bakımından ayrımı zor olan mikroalgler üzerinde de denenmiştir. Zou vd. [25] *rbcL*, *tufA*, ITS ve 16S bölgelerinin ayrım gücünü mikroalg cinsi üzerinde denemiş ve tek bir barkod bölgesi yerine birlikte kullanılan barkod bölgelerinin daha fazla bilgi verici olduğunu göstermiştir.

Mantarların barkodlanması için mantar ITS bölgesi kullanılmaktadır [26] (Tablo 1). Buna rağmen bu bölgelerin tür seviyesindeki ayrım gücü hayvanlarda kullanılan *COI* bölgesi kadar iyi değildir [27]. Örneğin tahmin edilen 740.000–6 milyon mantar türünden sadece 100.000 kadarı şimdiye kadar teşhis edilmiştir [28, 29, 30, 31]. Teşhis edilen türlerin yaklaşık %50’sinin Gen Bankası gibi açık erişimli önemli veritabanlarında DNA dizilimi bulunmamaktadır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4751>; <https://unite.ut.ee>). Bunun yanı sıra mantarların DNA barkodlama yöntemiyle teşhisi için önerilen ITS bölgesinin başarı yüzdesinin düşük olması sebebiyle son zamanlarda ikincil barkod bölgesi olarak *TEF1 α* bölgesi denenmektedir [32] (Tablo 2).

Tablo 1. Büyük soy hatlarında sıklıkla kullanılan DNA barkod bölgeleri.

Soy hattı	Birincil DNA barkod bölgesi	İkincil DNA barkod bölgesi
Makro-kırmızı ve yeşil algler	<i>rbcL/COI</i>	<i>LSU-D2/D3</i>
Mikro-yeşil algler	<i>tufA</i>	<i>LSU D2/D3, ITS</i>
Karasal bitkiler	<i>rbcL + matK</i>	<i>psbA-trnH/ITS</i>
Mantar	ITS, ITS-1, ITS-2,	<i>TEF1α</i>
Hayvanlar	<i>COI</i>	<i>COI, 16S</i>

Farklı canlı gruplarında yapılan çalışmalarda bir çok canlı için farklı barkod bölgeleri denenmiş ve bir çoğunda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Buna rağmen özellikle hayvan ve bitki örneklerinde atasal polimorfizm yada hibridizasyondan kaynaklanan sonuçlar yüzünden DNA barkod bölgeleri zayıf sonuçlar elde etmiştir [27].

DNA Dizileme Teknolojileri, Hesaplamalı Kaynaklar ve Veritabanları

DNA dizileme teknolojilerinin son yıllardaki hızlı gelişimi sayesinde zaman ve bütçe konusunda önemli ölçüde azalmalar sağlanmıştır [33]. Şu anda aktif olarak hizmet veren DNA dizileme platformları sayesinde on ila yüz milyonlarca kısa DNA parçası (50-300 baz çifti) Illumina ve ya BGI platformuyla yada on ila yüzbinlerce uzun DNA parçası (10,000–30,000 baz çifti) PacBio® ve ya Oxford Nanopore platformuyla elde edilebilir. Ayrıca standart DNA barkod bölgelerini hedefleyen genom kayması (genomun belli bir kısmının dizilenmesi) yada organel genomunun dizilenmesi gibi yöntemlerde bulunmaktadır. Dizileme teknolojilerinin bu hızla gelişmiş olması barkodlama çalışmalarında önemli bir yeri olan referans DNA kütüphanesinin oluşturulmasına büyük ölçüde katkı sağlamaktadır. Buna rağmen, canlılığı barkodlama hedefine ulaşılmasında DNA referans kütüphanesinde bulunan DNA dizisi ile var olan büyük canlı gruplarının sayısındaki fazlalığa dayalı önemli bir fark söz konusudur [34].

Canlılığı barkodlamanın temelinde kısa DNA parçasına dayalı analizler olsada, yaşanan gelişmeler araştırmacıları daha uzun DNA barkod dizisi kullanmaya teşvik etmiştir. Bu amaçla bazı araştırmacılar “super-barkod” [35, 36], ya da “ultra-barkod” [37] dizilimleri oluşturmuştur. Uzun dizilimlerle oluşturulmaya çalışılan barkod bölgeleri, çoğunlukla

bitkiler için uygulanmaya çalışılmıştır. Bunun en önemli nedeni ise geleneksel bitki DNA barkodlama girişimlerinin bitki genomundan kaynaklı bazı sorunları olmasıdır. Örneğin ne olduğundan bağımsız, canlılığı barkodlama yönteminin başarılı olması için mümkün olduğunca fazla türe ait DNA dizisi bulunan bir kütüphanenin olması gereklidir. Bu sebeple The Barcode of Life Data System (BOLD, <https://www.boldsystems.org/>, 21 Şubat 2024 tarihinde erişim sağlanmıştır) veri tabanı DNA barkodlama çalışmalarında ortaya çıkan tüm dizilimleri 2007 yılından bu yana bünyesinde toplamaktadır (Tablo 2). Buna ilaveten MDOP [38] gibi bazı hesaplamalı kaynaklar BOLD ve ya NCBI Gen Bankası'na yüklemeyen önce DNA barkod verisini organize etmek için yada BAGS [39], MACER [40] gibi hesaplamalı kaynaklar DNA verisinin kalitesini belirlemek için kullanılabilir. Canlılığı barkodlama yöntemi uygulanırken Yüksek Hacimli DNA verisinin biyoinformatik analizleri söz konusuysa, verinin ileri analizlere hazır hale getirilmesi daha da problemlili hale gelebilmektedir. Bu sorunu ortadan kaldırmak için son zamanlarda PIPEBAR, OverlapPER [41] and NGSspeciesID [42] gibi yazılım paketleri geliştirilmiştir.

DNA dizilim teknolojilerinin gelişimine paralel olarak DNA barkod bölgelerinin açık erişimli veri tabanlarına yüklenmesi ve karşılaştırma kütüphanesi olarak kullanılması da hız kazanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Yaşam Barkodlama Veri Sistemi (BOLD)'nde kayıtlı DNA barkod dizilim sayılarının canlı gruplarına göre dağılımı. Takson isimlerinde veri tabanının düzeni takip edilmiştir.

	Takson	Barkod Dizilim Sayısı
Hayvan		19268852
	Acanthocephala	3027
	Acoelomorpha	23
	Annelida	143136
	Arthropoda	17509271
	Brachiopoda	509
	Bryozoa	6854
	Chaetognatha	2145
	Chordata	992194
	Cnidaria	46042
	Ctenophora	1225
	Cycliophora	546
	Echinodermata	67037
	Entoprocta	116
	Gastrotricha	1749
	Gnathostomulida	50
	Hemichordata	402
	Kinorhyncha	832
	Mollusca	308591
	Nematoda	84545
	Nematomorpha	460
	Nemertea	9062
	Onychophora	1792
	Phoronida	246

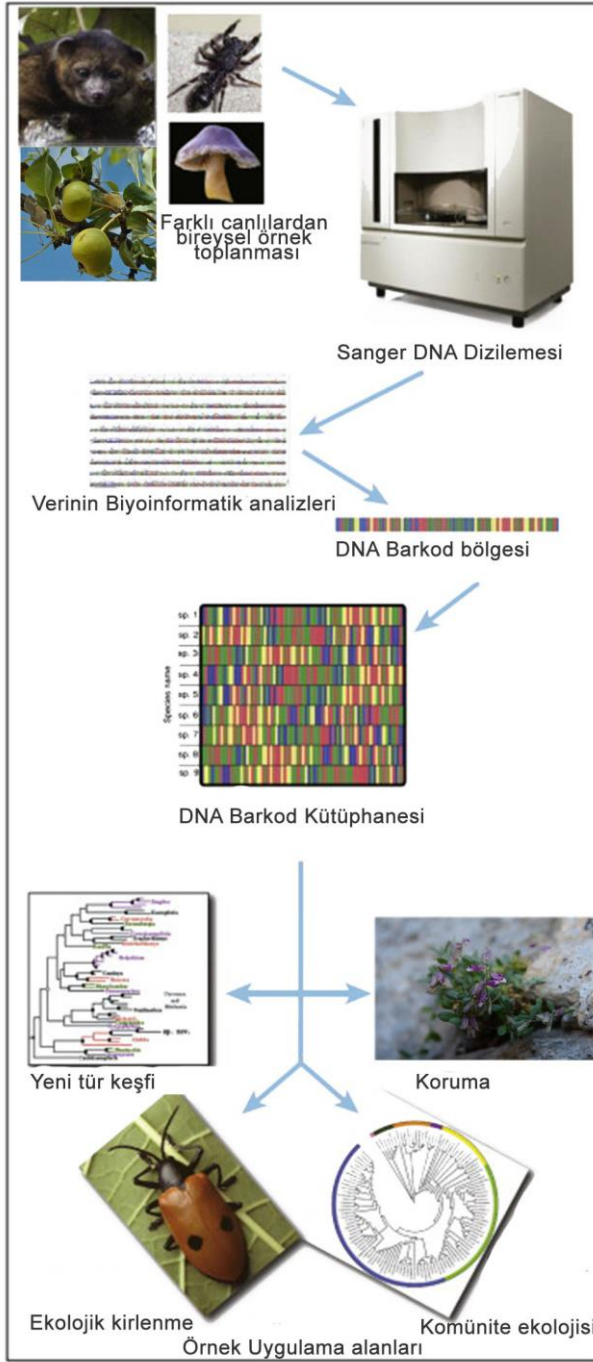
	Placozoa	26
	Platyhelminthes	53262
	Porifera	13586
	Priapulida	197
	Rhombzoa	48
	Rotifera	15309
	Tardigrada	5944
	Xenacoelomorpha	626
Bitki		534585
	Bryophyta	24073
	Chlorophyta	19944
	Lycopodiophyta	1408
	Magnoliophyta	469410
	Pinophyta	7829
	Pteridophyta	11921
Mantar		197461
	Ascomycota	111796
	Basidiomycota	78315
	Chytridiomycota	293
	Glomeromycota	3529
	Myxomycota	235
	Zygomycota	3293

Veri https://www.boldsystems.org/index.php/TaxBrowser_Home sayfasından 16 Şubat 2024’de indirilmiştir.

Canlılığı barkodlama çalışmalarında taksonomik teşhisin yapılarak kararın verilebilmesi için DNA verisi düzenlendikten sonra analizlerin derinleştirilmesini gerekmektedir. Bu amaçla geliştirilmiş Kraken2 [43], Protax [44] ve uzun zamandır kullanılan BLAST tool [45] gibi programlar halen aktif olarak kullanılmaktadır. Ayrıca son zamanlarda taksonomik sonuca ulaştırabilecek QIIME2 feature classifier [46], IDTAXA [47], MeTaxa2 [48], ve Basta [49] gibi programlar da performans göstermektedir. Tüm bunlara rağmen canlılığı barkodlama çalışmalarında yüksek performansla DNA verisinin analiz sonuçları cins ve altı taksonomik basamakların doğru teşhis edilmesinde her zaman başarılı olamamaktadır [50].

BİLİMSEL UYGULAMA ALANLARI

DNA kullanılarak canlılığı barkodlamının birincil amacı spesifik genetik belirteç kullanarak referans DNA kütüphanesindeki eşleşmeye dayalı tür seviyesinde teşhis yapabilmektir. Bunun yanı sıra ekoloji, evrim ve koruma biyoloji alanlarında temel soruların yanıtlanmasında araç olarak kullanılmaktadır (Şekil 2). Aşağıda ilgili başlıklar altında DNA barkodlama yönteminin temel bilimsel uygulama alanlarıyla ilgili bilgiler verilmiştir. Bu moleküler teknik ilk benimsendiğinden bu yana farklı amaçlarla farklı canlı grupları üzerinde denenmektedir. Ancak araştırmacılar, tür keşfi, ekoloji, evrim ve biyoçeşitliliğin korunması alanlarında bu yöntemin uygulanmasının henüz başlarında olduğunu düşünmektedir [27].



Şekil 2. Canlılığı Barkodlama genel iş akışı ve bazı örnek uygulama alanları. (Kress vd. 2015’den değiştirilerek alınmıştır).

Taksonomik Önemi

DNA kullanılarak canlılığı barkodlama yöntemi, tür sınırlarını belirlemeyi ve yeni tür keşfini içeren yeni ve önemli bir araçtır. Entomologlar bu yöntemi kullanmada öncü olmuşlar ve tür çeşitliliğinin en fazla olduğu alanlarda bu metodun başarısını test etmişlerdir [ör. 51]. Canlılığı barkodlama amaçlı kullanılan gen bölgelerinin tür teşhisinde başarı yüzdesi birbirinden farklı olsada alg [52], eğrelti [53], geofit bitkiler [54], mantar [55], nematot [56], eklembacaklılar [57], yumuşakçalar [58], balık [59], kuş [60] ve memeli

[61] gibi canlı gruplarında taksonomik amaçlı artan bir hızda kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra DNA kullanılarak canlılığı barkodlama yöntemi kriptik yada daha önce tanımlanmamış hayvan türlerinin teşhisinde kullanılmıştır [62]. Örneğin, morfolojik çeşitliliğe sahip bir böcek grubunda yapılan kapsamlı bir DNA barkodlama çalışmasında [63] tür teşhisi ve taksonomik hiyerarşiye ilişkin önemli sonuçlar elde edilmiştir. Benzer şekilde diatomlar ve balıklar üzerinde kriptik tür keşfinde, bu yöntem başarılı olmuştur [64, 65]. Ayrıca plastid ve çekirdek DNA barkod bölgelerine dayalı olarak taksonomik açıdan sorunlu tropik bir bitki familyası için yeni tür keşfi gerçekleştirilmiştir [66]. Sonuç olarak, tek bir gene dayalı DNA barkodlama yöntemi tüm taksonomik hiyerarşiyi çözmeye etkili olmasa da özellikle bazı özel durumlarda güvenilir sonuçlar vermektedir. Elde edilen sonucun başarı yüzdesi farklı canlı gruplarında değişkenlik göstermektedir. Örneğin çeşitli hayvan gruplarında %95-97 oranında tür seviyesine kadar taksonomik çözülme açıklanmış olsa da [67], bitkiler için bu oran daha da düşmektedir [54].

Biyoçeşitlilik ve Korumada Alanındaki Önemi

Birçok bilimsel çalışmada olduğu gibi biyoçeşitlilik çalışmalarının da doğru ve güvenilir biçimde gerçekleştirilebilmesi için çalışmaya konu olan türün doğru teşhis edilmesi gerekir. Aynı biçimde bir bilim insanı içinde araştırma konusundan bağımsız elindeki biyolojik materyalin doğru teşhis edilmesi gerekmektedir. DNA kullanılarak canlılığı barkodlama yöntemi de bu ihtiyaçları hızlı ve güvenilir biçimde tüm yaşayan canlılara uygulamak amacıyla ortaya çıkmıştır [68]. Canlı türünün doğru teşhisi, eğer tehlike altında bir tür söz konusuysa gerçekçi koruma yaklaşımlarının oluşturulmasında [69] yada korumada önceliklerin oluşturulması için alandaki filogenetik çeşitliliğin tespit edilmesine hizmet edebilir [70].

Bitkiler için bu yöntemin uygulanması, bir bitkinin hangi yaşam formunda (meyve, çiçek, tohum, steril birey) yada eksik örnek olmasından bağımsız doğru ve evrensel bir teşhisin gerçekleşmesiyle mümkündür [34]. Bu sebeple canlılığı barkodlama yöntemi, floristik çalışmaları da içeren yerel ve bölgesel biyoçeşitlilik verisinin oluşmasına önemli katkı sağlayabilmektedir. Belirli bir alanın biyolojik çeşitliliğinin araştırılmasında, alandan örnek ve ilgili veri toplanması en önemli ve temel basamağı oluşturmaktadır. Son zamanlarda, bu yönde gerçekleşen çalışmalarda uygun örnek toplanması, fotoğraflanması ve ekolojik bilgilerin not edilmesinin yanı sıra genetik çalışmalar içinde örnek alınması yönünde bir artış vardır [71]. Canlıya ait herhangi bir parçadan elde edilebilecek genomik DNA ve sonrasındaki işlemlerle moleküler bilgiye dayalı biyoçeşitlilik bilgisi elde denebilecektir.

Bir çok örnekte, belirli bir alanda özellikle biyoçeşitliliğin yüksek olduğu habitatlarda tür çeşitliliğinin tamamı bilinmemektedir [72]. Örneğin tropikal yağmur ormanlarında ekonomik bakımdan önemli ve tehlike altında olan bazı ağaç türlerinde tür üstü seviyelerde dahi olsa standart barkod bölgeleri taksonomik ayrımı sağlamıştır [73]. DNA barkod temelli bir yöntemin tür seviyesinde ayırım gücünün tüm canlılar için gerçekleşmediği bilinsede özellikle bazı spesifik konularda (ör. adli palinoloji, adli bilimler gibi) bilgi sağlayıcı olduğu görülmüştür [74-75]. Bunun yanı sıra CITES veri tabanı altında nesli tehlike altında olan bazı bitkiler için DNA barkod kütüphaneleri biyoçeşitliliğin korunması amacıyla oluşturulmaktadır [14].

Türler arasında simbiyotik ilişkilerin bilinmesi ekolojik bakımdan önemli olduğu kadar biyoçeşitliliği koruma bakımdan da önemlidir. Örneğin bitki-polinatör arasındaki simbiyotik mutualist ilişkiyi anlamak hem biyoçeşitliliğin korunması hemde tarımsal

ürünlerin devamlılığının sağlanmasında kritik role sahiptir. Bu etkileşimin doğası gereği polinatör, farklı taksonlardan gelen polen karışımını taşımaktadır. Bu karışımların taksonomik basamaklarının ortaya çıkarılmasında metabarkodlama yöntemi özelleşmiş bir yaklaşım olarak, biyoçeşitlilik ve ekoloji çalışanlarına önemli veri sağlamıştır [Ör. 76, 77].

Ekolojik Önemi

Aynı ekolojik kominütelerde yaşayan türlerin akrabalık ilişkileri analiz edildiğinde rekabet gibi bazı etkileşimlere ilişkin veriler de ortaya çıkmaktadır [78]. Bitki komünite filogenetiğine ilişkin DNA barkodlama yöntemi kullanılarak ilk çalışma 281 ağaç türü üzerinde yapılmıştır. Buna çalışma, kominüte üyeleri arasında güçlü evrimsel ilişkilerin ortaya çıkarılmasında çoklu bitki DNA barkod bölgelerinin kullanıldığı başarılı bir örnektir.

Özellikle ulaşılması zor habitatlarda sadece bitki kökleri toplanarak türlerin etkileşimlerini ortaya çıkarmada DNA barkodlama yöntemi kullanılmıştır [79, 80]. Ayrıca doğada yaşayan bazı omurgsuzların, kuşların ve büyük memelilerin beslenme alışkanlıklarının belirlenmesinde DNA barkodlama yöntemi önemli veri sağlamıştır [81]. Buna rağmen sindirim sırasında DNA yapısının parçalanması beslenme alışkanlıklarının belirlenmesinde önemli bir sınırlayıcı faktördür. Bu durumla karşılaşıldığında mini barkod yaklaşımı benimsense de [82] analiz başarısı artarken tür seviyesine kadar teşhis başarısı düşmektedir.

Tür etkileşimleri düşünüldüğünde en sık rastlanılan durumlardan bir tanesi simbiyotik ilişkilerdir. DNA barkodlama yöntemi bu ilişkilerin aydınlatılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Eklembacaklılar [83], omurgalılar [84], karasal bitkiler [85] ve mantarlar [86] gibi büyük canlı gruplarının simbiyotik ilişkilerini açıklamada bu yöntem kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, simbiyotik ilişkilerin hücresel düzeyde olduğu Likenler gibi özelleşmiş canlılarda yine DNA barkodlama yöntemi tercih edilmiştir [87]. Bu tarz çalışmalarda özellikle metabarkodlama yönteminin kullanılması güçlü sonuçlar ortaya çıkarabilmiştir [88].

CANLILIĞI BARKODLAMANIN GELECEĞİ

Uluslararası ve Ulusal Canlılığı Barkodlama Konsorsuyumları

Canlılığı barkodlama çalışmalarının gerçekleştirilebilmesi için gerekli DNA barkodlama dizilimlerinin oluşmasına dünya genelinde ulusal ve uluslararası düzeyde oluşturulan konsorsuyumların performansları da katkı sağlamaktadır. Bu uluslararası barkodlama konsorsuyumlarının başlangıcı 2004 yılında “Consortium for the Barcode of Life” ve 2008’de “International Barcode of Life Project “(iBOL, <https://ibol.org/>, 26 Şubat 2024 tarihinde erişim sağlandı) isimli organizasyonlarla başlamıştır. Bu konsorsuyum bünyesinde birçok ülkenin temsilcisini bulundurmaktadır, Türkiyeden ise iBOLEurope konsorsuyumunda Ankara Üniversitesi Evrimsel Genetik Laboratuvarı (eGL) (<https://iboleurope.org/partners/>) faaliyet göstermektedir. Canlılığı barkodlama konusunda ulusal girişimler de söz konusudur. Bunların arasında Avusturya (ABOL), Finlandiya (FinBOL), Almanya (GBOL), Hollanda (NBOL), Norveç (NorBOL), ve İsviçre (SwissBOL) sayılabilir. Son zamanlarda, iBOL bünyesinde yeni türlerin keşfini ve küresel ölçekte canlı çeşitliğinin izlenmesi konusunda çalışan 30’dan fazla ülkede

bulunan 1000 araştırmacının dahil olduğu BIOSCAN isimli uluslararası bir proje aktif olarak yürütülmektedir. Proje başarıyla sonuçlanırsa neredeyse tüm canlılıkla ilgili DNA kütüphanesi elde edilmiş olacaktır.

Metabarkodlama

Çevresel DNA (çDNA) terimi ilk kez Ogram [89] tarafından sedimentlerden topladığı mikrobiyal DNA örneklerini çalışırken önerilmiştir. Bu terim, materyal olarak alınan örnek içerisinde farklı canlı gruplarına ait birden fazla takson bulunduğunda kullanılmaktadır. Son zamanlarda ise, bu terim bazı araştırmacılar tarafından yeniden kullanılmaya başlamıştır (Ör. [88, 89]). Sucul yada sediment örneklerinden elde edilen DNA'yı ifade etmek için kullanılmış olsada sucul ekosistemden alınan örneklerle sınırlı kalmayıp, havadan (eDNAair) [90], topraktan yada flora yada fauna ait herhangi bir ortamdan alınan kalıntı DNA parçasını ifade etmektedir [91]. Biominitor çalışmaları gibi yaşayan bir canlı üzerinden herhangi bir ekosistemdeki farklılığı yada değişimi izleyen çalışmalarda dahil olmak üzere farklı ekolojik çalışmalarda çDNA örneği kullanılmaktadır [92].

Çevresel DNA örneklerinin Yeni Nesil DNA Dizileme teknolojileri kullanılarak canlılığı barkodlama amaçlı kullanılmasına ise metabarkodlama denmektedir. Metabarkodlama, DNA barkodlamının ortaya atılmasından sonra bu yöntemin daha gelişmiş bir uygulaması olarak ortaya çıkmış ve 2011 yılında önerilmiştir [93]. Bu yaklaşımla farklı taksonların genomik DNA'sından oluşan karışık bir örnek seti klonlamaya ihtiyaç duymadan paralel okuma sayesinde Yüksek Hacimli DNA kütüphanesi oluşturulabilmektedir. Bu sebeple metabarkodlamanın klasik DNA barkodlamadan farklı DNA barkodlama bireye dayalı alınan örneğin tür seviyesine kadar teşhisini hedeflerken, metabarkodlama parçalanmış DNA bulunduran karışık bir örnek setinin familya yada daha üst seviyelerde teşhis edilmesini hedefler.

DNA metabarkodlama analizleri sonucunda, Yüksek Hacimli DNA verisinde bulunan milyonlarca DNA dizisi taksonomik bir liste olarak ortaya çıkar. Taksonomik listeyi ortaya çıkarmada benimsenen anlayışlardan bir tanesi DNA dizilerini Moleküler Operasyonel Taksonomik Birim (MOTB) olarak kabul etmek ve referans DNA kütüphanesiyle karşılaştırma yaparak, her bir MOTB için taksonomik ismi teşhis etmektir. Ancak bu yöntemde PZR ve Yeni Nesil Dizileme platformundan kaynaklı yüksek dizileme hatalarıyla karşılaşmak olasıdır. Bu hatalarda referans kütüphanede eşleşmesi olası taksonomik birimi etkilemektedir. Biyoinformatik alanında gerçekleşen hızlı gelişmeler sayesinde gelecekte bu problemin üstesinden gelineceği düşünülmektedir [27].

Canlılığı barkodlama çalışmalarının hangi bilimsel alanda olursa olsun uygulanabilirliğini belirlemek için harcanan zaman, elde edilen kullanılabilir veri ve maliyet kriterleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Bitki DNA barkodlama konusunda yapılan bir çalışmada [94], klasik Sanger dizileme metodu, yüksek hacimli DNA verisi üreten yeni nesil dizileme metodu, genom kayması metodu ve yüksek hacimli DNA barkodlama verisine dayalı önerilen yeni bir yöntem (MEBarcoding) yukarıdaki kriterler açısından karşılaştırılmıştır. Sonuçta, en fazla zaman gerektiren metod Sanger dizileme olurken, en az zaman MEBarcoding yönteminde harcanmıştır. En yüksek maliyet genom kayması metodunda tespit edilmiş, en düşük maliyet ise Sanger dizileme ve MEBarcoding metodunda görülmüştür. En önemli kriter olan kullanışlı veri üretme konusunda en iyi yöntem yüksek hacimli DN veri eldesine dylı MEBarcoding olmuştur. En az veri ise Sanger dizileme ve genom kayması yönteminde oluşmuştur.

SONUÇ

Her yeni metodun bilim dünyasına tanıtılmasıyla birlikte bilimsel kaygılar ve karşıt görüşler ortaya çıkabilmektedir. DNA kullanılarak canlılığı barkodlama yöntemi içinde aynı süreç yaşanmaktadır ve bazı canlı gruplarında taksonomik bakımdan başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Buna rağmen canlılığı barkodlamanın bilimsel uygulama alanları sayesinde yeni tür keşfi ve türlerin adlandırılması, türlerarası etkileşimler ve tür sınırlarının çizilmesi, komünite ekolojisi ve etkileşimleri ve etkili koruma çalışmaları için biyoçeşitliliğin bilinmesi gibi alanlarda başarılı çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca son zamanlarda bir çok farklı alandan gelen veri seti birleştirilerek yeni tür keşfinin bilim dünyasına tanıtılması benimsenmiştir. Özellikle fazla tür çeşitliliğine sahip yada az bilinen alanlarda DNA barkodlama yöntemi yeni tür keşfine bilgi sağlayabilecek önemli bir araç olabilmektedir.

Bunun yanı sıra DNA dizileme teknolojileri ve Biyoinformatik alanında yaşanan hızlı gelişmeler canlılığı barkodlama çalışmalarının başarı yüzdesini artıracak yöndedir. Gelecekte hem bu alanlardaki gelişmeler hemde açık erişimli veritabanlarında hızla biriken DNA referans dizilimleri sayesinde canlılığı barkodlama yönteminin tüm canlılara başarıyla uygulanması mümkün hale gelebilir.

REFERANSLAR

- [1] Wilson, E.O. (2016): Half Earth: Our Planet's Fight for Life; WW Norton and Company: New York, NY, USA.
- [2] Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R. (2003): Biological Identifications through DNA barcodes. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences* 270:313-321.
- [3] Arnot, D. E., Roper, C., Bayoumi, R. A. (1993): Digital Codes from Hypervariable Tandemly Repeated DNA Sequences in the Plasmodium falciparum circumsporozoite Gene can Genetically Barcode Isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 61:15-24.
- [4] Olive, D. M., Bean, P. (1999): Principles and Applications of methods for DNA-based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1661-1669.
- [5] Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H., Vogler, A. P. (2003): A plea for DNA Taxonomy. *Trends Ecology in Evolution* 18 (2): 70-74.
- [6] Kress, W. J., Erickson, D. L. (2008): DNA Barcodes: Genes, Genomics, and Bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 2761–2762.
- [7] Kang, Y., Deng, Z., Zang, R. (2017): DNA Barcoding Analysis and Phylogenetic Relationships of Tree Species in Tropical Cloud Forests. *Scientific Reports* 7: 12564.
- [8] Keskin, E., Atar, H. H. (2013): DNA Barkodlama: Mitokondriyal COI Geni Kullanılarak Moleküler Tanımlama. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2: 1–8.
- [9] Kress, W. J., Erickson, D. L. (2012): DNA Barcodes: Methods and Protocols; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 858: 3-8.
- [10] 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*, 2:e508.
- [11] Pennisi, E. (2007): Taxonomy. Wanted: A Barcode for Plants. *Science* 318:190 -191.
- [12] Erickson, D.L., Spouge, J., Resch, A., Weigt, L. A., Kress, J. W. (2008): DNA Barcoding in Land Plants: Developing Standards to Quantify and Maximize Success. *Taxon*, 57: 1304 -1316.
- [13] Fazekas, A.J. (2008): Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE*, 3:e2802.

- [14] Lahaye, R., Van Der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G., Savolainen, V. (2008): DNA Barcoding the Floras of Biodiversity Hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 2923-2928.
- [15] Ledford, H. (2008): Botanical Identities: DNA Barcoding for Plants Comes a Step Closer. *Nature* 451: 616.
- [16] Hollingsworth, M. L. (2009): Selecting Barcoding Loci for Plants: Evaluation of Seven Candidate Loci with Species-level Sampling in Three Divergent Groups of Land Plants. *Molecular Ecology Resources* 9: 439-457.
- [17] CBOL Plant Working Group. (2009): A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31):12794-7.
- [18] Saunders, G. W., McDevit, D.C. (2013): DNA Barcoding Unmasks Overlooked Diversity Improving Knowledge on the Composition and Origins of the Churchill Algal Flora. *BMC Ecology*, 13: 9.
- [19] Peters, A.F., Couceiro, L., Tsiamis, K., Küpper F.C., Valero, M. (2015): Barcoding of Cryptic Stages of Marine Brown Algae Isolated from Incubated Substratum Reveals High Diversity in Acinetosporaceae (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Cryptogamie Algology*, 36: 3-29.
- [20] Bittner, L., Payri, C. E., Couloux, A., Cruaud, C., de Reviere B., Rousseau, F. (2008): Molecular Phylogeny of the Dictyotales and Their Position within the Phaeophyceae, Based on Nuclear, Plastid and Mitochondrial DNA Sequence Data. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 49: 211-226.
- [21] Manghisi, A., Gall, L. L., Ribera, M.A., Bonillo, C., Gargiulo G.M., Morabito, M. (2014): The Mediterranean Endemic New Genus *Felicinia* (Halymeniales, Rhodophyta) Recognized by a Morphological and Phylogenetic Integrative Approach. *Cryptogamie Algology* 35: 221-243.
- [22] Pombert, J., Otis, C., Lemieux C., Turmel, M: (2004). The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Green Alga *Pseudendoclonium akinetum* (Ulvophyceae) Highlights Distinctive Evolutionary Trends in the Chlorophyta and Suggests a Sister-group Relationship Between the Ulvophyceae and Chlorophyceae. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 922–935.
- [23] Pombert, J., Beauchamp, P., Otis, C., Lemieux C., Turmel, M. (2006): The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Green Alga *Oltmannsiellopsis viridis*: Evolutionary Trends of the Mitochondrial Genome in the Ulvophyceae. *Current Genetics* 50: 137-147.
- [24] Saunders, G. W., Kucera, H. (2010): An Evaluation of *rbcL*, *tufA*, UPA, LSU and ITS as DNA Barcode Markers for the Marine Green Macroalgae. *Cryptogamie Algology* 31: 487-528.
- [25] Zou, S., Fei, C., Wang, C., Gao, Z., Bao, Y., He, M., Wang. C. (2016): How DNA Barcoding can be More Effective in Microalgae Identification: a Case of Cryptic Diversity Revelation in *Scenedesmus* (Chlorophyceae). *Scientific Reports* 6: 36822.
- [26] Seifert, K. A. (2009): Progress towards DNA Barcoding of Fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9: 83-89.
- [27] Kress, W. J. García-Robledo, C., Uriarte, M., Erickson, D. L. (2015): DNA Barcodes for Ecology, Evolution, and Conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 30(1): 25-35.
- [28] O'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R. (2005): Fungal Community Analysis by Large-scale Sequencing of Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5544–5550.
- [29] Schmit, J., Mueller, G. (2007): An Estimate of the Lower Limit of Global Fungal Diversity. *Biodiversity and Conservation* 16: 99–111.
- [30] Blackwell, M. (2011): The Fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? *American Journal of Botany* 98: 426–438.

- [31] Taylor, D. L., Hollingsworth, T. N., McFarland, J. W., Lennon, N. J., Nusbaum, C., Ruess, R. W. (2014): A first Comprehensive Census of Fungi in Soil Reveals Both Hyperdiversity and Finescale Niche Partitioning. *Ecological Monographs*, 84(1): 3-20.
- [32] Hoang, M. T. V., Irinyi, L., Chen, S. C. A., Sorrell, T. C. (2019): the ISHAM Barcoding of Medical Fungi Working Group and Meyer, W. Dual DNA Barcoding for the Molecular Identification of the Agents of Invasive Fungal Infections. *Frontiers Microbiology* 10:1647.
- [33] Wilkinson, M. J. Szabo, C., Ford, C. S., Yarom, Y., Croxford, A. E., Camp, A., Gooding, P. (2017): Replacing Sanger with Next Generation Sequencing to Improve Coverage and Quality of Reference DNA Barcodes for Plants. *Scientific Reports* 7: 46040.
- [34] Gostel, M. R., Kress, W. J. (2022): The Expanding Role of DNA Barcodes: Indispensable Tools for Ecology, Evolution, and Conservation. *Diversity* 14: 213.
- [35] Kane, N., Cronk, M. (2008): Botany without Borders: Barcoding in Focus. *Molecular Ecology* 17: 5175-5176.
- [36] Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y., Chen, S. (2015): Plant DNA Barcoding: From Gene to Genome. *Biological Reviews* 90: 157-166.
- [37] Kane, N., Sveinsson, S., Dempewolf, H., Yang, J. Y., Zhang, D., Engels, J. M. M., Cronk, Q. (2012): Ultra-Barcoding in Cacao (*Theobroma* Spp.; Malvaceae) Using Whole Chloroplast Genomes and Nuclear Ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 99: 320-329.
- [38] Young, R. G., Yu, J., Cote, M. J., Hanner, R. H. (2020): The Molecular Data Organization for Publication (MDOP) R Package to Aid the Upload of Data to Shared Databases. *Biodiversity Data Journal*, 8: e50630.
- [39] Fontes, J. T., Vieira, P. E., Ekrem, T., Soares, P., Costa, F. O. (2021). BAGS: An Automated Barcode, Audit & Grade System for DNA Barcode Reference Libraries. *Molecular Ecology Resource*, 21: 573-583.
- [40] Young, R., Gill, R., Gillis, D., Hanner, R. (2021): Molecular Acquisition, Cleaning and Evaluation in R (MACER)—A Tool to Assemble Molecular Marker Datasets from BOLD and GenBank. *Biodiversity Data Journal*: 9.
- [41] Oliveira, R. R. M., Nunes, G. L., de Lima, T. G. L., Oliveira, G., Alves, R. (2018): PIPEBAR and OverlapPER: Tools for a Fast and Accurate DNA Barcoding Analysis and Paired-End Assembly. *BMC Bioinformatics* 19: 297.
- [42] Sahlin, K., Lim, M. C. W., Prost, S. (2021): NGSspeciesID: DNA Barcode and Amplicon Consensus Generation from Long-Read Sequencing Data. *Ecology and Evolution* 11: 1392–1398.
- [43] Wood, D. E., Salzberg, S. L. (2014): Kraken: Ultrafast Metagenomic Sequence Classification Using Exact Alignments. *Genome Biology* 15: R46.
- [44] Somervuo, P., Koskela, S., Pennanen, J., Nilsson, R. H., Ovaskainen, O. (2016): Unbiased Probabilistic Taxonomic Classification for DNA Barcoding. *Bioinformatics* 32: 2920-2927.
- [45] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, E. W., Lipman, D. J. (1990): Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- [46] Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., Gregory Caporaso, J. (2018): Optimizing Taxonomic Classification of Marker-Gene Amplicon Sequences with QIIME 2's Q2-Feature-Classifer Plugin. *Microbiome*, 6: 90.
- [47] Murali, A., Bhargava, A., Wright, E. S. (2018): IDTAXA: A Novel Approach for Accurate Taxonomic Classification of Microbiome Sequences. *Microbiome* 6: 140.
- [48] Bengtsson-Palme, J., Richardson, R. T., Meola, M., Wurzbacher, C., Tremblay, É.D., Thorell, K., Kanger, K., Eriksson, K. M., Bilodeau, G. J., Johnson, R. M. (2018): MetaxA2 Database Builder: Enabling Taxonomic Identification from Metagenomic or Metabarcoding Data Using Any Genetic Marker. *Bioinformatics*, 34: 4027-4033.

- [49] Kahlke, T., Ralph, P. (2018): BASTA–Taxonomic Classification of Sequences and Sequence Bins Using Last Common Ancestor Estimations. *Methods Ecology and Evolution* 10: 100-103.
- [50] Hleap, J. S., Littlefair, J. E., Steinke, D., Hebert, P. D. N., Cristescu, M. E. (2021): Assessment of Current Taxonomic Assignment Strategies for Metabarcoding Eukaryotes. *Molecular Ecology and Resource* 21: 2190-2203.
- [51] 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). *Systematic Entomology* 30: 499-509.
- [52] Machin-Sanchez, M. (2014): A Combined Barcode and Morphological Approach to the Systematics and Biogeography of *Laurencia pyramidalis* and *Laurenciella marilzae* (Rhodophyta). *European Journal of Phycology* 49: 115-127.
- [53] Dauphin, B. (2014): Molecular Phylogenetics Supports Widespread Cryptic Species in Moonworts (*Botrychium* ss, Ophioglossaceae). *American Journal of Botany* 101: 128-140
- [54] Uğurlu Aydın, Z., Kaya Y., Dönmez A. A. (2022): DNA Barcoding evaluation of Geophytes: Comparative Efficiency of Three Barcode loci for *Anemone* (*Ranunculaceae*) and *Gladiolus* (*Iridaceae*). *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 156: 926–937.
- [55] Yap, H. Y. Y. (2014): DNA Barcode Markers for Two New species of Tiger Milk Mushroom: *Lignosus tigris* and *L. cameronensis*. *International Journal of Agricultural Biology* 16: 841-844.
- [56] Felix, M. A. (2014): A Streamlined System for Species Diagnosis in Caenorhabditis (Nematoda: Rhabditidae) with Name Designations for 15 distinct Biological Species. *PLoS ONE*, 9: e94723
- [57] Pillai, P. M. (2014): Description, DNA barcode and phylogeny of a new species, *Macrobrachium abrahami* (Decapoda: Palaemonidae) from Kerala, India. *Zootaxa* 3768: 546-556
- [58] Layton, K. K. S. (2014): Patterns of DNA Barcode Variation in Canadian marine molluscs. *PLoS ONE* 9: e9500
- [59] Winterbottom, R. (2014): A Cornucopia of Cryptic species: a DNA Barcode Analysis of the Gobiid Fish Genus *Trimma* (Percomorpha, Gobiiformes). *Zookeys* 381: 79–111.
- [60] Saitoh, T., Sugita, N., Someya, S., Iwami, Y., Kobayashi, S., Kamigaichi, H., Higuchi, A., Asai, S., Yamamoto, Y., Nishiumi, I. (2015): DNA Barcoding Reveals 24 Distinct Lineages as Cryptic Bird Species Candidates in and Around the Japanese Archipelago. *Molecular Ecology Resource* 15: 177-186.
- [61] Wilson, J. J. (2014): Utility of DNA Barcoding for Rapid and Accurate Assessment of Bat Diversity in Malaysia in the Absence of Formally Described Species. *Genetics and Molecular Resource* 13: 920-925.
- [62] Smith, M. A. (2008): Extreme Diversity of Tropical Parasitoid Wasps Exposed by Iterative Integration of Natural History, DNA Barcoding, Morphology, and Collections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 12359-12364.
- [63] Smith, M. A. (2012): DNA Barcoding and the Taxonomy of Microgastrinae wasps (Hymenoptera, Braconidae): Impacts after 8 years and nearly 20 000 Sequences. *Molecular Ecology Resource*, 13: 168-176.
- [64] Silva, E. D. (2014): *Alona iheringula* Sinev & Kotov, 2004 (Crustacea, Anomopoda, Chydoridae, Aloninae): Life cycle and DNA Barcode with Implications for the Taxonomy of the Aloninae subfamily. *PLoS ONE*, 9: e97050.
- [65] Hamsher, S. E., Saunders, G. W. (2014): A Foristic Survey of Marine Tube-forming Diatoms Reveals Unexpected Diversity and Extensive Cohabitation among Genetic Lines of the *Berkeleya rutilans* complex (Bacillariophyceae). *European Journal of Phycology* 49: 47-59.

- [66] Kress, W. J. (2009): Plant DNA Barcodes and a Community Phylogeny of a Tropical Forest Dynamics Plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 18621-18626.
- [67] Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W. (2004): Ten Species in One: DNA Barcoding Reveals Cryptic Species in the Neotropical Skipper Butterfly *Astraptes Fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 41.
- [68] Hebert, P. D. N., Barrett, R. D. H. (2005): Reply to the Comment by L. Prendini on 'Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 83: 505-506.
- [69] Madden, M. J. L., Young, R. G., Brown, J. W., Miller, S. E., Frewin, A. J., Hanner, R. H. (2019): Using DNA Barcoding to Improve Invasive Pest Identification at U.S. Ports-of-Entry. *PLoS ONE* 14: e0222291.
- [70] Krishnamurthy, P. K., Francis, R. A. (2012): A Critical Review on the Utility of DNA Barcoding in Biodiversity Conservation. *Springer* 21: 1901-1919.
- [71] Funk, V. A., Gostel, M., Devine, A., Kelloff, C. L., Wurdack, K., Tuccinardi, C., Radosavljevic, A., Peters, M., Coddington, J. (2017): Guidelines for Collecting Vouchers and Tissues Intended for Genomic Work (Smithsonian Institution): Botany Best Practices. *Biodiversity Data Journal*, 5: e11625.
- [72] Purvis, A., Hector, A. (2000): Getting the measure of biodiversity. *Nature* 405: 212-219.
- [73] Nithaniyal, S., Newmaster, S. G., Ragupathy, S., Krishnamoorthy, D., Vassou, S.L., Parani, M. (2014): DNA Barcode Authentication of Wood Samples of Threatened and Commercial Timber Trees within the Tropical Dry Evergreen Forest of India. *PLoS ONE* 9: e107669.
- [74] Bell, K. L., Burgess, K. S., Okamoto, K. C., Aranda, R., Brosi, B. J. (2016): Review and Future Prospects for DNA Barcoding Methods in Forensic Palynology. *Forensic Science International Genetic* 21: 110-116.
- [75] Liu, J., Milne, R. I., Möller, M., Zhu, G. F., Ye, L. J., Luo, Y. H., Yang, J. B., Wambulwa, M. C., Wang, C. N., Li, D. Z. (2018): Integrating a Comprehensive DNA Barcode Reference Library with a Global Map of Yews (*Taxus* L.) for Forensic Identification. *Molecular Ecology Resource*, 18: 1115-1131.
- [76] Sickel, W., Ankenbrand, M. J., Grimmer, G., Holzschuh, A., Härtel, S., Lanzen, J., Steffan-Dewenter, I., Keller, A. (2015): Increased Efficiency in Identifying Mixed Pollen Samples by Meta-Barcoding with a Dual-Indexing Approach. *BMC Ecology*, 15: 20.
- [77] Lowe, A., Jones, L., Witter, L., Creer, S., de Vere, N. (2022): Using DNA Metabarcoding to Identify Floral Visitation by Pollinators. *Diversity*, 14.
- [78] Webb, C. O. (2000): Exploring the Phylogenetic Structure of Ecological Communities: an Example for Rain Forest Trees. *American Naturalist* 156: 145-155.
- [79] Jones, F. A. (2011): The Roots of Diversity: Below Ground Species Richness and Rooting Distributions in a Tropical Forest Revealed by DNA Barcodes and Inverse Modeling. *PLoS ONE*, 6: e24506.
- [80] Kesanakurti, P. R. (2011): Spatial Patterns of Plant Diversity Below-Ground as Revealed by DNA Barcoding. *Molecular Ecology*, 20: 1289-1302.
- [81] Gonzalez-Varo, J. P. (2014): Who dispersed the seeds? The Use of DNA Barcoding in Frugivory and Seed Dispersal Studies. *Methods Ecology and Evolution*, 5: 806-814.
- [82] Garcia-Robledo, C. (2013): Tropical Plant–Herbivore Networks: Reconstructing Species Interactions using DNA Barcodes. *PLoS ONE* 8: e52967.
- [83] Young, M. R., Proctor, H. C., Dewaard, J. R., Hebert, P. D. N. (2019): DNA Barcodes Expose Unexpected Diversity in Canadian Mites. *Molecular Ecology* 28: 5347-5359.
- [84] Bonato, K. O., Silva, P. C., Malabarba, L. R. (2018): Unrevealing Parasitic Trophic Interactions-A Molecular Approach for Fluid-Feeding Fishes. *Frontiers Ecology and Evolution*, 6: 1–8.

- [85] Keet, J.-H., Ellis, A. G., Hui, C., Roux, J. J. L. (2017): Legume–Rhizobium Symbiotic Promiscuity and Effectiveness Do Not Affect Plant Invasiveness. *Annals of Botany*, 119: 1319–1331.
- [86] Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Ariyawansa, H. A., Aoki, T., Cardinali, G., Crous, P. W., Druzhinina, I. S., Geiser, D. M. (2020): Unambiguous Identification of Fungi: Where Do We Stand and How Accurate and Precise Is Fungal DNA Barcoding?. *IMA Fungus* 11: 14.
- [87] Smith, H. B., Dal Grande, F., Muggia, L., Keuler, R., Divakar, P. K., Grewe, F., Schmitt, I., Lumbsch, H. T., Leavitt, S. D. (2020): Metagenomic Data Reveal Diverse Fungal and Algal Communities Associated with the Lichen Symbiosis. *Symbiosis*, 82: 133–147.
- [88] Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F. (2012): Towards Next-generation Biodiversity Assessment Using DNA Metabarcoding. *Molecular*, 21: 2045-2050.
- [89] Ogram, A., Saylor, G. S., Barkay, T. (1987): The Extraction and Purification of Microbial DNA from Sediments. *Journal of Microbiology Methods* 7: 57-66. doi:10.1016/0167-7012(87) 90025-x
- [90] Clare, E. L., Economou, C. K., Chris, G. F., Gilbert, J. D., Bennet, F., Drinkwater, R. (2021): eDNAir: Proof of Concept that Animal DNA can be Collected from Air Sampling. *Peerj* 9: e11030.
- [91] Kyle, K. E., Allen, M. C., Dragon, J., Bunnell, J. F., Reinert, H. K., Zappalorti, R. (2022): Combining Surface and Soil Environmental DNA with Artificial Cover Objects to Improve Terrestrial Reptile Survey Detection. *Conservation Biology* 9: e13939.
- [92] Yu, D. W., Ji, Y. Q., Emerson, B. C., Wang, X. Y., Ye, C. X., Yang, C. Y. (2012): Biodiversity soup: Metabarcoding of Arthropods for Rapid Biodiversity Assessment and Biomonitoring. *Methods Ecology and Evolution* 3: 613–623.
- [93] Pompanon, F., Coissac, E., Taberlet, P. (2011): Metabarcoding a New Way to Analyze Biodiversity. *Biofuture* 319: 30-32.
- [94] Gostel, M., Zuniga, J., Kress, W., Funk, V., Puente-Lelievre, C. (2020) Microfluidic Enrichment Barcoding (MEBarcoding): a new method for high throughput plant DNA barcoding. *Scientific Reports* 10: 8701.