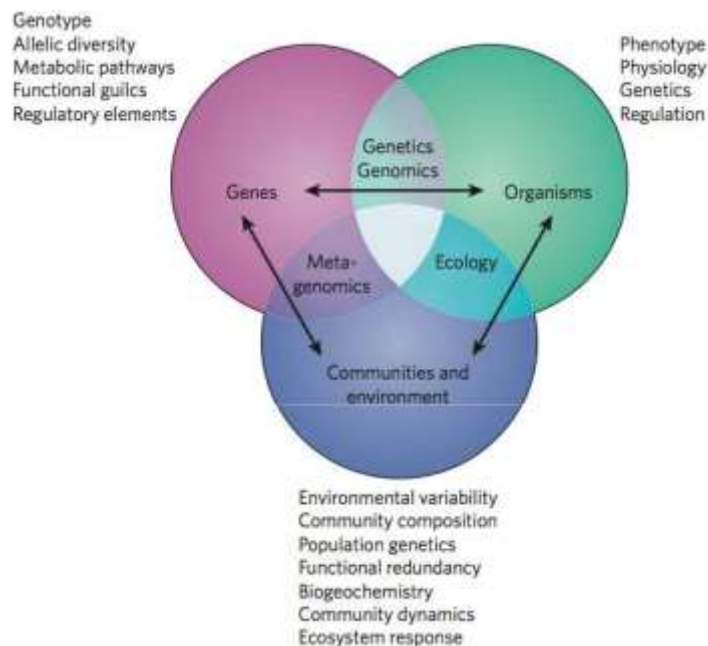


4.4 GAIA. TEKNIKA MOLEKULARRAK

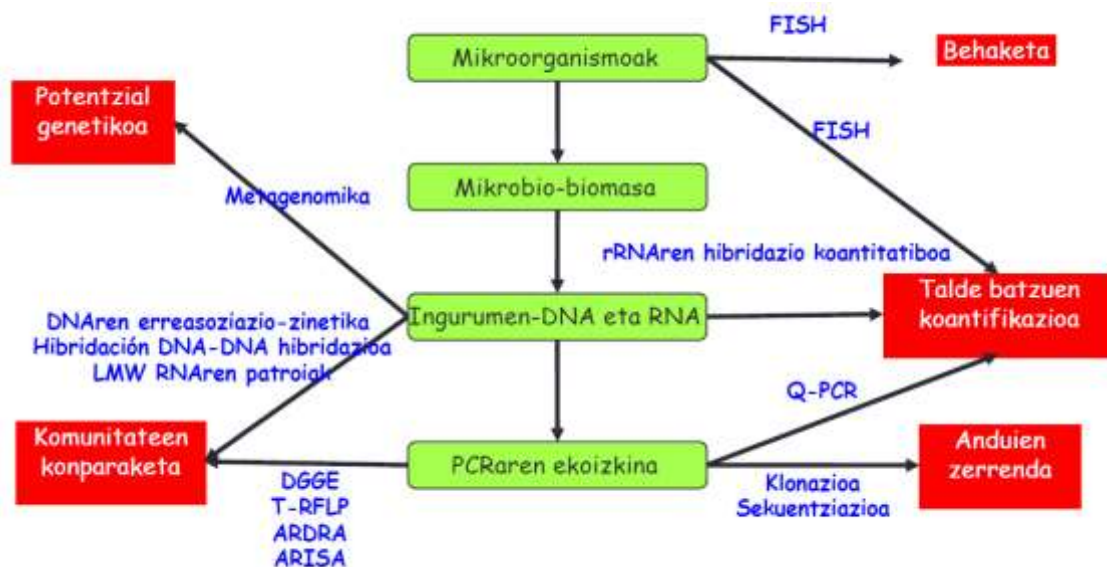
Zein da mikrobio-komunitate baten anizkoitzasuna edo dibertsitatea? Parametro honek hiru alderdi ditu:

- ABERASTASUNA: zenbat espezie dauden
- NORTASUNA: zeintzuk diren espezieak
- EKITABILITATEA: zein den beraien ugaritasun erlatiboa

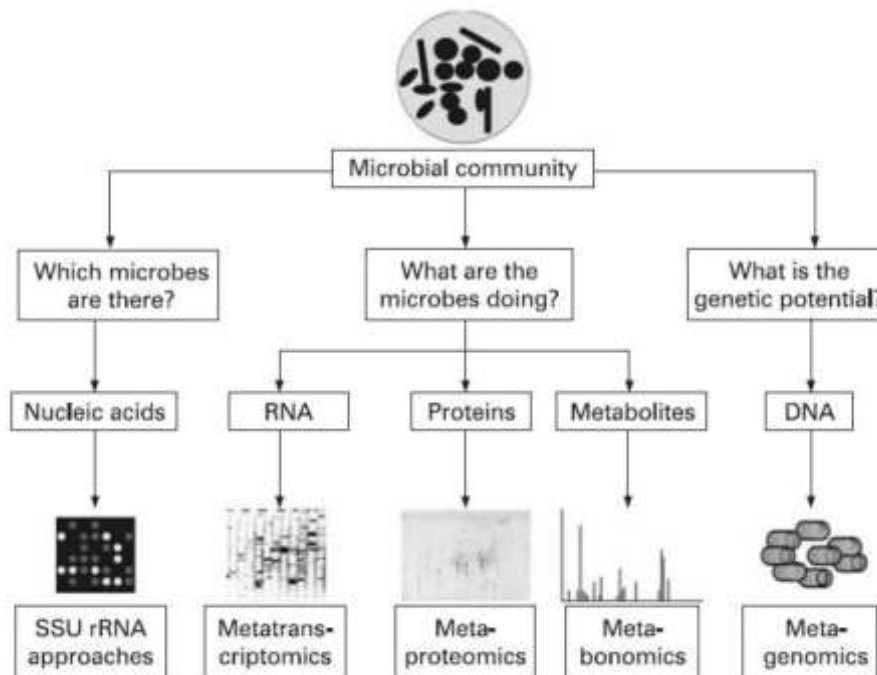
Dibertsitatea aztertzeko hiru elementu desberdin ikertu daitezke: geneak (genotipoa, dibertsitate alelikoa, bidezidor metabolikoak, erregulatzaileak, ...) , organismoak (fenotipoa, fisiologia, genetika, ...) edo komunitateak haien osotasunean (ingurune aldakortasuna, komunitatearen osaera, ...). Honetarako disziplina desberdinetaz baliatu gaitezke: metagenomika, ekologia eta genetikaz.



FILOGENIA MOLEKULARRA ETA MIKROBIO EKOLOGIA (eskema orokorra)



Galdera desberdinei erantzuteko teknika desberdinak erabiliko dira. Maila anitzetan azter daiteke mikrobio-komunitate bat: azido nukleikoak, DNA, RNA, proteina, metabolito, ...



LAN TRESNAK:

- Errestrikzio-entzimak
- Elektroforesiaren bidez azido nukleikoen banaketa
- Azido nukleikoen hibridazioa
- DNAREN kantitatearen handipena (PCR)
- Azido nukleikoen sekuentziazioa
- Datu-baseak (GenBank, EMLB, DDBJ, NDB, TIGR, JGI, ...)

Database	Web orria	Edukiak eta iruzkinak
GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	ADNaren sekuentziak Genomak aztertzeko lantresna informatikoak
EMBL	http://www.ebi.ac.uk/emb1/	Europatarra
DDBJ (DNA Databank of Japan)	http://www.ddbj.nig.ac.jp/	
INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration)	http://www.insdc.org/	GenBank, EMLB eta DDBJ arteko kolaborazioa
NDB (Nucleic Acid Database)	http://ndbserver.rutgers.edu/	Azido nukleikoen informazio tridimentsionala
RDP (Ribosomal Database Project)	http://rdp.cme.msu.edu/	
TIGR (The Institute for Genomic Research)	http://www.tigr.org/	
JGI (Joint Genome Institute)	http://www.jgi.doe.gov/	Mail handian sekuentziak Konparaketarako lantresnak
KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)	http://www.genome.jp/kegg/	Izakietan gene eta bide metabolikoak
GOLD (Genomes Online Database)	http://www.genomesonline.org/	

TEKNIKA MOLEKULARRAK

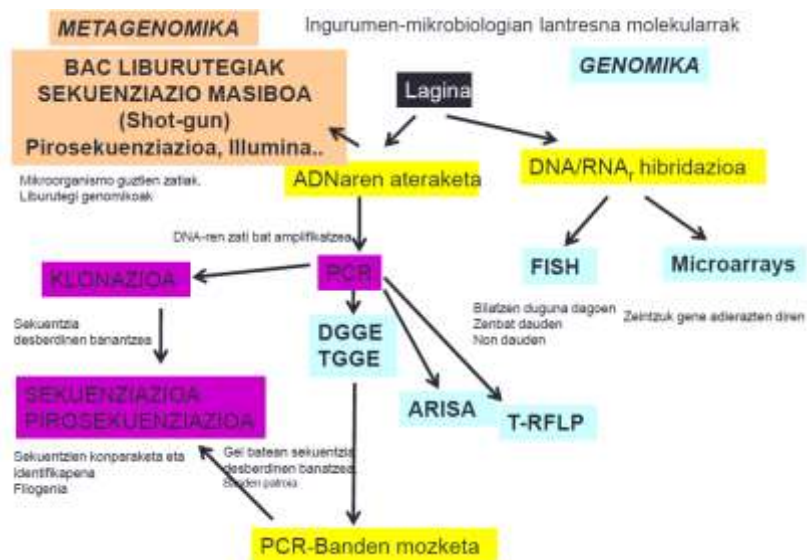
GENOMIKA

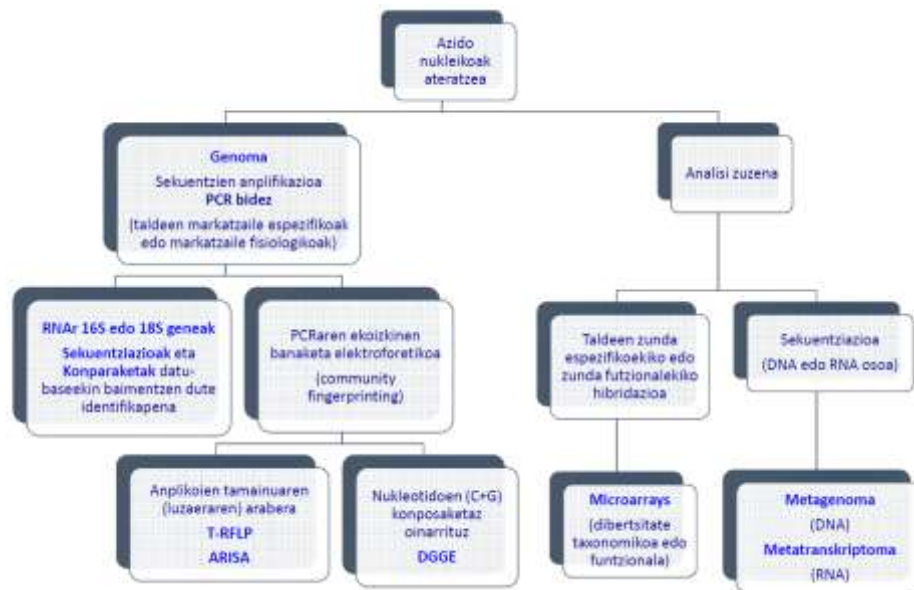
- Geneen zundak + hibridazioa
- PCR (Polymerase Chain Reaction) menpeko teknikak
 - Errestrikzio-zatien luzeraren polimorfismoen analisisa (RFLP)
 - Gradiente desnaturalizatzailearekin Gel/tenperatura elektroforesia (EDDG/TGGE)
 - RNAr-aren geneen arteko lekuen analisi autosomikoa (ARISA)

METAGENOMIKA

- BAC liburutegiak
- Sekuentziazio masiboa

PROTEOMIKA





GENOMIKA

1. Geneen zundak

Mikroorganismo espeziadikoen agerpena azido nukleikoekin hibridazioaren bidez adierazten duten azido nukleikoaren iturri-sekuentziak dira zundak. Oligonukleotidoen sekuentzia motzak dira, 18bp-ehunka basekoak. Zundak eraiki daitezke, Sambrook eta Russel, 2001, laborategirako protokoloa argitaratu zuten. Zunda mota desberdinak daude:

- Zunda funtzionala (entzima bakarra edo bide metaboliko baterako zunda. Gaitasuna detektatzen du)
- Zunda unibertsalak (*Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya*)
- Zunda filogenetikoak (taldeekiko edo azpitalekiko espezifikoak direnak).

Zundak ikusgarriak izateko markatu egin behar dira erradioaktibitatearekin (adb, P^{23}), autoradiografia bidez detektatzeko edo fluoreszentiarekin, markaturiko antigorputz edo estreptabidina-fosfato alkalinoaren bidez detektatzeko (adb, dioxigenina, biotina, fluoreszeina).

Geneen zundak + hibridazioa:

KOLONIEN HIBRIDAZIOA

GELEN HIBRIDAZIOA

- Southern hibridazioak
- Northern hibridazioak
- Dot blot hibridazioa

IN SITU FLUORESZENTZIA-HIBRIDAZIOA

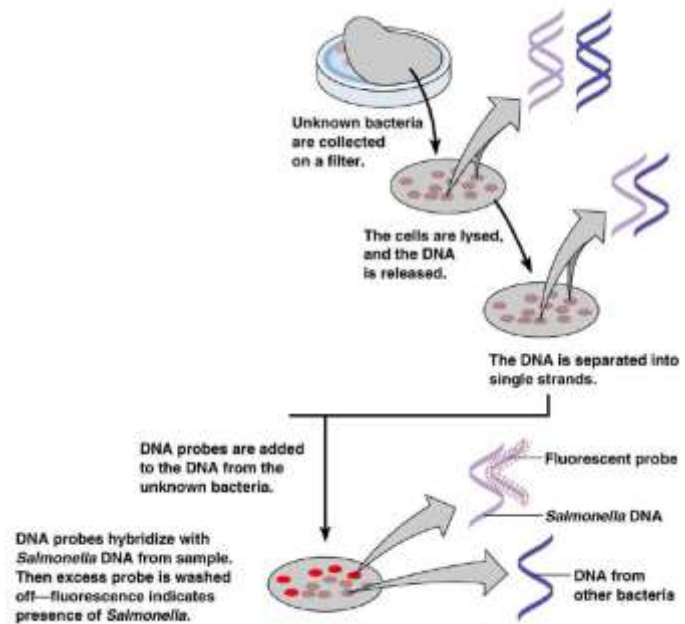
- *In situ* fluoreszentsia-hibridazioa (FISH)
- *Catalyzed reported deposition-FISH* (CARD-FISH)

ARRAYS

KOLONIEN HIBRIDAZIOA

Mikroorganismoak filtro batean ditugula, iragazi ostean, konposatu kimikoekin lisatuko ditugu eta DNA kanporatua denez, manipulatzeko aukera dugu.

DNA kateak banatuko ditugu eta ondoren zundak gehituko dira. Hibridazioa ematen bada, gure intereseko mikroorganismoa dugula baieztatzen da.

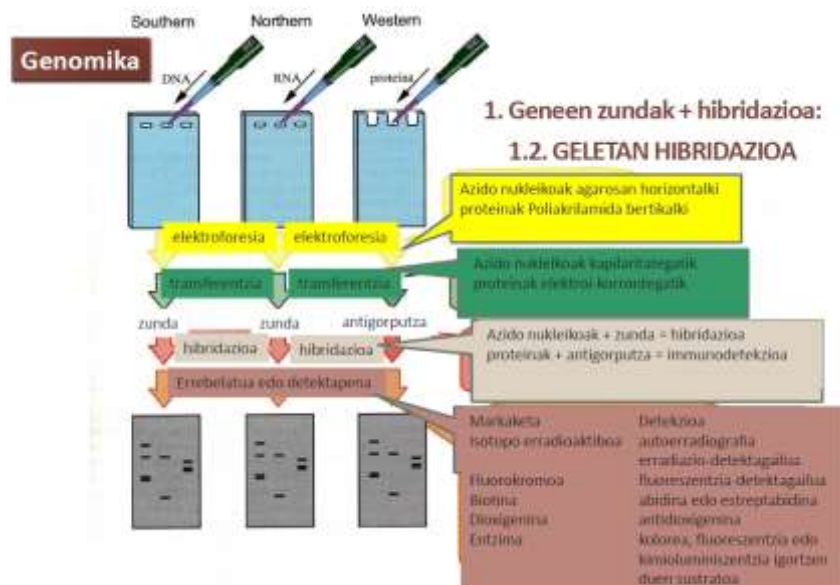


Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

GELEN HIBRIDAZIOA

DNA edo RNA hibridatu daiteke elektroforesia egin ostean:

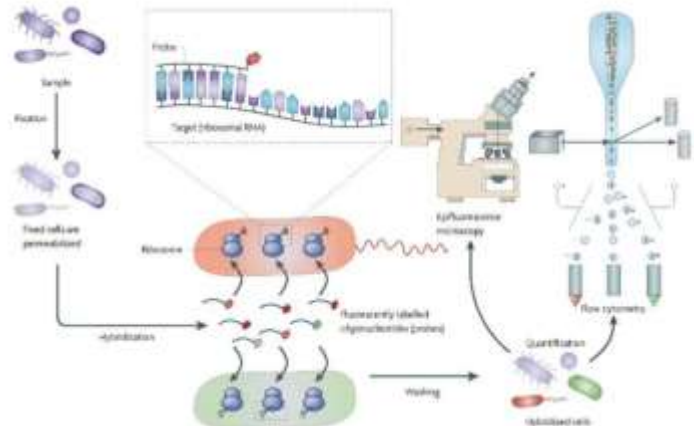
- Agarosazko gelean zuzenean. Korrontea eman eta DNaren fosfatoen karga negatiboagatik DNaren mugimendua anodora emango da (tamainaren arabera).
- Transferentzia mintz batera igaroz elektroforesian lorturikoa
 - SOUTHERN hibridazioa DNarekin
 - NORTHERN hibridazioa RNarekin
 - DOT BLOTTING (RNA): nitrozululosazko iragazkian azido nukleikoen bilketa eta hibridazioa (elektroforesirik gabe). Sekuentzia baten kantitatea hibridazio-kantitatearen arabera (dentsitometroa).



IN SITU FLUORESZENTZIA-HIBRIDAZIOA

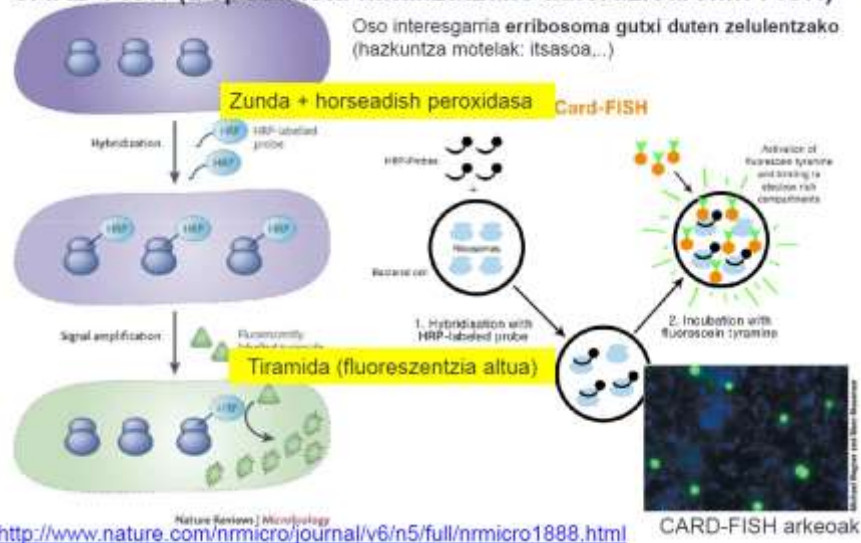
- Fluorokromo batekin markaturiko oligonukleotidoen zundak
- Hazkuntza behar ez duten behaketa-metodoak
- FISH (*in-situ* fluoreszentzia-hibridazioa).
 - FISH (rRNA 16S edo 18S edo 5S)
 - CARD-FISH Catalyzed reported deposition

Filotipoen artean desberdintzatzeko teknika. Normalean zunda filogenetikoak erabiltzen dira.



FISH baino, askoz gehiago erabiltzen da CARD-FISH metodoa. Hots, deposaketa katalizatzaile adierazlearekin FISH. Oso interesgarria da erribosoma gutxi dituzten zelulentzako. Zundarekin batera peroxidasa gehitzen da eta hurrengo pausuan tiramida (fluoreszentzia ematen duena).

CARD-FISH (Deposaketa katalizatzaile adierazlearekin FISH)



ARRAY

Microarray edo mikrotxipak erabiltzeko, DNA-zunden matrizea euskarri solido batera loturik egongo dira. Bertara lagina gehitzean, hibridazioa gertatuko da antzekotasuna duten sekuentziekin. Interesgarria izango da:

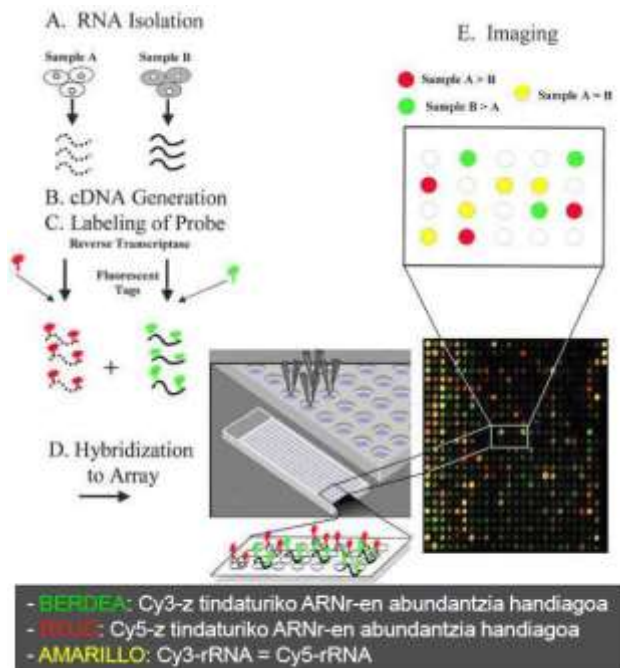
- Konparaketak egiteko baldintza desberdinetan

- Izaki baten transkribaturiko gene guztiak lortzeko (transkriptoma → sRNA multzoa analizatzen du. Baldintza batean zelularen sRNA zenbakia eta ugaritasuna edota baldintzen aldaketaren eragina transkriptomaren aldaketan)
- Geneak eta funtzioak erlazionatzeko
- Erregulazio-sareak ezagutzeko

2 mota:

- Inprimaturiko txip-ak (kimikoki portari loturikoa)
- *In silico* sintetizatzen txip-ak

Arazoak: prezioa eta eskuragarritasuna



- GEOTXIPA: geneak aztertzeke eta jakiteke zer egiten duten
- FILOTXIPA: 9000 bakterio eta arkeo-espezie ezagunentzako, jakiteke nortzuk diren han daudenak.
 - Mikrobio-komunitatearen konposaketa filogenetikoa aztertzeke
 - Espezie askotako komunitateen perfiletan eta populazioen dinamiketan aldaketak

<http://esd.ibi.gov/research/facilities/andersenlab/phylochip.html>

Bakterio eta arkeen 1.100.000 zunda desberdin (spots)

Spot bakoitzean taxoi espezifiko baten 16S ARNraren atal espezifiko batekin erreakzionatzeko 25 nukleotidozko zunda baten milaka kopia

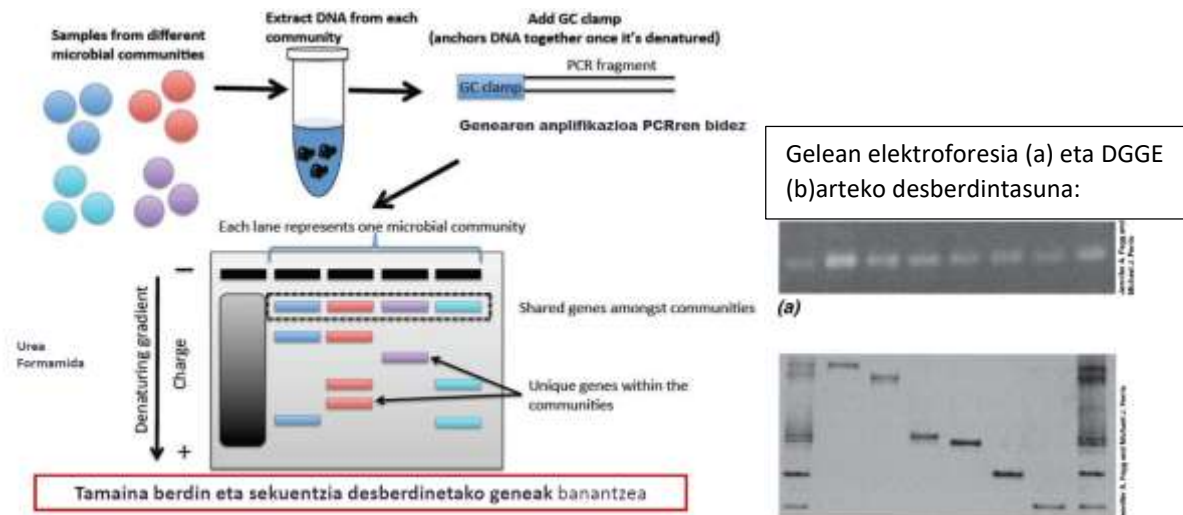


2. PCR (Polymerase Chain Reaction) menpeko teknikak

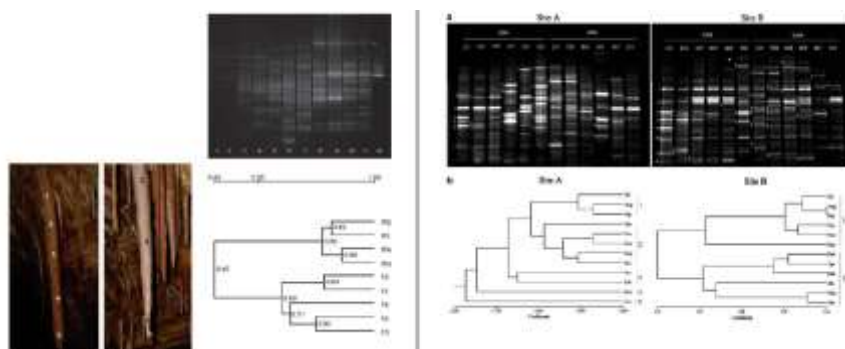
PCR bidez mikrobio-komunitatearen anizkoiztasunaren argazki azkarra lor daiteke (hatz-aztarnak deitzen zaio). Ez da norbanako espezien identifikapenik egiten, sekuentziazioa bezalako beste teknika batzuekin lotu beharko da horretarako.

- DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*. Gene baten tamaina berdineko sekuentzien aldaketa-zenbakia islatzen du.
- T-RFLP: *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*. Murrizte-entzimen leku-aldaketen bidez (DNA sekuentzian aldaketak) gene bakar baten aldakortasuna islatzen du. ARDRA deitzen da 16S rRNA erabiltzen denean.
- ARISA: *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*. 16S eta 23S RNA geneen arteko lekuaren informazioa ematen du.

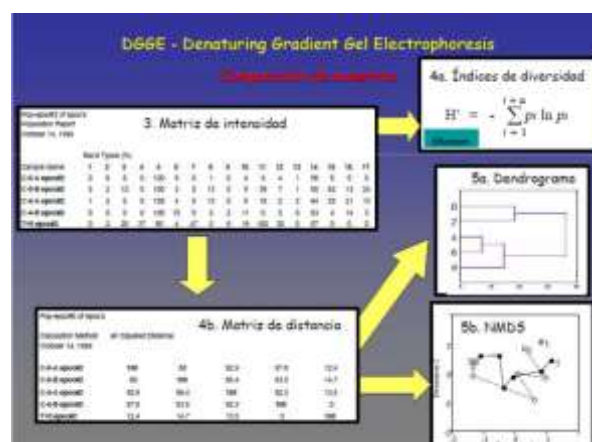
DGGE PCR bidez amplifikaturiko komunitateen sekuentziak (batez ere rRNA 16S) aztertuko dira. Sekuentziak tamaina berdinekoak baina konposaketa desberdinekoak izan daitezke. Kasu honetan, elektroforesi sinple baten bidez, ezinezkoa izango da bereizketa. Beraz, konposaketa desberdinekoak (G+C edukia) diren aztertzeke urea edo formaldehidoa erabiltzen da mugikortasun elektroforetikoko desberdina lortzeko. Banda-patroia komunitatearen aldaketak ikasteko erabil daiteke, edota banda bakoitzaren mikroorganismoa identifikatzeko sekuentziazio bidez.



Adibidez, Maier M. *et al* ikerketan, estalaktita desberdinetako mikrobio-komunitateak aztertu zituzten eta baita estalaktita bereko puntu desberdinak DGGE teknika erabiliz. Behatu zuten, horrela desberdinagoak zirela estalaktiten arteko komunitateak, berekoak baino.



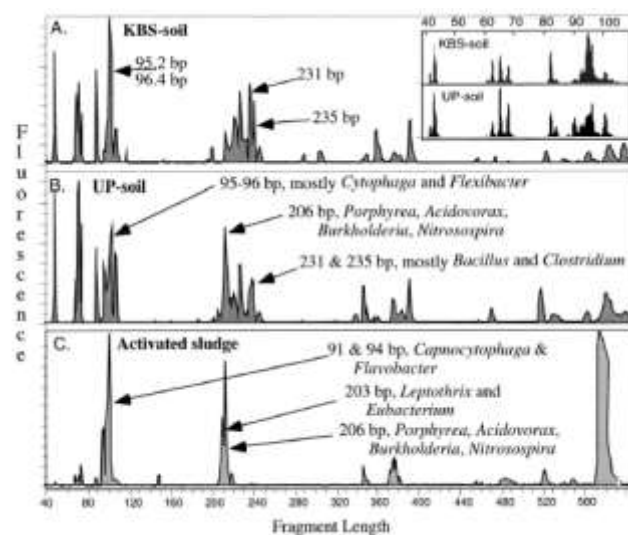
Datuak lortu ditugula, laginak konparatzeko dibertsitate indizea, dendrogramak NMDS-ak, erabili daitezke.



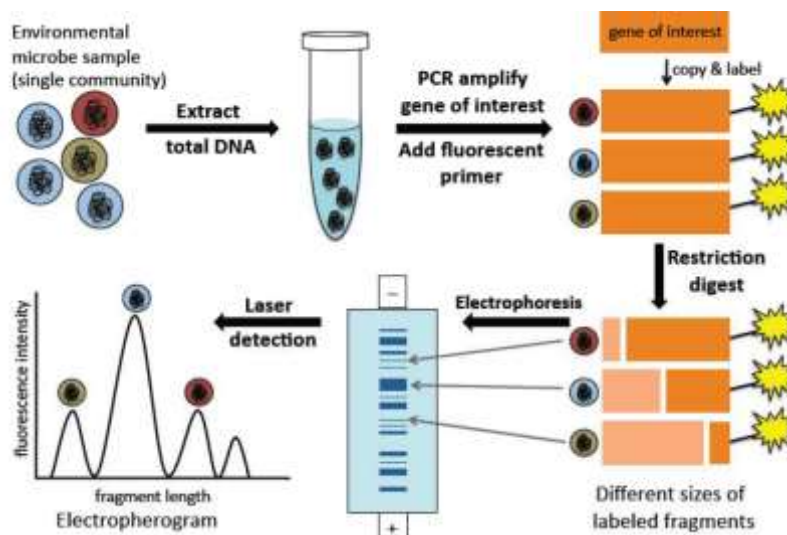
T-RFLP mikrobio-populazio baten hatz-azterna molekularrak sortzeko metodo erabilia da. Teknika honen bidez, anplifikaturiko gene baten gune terminalean kokatzen den errestrikzio guneak erabiliko dira sekuentziak desberdintzeko. Horrela, lagin batean ditugun gene berdinen sekuentziak errestrikzio-entzima bat edo gehiagoz moztean, tamaina desberdinetako sekuentziak lortuko dira. Hala ere, sekuentziazioa burutu beharko da mikroorganismoa detektatzeko. Jarraitu beharreko pausuak hurrengoak dira:

- Komunitatearen DNA aterata
- Gene interesgarri espezifiko baten anplifikazioa *primer* pare batekin (bat fluoreszenteki markatua). RNAr 16S-rako ARDRA erabiltzen da (Amplified ribosomal DNA restriction analysis)
- Digestioa murrizte-entzima bat edo batzuekin
- DNAREN banaketa eta markaturiko zatien detekzioa
- Mikrobio-anizkoitasuna elektroforogramaren pikuen arabera

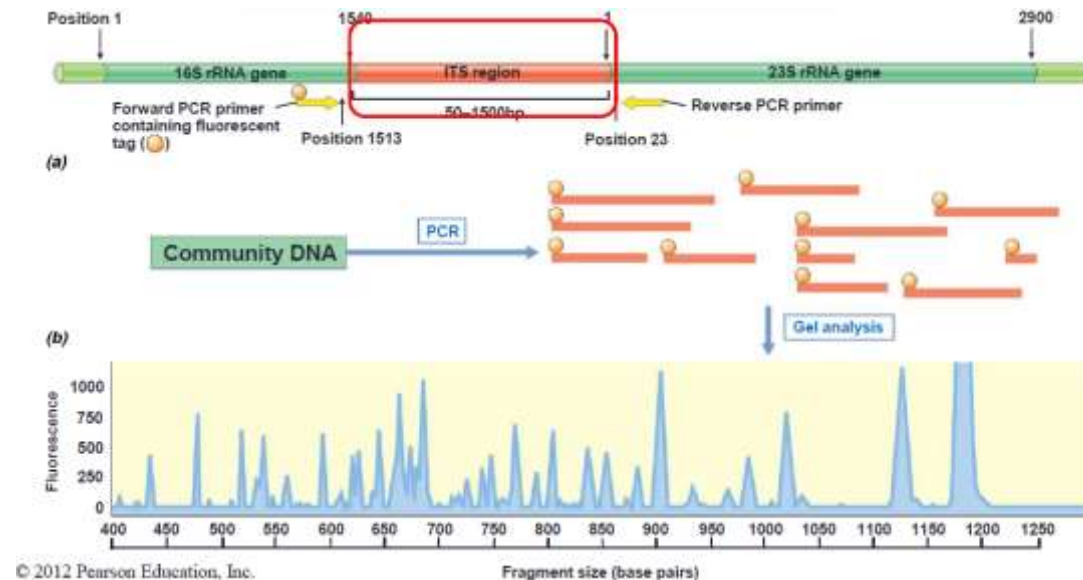
Irudi honetan elektroforograma bat dugu. Piko bakoitzak fluoreszentzia intentsitatea adierazten du Y ardatzean eta X ardatzean aldiz, haren tamaina.



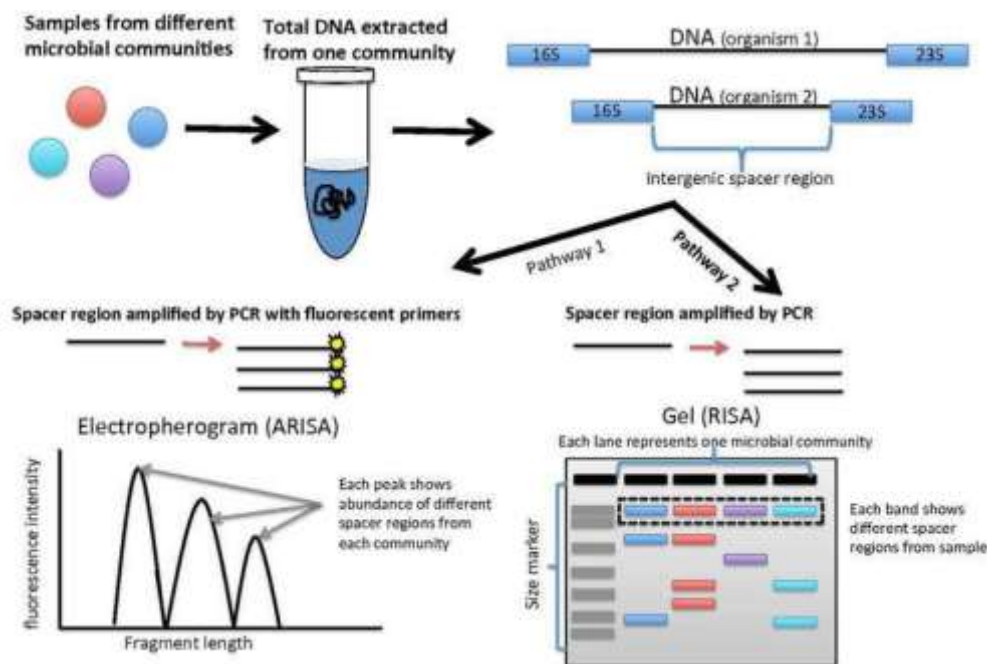
Eskema honetan goian aipaturiko pausuak irudikatu dira. Lehenik DNA erauzi beharko da eta PCR bidez anplifikatu. Behin intereseko geneak ditugula, errestrikzio-entzimen bidez zatituko dira eta elektroforesi bat egitean, bandak bereizturik agertuko dira. Azkenik, laser bidez detektatuko dira.

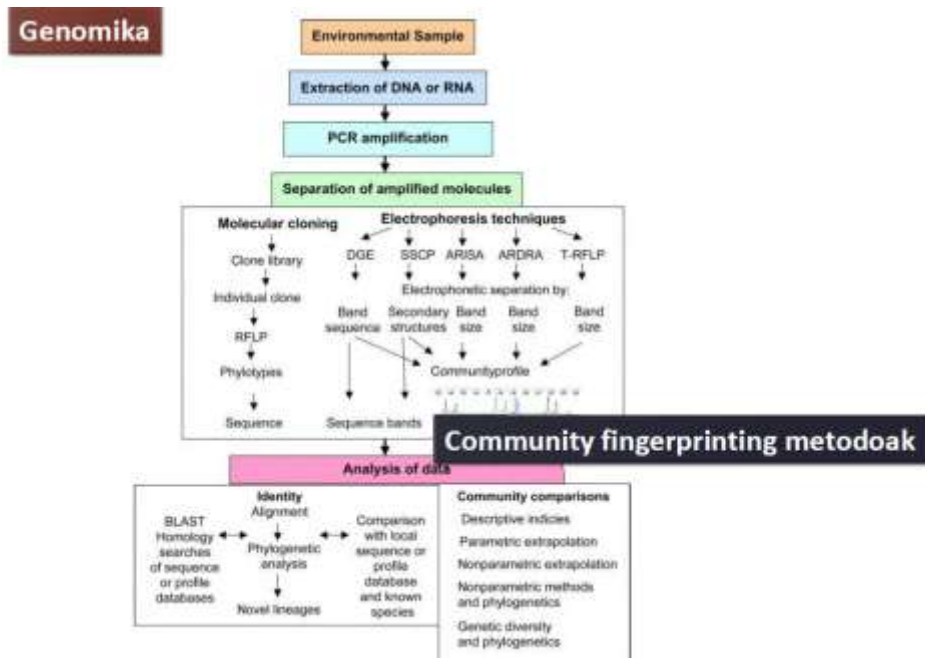


ARISA metodoaren bidez komunitate mikrobianoan oso kontserbaturik dauden bi sekuentzia erabiltzen ditu, 16S rRNA eta 23S rRNA. Bi zati hauek RNA erribosomikoaren bi azpiunitateak kodetzen dituzte. Bi azpiunitate hauen sekuentzien atean, gune intergeniko bat dago ITS (InTergenic Space) deiturikoa. ITS zonaldearen taimainua desberdina da OTU (Unitate Taxonomiko Operazionala) bakoitzean. Azpiko irudian, elektroforograma bat egin da. Ez dira ezagutuko sekuentziak zein OTU-ri dagokion, baina komunitatearen eredu orokor bat emango digu eta laginak konparatzeko beste teknika bat izango da.



Hurrengo irudian prozesua irudikatu da.

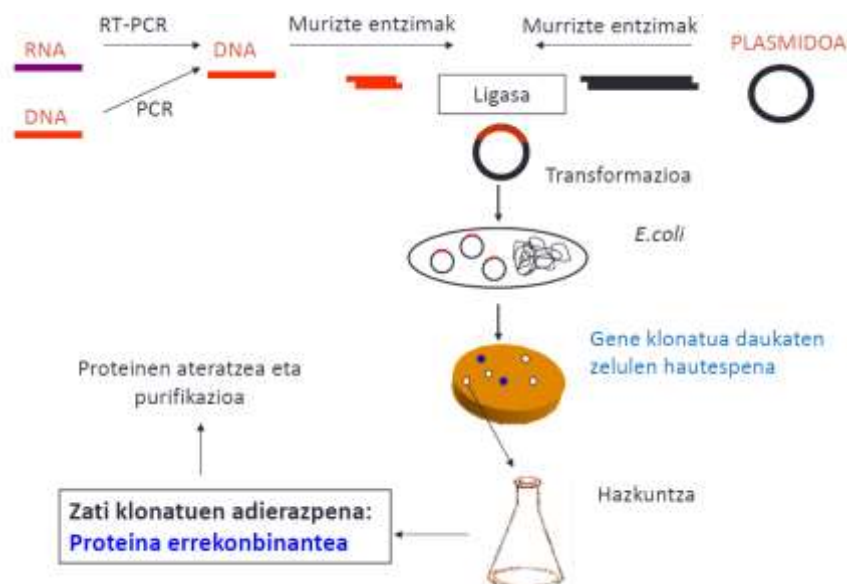




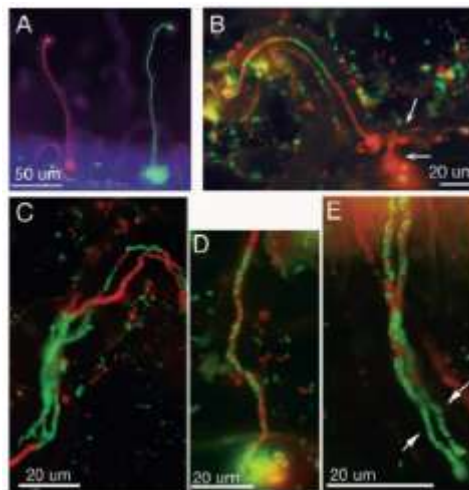
3. **Klonazioa** ere asko erabiltzen da genomikan. Klonazioak hainbat erabilera ditu:

- Sekuentziazioa. Mikroorganismo isolatu ez-kulturagarri ezezagunak karakterizatzea eta identifikatzeko edo gene berriak aurkitzeko.
- Gene espezifikoaren aktibitatea aztertzeko
- Proteinak purifikatzeko
- Mikroorganismoak markatzeko (GFP, Luziferasa, entzimak, ...)

****In vivo** anplifikazioa (errekonbinaketa) espezifikoagoa, garbiagoa eta zehatzagoa da *in vitro* baino (PCR)



4. Beste aukera bat **markatzaile genetikoak** erabiltzea da. Gehien erabiltzen den markatzailea GFP (Green Fluorescent Protein) da. *Azospirillum*-en sarrera garian. Baina horrelako markatzaile genetikoak erabiltzean mikroorganismoak ezin dira oxigenoarekiko oso sentikorrak izan. Adibidez, kasu honetan alpalpa landarean bakterioek burutzen duten infekzio-kanala azertu da *Sinorhizobium meliloti* bakterioaren kasuan.



Baita ere harraparitza aztertzeko balio dute markatzaileek laborategi praktikan egin zen bezala. Beste kasu batzuetan interesgarria izan daiteke mikroorganismo batek kutsatzaile baten degradazioa egiteko gai den edo ez. Kutsatzailea markatzen bada, haren eraldaketa jarraitu ahalko da. Beste kasu batzuetan gene informatzaileak sor daitezke luminiszentzia genea txertatuz intereseko genearen ondoan. Adibide honetan, plasmido bat txertatu da, *lux* genearekin eta naftalenoaren degradazio bidezidorra. Plasmidoa barneratzen duten mikroorganismoak luminiszentzia azalduko dute bidezidor metabolikoa aktibaturik egongo delako.

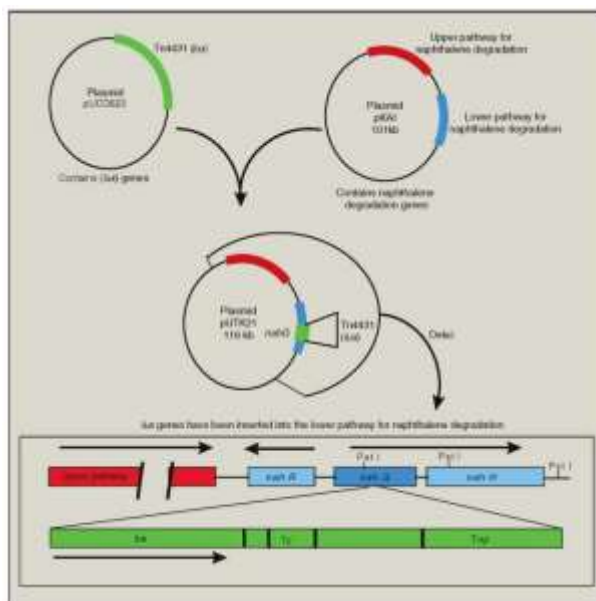
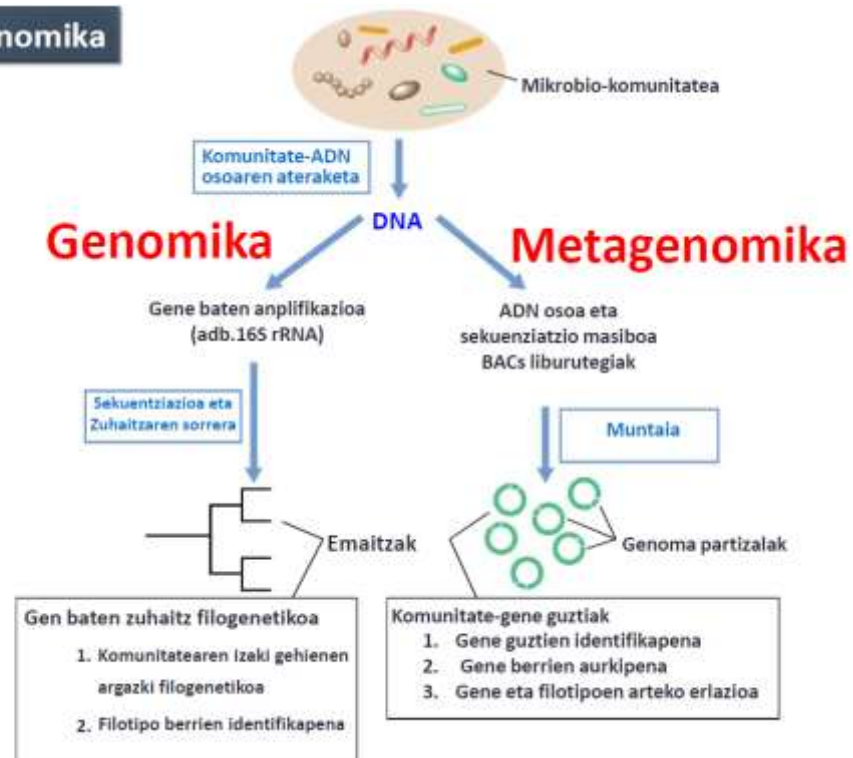


FIGURE 13.24. Example of a reporter gene. The *lux* genes, which code for a luminescence reaction, have been inserted into the naphthalene degradation pathway. As a result, an organism with the pUTK21 plasmid will luminesce while degrading naphthalene

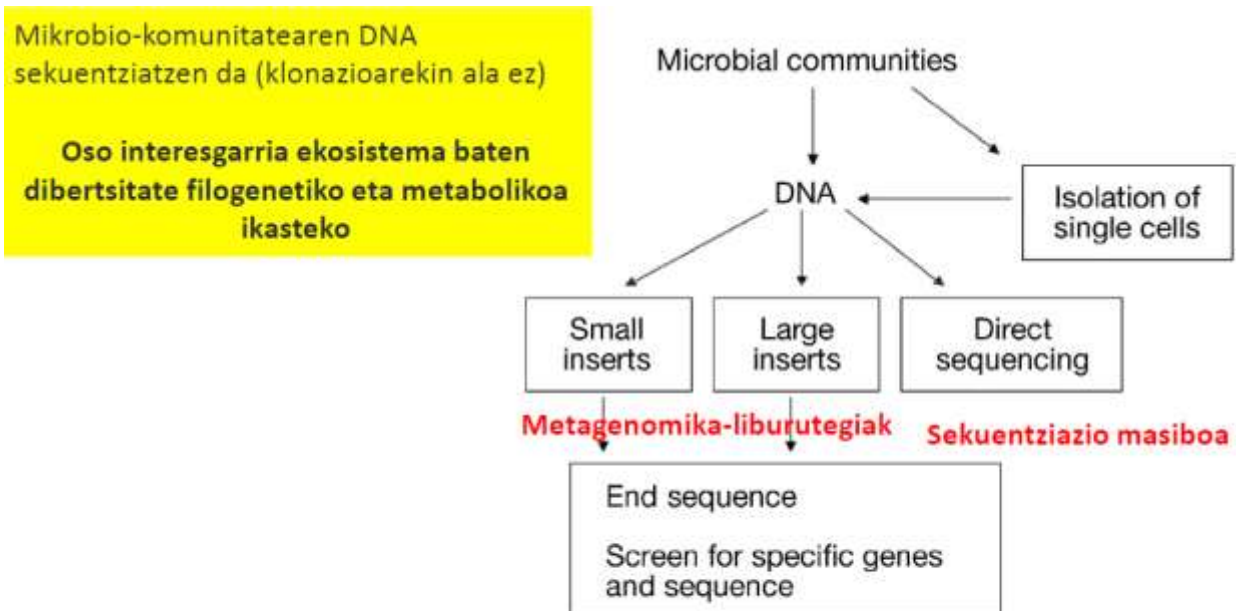
METAGENOMIKA

Genomikaren bidez, mikroorganismoen arteko konparaketa egiten da gene baten anplifikazioaren bidez, baina metagenimokaren bidez komunitate osoan dugun DNA edo RNA batu eta aztertuko dugu. Ondoren, datu pilo hori antolatu beharko da.

Metagenomika



Metagenomikan mikrobio-komunitatearen DNA sekuentziatzen da (klonazioarekin ala ez). Sekuentziazio masiboa egin daiteke edota liburutegiak erabili daitezke. Posible dugu gene guztiak sekuentziatzea edo ez. Metagenomika oso interesgarria izango da ekosistema baten dibertsitate filogenetiko eta metabolikoa ikasteko. Sekuentziazio masiboari *Next Generation Sequencing (NGS)* deritzo. Teknika hauek sekuentziazio paralelo masiboa egiten dute eta datu kimikoak datu digital bezala metatzen dira.

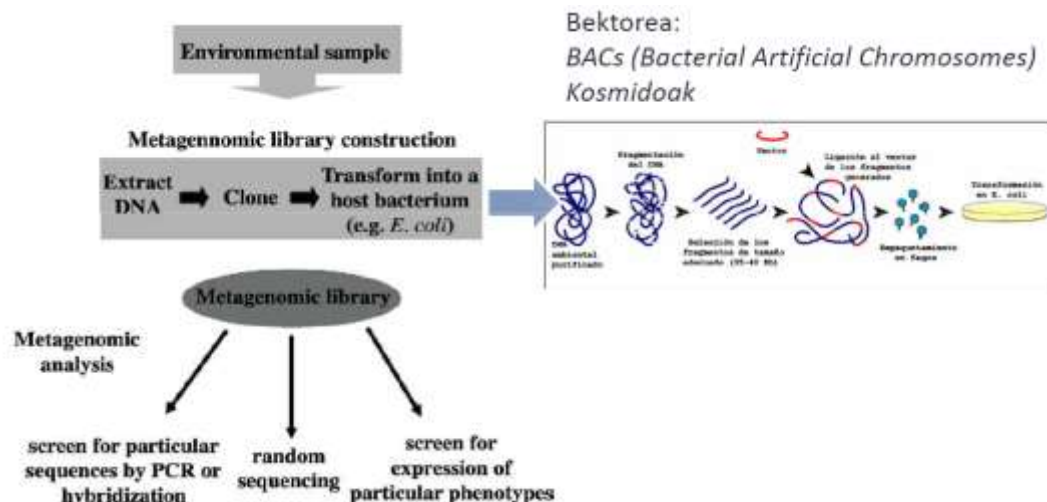


Next Generation Sequencing (NGS)

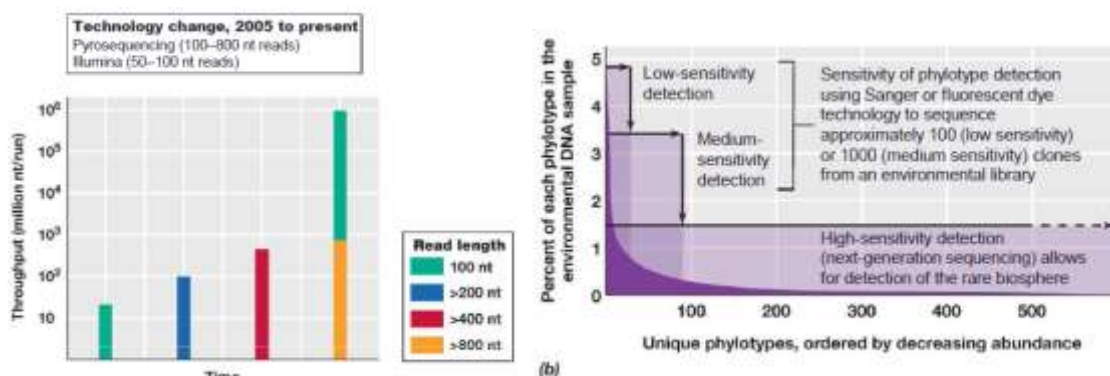
Erabilerak:

- FISIOLOGIA ETA METABOLISMOA
 - Izaki ez-kulturagarrien potentzial genetikoa eta metabolikoa aztertzeko
 - Kulturatzea ez-kulturagarria
- MIKROORGANISMOEN EKOLOGIA
 - Ingurugirora moldaera aztertzeko
 - Eredu biogeografikoak ulertzeko
- EBOLUZIO-PROZESUAK
- AURKIKUNTZA-POTENTZIALA
 - Gene berriak, metabolismo berriak, dibertsitate berria, ...

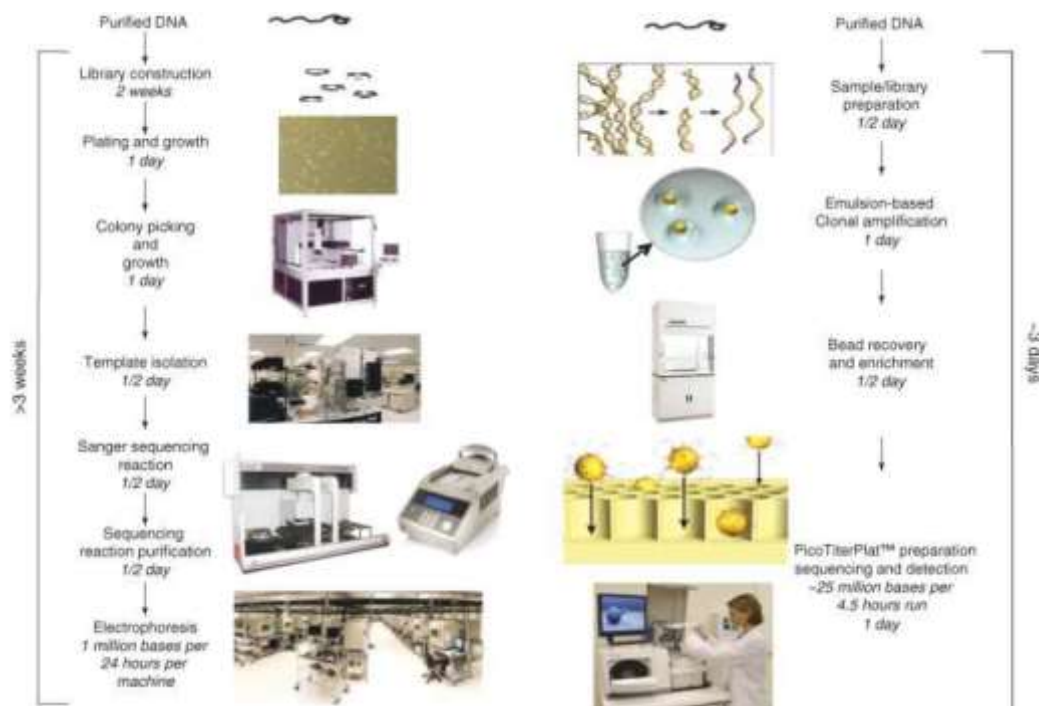
Metagenomika-liburutegiak eratzeko jatorrizko DNA-tik intereseko DNA isolatu eta klonatzen da ondoren bakterioak transformatzeko. Bektoreak kosmidoak edo BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) izaten dira. Askotan, txertaturiko DNA adieraz daiteke eta horrela bere funtzioa ezagutu daiteke.



Sekuentziazio masiboa egiteko DNA edo mRNA erabiltzen da. Sekuentziazio masiborako teknika erabilienak Sanger sekuentziazioa, Ion Torrent, -llumina, ABI-Solid eta pirosekuentziazioa dira. Erabiliko dugun sekuentziazio metodoaren arabera, laginen sekuentziak tamaina desberdinak izan beharko dituzte. Metodoen artean desberdintasunak daudenez, metodo bakoitzaren bidez lortuko diren emaitzak ez dira berdinak izango. Sentikortasun baxuko teknika bada, mikroorganismo ugariak soilik detektatuko ditugu. Ugartasun handi eta gutxiko mikroorganismoak aztertzeko teknika sentikorrak erabili beharko dira.



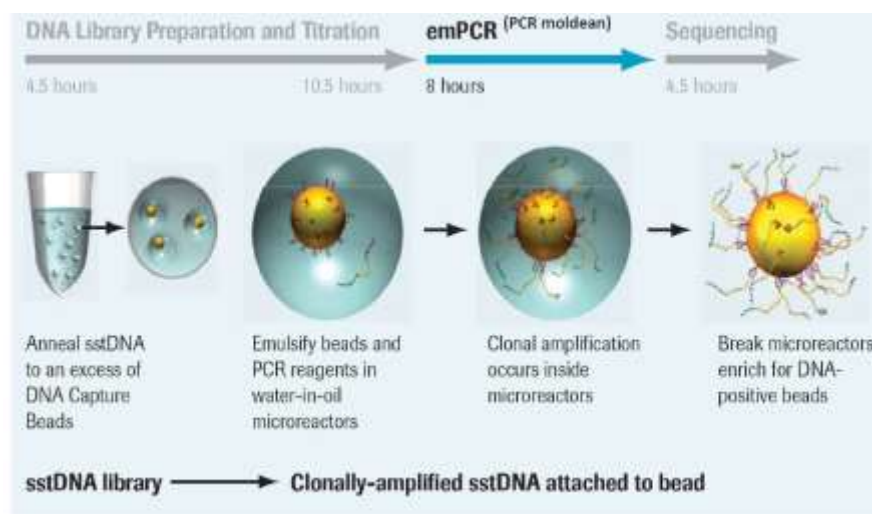
Sekuentziazio masiborako bi teknika konparatuko ditugu. Sanger sekuentziazioa eta M454 Pirosekuentziazioa. Sanger sekuentziazioa askoz ere prozesu luzeagoa da eta milioi base/eguneko lortzen dira. Aldiz, M454 pirosekuentziazioaren bidez, soilik egunak behar dira eta 20 milioi base pare lortzen dira 4,5h-tan. Eguno metodoak Sanger-en sekuentziazioa baino askoz ere errazagoak eta azkarragoak dira.



ION TORRENT DNA sekuentziatzeko beste teknika bat da, DNAREN polimerizazioan askaturiko protoien detekzioan oinarriturik. Intereseko DNA zati txikietan moztzen da eta zati bakoitza bolatxoetara txertatzen da. Bolatxoak txip batean egongo dira, eta periodikoki nukleotidoak gehituko dira. DNA polimerizazioa ematean, protoiak askatuko dira eta honek pH aldaketa ekarriko duenez, makinak detektatu egin ahalko ditu. Aldaketa kimikoak irakurritik, makina gai izango da sekuentziazioa lortzeko.

<https://www.youtube.com/watch?v=MxkYa9XCvBQ>

<https://www.youtube.com/watch?v=bFNjxKHP8Jc>



ILLUMINA/SOLEXA metodo honen bidez base desberdinak detektatzen dira DNA katera gehitzen diren bitartean. Nukleotido bakoitzak kolore bat izango du. Zati txikiagoak irakurtzen ditu eta koste handiagoak dakartza.

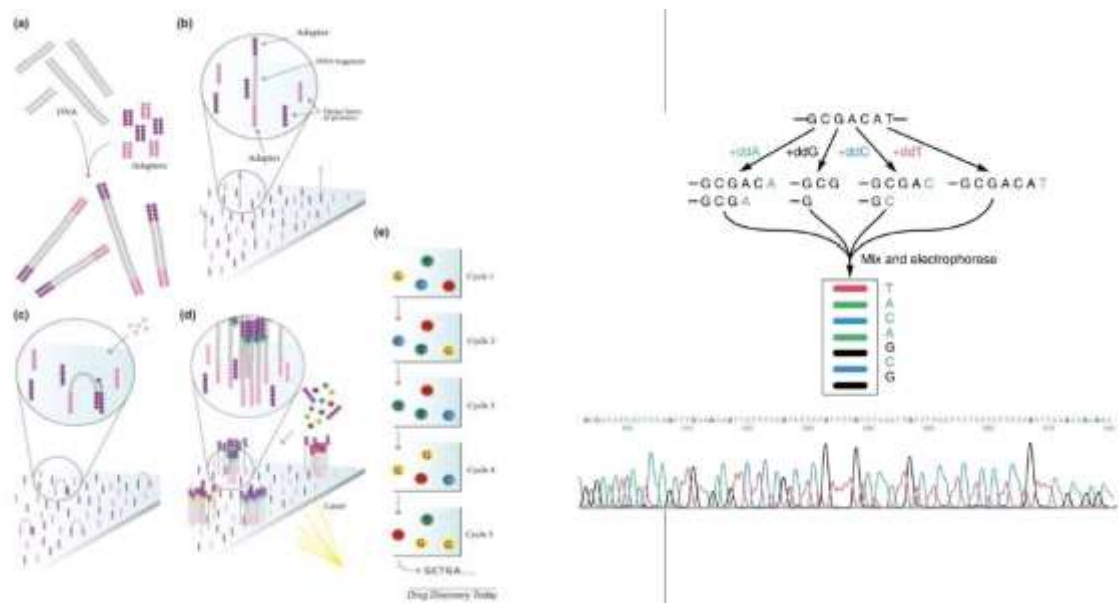


Figure 3. Illumina/Solexa process overview. Genomic DNA is randomly fragmented and adapters are added to each fragment end (a). Single-stranded fragments are then attached randomly inside flow cells (b). Bridge amplification is performed to generate double-stranded fragments (c). Following repeated cycles of denaturation and bridge amplification, millions of DNA copies are present in each flow cell (d). DNA sequence is determined with four-labeled reversible terminators primers and polymerase (e). Unincorporated terminators are washed, and the sequence is determined in each flow cell following laser excitation. The blocked 3' terminus and fluorophore are removed from the incorporated base and the cycle is repeated.

ABI SOLID metodoarekin liburutegi metagenomikoak prestatzen dira eta anplifikatuak dira PCR bidez. Sekuentziazioa hibridazio zikloen bidez burutzen da. Base nitrogenatuak kasu honetan ere tindaturik egongo dira.

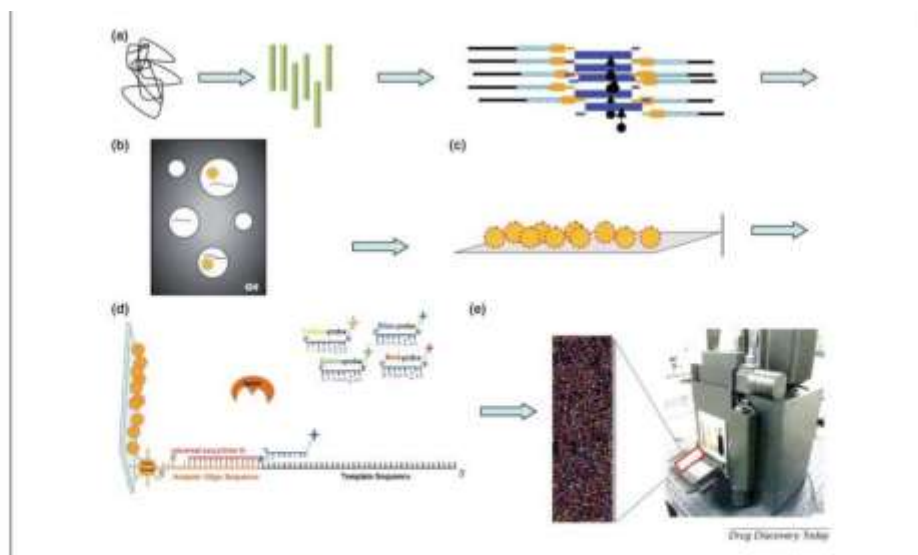


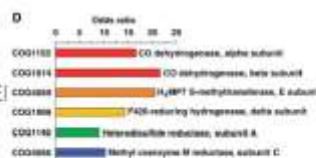
Figure 4. ABI Solid process overview. In a manner similar to the 454 technology, DNA libraries are prepared (a) and amplified by emulsion PCR (b). The template beads are deposited to form a random array (c), and sequencing is performed by repeated hybridization cycles with sequencing primers (d) and fluorescently labeled probes encoding the bases that are being interrogated (e).

Hainbeste datu lorturik, datuen analisia oso garrantzitsua izango da. Sekuentziaturiko zati motzak elkartu eta geneak identifikatuko dira. Ondoren, homologiaren bilaketa eta sailkapen funtzionala egingo da. Horrela, espezieen izendapena lortuko dugu.



A schematic diagram of a protein structure. It consists of a horizontal line representing the protein backbone, with several colored blocks representing different domains. From left to right, the blocks are: a green block, a red block, a blue block, a green block, a red block, and a red block. The blocks are connected by short segments of the backbone line.

1. RNA-en bilaketa
tRNA (tRNA-scan-SE)
rRNA, ncRNAs (homologia datu-baseekin)
2. Genen iragarpena
Metagenome Annotator, MetagenomeMark
3. Homologia bidez genen bilaketa
Blastx
4. Lekuen doikuntza, aldaketen erabakia
Blastx + Custom software
5. Esleipen funtzionala
Homologia vs KEGG, COGs, SEI
6. Binning, esleipen taxonomika
MEGAN
Homologia aukeraturiko genomekin (16S)

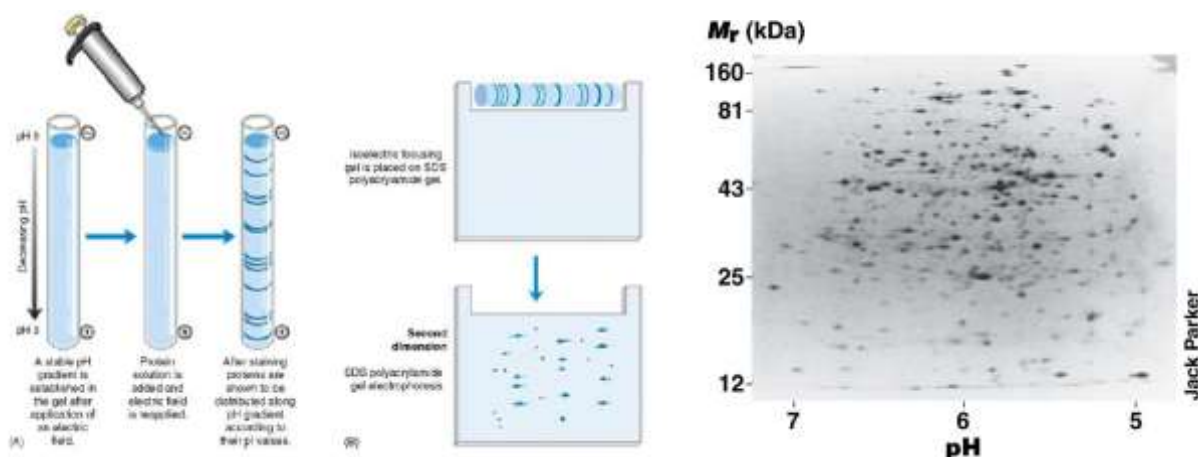


- Profil funtzionalaren analisi automatikoa egiteko CoMet programa erabiltzen da.
- Sekuentzia metagenomikoak esleitzean bide metabolikoak aztertu daitezke baita. MEGAN programa asko erabiltzen da zuhaitzak eraikitzeko.
- Beste programa batzuk: MG-RAST, MetaRep, COG, eggNOG, KEGG, MG-RAST, CAMERA, ...

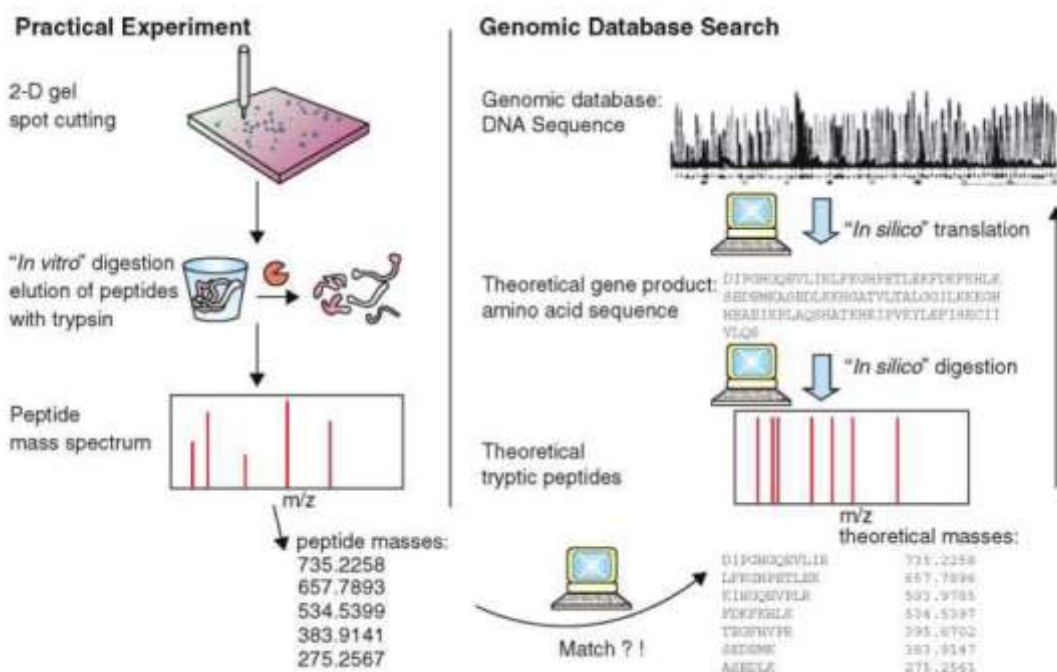
METAPROTEOMIKA

Zergatik aztertzen dira proteinak? Genoma aztertzean, gerta litekeena aztertzen gailtza. Hots, gerta daiteke baldintza naturaletan zenbait gene ez adieraztea. Transkriptoma aztertzerakoan (mRNA guztiak), gertatu behar dena aztertzen hari gara. Baina proteoma aztertzean gertatzen ari dena ulertuko dugu. Momentu konkretu horretan adierazirik dagoena.

Proteinak bereizteko elektroforesia da teknika zabalduna eta basikoena. Proteinen banaketa tamainaren arabera izango da. Elektroforesi bidimentsionalean, lehen banaketa tamainaren arabera izango da baina bigarrena, 90º-tara emango da. Kasu honetan proteinen ezaugarrien arabera izango da banaketa. Puntu elektrikoaren arabera desberdintzeak isoelektroenfoke izena dauka. Teknika honen bidez pH gradiente bat gehitzen da.



Masa espektrofotometroaren bidez molekulak haien masaren arabera banatzea lortzen dugu. Emaitzetan lorturiko masak datu baseekin konparatu daitezke eta behin proteinak ezaguturik haiek gene sekuentzia teorikoa. Horrela datu genomikoak izatera ere heldu gaitezke teknika honen bidez.



	Result	Richness	Evenness	Resolution
GENETIC FINGERPRINTS focusing on richness (number of operational units, absolute abundance)				
DGGE/TGGE	bands	<35 bands	5-100%	>0.5%
SSCP	bands	<35 bands	5-100%	>0.5%
T-RFLP	bands	<200 bands	0.1-100%	>0.05%
ARISA	bands	<500 bands	0.1-100%	>0.05%
Pryosequencing (454 technology)	100-250bp sequences	>10,000	–	
Clone libraries	sequence	>100	no	usually >200 clones
PFGE	bands	<50 bands	5-100%	>0.5% (genome size)
GENETIC FINGERPRINTS focusing on evenness (relative abundance)				
Quantitative PCR		no	0.01-100%	
FISH / TSA-FISH / CARD-FISH		no	0.1-100%	

Figure 1. A list of molecular methodologies used to measure richness and/or evenness of microbial communities. Also shown is the resolution of the technique. Simplified from a table assembled by the students and professors of the MarBEF training course Genetic Fingerprints in Biodiversity Research.