

Prvi rezultati DNA-barkodiranja bioraznolikosti hrvatske faune obalčara (Plecoptera) i lažištipavaca (Pseudoscorpiones)

Dora Hlebec¹, Martina Podnar², Ignac Sivc³, Branko Jalžić⁴, Mladen Kučinić¹

¹ Biološki odsjek (Laboratorij za entomologiju), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Rooseveltov trg 6, Zagreb

² Hrvatski prirodoslovni muzej, Demetrova 1, Zagreb

³ Odsjek za beskraljčnjake, Prirodoslovni muzej Slovenije, Prešernova cesta 20, Ljubljana, Slovenija

⁴ Hrvatsko biospeleološko društvo, Demetrova 1, Zagreb



dora.hlebec@biol.pmf.hr

1 UVOD

Uz primjenu morfoloških metoda za dobivanje podataka o raznolikosti, filogenetskim odnosima i taksonomskom statusu vrsta koriste se i molekularne metode. **Metoda DNA-barkodiranja** služi za determinaciju biološkog materijala u smislu identifikacije vrsta, a također i kao metoda za otkrivanje kriptičnih vrsta i utvrđivanje prisutnosti invazivnih vrsta.

Metoda se temelji na određivanju slijeda nukleotida standardiziranog fragmenta mitohondrijskog gena za podjedinicu citokromske oksidaze I (COI) duljine oko 658 pb, tzv. DNA-barkoda koji se uz detalje o jedinci i lokaciji sakupljanja upisuje u međunarodnu bazu podataka (BOLD). [1]

DNA-barkodiranje bioraznolikosti hrvatske faune podrazumijeva DNA-barkodiranje predstavnika vrsta iz 15 skupina organizama (≈ 1500 vrsta) iz 3 različite biogeografske regije s prosječno po 3 uzorka po vrsti prikupljenih na 200 različitih lokacija.

Hebert i suradnici predložili mitohondrijski gen COI kao standard za molekularnu identifikaciju **2003.**

BOLD baza **2005.**

International Barcode of Life projekt (iBOL) **2010.**

CroBarFauna **2017.**

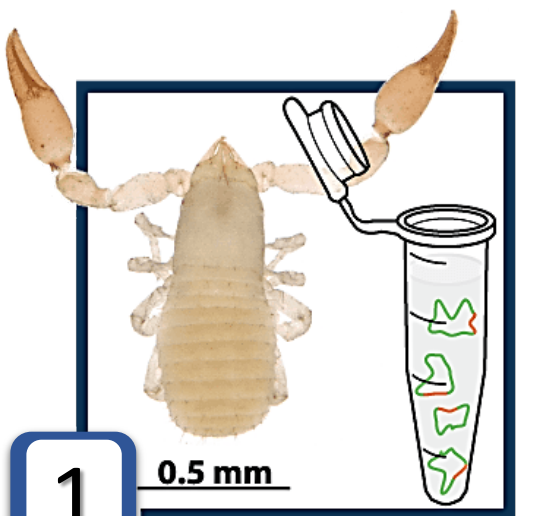


2 METODE

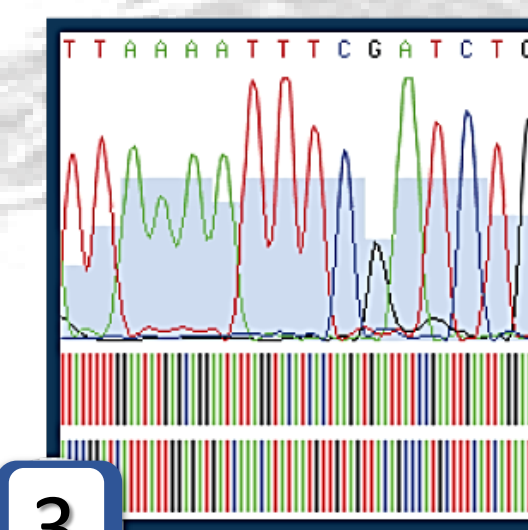
200 uzoraka Plecoptera (63 vrste) prikupljeno je u posljednjih 5 godina na 60-tak različitih lokacija i DNA-barkodirano
uzorci su konzervirani u 96 %-tnom etanolu i fotografirani

150 uzoraka Pseudoscorpiones (~70 vrsta) prikupljeno je tijekom zadnje 3 godine na 40 različitih lokacija (većinom tipski špiljski lokaliteti) i DNA-barkodirano
uzorci su konzervirani u 96 %-tnom etanolu i fotografirani

DNA je izolirana uzimanjem tkiva noge i korištenjem komercijalnih kitova za izolaciju (*Sigma-Aldrich* za Plecoptera i *Qiagen* za Pseudoscorpiones) prema standardnim protokolima.



658 pb COI-5P DNA barkod regije dobivene su uporabom standardnog seta početnica: LCO1490/HCO2198. [2]
PCR amplifikacija izvedena je prema unaprijed određenom protokolu, a uspješnost je provjerena metodom elektroforeze u agaroznom gelu. [2]



PCR produkti su enzimatski pročišćeni i poslani na obostrano sekvenciranje u servis *Macrogen*, a za pregledavanje i uređivanje sekvenci korišten je program Bioedit 7.2.4. [3]

3 REZULTATI

uočavanje desetak potencijalno kriptičnih vrsta i vrsta upitne determinacije

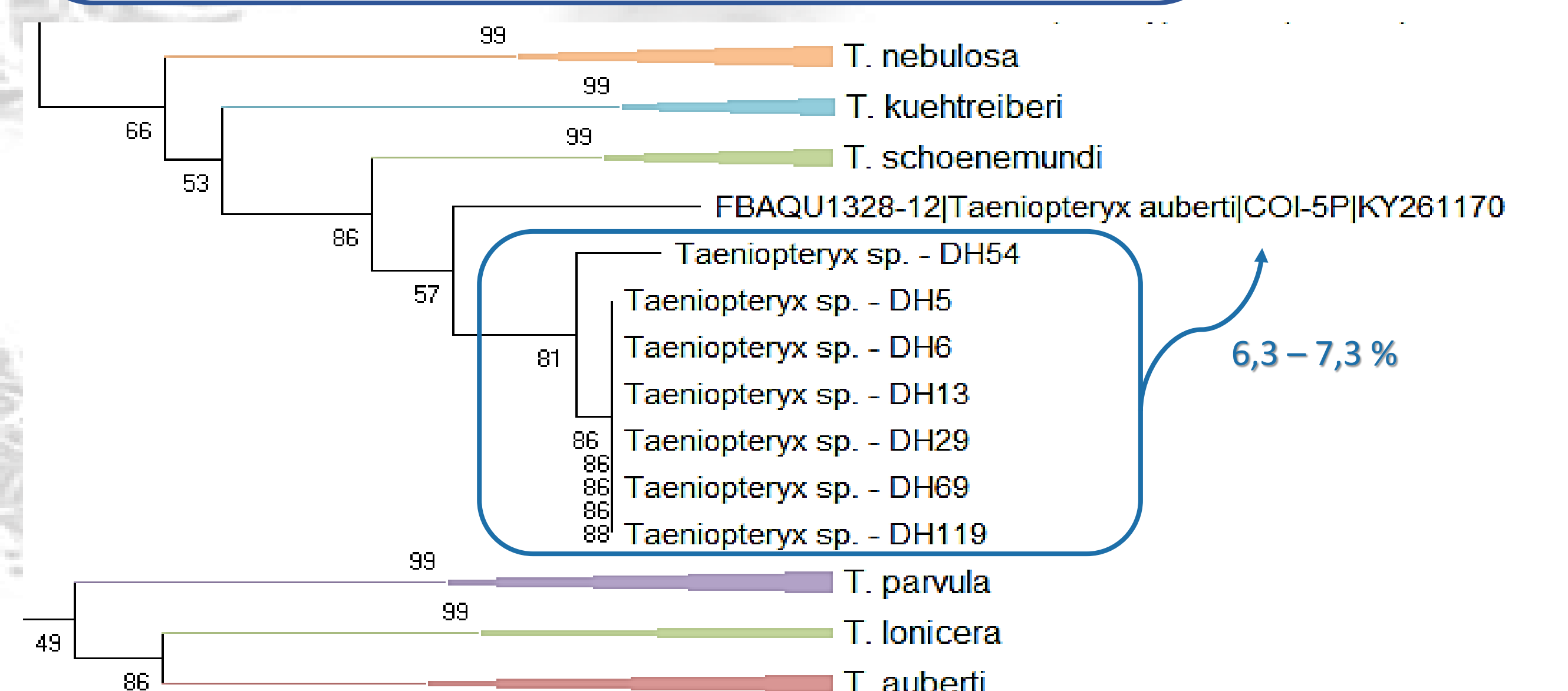
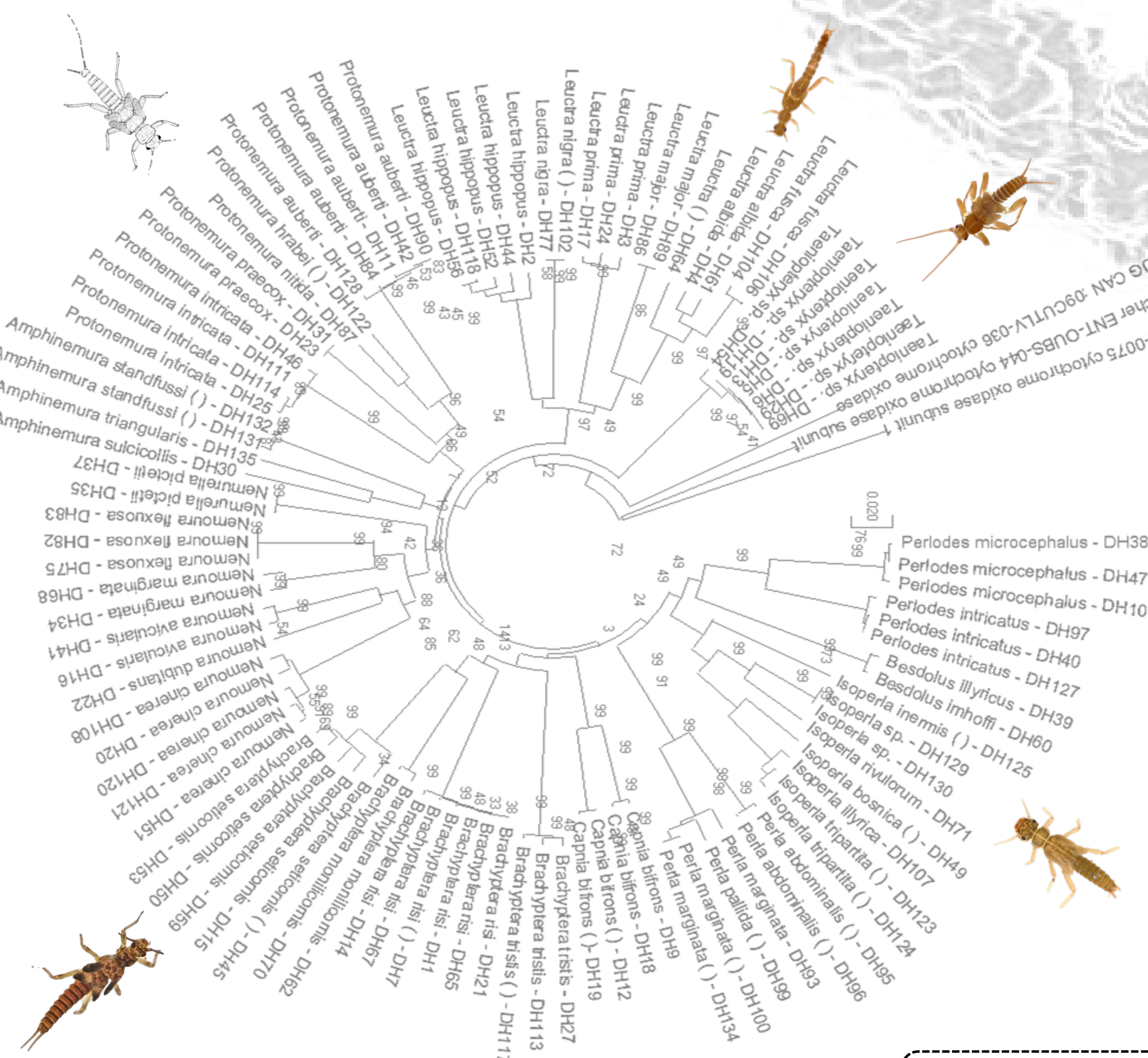
15 dobivenih sljedova karakterizira velika nekorrigirana udvojena genetska udaljenost (od 5 – 10 %) u odnosu na do sada opisane vrste (primjer slika 1.)

prvi upisi u BOLD bazu za 20 vrsta Plecoptera i 60 vrsta pseudoškorpiona, poput:

- Isoptera illyrica* Tabacaru, 1971
- Isoptera bosnica* Aubert, 1964

3

Dobiveni sljedovi uspoređeni su sa DNA-barkod sekvencama u BOLD bazi podataka korištenjem alata BOLD platforme. Filogenetske analize za uzorke Plecoptera provedene su metodama najveće vjerojatnosti (ML) i susjednog sparivanja (NJ) korištenjem programa MEGA 6. Također su određene nekorrigirane (PD) i korigirane (K2P) udvojene genetske udaljenosti. [4]



Slika 1. Isječak NJ filogenetskog stabla DNA-barkodiranih uzoraka vrsta roda *Taeniopteryx*. Istaknut je interval genetskih udaljenosti između novo DNA-barkodiranih uzoraka i neopisanog taksona *Taeniopteryx sp.* i njemu najrodnije ranije opisane vrste *Taeniopteryx auberti*

4 ZAKLJUČAK

Rezultati rada upućuju na:

- veliku bioraznolikost (relativno mali broj uzoraka i veliki broj vrsta) navedenih skupina i potrebu daljnjih istraživanja obiju skupina
- obogaćivanje BOLD baze upisivanjem DNA-barkodova endemskih vrsta
- vjerojatnost otkrivanja novih vrsta za znanost (posebno troglobiontske vrste lažištipavaca)
- potrebu primjene integrativne taksonomije

Slika 2. Filogenetsko stablo DNA-barkodiranih vrsta Plecoptera

Projekt DNA barkodiranja bioraznolikosti hrvatske faune je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost

Literatura:

- P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S.L. Ball, J. R. DeWaard, *Proc. R. Soc. Lond.* **270** (1512) (2003) 313-321.
- O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek, *J. Mol. Biol. Biotechnol.* **3** (5) (1994) 294-299.
- T. A. Hall, *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41** (1999) 95-98.
- K. Tamura, M. Nei, S. Kumar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101** (2004) 11030-11035.