



DNK barkodiranje – metoda determinacije komaraca



Nataša Bušić, mag. educ. bio et chem.

Uvod

KOMARCI

Insecta - Diptera - Culicidae

- molestanti
- vektori patogenih bolesti ljudi i životinja
- invazivne vrste



Ključan korak

točna i
precizna
identifikacija

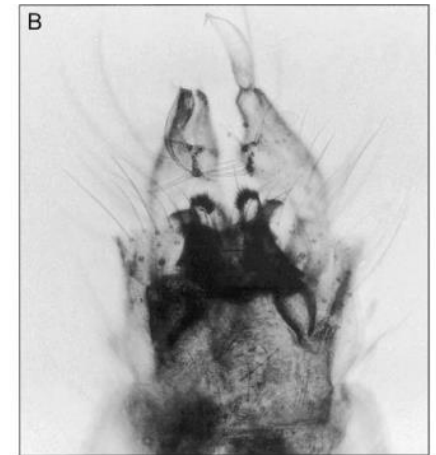


✓ morfološka determinacija

- dijelovi komarca bitni za determinaciju često se oštete prilikom uzorkovanja
- razlike su vidljive samo u određenom stadiju ili su vezane za spol
- komarci se pojavljuju kao kompleksi vrsta



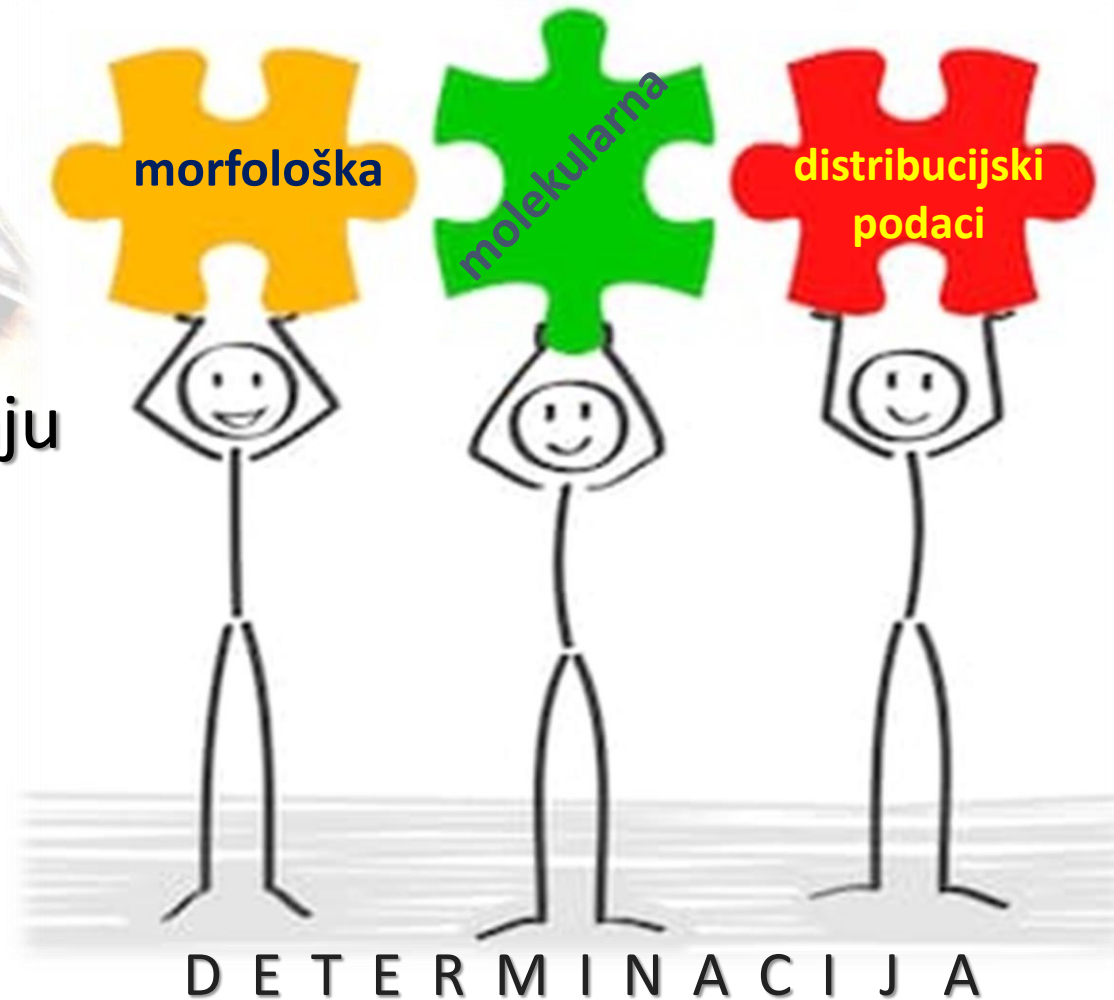
ljskice komarca



Morfologija kopulatornog aparata mužjaka (hypopygia) *Cx. torrentium* (A) i *Cx. pipiens* (B)

✓ molekularna determinacija

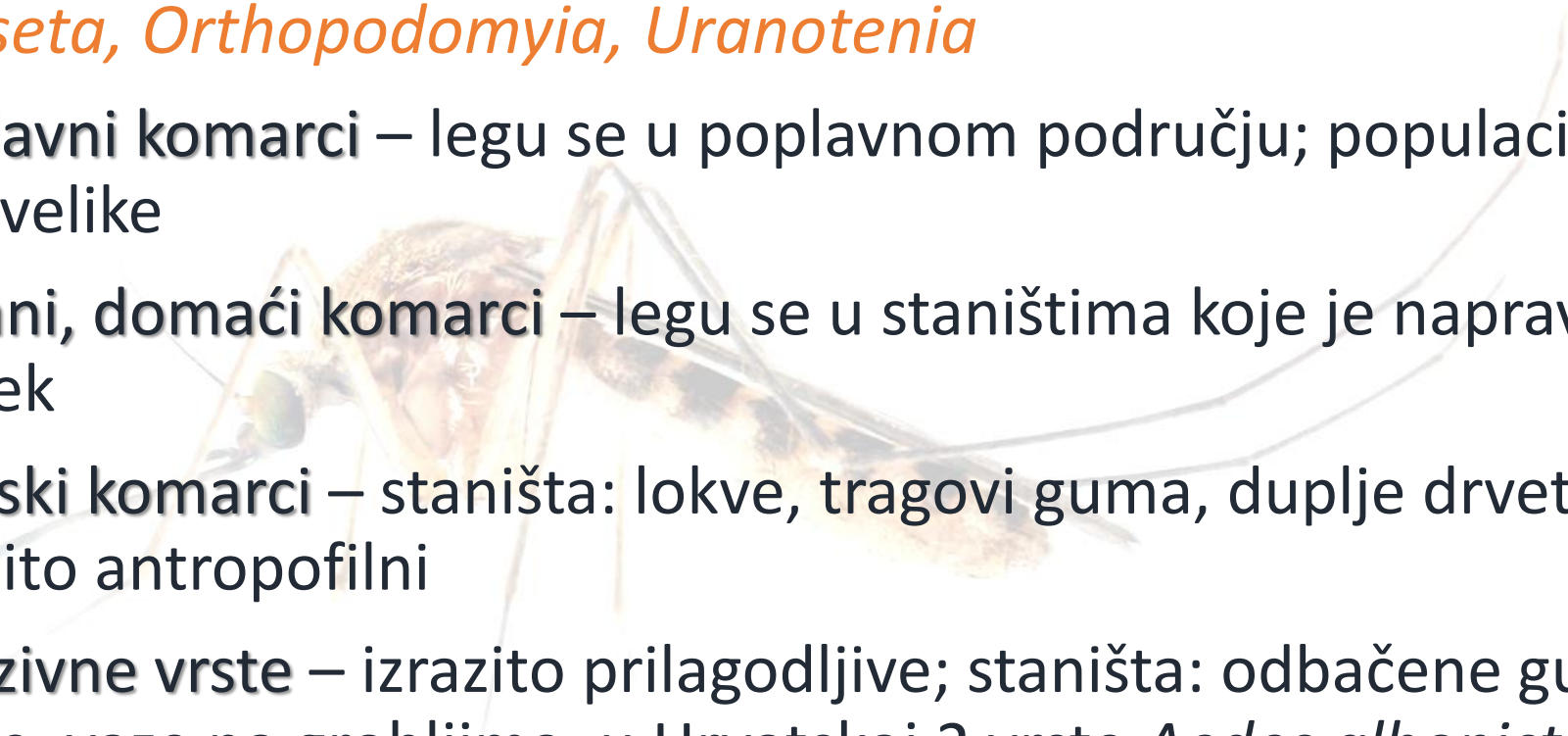
- preciznije metode
- neovisna o razvojnom stadiju, spolu ispitivanog uzorka ili njegovom oštećenju
- predviđa evolucijske i filogenetske veze unutar skupine





✓ fauna komaraca Hrvatske broji 52 vrste unutar 8 rodova *Anopheles*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Culiseta*, *Orthopodomyia*, *Uranotenia*

- poplavni komarci – legu se u poplavnom području; populacije vrlo velike
- urbani, domaći komarci – legu se u staništima koje je napravio čovjek
- šumski komarci – staništa: lokve, tragovi guma, duplje drveta; izrazito antropofilni
- invazivne vrste – izrazito prilagodljive; staništa: odbačene gume, kante, vaze na grobljima; u Hrvatskoj 2 vrste *Aedes albopictus* (prvi put zabilježen 2004.) i *Aedes japonicus* (prvi put zabilježen 2013.)

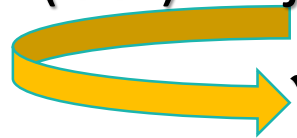


Metoda DNK barkodiranja



- mitohondrijski genom:
 - ✓ haploidno nasljeđivanje
 - ✓ izostanak introna
 - ✓ ograničena rekombinacija

- standardizirani fragment mitohondrijskog gena za podjedinicu I citokrom oksidaze (COI) duljine 650 pb



- ✓ univerzalne početnice (HCO2198 i LCO1490)
- ✓ brzina evolucijskih promjena - razlikovanje srodnih vrsta

- mnoga istraživanja pokazala su kako je COI valjani molekularni marker za identifikaciju vrsta komaraca

morfološka determinacija



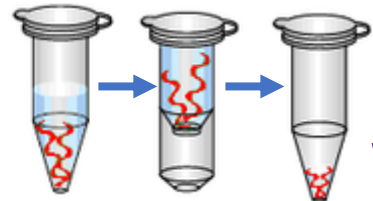
Shema DNK barkodiranja

referentni uzorak (vaučer)

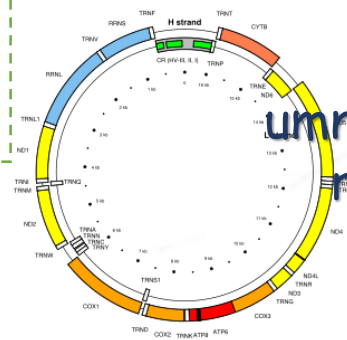


ostatak tkiva pohranjuje se u Zbirku tkiva

izolacija DNK

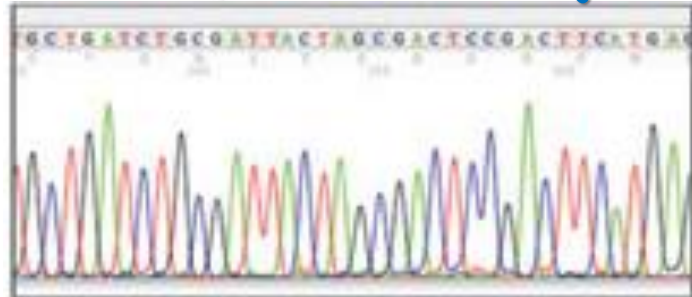


dio DNK pohranjuje se u Zbirku DNK



umnažanje barmod regije (COI)

obostrano sekvenciranje

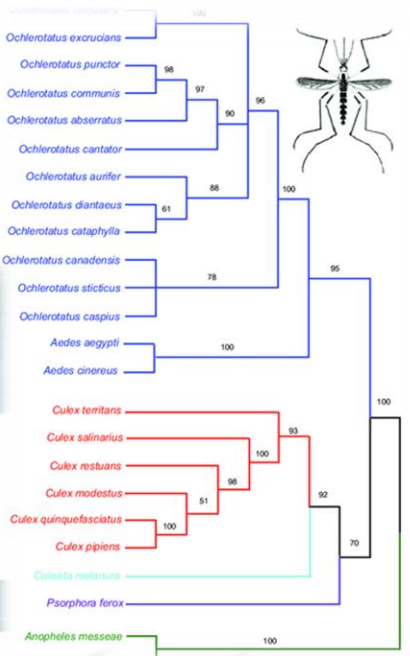


100%match

BARCODE OF LIFE DATA SYSTEMS *at work*

DESIGNED TO SUPPORT THE GENERATION & APPLICATION OF DNA BARCODE DATA

4,712k SPECIES
441k SPECIES
168k SPECIES
63k SPECIES



baze podataka BOLD, NCBI

barkod



Kompleksi vrsta komaraca



An. maculipennis kompleks

- rod *Anopheles*

- unutar roda nalazi se kompleks sestrinskih vrsta *Anopheles maculipennis* (10 vrsta)
- u Hrvatskoj potvrđene četiri
 - ✓ *Anopheles daciae*
 - ✓ *Anopheles maculipennis*
 - ✓ *Anopheles melanoon*
 - ✓ *Anopheles messeae*



Cx. pipiens kompleks

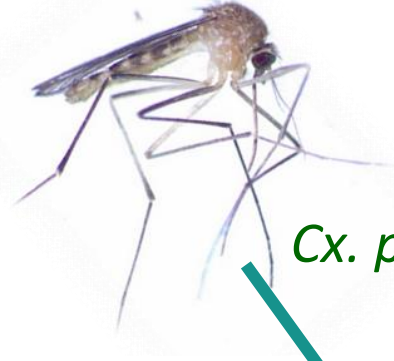
- rod *Culex*

- unutar roda nalazi se kompleks sestrinskih vrsta *Culex pipiens* (nekoliko vrsta, podvrsta, biotipova)
 - ✓ *Culex pipiens pipiens* - nominativni oblik
 - ✓ *Culex pipiens molestus* - biotip
 - ✓ *Culex pipiens quinquefasciatus* - podvrsta
 - ✓ *Culex torrentium* - sestrinska vrsta

Molekularno razlikovanje unutar kompleksa vrsta



An. maculipennis kompleks



Cx. pipiens kompleks

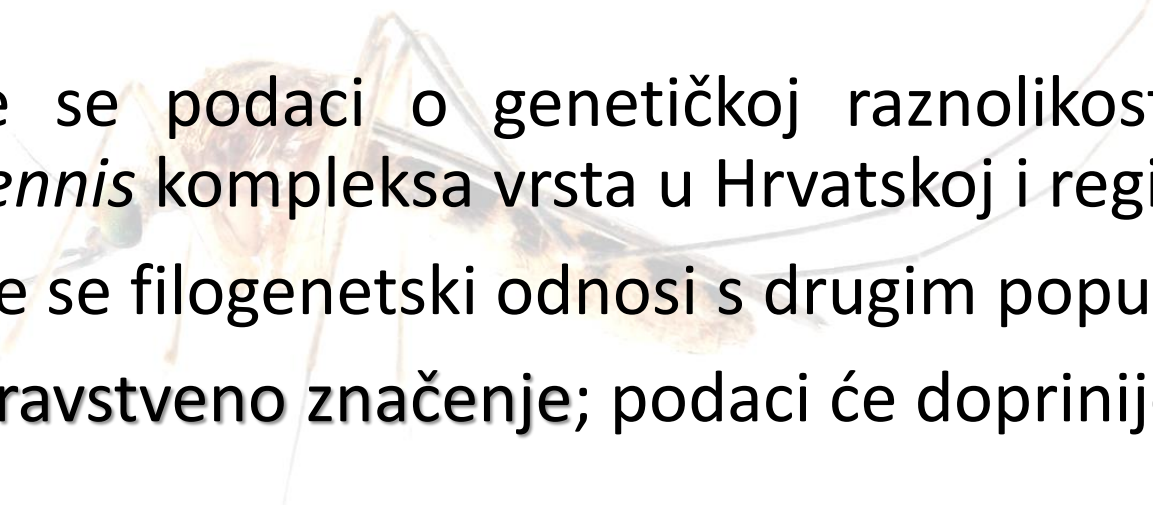
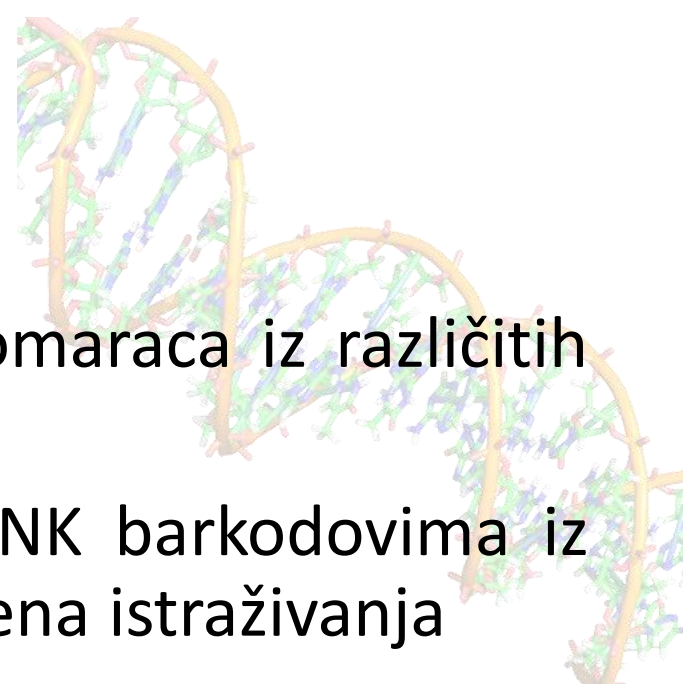
- regija nuklearne ribosomalne RNK razmaknica ITS2
- sekvenciranje

- varijacije di-nukleotidnog (TG) mikrosatelitskog lokusa CQ11 i ace-2
- elektroforeza

✓ integrirani skupovi podataka, uključujući genomske, morfološke i ekološke podatke ključni su za daljnje razumijevanje

Znanstveni doprinos barkodiranja

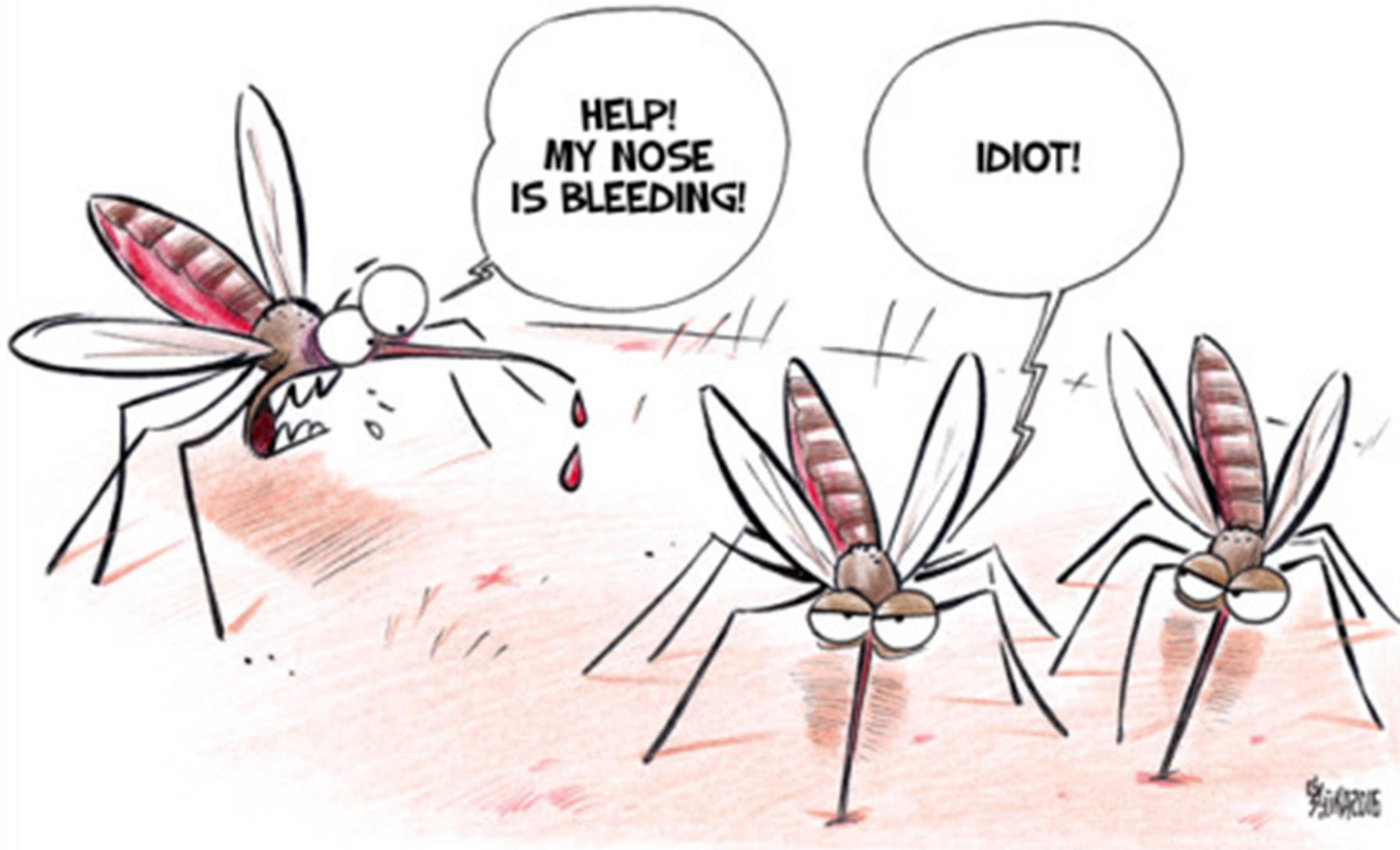
- prikupljanje DNK barkod podataka za velik broj vrsta komaraca iz različitih geografskih regija Hrvatske
- doprinos međunarodnoj bazi podataka (BOLD, NCBI) DNK barkodovima iz Hrvatske koja će predstavljati platformu za druga znanstvena istraživanja
- potvrdit će se postojeći popis vrsta komaraca u Hrvatskoj i moguće proširiti novim
- dobit će se podaci o genetičkoj raznolikosti *Culex pipiens* i *Anopheles maculipennis* kompleksa vrsta u Hrvatskoj i regiji
- utvrdit će se filogenetski odnosi s drugim populacijama u svijetu
- javno-zdravstveno značenje; podaci će doprinijeti kvaliteti kontrole vektora



Znanstvena istraživanja koja se provode na temu barkodiranja dio su projekata:

- „DNA barkodiranje bioraznolikosti hrvatske faune“ financiran od strane HRZZ (IP-2016-06-9988)
- „Barkodiranje faune komaraca Hrvatske s posebnim naglaskom na politipsku vrstu *Culex pipiens* kompleks“, financiran od strane Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku (UNIOS-ZUP 3866)





Hvala na pažnji! 😊