

Zróżnicowanie na poziomie molekularnym (barcoding) gatunków z rodziny *Hygrobatidae* po przeciwnych stronach pasma Alp

Roksana Malicka



Cel:

Celem badań będzie sprawdzenie faktycznej różnorodności gatunkowej w rodzinie *Hygrobatidae* po obu stronach Alp, przy pomocy badań molekularnych, w tym stwierdzenie obecności ewentualnych gatunków kryptycznych lub pseudokryptycznych. Dodatkowym celem badań, na podstawie uzyskanych wyników, będzie sprawdzenie czy Alpy stanowią barierę w dyspersji gatunków z rodziny *Hygrobatidae*.



Hipotezy badawcze:

- Faktyczne zróżnicowanie gatunkowe w rodzinie Hygrobatidae jest zdecydowanie większe niż wynika to z klasycznej taksonomii opartej na badaniach morfologicznych.
- Skład gatunkowy po stronie południowej i północnej Alp jest częściowo odmienny, co wskazuje że pasmo Alp stanowiło w okresie polodowcowym i stanowi dzisiaj barierę dla dyspersji przynajmniej części gatunków wodopójek.



Barkoding DNA

identyfikacja roślin i zwierząt w oparciu o krótką sekwencję DNA, zwaną kodem kreskowym



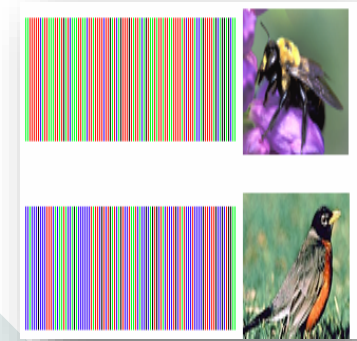
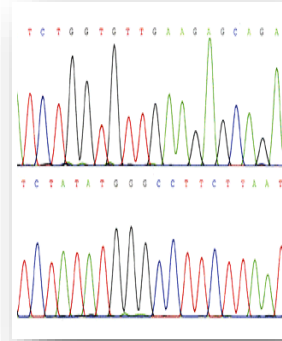
Barkod DNA

sekwencja DNA w wybranym,
standardowym regionie genomu
pozwalająca na identyfikację gatunku.

CCTATACCTAATCTTCGGAGCATGAGCGGGGCATGGTAGGC....



Otrzymywanie barkodów DNA



**Pobranie
próbki**

**Izolacja DNA
i PCR**

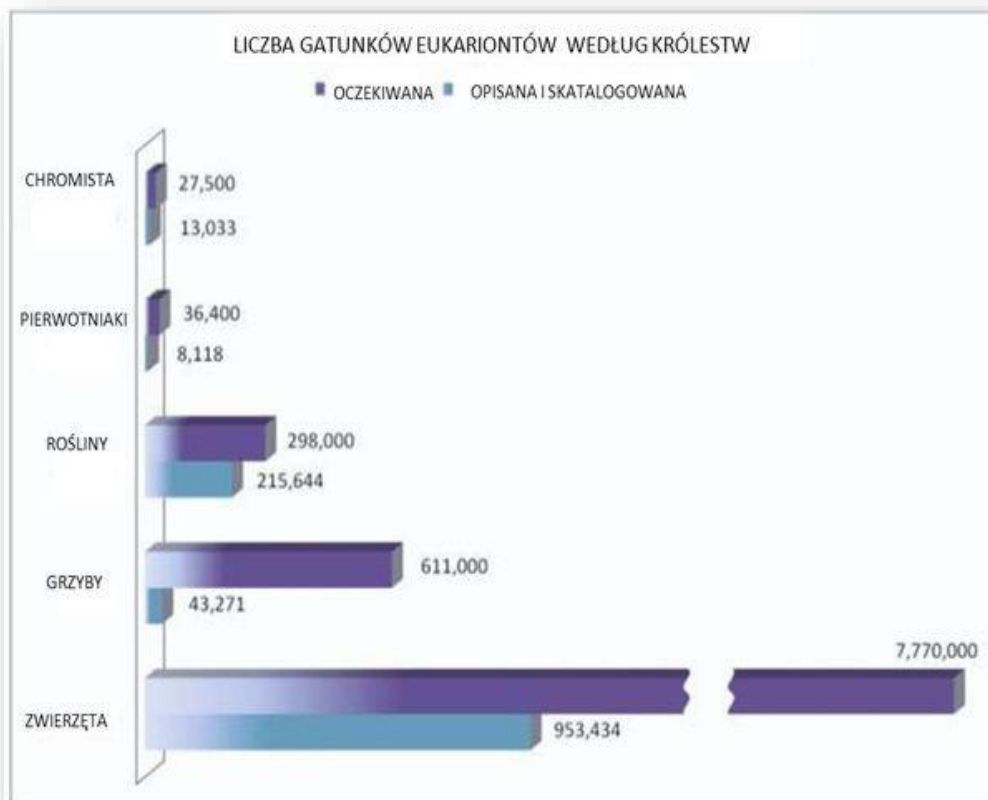
**Sekwencjono-
wanie**

**Porównanie
barkodu**



Dlaczego istnieje potrzeba stosowania barkodingu?

Problem 1: Liczba gatunków.



- ▶ **Istnieje obecnie między 1,5 a 2 mln opisanych gatunków**
- ▶ **Szacuje się, że liczba ta może stanowić zaledwie 1/4 rzeczywistej liczby gatunków**
- ▶ **Być może więcej niż 1/3 wszystkich gatunków są zagrożone**



Dlaczego istnieje potrzeba stosowania barkodingu?

Problem 2: Definicja gatunku

karlik malutki/karlik drobny



Astrartes fulgelator



Proces złożony, zależy od wielu czynników:

- ▶ **możliwości krzyżowania**
- ▶ **zmienności morfologicznej**
- ▶ **kontekstu ekologicznego**
- ▶ **genetycznego podobieństwa**



Dlaczego istnieje potrzeba stosowania barkodingu?

Problem 3: Ograniczenia klasycznej taksonomii



Strelicja królewska (*Strelitzia reginae* Ait.) – gatunek dużej, ozdobnej rośliny z rodziny strelicjowatych, o oryginalnej, grzbiecistej budowie i kontrastowych kolorach kwiatów: pomarańczowym i niebieskim. Łodyga w postaci krótkiego, w większości podziemnego kłącza. Liście wiecznie zielone, mocne długości 1,5–2 m. Blaszki liściowe dorosłej rośliny osiągają do 70 cm długości i 30 cm szerokości, a same ogonki liściowe do 1 m i średnicy 1 cm. Kwiat: okwiat o intensywnej, pomarańczowej barwie z ciemnoniebieskimi słupkami. Owoc skórzasty, suchy, pękający z pomarańczowymi wypustkami i licznymi nasionami w środku



Cudowronki, cudowronkowate, ptaki rajske (*Paradisaeidae*) – rodzina ptaków z rzędu wróblowych (Passeriformes). Długość ciała 34 cm. Samiec – głowa oraz grzbiet żółte, opalizująco zielone gardło, dziób kremowy, spód czekoladowobrązowy. Podczas toków prezentuje długie, czerwopomarańczowe pióra na bokach ciała. Samica – ciemnobrązowa z wierzchu i na spodzie ciała, potylicą i kark żółte. Pożywienie stanowią owady, tworzy stada mieszane z ptakami innych gatunków. Ptaki te charakteryzują się zwykle bardzo barwnym upierzeniem i obecnością niezwykle ozdobnych piór, czasem na głowie, czasem w ogonie. Występuje u nich silnie zaznaczony dymorfizm płciowy – samice są znacznie mniej kolorowe.

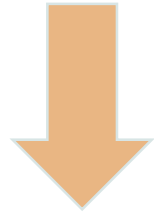
- ▶ **terminologia**
- ▶ **odpowiednie kwalifikacje**
- ▶ **identyfikacja okazów niedojrzałych, uszkodzonych, niekompletnych**



Problem 3: Ograniczenia klasycznej taksonomii



Strelitcja królewska (*Strelitzia reginae* Ait.) – gatunek dużej, ozdobnej rośliny z rodziny strelitcjowatych, o oryginalnej, grzbiecistej budowie i kontrastowych kolorach kwiatów: pomarańczowym i niebieskim, Łodyga w postaci krótkiego, w większości podziemnego kłącza. Liście wiecznie zielone, mocne długości 1,5–2 m. Blaszki liściowe dorosłej rośliny osiągają do 70 cm długości i 30 cm szerokości, a same ogonki liściowe do 1 m i średnicy 1 cm.



Skomplikowane
i raczej
nieobiektywne



> *Strelitzia reginae* (*matK*) gene, partial CDS

```
ATTTAAATTATGTGTCAGATATATTAATACCCCATCCCATCCATCTGGAAATC
CTGGTTCAAATACTTCAATGCTGGACTCAAGATGTTTCCTCTTTGCATTTATT
GCGATTCTTTCTCCACGAATATCATAATTCGAATAGTTTCATTACTCCGAAAA
AACCTATTT
ATAAAAGATTTTTTCGATTCCTATATAATTCTTATGTATTTGAATGTGAATTT
GTATTAGTTTTTTTACGATCAAGGTCCTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACAC
ATTTCTATGGAAAAATGGGGCATTTTTTAGTAGTGTGTTGTAATTATTTTCAG
AAGACCCAATGGTTCTTCAAAGATCCTTTTCTGCATTATAAGGAAAAGCAAT
TCTGGTGTCAAAGGGAACCTCGTCTTTTGATGAGGAAATGGAGATCTTACCTT
GTCCATTTTTGGCAATATTATTTTCAATTTTGGTCTCATCCGCATAGGATTCA
TATAAACCAATTATCAA
```

Proste (A, T, G, C),
bardziej
niezawodnie
i obiektywne



Idealny barkod DNA



**niska zmienność w obrębie gatunków (ok. 2%) i
równocześnie wysoka zmienność pomiędzy gatunkami**

oflankowanie konserwatywnymi domenami

niewielka długość – do ok. 600 pz

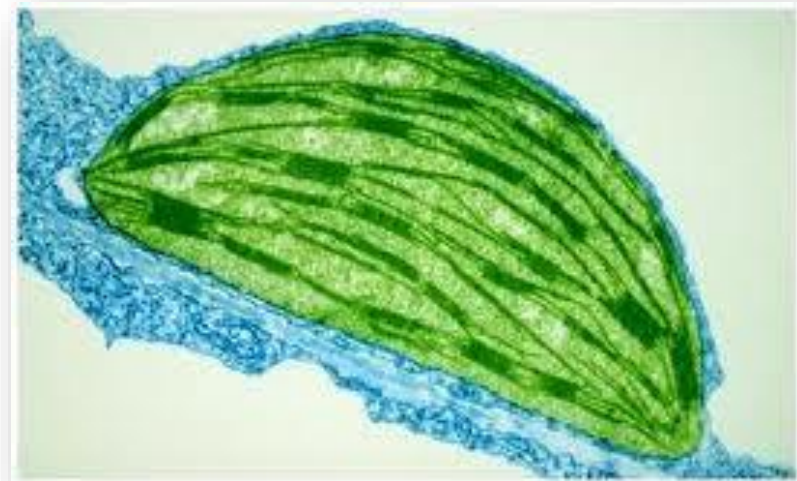
niewielka liczba insercji/delecji

występowanie w genomie w dużej liczbie kopii



Barkodem może być:

- DNA mitochondrialne (*coxI*)
- DNA chloroplastowe
- DNA jądrowe (ITS - Internal Transcribed Spacer)



Etapy projektu oraz metodologia projektu badawczego:

1. Zbiór materiału badawczego, a następnie tego utrwalanie materiału w 96 % alkoholu i przechowywanie w niskiej temperaturze.
2. Izolacja DNA
3. PCR– amplifikacja genu mitochondrialnego COX1
4. Oczyszczanie produktu PCR
5. Sekwencjonowanie produktu PCR
6. Analiza bioinformatyczna



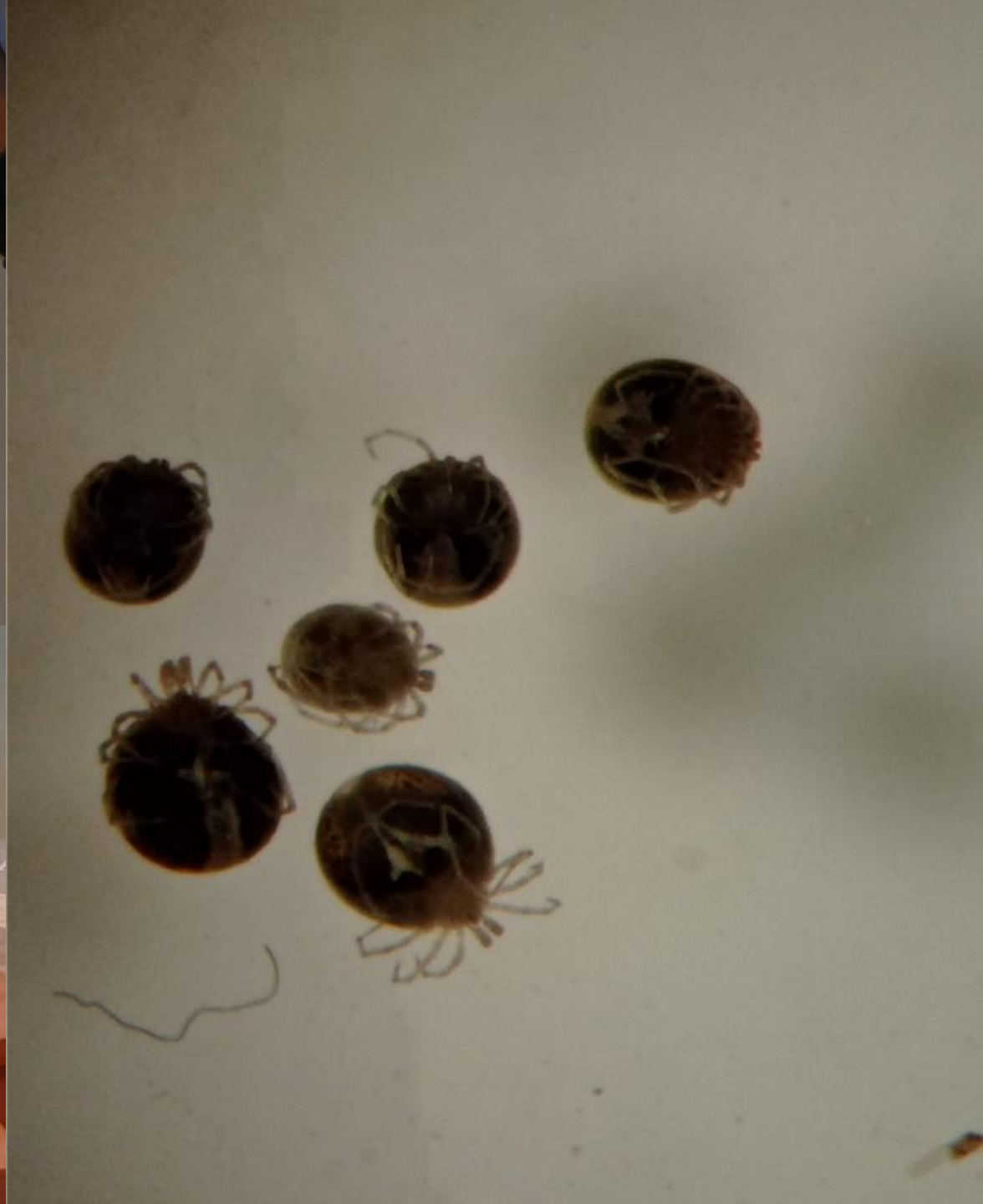
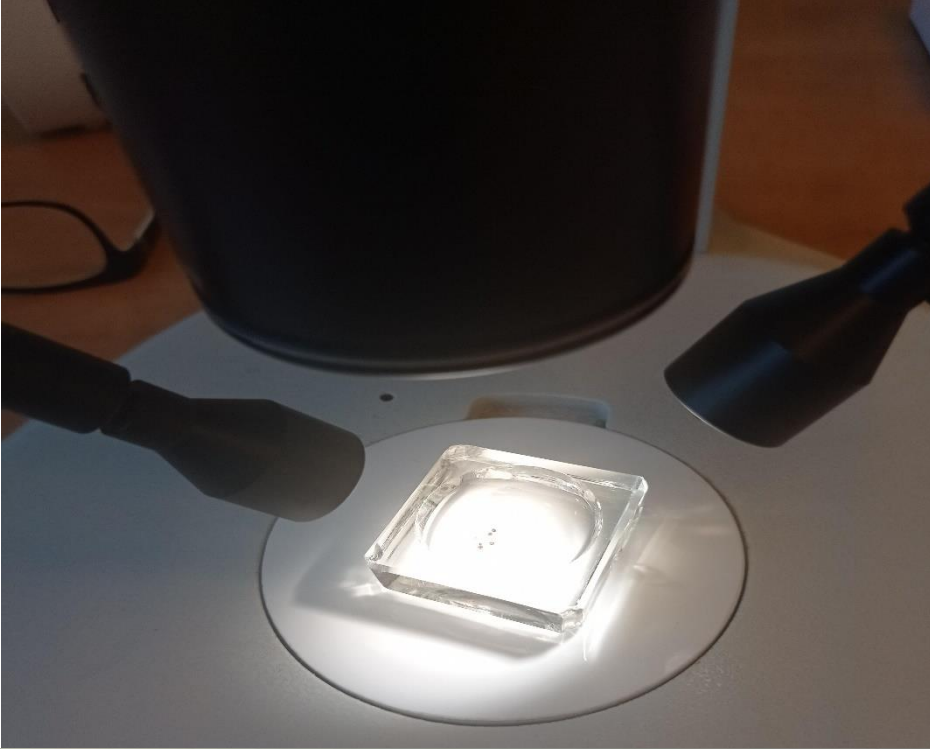
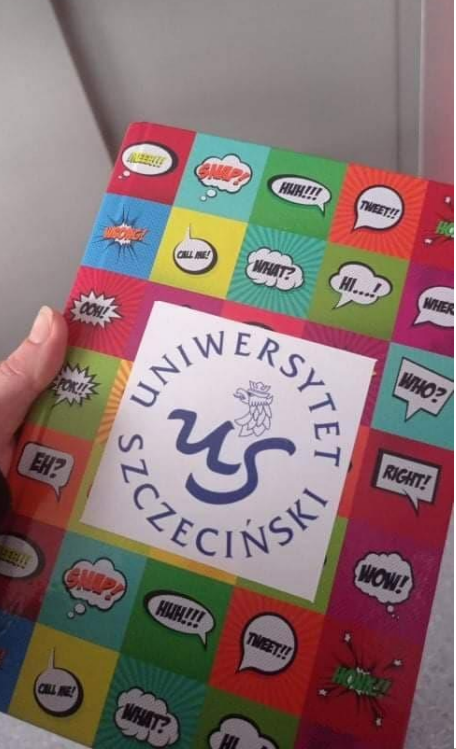
Materiał badawczy

- Rodzina Hygrobatidae należy do jednej z najbardziej zróżnicowanych gatunkowo grup roztoczy żyjących w słodkowodnych siedliskach.
- Obecnie znanych jest około 6000 gatunków wodopójek, a ta liczba stale rośnie.

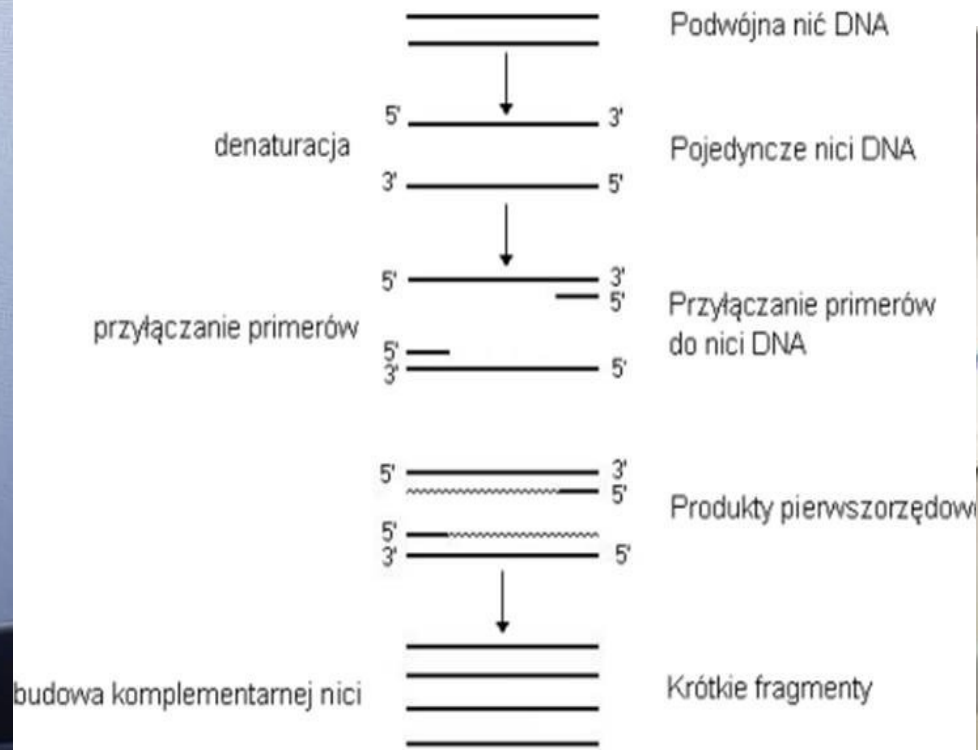


Materiał badawczy pobrany został w siedliskach naturalnych wodopójek. Stanowiska poboru znajdowały się w rzekach z Austrii, Niemiec, Szwajcarii i Włoch.



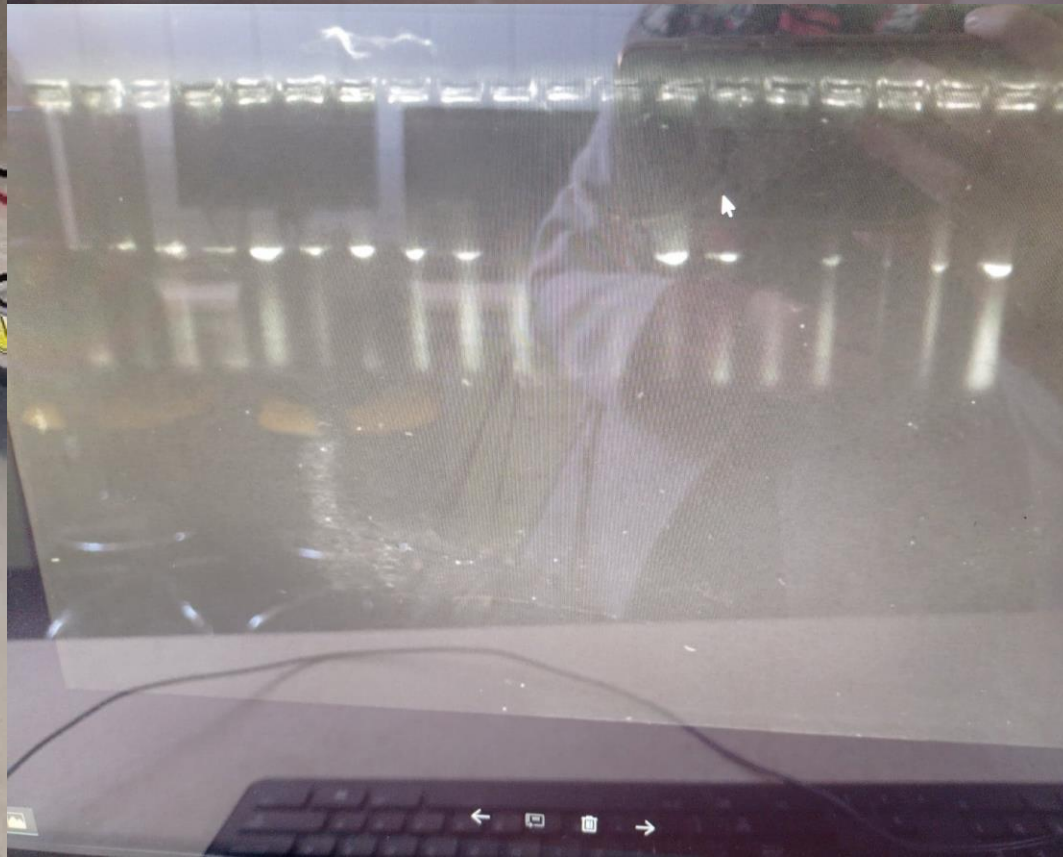
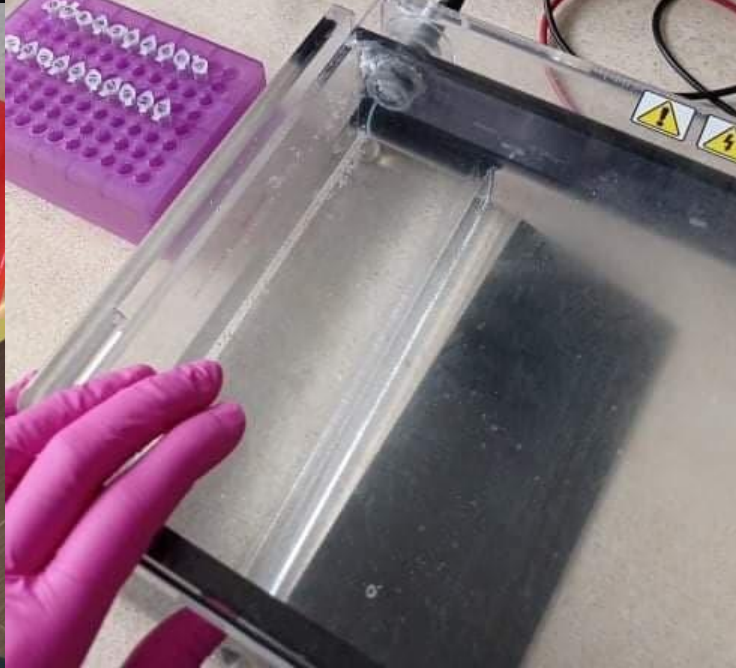


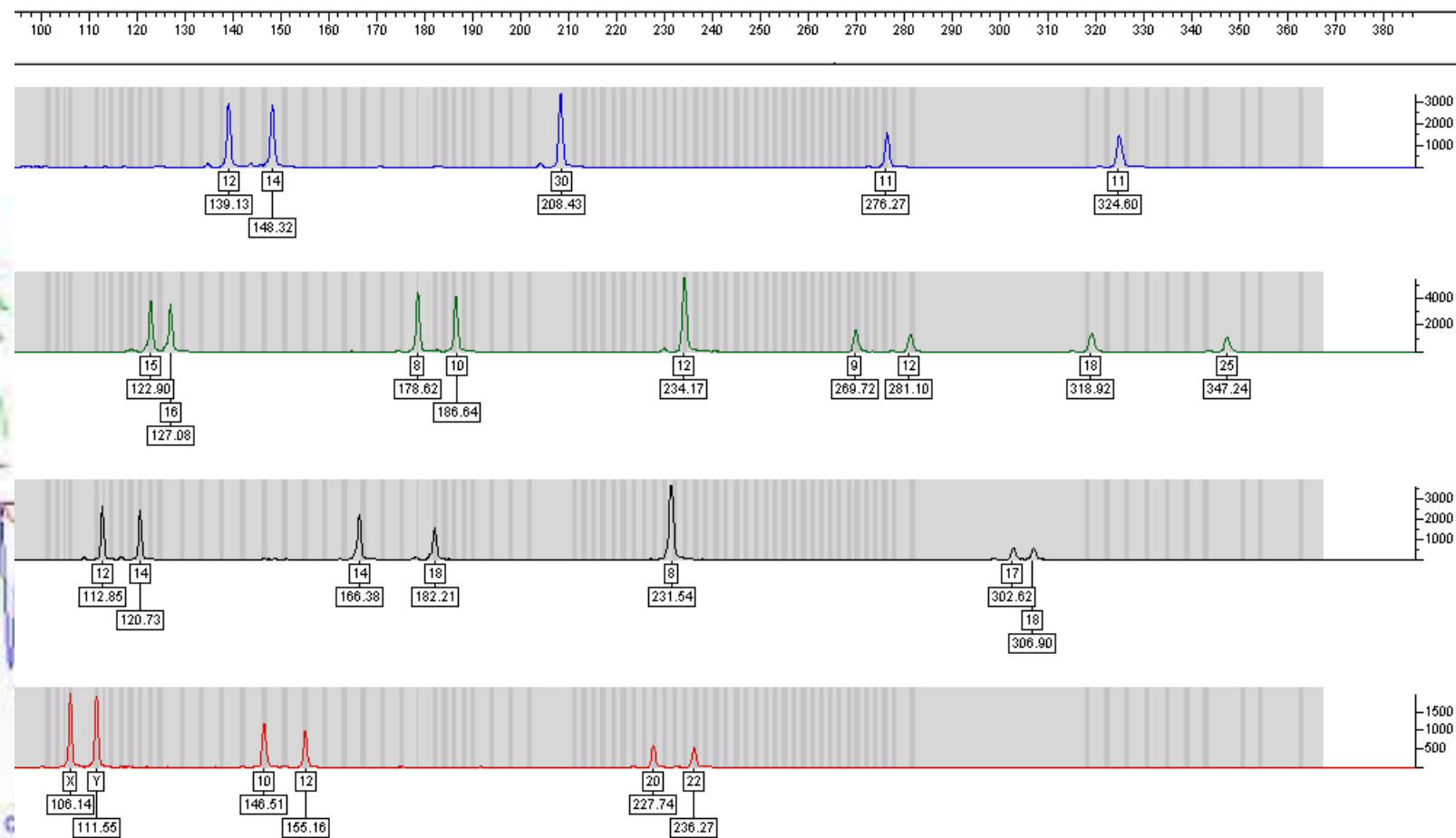
PCR– amplifikacja genu mitochondrialnego COX1



Ryc. Schematyczny model reakcji PCR







Sekwencjonowanie

Analiza bioinformatyczna wykonywana będzie za pomocą programów:

- BLAST
- MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)
- CLUSTAL W
- DNA SP 6, 10, 01







DZIĘKUJĘ

ZA UWAGĘ

