

Prisutnost bakterije Wolbachia sp. u mravima u Hrvatskoj

Ranogajec Blažeka, Sabina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:839598>

Rights / Prava: [In copyright](#)/Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sabina Ranogajec Blažeka

**Prisutnost bakterije *Wolbachia* sp. u
mravima u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Sabina Ranogajec Blažeka

**The presence of bacteria *Wolbachia* sp. in
ants in Croatia**

Master thesis

Zagreb, 2021

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod voditeljstvom doc. dr. sc. Dubravka Pavokovića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentoru dr. sc. Dubravku Pavokoviću, doc., na pruženoj prilici da pod njegovim vodstvom izradim diplomski rad. Zahvalna sam na stručnom vodstvu, uloženom vremenu, savjetima, podršci i optimizmu tijekom izrade ovoga rada!

Zahvaljujem svima koji su sudjelovali u uzorkovanju mrava – učenicama XV. gimnazije Marini Hajdarović i Dori Bedenić, profesorici biologije Mihaeli Marceljak Ilić i dr. sc. Duji Lisičiću, izv. prof.

Dr. sc. Ani Ješovnik zahvaljujem na pomoći oko determinacije mrava, proslijeđenoj literaturi i na savjetima u vezi eksperimenta.

Dr. sc. Nenadu Malenici, doc., zahvaljujem na korisnim savjetima i idejama tijekom rada u laboratoriju te na kritičkom čitanju diplomskog rada.

Svim članovima laboratorija za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju hvala na gostoprimstvu, ugodnoj radnoj atmosferi i pomoći oko sekvencioniranja uzoraka.

Hvala Tihani, Marti, Ani, Vedranu i Tomislavu na prijateljstvu tijekom diplomskog studija.

Hvala mojoj obitelji, a posebno suprugu Damjanu, što su vjerovali u mene u svim izazovnim trenucima.

Veliko hvala svima!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Prisutnost bakterije *Wolbachia* sp. u mravima u Hrvatskoj

Sabina Ranogajec Blažeka

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bakterija *Wolbachia* sp. je najrasprostranjenija endosimbiotska bakterija u životinjskome svijetu. Živi u velikom broju vrsta člankonožaca i oblića kao parazit ili mutualist. Glavni put prijenosa između jedinki domaćina je vertikalni prijenos s majke na potomke, a moguć je i horizontalni prijenos između jedinki. Ove bakterije imaju karakteristične fenotipske učinke na reprodukciju i plodnost domaćina kako bi povećale svoje širenje. U ovom radu istražena je prisutnost bakterije *Wolbachia* sp. u mravima (Hymenoptera, Formicidae) u Republici Hrvatskoj. Metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) na prisutnost bakterije, preko gena *wsp*, testirana su 92 uzorka mrava s 20 lokaliteta u Hrvatskoj. Bakterija je detektirana u uzorcima mrava s područja Svete Nedelje, Osijeka, Korčule, Kleka, Gorskog kotara, Kalnika i Visa. Učestalost infekcije u ukupnom uzorku mrava iz cijele Hrvatske iznosila je 8 %. U mravima iz kontinentalne regije učestalost infekcije bila je 12 %, iz gorsko - kotlinske regije 20 %, a iz primorske regije 4 %. Sekvenciranjem po Sangeru i BLAST analizom PCR produkata dvaju uzoraka pozitivnih na bakteriju potvrđena je 100 % - tna sličnost sa sekvencom gena *wsp* vrste *Wolbachia pipientis*. Zaključeno je da mravi u Hrvatskoj imaju nisku razinu infekcije bakterijom *Wolbachia* sp. te da su mjesta zaraze rijetka i izolirana.

(45 stranica, 20 slika, 10 tablica, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: endosimbiont, reproduktivni parazit, PCR, *wsp*, učestalost infekcije, sekvencioniranje, BLAST

Voditelj: dr. sc. Dubravko Pavoković, doc.

Ocjenitelji: dr. sc. Dubravko Pavoković, doc.
dr. sc. Petar Kružić, izv. prof.
dr. sc. Željka Vidaković Cifrek, prof.

Rad prihvaćen: 15.09.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

The presence of bacteria *Wolbachia* sp. in ants in Croatia

Sabina Ranogajec Blažeka

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Wolbachia sp. is the most widespread endosymbiotic bacteria in the animal kingdom. It lives as a parasite or mutualist in a large number of arthropods and nematodes. Its main transmission route is vertical transmission from mother to offspring, but horizontal transmission is also possible. They have characteristic phenotypic effects on host reproduction and fertility to maximize their spread. In this study, the presence of *Wolbachia* sp. in ants in Croatia was investigated. A total of 92 ant samples from 20 different locations of Croatia were tested by the polymerase chain reaction (PCR) for the presence of the bacterial gene *wsp*. The bacterium was detected in 7 samples originating from Sveta Nedelja, Osijek, Korčula, Klek, Gorski kotar, Kalnik and Vis. The frequency of *Wolbachia* infection in the total sample of analyzed ants was 8%. In the ants from continental, mountainous and coastal region the frequency of infection was 12, 20 and 4 %, respectively. Sanger sequencing and BLAST analysis of PCR products from two samples confirmed the 100 % similarity with the *wsp* gene sequence of the species *Wolbachia pipientis*. It was concluded that the analyzed ants in Croatia have a low level of infection with *Wolbachia* sp. and that sites of infection are rare and isolated.

(45 pages, 20 figures, 10 tables, 57 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: endosymbiont, reproductive parasite, PCR, *wsp*, infection frequency, sequencing, BLAST

Supervisor: dr. Dubravko Pavoković, Asst. Prof.

Reviewers: dr. Dubravko Pavoković, Asst. Prof.
dr. Petar Kružić, Assoc. Prof.
dr. Željka Vidaković-Cifrek, Prof.

Thesis accepted: September 15, 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Simbiotski odnosi mikroba i eukariota.....	1
1.2. Bakterije roda <i>Wolbachia</i> sp.....	2
1.2.1. Fenotipski učinci bakterije na domaćine.....	4
1.2.2. Gen za površinski protein bakterije <i>Wolbachia</i> sp.....	5
1.3. Mravi (Insecta: Hymenoptera: Formicidae).....	6
1.3.1. Mravi kao domaćini bakterije <i>Wolbachia</i> sp.....	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	8
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. Uzorci i područje istraživanja.....	9
3.2. Taksonomsko određivanje uzoraka.....	11
3.3. Izolacija DNA iz mrava.....	11
3.4. Mjerenje koncentracije izolirane DNA.....	12
3.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	12
3.5.1. Gen <i>COI</i>	13
3.5.2. Gen <i>wsp</i>	14
3.6. Elektroforeza.....	16

3.7. Pročišćavanje PCR - produkta.....	16
3.7.1. Pročišćavanje PCR - reakcije s nespecifičnim produktom.....	17
3.8. Sekvencioniranje.....	17
4.8. Bioinformatička analiza sličnosti sekvencija.....	17
4.8.1. BLAST.....	17
4. REZULTATI.....	19
4.1. Kvantitativna analiza uzoraka po geografskim regijama i sistematika	19
4.2. Izolacija DNA.....	22
4.3. Testiranje mrava na bakteriju <i>Wolbachia</i> sp. metodom PCR.....	23
4.4. Rezultati sekvencioniranja.....	29
5. RASPRAVA.....	35
6. ZAKLJUČCI.....	38
7. LITERATURA.....	39
8. ŽIVOTOPIS.....	45

1. UVOD

1.1. Simbiotski odnosi mikroba i eukariota

Prema izvornoj definiciji, simbioza je trajan zajednički život različitih organizama (Oliver i Russel 2016, Werren i sur. 2008) i obuhvaća široki raspon interakcija – od mutualizma (odnos u kojem svi učesnici imaju koristi) preko komenzalizma (jedan organizam ima koristi bez štete po drugog) do parazitizma (jedan organizam ima koristi na štetu drugoga) (Dimijian 2000). U stvarnosti ove tri kategorije postoje kao kontinuum duž kojeg se priroda simbiotskog odnosa zbog promjena životnih okolnosti tijekom evolucije i pojedinačnih organizama može mijenjati od jedne prema drugoj. Također, simbiotska interakcija može istovremeno imati obilježja svih triju kategorija (Werren i sur. 2018). ovisno o uvjetima.

Veliki broj simbiotskih odnosa sastoji se od jednog višestaničnog eukariotskog organizma združenog s jednom ili više vrsta mikroorganizama; bakterija, virusa, eukariotskih mikroorganizama ili arheja, koji često imaju ključnu ulogu u fiziologiji, razvoju, ekologiji i evoluciji eukariota. Neki primjeri takvih odnosa su: biljke i mikorizne gljive, biljke i nitrofikacijske bakterije, životinje i fotosintetske bakterije ili alge, životinje i kemosintetske ili luminiscentne bakterije, simbionti probavila životinja i nasljedni simbionti insekata. (Oliver i Russel 2016).

Veći organizmi u simbiotskom odnosu se obično nazivaju domaćinom, a manji organizmi simbiontima. Ektosimbionti su izvanstanični mikrobi koji koloniziraju površine poput epiderme korijena biljaka, kože sisavaca, egzoskeleta insekata i životinjskih probavila, svaka ih nova generacija domaćina stječe iz okoliša ili preko međusobnog kontakta i imaju ulogu u obrani i probavi. Endosimbionti su specijaliziraniji primjer simbiotskih mikroba koji naseljavaju unutarnja tkiva i stanice, a prenose se vertikalno preko jaja ili sjemenki i mogu opstati unutar nasljedne linije domaćina tisućama ili milijunima godina. Domaćina snabdijevaju nutrijentima i sekundarnim metabolitima za obranu.

Alternativni način prenošenja nasljednih simbionata uključuje manipulaciju reprodukcijских ili razvojnih procesa domaćina na način koji pogoduje transmisiji simbionta te takve primjere nalazimo u biljkama i člankonošcima, ali ne i u kralješnjacima (Oliver i Russel 2016) – u ovu kategoriju spadaju i reproduktivni paraziti, mikrobi karakteristični za člankonošce koji se nasljeđuju preko ženske gametne linije i usmjeravaju reprodukciju

domaćina prema većoj produkciji i preživljavanju zaraženih ženki, a najpoznatiji primjer takvog parazita su bakterije roda *Wolbachia* (Duron i sur. 2008.). Simbiotski odnosi mogu utjecati na adaptaciju, reprodukciju i fitnes (sposobnost opstanka) organizama, specijaciju i izumiranje vrsta te na ekološke sustave. Obligatna i nasljedna simbioza dovodi do procesa evolucije koji se naziva simbiogeneza (Gontier 2016).

1.2. Bakterije roda *Wolbachia*

Bakterije roda *Wolbachia* su najrasprostranjenije endosimbiotske bakterije u životinjskom svijetu. Obitavaju u velikom broju vrsta člankonožaca i nematoda s kojima žive u parazitskom ili mutualističkom odnosu. Prevalencija među vrstama kreće se u rasponu od 20-75 % (Hilgenboecker i sur. 2008). Imaju karakteristične fenotipske učinke na reprodukciju i plodnost domaćina kako bi povećale svoje širenje kroz populacije (Taylor i sur. 2018). Primarno se prenose vertikalno preko ženske gametne linije, no mogući je i horizontalni prijenos s vrste na vrstu preko hemolimfe ili probavila (White i sur. 2017.).

Otkriće ove bakterije 1924. godine bilo je rezultat suradnje dvaju znanstvenika, Samuela Burta Wolbacha i Marshalla Hertiga, u doba koje su obilježila istraživanja vezana za ulogu člankonožaca u transmisiji ljudskih bolesti. Nakon Wolbachovih otkrića da su bakterije rikecije uzročnici pjegave groznice stjenovitog gorja (engl. *Rocky Mountain spotted fever*) koju prenose krpelji, i tifusa, koji prenose buhe, dvoje znanstvenika je udružilo snage kako bi proučavali organizme slične rikecijama iz nekih drugih vrsta insekata. To je dovelo do pronalaska jednog takvog organizma u gonadama komarca *C. pipiens*, čiji će službeni opis roda i vrste objaviti Hertig 1936. godine i nazvati ga *Wolbachia pipientis* u čast svome suradniku (Kozek i Rao 2007).

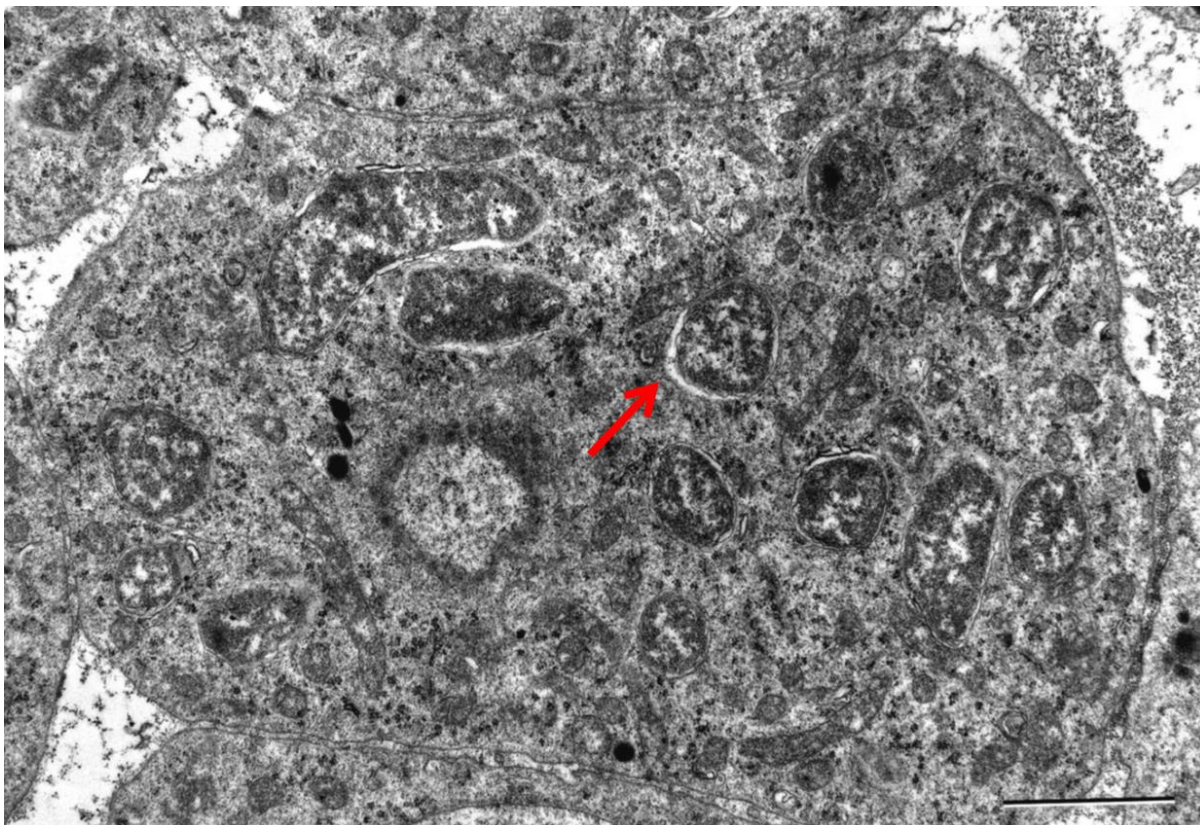
Bakterija *W. pipientis* pripada razredu *Alphaproteobacteria* u koljenu *Proteobacteria* i najbliži poznati srodnici su joj sve bakterije slične rikecijama koje uzrokuju bolesti sisavaca, a prenose ih člankonošci, npr. rodovi *Cowdria* i *Anaplasma*. Rezultati molekularne filogenske analize za rod *Wolbachia* otkrili su postojanje osam glavnih grupa (klada) koje se označavaju slovima od A do H, a u nedostatku formalnih opisa pripadajućih vrsta, nazivaju se supergrupama. Bakterije iz supergrupa C i D nađene su primarno u nematodama, dok su bakterije iz ostalih supergrupa primarno nađene u člankonošcima, kod kojih su A i B najčešće (Casiraghi i sur. 2005, Stouthamer i sur. 1999, Taylor i sur. 2018, Werren i sur. 2008).

Ove gram-negativne bakterije (Slika 1) poprimaju više strukturnih formi – od vrlo malih, nepravilno oblikovanih štapićastih (duljine 0,5 – 1,3 μm) ili sferičnih (promjera 0,25 – 0,5 μm) bakterija do jako velikih bakterija (1 – 1,8 μm) koje sadrže jednu ili više manjih jedinki. Perzistiraju unutar vakuole obavijene trima membranama. Vanjska potječe od domaćina, srednja je stanična stijenka bakterije, a unutarnja je plazma membrana bakterije (Stouthamer i sur. 1999, Serbus i sur. 2008). Iako su primarno lokalizirane u zametnoj liniji domaćina, mogu obitavati i u stanicama i izvanstaničnim prostorima somatskih tkiva, npr. u živčanom sustavu, masnom tijelu i probavilu člankonožaca te u hipodermalnim tetivama nematoda. Distribucija bakterije *Wolbachia* u somatska tkiva najviše je regulirana načinom segregacije u embrionalnom razdoblju, ali postoji i aktivna invazija somatskih tkiva tijekom ontogeneze domaćina (Pietri i sur. 2016).

Neke od potencijalnih evolucijskih posljedica infekcije bakterijama *Wolbachia* su spolna selekcija i promjene u omjeru spolova populacije, gubitak muškog spola zbog partenogeneze, specijacija kao posljedica citoplazmatske inkompatibilnosti i izumiranje zbog smanjenja broja potomaka i genetičke varijabilnosti populacija (Charlat i sur. 2003).

Istražuju se i mogućnosti praktične primjene bakterije *Wolbachia* i njenih svojstava kao alata za poboljšanje korisnih vrsta insekata kroz koinfekciju genetski modificiranog faktora koji se nasljeđuje preko citoplazme (virusa ili simbiotske bakterije) s bakterijom *Wolbachia* pri čemu bi *Wolbachia* bila pokretački faktor za nasljeđivanje, a citoplazmatski faktor bi služio za ekspresiju željenog gena, za suzbijanje populacija štetnih insekata kroz citoplazmatsku inkompatibilnost ili zamjenu štetne populacije s manje štetnom populacijom iste vrste, za ubrzavanje starenja insekata prijenosnika bolesti itd. (Bourtzis 2008, Stouthamer i sur. 1999).

Za detekciju bakterija roda *Wolbachia* koriste se fenotipska ispitivanja i molekularne metode koje su pouzdaniji način. Zbog svoje brzine i dostupnosti, u većini istraživanja koristi se dijagnostička metoda lančane reakcije polimerazom PCR (od engl. *polymerase chain reaction*) s početnicama specifičnima za bakteriju *Wolbachia*. Kod ove metode za potvrdu prisutnosti bakterije potrebno je detektirati PCR - produkt odgovarajuće veličine, a poželjna je i dodatna potvrda na razini sekvencije dobivenog produkta. Ipak, mana ove metode je mogućnost dobivanja lažnih negativnih rezultata koji nastaju zbog nepravilnog vezivanja početnica ili niskog titra bakterije u uzorku (Russell 2012).



Slika 1. Brojne bakterije roda *Wolbachia* u jajnoj stanici vrste oblića *Dirofilaria immitis* (srčani crv). Crvena strelica označava jednu bakterijsku stanicu. Skala = 1 μm (Preuzeto i prilagođeno od Kozek i Rao 2007).

1.2.1. Fenotipski učinci bakterije na domaćine

Najčešći učinak je citoplazmatska inkompatibilnost (CI, od engl. *cytoplasmic incompatibility*), mehanizam kod kojeg se jaja nezaražene ženke ne mogu razviti ako ih oplode spermalne stanice zaraženih mužjaka, a ako su i ženka i mužjak oboje zaraženi mogu proizvesti vijabilne embrije. Citoplazmatska inkompatibilnost je vrsta genskog upravljanja i utječe na strukturu populacije te uzrokuje reproduktivnu izolaciju (Beckmann i sur. 2017).

Indukcija partenogeneze (telitokije) je rjeđi učinak od CI i dosad je dokumentiran samo kod vrsta s haplodiploidnim sustavom određivanja spola, kod kojih se mužjaci razvijaju iz neoplođenih jajašaca i haploidni su, a ženke nastaju iz oplođenih jajašaca i one su diploidne (npr. kod grinja, opnokrilaca i resokrilaca). Partenogeneza u ovome slučaju nastaje zbog poremećaja u staničnome ciklusu tijekom ranog embrionalnog razvoja koji dovodi do duplikacije genetičkog materijala, odnosno do diploidnosti te se iz takvih neoplođenih

jajašaca zaraženih ženki ne razvijaju mužjaci već ženke, koje za razliku od muškog potomstva mogu dalje prenositi bakteriju (Werren i sur. 2008).

Feminizaciju mužjaka ova bakterija može uzrokovati kod izopodnih rakova i insekata. Kod izopoda feminizacija nastaje uslijed proliferacije bakterije u androgenim žlijezdama što dovodi do hipertrofije androgene žlijezde i inhibicije njene funkcije, zbog čega se genetički mužjaci razvijaju kao ženke, a kod insekata feminizacija nastaje zbog uplitanja bakterije u puteve determinacije spola (Vandekerckhove 2003, Werren i sur. 2008).

Neki sojevi bakterija roda *Wolbachia* uzrokuju selektivno ubijanje mužjaka (engl. *male-killing*) tijekom ličinačkog razvoja mehanizmom letalne feminizacije (Kageyama i Traut 2003), a neki sojevi su multipotentni pa tako u nekim vrstama uzrokuju CI, a u drugima ubijanje mužjaka (Werren i sur. 2008). Također, ova bakterija može povećati broj potomaka i pospješiti plodnost inficiranih mužjaka (Stouthamer i sur. 1999). U nametničkim nematodama ima mutualistički učinak i njena je prisutnost potrebna za normalni razvoj mikrofilarija i razmnožavanje zrelih jedinki, a moguće je i da pomažu u izbjegavanju imunološkog odgovora kralješnjaka na nematodne parazite (Taylor i Hoerauf 1999).

1.2.2. Gen za površinski protein bakterije *Wolbachia* sp.

Površinski protein bakterije *Wolbachia* (*wsp*, od engl. *Wolbachia surface protein*) je protein male molekulske mase od oko 22 kDa čija veličina jako varira između različitih sojeva bakterije. Vezan je za vanjsku membranu bakterije. Analiza sekvence gena *wsp* pokazala je da se sastoji od četiri hipervarijabilne regije odvojene konzerviranim regijama. Hipervarijabilne regije imaju veliku stopu genske rekombinacije i evoluiraju brže od drugih gena u genomu (Serbus i sur. 2021). Varijabilnost njegove DNA sekvence je 10 puta veća od varijabilnost sekvence za 16S rRNA te se zbog toga često koristi za filogenetske analize i kao marker za razlikovanje različitih sojeva bakterije (Baldo i sur. 2005, Parvizi i sur. 2013).

1.3. Mravi (Insecta: Hymenoptera: Formicidae)

Mravi pripadaju redu Hymenoptera (opnokrilci) unutar kojeg formiraju zasebnu porodicu Formicidae (mravi). Pojavili su se u ranoj kredi te su zahvaljujući svojoj socijalnoj organizaciji i prilagodljivosti na različite okolišne uvjete kolonizirali gotovo sva kopnena staništa na Zemlji. Autohtonih vrsta mrava nema jedino na Grenlandu, Islandu i Antarktici zbog niskih temperatura koje tamo vladaju (Keller i Gordon 2009). U svijetu je do sada opisano više od 13 870 vrsta mrava (Bolton 2021), a u Hrvatskoj broj opisanih vrsta iznosi 146 (Ješovnik 2020). Iako maleni veličinom, imaju veliki utjecaj na ekosustav – miješaju slojeve tla, obnavljaju ga i obogaćuju mineralnim sastavom, rasprostranjuju sjemenke biljaka, važni su kao predatori i hrana su drugim životinjama (Keller i Gordon 2009). Mnoge vrste mrava žive u simbiozi s biljkama, drugim člankonošcima, gljivama i mikroorganizmima (Schultz 2000).

Mravi su eusocijalni organizmi i žive u zajednicama (kolonijama) u kojima postoji visoko razvijeni sustav kasti. Kaste su grupe specijaliziranih članova kolonije koji obavljaju različite zadaće te sukladno tome imaju i različitu morfologiju. Kasta radnika obavlja većinu svakodnevnih zadataka poput sakupljanja hrane, njege za podmladak, održavanja i obrane gnijezda. U posebnim komorama gnijezda nalaze se jajašca, ličinke i kukuljice mladih mrava. Reproductivne jedinice kolonije su veće i imaju krila, pojavljuju se samo u određeno doba godine, a glavna im je zadaća da odlete i pare se. Kraljica kolonije, koja nastaje od oplodene ženske reproductivne jedinice iz druge kolonije, često je najveći mrav u zajednici i tijelo joj je nabrekli od jajašaca i pričuvnih masnoća. Ona je majka svih ostalih mrava u koloniji i jedina joj je zadaća da polaže jaja. Životni ciklus kolonije može se podijeliti na 3 faze: osnivanje, rast i reprodukcija (Agosti i sur. 2000). Nove kolonije nastaju na dva načina, samostalno – pri čemu oplodene kraljice odlete i same osnivaju kolonije, i nesamostalno – kraljica u pratnji mrava radnika.

U istraživanjima mogu služiti kao modeli za praćenje promjena u okolišu ili kao indikatori bioraznolikosti. Brojni atributi čine ih idealnim modelnim organizmima – velike su raznolikosti, dominantna su vrsta brojčano i biomasom u većini staništa na Zemlji, u taksonomskim bazama su dobro pokriveni, lako se uzorkuju, zbog stacionarnog gniježđenja mogu se višekratno uzorkovati, osjetljivi su na promjene u okolišu i važna su karika u ekosustavu (Agosti i sur. 2000).

1.3.1. Mravi kao domaćini bakterije *Wolbachia* sp.

Bakterija roda *Wolbachia* je najprevalentniji nasljedni simbiot mrava. Detektirana je u 37,8 % vrsta mrava (Russell i sur. 2012) i upravo su mravi skupina insekata najbolje proučena u vezi s ovom bakterijom. Infekcija potječe iz Azije, odakle se proširila na Amerike (Ramalho i Moreau, 2020). Od fenotipskih učinaka koje bakterija *Wolbachia* ima na mrave najčešća je citoplazmatska inkompatibilnost, a osim toga uzrokuje i selektivno ubijanje mužjaka (Van Borm i sur. 2001). Zaražene kolonije vrste *Monomorium pharaonis* imaju veće reproduktivno ulaganje odnosno proizvode više novih kraljica, brže rastu i razmnožavaju se te stoga imaju ubrzani životni ciklus kolonije (Singh i Linksvayer 2020). Kod vrste mrava *Tapinoma melanocephalum* bakterija pridonosi u opskrbi domaćina vitaminom B (Cheng i sur. 2019). Interakcija mrava i ove bakterije posebna je po tome što mravi mogu izgubiti i ponovno steći ovog bakterijskog simbionta tijekom životnog razdoblja i mogu biti nositelji više različitih sojeva bakterije istovremeno (Russell 2012). Infekcija bakterijom *Wolbachia* češća je kod vrsta mrava koje imaju nesamostalni način osnivanja kolonije (Wenseleers i sur. 1998).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja je istražiti prisutnost bakterije *Wolbachia* sp. u mravima Hrvatske metodom PCR, odrediti geografska područja zaraze, izračunati učestalost infekcije mrava za cijelu Hrvatsku te u pojedinim geografskim regijama Hrvatske.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci i područje istraživanja

Uzorci mrava na kojima je provedeno ovo istraživanje sakupljeni su na 20 lokaliteta Hrvatske (Slika 2). Na svakom lokalitetu sakupljen je po jedan ili više uzoraka mrava, a svaki uzorak sadržavao je nekoliko jedinki (Tablica 1). Uzorci mrava su konzervirani u 75% -tnom etanolu i do analize pohranjeni na +4 °C.

Tablica 1. Šifre uzoraka i područje njihova uzorkovanja.

Šifra uzorka	Područje uzorkovanja	Šifra uzorka	Područje uzorkovanja
1. G1	Gradišćak	37. OK51	Korčula, Vela Luka
2. G2	Gradišćak	38. OK52	Korčula, Vela Luka
3. G3	Gradišćak	39. OK21	Korčula, Prižba
4. G4	Gradišćak	40. OK22	Korčula, Prižba
5. G5	Gradišćak	41. OK31	Korčula
6. K2	Kalnik	42. OK32	Korčula
7. K3	Kalnik	43. OK41	Korčula
8. K4	Kalnik	44. OK42	Korčula
9. K5	Kalnik	45. L11	Lastovo, Ubli
10. KK1	Klek	46. L12	Lastovo, Ubli
11. KK2	Klek	47. L22	Lastovo
12. KK3	Klek	48. L31	Lastovo, Špilja
13. KR1	Krndija (Petrov vrh)	49. L32	Lastovo, Špilja
14. KR2	Krndija (Orahovica)	50. L41	Lastovo, Zace
15. OS1	Osijek	51. L42	Lastovo, Zace
16. OS2	Osijek	52. L51	Lastovo
17. OS3	Osijek	53. L52	Lastovo
18. OS4	Osijek	54. MT1	Mljet
19. OS5	Osijek	55. MT2	Mljet
20. SL3	Slatina	56. MT3	Mljet
21. SL4	Slatina	57. LK	Novi Vinodolski
22. SL5	Slatina	58. P1	Pula
23. SL6	Slatina	59. P2	Pula
24. SN1	Sveta Nedelja	60. P3	Pula
25. SN2	Sveta Nedelja	61. P4	Pula
26. SN3	Sveta Nedelja	62. P5	Pula
27. SN4	Sveta Nedelja	63. P6	Pula
28. SN5	Sveta Nedelja	64. RAB1	Rab
29. GK1	Gorski kotar	65. RAB2	Rab
30. GK3	Gorski kotar	66. RAB3	Rab
31. GK4	Gorski kotar	67. RAB4	Rab
32. GK5	Gorski kotar	68. RAB5	Rab
33. PM	Gorski kotar	69. SP1	Split
34. KJ	Kicljeva jama	70. SP2	Split
35. VR	Vrbovsko	71. SP3	Split
36. BR	Bribir	72. SP4	Split

Tablica 1. Šifre uzoraka i područje njihova uzorkovanja (*nastavak s prethodne stranice*).

Šifra uzorka	Područje uzorkovanja	Šifra uzorka	Područje uzorkovanja
73. SP5	Split	83. M10	Split (Marjan)
74. M1	Split (Marjan)	84. V1	Vis (Biševo)
75. M2	Split (Marjan)	85. V2	Vis (Komiža)
76. M3	Split (Marjan)	86. KA1	Vis (Komiža)
77. M4	Split (Marjan)	87. KA2	Vis (Komiža)
78. M5	Split (Marjan)	88. KA3	Vis (Komiža)
79. M6	Split (Marjan)	89. KA4	Vis (Komiža)
80. M7	Split (Marjan)	90. KA5	Vis (Komiža)
81. M8	Split (Marjan)	91. TE1	Vis (Tepluš)
82. M9	Split (Marjan)	92. V3	Vis (Stončica)



Slika 2. Lokaliteti uzorkovanja mrava. 1- Gradišćak, 2 – Kalnik, 3 – Sveta Nedelja, 4 – Slatina, 5 – Krndija, 6 – Osijek, 7 – Gorski kotar, 8 – Kicljeva jama, 9 – Vrbovsko, 10 – Klek, 11 – Bribir, 12 – Novi Vinodolski, 13 – Pula, 14 – Rab, 15 – Split, 16 – Marjan, 17 – Vis, 18 – Korčula, 19 – Lastovo, 20 – Mljet. Uzorci s pojedinih lokaliteta popisani su u Tablici 1.

Lokaliteti uzorkovanja svrstani su u tri geografske regije Hrvatske - kontinentalna regija, gorsko - kotlinska regija i primorska regija te su uzorci raspodijeljeni prema tim regijama (Tablica 2). Najveći broj uzoraka sakupljen je u primorskoj regiji - 57 uzoraka, zatim slijedi kontinentalna regija s 25 uzoraka te potom gorsko-kotlinska regija s 10 uzoraka.

Tablica 2. Podjela uzoraka po geografskim regijama Hrvatske.

Kontinentalna regija		Gorsko - kotlinska regija	Primorska regija			
G1	OS4	KJ	BR	L42	RAB3	M8
G2	OS5	KK1	OK51	L51	RAB4	M9
G3	SL3	KK2	OK52	L52	RAB5	M10
G4	SL4	KK3	OK21	MT1	SP1	V1
G5	SL5	GK1	OK22	MT2	SP2	V3
K2	SL6	GK3	OK31	MT3	SP3	KA1
K3	SN1	GK4	OK32	LK	SP4	KA2
K4	SN2	GK5	OK41	P1	SP5	KA3
K5	SN3	PM	OK42	P2	M1	KA4
KR1	SN4	VR	L11	P3	M2	KA5
KR2	SN5		L12	P4	M3	TE1
OS1			L22	P5	M4	V2
OS2			L31	P6	M5	
OS3			L32	RAB1	M6	
			L41	RAB2	M7	

3.2. Taksonomsko određivanje mrava

Jedinke mrava (Hymenoptera: Formicidae) iz svakog uzorka determinirane su pod lupom na temelju vanjskog izgleda i pomoću nekoliko determinacijskih ključeva (Bolton 2021, Bračko 2006, Seifert 2018).

3.3. Izolacija DNA iz mrava

Za izolaciju ukupne DNA iz mrava korišten je komercijalni komplet reagensa DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Njemačka). Ovisno o veličini mrava, kao jedan uzorak uzete su 1-2 jedinke mrava iz pojedine epice s uzorkom. Mravi su pomoću pincete prebačeni u čisti

tarionik i ostavljeni da se osuše od etanola 15 min na sobnoj temperaturi. Pomoću tučka i tarionika tkivo mrava je homogenizirano u 180 µl pufera ATL. Homogenat je prebačen u označenu plastičnu epruvetu (Eppendorf, Njemačka) od 1,5 ml i dodano joj je 20 µl proteinaze K. Uslijedili su miješanje i inkubacija od 2 sata u termobloku (Eppendorf 2045) na 56 °C i uz 300 okretaja po minuti (rpm). Tijekom inkubacije uzorci su vorteksirani još 3 puta, svakih pola sata, a po završetku inkubacije vorteksirani su 15 sekundi. U sljedećem koraku dodano je 200 µl pufera AL, uzorci su snažno vorteksirani i inkubirani 10 min na 56 °C uz 300 rpm. Uzorcima je potom dodano 200 µl 96%-tnog etanola i ponovno su vorteksirani. Smjesa je pipetom prebačena u DNeasy kolonu. Kolone su centrifugirane u centrifugi marke Hermle Labortechnik (Njemačka) 1 min na 6000 rcf (od eng. *relative centrifugal force*), na sobnoj temperaturi. U svim sljedećim koracima centrifugiralo se također na sobnoj temperaturi. Kolekcijske su epruvete s nastalim eluatom bačene, a kolone su smještene u nove epruvete. U kolone je dodano 500 µl pufera AW1 i centrifugirane su 1 min na 6000 rcf. Ponovno su kolone smještene u nove mikroeprevete. Dodano je 500 µl pufera AW2, kolone su centrifugirane 3 min na 20 000 rcf i zatim su smještene u označene epruvete od 1,5 mL. DNA je eluirana dodavanjem 200 µl pufera AE na sredinu membrane kolone. Uzorci su inkubirani 1 min na sobnoj temperaturi i na kraju centrifugirani 1 min na 6000 rcf. Izolirana DNA pohranjena je na -20 °C do daljnjih analiza.

3.4. Mjerenje koncentracije izolirane DNA

Koncentracija izolirane DNA određena spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoDrop ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, SAD). Mjerenje je standardizirano s 2 µl pufera AE (elucijski pufer) iz kompleta za izolaciju DNA. Volumen mjerenih uzoraka bio je 2 µl. Tijekom mjerenja uzorci su držani na ledu.

3.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Metodom lančane reakcije polimerazom (*polimerase chain reaction*, PCR) svi su uzorci prvo testirani na gen za podjedinicu citokrom c oksidaze 1 (*COI*) radi provjere kvalitete izolirane DNA uzoraka, a zatim na gen od interesa - *wsp* (od engl. *Wolbachia surface protein*). PCR se obavljao pomoću uređaja T100 Thermal Cycler (BioRad Laboratories, SAD). Tijekom pripreme PCR reakcija svi reagensi i uzorci DNA držani su na ledu. Početnice

su prije dodavanja kratko vorteksirane i centrifugirane na mini centrifugi. Prije dodavanja u reakcijsku smjesu uzorci DNA promiješani su laganim lupkanjem prsta po epruveti i zatim centrifugirani na mini centrifugi. Prije stavljanja u uređaj za PCR, pripremljene reakcije su također centrifugirane na mini centrifugi. PCR testiranje napravljeno je u više navrata po 28 (gen *COI*) ili 8 (gen *wsp*) reakcija, a prilikom svakog testiranja korištena je negativna kontrola (reakcija s dH₂O umjesto DNA uzorka). Po završetku PCR reakcije uzorci su odmah korišteni za gel elektroforezu.

3.5.1. Gen *COI*

Protokol za umnažanje gena *COI* preuzet je od Ješovnik i sur. (2017.). Umnažanje se provodilo u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 15 µl koja je sadržavala: 7,5 µl komercijalne smjese OneTaq Quick-Load 2x Master Mix (New England Biolabs, SAD) koja sadrži Taq i Deep VentR (TM) polimerazu, slobodne dNTP, MgCl₂, pufer, stabilizatore i dva bojila za vizualizaciju na gelu; Xylene Cyanol FF i Tartrazine, 0,3 µl 10µM specifičnih početnica (Tablica 3), 2 µl genomske DNA i dH₂O do 15 µl. Sastav PCR reakcije naveden je u Tablici 4, a korišteni program za umnažanje gena *COI* u Tablici 5.

Tablica 3. Početnice korištene za umnažanje gena *COI* i njihove temperature taljenja (T_m).

Početnica	Sekvencija (5' - 3')	T _m (°C)
Jerry	CAACATTTATTTTGATTTTTTGG	58,9
Ben 2	GCTACTACATAATAKGTATCATG	52,0

Tablica 4. Sastav PCR reakcije za umnažanje gena *COI*.

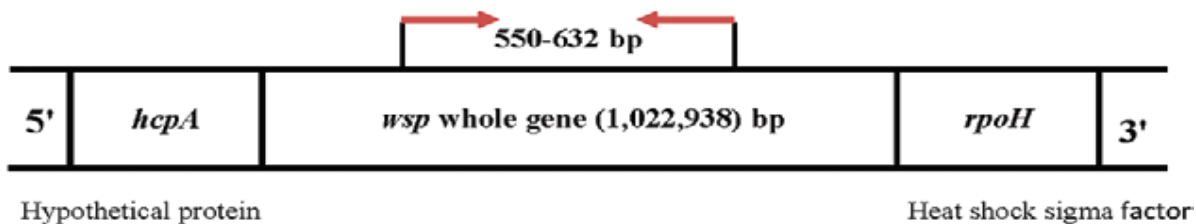
Komponenta	Volumen u reakciji (μl)	Konačna koncentracija
OneTaq Quick - Load 2x Master Mix	7,5	1x
Početnica Jerry (10 μM)	0,3	0,2 μM
Početnica Ben 2 (10 μM)	0,3	0,2 μM
dH ₂ O	4,9	
DNA	2	
Ukupno	15	

Tablica 5. PCR program za umnažanje gena *COI*.

Korak PCR - a	Temperatura i trajanje	
Predeaturacija	94 °C, 2 min	
Denaturacija	94 °C, 1 min	34 x
Prianjanje početnica	49 °C, 1 min	
Elongacija (sinteza)	72 °C, 1 min	
Završna elongacija (sinteza)	72 °C, 5 min	

3.5.2. Gen *wsp*

Detekcija prisutnosti bakterije *Wolbachia* sp. napravljena je pomoću seta početnica koje su nespecifične za soj bakterije, a specifične su za rod i umnažaju fragment gena *wsp* veličine od 550 – 632 pb. (Slika 3, Parvizi i sur. 2013). Protokol za umnažanje gena *wsp* preuzet je od Zha i sur. (2014), a provodio se u volumenu reakcijske smjese od 25 μl koja se sastojala od 12,5 μl komercijalne smjese OneTaq Quick-Load 2x Master Mix, 2,5 μl 2 μM početnica i dH₂O (Tablice 6 i 7). PCR program za umnažanje gena *wsp* prikazan je u Tablici 8.



Slika 3. Fragment gena za površinski protein bakterije *Wolbachia* sp. (*wsp*) koji se umnaža pomoću seta početnica 81F i 691R nespecifičnih za vrstu bakterije (preuzeto od Parvizi i sur. 2013)

Tablica 6. Početnice korištene za umnažanje gena *wsp* i njihove temperature taljenja (T_m).

Početnica	Sekvenca (5' - 3')	T_m (°C)
wsp - 81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	57,6
wsp - 691R	AAAAATTAAACGCTACTC CA	49,1

Tablica 7. Sastav PCR reakcije za umnažanje gena *wsp*.

Komponenta	Volumen u reakciji (μ l)	Konačna koncentracija
OneTaq Quick - Load 2x Master Mix	12,5	1x
Početnica wsp - 81F (2 μ M)	2,5	0,2 μ M
Početnica wsp - 691R (2 μ M)	2,5	0,2 μ M
dH ₂ O	5,5	
DNA	2	
Ukupno	25	

Tablica 8. PCR program za umnažanje gena *wsp*.

Korak PCR-a	Temperatura i trajanje	
Predenaturacija	94 °C, 4 min	
Denaturacija	94 °C, 40 s	30 x
Prianjanje početnica	55 °C, 40 s	
Elongacija (sinteza)	72 °C, 1 min	
Završna elongacija (sinteza)	72 °C, 10 min	

3.6. Elektroforeza

Za provjeru PCR - reakcija korišten je 1 % - tni agarozni gel pripremljen otapanjem 0,4 g agaroze (Sigma, Njemačka) u 40 ml 1 x TAE pufera uz zagrijavanje i povremeno miješanje. Nakon hlađenja na oko 50 °C u gel je dodano 2,3 µl boje GelStar Nucleic Acid Gel Stain koncentracije 10 000 x (Lonza, Švicarska). Gel je prebačen u kalup za pripremu gela i zatim se polimerizirao 20 min na sobnoj temperaturi prekriven aluminijskom folijom. Nakon toga gel je postavljen u kadnicu za elektroforezu (Embi Tec) s 1 x TAE puferom tako da gel bude uronjen do 0,5 cm ispod površine. U prvu jažicu gela nanoseno je po 0,5 µl biljega za određivanje molekularne mase 1 kb Plus DNA Ladder (New England BioLabs Inc., SAD). U preostale jažice nanoseno je po 25 µl PCR - reakcije. Elektroforeza je provedena pri naponu od 100 V kroz 20 do 30 min, odnosno dok boja nije došla do 1 cm od donjeg dijela gela. Po završetku elektroforeze gel je vizualiziran na UV-transiluminatoru (UVITEC) i fotografiran ugrađenom kamerom.

3.7. Pročišćavanje PCR - produkta

PCR - produkti pročišćeni su pomoću komercijalnog seta reagensa GeneJET Genomic DNA Purification Kit tvrtke Thermo Fisher Scientific (SAD). Najprije je u gotovu PCR - smjesu dodano 25 µl pufera BB (engl. *Binding Buffer*). Volumen dodanog pufera BB i PCR - smjese trebaju biti u omjeru 1:1. Smjesa je zatim dobro promiješana uvlačenjem pipetom nekoliko puta. Otopina je prebačena u GeneJET kolonu za pročišćavanje i centrifugirana 1 min na 14 000 rcf (od engl. *relative centrifugal force*). Nastali eluat je izbačen i dodano je 700 µl pufera za ispiranje (engl. *Wash Buffer*) te je uslijedilo centrifugiranje 1 min na 14 000 rcf.

Nakon izbacivanja eluata centrifugirana je prazna kolona 1 min na 14 000 rcf. Kolona je premještena u čistu epruvetu od 1,5 ml. Na kraju je dodano 30 µl elucijskog pufera (engl. *Elution Buffer*) na sredinu kolone. Kolona je ostavljena na inkubaciji 1 min na sobnoj temperaturi nakon čega je centrifugirana 1 min na 14 000 rcf.

3.7.1. Pročišćavanje PCR - reakcije s nespecifičnim produktom

Za uzorke koji su sadržavali i nespecifične PCR - produkte (više DNA signala na gelu) napravljena je gel elektroforeza (kao na str. 16) te je PCR - produkt od interesa izrezan iz gela i prebačen u prethodno izvaganu epruvetu od 1,5 ml. Masa komadića gela dobivena je oduzimanjem mase epruvete od zajedničke mase epruvete i komadića gela. U epruvetu je dodan onoliki volumen pufera BB (µl) koji po iznosu odgovara vrijednosti mase komadića gela sa željenim PCR - produktom (mg). Epruveta je zagrijavana u termobloku na 45 °C i uz 500 rpm sve dok se gel nije potpuno otopio. Nakon otapanja smjesa je dobro promiješana uvlačenjem gore - dolje pomoću pipete. Uslijedili su koraci kao što je prethodno opisano.

3.8. Sekvencioniranje

PCR - reakcije uzoraka kod kojih je dobiven željeni produkt poslani su na određivanje slijeda DNA u tvrtku Macrogen (Amsterdam, Nizozemska). Poslano je po 20 µl gotovih i prethodno pročišćenih PCR - smjesa i 30 µL početnice *wsp* - 81F.

4.8. Bioinformatička analiza sličnosti sekvencija

4.8.1. BLAST

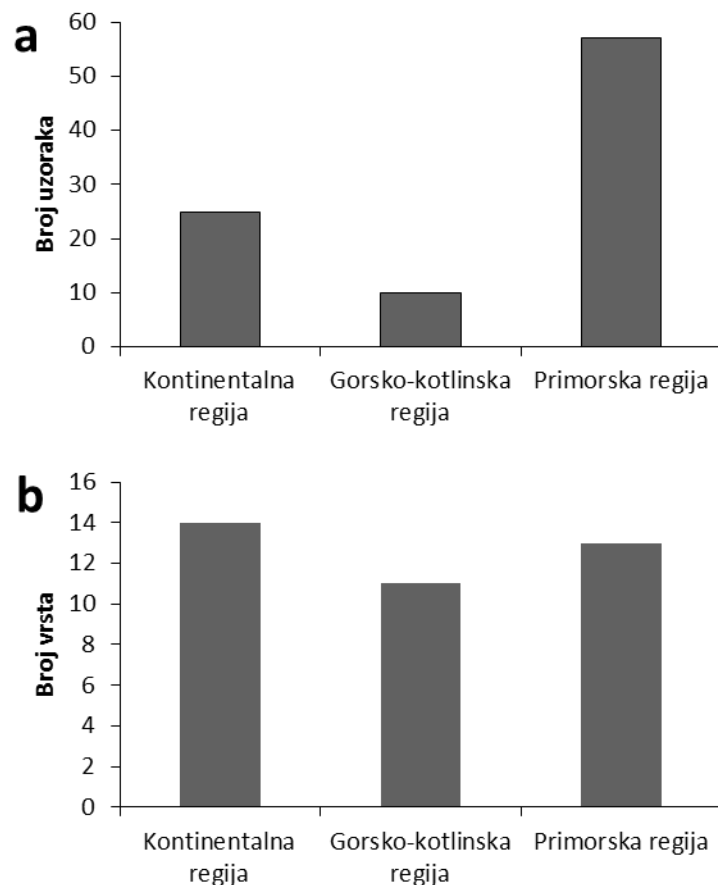
BLAST (od engl. *basic local alignment search tool*) je bioinformatički alat koji služi za usporedbu nukleotidnih ili proteinskih sekvencija s nekom određenom sekvencijom ili sekvencijama iz baze podataka uz računanje statističke značajnosti sparenih homologa. Algoritam BLAST identificira homologne sekvencije tako da pronalazi kratka mjesta podudarnosti dviju sekvencija te od njih započinje lokalna poravnavanja. Radi procjene sličnosti sekvencija PCR - produkata gena *wsp* sa sekvencijama iz baze sekvencija je kopirana u sučelje te je napravljeno pretraživanje „blastn“ na poveznici:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (11.8.2021.) (McGinnis i Madden 2004).

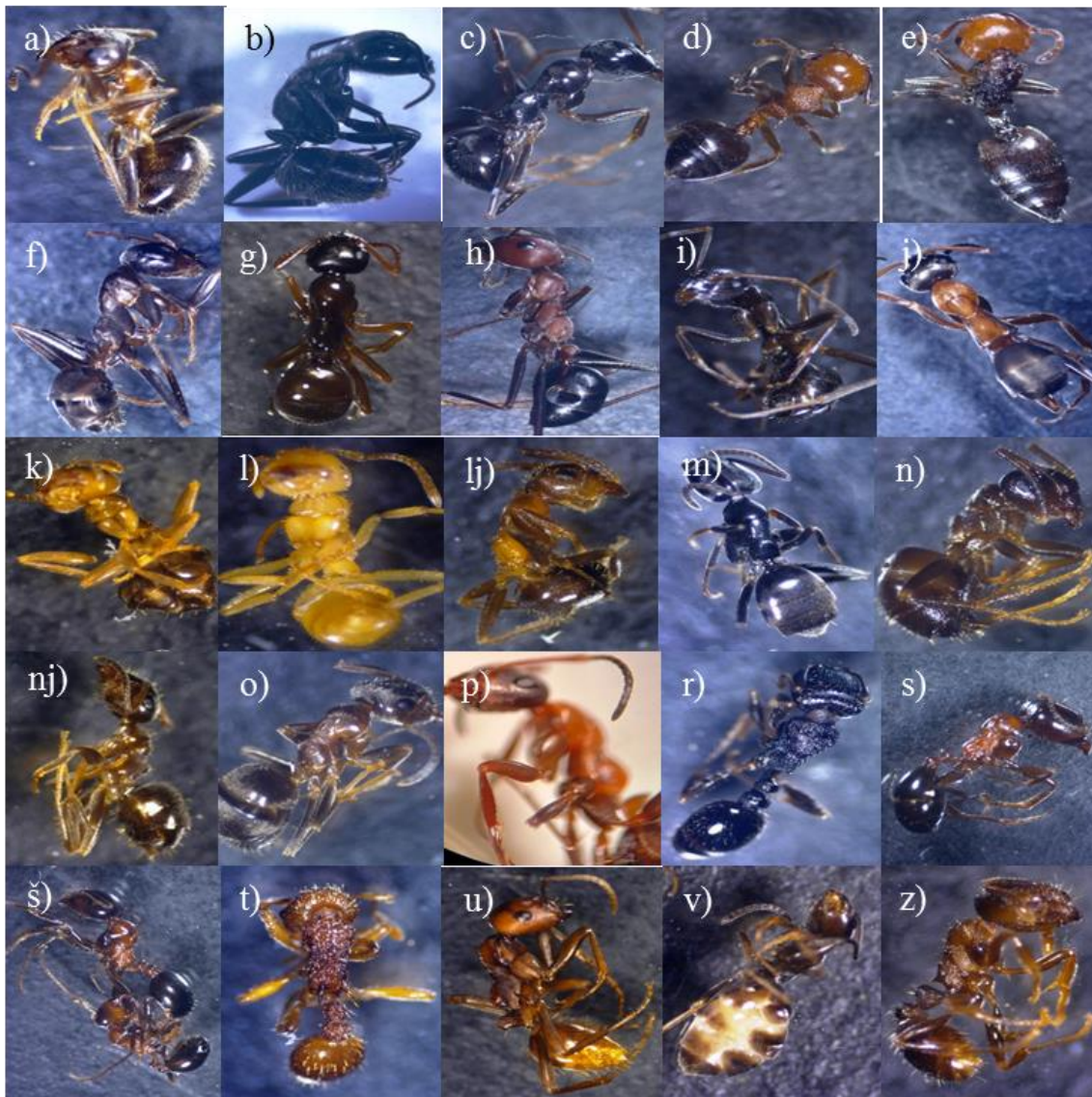
4. REZULTATI

4.1. Kvantitativna analiza uzoraka po geografskim regijama i sistematika

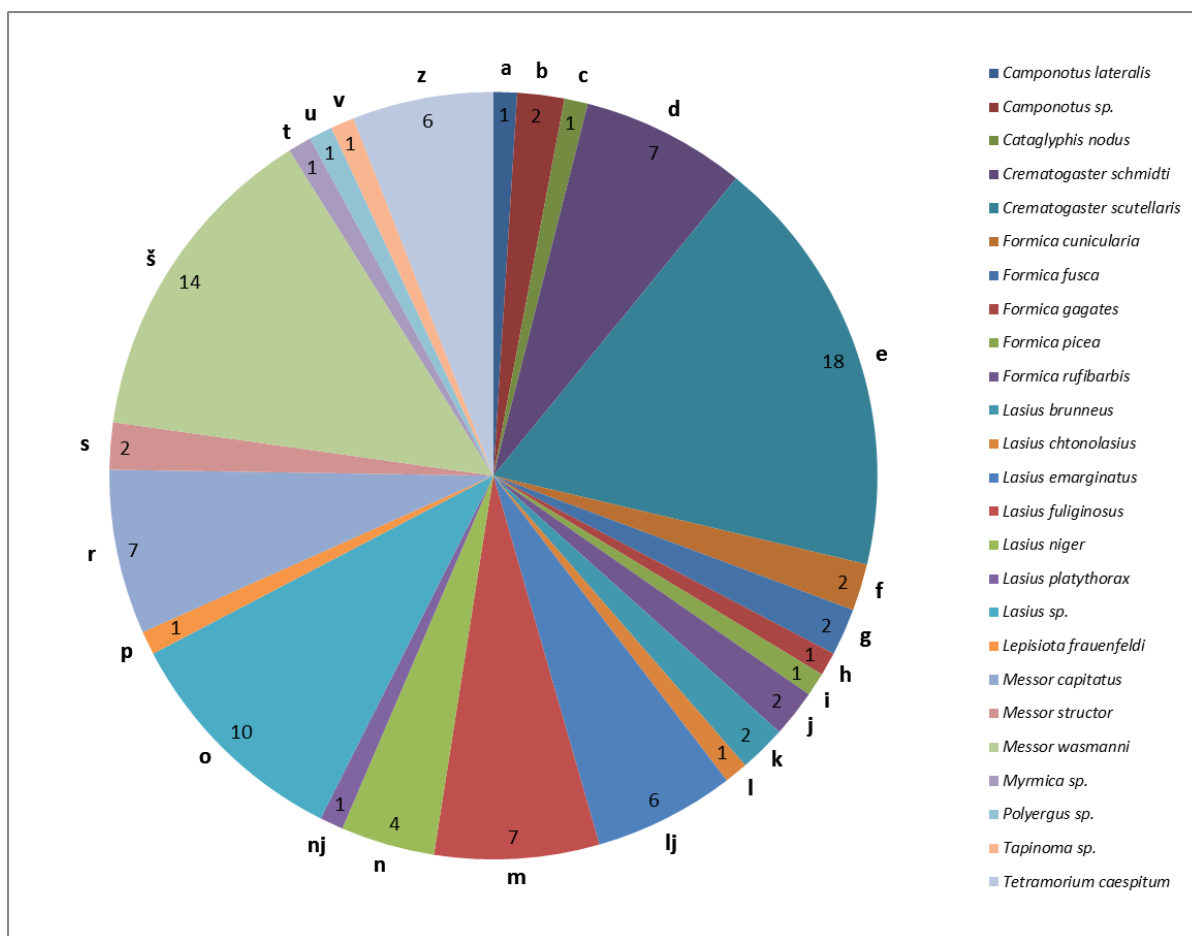
Determinacijom mrava iz ukupnog uzorka istraživanja koji se sastojao od 92 uzorka mrava uzetih sa 20 lokaliteta pronađeno je 25 različitih vrsta mrava. Najviše uzoraka sakupljeno je u primorskoj regiji (Slika 4, a), a najbrojniji vrstama bili su uzorci kontinentalne Hrvatske (Slika 4, b). Sve vrste prisutne u uzorcima prikazane su na Slici 5 te je za svaku vrstu navedeno u kojim je sve uzorcima nađena. Uzorci koji su determinirani samo do roda broje se kao različita vrsta budući da se nisu mogli svrstati među neku od drugih determiniranih vrsta. Najčešće vrste bile su *Crematogaster scutellaris* (19 uzoraka) i *Messor wasmanni* (14 uzoraka), dok se vrste *Tapinoma* sp., *Lasius platythorax*, *Formica picea*, *Formica gagates*, *Polyergus* sp., *Myrmica* sp., *Cataglyphis nodus*, *Lepisiota frauenfeldi* i *Camponotus lateralis* pojavljuju samo jednom (Slika 6).



Slika 4. a) Broj uzoraka po geografskoj regiji istraživanja; b) broj vrsta mrava po geografskoj regiji.



Slika 5. Reprezentativni primjerci vrsta mrava prisutnih u ukupnom uzorku istraživanja. Pojedina vrsta je nađena na jednom ili na više lokaliteta; a) *Camponotus lateralis* – Marjan (M9); b) *Camponotus* sp. Krndija (KR2), Novi Vinodolski (LK); c) *Cataglyphis nodus* – Gorski kotar (PM); d) *Crematogaster schmidti* – Korčula (OK52, OK21, OK42), Lastovo (L41), Mljet (MT2, MT3), Rab (RAB5); e) *Crematogaster scutellaris* – Bribir (BR), Korčula (OK31), Lastovo (L12, L31, L51), Rab (RAB1, RAB2, RAB3, RAB4), Split (SP1, SP2, SP4), Marjan (M1, M2, M3, M5, M8), Vis (V4); f) *Formica cunicularia* – Klek (KK2), Gorski kotar (GK1); g) *Formica fusca* – Gorski kotar (GK3), Gradišćak (G3); h) *Formica gagates* – Kalnik (K4); i) *Formica picea* – Kalnik (K2); j) *Formica rufibarbis* – Osijek (OS1, OS4); k) *Lasius brunneus* – Klek (KK2), Marjan (M9); l) *Lasius chthonolasius* – Sveta Nedelja (SN3); lj) *Lasius emarginatus* – Gradišćak (G4), Kalnik (K3), Krndija (KR1), Vrbovsko (VR), Marjan (M6), Vis (KA5); m) *Lasius fuliginosus* – Gorski kotar (GK1), Kicljeva jama (KJ), Klek (KK1), Osijek (OS3), Sveta Nedelja (SN4, SN5); n) *Lasius niger* – Gorski kotar (GK4, GK5), Slatina (SL4, SL5); nj) *Lasius platythorax* – Gradišćak (G5); o) *Lasius* sp. – Gradišćak (G2), Kalnik (K2, K4, K5), Slatina (SL3), Sveta Nedelja (SN3), Split (SP5), Marjan (M7); p) *Lepisiota frauenfeldi* – Split (SP3); r) *Messor capitatus* – Lastovo (L32), Marjan (M10), Osijek (OS5), Pula (P1, P2, P3, P6); s) *Messor structor* – Marjan (M4), Vis (KA2); š) *Messor wasmanni* – Korčula (OK51, OK22, OK32, OK41), Lastovo (L11, L42, L52), Mljet (MT1), Pula (P4, P5), Vis (V3, KA1, KA3, KA4); t) *Myrmica* sp. – Slatina (SL6); u) *Polyergus* sp. – Klek (KK2); v) *Tapinoma* sp. – Gradišćak (G1); z) *Tetramorium caespitum* – Klek (KK2, KK3), Osijek (OS2), Sveta Nedelja (SN2), Vis (V1).



Slika 6. Broj uzoraka u kojima se pojedina vrsta pojavljuje. a – *Camponotus lateralis*, b – *Camponotus sp.*, c – *Cataglyphis nodus*, d – *Crematogaster schmidti*, e – *Crematogaster scutellaris*, f – *Formica cunicularia*, g – *Formica fusca*, h – *Formica gagates*, i – *Formica picea*, j – *Formica rufibarbis*, k – *Lasius brunneus*, l – *Lasius chtonolasius*, lj – *Lasius emarginatus*, m – *Lasius fuliginosus*, n – *Lasius niger*, nj – *Lasius platythorax*, o – *Lasius sp.*, p – *Lepisiota frauenfeldi*, r – *Messor capitatus*, s – *Messor structor*, š – *Messor wasmanni*, t – *Myrmica sp.*, u – *Polyergus sp.*, v – *Tapinoma sp.*, z – *Tetramorium caespitum*.

4.2 Izolacija DNA

Izolacija DNA iz uzoraka mrava izvedena je pomoću DNeasy Blood and Tissue Kit-a od studenog 2020. do veljače 2021. godine i napravljen je jedan eluat za svaki uzorak. Koncentracije DNA nakon izolacije prikazane su u Tablici 9.

Tablica 9. Koncentracije ukupne izolirane DNA uzoraka mrava izmjerene spektrofotometrom.

Broj uzorka	Šifra uzorka	Koncentracija (ng/μl)	Broj uzorka	Šifra uzorka	Koncentracija (ng/μl)
1	G2	19,0	48	M6	19,6
2	KK1	22,0	49	M7	20,7
3	RAB1	24,5	50	M8	32,4
4	L52	23,5	51	M9	23,9
5	PM	21,5	52	P4	10,8
6	GK1	23,0	53	K4	10,3
7	SP1	22,0	54	K5	17,2
8	M1	35,5	55	OS3	25,7
9	SN1	14,1	56	SP5	30,4
10	G1	12,5	57	KA4	30,5
11	SL3	17,8	58	M10	19,3
12	KA1	31,2	59	KA5	27,4
13	P1	13,1	60	OS5	23,0
14	P2	29,9	61	SL5	43,0
15	RAB2	28,5	62	OS4	24,2
16	OS1	18,6	63	MT2	26,2
17	SP2	21,8	64	MT1	59,8
18	SN2	14,5	65	KR2	20,6
19	M2	25,0	66	KR1	26,7
20	OK52	22,2	67	MT3	31,1
21	K2	14,4	68	BR	29,2
22	KK2	22,8	69	VR	34,8
23	SL6	17,1	70	LK	44,1
24	RAB3	22,7	71	V1	13,5
25	SP3	11,9	72	V2	21,0
26	GK3	16,2	73	V3	32,6
27	M3	32,1	74	KJ	34,1
28	SN3	19,9	75	OK41	33,6
29	KK3	14,6	76	OK42	25,7
30	K3	19,4	77	L31	28,1
31	OS2	19,6	78	L32	24,6
32	G3	36,4	79	P6	26,5
33	SL4	12,4	80	V4	21,9

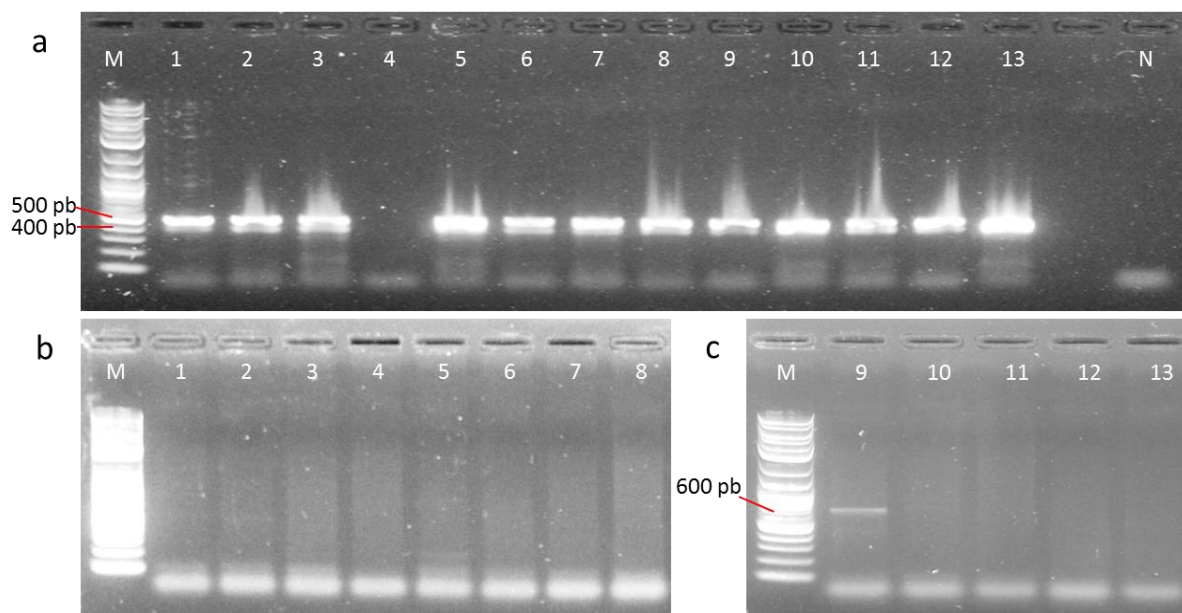
Tablica 9. Koncentracije ukupne izolirane DNA uzoraka mrava izmjerene spektrofotometrom (nastavak s prethodne stranice).

Broj uzorka	Šifra uzorka	Koncentracija (ng/μl)	Broj uzorka	Šifra uzorka	Koncentracija (ng/μl)
34	RAB4	30,7	81	L41	21,7
35	SN4	35,7	82	L12	12,5
36	SN5	34,4	83	OK21	31,0
37	GK4	18,1	84	L42	28,5
38	SP4	19,5	85	OK22	25,1
39	M4	21,8	86	L11	30,7
40	M5	25,1	87	OK31	28,2
41	KA2	30,9	88	OK51	27,2
42	KA3	12,9	89	L22	19,2
43	RAB5	28,5	90	OK32	31,1
44	G4	27,2	91	L51	24,6
45	G5	21,6	92	P5	18,8
46	P3	14,8			
47	GK5	24,6			

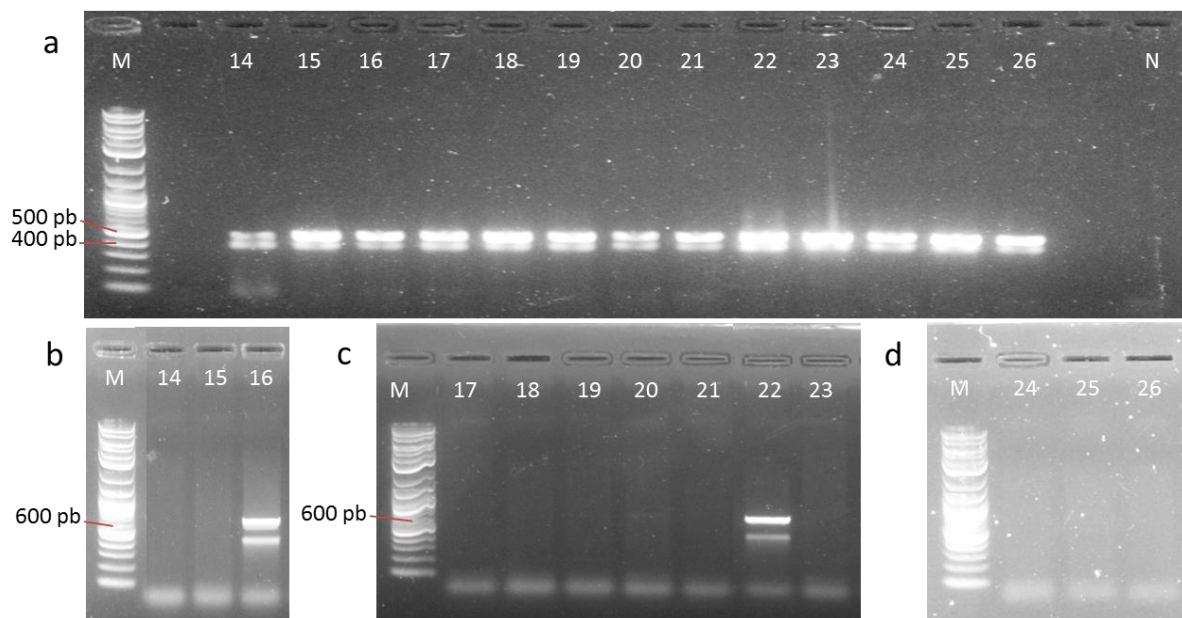
Za uspješnu PCR reakciju u reakcijskom volumenu od 50 μl količina DNA kalupa za genomsku DNA treba biti u rasponu 1 ng do 1 μg (New England Biolabs, SAD). Kriterij potrebne koncentracije DNA zadovoljili su svi uzorci.

4.3 Testiranje mrava na bakteriju *Wolbachia* sp. metodom PCR

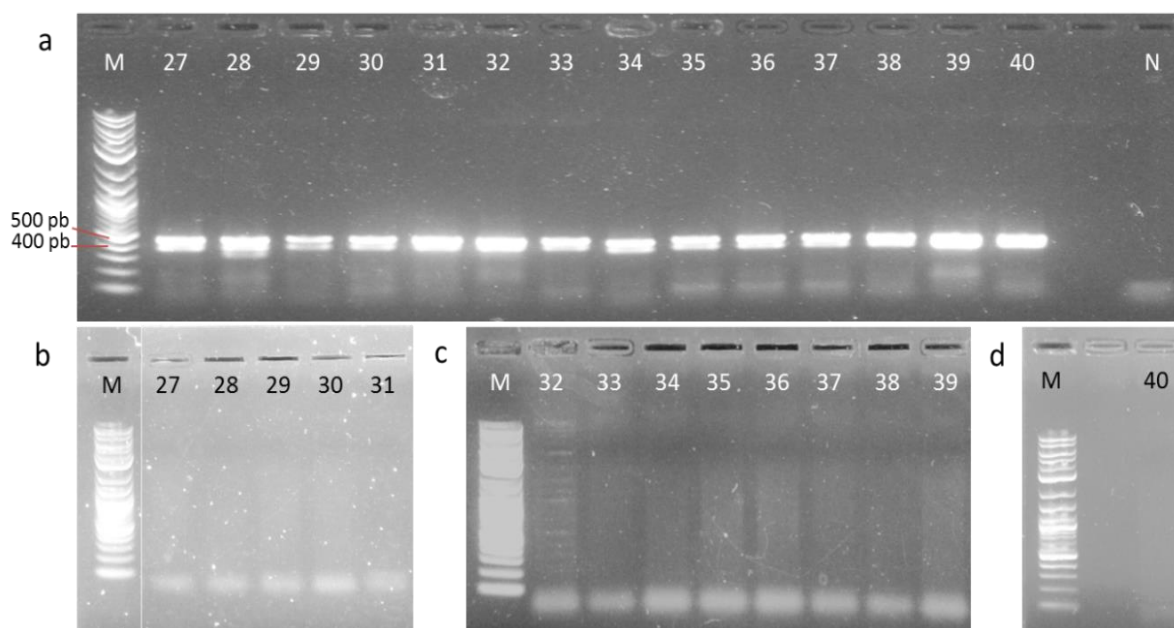
Testiranju uzoraka mrava na bakteriju *Wolbachia* sp. prethodila je kontrola kvalitete i čistoće DNA kalupa uzoraka radi eliminacije potencijalnih lažno negativnih rezultata. U tu svrhu umnožen je gen za podjedinicu 1 citokrom oksidaze (*COI*) veličine oko 400 pb. Potom su uzorci testirani na gen za površinski protein bakterije *Wolbachia* sp. (*wsp*). Usporedni prikaz rezultata kontrole kvalitete uzoraka i testiranja na bakteriju prikazani su na Slikama 7-13. Željeni PCR - produkt gena *wsp* veličine oko 600 pb dobiven je u 7 uzoraka – uzorak broj 9 (Slika 7, c), uzorak broj 16 (Slika 8, b), uzorak broj 20 (Slika 8, c), uzorak broj 22 (Slika 8, c), uzorak broj 47 (Slika 10, b), uzorak broj 53 (Slika 10, c) i uzorak broj 71 (Slika 12, c). Kod uzoraka 16, 22 i 47 osim željenog produkta od 600 pb nastao je i nespecifičan produkt od oko 400 pb. Zbog tehničkih poteškoća u tri uzorka gen *COI* je uspješno umnožen tek iz drugog pokušaja (Slika 14) pa su time svi uzorci zadovoljili kontrolu kvalitete DNA kalupa.



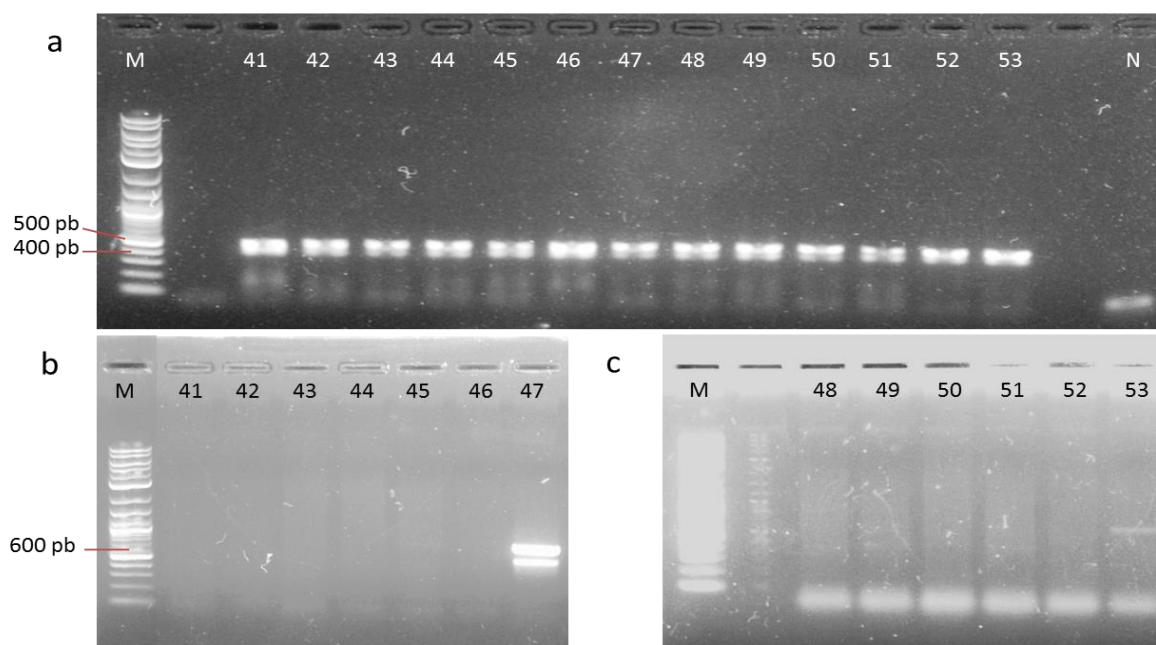
Slika 7. Elektroforeza na 1 % - tnom agaroznom gelu nakon umnažanja gena *COI* s početnicama Jerry i Ben 2 (a) i gena *wsp* s početnicama *wsp* - 81F i *wsp* - 691R (b i c) metodom PCR. Brojevi kojima su označene jažice odgovaraju uzorcima iz Tablice 1. (M) korišteni biljeg: DNA ljestve 100 - 1000 pb. (N) negativna kontrola.



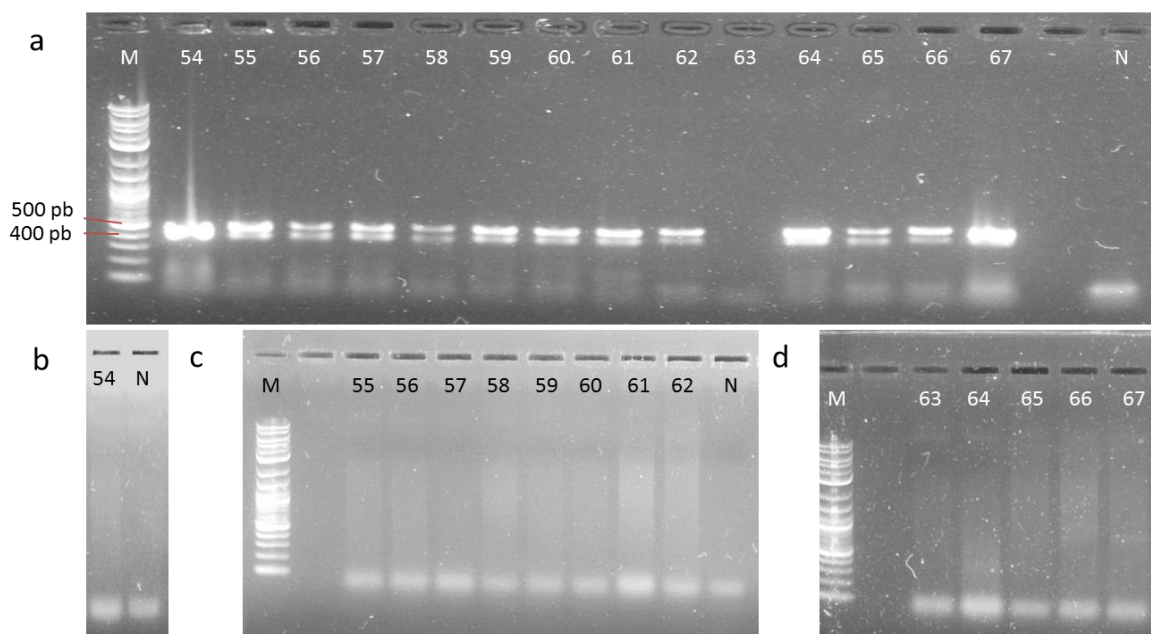
Slika 8. Elektroforeza na 1 % - tnom agaroznom gelu nakon umnažanja gena *COI* s početnicama Jerry i Ben 2 (a) i gena *wsp* s početnicama *wsp* - 81F i *wsp* - 691R (b, c i d) metodom PCR. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na uzorke u Tablici 1. (M) korišteni biljeg: DNA ljestve 100 - 1000 pb. (N) negativna kontrola.



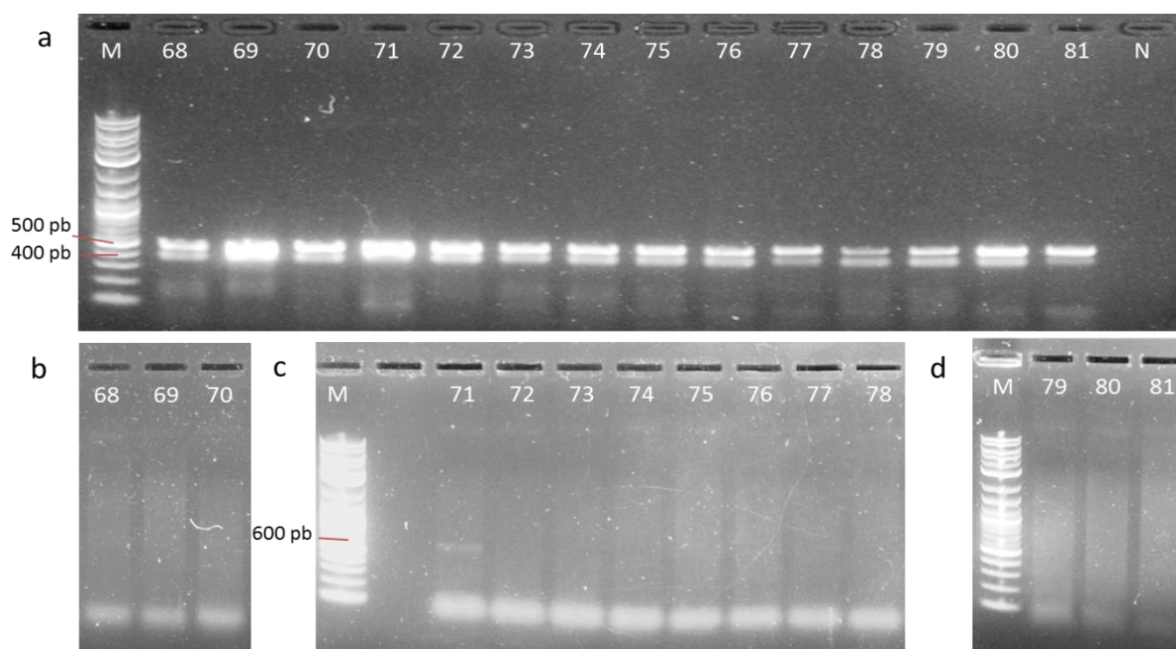
Slika 9. Elektroforeza na 1 % - tnom agaroznom gelu nakon umnažanja gena *COI* s početnicama Jerry i Ben 2 (a) i gena *wsp* s početnicama *wsp* - 81F i *wsp* - 691R (b, c i d) metodom PCR. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na uzorke u Tablici 1. (M) korišteni biljeg: DNA ljestve 100 - 1000 pb. (N) negativna kontrola.



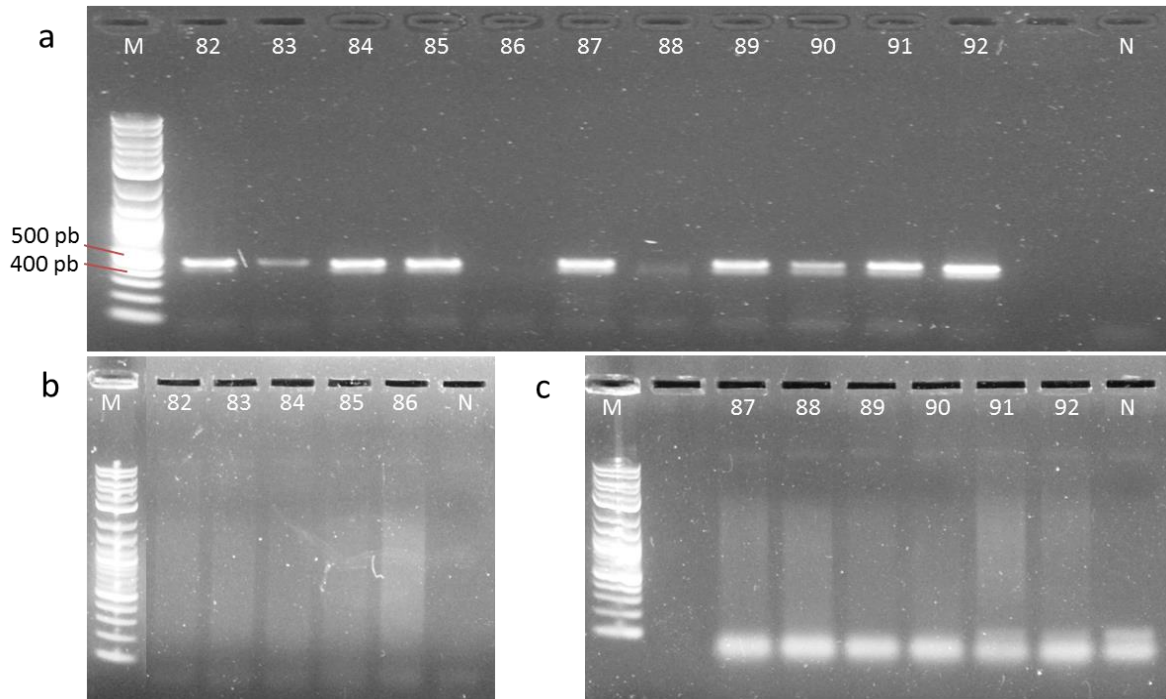
Slika 10. Elektroforeza na 1 % - tnom agaroznom gelu nakon umnažanja gena *COI* s početnicama Jerry i Ben 2 (a) i gena *wsp* s početnicama *wsp* - 81F i *wsp* - 691R (b i c) metodom PCR. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na uzorke u Tablici 1. (M) korišteni biljeg: DNA ljestve 100 - 1000 pb. (N) negativna kontrola.



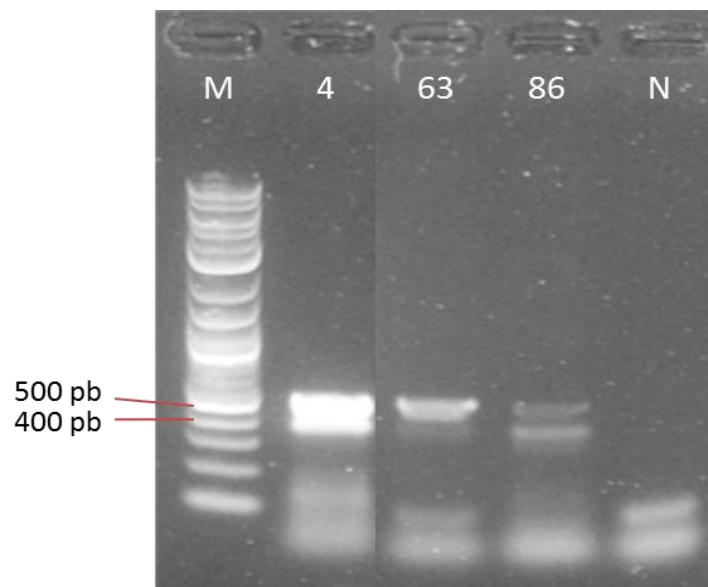
Slika 11. Elektroforeza na 1 % - tnom agaroznom gelu nakon umnažanja gena *COI* s početnicama Jerry i Ben 2 (a) i gena *wsp* s početnicama *wsp* - 81F i *wsp* - 691R (b, c i d) metodom PCR. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na podatke u Tablici 1. (M) korišteni biljeg: DNA ljestve 100 - 1000 pb. (N) negativna kontrola.



Slika 12. Elektroforeza na 1 % - tnom agaroznom gelu nakon umnažanja gena *COI* s početnicama Jerry i Ben 2 (a) i gena *wsp* s početnicama *wsp* - 81F i *wsp* - 691R (b i c) metodom PCR. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na uzorke u Tablici 1. (M) korišteni biljeg: DNA ljestve 100 - 1000 pb. (N) negativna kontrola.



Slika 13. Elektroforeza na 1 % - tnom agaroznom gelu nakon umnažanja gena *COI* s početnicama Jerry i Ben 2 (a) i gena *wsp* s početnicama *wsp* - 81F i *wsp* - 691R (b i c) metodom PCR. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na uzorke u Tablici 1. (M) korišteni biljeg: DNA ljestve 100 - 1000 pb. (N) negativna kontrola.



Slika 14. Ponovljena elektroforeza na 1 % - tnom agaroznom gelu nakon umnažanja gena *COI* s početnicama Jerry i Ben 2 za uzorke 4, 63 i 86. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na uzorke u Tablici 1. (M) korišteni biljeg: DNA ljestve 100 - 1000 pb. (N) negativna kontrola.

Uzorci kod kojih je detektirana bakterija *Wolbachia* sp. pridruženi su svojim lokalitetima uzorkovanja (Tablica 1 i 9). To su uzorci SN1 (br. 9) iz Svete Nedjelje, OS1 (br. 16) iz Osijeka, OK52 (br. 20) iz Korčule, KK2 (br. 22) sa Kleka, GK5 (br. 47) iz Gorskog kotara, K4 (br. 53) s Kalnika i V1 (br. 71) sa Visa. Lokaliteti zaraženih mrava prikazani su na Slici 15. U najvećem broju uzoraka zaraženi mravi bili su roda *Lasius* (SN1, KK2, GK5 i K4).

Na temelju rezultata PCR-a izračunata je učestalost infekcije po geografskim regijama Hrvatske te učestalost infekcije u ukupnom uzorku mrava iz cijele Hrvatske. U uzorku mrava iz kontinentalne regije učestalost infekcije bila je 12 %, u uzorku iz gorsko - kotlinske regije 20 %, a u uzorku iz primorske regije 4 %. Učestalost infekcije u ukupnom uzorku mrava iz cijele Hrvatske bila je 8 % (Tablica 10).



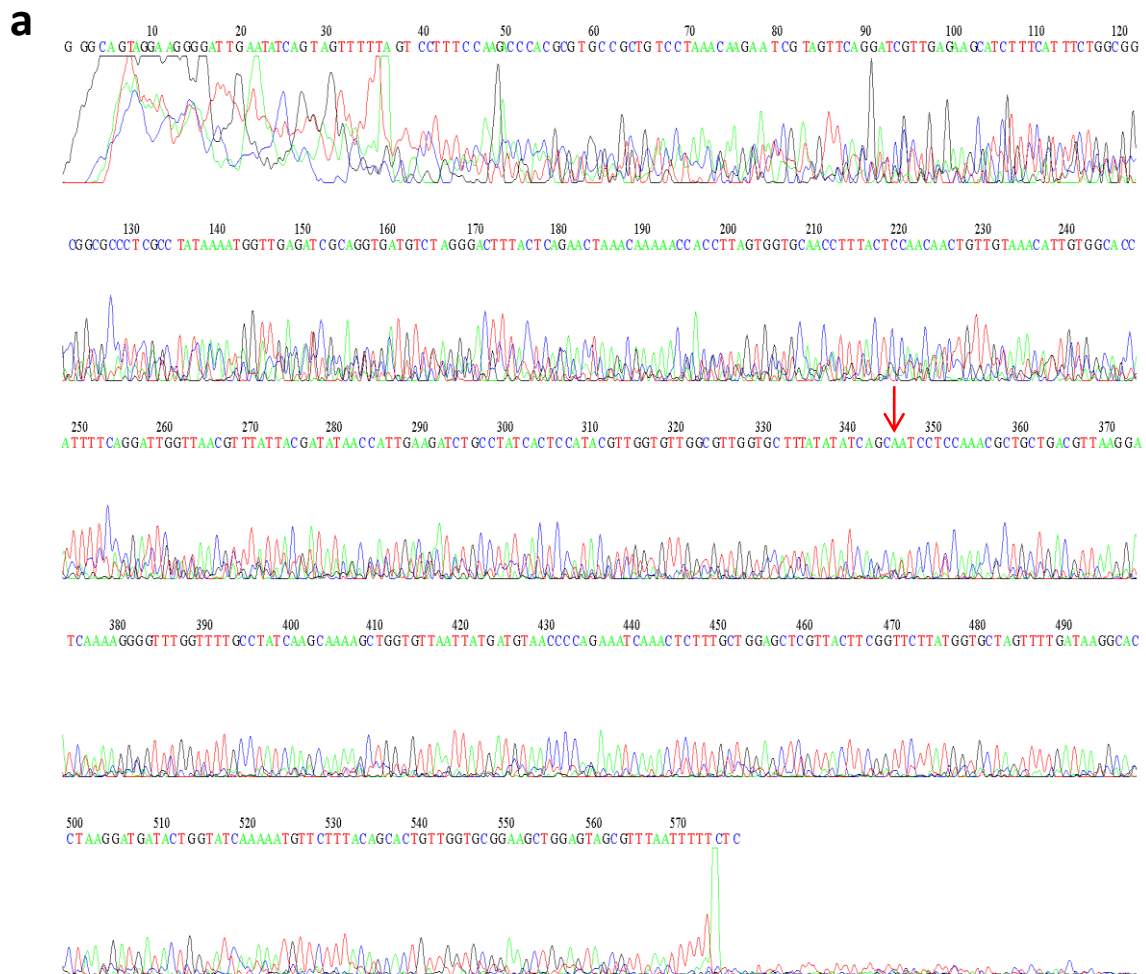
Slika 15. Lokaliteti na kojima su pronađeni mravi zaraženi bakterijom *Wolbachia* sp.

Tablica 10. Učestalost infekcije mrava bakterijom *Wolbachia* sp. po geografskim regijama Hrvatske i u ukupnom uzorku na temelju PCR analize.

	Kontinentalna regija	Gorsko - kotlinska regija	Primorska regija	Ukupni uzorak
Broj zaraženih mrava	3	2	2	7
Broj ispitanih mrava	25	10	57	92
Učestalost zaraženih mrava	12 %	20 %	4 %	8 %

4.4 Rezultati sekvencioniranja

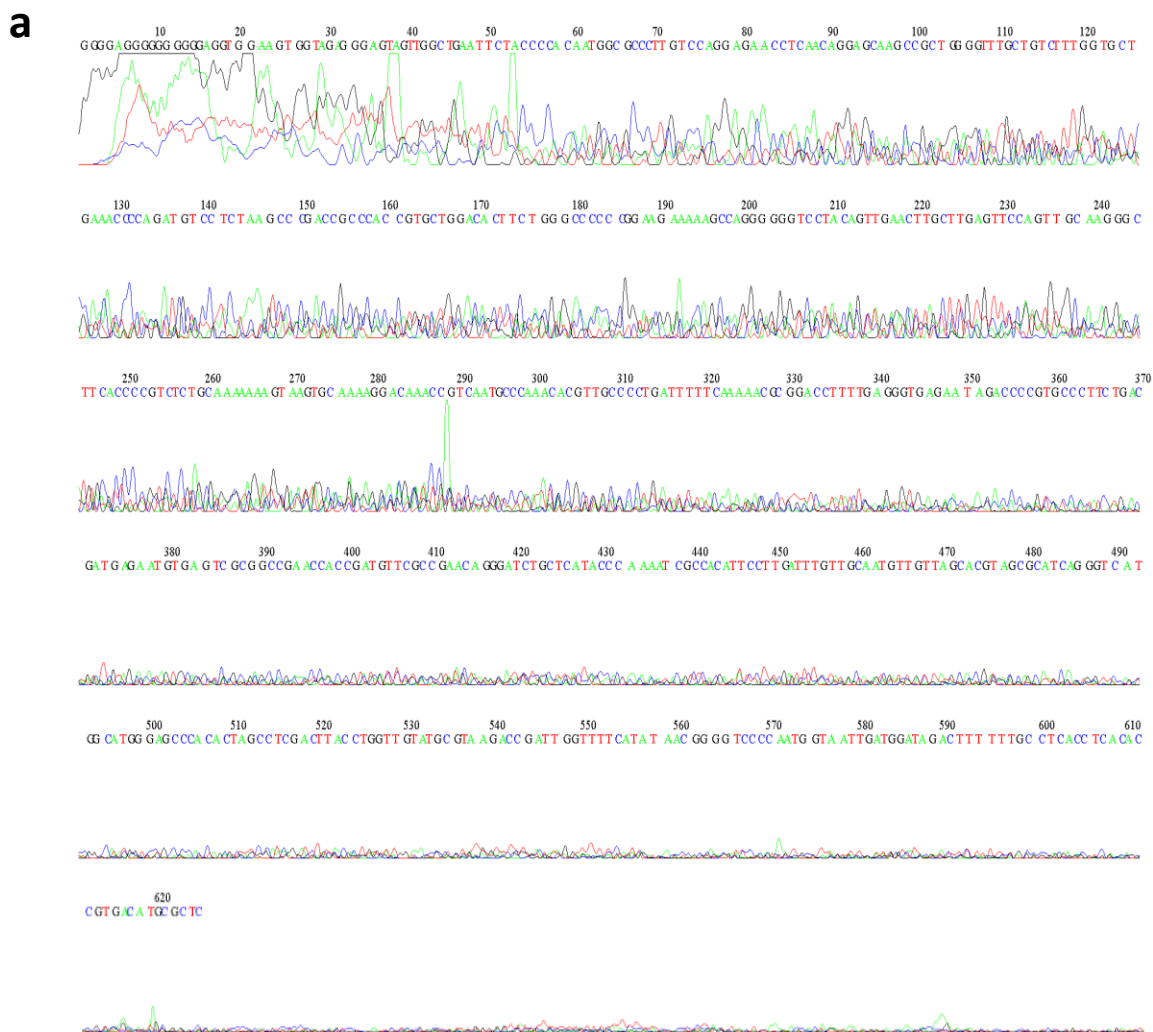
Da bi se potvrdila specifičnost dobivenih fragmenata, pročišćeni PCR-produkti odabranih uzoraka kod kojih je detektiran bakterijski gen *wsp*, sekvencionirani su metodom po Sangeru (Macrogen, Nizozemska). Kromatogrami i programske postavke sekvencija o redoslijedu baza prikazane su na Slikama 16-20. Zbog velike količine pozadinskog šuma i loše rezolucije na kromatogramu uzorka SN1 (Slika 16) za BLAST analizu korišten je dio sekvence od nukleotida broj 346, a dio koji mu prethodi je izostavljen. Analiza je pokazala 99,04 % - tnu sličnost (engl. *percentage identity*) s genom *wsp* izolata vrste *Wolbachia pipientis*. E vrijednost poravnavanja (engl. *E-value*) bila je jednaka $6e-100$. Za E vrijednosti između 0.01 i $1e-50$, podudarnost se može smatrati posljedicom homologije, a ne slučajnosti. Primjer dobre i pouzdane sekvencije dobiven je za uzorak KK2 (Slika 18). Za BLAST analizu ovoga uzorka uzet je dio sekvencije od nukleotida 70 te je dobivena 100 % - tna podudarnost s genom *wsp* endosimbionta *Wolbachia* sp. vrste mrava *Formica fusca* uz E vrijednost jednaku 0 (što je E vrijednost bliža nuli, to je podudarnost značajnija). Sekvencioniranje za ostale uzorke (OK52 - Slika 17, K4 – Slika 19 i V1 – Slika 20) nije uspjelo. Kromatogrami ovih uzoraka nisu dovoljno razlučivi, imaju previše pozadinskih signala te analizom dobivenih sekvencija tih uzoraka nije pronađena podudarnost u bazi.



b

GGGCAGTAGGAAGGGGATTGAATATCAGTAGTTTTAGTCCTTTCCAAGACCCACGCGT
 GCCGCTGTCCTAAACAAGAATCGTAGTTCAGGATCGTTGAGAAGCATCTTTCATTTCTGG
 CGGCGGCGCCCTCGCCTATAAAATGGTTGAGATCGCAGGTGATGTCTAGGGACTTTACTC
 AGAACTAAACAAAACCACCTTAGTGGTGC AACCTTTACTCCAACAACCTGTTGTAAACAT
 TGTGGCACCATTTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTACGATATAACCATTGAAGATCTGCCT
 ATCACTCCATACGTTGGTGTGGCGTTGGTGCTTTATATATCAGCAATCCTCCAACGCTG
 CTGACGTTAAGGATCAAAGGGGTTTGGTTTTGCCTATCAAGCAAAGCTGGTGTTAATT
 ATGATGTAACCCAGAAATCAAACCTTTTGTGGAGCTCGTTACTTCGGTTCTTATGGTGC
 TAGTTTTGATAAGGCACCTAAGGATGATACTGGTATCAAAAATGTTCTTTACAGCACTGTT
 GGTGCGAAGCTGGAGTAGCGTTTAATTTTTCTC

Slika 16. Rezultati sekvencioniranja po Sangeru za PCR - produkt uzorka SN1. Slika a) prikazuje kromatogram gdje zeleni signal označava adenin, crni - gvanin, crveni - timin i plavi - citozin. Crvena strelica označava početak sekvencije korištene za BLAST analizu. Na slici pod b) je najbolja pretpostavka programa o redoslijedu baza sekvencije; crveni dio sekvencije korišten je u BLAST analizi.



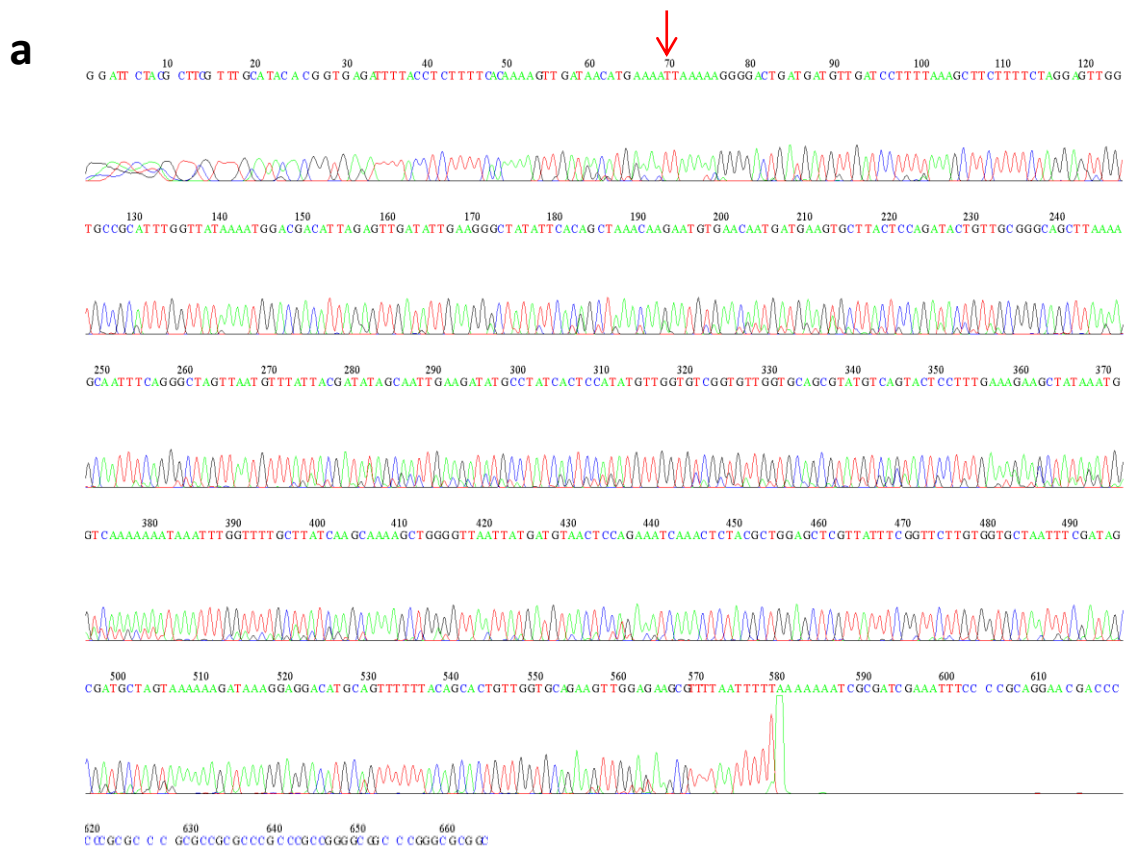
b

```

GGGGAGGGGGGGGGAGGTGGAAGTGGTAGAGGGAGTAGTTGGCTGAATTCTACCCC
ACAATGGCGCCCTTGTCCAGGAGAACCTCAACAGGAGCAAGCCGCTGGGGTTTGCTGT
CTTTGGTGCTGAAACCCAGATGTCCTCTAAGCCCGACCGCCACCGTGCTGGACTTC
TGGGCCCCCGGAAGAAAAAGCCAGGGGGTCTACAGTTGAACTTGCTTGAGTTCCA
GTTGCAAGGGCTTCAACCCGCTCTGCAAAAAAAGTAAGTGCAAAAGGACAAACCGTCA
ATGCCAAACACGTTGCCCTGATTTTTCAAAAACGCGGACCTTTTGAGGGTGAGAATA
GACCCCGTGCCCTTCTGACGATGAGAATGTGAGTCGCGGCCGAACCACCGATGTTGCC
GAACAGGGATCTGCTCATACCCAAAATCGCCACATTCCTTGATTTGTTGCAATGTTGTTAG
CACGTAGCGCATCAGGGTCATGGCATGGGAGCCACACTAGCCTCGACTTACCTGGTTGT
ATGCGTAAGACCGATTGTTTTTCATATAACGGGGTCCCAATGGTAATTGATGGATAGACT
TTTTGCCTCACCTCACACCGTGACATGCGCTC

```

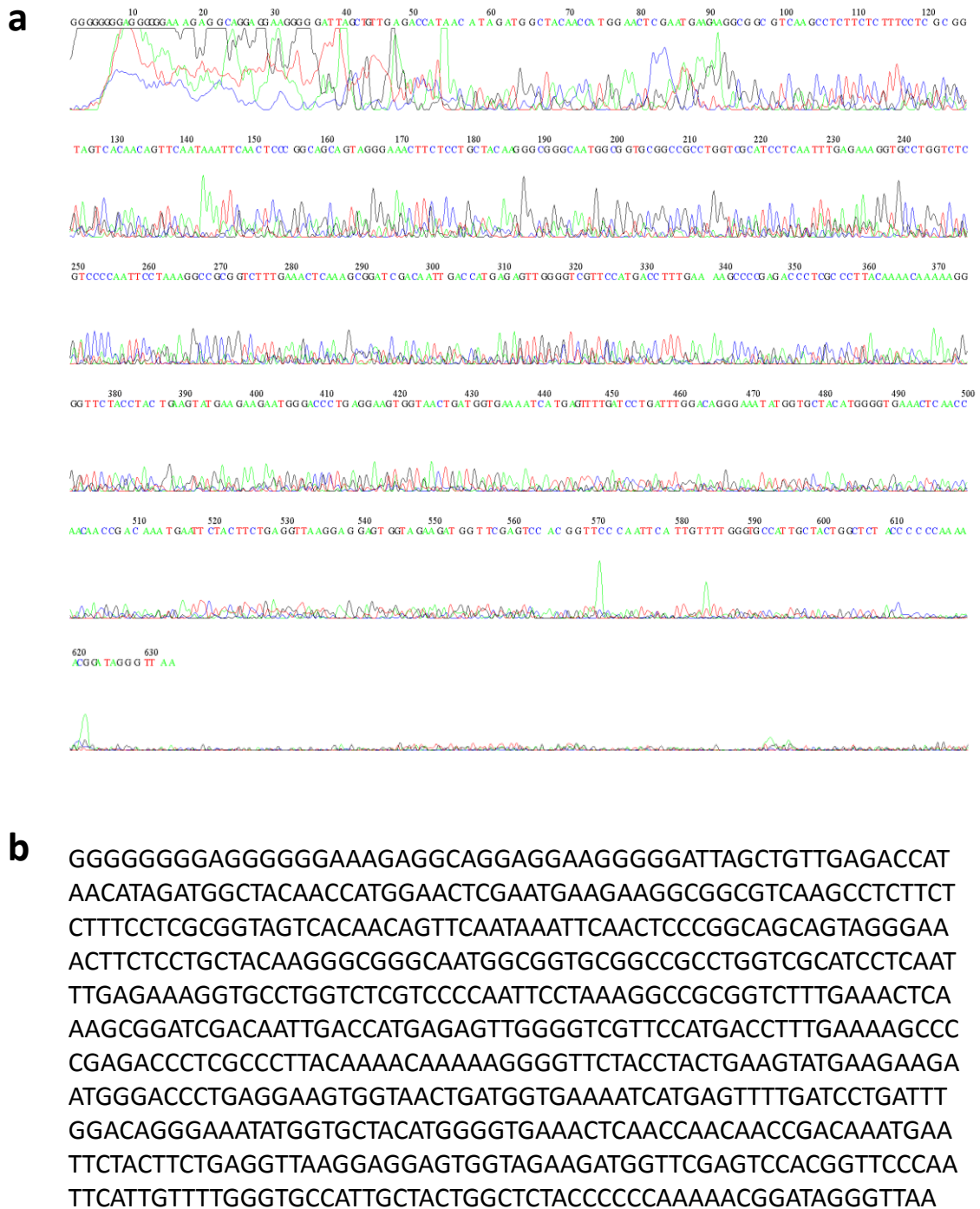
Slika 17. Rezultati sekvencioniranja po Sangeru za PCR - produkt uzorka OK52. Slika a) prikazuje kromatogram gdje zeleni signal označava adenin, crni - gvanin, crveni - timin i plavi - citozin. Na slici pod b) je najbolja pretpostavka programa o redoslijedu baza sekvencije.



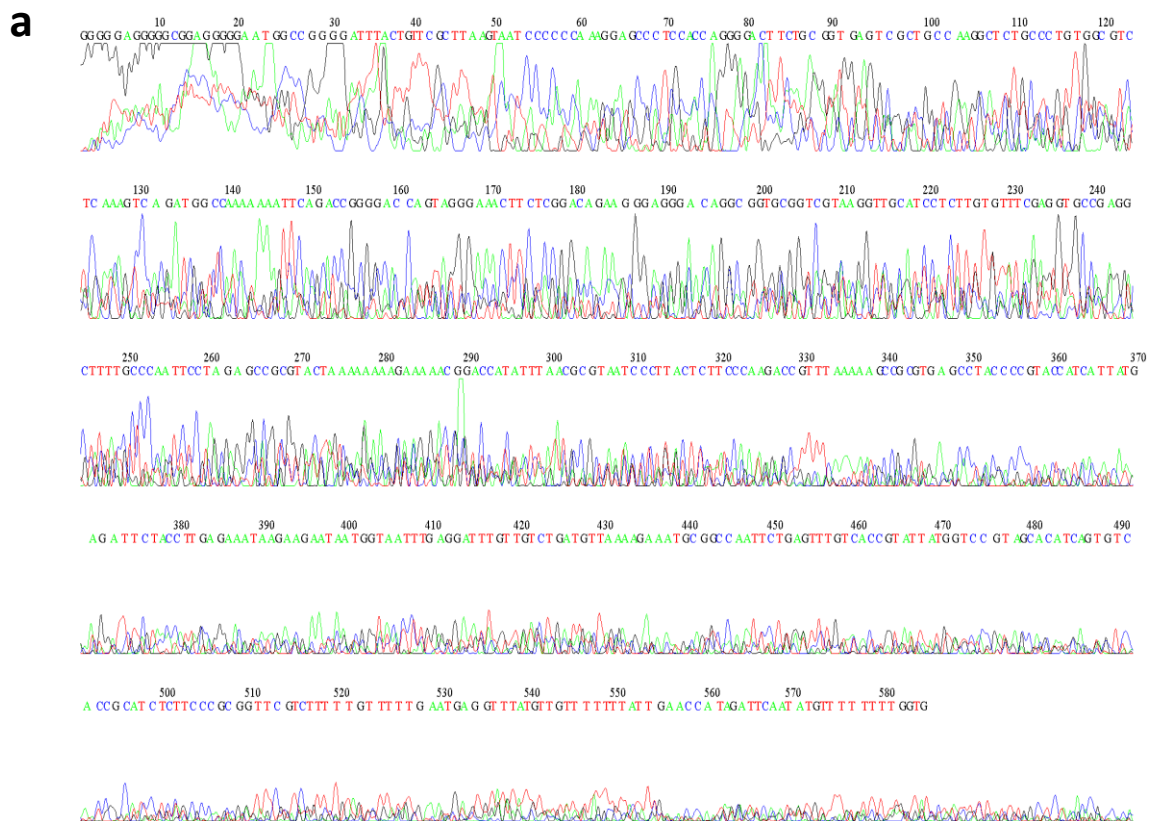
b

GGATTCTACGCTTCGTTTGCATACACGGTGAGATTTTACCTCTTTTCACAAAAGTTGATA
 ACATGAAAATTTAAAAGGGGACTGATGATGTTGATCCTTTTAAAGCTCTTTTCTAGGA
 GTTGGTGCCGCATTTGTTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGGGCTATA
 TTCACAGCTAAACAAGAATGTGAACAATGATGAAGTGCTTACTCCAGATACTGTTGCGG
 GCAGCTTAAAAGCAATTTCAGGGCTAGTTAATGTTTATTACGATATAGCAATTGAAGATA
 TGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTTCGGTGTTCAGCGTATGTCAGTACTCCTTTGA
 AAGAAGCTATAAATGGTCAAAAAAATAAATTTGGTTTTGCTTATCAAGCAAAAAGCTGGG
 GTTAATTATGATGTAACCTCAGAAATCAAACCTACGCTGGAGCTCGTTATTTTCGTTTCT
 TGTGGTGCTAATTTTCGATAGCGATGCTAGTAAAAAAGATAAAGGAGGACATGCAGTTTT
 TTACAGCACTGTTGGTGCAGAAGTTGGAGAAGCGTTTTAATTTTTAAAAAATCGCGAT
 CGAAATTTCCCGCAGGAACGACCCCCGCGCCCGCGCCCGCCCGCCGGGGC
 GGCCCGGGCGCGGC

Slika 18. Rezultati sekvencioniranja po Sangeru za PCR - produkt uzorka KK2. Slika a) prikazuje kromatogram gdje zeleni signal označava adenin, crni - gvanin, crveni - timin i plavi - citozin. Crvena strelica označava početak sekvencije korištene za BLAST analizu. Na slici pod b) je nabolja pretpostavka programa o redosljedu baza sekvence; crveni dio korišten je u BLAST analizi.



Slika 19. Rezultati sekvencioniranja po Sangeru za PCR – produkt uzorka K4. Slika a) prikazuje kromatogram gdje zeleni signal označava adenin, crni - gvanin, crveni - timin i plavi - citozin. Na slici pod b) je najbolja pretpostavka programa o redoslijedu baza sekvencije.



b

GGGGGAGGGGGCGGAGGGGGAATGGCCGGGGATTTACTGTTTCGCTTAAGTAATCCC
 CCCAAAGGAGCCCTCCACCAGGGGACTTCTGCGGTGAGTCGCTGCCAAGGCTCTGCC
 CTGTGGCGTCTCAAAGTCAGATGGCCAAAAAATTCAGACCGGGGACCAGTAGGGAA
 ACTTCTCGGACAGAAGGGAGGGACAGGCGGTGCGGTGCGTAAGGTTGCATCCTTGT
 GTTTCGAGGTGCCGAGGCTTTTGGCCAATTCCTAGAGCCGCTACTAAAAAAGAAA
 AACGGACCATATTTAACGCGTAATCCCTTACTCTTCCCAAGACCGTTTAAAAAGCCGCG
 TGAGCCTACCCCGTACCATCATTATGAGATTCTACCTTGAGAAATAAGAAGAATAATGGT
 AATTTGAGGATTTGTTGTCTGATGTTAAAAGAAATGCGGCCAATTCTGAGTTTGTACC
 GTATTATGGTCCGTAGCACATCAGTGTACCCGCATCTCTTCCCGGGTTCGTCTTTTTGT
 TTTTGAATGAGGTTTATGTTGTTTTTTTATTGAACCATAGATTCAATATGTTTTTTTTGGT
 G

Slika 20. Rezultati sekvencioniranja po Sangeru za PCR -produkt uzorka V1. Slika a) prikazuje kromatogram gdje zeleni signal označava adenin, crni - gvanin, crveni - timin i plavi - citozin. Na slici pod b) je najbolja pretpostavka programa o redosljedu baza sekvencije.

5. RASPRAVA

U ovome radu istraživana je prisutnost bakterije roda *Wolbachia* u mravima Hrvatske. Glavni ciljevi bili su odrediti postoje li u Hrvatskoj mravi zaraženi ovom bakterijom, na kojim lokalitetima te ukoliko postoje, izračunati učestalost infekcije kod mrava za cijelu Hrvatsku i za pojedine geografske regije. Glavna metoda detekcija bila je metoda lančane reakcije polimerazom sa specifičnim početnicama za bakterijski gen *wsp*, uz sekvenciranje po Sangeru za provjeru točnosti rezultata. Kautz i sur. (2013) otkrili su da je učestalost infekcije ovom bakterijom među vrstama mrava u Americi 22,1 %, a za područje Europe, pa ni Hrvatske, slični podaci nisu poznati. Na temelju svoje meta-analize Hilgenboecker i sur. (2008) zaključili su da infekcija bakterijom *Wolbachia* sp. unutar neke vrste domaćina slijedi obrazac „većina ili nekoliko“ te da je učestalost infekcije kod neke vrste obično jako visoka (veća od 90 %) ili vrlo niska (manja od 10 %). Iako se ovo istraživanje nije fokusiralo samo na jednu vrstu mrava, već na mrave kao porodicu (Formicidae), očekivalo se da će učestalost infekcije također slijediti isti obrazac „većina ili nekoliko“.

Doista, prema rezultatima PCR analize ovoga istraživanja učestalost infekcije bakterijom *Wolbachia* sp. u ukupnom uzorku mrava iz cijele Hrvatske iznosila je samo 8 %. Učestalost infekcije u geografskim regijama Hrvatske iznosila je 12 % za kontinentalnu regiju, 20 % za gorsko – kotlinsku regiju te 4 % za primorsku regiju. Za svaki lokalitet uzorkovanja testirano je više uzoraka, no ni u jednom slučaju bakterija nije detektirana u više uzoraka s istog lokaliteta, što znači da su mjesta gdje postoji infekcija rijetka i izolirana te da se horizontalni prijelazi bakterije između jedinki i populacija događaju rijetko.

U jednom od ukupno dva dosad provedena istraživanja o prisutnosti bakterije *Wolbachia* sp. u Hrvatskoj, Huber i sur. (2017) ispitali su prisutnost bakterije u psima zaraženima oblicem *Dirofilaria repens* s područja Hrvatske. Oblic *D. repens* parazitira u potkožnom tkivu pasa i prenose ga komarci (Capelli i sur. 2018), a istovremeno može biti domaćin bakterije *Wolbachia* sp. PCR analizom DNA iz krvi pasa (1080 jedinki) na bakterijski gen za 16S ribosomsku RNA (16S rRNA) i naknadnim sekvenciranjem, dobili su ukupnu učestalost bakterije *Wolbachia* sp. od 1,1 %. Gledano po geografskim regijama, najveću učestalost dobili su za kontinentalnu regiju gdje je ona iznosila 2,1 %, a u sjevernojadranskoj regiji i Dalmaciji učestalosti su bile jednake i iznosile su 0,8 %. Iako spomenuto istraživanje ne prati učestalost infekcije kod istog domaćina kao i ovo istraživanje, rezultati su slični po tome što je ukupna učestalost infekcije u oba slučaja niska, odnosno

manja od 10 %, dok se regije s najvećom učestalošću infekcije razlikuju – u slučaju oblića infekcija je najučestalija u kontinentalnoj regiji (2,1 %), a u slučaju mrava u gorsko - kotlinskoj regiji (20 %). Usporedbom ovih dvaju domaćina bakterije *Wolbachia* sp., oblića i mrava, mravi su se pokazali kao češći domaćini i imaju veću učestalost infekcije.

U drugom primjeru istraživanja s područja Hrvatske o prisutnosti bakterije *Wolbachia* sp. od Škaljac i sur. 2012 analizirane su dvije populacije vrste moljca *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), jedna iz Kaštela i druga iz Opuzena. Od ukupno testiranih 40 jedinki (ličinki) sve su bile pozitivne i učestalost infekcije je bila 100 %. Za razliku od mrava, kod ove vrste očit je trend kod kojeg je većina jedinki nositelj infekcije.

Prema Russell i sur. (2012) česte vrste mrava koje nose zarazu bakterijom *Wolbachia* su vrste roda *Acromyrmex*, *Formica*, *Solenopsis* i *Tetraponera*. U ovom istraživanju, jedan od zaraženih uzoraka bio je roda *Formica*, a najviše zaraženih mrava pripadala je rodu *Lasius*.

Iako je većina mrava bila negativna na bakteriju *Wolbachia*, gotovo je nemoguće za neku vrstu ili skupinu domaćina sa sigurnošću reći da je nezaražena - takav bi zaključak trebao biti potkrijepljen puno većim brojem uzoraka, budući da se ovi simbionti u nekim populacijama javljaju s vrlo malom učestalošću, ali ih ipak ima (Russell 2012). Iz tog razloga, stvarna učestalost infekcije bakterijom *Wolbachia* uvijek će biti veća od svih procjena dobivenih na temelju PCR detekcije. Osim problema nedovoljnog uzorkovanja, prilikom interpretacije ovih rezultata treba uzeti u obzir i ograničenja PCR metode. Jeyaprakash i Hoy (2000) pokazali su da umnažanje gena *wsp* standardnom PCR metodom često rezultira lažnim negativnim rezultatima i pretpostavili su da je mogući razlog tomu taj što DNA domaćina ometa umnažanje gena s bakterijske DNA. Stoga predlažu korištenje metode PCR dugog dometa (engl. *long range PCR*), koju su i sami primijenili u istome radu koristeći dvije polimeraze *Taq* i *Pwo*. Usporedbom osjetljivosti dviju metoda pokazali su da je PCR dugog dometa bio približno šest redova veličine efikasniji u umnažanju bakterijske DNA pomiješane s genomskom DNA insekta. Ovom metodom dobili su da je bakterijom zaraženo 75 % vrsta, a postotak dobiven standardnom metodom je bio samo 16,9 %. Obzirom da je u ovome radu korišten standardni PCR, moguće je da primijenjena metoda nije bila dovoljno osjetljiva da detektira bakteriju kod nekih uzoraka te bi se u budućnosti moglo pokušati s PCR-om dugog dometa.

Zbog tehničkih poteškoća kod nekih uzoraka kod kojih je pronađen bakterijski gen *wsp* sekvencioniranje radi potvrde rezultata PCR metode nije uspjelo, i neki uzorci nisu ni poslani

na sekvenciranje pa se ovi rezultati temelje većinom na metodi PCR. No budući da je za dva uzorka dobivena sekvencija pripadala upravo traženoj bakteriji, velika je vjerojatnost da se i kod drugih uzoraka radi o bakteriji *Wolbachia* sp. Premala količina pročišćene DNA i prisutnost nečistoća u nekim uzorcima negativno su utjecali na sekvencioniranje pa ono nije polučilo jednoznačnu sekvencu. Također, moguća je i istovremena infekcija jedinke s više različitih sojeva bakterije čije se sekvencije gena *wsp* na nekim mjestima razlikuju, što bi mogao biti još jedan razlog neuspjelog sekvencioniranja (Jeyaprakash i Hoy 2000). Za takve uzorke postupak bi trebalo ponoviti uz bolje uvjete PCR-a ili pročišćavanja PCR produkta kako bi se osigurala veća koncentracija i čistoća DNA, moglo bi se pokušati s boljom polimerazom, dizajnirati specifičniji set početnica za neki drugi bakterijski gen itd.

Niska razina infekcije bakterijom *Wolbachia* kod mrava je s evolucijskog gledišta povoljna za vrste jer su neke od potencijalnih dugoročnih posljedica infekcije gubitak muškog spola kod haplodiploidnih vrsta i izumiranje kao posljedica smanjenja produktivnosti populacije zbog iskrivljenog omjera spolova ili citoplazmatske inkompatibilnosti te zbog smanjenja genetske raznolikosti. Ako pretpostavimo da bakterija *Wolbachia* sp. u mravima može inducirati partenogenezu, što je slučaj kod nekih drugih opnokrilaca, nedostatak spolnog razmnožavanja doveo bi do akumulacije štetnih mutacija i smanjene evolubilnosti (Charlat i sur. 2003). S druge strane, nezaraženi mravi mogli bi biti zakinuti za neke povoljne učinke koje ova bakterija ima za domaćina – kao npr. već spomenuto snabdijevanje vitaminom B. Iako još nedovoljno istražene, postoje i indikacije da bi bakterija mogla pridonijeti u zaštiti mrava od napada parazitoida i RNA virusa te preliminarni rezultati na vrsti *Solenopsis invicta* ukazuju na to da je na lokalitetu s najvećom prevalencijom virulentnih RNA virusa učestalost infekcije bakterijom *Wolbachia* sp. najniža (Russell 2012).

6. ZAKLJUČCI

1. Među mravima (Insecta: Hymenoptera: Formicidae) u Hrvatskoj prisutna je infekcija bakterijom roda *Wolbachia*, odnosno vrstom *Wolbachia pipientis*.
2. Bakterija je prisutna u mravima s uskog područja Kalnika, Kleka, Osijeka, Svete Nedelje, Gorskog kotara, Korčule i Visa.
3. Učestalost infekcije bakterijom *Wolbachia* sp. u ukupnom uzorku od 92 mrava iz cijele Hrvatske iznosila je 8 %.
4. Učestalost infekcije u uzorku mrava iz kontinentalne regije Hrvatske je 12 %, u uzorku iz gorsko - kotlinske regije 20 %, a u uzorku iz primorske regije 4 %. Zbog nedovoljnog uzorkovanja i nedostataka korištene metode detekcije, stvarna učestalost je potencijalno i veća.
5. Sekvencioniranjem i BLAST - analizom PCR - produkata fragmenata bakterijskog gena *wsp* za dva uzorka potvrđena je 100 % - tna sličnost sa sekvencijom gena *wsp* bakterije roda *Wolbachia* i vrste *W. pipientis*.
6. Mjesta infekcije mrava bakterijom *Wolbachia* sp. su rijetka i izolirana.
7. U budućnosti, slično istraživanje moglo bi se unaprijediti korištenjem metode PCR dugog dometa. Većim uzorkovanjem učestalost infekcije mogla bi se preciznije izmjeriti.
8. Zbog niza negativnih učinaka koje bakterije *Wolbachia* sp. ima na domaćina, za mrave je niska učestalost infekcije ovom bakterijom povoljna.

7. LITERATURA

1. Agosti D., Majer J. D., Alonso L. E., Schultz T. R. (2000): *Ants - Standard methods for measuring and monitoring biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
2. Baldo L., Lo N., Werren J. H. (2005): Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *J Bacteriol* **187**: 5406–5418.
3. Beckmann J. F., Ronau J. A., Hochstrasser M. A. (2017): *Wolbachia* deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility. *Nat Microbiol* **2**: 17007.
4. Bessetti J. (2007): An introduction to PCR inhibitors. *Profiles DNA* **10**: 9-10.
5. Bolton B. (2021): An online catalog of the ants of the world. (dostupno na <https://antcat.org/>)
6. Boursaux-Eude C. i Gross R. (2000): New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. *Res Microbiol* **151**: 513-9.
7. Bourtzis K. (2008): *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. *Adv Exp Med Biol* **627**: 104-13.
8. Bračko G. (2006): Review of the ant fauna (Hymenoptera: Formicidae) of Croatia. *Acta Entomol Sloven* **14**: 131-156.
9. Capelli G., Genchi C., Baneth G., Bourdeau P., Brianti E., Cardoso L., Danesi P., Fuehrer H.P., Giannelli A., Ionică A. M., Maia C., Modrý D., Montarsi F., Krücken J., Papadopoulos E., Petrić D., Pfeffer M., Savić S., Otranto D., Poppert S., Silaghi C. (2018): Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasit Vectors* **11**: 663.
10. Casiraghi M., Bordenstein S. R., Baldo L., Lo N., Beninati T., Wernegreen J. J., Werren J. H., Bandi C. (2005): Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology (Reading)* **151**: 4015-4022.
11. Charlat S., Hurst G. D., Merçot H. (2003): Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends Genet* **19**: 217-223.

12. Cheng D., Chen S., Huang Y., Pierce N. E., Riegler M., Yang F., Zeng L., Lu Y., Liang G., Xu Y. (2019): Symbiotic microbiota may reflect host adaptation by resident to invasive ant species. *PLoS Pathog* **15**: e1007942.
13. Dimijian G. G. (2000): Evolving together: the biology of symbiosis, part 1. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **13**: 217–226.
14. Duron O., Bouchon D., Boutin S., Bellamy L., Zhou L., Engelstädter J., Hurst G. D. (2008): The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol* **6**: 1-12.
15. Gontier N. (2016): Symbiosis, History of. In: Kliman, R. M. (ed.), *Encyclopedia of Evolutionary Biology*. Oxford: Academic Press. vol. **4**: 272–281.
16. Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P., Telschow A., Werren J. H. (2008): How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* **281**: 215–220.
17. Huber D., Reil I., Duvnjak S., Jurković D., Lukačević D., Pilat M., Beck A., Mihaljević Ž., Vojta L., Polkinghorne A., Beck R. (2017): Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Wolbachia* sp. but not *Ehrlichia canis* in Croatian dogs. *Parasitol Res* **116**: 3019-3026.
18. Ješovnik A. (2020): Preliminarno istraživanje faune mrava otoka Biševa. Izvještaj. Udruga HMD za udrugu Spasimo Bišovo 18 (dostupno na <https://bisevoislandartistresidency.org/2551/preliminarno-istrazivanje-mrava-otoka-biseva-izvjestaj/>)
19. Ješovnik A., Sosa-Calvo J., Lloyd M. W., Branstetter M. G., Fernández F., Schultz T. R. (2017): Phylogenomic species delimitation and host-symbiont coevolution in the fungus-farming ant genus *Sericomyrmex* Mayr (Hymenoptera: Formicidae): Ultraconserved elements (UCEs) resolve a recent radiation. *Syst Entomol* **42**: 523–542.
20. Jeyaprakash A. i Hoy M. A. (2000): Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol* **9**: 393-405.

21. Kageyama D. i Traut W. (2004). Opposite sex-specific effects of *Wolbachia* and interference with the sex determination of its host *Ostrinia scapulalis*. *Proc Biol Sci* **271**: 251–258.
22. Kautz S., Rubin B. E. R., Moreau C. S. (2013): Bacterial Infections across the Ants: Frequency and Prevalence of *Wolbachia*, *Spiroplasma*, and *Asaia*. *Psyche: J Entomol* **2013**: 1-11.
21. Keller L. i Gordon E. (2009): *The Lives of Ants*. Oxford University Press, New York.
22. Keller L., Liautard C., Reuter M., Brown W.D., Sundström L., Chapuisat M. (2001): Sex ratio and *Wolbachia* infection in the ant *Formica exsecta*. *Heredity* **87**: 227–233.
23. Knight J. (2001): Meet the Herod bug. *Nature* **412**: 12–14.
24. Kooij P. W., Dentinger B. M., Donoso D. A., Shik J. Z., Gaya E. (2018): Cryptic Diversity in Colombian Edible Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae). *Insects* **9**: 191.
25. Kozek W. J. i Rao R. U. (2007): The discovery of *Wolbachia* in arthropods and nematodes - A historical perspective. In A. Hoerauf, & R. U. Rao (Eds.), *Wolbachia: A Bug's Life in another Bug*. *Issues Infect Dis* **5**: 1-14.
26. McGinnis S. i Madden T. L. (2004): BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* **32** (Web Serverissue): W20-W25.
27. Moreau C. S., Bell C. D., Vila R., Archibald S. B., Pierce N. E. (2006): Phylogeny of the ants: diversification in the age of angiosperms. *Science* **312**: 101-104.
28. Oliver K. i Russell J. (2016): *Symbiosis, Introduction to*. U: Kliman, R. M. (ur.) *Encyclopedia of Evolutionary Biology*. Oxford, Academic Press, str. 282-290.
29. Parvizi P., Bordbar A., Najafzadeh N. (2013): Detection of *Wolbachia pipientis*, including a new strain containing the *wsp* gene, in two sister species of *Paraphlebotomus* sandflies, potential vectors of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **108**: 414–420.
30. Pietri J. E., DeBruhl H., Sullivan W. (2016): The rich somatic life of *Wolbachia*. *Microbiologyopen* **5**: 923-936.
31. Ramalho M. O. i Moreau C. S. (2020): The Evolution and Biogeography of *Wolbachia* in Ants (Hymenoptera: Formicidae). *Divers* **12**: 426.

32. Russell J. A. (2012): The ants (Hymenoptera: Formicidae) are unique and enigmatic hosts of prevalent *Wolbachia* (Alphaproteobacteria) symbionts. *Myrmecol News* **16**: 7-23.
33. Russell J. A., Funaro C. F., Giraldo Y. M., Goldman-Huertas B., Suh D., Kronauer D. J., Moreau C. S., Pierce N. E. (2012): A veritable menagerie of heritable bacteria from ants, butterflies, and beyond: broad molecular surveys and a systematic review. *PloS ONE* **7**: e51027
34. Schultz T. R. (2000): In search of ant ancestors. Commentary. *PNAS* **97**: 14028-14029 (dostupno na <https://www.pnas.org/content/97/26/14028>)
35. Seifert B. (2018): *The Ants of Central and North Europe*. Lutra, Njemačka.
36. Serbus L. R., Casper-Lindley C., Landmann F., Sullivan W. (2008): The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annu Rev Genet* **42**: 683-707.
37. Singh R. i Linksvayer T. A. (2020): *Wolbachia* – infected ant colonies have increased reproductive investment and an accelerated life cycle. *J Exp Biol* **223**: 1-8.
38. Stouthamer R., Breeuwer J. A., Hurst G. D. (1999): *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* **53**: 71-102.
39. Škaljac M., Kostanjšek R., Žanić K. (2012): The Presence of *Wolbachia* in *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Populations from Coastal Croatia and Montenegro. *Afr Entomol* **20**: 191-194.
40. Taylor M. J., Bordenstein S. R., Slatko B. (2018): Microbe Profile: *Wolbachia*: a sex selector, a viral protector and a target to treat filarial nematodes. *Microbiology* **164**: 1345-1347.
41. Taylor M. J. i Hoerauf A. (1999): *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol Today* **15**: 437-442.
42. Van Borm S., Wenseleers T., Billen J., Boomsma J. (2001): *Wolbachia* in leafcutter ants: A widespread symbiont that may induce male killing or incompatible matings. *J Evol Biol* **14**: 805-814.
43. Vandekerckhove T., Watteyne S., Bonne W., Vanacker D., Devaere S., Rumes B., Maelfait J., Gillis M., Swings J., Braig H., Mertens J. (2003): Evolutionary trends in

feminization and intersexuality in woodlice (Crustacea, Isopoda) infected with *Wolbachia pipientis* (α -Proteobacteria). Belg J Zool **133**: 61-69.

44. Wenseleers T., Ito, F., Van Borm, S., Huybrechts R., Volckaert F., Billen J. (1998): Widespread occurrence of the microorganism *Wolbachia* in ants. Proc R Soc Lond **265**: 1447-1452.

45. Werren J. H. (1997): Biology of *Wolbachia*. Annu Rev Entomol **42**: 587-609.

46. Werren J., Baldo L., Clark M. (2008): *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nat Rev Microbiol **6**: 741–751.

47. Werren J. H. i Windsor D. M. (2000). *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?. Proc Biol Sci **267**: 1277–1285.

48. White P. M., Pietri J. E., Debec A., Russell S., Patel B., Sullivan W. (2017): Mechanisms of horizontal cell-to-cell transfer of *Wolbachia* spp. in *Drosophila melanogaster*. Appl Environ Microbiol **83**: 3425-16.

49. Zha X., Zhang W., Zhou C., Zhang L., Xiang Z., Xia Q. (2014): Detection and characterization of *Wolbachia* infection in silkworm. Genet Mol Biol **37**: 573–580.

Web izvori:

50. https://www.fws.gov/pacific/fisheries/fishhealth/Documents/BlueBook/cdr_pdfs/indexed/b6.2%20PCR%20Quality%20Assurance%202010%20with%20QPCR%20edits.pdf
(20.04.2021.)

51. <https://www.fishersci.com/shop/products/onetaq-quick-1-2x-mstr-mix-sta/504394>
(20.04.2021.)

52. <https://international.neb.com/protocols/2012/09/11/protocol-for-onetaq-quick-load-2x-master-mix-with-standard-buffer-m0486> (26.11.2020.)

53. https://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/tlem/pdfs/Bioinformatics_explained_BLAST.pdf
(01.08.2021.)

54. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (01.08.2021.)

55. <https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=276f9726-5e0c-4941-a394-45cf2c2b8fdd&lang=en> (01.08.2021)

56. <https://www.promega.es/-/media/files/resources/profiles-in-dna/1001/an-introduction-to-pcr-inhibitors.pdf?la=es-es> (05.08.2021.)

57. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q09TM6> (05.08.2021.)

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13.02.1993. u Varaždinu gdje završavam IV. osnovnu školu i osnovnu glazbenu školu. Paralelno upisujem opći dvojezični smjer na Prvoj gimnaziji Varaždin i srednju glazbenu školu (smjer gitara). Završavam dva razreda srednje glazbene škole. Od trećeg razreda srednje škole pohađam program međunarodne mature (IBDP - International Baccalaureate Diploma Programme) na engleskom jeziku. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjelujem na natjecanjima iz biologije i u drugom razredu osvajam 3. mjesto na državnom natjecanju u znanju. Tijekom ljetnih praznika sudjelujem na dvije ljetne škole znanosti, Summer School of Science u Višnjanu i XLAB International u Göttingenu (Njemačka) te pohađam ljetne škole engleskog jezika u Londonu i Oxfordu. Nakon završene srednje škole 2012. godine upisujem preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Sudjelujem u organizaciji nekoliko znanstveno - popularnih manifestacija „Noć biologije“, „Otvoreni dan kemije“ i „Dan za znanost“ i „Velika otkrića molekularne biologije“. Titulu prvostupnika stječem 2018. godine s temom „*Gene drives* – igranje evolucijom“, nakon čega upisujem diplomski studij eksperimentalne biologije, smjer Fiziologija i imunologija, također na PMF-u. Odrađujem stručnu laboratorijsku praksu na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta gdje i volontiram tijekom diplomskog studija na projektu epiSem. Nakon položenih svih ispita 2020. započinjem s izradom diplomskog rada na Zavodu za molekularnu biologiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Dubravka Pavokovića.