Molekularna filogenetika pauka roda Nesticus (Arachnida, Araneae, Nesticidae)

Gajski, Domagoj

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:943600

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

MOLEKULARNA FILOGENETIKA PAUKA RODA *NESTICUS* (ARACHNIDA, ARANEAE, NESTICIDAE)

MOLECULAR PHYLOGENETICS OF SPIDERS FROM THE GENUS *NESTICUS* (ARACHNIDA, ARANEAE, NESTICIDAE)

SEMINARSKI RAD

Domagoj Gajski

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1 UVOD
Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.
2 TEORIJSKA POZADINA MOLEKULARNE FILOGENETIKE 5
2.1 Povijesni pregled 5
2.2 Teorijska pozadina 5
2.2.1 Molekularni biljezi 6
2.2.2 Postupci izrade stabla nakon sekvencioniranja 7
2.2.3 Modeli evolucije 8
2.2.4 Metode za izradu evolucijskih stabla 8
2.3 Filogenetsko stablo 10
2.4 Ograničenja molekularne filogenetike 11
3 BIOLOGIJA ŠPILJSKIH PAUKA RODA *NESTICUS* 13
4 PRIMJENA MOLEKULARNE FILOGENETIKE U DOKAZIVANJU NOVE VRSTE 15
4.1 Materijali i metode 15
4.1.1 Taksonomsko uzimanje uzoraka; skladištenje uzoraka i ekstrakcija DNA 15
4.1.2 PCR-amplifikacija i sekvenciranje 16
4.1.3 Sravnjivanje 17
4.1.4 Filogenetska analiza 17
5 ZAKLJUČAK 19
6 LITERATURA 21
7 SAŽETAK 23
8 SUMMARY 24

1 UVOD

Molekularna filogenetika je grana filogenije koja analizira srodstvene razlike na molekularnoj razini, uglavnom se obazirući na DNA i RNA sekvence, kako bi dobila informacije o evolucijskom odnosu organizama i njihovoj evolucijskoj povijesti. Tijek istraživanja molekularne filogenetike je dobro definiran. Istraživanja kreću s izborom problema i nastavljaju se njegovim dizajniranjem, uzorkovanjem, utvrđivanjem molekularnih profila, filogenetskim analizama, utvrđivanjem srodstvenih odnosa, a završavaju raspravom i zaključivanjem o povijesti evolucije istraživane skupine, to jest njegovom filogenijom. Konačni rezultat koji dobijemo preko filogenetskih istraživanja je prikazan filogenetskim stablom.

Razred Arachnida je drugi najveći razred nakon Insecta po broju i raznolikosti vrsta (Savory, 1977). Također je među važnijim grupama beskralježnjaka koje se pojavljuju u špiljama, sa čak 9 od 11 postojećih redova koji sadrže nekolicinu vrsta koji su troglobionti. Red Aranea (Pauci) sadrži mnogo porodica kod kojih su pojedine vrste i rodovi usko povezani sa špiljama (troglobionti i troglofili) od kojih je jedan od najpoznatijih porodica Nesticidae. Pripadnici troglobionata unutar te porodice su efikasno prilagodili životu u tami tako što su reducirali broj očiju i pigmentaciju, produžili duljinu privjesaka, povećali broj i veličinu osjetilnih struktura, smanjili stopu metabolizma te smanjili opći broj jajašaca (Reddel, 2012). Rod *Nesticus* Thorell, 1869 je globalno rasprostranjen (osim Australije) i uključuje 125 vrsta. U Europi je *Nesticus* predstavljen preko 23 vrste od čega su četiri predstavljene kao endemične na Pirinejskom poluotoku.

Cilj ovog rada je opisati standardni proces molekularno filogenetskog istraživanja. U ovom radu je proces opisan primjerom

dokazivanja nove vrste špiljskog pauka *Nesticus baeticus* López-Pancorbo & Ribera, 2011 i njegovog uspoređivanja po filogeniji sa ostalim vrstama roda *Nesticus* koje su endemične za prostor Pirinejskog poluotoka kako bi ustvrdili njihovu srodnost.

2 TEORIJSKA POZADINA MOLEKULARNE FILOGENETIKE

Molekularna filogenetika je jedno od gledišta molekularne sistematike, šireg pojma koji uključuje korištenje molekularnih podataka u taksonomiji i biogeografiji. Ona proučava evolucijsku prošlost i odnose među organizmima na molekularnoj razini. Za cilj ima rekonstruirati točne genealoške veze među organizmima i procijeniti vrijeme divergencije između organizma od trenutka kada su se odvojili do zajedničkog pretka.

2.1 Povijesni pregled

Mnoga metodološka dostignuća su bila važan prethodnik omogućavanju istraživanja u području molekularne filogenetike. Općenito otkriće novih metoda istraživanja i unapređenje u metodama kao što su sekvenciranje (F. Sanger, 1975.), elektroforeza gela (O. Smithies, 1955.), softveri za obradu filogenetskih podataka (J.Felsenstein, 1973.) i lančana reakcija polimerazom – PCR (K. Mullis, 1983.).

Sva ta dostignuća su omogućila značajna otkrića u području molekularne filogenetike kao što su molekulski sat (E. Zuckerkandl i L. Pauling, 1962.) i filogenetsku rekonstrukciju (Walter Fitch). Dovela su i do danas najznačajnijeg rada u evoluciji hominida (A. Wilson i V. Sarich, 1969.) koja je podupirala prijedlog da se ogranak koji predstavlja današnje ljude odvojio od ogranka koji vodi prema današnjim afričkih majmuna prije 4 do 5 milijuna godina.

2.2 Teorijska pozadina i postupak izrade filogenetičkog stabla

Svaki živi organizam sadrži DNA i RNA uz proteinske molekule. Generalno gledajući, usko povezani organizmi imaju visok stupanj sličnosti u molekularnoj strukturi tih tvari, dok molekule u organizmima daleke srodnosti obično pokazuju različite uzorke. Konzervirane

sekvence, kao što je mitohondrijska DNA, pokazuju akumulaciju mutacija u ovisnosti s vremenom. Pretpostavka o konstantnoj stopi mutacija pruža molekulski sat za datiranje divergencije vrsta. Molekularna filogenija koristi te podatke za izradu filogenetičkog stabla koje prikazuje vjerojatnu evoluciju različitih vrsta. Otkrićem sekvenciranje, postala je korisna izolacija i mogućnost identifikacije tih molekularnih struktura.

2.2.1 Molekularni biljezi

I suvremenim metodama sekvenciranja, proces sekvenciranja čitavog genoma nekog organizma je i dalje dug i skup proces. Zato se koriste filogenetski markeri. To su fragmenti (lokusi) kodirajuće ili nekodirajuće DNA za koje se zna da nemaju varijacije unutar te vrste i čije su sekvence dostupne za sve vrste unutar roda. Filogenetski biljezi na osnovi kojih se konstruiraju stabla moraju biti varijabilni, jer su samo varijabilne karakteristike one koje su evoluirale. Nisu svi biljezi prikladni za rekonstrukciju filogenetskih odnosa između bilo kojih skupina organizama. Za one skupine koje su evoluirale jako davno, tj. za velike taksonomske kategorije potrebno je koristiti konzerviranije biljege, poput histonskih gena i 16S rRNA, dok su za mlađe evolucijske događaje, odnosno za rješavanje filogenetičkih odnosa na nižim sistematskim razinama, prikladni biljezi s većom varijabilnosti, primjerice mtDNA.

Molekularni filogenetski biljezi su superiorni u slučaju konflikta podataka dobivenih pomoću analize molekularnih i morfoloških biljega, jer su pogodniji za statističku analizu i manje podložni subjektivnoj interpretaciji istraživača. Mitohoondrijska DNA (mtDNA) nalik je prokariotskoj DNA jer je najčešće kovalentno zatvorena kružna molekula (cccDNA, covalently closed circular DNA). Imaju je gotovo sve eukariotske stanice a kodira za proteine, neke tRNA i rRNA (Sykes, 2003.). Ova je molekula popularan biljeg u filogeniji jer ju je lako

izolirati, nalazi se u velikom broju kopija, nema genske rekombinacije, nasljeđuje se po majčinoj liniji i relativno brzo evoluira.

2.2.2 Postupci izrade stabla nakon sekvencioniranja

Nakon izolacije i sekvenciranja DNA ili proteina koji se koriste kao filogenetski biljezi, slijedi analiza podataka. Osnovni koraci u molekularnoj filogenetskoj analizi su:

1. **Unos sekvenci u bazu** – dobije se broj za svaku sekvencu. Također se istražuju baze podataka na sličnost izoliranih sekvenci sa sekvencama unesenim u baze podataka prije. Najčešće se koriste EMBL FASTA i NCBI BLAST baze podataka koje heurističkim metodama pokušavaju naći „savršena“ poravnanja.

2. **Globalno sravnjivanje** – temelj i osnova svakog filogenetskog istraživanja, svođenje sekvenci na zajednički nazivnik preko algoritama. Pošušava sravnati svaki dio sekvence u svakoj sekvenci. Taj tip sravnjivanja je praktičan kada je ispitivani tip sekvenci sličan ili grubo jednage veličine. Često tu mogu nastati praznine između sravnanih sekvenci. Između ostalog je potrebno maknuti početak (tu su se tek vezali primeri) i kraj sljedova (tu obično dolazi do opadanja procesivnosti polimeraze).

3. **lokalno sravnjivanje**– fleksibilnije od tehnike globalnog sravnjivanja, može pronaći regije koje se pojavljuju u različitom redoslijedu ili orijentaciji u različitim sekvencama za koje se vjeruje da imaju slične regije ili sekvencijske motive unutar čitave sekvence.

4. **odabir evolucijskog modela** – filogenetska rekonstrukcija bazira se na statističkoj obradi podataka te ju je nemoguće provesti bez primjene određenih modela vjerojatnosti, budući da različiti tipovi supstitucija nisu nužno jednako učestali.

5. **odabir metode za izgradnju stabla na temelju modela**

2.2.3 Modeli evolucije

Modeli evolucije DNA su fenomenološki opisi evolucije DNA kao niz od 4 odvojenih stanja i zovu se još i markovljevski modeli. U teoriji vjerojatnosti, ti markovljevski modeli su stohastički modeli korišteni za podešavanje nasumično promjenjivih sustava gdje se pretpostavlja da buduća stanja ovise samo o trenutnim stanjima, a ne o događajima koji su se pojavili prije toga. Ti markovljevski modeli ne prikazuju direktno mehanizme mutacije niti akciju prirodne selekcije, nego više opisuju relativne stope različitih promjena. Ti modeli substitucije razlikuju se u uslovima parametara koje koriste za opis stope uz koju se jedan nukleotid mijenja u drugi tokom evolucije. Koriste se tokom kalkulacije vjerojatnosti nekog stabla ili za procjenu evolucijske udaljenosti između sekvenci iz promatranih razlika između sekvenci.

2.2.4 Metode za izradu filogenetičkih stabla

Reprezentativno filogenetičko stablo moguće je dobiti primjenom različitih metoda koje imaju matematički i statistički pristup obradi podataka. Ove metode mogu se podijeliti na dva različita načina u po dvije skupine: 1) ovisno o tome proučavaju li stanja karaktera ili matrice udaljenost i 2) ovisno o tome rade li iscrpno istraživanje ili postupno klasteriranje. Najčešće korištene metode za konstrukciju filogenetičkih stabala danas su metoda najveće štedljivosti (Maximum Parsimony) i metoda najveće vjerojatnosti (Maximum Likelihood).

Iako ima mnogo metoda za izrađivanje stabla, u ovom radu ću opisati samo metodu najveće štedljivosti. U filogeniji, najveća štedljivost je kriterij optimalnosti unutar kojeg filogenetičko stablo sa najmanjim

brojem promjena stanja karaktera se odabire kao najbolje stablo. Algoritam počinje proračune na osnovi pedefiniranog stabla određene topologije. To stablo se zatim nastoji rekonstruirati upotrebom najmanjeg mogućeg broja promjena karaktera potrebnih da bi se objasnili svi čvorovi stabla na svakoj poziciji sekvence. Zatim se provjerava sljedeća topologija na isti način. Nakon što su sve smislene topologije provjerene, odabire se ono stablo za koje je bio potreban najmanji broj promjena. Kako pronalazak najkraćeg stabla može trajati dugo, ova metoda se često preporučuje za mali broj taksona (manje od 9), a za veći broje se znanstvenici uglavnom okreću heurističkim metodama istraživanja. Metodama najveće štedljivosti se zapravo smanjuje količina homoplazije (konvergentne evolucije). Kako je stablo najveće štedljivosti uvijek najkraće stablo, često podcjenjuje stvarne evolucijske promjene koje su se desile. Na taj način stablo najveće štedljivosti nije statistički dosljedno pri većem broju podataka pa može biti proturječno pod nekim uvjetima kao što je privlačnost dugih ogranaka .

Nakon što se stablo konstruira jednom od metoda izrade filogenetskog stabla, potrebno je izvedeno stablo testirati na pouzdanost. Jedan od najčešćih testova koji se za to koristi je Felsensteinov bootstrap test. Ako postoji m broj sekvenci, svaka ima n broj nukleotida. Sa svake sekvence je nasumično uzeto n broj nukleotida koji se različitim zamjenama izmjene te onda sačinjavaju novi set sekvenci. Stablo je onda napravljeno sa novim sekvencama koristeći istu metodu za izradu stabla. Nakon izrade tih stabala, topologija svakog stabla se usporedi sa originalnim stablom. Ako je svaki čvor novog stabla jednak originalnom stablu, daje se vrijednost 1, u suprotnom je vrijednost 0. Proces rekonstrukcije stabla se ponavlja nekoliko stotina puta te se onda zapiše postotak čvorova sa vrijednošću 1. Taj postotak označava vrijednost bootstrap-a. Ako se preko analize dobije veliki postotak podrške, stablo je relativno dobro i mnogo karaktera podržava taj čvor stabla. Postotci od 70 % pa na više se smatraju umjerenom podrškom od strane znanstvenika (Hillis i Bull 1993).

Taj test je dostupan za 4 različite metode izrade stabla: metodu susjednog sparivanja (Neighbor Joining), metodu minimalne evolucije (Minimum evolution), metodu UPGMA (Unweight Pair Group Method with Aritmetic Mean) i za metodu koju koristimo u ovom radu – metoda najveće štedljivosti (Maximum Parsimony).

2.3 Filogenetičko stablo

Rezultati filogenetičkih istraživanja prikazuju se filogenetičkim stablima. Filogenetička su stabla stoga efektivno grafovi koji prikazuju odnose među organizmima ili genima različitih organizama, pri čemu divergencija gena iz dvije vrste može biti evolucijski starija od divergencije samih vrsta. Svako filogenetičko stablo sastoji se od karakterističnih dijelova i posjeduje jedinstvenu topologiju – čvorove i ogranke. Čvorovi predstavljaju taksonomske jedinice; mogu biti: vanjski ili krajnji čvorovi (operativne taksonomse jedinice, OTUs) i unutarnji čvorovi (hipotetske taksonomske jedinice, HTUs). Ogranci pokazuju odnose među taksonomskim jedinicama, mogu biti: vanjski ili periferni ogranci koji završavaju opisanim grupama i unutarnji ogranci koji povezuju hipotetske pretke.

Postoje dva tipa filogenetičkih stabala. Ako je poznat zajednički predak svih organizama čiji su odnosi prikazani na stablu, kažemo da je takvo stablo ukorijenjeno; u protivnom je neukorijenjeno. Najlakši način za procijeniti vrijeme divergencije pojedinih skupina prikazanih na filogeneičkom stablu je primjenom molekulskog sata, odnosno uz pretpostavku da sekvence nakupljaju promjene linearno u vremenu. Da bi se molekulski sat mogao primijeniti kod izrade filogenetičkog stabla, vremenski okvir mora biti poznat, što znači da stablo mora biti ukorijenjeno pomoću jedne ili više vanjskih grupa (*outgroup*), skupina organizama koje su dovoljno srodne, ali nisu među organizmima čije

odnose proučavamo. Topologija genetskog stabla može se razlikovati od topologije stabla vrste, a da bi se izbjegli pogrešni rezultati potrebno je koristiti DNA sekvence različitih lokusa koji su evoluirali neovisno jedan od drugoga. S obzirom na homologiju unutar genoma geni mogu biti paralogni geni (nastali duplikacijom, najvažnijim procesom u evoluciji gena; takvi geni se ne proučavaju kako bi se odredila srodnost organizama) i ortologni geni (nastali specijacijom; njihovom analizom određuje se srodnost organizama).

Gledajući odnose između podataka na filogenetičkom stablu, mogu biti podijeljeni u monofiletske, parafiletske i polifiletske grupe. Evolucijski točni odnosi dobiju se svrstavanjem organizama u monofiletske skupine (svi članovi grupe su porijeklom od jednog zajedničkog pretka), na temelju sinapomorfije (izvedeno karakterno stanje koje dijele dva ili više taksona, rezultat nasljeđivanja od neposrednog zajedničkog pretka), što je prvi uvidio njemački biolog Willi Hennig. On je također shvatio i da je pritom bitan princip parsimonije (najbolja hipoteza je ona koja zahjeva najmanje evolucijskih promjena). Smatra ga se utemeljiteljem moderne filogenetičke kladističke analize.

2.4 Ograničenja molekularne filogenetike

Molekularna filogenetika ima esencijalno kladistički pristup u kojem su organizmi svrstani ovisno o zajedničkim izvedenim karakteristikama koje se mogu pratiti do najmlađeg zajedničkog pretka i nisu prisutne u udaljenijim precima. One ne prikazuju nužno ispravnu evolucijsku povijest istraživane grupe organizama (takson). One su znanstvene hipoteze i subjekt falsifikaciji pri daljnjim studijama. Analize mogu biti zbunjujuće zbog genetske rekombinacije, hibridizacije nesrodnih vrsta, konvergentne evolucije i konzerviranih sekvenci. Nedavno otkriće opširnog horizontalnog prijenosa gena između organizama stvara značajnu komplikaciju za molekularnu filogenetiku, što ukazuje da različiti geni

unutar istog organizma mogu imati različito porijeklo. Također, molekularna filogenetika je osjetljiva na pretpostavke i modele preko kojih se predstavlja. Suočeni su sa problemima kao što su atrakcija dalekih ogranaka, genetska zasićenost te problemi kod izbora uzoraka za istraživanje. Zbog toga može doći do znatno drugačijih rezultata pri primjeni različitih modela za isti skup podataka (Philippe, Brinkmann, Lavrov, Littlewood, Manuel, Wörheide, Baurain, 2011.).

3 BIOLOGIJA ŠPILJSKIH PAUKA RODA *NESTICUS* Thorell, 1869

Kao što je spomenuto već u uvodu, razred Arachnida je drugi razred po broju vrsta i raznolikosti odmah iza Insecta (Savory, 1977.) Rasprostranjen je globalno i većinom su kopneni organizmi. Također je među važnijim grupama beskralježnjaka koji se pojavljuju u špiljama. Troglobionti su vrste koje cijeli život provode u špiljama i usko su uz njih vezane, dok su troglofili vrste koje mogu zalaziti u špilje ili im je jedan dio životnog ciklusa vezan uz špilje. U špiljama vrste razreda Arachnida uglavnom uzimaju poziciju predatora. Rodovi koji sadrže troglobionte uglavnom spadaju u porodice sa površine. Većina vrsta troglobionta ima vrlo ograničenu distribuciju te se mnogi pojavljuju samo u pojedinačnim špiljama. Nekoliko široko rasprostranjenih vrsta bi moglo predstavljati nedavno prilagođene troglobionte koji nisu dovoljno dugo izolirani da bi nastale dovoljno velike razlike među njima. Često ih se smatra kriptičnim vrstama. U velikom broju slučajeva poznat je samo jedan spol vrste ili samo jedna jedinka zbog površnih istraživanja (Reddel, 2012.).

Prilagodba okolini špilja zahtjeva često redukciju očiju i pigmenata, izduženje udova i povećanje osjetilnih struktura na površini tijela. Troglobiontske vrste uglavnom proizvode manji broj većih jajašaca i stopa metabolizma im se drastično smanjuje zbog čega uglavnom imaju duži životni vijek. Troglobiontske vrste su često osjetljive na smanjenje broja jedinki unutar populacije pa čak i na izumiranje. Zbog krčenja šuma došlo je do gubitka staništa za mnoge beskralježnjake i šišmiše koji pružaju nužne nutrijente za špiljski ekosustav zbog čega su mnoge vrste ugrožene (Reddel, 2012.)

Porodica Nesticidae je usko povezana sa špiljama te je mnogo vrsta troglobiontskog ili troglofilnog tipa. Pripadnici Roda *Nesticus* prisutni su u SAD-u, Meksiku, Kini, Koreji, Japanu i Europi te je opisano oko 130

vrsta sa podvrstama (Slika 1.). U Europi je *Nesticus* predstavljen sa preko 23 vrste od čega su četiri predstavljene kao endemične na Pirinejskom poluotoku. Vrsta iz spomenutog roda koja se opisuje u ovom radu je *Nesticus baeticus* sp. n. Ona nastanjuje kršne krajeve planina Cazorla I Segura te nacionalni park Las Villas gdje je pronađena u 8 špilja. Područje je vapnenačkog podrijetla, bujno i vlažno sa nekolicinom horizontalnih i vertikalnih špilja srednje veličine. Primjerci te vrste koji su korišteni kao uzorci za ovaj rad su bili generalno locirani nekoliko metara unutar zone mraka ili prema dubljoj unutrašnjosti špilje te su se intenzivno uzorkovali.

Slika 2.: *Nesticus cellulanus* Clerck, 1757 . Predstavnik roda *Nesticus*. Slika preuzeta sa stranice http://www.eurospiders.com/family_Nesticidae.htm

4 PRIMJENA MOLEKULARNE FILOGENETIKE U DOKAZIVANJU NOVE VRSTE (*Nesticus baeticus* sp. n.)

Preko rada o opisu nove vrste špiljskog pauka opisati ću primjenu molekularne filogenetike. Ovaj rad opisuje novu vrstu troglobionta čija distribucija obuhvaća kršna predjela nekoliko planina koja sačinjavaju sustav Betico, greben na samom jugu Pirinejskog poluotoka (López-Pancorbo & Ribera, 2011).

4.1 Materijali i metode

4.1.1 Taksonomsko uzimanje uzoraka; skladištenje uzoraka i ekstrakcija DNA

Takson analiziran u već spomenutom radu se nalazi u Tablica 1. Za sve vrste sa Pirinejskog poluotoka korišten je svježi uzorak za analizu DNA. *N. eremita* Simon, 1879 iz Hrvatske i *N. ionescui* Dumitrescu, 1979 iz Rumunjske su uključeni u istraživanje zbog testiranja monofilije vrsta sa Pirinejskog poluotoka. Sekvenca od *Nesticus* sp. iz Kine (Arnedo et al. 2004), koja je također uključena u istraživanje kao daleko srodna vrsta roda *Nesticus*te, je korištena za kako bi se ukorijenilo stablo.

Primjerci su bili sačuvani u apsolutnom alkoholu (96%) i skladišteni su na 4°C. Sveukupna genomska DNA je bila ekstrahirana iz noge jednog od primjeraka svake vrste korištenjem QIamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) sljedeći protokol priozvođača. Približna koncentracija i čistoća dobivene DNA su bile ovjerene korištenjem gel elektroforeze na 1% agarozi i TBE puferu.

TABLICA 1. :Vrste uključene u kladističku analizu i brojevi pristupanja GenBank bazi podataka za cox1 i rrnL. Svi brojevi pristupanja koji počinju sa EU su nove sekvence dobivene u radu koji se opisuje. Prilagođeno na temelju Lopez-Pancorbo i Ribera (2011.)

species	**Locality**	**cox1**	**rrnL**
Nesticus obcaecatus	Cueva del Molino de Aso, Valle de Añisclo, Huesca, Spain	EU746428	EU746437
Nesticus luquei	Cueva de la Picona, San Pedro de Carmona, Cabuerniga, Cantabria, Spain	EU746430	EU746439
Nesticus lusitanicus	Algar de Marradinhas II Concelho de Alcanena, Portugal	EU746429	EU746438
Nesticus baeticus	Sima Irene, Hornos, Jaén, Spain	EU746431	EU746440
Nesticus baeticus	Sima del Campamento, Hornos, Jaén, Spain	EU746432	EU746441
Nesticus baeticus	Sima de los Alhaurinos, Hornos, Jaén, Spain	EU746433	EU746442
Nesticus ionescui	Pestera Tismana, Tismana, Romania	EU746434	EU746443
Nesticus cellulanus	Manantiales Monte Castro, Sueras, Castellón, Spain.	EU746435	EU746444
Nuesticus eremita	Cave Pishurka (=Paganetijeva Pécina), Korcula Is., Croatia.	EU746436	EU746445
"Nesticus" X130	China	AY231024	AY230941

4.1.2 PCR amplifkacija i sekvenciranje

Selektivno su amplificirane dvije regije mitohondrijske DNA koje odgovaraju fragmentima gena citokrom oksidaze I (cox1) i 16S r RNA (rrnl). Za amplifikaciju su korišteni sljedeći parovi početnica:

- **cox1**: - C1-J-1718 (5' GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC 3') (Simon et al. 1994)

  - C1-N-2191(5' CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC 3') (Simon et al. 1994)

- **rrnL**: - LR-N-13398 (5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3') (Simon et al. 1994)

  - LR-J-12864(5' CTCCGGTTTGAACTCAGATCA 3') (Arnedo and Gillespie 2006)

Reakcijska smjesa za PCR je sadržavala finalnu koncentraciju od 0.2 µM svake početnice, 0.2 mM svakog deoksiribonukleotida (dNTP), 0.5

µM Taq polimeraze sa puferom i 1.5-2.5 mM MgCl2 u finalnom volumenu od 25 µL. Za izvođenje PCR-a se koristio Perkin-ElmerCetus Moldel 480 thermocycler sa 35 ponavljanja. Namješteni su bili sljedeći ciklusi: 30s na 95°C, 45s na 45°C, i 1 min na 72°C, započevši sa 3 min na 95°C, a završio je proces sa 10 min na 72°C. PCR rezultati su vizualizirani 1% agaroznim gelom sa TBE puferom. Amplificirani produkti su bili pročišćeni Microcon PCR kolonama prateći upute proizvođača. Pročišćeni produkti su bili ciklusno-sekvencirani sa oba lanca korištenjem ABI BigDye (Applied Biosystems) kemikalija pa istaloženi DyeEx Spin kit (Qiagen, Chatsworth, CA) kolonama I sekvencirane na ABI Prism 377 (Applied Biosystems) – uređaju za automatsko sekvenciranje. Reakcija sekvenciranja je bila pokrenuta u laboratoriju Serveis Científico-Tècnics u sveučilištu Barcelona.

4.1.3 Sravnjivanje

Sekvence su manipulirane i konstruirana su preliminarna ručna sravnjivanja koristeći BioEdit V.7.0.5.3 .Sravnjivanje fragmenata gena cox1 bilo je trivijalno zbog odsutnosti duljih polimorfizma. Međutim, bile su razlike u duljini između fragmenata rrnL, sugerirajući pojavu insercijskih ili delecijskih događaja tokom evolucije te sekvence. Automatska sravnjivanja za skup podataka od rrnL su bila izrađena sa programom MAFFT v 6.240.

4.1.4. Filogenetska analiza

Korišteno je nekoliko metoda pri izradi stabala, ali je najbolje prihvaćena metoda najveće štedljivosti (*Maximum Parsimony).* Parsimonijske analize kombiniranih podataka matrices u bili provedeni programom Winclada v.1.00.08. Korišteni su sljedeće strategije

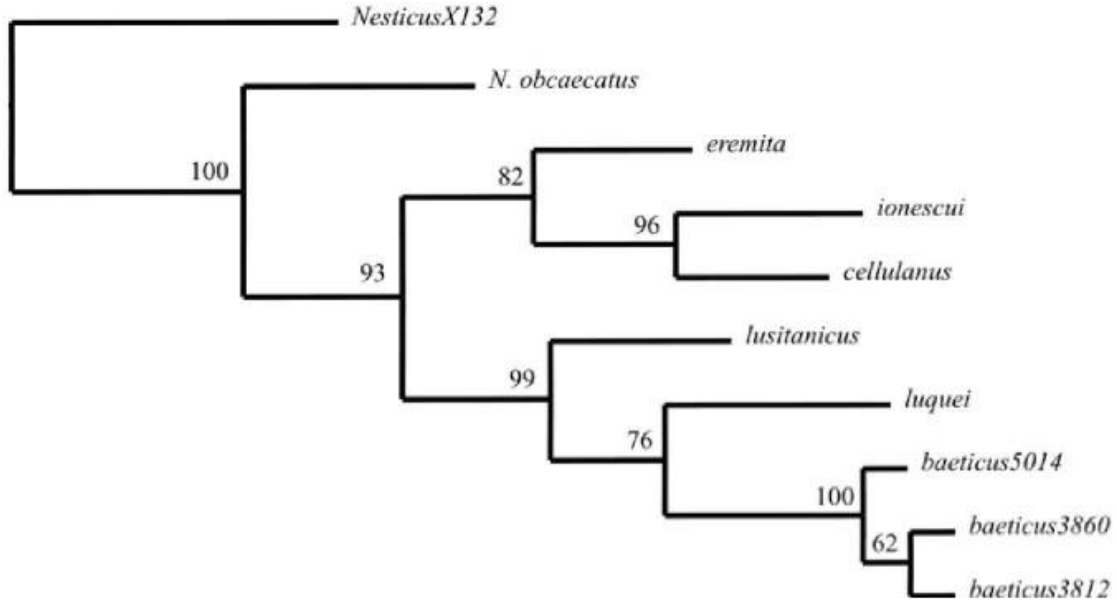
istraživanja heurističnog stabla: 1000 ponavljanja sa 10 Wagner stabala (evolucijska stabla koja zahtjevaju najmanji broj evolucijskih koraka za objasniti promatrane uzorke) konstruiranih sa nasumičnom adicijom taksona i kasnijim izmjenjivanjem grana metodom TBR (Tree Bisection and Reconnection) imajući tako sveukupni broj od 10000 stabala. Winclad program nam je olakšao kombinaciju različitih fragmenata gena u pojedinačnom skupu podataka za istovremene analize i pružio nam je dodatne statističke podatke za ta stable kao što su CI i RI koji pokazuju vrijednost homoplazije stabala. Potpora kladističkoj grupi je procijenjena preko Bootsrap testa koji se provodi u Winclada programu i zasnovana je na 1000 bootstrap kopija sa 20 ponavljanja i 10 početnih stabala po kopiji. Nekorigirane genetske udaljenosti između taksona za gen cox1 od najudaljenijih taksona su procijenjene programom Mega v.3.0 . Rezultati nekorigiranih genetetičkih udaljenosti su u Tablica 2.

Tablica 2: Nekorigirane genetičke udaljenosti gena cox1 između krajnjih taksona koje su analiziran u spomenutom radu. Kranji brojevi upisani uz vrstu N. baeticus označuju različite lokalitete iste vrste. Prilagođeno na temelju Lopez-Pancorbo i Ribera (2011.)

	obcaeca	**lusitan**	**luquei**	**baet5014**	**baet3860**	**baet3812**	**ionescui**	**cellula**	**eremita**
lusitanicus	0.173								
luquei	0.180	0.143							
baeticus5014	0.197	0.144	0.153						
baeticus3860	0.199	0.143	0.155	0.002					
baeticus3812	0.199	0.143	0.155	0.002	0.000				
ionescui	0.159	0.164	0.170	0.160	0.161	0.161			
cellulanus	0.153	0.168	0.176	0.168	0.169	0.169	0.110		
eremita	0.159	0.155	0.161	0.153	0.151	0.151	0.115	0.117	
NesticusX130	0.169	0.193	0.195	0.204	0.206	0.206	0.174	0.184	0.170

5 ZAKLJUČAK

Uzorci i sekvence analizirane u predstavljenom članku su navedene u tablica 1. Sravnjivanja dvaju mitohondrijskih gena i rezultati praznina prikazanih kao prisutno ili odsutno su spojeni i doveli su do kombiniranih matrica podataka od 950 karaktera (cox1=472, rrnL=456 i 22 karaktera praznina). Analize štedljivosti kombiniranih matrica dale su pojedinačno najštedljivije (most-parsimonius) stablo od 705 koraka (CI = 73 i RI = 62). Reprezentativno stablo prikazano je na slici 2.



Slika 2. : Stablo najveće štedljivosti ustanovljeno preko analize najveće štedljivosti (Maximum Parsimony) kombiniranih skupova podataka (cox1 = 472 bp, rrnl = 456 bp i 22 karaktera praznina) vrsta roda Nesticus sa Pirinejskog poluotoka (osim N.murgis), N. Ionescui iz Rumunjske i N. Eremita iz Hrvatske. Brojevi na čvorovima predstavljaju vrijednosti podupiranja bootstrap-a. Vanjska grupa Nesticus X130 podrijetlom je iz Kine. Krajnji brojevi kod vrste N. baeticus označuju uzorke sa različitih lokaliteta.

Rezultati pokazuju da vrste sa Pirinejskog poluotoka ne sačinjavaju monofiletsku grupu. *N. luquei*, *N. lusitanicus* i *N. baeticus* sp. n. formiraju kladističku grupu sa visokom podrškom bootsrap-a (99%), dok je *N. cellulanus* smještena unutar grupe koja uključuje *N. ionescui*, iz Rumunjske i *N. eremita* iz Hrvatske. *N. obcaecatus* je sestrinska grupa

ostalih vrsta unutar grupe. Takva raspodjela uz visoku genetsku divergenciju opaženu između *N. obcaecatus*, *N. cellulans* preostalih vrsta Pirinejskog poluotoka (Tablica 2) sugerira postojanje 3 nezavisnih kolonizacija Pirinejskog poluotoka. *N. obcaecatus* pokazuje na predstavljenom stablu filogenetsku jedinstvenost zbog bazalne pozicije na stablu, duboke genetske udaljenosti u usporedbi sa ostalim vrstama, troglobiontskih karakteristika i pojedinačnog lokaliteta. Zbog toga se pretpostavlja da je ta vrsta predstavlja relikt stare kolonizacije Pirinejskog poluotoka i trebala bi se proglasiti zaštićenom. Hipoteza Klimatskih relikata pretpostavlja da je prilagodba i specijacija špiljama bila potaknuta od strane klimatskih faktora. Glavnim krivcem za evoluciju špiljske faune u području Palearktika se smatraju glacijalni ciklusi geološke epohe Pleistocena (Barr 1968; Vandel 1958, 1964).

I morfološke analize spomenute u radu to potvrđuju (Lopez-Pacorbo i Ribera, 2011.). Ipak, da bi potvrdili ili odbacili pretpostavku, mora se napraviti molekularno filogenetička analiza svih mediteranskih pauka porodice Nesticidae na kojoj se trenutno i radi.

6 LITERATURA

Arnedo MA, Gillespie RG: **Species diversification patterns in the Polynesian jumping spider genus *Havaika* Prószyński, (Araneae, Salticidae).** Molecular Phylogenetics and Evolution 41 (2): 472–495 (2006)

Barr TC: **Cave ecology and the evolution of troglobites.** In: Dobzhansky T et al. (Eds) Evolutionary biology. K. Holland Pub. Co., 35–102. (1968)

Brower, Andrew V. Z.*:* **"Willi Hennig at 100".** Cladistics**.** (2013).

Hall TA (1999) BioEdit: **a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucleic Acids Symposium Series 41: 95–98.

Hillis DM & Bull JJ (**1993**): **An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis**. *Systematic Biology* **42**:182-192

Lopez-Pancorbo A. i Ribera C.: **Nesticus baeticus sp.n., a new troglobitic spider species from south-west Europe (Araneae, Nesticidae)**, Institut de Recerca de la Biodiversitat & Department de Biologia Animal. Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, Barcelona – 08028, Spain

Philippe, H.; Brinkmann, H.; Lavrov, D. V.; Littlewood, D. T. J.; Manuel, M.; Wörheide, G.; Baurain, D. Penny, David, ed. : ″**Resolving Difficult Phylogenetic Questions: Why More Sequences Are Not Enough**″. *PloS Biology*. 9 (3):e1000602.doi:10.1371/journal.pbio.1000602. PMC 3057953. PMID 214 23652. (2011).

Platnick NI.:**The world spider catalog**, Version 11.0.American Museum of Natural History (2011)

Reddell J.R.: **Encyclopedia of Caves**, The University of Texas at Austin (2012)

Savory T. : **Arachnida (2nd ed.)**, New York: Academic press (1977)

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P: **Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers**. Annals of the Entomological Society of America 87:651–701. (1994)

Sykes, B : ″**Mitochondrial DNA and human history**″. The Human Genome. Wellcome Trust. (2012)

Vandel A: **Biospeologie. La biologie des animaux cavernicoles.** Gauthier-Villars, Paris, 619 pp. (1964)

Wilson A. C. and Sarich V. M.**: A molecular time scale for human evolution**, by departmentsof biochemistry and anthropology, University of California, Berkeley, Communicated by Sherwood L. Washburn (1969)

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

http://www.isth.info/tools/blast/markers.php

https://bs.wikipedia.org/wiki/Kladistika

https://en.wikipedia.org/wiki/Cladogram

https://en.wikipedia.org/wiki/Computational_phylogenetics

https://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_phylogenetics

https://en.wikipedia.org/wiki/Models_of_DNA_evolution

https://en.wikipedia.org/wiki/Phylogenetic_tree

https://en.wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment

http://www.eurospiders.com/family_Nesticidae.htm

http://www.megasoftware.net/mega4/WebHelp/part_iv___evolutionary_analysis/constructing_phylogenetic_trees/statistical_tests_of_a_tree_obtained/bootstrap_tests/hc_bootstrap_test_phylogeny.htm

7 SAŽETAK

Molekularna filogenetika je grana filogenije koja analizira srodstvene razlike na molekularnoj razini, uglavnom se obazirući na DNA i RNA sekvence, kako bi dobila informacije o evolucijskom odnosu organizama i njihovoj evolucijskoj povijesti. Svrha molekularne filogenije je izraditi filogenetičko stablo od prikupljenog skupa podataka preko sekvenci gena poznatih kao molekularnih biljega. Cilj ovog rada je opisati primjerom kako teče proces molekularno filogenetskog istraživanja. U ovom radu je proces opisan primjerom dokazivanja nove vrste špiljskog pauka *Nesticus baeticus* López-Pancorbo & Ribera, 2011 i njegovog uspoređivanja po filogeniji sa ostalim vrstama roda *Nesticus* koje su endemične za prostor Pirinejskog poluotoka kako bi ustvrdili njihovu srodnost. Za izradu stabla korištena je metoda najveće štedljivosti (Maximum parsimony) gdje su koristili vrstu iz roda *Nesticus* Thorell, 1869 sa područja Kine kao vanjsku grupu te je bootstrap-testom provjerena pouzdanost svakog čvora. Kod analize gotovog stabla došlo se do zaključka da vrste roda *Nesticus* sa Pirinejskog poluotoka nisu unutar jedne monofiletičke grupe te se pretpostavlja da su nezavisno tri puta kolonizirali Pirinejski poluotok. Kako bi se pretpostavka potvrdila ili odbacila, treba se napraviti molekularno filogenetska analiza svih mediteranskih pauka iz porodice Nesticidae za bolji prikaz evolucijskih događaja i kako bi se testirao molofiletički status trenutnog roda.

8 SUMMARY

Molecular phylogenetics is a branch of phylogenetic analyzes of kinship differences at the molecular level, largely considering the DNA and RNA sequences, in order to obtain information about the evolutionary relationship of organisms and their evolutionary history. The purpose of the molecular phylogeny is to draw design a phylogenetic tree of the collected data set of sequences of genes known as molecular markers. The objective of this paper is to describe an example of the procedure of a study in molecular phylogenetics. In this paper, the procedure is described by how to prove a new species of cave spiders - Nesticus baeticus López-Pancorbo & Ribera, 2011 and its comparison in phylogeny with the other species of the genus Nesticus that are endemic to the area of the Iberian Peninsula. To create a tree they used the method of Maximum parsimony where they used a species form the genus Nesticus which is located in China as an outgroup and with the bootstrap test they checked the reliability of each node. In the final analysis of the tree, they came to the conclusion that all the species from genus Nesticus located on the Iberian Peninsula are not within the same monophyletic group and it is assumed that they colonized the Iberian Peninsula independently three times. To confirm or reject the hypothesis, the future research should be focused on resolving the philogeny of the Mediterranean Nesticidae and will include most of the Mediterranean species to test the molophyletic status of current genera.

.