

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE  
ŠTUDIJSKI PROGRAM BIODIVERZITETA

Mojca BAČNAR

**UPORABA DEGRADIRANE DNA PRI TAKSONOMSKEM  
DOLOČANJU S POMOČJO SISTEMA ČRTNIH KOD**

Zaključna naloga

(Mentor: doc. dr. Elena Varljen Bužan, Somentor: dr. Jure Jugovic)

Koper, 2013

## POVZETEK

Muzeji so postali nenadomestljivi viri bioloških zbirk, z velikim številom vrst, ki zajemajo široko taksonomsko območje. Zbrani muzejski viri zagotovijo zadostno količino dovolj kvalitetne DNA, da se jo skozi molekularno sistematiko, filogenijo in evlucijske študije lahko uporabi za opisovanje in razumevanje biodiverzitete. Količina in kakovost DNA muzejskih osebkov je predvsem odvisna od načina shranjevanja, obdelave in starosti vzorcev.

Sistem črtnih kod DNA je taksonomska metoda, pri kateri uporabljamo kratek odsek DNA, ki vsebuje dovolj informacije, da lahko na njeni podlagi predstavnika neznane vrste uvrstimo v znano taksonomsko skupino. Zaradi kratkih odsekov identifikacijske DNA lahko analiziramo vzorec tudi v primeru degradirane DNA.

DNA analiza se prične z izolacijo, nadaljuje s PCR (verižna reakcija s polimerazo) ter agarozno gelsko elektroforezo, na koncu pa se določi nukleotidno zaporedje določenega gena. V našem primeru smo določevali nukleotidno zaporedje mitohondrijskega gena za citokrom b (cyt b), ki je poleg mitohondrijske kontrolne regije (splošno sprejetega markerja za določanje na osnovi sistema črtnih kod) zelo primeren in zanesljiv molekularski marker za identifikacijo vrst.

V raziskavi smo analizirali 15 vzorcev kože vrste opic nosan (*Nasalis larvatus*), saj smo pri pomnoževanju DNA zaradi slabe kakovosti težko pomnoževali odseke daljše od 179bp.

Preverili smo povezave med danimi spremenljivkami: masno koncentracijo, krivuljo grafa absorbance ter uspešnostjo PCR. Uporabili smo Spearmanov koeficient korelacije. V našem primeru se je pokazala zmerno visoka pozitivna povezava med masno koncentracijo in krivuljo (Spearman's  $\rho=0,52$ ;  $p<0,05$ ), med ostalimi pari spremenljivk pa statistično pomembnih povezav ni bilo.

## ABSTRACT

Museums have become unreplaceable source of biological collections with large numbers of species that cover many taxonomic groups. Collected museum sources store quality DNA for understanding and describing of biodiversity through phylogenetic and evolution studies. Quantity and quality of DNA from museums specimens is depended on preserving, treatment and age of the samples.

DNA barcode is the taxonomy method where we use a short DNA fragment that comprise information sufficient for recognizing the species rank of the analysed animal. As short fragments of DNA are used for identification, even in the case of degraded DNA samples can be determined to the species level.

The DNA analysis starts with isolation, continues with PCR (polymerase chain reaction), agarose gel electrophoresis and in the end a nucleotide sequence of a particular gene is determined. In our case we analyzed sequence of mitochondrial gene for cytochrome b (in addition to general adopted marker for mitochondrial control region COI) is suitable and reliable marker for species identification.

We managed to analyse only 15 samples of skin species *Nasalis larvatus*. The main reason for limited numbers were problems in DNA multiplying sequences. Hence, only sequences up to 179bp long were produced.

We have checked all the relations of the given variables: mass concentrations, absorbance graph curve and performance of PCR. Spearman's correlation coefficients were used. A moderately high positive correlation had been shown only between mass concentration and absorbance graph curve (Spearman's  $\rho=0,52$ ,  $p<0,05$ ). There was no statistically significant correlations between other pairs of variables.

## KAZALO VSEBINE

1 UVOD .....	1
1.1 Raziskovalni problem .....	1
1.2 Analiza muzejske DNA .....	1
1.3 Sistem črtnih kod DNA .....	2
1.3.1 Uporaba pri identifikaciji organizmov .....	3
1.4 Citokrom b .....	4
1.5 Degradacija DNA .....	5
1.6 Namen in cilji zaključne naloge .....	5
1.7 Delovne hipoteze .....	5
2 MATERIAL IN METODE .....	6
2.1 Laboratorijsko delo .....	6
2.1.1 Protokol izolacije DNA .....	6
2.1.2 Preverjanje koncentracije izolirane DNA .....	7
2.1.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	7
2.1.4 Agarozna gelska elektroforeza .....	9
2.1.5 Določevanje nukleotidnega zaporedja .....	10
2.2 Statistična analiza .....	11
2.2.1 CodonCode aligner 1.63 .....	11
2.2.2 BLAST .....	11
2.2.3 SPSS .....	11
2.3 Rangiranje podatkov .....	12
2.4 Vrednost absorbance .....	12
3 REZULTATI .....	15
3.1 Analiza sekvenc .....	15
3.1.1 Kontaminacije .....	16
3.2 Odvisnost med spremenljivkami .....	17
4 DISKUSIJA .....	19
5 SKLEPI .....	21
6 SEZNAM VIROV IN LITERATURE .....	22
ZAHVALA .....	26
PRILOGE .....	27

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Ponavljanje PCR reakcij.....	15
Preglednica 2: Kontaminacija vzorcev.....	16
Preglednica 3: Tabela s spremenljivkami.....	17
Preglednica 4: Soodvisnost danih spremenljivk.....	17

## KAZALO SLIK

Slika 1: Koraki PCR reakcije.....	8
Slika 2: Primeri grafov absorbanca.....	14

## SEZNAM SIMBOLOV IN OKRAJŠAV

DNK: Deoksiribonukleinska kislina (angl. »DNA: Deoxyribonucleic acid«)

mtDNA: Mitohondrijska DNA

PCR: Verižna reakcija s polimerazo (angl. »Polymerase chain reaction«)

COI: Kontrolna regija

ExoI: Eksonukleaza 1

AP: Alkalna fosfataza (angl. »Alkaline Phosphatase«)

A: Adenin (baza)

T: Timin (baza)

C: Citozin (baza)

G: Gvanin (baza)

bp: Bazni pari

cyt b: Citokrom b

trnH-psbA: Medgenski vmesnik

rbcL in matK: Kloroplastni regiji

# 1 UVOD

## 1.1 Raziskovalni problem

Raznolikost molekularnih tehnik za uspešno izolacijo DNA iz različnih tkiv je v zadnjih dvajsetih letih močno narasla. Po svetu imamo veliko bioloških zbirk z velikim številom vrst, ki zajemajo široko taksonomsko območje. Možnost izolacije uporabne DNA je povzdignila muzeje v nenadomestljive vire za nadaljnje raziskave. Sodobna taksonomija se vse bolj naslanja na nova spoznanja molekularne biologije, ki ponuja učinkovite raziskovalne kriterije in omogoča razvrščanje na temelju genetske podobnosti. To pomeni, da lahko na tej osnovi ugotovljamo tudi evolucijska (razvojna), t.i. filogenetska razmerja med organizmi. Pri sesalcih črtne kode nimajo toliko vloge, ker je večina vrst taksonomsko znanih, vendarle so pomembni pri določanju filogenetskega koncepta vrste (na primer pri prepoznavanju taksonomskih skupin, ki se samostojno razvijajo–evoluirajo) (Kryštufek, 1999). Pridobivanje in obdelava muzejske DNA se lahko izkaže za problematično v primeru degradirane DNA, kjer je analiza dosti zahtevnejša.

## 1.2 Analiza muzejske DNA

Muzejske zbirke so vir visoke koncentracije DNA, ki se skozi molekularno sistematiko, filogenijo in evolucijske študije lahko uporabi za opisovanje in razumevanje sorodstvenih odnosov med vrstami, rodovi, družinami. Poleg tega muzejske zbirke zagotavljajo dostop do zgodovinskih intraspecifičnih genetskih vzorcev. Iz teh vzorcev lahko podamo oceno o genetskih variacijah vrst v naraščanju oz. upadanju (Higuchi in sod., 1984; Wandeler in sod., 2007). Prve molekularne študije muzejskih vzorcev so bile objavljene v sredini osemdesetih ter začetku devetdesetih let in število dokumentov o uporabi muzejskih primerkov za molekularne raziskave je od takrat začelo vztrajno naraščati (Higuchi in sod., 1984; Thomas in sod., 1990; Roy in sod., 1994; Taylor in sod., 1994).

Uspeh verižne reakcije s polimerazo (PCR) temelji na pomnoževanju zadostnega števila kopij molekule DNA. Količina in kakovost DNA muzejskih osebkov je predvsem odvisna od načina hranjenja, obdelave in starosti vzorcev (Wandeler in sod., 2007). Po dolgih letih hranjenja vzorcev se DNA uničuje, zato je mitohondrijsko DNA (mtDNA) lažje pomnoževati, ker je v celici prisotna v večjem številu kopij.

Za genetske analize je potrebno izbrati vzorce, ki bodo zagotovili ustrezno količino in kakovostno DNA. Pri muzejskih vzorcih je pogosta možnost izbire med različnimi tkivi, v nekaterih je DNA bolje ohranjena kot v drugih. Vedno pa je potrebno paziti, da pri odvzemu tkiva čim manj poškodujemo vzorec (Rohland in sod., 2004; Wisley in sod., 2004).

### 1.3 Sistem črtnih kod DNA

Sistem črtnih kod DNA (angl. »DNA barcoding«) je taksonomska metoda, pri kateri uporabljamo kratek odsek DNA, ki vsebuje dovolj informacije, da lahko na njihovi podlagi predstavnika neznane vrste uvrstimo v znano taksonomsko skupino. Od molekularne filogenije se razlikuje v tem, da glavni cilj ni klasifikacija, ampak identifikacija neznanega vzorca glede na znano klasifikacijo (Kress in sod., 2005).

Izraz »sistem črtnih kod DNA« je v uporabi šele od leta 2002 (Floyd, 2002). Metodologija določanja organizmov na podlagi nukleotidnih zaporedij pa je veliko starejša (Wilson, 1995). Novost principa črtnih kod je v določitvi enotnega odseka DNA (na podlagi genskega označevalca), ki bi bil uporaben pri identifikaciji vseh živih bitij. Kljub večletnemu delu na tem področju, so mnenja glede enotnega označevalca, ki bi bil primeren za identifikacijo vseh taksonov, še vedno deljena.

Želene lastnosti črtnih kod DNA pa so dokaj jasno opredeljene (Valentini, 2008):

- 1) Odsek mora biti standardiziran, tj. isti odsek mora biti uporaben pri različnih taksonomskih skupinah.
- 2) Odsek mora vsebovati dovolj filogenetske informacije, da se na njegovi podlagi osebek lahko razporedi v ustrezno taksonomsko skupino (vrsto, rod, družino...).
- 3) Odsek mora imeti ohranjena mesta za vezavo začetnih oligonukleotidov in mora omogočati enostavno pomnoževanje odseka ter določanje nukleotidnega zaporedja (to je zlasti pomembno pri kompleksih vzorcih iz narave, na primer vzorcih zemlje, pri katerih želimo identificirati veliko vrst naenkrat).
- 4) Odsek mora biti dovolj kratek, da ga lahko pomnožimo tudi v primeru degradirane DNA (fragmenti, krajši od 150 bp) (Valentini, 2008).

Valentini in sod. (2008) določanje s sistemom črtnih kod DNA delijo na določanje v širšem in v ožjem smislu. Določanje v ožjem smislu (*sensu stricto*) se nanaša na identifikacijo vrst na podlagi enega samega standardnega zaporedja DNA, medtem ko določanje s črtnimi kodami DNA v širšem smislu (*sensu lato*) označuje identifikacijo na kakršnemkoli taksonomskem nivoju na podlagi kateregakoli zaporedja DNA, tudi če ni priznana standardna črna koda DNA.

Za uvrstitev v znano taksonomsko skupino se pri živalih in nekaterih drugih evkariontih najpogosteje uporablja regija podenote mitohondrijske kontrolne regije (COI), ter citokrom b (cyt b) (Barcoding animal life), pri rastlinah pa regiji kloroplastne DNK *rbcL* in *matK* (Fišer Pečnikar in Varljen Bužan, 2011).

Poleg uporabe črtnih kod DNA v taksonomiji raziskovalci napovedujejo vedno večjo uporabo takih informacij tudi v drugih naravoslovnih panogah, na primer v varstveni biologiji (trgovanje z zavarovanimi vrstami, vnos potencialno invazivnih vrst), medicini (identifikacija

medicinsko pomembnih patogenov in njihovih vektorjev) ali farmaciji (identifikacija zdravilnih čajnih mešanic) (Fišer Pečnikar in Varljen Bužan, 2011). Metoda je uporabna tudi pri analizi prehrane živali, zlasti če se hranijo s tekočo hrano (Valentini in sod., 2008), ter pri nadzoru živil (Valentini in sod., 2008; Ward in sod., 2009) in trgovini z ogroženimi vrstami (Savolainen in sod., 2005; Valentini in sod., 2008). Precej se omenja še možnost ugotavljanja diverzitete v okoljskih vzorcih na podlagi analize nukleotidnih zaporedij DNA (Holterman in sod., 2008; Neigel in sod., 2007).

### **1.3.1 Uporaba pri identifikaciji organizmov**

Identifikacija vzorcev preko sistema črtnih kod temelji na dejstvu, da se v genomu dveh vrst, četudi sta si morfološko izjemno podobni, nahaja dovolj razlik, da se ju na njihovi podlagi uvrsti v dve ločeni taksonomski enoti (Fišer Pečnikar in Varljen Bužan, 2011). Zahtevno vlogo prestavlja identifikacija organizmov na podlagi morfoloških znakov. Številne vrste so si tako podobne, da jih lahko prepoznajo le strokovnjaki, specializirani za posamezno skupino organizmov (Hebert in sod., 2003a). V določenih primerih pa je določanje na podlagi morfoloških znakov nemogoče. To so primeri živali, ki imajo kompleksen razvojni krog, sestavljen in različnih stadijev. Včasih so lahko vzorci poškodovani ali pa imajo strokovnjaki za identifikacijo na voljo le majhen del tkiva. V slednjem primeru je določanje s pomočjo morfoloških znakov nemogoče. Podobno kot razvojni krog pri živalih velja tudi za številne rastline, ki so pogosto v vegetativnem stanju (brez cvetov ali plodov) le takih ne moremo določiti do vrste. Vrstna identifikacija vzorcev je pogosto ključnega pomena, še posebno, ko gre za prepoznavanje izdelkov iz ogroženih vrst, kmetijskih škodljivcev, invazivnih vrst, patogenih organizmov, živalskih prenašalcev bolezni oz. vektorjev (vmesnih gostiteljev), zajedavcev (parazitov) ter zdravilnih ali strupenih rastlin (Casiraghi, 2010). Strokovnjakov na področju taksonomije je vedno manj, število odkritih vrst pa je vedno višje. Zaradi omenjenih dejstev postajajo pri identifikaciji vse bolj pomembna molekularna orodja.

Pri vretenčarjih sistem črtnih kod temelji na 648 baznih parov dolgi regiji na mitohondrijski kontrolni regiji (COI), uporablja pa se tudi na mitohondrijskemu genu za citokrom b (cyt b) (Kochzius in sod., 2010). Trenutno so v javno dostopni bazi GenBank (angl. »genetic sequence database«) shranjena nukleotidna zaporedja za približno 60000 različnih vrst živali. Mitohondrijski genom je za identifikacijo s črtnimi kodami primernejši kot jedrni genom, saj ne vsebuje intronov, je manj izpostavljen rekombinaciji in je haploiden, kar omogoča enostavnejšo in nedvoumnejšo analizo njegovih nukleotidnih zaporedij (Hebert in sod., 2003a; Hebert in sod., 2003b). Zaporedji COI ter cyt b sta visoko spremenljivi, mutacije so večinoma substitucijskega tipa in ne vstavitve ali izbrisi, ki bi otežile poravnavanje nukleotidnih zaporedij (Lynch, 1993). Na splošno je znano, da vsebuje gen COI višji filogenetski signal kot katerikoli drugi mitohondrijski gen. Zaradi pogostih substitucij na tretjem mestu v kodonu poteka njegova evolucija dovolj hitro, da omogoča diskriminacijo na različne vrste in celo na linije znotraj posameznih vrst (Cox, 2001). V primeru degradirane DNA je primerna dolžina že okrog 109 bp (Hajibabaei in sod., 2007).



Pri rastlinah je iskanje črtne kode dosti bolj zahtevno kot pri živalih. Pri rastlinskem genomu najdemo nižjo heterogenost kot pri živalskem. Ker pri rastlinah mitohondrijska regija COI ni primerna za razlikovanje, so botaniki kar nekaj časa posvetili iskanju odseka DNA, ki bi ustrezal COI pri živalih (Fišer Pečnikar in Varljen Bužan, 2011). Nekaj časa se je kot najbolj ustrezno regijo omenjalo zaporedje jedrne regije ITS (angl. »Internal Transcribed Spacer«) in kloroplastnega medgenskega vmesnika trnH-psbA (Kress, 2005). Z izboljšanjem poznavanja začetnih oligonukleotidov ter večanjem njihove dostopnosti pa se je v zadnjih letih razširil tudi izbor potencialnih regij za črtne kode rastlin. Kljub temu kaže, da pri rastlinah ne obstaja nobena regija, ki bi bila tako spremenljiva, kot je pri živalih odsek COI in cyt b (Fišer Pečnikar in Varljen Bužan, 2011).

Iskanje ustrezne regije za črtno kodo DNA se je pri rastlinah osredotočilo na kloroplastni genom, ki predstavlja alternativo živalskemu mitohondrijskemu genomu. Kloroplastni genom je za črtne kode ustrezen, saj se v vsaki celici nahaja v visokem številu kopij in ga sestavlja ohranjeno zaporedje genov, njegova slaba lastnost pa je relativno nizka stopnja evolucije. Znanstveniki so se tako osredotočili na iskanje regije znotraj kloroplastnega genoma, ki bi se relativno hitro spreminjala, po drugi strani pa bi morala biti regija dovolj ohranjena, da bi bila prisotna pri vseh (kopenskih) rastlinah in bi jo bilo mogoče pomnožiti na enostaven način (z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi) (Fišer Pečnikar in Varljen Bužan, 2011).

Za ostale organizme si glede črtnih kod raziskovalci še niso enotni. Regijo COI se za enkrat uporablja tudi pri nekaterih nevretenčarskih skupinah, na primer spužvah in koralah (Moura, 2008; Worheide in Erpenbeck, 2007), pri morskih planktonskih ličinkah (Heimeier in sod., 2010) ter pri nekaterih invazivnih vrstah, prisotnih v balastnih vodah (Briski in sod., 2010). Pri nekaterih drugih skupinah, na primer glistah, regijo COI nadomeščajo zaporedja ribosomskih genov (Floyd in sod., 2002; Holterman, 2008; Virgilio in sod., 2010). Zaporedje COI se je izkazalo za neuporabno tudi pri določanju ožigalkarjev zaradi premajhne raznolikosti mitohondrijskega genoma (Hebert in sod., 2003a; Shearer in Coffroth, 2008). Le pri nekaterih glivah se kot ustrezno regijo uporablja COI, torej istega kot za živali (Ratnasingham in Hebert, 2007). Pri nekaterih drugih skupinah gliv pa ta gen ni uporaben, kar onemogoča univerzalno uporabo za vse glive. V zadnjem času predstavlja potencialnega kandidata tudi jedrna regija ITS (Seena in sod., 2010).

## 1.4 Citokrom b

Gen za citokrom b je dolg 1140 bp in nosi gensko informacijo za transmembranski protein citokrom b. Evolucijska dinamika gena je podobna kot pri drugih genih, ki kodirajo za funkcionalne proteine (Wilson, 1985). Vzrok za večino variacij med nukleotidnimi zaporedji gena za cyt b so substitucije (sinonimne; tihe mutacije) na tretjem mestu kodona (Hatefi, 1985). Del proteina na zunanji površini se spreminja izredno počasi, kar velja tudi za nukleotidno zaporedje, ki kodira ta del beljakovinske molekule. Protein je najbolj spremenljiv v transmembranskem, hidrofobnem delu ter na njegovih amino- in karboksi- koncih. Za

določene dele cyt b, ki so pomembni za njegovo terciarno strukturo (in posledično za aktivnost) kot tudi za promotorske regije v bližini strukturnega gena, so namreč značilne regije, ki so podvržene močnim selekcijskim pritiskom in so evolucijsko zelo ohranjene. Ker tudi med sorodstveno oddaljenimi vrstami v teh regijah ni veliko razlik, so pomembne za konstrukcijo “univerzalnih” začetnih oligonukleotidov, ki prepoznajo določeno zaporedje nukleotidov v ohranjenem delu gena za cyt b (Irwin in sod., 1991).

## 1.5 Degradacija DNA

Degradacija DNA je lahko rezultat več dejavnikov, največkrat pa gre za:

- 1) Uporaba zelo starih vzorcev DNA.
- 2) Uporaba DNA, ki je bila ekstrahirana iz vzorcev, ki so bili hranjeni v formalinu.
- 3) Uporaba večkrat zamrznjenih in odtajanih vzorcev.
- 4) Uporaba DNA vzorcev, shranjenih na sobni temperaturi.
- 5) Uporaba DNA vzorcev, ki so bili izpostavljeni vročini ali fizični deformaciji.
- 6) Uporaba slabo očiščenih DNA vzorcev (ostanek nukleaz) (Appliedbiosystems).

## 1.6 Namen in cilji zaključne naloge

V zaključni nalogi smo se osredotočili predvsem na spoznavanje in preverjanje uporabnosti metodologije sistema črtnih kod za taksonomsko identifikacijo. Zanimalo nas je, kateri problemi lahko nastanejo pri uporabi metodologije, zato smo se raziskave lotili obratno, kot je običajno. Pridobili smo muzejske vzorce opic nosan (*Nasalis larvatus*) in poskušali s kratkimi fragmenti gena za cyt b (ki je pri sesalcih uveljavljen marker za taksonomsko določanje), preveriti natančnost identifikacije s sistemom črtnih kod in poiskati korelacije med različnimi spremenljivkami. Zanimalo nas je tudi, ali so odvisnosti med pari spremenljivk, masno koncentracjo DNA v izoliranem vzorcu, krivuljo absorbance izolata ter uspešnostjo PCR (ter zaporedja baznih parov v pridobljeni sekvenci) statistično značilne.

## 1.7 Delovne hipoteze

- 1) Degradirani vzorci vsebujejo poškodovano DNA, kar otežuje določanje nukleotidnega zaporedja.
- 2) Obstaja statistično značilna odvisnost med proučevanimi spremenljivkami (koncentracijo DNA v izoliranem vzorcu, krivuljo absorbance izolata ter uspešnostjo PCR).

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 Laboratorijsko delo

Laboratorijsko delo je potekalo v Laboratoriju za molekularno ekologijo, Znanstveno raziskovalnega središča, Univerze na Primorskem.

Za raziskovalno delo smo pridobili tkivne vzorce strojenih kož vrste opic nosan, ki jih je prispeval Prirodoslovni muzej v Münchnu, Nemčija. Za izolacijo DNA smo uporabili 110 vzorcev, za nadaljnjo obdelavo pa le 20 vzorcev.

#### 2.1.1 Protokol izolacije DNA

Za izolacijo DNA smo uporabili QIAamp DNA Mini kit (Qiagen). DNA je bila izolirana iz posušenih muzejskih vzorcev po predvidenem protokolu proizvajalca.

##### 1) Priprava tkiva na izolacijo

S skalpelom smo iz vzorca izrezali kos tkiva v približni velikosti 2x2 mm. Košček smo nato razrezali še na manjše dele ter v terilnici zmacerirali. Pripravljeno tkivo smo prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko. Zaradi omejevanja in preprečevanja možnosti kontaminacije smo pri vsakem razrezu novega vzorca uporabili svežo brisačo, na kateri smo rezali ter skalpel sprali z etanolom ter ga obžgali nad plamenom.

##### 2) Liza tkiva

Je postopek, pri katerem liziramo (razbijemo) celice in dobimo DNK v mediju. V pripravljeno mikrocentrifugirko z vzorcem smo odpipetirali 180  $\mu$ L pufra za lizo (ATL buffer) in 20  $\mu$ L encima proteinaze K. Vsebinsko smo dobro premešali na vorteksu ter inkubirali pri 56 °C vsaj 4 ure oz. dokler celotno tkivo ni bilo lizirano (najpogosteje smo lizirali tkivo celo noč).

Ko je bilo tkivo lizirano, smo dodali 200  $\mu$ L AL pufra, dobro premešali (15 sekund na vorteksu), inkubirali 10 minut pri temperaturi 70 °C ter kratko centrifugirali, da smo odstranili morebitne kapljice s sten in pokrovčka mikrocentrifugirke.

Nadaljevali smo z dodajanjem 200  $\mu$ L 96 % etanola, ki deluje kot inhibitor za uporabljene encime. Vsebinsko mikrocentrifugirke smo dobro premešali in kratko centrifugirali.

##### 3) Vezava DNA na kolono

Dobljeno raztopino smo odpipetirali (približno 650  $\mu$ L) iz mikrocentrifugirke na kolono (QIAamp Spin Column). Pri tem smo pazili, da nismo zmočili obročka na vrhu kolone. Kolono z dodano raztopino smo 1 minuto centrifugirali na 8000 obratih/minuto. Če celotna vsebina kolone ni prešla v zbiralno epico, smo ponovili centrifugiranje. Filtrat smo zavrgli, kolono pa prestavili v novo 2 mL kolekcijsko epico.

#### 4) Čiščenje DNA

V kolono smo odpipetirali 500  $\mu\text{L}$  prvega čistilnega pufru (Buffer AW1) in jo centrifugirali 1 minuto pri 8000 obratov/minuto. Filtrat smo zavrgli, kolono pa prenesli v novo mikrocentrifugirko ter dodali 500  $\mu\text{L}$  drugega čistilnega pufru (Buffer AW2). Centrifugirali smo 3 minute pri največji možni hitrosti, ki je znašala 13200 obratov/minuto. Filtrat smo zavrgli, kolono pa ponovno prenesli v čisto mikrocentrifugirko ter ponovno centrifugirali, vendar le 1 minuto pri največji možni hitrosti.

#### 5) Ekstrakcija DNA iz kolone

Kolono smo prenesli v novo 1,5 mL mikrocentrifugirko. Na kolono smo odpipetirali 70  $\mu\text{L}$  elucijskega pufru (AE buffer) in jo inkubirali 20 minut na sobni temperaturi. Temu je sledilo centrifugiranje za 1 minuto pri 8000 obratih/minuto.

### 2.1.2 Preverjanje koncentracije izolirane DNA

Po izolaciji smo preverili kakovost izolirane DNA (koncentracijo in čistočo) na spektrofotometru Epoch. Za optimalno določitev smo porabili 3  $\mu\text{L}$  vzorca DNA.

Koncentracijo RNA ali DNA vzorcev lahko preverimo spektrofotometrično. Dušikove baze nukleotidov imajo največjo absorbanco pri valovni dolžini 260 nm. V nasprotju z nukleinskimi kislinami imajo proteini največjo absorbanco pri valovni dolžini 280 nm, predvsem zaradi triptofanskih ostankov. Če ima vzorec DNA najvišjo absorbanco okoli 280 nm, je najverjetneje v vzorcu prišlo do kontaminacije s proteini.

Razmerje med absorbancami vzorca pri 260 nm in absorbanco pri 280 nm nam pove čistost naše DNA. Razmerje med absorbancami mora biti med 1,8–2,0 (Clark in Christopher, 2000).

### 2.1.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

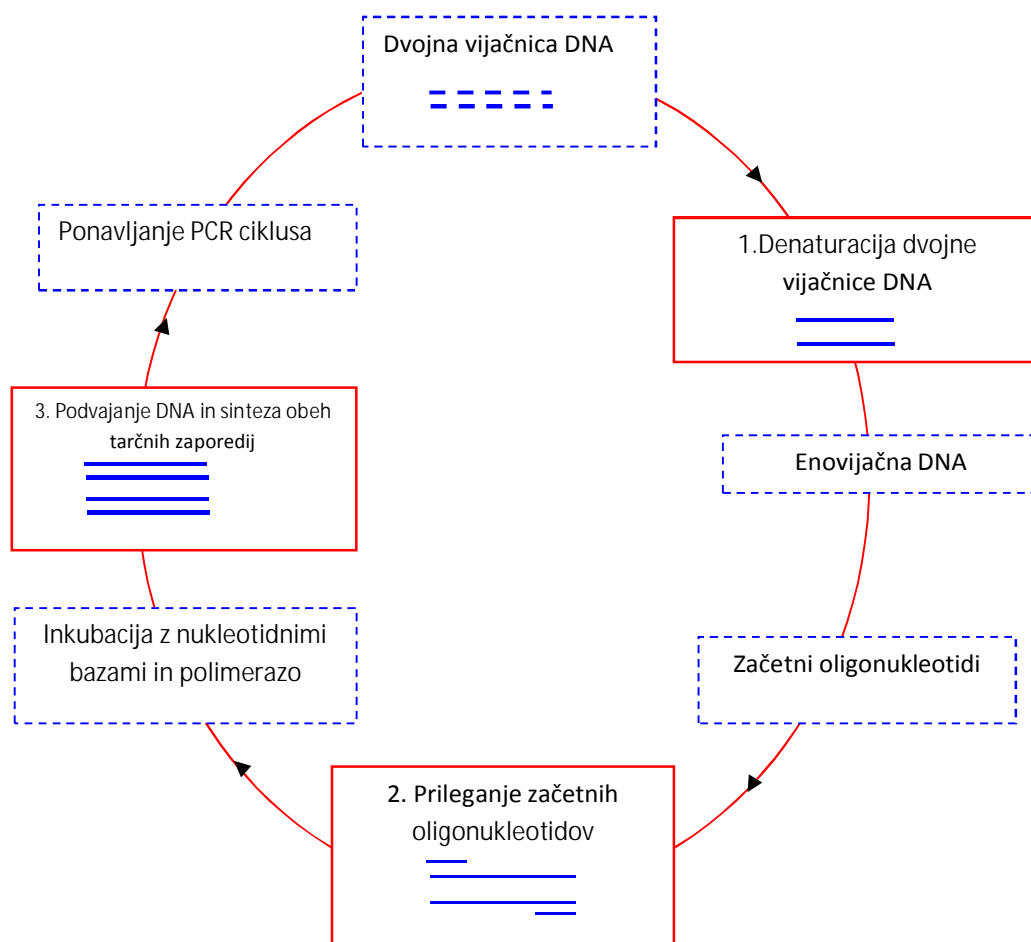
Verižna polimerizacija (PCR) je metoda za pomnoževanje DNA *in vitro*. Za izvedbo verižne polimerizacije (PCR) uporabljamo pomnoževalnik (angl. »thermo cycler«), ki nam omogoča vnos in natančno izvedbo programa z ustreznimi temperaturami in časovnimi intervali.

PCR poteka v treh korakih (Slika 1) (Logan, 1994):

- 1) Denaturacija dvojne vijačnice DNA v enovijačno DNA poteka pri visokih temperaturah (95–96 °C).
- 2) Prileganje oligonukleotidnih začetnikov (angl. »primer«) na oba konca enovijačne DNA (matrična DNA). Začetni oligonukleotidi so zasnovani tako, da so komplementarni matrični DNA, kar daje metodi PCR tudi specifičnost. Delovna temperatura je odvisna od nukleotidnega zaporedja oligonukleotidnih začetnikov. V povprečju je to med 55–65 °C. Temperatura je odvisna tudi od vodikovih vezi med komplementarnimi bazami A/T in C/G in sestave oligonukleotida. Število vodikovih vezi vpliva na temperaturo tališča ( $T_m$ ) nukleotidnega zaporedja začetnikov. Tam je temperatura, pri kateri so določeni oligonukleotidi še povezani, drugi pa ne, oziroma

temperatura, pri kateri se začetnika odlepita od DNA oziroma prilegata. Temperatura prileganja mora biti višja od temperature tališča. Začetnika morata biti med seboj nekomplementarna, da se ne bi zlepila. Polimerizacija DNA verige poteka v smeri 5'-3' in verigi, ki nastaneta, sta antiparalelni.

- 3) Podaljševanje začetnikov poteka po dodatku štirih nukleotidnih baz in DNA polimeraze. Uporablja se rekombinantna Taq-DNA polimeraza, ki zaradi toplotne odpornosti omogoča denaturacijo in ohlajanje pri višjih temperaturah.



Slika 1: Koraki PCR reakcije (Logan, 1994).

En PCR cikel obsega korake od 1–3. Po končanem ciklu dobimo dva dvovijačna odseka DNA, ki sta popolnoma enaka odseku matrične DNA. Po vsaki ponovitvi cikla se sintetizira nov odsek matrične DNA. Teoretično dobimo v vsakem ciklu  $2^n$  več kopij. Običajno ta postopek ponovimo 30 do 45-krat.

PCR metodo uporabljamo za pomnoževanje določenega odseka DNA do tolikšne mere, da odsek DNA lahko analiziramo (Bužan, 2007). Pri svojem delu smo za preliminarne raziskave

uporabili fragmente dolge od 434 do 623 bp. Zaradi neuspešnosti PCR smo na koncu uporabili fragmente dolge le 179 bp.

### PCR Protokol

Za PCR mešanico smo uporabili pufre in Taq polimerazo proizvajalca Fermentas. Gen za cyt b smo poskusili pomnožiti z uporabo univerzalnih začetnih nukleotidov L15318S (Richard in sod., 2003) in H15497-SP (Jaarola in sod., 2004).

Reakcijska mešanica s končnim volumnom 15 mL je bila sestavljena iz: 0,45  $\mu$ L vsakega od začetnih oligonukleotidov, 1,5  $\mu$ L pufra s KCl ali  $\text{NH}_4$ , 1,5  $\mu$ L  $\text{MgCl}_2$ , 0,3  $\mu$ L dNTP-jev, 0,4  $\mu$ L Taq polimeraze (Qiagen) in 4,4  $\mu$ L  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Za posamezen vzorec smo uporabili 9  $\mu$ L reakcijske mešanice in 6  $\mu$ L DNK vzorca.

Za pomnoževanje mitohondrijskih genov smo uporabili temperaturni profil DINNUC 48:

95 °C 7 minut	_____	1 cikel: Denaturacija
94 °C 1 minuta		
48 °C 1 minuta	}	45 ciklov: Prileganje zažetnih oligonukleotidov
72 °C 2 minuti		
72 °C 10 minut	_____	1 cikel: Podaljševanje

#### 2.1.4 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozno gelsko elektroforezo uporabljamo za ločevanje, prepoznavo pa tudi čiščenje DNK fragmentov. Gostota gela je odvisna od koncentracije agaroze. Ločevanje molekul temelji na potovanju molekul z električnim nabojem skozi agarozni gel v enosmernem električnem polju. Fragmenti DNA z negativnim nabojem potujejo znotraj gela od negativnega proti pozitivnemu polu s hitrostjo, ki je obratno sorazmerna logaritmu njihove molekulske mase (Andrews, 1986). Zaradi tega manjši fragmenti potujejo hitreje. Kakovost ločevanja fragmentov je odvisna predvsem od moči električnega polja, gostote gela in časa ločevanja. Za ločitev večjih fragmentov (nad 1000 bp) so primerni geli z nizko gostoto (približno 0,7 %), medtem ko je za učinkovito ločevanja krajših fragmentov primeren 1,5-odstoten gel. S povečevanjem časa potovanja molekul se povečuje tudi razdalja med posameznimi različno velikimi fragmenti, posledično pa tudi ločljivost fragmentov. Posebej velja opozoriti, da pri prevelikih napetostih potujejo delci na sredini gela hitreje kot na robu proge, kar lahko moti vrednotenje rezultatov.

Pri gelski elektroforezi smo uporabljali 1,5-odstoten gel (primeren za ločevanje fragmentov, dolgih od 200 do 4000 bp). Vlivali smo jih v modele z majhnim volumnom, čas strjevanja pa je bil od 15 do 20 minut. V žepke na agaroznem gelu smo dodali mešanico 5  $\mu\text{L}$  izolirane DNA ali produkta PCR reakcije, ki smo jo predhodno premešali s 3  $\mu\text{L}$  aplikacijskega pufra (angl. »loading dye«). Aplikacijski pufer obarva vzorce, da postanejo vidni, s čimer lahko sledimo njihovu potovanju po gelu. V zadnji žepki (navadno robni) smo dodali molekularni označevalec velikosti (angl. »gene ladder«). To je raztopina DNA z različno dolgimi fragmenti, ki se med seboj razlikujejo za 100 bp. Molekularni označevalec nam omogoča določitev dolžine posameznih fragmentov. Po elektroforezi smo gel obarvali z etidijevim bromidom. Molekularni etidijev bromid se vrine med baze nukleinskih kislin in pod vplivom UV svetlobe fluorescira z večjo jakostjo (v oranžnem delu vidnega spektra) kot proste molekule DNK. Za vizualizacijo »obarvanih« PCR produktov in slikanje gela se uporablja UV-transiluminator (Hladnik, 2012). Po končanem barvanju smo gel spirali, da smo odstranili nevezani etidijev bromid.

Gelska elektroforeza je potekala v boratnem pufrskem sistemu (1X TBE) 30 minut pri napetosti 120 V. Temu je sledilo 10–20 minut barvanja z etidijevim bromidom. Gele smo posneli s Mini Bis kamero v programu GelCapture.

## 2.1.5 Določevanje nukleotidnega zaporedja

### 2.1.5.1 Direktno čiščenje PCR produktov

Za direktno čiščenje smo uporabili Fast<sup>TM</sup>Thermosensitive Alkaline Phosphatase (AP) in Exonuclease I (Exo I). AP odstrani 5' in 3' fosfatne skupine iz DNK, toplotna inaktivacija tega encima pa se doseže pri 75 °C toplotne obdelave pri 5 minut. Eksonukleaza cepi verige DNK in RNK na njihovih končnih delih.

V mikrocentrifugirki smo za en vzorec zmešali 10  $\mu\text{L}$  PCR produkta, 0,2  $\mu\text{L}$  ExoI, 1 enoto (angl. »Unit«) AP in 2,8  $\mu\text{L}$  PCR (KCl ali  $\text{NH}_4$ ) pufra. Nato smo mešanico na pomnoževalniku inkubirali 45 minut pri 37 °C, da so se razgradili začetni oligonukleotidi in nukleotidi, ter nadaljnjih 15 minut pri 80 °C, da smo inaktivirali (denaturirali) encima.

### 2.1.5.2 Sekvenčna reakcija

Za sekvenčno reakcijo smo uporabili BigDye 3.1

Za sekvenčno reakcijo smo v 0,2 mL reakcijski mikrocentrifugirki zmešali:

- 3  $\mu\text{L}$  očiščenega PCR produkta
- 0,2  $\mu\text{L}$  začetnega oligonukleotida (10 Mm koncentracije)
- 0,5  $\mu\text{L}$  Big Dye
- 2  $\mu\text{L}$  BigDye pufra
- 4,3  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$

Končni volumen reakcije je bil 10  $\mu\text{L}$ . Za sekvenčno reakcijo smo uporabili naslednji temperaturni profil: začetni denaturaciji pri 96  $^{\circ}\text{C}$  za 3 minute je sledilo 50 ciklov, ki so bili sestavljeni iz denaturacije pri temperaturi 96  $^{\circ}\text{C}$  za 10 sekund, prileganje začetnih oligonukleotidov pri 48  $^{\circ}\text{C}$  za 10 sekund in podaljševanje verige pri 60  $^{\circ}\text{C}$  za 4 minute. Zaključili smo s segrevanjem na 72  $^{\circ}\text{C}$  za 7 minut.

### **2.5.1.3 Precipitacija z etanolom in EDTA**

Po sekvenčni reakciji smo produkte očistili s postopkom precipitacije z etanolom in EDTA. Vzorec smo na kratko centrifugirali. Dodali smo mu 2,5  $\mu\text{L}$  125 mM EDTA s pH 8,0, ter ponovno kratko centrifugirali, da je EDTA prišel v stik s sekvenčno reakcijo. Nato smo dodali 30  $\mu\text{L}$  96 % etanola. Ploščo smo prekrili s folijo ter jo premešali tako, da smo jo nekajkrat obrnili. Ploščo smo nato inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 55 minut pri 4  $^{\circ}\text{C}$  na maksimalni hitrosti (14000 obratov/minuto). Supernatant (etanol) smo izlili, nakar smo centrifugirali ploščo obrnjeno navzdol pri 190xG za 2 minuti. Po centrifugiranju smo ploščo inkubirali 5 minut na sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo. Dobljen produkt smo raztopili v 12  $\mu\text{L}$  formamida. Tako pripravljenim vzorcem smo s sekvenatorjem AbiPrism 3130 (Applied Biosystems) določili nukleotidno zaporedje.

## **2.2 Statistična analiza**

### **2.2.1 CodonCode aligner 1.63**

Prebrano nukleotidno zaporedje (sekvence) smo pregledali in obdelali s programom CodonCode Aligner 1.63 (CodonCodes Inc., Ewing in sod., 1998). Odstranili smo začetne in končne dele nukleotidnega zaporedja, ki niso bili berljivi, in primerjali sekvence tudi med različnimi vzorci posameznih vrst. Sekvence smo natančno očistili tudi morebitnih nepravilnosti v branju zaporedja baz, na primer vstavljenih razlik med bazami izpadlih mest (angl. »gap«).

### **2.2.2 BLAST**

Tako obdelane sekvence smo nato vstavili v program Blast (Basic Local Alignment Search Tool), ki nam je podal ujemanje nukleotidnih zaporedij z že znanimi sekvencami vrst (Stephen in sod., 1997).

### **2.2.3 SPSS**

SPSS 17.0 (angl. »Statistical Package for the Social Sciences«) je program namenjen za statistične analize.

Analizirati smo želeli odnose med spremenljivkami (koncentracijo DNA v izoliranem vzorcu, krivuljo absorbance izolata ter uspešnostjo PCR), za kar smo poskušali uporabiti Pearsonov korelacijski koeficient ( $r$ ). Vrednosti tega koeficienta se gibajo med -1 (močna negativna soodvisnot) in 1 (močna pozitivna soodvisnost). Izračun Pearsonovega korelacijskega koeficienta je upravičen le v primeru normalne razporeditve spremenljivk.



V primeru odstopanj od normalne porazdelitve smo korelacije med znaki ocenili s Spearmanovim korelacijskim koeficientom, ki je neparametrična alternativa Pearsonovemu korelacijskemu koeficientu. Za razliko od Pearsonovega, Spearmanov koeficient ne predpostavlja linearne povezanosti spremenljivk in enakomernosti frekvenčne porazdelitve, prav tako pa je z njim moč računati stopnjo povezanosti nezveznih spremenljivk (Thorpe, 1975).

### 2.3 Rangiranje podatkov

Oceno uspešnosti PCR smo ocenjevali vizualno glede na svetilnost pasov preko fotografij na gelu na dva načina:

- 1) Pri prvem načinu smo uporabili naslednjo lestvico (Preglednica 1):

0-neuspešno

1-zelo slabo

2-slabo

3-dobro

4-zelo dobro

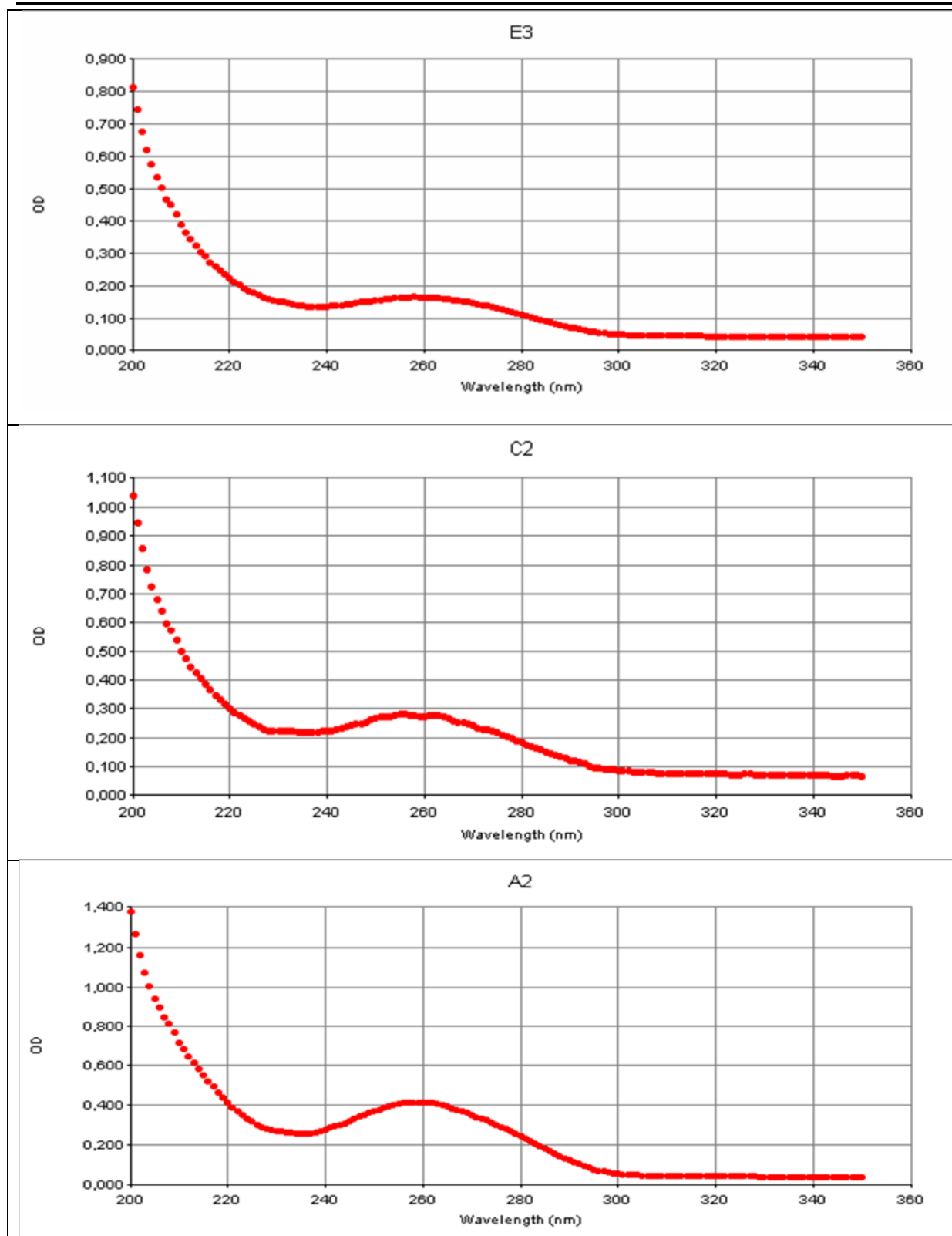
- 2) Pri drugem načinu (Preglednica 1) smo rangirali uspešnost PCR tako, da smo fotografije gela glede na svetilnost pasov razporedili od najslabše do najboljše in jih razporedili v kategorije. Vseh skupaj je bilo kategorij osem.

### 2.4 Vrednost absorbance

Izolirali smo 110 suhih vzorcev vrste opic nosan in izmerili koncentracije izolirane DNA. Pripravili smo tabelo izoliranih vzorcev s podatki o masni koncentraciji DNA v vzorcih ter čistosti izolata in za nadaljnje raziskave uporabili le nekatere vzorce (obarvane rumeno, Priloga A). Glavni kriterij pri izbiri vzorcev za nadaljnje delo, je temeljil na čistoči, masni koncentraciji ter na grafu absorbance. Optimalna čistoča vzorca je med 1,8 in 2,0 (Clark in Christopher, 2000), masna koncentracija pa okoli 50 ng/ $\mu$ L, v kolikor je bilo potrebno, smo vzorce redčili na želeno koncentracijo.

Za uspešen PCR je namreč potrebno imeti vzorec, ki vsebuje zadostno koncentracijo DNA, le-ta pa ne sme biti degradirana. Fragmentiranost DNA smo preverili z grafom absorbance (Slika 2). Degradacija DNA se kaže v nesklenjeni liniji pik na grafu. Bolj so pike sosledne, manj je DNA degradirana. Pozornost moramo nameniti tudi najvišji točki, ki jo graf doseže, ker ima molekula DNA največjo absorbanco pri 260  $\mu$ m. Večina vzorcev je na podlagi oglada grafov absorbanc vsebovala degradirano DNA. Izmed vseh smo izbrali tiste vzorce, katerih

krivulja je imela najvišji vrh pri 260  $\mu\text{m}$  in tako skušali zagotovili izbor vzorcev s čim bolj ohranjeno DNA za nadaljnjo obdelavo.



Slika 2: Primeri grafov absorbanč. Na abscisi je valovna dolžina presevnega žarka, na ordinati pa absorbanca. Zgoraj je primer vzorca s slabo absorbanco, v sredini je vzorec z nekoliko boljšo absorbanco in spodaj je primer vzorca z najboljšo absorbanco, gledano pri valovni dolžini 260-280 nm.

## 3 REZULTATI

### 3.1 Analiza sekvenc

PCR reakcije smo pri nekaterih vzorcih večkrat ponavljali. Uspešno se je DNA pomnožila le pri 15 vzorcih, pri nekaterih šele po več poskusih. Rezultate glede na uspešnost PCR reakcije smo rangirali od najslabšega do najboljšega (Preglednica 1), vendar je pri ocenah izidov PCR bil velik problem objektivnosti. Preglednico 1 smo naredili na podlagi vizualnih ocen. PCR reakcije smo delali naključno in jih na posameznih vzorcih ponavljali, dokler nismo pridobili dobro pomnoženo DNA, ki je omogočala nadaljnje delo. Samo pri 4 od 20 vzorcev je bila PCR reakcija že prvič uspešna, pri vseh drugih smo za uspešen PCR morali reakcijo ponoviti večkrat. Pri 4 vzorcih kljub večkratnim ponovitvam PCR reakcija ni bila uspešna (Preglednica 1).

Preglednica 1: Ponavljanje PCR reakcij ter najboljši izid glede na svetilnost pasov (angl. »band«) na agarozni gelski elektroforezi (Najboljši izid PCR reakc.: 0=neuspešno, 1=zelo slabo, 2=slabo, 3=dobro, 4=zelo dobro). Pri rangiranju smo upoštevali obe komponenti, ponavljanje PCR reakcij in najboljšo svetilnost pasov: najboljši izid smo ocenili z 8, najslabši izid z 1.

Vzorec	Ponavljjanje (x-krat)	Najboljši izid PCR reak. (0-4)	Rang (1-8)
1909 4047	3	0	1
1909 4031	2	0	1
1907 3064	4	0	1
1909 4018	5	0	1
1909 4016	1	1	2
1910 3039	5	1	2
1907 3058	2	1	3
1909 4027	4	1	3
1907 3055	4	1	3
1909 4043	5	2	4
1909 4014 (1)	3	1	4
1909 4035 (1)	5	1	4
1907 4043	1	1	4
1097 3076	2	2	5
1563 1910	5	2	5
1907 3061	1	2	6
1909 4017	2	3	7
1907 3010	1	2	7
820	2	3	8
1907 3030	7	3	8

### 3.1.1 Kontaminacije

Kontaminacije vzorcev s tujo DNA v molekularnem laboratoriju so huda neprijetnost in razlogi zanjo niso vedno jasni. Do kontaminacije najpogosteje pride zaradi velike pretočnosti ljudi v laboratoriju in nepazljivosti. V primeru muzejske DNA, pa bi lahko bil razlog tudi v shranjevanju vzorcev. Z iskalnikom BLAST, so ugotovili, da smo pomnožili DNA taksonom, ki so bili prisotni v drugih laboratorijskih analizah. Zato je pri kontaminiranih vzorcih velika možnost, da je prišlo do kontaminacije med pripravo vzorcev na pomnoževanje. Pri molekularnem delu je potrebna velika pazljivost in čim bolj sterilni pogoji.

Pri analiziranih vzorcih je bil delež kontaminacije s tujo DNA precej visok, kontaminiranih je bilo kar šest od petnajstih vzorcev (Preglednica 2).

Preglednica 2: Podatki o kontaminaciji vzorcev.

Vzorec	Kontaminacija
820	/
1097 3076	/
1563 1910	<i>Rupicapra rupicapra</i>
1907 3058	/
1907 3061	/
1907 4043	<i>Acomys dimidiatus</i>
1909 4017	<i>Rupicapra rupicapra</i>
1909 4027	/
1907 3055	/
1909 4014 (1)	/
1909 4035 (1)	<i>Acomys dimidiatus</i>
1909 4043	<i>Rupicapra rupicapra</i>
1907 3030	/
1909 4016	/
1910 3039	<i>Spermophilus citellus</i>
1907 3010	Sekvenciranje neuspešno
1909 4047	Sekvenciranje neuspešno
1909 4031	Sekvenciranje neuspešno
1907 3064	Sekvenciranje neuspešno
1909 4018	Sekvenciranje neuspešno

### 3.2 Odvisnost med spremenljivkami

S statistično obdelavo v SPSS smo preverjali soodvisnost med naslednjimi spremenljivkami; masno koncentracijo, krivuljo absorbance in uspešnostjo PCR. Soodvisnost se je izkazala pri vseh parih za zelo nizko (Preglednica 3).

Preglednica 3: Vrednosti testiranih spremenljivk pri posameznih analiziranih vzorcih (MK=masna koncentracija izolata (ng/ $\mu$ L); Krivulja: 1=slabo, 2=dobro, 3=zelo dobro; PCR: 0=neuspešno, 1=zelo slabo, 2=slabo, 3=dobro, 4=zelo dobro).

Vzorec	Spremenljivka		
	MK (ng/ $\mu$ L)	Krivulja	PCR
820	76,389	1	3
1097 3076	78,045	2	2
1563 1910	7,489	1	2
1907 3058	27,671	2	1
1907 3061	218,974	2	2
1907 4043	105,331	2	1
1909 4017	122,531	1	3
1909 4027	228,026	3	1
1907 3055	416,935	3	1
1909 4014 (1)	203,753	2	1
1909 4035 (1)	145,299	3	1
1909 4043	113,134	2	2
1907 3030	41,242	2	3
1909 4016	224,797	2	1
1910 3039	46,851	1	1
1907 3010	51,257	1	2
1909 4047	128,911	2	0
1909 4031	39,474	2	0
1907 3064	93,832	1	0
1909 4018	22,572	2	0

Zaradi odstopanj od normalne porazdelitve smo za oceno odvisnosti med spremenljivkami uporabili le Spearmanov koeficient korelacije. Za končni prikaz rezultatov smo uporabili tri spremenljivke (Preglednica 3). PCR smo kategorizirali na prvi način (uporabili smo štiri kategorije) (Preglednica 3). Vrednosti testa in njegova statistična značilnost so zbrani v Preglednici 4. Vse odvisnosti so zelo nizke ( $p < 0,6$ ) in razen para masna koncentracija-krivulja ostala dva nista statistično značilno povezana ( $p > 0,05$ ). Odvisnost med omenjenima spremenljivkama (MK in Krivulja,  $\rho = 0,52$ ) je pozitivna, kar pomeni, da se ob zviševanju vrednosti ene, tudi vrednosti pri drugi spremenljivki zvišujejo.

Preglednica 4: Soodvisnost testnih spremenljivk. Spearmanov korelacijski koeficient ( $\rho$ ) je prikazan v desnem zgornjem kotu (nad diagonalo), statistična značilnost testa pa v levem spodnjem kotu (pod diagonalo). Statistično značilno povezani pari na nivoju tveganja  $p < 0,05$  so poudarjeni. MK=masna koncentracija izolata (ng/ $\mu$ L), Krivulja=krivulja absorbance.

	<b>MK</b>	<b>Krivulja</b>	<b>Uspešnost PCR</b>
<b>MK</b>		0,520	-0,440
<b>Krivulja</b>	<b>0,019</b>		-0,312
<b>Uspešnost PCR</b>	0,854	0,180	

## 4 DISKUSIJA

Osnovni namen, da proučimo metodologijo in preverimo uporabnost degradirane DNA, je bil izpolnjen. Vse zastavljene cilje smo izpeljali po korakih; izolirali smo DNA, pomnožili ter naredili sekvenčno reakcijo in analizirali nukleotidna zaporedja. Pri pomnoževanju DNA smo imeli velike težave. Za potrditev identifikacije vzorcev smo pridobili krajši segment gena za cyt b, dolžine 179 baznih parov. Tako smo pomnožili 15 vzorcev in določili 9 vzorcev za opico nosan. Za natančnejšo identifikacijo je zaželeno imeti fragment dolg vsaj okoli 400 bp (Minarovič in sod., 2010). Čeprav smo pričakovali, da bomo uspeli pridobiti več sekvenc, lahko nizko stopnjo uspešnosti utemeljimo s težavami v postopku (glej nadaljevanje).

Za analizo smo uporabili vzorce, ki so bili več let hranjeni v muzeju. Znano je, da je lahko DNA vzorcev iz muzejskih zbirk degradirana zaradi nepravilnega hranjenja (Fišer in sod., 2010). Tkivo, ki smo ga uporabili za analizo (koža) je bilo posušeno in obdelano. S tem se je zmanjšala kakovost DNA, ki je bila pridobljena iz tkiva. Že pri preverjanju grafov absorbanco smo opazili, da je bila DNA v 35 % vzorcev premočno degradirana, zato ni bilo presenetljivo, da smo imeli pri nadaljnjih raziskavah težave. Problem je nastal zaradi nizke uspešnosti PCR reakcij, saj se vzorci niso uspešno pomnoževali. Da bi prišli do boljših rezultatov, smo poizkušali večkrat pomnožiti DNA iz istih vzorcev. Vseeno smo sekvence uspeli pridobiti le pri petnajstih vzorcih.

Pri šestih vzorcih je prišlo do kontaminacije s tujo DNA treh vrst: bodičaste miši (*Acomys dimidiatus*), gamsa (*Rupicapra rupicapra*) in tekunice (*Spermophilus citellus*). V laboratoriju so bili prisotni vsi trije taksoni, zato je prišlo do kontaminacije. Tudi pri preverjanju odvisnosti med pari testnih spremenljivk smo naleteli na težave. Zaradi nenormalne razporeditve spremenljivk in linearne nepovezanosti podatkov ni bilo mogoče analizirati s parametričnim Pearsonovim koeficientom korelacije (Lupton, 1993), ki sicer ima večjo statistično moč kot njegove neparametrične alternative. Uporabili smo Spearmanov koeficient (Thorpe, 1975). Ta je pokazal, da med spremenljivkami ni močne povezanosti, razen med masno koncentracijo (MK) in krivuljo se kaže zmerno visoka pozitivna povezava (Spearman's  $\rho=0,52$ ,  $p=0,019$ ; Preglednica 4). Pričakovali smo tudi pozitivno soodvisnost med masno koncentracijo DNA in uspešnostjo PCR reakcije, a je nismo potrdili. Morda bi hipotezo potrdili, če DNA ne bi bila tako močno fragmentirana, kar pomeni, da poleg višje koncentracije DNA za uspešnost PCR reakcije pomembnih še vsaj nekaj drugih dejavnikov, ki v našem primeru (zlasti nizka stopnja degradacije DNA) niso bili izpolnjeni. Poleg tega je zanesljivost analize odvisnosti med spremenljivkami zmanjšala tudi vizualna ocena za uspešnost PCR. To težavo smo želeli omiliti tako, da smo podatke rangirali na dva načina (glej Material in metode ter Rezultate) in primerjali pridobljene rezultate, a kljub pričakovanjem višje število kategorij ni bistveno prispevalo k lažji in jasnejši interpretaciji rezultatov. Težave, povezane s slabo kakovostjo DNA, so nas privedle tudi do majhnega vzorca za analizo (N=20), kar je nadalje oteževalo interpretacijo rezultatov. Zato ni presenetljivo, da hipoteze, da med masno koncentracijo, krivuljo grafa absorbance ter



uspešnostjo PCR pričakujemo statistično pomembno soodvisnost, nismo v celoti niti potrdili, niti ovrgli.

Ugotavljamo, da so vsi deli obdelave DNA zelo pomembni za uspešnost končnih sekvenčnih analiz (Rapley in Harbron, 2012). Statistične metode za majhno količino podatkov niso najbolj primerne, saj so naključni vplivi lahko preveliki. V našem primeru je bil dodaten problem še uporaba subjektivnih ocen rezultatov, četudi smo jih poizkušali predstaviti, kar je le bilo mogoče objektivno (večkratna razporeditev rezultatov).

Vsem težavam navkljub pa smo uspeli potrditi predpostavko, da je analiza s pomočjo črtnih kod mogoča že na krajšem odseku DNA (Valentini, 2008). Kljub temu, da smo v naši raziskavi uspeli pridobiti sekvence gena za *cyt b*, krajše od 200 baznih parov, smo v primerih brez kontaminacij uspeli identificirati pravo vrsto, kateri je analizirano tkivo pripadalo. Treba pa je poudariti, da je zanesljivost uporabljene metode močno odvisna od pravilne priprave in hrambe vzorcev. Obe pripomoreta k boljšemu ohranjanju DNA v vzorcih in manjši fragmentiranosti DNA ob izolaciji iz tkiva. Natančnost izvajanja protokola ter sterilno delovno okolje nadalje pripomoreta k zmanjšanju tveganja za kontaminacijo analiziranega tkiva s tujo DNA. Čeprav je jasno, da degradirana DNA otežuje analize sistema črtnih kod, pa smo z našim primerom potrdili, da taka analiza ni nemogoča. To toliko bolj pomeni, da je ravno gen za *cyt b* zelo primeren in zanesljiv molekularski marker za identifikacijo vrst.

V raziskavah je pogosto uporabljen *cyt b* zaradi dveh njegovih prednosti, (1) uporabnosti na starih (muzejskih) vzorcih in (2) primernosti za identifikacijo vrst že ob krajšem segmentu.

## 5 SKLEPI

Na modelnem organizmu, opici nosanu, smo testirali uspešnost identifikacije vrst na podlagi kratkih zaporedij gena za cyt b (barcoding), ki smo jih izolirali in pomnožili iz starih tkivnih vzorcev.

1. Najprej smo na podlagi merjenja koncentracije DNA v vzorcih ter njene absorbance zbrali iz večjega števila analiziranih tkiv le tkiva, ki so obetala uspešen nadaljnji postopek. Izbor vzorcev za nadaljnjo analizo je bil opravljen predvsem na podlagi pregleda grafov absorbanc DNA za posamezne vzorce. Ta nam je pokazal, ali je DNA degradirana in koliko DNA imamo v vzorcu (glede na vrh krivulje, pri 260 nm). Glede na to, da večja absorbanca pomeni večjo koncentracijo DNA, ne zagotavlja pa nizke stopnje degradiranosti, ni presenetljivo, da smo sekvence uspeli pridobiti le v majhnem številu. To potrjuje predpostavko, da je pomnoževanje nukleotidnega zaporedja ustrezne dolžine za identifikacijo taksonomskih skupin iz muzejskih vzorcev strojenih kož zelo težavno. Predvidevamo, da je glavni vzrok za to ravno visoka stopnja degradirane DNA v teh vzorcih, zato tudi daljših (>500 baznih parov) sekvenc nismo uspeli pridobiti. Težavam navkljub smo uspeli pridobiti vsaj kratke sekvence za gen cyt b (179 bp), ki so vseeno omogočali dokaj zanesljivo identifikacijo tarčne vrste.
2. Soodvisnost med pari testnih spremenljivk (koncentracijo DNA v izoliranem vzorcu, krivuljo absorbance izolata ter uspešnostjo PCR) je nizka. Edina izjema pri tem je statistično pomembna ( $p < 0,05$ ), a vseeno le zmerno visoka soodvisnost med masno koncentracijo (MK) in krivuljo (Spearman's  $\rho = 0,52$ ,  $p = 0,019$ ). Pričakovane visoke in statistično značilne odvisnosti med koncentracijo DNA in uspešnostjo PCR nismo uspeli potrditi, verjetno zato, ker višja koncentracija DNA še ne zagotavlja nizke stopnje njene degradiranosti.

## 6 SEZNAM VIROV IN LITERATURE

Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res*, 25: 3389–3402.

Andrews A.T. 1986. *Electrophoresis*. Press C. (ur.) New York, Oxford University Press.

Applied biosystems:  
[http://www3.appliedbiosystems.com/WebTroubleshooting/SNPNotAmplifying/You\\_may\\_have\\_degraded\\_genomic\\_DNA.htm](http://www3.appliedbiosystems.com/WebTroubleshooting/SNPNotAmplifying/You_may_have_degraded_genomic_DNA.htm)(25. okt. 2012).

Hebert lab. 2003. Barcoding animal life:  
[http://www.dnabarcoding.ca/primer/Differential\\_Rates.html](http://www.dnabarcoding.ca/primer/Differential_Rates.html) (25. nov. 2012).

Briski E., Cristescu M.E., Bailey S.A., MacIsaac H.J. Use of DNA barcoding to detect invertebrate invasive species from diapausing eggs. *Biological Invasions*. 2010. Online publication date(9. nov. 2010).

Bužan E. 2007. Filogenetska analiza kot osnova za oceno varstvenega statusa reliktnih dinarskevoluharice (*Dinaromys bogdanovi*). Doktorska disertacija. Ljubljana. str. 154.

Casiraghi M., Labra M., Ferri E., Galimberti A., De Mattia F. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics*, 11(4): 440–453.

Clark W., Christopher K. 2000. Chapter 5: An Introduction to DNA: Spectrophotometry, Degradation, and the 'Frankengel' Experiment, Department of Biological Sciences, University of Alberta. <http://www.ableweb.org/volumes/vol-22/5-clark.pdf> (11. apr. 2012).

Cox A.J., Hebert P.D.N. 2001. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Mol. Ecol.*, 10: 371–386.

Fišer C., Coleman C.O., Zigmajster M., Zwitter B., Gerecke R., Sket B. 2010. Old museum samples and recent taxonomy: A taxonomic, biogeographic and conservation perspective of the *Niphargus tatrensis* species complex (Crustacea: Amphipoda). *Organism Diversity & Evolution*, 10: 5–22.

Fišer Pečnikar Ž., Varljen Bužan E. 2011. Taksonomska identifikacija s pomočjo sistema črtnih kod DNA kot sodobna podpora biovarnosti. *Farm Vestn*, 63: 143–202.

Floyd R., Abebe E., Papert A., Blaxter M. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11: 839–850.

Hajibabaei M.A.C., Singer G., Clare E., Hebert P.. 2007. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology*, 5:24.

Harrison G. R., Bogdanowicz S. M., Hoffmann R. S., Yensen E., Sherman P. W. 2003. Phylogeny and Evolutionary History of the Ground Squirrels (Rodentia: Marmotinae). *Journal of Mammalian Evolution*. Vol. 10, No.3.

Hatefi Y. 1985. The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System. *Annual Review of Biochemistry*, 54: 1015–1069.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. 2003a. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*, 270:313–321.

Hebert P.D.N., Ratnasingham S., DeWaard J.R. 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 270: S596–S599.

Heimeier D., Lavery S., Sewell M.A. 2010. Using DNA barcoding and phylogenetics to identify Antarctic invertebrate larvae: Lessons from a large scale study. *Marine Genomics*, 3(3–4): 165–177.

Higuchi R., Bowman B., Freiburger M., Ryder O.A., Wilson A.C. 1984. DNA-sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*. 312: 282–284.

Holterman M., Rybarczyk K., Van Den Elsen S., Van Megen H., Mooyman P., Santiago R.P., Bongers T., Bakker J., Helder J. 2008. A ribosomal DNA-based framework for the detection and quantification of stress-sensitive nematode families in terrestrial habitats. *Molecular Ecology Resources*, 8: 23–34.

Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C. 1991. Evolution of the Cytochrome b Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128–144.

Jaarola M., Martínková N., Gündüz I., Brunhoff C., Zima J., Nadachowski A., Amori G., Bulatova N.S., Chondropoulos B., Fragedakis-Tsolis S., González-Esteban J., López-Fuster M.J., Kandaurov A.S., Kefelioglu H., Mathias M.L., Villate I., Searle J.B. 2004. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 647–663.

Kochzius M., Seidel C., Antoniou A., Botla S.K., Campo D., Cariani A., Vazquez E.G., Hauschild J., Hervet C., Hjörleifsdottir S., Hreggvidsson G., Kappel K., Landi M., Magoulas A., Marteinson V., Nölte M., Planes S., Tinti F., Turan C., Venugopal M.N., Weber H., Blohm D. 2010. Identifying Fishes through DNA Barcodes and Microarrays. *POS ONE*.

Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(23):8369–74.

Kryštufek B. 1999. *Osnove varstvene biologije*. 1. izd. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije. str. 155.

Logan N.A. 1994. *Bacterial Systematic*. Oxford, Blackwell Scientific Publications.

Lynch M., Jarrell P.E. 1993. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics*, 135: 1197–1208.

Lupton R. 1993. *Statistics in theory and practice*. New Jersey. Princeton University Press, str. 188.

Minarovič T., Trakovická A., Rafayová A., Lieskovská Z. 2010. Animal Species Identification by PCR – RFLP of Cytochrome b. *Animal Science and Biotechnologies*, 43 (1)

Moura C.J., Harris D.J., Cunha M.R., Rogers A.D. 2008. DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deepsea environments. *Zool. Scr*, 37: 93–108.

Neigel J., Domingo A., Stake J. 2007. DNA barcoding as a tool for coral reef conservation. *Coral Reefs*, 26: 487–499.

Rapley R., Harbron S. 2012. *Molecular Analysis and Genome Discovery*. Oxford. John Wiley & Sons. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0470020202.fmatter/pdf> (10. sept. 2012).

Ratnasingham S., Hebert P.D.N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*, 7: 355–364.

Rohland N., Siedel H., Hofreiter M. 2004. Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens. *BioTechniques*, 36: 814.

Roy M.S., Girman D.J., Taylor A.C., Wayne R.K. 1994. The use of museum specimens to reconstruct the genetic variability and relationships of extinct populations. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 50: 551–557.

Savolainen V., Cowan R. S., Vogler A. P., Roderick G. K., Lane R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360, 1462: 1805–1811.

Seena S, Pascoal C, Marvanova L, Cassio F. 2010. DNA barcoding of fungi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species. *Fungal Diversity*, 44: 77–87.

Shearer T.L., Coffroth M.A. 2008. Barcoding corals: Limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Resources*, 8(2): 247–255.

Taylor AC, Wayne RK, Sherwin WB. 1994. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat. *Molecular Ecology*, 3: 277–290.

Thomas W, Pääbo S, Villablanca F, Wilson A. 1990. Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens. *Journal of Molecular Evolution*, 31: 101–112.

Thorpe R.S., 1975. Quantitative handling of characters useful in snake systematics with particular reference to intraspecific variation in the ringed snake *Natrix natrix* (L.). *Biological Journal of the Linnean Society*, 7: 27–43.

Valentini A., Pompanon F., Taberlet P. 2008. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2): 110–117.

Virgilio M., Backeljau T., Nevado B., De Meyer M. 2010. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics*, 11: 206.

Wandeler P., Hoeck P.E., Keller LF. 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 22: 9.

Ward R. D., Hanner R., Hebert P. D. N. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74: 329–356.

Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George Jr.M., Gyllenstein U.B., Helm-Bychowski K., Higuchi R.G., Palumbi S.R., Prager E.M., Sage R.D., Stoneking M. 1985. Mitochondrial DNA and Two Perspectives on Evolutionary Genetics. *Biological Journal of Linnean Society*, 26: 375–400.

Wilson K.H. 1995. Molecular biology as a tool for taxonomy. *Clin Infect Dis*, 20: 192–208.

Wisely S.M., Maldonado J.E., Fleischer R.C. 2004. A technique for sampling ancient DNA that minimizes damage to museum specimens. *Conservation Genetics*, 5: 105–107.

Worheide G., Erpenbeck D. 2007. DNA taxonomy of sponges - progress and perspectives. *J. Mar. Biolog. Assoc. U.K.*, 87: 1629–1633.

## **ZAHVALA**

V prvi vrsti se iskreno zahvaljujem mentorici, doc. dr. Eleni Varljen Bužan, za vso pomoč, ki mi jo je nudila skozi celotno izdelavo naloge. Predvsem, ker mi je omogočila opravljati laboratorijski del naloge v laboratoriju za molekularno ekologijo Znanstveno raziskovalnega središča, Univerze na Primorskem v Izoli. Hvala za vse nasvete, usmeritve, znanja in čas, ki ga je vložila v mojo nalogo.

Najlepša hvala somentorju, dr. Juretu Jugovicu, za pomoč pri statističnem in oblikovnem delu naloge. Brez njegove pomoči v zaključnem delu naloge nebi šlo. Hvala, ker si je na koncu vzela čas, da smo lahko do roka izdelali nalogo.

Pri laboratorijskemu delu nebi šlo brez nesebične pomoči Sandre Hasić ter Sare Zupan. Hvala obema za čas in pomoč. Hvala tudi Katji Kalan ter Nataši Fujs, ki sta mi priskočili na pomoč, če se je pri laboratorijskemu delu kaj zataknilo.

Zahvaljujem pa se tudi vsem sošolcem, prijateljem in družini, ki so mi vseskozi stali ob strani.

## PRILOGE

PRILOGA A: Tabela vseh vzorcev s podatki o čistoči vzorcev ter masni koncentraciji DNA v vzorcih

Vzorec	Vrsta	Čistoča (260/280)	Masna koncentracija (ng/μL)
820	<i>Nasalis larvatus</i>	1,967	76,389
835	<i>Nasalis larvatus</i>	1,823	75,505
837	<i>Nasalis larvatus</i>	1,749	22,912
879	<i>Nasalis larvatus</i>	1,822	44,009
888	<i>Nasalis larvatus</i>	1,629	24,291
893	<i>Nasalis larvatus</i>	1,78	74,933
1097 3076	<i>Nasalis larvatus</i>	1,83	78,045
1555 1910	<i>Nasalis larvatus</i>	1,907	66,848
1563 1910	<i>Nasalis larvatus</i>	1,586	7,489
1907 3030	<i>Nasalis larvatus</i>	1,62	41,242
1907 3008	<i>Nasalis larvatus</i>	1,692	3,642
1907 3009	<i>Nasalis larvatus</i>	1,781	45,273
1907 3010	<i>Nasalis larvatus</i>	1,838	51,257
1907 3011	<i>Nasalis larvatus</i>	1,899	35,571
1907 3012	<i>Nasalis larvatus</i>	1,626	72,817
1907 3013	<i>Nasalis larvatus</i>	1,561	13,279
1907 3019	<i>Nasalis larvatus</i>	1,573	79,106
1907 3020	<i>Nasalis larvatus</i>	1,504	29,093
1907 3021	<i>Nasalis larvatus</i>	1,889	10,442
1907 3022	<i>Nasalis larvatus</i>	1,694	35,932
1907 3023	<i>Nasalis larvatus</i>	1,601	59,746
1907 3024	<i>Nasalis larvatus</i>	1,565	18,008
1907 3025	<i>Nasalis larvatus</i>	1,643	54,862
1907 3027	<i>Nasalis larvatus</i>	1,683	15,249
1907 3028	<i>Nasalis larvatus</i>	1,47	73,82
1907 3029	<i>Nasalis larvatus</i>	1,552	15,098
1907 3030	<i>Nasalis larvatus</i>	1,883	77,919
1907 3031	<i>Nasalis larvatus</i>	1,584	24,769
1907 3033	<i>Nasalis larvatus</i>	1,685	83,704
1907 3037	<i>Nasalis larvatus</i>	1,613	57,797
1907 3038	<i>Nasalis larvatus</i>	1,609	42,933
1907 3039	<i>Nasalis larvatus</i>	1,665	17,086
1907 3043	<i>Nasalis larvatus</i>	1,671	15,389
1907 3045	<i>Nasalis larvatus</i>	1,54	24,393
1907 3047	<i>Nasalis larvatus</i>	1,506	29,367



1907 3048	<i>Nasalis larvatus</i>	1,973	<b>12,287</b>
1907 3050	<i>Nasalis larvatus</i>	1,752	<b>13,404</b>
1907 3051	<i>Nasalis larvatus</i>	1,254	<b>66,185</b>
1907 3053	<i>Nasalis larvatus</i>	2,003	<b>31,895</b>
1907 3054	<i>Nasalis larvatus</i>	1,98	<b>26,603</b>
1907 3055	<i>Nasalis larvatus</i>	1,889	<b>416,935</b>
1907 3056	<i>Nasalis larvatus</i>	1,829	<b>143,893</b>
1907 3057	<i>Nasalis larvatus</i>	1,729	<b>30,021</b>
1907 3058	<i>Nasalis larvatus</i>	1,639	<b>27,671</b>
1907 3060	<i>Nasalis larvatus</i>	1,773	<b>33,814</b>
1907 3061	<i>Nasalis larvatus</i>	1,78	<b>218,974</b>
1907 3062	<i>Nasalis larvatus</i>	1,52	<b>18,375</b>
1907 3063	<i>Nasalis larvatus</i>	1,884	<b>110,273</b>
1907 3064	<i>Nasalis larvatus</i>	1,66	<b>93,832</b>
1907 3066	<i>Nasalis larvatus</i>	1,739	<b>14,98</b>
1907 3068	<i>Nasalis larvatus</i>	1,715	<b>87,086</b>
1907 3071	<i>Nasalis larvatus</i>	1,589	<b>6,478</b>
1907 4043	<i>Nasalis larvatus</i>	1,847	<b>105,331</b>
1908 3014	<i>Nasalis larvatus</i>	1,978	<b>20,191</b>
1908 3015	<i>Nasalis larvatus</i>	1,444	<b>26,065</b>
1908 3018	<i>Nasalis larvatus</i>	1,553	<b>48,855</b>
1908 3023	<i>Nasalis larvatus</i>	1,811	<b>35,613</b>
1909 3053	<i>Nasalis larvatus</i>	1,679	<b>22,364</b>
1909 4013	<i>Nasalis larvatus</i>	1,784	<b>46,668</b>
1909 4014	<i>Nasalis larvatus</i>	1,873	<b>17,14</b>
1909 4014 (1)	<i>Nasalis larvatus</i>	1,875	<b>203,753</b>
1909 4015	<i>Nasalis larvatus</i>	1,832	<b>27,372</b>
1909 4016	<i>Nasalis larvatus</i>	1,909	<b>224,797</b>
1909 4017	<i>Nasalis larvatus</i>	1,858	<b>122,531</b>
1909 4018	<i>Nasalis larvatus</i>	1,818	<b>22,572</b>
1909 4019	<i>Nasalis larvatus</i>	1,802	<b>46,789</b>
1909 4020	<i>Nasalis larvatus</i>	1,598	<b>52,474</b>
1909 4022	<i>Nasalis larvatus</i>	1,749	<b>18,401</b>
1909 4024	<i>Nasalis larvatus</i>	1,841	<b>328,793</b>
1909 4025	<i>Nasalis larvatus</i>	1,728	<b>27,412</b>
1909 4027	<i>Nasalis larvatus</i>	1,881	<b>228,026</b>
1909 4029	<i>Nasalis larvatus</i>	1,959	<b>401,346</b>
1909 4030	<i>Nasalis larvatus</i>	1,756	<b>29,062</b>
1909 4031	<i>Nasalis larvatus</i>	1,752	<b>39,474</b>

1909 4035	<i>Nasalis larvatus</i>	1,6	<b>34,896</b>
<b>1909 4035 (1)</b>	<b><i>Nasalis larvatus</i></b>	<b>1,901</b>	<b>145,299</b>
1909 4037	<i>Nasalis larvatus</i>	1,746	<b>18,789</b>
1909 4038	<i>Nasalis larvatus</i>	1,739	<b>43,983</b>
1909 4040	<i>Nasalis larvatus</i>	1,673	<b>90,291</b>
<b>1909 4043</b>	<b><i>Nasalis larvatus</i></b>	<b>1,651</b>	<b>113,134</b>
1909 4045	<i>Nasalis larvatus</i>	1,799	<b>29,031</b>
1909 4046	<i>Nasalis larvatus</i>	1,725	<b>79,25</b>
<b>1909 4047</b>	<b><i>Nasalis larvatus</i></b>	<b>1,71</b>	<b>128,911</b>
1909 4048	<i>Nasalis larvatus</i>	1,632	<b>51,155</b>
1909 4052	<i>Nasalis larvatus</i>	1,505	<b>42,682</b>
1909 4056	<i>Nasalis larvatus</i>	1,86	<b>12,417</b>
1909 4057	<i>Nasalis larvatus</i>	2,838	<b>5,854</b>
1909 6055	<i>Nasalis larvatus</i>	1,733	<b>12,759</b>
1909 885	<i>Nasalis larvatus</i>	1,563	<b>18,508</b>
1910 3007	<i>Nasalis larvatus</i>	1,825	<b>5,579</b>
1910 3010	<i>Nasalis larvatus</i>	1,168	<b>17,394</b>
1910 3016	<i>Nasalis larvatus</i>	1,919	<b>11,614</b>
1910 3017	<i>Nasalis larvatus</i>	1,85	<b>23,417</b>
1910 3020	<i>Nasalis larvatus</i>	1,915	<b>40,788</b>
1910 3023	<i>Nasalis larvatus</i>	1,861	<b>29,497</b>
1910 3027	<i>Nasalis larvatus</i>	1,777	<b>61,097</b>
1910 3028	<i>Nasalis larvatus</i>	1,781	<b>48,718</b>
1910 3034	<i>Nasalis larvatus</i>	1,701	<b>25,644</b>
1910 3037	<i>Nasalis larvatus</i>	1,735	<b>55,361</b>
1910 3038	<i>Nasalis larvatus</i>	2,019	<b>53,638</b>
<b>1910 3039</b>	<b><i>Nasalis larvatus</i></b>	<b>1,809</b>	<b>46,851</b>
1910 3040	<i>Nasalis larvatus</i>	1,84	<b>16,556</b>
1910 3041	<i>Nasalis larvatus</i>	1,823	<b>25,722</b>
1910 3046	<i>Nasalis larvatus</i>	1,802	<b>11,645</b>
1910 3049	<i>Nasalis larvatus</i>	1,469	<b>13,946</b>
1910 3050	<i>Nasalis larvatus</i>	1,827	<b>7,65</b>
1910 3052	<i>Nasalis larvatus</i>	1,773	<b>25,145</b>
1910 3055	<i>Nasalis larvatus</i>	1,678	<b>25,093</b>
1911 3004	<i>Nasalis larvatus</i>	2,026	<b>34,785</b>
1911 3005	<i>Nasalis larvatus</i>	2,058	<b>11,81</b>