TEHNICA ADN BARCODING ȘI IDENTIFICAREA SPECIILOR

Sorina ISTRATI,
Facultatea de Biologie şi Pedologie

CZU: 595.7(478) *istratisorina98@gmail.com*

Unul dintre cele mai numeroase ordine din cadrul regnului animal este Coleoptera (Insecta) cu aproximativ 400 mii specii descrise [6]. Literatura de specialitate indică un număr diferit de specii în cadrul acestui ordin, dar cert este faptul că multe specii urmează încă a fi descrise. Astfel, o mare parte din biodiversitate este încă necunoscută. Accelerarea procesului de descriere a speciilor este o problemă care depășește cu mult posibilitățile comunității taxonomice. Taxonomia clasică ca știință care descrie, numește și clasifică organismele vii se confruntă cu un șir de probleme printre care: dificultăți în identificarea stadiilor imature ale multor specii, timpul necesar pentru identificare, plasticitatea fenotipică a caracterelor morfologice folosite pentru recunoașterea speciilor etc. Unele dintre aceste dificultăți pot fi soluționate prin utilizarea metodelor molecular-genetice, și anume, tehnica ADN barcoding - sistem universal complet bazat pe ADN pentru delimitarea și identificarea speciilor [1, 7]. Aceasta intenționează să înlăture unele limitări ale taxonomiei bazate exclusiv pe caractere morfologice [5]. Fiind aplicată în studiul biodiversității tehnica ADN barcoding permite identificarea, în timp restrâns, a speciilor, în baza secvențelor ADN.

Scopul studiului de față a constat în elucidarea importanței și eficienței utilizării tehnicii ADN barcoding în calitate de instrument de identificare a speciilor pe exemplul coleopterelor. Coleopterele adulte au fost colectate în 5 localități din Nordul (Sofia, Pelinia) și Sudul (Bugeac, Ciumai, Ștefănești) Republicii Moldova. Insectele au fost transportate în laborator în eprubete de plastic sterile, cu alcool etilic de 96%. Izolarea și purificarea ADN a fost realizată folosind protocolul optimizat [2] și folosind kit-ului de reactivi „Qiagen Dneasy Blood & tissue Kit". Pentru amplificarea regiunilor cod de bare ADN au fost utilizate două perechi de primeri LCO1490/HCO2198 și LepF1/LepR1. Produsul PCR a fost purificat, și expediat pentru secvențiere către laboratoare specializate precum

Centrul Canadian pentru ADN Barcoding, Ontario, Canada (https://ccdb.ca/) și StarSEQ GmbH, Mainz, Germania (https://www.starseq.com/). Secvențele nucleotidice ale porțiunilor de genă COI au fost aliniate cu secvențele similare disponibile în baza de date GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) și în baza de date BOLD (http://www.boldsystems.org/). Editarea, alinierea secvențelor și reconstrucția arborilor filogenetici a fost realizată în programul MEGA X [3]. Rezultatele obținute au fost validate folosind metode clasice morfologice [4, 8].

În rezultatul cercetărilor efectuate au fost obținute secvențe parțiale ale genei COI mitocondriale pentru 85,71% din exemplarele de coleoptere investigate. În rezultatul analizei BLAST și utilizării sistemului BOLD IDS toate secvențele regiunilor cod de bare ADN au fost asociate cu specii de coleoptere aparținând familiilor Oedemeridae, Tenebrionidae și Mordellidae. Toate speciile identificate sunt cunoscute ca specii răspândite în Republica Moldova. Secvențele nucleotidice obținute au fost depuse în bazele de date internaționale completând bibliotecile de referință de succesiuni nucleotidice ale regiunii cod de bare ADN pentru coleoptere. Tehnica ADN barcoding reprezintă un instrument molecular util, care face procedura de identificare a speciilor mai rapidă, în special pentru cei care nu sunt specialiști în taxonomie clasică, favorizând caracterizarea diversității coleopterelor.

Rezultatele științifice expuse în prezenta lucrare au fost obținute grație suportului financiar al proiectelor GTI Training Course 2016, CPEA-LT-2016/10140, Program de stat (2020-2023) 20.80009.7007.12 „Diversitatea artropodelor hematofage, a zoo- și fitohelminților, vulnerabilitatea, strategiile de tolerare a factorilor climatici și elaborarea procedeelor inovative de control integrat al speciilor de interes socio-economic”.

Referințe:

1. HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L., de WAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. În: *The Royal Society*, 2003, nr. 270(1512), pp. 313-321.
2. IVANOVA, N.V., de WAARD, J.R., HEBERT, P.D.N. An inexpensive, automation friendly protocol for recovering high quality DNA. În: *Molecular Ecology Resources*, 2006, nr. 6, pp. 998-1002.

3. KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. În: *Molecular Biology and Evolution*, 2018, nr. 35, pp. 1547-1549.
4. *Mike's Insect Keys*. Disponibil online: https://sites.google.com/view/mikes-insect-keys/mikes-insect-keys (accesat în 2020-2021).
5. PENTINSAARI, M., HEBERT, P., MUTANEN, M. Barcoding Beetles: A Regional Survey of 1872 Species Reveals High Identification Success and Unusually Deep Interspecific Divergences. În: *PLOS ONE*, 2014, nr. 9(9), pp. 1-8.
6. SLIPINSKI, S, LESCHEN, R,, LAWRENCE, J. Order Coleoptera Linnaeus, 1758. În: *Zootaxa*, 2011, nr. 3148, pp. 203-208.
7. TAUTZ, D., ARCTANDER, P., MINELLI, A., THOMAS, R.H., VOGLER, A. A plea for DNA taxonomy. În: *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, nr. 18(2), pp. 70-74.
8. *Определитель насекомых европейской части СССР в пяти томах. Том 2. Жесткокрылые и веерокрылые.* Изд-во «Наука». Москва - Ленинград. 1965. 668 стр.

Recomandat
Anna MOLDOVAN, dr., lector univ.
Natalia MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, dr., conf. cercet.