

## Örümceklerde (Ordo: Araneae) farklı muhafaza koşullarının DNA Sekanslama ve Barkotlama Analizleri Üzerine Etkileri

Rufana MAMMADOVA, Adile AKPINAR\*, Derya ARSLAN, Aynur YÜNCÜ

Gaziantep Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, GAZİANTEP

\*e-mail: aozdemir@gantep.edu.tr

**Öz:** Bu çalışmada farklı koşullarda muhafaza edilen Lycosidae ve Thomisidae (Ordo: Araneae) familyalarına ait müze örneklerinden DNA izole edilmiş ve DNA barkotlama çalışmaları yapılmıştır. Örümceklerin vücut büyüklüğü, farklı alkol değerleri ve DNA konsantrasyonlarının DNA sekansları üzerine etkisi araştırılmıştır. 15 yıllık örneklerden genomik DNA izolasyonları yapılmış, iki farklı gen bölgesi (COI, ITS) PCR ile çoğaltılmış ve sekanslama işlemlerine tabi tutulmuştur. Sekanslama üzerine örneklerde vücut büyüklüğü ile DNA konsantrasyonu arasında bir ilişki belirlenemezken, saklama koşullarının DNA kalitesini ve sekanslamayı etkilediği belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Lycosidae, Thomisidae, DNA barkotlama, Sekans

### Effect of different preservation conditions on DNA sequencing and barcoding in spiders (Ordo: Araneae)

**Abstract:** In this study, DNA isolations and DNA barcoding studies on museum samples of Lycosidae and Thomisidae (Ordo: Araneae) that were preserved in different conditions were examined. Effect of spider body size, different alcohol values and DNA isolation methods on DNA sequencing were investigated. Genomic DNA isolations were performed by using 15 years old samples and two different genic regions (COI and ITS) were amplified with PCR and sequenced. Preservations conditions were detected to effect DNA quality and sequencing while body size of samples and DNA concentrations were not correlated with sequencing.

**Keywords:** Lycosidae, Thomisidae, DNA barcoding, Sequencing

#### 1. Giriş

Örümcekler, karada her türlü habitatta yaşayabilen hayvanlar olarak bilinirler. Bugüne kadar tanımlanmış 116 örümcek familyasına ait 4089 cins ve 47494 tür bulunmaktadır (World Spider Catalog, 2018). Ülkemizde tespit edilmiş 52 familya, 339 cins ve 1117 tür tanımlanmıştır (Demir ve Seyyar, 2017). Örümceklerin teşhis ve tanımlamaları yapılırken özellikle morfolojik özellikleri

temel alınarak sınıflandırılmaktadırlar. Bu nedenle örümcekler temel morfolojilerinin bozulmasını engelleyici şekilde saklanmaktadır. Hayvanların yapılarının bozulmadan saklanmasında yıllarca pek çok kimyasal kullanılmıştır. Günümüzde Arthropodların saklanmasında etanol kullanılmaktadır. Etil alkol hidrolitik ve oksidatif etkilerinden dolayı DNA koruyucu etkiye sahiptir (Vink ve ark., 2005). Örümcekler %70 etil alkolde veya

etilen-glikol karışımında oda sıcaklığında bekletildiğinde DNA yapısının bozulduğu belirlenmiştir (A'Haea ve ark., 1998).

Alkolde muhafaza edilen hayvanların DNA' larının kaliteli bir şekilde elde edilmesi daha sonraki aşamalarda da (PCR ve sekanslama) verimli ürünler elde edilmesine yardımcı olacaktır. Bu bağlamda son yıllarda örümcekler üzerine yapılan DNA barkot çalışmaları ön plana çıkmış ve ülkeler kendi sınırları içerisinde belirleyebildikleri canlıların DNA veri bankalarını oluşturmaya başlamışlardır. DNA barkot çalışmalarında morfolojik veriler ile moleküler verilerin birlikte değerlendirilmesi biyoçeşitlilik araştırmalarında daha sağlıklı sonuçlar vermektedir (Dayrat, 2005; Will ve ark., 2005; Goldstein ve DeSalle, 2011; Tänzler ve ark., 2012).

Bu çalışmada, örümceklerin müzede muhafaza edilen ve yeni toplanan örneklerinden DNA izole edilmesi, konsantrasyon değerlerine bakılması ve DNA barkotlama yapılabilmesi üzerine araştırma yapılmıştır. Örümcekler üzerine henüz ülkemizde pek fazla DNA barkotlama çalışması bulunmamakta, var olan müze materyallerinin değerlendirilmesi ve her geçen gün toplanan örneklerin uygun koşullarda saklanarak sonraki dönemlerde kaliteli DNA elde edilebilmesi araştırılmıştır.

Hedefimiz yıllardır toplanan ve müzelerde muhafaza edilen (2002-2017) örümceklerden başarılı DNA elde etmek ve barkot kütüphaneleri oluşturulmasına katkı sağlamaktır.

## 2. Materyal ve Metot

Bu çalışma ile Gaziantep, Adıyaman, Sinop, Samsun, Kahramanmaraş, Çorum, Elazığ, Tokat, Yozgat ve Ordu illerinden 2002-2017 yıllarında yakalanan %70 -96 etil alkolde tutulan veya -20 °C de muhafaza edilen, Lycosidae ve Thomisidae familyalarına ait örümcek örnekleri araştırılmıştır. Örümcekler, aspiratör, atrap, çukur tuzak ve elle toplama yöntemleri ile yakalanmıştır. Bu yöntemlerden aspiratör ile taş altı, kaya üstü, yaprak yüzeyi, ağ üzeri, ot kümeleri gibi yerlerden hareket eden veya sabit duran örümcekler yakalanmıştır. Atrap ile tarım alanlarından, otlaklardan ve bitkilerin üzerinden örnek toplanmıştır. Örnekler % 70- 96 lık etil ortamında laboratuvara getirilmiştir. Örneklerden DNA izolasyonu, PCR ve sekanslama işlemleri yapılmıştır. DNA barkot .kütüphaneleri oluşturulmasında öncelikle örneklerden kaliteli DNA izole edilmesi gerekmektedir.

### 2.1. DNA İzolasyonu

Müze de muhafaza edilen eski örnekler (2002-2012) ile yeni toplanmış ve

buzdolabında muhafaza edilen yeni örneklerden (2015-2017) vücut büyüklükleri gözönünde bulundurularak genomik DNA izole edildi. 358 örümcekte ergin ve yavru olduğuna bakılmaksızın, küçük vücutlu örnekler için 2-4 adet bacak, büyük vücutlu örneklerde 2 adet bacak koparılarak kit yardımı ile DNA izolasyonları yapılmıştır (Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kit ). Elde edilen DNA'lar spektrofotometrik analiz ile kalite ve konsantrasyonları ölçülmüştür. Örneklerden 1,5 ul alınarak Nano Drop spektrofotometre ile ölçüldü.

## 2.2. PCR Çalışmaları

Gen amplifikasyonu kısa sürede ve doğru olarak gerçekleştirilmesi açısından laboratuvar ortamında hedef DNA'nın çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Amplifikasyonun verimli olması için DNA'nın saf olarak elde edilmiş olması gerekmektedir.

Çalışmada DNA konsantrasyon değerleri belirlenen örnekler daha sonra PCR çalışmalarına tabi tutulmuş ve jel görüntüleri alınmıştır. Bu amaçla omurgasız hayvanlarda mitokondrial bir gen bölgesi olan COI (Sitokrom C oksidaz I) ve nükleer gen bölgesi olan ITS (internal transcribed spacer) kullanılmıştır. Çalışma kapsamında hayvanlarda standart barkot geni olarak kabul edilen Sitokrom C oksidase I (COI) (658bp) gen bölgesi için uygun primerler LCO1490 (İ: 5'-

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG -3' ) (Folmer et al., 1994) ve Keliser Reverse 2 (G: 5' - GGATGGCCAAAAAATCAAAATAAA TG-3') (Barrett and Hebert, 2005) ve ITS gen bölgesi için uygun primerler CAS18sF1: 5'- TACACACCGCCCTCGCTACTA -3 ' ve CAS28sBld: 5'- TTCTTTTCCTCCGCTTATTTATATGC TTAA -3' (Ji et al, 2013) kullanılarak PCR gerçekleştirildi. PCR koşulları ve döngü sayıları Çizelge 1 ve Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 1. PCR döngüleri

	COI/ITS	COI/ITS
Denatürasyon	95 °C'de / 94 °C'de	5 dakika / 4dakika
	52 °C'de / 94 °C'de 95 °C'de	40saniye / 30saniye 30 saniye
Döngü	72 °C'de / 62 °C'de	1,30 dakika / 40saniye
	--- / 72 °C'de	--- / 1dakika
Sonlanma	72 °C'de / 72 °C'de	10 dakika / 4dakika
Döngü sayısı	35 / 30	

Ayrıca PCR ürünlerinin gözlemlenebilmesi için, örnekler %1,5'lük agaroz jelde 1X TBE tamponu içerisinde elektroforez işlemi uygulandı. Her bir kuyucuğa 4 µl pcr ürünü, 2 µl yükleme tamponu olmak üzere 6 µl ürün konularak 100 voltta 60 dk yürütüldü ve UV ışık altında DNA fragmentleri gözlemlendi.

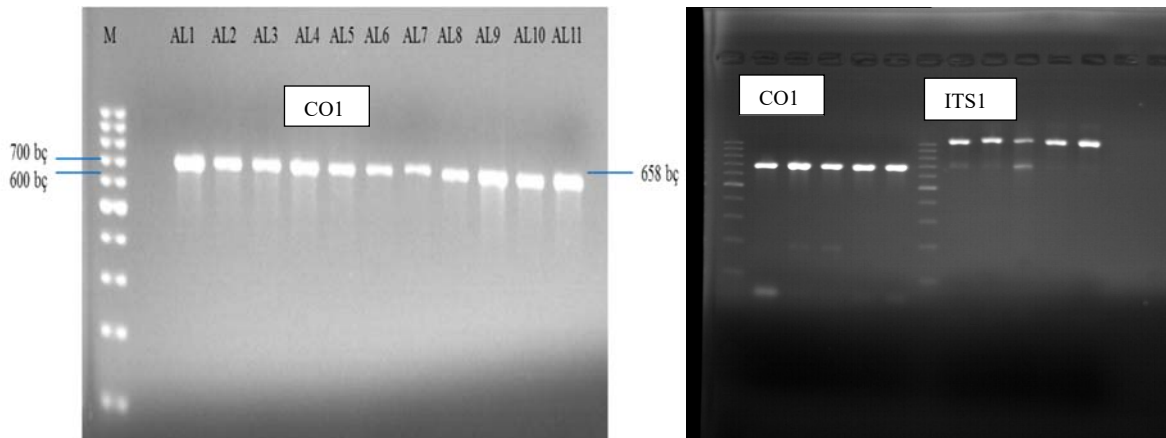
**Çizelge 2.** COI ve ITS1 genlerinin çoğaltılması için hazırlanan reaksiyon içeriği

Reaksiyon İçeriği	Miktar
ddH <sub>2</sub> O	15.8 µl
10X Taq Buffer (KCl)	2.5 µl
dNTP mix	0.5 µl
2.5 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl
10 µmol İleri Primer	1µl
10 µmol Geri Primer	1µl
5U/1µl Taq Polimeraz	0.12 µl
Genomik DNA	2 µl
<b>Toplam Hacim:</b>	<b>25 µl</b>

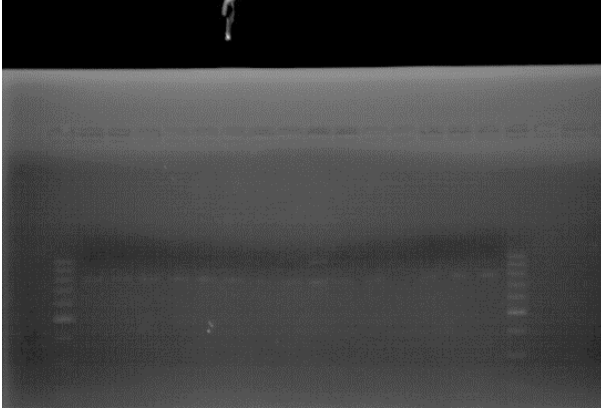
### 3. Sonuçlar ve Tartışma

Çalışma ile Lycosidae ve Thomisidae familyasına ait farklı ortamlarda muhafaza edilen örümcek örneklerinin DNA konsantrasyonlarının DNA barkotlamadaki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca gerek müzede 2002-2012 yılları arasında oda sıcaklığında saklanan örümcekler gerekse 2012-2017 yılları arasında buzdolabında muhafaza edilen örneklerden de vücut büyüklükleri dikkate alınarak DNA izolasyonları

gerçekleştirilmiştir. Toplamda 358 örnek değerlendirilmiştir. Taze örnekler olarak nitelendirdiğimiz 2012-2017 arasındaki örneklerden elde edilen DNA konsantrasyon değerleri kaliteli çıkmış, verimli PCR ürünleri elde edilmiş ve elektroforez görüntüleri oldukça net gözlemlenmiştir (Şekil 1). Ayrıca PCR ürünleri sekanslama işlemine tabi tutuldu (Sanger dizileme) ve 187 örneğin sekanslarının kaliteli olduğu belirlenirken 171 örneğe ait sekans verilerinin filogenetik çalışmalarda kullanılmaya uygun olmadığı belirlenmiştir. Sekans dizilerine bakıldığı zaman DNA konsantrasyonları düşük, PCR ürünlerinin verimli olmayan ve jel görüntülerinde gözlemlenemeyen örnekler olduğu belirlendi (Şekil 2). Bu durumdaki örümcek DNA' ları 2012 yılından önceki döneme ait yani 2002-2012 yıllarına ait örnekler olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 1.** 2012-2017 yılları arasındaki A:Lycosidae (*Alopecosa* sp.) örneklerine ait COI gen bölgesi; B: Thomisidae örneklerinin COI ve ITS1 gen bölgesi, PCR ürünleri Elektroforez görüntüsü.



**Şekil 2.** 2002-2012 yılları arasındaki Thomisidae örnekleri ITS gen bölgesi, PCR ürünleri Elektroforez görüntüsü.

DNA barkot çalışmalarında sekansların net okunabilir olması sonraki çalışmalar açısından önemlidir. Bu çalışmadaki kaliteli sekanslara bakıldığında bu örneklerin yeni ve morfolojilerinin küçük (1-3 mm) veya büyük (3mm den büyük) olmasıyla ilişkili olmadığı belirlenmiştir.

Müze örnekleri üzerinde örneğin yaşı ve DNA barkotlama üzerine etkisinin araştırıldığı bazı çalışmalarda (Zucon ve ark., 2012; Anderson ve Mills, 2012) örneklerin yaşı ve DNA konsantrasyonları arasında doğrudan bir uyum belirlenmemiştir.

Bu çalışma ile 5 yılı aşkın bir zamandır müzelerde oda sıcaklığında %70 etil alkolde muhafaza edilen örneklerin hem DNA konsantrasyonları hemde sekans ürünleri DNA barkot çalışmaları için yetersiz bulunmuştur. Ölçülen DNA konsantrasyonları salt sonuçlar belirteç değildir. Bu örneklerde elde edilen sekanslar

kısa baz uzunluğunda (150-300bp) olup örneklerin tanımlanmasında kullanılamazlar. Çalışma kapsamında belirlenen COI gen bölgesi için 600-700 bp ve ITS için 750-1000bp lik başarılı sekans ürünleri, türler üzerinde yapılan DNA barkot çalışmalarında daha net sonuçlar vermiştir ve bu sonuçlar Genbank'a gönderilmiştir. Kırık elde edilmiş DNA ve sonucunda kısa uzunluktaki sekanslamalar DNA barkot çalışmaları için kullanılamamışlardır. Araştırma ile örümceklerin %96 etil alkolde ve -20 °C de saklanması gerektiği belirlenmiştir. Ayrıca, morfolojik tür tanımlamalarında tamamen devre dışı bırakılan yavru bireyler, DNA bazlı çalışmalar ile tanımlanabildiği için saklama koşullarının ayarlanabilmesi moleküler çalışmalardaki başarıyı arttıracaktır. Ülkemizde çok fazla sayıda müzelerde ve oda sıcaklığında örneklerin muhafaza edildiği düşünülürse bu örneklerin vakit kaybedilmeden DNA barkot çalışmalarının yapılması Türkiye Örümcek envanterinin ve DNA veri bankasının oluşumu açısından önemlidir.

### **Teşekkür**

Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, FEF.YLT.17.09 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- A’Haea S, Harling R, McKinlay RG, Topping CJ (1998). RAPD profiling of spider (Araneae) DNA. *Journal of Arachnology* 26: 397–400.
- Anderson JC, Mills NJ (2012). DNA extraction from museum specimens of parasitic Hymenoptera. *PloS ONE* 7: e45549.
- Barret RDH, Hebert PDN (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 83: 481–491.
- Dayrat B (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.
- Demir H, Seyyar O (2017). Annotated checklist of the spiders of Turkey. *Munis Entomology & Zoology Journal* 12(2): 433–469.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3(5): 294–299.
- Goldstein PZ, DeSalle R (2011). Integrating DNA barcode data and taxonomic practise: determination, discovery and description. *Bioessays* 33: 135–147.
- Ji YJ, Zhang DH, He LJ (2003). Rvolutionary conservation and versatility of a new set of primers amplifying internal transcribed spacer regions in insect and other invertabrates. *Molecular Ecology Notes* 3: 581–585.
- Nentwig W, Blick T, Gloor D, Hänggi A, Kropf C (2017). Spiders of Europe. [www.araneae.unibe.ch](http://www.araneae.unibe.ch). Version of access date: 10.2017
- Qiagen (2006). DNeasy Blood & Tissue Handbook.(USA).
- Tänzler R, Sagata K, Surbakti S, Balke M, Riedel A (2012). DNA barcoding for community ecology-how to tackle a hyperdiverse, mostly undescribed Melanesian fauna. *PLOS One* 7(1):1-11.
- Vink CJ, Thomas SM, Paquin P, Hayashi CY, Hedin M (2005).The effect of preservatives and temperatures on Arachnid DNA. *Invertebrate Systematics* 19: 99–104.
- Will KW, Mishler BD, Wheeler QD (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54: 844–851.
- World Spider Catalog (2018). World spider catalog. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 19.0, accessed on {date of access}. doi: 10.24436/2
- Zucon D, Brisset J, Corbari L, Puillandre N, Utge J, Samadi S (2012). An optimised protocol for barcoding museum collections of decapod crustaceans: a case-study for a 10-40 years- old collection. *Invertebrate Systematics* 26: 592–600.