

Over streepjescodes en boswitjes (DNA-barcoding bij Leptidea) :

Hoe, Wat, Waarom ?

Een inleiding

Agenda :

- Wat is een soort ?
- DNA ?
- Hoe ontstaan (nieuwe) soorten ?
- Hoe DNA onderzoeken ?
- *Leptidea* (Boswitjes)

Wat is een Soort ? (1)

- Stef Spruytte



Laurian Parmentier

Wat is een soort ? (2)

- Veelgebruikte definitie voor vlinders en aanverwanten :
 - Voortplanting door 2 “individuen”
 - Nakomelingen terug vruchtbaar
- Niet altijd van toepassing ...

Soorten herkennen : Boswitjes (1)

- **Morfologische** kenmerken :

- 11 :
- Man
- Zomer
- *L. sinapis*
- 100 % !



- *Leptidea sinapis* (Linnaeus 1758), het Boswitje
- Niet altijd even gemakkelijk...

Soorten herkennen : Boswitjes (2)

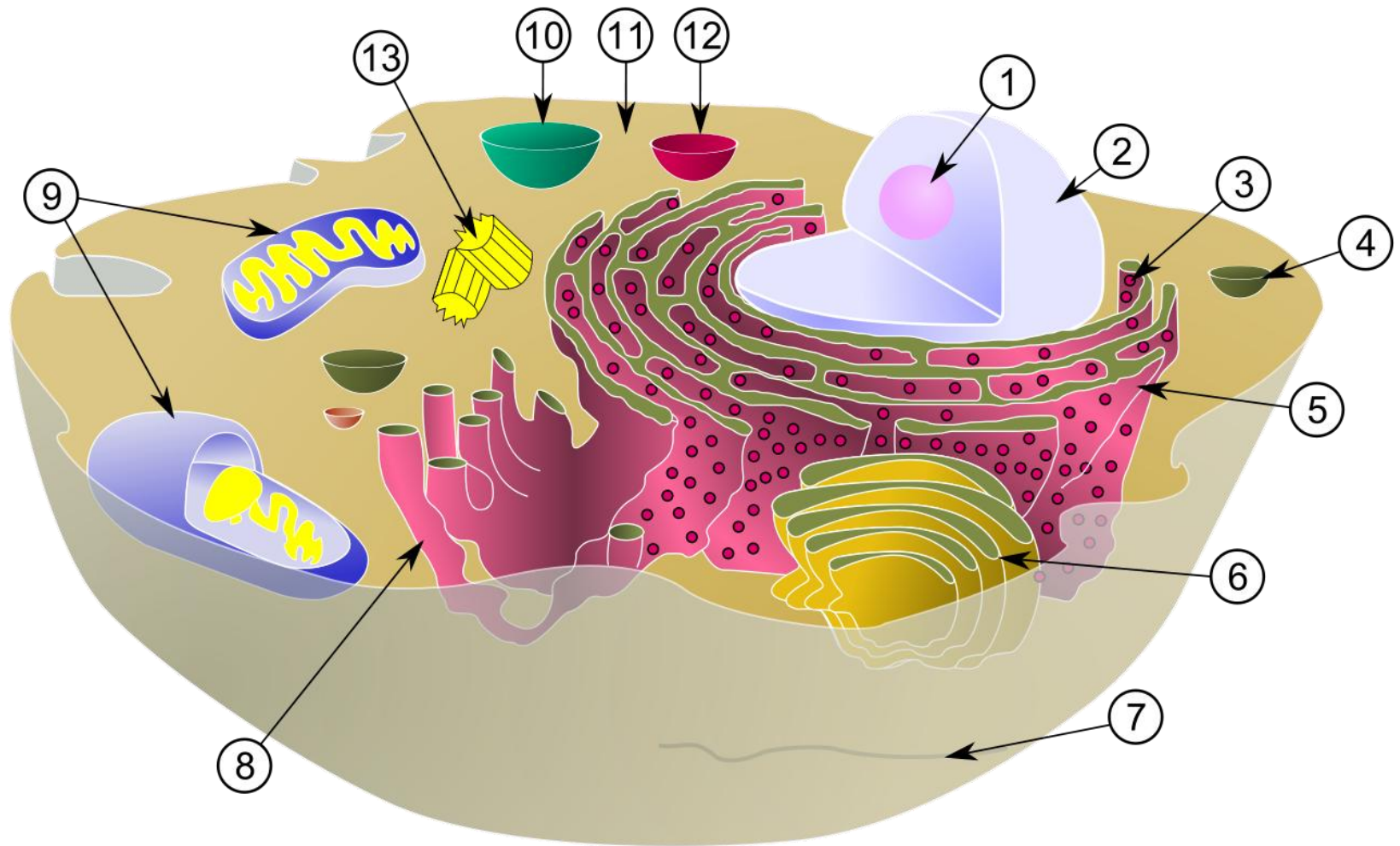
- 1989 :
- **Genitaliën**onderzoek
- Tweede soort :
 - *Leptidea reali*
 - Komt over gans Europa voor in dezelfde gebieden als *L. sinapis* (sympatric)



En nu eventjes inzoomen

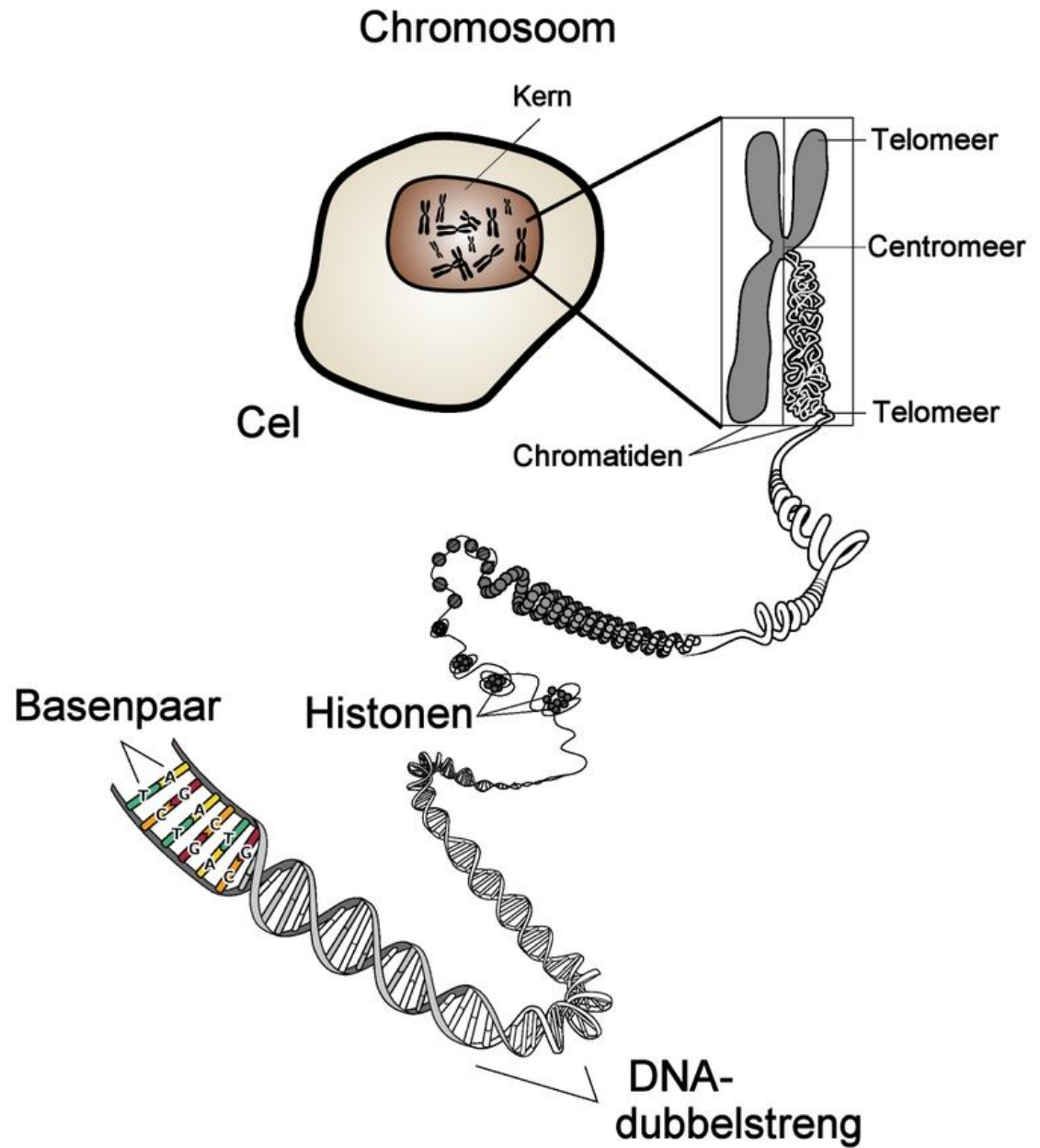
...

Cel :



Kern DNA :

- Wiki



DNA ?? Wat ?

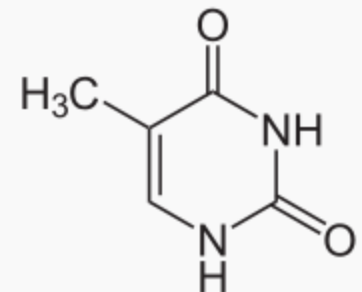
- Een groot molecuul
- Bevat genen => eiwitten
- Bevat erfelijke informatie : hoe zie je eruit, welke soort ben je, ...
- Bestaat uit “blokjes” (nucleotiden) verbonden door “basen”
- Slechts 4 soorten “blokjes”
 - Adenine (A)
 - Thymine (T)
 - Guanine (G)
 - Cytosine (C)

(bron : Wiki :)

Basenpaar



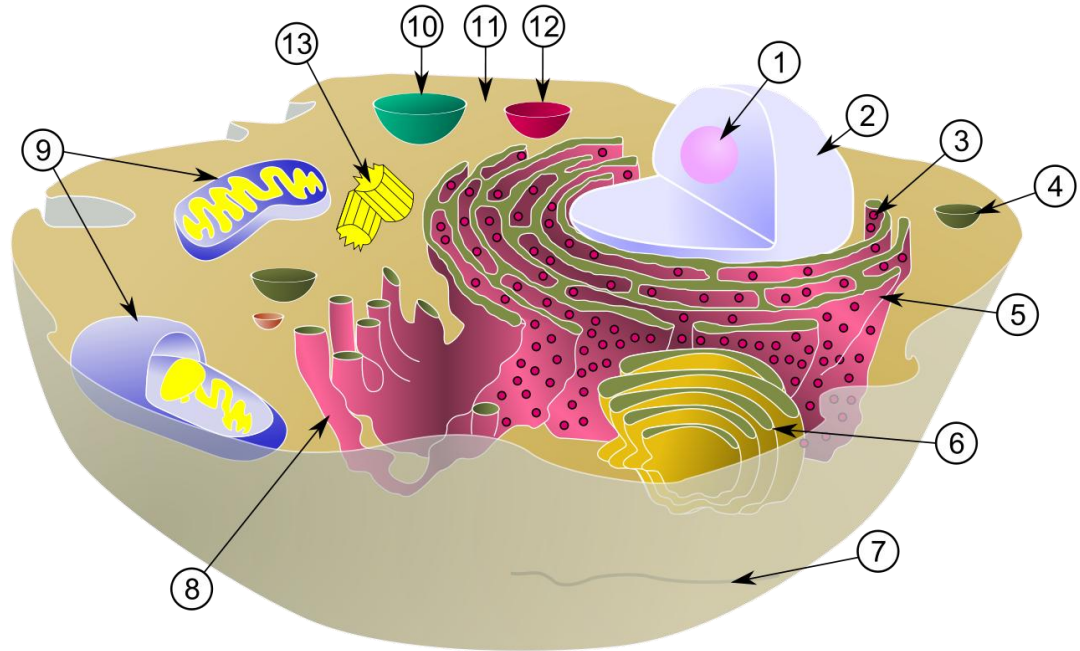
Structuurformule en molecuulmodel



Structuurformule van thymine

Mithochondriaal DNA :

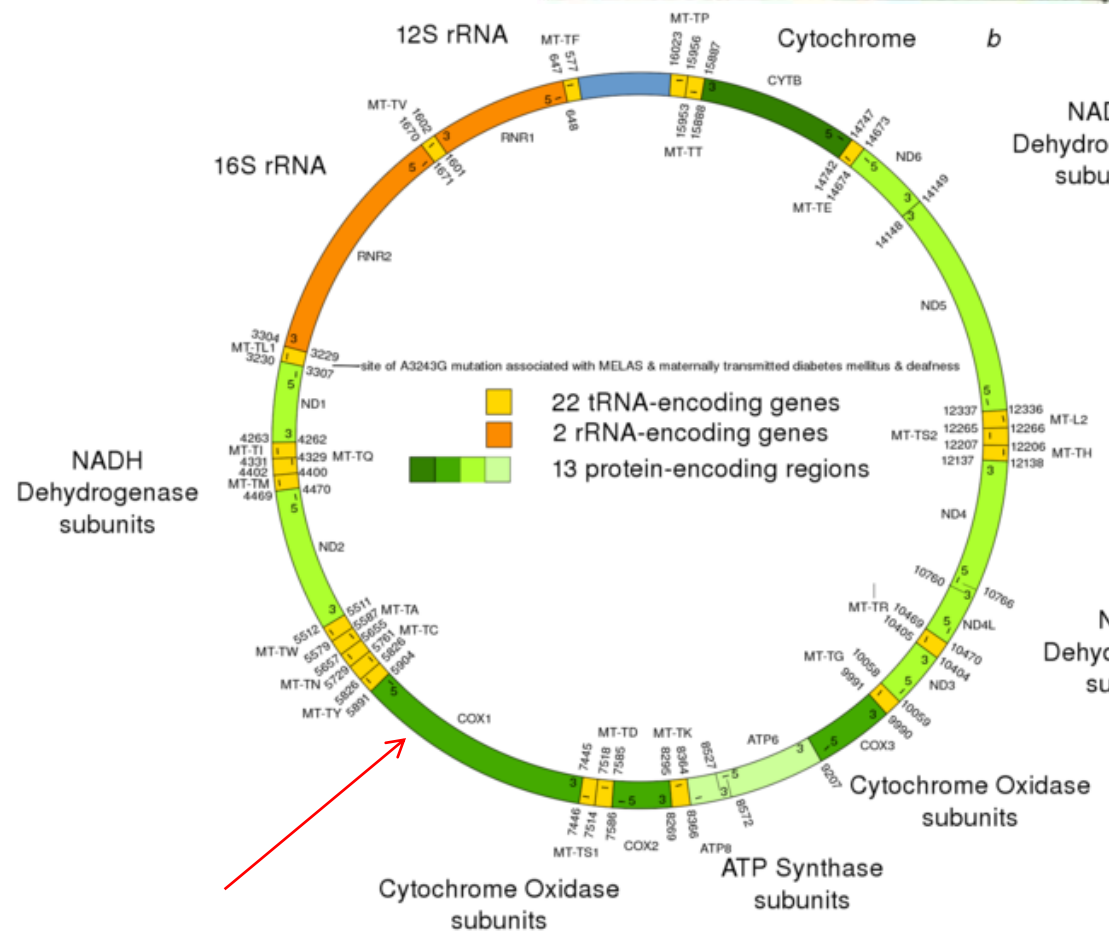
- Mitochondrion :



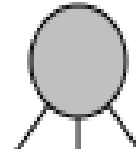
- Energie-machines : maken energie aan voor de cel
- Zijn met velen (+- honderden per cel)
- Bevatten een deel van het DNA (bij dieren)
- (bron Wiki :)

Mithochondriaal DNA :

- Gebruikt om eiwitten te maken.
- Komt enkel van de moeder
 - Weinig evolutie in dit DNA (niet zoals kernDNA)
- DNA-barcoding !!



Waarom DNA onderzoeken ?? (1)



- Evolutie (Darwin)
- DNA wijzigt
 - > “foutjes” (mutatie)
- Hoe ?
 - Straling (UV, ...)
 - Virussen
 - Bacteriën
 - Chromosomen deling/samensmelten
 - ...
- Natuurlijke selectie
- Belang voor evolutie van soorten

Waarom DNA onderzoeken ?? (2)

- Genetische variatie (Genenpool)
 - Cryptic species
 - Soorten
-
- Belang voor biodiversiteit / herkennen van soorten / ontdekken nieuwe soorten

Dna-onderzoek : Hoe ?

- PCR filmpje :
 - <https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

1

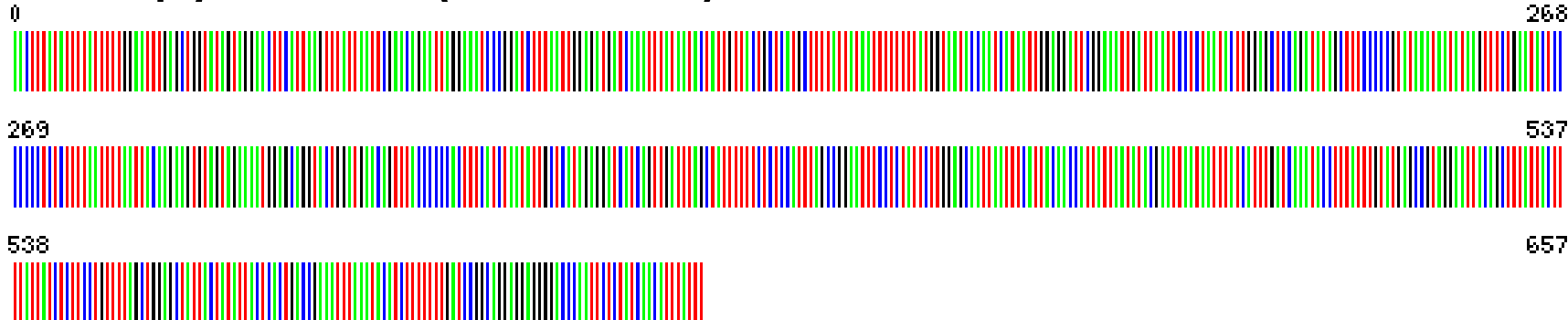
We gaan op Dna-onderzoek : Barcode Of Life Data (BOLD)

- [\(bron : boldsystems.org\)](http://boldsystems.org)
- mtDNA Boswitje “21 (06-H634)”

```
AACTTTATATTTTATTTTGGAAATTGAGCTGGTATAGTAGGAACCTTCATTAAAGTTTATTAATTCGAACAGAATT
AGGAAATCCCGGATCTTTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATACTATTGTTACTGCTCATGCTTTTATTATAAT
TTTTTTTATGGTAATACCAATCATAATTGGAGGATTTCGGAAATTGATTAATTCCTCTAATACTTGGAGCTCCAGA
TATAGCTTTCCCCCGTATAAATAATATAAGTTTCTGAATACTCCCCCCTCTCTTTTAATTTTAATTACAAGAAG
TGTAGTAGAAAATGGAGCAGGTACTGGATGAACAGTTTACCCCCACTTTCATCTAATATTGCTCATAGAGGATC
ATCAGTTGATTTAGCTATTTTTTCTCTCCATTTAGCCGGAATTTCTCTATTCTTGGAGCAATTAATTTTCATTAC
AACCATTATTAATATACGAATTAATAATTTATCATTGATCAAATACCTTTATTTGTATGAGCCGTAGGAATTAC
AGCTTTATTACTTTTATTATCTCTTCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTACTCACTGACCGAAATTTAAA
TACATCTTTTTTTGATCCGGCAGGAGGAGGGGACCCAATTCTCTATCAACATTTATTT
```



- Streepjescode (Barcode)



2 Boswitjes uit Zuid-Frankrijk

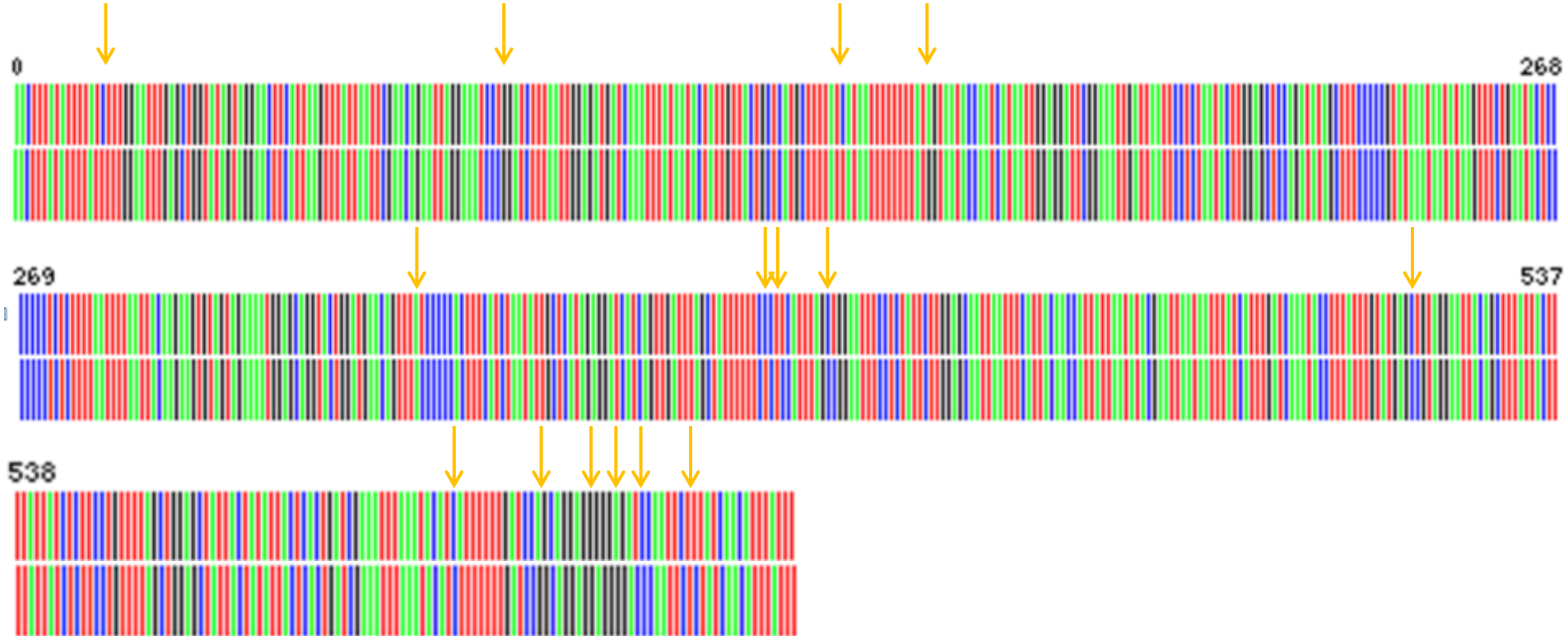
• 42 : man (Provence)

63 : man (Isère)



2

Vergelijk 42 – 63 (Provence - Isère)



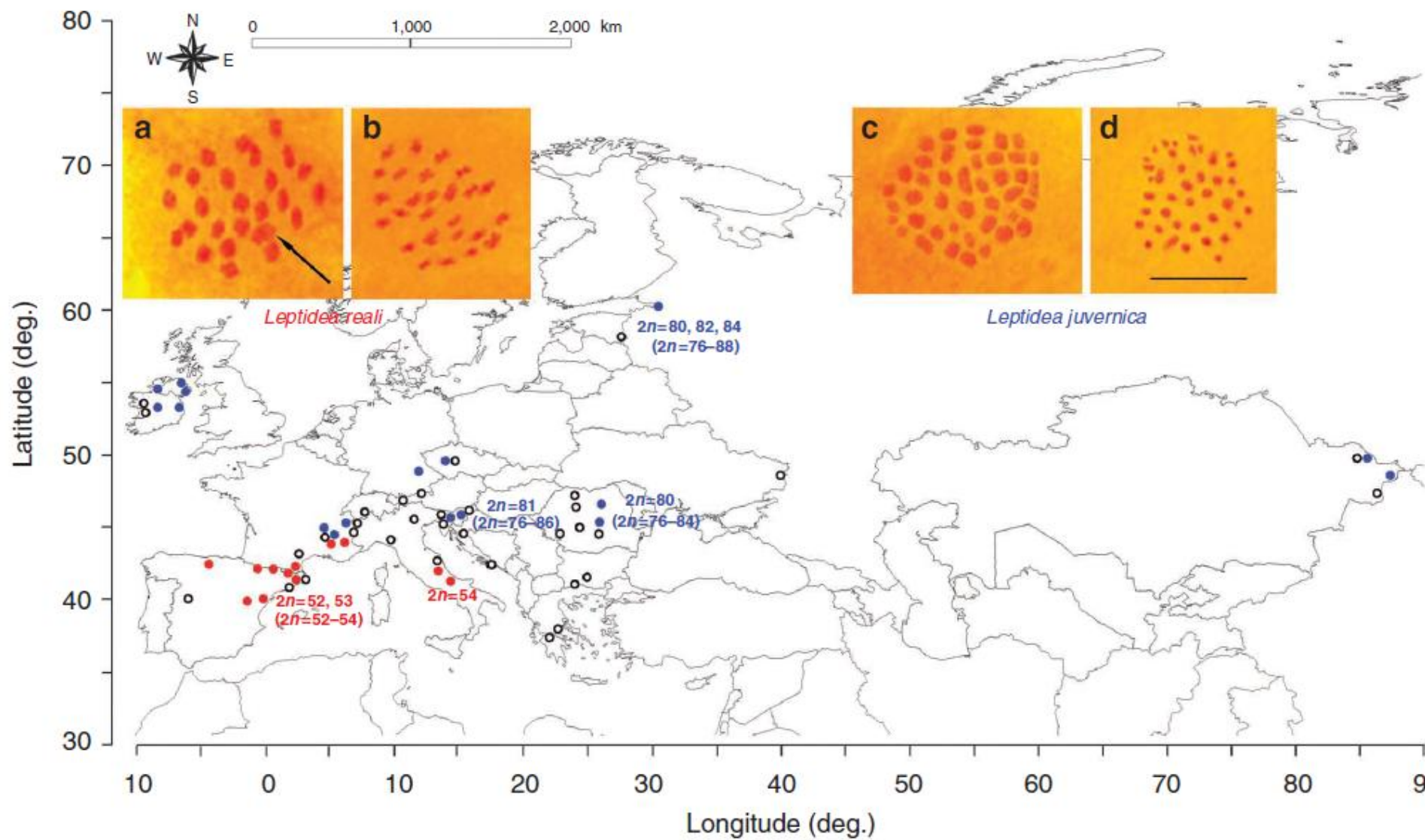
- 15 verschillen (op 658 bp) ~ 2,3 %

Wat heeft dit “ons” geleerd ?

- 2011 :
 - Unexpected layers of **cryptic** diversity in wood white *Leptidea butterflies* (Vlad Dinca, Vladimir A. Lukhtanov, Gerard Talavera, & Roger Vila)
 - DNA onderzoek => *L. reali* bestaat uit 2 soorten :
 - *L. reali*
 - *L. juvernica*
 - => allopatric

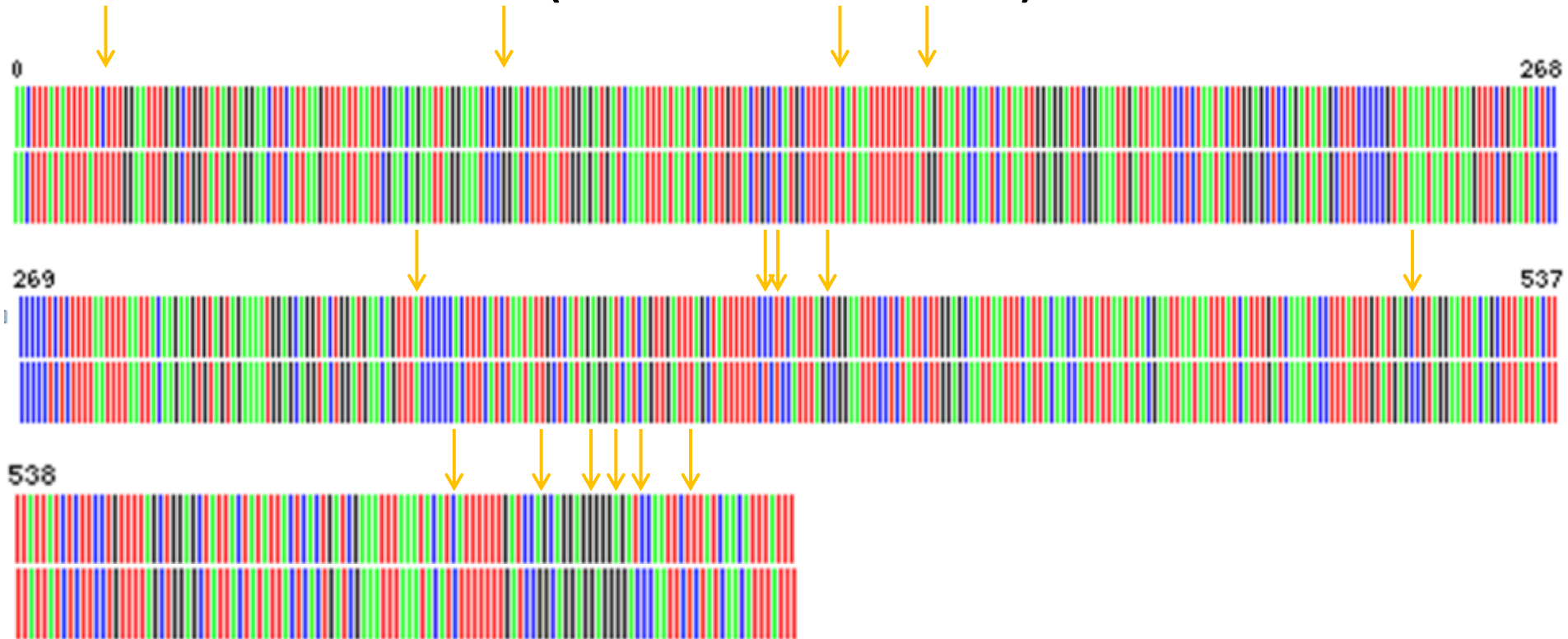
L. juvernica

- DNA verschillend (zowel mitochondriaal als kern-DNA, beide op verschillende plaatsen)
- Verschillend aantal chromosomen :
 - *L. reali* ($2n = 52-54$) and *L. juvernica* stat. nov. ($2n = 80-84$). (Dinca et al, 2011)



2

Vergelijk 42 – 63
(reali – juvernica)
(Provence - Isère)



- 15 verschillen (op 658 bp) ~ 2,3 %

2 Boswitjes uit Zuid-Frankrijk

• 42 : L. *reali* (Provence)

63 : L. *juvernica* (Isère)



Is dit nu echt een aparte **soort** ??

- 2013
- Reproductive isolation and patterns of genetic differentiation in a cryptic butterfly species complex (Vlad Dinca et al.)
 - Bevestiging van onze definitie van “soort”
 - Filmpje (met dank aan Vlad Dinca)

Soorten herkennen (3)

- *L. juvernica*
- Morphologie ?? (straks)
- Genitaliën ??
- Niet te onderscheiden van *Leptidea reali*
 - Komt over gans Europa voor in dezelfde gebieden als *L. sinapis*
- DNA-barcoding !

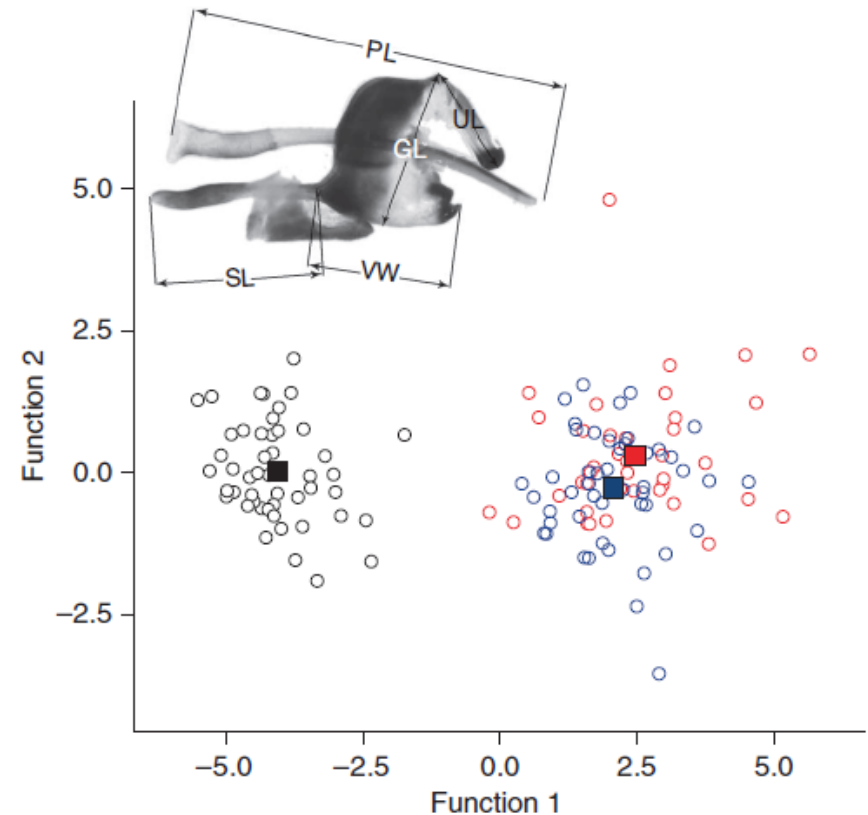


Figure 4 | Discriminant analysis based on male genitalia morphometry. *L. sinapis* (black) is identifiable based on male genitalia, but there is broad overlap between *L. reali* (red) and *L. juvernica* stat. nov. (blue). Circles represent individuals and squares represent centroids for each species. Elements of the male genitalia measured were PL, SL, VW, GL and UL. The discriminant variables were PL and SL for function 1 and SL and VW for function 2. The upper left corner image indicates the variables measured for *Leptidea* male genitalia.

DNA- barcoding bij Leptidea :
Wat kunnen we nog leren ?

3

Wie zijn deze ? (3a)

- Foto's : 21, 86



3

Wie is deze ? (3b)

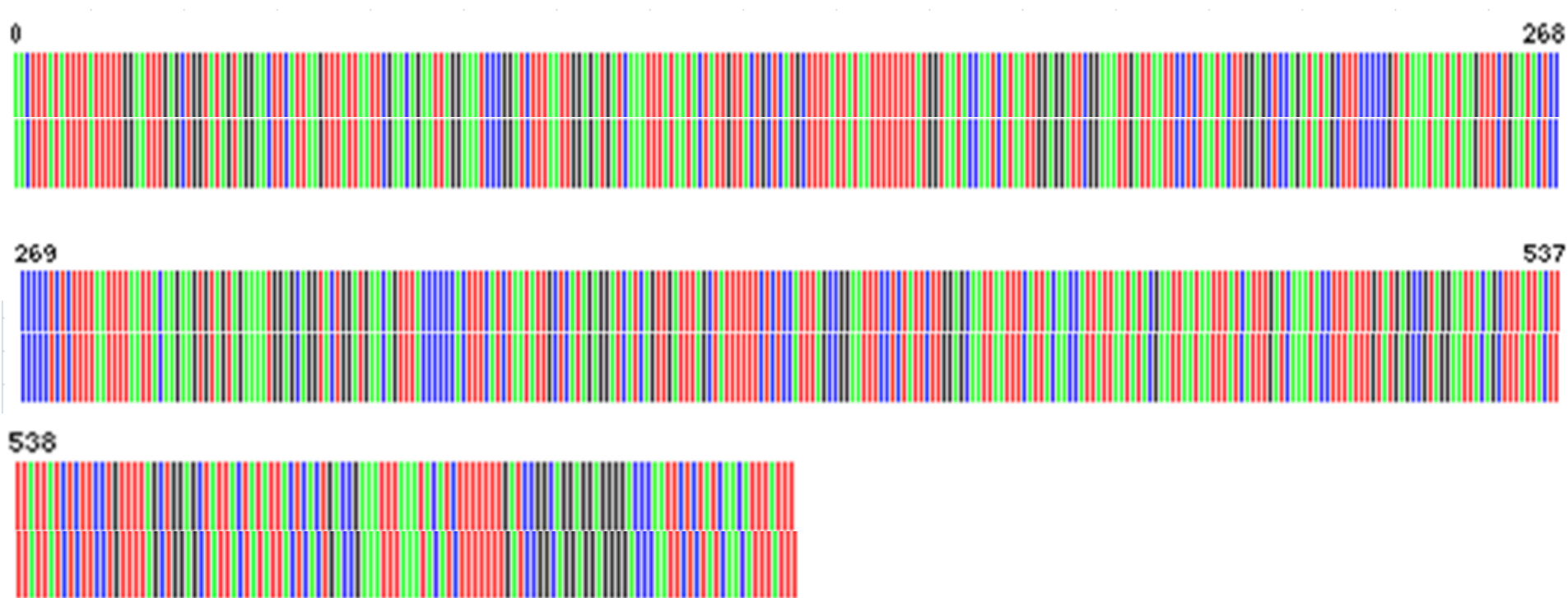
- Mazel, 2012 : man - zomer



	<i>juvernica</i>	<i>sinapis</i>
		
	Macule apicale +/- arrondie	Macule +/- ronde, très réduite en 3 ^{ème} génération
		
	Fond blanc très rarement crème Dessin typique léger +/- net	Fond blanc Traces de dessin gris +/- net
		
Revers jaune pâle ou crème Dessin résiduel ou nul	Pas de forme jaune	Fond jaune pâle Dessin +/- nul

3

Wie zijn deze (3c) DNA-barcoding : 21 – 86



- Geen verschillen tussen beide
- DNA-barcoding => 2x *juvernica* Kazachstan

3

Wie zijn deze ? (3d)

- Foto's : 21, 86



- Beide zijn man – zomer – *juvernica* (Kazachstan) : komen niet echt overeen met Mazel (zie straks)

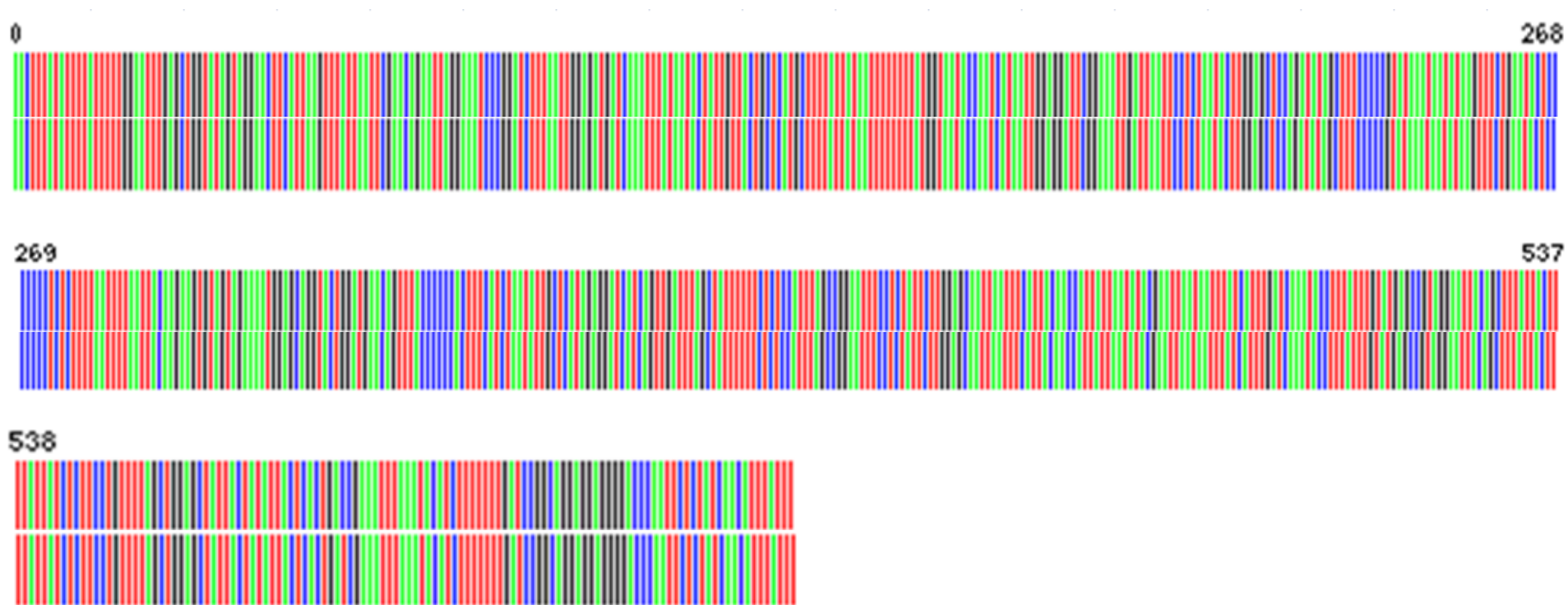
4

Vergelijk 21 – 63 (*juvernica* Kazakhstan - Isère)



4

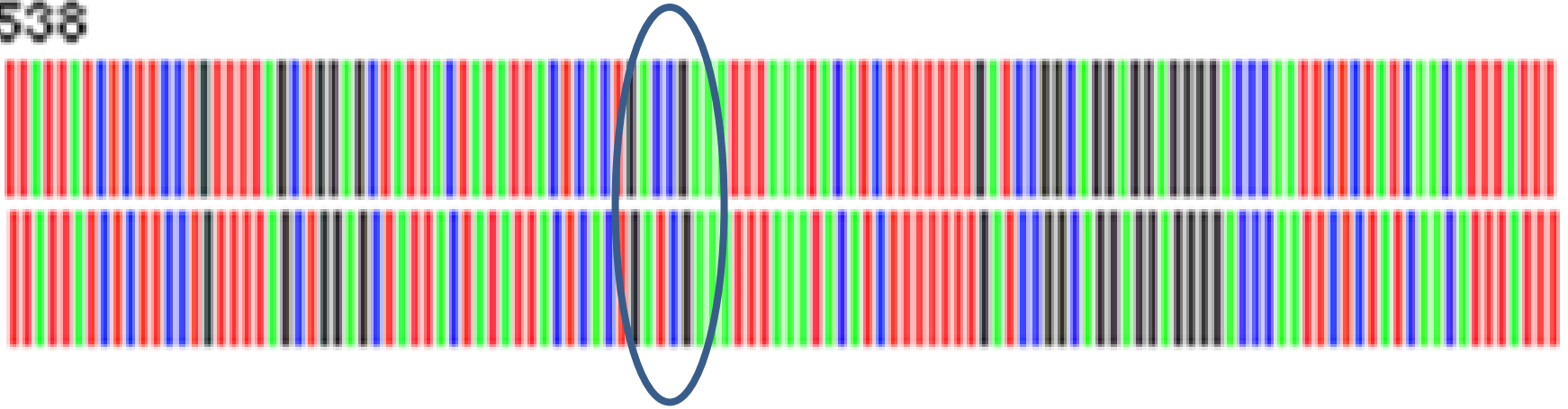
Vergelijk 21 – 63 (*juvernica* Kazakhstan - Isère)



4

Vergelijk 21 – 63 (*juvernica* Kazachstan - Isère)

538



- 1 bouwblokje verschillend : van C (cytosine) naar G (guanine)
- Verschillend “haplotype”

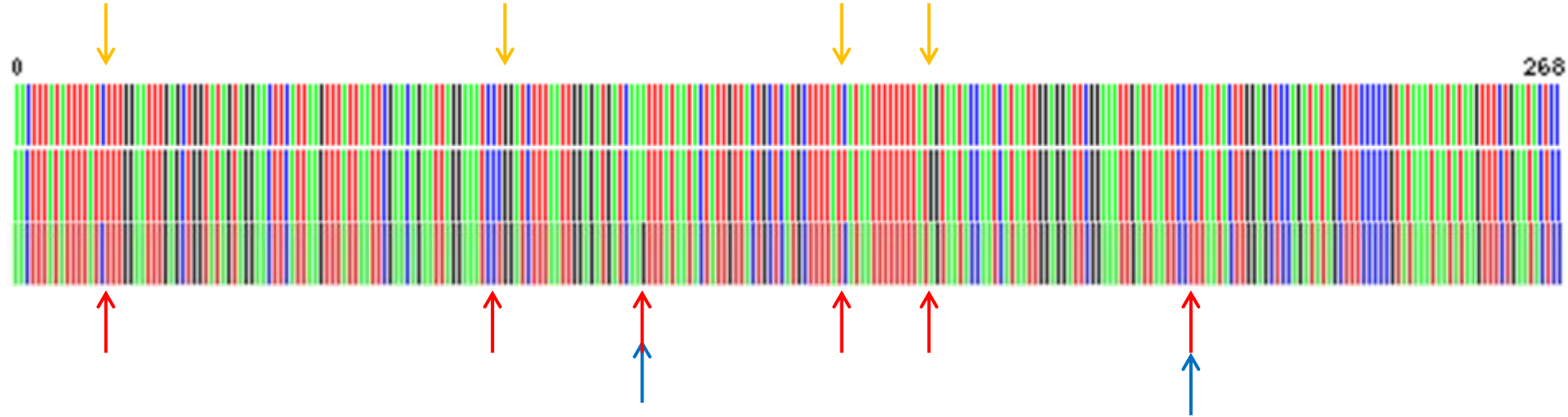
5

3 boswitjes : 42 – 63 - 41

- *reali – juvernica – sinapis*
- Lente – zomer - zomer
- 42 – 63 – 41

5

Vergelijk 42 – 63 - 41
(Provence – Isère – Drôme)
reali – juvernica – sinapis

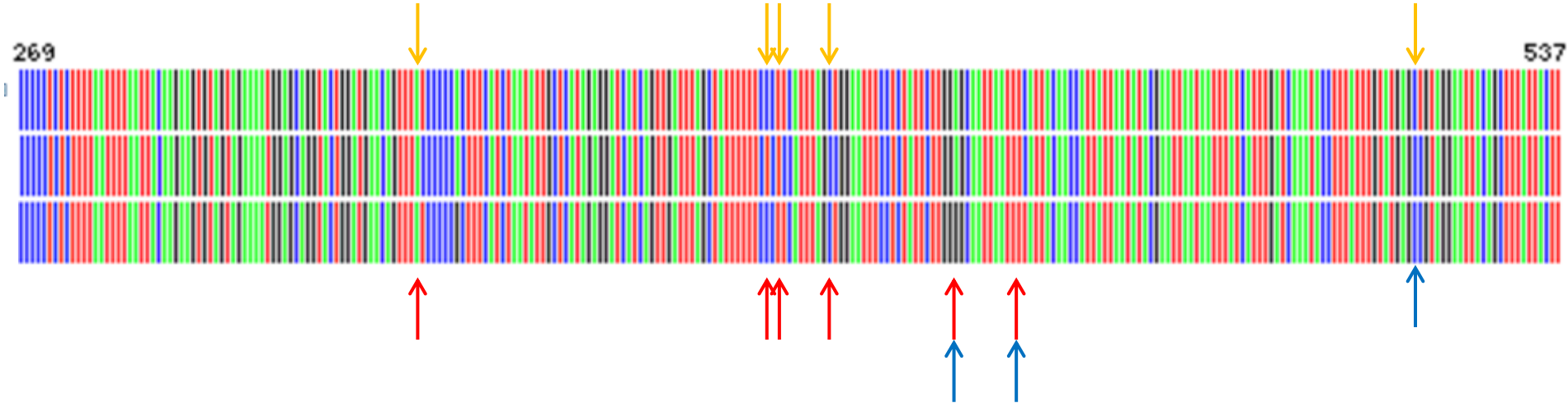


- *reali – juvernica* :
- *juvernica – sinapis*
- *reali – sinapis*



5

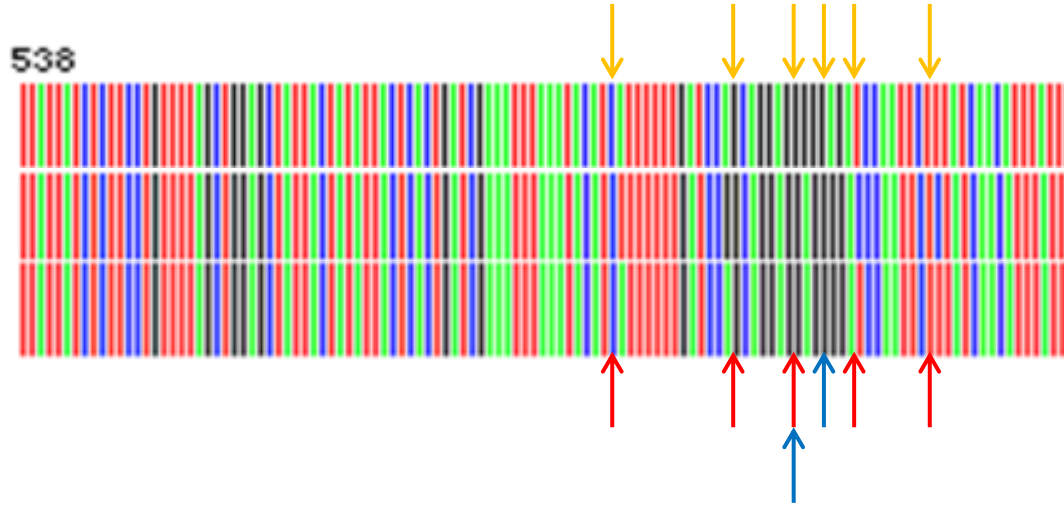
Vergelijk 42 – 63 - 41
(Provence – Isère – Drôme)
reali – juvernica - sinapis



reali – juvernica : 5 ↓
juvernica – sinapis : 6 ↑
reali – sinapis : 3 ↑

5

Vergelijk 42 – 63 - 41
(Provence – Isère – Drôme)
reali – juvernica - sinapis



reali – juvernica : 6↓

juvernica – sinapis : 5↑

reali – sinapis : 2↑

5

reali – juvernica – sinapis : totaal

reali – juvernica : 15

juvernica – sinapis : 17

reali – sinapis : 7

- *juvernica* meest verschillend van “zusters”
reali – sinapis !

Wat kunnen we nog leren ? (2)

- Resultaten **Dna** onderzoek van Leptidea :
 - Duidelijke verschillen in Dna
 - “*L. reali*” bestaat uit *L. reali* en *L. juvernica*
 - allopatric
 - *reali* : SP, IT, zuid-FR
 - *juvernica* : rest van Europa
 - Sympatric met *sinapis*

Een boswitjes-stamboom

- Vergelijken van verschillen in DNA :
 - “evolutie (fylogenetische) stamboom”
(phenologenetetic tree)
 - Toont de evolutiegeschiedenis van verwante soorten :
 - Verschillende lineages / verwantschappen
 - + (soms) Schatting tijdsverloop

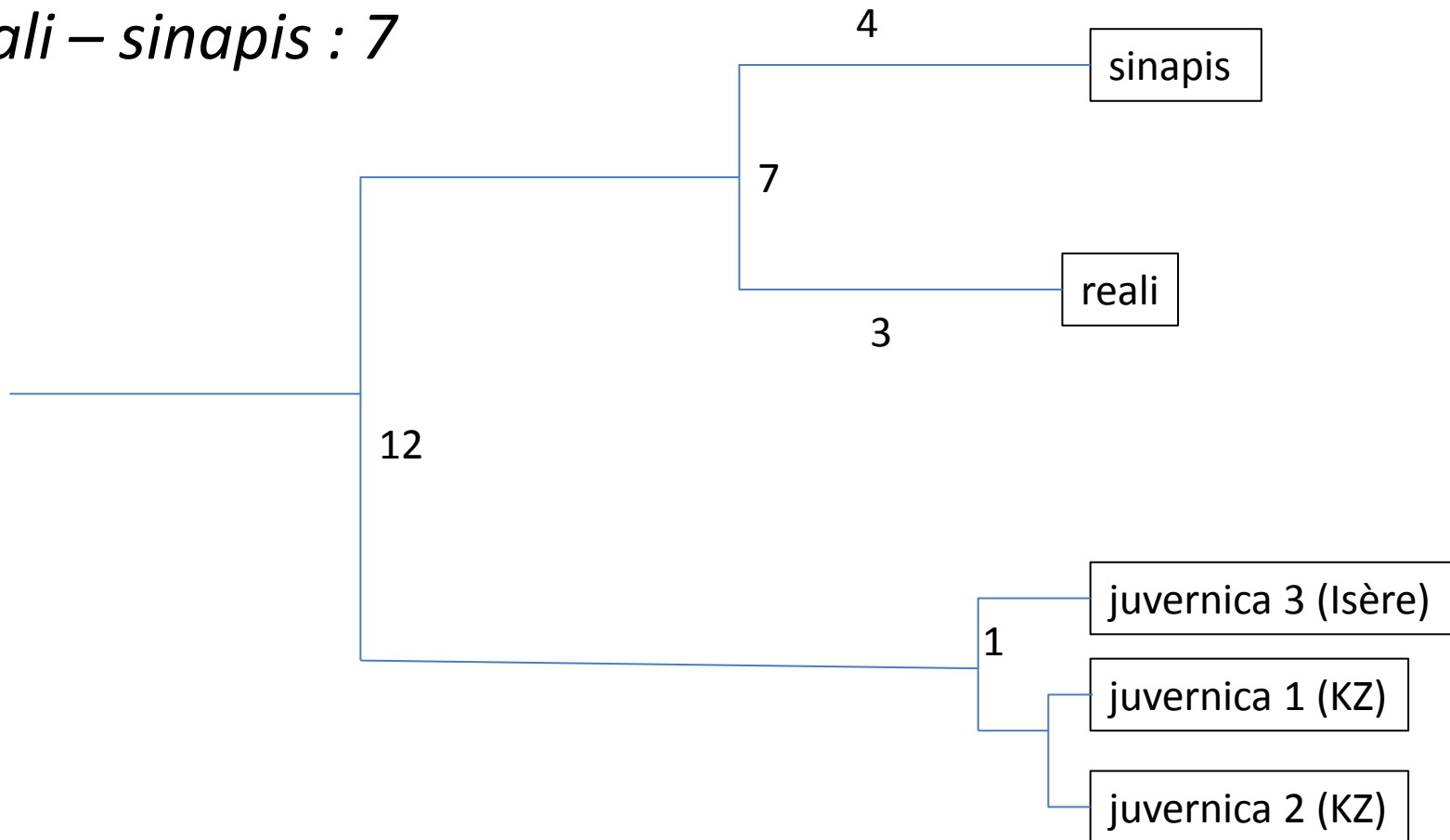
5

Hoe maken we een “stamboom” ?

reali – *juvernica* : 15

juvernica – *sinapis* : 17

reali – *sinapis* : 7

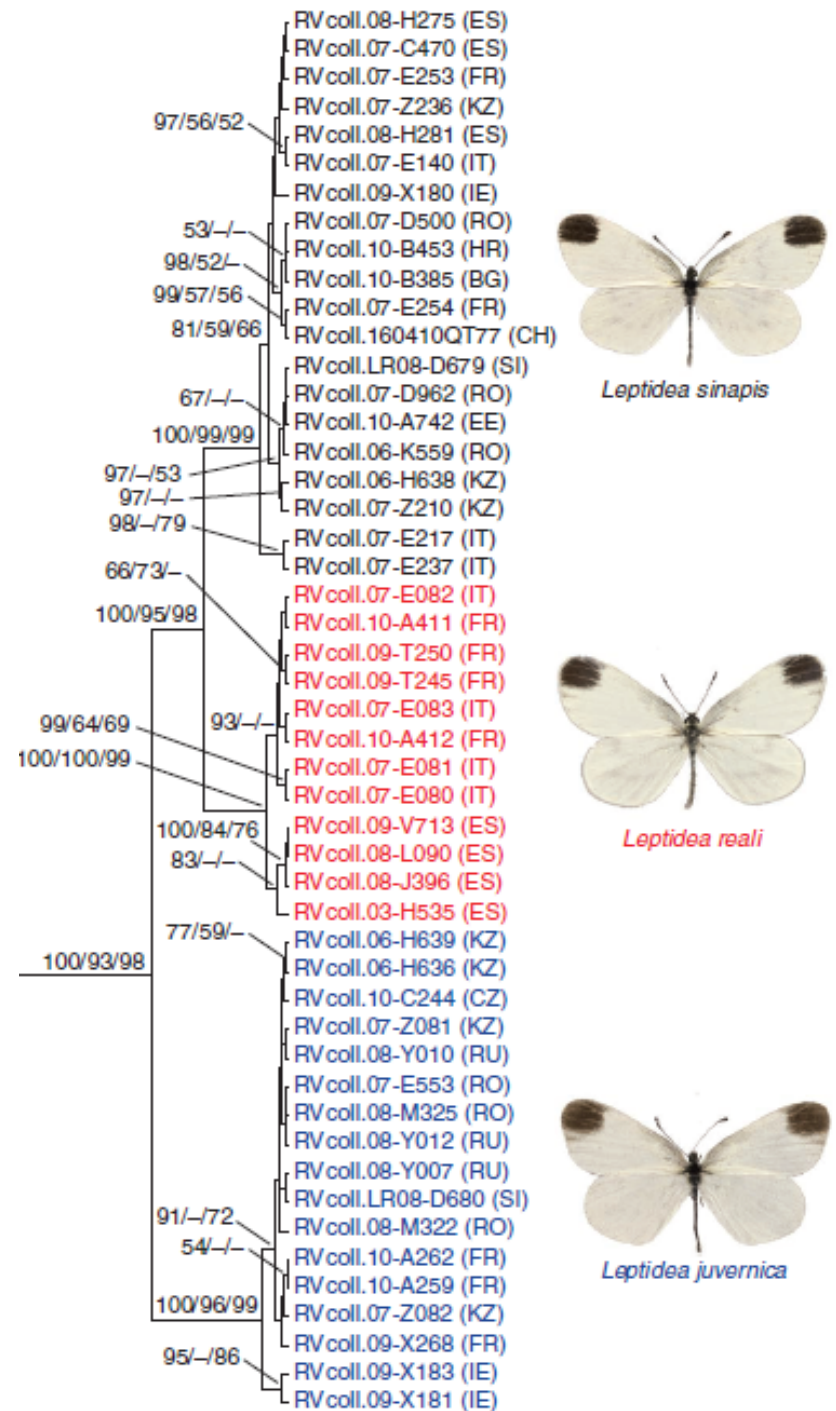
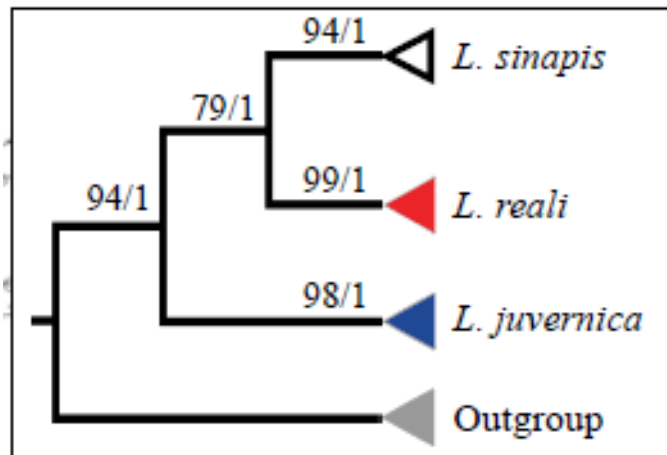


Stamboom : leptidea

reali – *juvernica* : 15

juvernica – *sinapis* : 17

reali – *sinapis* : 7

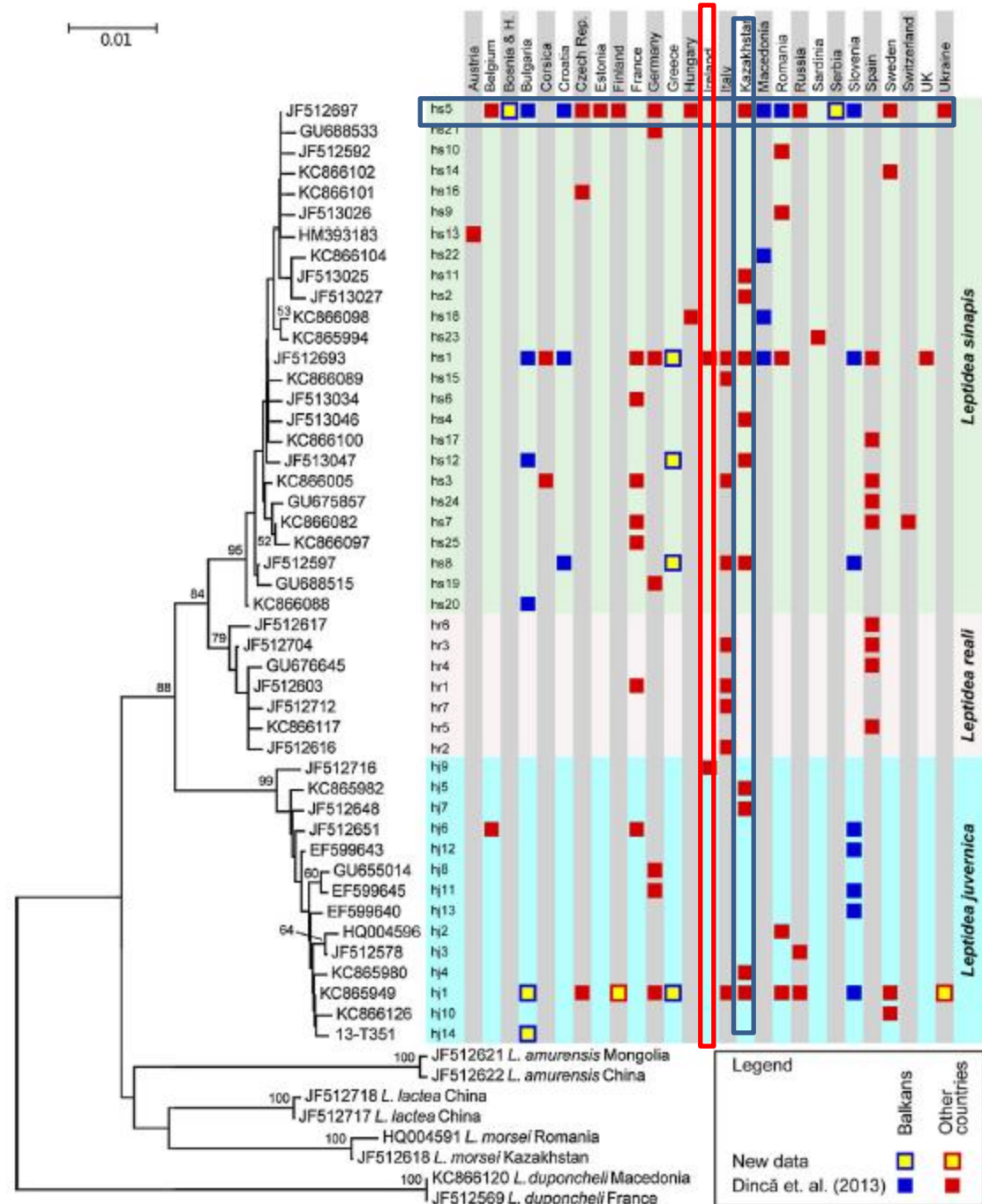


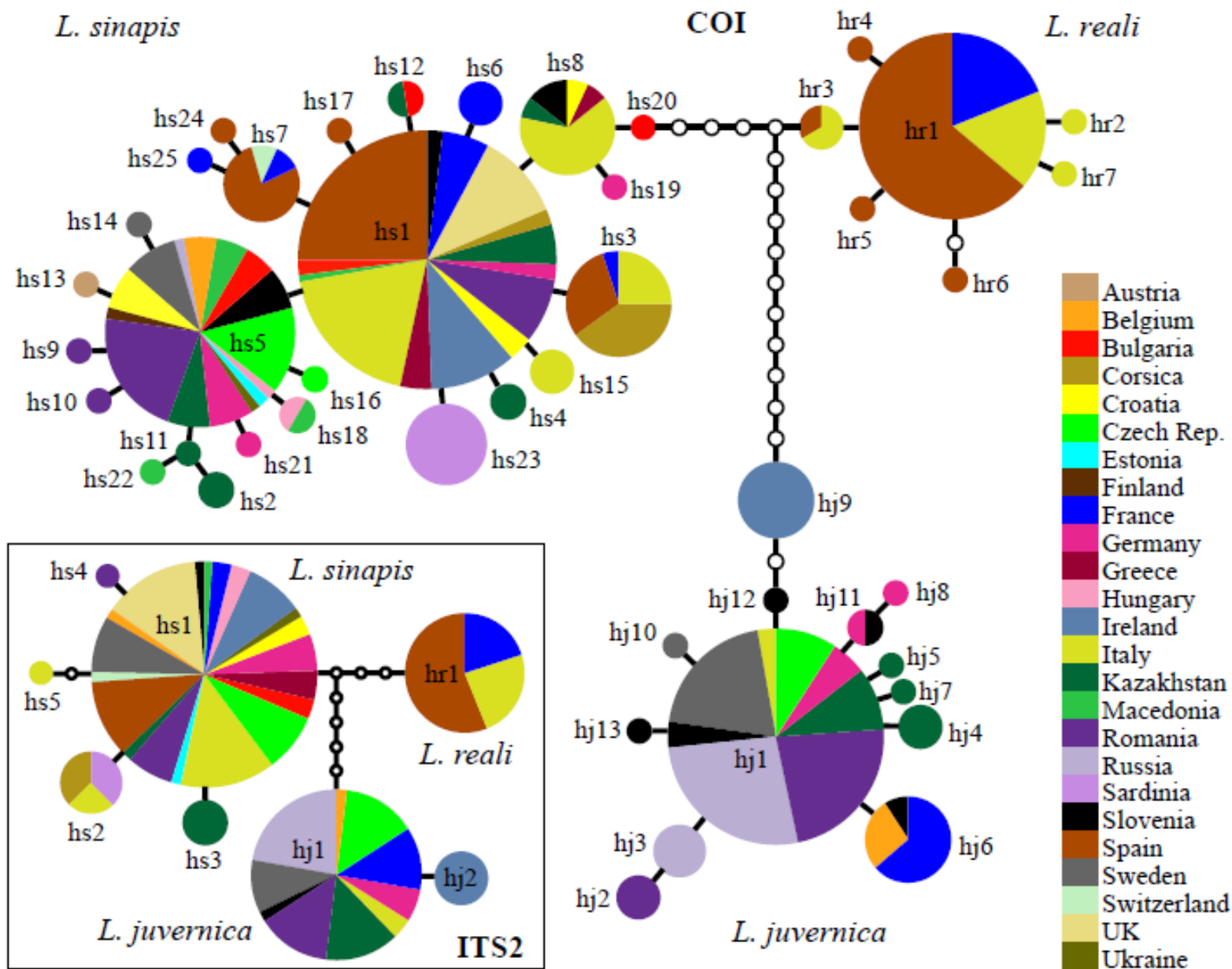
Wat kunnen we nog meer leren ?

- Shtinkov, N. et al (Zoology 2015, in press)
 - Leptidea juvernica and sinapis in the Balkan
 - Genetische diversiteit
 - Onderzoek haplotypes (vgl Europa)
 - Joining tree of mtDNA haplotypes

- Haplotype : een groep van genen die gezamenlijk overge-erfd worden.
- “familie” / “ondersoort”

- Genetische opsplitsing ?
 - Sommige haplotypes komen over gans Europa voor :
 - Op sommige plaatsen komen veel verschillende types voor :
 - Enkel in Ierland : gescheiden geografische evolutie





- Bedankt en zijn er nog vragen ?
- Nu alles duidelijk is kan je de in de presentatie vermelde artikels nog eens opnieuw nalezen op :
 - <http://biologiaevolutiva.org/rvila/Lab/Publications.html>