

NOVA VRSTA STRIGE IZ ŠPILJE MILJACKA II, *Eupolybothrus cavernicolus* Komerički & Stoev, 2013, KAO MODEL NOVOG PRISTUPA U TAKSONOMIJI

Ana Komerički
Hrvatsko biospeleološko društvo - Zagreb

U sklopu istraživanja faune striga speleoloških objekata Dinarida i revizije roda *Eupolybothrus*, opisana je nova vrsta iz špilje Miljacka II u Nacionalnom parku Krka. Za primjer novoga, holističkog pristupa opisu novih vrsta, izabrana je vrsta *Eupolybothrus cavernicolus* Komerički & Stoev, 2013, u sklopu čijeg se opisa uz klasičan morfološki opis pružaju i podatci dobiveni sekvenciranjem transkriptoma (set svih molekula RNK), DNK barcoding analizom, detaljne anatomske micro-CT snimke te videosnimka živog primjerka *ex situ*. Takve analize generiraju velik broj podataka koje je potrebno administrirati i pohraniti da budu lako dostupni što većem broju istraživača u svim poljima znanosti. Rad o ovoj temi objavljen je u listopadu 2013. godine u prvom izdanju novog online znanstvenog časopisa otvorenog pristupa *Biodiversity Data Journal*, izdavačke kuće Pensoft Publishers. U ovome članku predstavljen je kratak pregled striga kao skupine, metode korištene u radu, opis tipskog lokaliteta i same životinje te važnost novog pristupa u taksonomiji.

UVOD

S obzirom na to da živimo u vrijeme kada je, prvi put u povijesti, brzina izumiranja vrsta veća od brzine kojom se otkrivaju nove vrste, taksonomi su primorani ubrzati proces istraživanja bioraznolikosti. Primjeri „turbo taxomonije“ koja rabi molekularne podatke, sažete morfološke podatke i digitalne zapise, nedavno su objavljene u radovima u kojima je opisano 178 novih vrsta nametničkih osa ili 101 nova vrsta pipa (Stoev et al. 2013). Rad opisa nove vrste strige iz špilje u Hrvatskoj primjer je drukčijeg pristupa istraživanju bioraznolikosti.

BIOLOGIJA SKUPINE

Strige (Chilopoda) su skupina stonoga koja broji oko 3150 poznatih vrsta, rasprostranjenih na gotovo svim kontinentima i staništima, osim Antartike, arktičkih otoka i zapadne Sahare. To su kopnene životinje koje žive kao



Ulaz u špilju Miljacka II Foto: Kazimir Miculinić

grabežljivci uglavnom aktivni noću. Tijelo im je duljine od 4 mm do 30 cm, izduženo i člankovito, a broj tjelesnih članaka koji sadrže svaki po jedan par nogu kreće se od 15 do 191. Na glavi, koja se jasno razlikuje od ostatka

tijela, nalaze se ticala (antene). Plijen love pomoću čeljusnih nožica, prvog para nogu preobraženog u zavinute bodlje, u kojima se nalaze otrovne žlijezde. One otpuštaju otrov u čeljusne nožice koje pri ugrizu otpuštaju



Spoj Glavnog kanala (gore lijevo, gdje je pronađena striga) i Povratnog kanala (desno), gledano prema izlazu Foto: Nenad Buzjak

otrov u plijen (Minelli & Koch 2011). Strige poznate na području Hrvatske ne mogu ugrizom ozbiljno nauditi ljudima pa za njih ne predstavljaju opasnost. Prema dosad objavljenoj literaturi, broj vrsta i podvrsta poznat za područje Hrvatske kreće se oko 91, no ta se brojka može smatrati samo okvirnom, s obzirom na to da nedostaju sustavna istraživanja faune striga na području Hrvatske i Balkana općenito.

Strige su mahom stanovnici tla koji izbjegavaju svjetlost i preferiraju vlažna mikrostaništa u kojima se zadržavaju danju, skrivajući se pod lišćem i kamenjem, dok noću izlaze u lov. Ograničavajući faktor za rasprostranjenost striga jest vlaga. Eksperimenti na nekoliko vrsta roda *Lithobius* dokazuju da preferiraju staništa sa 100 % vlage. Podzemna staništa poput špilja pripadaju u vlažna staništa sa stalnom razinom vlage od najčešće 90 – 100 %, a karakterizira ih i nedostatak svjetlosti što ih čini idealnim staništem za strige. Mnoge vrste često nalazimo u špiljama i njihovim ulaznim djelovima, no to nisu nužno prave špiljske životinje, već se samo koriste špiljama kao pogodnim skloništim. Postoje i vrste koje su se u potpunosti prilagodile i vezale

uz špiljska staništa, troglobiontne strige. Dosad su troglobiontne vrste striga zabilježene uglavnom u Europi te u Srednjoj Americi i Australiji (Voigtländer 2011). Kod takvih vrsta zabilježene su prilagodbe na podzemni način života kao što su izduženje ticala i nogu te redukcija pigmenta i broja ocela. U podzemnim staništima strige se nalaze na vrhu hranidbene piramide, kao grabežljivci koji se hrane svime što je manje od njih, pa čak i ostalim grabežljivcima kao što su pauci i lažištupavci.

MATERIJALI I METODE

Primjerci nove vrste *Eupolybothrus cavernicolus* Komerički & Stoev, 2013, sakupljeni su tijekom provedbe projekata „Inventarizacija faune speleoloških objekata NP Krka” i „Istraživanje novih i rijetkih svojiti podzemne faune beskralješnjaka u speleološkim objektima NP Krka”, koje je financirao Nacionalni parka Krka, a provelo Hrvatsko biospeleološko društvo. Osam primjeraka sakupljeno je ručno pincetom uz pomoć plastičnih posuda za uzorke. Holotip, primjerak na kojem se temelji opis vrste, snimljen je *ex situ* fotoaparatom Canon Eos 400D uz upotrebu objektiva 100 mm macro. Video je snimio Marko Lukić

(HBSD) kamerom Sony DCR HC 1000, uz upotrebu rasvjetnih tijela Hama Combi 30 W i pohranu materijala na kazete Mini DV. Jedan uzorak sakupljen je živ i konzerviran u otopinu RNAlater za potrebe analize transkriptoma, dok su ostali konzervirani u 70% i 96%-tnom etanolu. Dijelovi tijela četiriju primjerka sakupljenih 2010. godine pripremljeni su i poslani na molekularnu analizu COI barcoding u Canadian Centre for DNA Barcoding, Guelph, Kanada u suradnji s dr. sc. Alexanderom Weigandom iz Goethe-University, Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Frankfurt am Main, Njemačka. Analiza transkriptoma provedena je u BGI-Schenzen, Kina, gdje je izolirana ukupna RNK iz jednog odraslog mužjaka, a sufinancirana je od strane Pensoft Publishers Ltd., Sofia, Bugarska. Jedan od primjeraka mužjaka konzerviranih u alkoholu snimljen je uz pomoć JEOL JSM-6335F elektronskog mikroskopa u Natural History Museum of Denmark, Copenhagen, Danska, prilikom radnog posjeta autorice članka, Ane Komerički, financiranog od programa European Commission's (FP 6) Integrated Infrastructure Program SYNTHESYS (DK-TAF). Primjerak odrasle ženke konzerviran u alkoholu poslan je u suradnji s Jeroen

Hostensom na snimanje mikro računalnom tomografijom (microCT) u Bruker microCT, Kontich, Belgija, gdje je sustavom SkyScan 1172 snimljen 3D video prikaz sastavljen od 3865 snimaka presjeka u .bmp formatu.

LOKALITETI

Miljacka II i Špilja iza mlina na Miljacki (Miljacka IV) jedini su zasad poznati lokaliteti za ovu vrstu. Tijekom istraživanja provedenih za NP Krka posjećeno je i biospeleološki obrađeno 46 speleoloških objekata te je u njima zabilježeno ukupno 6 svojti striga. No *E. cavernicolus* pronađen je samo u ove dvije špilje s tim da je u Miljacki II pronađeno ukupno 6 od 8 primjeraka, stoga je ona i tipski lokalitet.

Tipski lokalitet:

Miljacka II, Hidroelektrana Miljacka, NP Krka, Kistanje, Knin.

Miljacka II nalazi se unutar područja Hidroelektrane Miljacka, na desnoj obali rijeke Miljacke, preko puta centrale hidroelektrane. Najduža je špilja u Nacionalnom parku Krka sa 2800 m dosada topografski snimljenih kanala, a istražena je i dalje bez naznake završetka. Velik i prostran ulaz u špilju nalazi se u stijeni, a drvena ograda koja ograđuje cijeli ulaz i ostavlja samo jedna vrata za ulazak potječe iz doba kada su se ljudi koristili ovom špiljom za čuvanje stoke. Prvi su je put istražili i nacrtali članovi SO PD "Željezničar" 1989. godine u sklopu istraživanja Hrvatskog prirodoslovnog muzeja iz Zagreba (Lukić, 1992). Špilja se smatra povremenim izvorom sa stalnim vodenim tokom, a osim prvih 300 m glavnoga kanala veći dio kanala špilje nalazi se pod vodom. Primjerci strige sakupljeni su u glavnom kanalu na otprilike 50 m udaljenosti od ulaza, u zoni potpunog mraka, gdje povremeni vodeni tok iznimno rijetko dopire. Sediment je u tom predjelu uglavnom glinovit, a životinje su pronađene ispod sedimenta ili kako se kreću po sedimentu. Tijekom istraživanja 2010. g. izmjerena temperatura zraka iznosila je 12,5 - 13,7 °C, temperatura sedimenta 12,5 - 13,2 °C, temperatura vode 12,6 - 13,2 °C, a vlaga je bila 100%. S biospeleološkog staništa špilja je vrlo bogata faunom beskrajnjaka te je u njoj zabilježen velik broj vrsta (Marguš et al. 2012).

ŠPILJSKA VELEKAMENJARKA

Razred: Chilopoda - strige

Red: Lithobiomorpha

Porodica: Lithobiidae

Potporodica: Ethopolyinae Chamberlin, 1915

Rod: *Eupolybothrus* Verhoeff, 1907 - vele kamenjarke

Eupolybothrus cavernicolus Komerički & Stoev, 2013 - špiljska vele kamenjarke



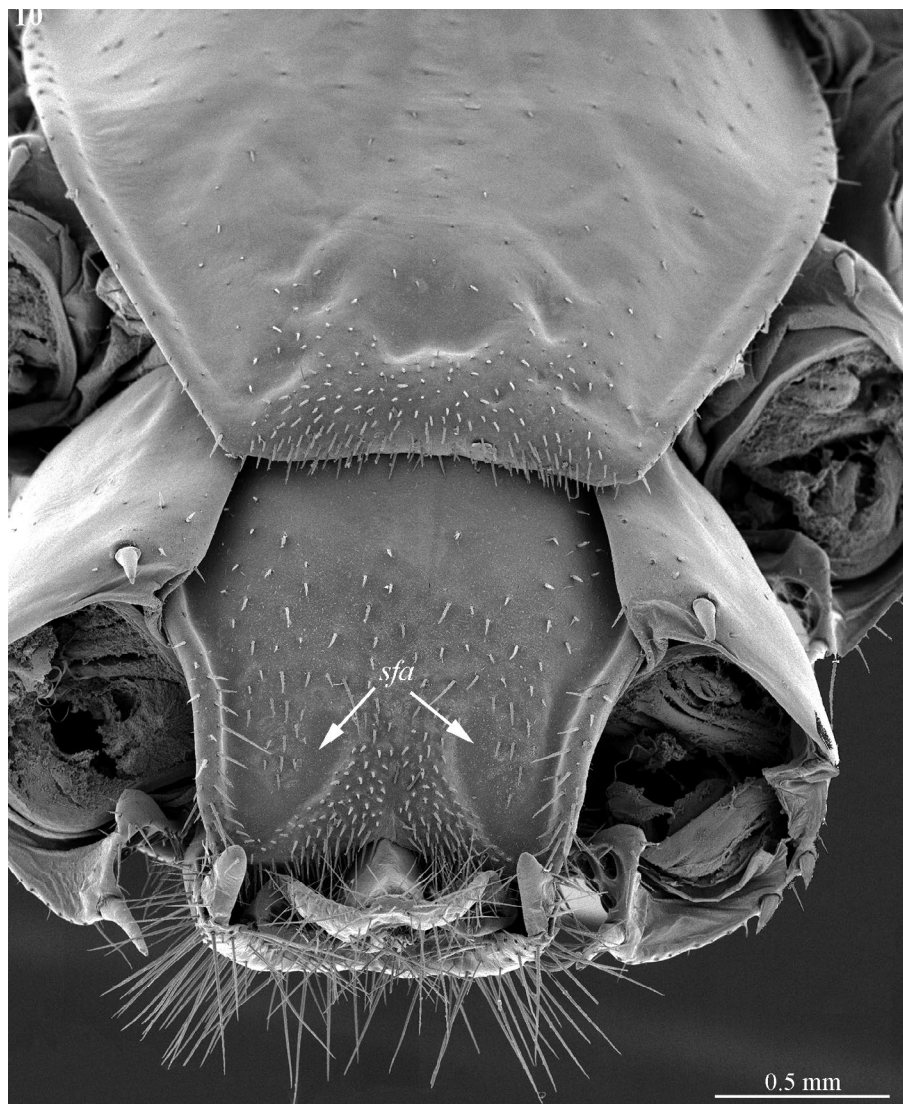
Odrasli mužjak špiljske vele kamenjarke – holotip Foto: Ana Komerički

Prvi primjerak ove vele kamenjarke sakupio je Marko Lukić, 4. svibnja 2010. godine prilikom terenskog istraživanja u Špilji iza mlina na Miljacki, a naknadna taksonomska obrada ukupno četiriju primjerka sakupljena tom prilikom dala je naslutiti da se radi o dosad nepoznatoj vrsti. U sklopu istraživanja roda *Eupolybothrus* na području Dinarida, dijelovi svih četiriju primjerka poslani su u na analizu DNK u Kanadu. Po obradi rezultata bilo je jasno da se sva četiri primjerka zajedno odvajaju od ostalih vrsta roda s kojima su poslani na analizu. U svrhu objave dijela rezultata analize započeo je opis ove vrste kao prve u nizu koji slijedi.

Špiljska vele kamenjarke ima žučkasto-smeđe do kestenjasto obojeno tijelo duljine oko 30 mm, sa zadnjim nogama i ticalima dužim od 20 mm. Ime *cavernicolus* znači da živi u špiljama, što je karakteristika koja se ovdje željela naglasiti. Kod nje su zabilježene neke prilagodbe na špiljska staništa, no kod striga je teško prosuditi stupanj troglomorfije, s obzirom na to da su mnogi taksonomski

karakteristi uglavnom kvantitativni i varijabilni unutar vrsta. Činjenica je da *E. cavernicolus* nije u potpunosti prilagođena na špiljska staništa poput nekih vrsta zabilježenih u Istri i južnoj Dalmaciji, no u svakom slučaju pokazuje određeni stupanj troglomorfije.

Pripada potporodici Ethopolyinae Chamberlain, 1915 kojoj pripadaju neke od najvećih vrsta reda Lithobiomorpha veličine tijela čak 45 - 50 mm, a sastoji se od četiri roda. Rod *Eupolybothrus* sadrži 23 validne i 15 upitnih svojti rasprostranjenih od južne Europe i sjeverne Afrike preko Sredozemlja do Bliskog i Srednjeg istoka. Dva centra bioraznolikosti su Apeninski i Balkanski poluotok gdje su zabilježene špiljske vrste s ograničenim područjem rasprostranjenja (Stoev et al. 2013). Za područje Hrvatske dosad je bilo poznato 9 vrsta ovog roda, a nakon ovog opisa u pripremi su daljnji opisi novih vrsta s područja Hrvatske koje su utvrđene dosadašnjim analizama uzoraka striga iz zbirke Hrvatskog biospeleološkog društva.



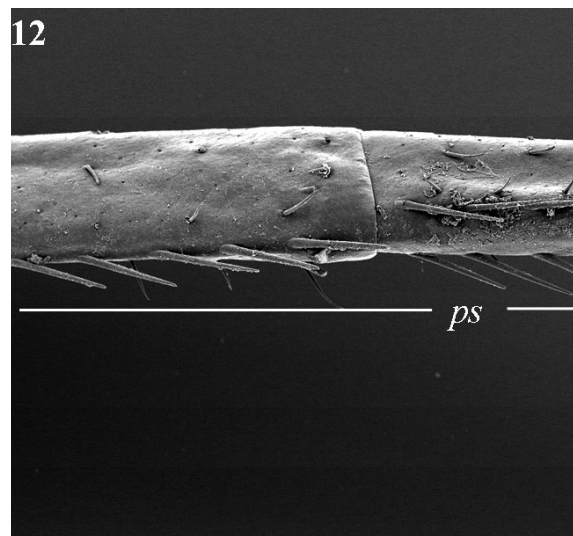
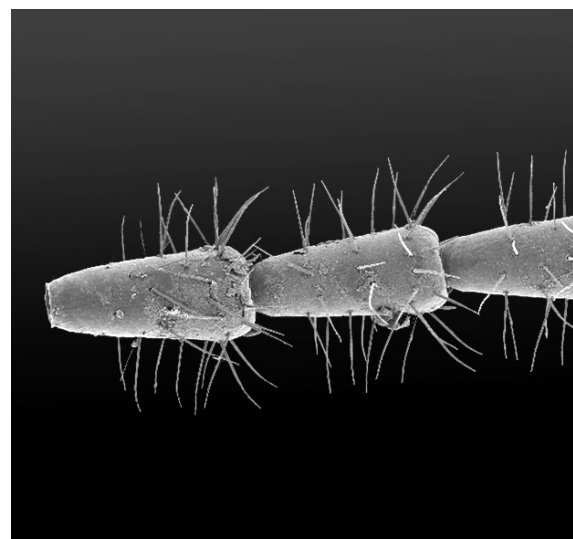
Zadnja i predzadnja leđna pločica (tergit) s karakterističnim rasporedom dlaka na donjem rubu snimljenim skening elektronskim mikroskopom (SEM)

DISKUSIJA

Taksonomija je znanost koja se bavi imenovanjem, opisivanjem i klasifikacijom živih organizama, a kod striga se donedavno u najvećoj mjeri oslanjala na morfologiju. Razvoj molekularnih znanstvenih metoda i porast učestalosti njihova korištenja otvorili su vrata uporabi tih metoda u taksonomske svrhe. Prvotna istraživanja upozoravala su na potrebu korjenitih promjena u dosadašnjem shvaćanju morfoloških raznolikosti unutar i između vrsta. U relativno kratkom vremenu podatci dobiveni molekularnim analizama dobili su na važnosti te se istakli kao podjednako važni u taksonomskoj analizi, koristeći se paralelno uz morfološke. Iako je morfologija presudna za tumačenje molekularnih analiza, u posljednje se vrijeme u znanosti one često koriste pri opisu novih vrsta.

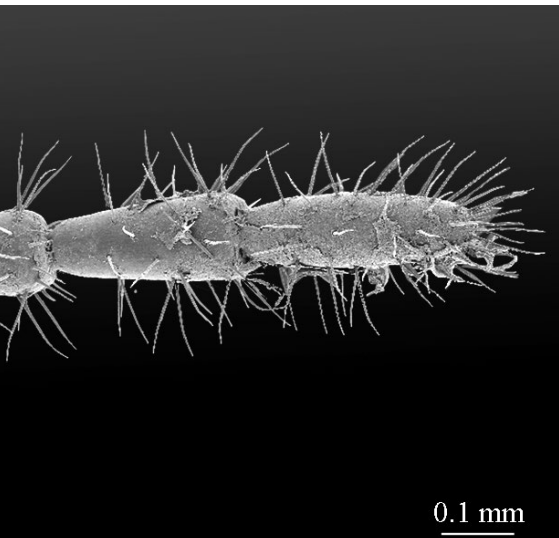
Rad opisa vrste *Eupolybothrus cavernicolus* Komerički & Stoev, 2013 primjer je drukčijeg pristupa istraživanju

bioraznolikosti te je njime prvi put u opisu nove vrste pružen toliko opsežan set podataka. Mogućnost pohrane podataka u online bazama podataka trenutno postoji, no taj bi se proces trebao pojednostavniti i unificirati. Podatci dobiveni ovim analizama pohranjeni su na nekoliko mjesta, a pritom se pazilo da su međusobno povezani. Uzorci poslani na analizu DNK pohranjeni su u online bazi podataka Barcode of Life Data System (BOLD), a sekvence su sve registrirane u online bazi podataka GenBank prema najnovijim standardima za pohranu metapodataka. U suradnji s GigaScience database, GigaDB, koja je omogućila upravljanje podacima u velikom razmjeru i njihovu pohranu i javnu objavu prema najstrožim standardima za metapodatke, u njoj su pohranjeni setovi podataka dobiveni micro-CT tomografijom i analizom transkriptoma. Set podataka od micro-CT-a sastoji se od seta slika pohranjenih u dva formata, dokumentacije snimanja i procesa rekonstrukcije, podatke o



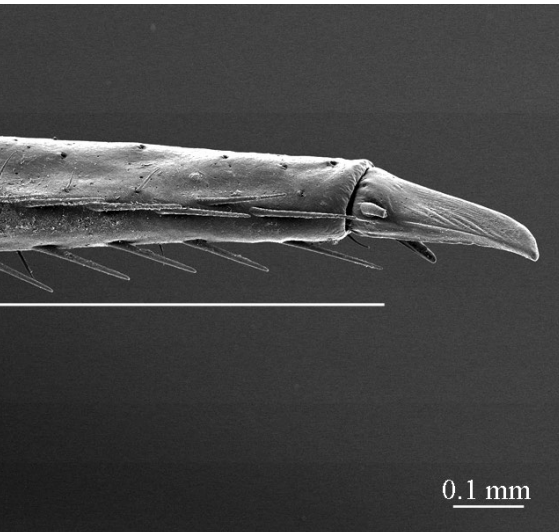
primjercima u Darwin Core formatu i poveznice s lokacijom fizičkog materijala i transkriptomskim podacima te ISA-TAB metapodacima koji omogućuju dostupnost i interoperabilnost podataka (Stoev et al. 2013).

Upotrebom micro-CT-a testirana je nedavno uvedena ideja „cybertypea“, digitalnog 3D prikaza cijele životinje povezanog s originalnim tipskim materijalom kao virtualnog seta podataka o anatomiji i morfologiji koji omogućuje rekonstrukciju i interaktivnu manipulaciju tipskim materijalom. Rad je objavljen u prvom izdanju novog online open access časopisa *Biodiversity Data Journal*, koji je razvijen u svrhu omogućavanja upravljanja podacima te je dan prijedlog tijekom rada u časopisu. Kao dio pilot-projekta koji se provodi u okviru pro-iBiosphere projekta sve validne vrste roda *Eupolybothrus*, podroda *Schizopolybothrus*, povezane su sa svojim originalnim opisima koji su izvađeni iz izvornih radova uz pomoć



0.1 mm

Vršnih pet članaka ticala (SEM)



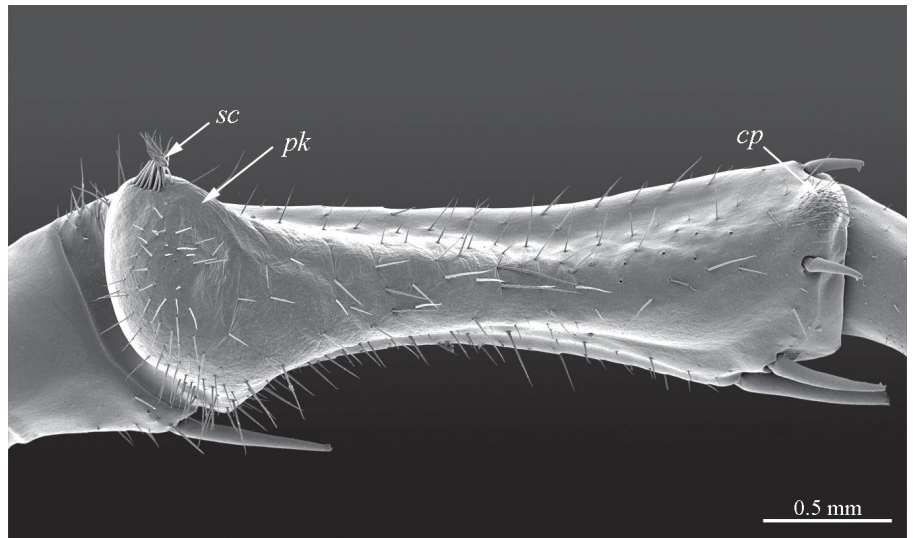
0.1 mm

Tarsus 10. noge s karakterističnim rasporedom dlaka (SEM)

tehnike OCR (Optical character recognition) i označeni uz pomoć programa Golden Gate (Stoev et al. 2013).

ZAKLJUČAK

Razvoj novih tehnologija koje omogućuju prikupljanje velikog broja različitih informacija u kratko vrijeme uputio je na potrebu za uspostavljanjem pravila i standarda za upravljanje tim podacima, kako bi se mogao iskoristiti njihov puni potencijal. Prilikom opisa nove vrste roda *Eupolybothrus* iz Miljacke II u NP Krka dan je primjer obrade, pohrane i upravljanja podacima dobivenim brojnim analizama, čime su se goleme količine podataka trajno, u digitalnom obliku, očuvale i učinile dostupnim raznim znanstvenim granama. Također, postoji još mnogo prostora za poboljšanje infrastrukture vezane uz pohranu takvog tipa podataka pa valja nastaviti rad na tome, kako bi se izbjeglo daljnje stvaranje izoliranih setova podataka.



0.5 mm

Prefemur zadnjih nogu s karakterističnom izbočinom s čupom dlaka na vrhu (SEM)



Genitalni segment tijela odraslog mužjaka (holotipa) na kojem se jasno vide brojne koksalne pore i dlake Foto: Ana Komerički

LITERATURA:

Lukić O. (1992): Speleološka istraživanja na području Nacionalnog parka „Krka“. *Speleolog*, 38/39, p 4-16.

Marguš D, Barišić T., Bedek J., Dražina T., Gracin J., Hamidović D., Jalžić B., Komerički A., Lukić M., Marguš M., Menđušić M., Miculinić K., Mihelčić G., Ozimec R., Pavlek M. (2012) Tajne podzemlja.

SUMMARY

A new species of centipede, *Eupolybothrus cavernicolus* Komerički & Stoev, 2013 has been discovered in the Miljacka II Cave in the Krka National Park in Croatia. It has been used as a model to present a new holistic approach in taxonomy. A paper has been published in the *Biodiversity Data Journal* which includes, along with a classical morphological description of the new species, vast sets of data have been provided; a fully sequenced transcriptome, DNA barcodes, detailed X-ray micro-computed tomography scanning (micro-CT), and a video of the centipede showing behavioural features. This type of approach to describe a new species has required considerable interdisciplinary collaboration and also produced a large amount of data. To make the data available and easily accessible to a variety of scientific fields, this has been deposited in several online databases all of which are inter linked. With recent advancements in scientific methods and analyses, a large amount of information is being produced and the need for proper management is growing. A proposition for future data management is given, indicating the importance of a quality infrastructure to maximize data utilisation.

Javna ustanova „Nacionalni park Krka“, Šibenik, 237 pp.

Minelli A. & Koch M. (2011): Chilopoda – General Morphology. In: Minelli A (Ed.) *Treatise on Zoology – The Myriapoda*. 1. 43-66 pp.

Stoev P., Komerički A., Akkari N., Liu S., Zhou X., Weigand A., Hostens J., Hunter C., Edmunds S., Porco D., Zapparoli M., Georgiev T., Mietchen D., Roberts D., Faulwetter S., Smith V., Penev L. (2013) *Eupolybothrus cavernicolus* Komerički & Stoev sp. n. (Chilopoda: Lithobiomorpha: Lithobiidae): the first eukaryotic species description combining transcriptomic, DNA barcoding and micro-CT imaging data. *Biodiversity Data Journal* 1:e1013. doi: 10.3897/BDJ.1.e1013.

Voigtländer K. (2011): Chilopoda – Ecology. In: Minelli A (Ed.) *Treatise on Zoology – The Myriapoda*. 1. 309-326 pp.