

## Web-aplikácia na determináciu druhov s využitím molekulárných markerov

Fedor ČIAMPOR Jr

*Ústav zoológie SAV, Dúbravská cesta 9, 845 06, Bratislava;*

*e-mail: f.ciampor@savba.sk*

### Abstrakt

V tomto príspevku sú zhrnuté priebežné informácie o vyvíjanej internetovej aplikácii zameranej na determináciu druhov pomocou molekulárných markerov. Pre determináciu druhov boli zvolené viaceré typy molekulárných dát, jednotlivé techniky sú testované na modelových taxónoch a následne budú vypracované postupy na získavanie dát, ich spracovanie a použitie v prostredí web-aplikácie na presnú determináciu druhov.

### Úvod

V poslednej dobe sa v súvislosti s determináciou druhov stále častejšie spája využívanie molekulárných dát. Je to jednak preto, že náklady na ich získanie sa neustále znižujú a tiež preto, že na celom svete vznikajú a sú nestále dopĺňané internetové databázy s referenčnými dátami. Tieto databázy sú však skoro výlučne zamerané na determináciu pomocou takzvaných Bar kódov, čo je krátka sekvencia mitochondriálneho génu pre cytochróm oxidázu. Tieto sekvencie sú síce vysoko (druhovo) špecifické, vyžadujú však sekvenovanie DNA, čo zatiaľ nie je metóda, ktorú možno bežne aplikovať v každom laboratóriu (vyžaduje to vlastniť sekvenátor, čo je finančne veľmi náročné, alebo vzorky odoslať do externej služby a následne editovať surové dáta, čo vyžaduje prax a skúsenosti). Využívanie molekulárných dát na determináciu má aj ďalšiu výhodu a to, že získané dáta nie sú závislé na vývinovom štádiu, ani na zachovaní dôležitých morfológických štruktúr. Preto je možné determinovať zložky študovanej fauny presnejšie, aj na základe larválnych štádií, či poškodených, nekompletných jedincov.

V súčasnosti sú stále mnohé ekologické štúdie, či monitoring biotopov a ekosystémov, odkázané na determináciu zložiek fauny na základe morfológických znakov. Často sa potom stáva, že niektoré taxóny sú určené iba do rodu, či dokonca len do vyšších taxonomických skupín. Dôsledkom toho je výrazná strata dôležitých dát a skreslené výsledky. Hydrobiologický výskum je toho veľmi dobrým príkladom. Vzorky odobrané v teréne obsahujú veľké percento jedincov v larválnom štádiu (napríklad hmyz), čerstvo vyliahnutý plôdik, či poškodené jedince, ktoré sú schopní určiť len experti s dlhoročnou praxou, respektíve ich nie je možné určiť do druhu vôbec. V takom prípade je jedinou možnosťou ako takéto vzorky určiť, využitie molekulárných techník.

Samozrejme, okrem samotného sekvenovania DNA existuje viacero techník, ktoré síce nie sú až tak špecifické, ak však existujú dáta z predbežnej determinácie (napríklad do čeľade, rodu) a jedná sa o lokálne vzorky (napríklad z našej fauny), je možné vytvoriť súbor referenčných dát a následne výsledky týchto analýz jednoducho a efektívne využiť, bez dlhoročných skúseností

s určovaním, na presnú determináciu. Tento predpoklad sme využili aj počas realizácie projektu Štrukturálnych fondov na Ústave zoológie SAV.

### Materiál a metódy

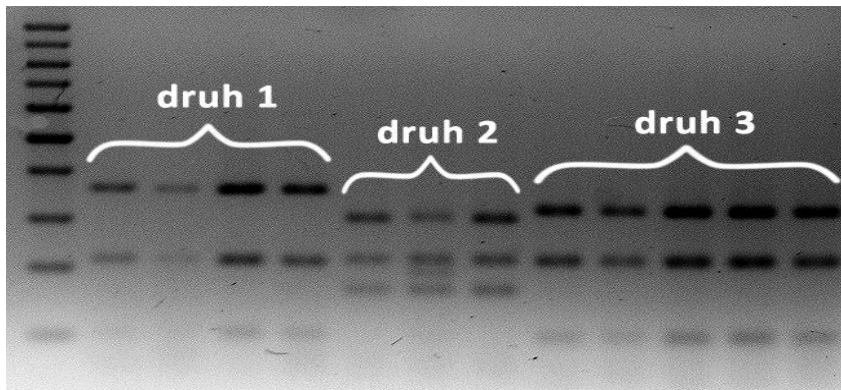
Pre testovanie molekulárnych markerov boli použité modelové taxóny vodných živočíchov: potočníky (*Hydropsyche*), chrobáky (*Elmis*), ryby (Salmonidae, *Neogobius*), mäkkýše (*Sphaerium*), kôrovce (*Simocephalus*, *Macrocylops*). Celková DNA bola izolovaná pomocou štandardných extrakčných kitov podľa manuálu výrobcu. Pomocou PCR boli amplifikované fragmenty mitochondriálnej DNA (časť génu pre cytochróm oxidázu, gén pre cytochróm b). Amplifikované fragmenty boli sekvenované v externom sekvenačnom laboratóriu, respektíve využité pre RFLP, asPCR a SSCP techniky. Získané dáta boli editované a následne bol zvolený vhodný formát pre vkladanie do aplikácie. Web-aplikácia je vyvíjaná v spolupráci s externým dodávateľom, vytvorená bola pomocou CMS (Client Management System).

### Výsledky a diskusia

Počas prvej etapy boli determinované druhy modelových skupín – využili sme skúsenosti expertov a spoľahlivo determinovateľné jedince. Tie boli použité na izoláciu celkovej DNA. Vzorky čistej DNA boli následne využité pre získanie viacerých typov molekulárnych dát.

**Sekvenovanie** (Bar coding): sekvenované boli 2 fragmenty mtDNA,  $\pm 750$ bp fragment génu pre cytochróm oxidázu (*cox1*) a  $\pm 350$ bp fragment génu pre cytochróm b (*cytb*). Získané sekvencie boli editované (Bioedit, Sequencher), definovaná bola vnútrodrohová a medzidrohová diverzita.

**RFLP** (restriction fragment length polymorphism): na podklade sekvencií *cox1* fragmentu sme vyľadali restričné miesta a k nim komplementárne restričné endonukleázy. Amplifikovali sme fragment *cox1*, inkubovali spolu s vybranými enzýmami, pričom vznikli druho špecifické fragmenty použitej vzorky DNA. Vzorky sa vizualizujú v elektroforéze, pričom vzniknú druho špecifické vzory (Obr. 1).



Obrázok 1. Príklad výsledku RFLP analýzy s druho špecifickými vzormi fragmentov.

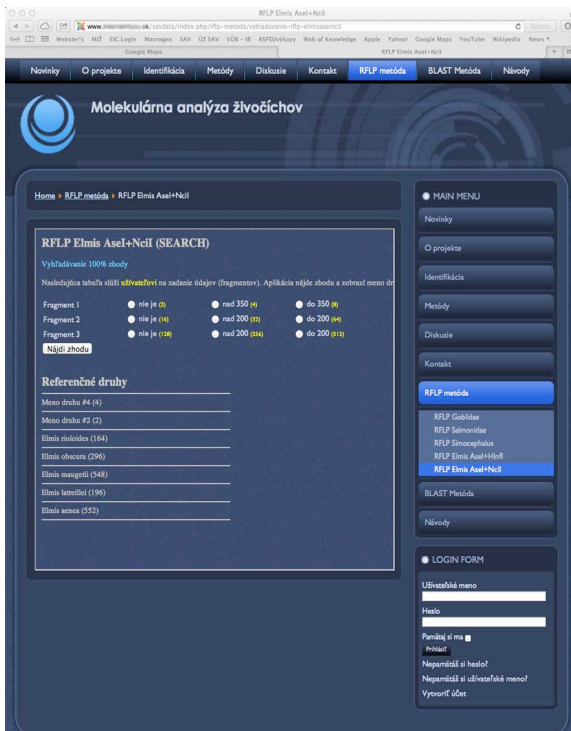
asPCR (allele specific PCR): na podklade sekvencií cox1 fragmentu sme vytvorili druhovo špecifické interné primery, ktoré boli použité v PCR reakcii. Okrem pôvodného fragmentu sú amplifikované aj ďalšie fragmenty, ktoré sú u jednotlivých druhov rôzne dlhé v závislosti od použitých interných primerov. Vzorky sa vizualizujú v elektroforéze, pričom vzniknú druhovo špecifické vzory.

SSCP (single strand conformation polymorphism): amplifikovaná bola časť cox1 génu a vzorky boli následne denaturované, dvojlávková DNA sa rozdelila, pričom vznikajú druhovo špecifické konformácie jednovláknovej nukleovej kyseliny. Vzorky sa vizualizujú v elektroforéze, pričom odlišné konformácie spôsobené druhovo špecifickými bodovými mutáciami spôsobujú odlišnú pohyblivosť NK v elektrickom poli.

V druhej etape sú výstupy molekulárnych analýz transformované do znakov, ktoré je možné jednoducho vložiť do web-aplikácie. Sekvenované fragmenty sa vkladajú ako poradie nukleotidov, výsledky elektroforézy sa transformujú do údajov o prezencii/absencii fragmentov v stanovených dĺžkových intervaloch. Druhovo špecifické výsledky získané analýzou spoľah-

livo determinovaných druhov modelových taxonomických skupín boli vložené do databázy web-aplikácie ako referenčné dáta. Následne, determinácia vlastných vzoriek prebieha v prostredí aplikácie porovnaním vložených dát s referenčnými údajmi.

Základným princípom vyvinutej aplikácie a použitých molekulárnych markerov je ich jednoduchosť, prístupnosť a finančná nenáročnosť, pri zachovaní ich spoľahlivosti. Vyvinutá web-aplikácia obsahuje okrem hlavnej časti (náštrój na determináciu vzoriek – Obr. 2) aj opisy metód, návody a protokoly na získanie molekulárnych dát.



Obr. 2. Náhľad vyvíjanej determinačnej web-aplikácie.

Momentálne aplikácia pracuje off-line, riešitelia projektu vkladajú jednotlivé súčasti a testujú schopnosť aplikácie určiť vzorky na základe referenčných dát. Determinačná časť aplikácie obsahuje referenčné dáta k jednotlivým druhom z viacerých molekulárnych analýz, to znamená, že používateľ sa môže rozhodnúť aké dáta zo svojich vzoriek získa (podľa schopností a možností) a následne použije pre ich determináciu. Zatiaľ aplikácia obsahuje už spomínané Bar kódy, druhovo charakteristické dáta z analýzy RFLP a čiastočne aj SSCP a asPCR.

V budúcnosti sa predpokladá rozšírenie možností aplikácie, hlavne využitie ďalších typov molekulárnych dát (napr. Reverse line blot, mikročipy) a tiež postupné dopĺňanie ďalších taxonomických skupín, ktoré bude možné pomocou web-aplikácie determinovať.

### **PodĎakovanie**

Vývoj determinačnej aplikácie je výsledkom realizácie projektu s kódom ITMS: 26240220049, realizovaného v rámci operačného programu Výskum a vývoj financovaného zo štrukturálnych fondov EÚ.

## **NÁZOR**

### **Nová hrozba pre naše rieky**

Ekologický stav slovenských potokov a riek sa postupne zlepšuje od pádu komunistického režimu po novembri 1989. Nepochybne je to vďaka klesajúcemu znečisteniu vôd. Bohužiaľ, opačný trend pozorujeme vo vývoji tzv. morfológického stavu našich potokov a riek. Bolo dobudovaných niekoľko významnejších vodných diel (napr. VD Gabčíkovo), ktoré negatívne poznačili riečne ekosystémy. Potom nastal útlm stavebnej činnosti na vodných tokoch a až donedávna sa zdalo, že stavebné firmy majú dost inej práce, a teda zárobky z budovania vodných stavieb ich veľmi nelákajú. Dokonca svitla nádej, že po desiatkach rokov devastačných regulačných zásahov aj na Slovensko od západu dorazí trend revitalizácií nevhodne upravených vodných tokov. Tento pozitívny vývoj zvrátili až povodne v ostatných rokoch, ktoré sa stali dôvodom (často skôr zámenkou) na realizáciu ďalších regulačných zásahov pod heslom „protipovodňových opatrení“. Tie poznačili nielen dovtedy neregulované toky, ale často zvrátili pozitívne samorevitalizačné procesy prebiehajúce na regulovaných tokoch, do ktorých vodohospodári výraznejšie nezasahovali aj niekoľko desiatok rokov. Zrazu sa roztrhlo vreco s necitlivými výrubmi brehových porastov, prehľbovaním a opevňovaním korýt či spevňovaním hrádzí.

V náhlom stavebnom ruchu trochu zanikla spáva, že sa vláda chystá dať zelenú ďalšej masovej výstavbe na našich vodných tokoch. Tento krát sa stala zámenkou údajná potreba budovania nových zdrojov obnoviteľnej elektrickej energie. Ministerstvo životného prostredia (MŽP) spracovalo strategický dokument „Konceptia využitia hydroenergetického potenciálu vodných tokov SR do roku 2030“ (nájdete ho na <http://www.minzp.sk/files/>