

## Determinácia druhov vodných chrobákov rodu *Elmis* (Coleoptera: Elmidae) Slovenska s využitím fragmentovej analýzy DNA

Fedor ČIAMPOR Jr, Kristína LAŠŠOVÁ & Zuzana ČIAMPOROVÁ-ZAŤOVIČOVÁ

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

e-mail: f.ciampor@savba.sk

### Abstrakt

Tento príspevok prezentuje možnosti determinácie vzoriek vodných chrobákov rodu *Elmis* zo Slovenska s použitím fragmentovej analýzy (RFLP) časti mitochondriálnej DNA. Úsek génu pre cytochróm oxidázu dlhý 688 bázových párov (bp) bol rozštiepený pôsobením dvoch párov restriktčných endonukleáz (*Asel*+*Hinf*I a *Nci*I+*Hinf*I), pričom v obidvoch analýzach vznikli druhovo špecifické vzory fragmentov, vizualizované na agarózovom géli. Vyvinutá metóda umožňuje rýchlu a spoľahlivú determináciu vzoriek chrobákov rodu *Elmis*, s možnosťou praktického využitia v hydrobiologickom výskume.

### Úvod

Presná determinácia biologických vzoriek je základnou podmienkou všetkých nadväzujúcich štúdií a experimentov, na ktoré sa tieto vzorky využívajú. V hydrobiologickej praxi sa však veľmi často stretávame so vzorkami zaradenými iba do rodov či dokonca vyšších taxonomických skupín, čo je spôsobené buď nedostatkom skúseností, ale častejšie preto, že blízko príbuzné druhy, larválne štádiá, či poškodené jedince nie je možné determinovať do druhu iba na základe morfológických znakov. Vodné chrobáky rodu *Elmis* tvoria dôležitú súčasť makrozoobentosu tečúcich vôd, ale ich determinácia na druhovej úrovni je často obtiažna (napr. morfológicky veľmi podobné druhy *E. maugetii* a *E. aenea*), respektíve nemožná (larválne štádiá – Obr. 1). Vzhľadom k tomu, že jednotlivé druhy majú odlišné ekologické nároky, je ich zlúčenie na rodovej úrovni skresľujúce a môže mať negatívny vplyv na závery a výstupy prác, ktoré študujú faunu bentických bezstavovcov.

Jednou z možností, ako takéto „problematické“ vzorky presne determinovať, je použitie molekulárnych techník. Ich výhodou je nezávislosť na vývinovom štádiu, či kompletnosti jedinca, nevýhodou je zatiaľ stále relatívne vysoká cena (napr. DNA BarCoding). Niektoré techniky založené na molekulárnych znakoch sa však stávajú stále dostupnejšími, no ich potenciál pri determinácii vzoriek a použitia v praxi nie je využitý.

RFLP (restriction fragment length polymorphism) sa často využíva na určenie otcovstva, alebo ako genetický odtlačok prstov. Na determináciu organizmov je táto jednoduchá a dostupná metóda využívaná najviac pri identifikácii škodcov (Gaskin et al. 2011), alebo invazívnych druhov (Kohout et al. 2013). V hydrobiologickom výskume však táto metóda nebola doposiaľ používaná. Cieľom tejto práce bolo vyvinúť jednoduchý postup na identifikáciu vzoriek chrobákov rodu *Elmis* vyskytujúcich sa na území SR, ktorý bude využívať na determináciu molekulárne markery s ohľadom na jednoduchosť, spoľahlivosť a využiteľnosť v bežnej praxi.

Obr. 1. *Elmis* sp. larva.

### Materiál a metódy

Imága a larvy chrobákov rodu *Elmis* boli zbierané na celom území SR počas viacerých sezón, imága boli determinované do druhu na základe morfológických znakov a larvy boli predbežne priradené k imágam na základe rovnakej lokality odberu. Spolu so vzorkami zo SR bol analyzovaný druh *E. fossulata* zo Sardínie. Všetky vzorky boli fixované 96 % etanolom a uskladnené pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Pre izoláciu DNA boli použité celé jedince, ktoré boli homogenizované. Na extrakciu celkovej DNA bol použitý extrakčný kit ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System (Promega) podľa protokolu výrobcu. Na RFLP analýzu bol pomocou PCR amplifikovaný 688bp fragment mitochondriálneho génu pre cytochróm oxidázu, použité boli primery LCO a HCO (Folmer et al. 1994).

Pre vyhľadanie restričných miest a vhodných kombinácií endonukleáz bol použitý program EnzymeX 3.1 (<http://enzymex.en.softonic.com/mac>)

na základe známych sekvencií použitého fragmentu. Amplifikované fragmenty COI boli cez noc natrávené kombináciou enzýmov *AseI+HinfI* a *AseI+NciI* podľa protokolu výrobcu (New England Biolabs) a produkty fragmentovej analýzy boli značené farbičkou GoldView (Guangzhou Geneshun Biotech) a separované na 2 % agarózovom géli. Výsledok elektroforézy bol vizualizovaný pod UV.

### Výsledky a diskusia

Pre fragmentovú analýzu bolo použitých 14 vzoriek lariev a imág z piatich druhov rodu *Elmis* vyskytujúcich sa na území SR (*E. maugetii maugetii*, *E. aenea*, *E. obscura*, *E. latreillei*, *E. rioloides*), s pridaním jedného poddruhu, ktorý sa na našom území nevyskytuje (*E. maugetii fossulata* – Sardínia). V programe EnzymeX bolo identifikovaných viacero restričných miest na použítom fragmente mtDNA, z ktorých boli vybrané dve kombinácie enzýmov – *AseI+HinfI* a *AseI+NciI*, ktoré štiepili fragment u jednotlivých druhov na 2–4 kratšie fragmenty (Tab. 1). Zvolené enzýmy majú vhodné reakčné podmienky a kombinácie enzýmov štiepia PCR produkt na zreteľne odlišiteľné menšie fragmenty na agarózovom géli a zároveň poskytujú druhovo špecifické vzory.

Tab.1. Dĺžka (bp) jednotlivých fragmentov po rozštiepení 688bp úseku DNA vzoriek druhov rodu *Elmis* vybranými kombináciami restričných enzýmov.

Ase I + Hinf I					Ase I + Nci I				
Druh	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4	Druh	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
<i>E.maugetii maugetii</i>	271	214	159	44	<i>E.maugetii maugetii</i>	376	214	97	1
<i>E.obscura</i>	214	199	169	106	<i>E.obscura</i>	305	214	169	-
<i>E.aenea</i>	474	214	-	-	<i>E.aenea</i>	328	214	98	48
<i>E.rioloides</i>	271	214	203	-	<i>E.rioloides</i>	474	200	14	-
<i>E.latreillei</i>	489	199	-	-	<i>E.latreillei</i>	590	98	-	-
<i>E.maugetii fossilata</i>	430	214	44	-	<i>E.maugetii fossilata</i>	376	214	98	-

Získané fragmenty sa na agarózovom géli jasne oddelili, pričom vznikli špecifické vzory, na základe ktorých je možné jednoznačne odlíšiť porovnávané vzorky (Obr. 2). V oboch prípadoch je možné odlíšiť jednotlivé druhy, v prípade použitia kombinácie enzýmov *AseI+HinfI* je možné odlíšiť aj poddruhy druhu *E. maugetii*. Druhovo špecifické vzory fragmentov sú nezávislé od použitého vývinového štádia, analýzy vzoriek lariev aj imág boli identické (u druhov/poddruhov *E. rioloides*, *E. m. fossilata* larvy neboli k dispozícii). Fragmenty do 100 bázových párov neboli na géli zreteľné, pre spoľahlivé odlíšenie analyzovaných taxónov však nie sú nevyhnutné. Pre menšie fragmenty by bolo nutné použiť hustejší gél, respektíve separovať fragmenty pomocou vertikálnej elektroforézy na polyakrylamidovom géli.

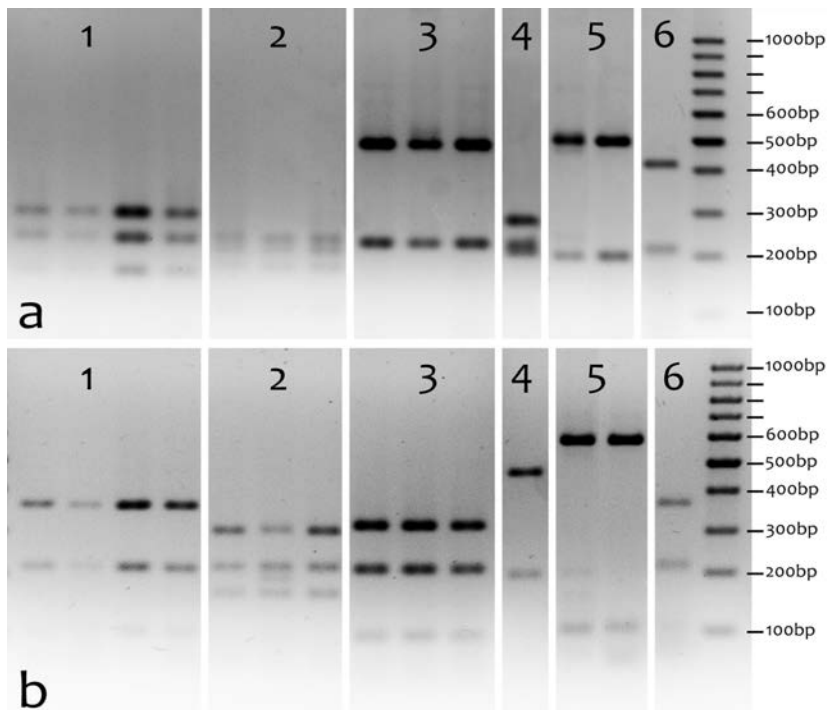
Fragmentová analýza vzoriek chrobákov rodu *Elmis* dokázala, že pomocou časti génu pre cytochróm oxidázu a použitím restričných endonukleáz je možné efektívne a jednoducho identifikovať druhy tohto rodu. Odlíšenie poddruhu *E. maugetii fossilata* naznačilo, že metódu je možné použiť aj na nižšej, ako druhej úrovni a taktiež, že bude možné rozšíriť jej použitie aj na ostatné (nielen slovenské) druhy rodu.

### PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: *Vývoj a aplikácia inovatívneho diagnostického postupu pre molekulárnu identifikáciu živočíchov* (ITMS: 26240220049), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

### Literatúra

- 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. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-297.
- GASKIN, J.F., BON, M.C., COCK, M.J.W., CRISTOFARO, M., DE BIASE, A., DE CLERCK-FLOATE, R., ELLISON, C.A., HINZ, H., HUFBAUER, R., JULIEN, M. & SFORZA, R. 2011. Applying molecular-based approaches to classical biological control of weeds. *Biological Control* 58: 1-21.
- KOHOUT, J., PEKÁRIK, L., ŠEDIVÁ, A., DIDENKO, A., ČIAMPOR, F. & ČIAMPOROVÁ-ZAŤOVIČOVÁ, Z. 2013. Discrimination between invasive Ponto-Caspian gobies using a PCR-RFLP method. *Journal of Applied Ichthyology* 1: 1-5.



Obr. 2. Identifikácia druhov rodu *Elmis* pomocou kombinácie restriktčných enzýmov *Asel+HinfI* (a) a *Asel+NciI* (b) s použitím 688bp fragmentu mitochondriálneho génu pre cytochróm oxidázu I. Vzory na 2 % agarózovom géli zodpovedajú druhom (poddruhom) *Elmis maugettii maugettii* (1), *E. obscura* (2), *E. aenea* (3), *E. rioloides* (4), *E. latreillei* (5) a pre porovnanie *E. maugettii fossulata* zo Sardínie (6).

## INFORMÁCIE O ČINNOSTI EFFS

### Zápis zo zasadnutia reprezentantov EFFS konaného dňa 2. júla 2013 v hoteli Mövenpick Münster, Nemecko

Prítomní: **Luigi Naselli-Flores** (preseda, Taliansko), **Alan Hildrew** (Freshwater Biological Association), **Philippe Cecchi**, **Florence Hulot** (Association Française de Limnology), **Giuseppe Morabito** (Associazione Italia di Oceanologia e Limnologia), **Antonio Camacho** (Asociación Ibérica de Limnología), **Martin Rulík** (Česká limnologická spoločnosť), **Elisabeth Meyer** (Deutsche Gesellschaft für Limnologie), **Geta Rîşnoveanu** (Societatea Română de Ecologia), **Maria Leichtfried** (Verein Österreichischer Limnologen), **Christine Ilg** (Schweizerische Gesellschaft für Hydrologie and Limnologie),