

DNA barcoding a diverzita vodných chrobákov

Fedor ČIAMPOR & Zuzana ČIAMPOROVÁ-ZAŤOVIČOVÁ

*Botanický ústav SAV, ZooLab, Dúbravská cesta 9, SK – 845 23 Bratislava;
e-mail: f.ciampor@savba.sk; zuzana.zatovicova@savba.sk*

Molekulárne dáta v taxonómii živočíchov nie sú ničím novým, veď na riešenie evolučných vzťahov, príbuzenstva, či fylogeny rôznych skupín sa využívajú už desaťročia. Až v roku 2003 však prišiel kanadan Paul Hebert s prvými prácami, ktoré využívali krátky fragment mitochondriálnej DNA na odlišenie druhov, predovšetkým tých, ktoré nebolo možné odlíšiť na základe morfológických znakov (Hebert et al. 2003). Okrem toho navrhol štandardne využívať na tieto účely fragment mitochondriálneho génu pre cytochróm oxidázu c podjednotku I a inicioval budovanie databáz, ktoré by obsahovali referenčné sekvencie a umožňovali determináciu druhov s využitím týchto fragmentov, tzv. DNA čiarových kódov (DNA barcode). V súčasnosti táto metóda ťaží zo stále lepšej dostupnosti molekulárnych dát, okrem toho má však viacero výhod oproti štandardným determinačným morfológickým znakom.

V prvom rade dokáže identifikovať kryptické druhy, nie je závislá na vývinovom štádiu, ani na zachovaní konkrétnych morfológických štruktúr. Inými slovami, stačí kúsok tkaniva, aby sme boli schopní potvrdiť prítomnosť konkrétneho druhu. Samozrejme, pokiaľ je tkanivo v stave, že je možné z neho izolovať DNA, a pokiaľ existujú referenčné dáta, ktoré umožnia vzorku (sekvenciu) identifikovať. Metódy izolácie DNA a tiež metódy sekvenovania sú stále citlivejšie, kvalitnejšie a lacnejšie. DNA sa dá izolovať aj z vody (environmentálna DNA), alebo z veľkého počtu jedincov naraz (metabarkóding), takže limitujúcim sa stáva práve to druhé „pokiaľ“. Napriek tomu, že v mnohých vyspelých krajinách prebiehajú kampane (a investujú sa nemalé finančné prostriedky) na získanie referenčných DNA barkódov, databázy zďaleka nie sú kompletné.

Vodné chrobáky síce v porovnaní s diverzitou všetkých chrobákov, či v porovnaní s celosvetovou diverzitou živočíchov netvorí významnú skupinu, majú však veľký význam vo vodných ekosystémoch a často sa využívajú na hodnotenie ich ekologického stavu. Ich určovanie však mnohokrát zlyháva. V tropických oblastiach preto, že ich diverzita stále nie je dostatočne zdokumentovaná, v našich podmienkach je to hlavne kvôli nedostatku expertov, či kvôli problematickej determinácii ich larválnych štádií. Nepresná determinácia následne výrazne skresľuje odhady skutočnej diverzity a tým pádom aj hodnotenie stavu biotopov. Preto nevyhnutne potrebujeme budovať databázové zdroje, ktoré by pokryli medzidruhovú a vnútrodruhovú diverzitu a umožnili využívať v plnej miere molekulárne dáta na presnú identifikáciu druhov a určenie skutočnej diverzity.

Užitočnosť DNA barkódov možno dokumentovať viacerými príkladmi z nášho výskumu diverzity juhoamerickej fauny vodných chrobákov čeľade Elmidae:

Rod *Onychelmis* Hinton, 1941

Rod *Onychelmis* je rozšírený v horských a podhorských oblastiach Ánd a zahŕňa tri opísané druhy známe z Panamy, Guatemaly, Kostariky, Kolumbie a Ekvádora (Jäch et al. 2016). V súčasnosti spracovávame materiál z Ekvádora (z ktorého je známy jeden druh) obsahujúci 84 jedincov rodu *Onychelmis* (Linský 2016). Podľa externých morfológických znakov sú všetky jedince takmer identické (Obr. 1). V úvodnej analýze molekulárnych znakov sme sekvenovali 6 jedincov z piatich lokalít, pričom sme identifikovali 5 dobre odlíšených druhov (Obr. 2), ktoré boli neskôr potvrdené aj analýzou samčích genitálií.

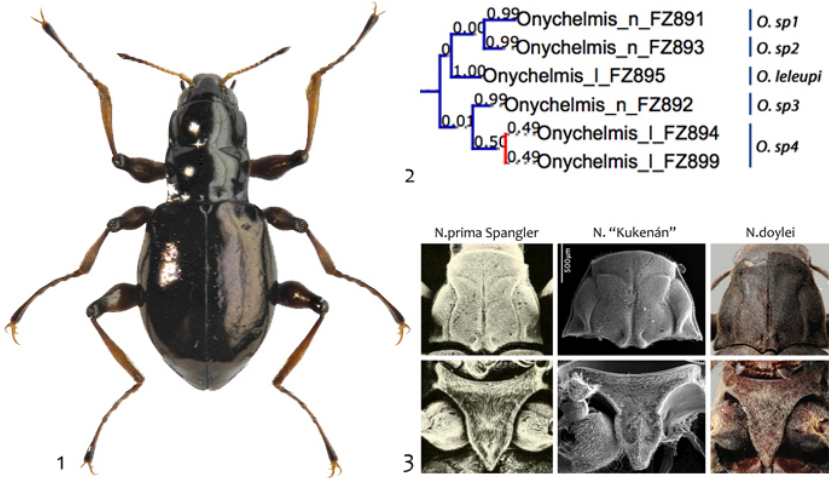
Rod *Xenelmis* Hinton, 1936 a *Oolimnius* Hinton, 1939

Rod *Xenelmis* zahŕňa 14 druhov, rod *Oolimnius* jeden známy druh. Druhy oboch rodov sú charakteristické krátkym oválnym telom, líšia sa hlavne prítomnosťou/ absenciou karín na pronóte. Tento znak je však značne inkonzistentný, čo potvrdila analýza DNA barkódov z materiálu týchto „malých oválnych“ chrobákov čeľade Elmidae z Venezuely. Analyzovali sme 18 jedincov, pričom sekvencie sa rozdelili do štyroch evolučných línií, ktoré podľa genetickej vzdialenosti reprezentujú štyri samostatné rody.

Rod *Neblinagena* Spangler, 1985

Tento rod bol opísaný z Cerro de la Neblina, stolovej hory na juhu Venezuely na hranici s Brazíliou. O 14 rokov neskôr bol z Guayanskej vysočiny opísaný druhý druh, *Neblinagena doylei* Kodada & Jäch, 1999. Momentálne máme k dispozícii materiál zo stolových hôr Kukenán (imága aj larvy) a Auyan (larvy) vo Venezuele. Analýzou barkódov sme potvrdili príslušnosť lariev a imág z Kukenánu k rovnakému druhu, čo umožní opis nového druhu a zároveň opis jeho larvy, a taktiež sme identifikovali príbuzný druh z Auyanu napriek tomu, že máme k dispozícii z tejto lokality len larvy. Navyše sme zistili, že genetická vzdialenosť jedincov z Kukenánu a Auyanu od *N. doylei* poukazuje na existenciu dvoch rodov. Morfológicky však imága nového druhu z Kukenánu pripomínajú viac typový druh rodu, *N. prima* (Obr. 3). To by mohlo naznačovať, že *N. doylei* je v skutočnosti predstaviteľom morfológicky veľmi podobného, ale samostatného rodu.

Toto je len zopár príkladov, ako DNA barkódy pomáhajú pri presnejšom odhade skutočnej diverzity vodných chrobákov. Okrem tropickej fauny spracovávame aj materiál zo Slovenska a aj tu sa ukazujú molekulárne dáta ako veľmi užitočné (napr. opis larvy druhu *Stenelmis puberula*, Čiamporová-Zaťovičová et al. 2007; potvrdenie výskytu druhu *Elmis rioloides* na Slovensku). Súčasne so získavaním molekulárnych dát budujeme referenčné databázy barkódov týchto chrobákov, ako aj ďalších skupín vodného hmyzu a veríme, že budú mať v budúcnosti aj praktické využitie.



Obr. 1. *Onychelmis* sp., zatiaľ neopísaný nový druh z Ekvádora (Foto: F. Čiampor Jr); Obr. 2. Identifikácia druhov na základe molekulárnych dát pomocou metódy bPTP (Bayesian Tree Poisson Process); Obr. 3. Morfológia predohrude druhov rodu *Neblinagena*.

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre ochranu a využívanie krajiny a biodiverzitu (ITMS: 26240120014) spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- ČIAMPOROVÁ-ZAŤOVIČOVÁ, Z., ČIAMPOR JR, F. & KODADA, J. 2007. *Stenelmis puberula* Reitter (Coleoptera: Elmidae) – description of larva and its association with adults, using DNA sequences. *Zootaxa* 1661: 17-28.
- HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L., DEWAARD, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270 (1512): 313-321.
- JÁCH, M.A., KODADA, J., BROJER, M., SHEPARD, W.D., & ČIAMPOR JR, F. 2016. Coleoptera: Elmidae and Protelmidae. *World catalogue of insects*, vol. 14. Leiden, The Netherlands: Brill.
- LINSKÝ, M. 2016. Rody *Notelmis* Hinton, 1941 a *Onychelmis* Hinton, 1941 (Coleoptera: Elmidae): taxonómia, rozšírenie a DNA barkoding. Bakalárska práca, Prírodovedecká fakulta UK, Bratislava, 41s.