

je teda vzácnym glaciálnym reliktom, nie stredoeurópskym endemitom. Ako sme zistili, Jelšový les je miestom, kde prežíva väčšina populácie *A. congener*. Publikované ojedinelé nálezy zo Šúrskeho kanála, Račieho potoka, rybníka a náš nález zo štrkoviska pravdepodobne zachytávali iba okraje areálu šúrskej populácie, prípadne išlo o náhodný výskyt.

Bohužiaľ, Jurský Šúr je stále viac obklopaný zástavbou rodinných domov a budovaným diaľničným obchvatom Bratislavy. Napriek tomu, v zmenšujúcom sa ostrove pôvodnej prírody stále dokážu prežiť niektorí svedkovia dôb, v ktorých sa rozsiahle mokrade rozprestierali od úpätia Malých Karpát až k Dunaju. Patrí k nim aj *A. congener*, ktorej populácia je jedným z mnohých dôvodov na dôslednú ochranu NPR Jurský Šúr.

Literatúra:

- BALTHASAR, V. 1937. Arthropleidae, eine neue Familie der Ephemeropteren. Zool. Anz. 120: 204-230.
- BAUERNEFEIND, E. & SOLDÁN, T. 2012. The Mayflies of Europe (Ephemeroptera). Apollo Books, Ollerup, 781 pp.
- KRNO, I. 1993. Podenky (Ephemeroptera) a pošvatky (Plecoptera) prírodnej rezervácie Svätojurský Šúr. Biológia, Bratislava 48: 513-518.
- LANDA, V. 1954. K výskytu severských druhů jepic v Československu. Čas. Čs. spol. ent. 51: 225-236.
- LANDA, V. 1969. Fauna ČSSR. Jepice – Ephemeroptera. Academia, Praha, 352 pp.
- SOLDÁN, T. 1979. Struktur and Funktion der Maxillarpalpen von *Arthroplea congener* (Ephemeroptera, Heptageniidae). Acta Entomologica Bohemoslovaca 76: 353-368.

DNA vo vodách Dunaja (budúcnosť monitoringu?)

Fedor ČIAMPOR Jr & Zuzana ČIAMPOROVÁ-ZAŤOVIČOVÁ

ZooLab, Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV, Dúbravská cesta 9, SK-845 23 Bratislava; e-mail: f.ciampor@savba.sk, zuzana.zatovicova@savba.sk

Úvod

V poslednom období sa stále častejšie spomína biodiverzita a hlavne dopad jej výrazného úbytku na fungovanie ekosystémov, hospodárstvo či spoločnosť (napr. Darwall et al. 2020). Záujem o zachovanie biodiverzity, teda druhovej pestrosti a obavy z negatívnych trendov sú namieste, pretože na nej v podstate stojí fungovanie celého sveta. Platí to aj pre sladkovodné ekosystémy, ale rovnako platí aj to, že naše poznatky o skutočnom stave biodiverzity sú stále nedostatočné. Dokazujú to najmä nové metódy, ktoré využívajú na analýzu a hodnotenie stavu biodiverzity molekulárne dáta. Tie sa oproti konvenčným postupom (najmä hodnotenie druhového spektra pomocou morfológických znakov) posúvajú o úroveň hlbšie a odhaľujú rozmanitosť, ktorú sme vidieť nemohli (slabá rozlišovacia schopnosť morfológických znakov, nedostatok



Obr. 1 eDNA lokality na Dunaji a jeho prítokoch.

vhodného materiálu na morfológickú analýzu, nedostatok expertov na jednotlivé taxonomické skupiny...). Zároveň, DNA metódy sú výrazne rýchlejšie, šetrnejšie k analyzovaným spoločenstvám a neplatí už ani hlavný argument proti – že sú drahé.

V roku 2019 sa realizoval v poradí ďalší z pravidelných prieskumov Dunaja – Joint Danube Survey, organizovaný ICPDR (<http://www.danube.survey.org/jds4/>). V poradí už štvrtý prieskum (JDS4) po prvý raz zahŕňal aj DNA metabarkódingové analýzy bioty Dunaja na vybraných lokalitách. Tento pilotný projekt, realizovaný v spolupráci s členmi EU COST akcie DNAqua-Net, mal za cieľ otestovať DNA monitoring v praxi a overiť jeho možné využitie v rutinnom monitoringu vodných ekosystémov v budúcnosti. Plánovaný výskum prebiehal na viacerých lokalitách pozdĺž celého Dunaja a podrobnejšie na vybraných lokalitách na rakúskom úseku. My sme túto metodiku testovali nezávisle, na lokalitách na slovenskom úseku, kde sa ekologický stav Dunaja monitoruje pravidelne.

Metodika

Počas testu boli z 11 lokalít (10 na Slovensku + lokalita Hainburg) odoberané environmentálne vzorky vody. Šesť lokalít leží priamo na Dunaji a 5 na jeho hlavných slovenských prítokoch Morava, Hron, Váh a Ipel' (Obr. 1). Vzorky boli odoberané v apríli a júli 2019, na každej lokalite v dvoch opakovaniach 10 litrov vody, z ktorých bol 1 liter prefiltrovaný pomocou Sterivex filtrov (veľkosť pórov 0,22 μm). Filtre boli zafixované Longmire pufróm. Každý deň bola vykonaná

jedna negatívna kontrola nahradením riečnej vody sterilnou vodou. V laboratóriu bol pufof použitý na extrakciu DNA pridaním Proteinázy K a purifikovaný kolonkovým kitom podľa protokolu výrobcu (DNEasy Blood & Tissue, Qiagen kit). Po extrakcii boli vzorky prenesené do iného laboratória (v inej budove), aby sa znížilo riziko kontaminácie. DNA knižnica bola pripravená v dvoch PCR reakciách s použitím primerov BF3-BR2 a sekvenovaná na platforme Illumina MySeq (podľa Elbrecht et al. 2019), z každej vzorky boli urobené dva pseudoreplikáty. Sekvenačné dáta boli importované do systému mBRAVE (<http://www.mbrave.net>), v ktorom sa sekvencie filtrovali s ohľadom na ich kvalitu, de-replikovali (rozdelenie do jednotlivých lokalít a opakovaní podľa DNA tagov) a zoskupili do operačných taxonomických jednotiek (OTUs). Následne systém porovnal OTUs s referenčnou databázou DNA barkódov (BOLD) a priradil ich k existujúcim BIN-om (Barcode Index Number), ktoré v ideálnom prípade reprezentujú jednotlivé druhy (determinácia).

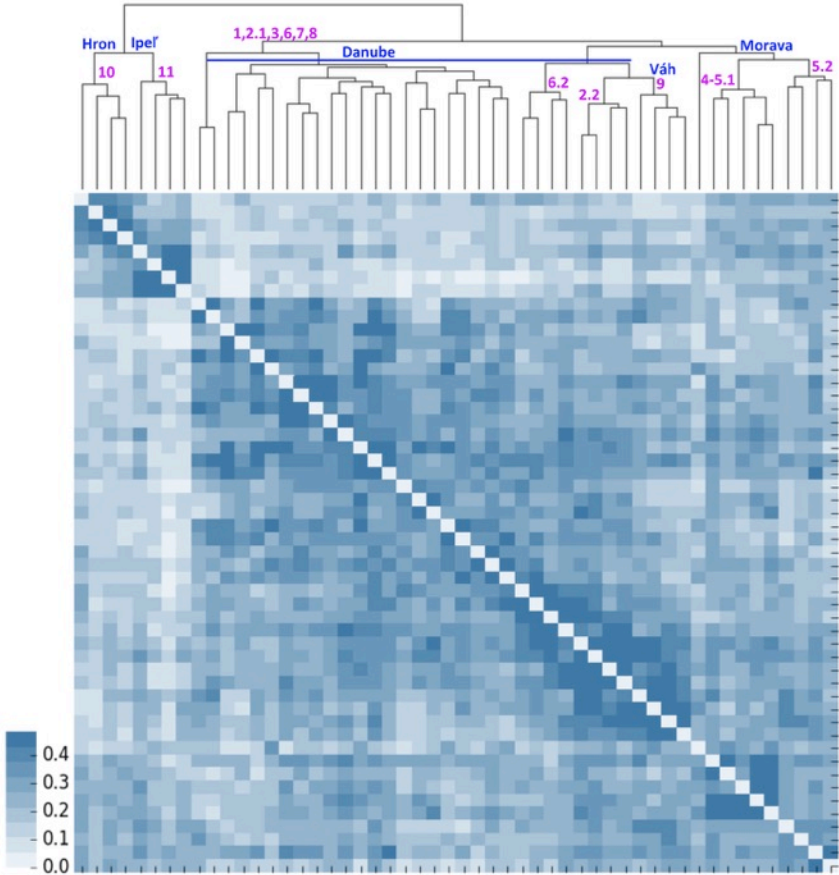
Výsledky

Spolu bolo vo vzorkách vody Dunaja a jeho prítokov identifikovaných 177 BINov/druhov bezstavovcov: 165 vodných, 11 suchozemských, 1 endoparazit, a to od 12 (Dunaj Dobrohošť) do 53 (Dunaj Medveďov) druhov na lokalitu. Zaznamenali sme 11 kmeňov, z ktorých dominovali obrúčkavce (Annelida) a článkonožce (Arthropoda). Na všetkých lokalitách bol zaznamenaný iba jeden spoločný druh (nepôvodné korýtko *Sinanodonta woodiana*), dunajské lokality zdieľali 7 spoločných BINov. Analýza beta diverzity výraznejšie oddelila Hron a Ipeľ, dunajské lokality vytvorili klaster s Moravou a Váhom, pričom z pohľadu fauny najpodobnejším s Dunajom bol práve Váh (Obr. 2).

Na zhodnotenie výsledkov eDNA analýz sme použili údaje o makrozoobentose získané štandardnými metódami (morfologickou determináciou) v rámci JDS4. Porovnaných bolo 11 JDS4 lokalít, ktoré sa prekrývali s lokalitami, kde bola analyzovaná aj eDNA. V rámci týchto lokalít bolo rôznymi odborníkmi zaznamenaných 211 taxónov (TaxalD), ale iba 129 z nich bolo určených do úrovne druhu. Z eDNA vzoriek priradil mBrave druhové meno v 98 prípadoch, avšak vzorky eDNA potvrdili prítomnosť celkovo 165 BINov, čo predstavuje v podstate determináciu 165 taxónov do druhovej úrovne. Niektoré „druhy“ však nemajú priradené meno, pretože sa nena-chádzajú v referenčnej databáze, resp. môže ísť aj o zatiaľ neznáme kryptické druhy.

Záver

Celkovo môžeme povedať, že analýzy eDNA fungujú porovnateľne, alebo aj o čosi lepšie ako konvenčné metódy. V porovnaní s klasickým prístupom má analýza environmentálnej DNA niekoľko výhod: 1) kompletnú analýzu je schopný vykonať malý tím (4 osoby bez špecifických taxonomických skúseností) v priebehu asi 2 týždňov, kým spracovanie a determinácia klasických bentických vzoriek je časovo omnoho náročnejšia a vyžaduje



Obr. 2 Analýza beta diverzity eDNA vzoriek z Dunaja a jeho hlavných slovenských prítokov (Morava, Váh, Hron, Ipeľ).

zapojenie viacerých špecialistov na jednotlivé taxonomické skupiny; 2) hoci eDNA ešte dnes nie je schopná identifikovať všetky taxóny do druhov (medzery sú na druhovej úrovni (BINy), kým morfologicky determinované taxóny často predstavujú rody, skupiny druhov, čeľade a preto obsahujú istú dávku nepresnosti, taktiež rôzni odborníci môžu priradiť ten istý druh k inému TaxalD alebo naopak, jeden TaxalD môže predstavovať viac ako jeden druh; 3) odber a analýza vzoriek eDNA je neinvazívna, a preto nemá negatívny vplyv na sledované spoločenstvá, môže tiež zaznamenať prítomnosť druhov (napr. invázných) aj bez ich fyzického odchytenia.

Výstupy tohto prvého metabarkódového testu na Slovensku naznačili, že budúcnosť monitorovania biodiverzity slovenských vôd by jednoznačne mala zahŕňať aj molekulárne analýzy. Výhodou je, okrem spomenutého, aj ich všetrannosť: eDNA z Dunaja napríklad potvrdila aj prítomnosť 38 druhov rýb, resp. 9 druhov cicavcov, čo umožňuje komplexnejší pohľad na celý ekosystém z jednej analýzy. Aj napriek detailnosti výsledkov bude, samozrejme, potrebné tento test a jeho závery podporiť analýzou ďalších vzoriek.

PodĎakovanie

Tento výskum bol realizovaný v rámci spolupráce s VÚVH (HZ 2019). Za podporu a spoluprácu ďakujeme hlavne Marianne Cíchovej, Eme Mišikovej Elexovej, Miroslavovi Očadlíkovi a Jarmile Makovinskej; s eDNA analýzami pomohol Ondrej Vargovčík. Výskum bol čiastočne podporený projektom VEGA 02/0030/17.

Literatúra

- DARWALL, W., BREMERICH, V., DE WEVER, A., DELL, A.I., FREYHOF, J., GESSNER, M.O., GROSSART, H.P., HARRISON, I., IRVINE, K., JÄHNIG, S.C., JESCHKE, J.M., LEE, J.J., LU, C., LEWANDOWSKA, A.M., MONAGHAN, M.T., NEJSTGAARD, J.C., PATRICIO, H., SCHMIDT-KLOIBER, A., STUART, S.N., THIEME, M., TOCKNER, K., TURAK, E., WEYL, O. 2018. The Alliance for Freshwater Life: A global call to unite efforts for freshwater biodiversity science and conservation. *Aquatic Conservation* 28: 1015-1022.
- ELBRECHT, V., BRAUKMANN, T.W.A., IVANOVA, N.V., PROSSER, S.W.J., HAJIBABAEI, M., WRIGHT, M., ZAKHAROV, E.V., HEBERT, P.D.N., STEINKE, D. 2019. Validation of COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods. *PeerJ* 7: e7745.
- WEIGAND, H., BEERMANN, A.J., ČIAMPOR, F., COSTA, F.O., CSABAI, Z., DUARTE, S., GEIGER, M.F., GRABOWSKI, M., RIMET, F., RULIK, B., STRAND, M., SZUCSICH, N., WEIGAND, A.M., WILLASSEN, E., WYLER, S.A., BOUCHEZ, A., BORJA, A., ČIAMPOROVÁ-ZAŤOVIČOVÁ, Z., FERREIRA, S., DIJKSTRA, K.-D.B., EISENDLE, U., FREYHOF, J., GADAWSKI, P., GRAF, W., HAEGERBAEUMER, A., VAN DER HOORN, B.B., JAPOSHVILI, B., KERESZTES, L., KESKIN, E., LEESE, F., MACHER, J.N., MAMOS, T., PAZ, G., PEŠIĆ, V., PFANNKUCHEN, D.M., PFANNKUCHEN, M.A., PRICE, B.W., RINKEVICH, B., TEIXEIRA, M.A.L., VÁRBÍRÓ, G., EKREM, T. 2019. DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *Science of the Total Environment* 678: 499-524.