

# NAUJOS KARTOS MOLEKULINIAI METODAI BALTIJOS JŪROS TYRIMUOSE, *arba* KIEKVIENAS LAŠAS TURI SAVO „BARKODĄ“

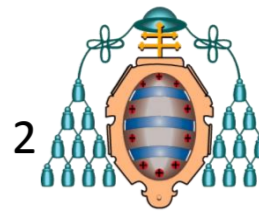
Anastasija Zaiko<sup>1\*</sup>, Aurelija Samuilovienė<sup>1</sup>, Alba Ardura<sup>1,2</sup>, Alba Ardura<sup>2</sup>, Yaisel Pichs<sup>2</sup>, Eva Garcia-Vazquez<sup>2</sup>



Klaipeda University, Lithuania<sup>1</sup>

\*el. paštas: [anastasija@corpi.ku.lt](mailto:anastasija@corpi.ku.lt)

University of Oviedo, Spain<sup>2</sup>



## Įvadas

Savalaikis rūšių aptikimas ir tikslus identifikavimas yra aktualus ir itin svarbus uždavinys vykdant mokslinius tyrimus ir stebėsenos programas pagal ES direktyvas. Vandens ekosistemose specifinės aplinkos sąlygos, didelė organizmų morfologinė įvairovė bei morfologinių bruožų kaitos skirtingose vystymosi stadijose dažnai apsunkina šią užduotį. Šiuo atveju daug pranašesni yra molekuliniai rūšių identifikacijos metodai, kurie remiasi DNR barkodų nustatymu.

**DNR barkodas** - tai trumpas DNR regionas, tinkamas rūšių atpažinimui ir atskirymui. Šie regionai pasižymi labai maža įvairove tarp vienos rūšies individų, bet labai didele variacija tarp skirtingų, netgi giminingų, rūšių.

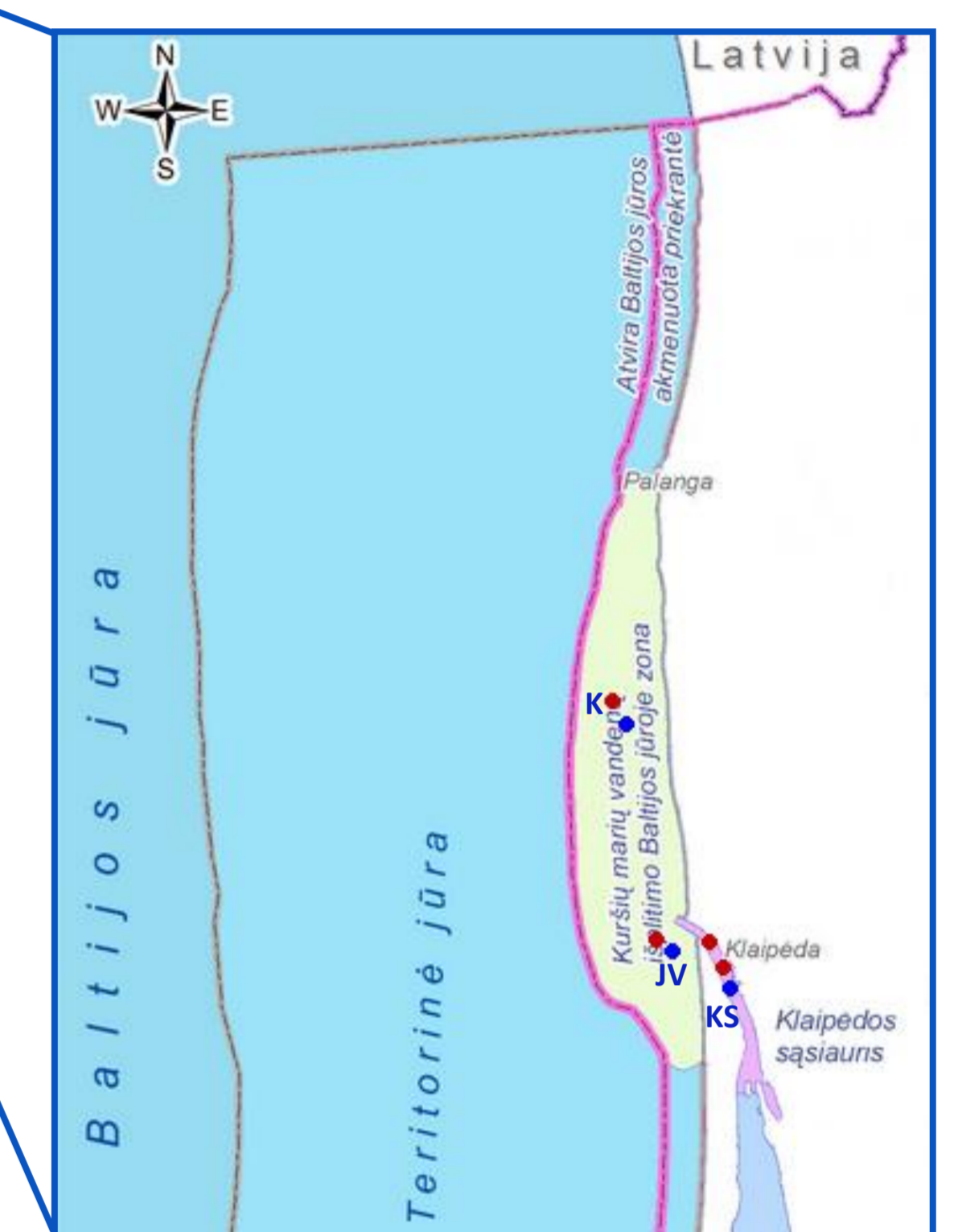
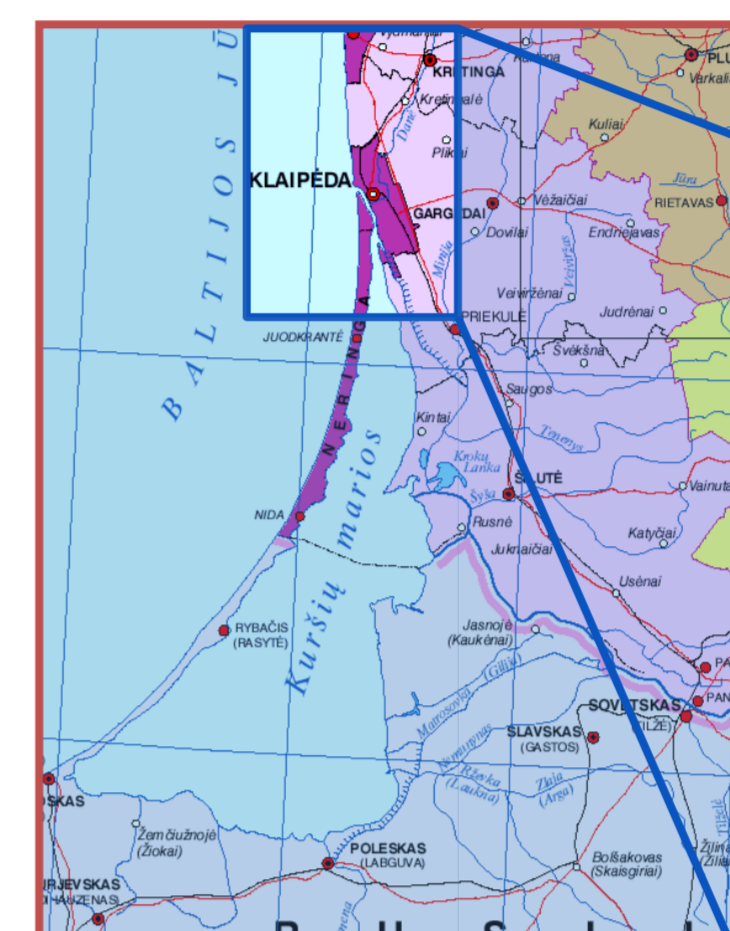
Šie DNR regionai pasižymi labai maža įvairove tarp vienos rūšies individų, bet labai didele variacija tarp skirtingų, netgi giminingų, rūšių. Sulyginus informaciją apie tiriamų individų šių regionų sekas su sekomis, esančiomis genų duomenų bazėse, galima nustatyti rūšies identišumą. DNR barkodų nustatymas leidžia identifiuoti organizmą iki rūšies taksonominio vieneto, turint labai nedidelį kiekį mėginio (netgi iš dalies degradavusių organizmų). Metodus leidžia identifiuoti rūšis įvairiose jų vystymosi stadijose - kiaušinio, lervos bei suaugėlio, tiksliau atskirti morfologiškai panašias rūšis.

**1 lentelė:** Rūšys, aptiktos LNM ir DNR barkodų mėginiuose, žvaigždute pažymėtos rūšys, kurių DNR sekos nėra įtrauktos į duomenų bazes, raudonai pažymėtos nevietinės rūšys.

Aptiktos rūšys	Monitoringo duom.	DNR duom.
<i>Acartia longiremis</i> *	+	-
<i>Acartia sp.</i>	+	-
<b>A. tonsa</b>	-	+
<i>Asplanchna priodonta</i> *	+	-
<i>Bosmina coregoni</i>	-	+
<i>Bosmina sp.</i>	+	+
<i>Brachionus calyciflorus</i>	+	-
<i>Centropages sp.</i>	+	-
<b>Cercopagis pengoi</b>	+	+
<i>Chydorus sphaericus</i>	+	-
<i>Conochilus unicornis</i>	+	-
<i>Cyclops sp.</i>	+	+
<i>Daphnia cucullata</i>	+	+
<i>D. galeata</i>	+	+
<i>Diaphanosoma brachyurum</i>	+	-
<b>Dreissena polymorpha</b>	-	+
<i>Eubosmina longispina</i> *	+	-
<i>Eudiaptomus gracilis</i>	+	-
<i>Evadne nordmanni</i>	+	+
<i>Filinia longiseta</i>	+	-
<i>Hydrobia ulvae</i>	-	+
<i>Kellicottia longispina</i> *	+	-
<i>Keratella cochlearis</i>	+	-
<i>K. quadrata</i>	+	+
<i>Leptodora kindtii</i>	+	+
<i>Macoma balthica</i>	-	+
<b>Marenzelleria neglecta</b>	-	+
<b>M. viridis</b>	-	+
<i>Mesocyclops leukarti</i>	-	+
<i>Mytilus sp.</i>	-	+
<i>Oithona similis</i>	+	+
<i>Paracalanus sp.</i>	+	-
<i>Podon leukartii</i>	+	+
<i>Pleopis polyphemoides</i>	-	+
<i>Polyarthra sp.</i>	+	-
<i>Synchaeta monopus</i> *	+	-
<i>Temora sp.</i>	+	-

## Metodai

Pirmą kartą DNR barkodų metodika buvo pritaikyta Baltijos jūros Lietuvos priekrantės bioįvairovės tyrimui 2013 metai. Šios pilotinės studijos metu COI barkodo (mitochondrijų geno citochromo c oksidazės geno I segmento) pagalba buvo identifiuojami mesozooplanktono organizmai Klaipėdos sąsiauryje (KS) ir Kuršių marių vandens išplitimo zonoje Baltijos jūroje - prie jūros vartų (JV) ir ties Karkle (K) (Pav. 1).



**Pav. 1:** Zooplanktono mėginių ėmimo vietos (raudoni taškai – zooplanktono monitoringo mėginiai, mėlyni taškai – zooplanktono DNR barkodų mėginiai).

Integruoti zooplanktono mėginiai DNR barkodų analizei buvo imami pakartotinai (gegužės 26 – K, JV; birželio 19 – KS, JV ir rugpjūčio 7 – KS ir JV), planktoninio tinklo pagalba (diametras 55 cm, akies dydis 80 mkm), ir laikomi ant ledo iki atvežimo į laboratoriją. Laboratorijoje visa koncentruoto mėginio medžiaga buvo nusodinama ant membraninio filtro (akies dydis 0,12 mkm), ir kartu su filtru fiksuojama 96% etanoliu. Vėliau DNR buvo išskiriama iš nusodintos medžiagos naudojant QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

PGR amplifikacijai buvo naudojami universalūs modifikuoti COI pradmenys (Geller et al. 2013). Amplifikuotos sekos buvo analizuojamos taikant naujos kartos DNR sekvenavimo metodikas (New Generation Sequencing), Genome Sequencer FLX (Roche) platformą (atlikta „Macrogen“ kompanijos, Korėja).

Po pirminės atrankos (pagal ilgį ir kokybę), gautos DNR sekos buvo analizuojamos BLAST (NCBI) programos pagalba, siekiant nustatyti atitinkančias sekas nukleotidų duomenų bazėse. Tolimesnei analizei buvo atrinktos daugialščių bestuburių sekos, atitinkančios esančioms duomenų bazėse ne mažiau 97%, su >90% nukleotidų padengimu. Gauti rezultatai buvo palyginti su Lietuvos nacionalinio monitoringo (LNM) metu gautais zooplanktono duomenimis (artimiausių stočių mėginiai, paimti, atitinkamai, KS - 2013 m. gegužės 24, birželio 12, liepos 18 ir rugpjūčio 12; JV – gegužės 15 ir rugpjūčio 21; K – gegužės 14 ir rugpjūčio 20).

## Išvados

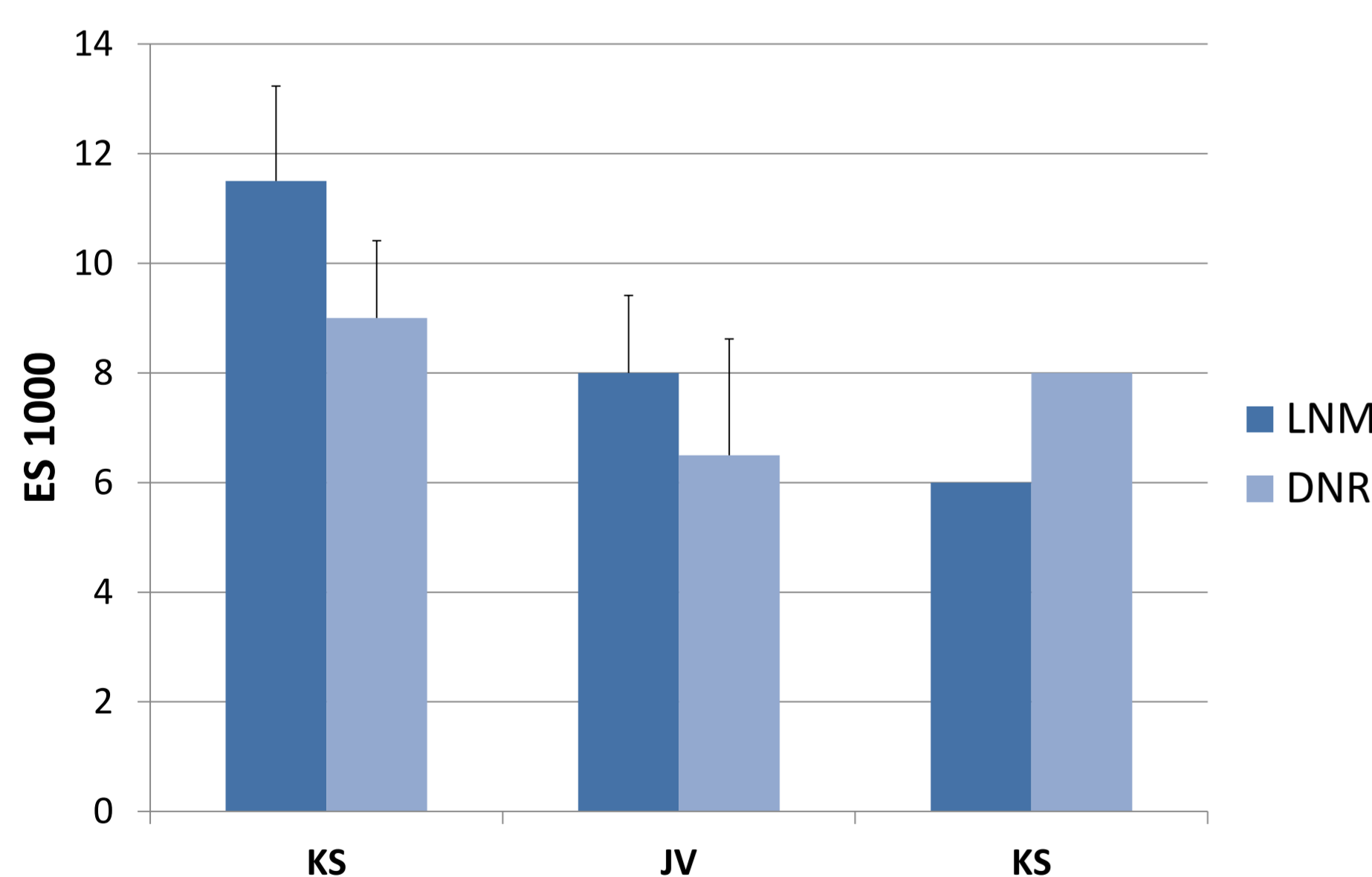
- DNR barkodų metodika potencialiai gali būti taikoma zooplanktono bioįvairovės tyrimams bei monitoringui, suteikiant geros taksonominės rezoliucijos duomenis
- Metodas nereikalauja specifinių ekspertinių žinių, leidžia atpažinti rūšis skirtingose gyvenimo stadijose (pvz., planktonines dugno bestuburių lervas), tačiau norint užtikrinti patikimumą, būtina vietinių rūšių DNR barkodų duomenų bazė
- Metodas leidžia aptikti negausias rūšis, ar net jų molekulinis pėdsakas, kas yra svarbų nevietinių ir invazinių rūšių ankstyvam aptikimui bei pasiskirstymo stebėsenai
- DNR barkodų duomenys tinka tiek bendrijų rūšinės sudėties ir erdvinio pasiskirstymo nustatymui, tiek kiekybinių indikatorių (pvz., JSPD reikmėms) apskaičiavimui

## Rezultatai

Iš šešių analizuojamų mėginių buvo gauta ~100 tūkstančių geros kokybės DNR sekų, priklausančių daugialščiams organizmams. 98% sekų buvo statistškai reikšmingai ( $e < 0,01$ ) priskirti 18 duomenų bazėse registruotiems taksonomiems vienetais (genties arba rūšies lygmeniu). 8 jų taip pat buvo aptikti monitoringo mėginiuose (1 lentelė).

Iš 19 rūšių, identifiкуotų monitoringo metu ir neaptiktų DNR barkodų mėginiuose, 5 neturi atitinkamos DNR sekos informacijos duomenų bazėse (Barcode of Life ir GenBank). Kitos, nors ir įtrauktos į DNR barkodų duomenų bazes, neturi etaloninių sekų iš Baltijos jūros individų (kas galėjo lemti vidurūšinę variaciją analizuojamojoje sekoje).

Keturios iš penkių nevietinių rūšių analizuojamuose mėginiuose buvo aptiktos tik DNR barkodų pagalba.



**Pav. 2:** ES 1000 reikšmės tyrimų vietose, įvertintos pagal Lietuvos nacionalinio monitoringo ir aptiktų DNR barkodų sekų duomenis.

Laikantis prielaidos, kad mėginiuose DNR kiekis bus proporcingas rūšių gausumui, buvo apskaičiuota ir palyginta rūšinė įvairovė (pagal Hulberto indeksą) LNM ir DNR barkodų mėginiuose (naudojant aptiktų sekų skaičių kaip gausumo matą). Įvertintos ES1000 reikšmės (tikėtinas rūšių skaičius, esant gausumui 1000 ind/m<sup>3</sup>) tiek LNM, tiek DNR mėginiuose parodė bendrą rūšių skaičiaus mažėjimo tendenciją tostant nuo Kuršių marių (Pav. 2).