**Názov témy:**

eDNA a inovatívny genetický skríning v hodnotení ekologického stavu vodných ekosystémov

**Vyučujúci:**

Zuzana Čiamporová-Zaťovičová

Fedor Čiampor (CBRB SAV)

Ondrej Vargovčík (doktorand)

**Cieľ:**

Zhodnotiť možnosti využitia DNA dát pri hodnotení diverzity spoločenstiev vodných ekosystémov na príklade Dunaja a jeho prítokov.

**Anotácia:**

Moderné nástroje založené na analýze environmentálnej DNA (eDNA) majú veľkú perspektívu pre vývoj biomonitoringu v budúcnosti. Ukazuje sa, že identifikácia druhov pomocou DNA barkódov a metabarkódingu je porovnateľne presná a spoľahlivá ako tradičné metódy založené na morfotaxonómii, zároveň sú však tieto metódy oveľa rýchlejšie, efektívnejšie a menej závislé od expertných skúseností s taxonómiou a determináciou jednotlivých skupín organizmov. Rýchlo sa rozvíjajúce referenčné databázy DNA barkódov umožňujú s vysokou presnosťou realizovať prieskum biodiverzity, vrátane väčšiny štandardne používaných bioindikátorových, nepôvodných či inváznych druhov. Stále sa vyvíjajúce technológie vysoko výkonného sekvenovania (HTS) umožňujú aplikáciu DNA determinácie na úrovni celých spoločenstiev a poskytujú tak možnosť hodnotiť ekologický stav ekosystémov, alebo získať jedinečný a komplexný prehľad stavu a zmien biodiverzity vo vzťahu k faktorom prostredia (napr. antropogénne zásahy, zmena klímy).

Biologické vzorky používané na analýzu DNA môžu predstavovať súbory jedincov, prípadne environmentálne vzorky (napr. voda, pôda) obsahujúce DNA uvoľnenej z organizmov obývajúcich študovanú lokalitu (napr. odumretá pokožka rýb či iných stavovcov, pohlavné bunky vylúčené do prostredia, jednobunkové organizmy, zvyšky tiel bezstavovcov, atď.). Zo vzoriek je izolovaná celková DNA a využitím špecifických primerov (krátkych oligonukleotidov) je v rámci PCR reakcie amplifikovaný krátky fragment (DNA barkód). Tieto fragmenty sú druhovo špecifické a ich osekvenovaním a porovnaním s referenčnou databázou je možné identifikovať jedince vo vzorke. Vzhľadom k tomu, že HTS sekvenovanie produkuje milióny až miliardy báz v jednej reakcii, je možné analyzovať naraz desiatky až stovky vzoriek obsahujúcich väčší počet druhov. Následným bioinformatickým spracovaním sa dáta priradia k pôvodným vzorkám (lokalitám) a porovnaním DNA dát s databázou sa determinujú prítomné druhy.

**Materiál a metódy:**

Vzorky biologického materiálu (bentos) a eDNA (voda a sediment na analýzu DNA) budú každý deň doobeda odobraté v teréne, na vybraných lokalitách riek Dunaj a Morava v okolí Bratislavy.

V poobedných hodinách budú v laboratóriu CBRB SAV určované vzorky bentosu pomocou binokulárnych lúp a určovacích kľúčov a demonštrované molekulárne metódy využívané pri analýze environmentálnych vzoriek (izolácia DNA, PCR, NGS sekvenovanie).

Vzorový dataset DNA sekvencií zo záujmového územia bude spracovaný pomocou bioinformatických softvérov mBRAVE, JAMP, referenčnej databázy BOLD.

Výsledky z jednotlivých dní budú zosumarizované v podobe prezentácie.

**Úlohy:**

* porovnanie druhovej diverzity spoločenstiev vodných organizmov vybraných lokalít Dunaja a jeho prítokov
* porovnanie diverzity vybraných lokalít zistenej analýzou vzoriek bentosu („bulk sample“) a analýzou environmentálnej DNA („eDNA“)
* vyhodnotenie rozdielov vo výsledkoch analýzy molekulárnych dát získaných dvoma rôznymi bioinformatickými prístupmi (mBRAVE, JAMP)
* porovnanie výsledkov DNA analýz s údajmi z morfologickej determinácie (údaje z monitoringu VÚVH)

**Pomôcky:**

Primerané terénne oblečenie (aj do dažďa), vhodná obuv (aj do vlhka, prípadne gumáky), písacie potreby, zápisník, fotoaparát (stačí smart mobil), jedlo (desiata/suchý obed, tekutiny), lieky (antihistaminiká, repelent... podľa individuálnych potrieb).

Ďalšie pomôcky na odber bentosu (hydrobiologická sieťka, misky, pinzety, vzorkovnice, vysoké čižmy) a odber eDNA (filtre, striekačky, vedro...) prinesú vyučujúci.

Na spracovanie výsledkov a prípravu prezentácie je potrebný notebook (minimálne jeden v skupine).

**Odporúčaná literatúra a internetové zdroje:**

Deiner K, Bik HM, Mächler E, et al. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26:5872–5895.

Leese F, Bouchez A, Abarenkov K, et al., 2018. Why we need sustainable networks bridging countries, disciplines, cultures and generations for aquatic Biomonitoring 2.0: A perspective derived from the DNAqua-Net COST Action. Advances in Ecological Research, 58: 63-99.

Pawlowski J, Apothéloz-Perret-Gentil L, Mächler E, Altermatt F 2020. Environmental DNA applications  in biomonitoring and bioassessment of aquatic ecosystems, Guidelines, Federal Office for the Environment (FOEN), Bern, 71pp.

Weigand H, Beermann A, Čiampor Jr F, et al., 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.

<http://v4.boldsystems.org>

<https://aquabol.sk>

<http://dnaqua.net>