

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA BARKODINGU W OCHRONIE PRZYRODY

Andrzej Grzywacz, Wiesław Bogdanowicz

Streszczenie

Muzeum i Instytut Zoologii PAN w Warszawie koordynuje badania wykorzystujące kod paskowy DNA, wykonywane w ramach powstałego Krajowego Banku DNA Roślin, Grzybów i Zwierząt. W skład tego konsorcjum naukowego wchodzi na razie 5 instytutów. Barkoding może przynieść nieocenioną pomoc w badaniach gatunkowej różnorodności biologicznej, w botanice, zoologii, mikologii oraz w naukach aplikacyjnych: rolnictwie, leśnictwie, medycynie, weterynarii, naukach o żywności, ochronie przyrody i innych.

Słowa kluczowe: barkoding, kod genetyczny

POSSIBILITIES OF BARCODING APPLICATION IN NATURE PROTECTION

Abstract

Museum and Institute of Zoology of Polish Academy of Sciences in Warsaw coordinate research using DNA barcode. The research is carried out under the National Bank of DNA of Plants, Fungi, and Animals. Up to this moment, this research consortium includes five institutes. Barcoding can bring invaluable help in studies of species biodiversity, botany, zoology, mycology, and application sciences: agriculture, forestry, medicine, veterinary, food science, nature protection and others.

Keywords: barcoding, genetic code

Wstęp

Zastosowanie genetycznego metkowania (DNA barcoding) stanowi wielki przełom w metodach identyfikowania gatunków, przy wykorzystaniu osiągnięć biologii molekularnej. Polega na analizie kodu identyfikacyjnego składającego się z jednej lub kilku sekwencji, np. fragmentu mitochondrialnego genu oksydazy cytochromu c (COI) o długości 648 par zasad w przypadku zwierząt. Zaletą tej metody jest możliwość oznaczania organizmów również w stadiach rozwojowych trudnych do identyfikacji metodami tradycyjnymi, opartymi głównie na wielu cechach morfologicznych i anatomicznych. Można wówczas oznaczyć gatunek mając do dyspozycji np. tylko jajo, larwę owada, nasiona lub siewkę rośliny, fragmenty kości i piór zwierząt kręgowych, grzybnię, zarodniki. Oznaczanie kodu paskowego DNA, a szerzej metody biologii molekularnej, znajdują szerokie zastosowanie w praktyce, a nie tylko w taksonomii organizmów, np. w badaniach wpływu antropopresji na różnorodność biologiczną, badaniach zmienności genetycznej i śledzeniu historii demograficznej populacji, monitorowaniu stanu środowiska, oznaczaniu alergenów u ludzi, gatunków sprawców zatruc pokarmowych, badaniu rodzicielstwa i pokrewieństwa, identyfikacji pokarmu, w problematyce inbrodu (wsobności, krzyżowania się osobników spokrewnionych), orzecznictwie sądowym związanym z ochroną przyrody (kłusownictwo, kradzieże, nielegalny handel), wskazywaniu pochodzenia i dróg migracji gatunków inwazyjnych oraz patogenów, w prowadzeniu banków różnorodności genetycznej itd.

Gatunkowa różnorodność biologiczna

Różnego typu szacunki i wyliczenia wskazują, że potencjalnie jest możliwe istnienie we współczesnym świecie od 5 do 12 mln gatunków organizmów. Według innych autorów liczebność gatunkowa bioróżnorodności może wynosić ponad 30 mln, „maksymaliści” twierdzą, że na Ziemi bytuje prawdopodobnie aż 50-80 mln gatunków mikroorganizmów, roślin, grzybów i zwierząt (Wilson 1999). Do tej pory naukowo opisano, zarejestrowano tylko ponad 1,7 mln gatunków organizmów. Aktualnie nieco więcej, gdyż corocznie opisywanych jest tysiące nowych gatunków, głównie z rejonów lasów tropikalnych. Gdy przyjmiemy istnienie 5 mln gatunków, to zidentyfikowano, naukowo opisano, dopiero 34%, a według innych danych 14% lub 3-6%, czy też zaledwie 2% biologicznej różnorodności świata.

Tab. 1. Zarejestrowana gatunkowa różnorodność biologiczna Polski*

Table 1. Registered species biodiversity of Poland

Jednostka systematyczna	Liczba taksonów
Organizmy bezjądrowe	1945
Bakterie	298
Sinice	1647
Organizmy jądrowe	55418
Pierwotniaki	1152
Grzyby	5368
Rośliny	13530
Zwierzęta	35386
Ogółem	57363

* zestawiono na podstawie: *Różnorodność biologiczna Polski (2003)*, Andrzejewski, Weigle (red.)

Tab. 2. Rośliny telomowe występujące w Polsce*

Table 2. Embryophytes occurring in Poland

Podgrupy	Liczba gatunków
wątrobowce	234
glewiki	4
mchy	697
widłakowe	13
skrzypowe	10
paprociowe	52
nagozalążkowe	10
okrytozalążkowe	2405
razem	3425

* wg H. Klamy (2003), J. Żarnowca (2003) oraz M. Zając i A. Zająca (2003)

Z analiz zawartych w zbiorowym opracowaniu „Różnorodność biologiczna Polski” pod redakcją Andrzejewskiego i Weigle (2003) wynika, że zarejestrowana gatunkowa różnorodność biologiczna naszego kraju wynosi 57-60 tys. gatunków (tab. 1). Niektóre grupy organizmów, co do liczebności gatunków rozpoznane są dość dobrze. Roślin telomowych bytuje u nas 3425 gatun-

ków, najwięcej okrytozależkowych i mchów (tab. 2). Zwierząt strunowych jest 657-708 gatunków, w zależności od źródła danych i sposobów kwalifikowania, najwięcej gatunków jest ptaków (tab. 3). Porostów występuje 1738 gatunków, nieco ponad 4500 gatunków grzybów wielkoowocnikowych.

Tab. 3. Zwierzęta strunowe występujące w Polsce*
Table 3. Chordates occurring in Poland

Jednostki systematyczne	Liczba gatunków
Podtyp – osłonice	
żachwy	2-6
ogonice	2
Podtyp kręgowce	
smoczkouste (kręgowste)	4
ryby	89-129
płazy	18
gady	9
ptaki	428-435
ssaki	105
razem	657-708

* wg E. Chudzikiej i E. Skibińskiej (2003)

Liczne grupy organizmów są niedostatecznie rozpoznane np. bakterie, pierwotniaki, grzyby mikroskopijne, nicienie, niektóre taksony owadów i pajęczaków (Grzywacz 2008). Są co najmniej trzy przyczyny takiego stanu rzeczy: brak dostatecznej ilości specjalistów od niektórych grup organizmów; czasochłonne, kosztowne i specjalistyczne procedury laboratoryjne potrzebne do oznaczania niektórych taksonów; oparcie dotychczasowych metod taksonomii głównie na cechach budowy anatomicznej i morfologicznej, a szczegóły budowy są tak zróżnicowane, że rozpoznanie spokrewnionych gatunków wymaga dużej wiedzy i doświadczenia (często okazów porównawczych, dużych kolekcji i zbiorów), co sprawia, że specjaliści od taksonomii zajmują się określoną (niekiedy wąską) grupą organizmów np. umieją oznaczać niektóre rzędy lub rodziny owadów, pajęczaków, pierwotniaków, glonów, grzybów itd.

Gdybyśmy zsumowali liczbę gatunków roślin telomowych (3425) i zwierząt strunowych (708), które w potocznym rozumieniu są traktowane i postrzegane w percepcji społeczeństwa jako typowi przedstawiciele flory i fauny, to stanowiłyby one tylko 5,4% całej przypuszczalnej, potencjalnie występującej gatunkowej różnorodności biologicznej Polski lub 7,2% liczebności gatunkowej zarejestrowanej do tej pory.

Liczba gatunków występujących w Polsce, uznawana jest za wysoką w stosunku do państw sąsiednich. Dotychczas zarejestrowano u nas około 57-60 tys., a przypuszczalnie, potencjalnie występuje około 75-76 tysięcy. Według szacunkowych danych, w naszych lasach żyje ok. 36 tys. gatunków zarejestrowanych, a organizmów prawdopodobnie żyjących w lasach może być ok. 47 tys. gatunków. Za organizmy leśne uznaje się takie, które wyłącznie bytują w lasach (obligatoryjnie), oraz takie które także mogą występować w lasach (fakultatywnie) lub są z lasami związane sporadycznie (Grzywacz 2008). Jako ilustracja takiej rozbieżności między stanem zbadania gatunków, a prawdopodobną ich całkowitą liczebnością na danym terytorium, niech posłużą grzyby. W Polsce występuje prawdopodobnie ponad 14 tys. gatunków grzybów, z czego 4,5-5 tys. grzybów wielkoowocnikowych (*macromycetes*) i 7-8 tys. grzybów mikroskopijnych (*micromycetes*) oraz prawie

2 tys. grzybów lichenizowanych, tworzących z zielenicami i sinicami symbiotyczne organizmy w postaci porostów. Do tej pory zarejestrowano około 7,6 tys. gatunków grzybów (4 tys. wielkoowocnikowych, 2 tys. mikroskopijnych i 1,6 tys. grzybów lichenizowanych), co oznacza, że stopień rozpoznania fungi (świata grzybów) wynosi w Polsce ok. 54% (Grzywacz 2003).

Carl von Linné, Karol Linneusz (1707-1778) w fundamentalnym swoim dziele „Systema Naturae” upowszechnił zasadę binominalnego (nazwa rodzaju i gatunku) nazewnictwa biologicznego. W swoim bardzo pracowitym życiu sam opisał 7,7 tys. gatunków roślin i ponad 4,1 tys. zwierząt. Zaproponowany przez niego system taksonomiczny był sztuczny, ale stał się podstawą współczesnej systematyki.

Nadal wiele gatunków w Polsce, Europie i na świecie czeka na odkrycie. Nie da się zastąpić pracy klasycznych taksonomów, ale biologia molekularna może przyspieszyć i ułatwić identyfikację gatunków, tworząc katalogi genetycznych kodów paskowych.

Krajowy Bank DNA Roślin, Grzybów i Zwierząt

Polski Bank DNA jest inicjatywą instytucji naukowych (tabela 4) wykorzystujących kody paskowe DNA w badaniach taksonomicznych jak i praktycznym zastosowaniu. Początki działalności banku datuje się na 2006 r. Jest tam gromadzony materiał biologiczny do otrzymania DNA. Celem Banku jest gromadzenie i powiększanie wiedzy o roślinach, grzybach i zwierzętach przy wykorzystaniu najnowszych odkryć i standardów w badaniach DNA. Bank prowadzi witrynę internetową <http://www.bankdna.pl/>, która ma służyć jako źródło wiedzy dla wszystkich zainteresowanych barkodowaniem DNA oraz gromadzeniem danych o oznaczonych próbkach i cyklicznej prezentacji wyników badań.

Dzięki analizom DNA powstają nowe gałęzie biologii: taksonomia molekularna, ekologia molekularna oraz nowe możliwości w ochronie przyrody, w tym dla ratowania ginących gatunków. Na stronach internetowych Krajowego Banku DNA można uzyskać informacje o sposobach zbierania próbek, jak dokumentować i przechowywać materiał do badań DNA: roślin naczyniowych, grzybów, ssaków, ptaków i dużych bezkręgowców, małych ryb i innych bezkręgowców.

Tab. 4. Placówki naukowe wchodzące do tej pory w skład Banku DNA

Table 4. Scientific institutions joining DNA Bank until now

Placówka naukowa	Miejscowość
Muzeum i Instytut Zoologii PAN	Warszawa
Instytut Botaniki PAN im. W. Szafera	Kraków
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN	Jastrzębiec
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin	Radzików
Uniwersytet Zielonogórski, Wydział Nauk Biologicznych	Zielona Góra

Podano tam również przykłady zastosowania barkodingu DNA w systematyce organizmów oraz w celach praktycznych, wyniki badań z wielu laboratoriów na całym świecie (Bogdanowicz, Draber-Mońko, Malewski 2008). Warto wiedzieć, że Consortium for the Barcode of Life (CBOL) skupia 157 organizacji z 45 krajów i powstaje program sekwencjonowania COI u wszystkich motyli, ryb, ptaków oraz organizmów żyjących w rejonach polarnych.

Koordynatorem Banku jest Muzeum i Instytut Zoologii PAN w Warszawie. Sieć naukowa Banku jest otwarta, dla wszystkich placówek badawczych już zajmujących się, bądź zainteresowanych wykorzystaniem barkodingu DNA. Dotyczy to uczelni i instytutów z zakresu nauk przyrodniczych, medycyny, weterynarii, rolnictwa, leśnictwa, ochrony przyrody, nauk o żywności i wielu innych.

Genetyczne metkowanie gatunków

Wielkie hipermarkety z powodu niemożności zapamiętania przez kasjerów cen tak dużych ilości różnorodnych towarów znajdujących się w sprzedaży, wprowadziły kod paskowy, gdzie występuje najczęściej kombinacja kilkunastu elementów (pasków długich i krótkich oraz pasków grubych i cienkich). Pewną analogię do tej metody identyfikacji towarów wykorzystano w genetyce.

Sposób identyfikacji organizmów nazywam DNA barkodowaniem (barcode – kod paskowy). Stało się to dzięki opracowaniu metod ekstrakcji, oczyszczania i analizowania struktury DNA, ale również dzięki zwiększeniu mocy obliczeniowej komputerów, rozwojowi bioinformatyki (markery, programy). Dopiero wspólne sukcesy biologii molekularnej i informatyki dały możliwości identyfikacji gatunków tylko na podstawie sekwencji DNA.

Do genetycznego metkowania gatunków np. u zwierząt wybrano fragment DNA o długości ok. 650 nukleotydów genu pierwszej podjednostki oksydazy cytochromowej (COI). Sekwencję COI cechuje mała zmienność wewnątrzgatunkowa, stąd gen ten jest dobrą metką biologiczną. Dla innych grup organizmów służą inne fragmenty DNA z różnorodnych genów, takie aby najbardziej były charakterystyczne dla gatunku.

Oznaczenie kodu paskowego DNA znalazło już szerokie zastosowanie w praktyce. Służy w taksonomii organizmów, do oceny wpływu antropopresji na różnorodność biologiczną, do śledzenia historii demograficznej populacji i ich zmienności genetycznej, do monitorowania stanu środowiska, oznaczanie alergenów u ludzi, gatunków sprawców zatruc pokarmowych (grzyby, rośliny), w badaniach rodzicielstwa i pokrewieństwa, w identyfikacji składu gatunkowego pokarmu ludzi i zwierząt, w problematyce inbrodu (wsobności, krzyżowania się osobników spokrewnionych) (Bogdanowicz, Draber-Mońko, Malewski 2008, Freeland 2008). Oznaczenie kodu paskowego DNA służy w orzecznictwie sądowym związanym z rozstrzygnięciem spraw związanych z kłusownictwem, kradzieżami zwierząt i produktów pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, nielegalnym handlem, fałszerstwami w produkcji żywności.

Dla przykładu można podać identyfikację gatunkową jelenia, sarny lub rozróżnianie ich mięsa od mięsa zwierząt domowych (koza, owca, bydło), co wykonuje się na zlecenie producentów żywności, kółek łowieckich, policji, w przypadkach badania nielegalnego pochodzenia produktów spożywczych, kłusownictwa, wypadków drogowych z udziałem zwierząt (Natanek-Wiśniewska 2009). Można badać skład gatunkowy komponentów drobiu w produktach spożywczych i karmie dla zwierząt w celu sprawdzenia rzetelności informacji podanych przez producentów. Badano próbki krwi pochodzące od kury, gęsi, kaczki i indyka z której wyizolowano sekwencję konserwatywnego regionu 12S-rDNA (Natanek-Wiśniewska 2009b).

Badania kodu paskowego DNA można wykorzystywać w entomologii sądowej (Kaczorowska, Draber-Mońko 2009) np. do odróżniania nekrofagicznych gatunków muchówek z rodziny plujkowatych, co pomocne jest w określaniu czasu jaki upłynął od chwili śmierci do momentu odkrycia

zwłok. Korzyści z badań kodu paskowego można zastosować w ochronie roślin i fitopatologii we wskazywaniu pochodzenia i dróg migracji gatunków inwazyjnych (owady, pajęczaki, nicienie) oraz patogenów (grzyby, organizmy grzybopodobne). Barkoding DNA jest pomocny w prowadzeniu banków różnorodności genetycznej.

Metkowanie genetyczne gatunków grzybów jest niezwykle przydatne np. w badaniach mikoryzy drzew leśnych. Ektomikoryzy drzew są badane w różnych latach i porach roku, często przy braku lub efemerycznym, krótkotrwałym pojawie owocników. Na podstawie morfologii i budowy anatomicznej owocnika można oznaczyć gatunek, ale gdy go brak – nie, gdyż tradycyjnymi metodami, na podstawie samej grzybni tego zrobić nie można. Grzybnia pobrana z korzeni jest wystarczającą próbką do barkodingu DNA, co pozwala oznaczyć jej gatunek (Trocha 2008). Dokonuje się tego na podstawie analizy regionu ITS.

Barkoding DNA ma także swoich oponentów. Najczęściej argumentują oni, że metoda ta nie pozwala rozróżnić gatunki blisko spokrewnione i że aktualnie są pewne słabości metodyczne nie pozwalające na rozróżnienie niektórych gatunków zwierząt, a nawet niektórych grup taksonomicznych; że „znakowanie kodem DNA” to tylko chwyt marketingowy i nie jest to wcale nowość; sądzą, że barkoding DNA zmniejszy dotacje na finansowanie badań taksonomicznych tradycyjnymi metodami, która to dziedzina nauki i tak cierpi na chroniczny brak środków; bardzo często wskazuje się na wysokie koszty metkowania genetycznego organizmów, że długo jeszcze będzie potrzeba czekać na potaniecie badań próbek. Mimo tego, wykorzystywanie metod biologii molekularnej, w tym barkodingu w świecie i w Polsce bardzo rozwija się.

Marzeniem przyszłości jest sytuacja, w której postęp naukowo-techniczny pozwoli na zbudowanie podręcznych urządzeń, np. wielkości odbiornika GPS lub telefonu komórkowego, za pomocą którego będzie można „odczytać” charakterystyczny dla gatunku odcinek DNA z małej próbki tkanki (Stoechle, Hebert 2009). Badacz, turysta, celnik, leśnik, przyrodnik, działacz ochrony przyrody, za pomocą takiego, nieistniejącego jeszcze urządzenia mógłby na podstawie fragmentu włosa, pióra, odnóża owada, kawałka owocnika grzyba lub liścia rośliny, przeanalizować sekwencję nukleotydów we fragmencie DNA, pełniącemu funkcję kodu kreskowego.

Odczyt zostałby przesłany do bazy danych, publicznie dostępnej biblioteki (banku) kodów paskowych, przeanalizowany przez odpowiednie programy i stamtąd napłynęłyby podstawowe informacje – nazwa gatunku, ogólna charakterystyka, poglądowe zdjęcia, mapa z rozmieszczeniem występowania, czy też inne dane. Każdy w dowolnym czasie i miejscu mógłby zidentyfikować interesujący go organizm lub też dowiedzieć się, że dany okaz nie został do tej pory jeszcze przez niego opisany dla nauki. Aktualnie jest to marzenie, fantastyka naukowa, ale kto wie!

Na razie jest pilna potrzeba rozbudowy banków genów (leśnych, rolniczych, medycznych, ogólnobiologicznych – botanicznych, zoologicznych, mikologicznych, mikrobiologicznych); rozwoju instytucjonalnego i finansowego Krajowego Banku DNA Roślin, Grzybów i Zwierząt koordynowanego przez Muzeum i Instytut Zoologii PAN w Warszawie; intensyfikacji badań terenowych przez biologów oraz szczegółowej penetracji słabiej zbadanych siedlisk, zbiorowisk roślinnych i zwierzęcych oraz regionów kraju oraz gromadzenia odpowiednich próbek organizmów; rozwoju bazy markerów genetycznych, programów komputerowych, sprzętu i urządzeń laboratoryjnych, zwiększenia nakładów finansowych na barkoding DNA.



Literatura

- Andrzejewski R., Weigle A. (red.). 2003. Różnorodność biologiczna Polski. Narodowa Fundacja Ochrony Środowiska, Warszawa.
- Bogdanowicz W., Draber – Mońko A., Malewski T. 2008. Biologiczna metka. Akademia, 1(13): 31-33.
- Chudzicka E., Skibińska E. 2003. Różnorodność gatunkowa – zwierzęta. [W:] Różnorodność biologiczna Polski, R. Andrzejewski, A. Weigle (red.), NFOŚ, Warszawa, 93-138.
- Freeland J.R. 2008. Ekologia molekularna. PWN, Warszawa.
- Grzywacz A. 2003. Różnorodność gatunkowa – grzyby. [W:] Różnorodność biologiczna Polski, R. Andrzejewski, A. Weigle (red.). NFOŚ, Warszawa, 21-35.
- Grzywacz A. (red.). 2008. Zasoby przyrodnicze polskich lasów. PTL, Cedzyna k. Kielc.
- Kaczorowska E., Draber – Mońko A. 2009. Wprowadzenie do entomologii sądowej. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk.
- Klama H. 2003. Różnorodność gatunkowa – wątrobowce i glewki. [W:] Różnorodność biologiczna Polski, R. Andrzejewski, A. Weigle (red.), NFOŚ, Warszawa, 49-58.
- Natanek-Wiśniewska M. 2009. Identyfikacja gatunkowa przeżuwaczy na podstawie analizy cytochromu B. Materiały I Kongresu Nauk Rolniczych „Nauka – Praktyce”, 229-230.
- Natanek-Wiśniewska M. 2009a. Wykrywanie komponentu drobiowego w celu identyfikacji gatunkowej. Materiały I Kongresu Nauk Rolniczych „Nauka – Praktyce”, 231-232.
- Stoechle M.Y., Hebert P.D.N. 2009. Kreskowy kod życia. Świat Nauki 3: 40-45.
- Trocha L.K. 2008. Zróżnicowanie mikoryz w monokulturach 12 gatunków drzew leśnych. Mażynopis rozprawy doktorskiej. Instytut Dendrologii PAN, Kórnik.
- Wilson E.O. 1999. Różnorodność życia. PIW, Warszawa.
- Zajac M., Zajac A. 2003. Różnorodność gatunkowa – rośliny naczyniowe i inne. [W:] Różnorodność biologiczna Polski, R. Andrzejewski, A. Weigle (red.), NFOŚ, Warszawa, 67-82.
- Żarnowiec J. 2003. Różnorodność gatunkowa – mchy. [W:] Różnorodność biologiczna Polski, R. Andrzejewski, A. Weigle (red.), NFOŚ, Warszawa, 59-65.

Andrzej Grzywacz
Wydział Leśny SGGW
andrzej_grzywacz@sggw.pl

Wiesław Bogdanowicz
Muzeum i Instytut Zoologii PAN
sekretariat@miiz.waw.pl