



PISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA PRZYRODNIKÓW IM. KOPERNIKA

WYDAWANE PRZY WSPÓŁDZIAŁE: AKADEMII GÓRNICZO-HUTNICZEJ,
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO, POLSKIEJ AKADEMII UMIEJĘTNOŚCI

TOM 113
ROK 130

LIPIEC – SIERPIEŃ – WRZESIEŃ 2012

ZESZYT 7–9
2583–2585

OCENA RÓŻNORODNOŚCI GENETYCZNEJ PRZY POMOCY MARKERÓW MOLEKULARNYCH – ZASTOSOWANIE W EKOTOKSYKOLOGII

Magdalena Mikowska, Renata Świergosz-Kowalewska, Ewa Śliwińska (Kraków)

W jakim celu i jakimi metodami badamy zmienność genetyczną organizmów i populacji ?

Ochrona różnorodności biologicznej na poziomie genomowym zyskała w ostatnich latach szczególne zainteresowanie badaczy. Szerokie spektrum czynników, które mogą modyfikować różnorodność genetyczną populacji (np. izolacja naturalna czy antropogeniczna, zanieczyszczenia, oddziaływanie gatunków inwazyjnych) daje ku temu szczególne uzasadnienie. Pomimo braku przesłanek świadczących o wpływie poziomu różnorodności genetycznej na komponenty dostosowania (przeżywalność, sukces reprodukcyjny), można spodziewać się, że niższy poziom heterozygotyczności w danej populacji świadczy o zwiększonej depresji inbredowej, co może prowadzić w sposób bezpośredni do jego zmniejszenia. Poznanie istoty tego zjawiska oraz czynników mających negatywny wpływ na różnorodność genetyczną jest bardzo ważne dla ochrony, przetrwania i prawidłowego rozwoju populacji zagrożonych z różnych przyczyn.

Badania różnorodności genetycznej dotyczą najczęściej gatunków zagrożonych, endemicznych, czy tzw. „keystone species”, których obecność warunkuje prawidłowe funkcjonowanie ekosystemów. Coraz częściej badacze decydują się na ocenę zmienności

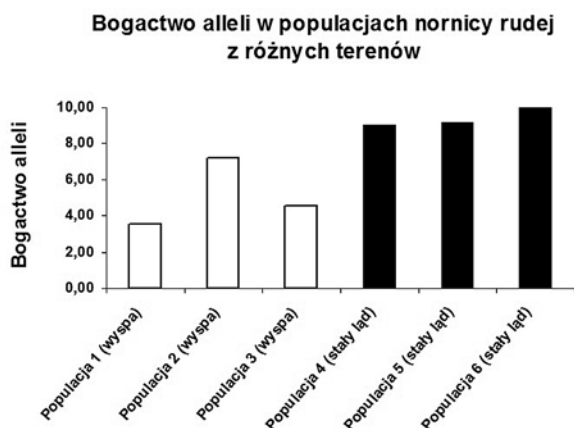
genetycznej pod kątem oceny skutków działania konkretnych czynników środowiskowych, np. chemicznych czy fizycznych. Takie badania prowadzi się zarówno na populacjach dziko żyjących, jak również populacji hodowanych w laboratoriach. Przedmiotem badań stają się więc pospolite gatunki mo-



Ryc. 1. Nornica ruda (*Myodes* [= *Clethrionomys*] *glareolus*).
Fot. K. Chrzęściak.

delowe, będące reprezentantami danego ekosystemu, np. mysz zaroślowa (*Apodemus sylvaticus*, Rząd: *Rodentia* – gryzonie), nornica ruda (*Myodes* [= *Clethrionomys*] *glareolus*, Rząd: *Rodentia* – gryzonie) – (Ryc. 1).

Czynniki, których wpływ bada się najczęściej to metale ciężkie, pestycydy, węglowodory aromatyczne, dioksyny, natomiast fizyczne to promieniowanie jonizujące czy temperatura. W przypadku czynników chemicznych np. metali ciężkich czy czynników fizycznych np. promieniowania pierwiastków radioaktywnych wiadomo, że mogą one zwiększać częstość mutacji, a co za tym idzie zwiększać zmienność genetyczną w narażonych populacjach. Nie można jednak wykluczyć odwrotnego mechanizmu ich działania – silne narażenie może prowadzić do selekcji i drastycznego zmniejszenia liczebności populacji (a więc także jej puli genowej – tzw. efekt szyjki od butelki, ang. *bottleneck effect*), a zatem do spadku poziomu różnorodności genetycznej. Niższa różnorodność genetyczna w małych i izolowanych populacjach jest wśród badaczy znanym zjawiskiem (Ryc. 2).



Ryc. 2. Wykres prezentujący bogactwo alleli (jeden z parametrów opisujących poziom zmienności genetycznej) w populacjach zamieszkujących tereny wyspowe i tereny na otwartym lądzie. Widoczne jest niższe bogactwo alleli u zwierząt wyspowych (reprezentujących małe i izolowane populacje) w porównaniu do zwierząt ze stałego lądu. Dane uzyskane przy pomocy badań markerami mikrosatelitarnymi (M. Mikowska, R. Świergosz-Kowalewska, dane niepublikowane).

Sposób oddziaływania czynników chemicznych i fizycznych na strukturę genetyczną organizmu i populacji jest niezwykle złożony, co utrudnia często stworzenie takiego układu eksperymentalnego (zarówno w laboratorium jak i w warunkach naturalnych), który pozwoliłby na przetestowanie postawionych hipotez badawczych. Nie jest to jednak jedyna trudność, z którą spotykamy się w przypadku badań różnorodności genetycznej. Kolejnym, kluczowym punktem tego rodzaju badań jest wybór odpowiedniego narzędzia, czyli w tym przypadku, markera molekularnego. To on, właściwie dobrany, pozwoli na uzyskanie wiarygodnych danych pozwalających na odrzucenie lub przyjęcie testowanych hipotez.

Czym są markery molekularne? Otóż markery molekularne to cechy DNA, RNA i białek pozwalające na identyfikację osobników lub badanie cech genetycznych całych populacji. W ostatnich latach ich spektrum i łatwość wykorzystywania rośnie w bardzo szybkim tempie, zarówno w naukach biologicznych jak i medycynie. Markery molekularne wkraczając do laboratoriów praktycznie wszystkich dziedzin biologii, nie omijając również ekologii, w której stanowią doskonałe narzędzie do badania pokrewieństw między osobnikami czy struktury populacji. Nie dziwi więc fakt zastosowania ich do oceny wpływu różnych czynników środowiskowych (np. pH, zasolenia, temperatury) na różnorodność genetyczną populacji. Wiele markerów stosowanych w biochemii, medycynie czy ekologii zostało z powodzeniem zaadaptowanych w badaniach ekotoksykologicznych do oceny wpływu różnych substancji toksycznych (metali ciężkich, związków organicznych i nieorganicznych) na różnorodność genetyczną narażonych populacji.

Dzięki szybkiemu rozwojowi technik molekularnych w ostatnich kilku dekadach dysponujemy dzisiaj wieloma markerami, spośród których możemy wybrać te, które posłużą nam najlepiej w naszych badaniach. Takich możliwości nie mieli badacze u początków rozwoju biologii molekularnej w latach 80. XX wieku. Obecnie w grupie markerów molekularnych można znaleźć narzędzia bardziej uniwersalne, których zastosowanie nie ogranicza się do jednego gatunku lub rodzaju oraz bardziej specyficzne dla danego gatunku, wymagające wiedzy na temat badanego genomu. Decyzja, o wyborze najbardziej odpowiedniego markera będzie zależała od postawionych pytań badawczych, jak również od informacji, jakimi dysponujemy w przypadku badanego organizmu. W tym ostatnim przypadku analizy molekularne poprzedza faza zbierania informacji w oparciu o genetyczne bazy danych (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) oraz wyniki innych badaczy pracujących na interesującym nas gatunku. Jeśli możemy bazować na tych informacjach, wybór i opracowanie metod badawczych staje się łatwiejsze. Znacznie dłużej trwa natomiast faza przygotowań w przypadku badań nad organizmami, których genom nie jest poznany. Znacząco też wzrastają koszty tego typu badań. Tak bywa właśnie w przypadku wielu badań ekotoksykologicznych, kiedy nie mamy do czynienia z gatunkiem modelowym, dla którego już wcześniej opisano i wykorzystywano z sukcesem odpowiednie markery molekularne. Wybór metody badawczej, czyli markera molekularnego, będzie więc zależał od wielu czynników: obiektu badań oraz dostępnych informacji o jego genomie, rodzaju czynnika stresowego (np. skażenia) i sposobie jego oddziaływania.

Obecnie możemy wybierać spośród wielu markerów bazujących na różnym materiale genetycznym: DNA jądrowym, chloroplastowym, mitochondrialnym. Istnieją wśród nich markery kodominujące (dające możliwość odróżnienia homozygot od heterozygot) i dominujące. Jednakże nie zawsze dla badaczy najważniejsze jest to, czy metoda jest najnowocześniejsza, bardziej liczy się wiarygodność wyniku, a także koszt i nakład pracy pozwalający uzyskać jak najwięcej informacji na temat danej populacji. W badaniach ekotoksykologicznych czy monitoringowych głównym celem często jest szybkie sprawdzenie jak kształtuje się poziom różnorodności genetycznej w zależności od zanieczyszczenia określonego na podstawie emisji, indeksu toksyczności czy stężenia metali w tkankach organizmów. Dlatego też naukowcy decydują się czasami na zastosowanie metod, które przez niektórych traktowane są jako przestarzałe i mniej wiarygodne, ale pozwalają na uzyskanie ogólnej informacji o badanej populacji szybko i niskim kosztem. Zalety i wady wybranych metod molekularnych, wraz z przykładami zastosowań w badaniach, zostały omówione w następnym podrozdziale.

Wybrane techniki molekularne w ekotoksykologii

Badania zmienności genetycznej, zanim weszły w dynamiczny rozwój pod koniec XX w., zdominowane były niemal całkowicie przez metodę wykorzystującą allozymy. Allozymy to różne formy białka kodowane przez różne allele tego samego genu. Ich rozróżnienie polega na przeprowadzeniu elektroforezy i rozdzieleniu produktów o różnej mobilności elektroforetycznej. Markery te są kodominujące, co pozwala na obliczenie heterozygotyczności i homozygotyczności w badanej populacji. Ich efektywność w stosunku do kosztu analizy jest zadowalająca, pomimo, że pozwalają wykryć tylko około 1/3 substytucji (zmiany sekwencji DNA dotyczące jednego nukleotydu). Ponieważ jest to metoda stosunkowo szybka i prosta, allozymy w dalszym ciągu pozostają w użyciu, ale nie tak powszechnie jak to było w przeszłości, kiedy niedostępne były inne metody. Metoda badania allozymów zajmuje również swoje miejsce na liście użytecznych biomarkerów stosowanych w ekotoksykologii. Jako przykład posłużyć mogą badania prowadzone na dżdżownicy *Dendrobaena octaedra* (Rząd: *Haplontaxida*) w gradiencie skażenia w okolicach dwóch hut cynku w Polsce i w Szwecji. Autorzy badając zmienność genetyczną tego gatunku przy pomocy dziesięciu enzymów, tylko w przypadku zmienności dwóch z nich (esterazy i dysmutazy nadtlenkowej) stwierdzili słabą korelację z indeksem

toksyczności. Pomimo widocznych zmian w zagęszczeniu populacji, nie udało się dowieść silnej zależności pomiędzy skażeniem środowiska (rtęć, kadm, miedź) a zmiennością genetyczną w populacjach dżdżownic.

Z chwilą upowszechnienia łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *PCR – polymerase chain reaction*) w latach 90. XX wieku, pojawiły się metody bazujące na amplifikacji konkretnych fragmentów genomu, takie jak RAPD, ISSR czy polimorfizm rejonów mikrosatelitarnych. Losowo amplifikowany polimorficzny DNA (RAPD, ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*) to metoda, która opiera się na reakcji PCR. Jest to metoda dosyć tania i możliwa do zastosowania przy zupełnym braku danych dotyczących genomu badanego organizmu. W tej reakcji starterami są krótkie (10 par zasad) fragmenty o losowej sekwencji. Długość jądrowego DNA pozwala założyć, że w sekwencji znajdzie się co najmniej kilka, a nawet kilkanaście fragmentów komplementarnych do naszego startera. Rozdzielając produkty tej reakcji na żelu możemy określić zarówno ich liczbę jak i rozmiar. Porównanie takich profili dla kilku osobników tego samego gatunku i stwierdzenie różnic (powstały różne produkty) oznacza, że w badanych fragmentach DNA doszło do zmian spowodowanych np. mutacjami. RAPD ma również kilka poważnych wad. Jest markerem dominującym (nie można odróżnić heterozygoty od homozygot). Ponadto, nie można określić jakie fragmenty zostały namnożone w reakcji (czy był to rejon kodujący, czy niekodujący?). Kolejną wadą tej metody jest to, że bardzo trudno jest uzyskać porównywalne wyniki pracując w różnych laboratoriach i na różnym sprzęcie.

Jednym z przykładów zastosowania RAPD w badaniach ekotoksykologicznych jest badanie wpływu zanieczyszczenia wody morskiej przez hutę ołowiu na zmienność genetyczną u dwóch gatunków organizmów wodnych: *Leander intermedius* (Rząd: *Decapoda* – dziesięcionogi) i *Platynympha longicaudata* (Rząd: *Isopoda* – równonogi). W pracy stwierdzono, że w przypadku *Leander intermedius* różnorodność genetyczna w populacjach z terenów zanieczyszczonych była niższa tylko w porównaniu do jednej z populacji referencyjnych, natomiast zmienność w populacjach *Platynympha longicaudata* okazała się niższa w populacjach z terenów skażonych w porównaniu z wszystkimi populacjami z terenów referencyjnych. Wyniki te sugerować mogą wpływ zanieczyszczenia na zmienność genetyczną w tych populacjach, aczkolwiek aby to potwierdzić, warto byłoby zastosować inne markery molekularne.

Innym dominującym markerem molekularnym jest polimorfizm sekwencji międzymikrosatelitarnej,

ISSR (ang. *Inter-Simple Sequence Repeats*). W metodzie tej stosuje się startery o długości 16–18 pz, o sekwencjach bardzo licznie występujących w genomie, dające od 10 do 60 produktów o długości 200–2000 par zasad. Stosowane startery mogą być niezakotwiczone, albo zakotwiczone na końcu 3' lub 5'. Kotwica „anchor” w postaci 1–3 par zasad komplementarnych do sekwencji mikrosatelitarnej daje gwarancję przyłączenia do specyficznego mikrosatelitarnego fragmentu DNA. Stosowane startery zawierające sekwencje powtórzone ([AG], [GA], [CT], [TC], [AC], [CA]) wykazują wysoki poziom polimorfizmu. Identyfikacja produktów następuje na podstawie ich rozmiaru, dlatego do ich rozdziału stosuje się bardzo czułe metody takie jak np. elektroforeza kapilarowa lub na żelu poliakrylamidowym. Powszechne, w tego rodzaju badaniach, jest stosowanie wielu par starterów, co pozwala na uzyskanie bardziej wiarygodnej informacji. W związku z tym, że marker ten jest dominujący, analiza polega na porównywaniu profilu prążków uwidocznionych na żelach elektroforetycznych poszczególnych osobników. Niewątpliwą zaletą metody ISSR jest uniwersalny charakter starterów, dzięki czemu mogą być one używane w przypadku gatunków roślin i zwierząt, dla których nie opisano jeszcze starterów dla fragmentów mikrosatelitarnych. Metoda ta służy do analiz filogenetycznych, a także tych dotyczących poziomu zmienności genetycznej. Przykładem zastosowania tej metody w ekotoksykologii są badania nad gatunkiem *Talitrus saltator* (zmieraczek plażowy, Rząd: *Amphipoda* – obunogi) w miejscu skażenia metalami (rtęć, kadm, miedź). Autorzy badań stwierdzili najniższą zmienność genetyczną w populacjach gdzie stężenie rtęci było najwyższe. Nie stwierdzono takich zależności między zmiennością a stężeniem pozostałych metali, kadmu i miedzi. Użycie w tym wypadku markerów ISSR podyktowane było brakiem informacji na temat genomu badanego gatunku.

Kolejną, ale już specyficzną grupą markerów są „mikrosatelity” – tandemowe powtórzenia prostych sekwencji (2–4 par zasad) w genomie, nie kodujące żadnej z cech, posiadające wysoki stopień polimorfizmu oraz dziedziczące się zgodnie z prawami Mendla. Polimorfizm tych fragmentów jest tak wielki, że poziom heterozygotyczności w *loci* mikrosatelitarnych wynosi przeciętnie 80%, natomiast częstość mutacji w takich *loci* szacuje się na około 0,001 w *locus* na pokolenie. Cechy te czynią owe fragmenty bardzo dobrymi markerami molekularnymi. Charakterystyczne dla tych markerów jest to, że są specyficzne dla gatunku, a u każdego osobnika liczba takich powtórzeń w określonym *locus* może być różna. Każdy osobnik

diploidalny posiada po 2 kopie takich fragmentów, a w każdej z nich liczba powtórzeń może być odmienna, co dodatkowo zwiększa polimorfizm. Ogromne możliwości markerów mikrosatelitarnych zachęcają do coraz częstszych badań nad ich strukturą i opracowaniami dla nowych gatunków. Zrozumienie procesów powstawania nowych alleli w *loci* mikrosatelitarnych jest konieczne do ulepszania narzędzi statystycznych i właściwego wnioskowania.

Zalety markerów mikrosatelitarnych zachęcają do ich stosowania, niemniej jednak metoda ta ma pewne ograniczenia. Aby praca z mikrosatelitami była w ogóle możliwa, do stworzenia par starterów dla tych fragmentów konieczna jest znajomość sekwencji konkretnych *loci*. Niestety jest to niewralgiczny punkt tej metody, zwłaszcza z punktu widzenia ekotoksykologa, który poszukuje raczej gotowego „narzędzia” pracy. Jeżeli nawet znane są takie sekwencje, należy liczyć się z tym, że dopracowanie starterów i sprawdzenie czy produkty reakcji są polimorficzne może zabrać dużo czasu i pochłonąć sporo środków finansowych.

Startery mikrosatelitarne znakuje się fluorescencyjnie, a produkty reakcji identyfikuje przy pomocy elektroforezy kapilarowej na podstawie długości, czyli tak naprawdę liczby powtórzeń krótkich fragmentów. Analiza danych uzyskanych dzięki tej metodzie pozwala ocenić ile alleli występuje w konkretnym *locus*, ile spośród nich jest allelami występującymi tylko i wyłącznie w konkretnej populacji (tzw. allele prywatne), jaka jest heterozygotyczność. Uzyskane parametry pozwalają ocenić poziom zmienności w badanych populacjach, a także wyciągać nieco dalej idące wnioski (np. historia populacji – efekt „szyjki od butelki”). Zastosowanie markerów mikrosatelitarnych w ekologii populacyjnej zwiększyło możliwości badania struktury genetycznej populacji, pokrewieństw, zmienności genetycznej i filogenezy populacji. Oprócz stosowania markerów mikrosatelitarnych do badania różnorodności w populacjach gatunków zagrożonych jak np. ryś, markery te stosuje się z powodzeniem dla określenia zmienności w populacjach narażonych na zanieczyszczenia. Dobrym przykładem mogą być badania zmienności genetycznej w populacjach myszy zaroślowej bytujących w pobliżu huty metali nieżelaznych, gdzie użyto 10 *loci* mikrosatelitarnych. Skażenie potwierdzone było wysokim poziomem metali w glebie, malejącym ze wzrastającym dystansem od huty. Badania pokazały ogólnie wysoki poziom zmienności wewnątrzpopulacyjnej we wszystkich populacjach, pokazały też zróżnicowanie genetyczne pomiędzy populacjami z terenów bardziej i mniej skażonych. Nie wykryto

jednak bezpośredniego wpływu skażenia na poziom zmienności genetycznej. Metoda markerów mikrosatelitarnych została również użyta do określenia zmienności genetycznej w populacjach nornicy rudej z obszarów położonych w okolicach hut cynku i ołowiu na Śląsku (dane niepublikowane). Wyniki pokazały, iż poziom zmienności populacji skażonych niższy był w porównaniu z populacjami czystymi tylko w wypadku jednej populacji. Prawdopodobnie czynnikiem odpowiedzialnym była, obok zanieczyszczenia, izolacja (obszar ten otoczony jest terenami przemysłowymi i szerokimi jezdniami).

Sekwencjonowanie nowej generacji – perspektywy zastosowania w ekotoksykologii

Wydawać by się mogło, że w dziedzinie technik molekularnych nauka osiągnęła już prawie wszystko, jednakże naukowcy w dalszym ciągu poszukują lepszych, szybszych i tańszych rozwiązań. Sekwencjonowanie metodą Sangera przez wiele lat było metodą powszechnie stosowaną w wielu laboratoriach na świecie. Jednak wydajność tej metody (koszty i pracochłonność) w pewnym momencie przestała być dla badaczy wystarczająca. To stało się motorem nowych poszukiwań, dzięki którym rozwinęły się nowoczesne techniki sekwencjonowania nazywane „sekwencjonowaniem nowej generacji” (ang. *new generation sequencing*). Metody te (454, Ion Torrent, SOLID, Illumina, PacBio) pozwalają na sekwencjonowanie tysięcy sekwencji jednocześnie, dzięki czemu uzyskuje się ogromną ilość danych w krótkim czasie i kosztem niższym, niż w przypadku metody Sanger. Dzięki temu rozwijają się badania na gatunkach, których genom nie był dotychczas zsekwencjonowany, a więc również badania z zakresu ekotoksykologii. Zastosowanie sekwencjonowania wielkoskalowego stwarza ogromne możliwości na przykład w badaniach lokalnych adaptacji organizmów do skażonego środowiska. Dobrym przykładem mogą być badania nad rośliną *Arabidopsis lyrata* (Rząd: *Brassicales* – kapustowce) na glebach bogatych w metale w Stanach Zjednoczonych. Autorzy dzięki sekwencjonowaniu nowej generacji (Illumina) uzyskali sekwencje wielu osobników z gleb czystych i bogatych w metale. Na podstawie uzyskanych wyników, wytypowali miejsca polimorficzne, które mogłyby odpowiadać za przystosowanie tych roślin do gleb o wyższej zawartości

metali. Na liście znalazły się między innymi geny odpowiadające za detoksyfikację i transport metali, co może sugerować lokalną adaptację tego gatunku. W badaniach europejskiego podgatunku tej rośliny, zsekwencjonowanie trzech *loci* pozwoliło stwierdzić równoległe zróżnicowanie w jednym z *loci*, natomiast w dwóch pozostałych pokazało inny polimorfizm, co sugerować może ewolucję zbieżną. Nowoczesne metody sekwencjonowania są, również z sukcesem wykorzystywane w przypadku kręgowców, np. u różnych gatunków ryb. Dobrym przykładem jest gatunek *Perca flavescens*, (Rząd: *Perciformes* – okoniokształtne) dla której przeprowadzono analizę transkryptomu z prób wątroby, zsekwencjonowanego dzięki metodzie 454. Naukowcy wykazali, iż wraz z podwyższonym stężeniem metali w tej tkance zmniejszał się poziom transkrypcji wielu genów związanych z syntezą białek, układem odpornościowym i metabolizmem.

Podsumowanie

Badania zmienności genetycznej, jako jednego z typów badań bioróżnorodności, stały się bardzo powszechne. Wybór odpowiedniego narzędzia badań jest bardzo istotny. Zastosowanie markerów mikrosatelitarnych wymaga może nieco większego nakładu pracy i wyższych nakładów finansowych, ale daje z pewnością niewspółmierne korzyści w porównaniu do zastosowania opisywanych wcześniej markerów dominujących, RAPD czy ISSR. Stosowanie markerów mikrosatelitarnych bazujących na poznanej sekwencji DNA danego gatunku nie tylko dostarcza więcej informacji, ale również pozwala na porównanie wyników uzyskanych tą samą metodą przez innych badaczy. Zastosowanie szybkich i prostych metod np. RAPD i ISSR jest natomiast uzasadnione w przypadku, kiedy mamy do czynienia z gatunkami o nieznanym genomie. Jednakże autorzy podczas analizowania wyników i formułowaniu wniosków pamiętać muszą o ograniczeniach związanych z tymi metodami. Konieczność zachowania ostrożności w tej kwestii leży również po stronie czytelnika. Duże nadzieje wiążą badacze z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji. Wydaje się, że, zakres jego użycia zależy głównie od inwencji naukowca, gdyż metoda ta niesie ze sobą ogromne możliwości, a jej popularność będzie wciąż rosnąć, również w badaniach ekotoksykologicznych.