

ГБНОУ «Санкт-Петербургский городской Дворец творчества юных»
ЭБЦ «Крестовский остров»
Лаборатория экологии и биомониторинга «ЭФА»



**Метод внеорганизменной ДНК в биоиндикации беспозвоночных
(Применение метода анализа внеорганизменной ДНК для
биоиндикации беспозвоночных в естественных средах)**

Авторы:
Андросова Евгения
11 класс, ГБОУ лицей 101 Выборгского района

Руководитель:
с.н.с., к.б.н. Адонин Леонид Сергеевич (ФГБУН ИНЦ РАН)

Санкт-Петербург
2019 год

Аннотация

Мониторинг биоразнообразия основывался на физической идентификации видов, например, путем визуальных обследований и подсчета особей в полевых условиях. Такие классические методы часто бывают неэффективны, например, из-за фенотипической пластичности видов, инвазивности традиционных методов для исследуемых видов, сложной морфологической идентификацией и др., что создало спрос на альтернативные подходы. Анализирование сохраняющейся в среде ДНК организмов является крупным технологическим прорывом. Поэтому методы определения биоразнообразия, основывающиеся на секвенировании внеорганизменной ДНК (внДНК; environmental DNA, eDNA) способны справляться со многими проблемами классических методов.

Целью настоящего исследования является сравнение методов классического биомониторинга и метода внДНК. Для достижения цели необходимо решить следующие **задачи**: 1) Оценить работоспособность подобранных вырожденных праймеров к участкам 18S и 28S рибосомальной ДНК организмов; 2) Определить частичные последовательности 18S и 28S рДНК у выбранных видов-биоиндикаторов для сконструирования видоспецифичных праймеров; 3) Сравнить результаты применения выбранных методов анализа и оценить возможность дальнейшего использования метода eDNA для биоиндикации.

Материал и методы. В работе использованы пробы, отобранные в ходе полевой экспедиции сезона 2018 г в руч. Коньячный и р. Переяглище. В этих же местах собраны организмы, для которых определяли частичные последовательности рДНК. Для определения адекватности применения метода внДНК использован список видов этих же участков за 2017 год.

В ходе работы сделаны следующие выводы: 1) Определены частичные последовательности 18S и 28S рДНК следующих видов: *Nemoura sp.*, *Dicranota bimaculata*, *Plectonemia conspersa*, *Sialis sp.*, *Chaetopterox sp.*, к этим участкам сконструированы видоспецифические праймеры; 2) Проведенный ПЦР анализ внДНК природных экосистем с использованием подобранных праймеров доказал возможность их использования для определения присутствия организма; 3) Метод определения видового состава сообщества по внДНК показал применимость и выгоду использования по сравнению с классическими методами, если необходима оценка присутствия/отсутствия организма.

Настоящий проект способствует улучшению качества жизни тем, что благодаря рассмотренному в работе новому методу биоиндикации можно более точно и с меньшими затратами ресурсов оценивать видовой состав среды, который непосредственно влияет на образ и качество жизни людей, проживающих в данной среде.

Введение

Биоиндикация или оценка качества и состояния среды обитания определяется при помощи различных методов. Как правило, используются классические методы, основанные на сборе и обработке собранного материала. Для использования таких методов исследователю необходимо обладать высокой квалификацией и необходимыми навыками для работы с собранным материалом, поскольку классические методы подразумевают под собой разбор проб, описание видового состава, определение доли видов-индикаторов в сообществе, расчет плотности популяций и много другое, на основе чего строятся предположения о дальнейшем развитии сообществ и среды в целом.

В настоящей работе представлен и использован метод анализа ДНК окружающей среды, который используется для оценки видового разнообразия среды. ДНК окружающей среды – многокомпонентная смесь ДНК ядерных, митохондриальных и пластидных геномов различных организмов, выделенная в окружающую среду вместе с отмершими частями тканей, продуктами обмена и жизнедеятельности, половыми продуктами и т. д. Этот материал в зависимости от условий сохраняется в среде от нескольких часов до тысячи лет и позволяет обнаружить организмы на любой стадии их жизненного цикла. Впервые данный метод применился в 2008 году для поиска инвазивного во Франции вида лягушки-быка (*Lithobates catesbeianus*) (Ficetola et al. 2008,) и в дальнейшем использовался как для выявления отдельных видов-вселенцев и редких исчезающих видов, так и для оценки общего видового разнообразия среды. Большая часть исследований с применением метода анализа ДНК окружающей среды направлена на выявление относительно крупных позвоночных и проведено довольно мало работ по идентификации каких-либо беспозвоночных животных. Эта работа является продолжением работы Е. А. Ежовой «Оценка возможности использования внеорганизменной ДНК для мониторинга состояния пресноводных водоемов», где уже был применен метод анализа внеорганизменной ДНК на беспозвоночных животных в лабораторных условиях на примере моллюска *Lymnaea stagnalis*. **Целью** же настоящей работы является применение метода анализа ДНК окружающей среды в естественных экосистемах на примере насекомых рек с последующим сравнением с классическими методами.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

- 1) Подбор видоспецифичных праймеров к геномной и митохондриальной ДНК отобранных насекомых

- 2) Применение подобранных праймеров в ПЦР для выявления наличия объектных организмов в пробах, отобранных из естественных водоемов
- 3) Сравнение метода анализа ДНК окружающей среды с параллельно примененными классическими методами биоиндикации.

Обзор литературы

ДНК появляется в окружающей среде путем отделения каких-либо тканей организмов и вместе с выделениями продуктов обмена. ДНК можно выделить из таких образцов окружающей среды как фекалии, вода, почва, мертвые организмы и т. д. (Herder et al., 2014). После того выделения в окружающую среду ДНК подвергается деградации, скорость которой зависит от условий среды.

Эксперименты с помещенными в аквариумы организмами показали, что ДНК начинает выделяться сразу после внесения объектов в среду. Через 3-5 часов количество выделенной ДНК становится равным количеству деградирующей (Pilliod et al., 2014). Продолжительность сохранения биологической активности ДНК в аквариумах после изъятия из них организмов колеблется от 1-2 недель (Piaggio et al., 2014; Thomsen et al., 2012a) до месяца (Dejean et al., 2011) при условии, что вода аэрировалась и была при постоянной комнатной температуре, резервуары были защищены от прямых солнечных лучей.

В естественных же средах на ДНК воздействуют многие способствующие ее деградации факторы: УФ-излучение, эндогенные нуклеазы, пагубное воздействие микроорганизмов, высокие температуры, механические повреждения за счет движения среды (скорость течения рек) и т.д. (Herder et al., 2014). При наличии этих факторов персистентность ДНК в естественных водоемах составляет от нескольких часов в проточных пресных водоемах (Pilliod et al., 2014) до недели в тоще и месяца в отложениях дна в морских водах (Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., 2004). После изъятия ДНК из среды ее деградация не прекращается, поэтому необходимо обеспечить хранение при низких температурах в спиртосодержащей среде для остановки процесса гидролиза и влияния нуклеаз микроорганизмов (Herder et al., 2014).

Стоит отметить некоторые преимущества метода анализа ДНК окружающей среды перед классическими методами. Этот метод позволяет с высокой вероятностью подтвердить или опровергнуть наличие вида в каком-либо районе с точностью от нескольких часов до пары недель, более удобен при поиске редких и скрытных организмов и предоставляет видовое разнообразие именно местной фауны. Метод анализа ДНК окружающей среды позволяет точнее определять систематические положение организма в отличие от визуальной оценки. Также данный метод можно

применять в различных труднодоступных средах, где применить классические методы не представляется возможным без потери продуктивности (Thomsen et al., 2012b). Время суток отбора проб также не является ограничением для метода анализа ДНК окружающей среды. В отличие от многих других этот метод оказывается менее затратным как с финансовой, так и с трудовой точки зрения (Herder et al., 2014).

Несмотря на большое число положительных сторон этот метод имеет ряд недостатков. С помощью него невозможно определить половозрастной состав популяции и ее плотность, поскольку корреляция между плотностью популяции и концентрацией ДНК в среде выявлена только в искусственных средах, где на ДНК не воздействуют многие факторы, присущие естественным средам. Также из-за того, что большая часть видоспецифичных праймеров подобрана не к ядерным геномам, а геномам митохондрий, и, поскольку митохондриальные гены передаются только по материнской линии, невозможно определить гибридный вид (Herder et al., 2014).

Материалы и методы

Материалом для работы послужили собранные в июне 2018 года во время экспедиции на реку Лемовжа группой Лаборатории экологии и биомониторинга «Эфа» организмы из трех водоемов:

- 1) *Nemoura sp.*, *Dicranota bimaculata*, *Plectronemia conspersa*, *Sialis sp.*, *Chaetopterox sp.* из руч. Коньячный;
- 2) *Nemoura sp.*, *Dicranota bimaculata*, *Chaetopterox sp.* из р. Переяглище;
- 3) *Chaetopterox sp.*, *Nemoura flexuosa*, *Agabus sp.*, *Dicranota bimaculata*, *Plectronemia conspersa* из р. Лемовжа.

Сбор проводился с помощью сачка, также объекты собирались вручную с поверхностей камней, коряг и других предметов в водоемах.

Отбор проб воды производился из руч. Коньячный и р. Переяглище с помощью фильтров и одноразовых шприцов по 10 мл с каждой точки. Пробы воды из р. Коньячного были собраны из располагающихся на расстоянии 6-7 метров друг от друга 5 точек по две повторности, из р. Переяглище – из располагающихся на расстоянии 6-7 метров друг от друга 4 точек без повторностей. В обоих водоемах пробы собирались вверх по течению. Далее объекты и фильтры были зафиксированы этиловым спиртом и хранились в холодильнике. В стационарных условиях Лаборатории экологии и биомониторинга «Эфа» было установлено максимально возможное систематическое положение организмов.

Далее на базе лаборатории группы Некодирующей ДНК ИНЦ РАН проводилась последующая работа над проектом.

Выделение ДНК из проб воды: Собранные в ходе экспедиции пробы воды были пронумерованы следующим образом: №1-10 соответствуют фильтрам №1.1-5.2 из руч. Коньячного (т. е. фильтр 1.1. и 1.2. — это пробирки 1 и 2 и т.д.); №11-14 соответствуют фильтрам №1-4 из р. Переяглище. Мембраны из фильтров были помещены в стерильные пробирки, затем залиты по 300 мкл лизирующим буфером (NaCl (5 M), Tris*HCl (1 M), EDTA (0,5 M), SDS (15%), Triton x-100 (10%)) и отправлены в термостат при температуре 37° С. Через час пробы были вынуты и к раствору была добавлена протеиназа К по 200 мкл (концентрация = 20 мг\мл), после чего пробы были помещены обратно в термостат примерно на 20 часов. Далее к получившемуся раствору был добавлен фенол (500 мкл) и после полуторачасового пребывания в холодильнике хлороформизомил по 400 мкл. Пробы были откручены 5 мин для разделения раствора на фазы ДНК, белок и РНК. Фаза ДНК была собрана в новые пробирки по 300-400 мкл и разбавлена 400 мкл изопропила. После часа пребывания при температуре -20° С жидкая фаза была заменена

на очищенный 96% этанол на 5 мин. Далее, после центрифугирования, спирт был убран, пробы подверглись 30 минутной сушке в эксикаторе под вакуумом, затем осадок был разведен SQ.

Выделение ДНК из объектных организмов: Материалом для выделения ДНК послужили пробы с фиксированными в этиловом спирте организмами, которым была присвоена следующая нумерация: 1-*Nemoura sp.*, 2-*Dicranota bimaculata*, 3-*Plectronemia conspersa*, 4-*Sialis sp.*, 5-*Chaetopterix sp.*, 11-*Nemoura sp.*, 12-*Dicranota bimaculata*, 13-*Chaetopterix sp.*, 21-*Chaetopterix sp.*, 22-*Nemoura flexuosa*, 23-*Nemoura flexuosa*, 24-*Agabus sp.*, 25-*Dicranota bimaculata*, 26-*Plectronemia conspersa*; №1-5 - руч. Коньячный, №11-13 - р. Переяглище, № 21-26 – р. Лемовжа. Животные были помещены в стерильные пробирки и залиты PBS x 1 по 1 мл в каждую пробирку; через каждые 10 мин 3 раза старый раствор PBS x 1 убирался и заливался новый. Затем PBS x 1 был заменен на стерильный лизирующий буфер. Последующие процессы выделения ДНК сходны с описанными ранее.

Праймеры, ПЦР и электрофорез: В ходе работы были подобраны 9 праймеров (табл. 1), которые были использованы попарно: 3 и 4, 6 и 9, 1 и 2, 7 и 8, 2 и 7, 4 и 7, 2 и 6, 2 и 5.

Таблица 1. Используемые праймеры.

№	Название	Последовательность 5'-3'
1	LS-28S-R2	CGGCTCACCTCGACCG
2	LS-28S-F2	CGCGTGCACCTTCCGC
3	LSUD1F	ACCCGCTGAATTTAAGCATA
4	LSU4Ra	AACCAGCTACTAGRYGGTTCGAT
5	Aa-L28S-12	TCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG
6	Aa-L28S-21	GAACRGCTCAAGCTTRAAATCT
7	Aa-L18S-88	GCGAATGGCTCATTAATCAGTT
8	Aa-L18S-1159	CGGAAGGGCACCACCAGGAG
9	Aa-H28S-1078	GAAACTTCGGAGGGAACCAGCTAC

Все ПЦР содержали в себе следующие компоненты: TaqRedBuf 1%, dNTP's 1%, рабочий раствор из двух праймеров (по 2 мкл каждого на реакцию), Taq 1мкл/100мкл реакции, 1 мкл матрицы и SQ для доводки до необходимого объема в 25 мкл.

Реакция содержала в себе первичную денатурацию при температуре 105° С и последующие 40 циклов, в каждом из которых происходили денатурация ДНК при температуре 94-95° С (1 минута 20 секунд), отжиг праймеров при температуре 57,5-57° С (20 секунд) и элонгация при температуре 72° С (1 минуты 20 секунд). Далее с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с бромистым этидием в буфере из TAE x 1 проводилась визуализация продуктов ПЦР.

Результаты и обсуждения

Проверка подбора праймеров осуществлялась с помощью ПЦР, где матрицей служила тотальная ДНК, выделенная из тканей объектных организмов. В качестве отрицательного контроля была ПЦР, где матрица ДНК была заменена SQ. Исходя из продуктов реакции, были оставлены пары праймеров 6 и 9, 1 и 2, 7 и 8, 2 и 7,4 и 7?(15.11.18), 2 и 6, 2 и 5.

В таблице 2 представлены видовые названия животных и видоспецифичные к ним праймеры.

Номер пробы	Видовое название	Праймеры
1	<i>Nemoura sp.</i>	Aa-L28S-21 и H28S-1078 (рис.1) LS-28S-R2 и LS-28S-F2.(рис. 2)
2	<i>Dicranota bimaculata</i>	Aa-L28S-21 и H28S-1078 (рис.1)?
3	<i>Plectronemia conspersa</i>	Aa-L28S-21 и H28S-1078 (рис.1)
4	<i>Sialis sp.</i>	
5	<i>Chaetopteryx sp.</i>	
11	<i>Nemoura sp.</i>	LS-28S-R2 и LS-28S-F2.(рис 2)
12	<i>Dicranota bimaculata</i>	
13	<i>Chaetopteryx sp.</i>	

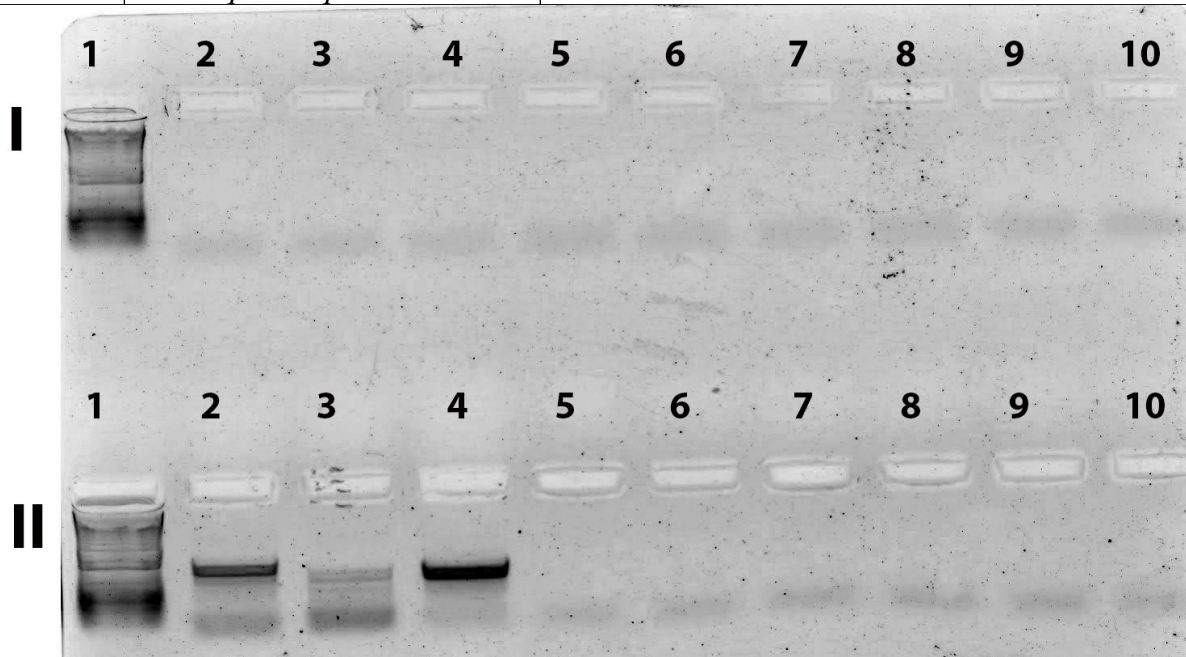


Рис. 1. Пробы 1,2,3,4,5,11,12,13 (дорожки 2-9 соответственно) ,1- маркер, 10-контроль. **I** - праймеры LSUD1F и LSU4Ra, **II** - праймеры Aa-L28S-21 и H28S-1078.

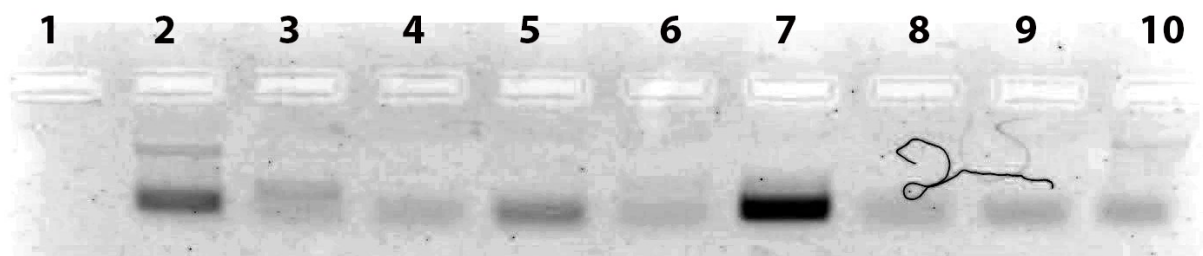


Рис. 2. Пробы 1,2,3,4,5,11,12,13 (дорожки 2-9 соответственно) 1- маркер, 10-контроль. 1- маркер, 10-контроль. Праймеры - LS-28S-R2 и LS-28S-F2.

Выводы

В ходе работы сделаны следующие выводы:

- 1) Определены частичные последовательности 18S и 28S рДНК следующих видов: *Nemoura sp.*, *Dicranota bimaculata*, *Plectronemia conspersa*, *Sialis sp.*, *Chaetopterox sp.*, к этим участкам сконструированы видоспецифические праймеры;
- 2) Проведенный ПЦР анализ вДНК природных экосистем с использованием подобранных праймеров доказал возможность их использования для определения присутствия организма;
- 3) Метод определения видового состава сообщества по вДНК показал применимость и выгоду использования по сравнению с классическими методами, если необходима оценка присутствия/отсутствия организма.

Список литературы

- 1) Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., Miaud, C., 2011. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. PLoS ONE 6, e23398.
- 2) Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., 2004. Degradation and Turnover of Extracellular DNA in Marine Sediments: Ecological and Methodological Considerations. Appl. Environ. Microbiol. 70, 4384–4386.
- 3) Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. Biol. Lett. 4, 423.
- 4) Herder, J.E., Valentini, E., Bellemain, T., Dejean, J.J.C.W., van Delft, P.F., Thomsen and P. Taberlet, 2014. Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. Stichting RAVON, Nijmegen. Report 2013-104
- 5) Piaggio, A.J., Engeman, R.M., Hopken, M.W., Humphrey, J.S., Keacher, K.L., Bruce, W.E., Avery, M.L., 2014. Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. Mol. Ecol. Resour. 14, 374–380.
- 6) Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P., 2014. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. Mol. Ecol. Resour. 14, 109–116.
- 7) Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M., Willerslev, E., 2012b. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. PLoS One 7, e41732
- 8) Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012a. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Mol. Ecol.
- 9) Ежова Е. А. 2017. Оценка возможности использования внеорганизменной ДНК для мониторинга состояния пресноводных водоемов. Исслед. раб. уч-ся эколого-биологического центра «Крестовский остров» ГБОУ ЦО «Санкт-Петербургский городской Дворец творчества юных», с 1-12.