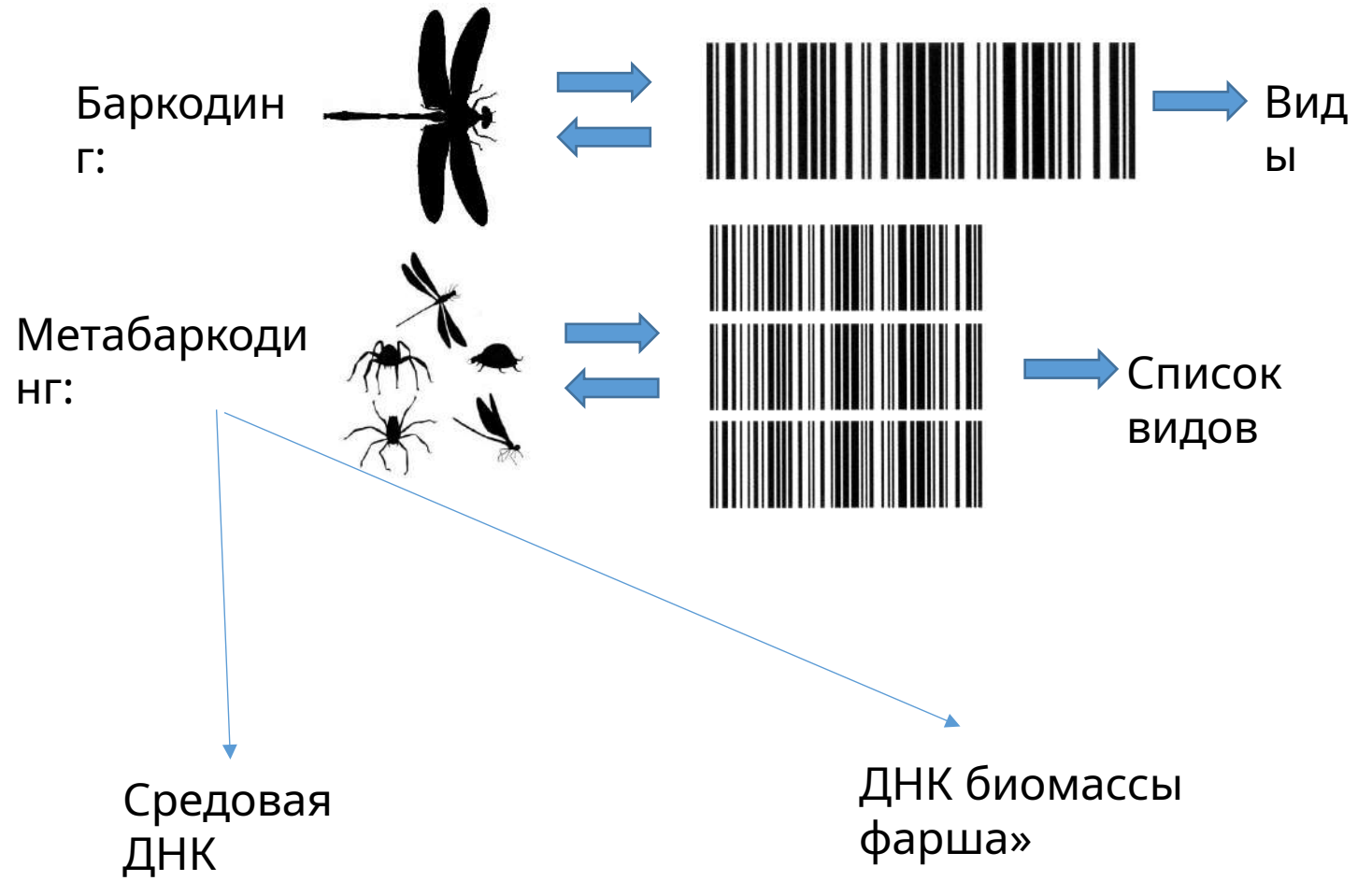


Больше почвы для больших организмов – модификация метода метабаркодирования средовой ДНК для оценки разнообразия почвенного населения

Сотников И.В., Мартыненко Н.А., Гусев Е.С.

Понятие метабаркодинга

Enumerating soil



Средовая ДНК в почве

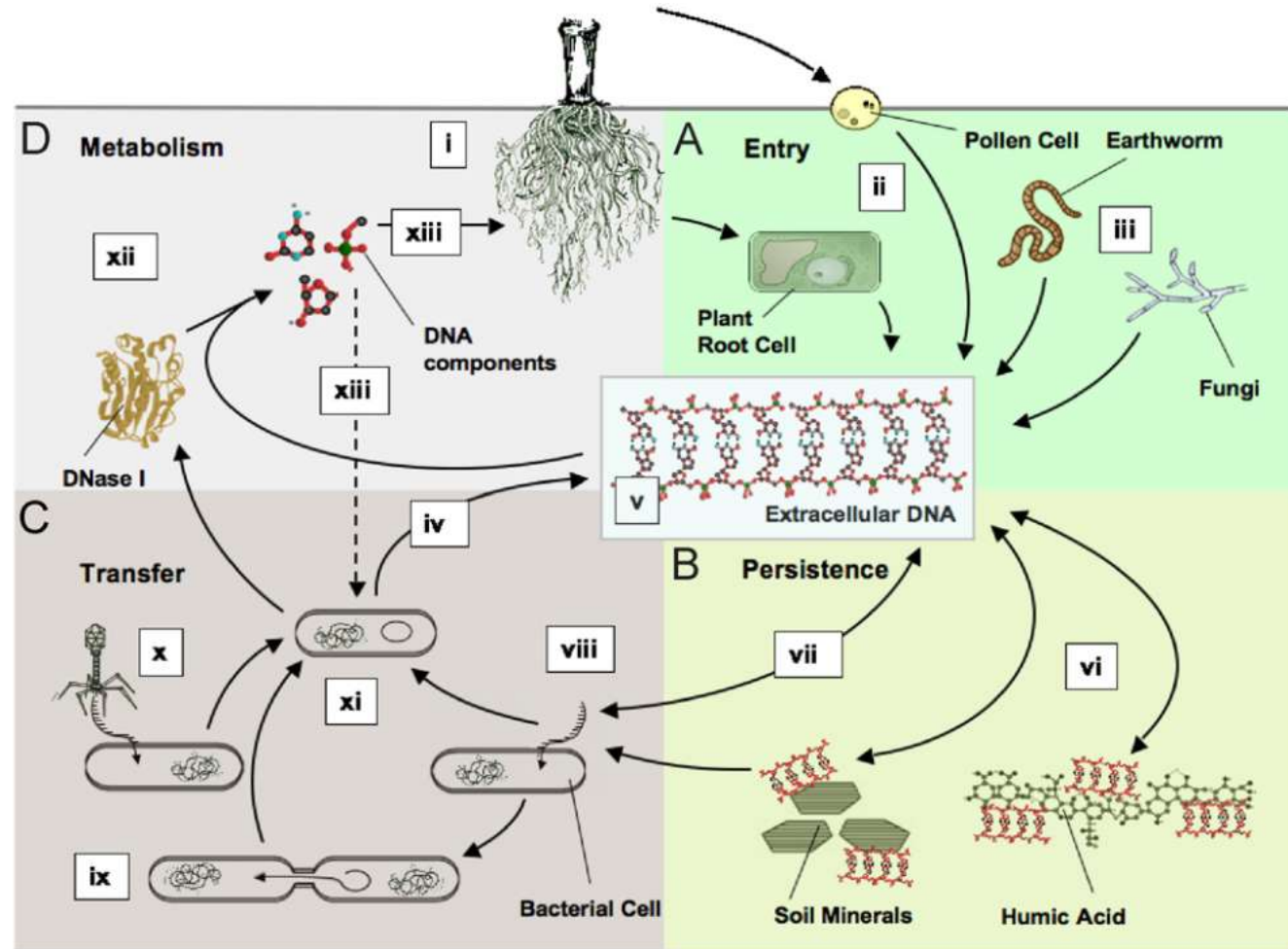
Средовая
ДНК

Внутриклеточн
ая

Внеклеточн
ая

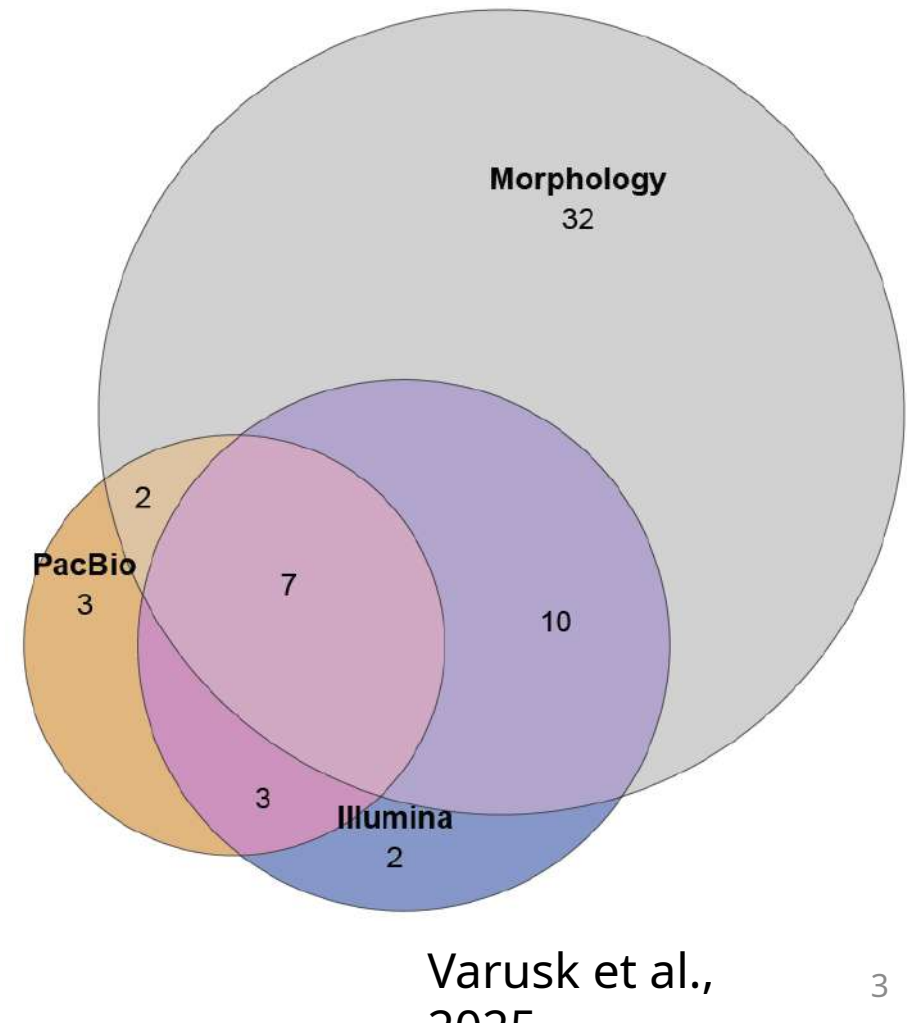
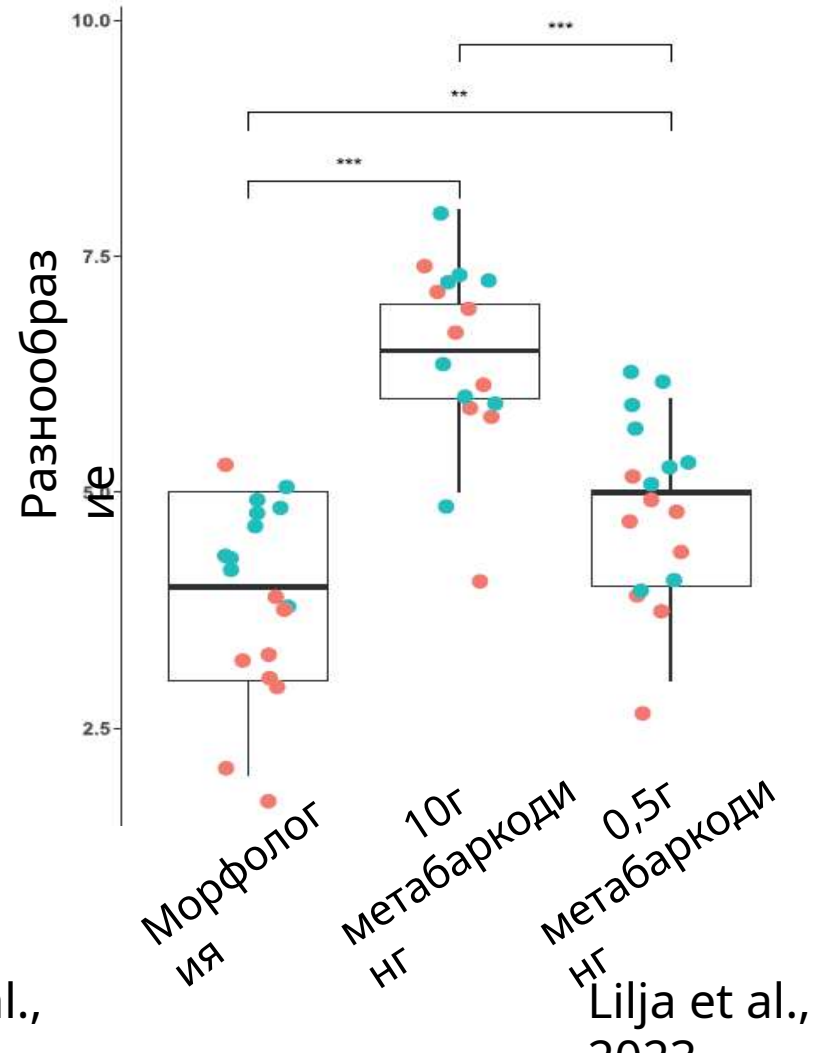
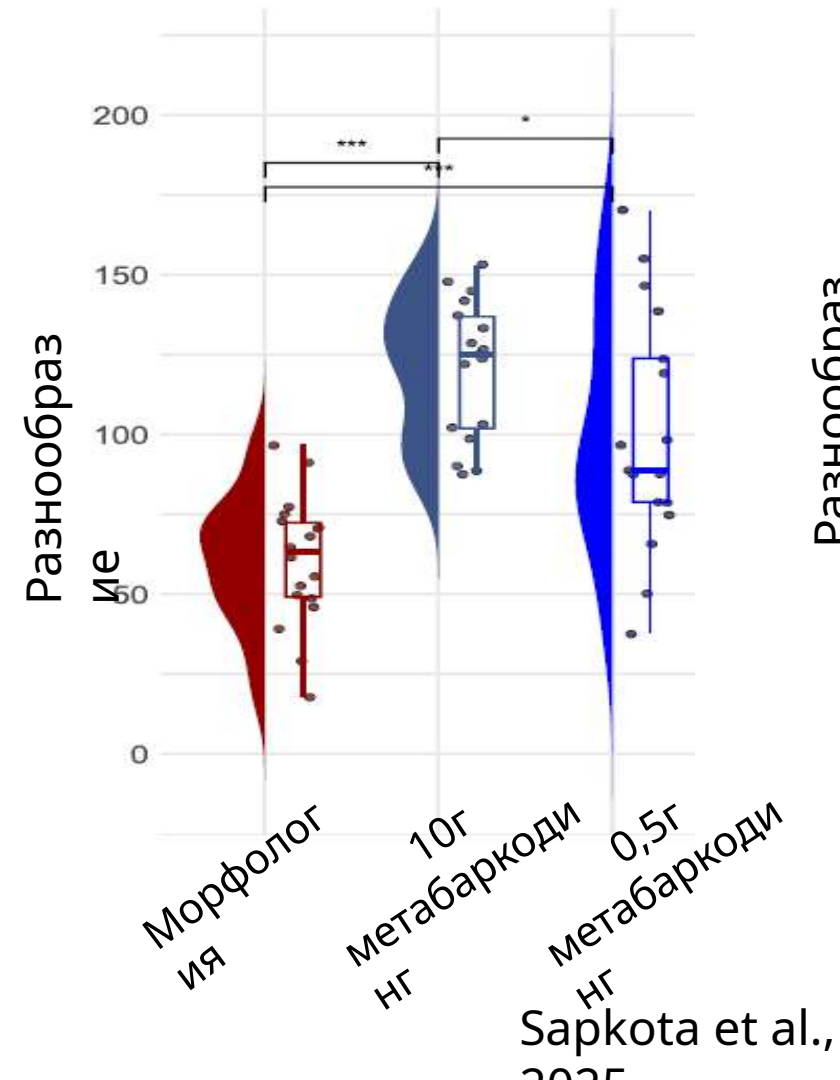
Сорбированная
на твёрдых
частицах

Растворённ
ая

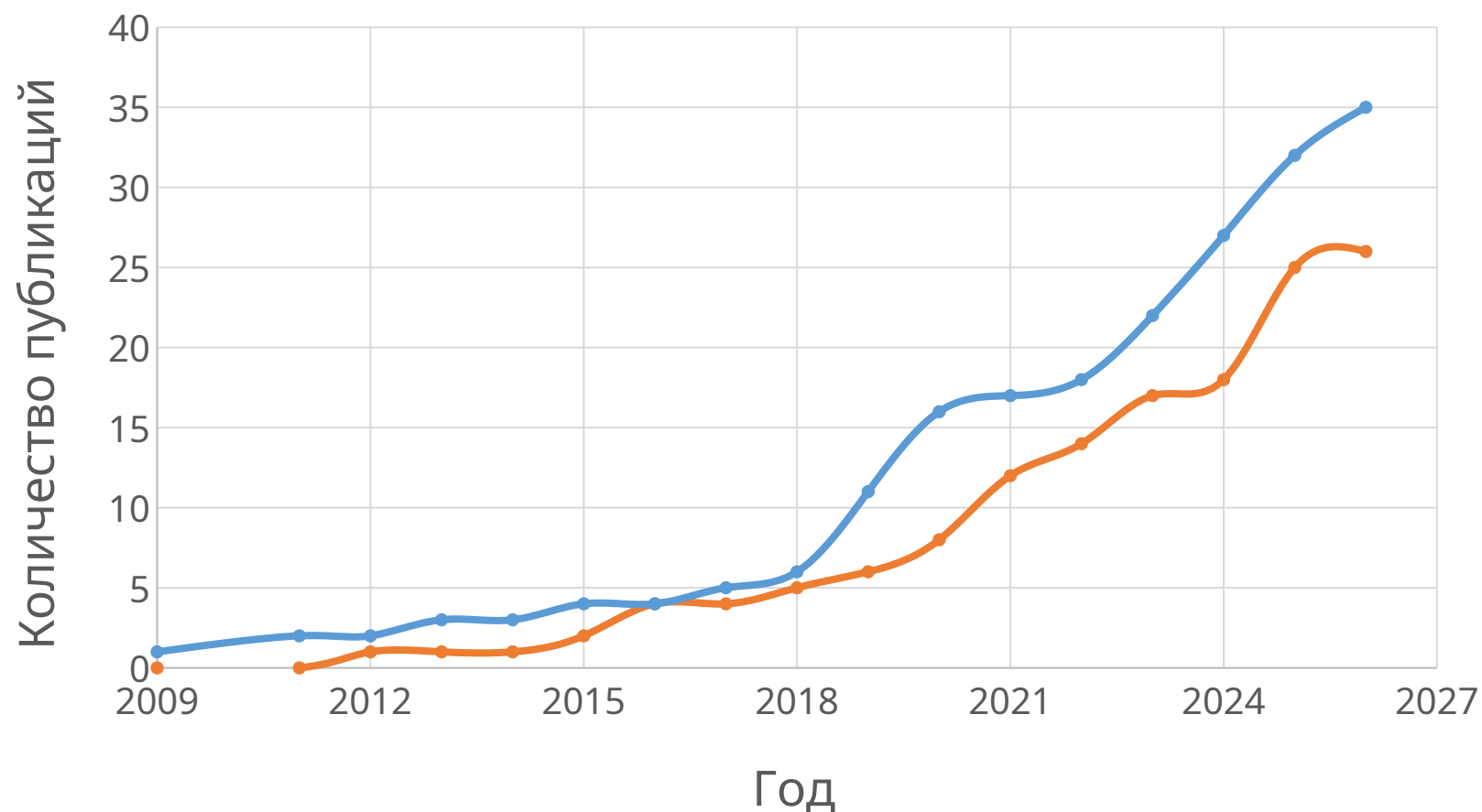


Levy-Booth et al.,
2007

Почва как источник средовой ДНК почвенных беспозвоночных



Методы выделения окружающей ДНК



Всего 61 работа
57% - стандартные
навески
43% - большие навески

● Стандартные навески (<1г) ● Большие навески (>10г)

Методы выделения средовой ДНК

1) «Стандартные навески
(0,2 – 1 г)

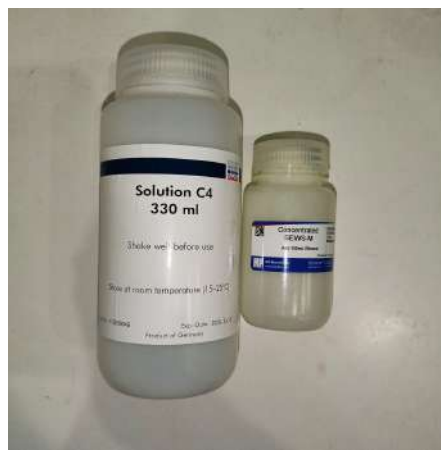


2) Набор PowerMax
(Лимит – 10 г почвы)



Наборы содержат:

- 1) Растворы для десорбции ДНК с почвенных частиц (Na_2HPO_4), $\text{pH} = 8$
- 2) Реагенты для лизиса клеток
- 3) Реагенты для очистки от гуминовых кислот и остатков клеток



Методы выделения средовой ДНК

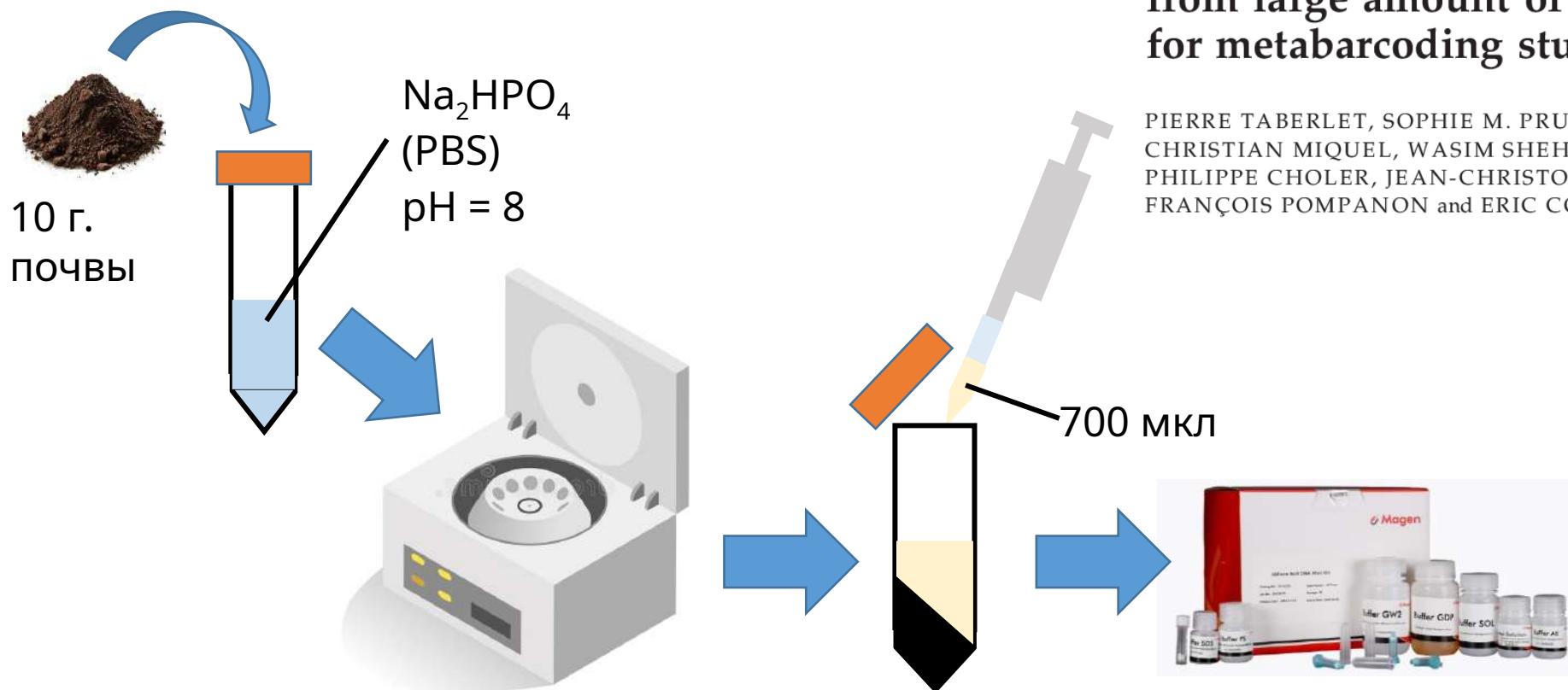
MOLECULAR ECOLOGY

Molecular Ecology (2012) 21, 1816–1820

doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05317.x

3) Десорбция внеклеточной ДНК | Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies

PIERRE TABERLET, SOPHIE M. PRUD'HOMME, ETIENNE CAMPIONE, JULIEN ROY, CHRISTIAN MIQUEL, WASIM SHEHZAD, LUDOVIC GIELLY, DELPHINE RIOUX, PHILIPPE CHOLER, JEAN-CHRISTOPHE CLÉMENT, CHRISTELLE MELODELIMA, FRANÇOIS POMPANON and ERIC COISSAC



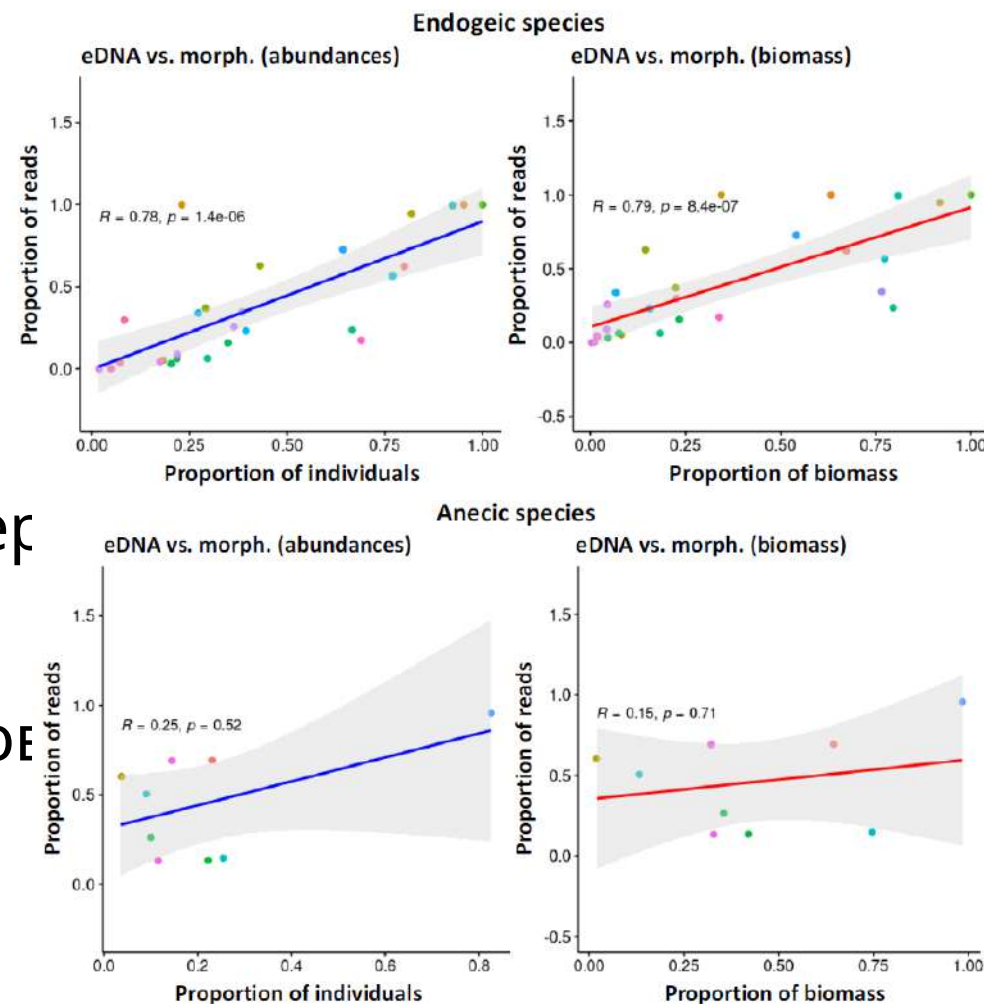
Оценка обилия беспозвоночных по данным метабаркодинга средовой ДНК почвы

В качестве показателей обилия традиционно используют относительное количество ридов (количество обнаруженных молекул ДНК) каждого таксона в образце.

Много потенциальных ошибок:

- Разная «активность продукции» ДНК животным
- Разное количество клеток (=копий гена) и размер организмов
- Ошибки ПЦР и секвенирования

Альтернативой относительному количеству ридов может быть использован показатель встречаемости таксонов в серии проб средовой ДНК

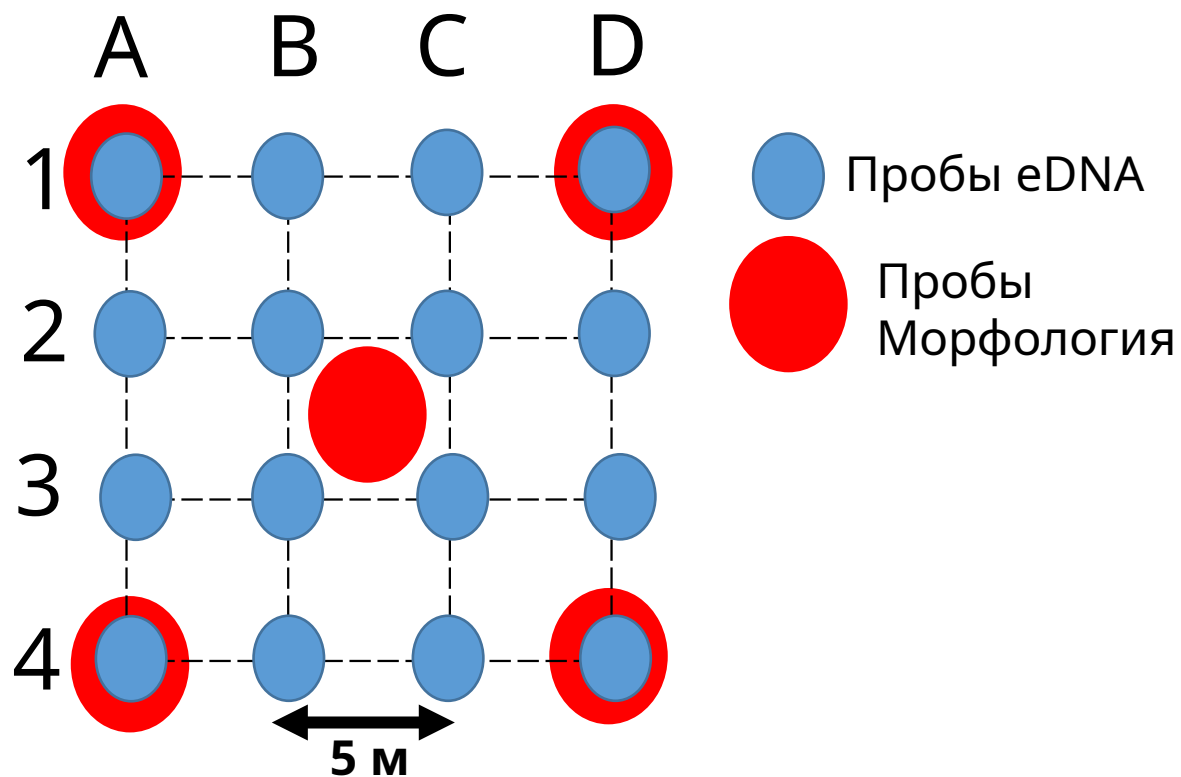


Цель

Модифицировать существующие методики выделения ДНК из почвы для получения репрезентативных данных о разнообразии почвенных беспозвоночных и количественных данных об их обилии.

Отбор проб

Отбор проб проводили в смешанном лесу окрестностей
биогеоценологической станции ИПЭЭ
РАН «Малинки», Москва



На том же участке отбирались
пробы для характеристики
макрофауны (ручной разбор
проб 25*25*10 см) и мезофауны
(Воронки Тульгерна)



Выделение ДНК

1 Коммерческий набор для выделения ДНК из 0.5-1 грамм почвы **HiPure Soil DNA Kit**



2 Коммерческий набор для выделения ДНК из 10 грамм почвы **Power Max DNA**



3. Предлагаемая методика:



10г. Почвы
+
20 мл
буфера



Фильтрация на
нитрат-целлюлозные
фильтры



Использование
фильтров в качестве
стартового
материала для
выделения ДНК



Состав буфера

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (PBS)
1M

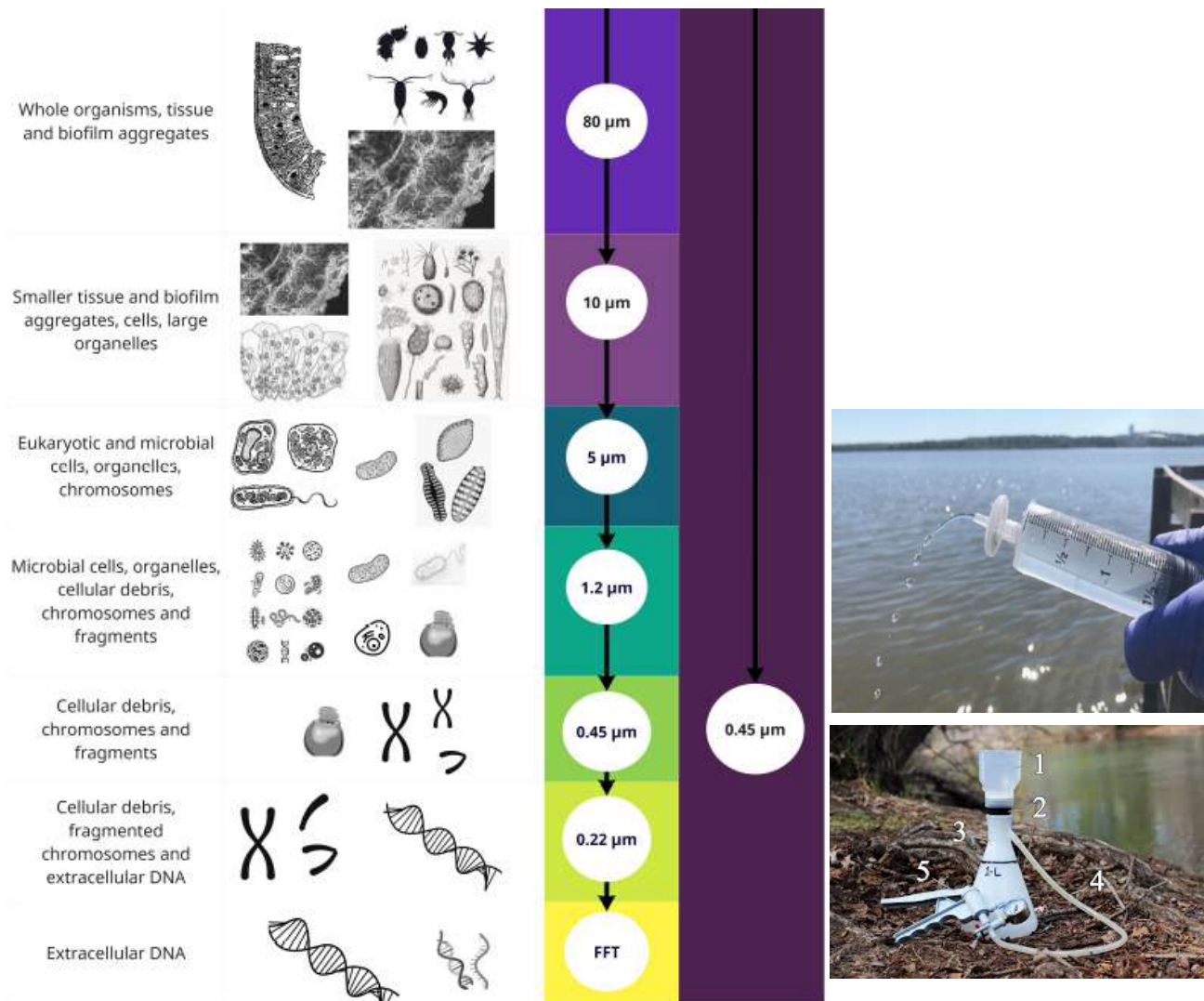
NaCl 0.1M

Na-EDTA – 0.1M pH = 8

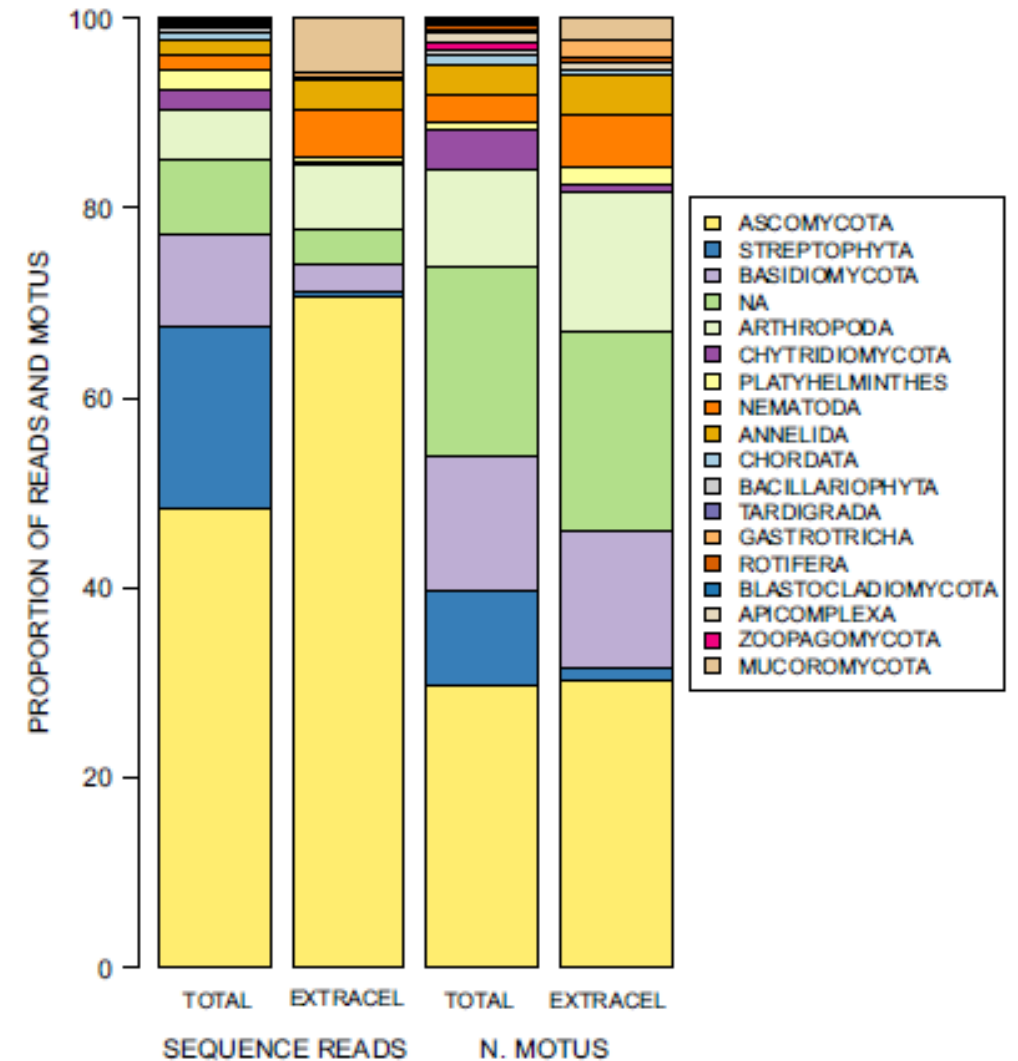
Tris-HCl – 0.1M

SDS – 0.5%

Методика фильтрации

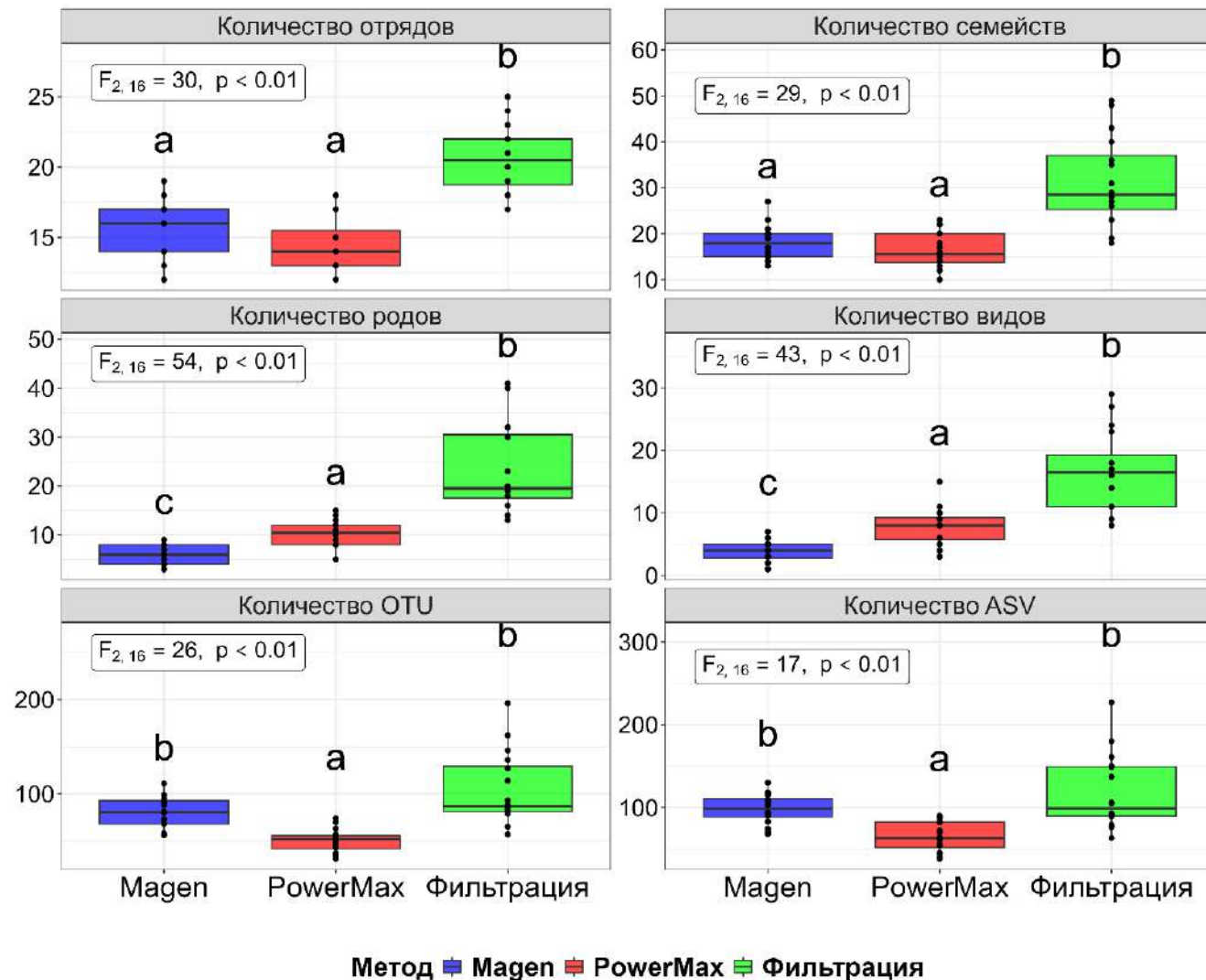


Power et al., 2009

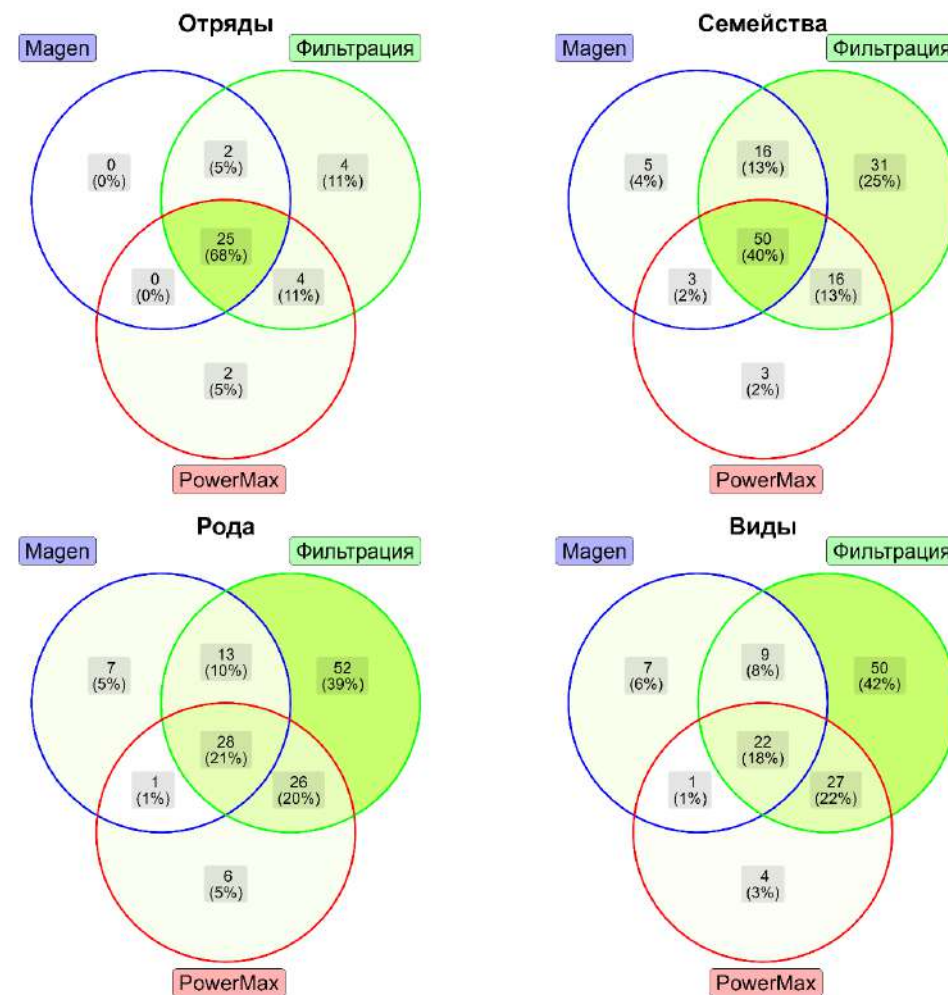
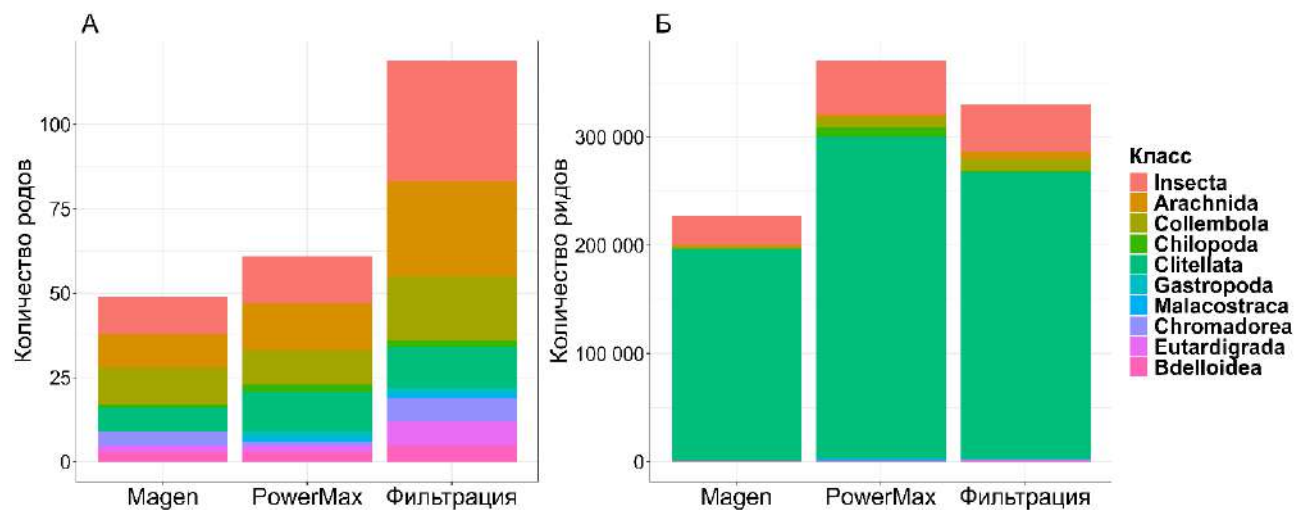


Lopes et al., 2009

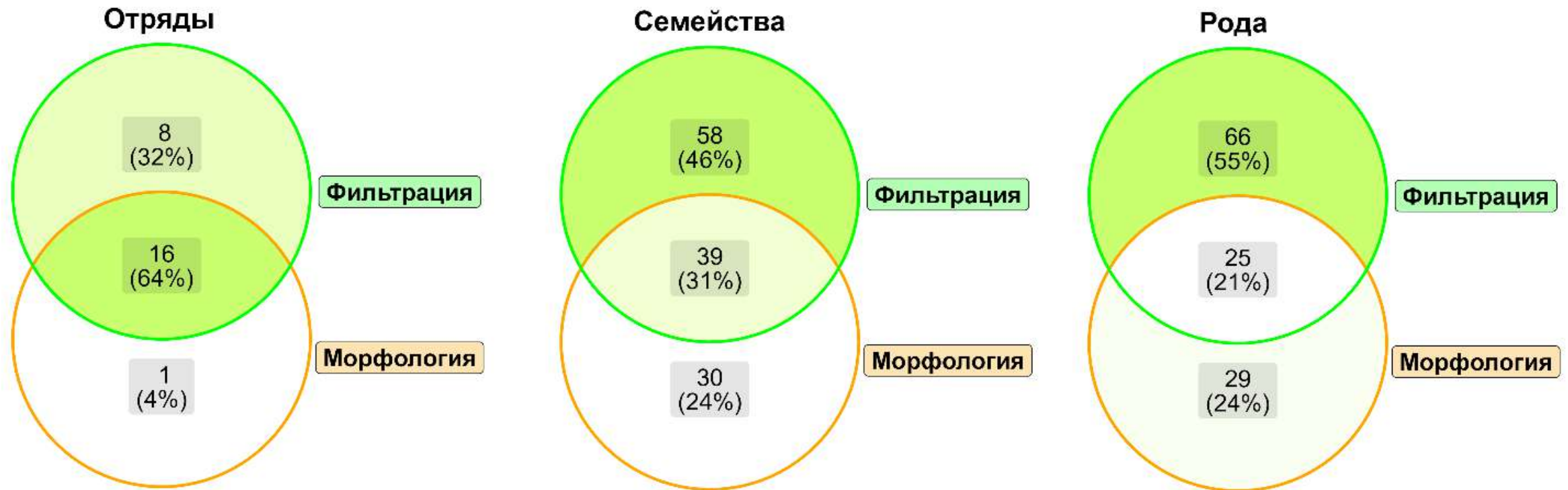
Сравнение методов экстракции ДНК



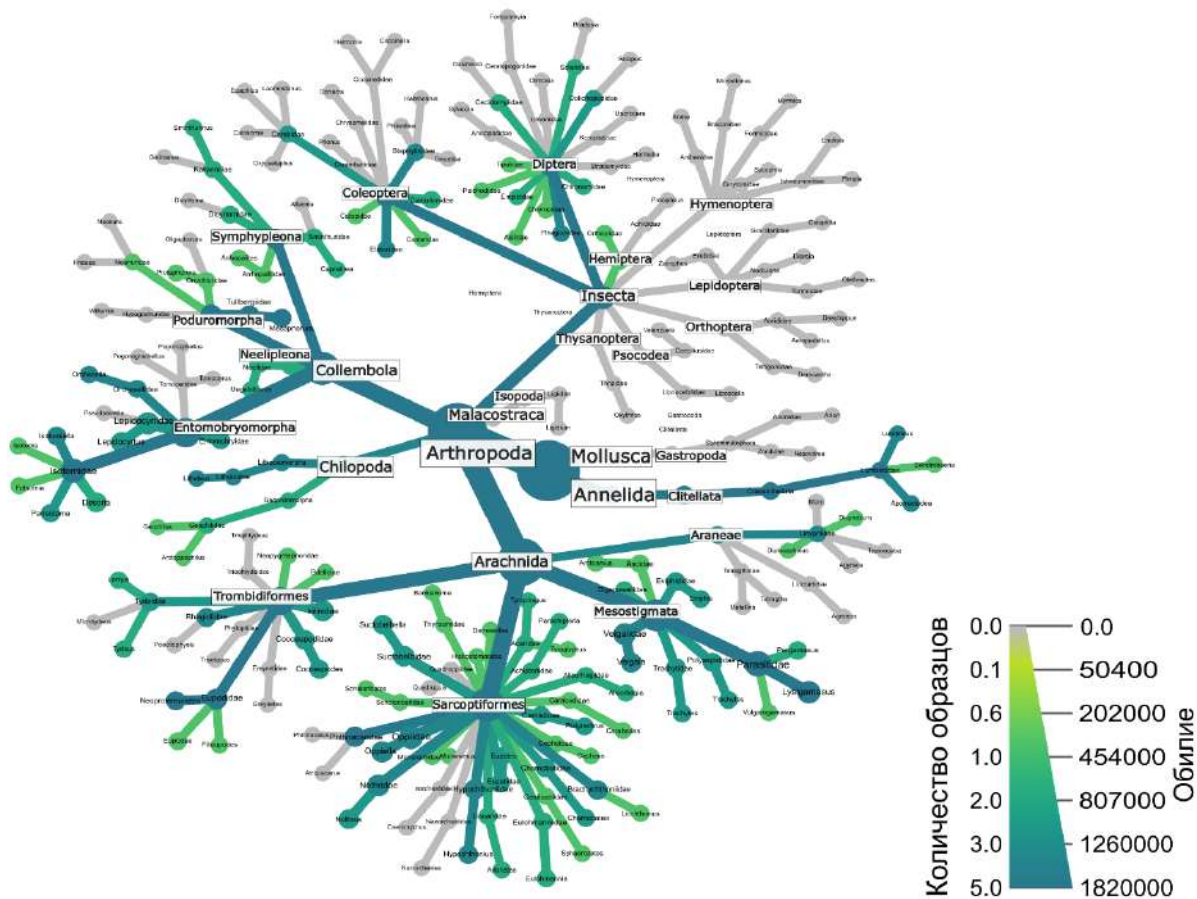
Сравнение методов экстракции ДНК



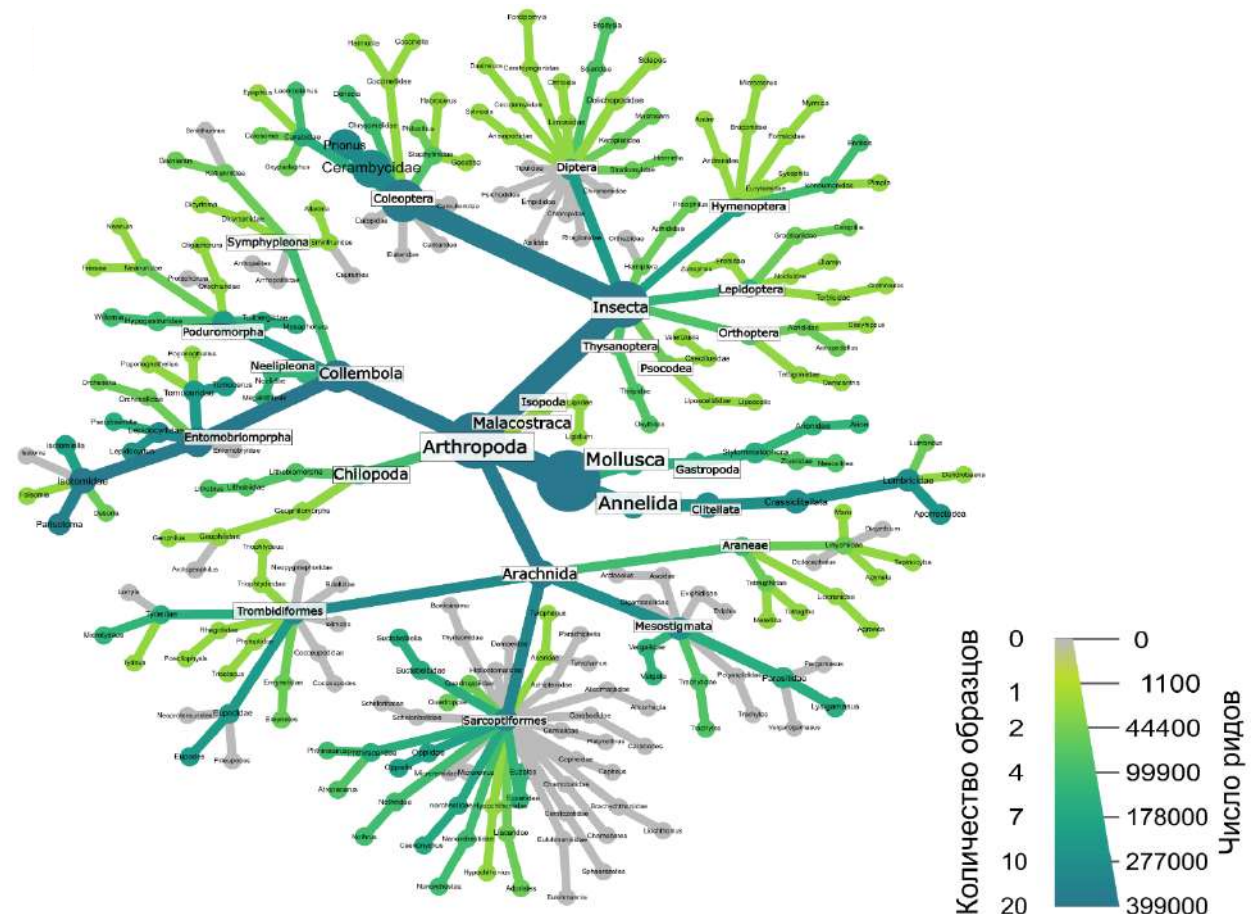
Сравнение разработанной методики с традиционными методами



Сравнение разработанной методики с традиционными методами

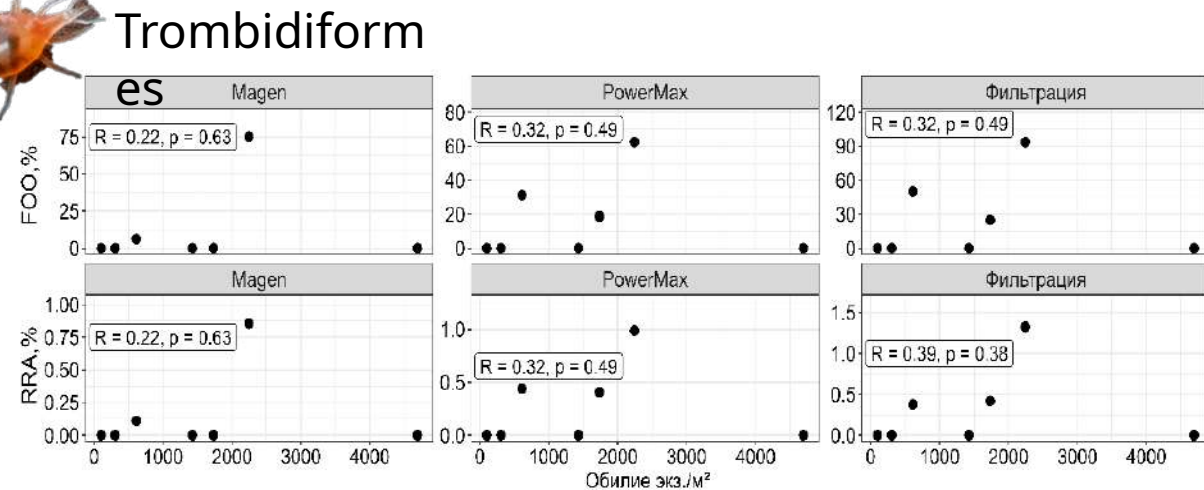
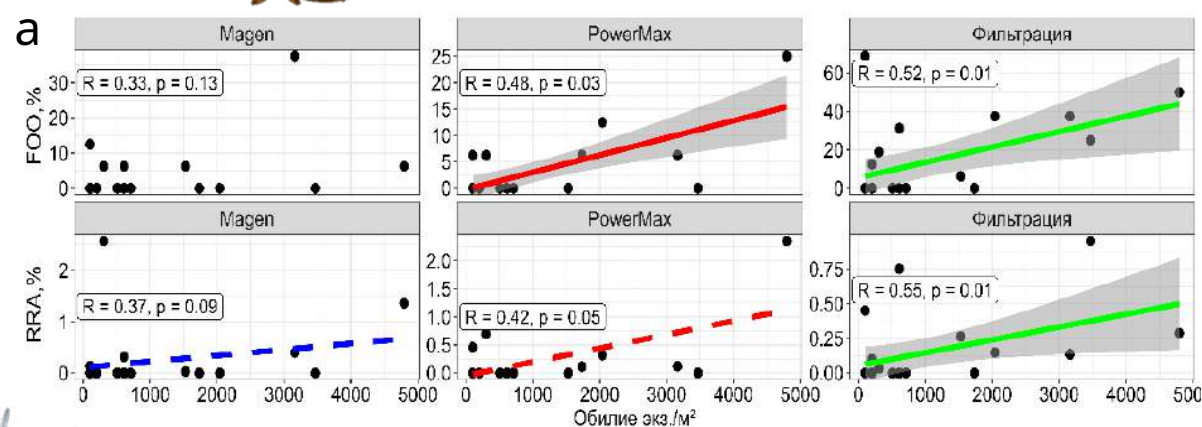
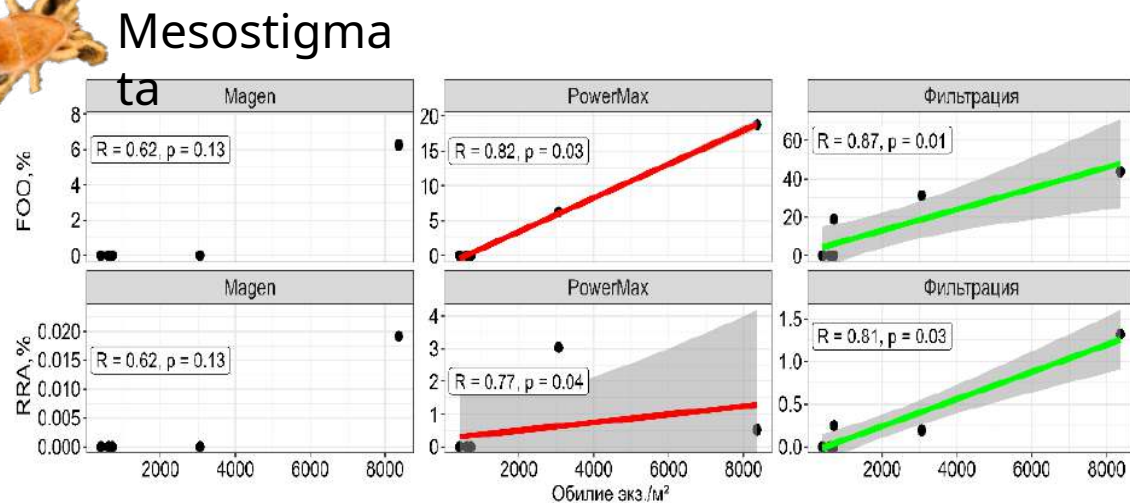
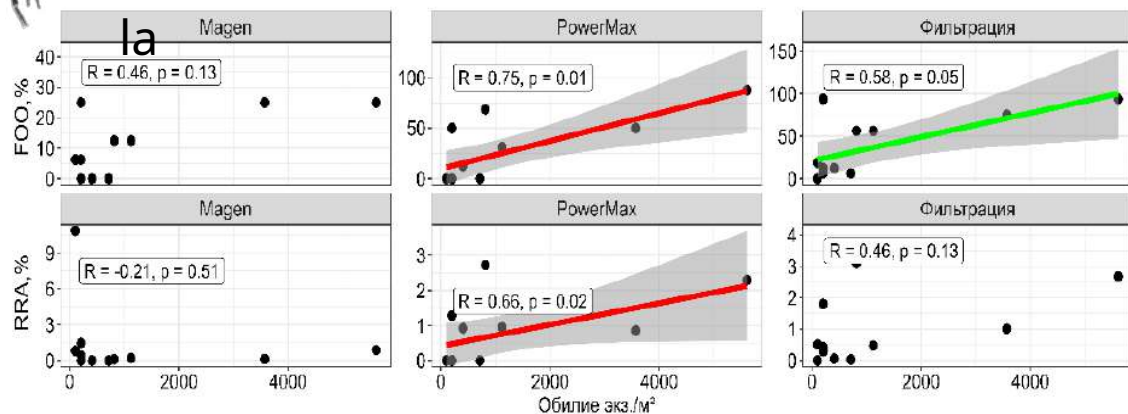
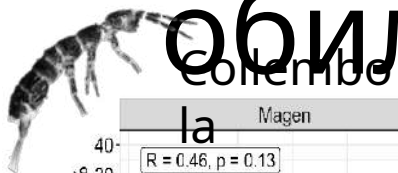


Морфология



Метабаркодинг

Связь встречаемости и относительного числа ридов с обилием



Выводы

- Предлагаемая методика предобработки почвы лизирующим фосфатным буфером с последующей фильтрацией надосадочной жидкости на бумажных фильтрах приводит к более эффективному выявлению разнообразия почвенной фауны по сравнению с классическими методами выделения ДНК
- Встречаемость таксонов в серии проб метабаркодинга eDNA может быть использована как количественный показатель, но лишь для некоторых таксонов.

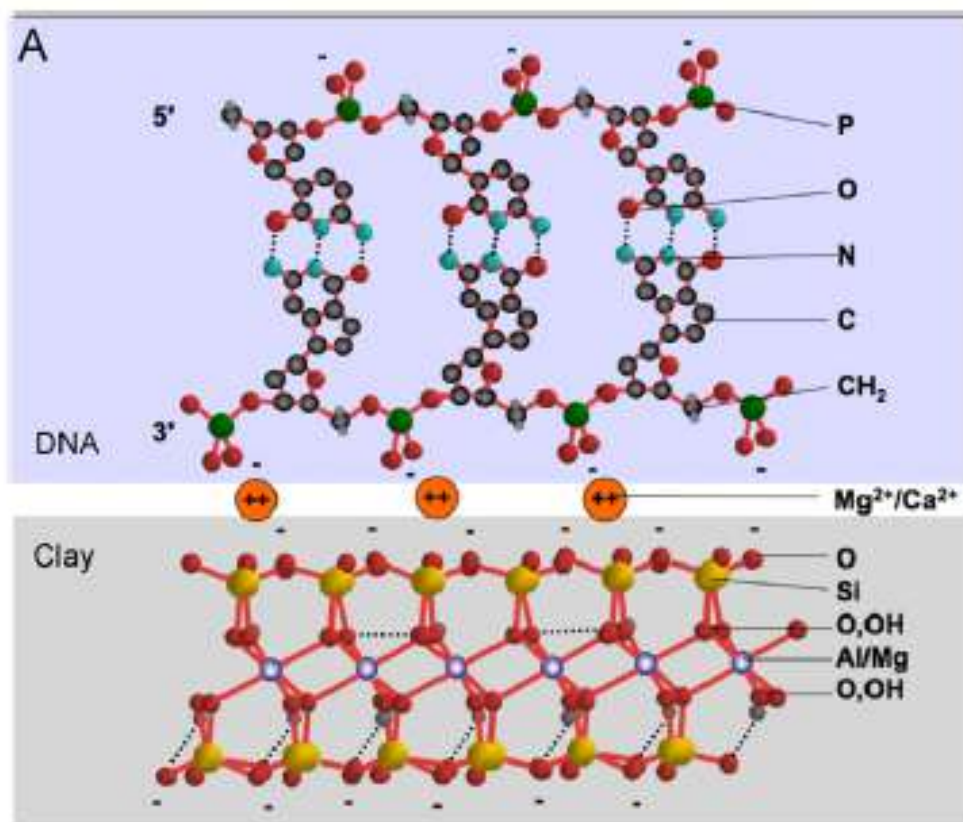
Спасибо за ВНИМАНИЕ

Благодарности:
Короткевич А.Ю., Кривошеина
М.Г., Леонов В.Д., Макарова
О.Л., Танасевич А.В., Ефейкин
Б.Д., Тиунов А.В.

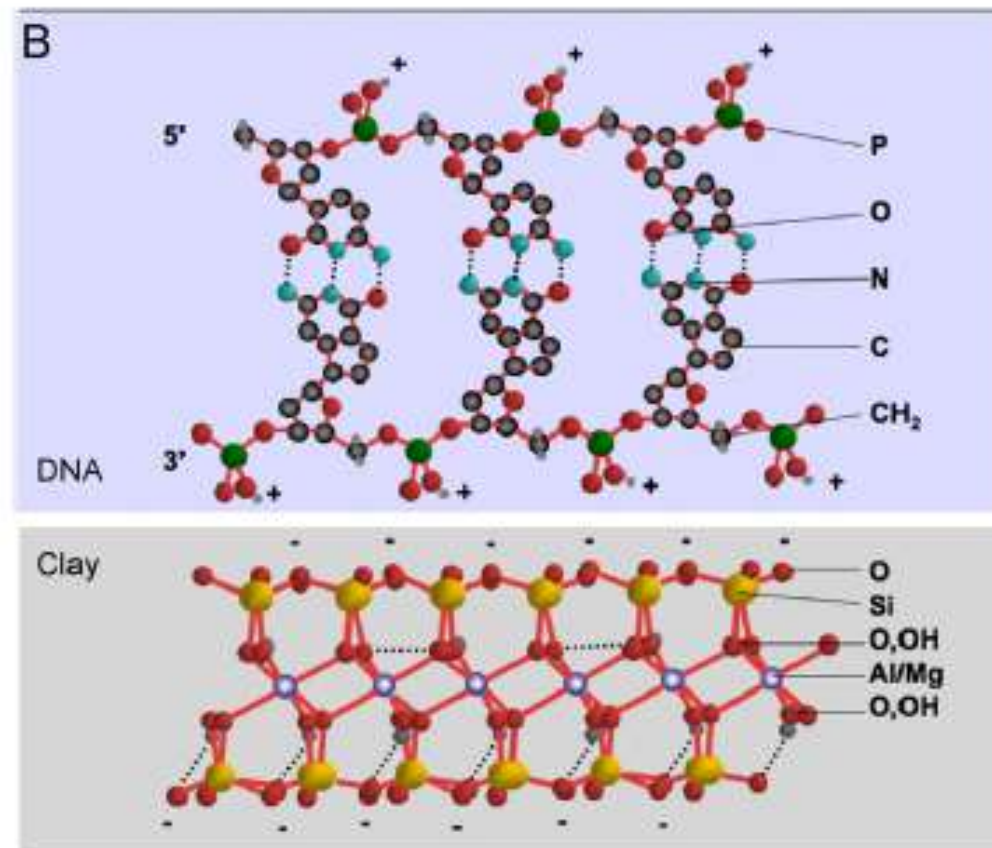


vania.sotnikov@ya
.ru

Устойчивость ДНК в почве



pH >
5



pH <
5

Основные этапы (в целом молекулярки)



Полево
й
Этап

Лабораторный этап
(Мокрая биология)

Этап
обработки
(Сухая
биология)



Технические этапы, которые почти не зависят от объекта и задач экологического исследования