

CZU: 577.21:574.2+568/569

ADN-UL DE MEDIU – INSTRUMENT DE MONITORIZARE A DIVERSITĂȚII VERTEBRATELOR TERESTRE

SÎTNIC Victor

Institutul de Zoologie

Rezumat. *Abordările care au la bază cercetarea ADN-ului de mediu prezintă un ansamblu de tehnici neinvazive, eficiente și sensibile care vin să completeze metodele tradiționale de biomonitoring. În general, pentru secvențierea și metabarcodarea eADN-ului asociat unui anumit grup taxonomic se creează baze de date cu markeri moleculari specifici care au ca scop monitorizarea biodiversității la scară locală. Prezentul studiu are la bază cercetări în desfășurare cu privire la crearea unor sisteme de metabarcodare și baze de date locale care să cuprindă speciile de vertebrate terestre din Republica Moldova cu mitogenom secvențiat inclus în baza de date globală RefSeq.*

Cuvinte cheie: *ADN de mediu, biomonitoring, sisteme de metabarcodare, RefSeq, vertebrate terestre.*

ENVIRONMENTAL DNA – A TOOL FOR MONITORING THE DIVERSITY OF TERRESTRIAL VERTEBRATES

Abstract. *The approaches regarding environmental DNA research represent a set of non-invasive, efficient, and sensitive techniques that comes to complement traditional biomonitoring methods. In order to perform sequencing and metabarcoding of eDNA associated with a specific taxonomic group is necessary to create databases with specific molecular markers. The current study is based on ongoing investigations regarding creation of metabarcoding systems and local reference databases. The target taxonomic groups are terrestrial vertebrate species from the Republic of Moldova that have their mitogenomes included in the global database RefSeq.*

Keywords: *Environmental DNA, eDNA, biomonitoring, metabarcoding systems, RefSeq, terrestrial vertebrates.*

Introducere

Monitorizarea faunei de vertebrate terestre se bazează adesea pe utilizarea tehnicilor tradiționale de cercetare, acestea fiind uneori insuficiente pentru aprecierea datelor cu referire la specii. Deoarece în ultimul deceniu, ADN-ul de mediu (eADN) a devenit rapid un instrument de elecție în evaluarea biodiversității, apare necesitatea dezvoltării și aplicării acestuia, inclusiv în monitorizarea faunei de vertebrate terestre. Abordările care au la bază cercetarea ADN-ului de mediu prezintă un ansamblu de tehnici neinvazive, eficiente și sensibile care vin să completeze metodele tradiționale de biomonitoring. De obicei, eADN-ul este extras din probe de sol, sedimente, apă, fecale, conținut intestinal, praf și este un amestec complex de ADN intra- și extracelular derivat din multe surse și de calitate diferită. În general, pentru secvențierea și metabarcodarea eADN-ului asociat unui anumit grup taxonomic se

crează baze de date cu markeri moleculari specifici care au ca scop monitorizarea biodiversității la scară locală [1].

Vertebratele sunt specii cheie în majoritatea ecosistemelor terestre, însă din cauza factorului antropic și a schimbărilor de mediu acest grup de animale cunoaște un declin continuu în numărul și dimensiunea populațiilor [5]. Cercetarea diversității vertebratelor terestre doar cu aplicarea metodelor tradiționale este în general laborioasă și dificilă, astfel în prezent există tendințe tot mai pronunțate de creare a bazelor de date și sistemelor de metabarcodare axate pe grupuri taxonomice țintă care permit monitorizarea speciilor la scară de comunități locale. Pentru crearea acestora este necesar ca grupul taxonomic țintă să fie constituit din specii cu mitogenom (genom mitocondrial) secvențiat inclus în baza de date globală *RefSeq* [2,3,4]. Aceasta din urmă cuprinde secvențe verificate, nonredundante și de o calitate înaltă. Scopul lucrării de față a fost identificarea speciilor de vertebrate terestre din fauna Republicii Moldova care au mitogenomul inclus în *RefSeq*.

Materiale și metode

Cercetarea ADN-ului de mediu necesită utilizarea unor tehnici interdisciplinare care combină ecologia clasică, bioinformatica și biologia moleculară. Etapele cheie în realizarea acestor studii sunt:

1. Crearea unui sistem de metabarcodare. Etapa cuprinde: stabilirea grupei taxonomice și selectarea taxonilor țintă, designul primerilor și identificarea metabarcodurilor (un metabarcod este format dintr-un fragment de ADN scurt și informativ din punct de vedere taxonomic, flancat de două regiuni conservate, care servesc drept ancore pentru primeri și pentru realizarea PCR-ului), determinarea *in silico* a specificității și acoperirii taxonomice a primerilor, crearea bazei de date care să conțină metabarcodul asociat fiecărui taxon.
2. Realizarea experimentelor de laborator. Cuprinde: colectarea probelor, extragerea, amplificarea (PCR) și secvențierea eADN-ului.
3. Analiza datelor și interpretarea biologică a acestora.

Pentru a crea un sistem de metabarcodare este necesar de a fi luate în considerare câteva elemente importante. În primul rând trebuie definitivat clar grupul taxonomic de interes dar și nivelul rezoluției taxonomice necesare pentru a răspunde la întrebările științifice. Este necesar ca genomul mitocondrial al taxonilor țintă să conțină cât mai puține erori de aceea se recomandă utilizarea secvențelor incluse în *RefSeq*. Alt criteriu important este stabilirea dimensiunii metabarcodurilor. Pentru eADN-ul cu nivel înalt

de degradare cum este cel din materiile fecale se va opta pentru fragmente scurte (sub 150 perechi de baze). În consecință, nu există un protocol standard recomandat pentru investigarea tuturor tipurilor de eADN și ajustarea protocoalelor de lucru se efectuează în funcție de specificul cercetărilor și a grupului taxonomic țintă care urmează a fi studiat.

Rezultate și discuții

Până în prezent au fost identificate 192 specii de vertebrate terestre care fac parte din fauna Republicii Moldova și au mitogenomul inclus în *RefSeq*. Acestea cuprind: 140 specii de păsări, 43 specii de mamifere, 5 specii de amfibieni și 4 specii de reptile. Totodată, sunt în desfășurare primele studii cu privire la designul primerilor, identificarea metabarcodurilor și crearea bazelor de date de referință care să cuprindă cei 192 taxoni. În cazurile în care nu este necesară identificarea simultană a mai multor specii se urmărește și obținerea perechilor de primeri asociați unui singur taxon. Aceștia pot fi utilizați în special pentru monitorizarea speciilor rare sau invazive, iar metoda implică doar utilizarea reacției de PCR.

Deși eficiente în monitorizarea biodiversității, metodele de cercetare a ADN-ului de mediu nu se aplică pe larg în Republica Moldova și se află încă în stadiu incipient. Dezvoltarea bazelor de date de referință care să cuprindă speciile de vertebrate terestre din fauna actuală cu mitogenom în *RefSeq*, în comun cu crearea condițiilor de laborator, va permite aplicarea protocoalelor de secvențiere și utilizarea ADN-ului de mediu în calitate de instrument de monitorizare a faunei locale. Dezvoltarea sistemelor de metabarcodare a faunei terestre prezente în țara noastră va face posibilă detectarea a zeci și sute de specii într-un singur experiment.

eADN-ul a devenit o abordare foarte atractivă pentru studierea comunităților de animale din fauna actuală, totuși, în ciuda entuziasmului apărut în comunitățile științifice unele aspecte tehnice și bioinformaticice legate de acest tip de cercetări rămân a fi o provocare până în prezent.

Concluzii

1. Până în prezent au fost identificate 192 specii de vertebrate terestre care fac parte din fauna Republicii Moldova și au mitogenomul inclus în *RefSeq*.
2. Monitorizarea faunei prin cercetarea ADN-ului de mediu depinde de existența bazelor de date de referință ce permit atribuirea taxonomică a metabarcodurilor

studiate. Dezvoltarea acestora va permite inițierea campaniilor de monitorizare a speciilor în baza eADN-ului și la eficientizarea evaluării diversității faunistice.

Studiul are loc în cadrul proiectului 20.80009.7007.02. Schimbări evolutive ale faunei terestre economic importante, ale speciilor rare și protejate în condițiile modificărilor antropice și climatice, Program de Stat (2020-2023).

Bibliografie

1. ETHAN, RYAN; PHIL, BATEMAN; MIEKE, van der Heyde; et al. Comparison of eDNA metabarcoding to camera trapping for terrestrial vertebrate monitoring highlights the importance of substrate type, frequency of sampling and animal size. Authorea. November 03, 2020. DOI: 10.22541/au.160442291. 13614413/v1
2. O'LEARY, N.A.; WRIGHT, M.W.; BRISTER, J.R.; CIUFO, S.; HADDAD, D.; MCVEIGH, R.; RAJPUT, B.; ROBBERTSE, B.; SMITH-WHITE, B.; AKO-ADJEI, D.; ASTASHYN, A.; BADRETDIN, A.; BAO, Y.; BLINKOVA, O.; BROVER, V.; CHETVERNIN, V.; CHOI, J.; COX, E.; ERMOLAEVA, O.; FARRELL, C.M.; GOLDFARB, T.; GUPTA, T.; HAFT, D.; HATCHER, E.; HLAVINA, W.; JOARDAR, V.S.; KODALI, V.K.; LI, W.; MAGLOTT, D.; MASTERSON, P.; MCGARVEY, K.M.; MURPHY, M.R.; O'NEILL, K.; PUJAR, S.; RANGWALA, S.H.; RAUSCH, D.; RIDDICK, L.D.; SCHOCH, C.; SHKEDA, A.; STORZ, S.S.; SUN, H.; THIBAUD-NISSEN, F.; TOLSTOY, I.; TULLY, R.E.; VATSAN, A.R.; WALLIN, C.; WEBB, D.; WU, W.; LANDRUM, M.J.; KIMCHI, A.; TATUSOVA, T.; DICUCCIO, M.; KITTS, P.; MURPHY, T.D.; PRUITT, K.D. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D733-45 PubMed
3. TATUSOVA, T.; DICUCCIO, M.; BADRETDIN, A.; CHETVERNIN, V.; NAWROCKI, E.P.; ZASLAVSKY, L.; LOMSADZE, A.; PRUITT, K.D.; BORODOVSKY, M.; OSTELL, J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.* 2016 Aug 19; 44(14). Pp. 6614-24 PubMed
4. BRISTER, J.R.; AKO-ADJEI, D.; BAO, Y.; BLINKOVA, O. NCBI viral genomes resource. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D571-7 PubMed
5. www.iucnredlist.org