

אזרחים אוספים DNA

ניטור תפוצת מינים באמצעות DNA סביבתי

מעובד על פי המאמר[1]:

Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R. A., Foster, J., Wilkinson, J.W., Arnell, A., Brotherton, P., Williams, P., Dunn, F. (2015): Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (Triturus cristatus). Biological Conservation 183: 19–28.

מבוא

DNA סביבתי (eDNA) הוא DNA הנאסף מהסביבה - מהקרקע, ממקווי מים או מהאוויר, במקום ישירות מהאורגניזם. מקורו בהפרשות או חלקי רקמה של האורגניזמים החיים בסביבה: גללים, רקמת עור, ריר העוטה את האורגניזמים, תאי מין המופרשים לסביבה, קשקשים או שיער. אפשר לאסוף דגימות של קרקע או מים ולבצע אנליזת DNA בשיטות ריצוף חדישות (High throughput DNA sequencing) המאפשרות לנתח כמויות גדולות של רצפי DNA שמקורן באורגניזמים רבים. בשיטה זו אפשר לזהות לאילו אורגניזמים שייכים רצפי ה-DNA שבדגימה, בעיקר כדי לנטר מגוון ביולוגי ותפוצה של מינים שקשה לתפוס או לתצפת (Lodge et al., 2012). מחקרים שבדקו את היתכנות השיטה הראו ש- eDNA יכול לנטר היטב את נוכחותם של דו-חיים, דגים, חסרי חוליות, עופות מים ויונקים (Thomsen et al., 2012) ואת תפוצתם. במחקרים אלה נמצא כי שימוש ב- eDNA יכול להיות לא פחות יעיל לעומת שיטות מסורתיות לבדיקת תפוצה של מינים (Thomsen et al., 2012).

אחד היתרונות בבדיקת eDNA הוא בנטילת הדגימה מהסביבה, שהינה לרוב מהירה ופשוטה יותר מזיהוי היצורים או תפיסתם (Ficetola, 2008). עובדה זו פותחת את האפשרות לבצע דגימות eDNA באמצעות אנשים שאינם אקולוגים מומחים ואינם מיומנים כמוהם. פנייה לציבור וגיוס מתנדבים לניטור מים ולמדידת מגוון ביולוגי נעשית יותר ויותר מקובלת ברחבי העולם (Schmeller, 2009). כך יכולים פרויקטים מחקריים העוסקים בתפוצת אורגניזמים לשלב בין הרחבת הגבולות הגיאוגרפיים של המחקר עם הכרה בחשיבות מעורבותו של הציבור הרחב במחקר מדעי ובשמירה על הטבע. מטרת המחקר המתואר כאן הייתה אפוא לבדוק את התוקף של סקר מדע אזרחי המבוסס על eDNA ולבחון אם אפשר להסתמך על תוצאותיו.

במחקר המתואר, שנערך בבריטניה, השוו החוקרים בין סקר מתנדבים באמצעות דגימות eDNA לסקר מתנדבים בגישות מסורתיות של תפוצת Triturus cristatus - מין צפוני של טריטון[2]. מין זה של טריטון נחשב בסכנת הכחדה, וכדי לקבוע שהוא נעדר מסביבת גידול מסוימת דרושים לפחות ארבעה עד שישה ביקורים בשנה בסביבת הגידול והפעלת שלוש שיטות ניטור שונות לפחות (Sewell et al., 2010). המאמצים הגדולים הכרוכים בשיטות אלה מונעים את ייסודה של מערכת קבועה לניטור תפוצת מינים בבריטניה: ניטור על ידי גורמים פרטיים גורר הוצאה כספית לא מבוטלת, ופנייה למתנדבים אינה סבירה בשל המאמץ והזמן המרובים שעליהם להשקיע כדי לבצע ניטור שיטתי ועקבי בשיטות אלה (Wilkinson and Arnell, 2013).

המחקר המתואר הערך את מהימנות האנליזה של דגימות eDNA לבדיקת נוכחותם של טריטונים מהמין הנחקר בהשוואה לשיטות ניטור מסורתיות כמו ספירה בלילה באמצעות פנסים, לכידה בבקבוקים וחיפוש ביצים. כמו כן נבדקה יכולתם של מתנדבים לאסוף דגימות eDNA מהימנות כהכנה לרשת ניטור רחבה בבריטניה.

שיטות

שיטות ניטור מסורתיות

במחקר נערכה השוואה בין ניטור באמצעות eDNA לניטור באמצעות שלוש שיטות מסורתיות (Sewell et al., 2010): (1) ספירה לילית של פרטים במים באמצעות פנסים; (2) לכידת פרטים בבקבוקים (Griffiths, 1985). הבקבוקים מפוזרים במים פתוחים וקשורים לענפים במקומות שבהם סביר שהטריטונים עוברים בשטח המחיה הנבדק. לאחר הספירה הפרטים משוחררים למים במקום שבו נלכדו; (3) איתור ביצי טריטונים במים. דו-חיים מטילים לרוב את ביציהם בצברים גדולים של מאות עד אלפי ביצים ולכן קל יחסית לאתר את הביצים.

בעוד שההתאמה בין כמות eDNA נמוכה לאוכלוסיות קטנות הייתה טובה, כמות eDNA גבוהה יותר לא ניבאה בהכרח קיומן של אוכלוסיות טריטונים בינוניות

[1] הגרסה המובאת כאן היא סקירה של תוכני המאמר המקורי, ונועדה להנגיש את המידע לציבור המורים לביולוגיה ולמדעי הסביבה. העיבוד כלל הוספת הסברים ואיורים לתכנים מורכבים, סינון מידע שאינו נקשר לרעיון המרכזי של הגרסה המעובדת, הגדרת מונחים מקצועיים, ובמידת האפשר קישור הדברים לתהליכי למידה והוראה. המעוניינים לקרוא את המאמר המקורי מוזמנים לפנות למקור המובא בתחילת הגרסה המעובדת.

[2] טריטון: סוג של דו-חיים בעל זנב ממשפחת הסלמנדרות, המעדיף את החיים במים גם בבגרותו. בארץ מצוי מין יחיד - טריטון הפסים, הנמצא בסכנת הכחדה. המין שעליו נערך המחקר המתואר כאן מכונה באנגלית: Great Crested Newt.

אתרי הניטור

ההשוואה נערכה בשלושים וחמש בריכות טבעיות, עשרים מהן בדרום בריטניה (המפשייר) וחמש-עשרה באזור צפוני יותר (ווילס). אזורים אלה נבחרו מפני שדגם התפוצה של הטריטון שונה בכל אחד מהם: בדרום אנגליה הבריכות נדירות יותר, המרחקים ביניהן גדולים ואוכלוסיית הטריטון מפוזרת ופחות צפופה. באזור הצפוני יותר יש יותר בריכות, הן קרובות זו לזו במידה רבה יותר ואוכלוסיית הטריטונים צפופה יותר. ידוע מראש כי כל הבריכות מאכלסות טריטונים מהמין הנבדק, כך שהן שימשו רק מבחן לשיטה. בדרום נוטרו הבריכות על ידי צוות קטן של נוטרים מקצועיים. הבריכות הצפוניות יותר נוטרו על ידי צוות של 50 מתנדבים, בהנחיית חלק מאנשי הצוות המקצועי.

מערך הניטור

הביקורים בבריכות נערכו ארבע פעמים במהלך עונת הרבייה של הטריטון, מסוף אפריל ועד סוף יוני, אחת לשבועיים-שלושה. בסך הכול נערכו בבריכות 140 ביקורים. עם ההגעה לבריכה החלו הנוטרים בספירת פנסים לילית בשולי הבריכות שנמשכה כחצי שעה. לאחר מכן נלקחו דגימות מים לבדיקת eDNA ולבסוף פוזרו בקבוקי לכידה. הבקבוקים פוזרו בשולי הבריכות במרחקים של שני מטרים זה מזה, 17-62 בקבוקים לבריכה, לפי גודל הבריכות. הם נבדקו למחרת בבוקר, הפרטים שנלכדו נספרו, נערכה קביעת מגדר והערכת גיל, ואז הם שוחררו. בשלב זה נערך ניטור של ביצים. רצף זה של ניטור (ספירת פנסים, דגימות מים, לכידה בבקבוקים, איתור ביצים) נקבע כדי למזער פגיעה של שיטת ניטור אחת בשיטת ניטור אחרת.

אוכלוסייה שמנתה עשרה פרטים נחשבה לאוכלוסייה קטנה; אחד-עשר עד מאה פרטים - אוכלוסייה בינונית; מעל מאה פרטים - אוכלוסייה גדולה.

דגימות מים לניטור eDNA

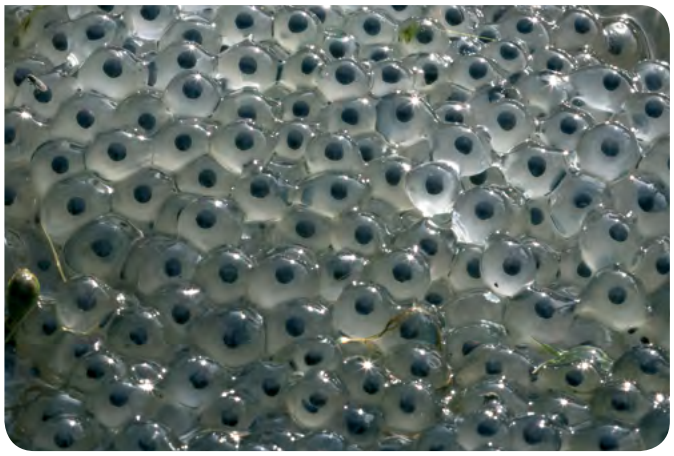
לצורך אנליזת eDNA נאספו לשקית סטרילית 30 מיליליטר מי בריכה מעשרים מקומות שונים בשולי הבריכה, כך שבסך הכול התקבלו 600 מיליליטר מי בריכה. כל נוטר שלקח דגימת מים עמד על גדת הבריכה בלי להיכנס למים, כדי לא לזהם את המים דרך המגפיים שנעל ולא להציף את המים בבוץ ומשקעים. הדגימות נלקחו משולי הבריכה בפיזור שווה עד כמה שאפשר, מאתרים שצפויים להימצא בהם טריטונים: למשל ליד צמחייה שבה הם מטילים ביצים.

90 מיליליטר מים מהדגימה המאוחדת חולקו לשש מבחנות אשר בכל אחת מהן חמישה-עשר מיליליטר מי בריכה. לצורך שימור ה-DNA הכילה כל מבחנה 33 מיליליטר של 100% אתנול ו-1.5 מיליליטר של 3M סודיום אצטאט. המבחנות נשמרו בחדר קור עד שנשלחו למעבדת הבדיקות לאנליזה, שם הוקפאו ב-20°C-. האנליזות נערכו עד חודש מיום איסוף הדגימות.

הכנות לאנליזת eDNA

אנליזת דגימות ה-eDNA נערכה ב-PCR[3] באמצעות תחלים[4] וגלאים[5] שנבחרו על-פי מאגר נתוני גנום של 56 מיני דו-חיים אירופאים. התחלים והגלאים נבדקו קודם לכן על DNA שבודד מטריטונים וכן על תאי רקמה של שישה-עשר טריטונים משלושה מקומות שונים בבריטניה. את תאי הרקמה לקחו מומחים מורשים לכך באמצעות העברת מטוש על גוף הטריטונים באופן חיצוני ולא חודרני. מיצוי ה-DNA וקביעת כמותו נערכו בעזרת ערכות מסחריות. כדי לוודא את ייחודיות הגלאים והתחלים לטריטון מהמין הנבדק נערכו עימם אנליזות PCR גם על DNA שבודד משני מיני טריטונים אחרים (Triturus marmoratus, Triturus carnifex). כדי למצוא את כמות ה-DNA המועטה ביותר שאפשר לזהות בדגימה באמצעות התחלים והגלאים[6], ואת כמות ה-DNA המועטה ביותר שעדיין יכולה להניב תוצאות אמינות ומדויקות באמצעותם[7], נערכו הגברה וכימות של סדרת מיהולים ידועה של DNA של טריטון, מ-10^{-1} ננוגרם למיקרוליטר ועד 10^{-10} ננוגרם למיקרוליטר, עם 12 חזרות לכל ריכוז.

לאחר בדיקה על DNA ועל תאים של טריטון נערכה בדיקה מקדימה על DNA מדגימות של מי בריכות שבהן היה ידוע גודל אוכלוסיית הטריטונים. תשע דגימות מים נאספו מבריכות כאלה בין אפריל למאי. שלוש דגימות נלקחו מבריכות שהתקבלו בהן ספירות נמוכות של אוכלוסיית הטריטונים, שלוש דגימות נלקחו מבריכות שהתקבלו בהן ספירות בינוניות של אוכלוסיית הטריטונים (בדרום בריטניה) ושלוש דגימות נלקחו מבריכות שלא נמצאו בהן טריטונים (בצפון סקוטלנד).



[3] Polimerase Chain Reaction: שיטה להגברת כמות DNA באמצעות תהליכי שכפול חוזרים ונשנים של קטעי DNA על ידי האנזים DNA פולימראז.

[4] primers

[5] probes

[6] limit of detection LOD

[7] limit of quantification LOQ

אנליזת eDNA מהדגימות

כל הדגימות סומנו בקוד מספרי ייחודי כך שלא ייחשפו פרטים על אתר הבריכה או על נוטלי הדגימה. מיצוי ה-DNA נערך בחדר ובו תנאים המונעים זיהומי DNA מיצורים אחרים (זרימת אוויר מהחדר החוצה, תאורת UV ותחלופת אוויר גבוהה לשמירה על סטריליות). אנשי המעבדה לבשו ביגוד סטרילי, כפפות, כיסוי ראש ומסכת פנים טרם כניסתם לחדר. מיצוי DNA ממבחנות בקרה שלילית נערך באופן קבוע יחד עם הדגימות מהבריכות ונועד לאתר זיהום של DNA. מיצויי ה-DNA עברו כימות באמצעות תגובת PCR כמותי ושימוש בגלאים ובתחלים מתאימים (Thomsen, 2012; זאת בטמפרטורה התחלתית של 50°C למשך חמש דקות, 95°C למשך 10 דקות ואחר כך 55 מחזורים של 95°C למשך שלושים שניות ו- 56.3°C למשך דקה אחת. לכל דגימה נערכו שתים-עשרה הרצות של תגובת PCR (שתים-עשרה חזרות). ה-PCR הכמותי הושווה לסדרת מיהולים ידועים של DNA מהמין הנחקר של הטריטון, מ-10^{-1} ננוגרם למיקרוליטר ועד 10^{-4} ננוגרם למיקרוליטר. הוספת סדרת המיהולים ל-PCR הכמותי נעשתה בחדר נפרד מחדר מיצוי ה-DNA כדי למנוע זיהומים ב-DNA. לתגובה נוספו ארבע בקרות שליליות. תגובת ה-PCR הכמותי נערכה בחדר שלישי המוקדש ומותאם לכך (זרימת אוויר מהחדר החוצה, תאורת UV ותחלופת אוויר גבוהה לשמירה על סטריליות). בכל המקרים, כמות ה-DNA המינימלית (LOQ) הייתה מתחת לגבול הכימות, כך שאי אפשר היה לכמת את ה-DNA בתגובה. לכן הדיווח על כמות ה-DNA בדגימות נעשה באמצעות מספר המבחנות שבהן התקבל DNA בתגובת ה-PCR מתוך 12 החזרות (מ-0 מבחנות מתוך 12 ועד 12 מבחנות מתוך 12).

בדיקה לתוצאות חיוביות כוזבות

כדי לקבוע אם שיטת ה-eDNA מניבה תוצאות חיוביות כוזבות, כלומר מדווחת על נוכחות DNA של הטריטון אף שאין טריטונים ממין זה בבריכה, נאספו דגימות משתי קבוצות של אתרים שהיה לחוקרים יסוד טוב להאמין שאין בהם טריטונים מהמין הנחקר. קבוצת אתרים אחת הייתה צפונית מעט מהטווח הצפוני ביותר של התפוצה הידועה של המין. קבוצת האתרים השנייה הייתה בטווח התפוצה, אך על פי דיווחים מקומיים לא נצפו בה פרטים מהמין הנחקר של הטריטון. האתרים כללו בריכה בגינות של המשתתפים בפרויקט המחקר שלא נראה בהן טריטון מעולם; בריכות במרכזי למידה שאנשי התחזוקה מעולם לא ראו בהן טריטונים, ובריכות שאוכלוסיית הדגים בהן צפופה ולכן אינן מתאימות לטריטונים. מכאן שאף על פי שהחוקרים לא ביקרו באתרים אלה, הם הניחו בביטחון רב שאין בהם טריטונים.

בדיקות ה-eDNA בדגימות מ-35 הבריכות שנוטרו בדרום בריטניה ובאזור הצפוני יותר איתרו טריטונים מהמין Triturus cristatus ב-139 מתוך 140 ביקורים

הפעלת שיטת ה-eDNA על ידי מתנדבים

כדי להעריך את דיוק השיטה הפעילו החוקרים רשת של מתנדבים באזור התפוצה של הטריטון בבריטניה. בתוך כך גויסו 86 מתנדבים, חלקם אנשי מקצוע וחלקם חובבים, רובם הגדול מעורב בפרויקטים של ספירת חיות בר. הם אספו דגימות מ-239 בריכות המפוזרות בכל אזור התפוצה של המין, קרוב ככל האפשר לשיא עונת הרבייה של הטריטון, בין אמצע מאי לאמצע יוני. המתנדבים קיבלו דף הנחיות פשוטות על שיטת הניטור (ראו תיאור לעיל, תחת הכותרת דגימות מים לניטור eDNA), אך לא אומנו ולא נערך פיקוח על עבודתם בשדה. צוות המחקר נטל דגימות חוזרות מ-26 אתרים (11%) כדי להשוותן לדגימות של המתנדבים.

נתונים נוספים על הבריכות

קיים מידע מועט מאוד על השפעת הסביבה על פירוק eDNA במים מתוקים. ידוע שבליית eDNA נוצרת בשל פעילות של נוקלאזות, מים, קרינת UV ופעולת חיידקים ופטריות (Dejean, 2011), ושבמתקני מחקר אקולוגיים גדולים במיוחד (mesocosms) eDNA של הטריטון הנחקר מתפרק רק לאחר שבוע עד שבועיים (Thomsen et al., 2012). לכן ניסו החוקרים לאסוף נתונים א-ביוטיים וביוטיים על הדגימות והבריכות ולמצוא מתאם בין נתונים אלה לתוצאות האנליזה: אזור הבריכה, מידת הצל, צפיפות הצמחייה, מדד סובייקטיבי של איכות המים, תנועה של גוף המים, איכות בית הגידול שלחופי הבריכה, מספר הבריכות הסמוכות לבריכה, נוכחות דגה ומפלים. כמו כן, שקלול כל הנתונים הביוטיים והא-ביוטיים שנאספו סייע לחשב מדד להתאמת הבריכה כבית גידול[8] לטריטונים מהסוג הנחקר.

DNA סביבתי (environmental DNA, eDNA)

DNA סביבתי (eDNA) הוא DNA הנאסף מהסביבה - מהקרקע, ממקור-מים או מהאוויר, במקום ישירות מהאורגניזם. מקורו בהפרשות או חלקי רקמה של שלל האורגניזמים החיים בסביבה: גללים, רקמת עור, ריר העוטה את האורגניזמים, תאי מין המופרשים לסביבה, קשקשים או שיער. מכיוון שהדגימות מהסביבה מכילות מולקולות DNA שמקורן באורגניזמים רבים משתמשים בגלאים ותחלים הנקבעים לפי מאגרי מידע ממוחשבים המכילים רצפים שלמים של גנום מאורגניזמים שונים, בהתאם למטרת האנליזה ולמגוון האורגניזמים שבבית הגידול. באמצעות שיטות ריצוף חדישות (High throughput DNA sequencing) המאפשרות לנתח כמויות גדולות של רצפי DNA שמקורן באורגניזמים רבים אפשר לזהות לאילו אורגניזמים שייכים רצפי ה-DNA שבדגימה. התוצאות מאפשרות לקבוע במהירות יחסית מגוון ביולוגי ותפוצה של מינים שקשה לתפוס או לתצפת, מינים פולשים, או מינים הנתונים בסכנת הכחדה. בדרך זו ממזערים את התערבות האדם ונמנעים מגרימת נזק או עקה לפרטים מהמינים הנחקרים. תרומת האנליזה של DNA סביבתי היא בעיקר לתהליכי שימור והצלה של בתי גידול ומינים בסכנת הכחדה. השיטה יעילה במיוחד עבור אוכלוסיות קטנות של מינים בשל רגישותה הגבוהה, אך היא תלויה בשימור ה-DNA בבית הגידול, כלומר, במידה שבה ה-DNA מתפרק בסביבה שבה הוא נמצא.

[8] Habitat Suitability Index (HIS)



ניתוח הנתונים

לשם השוואה בין שיטת הניטור באמצעות eDNA לשיטות הניטור המסורתיות עשו החוקרים שימוש במבחן של McNemar, שלפיו מחשבים אם ההבדל בין זוג משתנים שאינם בהתאמה גדול יותר מההבדל הצפוי ביניהם כאשר הסיבה להבדל היא אקראית (McNemar, 1947). במקרה של המחקר המתואר כאן, זוג משתנים שאינם בהתאמה יהיו כאשר ניטור באמצעות eDNA מאתר נוכחות של טריטון מהמין הנחקר, ואילו שיטות מסורתיות אינן מאתרות את נוכחותו, או להפך. מערך המחקר התאים למבחן כזה משום שלחוקרים היה ידוע מראש שבכל הבריכות שנבדקו היו טריטונים מהמין הנחקר.

תוצאות

אנליזת הדגימות מהבריכות בדקה שתי שאלות: (1) האם קיימת התאמה בין נוכחות פרטים מהמין Triturus cristatus בבריכות לבין זיהוי DNA של המין בדגימות מהבריכות? כדי לענות לשאלה זאת השתמשו החוקרים בתגובת PCR שבה נעשה שימוש בתחלים ובגלאים ייחודיים למין זה של טריטון: אם יש התאמה כזאת, החוקרים יצפו שבתגובת ה-PCR תהיה הגברה של כמות ה-DNA הייחודי למין רק בדגימות מבריכות שהיה ידוע מראש שקיימים בהן פרטים ממין זה. כמו כן, הם יצפו שלא תהיה הגברת DNA בדגימות מבריכות שהיה ידוע מראש שלא קיימים בהן פרטים ממין זה; (2) האם כמות ה-DNA הייחודי למין זה של טריטון מתאימה לגודל האוכלוסייה כפי שנקבע באמצעות ספירות ושיטות ניטור מסורתיות? כדי לענות לשאלה זאת ביצעו החוקרים PCR כמותי של הדגימות מהבריכות עם תחלים וגלאים ייחודיים למין זה של טריטון בהשוואה ל-PCR כמותי של סדרת מיהולי DNA של Triturus cristatus בריכוזים ידועים.

הערכת תוצאות השימוש בתחלים ובגלאים

הפעלת התחלים בלבד על הדגימות מהבריכות, ללא הגלאים, יצרה הגברה של 63 מינים על פי השוואה למאגר הרצפים GenBank. לפני הניטור, כשהוכנו התחלים והגלאים ונערכה בדיקה מוקדמת של היברידיזציה לרצפי DNA ידועים, התאימו התחלים והגלאים התאמה מלאה בהיברידיזציה לרצפי הטריטון מהמין הנחקר, אך כמו כן התאימו חלקית (עם כמה אי התאמות) למינים נוספים: לדג ממוצא אוסטרלי מהמין Melanotaenia splendida ; לטריטון מהמין Taricha torosa, לטריטון מהמין Triturus carnifex ולטריטון מהמין Triturus karelinii. מפאת אי ההתאמות של התחלים לרצפי המינים האלה, הסיכוי להגביר אותם בדגימות מהבריכות הוא קטן, אבל אי אפשר להתעלם מאפשרות כזאת. כל המינים האלה אינם נמצאים בבריטניה, מלבד הטריטון מהמין Triturus carnifex. מין זה אינו מותאם לתנאים בבריכות שנדגמו למחקר, והוא נמצא רק במספר מוגבל של אתרים בבריטניה (Jehle, 2011). נוסף על כך, בהכנות לאנליזת eDNA לא התקבלה הגברה של DNA כאשר התחלים והגלאים הופעלו על DNA של Triturus carnifex, מה שהוכיח את התאמתם לניטור Triturus carnifex.

בדגימות התקבלה הגברה של רצפי DNA בכל הבריכות שנמצאו בהן פרטים מהמין Triturus carnifex ולא התקבלה הגברה בבריכות שלא נמצאו בהן פרטים ממין זה. כמות ה-DNA המועטה ביותר שעדיין הניבה תוצאות כמותיות אמינות ומדויקות (LOQ)בתהליך ה-PCR הכמותי הייתה במחקר זה 3×10^{-3}ng, בעוד שה-DNA של Triturus cristatus אותר גם בריכוזים של 3×10^{-9}ng, עם לפחות מבחנה אחת מתוך שתים-עשרה שהראתה תוצאה חיובית בתהליך ה-PCR הכמותי. לכן נקבע ריכוז זה (3×10^{-9}ng) ככמות ה-DNA המועטה ביותר שאפשר לזהות בדגימה (LOD).

השוואה לשיטות ניטור מסורתיות

בדיקות ה-eDNA בדגימות מ-35 הבריכות שנוטרו בדרום בריטניה ובאזור הצפוני יותר איתרו טריטונים מהמין Triturus carnifex ב-139 מתוך 140 ביקורים (99.3%). לכידה בבקבוקים וספירה לאור פנסים איתרו נוכחות רק ב-76% ו-75% מהביקורים בהתאמה, ואילו איתור ביצים - ב-44% מהביקורים. ההבדלים בין eDNA והשיטות המסורתיות היו מובהקים ($p < 0.0005$, על פי מבחן McNemar).

נוטרים מקצועיים של דו-חיים משלבים פעמים רבות כמה שיטות ניטור כדי לקבוע גדול אוכלוסייה, ולכן צירפו החוקרים את התוצאות משיטת הבקבוקים עם תוצאות שיטת הפנסים. בשתי השיטות יחד אותרו טריטונים ב-95% מהביקורים, אחוז גבוה ודומה לשיטת ה-eDNA אך עדיין שונה ממנה באופן מובהק ($p < 0.05$, על פי מבחן McNemar).

באתרים שונים נספרו בשיטות המסורתיות (ספירת פנסים ולכידה בבקבוקים) בין 1 ל-45 פרטים לביקור, להוציא שני ביקורים שבהם לא נספרו פרטים כלל. 75 אחוזים מהספירות בביקורים נכנסו לקטגוריית אוכלוסיות קטנות, ו-25 אחוזים לקטגוריית אוכלוסיות בינוניות. לרוב, בדיקות ה-eDNA ב-PCR הכמותי התאימו לספירות הטריטונים. אולם בעוד שההתאמה בין כמות eDNA נמוכה לאוכלוסיות קטנות הייתה טובה, כמות eDNA גבוהה יותר לא ניבאה בהכרח קיומן של אוכלוסיות טריטונים בינוניות. לכן כימות eDNA אינו שיטה מתאימה לבדיקת שכיחות של טריטונים מהמין הנחקר.

תוצאות eDNA שנאסף על ידי מתנדבים

218 מתוך 239 האתרים (91 אחוזים) שבהם מתנדבים אספו דגימות eDNA הראו תוצאה חיובית. מכיוון שבכל 239 האתרים נמצאו טריטונים, המשמעות היא ש-9 אחוזים מהאתרים הראו תוצאה שלילית כוזבת. תוצאות שליליות אלה לא נמצאו קשורות לתאריך נטילת הדגימות או לתנאים ביוטיים ואו-ביוטיים מסוימים בסביבה, אלא למדד התאמת האתר כבית גידול לטריטונים שחושב על ידי שקלול כל התנאים בבריכה. כלומר, הגורם שהשפיע על מציאת DNA של טריטון בדגימות

היה מידת התאמתו של בית הגידול לטריטונים מהמין הנחקר.

בארבע מתוך 21 הבריכות שהראו תוצאות שליליות כוזבות נעשו טעויות באיסוף דגימות המים: איסוף דגימות רק מחלק מהיקף הבריכה, או מאזורים שאינם נגישים לטריטונים, כמו מים רדודים במיוחד או אזורים בעלי צמחייה צפופה במיוחד. בשש מהן נספרו טריטונים מעטים בשיטות המסורתיות. עבור התוצאות השליליות הכוזבות שהתקבלו משאר אחת-עשרה הבריכות לא נמצא הסבר סביר.

לעומת תוצאות שליליות כוזבות, לא התקבלו תוצאות חיוביות כוזבות מדגימות ה-eDNA שאספו המתנדבים - לא מבריכות בתחום המחיה של טריטונים ולא מבריכות מחוץ לו.

כבקרת איכות לדגימות ה-eDNA שאספו המתנדבים נאספו דגימות eDNA מ-26 אתרים על ידי מומחים חברי צוות המחקר. ב-25 מתוכם (96%) התקבלו אנליזות זהות של דגימות מתנדבים ודגימות מומחים.

דיון

יעילות שיטת ה-eDNA בקביעת נוכחות הטריטון או היעדרו

אנליזת eDNA הייתה שיטה יעילה ביותר, שאִבחנה באופן כמעט מושלם את נוכחות המין הצפוני של הטריטון במחקר שהתבצע ב-35 הבריכות. שיטה זאת הייתה אף יעילה יותר משיטות ניטור מסורתיות. התוצאות שהתקבלו במחקר זה דומות לתוצאות שהתקבלו במחקר אחר (Pilliod et al., 2013), שבו התקבל אבחון בשיעור של 83-100 אחוזים של שני מיני דו-חיים בשלושה-עשר אתרים. אחוזי הצלחה גבוהים כל כך בתוצאות אנליזת eDNA תומכים בהצעה ששיטה זו יכולה להפוך לשיטת ניטור מקובלת, במיוחד כדי לחסוך ביקורים תכופים בשטח כדי לקבוע את היעדר המין הנחקר מהאתר. למעשה, דרושה דגימת eDNA אחת בעונת הרבייה, שהיא שוות ערך לחמישה ביקורים באתר ולהפעלת שלוש שיטות מסורתיות בכל ביקור, כדי להסיק בביטחון של 95 אחוזים שהטריטון נעדר מהבריכה הנבדקת.

התוצאות שהתקבלו מדגימות שנטלו המתנדבים מצביעות על ישימות השיטה כשמעורבים צוותים גדולים יחסית של נוטרים בעלי ניסיון והכשרה מועטים. אומנם התקבלו תוצאות שליליות כוזבות באחוז גבוה יותר באנליזת הדגימות שאספו המתנדבים, ואולם התקבל אחוז גבוה (91 אחוזים) של תוצאות חיוביות, שהיה בהתאם לאחוזים גבוהים שהתקבלו במחקרים אחרים שהשתמשו באנליזת eDNA לניטור אורגניזמים (Thomsen et al., 2012; Pilliod et al., 2013), כך שהשיטה אחידה מאוד, גם כאשר היא מיושמת על ידי נוטרים חסרי ניסיון. למרות זאת, תוצאות של 91 אחוזים אינן מספיקות לניטור באמצעות ביקור יחיד באתר. בהינתן שהמתנדבים עבדו רק לפי דף הנחיות ולא קיבלו הדרכה כלשהי על שיטת האיסוף, החוקרים משערים שלאחר הדרכה פשוטה יחסית אפשר יהיה לאבחן נוכחות או היעדר של אורגניזם ברמה הדומה לזו שמתקבלת כאשר החוקרים מפקחים על האיסוף או מבצעים אותו בעצמם. אם מוצאים את הנתונים שהתקבלו בשל טעויות בהפעלת השיטה עולה אחוז הבריכות שנמצאו בהן טריטונים באמצעות eDNA ל-95 אחוזים.

מיעוט התוצאות השליליות הכוזבות לא אפשר אנליזה סטטיסטית של גורמי סביבה אפשריים התורמים לתוצאות כאלה, אבל מתוך שיחות עם המתנדבים אפשר לציין שלושה גורמים אפשריים לכך: (1) בריכות שמספר הטריטונים בהן היה נמוך במיוחד, ולכן לא היה בדגימות DNA של טריטונים מהמין הנחקר; (2) בריכות שבהן המתנדבים הצליחו להגיע רק לחלק מהמים הרדודים שבהיקף הבריכה; (3) בריכות שבהן אזור רחב מאוד של מים רדודים ביותר, ובהן המתנדבים לא הצליחו להגיע למים מעט יותר עמוקים החביבים על הטריטונים, משום שהונחו לא להיכנס למים. לפחות חלק מגורמים אלה אפשר לפתור באמצעים טכניים (כמו מוט ארוך שיאפשר גישה לאזורי מים רחוקים יותר כדי ליטול את הדגימה), או בהסבר מפורט יותר של ההנחיות (לדוגמה, מהם מאפייני האזורים החביבים על טריטונים בבריכה).

הערכת שכיחותו של הטריטון באמצעות eDNA

אנליזת eDNA יעילה ביותר בקביעת נוכחות של המין או היעדרו מאתר מסוים, אך פחות יעילה בקביעת שכיחותו באותו אתר. אף שהייתה התאמה כללית בין כמות eDNA בדגימות לבין ספירת הפרטים בשיטות המסורתיות, ההתאמה הטובה ביותר הייתה כאשר כמות ה-eDNA של הטריטון הייתה נמוכה יחסית: בכל המקרים שבהם התקבלה כמות נמוכה של eDNA של



הטריטון הייתה גם ספירה נמוכה בשיטות המסורתיות. לעומת זאת, כמות eDNA גבוהה של הטריטון התקבלה גם מאתרים שנספרו בהם מעט טריטונים וגם מאתרים שנספרו בהם טריטונים רבים. הערכת שכיחות הטריטון באמצעות ספירת פרטים בשיטות המסורתיות היא בעייתית, ועלולה להעריך גודל אוכלוסייה גבוה מהמצוי או נמוך ממנו (Sewell et al., 2013). לרוב, כדי לקבוע שכיחות של פרטים באוכלוסייה יש לגדר את השטח ולפרוס מלכודות צמוד לה, או לבצע לכידות, סימון, שחרור ולכידה מחדש של הפרטים באוכלוסייה. לכן אין פלא שהתקבלו אי התאמות בין כימות ה-eDNA לבין הספירות. נוסף על כך, החוקרים לא הצליחו לקשר בין כמות ה-DNA לשכיחות הפרטים משום שקביעת שכיחות DNA מדויקת התקבלה רק בריכוזי DNA שהיו מתחת לגבול הכימות בכלים שעמדו לרשותם במחקר הנוכחי. ייתכן כי שימוש עתידי בכלים שיאפשרו לכמת DNA בריכוזים נמוכים מאוד יעזור לקביעת השכיחות על פי כמות ה-eDNA. עם זאת יש לזכור שיכולים להיות גורמים נוספים המשפיעים על הקשר בין כמות eDNA לשכיחות, כמו פיזור הטריטונים בבריכות, דרכי איסוף דגימות המים וגורמים סביבתיים המשפיעים על פירוק DNA. על פי גורמים שנמצאו משפיעים על פירוק eDNA במעבדה (Strickler et al., 2015) יש יסוד

סביר להניח שבריכות קרות יחסית, מוצלות ומוגנות מקרינת UV ובעלות pH בסיסי יותר שומרות לאורך זמן רב יותר על eDNA, לעומת בריכות חמות יותר, חשופות לשמש ובעלות pH ניטרלי או חומצי. מכיוון שהבריכות שחיים בהן טריטונים מהמין הנחקר משתרעות על פני שטח מגוון מבחינת תנאים א-ביוטיים אלה, כדאי יהיה בעתיד לבדוק את הקשר ביניהם לבין כמות ה-eDNA של הטריטונים בדגימות.

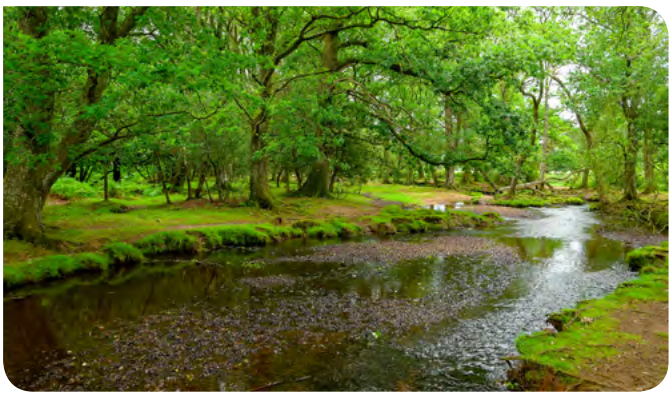
דרכים לשיפור השיטה

האופן שבו אפשר להפעיל את שיטת איסוף ה-eDNA עדיין חסר פרטים רבים: מהם המקומות המיטביים לאיסוף הדגימות? אילו הבדלים בייצור eDNA קיימים לאורך חייו של פרט ממין מסוים? כיצד משתנים ריכוזי eDNA של מין מסוים לאורך השנה? האם יעיל לאסוף eDNA גם ממשקעים בבריכה? כיצד מפוזר eDNA בבריכות והאם יש לכך השפעה על שימורו?

משקעי הבריכה יכולים להיות מקור מצוין ל-eDNA. במחקר שבדק eDNA של קרפיון נמצא שריכוזו במשקעים היה פי 8 עד 1800 יותר מאשר במים, ונשמר 152 ימים (Turner, 2015). לכן כדאי מאוד להימנע מזיהום של דגימות המים במשקעים מהקרקעית. בד בבד, באתרים שבהם ריכוז ה-eDNA במים נמוך ביותר, כמו אתרים שאוכלוסיית הטריטונים בהם קטנה במיוחד, דגימות מהקרקעית יכולות להיות חלופה אפשרית לדגימות המים.

גם אופן השמירה על הדגימות מהשטח ופרוטוקול מיצוי ה-DNA מהדגימות עשויים להשפיע על התוצאות המתקבלות. לדוגמה, במיצוי דגימות מים קפואות מתקבלת כמות נמוכה יותר של DNA (Takahara et al., 2014). חשוב ליצור אחידות בין שיטות מעבדה ושיטות בשטח בכל הנוגע לשמירת הדגימות ולפרוטוקול המיצוי, כדי שאפשר יהיה להשוות ביניהן. זאת במיוחד כשצפוי להתקבל שיעור נמוך של תוצאות שליליות או חיוביות כוזבות. לדוגמה, חדירה של מים ממקור מים אחר, נשאי DNA של דו-חיים כמו ציפורי מים, או תפעול שגוי של הפרוטוקול יכולים לגרום בשטח לזיהום של DNA ולהניב תוצאה חיובית כוזבת.

מכל אלה אפשר להבין עד כמה חשוב ליצור פרוטוקול עבודה אחיד בסטנדרטים גבוהים במיוחד במעבדה עבור דגימות eDNA, שיניב אפס תוצאות חיוביות כוזבות, כך שהתוצאות יהיו הדירות ומהימנות, בדומה לפרוטוקולים שפותחו לחקר DNA במאובנים ובממצאים היסטוריים (Knapp et al., 2012). שמירה על סטנדרטים גבוהים חשובה במיוחד בכל הנוגע להחלטות על מיזמים יקרים או משמעותיים בהיקפם, שקביעת השפעתם על הסביבה תלויה בנתונים על תפוצה של אורגניזמים וכמותם.



לאחר בדיקה על DNA ועל תאים של טריטון נערכה בדיקה מקדימה על DNA מדגימות של מי בריכות שבהן היה ידוע גודל אוכלוסיית הטריטונים

השלכות מעשיות על שימור הטריטון

כאמור, מחקר זה מראה שאיסוף eDNA הוא שיטה מהימנה לביצוע ניטור בהיקף רחב של תפוצת מינים הנמצאים בסכנת הכחדה באזורים נרחבים בבריטניה. די בדגימה אחת של eDNA כדי להחליף ארבעה ביקורים באתר והפעלת שלוש שיטות ניטור מסורתיות. איסוף הדגימה מהיר בהרבה מהפעלת שיטות מסורתיות, ועלות האנליזה במעבדה אינה גבוהה, בדומה לשיטות ניטור הנהוגות לבדיקת איכות המים מבחינה כימית. השיטות המסורתיות מסורבלות בשל כללי בטיחות המחייבים עבודה בזוגות וקבלת אישורים שונים ולכן מייקרים את עלות הפעלתן: עלות שיטת ה-eDNA בשדה ובמעבדה הייתה 140 יורו לאתר, לעומת 1450 יורו לאתר עבור הפעלת שיטות מסורתיות. בבדיקה שנעשתה בעבר הראו חוקרים שכדי לקבל תמונה מלאה על תפוצתו של הטריטון הנחקר יש צורך לנטר 110 בריכות באנגליה, 600 בריכות בוויילס ו-380 בריכות בסקוטלנד (Biggs et al., 2014). ארגון של ניטור בסדר גודל כזה הוא קשה ביותר כשיש צורך בארבעה ביקורים באתר והפעלת שלוש שיטות מסורתיות כדי לקבוע שהטריטון אינו נמצא באתר מסוים. כתוצאה מכך קשה להפעיל מערכים קיימים של תוכניות ניטור ומתנדבים וליצור מאגרי נתונים גדולים דים לניטור אוכלוסיית הטריטון בבריטניה. לעומת זאת, יצירת מערך ניטור באמצעות איסוף דגימות של eDNA יכול להיות חלופה ישימה גם למינים אחרים של אורגניזמים, כמו חסרי חוליות ודגים.

השלכות מעשיות על איסוף eDNA באמצעות מתנדבים

גיוס מתנדבים לניטור בשיטות מסורתיות כבר קיים והוכח כמוצלח (Botham et al., 2013), אולם איסוף eDNA יכול להגדיל באופן משמעותי את מגוון המינים המנוטר ואת שיתוף האוכלוסייה המקומית בניטורם. כרגע מבצעי ניטור באמצעות הציבור מוגבלים למינים מוכרים היטב מבחינה טקסונומית, כמו ציפורים, דו-חיים, צמחים, יונקים וחרקים. אורגניזמים שקשה להגדירם טקסונומית מוגדרים ברמות טקסונומיות גבוהות יותר, ולכן חלה פגיעה באיכות הניטור שלהם והם אינם נכללים בתוכניות ניטור או שימור. שימוש ב-eDNA יכול להעשיר את המינים שאפשר לנטר באופן שיטתי על ידי אנשים ללא הכשרה מקצועית בהגדרה טקסונומית, ולמנוע טעויות בהגדרה, שהן עיקר הדאגה של ניטור באמצעות הציבור הרחב. החוקרים מצפים שניטור באמצעות eDNA יגדיל את התעניינות הציבור בתיעוד ביולוגי במקווי מים, ויאפשר אבחון מהיר של מינים נדירים או בסכנת הכחדה, שלרוב דורשים השקעת זמן רב ומומחיות בשדה.

מקורות

Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Griffiths, R.A., Foster, J., Wilkinson, J., Arnett, A., Williams, P., Dunn, F. (2014): Analytical and methodological development for improved surveillance of the Great Crested Newt. Defra Project WC1067. Freshwater Habitats Trust: Oxford.

Botham, M.S., Brereton, T.M., Middlebrook, I., Randle, Z., Roy, D.B. (2013): United Kingdom Butterfly Monitoring Scheme Report for 2012. Centre for Ecology & Hydrology, Wallingford.

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.

Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. (2008): Species detection using environmental DNA from water samples. Biological Letters 4: 423–425.

Griffiths, R.A. (1985): A simple funnel trap for studying newt populations and an evaluation of trap behaviour in smooth and palmate newts, Triturus vulgaris and Triturus helveticus. Herpetology Journal 1: 5–10.

Jehle, R., Thiesmeier, B., Foster, J. (2011): The Crested Newt. Laurenti-Verlag, Bielefeld.

Knapp, M., Clarke, A.C., Horsburgh, K., Matisoo-Smith, E.A. (2012): Setting the stage–Building and working in an ancient DNA laboratory. Annals of Anatomy 194: 3–6.

Lodge, D.M., Turner, C.R., Jerde, C.L., Barnes, M.A., Chadderton, L., Egan, S.P., Feder, J.L., Mahon, A.R., Pfrender, M.E. (2012): Conservation in a cup of water: estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. Molecular Ecology 21 2555–2558.

McNemar, Q. (1947): Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. Psychometrika 12 (153): 157.

Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P. (2013): Estimating ccupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 70: 1123–1130.

Schmeller, D.S., Henry, P.Y., Julliard, R., Gruber, B., Clobert, J., Dziock, F., Lengyel, S., Nowicki, P., Deri, E., Budrys, E., Kull, T., Tali, K., Bauch, B., Settele, J., Van Swaay, C., Kobler, A., Babij, V., Papastergiadou, E., Henle, H. (2009): The advantages of volunteer-based biodiversity monitoring in Europe. Conservation Biology 23: 307–316.

Sewell, D., Beebee, T.J.C., Griffiths, R.A. (2010): Optimising biodiversity assessments by volunteers: the application of occupancy modelling to large-scale amphibian surveys. Biological Conservation 143: 2102–2110.

Strickler, K.M., Fremier, A.K., Goldberg, C.S. (2015): Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. Biological Conservation 183: 85-92.

Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H. (2014): Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (Cyprinus carpio). Biological Conservation 183: 64-69.

Thomsen, P., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E. (2012): Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molecular Ecology 21, 2565–2573.

Turner, C.R., Uy, K.L., Everhart, R.C. (2015): Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. Biological Conservation 183: 93-102.

Wilkinson, J.W., Arnell, A.P. (2013): NARRS Report 2007–2012: Establishing the Baseline (HWM Edition). ARC Research Report 13/01.

