

Sedimentti muinais-DNA ja sen käyttö muinaisen biodiversiteetin
tutkimuksessa

Taavi Kupila

LuK-tutkielma

Biologian tutkinto-ohjelma

Oulun yliopisto

Elokuu 2023

Sisällys

Tiivistelmä	3
1. Johdanto	4
2. Miten eDNA käyttäytyy solun lyysautumisen jälkeen, kun se vapautuu ympäristöön	5
2.1. DNA:n integroituminen muiden eliöiden genomeihin	5
2.2. Bioottinen hajottaminen	5
2.3. Abioottinen hajottaminen	6
2.4. DNA:n päätyminen sedimentteihin	7
2.5. sedaDNA:n säilyminen	7
2.6. SedaDNA:n iän määrittäminen	8
3. Näytteenotto ja kontaminaatoriskit	8
3.1. Sedimentin valintaan vaikuttavat tekijät	8
3.2. Sedimentin litologian vaikutus	9
3.3. Näytteenotto	10
3.4. Kontaminaatoriskit	10
3.5. Laboratoriovaatimukset	11
3.6. Kontaminaatioiden jäljitys	11
3.7. SedaDNA:n eristys	12
3.8. Sekvensointi	13
3.9. Bioinformatiikka	13
4. SedaDNA:n käyttö muinaisen biodiversiteetin tutkimuksessa	15
4.1. SedaDNA yhdistettynä muihin paleoekologisen tutkimuksen työkaluihin	15
4.2. Taksonin esiintyminen sedaDNA:ssa pitkällä aikavälillä	16
4.3. Lajit, joista ei jää fossiiliaineistoa	17
4.4. Ihmisen evolutiivinen historia	17
4.5. Muutokset sienten biodiversiteetissä indikoivat muutoksia ekosysteemitasolla	18
5. Johtopäätökset	18
Lähdeluettelo:	20

Tiivistelmä

Eliöistä säilyy ympäristössä jäänteitä DNA-molekyylien muodossa niiden elinkaaren päättymisen ja hajoamisen jälkeen. Nämä jäänteet kerääntyvät sedimentteihin, missä ne voivat säilyä jopa miljoonia vuosia. Näitä sedimenteissä säilyneitä DNA-molekyylejä (SedaDNA) voidaan eristää ja sekvensoida sedimenttinäytteistä. Tämä mahdollistaa alueen eliöiden esiintymisen tutkimisen nykyajasta miljoonienkin vuosien taakse.

Eliön elinkaaren päättyessä DNA-molekyyli vapautuu ympäristöön ja sen matka kohti sedimenttejä alkaa. DNA-molekyylit kohtaavat matkallaan sedimentteihin monia abiottisia ja bioottisia hajottajia, joiden takia vain erittäin pieni osa niistä päätyy sedimentteihin asti. Sedimentin saavuttavat DNA-molekyylit esiintyvät erittäin lyhyinä juosteina. DNA-molekyylien matkaa sedimentteihin suojaa niiden adsorptiokyky erilaisiin hiukkasiin. Sedimentteihin päästyään niitä puolestaan suojaa siellä vallitsevan suotuisat abiottisen olosuhteet. Nykyisillä molekyyli menetelmillä näitä helposti vahingoittuvia DNA-juosteita voidaan hyödyntää muinaisen biodiversiteetin tutkimiseen.

Eriytistä haastetta muinaisen biodiversiteetin tutkimiseen sedaDNA:n avulla tuo eristettyjen ja sekvensoitujen DNA-juosteiden lyhyt pituus. Tästä syystä tarvitaan erilaisia bioinformatiikan työkaluja ja tietokoneen laskentakykyä, jotta lyhyistä sedaDNA-juosteista voidaan tunnistaa mitä taksonia ne sedimenttinäytteessä edustaa.

On havaittu, että sedaDNA voi säilyä sedimenttiin päästyään erittäin hyvin. Tämä yhdistettynä sedimenttien hitaaseen kerrostumiseen, mahdollistaa eri taksonien esiintymisten tutkimisen pitkällä aikavälillä tietyllä alueella.

SedaDNA:n avulla muinaisen biodiversiteetin tutkimus on laajentunut ja tarkentunut eri taksonomisilla tasoilla paljon perinteisten tutkimusmenetelmien puutteita täydentäen. Nämä perinteiset menetelmät ovat pitkälti olleet riippuvaisia harvasta fossiiliaineistosta ja biomarkkereista, joiden taksonominen edustus on usein kapeaa.

SedaDNA:n käyttö tutkimuksessa on alkutaipaleellaan kun sen potentiaalia ollaan vasta ymmärtämässä. Sen käyttö kuitenkin vaatii standardoitujen tutkimusmenetelmien kehittämistä ja optimointia, jotta tulokset voivat olla luotettavampia. Varsinkin bioinformatiikan työkalujen nopea kehitys tarjoaa monia mahdollisuuksia sekä haasteita sedaDNA:n potentiaalın hyödyntämiseen.

1. Johdanto

Ympäristö-DNA eli eDNA (environmental DNA) tarkoittaa DNA:ta, jota ei ole eristetty suoraan eliöstä vaan ympäristönäytteestä, mikä voi olla esimerkiksi vesinäyte tai maaperänäyte. Sedimentti muinais-DNA (sedaDNA) voidaan määritellä olevan se osa eDNA:sta, joka on kasautunut sedimentteihin ja on peräisin eliöistä, jotka eivät ole fysiologisesti aktiivisia (Capo ym., 2021). Sedimentit ovat kerrostunutta maa-ainesta. Maa-aines kulkeutuu yleensä veden kuljettamana ja kerrostuu järvien, jokien ja merien pohjiin. Myös tuuli ja jäätikön liikkeet voivat aikaansaada sedimenttien kerrostumista. SedaDNA:ta voidaan eristää vesistöjen sedimenteistä merien, järvien ja jokien pohjista sekä luolista ja arkeologisista kaivauksista löytyvistä sedimenteistä. Myös ikiroudan alta löytyy runsaasti sedimenttejä, jotka ovat ympäristöolosuhteiltaan erinomaisia sedaDNA:n säilyvyyden kannalta. Vanhin eristetty sedaDNA näyte on 2 miljoonaa vuotta vanha (Kjær ym., 2022).

Ensimmäinen onnistunut sedaDNA monistus tehtiin bakteerin DNA:lle, joka eristettiin järven sedimentistä (Coolen & Overmann, 1998). Willerslev ym. (2003) onnistuivat puolestaan ensimmäisinä eristämään eukaryoottista sedaDNA:ta Siperiasta ikiroudan sedimenteistä sekä Uudessa-Seelannissa luolasedimentistä. Ensimmäisten sedaDNA tutkimusten jälkeen sedaDNA on otettu yhdeksi paleoekologisen tutkimuksen työkaluksi. SedaDNA:n avulla muinaista biodiversiteettiä on pystytty tutkimaan monipuolisemmin kun tutkimus ei ole rajautunut harvaan fossiiliaineistoon. Uuden sukupolven sekvensointimenetelmien kehittyminen on ollut tärkeä tekijä, joka on mahdollistanut sedaDNA:n laajan hyödyntämisen muinaisen biodiversiteetin tutkimuksessa (Dusseix ym., 2021). Etenkin viimeisen seitsemän vuoden aikana sedaDNA aiheisten julkaisujen määrä on kasvanut huomattavasti (Capo ym., 2021).

Sedimentteihin päätyvä DNA voi olla peräisin niin akvaattisista kuin terrestrisistäkin elinympäristöistä (Capo ym., 2021) ja kaikista eliöiden kunnista. Sedimenttien jatkuva kerrostuminen ja sedaDNA:n monipuolisuus mahdollistaa menneiden ekologisten yhteisöiden jälleenrakentamisen hyvällä taksonomisella ja ajallisella resoluutiolla (Dusseix ym., 2021). SedaDNA on lupaava ja nopeasti kehittyvä työkalu muinaisen biodiversiteetin tutkimuksessa, mutta silti on tehokkaampaa käyttää sitä yhdessä muiden työkalujen kuten siitepölyn ja makrofossiilien kanssa (Edwards, 2020; Pedersen ym., 2015).

Tutkielmani tavoitteena on tehdä kattava katsaus sedaDNA:han käyden läpi miten se käyttäytyy ympäristössä matkalla sedimentteihin ja sedimentissä, minkälaisia kokeellisia

menetelmiä sedaDNA tutkimuksessa on tänä päivänä käytössä ja minkälaisia puutteita niissä on sekä miten sedaDNA soveltuu muinaisen biodiversiteetin tutkimukseen.

2. Miten eDNA käyttäytyy solun lyysautumisen jälkeen, kun se vapautuu ympäristöön

DNA-molekyylit vapautuvat ympäristöön niin kuolleista kuin elävistäkin soluista. Kuolleista soluista DNA-molekyylit vapautuvat joko autolysin seurauksena tai hajottajien lyysaamana ja elävistä soluista sitä vapautuu ekskreetion eli aineenvaihdunnan ylijäämätuotteiden poiston kautta (Nielsen ym., 2007). Solusta ympäristöön vapautumisen jälkeen DNA-molekyyli voidaan hajottaa, integroida muiden eliöiden genomeihin tai se voi säilyä ympäristössä (Pedersen ym., 2015).

2.1. DNA:n integroituminen muiden eliöiden genomeihin

Osa eDNA:sta päätyy osaksi toisten eliöiden genomeita transformaation avulla. Ympäristössä tapahtuvaa luonnollista transformaatiota harjoittavat kompetentit mikrobit. Näitä ovat pääasiassa bakteerit ja arkit, mutta on myös eukaryooteista löytyä tähän kykeneviä, kuten pääjaksoon *Rotifera* kuuluvat *Bdelloidea*-luokan mikroeukaryootit (Pedersen ym., 2015). Transformaatio on tehokasta tuhansien emäsparien eli bp (base pair) pituisilla DNA-molekyyleillä (Pedersen ym., 2015). On kuitenkin havaittu sen onnistuvan myös paljon lyhyemmillä, vain jopa 20 bp pituisilla, ja pilkkoutuneilla DNA:n pätkillä, joka on eDNA:lle ominaista (Pedersen ym., 2015). Suurin osa mikrobien sisäänsä ottamasta DNA:sta kuitenkin hajotetaan muuhun käyttöön.

2.2. Biottinen hajottaminen

DNaasit ovat entsyymejä, jotka katalysoivat DNA:n fosfodiesterisidoksia hydrolysoivia reaktioita. DNA:n vapauduttua solusta ympäristöön ne altistuvat saprotrofien DNaaseille, jotka saavat hajottamastaan DNA:sta käyttöönsä hiiltä, typpeä, fosforia sekä nukleiinihappojen rakenneosia (Nielsen ym., 2007). Maaperässä DNA:n hajotus tapahtuu DNaaseilla, jotka sijaitsevat elävissä soluissa, kuolleissa soluissa tai solujätteen seassa (Nielsen ym., 2007). Maaperässä on myös solujen ulkopuolisia DNaaseja vapaana liuenneena tai adsorptoituneina saveen tai erilaisiin orgaanisiin aineisiin (Nielsen ym., 2007). Vesistöissä DNaasien adsorptio ja sitoutuminen kiinteisiin aineisiin on vähäisempää kuin maaperässä ja suurin osa DNaaseista ovatkin mikrobisoluissa (Nielsen ym., 2007). Sedimenteissä on maaperän kaltaisesti runsaasti aineita joihin DNaasit sitoutuvat ja adsorptoituvat (Nielsen

ym., 2007). Blum ym. (1997) havaitsi, että eDNA:n hajotuksesta vastaa pääasiassa bakteerien DNA:it eikä solujen ulkopuoliset DNA:it hajota DNA:ta kuin vain marginaalisen osuuden. Koska sedimenteissä DNA:it ovat pääasiassa adsorptoituneina ja sitoutuneina solun ulkopuolisiin aineisiin, ovat DNA-molekyylit paremmin suojassa hajottamiselta kuin vesistöissä, joissa tilanne on päinvastainen (Nielsen ym., 2007).

Myös DNA voi sitoutua mineraaleihin, humushappoihin tai muihin suuriin orgaanisiin molekyyliin ja varattuihin hiukkasiin adsorptiolla suojaten sitä nukleaasien toiminnalta (Pedersen ym., 2015). Savimineraalien on havaittu olevan hyviä sitomaan DNA:ta ja jotkin pystyvät sitomaan jopa omaa massaansa suuremman määrän DNA:ta suuren negatiivisesti varautuneen pintansa ansiosta (Pedersen ym., 2015). Hiekka ei toimi yhtä hyvänä DNA:n sitojana kuin savi pienemmän pintansa takia, mutta hiekan kyky sitoa ja sitä kautta suojata DNA:ta kasvaa divalenttien kationien, varsinkin Mg^{2+} - ja Ca^{2+} -konsentraatioiden lisääntyessä (Pedersen ym., 2015).

2.3. Abioottinen hajottaminen

DNA-korjausmekanismit eivät vaikuta kuolleiden solujen sisällä oleviin tai solujen ulkopuolisiin DNA-molekyyliin, mikä altistaa ne eri abioottisille tekijöille, jotka hajottavat DNA:ta. Varsinkin kosteissa olosuhteissa hydrolyysi, hapettuminen ja UV-säteily ovat keskeisiä hajottavia tekijöitä (Torti ym., 2015). Sedimenteissä valon ja hapen vähäisyys suojaa UV-säteilyn ja hapettumisen aiheuttamilta hajottamisilta.

Sedimenteissä DNA:n abioottisen hajoamisen pääaiheuttajana on hydrolyysi.

Hydrolyysireaktioita DNA:ssa on fosfodiesterisidosten katkaisemisen lisäksi depurinaatio, jossa puriiniemäs (adeniini tai guaniini) irtoaa johtaen yksijuosteisen DNA:n katkeamiseen (Torti ym., 2015). Arrheniuksen yhtälöllä voidaan ennustaa depurinaation nopeutta. Se hidastuu lämpötilan laskiessa. Lämpötilan lisäksi depurinaation vaikuttavia tekijöitä ovat pH ja ionikonsentraatio (Torti ym., 2015). Depyrimidaatio (sytosiinin ja tymiinin irtoaminen) puolestaan on verrattain vähäistä depurinaationa verrattuna, vain noin 5 % depurinaation määrästä (Torti ym., 2015). DNA:ta hajottava hydrolyysireaktio deaminaatio on myös yleinen. Deaminaatiossa aminoryhmä irtoaa DNA:n puriini- tai pyrimidiiniemäksestä. Kuten depurinaatiossa, myös deaminaation on havaittu lisääntyvän lämpötilan noustessa ja happamissa olosuhteissa (Torti ym., 2015). Vaikka sedimenteissä DNA on suojassa UV-säteilyltä ja hapettumiselta, voi DNA ennen sedimentteihin päätymistään vaurioitua runsaastikin näillä tavoilla.

2.4. DNA:n päätyminen sedimentteihin

DNA:n päätymiseen sedimentteihin vaikuttaa moni eri tekijä riippuen onko DNA:n alkuperä akvaattisissa eliöissä vaiko valuma-alueen terrestrisissä eliöissä. Akvaattisten eliöiden päätymiseen sedimentteihin vaikuttaa mm. kyseisen eliön määrä ja alueellinen jakautuminen sekä kyseisen taksonin paikka ravintoketjussa (Capo ym., 2021). Terrestristen eliöiden DNA:n sedimentteihin päätymiseksi on niiden kulkeuduttava valuma-alueelta vesistöihin, joten edellä mainittujen seikkojen lisäksi moni abioottinen tekijä on otettava huomioon kuten maaperän eroosio sekä jokien ja järvien yhdistyvyys ja verkostuneisuus (Capo ym., 2021).

2.5. sedaDNA:n säilyminen

DNA-molekyylien säilyvyyteen vaikuttavia tekijöitä sedimenttien ja veden rajapinnalla ja itse sedimenteissä on havaittu olevan niiden vallitsevat ympäristöolosuhteet. Ympäristön olosuhteista on havaittu ainakin lämpötilan, hapetusluvun ja pH:n vaikuttavan DNA:n hajoamisnopeuteen (Capo ym., 2021). Pelkkä DNA:n hajoamisnopeus ei kuitenkaan ole ainoa tekijä, jolla on vaikutusta kuinka hyvin DNA päätyy sedimenttiin, kuinka säilyneenä se sinne päätyy ja kuinka hyvin se sedimentissä säilyy. Kuten aiemmin mainittiinkin, on DNA-molekyylin adsorptiokyky havaittu olevan tärkeä tekijä DNA:n säilymisessä ja hajoamisen estossa. Adsorpoitu DNA saattaa kuitenkin desorptoitua takaisin pois sitoutuneesta mineraalista tai hiukkasesta. Tähän desorptioon vaikuttavia tekijöitä on havaittu olevan ainakin sedimentin mineraloginen koostumus, huokosveden pH sekä sedimentin kationien valenssit ja pitoisuudet (Capo ym., 2021). Voidaan siis olettaa ympäristön olosuhteiden muutoksilla olevan suuria vaikutuksia sedaDNA:n säilyvyyteen. Huonojen olosuhteiden kuten trooppisten lämpimien järvien tai syvänmeren hapettuneista sedimenteistä eristetyt ja analysoidut sedaDNA:t tukevat tätä oletusta. Näiden sedimenttien DNA:n säilyvyys on ollut heikkoa poislukien ylimmät sedimentit, jotka vastaavat noin viimeisten 200 vuoden kerrostumaa (Capo ym., 2021). Olosuhteiden vaikutuksista sedaDNA:n säilyvyyteen on kuitenkin tutkittu vielä rajallisesti, joten aihetta ei vielä kunnolla ymmärretä.

Diageneesi on sedimentissä sen kerrostumisen jälkeen tapahtuvia fyysisiä, kemiallisia ja biologisia muutoksia (Kuznetsova ym., 2019). Näitä muutoksia saa aikaan erilaiset sedimenteissä tapahtuvat geokemialliset prosessit (Kuznetsova ym., 2019). Diageneesin prosessit ovat usein erittäin hitaita ja kestävät pitkään. Järvien sedimenteissä tehdyt kokeet osoittavat ettei diageneesillä ole suurta vaikutusta eukaryoottisten mikrobien sedaDNA signaaliin eli DNA:n konsentraatioon sedimentissä (Capo ym., 2021). Varhaisen diageneesin

aikana bioottiset ja abioottiset tekijät voivat aiheuttaa ekstrasellulaarisen sedaDNA:n hajottamista (Capo ym., 2021). Solukalvon vahvuudet vaihtelevat eliöittäin, millä on todennäköisesti vaikutusta intrasellulaarisen DNA:n säilyvyyteen (Capo ym., 2021). Esimerkiksi terrestristen kasvien sisältämä ligniini polymeeri suojaa intrasellulaarista DNA:ta näiden elöiden soluissa paremmin kuin verrattuna moneen akvaattiseen tuottajaan kuten suurimpaan osaan levistä ja makrofytyteihin, joissa ligniiniä ei tuoteta (Capo ym., 2021).

2.6. SedaDNA:n iän määrittäminen

Useat sedaDNA tutkimukset olettavat sedaDNA:n iän olevan sama kuin sedimentin kerros, josta se on eristetty. Tutkimusalueen sedimenttien eri kerrosten geologisen stratigrafian tuntemus onkin erittäin tärkeää sedaDNA:n iän sijoittamiseksi oikeaan aikaan. Iän määrittämisessä voidaan käyttää mm. fossiilien radiohiiliajoitusta eli hiilen isotooppien runsauksien mittaamiseen perustuvaa menetelmää ja geokemiallisia analyysejä (Alsos ym., 2020).

SedaDNA ei kuitenkaan välttämättä ole saman ikäistä sedimentin kerroksen kanssa, josta se löytyy. Haile (2007) osoitti, että tietyissä olosuhteissa sedaDNA voi penetroitua vanhempiin sedimentin kerroksiin todennäköisesti virtsan mukana. Tämä ilmiö kuitenkin rajoittui vain eläimiin, jotka tuottivat paljon virtsaa (Haile ym., 2007). Tätä pystysuuntaista sedaDNA:n liikettä havaittiin vain alaspäin. Tätä ilmiötä ei ole myöskään havaittu järvien tai ikeroudan tai hiljattain jäätyneiden alueiden sedimenteissä, vaan kuivemmissä ympäristöissä kuten luolien sedimenteissä ja maaperässä (Jia ym., 2022; Pedersen ym., 2015). Sedimenttien uudelleen kerrostuminen onkin suurempi haaste sedaDNA:n iän oikein määrittämisessä (Pedersen ym., 2015).

3. Näytteenotto ja kontaminaatoriskit

SedaDNA on luonteeltaan hyvin pilkkoutunut, joten eristetyt DNA-molekyylit ovat erittäin lyhyitä. Tämä tuottaa sekvensoimisessa ja bioinformatiivisissa analyyseissä omia haasteitaan. DNA:n määrä näytteessä on myös erittäin vähäinen. SedaDNA onkin hyvin riskialtis kontaminaatioille. Seuraavassa osiossa tulen käymään läpi minkälaisia kokeellisia menetelmiä sedaDNA:n käsittely vaatii.

3.1. Sedimentin valintaan vaikuttavat tekijät

SedaDNA tutkimuksissa sedimentin valintaan on tärkeä huomioida eri tekijät, jotka vaikuttavat sedaDNA:n säilymiseen, mitä taksonia sedimentistä mahdollisesti löytyy ja miltä

alueelta ne ovat peräisin. Denisovanihmisen jäänteitä on löytynyt Etelä-Siperiassa sijaitsevasta Denisovan luolasta. Zavala ym. (2021) käytti samasta luolasta löytyviä sedimenttejä sedaDNA:n lähteenä tutkiessaan alueen muinaisten hominiinien asumista paremmalla tarkkuudella eri aikoina verrattuna mitä niukalla fossiiliaineistolla pystyttiin saavuttamaan. Muinaista biodiversiteettiä ja paleoekologiaa tutkiessa tällaisen luolan sedimentit eivät olisi optimaalisimpia näytteenottoaikoja. Tähän tarkoitukseen soveltuu paremmin järvien sedimentit. Järvien sedimentit ovat havaittu erittäin hyviksi sedaDNA tutkimuskohteiksi, koska ne sisältävät orgaanista ainesta niin järven valuma-alueelta kuin itse järvestäkin (Jia ym., 2022). Varsinkin ylänköjen, vuoristoisten, boreaalisten ja arktisten alueiden järvet ovat usein alhaisten lämpötilojen, pohjaveden vähäisen hapen ja vähäisen bioturbaation (eli maaperän ja sedimentin uudelleenkasittelyä eläinten ja kasvien toimesta) takia sedaDNA:n säilymiseen hyviä (Capo ym., 2021).

Myös terrestristen elöiden paleoekologiaa tutkiessa on hyvä huomioida järven ja sen valuma-alueen kokosuhteita, topografiaa ja hydrologista verkostuneisuutta, jotka voivat vaikuttaa eroosionopeuksiin ja sitä kautta elöiden edustukseen sedaDNA:ssa (Capo ym., 2021).

Esimerkiksi jos järveen ei tule suuria sisäänvirtauksia tai ne tulevat alueilta, joissa korkeuserot ovat hyvin pieniä, edustaa järven kasvi sedaDNA lähinnä järven ja sen välittömän läheisyyden kasvistoa (Capo ym., 2021).

Myös sedaDNA:n säilymiseen liittyy taksonomista vaihtelua. Akvaattisilla eliöillä saattaa olla parempi mahdollisuus säilyä sedimenteissä verrattuna terrestrisiin eliöihin, koska ne eläessään ovat jo valmiina vesistössä ja kuollessaan voi vajota suoraan vesistön pohjaan ja hautautua sedimenttiin suoraan ilman, että sen pitää ensin kulkeutua jostain kauempaa samalla altistuen monelle DNA:ta hajottavalle tekijälle (Jia ym., 2022). Kuivien alueiden sedaDNA:n kulkeutumisprosesseja ei ole tutkittu.

3.2. Sedimentin litologian vaikutus

Sedimentin litologia kuvaa sedimentin rakenneosien fysikaalisia ominaisuuksia kuten mineraalikoostumusta ja raekokoa. Sedimentin litologia on myös hyvä ottaa tutkimuksissa huomioon, koska sen vaihtelulla voi olla vaikutusta sedaDNA:n PCR:n onnistumiseen (Capo ym., 2021). DNA:ta eristäessä sedimentistä mukana voi eristyä epäpuhtauksia kuten humusaineita ja raskasmetalleja, jotka voivat toimia inhibiittoreina haitaten PCR:ää tai muita nukleiinihappoanalyysejä (Armbrecht ym., 2020; Capo ym., 2021). Capo ym. (2021) huomasi vertailemalla sedimentin eri kerroksia, että mineraalirikkaammassa kerroksissa, joiden ikä oli

noin 32000 - 21000 vuotta, inhibiitotekijöiden vaikutus PCR:n onnistumiseen oli hyvin vähäistä. Nuoremmat enemmän orgaanista ainesta sisältävät kerrokset puolestaan sisälsivät enemmän inhibiitiota, mutta nämä vaikutukset olivat hyvin vaihtelevia eikä selkeää suhdetta inhibiitiolla ja sedimenttityypillä ollut havaittavissa (Capo ym., 2021). Sedimentin nuorimpaa kerrosta lähestyessä inhibition määrä taas laski. Selkein tulos, jonka Capo ym. (2021) löysi, oli vahva negatiivinen korrelaatio PCR:n inhibiition määrän ja amplifioidun sekä sekvensoidun kasvi DNA:n määrän välillä. Aihe on kuitenkin vielä hyvin tuntematon ja tarvii lisätutkimuksia ennen kuin suurempia johtopäätöksiä litologian vaikutuksista voidaan tehdä.

3.3. Näytteenotto

Sedimentit, joihin halutaan päästä käsiksi ovat usein järven tai meren pohjassa syvällä, joten niihin käsiksi pääsy ei ole aina kovin helppoa ja sedaDNA:n luonteen takia vaatii erityistä varovaisuutta kontaminaatioriskien minimoimisiksi. Näyte otetaan tyypillisesti poralla, joka ottaa pitkän lieriön muotoisen ydinnäytteen sedimentistä (Alsos ym., 2020; Armbrrecht ym., 2020). Pitkä ydinnäyte edustaa montaa eri sedimentin kerrosta, joiden iät voivat erota tuhansillakin vuosilla (Lammers ym., 2021). Järvessä näyte otetaan yleensä syvimmästä kohdasta, koska geneettisen materiaalin oletetaan jakautuvan homogeenisesti järven sedimentteihin, tehden siitä parhaimman edustuksen koko valuma-alueen biodiversiteetistä (Capo ym., 2021). Tämä voi ollakin hyvä taktiikka, kun tutkitaan plankton tason eliöitä, jotka jakautuvat vesistöön homogeenisemmin. Mutta esimerkiksi suurten akvaattisten eliöiden kuten kalojen DNA voi jakautua hyvinkin heterogeenisesti vesistössä. Tiedetään kuitenkin, että fossiileilla ja orgaanisella aineella voi olla hajanaista jakautumista koko järvioltaan alueella (Capo ym., 2021). Useamman ydinnäytteen ottamisella voidaan tutkia kohde alueen sedaDNA signaalin tasaisuutta sekä alueellista vaihtelua.

Luolien sedimentteihin voidaan päästä suoraan käsiksi, jolloin näyte voidaan ottaa suoraan halutusta sedimentin kerroksesta. Tällaiset sedimentit ovat erityisen herkkiä kontaminoitumaan modernilla DNA:lla. Zavala ym. (2021) keräsi Denisovan luolasta sedimenttinäytteet suoraan kohteesta ensin poistaen 1cm paksuisen kerroksen steriloidulla skalpellilla, jonka jälkeen he ottivat näytteet suoraan sedimentistä uudella skalpellilla.

3.4. Kontaminaatioriskit

SedaDNA:ta on määrällisesti hyvin vähän ja sedaDNA juosteet ovat hyvin lyhyitä (Armbrrecht ym., 2020; Capo ym., 2021; Orlando ym., 2021). Armbrrecht ym., (2020) sekvensoi merisedimentistä 143 miljoonaa juostetta, joiden pituus vaihteli 27 bp ja 125 bp

välillä. SedaDNA on hyvin riskialtista kontaminaatioille kaikissa sen käsittelyn vaiheissa. Näytteenotossa ja näytteiden säilytyksessä ennen laboratorioanalyysijä näyte on suuressa riskissä kontaminoitua modernilla DNA:lla työvälineistä ja näytteiden ottajista.

Sedimenttinäytteen säilytyksessä riskinä on myös sedaDNA:n bioottinen ja abioottinen hajoaminen (Capo ym., 2021). Lyhytkin altistus hapelle voi aiheuttaa bakteerien ja sienten nopean kasvun, jotka käyttävät nukleiinihappoja substraatteina hajotusprosesseissa (Capo ym., 2021). Tämä mikrobien määrän kasvu kasvattaa mikrobisten eliöiden DNA-poolia, joka saattaa väärentää tutkimuksen tuloksia sedaDNA-signaalin luotettavuudessa. Hydrolyysisekä hapetusreaktiot voivat myös hajottaa sedaDNA:ta näytteenoton ja säilytyksen aikana.

3.5. Laboratoriovaatimukset

Näytteenotossa ja säilytyksessä esiintyvät riskit eivät katoa kun näytteitä aletaan käsittelemään ja analysoimaan laboratoriossa. Muinais-DNA:ta (aDNA) on määrällisesti paljon vähemmän moderniin-DNA:han (mDNA) verrattuna. Näytteiden kontaminoituessa mDNA:lla on PCR:ssä suuri riski, että mDNA:ta amplifioidaan eDNA:n tai aDNA:n sijasta (Capo ym., 2021). Ympäristö-DNA:n käsittelyssä on käytettävä erillistä pre-PCR laboratoriota, jotta näytteet eivät kontaminoituisi PCR tuotteilla. Myös modernin DNA:n aiheuttama kontaminaatoriski on suuri. Muinais-DNA on modernia eDNA:ta vielä haavoittuvaisempaa kontaminaatioille DNA-molekyylien hyvin vähäisen määrän ja niiden lyhyen pituuden vuoksi (Orlando ym., 2021). Muinais-DNA:n käsittelyssä käytettävät laboratoriot sijaitsevat usein eri rakennuksissa kuin post-PCR laboratoriot ja niitä pidetään mahdollisimman steriileinä positiivisella ilmanpaineella, filteröidyllä ilmalla, päivittäisellä UV-valotuksella ja pintojen pyyhkimisellä valkaisuaineella (Orlando ym., 2021).

3.6. Kontaminaatioiden jäljitys

SedaDNA tutkimuksissa kontaminaatioita voidaan jäljittää monin eri keinoin ja eri vaiheissa näytteiden käsittelyä. Yksi keino on näytteitä ottaessa päällystää työkalujen pinnat jollain helposti tunnistettavalla DNA-jäljittimellä, jota ei todennäköisesti löydy tutkittavasta kohteesta (Capo ym., 2021; Pedersen ym., 2015). Tällä voidaan varmistaa että vain sedimenttinäytteiden sisemmät kontaminaatiovapaat osat analysoidaan. Negatiivisia kontrollinäytteitä on hyvä ottaa systemaattisesti eri välivaiheissa kuten näytteenottoaikalla ja laboratoriossa reagensseista, jotta voidaan havaita missä kohtaa mahdollinen kontaminaatio on tapahtunut (Pedersen ym., 2015). Tämä on tärkeää, koska uuden sukupolven sekvensointitekniikoilla voidaan sekvensoida erittäin pieniäkin määriä kontaminaatteja

(Pedersen ym., 2015). Muinais-DNA:ta käsitellessä positiivisten kontrollien ottamista tulisi välttää tai käsitellä ne fyysisesti eri laboratoriossa ristikontaminaation välttämiseksi (Capo ym., 2021).

3.7. SedaDNA:n eristys

Sedimenttinäytteestä DNA:n eristys ei ole yhtä helppoa kuin suoraan eliöstä (esim. kudoksesta) eristettäessä. Sedimenttinäytteet niin kuin muutkin ympäristönäytteet sisältävät hyvin paljon vaihtelua niiden koostumuksissa ja ominaisuuksissa, ettei ole olemassa yhtä universaalia eristysprotokollaa, jolla saataisiin eritettyä DNA:ta samalla tehokkuudella eri näytteistä (Pedersen ym., 2015). Eristysprotokolla on valittava sedimentin ominaisuuksien sekä tutkittavan taksonin mukaan. Eristettävä DNA voi olla intrasellulaarista eli edelleen solun sisällä solurakenteiden suojaamana (Capo ym., 2021), jolloin eristys voi suosia tiettyjä taksoneita, joiden solurakenne ei ole yhtä suojaava kuin toisen. Merissä niin eläin- kuin kasviplanktonienkin morfologioissa on suuriakin eroavaisuuksia. Kolmen suuren kasviplanktonryhmän piilevien, panssariisiimaeliöiden ja kokkolitoforien ulkoisen solukalvon rakenne eroaa hyvinkin paljon (Armbrecht ym., 2020). Yleisten DNA:n eristys protokollien käyttö merisedimenteissä johtaa huonoon taksonomiseen kattavuuteen näiden eliöiden välisten morfologisten vaihtelevuuksien seurauksesta (Armbrecht ym., 2020).

Ekstrasellulaarinen DNA puolestaan adsorboidaan savimineraalien toimesta sedimenteissä, jolloin sen eristämismetodillaan olisi lisättävä DNA:n desorptiota lisääviä tekijöitä kuten Taberlet ym. (2012) protokollassa käytettävää fosfaattipuskuria. Sedimentin litologiset ominaisuudet vaikuttavat eristysprotokollan tehokkuuteen. Capo ym. (2021) osoitti, että karbonaattirikkaissa sedimenteissä perinteiset sedimentti-DNA eristysprotokollat kuten PowerSoil Kit tuottavat huonommat eristystuoton verrattuna sedimenteihin, jotka koostuvat enemmän orgaanisesta aineksestä. Inhibiittoreiden eristys DNA:n mukana on myös ongelmana etenkin sedimenteissä, joiden koostumuksessa on runsaasti orgaanista ainetta (Capo ym., 2021). Inhibiittorit voivat olla ongelmallisia näytteiden myöhemmissä käsittelyn vaiheissa kuten PCR:ssä (Armbrecht ym., 2020; Orlando ym., 2021).

Suurimmassa osassa tutkimuksissa on kuitenkin parasta käyttää eristysprotokollaa, joka pystyy eristämään niin intra- kuin ekstrasellulaarisen DNA:n ja sisältää fyysisen lyysausvaiheen, jolla parannetaan eri taksonien havaitsemista (Capo ym., 2021). Protokollan valintaan vaikuttaa kuitenkin eniten tutkimusryhmien oma menestys tietyn eristysprotokollan kanssa (Capo ym., 2021).

3.8. Sekvensointi

Sekvensointidatan keräämiseksi sedaDNA tutkimuksissa käytetään PCR:ään pohjautuvia menetelmiä tai metagenomisia menetelmiä, joissa voidaan teoreettisesti sekvensoida joko kaikki näytteen DNA-molekyylit haulikkosekvensoinnilla (shotgun sequencing) tai kohdennetusti vain halutut genomien osat sekvensoiden (Capo ym., 2021; Jia ym., 2022).

PCR:ää käytetään DNA-viivakoodauksessa kun tutkimuksen kohteena on joku tietty laji ja sen esiintyminen näytteessä (Capo ym., 2021; Taberlet ym., 2012). DNA-viivakoodauksella tarkoitetaan lajin tunnistamista lajille ominaisen standardoidun DNA-sekvenssin avulla (Taberlet ym., 2012). Metaviivakoodauksella tarkoitetaan menetelmää, jossa DNA-
viivakoodausta käytetään tunnistamaan kaikki näytteen sisältämät lajiryhmät yhdellä kokeella (Taberlet ym., 2012). Metaviivakoodauksessa käytetään universaaleja alukkeita, joilla pystytään monistamaan useampaa taksonia yhtäaikaaisesti PCR:ssä (Pedersen ym., 2015).

Metaviivakoodaus voi kuitenkin olla ongelmallista sedaDNA:ta tutkiessa. PCR suosii pidempiä DNA-pätkiä, jolloin pienikin moderni-DNA kontaminaatio on ongelmallinen, koska aDNA on hyvin pilkkoutunutta ja lyhyttä (Armbrecht ym., 2020; Orlando ym., 2021). Sedimentinäytteissä on myös erittäin vähän itse sedaDNA:ta. Vähäinen templaattidNA:n määrä aiheuttaa satunnaista suosimista PCR:n ensimmäisten syklien aikana (Armbrecht ym., 2020). Näytteestä vahingossa mukana eristyvät epäpuhtaudet ovat myös ongelma niiden toimiessa inhibiittoreina PCR:ssä (Armbrecht ym., 2020; Capo ym., 2021; Orlando ym., 2021).

Metagenomisilla menetelmillä pystytään sekvensoimaan todella lyhyitä DNA-molekyylejä, joita ei PCR:n avulla pystytä monistamaan (Capo ym., 2021). Varsinkin haulikkosekvensointi välttää PCR:n ongelmat suosimisen kanssa (Capo ym., 2021). Metagenomiset menetelmät kykenee myös sekvensoimaan lyhyiden aDNA-molekyylien päät, joita ei PCR:llä pystytä käsittelemään (Capo ym., 2021). Nämä sekvensoidut molekyylien päät paljastavat aDNA:lle tyypilliset vauriot ja sen avulla auttaa tunnistamaan moderni-DNA:n kontaminaatiot, joissa samoja tyypillisiä vaurioita ei ole havaittavissa (Capo ym., 2021). Nämä vauriot ovat deaminaation aiheuttamia sytosiinien ja tymiinin substituutioita (Jia ym., 2022).

3.9. Bioinformatiikkaa

Bioinformatiikan työkaluja tarvitaan, jotta sekvenssidatasta voidaan saada tuloksia. Tällä hetkellä ei ole olemassa standardoitua prosessia sedaDNA-datan käsittelylle kummallekaan

sekvensointimenetelmälle (metaviivakoodaus- ja metagenominen-data), koska datan filteröinnin ja puhdistuksen kriteerit ovat vielä kehittyä vaiheessa (Capo ym., 2021). Tässä osiossa tulen kuitenkin kertomaan sedaDNA tutkimuksissa hyödynnettävistä bioinformatiikan menetelmistä sekä niissä havaittavista puutteista. Tuon myös esiin muutaman yleisimmin käytetyn ohjelmiston, joilla sedaDNA aineistoja analysoidaan.

Negatiivisissa kontroleissa useammin kuin näytteissä havaittavat taksonit voidaan poistaa aineistosta (Capo ym., 2021). Vaikka tämä on yleensä hyvä kriteeri, on silti mahdollista, että poistetaan oikeasti läsnäolevia taksoniteita tai jätetään poistamatta sellaisia taksoniteita, jotka eivät oikeasti ole läsnä (Capo ym., 2021). Näiden virheiden välttämiseksi sedaDNA aineistoa voidaan verrata muihin itsenäisiin tutkimusmenetelmiin, jotta voidaan todentaa eri taksonien mahdollista läsnäoloa sedimenteissä (Capo ym., 2021). Näitä voivat olla muun muassa makrofossiili- ja siitepölyanalyysit. Kun tämä ei ole mahdollista voidaan filteröintiä suorittaa esimerkiksi asettamalla maantieteellisiä rajoja sulkemalla aineistosta pois taksonit, jotka eivät eliömaantieteellisesti todennäköisesti esiinny alueella (Capo ym., 2021). Tämä todennäköisesti kuitenkin suosii liikaa nykyajan taksonomista biodiversiteettiä (Capo ym., 2021). Metagenomisen aineiston filteröinnissä hyvin vähäiset osumat (esim. alle 5 yhdessä näytessä) poistetaan virheellisinä ja asetetaan hyvin tarkka minimipituus sekvensseille (esim. 35 bp) väärin osumien vähentämiseksi (Capo ym., 2021).

Sekvensoitujen näytteiden taksonien tunnistamiseksi tarvitaan tietokantoja, joihin niitä voidaan verrata. Vaikka sekvenssitietokantoja on useita ja ne sisältävätkin erittäin paljon sekvenssidataa, ei niiden sisältö ole kaikkien erilaisiin tutkimuksiin sopivaa. Useimmiten metagenomisissa tutkimuksissa suurinta osaa sekvensseistä (>90 %) ei voida tunnistaa minkään taksonin alle pääasiassa vertailugenomien puutteen takia tietokannoissa (Jia ym., 2022). Väärät positiiviset osumat tietokannoissa johtuu usein virheistä tietokannoissa (Capo ym., 2021). Väärä positiivinen osuma voi johtua myös siitä, että jollain toisella taksonilla on myös sama sekvenssi ja oikea taksoni puuttuu tietokannasta kokonaan (Capo ym., 2021). Genomisissa tietokannoissa on myös yleisesti vahva painotus nisäkkäisiin, patogeenisiin mikrobeihin ja maataloudessa tai lääketieteessä hyödynnettäviin kasveihin (Jia ym., 2022). Tietokantojen ongelmia voidaan ratkoa luomalla spesifisiä tietokantoja esimerkiksi maantieteen tai taksonien mukaan. Esimerkiksi Wang ym. (2021) rakensivat PhyloNorway kasvigenomi tietokannan sekvensoimalla 1541 arktista ja boreaalista kasvilajia. Tämän kaltaisilla tietokannoilla voidaan vähentää sekvenssien väärin tunnistamisia.

Bioinformatiikan hyödyntämiseen tarvitaan siihen soveltuvia ohjelmistoja, jotka pystyvät käsittelemään uuden sukupolven sekvensoinnilla (NGS) tuotettuja erittäin suuria aineistoja. Metaviivakoodaustutkimuksissa yleisimmin käytetty ohjelmisto on OBITOOLS, joka on luotu varta vasten NGS-datalle DNA-metaviivakoodaus kontekstissa (Boyer ym., 2016). OBITOOLS-ohjelmistolla voidaan luoda standardoituja analyttisiä prosesseja datan filteröinniksi, puhdistamiseksi ja editoinniksi samalla taksonomisesti lajitellen aineistoa (Boyer ym., 2016). Metagenomista dataa analysoidessa yleisesti käytetty ohjelmisto MEGAN vertaa aineiston sekvenssejä BLAST-työkalulla tai vastaavalla työkalulla tietokantoihin, joista löytyy sekvenssejä kaikista taksonomisista ryhmistä (Huson ym., 2007). Tämän jälkeen MEGAN laskee näytteen taksonomisen sisällön ja asettaa osumat järjestykseen lähinten yhteisten esi-isien perusteella niin että sekvenssille laskettu taksoni kuvastaa kyseisen sekvenssin säilymistä (Huson ym., 2007). Edellä mainitut ohjelmistot kehittyvät ja päivittyvät jatkuvasti, mutta on myös olemassa lukuisia muitakin ohjelmistoja, joiden avulla sedaDNA dataa käsitellään ja analysoidaan.

4. SedaDNA:n käyttö muinaisen biodiversiteetin tutkimuksessa

Muinais-DNA:n käyttö muinaisen biodiversiteetin tutkimuksessa rajoittui pitkään harvaan fossiiliaineistoon. Löydetyt fossiilit mahdollistivat aDNA:n käsittelyn kehittymisen, jonka ansiosta opittiin jälleenrakentamaan muinaisia paleoekologisia tapahtumia ja sitä kautta opittiin paljon monesta evolutiivisesta ja ekologisesta prosessista (Willerslev ym., 2003). Kokeelliset vaikeudet rajoittivat kuitenkin fossiiliaineiston käyttöä muinaisen biodiversiteetin tutkimuksessa ja hyvin säilyneet fossiilit, joista aDNA:ta pystyttiin eristämään ja analysoimaan olivat harvassa (Willerslev ym., 2003). Willerslev ym. (2003) osoitti läpimurtavassa tutkimuksessaan, että myös eukaryoottien DNA säilyy sedimenteissä fossiilien ulkopuolella ympäristö-DNA:na. Seuraavassa osiossa käyn läpi sedaDNA:n potentiaalinen muinaisen biodiversiteetin tutkimuksessa ja miten se vertaa muihin paleoekologisissa tutkimuksissa käytettyihin työkaluihin.

4.1. SedaDNA yhdistettynä muihin paleoekologisen tutkimuksen työkaluihin

Makrofossiilien lisäksi sedimenteistä löydettiin paljon mikroskooppisia fossiileita, jotka olivat sen verran hyvin säilyneitä, että niitä pystyttiin tunnistamaan morfologiansa perusteella (Capo ym., 2021). Kuitenkin vain hyvin rajallinen määrä niin akvaattisia kuin terrestrisiä eläin eliöryhmiä jättää tällaisia jäänteitä (esim. sienitiöt, siitepöly ja piilevät), joten suuri osa biologisesta diversiteetistä jää edelleen tutkimusten ulkopuolelle (Capo ym., 2021).

Ympäristöissä, joissa mikrofossiilien säilyvyys on huonompaa käytettiin erilaisia biomarkkereita (esim. lipidit ja pigmentit) tukemaan mikrofossiiliaineistolla tehtyä tutkimusta muinaisesta biodiversiteetistä (Capo ym., 2021). Nämäkin keinot ovat kuitenkin usein puutteellisia taksonomisen tarkkuudensa kanssa.

Willerslev ym. (2003) osoitti, että sedimentteihin jää DNA-jälkiä monista eri eliöryhmistä kuten kasveista ja nisäkkäistä. Esimerkiksi he havaitsivat Siperiasta ikiroudan sedimenteistä villamammutin (*Mammuthus primigenius*) DNA:ta sekä Uuden-Seelannin luolasedimentistä kahden eri sukupuuttoon kuolleen moa-linnun (*Megalapteryx didinus* ja *Pachyornis elephantopus*) DNA:ta (Willerslev ym., 2003). Tämän jälkeen useat tutkimukset ovat onnistuneet käyttämään eukaryoottista eDNA:ta muinaisen biodiversiteetin tutkimuksessa, osoittaen eDNA:n olevan hyvä työkalu myös ei-mikrobisten eliöiden tutkimuksessa (Pedersen ym., 2015). Vaikka nykyisin sedaDNA:ta käytetään paljonkin tutkimuksissa, sen tuntemuksessa on vielä paljon aukkoja ja sedaDNA-datan luotettavuuden parantamiseksi on tehtävä vielä paljon tutkimusta (Capo ym., 2021). SedaDNA ei itsenäisesti ole vielä täydellinen keino selvittää muinaista biodiversiteettiä vaan tutkimusten luotettavuuden kannalta se toimiikin paremmin yhdessä muiden paleoekologisten tutkimusmenetelmien kuten mikrofossiili- ja biomarkkerianalyyysien kanssa (Pedersen ym., 2015).

4.2. Taksonin esiintyminen sedaDNA:ssa pitkällä aikavälillä

Sedimentit kerrostuvat usein jatkuvasti ja pitkällä aikavälillä ja samalla sedimenttien kerrostuessa niihin hautautuu eDNA:ta (Dussex ym., 2021). Tämä mahdollistaa menneiden ekologisten yhteisöiden jälleenrakentamisen hyvällä taksonomisella ja ajallisella resoluutiolla (Dussex ym., 2021). SedaDNA mahdollistaa taksonin paikallisen ensimmäisen (FAD, first appearance date) ja viimeisen esiintymispäivän (LAD, last appearance date) määrittämisen ilman fossiiliaineiston läsnäoloa (Dussex ym., 2021). LAD:n avulla voidaan ajoittaa lajien sukupuuttoon kuolemisia ja FAD:n avulla yhdistää lajien saapumista tietyille alueille tiettyinä ajankohtina, joilla voi olla suuriakin ekologisia merkityksiä ja vaikutuksia kuten vieraslajin saapuminen eristäytyneelle saarelle tai jäätikön sulamisen jälkeinen lajiston kehitys (Dussex ym., 2021). Metagenomiset sekvensointi menetelmät mahdollistavat haplotyyppisen geneettisen informaation keräämisen suoraan sedaDNA:sta mahdollistaen populaatiotason geneettisten muutosten tutkimisen kuten alleelien saapumisen ja katoamisen populaatiossa (Dussex ym., 2021). SedaDNA:lla on monia sovellutuksia muinaisen biodiversiteetin

tutkimuksessa. Seuraavassa osiossa esittelen eri esimerkkejä tutkimuksista, joissa sedaDNA:ta on hyödynnetty.

4.3. Lajit, joista ei jää fossiiliaineistoa

SedaDNA:n avulla voidaan tutkia lajeja, joista ei jää fossiiliaineistoa (Lammers ym., 2021). Lammers ym. (2021) käytti sedaDNA:ta viimeisimmän jääkauden huippukohtaan ajalta yli 17 tuhannen vuoden takaa jälleenrakentaakseen leväsuvun *Nannochloropsis* mitokondriaaliset ja kloroplastiset genomit. Tutkijat havaitsivat kaksi merkittävää haploryhmää kummastakin organellogenomista, jotka voitiin määritellä tunnetuksi lajiksi *N. limnetica* (Lammers ym., 2021). Lammers ym. (2021) osoitti haulikkosekvensoinnin ja järvi sedaDNA:n potentiaalin paljastaa populaatiotason geneettistä informaatiota lajista, joka ei säily fossiilina.

4.4. Ihmisen evolutiivinen historia

Denisovan luola on Etelä-Siperiassa Altai-vuoristossa olevan arkeologinen kohde, josta on löydetty useita homiinien jäänteitä (Zavala ym., 2021). Näihin kuuluu niin denisovanihminen kuin neandertalinihminen sekä näiden yhteinen lapsi (Zavala ym., 2021). Fossiiliaineiston perusteella on kuitenkin epäselvää milloin nämä ryhmät ovat asuttaneet aluetta ja missä järjestyksessä sekä mitä muita eläimiä aluetta on asuttanut samoihin aikoihin (Zavala ym., 2021). Zavala ym. (2021) käytti samasta luolasta kerättyä sedaDNA:ta selvittääkseen alueen asuttamisen historiaa ja saadakseen vastauksia aukkoihin tiedossamme kyseisten homiinien evolutiivisesta historiasta. Zavala ym. (2021) tunnisti 175 sedimenttinäytteestä muinaisten homiinien mitokondriaalista DNA:ta sekä 685 näytteestä useiden eri suurten nisäkkäiden DNA:ta. Tämä suuri geneettisen informaation määrä verrattuna harvaan fossiiliaineistoon mahdollisti aluetta asuttaneiden lajien ajoittamisen oikeaan aikakauteen (Zavala ym., 2021).

Havaitun denisovanihmisen mitokondriaalisen DNA:n ajoitus tuki myös aiempien paleontologisten tutkimusten hypoteesia, jonka mukaan pleistoseenin aikaan moni nisäkäslaji siirtyi kaakoisaasian alueelta kohti Altai-vuoristoa, joka aikaansai denisovanihmisen hajaantumista alueella (Zavala ym., 2021). Tämän lisäksi havainnot neandertalinihmisestä tarkentaa käsitystämme ajasta jolloin tapahtui eräs neandertalinihmisen historian merkittävä tapahtuma, jossa eräs neandertalinihmisen varhainen linja korvautui toisella linjalla, joka oli saanut geneettistä materiaalia nykyihmisen esi-isiltä (Zavala ym., 2021).

4.5. Muutokset sienten biodiversiteetissä indikoi muutoksia ekosysteemitasolla

Sienet ovat kuntana hyvin monipuolinen ja niillä on monia tärkeitä ekologisia tehtäviä toimien saprotrofeina, symbionteina ja parasitteina eläimille ja kasveille (Talas ym., 2021). Muutokset sieniyhteisöissä täten indikoi muutoksista koko ekosysteemissä (Talas ym., 2021), joka mahdollistaa ekosysteemien muutosten seuraamisen sienten biodiversiteettiä tutkimalla sedaDNA:n avulla. Talas ym. (2021) käyttivät järvi sedaDNA:ta arvioidakseen sieniyhteisöjen koostumusta, ekologisesti funktionaalisia tehtäviä sekä niiden muutoksia viimeisen 10 tuhat vuoden ajalta. He suhteuttivat nämä muutujat eri ympäristötekijöihin demonstroidakseen, että sienet monipuolisilla ekologisilla tehtävillään toimivat hyvinä indikaattoreina alueen yleisestä biodiversiteetistä muissakin kunnissa (Talas ym., 2021). Talas ym. (2021) osoitti myös kuinka parasitiittisieniä, joilla on hyvin spesifinen isäntälaji, voidaan käyttää näiden isäntälajipopulaatioiden tutkimiseen alueella, koska sienet todennäköisesti jättävät vahvemman signaalin verrattuna isäntälajiin, joka saattaa olla esimerkiksi nisäkäs. Tämä johtuu sienten laajasta levinneisyydestä sekä itiöiden tarjoamasta suojasta sedimenteissä (Talas ym., 2021).

5. Johtopäätökset

Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät ovat mahdollistaneet muinaisten ekologisten yhteisöiden uudelleenrakentamisen sedaDNA:sta hyvällä tarkkuudella, tehden sedaDNA tutkimuksesta nopeasti kehittyvän tieteenalan (Dusseix ym., 2021). Viime vuosien aikana ollaan tultu siihen pisteeseen, että sedaDNA tunnistetaan tehokkaana paleoekologisen tutkimuksen työkaluna, mutta sillä on kuitenkin omat ongelmat ja epäkohdat, jotka vaativat lisää tutkimusta niiden kunnolla ymmärtämiseksi (Edwards, 2020).

DNA:n molekyyli-tason muutokset lähtöeliöistä aina sedimentteihin asti kuten luonnossa tapahtuvat hajottamisprosessit tunnetaan varsin hyvin. Kylmyys, anaerobisuus ja neutraali pH ovat olleet kaikista lupaavimpia olosuhteita sedimenteissä DNA:n säilyvyyden ja onnistuneen eristyksen suhteen (Edwards, 2020). DNA:n adsorptiokyky moniin epäorgaanisiin partikkeleihin suojaa DNA:ta ja näin parantaa sen säilytystä. Sedimenteistä, joissa on rikas orgaaninen koostumus tai muita epäsuosiollisia ympäristöolosuhteita voidaan kuitenkin onnistuneesti eristää sedaDNA:ta. Miksi tietyn ympäristöolosuhteen sedimenteistä saadaan parempia tuloksia ja toisesta huonompia ei vielä ymmärretä ja siksi sedaDNA:n tafonomia vaatii runsaasti lisää tutkimusta.

DNA-viivakoodeihin perustuvat menetelmät hyödyntävät PCR:ää ja ovat hallinneet sedaDNA tutkimuksia pitkään, koska niiden avulla voidaan tunnistaa hyvin kätevästi haluttuja taksoniteita. Metaviivakoodauksessa laboratorio ja bioinformatiikka-analyysit voivat kestää jopa useita kuukausia, mutta ovat silti ajallisesti hyvin tehokkaita moniin perinteisempiin menetelmiin kuten siitepölyanalyysiin verrattuna (Edwards, 2020). PCR:ään pohjautuvilla menetelmillä on puolestaan taipumusta vääristää tuloksia.

PCR:n ongelmia on saatu ratkaistua haulikkosekvensoinnilla, jossa näytteen kaikki DNA-molekyylit sekvensoidaan ilman PCR:ää. Haulikkosekvensointi tuottaa erittäin suuren määrän sekvenssidataa, koska se pystyy sekvensoimaan erittäin lyhyitäkin sekvenssejä. Nämä lyhyet sekvenssit ovat mahdollisesti samoja eri taksoniteilla, jolloin ongelmaksi muodostuu sekvenssien tunnistaminen oikean taksonin alle. Sekvenssien tunnistamiseksi tarvitaan myös vertauskohtia sekvenssitietokannoista. Tietokantojen sisältämien sekvenssien määrä lisääntyy jatkuvasti nopealla tahdilla. Tästä huolimatta niissä on puutteita. Suurimmassa osassa metagenomisista tutkimuksista, yli 90 % sekvensseistä ei pystytä tunnistamaan minkään taksonin alle vertausgenomien puutteen vuoksi (Jia ym., 2022). Tämä ongelma todennäköisesti helpottuu lähitulevaisuudessa, koska tietokantojen arkistot kasvaa erittäin nopeasti ja voidaan luoda tarkennettuja tietokantoja esimerkiksi maantieteellisin rajauksin.

SedaDNA mahdollistaa muinaisen biodiversiteetin tutkimisen ilman että löydetään harvinaisia fossiileita. Tästä huolimatta muinaisen biodiversiteetin tutkimuksessa hyödynnettäviä työkaluja kuten biomarkkereita sekä makro- ja mikrofossiileita ei tule hylätä vaan sedaDNA toimii parhaiten yhdistettynä näihin menetelmiin.

FAD ja LAD mahdollistavat taksonien esiintymisen seuraamisen pitkällä aikavälillä ja sen avulla voidaan tutkia miten jokin muinainen merkittävä tapahtuma on vaikuttanut biodiversiteettiin. Esimerkkejä tällaisesta voi olla miten ihmisen saapuminen tietylle alueelle on vaikuttanut alueen lajistoon tai minkälaisia vaikutuksia ilmaston lämpötilan muutoksilla on ollut. Tällaiset muinaiset muutokset ja niiden seuraukset ovat relevantteja myös nykymaailmassa ja niistä saatua tietoa voidaan mahdollisesti hyödyntää tulevaisuuden ongelmien ehkäisemiseksi ja ratkaisemiseksi.

On edelleen epävarmaa kuinka hyvin tietyn sekvenssin esiintymistiheys kuvastaa kyseisen taksonin runsautta tai biomassaa (Edwards, 2020). On siis hyvä ymmärtää, että sedaDNA tutkimustyökaluna on vielä hyvin tuore ja siinä on monia puutteita. Tästä syystä monesta

muinaisen biodiversiteetin tutkimuksesta ei voida tehdä liian suuria johtopäätöksiä varsinkaan kvantitaavisten muuttujien osalta.

Lähdeluettelo:

- Alsos, I. G., Sjögren, P., Brown, A. G., Gielly, L., Merkel, M. K. F., Paus, A., Lammers, Y., Edwards, M. E., Alm, T., Leng, M., Goslar, T., Langdon, C. T., Bakke, J., & van der Bilt, W. G. M. (2020). Last Glacial Maximum environmental conditions at Andøya, northern Norway; evidence for a northern ice-edge ecological “hotspot”. *Quaternary Science Reviews*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2020.106364>
- Ambrecht, L., Herrando-Pérez, S., Eisenhofer, R., Hallegraeff, G. M., Bolch, C. J. S., & Cooper, A. (2020). An optimized method for the extraction of ancient eukaryote DNA from marine sediments. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 906–919. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13162>
- Blum, S. A. E., Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1997). Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 20(4), 513–521. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80021-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80021-5)
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., le Bras, Y., Taberlet, P., & Coissac, E. (2016). obitools: A unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 176–182. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12428>
- Capo, E., Giguët-Covex, C., Rouillard, A., Nota, K., Heintzman, P. D., Vuillemin, A., Ariztegui, D., Arnaud, F., Belle, S., Bertilsson, S., Bigler, C., Bindler, R., Brown, A. G., Clarke, C. L., Crump, S. E., Debroas, D., Englund, G., Ficetola, G. F., Garner, R. E., Gauthier, J., Gregory-Eaves, I., Heinecke, L., Herzsuh, U., Ibrahim, A., Kisand, V., Kjær, K. H., Lammers, Y., Littlefair, J., Messenger, E., Monchamp, M. E., Olajos, F., Orsi, W., Pedersen, M. W., Rijal, D. P., Rydberg, J., Spanbauer, T., Stoof-Leichsenring, K. R., Taberlet, P., Talas, L., Thomas, C., Walsh, D. A., Wang, Y., Willerslev, E., van Woerkom, A., Zimmermann, H. H., Coolen, M. J., Epp, L. S., Domaizon, I., Alsos, I. G., & Pardiucci, L. (2021). Lake sedimentary DNA research on past terrestrial and aquatic biodiversity: Overview and recommendations. *Quaternary*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/quat4010006>
- Coolen, M. J. L., & Overmann, J. (1998). Analysis of subfossil molecular remains of purple sulfur bacteria in a lake sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4513–4521. <https://doi.org/10.1128/aem.64.11.4513-4521.1998>

- Dusseux, N., Bergfeldt, N., de Anca Prado, V., Dehasque, M., Díez-Del-Molino, D., Ersmark, E., Kanellidou, F., Larsson, P., Lemež, Š., Lord, E., Mármol-Sánchez, E., Meleg, I. N., Måsviken, J., Naidoo, T., Studerus, J., Vicente, M., von Seth, J., Götherström, A., Dalén, L., & Heintzman, P. D. (2021). Integrating multi-taxon palaeogenomes and sedimentary ancient DNA to study past ecosystem dynamics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *288*(1957). <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1252>
- Edwards, M. E. (2020). The maturing relationship between Quaternary paleoecology and ancient sedimentary DNA. *Quaternary Research (United States)*, *96*, 39–47. <https://doi.org/10.1017/qua.2020.52>
- Haile, J., Holdaway, R., Oliver, K., Bunce, M., Gilbert, M. T. P., Nielsen, R., Munch, K., Ho, S. Y. W., Shapiro, B., & Willerslev, E. (2007). Ancient DNA chronology within sediment deposits: Are paleobiological reconstructions possible and is DNA leaching a factor? *Molecular Biology and Evolution*, *24*(4), 982–989. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm016>
- Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J., & Schuster, S. C. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research*, *17*(3), 377–386. <https://doi.org/10.1101/gr.5969107>
- Jia, W., Anslan, S., Chen, F., Cao, X., Dong, H., Dulias, K., Gu, Z., Heinecke, L., Jiang, H., Kruse, S., Kang, W., Li, K., Liu, S., Liu, X., Liu, Y., Ni, J., Schwalb, A., Stoof-Leichsenring, K. R., Shen, W., Tian, F., Wang, J., Wang, Y., Wang, Y., Xu, H., Yang, X., Zhang, D., & Herzschuh, U. (2022). Sedimentary ancient DNA reveals past ecosystem and biodiversity changes on the Tibetan Plateau: Overview and prospects. *Quaternary Science Reviews*, *293*, 107703. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2022.107703>
- Kjær, K. H., Mikkelsen, W. P., Bianca, D. S., De Cahsan, B., Korneliussen, T. S., Michelsen, C. S., Sand, K. K., Jelavić, S., Ruter, A., Schmidt, A. A., Kjeldsen, K. K., Tesakov, A. S., Snowball, I., Gosse, J. C., Alsos, I. G., Wang, Y., Dockter, C., Rasmussen, M., Jørgensen, M. E., Skadhauge, B., Prohaska, A., Kristensen, J., Bjerager, M., Allentoft, M. E., Coissac, E., Alsos, I. G., Coissac, E., Rouillard, A., Simakova, A., Fernandez-Guerra, A., Bowler, C., Macias-Fauria, M., Vinner, L., Welch, J. J., Hidy, A. J., Sikora, M., Collins, M. J., Durbin, R., Larsen, N. K., & Willerslev, E. (2022). A 2-million-year-old ecosystem in Greenland uncovered by environmental DNA. *Nature*, *612*(7939), 283–291. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05453-y>
- Kuznetsova, O. v., Sevastyanov, V. S., & Timerbaev, A. R. (2019). What are the current analytical approaches for sediment analysis related to the study of diagenesis? Highlights from 2010 to 2018. *Talanta*, *191*, 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.080>

- Lammers, Y., Heintzman, P. D., & Alsos, I. G. (2021). Environmental palaeogenomic reconstruction of an Ice Age algal population. *Communications Biology*, *4*(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01710-4>
- Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D., & Daffonchio, D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research*, *6*(1–2), 37–53. <https://doi.org/10.1051/ebr:2007031>
- Orlando, L., Allaby, R., Skoglund, P., der Sarkissian, C., Stockhammer, P. W., Ávila-Arcos, M. C., Fu, Q., Krause, J., Willerslev, E., Stone, A. C., & Warinner, C. (2021). Ancient DNA analysis. *Nature Reviews Methods Primers*, *1*(1). <https://doi.org/10.1038/s43586-020-00011-0>
- Pedersen, M. W., Overballe-Petersen, S., Ermini, L., der Sarkissian, C., Haile, J., Hellstrom, M., Spens, J., Thomsen, P. F., Bohmann, K., Cappellini, E., Schnell, I. B., Wales, N. A., Carøe, C., Campos, P. F., Schmidt, A. M. Z., Gilbert, M. T. P., Hansen, A. J., Orlando, L., & Willerslev, E. (2015). Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1660). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0383>
- Taberlet, P.,Homme, S. M. P., Campione, E., Roy, J., Miquel, C., Shehzad, W., Gielly, L., Rioux, D., & Melodelima, C. (2012). Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular Ecology*, *21*(8), 1816–1820. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05317.x>
- Talas, L., Stivrins, N., Veski, S., Tedersoo, L., & Kisand, V. (2021). Sedimentary ancient DNA (SedaDNA) reveals fungal diversity and environmental drivers of community changes throughout the holocene in the present boreal lake Lielais Svētīn, U (eastern Latvia). *Microorganisms*, *9*(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040719>
- Torti, A., Lever, M. A., & Jørgensen, B. B. (2015). Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Marine Genomics*, *24*, 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.08.007>
- Wang, Y., Pedersen, M. W., Alsos, I. G., de Sanctis, B., Racimo, F., Prohaska, A., Coissac, E., Owens, H. L., Merkel, M. K. F., Fernandez-Guerra, A., Rouillard, A., Lammers, Y., Alberti, A., Denoeud, F., Money, D., Ruter, A. H., McColl, H., Larsen, N. K., Cherezova, A. A., Edwards, M. E., Fedorov, G. B., Haile, J., Orlando, L., Vinner, L., Korneliusen, T. S., Beilman, D. W., Bjørk, A. A., Cao, J., Dockter, C., Esdale, J., Gusarova, G., Kjeldsen, K. K., Mangerud, J., Rasic, J. T., Skadhauge, B., Svendsen, J. I., Tikhonov, A., Wincker, P., Xing, Y., Zhang, Y., Froese, D. G., Rahbek, C., Nogues, D. B., Holden, P. B., Edwards, N. R., Durbin, R., Meltzer, D. J., Kjær, K. H., Möller, P., &

Willerslev, E. (2021). Late Quaternary dynamics of Arctic biota from ancient environmental genomics. *Nature*, *600*(7887), 86–92. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04016-x>

Willerslev, E., Hansen, A. J., Binladen, J., Brand, T. B., Gilbert, M. T. P., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D. A., & Cooper, A. (2003). Diverse plant and animal genetic records from holocene and pleistocene sediments. *Science*, *300*(5620), 791–795. <https://doi.org/10.1126/science.1084114>

Zavala, E. I., Jacobs, Z., Vernot, B., Shunkov, M. v., Kozlikin, M. B., Derevianko, A. P., Essel, E., de Filippo, C., Nagel, S., Richter, J., Romagné, F., Schmidt, A., Li, B., O’Gorman, K., Slon, V., Kelso, J., Pääbo, S., Roberts, R. G., & Meyer, M. (2021). Pleistocene sediment DNA reveals hominin and faunal turnovers at Denisova Cave. *Nature*, *595*(7867), 399–403. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03675-0>