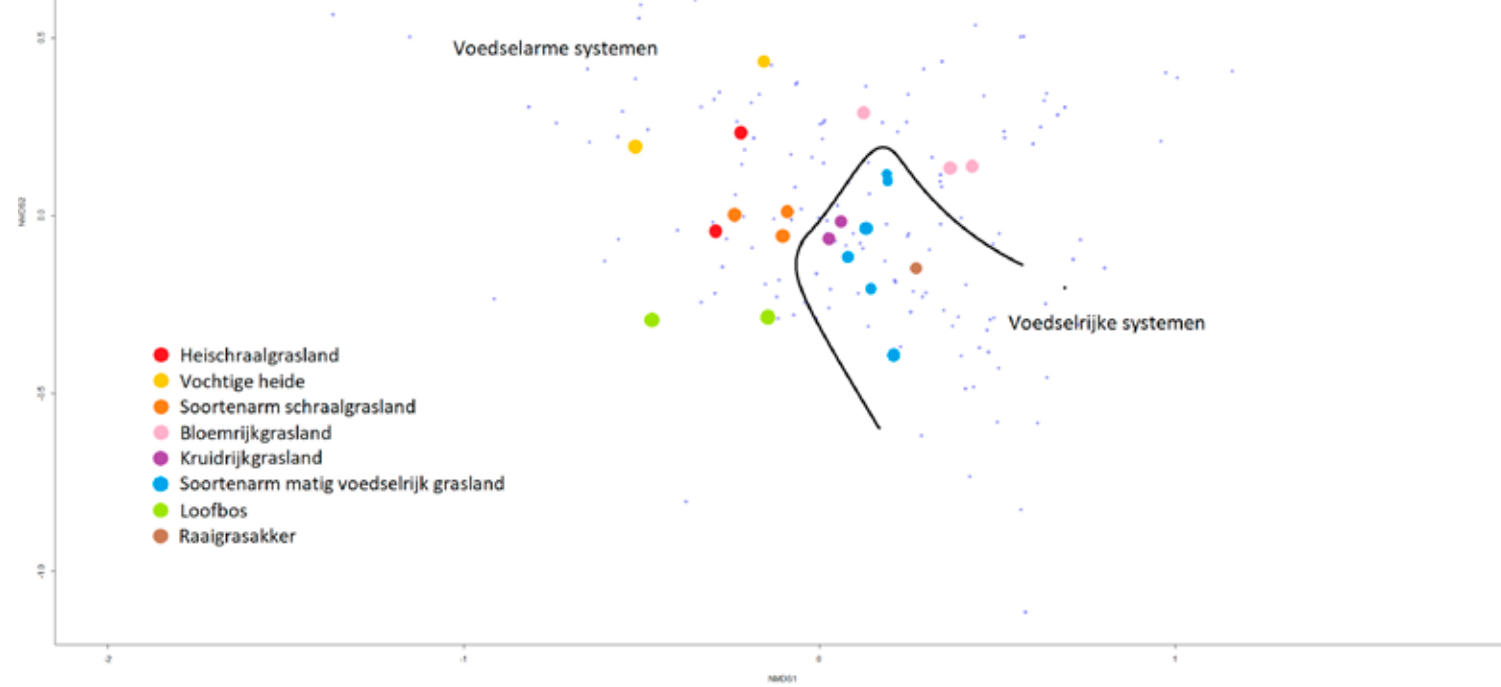


eDNA als instrument om bodembioologische gemeenschap in kaart te brengen



Uit wetenschappelijk onderzoek blijkt dat bodembioologie een essentiële rol speelt in allerlei biochemische processen van bodemecosystemen. Tegelijkertijd is het vaak nog onduidelijk wat die rol dan precies is en hoe bodemorganismen een sturende invloed hebben op de ontwikkeling van vegetatie. Het beschikbaar komen van nieuwe eDNA technieken biedt handvaten om de rol van bodemorganismen in het bodemecosysteem beter te gaan begrijpen.

technieken is het sinds een aantal jaar mogelijk geworden om op basis van DNA het bodemleven in kaart te brengen en te onderzoeken. In het natuurbeheer worden DNA-technieken tot nu toe zeer beperkt ingezet. Daarom zijn Datura Molecular Solutions en het Adviesloket voor Bodem en Natuur in 2017 van start gegaan met het verzamelen van bodemmonsters om op basis van DNA uitspraken te kunnen doen over het functioneren van ecosystemen. De eerste analyses zijn veelbelovend. Er zijn duizenden soorten gedetecteerd en de resultaten zijn goed te verklaren aan de hand van de bekende gegevens over de bemonsterde systemen. Ook komen klassieke bodemparameters zoals de schimmel/bacterie ratio duidelijk uit de analyses naar voren.

eDNA

Elke cel van een organisme bevat een unieke DNA-code. Met specialistische technieken kun je deze code uitlezen en weet je om welke soort het gaat. In bodemmonsters is veel DNA aanwezig. De bulk van DNA in een bodemmonster wordt “environmental” DNA, eDNA genoemd. Dit eDNA bestaat vooral uit DNA van micro-organismen zelf (zoals schimmels en bacteriën), maar er is ook DNA in de bodem aanwezig dat organismen achterlaten in hun omgeving, bijvoorbeeld via uitwerpselen. eDNA kan gedetecteerd worden zonder eerst specifiek soorten uit een bodem-

monster te isoleren. Vervolgens kan het DNA in de bodem geïdentificeerd worden door middel van eDNA metabarcoding.

Metabarcoding

Na het verzamelen van een bodemmonster, volgt een serie handelingen in het laboratorium die het DNA isoleren uit de bodemmonsters. Het resultaat is een buisje met zuiver DNA. Door middel van PCR (polymerase chain reaction) wordt het DNA tot meetbare concentraties vermenigvuldigd. Een PCR wordt uitgevoerd met behulp van primers. De primers zorgen ervoor dat een specifiek klein stukje van het DNA dat het mogelijk maakt om het DNA te identificeren, vermeerderd wordt. Datura Molecular Solutions heeft een primer ontwikkeld die dermate universeel is dat het een stukje DNA vermeerderd dat aanwezig is in alle organismen. Zodoende kunnen in één klap bijna alle organismen die in de bodem voorkomen, gedetecteerd worden. Tot nu toe was het niet goed mogelijk om tegelijkertijd alle schimmels én alle bacteriën in beeld te brengen en moesten verschillende primers gebruikt worden. Daar brengt deze methode dus verandering in. Doordat vrijwel al het DNA in de bodem aanwezig is in cellen van organismen wordt vooral het DNA gedetecteerd van micro-organismen die als geheel in de bodemmonster aanwezig zijn, zoals bacteriën, schimmels en nematoden. In de bodem

< **Figuur 1.** Correspondentie-analyse van de bodembioologische gemeenschappen op basis van eDNA. De kleine blauwe stipjes geven de gedetecteerde klassen weer. Klassen die dicht bij elkaar weergegeven worden, zijn met elkaar geassocieerd. De locaties zijn weergegeven in de gekleurde cirkels. Cirkels die dicht bij elkaar gepositioneerd zijn, lijken op elkaar wat betreft de bodembioologische samenstelling. Opvallend is dat alle voedselrijke systemen samen clusteren.

zijn ook eDNA-sporen aanwezig van grotere soorten (mesofauna) als mijten, springstaarten en wormen. Deze sporen kunnen gedetecteerd worden met speciaal daarvoor ontworpen specifieke primers. Echter, bij toepassing van de universele primers verdwijnen de sporen van eDNA van mesofauna grotendeels tegen de achtergrond van het veel talrijker aanwezige eDNA van micro-organismen.

DNA sequencer

Met behulp van een speciaal apparaat, een DNA sequencer, kunnen we de DNA-code van het vermeerderde DNA bepalen. De samenstelling van de DNA-code in het vermeerderde DNA-fragment is uniek en kunnen we bepalen in welke soort het gaat. Soms zijn er soorten binnen een genus of familie die dezelfde DNA-code hebben. Deze soorten zijn in het fragment dan niet te onderscheiden van elkaar.

Het DNA sequencen resulteert in een enorme hoeveelheid data. Er zijn miljoen A4'tjes nodig om dit uit te printen! Om deze grote hoeveelheden data te verwerken, zijn krachtige rekencomputers nodig. Vervolgens is het noodzakelijk om de unieke stukjes uitgelezen DNA aan een soort te koppelen. Wereldwijd zijn er initiatieven om grote databases op te zetten met daarin het DNA van soorten. De identificatie van soorten wordt hierdoor steeds beter en eenvoudiger. Weliswaar zijn nog niet alle soorten via het DNA te identificeren, maar bijna altijd is er wel een verwante soort bekend. Daardoor kunnen vrijwel alle uitgelezen DNA codes tot op voldoende detailniveau geïdentificeerd worden.

Met deze metabarcoding stel je niet alleen vast of een soort in de bodem aanwezig is, maar kun je ook iets zeggen over het aandeel dat een soort in de totale hoeveelheid DNA inneemt en over de verhouding tussen de hoeveelheid schimmels en bacteriën in een bodem.

Eerste resultaten

Uit de eerste bodemmonsters blijkt dat het goed mogelijk is om het bodemleven met behulp van metabarcoding in kaart te brengen. In enkele monsters zijn duizenden verschillende soorten en groepen van verwante soorten gedetecteerd. We hebben enkele analyses uitgevoerd om een eerste inzicht te krijgen van de betekenis van de verkregen gegevens. Onze hypothese was dat systemen met vergelijkbare vegetatie, beheer en milieu, ook een vergelijkbare biologische bodemgemeenschap zouden bezitten. Om dit te testen hebben we op diverse locaties bodemmonsters verzameld. Op

deze monsters is een eDNA-analyse uitgevoerd met behulp van de “universele” primers. We hebben een correspondentie-analyse uitgevoerd om vast te stellen hoe de biologische gemeenschap van verschillende type locaties zich tot elkaar verhouden.

Op een laag taxonomisch niveau bleken de monsters dermate sterk van elkaar te verschillen dat er te weinig overlap was tussen ‘soorten’ zodat we geen correspondentie-analyse konden uitvoeren. Om deze reden zijn de relatieve hoeveelheden gemeten DNA op klasse-niveau (insecten en zoogdieren zijn bijvoorbeeld twee klassen) samengevoegd. Zodoende was het mogelijk om totaal verschillende systemen toch met elkaar te vergelijken. Gelijkende systemen clusterden zoals verwacht inderdaad samen. Hiermee wordt bevestigd dat verschillende ‘natuurtypen’ een eigen bodemgemeenschap bezitten.

Schimmel/bacterie ratio

In het natuurbeheer wordt vaak gekeken naar de verhouding tussen de hoeveelheid schimmels en bacteriën die in de bodem voorkomen. In voedselrijke graslanden en in verstoorde milieus, zoals in de landbouw, is vaak sprake van door bacteriën gedomineerde systemen met relatief weinig schimmels. In bossen en in schrale systemen zijn het juist de schimmels die het systeem domineren.

Figuur 2 laat de gemeten schimmel/bacterie ratio van verschillende systemen zien. Het aandeel eDNA van schimmels is in bossen en in schrale systemen inderdaad veel groter dan in graslanden. Bovendien bleken de matig voedselrijke graslanden en een raaigrasakker die in agrarisch gebruik is, voornamelijk eDNA van bacteriën te bevatten. Dit bevestigt dat eDNA ook gebruikt kan worden om de schimmel/bacterie ratio te monitoren.

Functionele bodemorganismen

Het detailniveau van de analyses is voldoende om de functies van soortgroepen in het ecosysteem

toe te wijzen. Zo kunnen we van schimmels niet altijd vaststellen welke soort het precies betreft maar wel of het een schimmel is die dood hout afbreekt, of dat het juist een schimmel is die in symbiose met planten leeft, en de plant van voedsel voorziet. Op dit moment werken we aan een indeling op dergelijk functioneel niveau. In de toekomst hopen we zo problemen in natuurontwikkeling te kunnen herleiden tot de aan- of afwezigheid van bepaalde functionele bodemorganismen.

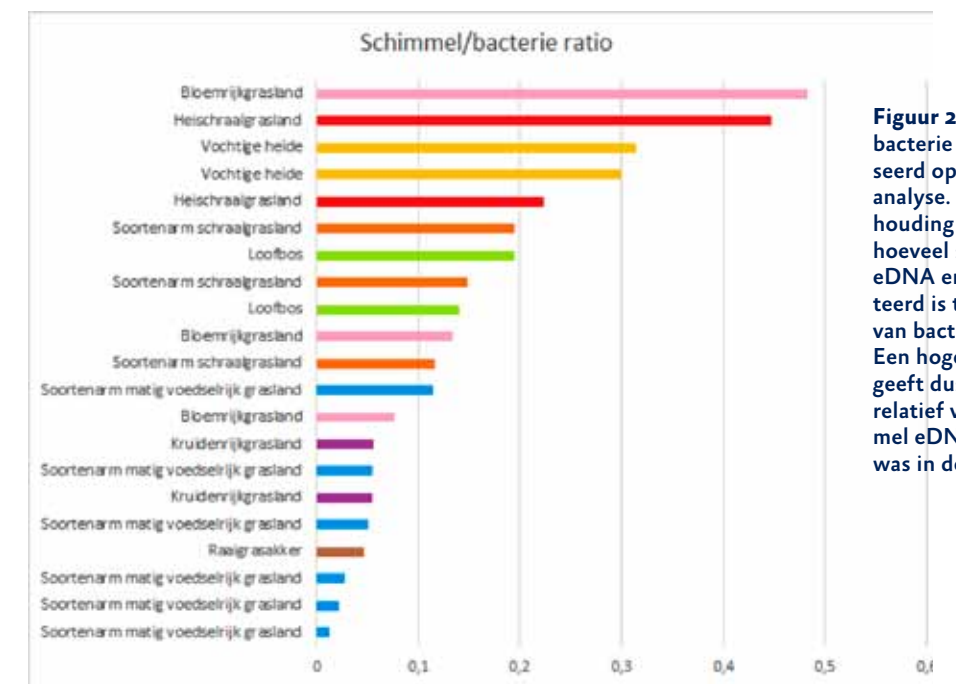
Toekomstperspectief

De ontwikkelde ‘universele primers’ worden in aquatische context reeds toegepast. Bovendien wordt op dit moment een wetenschappelijk onderzoekstraject voorbereid waarin de eDNA-techniek voor watersystemen ontwikkeld wordt. In de bodem zijn deze ‘universele primers’ nu voor het eerst toegepast. De eerste analysesresultaten zijn zeer hoopvol, en de komende tijd zal de praktische toepasbaarheid in terrestrische ecosystemen verder ontwikkeld worden.

In natuurherstelprojecten wordt bodembioologie steeds meer geïntegreerd in herstelstrategieën. Hierbij is eDNA een geschikte methode om de uitgangssituatie te bepalen. Door goed ontwikkelde referentiepercelen te vergelijken met slecht ontwikkelde doelpercelen kunnen verschillen in het bodemleven worden blootgelegd. Door het verzamelen van monsters van allerlei goed ontwikkelde vegetatietypes bouwt Datura Molecular Solutions een database op waarin patronen en correlaties kunnen worden aangetoond. Aan de hand hiervan kunnen herstelstrategieën worden ontwikkeld waarin rekening gehouden wordt met het bodemleven.<

info@datura.nl

Kapschuur 11.30 - 12.15



Figuur 2. Schimmel/bacterie ratio gebaseerd op de eDNA-analyse. De verhouding geeft weer hoeveel schimmel eDNA er gedetecteerd is ten opzichte van bacterie eDNA. Een hoge waarde geeft dus aan dat er relatief veel schimmel eDNA aanwezig was in de bodem.