



eDNA metabarcoding bodemvoedselweb – Holag & Vogelbescherming

Colofon

Titel	eDNA metabarcoding bodemvoedselweb – Holag & Vogelbescherming
Tekst, foto's en samenstelling	Robbert van Himbeek, Kees van Bochove
In opdracht van	Holag
Naam opdrachtgever	Hans Hofland
Rapportnummer	RA20014
Datum oplevering rapport	14-05-2020
Aantal pagina's	11
Wijze van citeren	Van Himbeek, R., van Bochove, K. 2019 eDNA metabarcoding bodemvoedselweb – Holag & Vogelbescherming. Datura Molecular Solutions, Wageningen.
Laboratorium analist	J. Rook



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:

Agro Business Park 10
6708 PW Wageningen

0031(0)618441781

www.datura.nl

robert.vanhimbeek@datura.nl

Inhoudsopgave

1. Doelstelling	4
2. Methode	4
2.1 Bemonstering	4
2.2 Laboratoriumanalyses en bio-informatica	4
3. Resultaten	6
3.1 Totale (genetische) diversiteit	6
3.2 Schimmel:bacterie verhouding	7
3.3 Ordinatie	8
3.4 Indeling in herkenbare groepen	9
4. Conclusie en aanbeveling	11
5. Literatuur	11

1. Doelstelling

Het doel van dit onderzoek was om inzicht te krijgen in de bodemgemeenschap van intensief en extensief beheerde percelen.

2. Methode

2.1 Bemonstering

De bemonstering is uitgevoerd door Hans Hofland.

2.2 Laboratoriumanalyses en bio-informatica

De bodemmonsters zijn onderzocht op de aanwezigheid van alle mogelijke levensvormen met behulp van *next generation sequencing*. In het kort komt de techniek op het volgende neer: DNA van het bodemleven dat in de bodem aanwezig is, zogenaamd *environmental DNA* (eDNA) wordt in het laboratorium geïsoleerd. Vervolgens wordt het eDNA met behulp van PCR vele keren gekopieerd tot een hoge DNA-concentratie. Hierbij worden “primers” gebruikt die speciaal door Datura Molecular Solutions zijn ontwikkeld. Deze primers hechten aan de specifiek deel van het DNA, dat ook wel “marker” genoemd wordt.

Deze primers vermeerderen een kort fragment van het eDNA dat aanwezig is en waarmee in principe alle soorten die in de bodem voorkomen in kaart gebracht kunnen worden; van bacteriën tot regenwormen. Bij het uitlezen, sequencen genaamd, worden miljoenen stukjes van het eDNA vertaald in digitale code. Het uitgelezen eDNA resulteert in een enorm grote ruwe dataset. Met krachtige computers wordt de ruwe data opgeschoond en volgen er verschillende kwaliteitschecks. Daarna worden vele families, geslachten en soorten bodemleven geïdentificeerd aan de hand van referentie databases. De laatste stap bestaat uit het indelen van de gevonden soorten in “functionele groepen”. Het resultaat van de analyse is semi-kwantitatief: van iedere gedetecteerde ‘soort’ is het aandeel eDNA bepaald ten opzichte van de totaal aanwezig hoeveelheid eDNA.

De ruwe DNA-data wordt verwerkt tot een spreadsheet met daarin de aantallen DNA uitlezingen per gedetecteerde DNA sequentie. Een unieke DNA-sequentie die gedetecteerd is, wordt een OTU (*operational taxonomic unit*) genoemd. Dit kan een soort zijn, maar vaak zullen diverse nauw verwante organisme dezelfde DNA-sequentie dragen. In zo’n geval kan niet vastgesteld worden welke soort het betreft, maar betreft het een groep nauw verwante organismen. De aantallen OTU’s geven een goede indicatie voor de diversiteit in het algemeen, of bijvoorbeeld binnen een bepaalde soortgroep. Voor meer technische informatie en kwaliteitswaarborging, zie www.datura.nl.

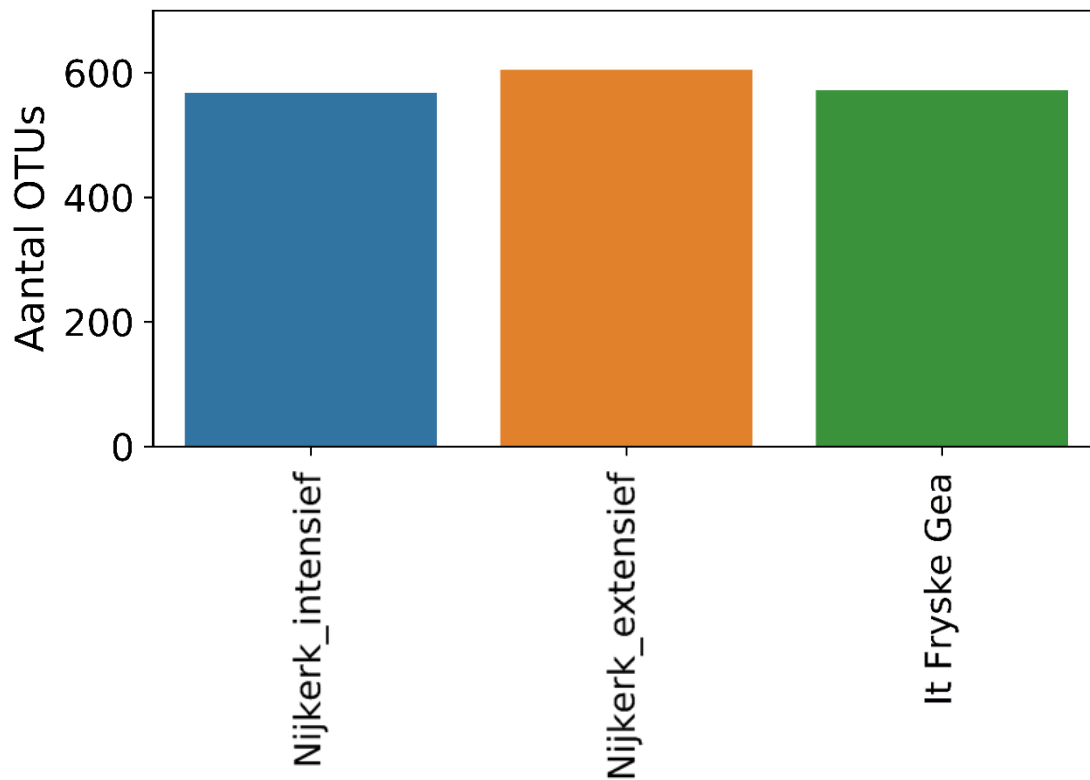
Op basis van de data van deze DNA-analyses is het volgende bepaald:

- (Genetische) diversiteit
- Schimmel:bacterie verhouding
- Ordinatie plot
- Indeling in herkenbare groepen

3. Resultaten

3.1 Totale (genetische) diversiteit

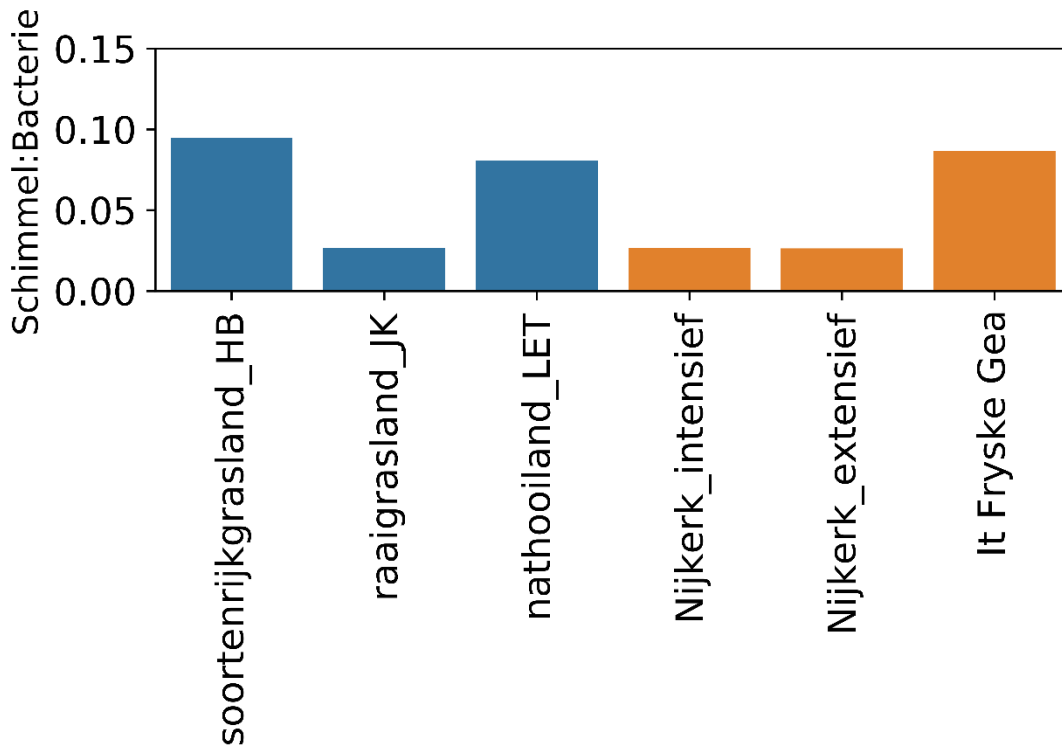
In figuur 1 is de totale (genetische) diversiteit aan bodemleven weergegeven voor de verschillende percelen. Een OTU is een uniek gevonden sequentie en kan in brede zin als een soort gezien worden. Uit de figuur is af te lezen dat er qua totale (genetische) diversiteit geen grote verschillen zijn tussen de percelen.



Figuur 1: Diversiteit (aantal OTUs, y-as) van het bodemleven, locaties op de x-as.

3.2 Schimmel:bacterie verhouding

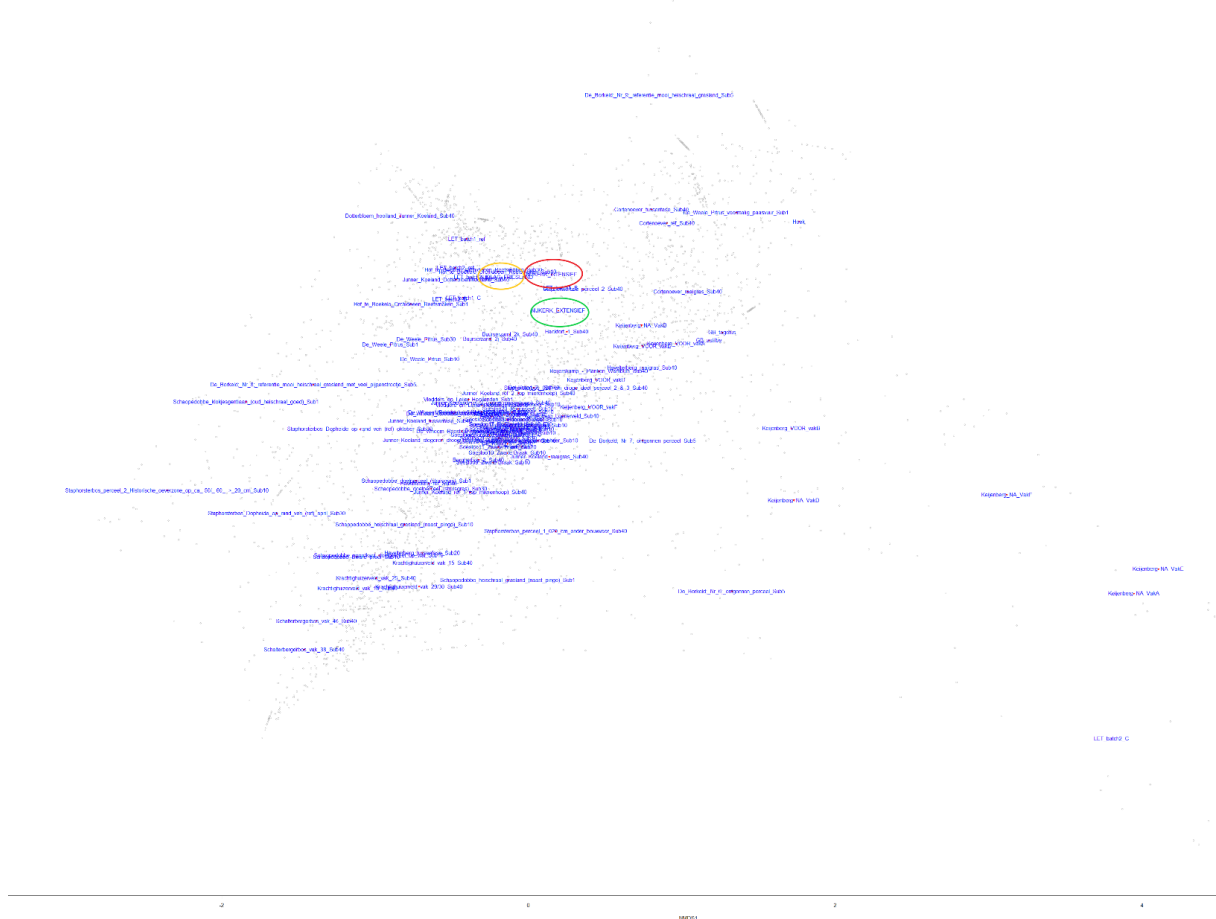
Figuur 2 geeft de verhouding tussen schimmels en bacteriën weer voor de verschillende percelen. Opvallend is dat de intensief en extensief beheerde percelen in Nijkerk een nagenoeg identieke schimmel:bacterie verhouding hebben. Het extensief beheerde perceel in Friesland heeft een hogere schimmel:bacterie verhouding. Opvallend is dat de percelen in Nijkerk een gelijkaardige schimmel:bacterie ratio hebben dan het engels raaigrasland (referentie perceel). De schimmel:bacterie verhouding van het perceel van It Fryske Gea is ongeveer gelijk aan die van de meer ontwikkelde referentie percelen (soortenrijkgrasland en nat hooiland).



Figuur 2: Verhouding van schimmels en bacteriën op basis van het aantal reads. Locaties op x-as. Er zijn 3 percelen (blauw) toegevoegd ter referentie. De 3 percelen van het huidige onderzoek zijn weergegeven in oranje.

3.3 Ordinatatie

Figuur 3 geeft een ordinatatie weer op basis van de relatieve fracties van de gedetecteerde OTUs. In deze analyse worden monsters die qua bodemleven op elkaar lijken dichtbij elkaar geplaatst, terwijl monster die minder op elkaar lijken verder van elkaar weg worden geplaatst. In deze analyse zijn al de bodemmonsters van de database van Datura toegevoegd. In deze database is een zeer diverse set aan bodems opgenomen: van heide, bossen tot graslanden en van vochtig tot droog. De 3 onderzochte samples (gele, rode, en groene cirkel) worden relatief dicht bij elkaar geplaatst. Dit duidt erop dat het bodemleven van deze percelen relatief veel op elkaar lijkt ten opzichte van de gehele dataset van Datura. De 3 onderzochte samples worden dichtbij vochtige percelen met matig tot voedselrijke bodems geclusterd, inclusief percelen van intensieve landbouw (e.g. raaigrasakkers). Ze worden ver weg gepositioneerd van bijvoorbeeld droge en schrale graslanden.

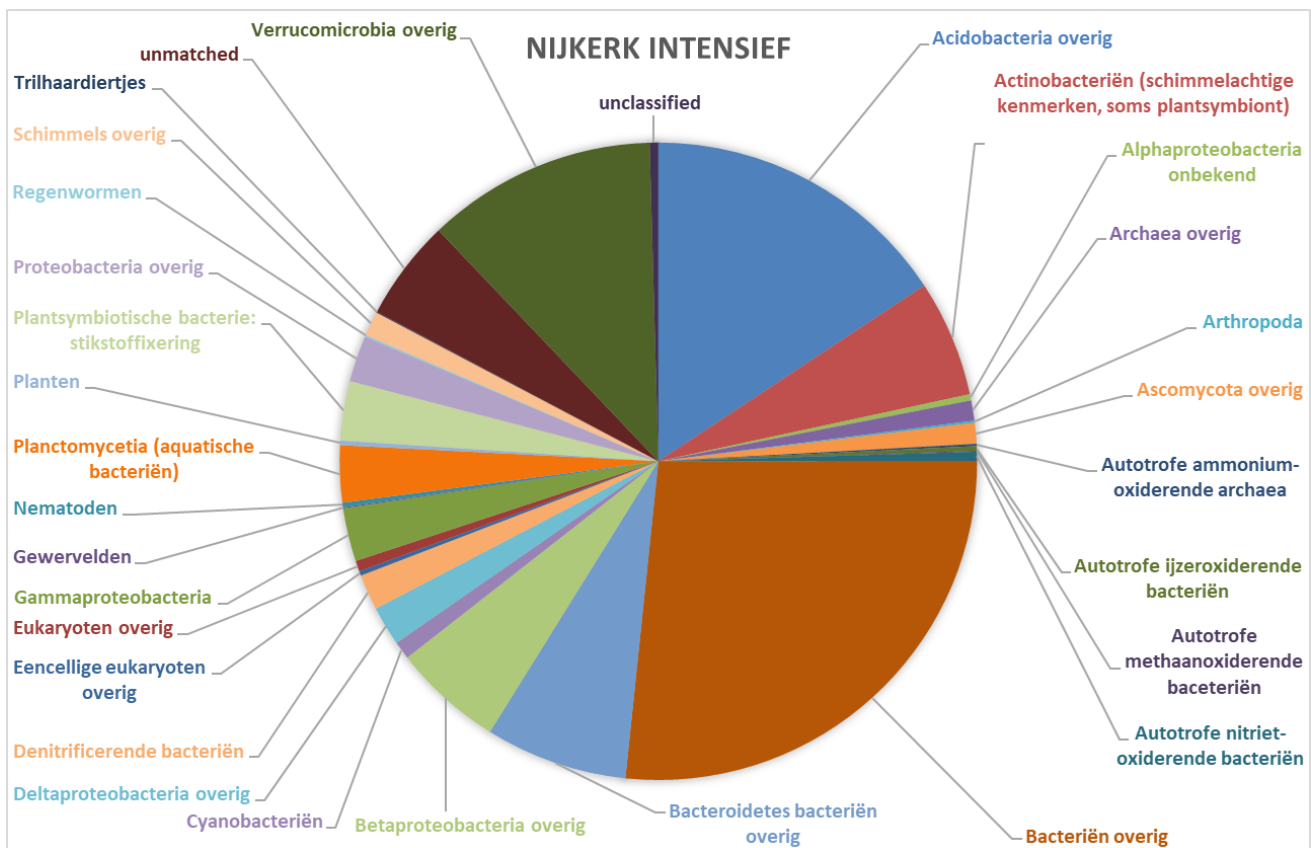


Figuur 3: Ordinatatie (NMDS) op basis van de relatieve fracties van ieder OTU. Ieder blauw woord stelt een individueel monster voor. Rode cirkel= “NIJKERK_intensief”; groene cirkel= “NIJKERK_extensief”, gele cirkel = “HOLAG_Friesland”

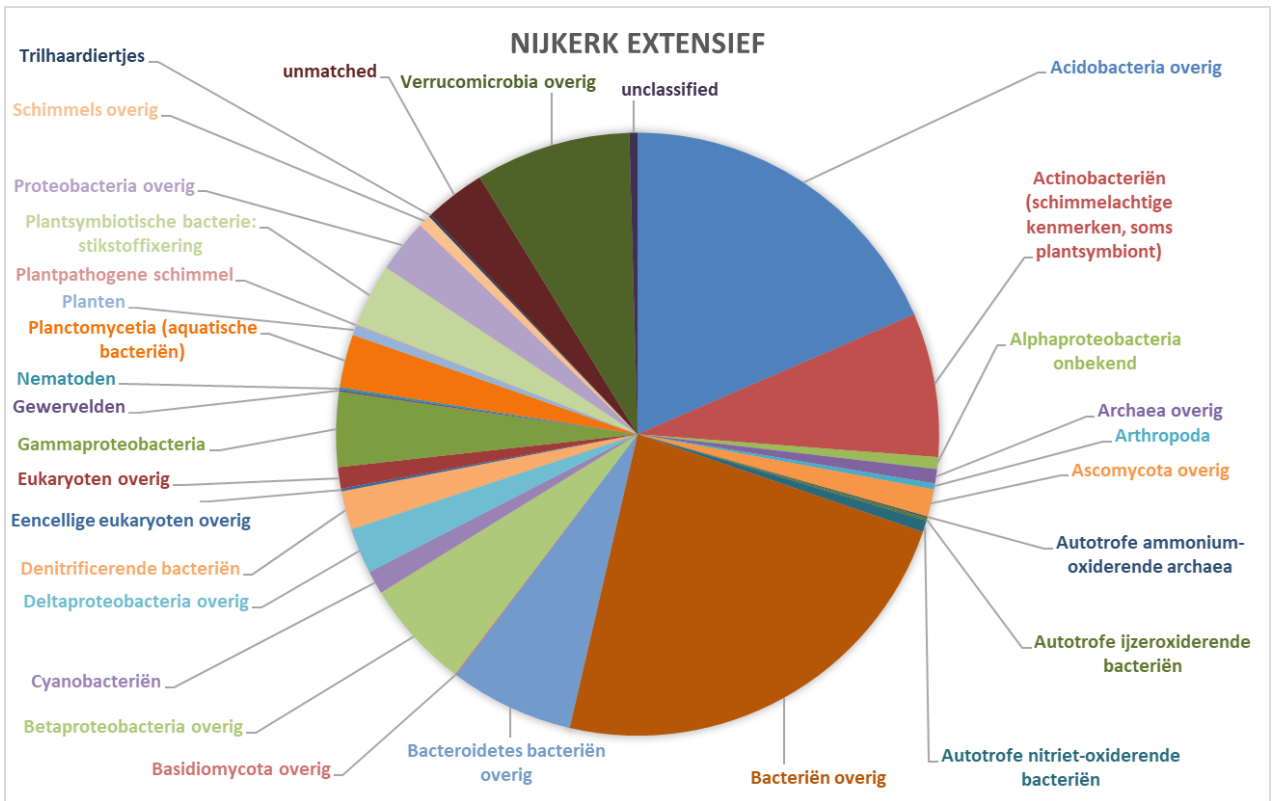
3.4 Indeling in herkenbare groepen

Om een beeld te vormen waaruit het bodemleven zoal bestaat in de onderzochte percelen, zijn in figuur 4, 5 en 6 een indeling van het relatief aandeel van de gedetecteerde OTU's weergegeven, in herkenbare (en in sommige gevallen, functionele) groepen.

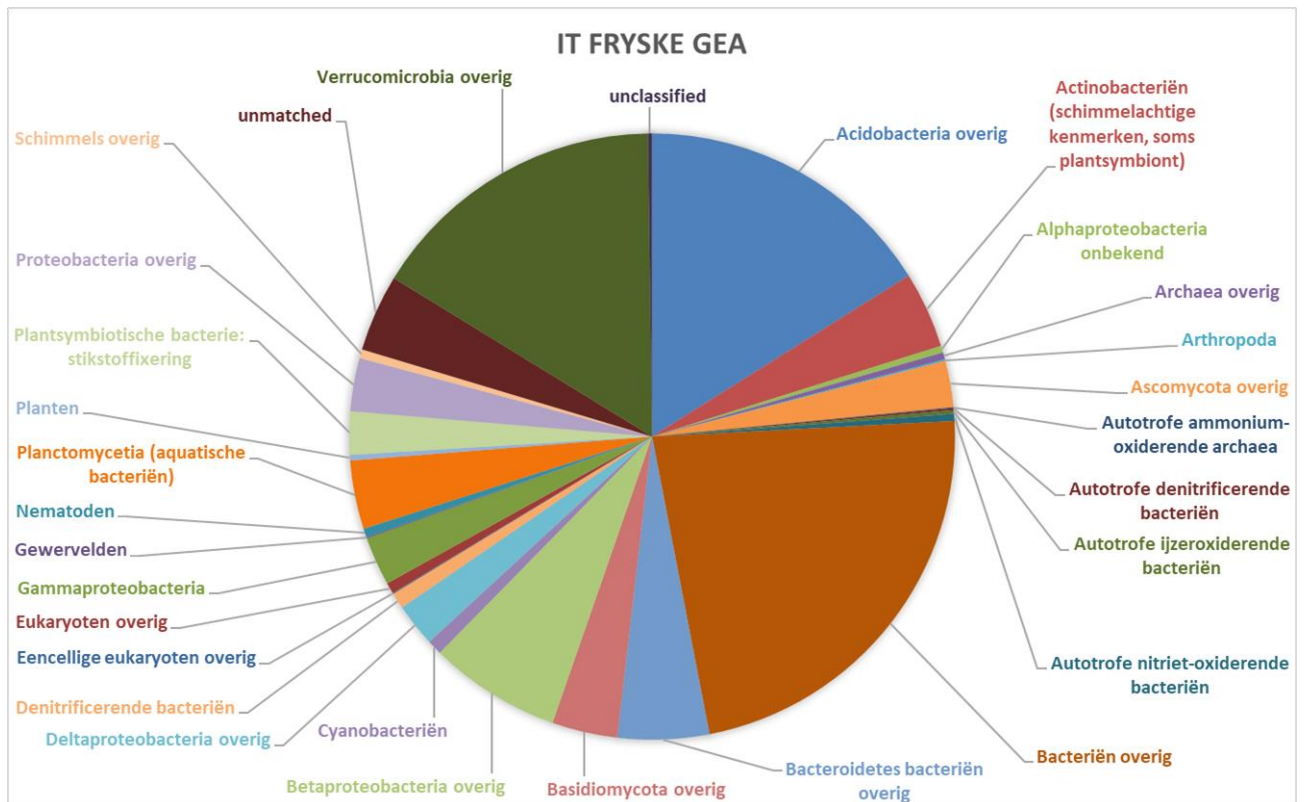
Globaal gezien lijken de percelen qua verhoudingen van (functionele) groepen sterk op elkaar. Opvallend is dat het relatieve aandeel van "Basidiomycota overige" (i.e. een groep schimmels) in het perceel van It Fryske Gea een stuk groter is dan de percelen in Nijkerk. De Basidiomycota zijn een diverse groep schimmels waaronder de typische paddenstoelen behoren (e.g. vliegenzwam). De groep speelt belangrijke rollen in het ecosysteem functioneren, o.a. door hun vermogen om complexe koolstof bronnen af te breken en symbiotische relaties aan te gaan met planten (de Mattos-Shipley, Ford et al. 2016).



Figuur 4: Indeling in herkenbare groepen, perceel Nijkerk intensief



Figuur 5: Indeling in herkenbare groepen, perceel Nijkerk extensief



Figuur 6: Indeling in herkenbare groepen, perceel It Fryske Gea

4. Conclusie en aanbeveling

Op basis van de eDNA voedselweb analyse lijken er in het algemene bodemvoedselweb weinig grote verschillen te zijn tussen de intensief en extensief beheerde percelen. Wel zijn er in perceel van It Fryske Gea, wat momenteel als natuur beheerd wordt, relatief meer schimmels (voornamelijk van de groep Basidiomycota) aanwezig dan in de percelen in Nijkerk.

Hoewel het huidige onderzoek een beeld schetst van de bodemgemeenschap van percelen met een verschillend beheertype, zou een uitgebreider vervolgonderzoek met meerdere bemonsterde percelen per beheertype een duidelijker inzicht creëren in de invloed van het beheer op de bodemgemeenschap. In relatie tot weidevogels zou daarbij aanvullend (DNA) onderzoek naar het voedsel (i.e. wormen en andere ongewervelden) van deze vogels uitgevoerd kunnen worden.

5. Literatuur

de Mattos-Shipley, K., K. Ford, F. Alberti, A. Banks, A. Bailey and G. Foster (2016). "The good, the bad and the tasty: the many roles of mushrooms." Studies in mycology **85**: 125-157.