



! Gerne Screenshots machen !

Analyse von Malaisefallen über DNA-Metabarcoding in 3 LTER-Gebieten; erste Ergebnisse aus 2020

Florian Leese, Dominik Buchner, Vasco Elbrecht, Peter Haase

LTER-D Jahrestagung
17. März 2021
virtuell





----- letztes Jahr -----

Chancen & Herausforderungen genetischer Methoden für großflächige Biodiversitätserhebungen

Florian Leese, Universität Duisburg-Essen

LTER-D Jahrestagung
9. März 2020
Umweltforschungszentrum (UFZ)
Leipzig





Florian Leese, Dominik Buchner, Vasco Elbrecht, Peter Haase

ILTER-D Jahrestagung
17. März 2021
virtuell





Letzter Termin: Wasserrahmenrichtlinien-Monitoring
der nordischen Länder. 5 Tage für 1008 Proben vor
Lockdown...

Metabarcoding for use in Nordic routine aquatic biomonitoring

- a validation study



Kristian Meissner, Vasco Elbrecht,
Dominik Buchner, Florian Leese et al.



Nach der Revolution → Konstitution!



<https://dnaqua.net>
<https://dnaquahub.eu>



→ DNAqua-Net WG3; Appearing soon!

Pawlowski et al. 2020: Available in 3 languages!

Wissenstransfer und Standardisierung



CEN/TC 230/WG 28 N 5

CEN/TC 230/WG 28
DNA and eDNA methods

Email of secretary: jari.nuutinen@syke.fi
Secretariat: SFS (Finland)

CEN-TC230-WG28 DNA N5 Draft2

Document type: Working draft

Date of document: 2021-01-21

Expected action: VOTE

Action due date: 2021-02-19

Background: Vote on the next step of the "Water quality — Collecting and preserving samples for capture of environmental DNA in aquatic environments" draft.

Committee URL: <https://cen.iso.org/livelink/livelink/open/centc230wg28>



TECHNICAL REPORT
RAPPORT TECHNIQUE
TECHNISCHER BERICHT

CEN/TR 17245

September 2018

ICS 13.060.70

English Version

Water quality - Technical report for the routine sampling of benthic diatoms from rivers and lakes adapted for metabarcoding analyses

Qualité de l'eau - Rapport technique pour l'échantillonnage en routine de diatomées benthiques dans les rivières et les plans d'eau adapté pour les analyses en metabarcoding

Wasserbeschaffenheit - Technischer Bericht zur routinemäßigen Beprobung benthischer Diatomeen aus Fließgewässern und Seen angepasst für Metabarcodinganalysen



Jetzt geht's wirklich los:

- Juni/Juli 2020: 10
Fallenleerungen aus 3
LTER-Gebieten
- Rhein-Main
Observatorium (RMO)
- Steigerwald (StW)
- Hunsrück (HU)



Fragen

- Können wir nicht-invasiv die Artendiversität via Ethanol-Metabarcoding rekonstruieren?
- Wie vergleichbar sind die Daten zwischen Fallen?
- Kann das Protokoll für 1000e Proben skaliert werden?



Wo wurde was gemacht?



	Hunsrück (HU)		Rhein-Main-Ob. (RMO)		Steigerwald (StW)	
Fallentypen	Wald (1)	Offenland (2)	Wald (1)	Offenland (2)	Wald (1)	Offenland (2)
A = Kref. w.	X	X	X	X	X	X
B = Bartak D.	X	X	X	X	X	X
C = Kref. s.	X	X	X	X	X	X
D = Bartak F.	X	X	X	X	X	X
E = Bay. W.	X	X	X	X	X	X

Fallen wurden rotiert – hier aber nur eine Leerung betrachtet!

Wo wurde was gemacht?



Foto + weitere Infos: Peter Haase / Vortrag Johannes Uhler

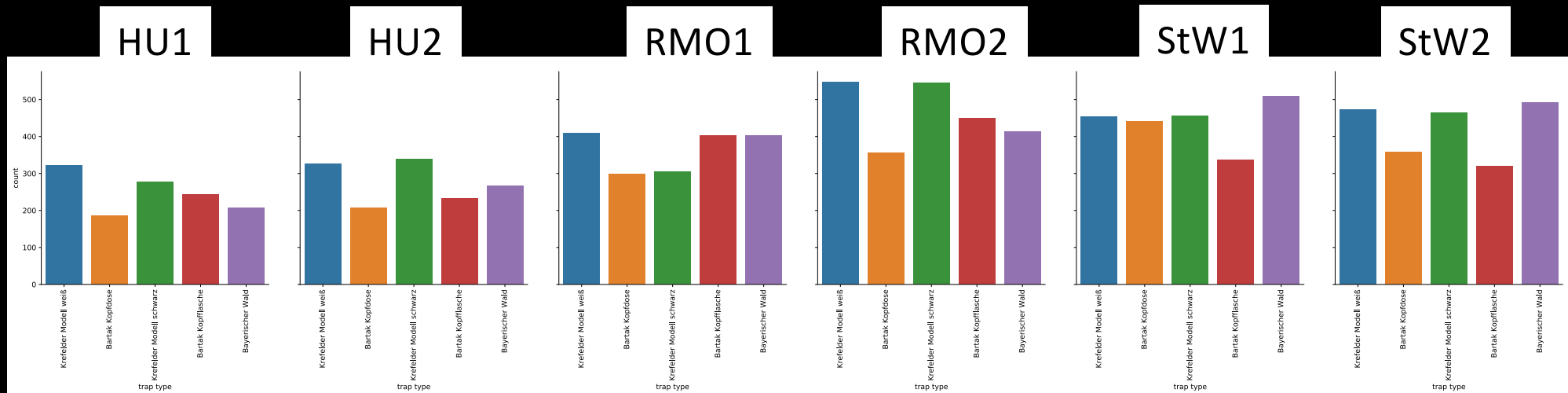
Was wurde gemacht?



1. Ethanol gesamt gefiltert (CN-Filter, ,original'),
2. Größensortierung (<4 mm ,klein', >4 mm ,groß')
3. Neues EtOH, dann Probe gefroren (-80°C), gefiltert (,klein', ,groß')
4. Separat extrahiert (jeweils 2x)
5. PCR (fwhF2:fwhR2n; Vamos, Elbrecht, Leese 2017)
6. Illumina MiSeq (100k+ je Replikat [Zukunft Hi/NovaSeq])
7. Standard bioinformat. Analyse mit JAMP (Vsearch) (V. Elbrecht)
8. Taxonomische Zuordnung via BOLDigger (Buchner & Leese 2020)

30 Proben – 150 Datensätze; Manuskript(e) in Vorbereitung,
hilfreiche Anmerkungen immer willkommen

Metabarcoding findet viele Arten!



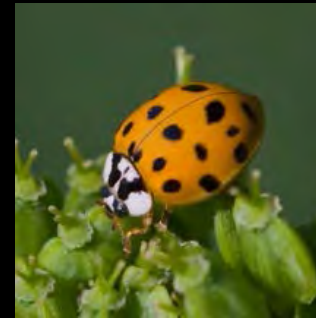
Gesamt Artenzahlen je Falle über 3 Standorte

- Je LTER-Gebiet und Fallentyp zwischen 190 und 510 Arten / Leerung

Buchner, Elbrecht, Leese & Haase in Vorb.

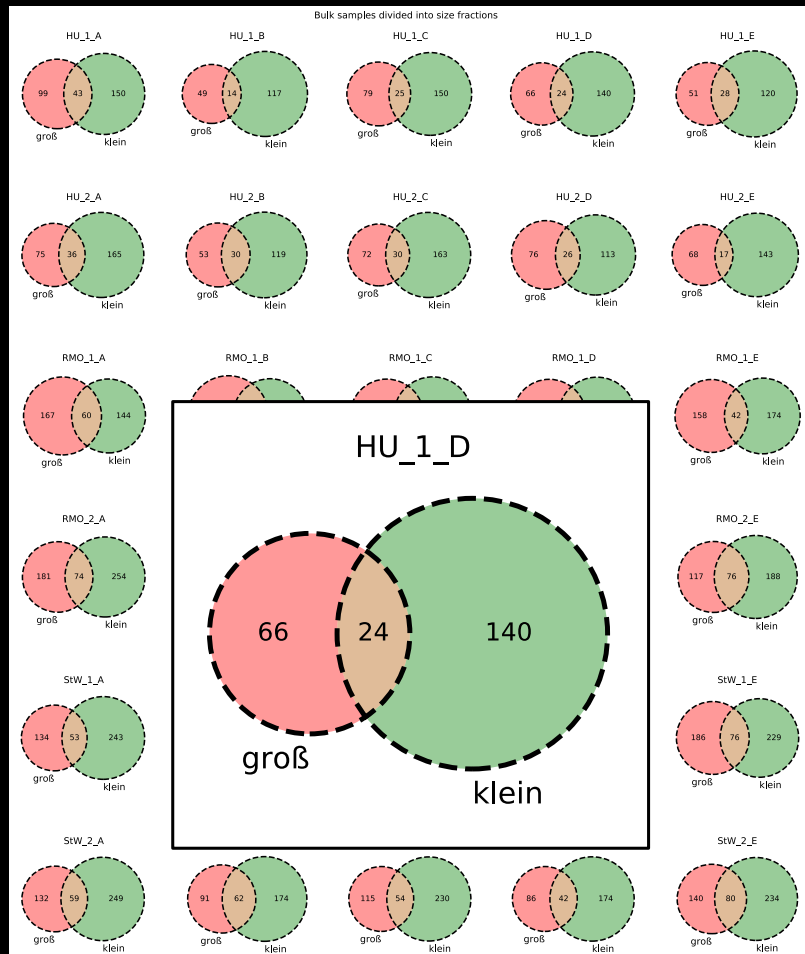
Häufige Arten

Family	Genus	Species
Syrphidae	Melanostoma	mellinum
Cecidomyiidae	Peromyia	fungicola
Anthomyiidae	Delia	platura
Syrphidae	Sphaerophoria	scripta
Crambidae	Chrysoteuchia	culmella
Dolichopodidae	Sciapus	platypterus
Sciaridae	Ctenosciara	hyalipennis
Sciaridae	Bradysia	trivittata
Anthomyiidae	Hylemya	urbica
Lauxaniidae	Minettia	lupulina
Sciaridae	Bradysia	brevispina
Erebidae	Hypena	proboscidalis
Anthomyiidae	Botanophila	fugax
Gelechiidae	Bryotropha	terrella
Coccinellidae	Harmonia	axyridis
Mycetophilidae	Mycetophila	perpallida
Sciaridae	Peyerimhoffia	vagabunda
Stenopsocidae	Graphopsocus	cruciatus
Coccinellidae	Coccinella	septempunctata
Empididae	Empis	livida
Mycetophilidae	Mycetophila	fungorum
Syrphidae	Episyrphus	balteatus
Fanniidae	Fannia	armata
Sciaridae	Scatopsiara	atomaria
Tortricidae	Celypha	lacunana
Pieridae	Pieris	napi
Asilidae	Neoitamus	socius
Sarcophagidae	Sarcophaga	variegata
Tettigoniidae	Pholidoptera	griseoptera
Drosophilidae	Scaptomyza	pallida



Sehr viel auf Artniveau – dank GBOL - zuweisbar

Große vs. kleine Fraktion ‚bulk‘



- Mehr Arten in der kleinen Fraktion
- Analog zum Ergebnis von Elbrecht et al. (2017) sowie Elbrecht et al. (preprint s.u.)
- **1 oder 2 Anteile groß auf 10 klein sinnvoll**

ORIGINAL RESEARCH

WILEY Ecology and Evolution

Sorting things out: Assessing effects of unequal specimen biomass on DNA metabarcoding

Vasco Elbrecht¹ | Bianca Peinert¹ | Florian Leese^{1,2}

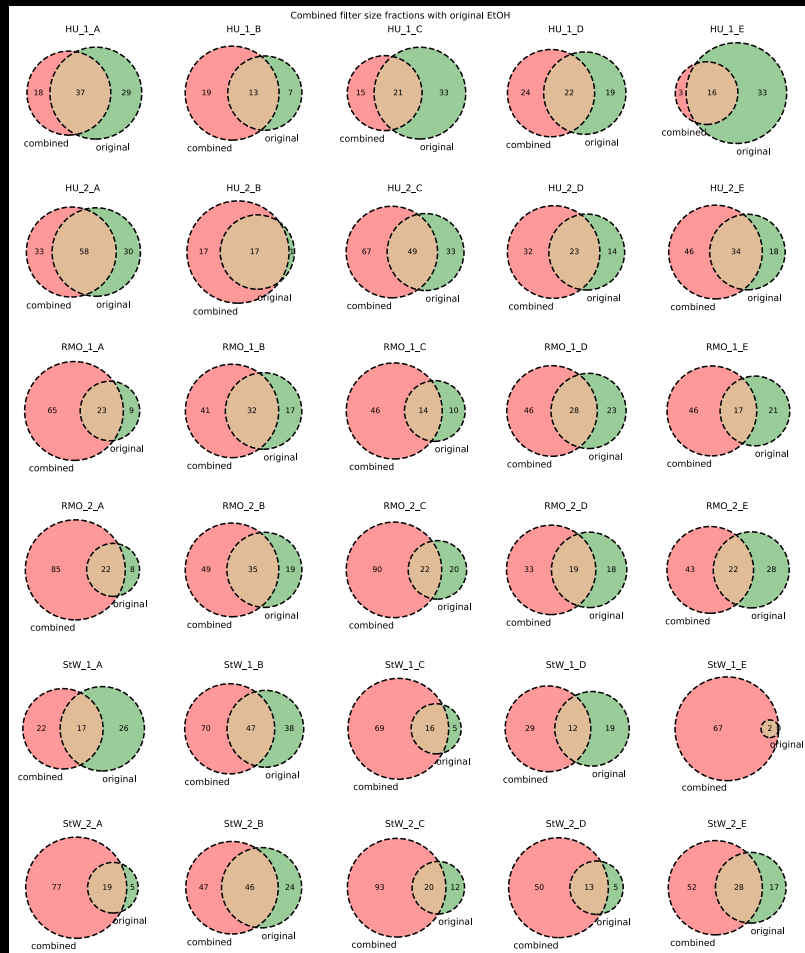
Pooling size sorted malaise trap fractions to maximise taxon recovery with metabarcoding

Vasco Elbrecht, Sarah J. Bourlat, Thomas Hörren, Angie Lindner, Adriana Mordente, Niklas W. Noll, Martin Sorg, Vera M.A. Zizka

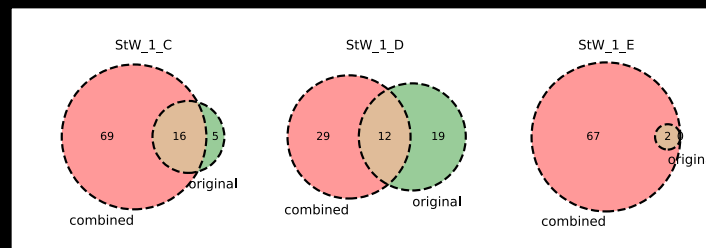
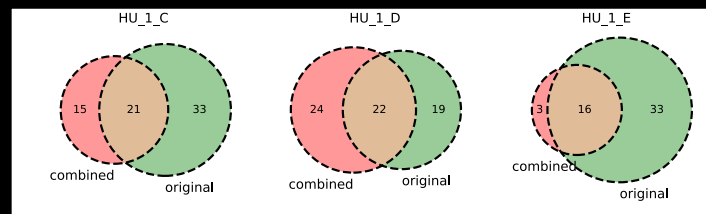
doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.09.118950>

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.09.118950v1>

1. Ethanolphase vs. 2. Ethanolphase!

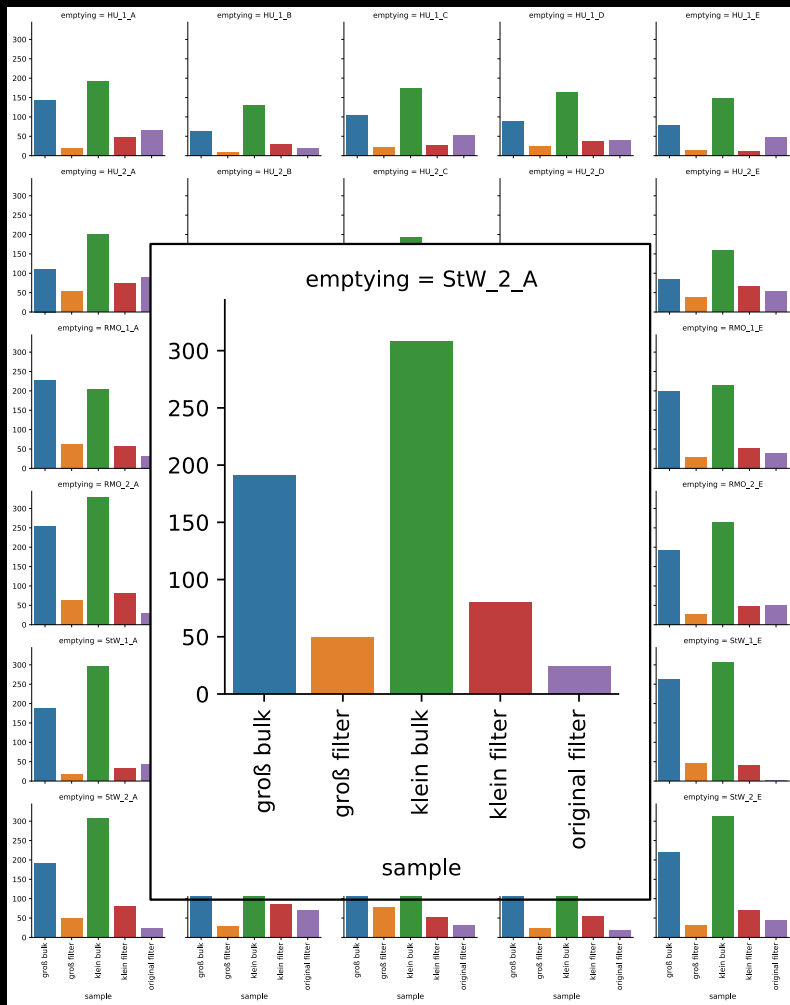


- Dtl. Unterschiede in 1. vs. 2. Ethanol-Phase („combined“)
- **Deutlich weniger Arten als in Bulk!**



Buchner, Elbrecht, Leese & Haase, in Vorbereitung

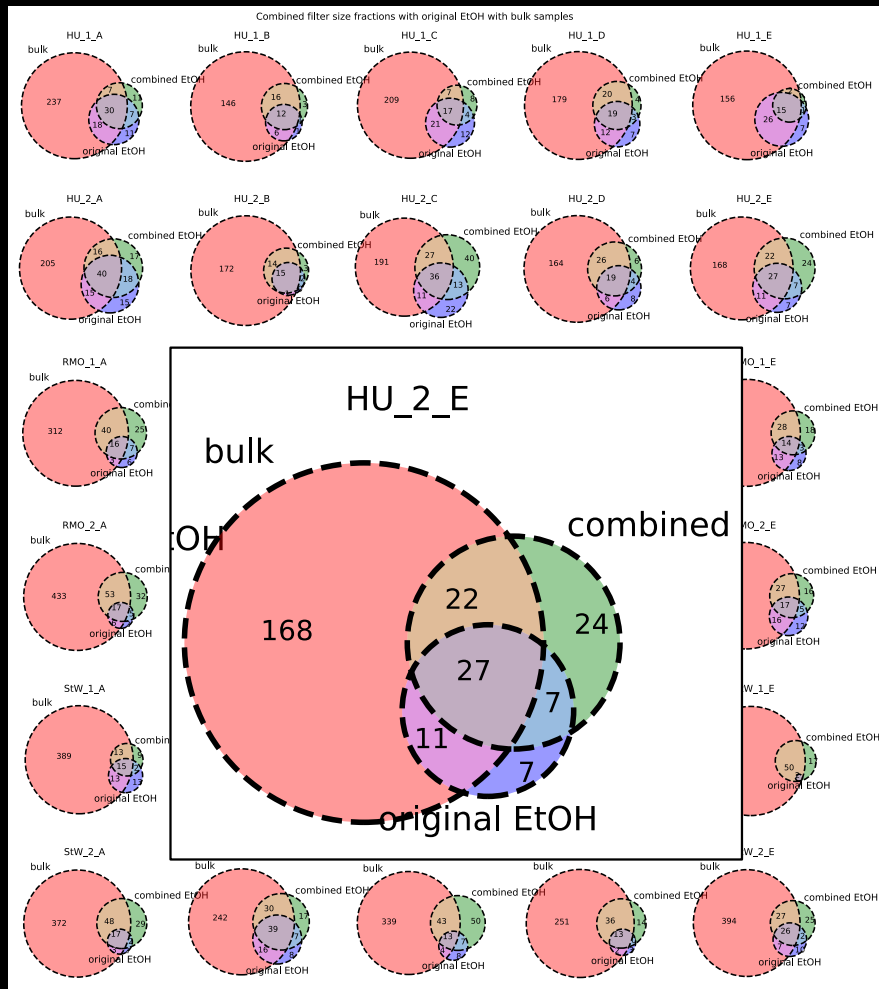
Ethanol-Filtrat: leider nicht befriedigend



- Homogenisierte Mischprobe deutlich besser als EtOH (y-Achse Artenzahl)
- 2. Phase, gefroren, oft besser als 1. Phase ('Original Filter')

Buchner, Elbrecht, Leese & Haase, in Vorbereitung

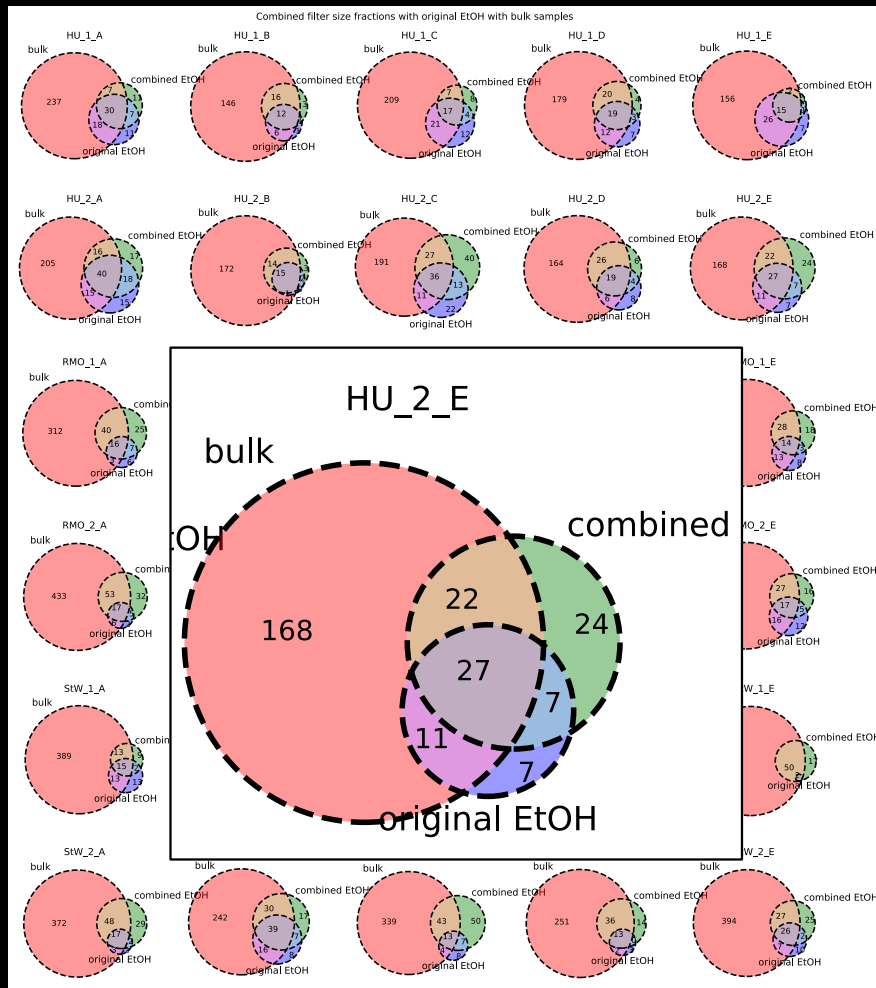
Ethanol-Filtrat ist leider nicht befriedigend



- Homogenisierte Mischprobe deutlich besser als EtOH
- Ca. $\frac{3}{4}$ der Arten nur in Bulk!
- Anders als im Süßwasser (Zizka et al. 2019 etc.)
- 2. Phase, gefroren, oft besser als 1. Phase
- Ethanol: einige Taxa, die nicht in der homogenisierten Probe detektiert wurden!

Buchner, Elbrecht, Leese & Haase, in Vorbereitung

Nicht-invasive (...) Lyse und Metabarcoding



- Idee anstatt Ethanol die Mischprobe in Lysepuffer 'anzuverdauen' können vielversprechend sein
- Am Ende hat man 500 mL 'matschige' Tiere, die schwer zu separieren und teils noch schwerer zu bestimmen sind
- Aufwändiger, möglich, Erfahrungen oft nicht so positiv wie in den Veröffentlichungen

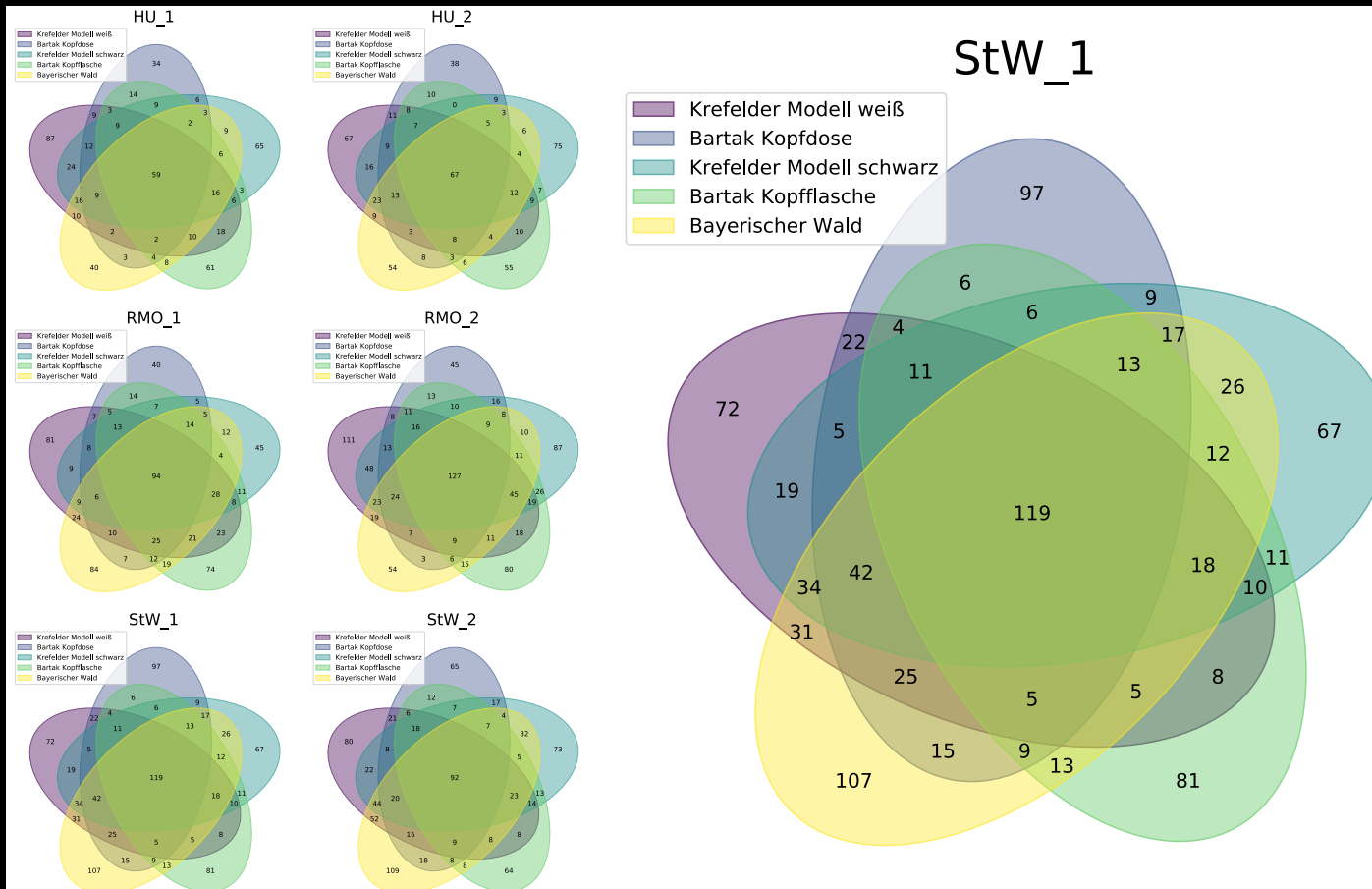


Can non-destructive DNA extraction of bulk invertebrate samples be used for metabarcoding?

Melissa E. Carew¹, Rhys A. Coleman¹ and Ary A. Hoffmann¹

¹ School of BioSciences, The University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia
² Applied Research, Melbourne Water Corporation, Melbourne, Victoria, Australia

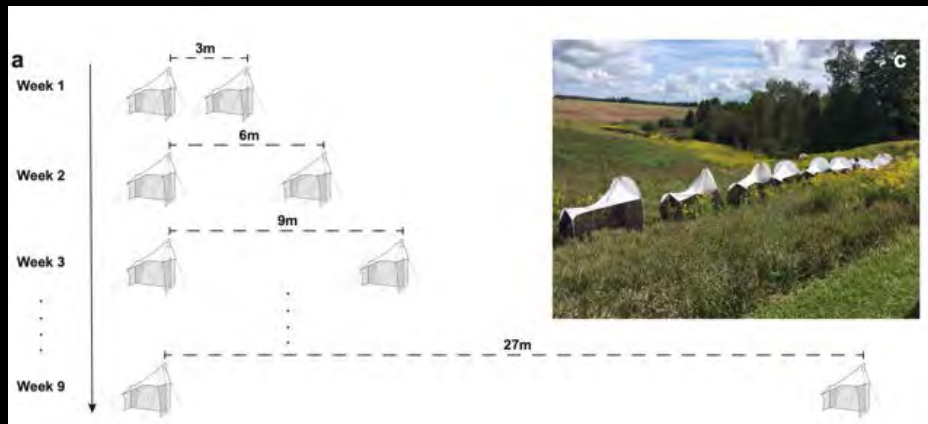
Wie unterschiedlich sind 5 Fallentypen?



- Jede Falle 10-20% der Arten exklusiv
- 20-30% overlap mit allen Fallen
- Glas halb voll oder halb leer?
- Was sind unsere Erwartungen?

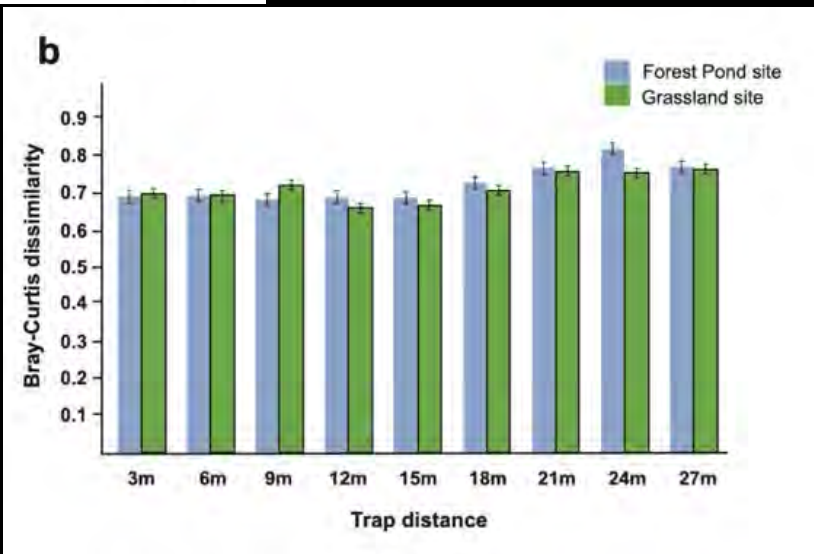
Buchner, Elbrecht, Leese & Haase, in Vorbereitung

Welche Unterschiede erwarten wir mit einem Typ?



Steinke et al. in review

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.30.321430v1.full>



- Jede Falle 10-20% der Arten exklusiv
- 20-30% geteilt mit allen
- Glas halb voll oder halb leer?
- Was sind unsere Erwartungen?
- **Gleicher Fallentyp: Nebeneinander nur 20-35% Überlapp**

Backbone für Hochdurchsatz-Metabarcoding steht

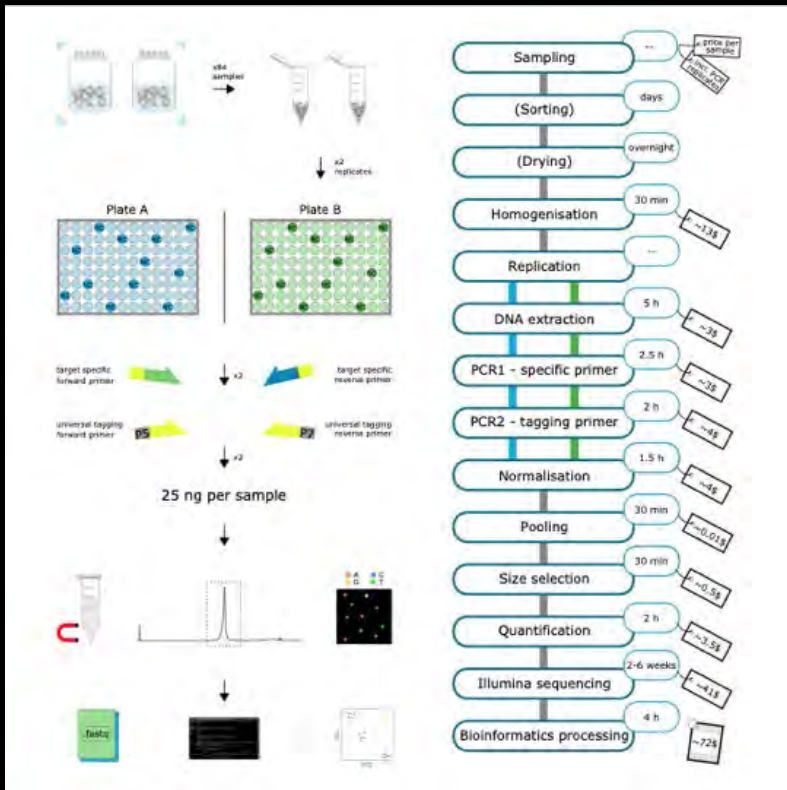
OPINION

WILEY Freshwater Biology

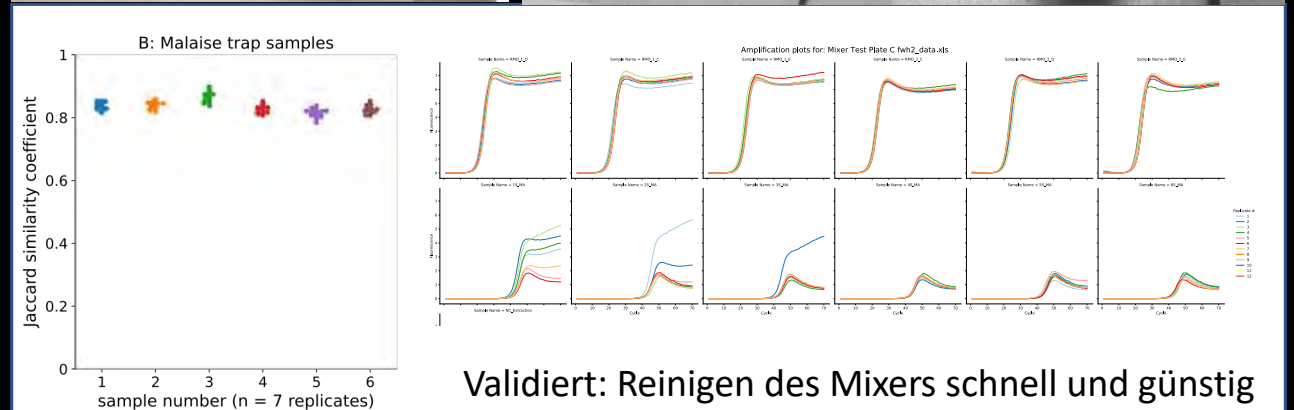
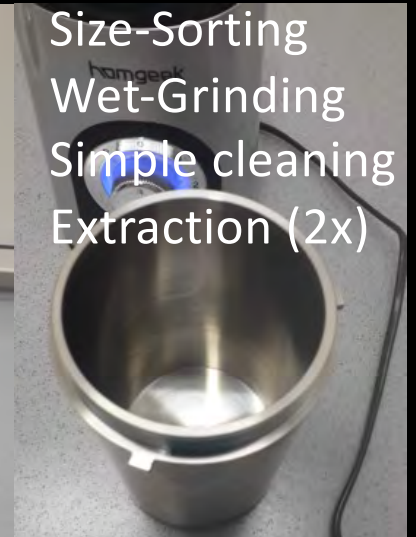
Scaling up DNA metabarcoding for freshwater macrozoobenthos monitoring

Vasco Elbrecht¹ | Dirk Steinke^{1,2}

Buchner, Macher et al. (in prep.)



- Size-Sorting
- Wet-Grinding
- Simple cleaning
- Extraction (2x)



Buchner, Haase & Leese (2021): <https://doi.org/10.3897/aca.4.e65022>

Backbone für Hochdurchsatz-Metabarcoding steht

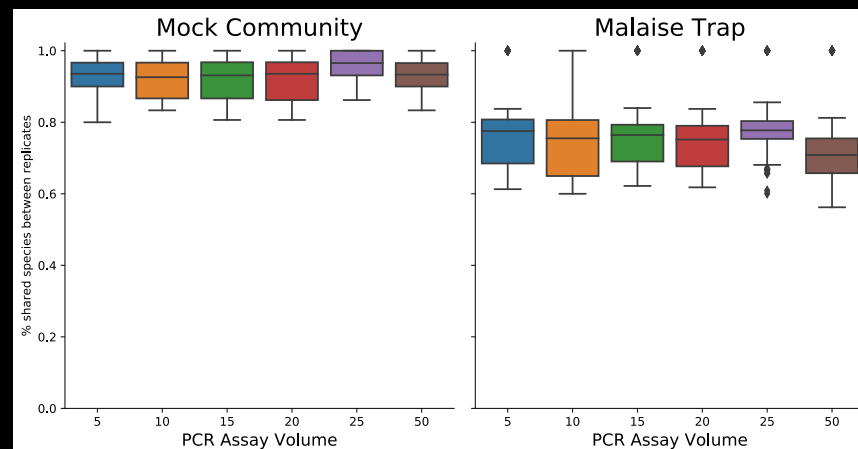
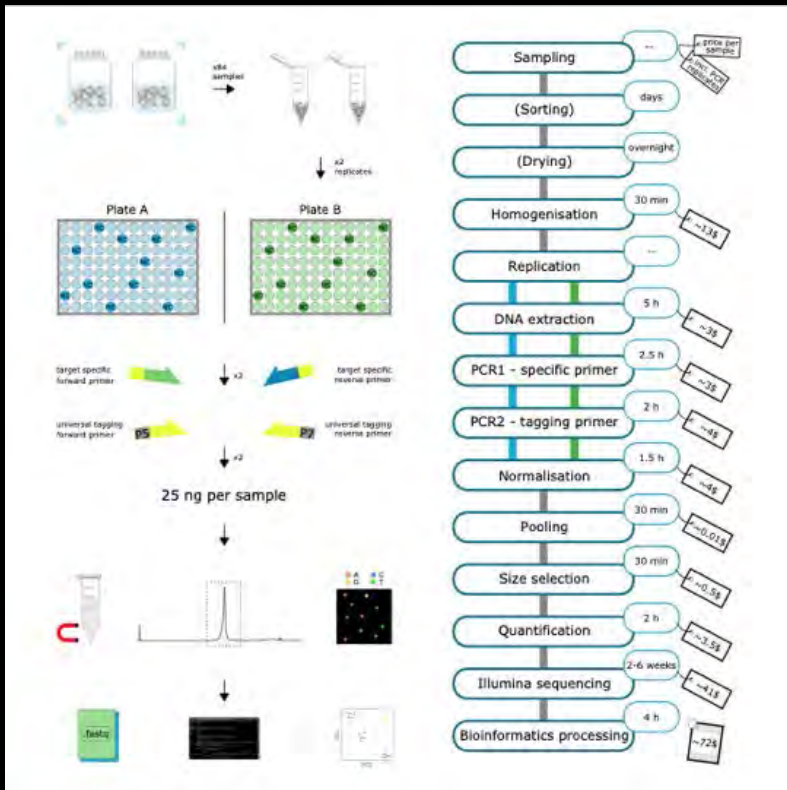
OPINION

WILEY Freshwater Biology

Scaling up DNA metabarcoding for freshwater macrozoobenthos monitoring

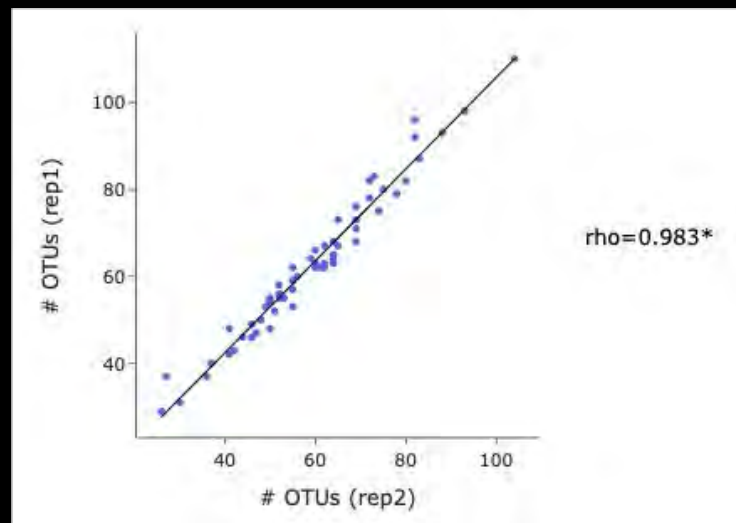
Vasco Elbrecht¹ | Dirk Steinke^{1,2}

Buchner, Macher et al. (in prep.)



- Replikate mit kleinem Volumen!

Buchner et al. (in review EcolEvol)





Fragen

- Können wir nicht-invasiv die Artendiversität via Ethanol-Metabarcoding rekonstruieren?
- Wie vergleichbar sind die Daten zwischen Fallen?
- Kann das Protokoll für 1000e Proben skaliert werden?





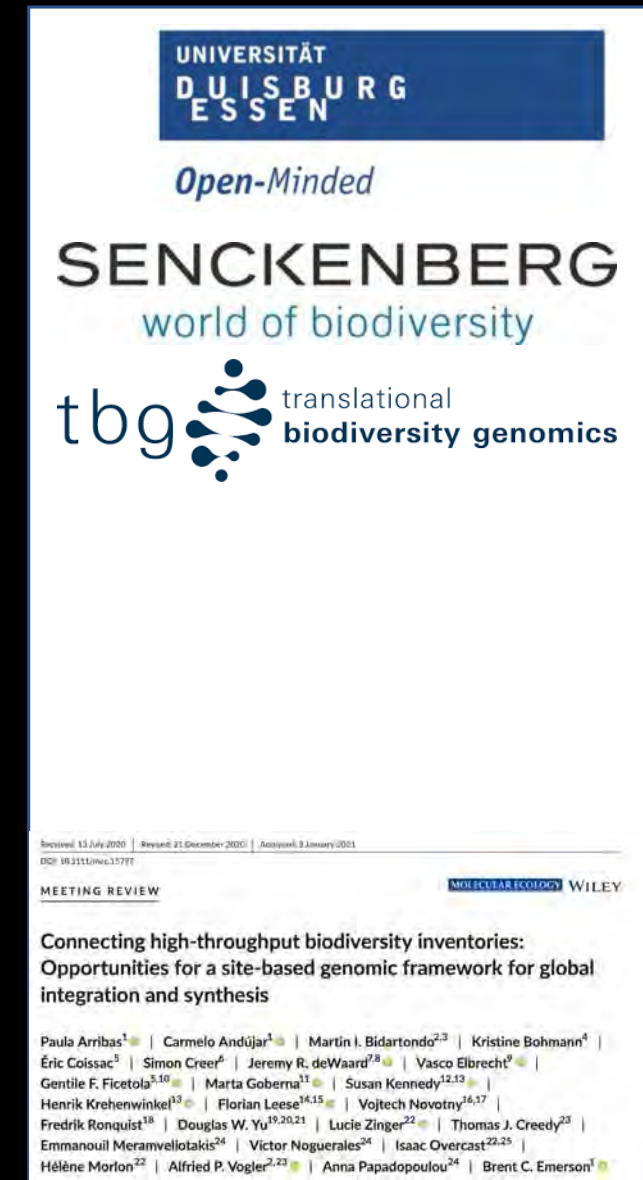
Fragen

- Können wir nicht-invasiv die Artendiversität via Ethanol-Metabarcoding rekonstruieren?
- Wie vergleichbar sind die Daten zwischen Fallen?
- Kann das Protokoll für 1000e Proben skaliert werden?



Plan für 2021:

- >1700 Malaise-Proben (Haase, LTER)
- Proben Größensortieren (automatisiert)
- EtOH 'wet grinding' komplette Probe
- 2x unabh. Extraktion / 2-step PCR (fwhF2+R2n)
- HiSeq 2x150 bp
- **ZUSAMMENARBEIT DER INITIATIVEN AUSBAUEN (NAT./INTERNAT.)**
- **Validierungsstudien ausweiten (Ringtests)**



Weitere Erkenntnisse

Umwelt-DNA für Insekten auf Vormarsch

Received: 27 April 2020 | Revised: 4 November 2020 | Accepted: 11 November 2020
DOI: 10.1002/edn3.177

SPECIAL ISSUE ORIGINAL ARTICLE

Environmental DNA

WILEY

Improved freshwater macroinvertebrate detection from environmental DNA through minimized nontarget amplification

Florian Leese^{1,2} | Mandy Sander¹ | Dominik Buchner¹ | Vasco Elbrecht³ | Peter Haase^{4,5} | Vera M. A. Zizka^{1,3}

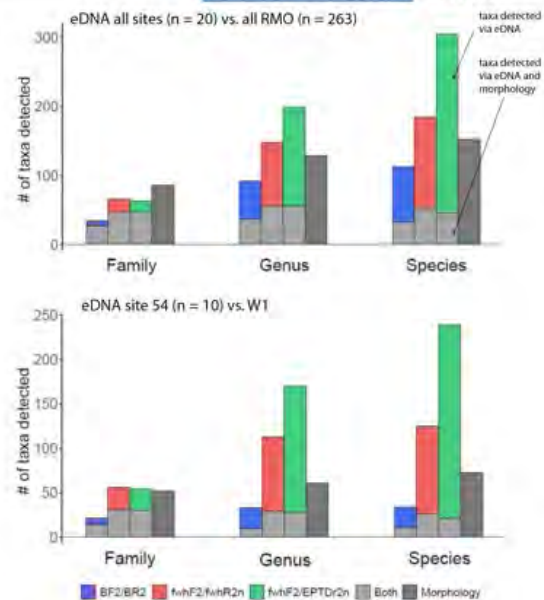
LEESE ET AL.

Environmental DNA

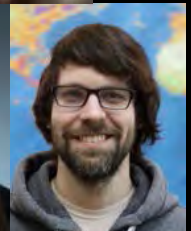
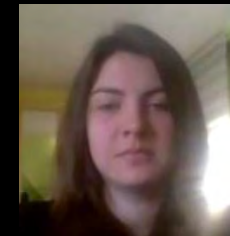
WILEY

271

FIGURE 6 Top panel: Comparison of detected taxa between the 20 eDNA and 263 morphological assessments in the RMO. The shaded portions in the columns indicate the number of taxa shared between eDNA and morphology-based assessment. Bottom panel: Comparison of detected taxa between the "site 54" eDNA samples and the long-term morphological assessment data from the adjacent W1 site [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



- eDNA Zeitreihe im RMO LTER-Gebiet
- Insekten-spezifische(r) Primer
- Einfache, schnelle Erhebung



Einfache(re) Software

Software Description

BOLDigger – a Python package to identify and organise sequences with the Barcode of Life Data systems

Dominik Buchner¹, Florian Leese¹

¹ University of Duisburg-Essen, Aquatic Ecosystem Research, Universitätsstr. 5, 45141 Essen, Germany

Corresponding author: Dominik Buchner (dominik.buchner@uni-due.de)

Academic editor: Dirk Steinke | Received 22 April 2020 | Accepted 29 May 2020 | Published 3 June 2020



Figure 1. Graphical User Interface of BOLDigger.

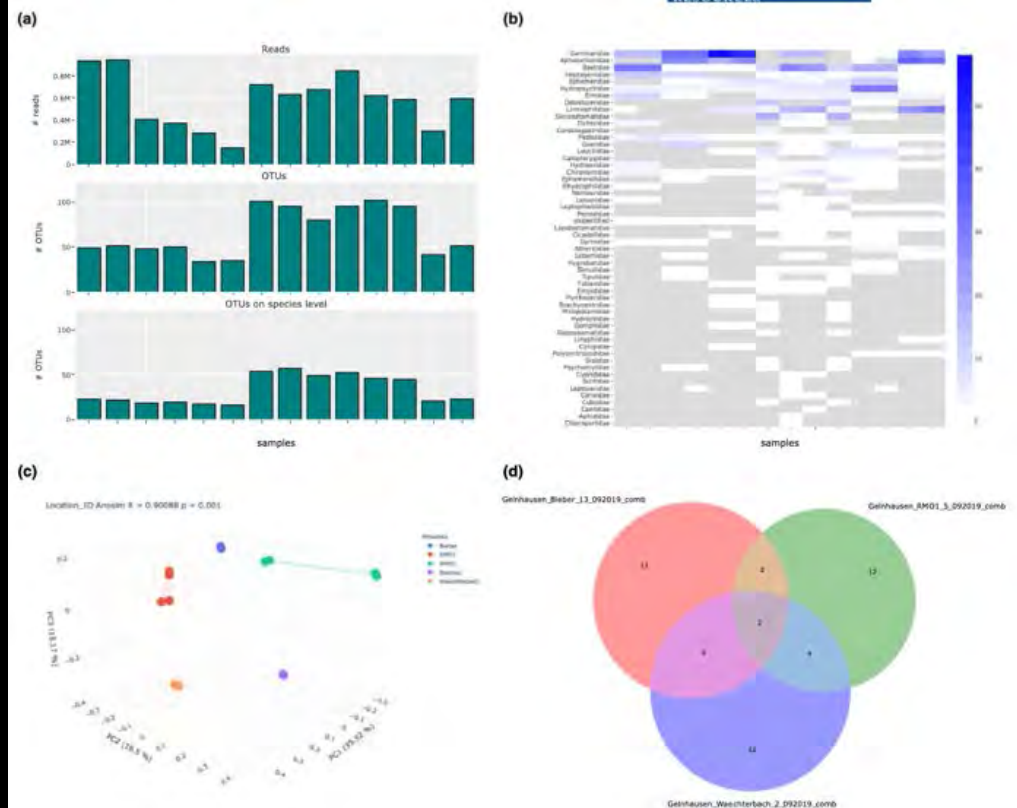
Received: 8 September 2020 | Accepted: 9 February 2021

DOI: 10.1111/1755-0998.13358

RESOURCE ARTICLE

MOLECULAR ECOLOGY
RESOURCES WILEY

TaxonTableTools: A comprehensive, platform-independent graphical user interface software to explore and visualise DNA metabarcoding data



Metabarcoding + Computer Vision

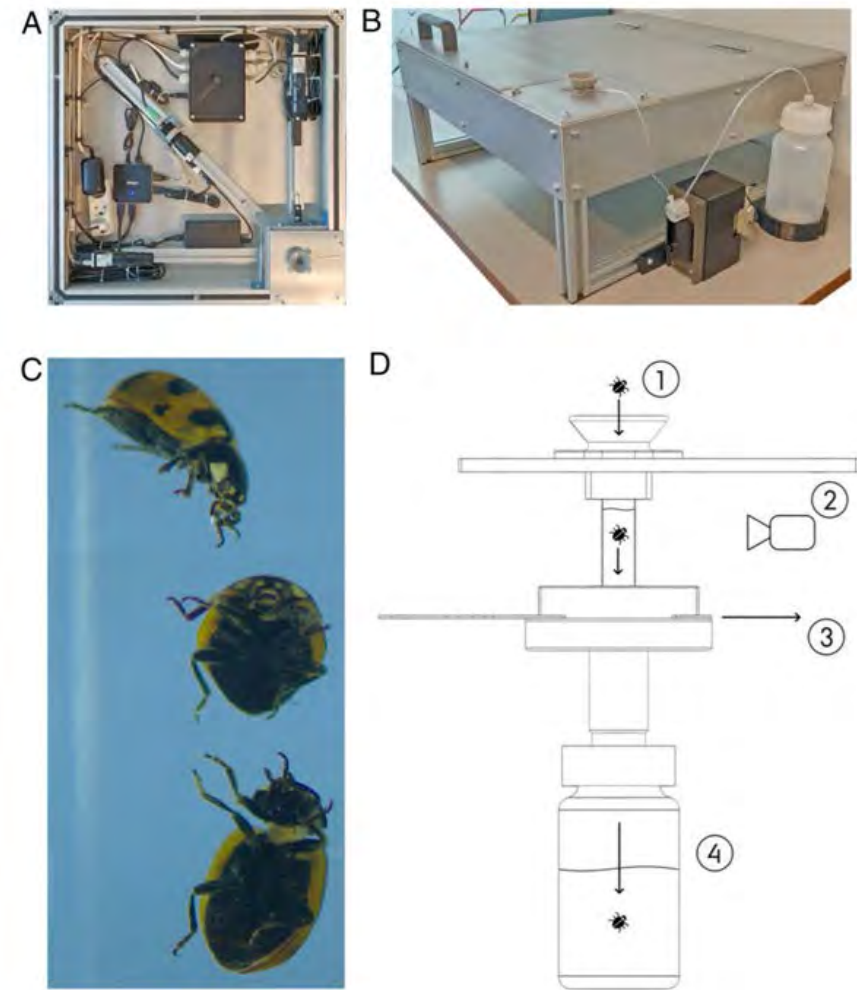
SPECIAL FEATURE: PERSPECTIVE

Deep learning and computer vision will transform entomology

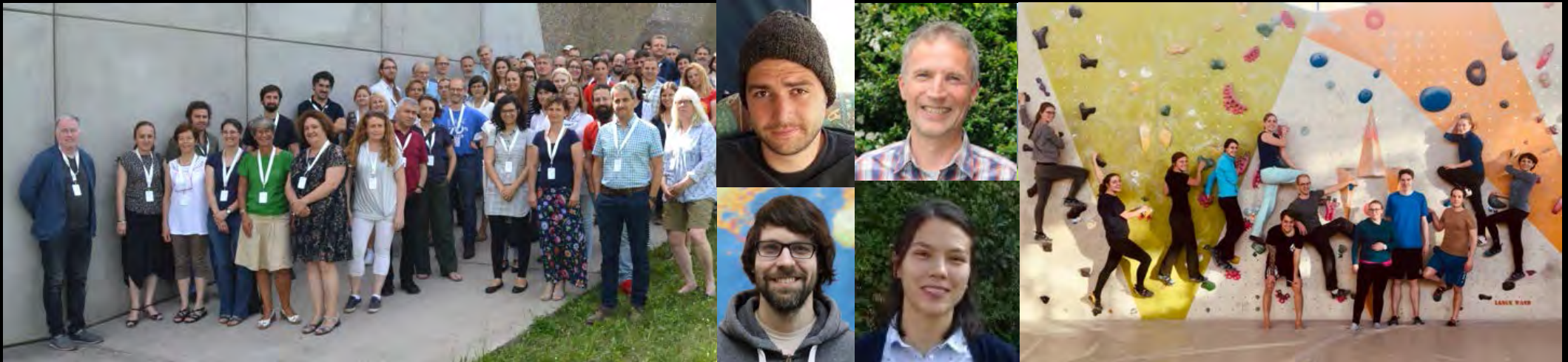
Toke T. Høye^{a,b,1}, Johanna Årje^{a,b,c}, Kim Bjerger^d, Oskar L. P. Hansen^{a,b,e,f,g}, Alexandros Iosifidis^h, Florian Leeseⁱ, Hjalte M. R. Mann^{a,b}, Kristian Meissner^j, Claus Melvad^{b,d}, and Jenni Raitoharju^k

Edited by Matthew L. Forister, University of Nevada, Reno, NV, and accepted by Editorial Board Member May R. Berenbaum October 23, 2020 (received for review March 24, 2020)

Høye et al. 2021, PNAS



Egal was – aber ganz besonders im Biodiversitätsmonitoring: Es funktioniert besser gemeinsam!



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



@leeselab @dnaquanet



Kolleg*innen der LTER-Gebiete Steigerwald, Hunsrück, RMO