



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## What's in the diet? DNA-based analysis for qualitative and quantitative assessment of animal diet

Groen, K.

### Citation

Groen, K. (2024, October 9). *What's in the diet?: DNA-based analysis for qualitative and quantitative assessment of animal diet*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4094106>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4094106>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## Samenvatting

Het bestuderen van diëten van dieren speelt een cruciale rol binnen de ecologie door inzicht te bieden in trofische interacties, energiestromen en nutriëntenkringlopen binnen ecosystemen. Door te analyseren wat dieren eten, kunnen onderzoekers specialisatie van soorten en roofdier-prooi dynamieken begrijpen, wat van groot belang is voor natuurbescherming en ecosysteembeheer. Dieetanalyses zijn ook essentieel voor het beheersen van invasieve soorten, het voorspellen van milieuveranderingen en het beoordelen van de gezondheid van ecosystemen.

Ecologen gebruiken verschillende technieken om diëten van dieren te analyseren, waaronder niet-genetische en genetische methoden. Niet-genetische benaderingen, zoals visuele inspectie van maaginhoud, uitwerpselen en veldobservaties van jacht, bieden directe inzichten maar kunnen arbeidsintensief zijn en worden beïnvloed door verschillen in vertering van bepaalde prooidiersoorten. Genetische benaderingen, zoals DNA-sequencing van uitwerpselen of maaginhoud, maken een nauwkeurige identificatie van geconsumeerde soorten mogelijk, wat zowel kwalitatieve als kwantitatieve dieetstudies vergemakkelijkt. Deze geavanceerde methoden hebben echter te maken met uitdagingen zoals onvolledige referentiedatabases, niet-gestandardiseerde protocollen en problemen met kwantitatieve nauwkeurigheid.

Deze scriptie heeft als doel enkele van de kritieke uitdagingen die gepaard gaan met DNA-gebaseerde analyses te onderzoeken door middel van kwalitatieve en kwantitatieve beoordeling van het dieet van dieren. Het verkent de rijkdom aan mogelijkheden en uitdagingen die deze innovatieve benadering biedt en biedt een uitgebreide studie naar de voordelen, beperkingen en toepassingen voor ecologisch onderzoek waardoor ons begrip van complexe dieetinteracties in ecologisch onderzoek wordt verbeterd.

Hoofdstuk 1 begint met het schetsen van de diverse toepassingen van dieetstudies in verschillende ecologische onderzoeksvelden. Vervolgens wordt ingegaan op de methoden van dieetanalyses, waarbij ze worden gecategoriseerd in genetische en niet-genetische benaderingen. Het hoofdstuk bespreekt vervolgens de uitdagingen die gepaard gaan met niet-genetische methoden en benadrukt hoe genetische (DNA-gebaseerde) kwalitatieve en kwantitatieve

technieken deze problemen kunnen oplossen. De inleiding sluit af met een bespreking van de huidige beperkingen en kennishiaten in DNA-gebaseerde dieetstudies en schetst mijn onderzoeksdoelen om deze uitdagingen aan te pakken.

In Hoofdstuk 2 werd een robuuste methode ontwikkeld voor de kwantificering van DNA (hierna target DNA genoemd) afkomstig van geconsumeerde zaden in het dieet van bosmuizen. Hier hebben we vooral gekeken naar de methodologische biases van DNA-extractie, PCR-inhibitie en markerkeuze (PCR-assay en gevoeligheid) op de kwantificering van target DNA in de uitwerpselen van bosmuizen. Biologische biases, zoals de effecten van vertering, leeftijd en geslacht van de bosmuis, en het effect van andere dieetcomponenten in hun dieet op de hoeveelheden target DNA werden daarnaast onderzocht. Verder werden de darmpassagetijden voor het target DNA verkregen voor de bosmuis, waarbij een darmpassagetijd tussen 8 en 24 uur werd waargenomen voor 95% van het target DNA. We observeerden daarnaast dat standaard extractiekits betrouwbare kwantificering verhinderden en optimalisatie van de DNA extractie methode noodzakelijk was. PCR inhibitie werd voorkomen door het gebruik van droplet digital PCR, een inhibitie vrije manier van DNA kwantificeren. Verschillende DNA-markers, die op verschillende delen van het chloroplast gericht waren, beïnvloedden de detecteerbaarheid van target DNA. Echter, alle markers toonden een hogere hoeveelheid target DNA voor hogere zaadaantallen. Hoewel we methodologische biases zoveel mogelijk probeerden te voorkomen, bemoeilijkte DNA-afbraak door willekeurige verteringsprocessen een robuuste kwantificering enigszins, aangezien de hoeveelheden target DNA grote variatie vertoonden bij muizen die hetzelfde aantal zaden hadden geconsumeerd. We vonden echter dat biologische factoren zoals leeftijd, geslacht en andere dieetcomponenten de verteringspatronen en dus de kwantificering niet veranderden. Over het algemeen maakte de nieuw ontwikkelde, DNA-gebaseerde benadering een minimaal invasieve en robuuste kwantificering van kleine dieetcomponenten in uitwerpselen mogelijk, die anders niet detecteerbaar zouden zijn met traditionele niet-genetische methoden.

In Hoofdstuk 3 werd de bovengenoemde methode getest in een realistisch veldscenario. Biologische factoren zoals maaltijdgrootte en verteerbaarheid en hun effect op de hoeveelheid target DNA in de uitwerpselen van bosmuizen werden hier verder bestudeerd. Daarnaast onderzochten we de mogelijkheden om de

hoeveelheden target DNA in de uitwerpselen te relateren aan het daadwerkelijke aantal geconsumeerde zaden. We observeerden dat een grotere maaltijdgrootte ook de variabiliteit van target DNA in de uitwerpselen van bosmuizen vergrootte. Dit illustreerde verder dat, hoewel robuuste kwantificatietechnieken waren vastgesteld, het gebruik van uitwerpselen als startmateriaal, dat altijd onderhevig is aan verteringsprocessen, alleen betrouwbaar kan zijn wanneer voldoende uitwerpselenmonsters worden geanalyseerd om voor willekeurige DNA-afbraak te corrigeren. Door dit te doen, slaagden we erin statistisch significante verschillen in target DNA te verkrijgen wanneer muizen verschillende zaadaantallen gevoerd kregen. Dit stelde ons in staat kalibratiecurves te ontwikkelen die target DNA hoeveelheden relateren aan het aantal gevoerde zaden. Vervolgens werden deze curven toegepast in een veldproef om zaadinname in een wilde bosmuispopulatie te kwantificeren. We detecteerden zaad DNA in de fecale monsters van de in het veld gevangen bosmuizen, wat een zaad consumptie van maximaal 1 zaad aangaf (hoewel met grote betrouwbaarheidsintervallen). Dit was echter de allereerste studie die zaadinname in een realistisch veldscenario kwantificeerde met behulp van een DNA-gebaseerde analyse, wat aantoonde dat nauwkeurige schattingen van zaadinname kunnen worden verkregen mits een voldoende groot aantal monsters wordt geanalyseerd.

In Hoofdstuk 4 was het doel om te kijken naar de bijdrage van kleine prooi-soorten aan het dieet van leeuwen. We concludeerden dat de gevoeligheid van DNA-gebaseerde dieetanalyses helpt bij het detecteren van kleine taxa in vergelijking met niet-genetische methoden, maar dat deze gevoeligheid ook betekent dat het soorten zal detecteren die mogelijk niet zijn gegeten door het dier in kwestie. In onze studie vonden we een substantiële aanwezigheid (8% van het dieet) van mesopredator DNA in de fecale monsters van leeuwen, wat we interpreteerden als overmarkering door mesopredatoren. Daarnaast kan er ook sprake zijn van ecologische overdracht; uitwerpselen trekken insecten aan (coprofagische taxa), deze insecten trekken op hun beurt weer kleine roofdieren aan (zoals insectivoren). Via speeksel of eestrestanten of direct door het aanraken van de fecale monsters kunnen deze kleine roofdieren hun DNA overbrengen op de uitwerpselen van leeuwen. We concludeerden dat veldbesmetting (via overmarkering, ecologische overdracht of secundaire predatie) waarschijnlijk zeer vaak voorkomt in terrestrische studies van DNA-gebaseerde carnivoordieten en moet voor worden gecorrigeerd in de analyses. Een combinatie van DNA- en morfologisch gebaseerde methoden, die minder gevoelig zijn voor veldbesmetting

(zoals microscopische analyse van onverteerd materiaal, bijvoorbeeld haren), kan complementair zijn in dergelijke gevallen.

In Hoofdstuk 5, na kennis te hebben genomen van de biases en overwegingen in eerdere hoofdstukken en de geleerde lessen toe te passen, stapten we af van methodologische vragen en richtten we ons op een toegepaste ecologische vraag. We maakten gebruik van het vermogen om grote steekproefgroottes te analyseren met DNA-metabarcoding om een directe vergelijking van het dieet en de prooivoorkeur van leeuwen tussen vier verschillende Nationale Parken (NP's) mogelijk te maken om het effect van omheiningen te bestuderen. We vonden veranderende dieetcomposities en prooivoorkeuren van leeuwen over een gradient van volledig omheinde NP's tot volledig niet-omheinde NP's. Opvallend was dat het omheinde park ook een bijna tegenovergesteld patroon vertoonde in termen van prooivoorkeuren voor specifieke prooi lichaamsgewichten in vergelijking met het niet-omheinde NP. De leeuwen in dit kleine en omheinde reservaat toonden een hoge voorkeur voor kleinere prooien en vermeden prooi gewichten die over het algemeen worden geprefereerd in andere NP's. Gedeeltelijk omheinde NP's vertoonden over het algemeen wisselende dieetresultaten, maar bevonden zich bijna altijd binnen de voorkeur grenzen die werden vastgesteld door de prooivoorkeuren van het omheinde en niet-omheinde NP en vertoonden geen bijzondere uitschieters voor bepaalde prooi-soorten.

Hoofdstuk 6 behandelt de uitdagingen en kansen die gepaard gaan met DNA-gebaseerde analyses voor kwalitatieve en kwantitatieve beoordeling van diëten van dieren. Hier verken ik de interpretatie van DNA-afgeleide dieetdata en benadruk ik het potentieel van het combineren van high-throughput sequencing en diagnostische PCR-technieken om de nauwkeurigheid te verbeteren. Verder benadruk ik de noodzaak om methodologische, biologische en omgevingsbiases aan te pakken om een betere overeenstemming te bereiken tussen het geschatte dieet en het werkelijke dieet. Bovendien bespreek ik de complementariteit van genetische en niet-genetische methoden, waarbij ik concludeer dat het integreren van deze benaderingen dieetstudies kan verbeteren. De resultaten van deze scriptie onderstrepen verder het belang van voortdurende technologische vooruitgang en multidisciplinaire methoden voor nauwkeurige reconstructie van diëten en ecologisch onderzoek, en benadrukken het potentieel van genetische technieken om uitgebreide inzichten te bieden in trofische interacties en ecosysteem dynamiek.