



Llywodraeth Cymru  
Welsh Government



1872 PRIFYSGOL  
ABERYSTWYTH  
UNIVERSITY



# Dilyniannodi DNA Planhigion Uwch mewn Pridd

Tachwedd 2022

# Adroddiad Terfynol

## Dilyniannodi DNA Planhigion Uwch mewn Pridd (Contract LIC C343/2017/2018)

Lina Avila Clasen, Andrew P Detheridge, John Scullion a Gareth Wyn Griffith

IBERS, Prifysgol Aberystwyth,  
Ebrill 2022

### Crynodeb gweithredol

Pwrpas Rheoliadau Asesu'r Effeithiau Amgylcheddol (AEA) (Amaethyddiaeth) (Cymru) yw sicrhau nad yw amgylchedd naturiol a hanesyddol Cymru yn cael ei niweidio trwy weithredoedd amaethyddol. Yn ymarferol, mae hyn yn golygu cynnal asesiad maes o lastir cyflawn cyn i unrhyw waith ddechrau. Mae'r Uned AEA (Amaethyddiaeth) hefyd yn ymchwilio i achosion posibl o dorri'r rheoliadau, a gall ddod ar draws ardaloedd sydd wedi'u trin yn ddiweddar, neu gaeau o bridd moel.

Trwy ddefnyddio'r methodologau DNA amgylcheddol sydd eisoes yn bodoli ar gyfer ffyngau, mae'r astudiaeth hon yn ymchwilio i weld a allai'r broses hefyd ganfod meinweoedd (gwreiddiau) a gweddillion eraill planhigion uwch yn y pridd, gan felly fod â'r potensial i helpu'r tîm AEA i gasglu tystiolaeth. Gellid defnyddio proses o'r math hwn mewn ffyrdd eraill yn y tîm, a gellid ei defnyddio, er enghraifft, yn y gwaith o fonitro cynefinoedd safleoedd adfer y tu allan i'r tymor (misoedd y gaeaf).

Profwyd effeithiolrwydd a chywirdeb y gwaith o fetabarcodio DNA amgylcheddol trwy gymharu DNA a dynnwyd o greiddiau pridd ag asesiadau botanegol safonol (% gorchudd) mewn tri chynefin glaswelltir amlwg. Canfuwyd bod y data DNA amgylcheddol a % gorchudd yn gyson iawn a bod y dull DNA amgylcheddol yn well o ran nodi gweiriau. Fodd bynnag, ni chafodd rhai rhywogaethau oedd yn bresennol mewn niferoedd isel iawn eu hadnabod.

Mae'r gwaith o ddatblygu'r fethodoleg ar gyfer DNA amgylcheddol ffyngau wedi'i drosi'n llwyddiannus i gynnwys data ar gyfer planhigion uwch, sef prif nod y prosiect hwn. Fodd bynnag, nid yw'n 'fwled aur' y gellir ei ddefnyddio ar ei ben ei hun heb gynnal profion ychwanegol ar draws ystod eang o samplau 'byd go iawn' o ymchwiliadau AEA.

- Mae'r gwaith o ddatblygu'r broses ar gyfer DNA amgylcheddol ffyngau wedi'i drosi'n llwyddiannus i gynnwys data ar blanhigion uwch, sef prif nod y prosiect hwn. Fodd bynnag, mae gan y broses DNA amgylcheddol rai cyfyngiadau ac, ar hyn o bryd, ni ellir ei defnyddio ar ei phen ei hun i brofi bod y rheoliadau wedi'u torri, neu fod safle adfer yn dychwelyd i'w ansawdd blaenorol cyn i'r digwyddiad dwysáu arno.
- Mae'r broses DNA amgylcheddol yn perfformio'n debyg i dechnegau arolygu mwy traddodiadol, gan ddosbarthu cymunedau planhigion i'r un grwpiau ag a

geir yn y Dosbarthiad Llystyfiant Cenedlaethol (NVC). Fodd bynnag, rhaid bod yn ofalus gan y gall ffactorau fel halogi gan y gwynt, methu â chanfod rhywogaethau sy'n brin iawn ar y safle a ffurfiant gwreiddiau planhigion arwain at ganlyniadau camarweiniol. Fodd bynnag, roedd y broses DNA amgylcheddol yn nodi mwy o rywogaethau o weiriau yn gyson nag yr oedd arolygwyr maes.

- Mae gweddillion planhigion yn diraddio'n sylweddol dros amser yn y pridd ond roedd modd canfod rhai gweddillion ar ôl cyfnod o 12 mis. Felly dylid ymyrryd a chasglu pridd cyn gynted â phosib ar ôl aflonyddwch er mwyn rhoi darlun cywir â phosibl o'r glastir blaenorol.
- Byddai meintioli rhywogaethau 'dangosydd allweddol' yn benodol gan ddefnyddio'r dull PCR mwy sensitif yn debygol iawn o fod yn fwy effeithiol mewn samplau pridd mwy hanesyddol, pan fydd mwy na thri i chwe mis wedi mynd heibio ers y digwyddiad aflonyddu.
- Mae data sy'n deillio o weddillion ffyngau yn rhoi arwydd ychwanegol a nodedig o arferion rheoli'r gorffennol (diffyg aflonyddwch pridd), hyd yn oed ar ôl i 12 mis fynd heibio ers y digwyddiad aflonyddu.
- Canfuwyd bod y technegau trawslun W presennol a ddefnyddir gan yr Uned AEA yn addas ar gyfer casglu samplau. Gellir casglu 800–1,000 g o bridd mewn 30 munud, gan ddarparu sampl o faint addas i'w ddadansoddi.
- Gallai storio amhriodol wrth symud samplau a diraddiad cysylltiedig o'r DNA newid y cymunedau planhigion a ddarganfyddir yn ddiweddarach. Felly, profwyd ystod o amodau storio a chanfuwyd mai ychydig iawn o newidiadau yn unig a gafwyd wrth storio yn yr oergell am gyfnod o hyd at bythefnos. Ni ddylid rhewi samplau cyn eu cludo i labordai dadansoddol ond, yn hytrach, dylid eu storio yn yr oergell i gadw'r DNA.
- Nododd gwaith dadansoddi o ddata metabarcodio ar gyfer poblogaethau ffyngau mewn priddoedd, cyn ac ar ôl tarfu arnynt, sawl rhywogaeth a oedd yn ddangosyddion dibynadwy o bridd glaswelltir lled-naturiol a hefyd rhywogaethau eraill sy'n nodweddiadol o bridd yr aflonyddwyd arno'n fawr.

# MYNEGAI

## Cyflwyniad

## Nod y prosiect

Cyflwynir canlyniadau'r prosiect hwn mewn pedair prif adran:

- 1) **Datblygu a phrofi marciwr cod bar ar gyfer DNA planhigion a chronfa ddata RDP i blanhigion**
  - 1A) Dewis primyddion a'u hoptimeiddio
  - 1B) Datblygu cronfa ddata RDP i blanhigion uwch yn seiliedig ar godau bar DNA ITS
  
- 2) **Cymharu DNA amgylcheddol planhigion mewn priddoedd â data'r Dosbarthiad Llystyfiant Cenedlaethol (NVC)**
  - 2A) Prosesu data dilyniant
  - 2B) Cymharu data NVC Brignant â data DNA amgylcheddol
  - 2C) Cymharu data NVC Kirby Muxloe â data DNA amgylcheddol
  - 2D) Turlough
  
- 3) **Meintioli cyfradd dadfeilio DNA planhigion mewn priddoedd yr aflonyddwyd arnynt (arbrwf potiau)**
  - 3A) Trosolwg
  - 3B) Dull
  - 3C) Canlyniadau
  
- 4) **Profi gwahanol ddulliau samplu a storio pridd**
  - 4A) Effaith gwahanol ddulliau samplu pridd
  - 4B) Cymhariaeth o'r pedwar cae yn Nhrawsgoed
  - 4C) Effaith gwahanol amodau storio pridd

## Trafodaeth

## Casgliad

## Cyfeiriadau

## Cyflwyniad

Mae dyfodiad bioleg foleciwlaidd yn y 1970au wedi trawsnewid ein dealltwriaeth o fioleg. Effeithiodd datblygiadau o'r fath yn bennaf ar fioleg celloedd a meddygaeth ond mae dylanwad technoleg DNA hefyd wedi lledaenu i feysydd ecoleg a thacsonomeg. Yn benodol, mae'r syniad y gallai dilyniannau DNA, yn ogystal â'u morffoleg, ddiffinio rhywogaethau biolegol yn newid y ffordd y mae'r byd naturiol a phrosesau ecolegol yn cael eu hastudio.

Arloeswyd y defnydd o ddilyniannau DNA i adnabod rhywogaethau gan Carl Woese (1977), a ddefnyddiodd gyfran fach (rhanbarth 5.8S; 160 pâr o fasau [bp] o hyd) o'r locws RNA ribosomaidd (rRNA) i nodi perthnasoedd rhwng rhywogaethau bacteriol amrywiol, ac yn y broses o wneud hyn i nodi bodolaeth parth cwbl newydd o fywyd, yr Archaea. Roedd y penderfyniad ganddo i ddewis y locws rRNA yn ysbrydoledig, gan fod y genynnau hyn yn bresennol ym mhob organeb fyw, gan ffurfio cydrannau allweddol o'r ribosomau, sef ffatrïoedd protein celloedd byw. Roedd dyfeisio'r adwaith cadwynol polymeras (PCR) gan Kary Mullis (1986) yn caniatáu llusoi (mwyhau) a dilyniannodi symiau bach penodol o DNA o gymysgeddau cymhleth gan ddefnyddio darnau synthetig bach o DNA (prymyddion oligoniwcleotid) sy'n cyd-fynd â'r dilyniant DNA ar ddau ben y darn a ddymunir. Arloeswyd dilyniannodi'r darnau hyn gan ddefnyddio dull terfynu cadwyn dideocsi Sanger ar gyfer dilyniannodi DNA (Sanger ac eraill, 1973), a chymharu dilyniannodi DNA trwy amrywiol ddulliau ffylogenetig, gan Felsenstein (1988) ac eraill.

Cynlluniodd White ac eraill (1990) set o brymyddion oligoniwcleotid i ganiatáu mwyhau, trwy broses PCR, ranbarth mwy amrywiol gwahanwyr trawsgrifedig mewnol (internal transcribed spacer – ITS) clwstwr y genynnau rRNA. Cynlluniwyd y rhain yn wreiddiol i ganiatáu adnabod ffyngau o myseliwm sy'n tyfu mewn dysglau Petri yn seiliedig ar debygrwydd i ddilyniannau DNA o fadarch, ond, wedi hynny, maent wedi cael eu defnyddio'n helaeth ar gyfer llawer o ewcaryotau eraill. Cynlluniwyd prymyddion ITS White ac eraill (1990) i gyd-fynd â rhanbarthau wedi'u cadw o fewn genynnau rRNA sydd ar y naill ochr a'r llall i'r rhanbarth ITS ac felly roeddent yn gallu mwyhau rhanbarth ITS ystod eang o ewcaryotau. Er eu bod ymhlith y dilyniannau cynharaf o brymyddion PCR i gael eu cyhoeddi, mae'r un prymyddion hyn yn dal i gael eu defnyddio'n eang heddiw, gan gynnwys yn yr astudiaeth bresennol. Defnyddiwyd yr un dull yn ddiweddarach gan dacsonomegwyr ffwngaid i gael dilyniannau DNA o samplau cyfeiriol herbariwm/ffwngariwm er mwyn astudio perthnasedd gwahanol grwpiau o ffyngau. Mae'r holl ddilyniannau newydd ar gael yn gyhoeddus ar gronfeydd data DNA (sy'n ofynnol gan gyfnodolion fel amod cyhoeddi), yn arbennig GenBank (yn y Ganolfan Genedlaethol ar gyfer Gwybodaeth Biotechnoleg [NCBI], a leolir ym Methesda, Maryland). Mae'r casgliad o ddilyniannau cyfeirio ITS sy'n gysylltiedig â samplau herbariwm a nodwyd yn glir wedi caniatáu adnabyddiad cynyddol gywir o adeileddau biolegol o darddiad anhysbys, er enghraifft darnau o fyselia / gwreiddiau planhigion / samplau cig ac ati.

Cyflwynwyd y term barcodio DNA yn ddiweddarach o lawer (Hebert ac eraill, 2003), yn bennaf mewn cyd-destun sŵolegol ac yn dibynnu ar fwyhau, trwy broses PCR o locws gwahanol, sef cytocrom ocsidas is-uned I (COI), yn y genom mitocondriaidd. Mae'r dilyniannau hyn hefyd yn cael eu cyhoeddi yn GenBank ac yn darparu sail ar

gyfer adnabod anifeiliaid yn foleciwlaidd. Un broblem gyda GenBank yw nad yw wedi'i guradu ac, erbyn hyn, mae'n cynnwys llawer o ddilyniannau sy'n cael eu neilltuo'n anghywir i rywogaethau penodol, yn ogystal â llawer â metadata cyfyngedig. Er bod GenBank wedi ceisio mynd i'r afael â'r broblem hon drwy greu cronfa ddata wedi'i churadu RefSeq (Pruitt ac eraill, 2005), mae nifer o gronfeydd data wedi'u curadu eraill wedi'u creu ac yn cael eu defnyddio'n ehangach – er enghraifft, BOLD (Barcode of Life Data System) (Ratnasingham a Hebert, 2007).

Er bod BOLD yn rhoi sylw da i anifeiliaid ac i raddau llai planhigion, mae'r sylw a roddir i fiota eraill yn wael. Ar gyfer bacteria / yr Archaea, mae cronfeydd data fel cronfa ddata RNA ribosomaidd SILVA (Pruesse ac eraill, 2007). Ar gyfer ewcaryotau nad ydynt yn anifeiliaid, mae cronfeydd data dilyniannau tebyg o ddilyniannau ITS2 wedi'u curadu, er enghraifft yn Würzburg, yr Almaen (Cronfa Ddata V ITS2, <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>; Ankenbrand ac eraill, 2015; Koetschan ac eraill, 2009). Ar gyfer ffyngau, y gronfa ddata a ddefnyddir amlaf yw UNITE (Koljalg ac eraill, 2005; <https://unite.ut.ee/>), sydd â'r fantais ei bod yn cael ei churadu a'i diweddarau'n barhaus gan garfan fawr o arbenigwyr tacsonomig.

Ar gyfer barcodio DNA a metabarcodio planhigion, daeth ymdrechion cynnar i ddefnyddio locws ITS1/2 ar draws problemau yn sgil mwyhau DNA ffyngau trwy broses PCR yn anfwriadol oherwydd presenoldeb eang endoffyttau ffwngaid mewn meinweoedd planhigion (Zhang ac eraill, 1997). Oherwydd cyfraddau isel o esblygiad dilyniant mewn genomau DNA mitochondriaidd planhigion, canolbwyntiwyd ar ddatblygu codau bar DNA yn seiliedig ar loci amrywiol o fewn y genom cloroplast (Hollingsworth ac eraill, 2009). Mae'r locws *rbcL* wedi'i ddefnyddio fwyaf ymhlith y rhain ac mae ymdrechion byd-eang wedi arwain at adeiladu cronfeydd data cyfeirio gyda sylw tacsonomig da (Bell ac eraill, 2017).

Yr hyn sy'n arbennig o berthnasol i'r astudiaeth bresennol yw cynhyrchu codau bar *rbcL* ar gyfer holl blanhigion blodeuol Cymru (de Vere ac eraill, 2012). Fodd bynnag, mae datrysiad tacsonomaidd *rbcL* (y gallu i wahaniaethu rhwng rhywogaethau sy'n perthyn yn agos) yn wael ar gyfer rhai grwpiau o blanhigion ac mae bellach yn cael ei ddefnyddio'n aml ar y cyd â locws ITS2, gyda'r broblem o fwyhau, trwy broses PCR, ddilyniannau nad ydynt yn blanhigion yn y locws ITS yn cael ei datrys trwy ddefnyddio primyddion PCR mwy penodol (Moorhouse-Gann ac eraill, 2018; Sickel ac eraill, 2015).

Mae bodolaeth codau bar DNA dibynadwy a'u defnydd mewn metabarcodio DNA amgylcheddol wedi caniatáu datblygiadau mewn sawl maes astudio, gan gynnwys dadansoddi paill yn yr awyr (Brennan ac eraill, 2019) ac ail-greu deiet o few anifeiliaid (Moorhouse-Gann ac eraill, 2018; Reese ac eraill, 2019).

Mae'r dulliau hyn hefyd wedi'u defnyddio ar gyfer dadansoddi DNA amgylcheddol planhigion mewn pridd, gyda Matesanz ac eraill (2019) yn defnyddio cymunedau 'ffug' synthetig i feintioli biomas gwreiddiau ym mhriddoedd Môr y Canoldir, a Fahner ac eraill (2016) yn defnyddio'r dull i asesu cyfoeth rhywogaethau planhigion mewn gwlyptiroedd boreal. Un o'r ymdrechion cynharaf i ddefnyddio metabarcodio DNA amgylcheddol i adnabod biomas planhigion o bridd oedd gan Yoccoz ac eraill (2012), gan ddefnyddio rhanbarth amplicon byr (tua 90 bp), sef dolen P6 yr intron plastid *trnL* (UAA) o fewn y genom cloroplast. Roedd datrysiad tacsonomaidd isel yn perthyn i'r

dull hwn (oherwydd dilyniant targed byr) a sylw gwael i'r maes hwn mewn cronfeydd data DNA, ond gwnaeth yr awduron ganfod DNA o rai rhywogaethau nad oeddent wedi cael eu tyfu ar y safle ers degawdau lawer. Mewn ecoleg pridd ehangach, defnyddiodd Leff ac eraill (2018) ddull metabarcodio DNA amgylcheddol i ragfynegi strwythur cymunedau pridd yn seiliedig ar dacsonomeg y gymuned o blanhigion.

## **Nodau'r prosiect**

Er mwyn gorfodi'r Rheoliadau AEA, mae angen gallu dangos yn ddiamwys bod newid defnydd tir wedi digwydd mewn ardal benodol. Yn achos cynefinoedd glaswelltir neu rostir, byddai hyn yn golygu cadarnhau bod y cymunedau planhigion sy'n bresennol (yn aml yr amheuir eu bod wedi deillio o welliant amaethyddol) yn newydd a bod llystyfiant gwahanol yn yr ardal yn flaenorol. Rhaid i'r dystiolaeth a gesglir fod yn wyddonol gadarn, gan fod heriau cyfreithiol rheolaidd yn cael eu gwneud yn erbyn penderfyniadau'r tîm AEA.

Un ffordd y gellid cyflawni hyn yw cadarnhau presenoldeb gweddillion y gymuned flaenorol o blanhigion trwy ganfod presenoldeb DNA yn y pridd o'r rhywogaethau yr amheuir eu bod yn bresennol yn flaenorol. Os bydd cae yn destun gwelliant amaethyddol, bydd gweddillion y cymunedau planhigion blaenorol yn bresennol yn y pridd ond disgwylir iddynt bydru yn y pen draw. Mae'n anodd rhagweld faint o amser y byddai gweddillion o'r fath yn parhau a bydd yn dibynnu ar ffactorau megis yr amodau hinsoddol a threfn amaethyddol bresennol.

Rydym eisoes wedi arloesi'r defnydd o ddadansoddi DNA amgylcheddol mewn priddoedd i nodi glaswelltiroedd ag amrywiaeth fycologol uchel, gan ganolbwyntio'n bennaf ar gapiau cwyr a ffyngau perthynol sy'n gysylltiedig â phorfeydd heb eu haflonyddu, na fuont yn destun rheolaeth ddwys o'r blaen (Griffith ac eraill, 2019; Griffith ac eraill, 2020). Defnyddiwyd ein dull yn llwyddiannus i gynorthwyo wrth hysbysu Safleoedd o Ddiddordeb Gwyddonol Arbennig (SoDdGA), mewn ceisiadau cynllunio, ac i ddeall ecoleg y ffyngau hyn yn well (Williams, 2020).

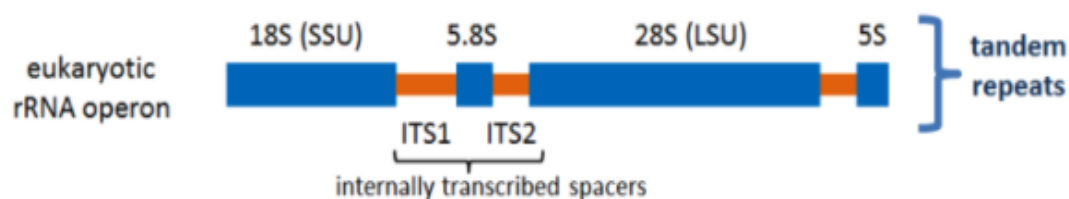
Yma, ein nod yw defnyddio dull tebyg ar gyfer canfod DNA amgylcheddol planhigion mewn priddoedd. Er bod y protocolau ar gyfer samplu pridd, echdynnu DNA, a bioleg foleciwlaidd a biowybodeg ddilynol yn debyg i'r rhai a ddefnyddiwyd gennym o'r blaen, mae angen dyfeisio a phrofi gwahanol primyddion PCR a dulliau dadansoddi data. Ar gyfer DNA amgylcheddol ffyngau, ein nod yw canfod DNA o fyselïa ffyngau byw, ond yn yr astudiaeth bresennol y prif nod yw canfod DNA o fewn gweddillion cymunedau planhigion sy'n pydru ac felly mae angen pennu pa mor hir y gellir canfod DNA o fewn y gweddillion hyn.



# 1) Datblygu a phrofi primyddion PCR penodol i blanhigion a chronfa ddata RDP i blanhigion

Cynhyrchodd y dull metabarcodio DNA amgylcheddol a ddefnyddiwyd yn y prosiect hwn niferoedd mawr (miliynau) o ddilyniannau DNA byr (300–400 bp) o loci codau bar DNA. Mae swm y data dilyniant a gynhyrchwyd yn enfawr ac mae angen dadansoddiad biowybodol i gysylltu'r data hyn ag enwau rhywogaethau ac i ddarparu data toreithrwydd ar gyfer pob rhywogaeth.

Yn ein gwaith blaenorol, yn ymwneud yn bennaf â ffyngau, datblygwyd piblinell fiowybodol gennym i ddadansoddi data ar gyfer ffyngau gan ddefnyddio codau bar rhanbarth LSU D1 a rhanbarth ITS2 (Ffig. 1.1). Ar gyfer y locws cyntaf, defnyddiwyd cronfa ddata o ddilyniannau ffwngaid 28S (LSU) a gasglwyd fel rhan o'r RDP (Prosiect Cronfa Ddata Ribosomaid / Ribosomal Database Project) a leolir ym Mhrifysgol Talaith Michigan (<https://rdp.cme.msu.edu/>). Mae'r gronfa ddata ffwngaid hon yn cynnwys 125,525 o ddilyniannau (RDP Release 11, Update 5 :: September 30, 2016) ac fe wnaethom hefyd ychwanegu nifer o ddilyniannau DNA o samplau cyfeiriol o ffyngau glaswelltir o ffwngariwm Prifysgol Aberystwyth.



**Ffig. 1.1.** Ffuriant operon y locws RNA ribosomaid ewcaryotig. Mae hydoedd gwahanol ranbarthau yn amrywio rhwng organebau (SSU: tua 1,850 bp; LSU: 3–5,000 bp; ITS1/2: 200–350 bp yr un; 5.8S: tua 160 bp; 5S: tua 121 bp).

Yn ystod y blynyddoedd diwethaf, rydym hefyd wedi canolbwyntio mwy ar ddefnyddio'r locws ITS2 cyfagos, sydd bellach yn cael ei gydnabod fel y cod bar DNA sylfaenol ar gyfer ffyngau (Schoch ac eraill, 2012). Er ei fod ychydig yn hirach (400 bp yn erbyn 250 bp ar gyfer y locws LSU) ac felly'n fwy heriol ar gyfer mwyhau a dilyniannodi trwy broses PCR, mantais y locws hwn yw bod llawer mwy o godau bar DNA cyfeiriol ar gael a hefyd ei fod yn caniatáu adnabod ar lefel rhywogaeth ar draws pob tacson ffwngaid. Rydym hefyd wedi cydweithio â mycolegwyr yn Estonia, sydd wedi creu cronfa ddata gymunedol UNITE wedi'i churadu (<https://unite.ut.ee/>), sydd bellach yn cynnwys >1.75 miliwn o ddilyniannau (fersiwn ryddhau ddiweddaraf 8.1; diweddarwyd ddiwethaf: 2019-09-21). Un o fanteision pwysig y gronfa ddata hon yw ei bod yn bosibl i fycolegwyr yn fyd-eang gymryd rhan yn y gwaith o guradu'r gronfa ddata, er enghraifft trwy ychwanegu rhywogaethau newydd, adolygu cysyniadau rhywogaeth hen ffasiwn ac ati (Kõljalg ac eraill, 2013).

## 1A) Dewis primyddion a'u hoptimeiddio

Ar gyfer planhigion uwch, y cod bar DNA sylfaenol yw'r genyn *rbcL* yn y rhanbarth cloroplast, gyda loci cloroplast eraill yn cael eu defnyddio fel codau bar eilaidd (yn enwedig locws *matK*) (Hollingsworth ac eraill, 2009). Fodd bynnag, yn debyg i'r locws LSU ar gyfer ffyngau, nid yw'r rhain bob amser yn darparu adnabyddiaeth ar lefel

rhywogaeth, ac ar ben hynny mae ampliconau *rbcl* a *matK* yn eithaf hir (tua 600 bp), a all greu problemau o ran mwyhau a dilyniannodi trwy broses PCR.

Felly fe wnaethom ddewis yr ITS2 fel y locws barcodio o ddewis, gan ddefnyddio parau o brimyddion a ddefnyddir yn eang, sef ITS3chenS2F (ATGCGATACTTGGTGTGAAT) fel y primydd blaen (mewn rhanbarth cadwedig o'r genyn rRNA 5.8S (Chen ac eraill, 2010)) ac ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), a leolir mewn rhanbarth cadwedig ar ben 5' y genyn rRNA 28S (LSU). Roedd y primydd olaf yn un o'r primyddion barcodio ITS cyntaf a ddyfeisiwyd gan White ac eraill (1990) (gweler uchod), ond gwyddys ei fod yn effeithiol o ran mwyhau rhanbarthau ITS2 planhigion. Cyn dewis ITS3chenS2F fel y primydd blaen, fe wnaethom hefyd brofi primydd planhigion cyffredinol newydd (TGTGAATTGCARRATYCMG) a ddyfeisiwyd gan Moorhouse-Gann ac eraill (2018), ond canfuwyd bod hwn yn llai effeithiol (llwyddiant mwyhau gwael o'i gymharu â phrimyddion Chen).

Roedd y defnydd o brimydd cefn ITS4 (a ddefnyddiwn hefyd ar gyfer barcodio DNA ffyngau) yn cynnig y posibilrwydd i fwyhau codau bar ar gyfer planhigion a ffyngau ar yr un pryd. Mantais hyn yw bod codau bar y ffyngau yn darparu gwybodaeth gyd-destunol ddefnyddiol ar gyfer y rhywogaethau planhigion a ganfuwyd (ac i'r gwrthwyneb). Anfantais bosibl hyn yw y ceir llai o ddilyniannau planhigion ar gyfer pob sampl. Fodd bynnag, mae amrywiaeth y planhigion sy'n bresennol ar unrhyw safle penodol yn drefn maint yn llai nag ar gyfer ffyngau. Ar gyfer rhediad dilyniannodi arferol, ceir 20,000 o ddarlleniadau dilyniant, ond mae 5,000–10,000 o ddarlleniadau yn ddigon i ddarparu dyfnder dilyniant da ar gyfer y gymuned blanhigion sy'n bresennol.

Ar gyfer y ffyngau, fe wnaethom ddefnyddio cymysgedd o chwe phrimydd blaen (ITS3NGS1, ITS3NGS2, ITS3NGS3, ITS3NGS4, ITS3NGS5 ac ITS3NGS10) yn cynnwys nifer cyfartal o folau, fel yr argymhellwyd yn yr astudiaeth metabarcodio DNA ffyngau fwyaf eang hyd yma (Tedersoo ac eraill, 2014). Dangoswyd bod defnyddio'r cymysgedd hwn yn creu proses fwyhau effeithlon ar draws yr holl ffyla ffwngaidd a hefyd yn mwyhau'r öomysetau anffwngaidd (rhywogaethau *Phytophthora* ac ati).

Mewn cyfres o arbrofion prawf, fe wnaethom ddefnyddio cymysgedd o brimyddion ffwngaidd Tedersoo mewn cymarebau amrywiol gyda'r primydd ITS3chenS2F, gan ddarganfod bod cymhareb folar o 3:1 (ITS3chenS2F : cyfanswm primyddion ffwngaidd) yn cynhyrchu yn nodweddiadol tua dwywaith cymaint o ddilyniannau planhigion na ffyngau (tua 65–80%). Defnyddiwyd y cymysgedd hwn ar gyfer yr holl arbrofion a adroddir yma.

## **1B) Datblygu cronfa ddata RDP i blanhigion uwch yn seiliedig ar godau bar DNA ITS**

Gan nad oes cronfa ddata gynhwysfawr debyg i UNITE yn bodoli ar gyfer planhigion uwch, fe wnaethom greu cronfa ddata newydd trwy lawrlwytho dilyniannau ITS2 o GenBank gan ddefnyddio'r termau chwilio "Viridiplantae" [Organeb] AC ("UK" [Pob maes] NEU "USA" [Pob maes]) AC ("ITS2" [Diffiniad] NEU "internal transcribed spacer 2" [Diffiniad]). Cynhyrchodd y chwiliad hwn 83,618 o ddilyniannau o GenBank, a gafodd eu lawrlwytho i Geneious v10.

Er mwyn creu cronfa ddata, mae hefyd angen cysylltu'r dilyniannau DNA, rhifau adnabod derbyniadau GenBank ac enwau rhywogaethau â hierarchaeth dacsonomig. O fewn GenBank, priodolir maes dynodwr tacsonomig (db\_xref) i bob rhywogaeth. Defnyddiwyd hwn i greu hierarchaeth dosbarthiad tacsonomig ar gyfer pob dilyniant, fel y dangosir isod (Tabl 1.1).

Gan nad yw prif gronfa ddata GenBank wedi'i churadu, mae'n cynnwys rhai dilyniannau sydd wedi'u cam-nodi neu fel arall yn wallus (Ffig. 1.2). Yn ystod ein gwaith curadu, tynnwyd 257 o'r dilyniannau gwallus hyn o'n cronfa ddata.

Yn ogystal, ar gyfer nifer o dacsonau planhigion, ni ellir adnabod rhywogaethau unigol ar lefel rhywogaeth gan ddefnyddio dilyniannau ITS2. Yn aml, mae hyn yn wir oherwydd y gyfradd uchel o lif genynnau (digwyddiadau hybrideiddio) rhwng rhywogaethau sy'n perthyn yn agos. Canlyniad hyn yw na ellir yn ddibynadwy neilltuo rhai tacsonau i rywogaethau unigol, fel y dangosir gan *Agrostis capillaris/gigantea* ac *A. canina/stolonifera* (Ffig. 1.3). Ar gyfer rhai tacsonau, dim ond i lefel genws y mae modd neilltuo dilyniannau ITS2 (e.e. rhywogaethau *Pinus*).

**Tabl 1.1.** Ciplun o'r gronfa ddata RDP fewnol a grëwyd yn ystod y prosiect hwn yn dangos strwythur ein cronfa ddata RDP fewnol.

Accession	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Sequence	db_xref	Description	Organism
KM999962.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_stol_can	AGTGTGGGT	taxon:63632	Agrostis stolonifera cultivar 007 clone till	Agrostis stolonifera
KM999963.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_stol_can	AGTGGGAGC	taxon:63632	Agrostis stolonifera cultivar 007 clone till	Agrostis stolonifera
KM999964.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_stol_can	GAGAGGTGA	taxon:63632	Agrostis stolonifera cultivar 007 clone till	Agrostis stolonifera
KM999965.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_stol_can	AGTGAGGTG	taxon:63632	Agrostis stolonifera cultivar 007 clone till	Agrostis stolonifera
FJ042802.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_vinealis	TCGTGACCC	taxon:247443	Agrostis vinealis clone vin02 internal trar	Agrostis vinealis
FJ042803.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_vinealis	TCGTGACCC	taxon:247443	Agrostis vinealis clone vin11 internal trar	Agrostis vinealis
FJ042804.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_vinealis	TCGTGACCC	taxon:247443	Agrostis vinealis clone vin07 internal trar	Agrostis vinealis
FJ042805.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_vinealis	TCGTGACCC	taxon:247443	Agrostis vinealis clone vin15 internal trar	Agrostis vinealis
FJ042806.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_vinealis	TCGTGACCC	taxon:247443	Agrostis vinealis clone vin18 internal trar	Agrostis vinealis
FJ042807.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_vinealis	TCGTGACCC	taxon:247443	Agrostis vinealis clone vin12 internal trar	Agrostis vinealis
FJ042808.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_vinealis	TCGTGACCC	taxon:247443	Agrostis vinealis clone vin01 internal trar	Agrostis vinealis
FJ042814.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_vinealis	TCGTGACCC	taxon:247443	Agrostis vinealis clone vin17 internal trar	Agrostis vinealis
FJ042815.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_vinealis	TCGTGACCC	taxon:247443	Agrostis vinealis clone vin08 internal trar	Agrostis vinealis
FJ042871.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Agrostis	Agrostis_vinealis	TCGTGACCC	taxon:247443	Agrostis vinealis clone vin04 internal trar	Agrostis vinealis
KX166278.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Aira	Aira_caryophyllea	TGCAGAATC	taxon:336211	Aira caryophyllea voucher NMW3168 5.8	Aira caryophyllea
EF153021.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Allolepis	Allolepis_texana	TCGTGACCC	taxon:433842	Allolepis texana internal transcribed spac	Allolepis texana
GU359264.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Allolepis	Allolepis_texana	TGACCTGCG	taxon:433842	Allolepis texana voucher US:Hitchcock 7	Allolepis texana
GU359265.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Allolepis	Allolepis_texana	TGACCTGCG	taxon:433842	Allolepis texana voucher US:Le Roy 141	Allolepis texana
KM523749.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Alopecurus	Alopecurus_aequalis	TCGTGACCC	taxon:114194	Alopecurus aequalis voucher US:Peterst	Alopecurus aequalis
KM523750.1	Viridipl	Strepto	Liliopsii	Poales	Poaceae	Alopecurus	Alopecurus_arundinaceus	TCGTGACCC	taxon:1227975	Alopecurus arundinaceus voucher CAN:	Alopecurus arundinaceus

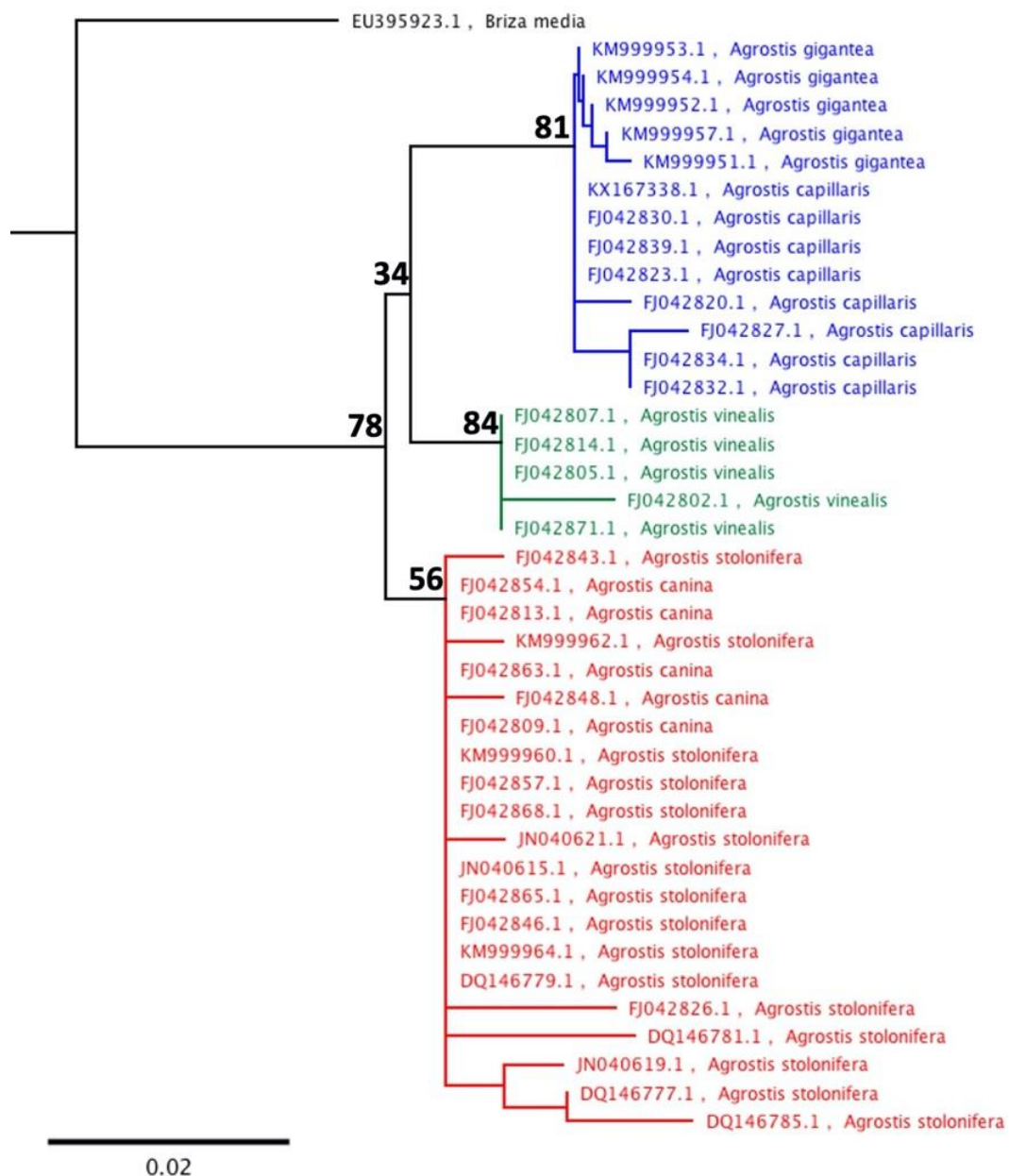
## Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa trivialis var. trivialis voucher Neaves s.n. (MEL 2070933A) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S</a>	390	390	100%	1e-104	98.22%	<a href="#">KJ598983.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Uncultured Basidiomycota isolate soil 2859 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and</a>	385	385	100%	5e-103	97.78%	<a href="#">MF484066.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa trivialis voucher NMW6132 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribos</a>	385	385	100%	5e-103	97.78%	<a href="#">KX167368.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa trivialis voucher NMW3357 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribos</a>	385	385	100%	5e-103	97.78%	<a href="#">KX166877.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa trivialis voucher NMW6146 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribos</a>	385	385	100%	5e-103	97.78%	<a href="#">KX166151.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa trivialis 5.8S rRNA gene and ITS1 and ITS2, isolate 700002</a>	385	385	98%	5e-103	98.19%	<a href="#">AJ240161.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Alopecurus myosuroides 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal R</a>	381	381	100%	7e-102	97.33%	<a href="#">KT948627.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Embryophyte environmental samole clone IMG849 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal trans</a>	381	381	97%	7e-102	98.18%	<a href="#">KM515757.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa trivialis isolate ootri1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal trans</a>	342	342	89%	3e-90	97.52%	<a href="#">AF171185.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa trivialis isolate ootri1a internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal trans</a>	342	342	89%	3e-90	97.52%	<a href="#">AF171184.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa compressa voucher NMW3346 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S r</a>	339	339	100%	4e-89	94.22%	<a href="#">KX166725.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa compressa voucher Walsh 6644 (MEL 2296027A) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosom</a>	339	339	100%	4e-89	94.22%	<a href="#">KJ598896.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa compressa voucher Gillespie 6457 CAN 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA ge</a>	339	339	100%	4e-89	94.22%	<a href="#">EU792395.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa secunda voucher ID:174326 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c</a>	333	333	100%	2e-87	93.78%	<a href="#">MK802472.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa secunda voucher ID:174327 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c</a>	333	333	98%	2e-87	94.12%	<a href="#">MK802469.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa secunda voucher ID:174254 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c</a>	333	333	100%	2e-87	93.78%	<a href="#">MK802468.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa fendleriana subsp. fendleriana voucher ID:174267 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal t</a>	333	333	100%	2e-87	93.78%	<a href="#">MK802467.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa trivialis voucher LEB&lt;ESP&gt;-F.Liamas &amp; C. Acedo 47.2016 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and ir</a>	333	333	87%	2e-87	97.46%	<a href="#">KP296102.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Poa feratiana voucher LEB&lt;ESP&gt;-F.Liamas 286.2012 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr</a>	333	333	87%	2e-87	97.46%	<a href="#">KP296097.1</a>

**Ffig 1.2.** Allbwn o chwiliad BLAST o GenBank yn defnyddio dilyniant ITS2 *Poa trivialis* o Frignant. Nodir trawiadau sy'n amlwg yn anghywir neu rai sydd wedi'u nodi'n wael (sêr coch). Sylwch sut mae derbyniadau *P. trivialis* yn >97% yn union yr un fath â'r sampl (sgwâr glas), tra bo rhywogaethau eraill sy'n perthyn yn agos (e.e. *Poa compressa*) yn fwy annhebyg (tua 94%). Sylwch ar y samplau cyfeirio o Gymru (sgwâr coch; cod NMW) a gyhoeddwyd yn yr astudiaeth bwysig gan de Vere ac eraill (2012).

Ar gyfer profion cychwynnol o gronfa ddata RDP, rhoddwyd data metabarcodio drwy'r biblinell ac yna gwiriwyd yr holl dacsonau a neilltuwyd â llaw gan ddefnyddio BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Os oedd unrhyw ansicrwydd, lawrlwythwyd dilyniannau GenBank oedd yn perthyn yn agos a nodwyd trwy chwiliadau BLAST i Geneious. Cafodd y rhain eu halinio a'u defnyddio i greu coed ffylogenetig i gadarnhau pa dacsonau y gellid eu gwahanu'n ddibynadwy ar lefel rhywogaeth (fel y dangosir yn Ffig. 1.3). Yn raddol, dilëwyd unrhyw adnabyddiaeth anghywir neu gamarweiniol trwy ailadrodd y broses uchod.



**Ffig. 1.3.** Coeden ffylogenetig yn seiliedig ar ddilyniannau ITS2 o aelodau'r DU o'r genws *Agrostis*. Sylwch nad oes modd gwahanu *Agrostis capillaris* ac *A. gigantea* oddi wrth ei gilydd, nac *A. canina* ac *A. stolonifera* ychwaith, yn fwyaf tebygol oherwydd amlder uchel digwyddiadau hybrideiddio, tra bo *A. vinealis* yn ffurfio cytras un rhywogaeth penodol.

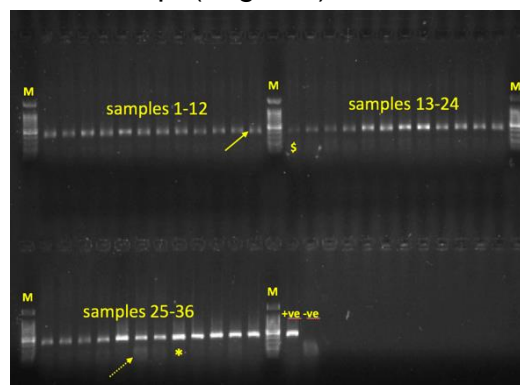
## **2) Cymharu DNA amgylcheddol planhigion mewn priddoedd â data'r Dosbarthiad Llystyfiant Cenedlaethol (NVC)**

Ar ôl datblygu protocol ar gyfer mwyhau DNA amgylcheddol planhigion o'r pridd trwy broses PCR, penderfynasom brofi effeithiolrwydd ein dull o asesu cymunedau planhigion o wahanol safleoedd glaswelltir o'i gymharu â dadansoddiadau llystyfiant traddodiadol, gan ddefnyddio'r fethodoleg safonol a ddefnyddir yn null yr NVC (Dosbarthiad Llystyfiant Cenedlaethol) a ddyfeisiwyd gan Rodwell (1992). Dewiswyd tri safle glaswelltir cyferbyniol: un yn laswelltir ucheldirol yng Nghymru (arbrawf dad-ddwysáu glaswelltir hirdymor Brignant, Pontarfynach), glaswelltir iseldir yn Lloegr (Kirby Muxloe, Swydd Gaerlŷr), ac, yn drydydd, glaswelltir calchaid yn Iwerddon (Ysgol Genedlaethol Turlough, Swydd Clare).

Ar gyfer pob safle, casglwyd creiddiau pridd mewn bag clo-sip, eu cadw'n oer wrth eu cludo, a'u rhewi o fewn ychydig oriau i'w casglu. Er cysondeb, cafodd unrhyw ddail/coesyntau oedd yn bresennol ar ben y craidd eu torri i ffwrdd ar lefel y pridd, fel y byddai'r DNA a ganfyddir yn ddiweddarach yn dod o wreiddiau/cloron byw neu necromas planhigion.

Trosglwyddwyd y bagiau hyn i rewgell -80°C ym Mhrifysgol Aberystwyth a'u sychrewi am sawl diwrnod. Mae'r broses hon yn tynnu dŵr trwy sychdarthiad (o rew i ager), gan osgoi ffurfio unrhyw ddŵr hylif yn y broses sychu, gan atal unrhyw ddiraddiad biolegol. Mae hefyd yn gwneud pridd yn hyfriw iawn, ac yn hawdd ei falu. Ymgwymerwyd â malu trwy rwbio pridd trwy ridyll 2 mm. Cymysgwyd y pridd yn drylwyr ar yr adeg hon a chymerwyd 50 g i'w falu ymhellach trwy ridyll 1 mm, ac yna ei gymysgu'n drylwyr ymhellach. Cafodd rhidyllau eu golchi mewn dŵr ac yna cannydd rhwng samplau, a gwisgwyd menig latecs tafladwy ar gyfer y broses falu, er mwyn lleihau'r posibilrwydd o groes-halogi unrhyw samplau.

Cymerwyd is-sampl o'r pridd wedi'i falu'n fân (200 mg) ar gyfer echdynnu DNA amgylcheddol gan ddefnyddio pecyn PowerSoil QIAGEN yn unol â chyfarwyddiadau'r gwneuthurwr, ac fe'i rhoddwyd trwy proses PCR gan ddefnyddio'r cymysgedd o brimyddion a ddisgrifir isod. Cyflawnwyd mwyhau trwy broses PCR gan ddefnyddio'r cylch canlynol: dadnatureiddio ar 95°C am 3 munud ac yna 30 cylch yn cynnwys dadnatureiddio ar 95°C am 30 eiliad, anelio ar 55°C am 30 eiliad, estyn ar 72°C am 30 eiliad, ac yna cam estyn terfynol o 5 munud. Penderfynwyd ar lwyddiant y broses PCR (a farnwyd gan bresenoldeb band o faint disgwylidig: 400–500 bp) trwy gyflawni electrofforesis gel agaros ar sampl (Ffig. 2.1).



**Ffig. 2.1.** Gel agaros yn dangos y bandiau amplicon ITS2 tua 450 bp (saeth solet) o 36 o gynhyrchion PCR DNA amgylcheddol. Mae 'M' yn nodi marciwr maint (PCRBIO Ladder IV; y band llachar yw 500 bp). Roedd rhai bandiau yn llawer cryfach (\*) nag eraill (\$). Dangosir rheolyddion positif (DNA planhigion pur) a negatif (dim DNA) hefyd. Tynnwyd cynhyrchion PCR llai (saeth ddotiog), deumerau primyddion yn ôl pob tebyg, trwy eu puro'n ddiweddarach.

Rhanbarth 2 y gwahanwr trawsgrifedig mewnol (ITS) oedd y rhanbarth cod bar a ddewiswyd i adnabod y rhywogaethau planhigion a ffyngau. Y primyddion a ddefnyddiwyd ar gyfer hynny oedd ATGCGATACTTGGTGTGAAT ITS2-S2F (Chen ac eraill, 2010), yn targedu planhigion, ac, ar gyfer ffyngau, cymysgedd o chwe phrimydd NGS (Tedesoo ac eraill, 2014), fel a ganlyn:

ITS3NGS1	CTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGCAG	(tua 95% o'r holl ffyngau)
ITS3NGS2	CTAGACTCGTCAACGATGAAGAACGCAG	(Chytridiomycota)
ITS3NGS3	CTAGACTCGTCACCGATGAAGAACGCAG	(Sebacinales p.parte)
ITS3NGS4	CTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGTAG	(Glomeromycota)
ITS3NGS5	CTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGTGG	(Sordariales p.parte)
ITS3NGS10	CTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGCTG	(Stramenopila [öomysetau])

Y primydd cefn ym mhob achos oedd ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Er mwyn dad-blecsu dilyniannau ar ôl dilyniannodi, cafodd y primydd ITS4 ar gyfer pob sampl ei syntheseiddio fel a ganlyn:

**CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACCTCCTCCGCTTATTG ATATGC** (yr enghraifft hon yw AD1X1ITS4 o fewn mynegai IX1).

...gyda'r primydd dilyniannodi ar y 5' (mewn coch), wedi'i ddilyn gan ddilyniant graddnodi dilyniannwr allweddol o 4 bp (mewn print itelig), dilyniant mynegai sampl-benodol o 10–12 bp (wedi'i danlinellu), wedi'i ddilyn gan ddilyniant y primydd ITS4 ei hun (mewn print trwm). Y dilyniannau mynegai oedd y rhai a argymhellir gan Ion Torrent ac maent yn defnyddio'r dilyniannau mynegai IonExpress (IX) a argymhellir gan Ion Torrent. Felly, ar gyfer pob sampl y bwriedir ei dilyniannodi yn yr un swp, defnyddiwyd cod IX gwahanol (o IX1 i IX60), gan ganiatáu i'r dilyniannau gael eu dad-blecsu ar ôl dilyniannodi.

Cafodd cynhyrchion PCR o'r holl samplau eu mesur gan ddefnyddio fflworomedr Qubit 2.0®. Yna cafodd y samplau eu cronni gyda'i gilydd ar yr un crynodiad DNA. Defnyddiwyd glanhäwr AMPure ar gyfer llyfrgelloedd cyfun o Ion Torrent i sicrhau bod unrhyw ddarnau byr (fel arfer o ganlyniad i ddeumerau primyddion; Ffig. 1.3, saeth ddotiog) yn cael eu tynnu. Yna rhedwyd y gronfa lân trwy fioddadansoddwr Agilent 2100 (Santa Clara, CA) gyda sglodyn DNA sensitif uchel gan Agilent. Yna defnyddiwyd canlyniadau'r bioddadansoddwr ar gyfer y gwanediadau ar darged o 50 pM. Defnyddiwyd system Ion Chef i berfformio'r broses fwyhau ar y llyfrgell, adfer a chyfoethogi ISP, a llwytho sglodion, gan ddefnyddio sglodyn Ion 316 am hydoedd darlleniadau o hyd at 400 bp. Yn olaf, y dilyniannwr a ddefnyddiwyd oedd system PGM Ion Torrent.

## **2A) Prosesu data dilyniant**

Roedd ansawdd y data dilyniant yn cael ei wirio a chafodd y data eu tocio i 500 bp a'u dad-blecsu gan ddefnyddio MOTHUR (f. 1.31.2; (Schloss ac eraill, 2009)). Dilëwyd dilyniannau gyda dilyniannau o brimyddion cod bar nad oeddent yn cydweddu a dilyniannau byr / o ansawdd gwael (â hyd yn llai na 100 bp ac â sgôr gyfartalog Phred o lai nag 20). Perfformiwyd clystyru a thynnu cimerâu gan ddefnyddio piblinell

UPARSE trwy USEARCH v.9 (Edgar, 2013). Cafodd ffeiliau dilyniant eu dad-ddyblygu a gwaredwyd ar ddilyniannau unigryw a oedd yn ymddangos unwaith yn unig ("singletons"), fel yr argymhellir yn Tedersoo ac eraill (2010), ynghyd ag unedau tacsonomig gweithredol (OTUs) gyda chlystyru o 97%; gwaredwyd ar glystyrau yn cynnwys llai na dau ddilyniant.

Neilltuwyd tacsonomeg i bob OTU (uned dacsonomig weithredol) gan ddefnyddio dosbarthwr Bayesaidd naïf (Wang ac eraill, 2007). Pan na chafodd y rhywogaeth ei neilltuo gan y dosbarthwr (ond cafodd yr uned ei neilltuo i genws, teulu neu urdd, oherwydd bod hyder yn is na'r trothwy), neilltuwyd dynodwr OTU i'r clwstwr hwnnw. Yna cafodd data eu cyflwyno yn Excel a'u safoni trwy rannu nifer y darlleniadau ym mhob uned dacsonomig â chyfanswm nifer y darlleniadau ffwngaid ym mhob sampl i roi toreithrwydd cymharol y tacsonau a neilltuwyd ar gyfer pob cwadrat; adroddwyd ar wahân am unrhyw dacsonau nad oeddent yn ffyngau.

Defnyddiwyd y pecyn R ar gyfer delweddu matricesau toreithrwydd cymharol, gan ddefnyddio dosbarthiad/dadansoddiad o'r prif gyfesurynnau (PCO) ar fatrics pellter Bray-Curtis i nodi patrymau yn y data. Defnyddiwyd dadansoddiadau amlamrywedd trynewidiol o amrywiant (PERMANOVA) i bennu gwahaniaethau sylweddol cyffredinol mewn data cymunedol yn ôl pridd a glaswellt ac fe'u perfformiwyd yn PRIMER 6 a PERMANOVA+ (fersiynau 6.1.12 ac 1.0.2 yn y drefn honno; PRIMER-E, Ivybridge, DU). Roedd data canrannol ar doreithrwydd yn destun trawsffurfio ail israddau a chyfrifwyd matricesau pellter Bray-Curtis. Cynhaliwyd PERMANOVA gan ddefnyddio gosodiadau diofyn gyda 9,999 o drynewidion anghyfyngedig. Cynhaliwyd dadansoddiad o debygrwydd (ANOSIM) yn PRIMER 6 a PERMANOVA+ gan ddefnyddio'r matrices pellter Bray-Curtis a gyfrifwyd uchod.

## **2B) Cymharu data NVC Brignant â data DNA amgylcheddol**

Mae arbrawf hirdymor dad-ddwysáu glaswelltir Brignant ger Pontarfynach, Aberystwyth, yn rhan o Lwyfan Ymchwil yr Ucheldir Pwllpeiran a reolir gan IBERS. Mae GWG wedi chwarae rhan hirdymor yn y gwaith o reoli'r arbrawf hwn, a sefydlwyd gan Mike Hayes o dan gyllid DEFRA yn 1994. Mae'r arbrawf yn cynnwys lleiniau triphlyg mewn tri bloc sy'n destun saith triniaeth amaethyddol gyferbyniol. Mae'r rhain yn cynnwys ychwanegu (neu beidio) gwrtaith neu galch a threfniadau pori gwahanol (pori defaid yn yr haf a thorri gwair gyda phori adladd neu hebdo).

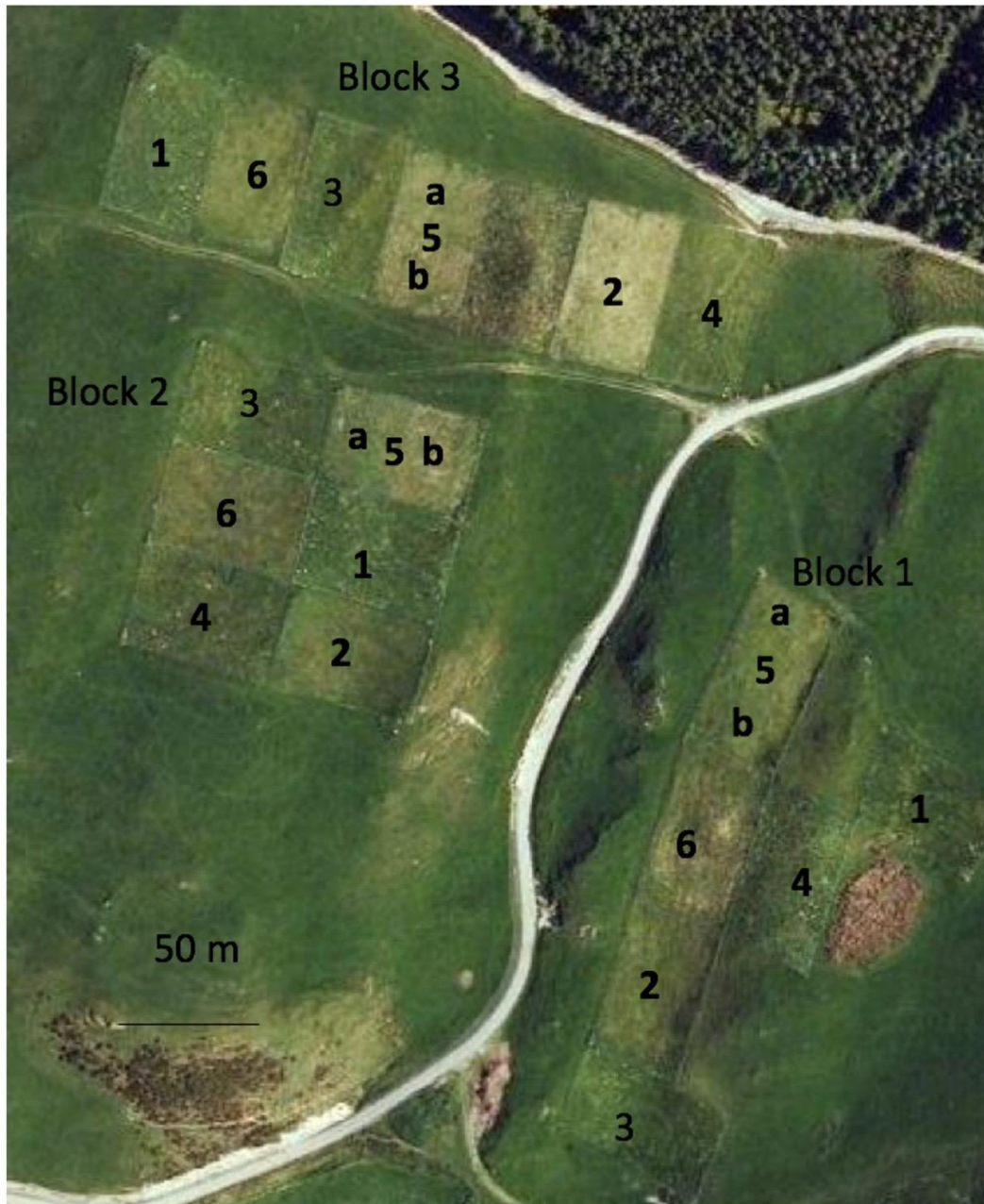
Yn hytrach na cheisio cynnal arolygon llystyfiant ar draws yr holl driniaethau, roedd y ffocws yma ar y ddwy driniaeth fwyaf cyferbyniol, sef P1: ychwanegu gwrtaith a chalch ynghyd â phori yn yr haf (y triniaethau mwyaf dwys ["triniaeth busnes fel arfer"]) yn erbyn P6 (y driniaeth â'r dwyster lleiaf; dim newidiadau, torri gwair gyda phori adladd). Er mwyn rhoi cyfrif am y posibilrwydd o amrywiadau o fewn lleiniau, gosodwyd tri chwadrat 2 x 2 m (Q1-Q3) o fewn pob llain o bob bloc (B1-B3; Ffig. 2.2), sef cyfanswm o naw cwadrat fesul triniaeth.

Cynhaliwyd yr arolwg llystyfiant ar 20 Gorffennaf 2018 gan Dr Rob Rowlands (cyfarwyddwr yn Ecology Solutions, Manceinion), ecolegydd gyda >20 mlynedd o brofiad o arolygu llystyfiant ar gyfer ymchwiliadau AEA. Ar gyfer pob cwadrat, nododd yr holl blanhigion uwch a oedd yn bresennol ac amcangyfrif canran y gorchudd.



Ar gyfer pob cwadrat (ar yr un diwrnod), cymerwyd naw craidd pridd (dimamedr o 15 mm a dyfnder o 10 cm; tua 80 cm rhwng pob craidd) a'u cyfuno. Cafodd y rhain eu rhewi ar  $-80^{\circ}\text{C}$  a'u prosesu fel y disgrifir uchod.

Roedd y tywydd wedi bod yn sych iawn ym Mehefin/Gorffennaf 2018, felly, hyd yn oed ym Mrignant (375 metr uwchlaw lefel y môr; glawiad blynyddol o 1,800 mm), roedd y llystyfiant yn sych iawn ac roedd hyn yn gwneud y gwaith o adnabod rhywogaethau yn fwy heriol.



Treatment	Fertiliser	Lime (98/16)	Hay Cut	Grazing
1	Y	Y	N	Apr-Nov
2	N	Y	July	Aug-Nov
3	N	N	N	Apr-Nov
4	N	Y	N	Apr-Nov
5a	N	Y	July	N
5b	N	N	July	N
6	N	N	July	Aug-Nov

**Ffig. 2.2.** Map o arbrwf Brignant a manylion y trefniadau trin. Gwasgarwyd 60 kg o wrtaith N ha<sup>-1</sup> a 30 kg o wrtaith P ha<sup>-1</sup> bob mis Mai. Gwasgarwyd calch ym mis Mai 1998 i godi'r pH i 6, ac ailadroddwyd y driniaeth hon ym mis Mai 2016.

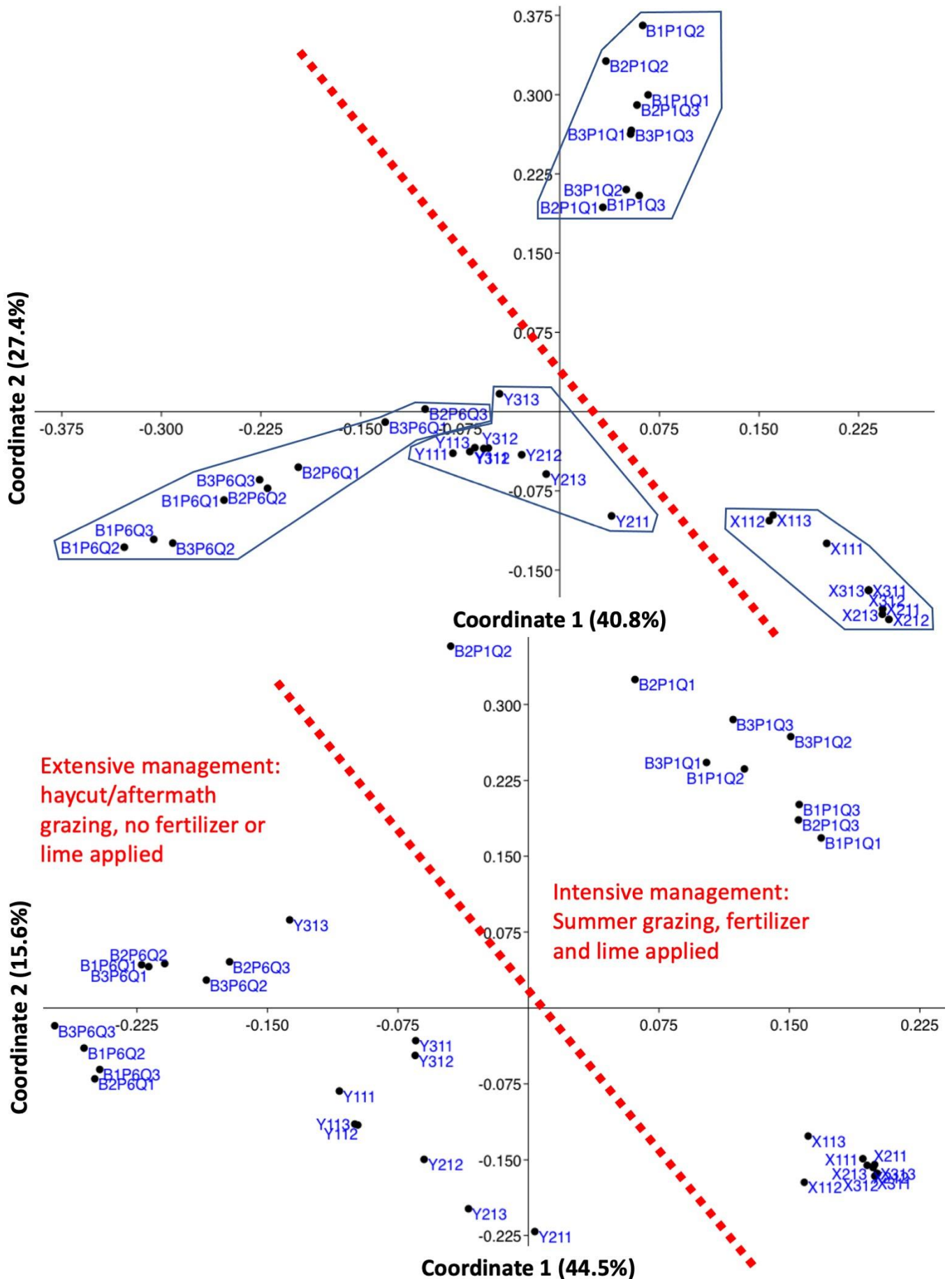
Ar gyfer y dadansoddiad o DNA amgylcheddol, daeth 79% o ddarllenwyr o blanhigion ac, o'r rhain, neilltuwyd 0.36% (cymedr; amrediad 0.06–0.97%) i algâu gwyrdd (ffylwm Chlorophyta) a phlanhigion is (Bryopsida [mwsoglau] neu Jungermannopsida [glysiâu'r afu]). Roedd nifer y dilyniannau planhigion a ddarllenwyd fesul sampl yn amrywio o 22,700 i 57,863 (cymedr 35,628).

Yng nghyd-destun Tabl 2.1, byddai dilyniannau ar amllder isel iawn, er enghraifft 0.01%, yn cael eu cynrychioli gan rhwng dau a phum dilyniant, gyda dilyniannau unigryw a oedd yn ymddangos unwaith yn unig ["singletons"] yn cael eu taflu yn ystod y prosesu rheoli ansawdd. Mae'n bosibl y gallai rhywogaethau a ganfuwyd ar niferoedd isel iawn yn unig fod wedi tarddu o hadau heb eu hegino neu ddarnau o feinwe dail sydd wedi chwythu yn y gwynt ac felly ni fyddent yn cael eu hystyried yn aelodau o'r gymuned laswelltir benodol hon. Byddai'n bosibl pennu lefel drothwy ar gyfer amllder, lle mae rhywogaethau ond yn cael eu cyfrif fel rhai sy'n bresennol pan fydd mwy ohonynt na'r lefel hon, ond nid yw'n glir sut y gellid gosod trothwy o'r fath yn wrthrychol. Felly yma, mae pob rhywogaeth a ganfuwyd o ddau ddarllenwyr dilyniant neu fwy yn cael eu cyfrif yn bresennol.

Cyfunwyd data o DNA amgylcheddol a llystyfiant yn un daenlen, yn dangos toreithrwydd canrannol pob rhywogaeth ym mhob cwadrat (Tabl 2.1). Nodwyd cyfanswm o 41 o rywogaethau ar draws pob llain gan ddefnyddio'r ddau ddull. O'r rhain, canfuwyd 35 rhywogaeth gan DNA amgylcheddol, 31 rhywogaeth gan ddadansoddi llystyfiant, a 25 rhywogaeth gan y ddau ddull. Felly gwnaeth dadansoddi DNA amgylcheddol fethu ag adnabod chwe rhywogaeth a dadansoddi llystyfiant deg rhywogaeth.

Dangosodd dosbarthiad o brif gyfesurynnau setiau data'r arolwg (Ffig. 2.3) fod y cymunedau planhigion yn y ddwy gyfundrefn drin wedi'u gwahanu'n glir gan y dadansoddiad o DNA amgylcheddol (rhagddodiad B) a'r dadansoddiad o llystyfiant (rhagddodiad Y [Llain 1: dwys] neu Y [Llain 6: ddim yn ddwys]). Nid yw'r dosbarthiad a ddeilliwyd o'r un lleiniau a ddadansoddiwyd trwy wahanol ddulliau yn troshaenu ei gilydd ond maent yn gyfagos. Mae'n debygol mai'r rheswm am hyn yw bod y data toreithrwydd cymharol a gafwyd o'r ddau ddull yn aml yn wahanol iawn. Nid yw hyn yn syndod gan y gellid disgwyl i doreithrwydd cymharol biomas gwreiddiau a dail/coesyntau fod yn wahanol rhwng rhywogaethau.





**Fig 2.3:** Principal Coordinates ordination plots of plant communities in Plots 1 and 6 at the Brignant longterm experiment using eDNA (B.....) or vegetation surveying (X/Y...). A) including all higher plants and B) including only species found detected using both methods.

### Eglurhad o blotiau dosbarthu

*Darperir yr esboniad hwn i gynorthwyo â dehongli'r amrywiol blotiau dosbarthu a gyflwynir yn yr adroddiad hwn [e.e. Ffig. 2.3] sy'n ceisio crynhoi, ar ffurf graffiau, y data toreithrwydd cymharol ar blanhigion/ffyngau a gyflwynir yn y tablau cysylltiedig [e.e. Tabl 2.1].*

Ym maes ecoleg, wrth gasglu data am rywogaethau planhigion sy'n bresennol a'u toreithrwydd cymharol mewn sawl cwadrat, mae plotiau dosbarthu yn darparu dull hygrych o gyflwyno trosolwg o'r data, i ddangos pa gwadradau sydd debycaf i'w gilydd. Mae pob cwadrat yn yr arbrawf yn cael ei gynrychioli gan un pwynt, gyda phwyntiau wedi'u plotio'n agos at ei gilydd â chymunedau planhigion/ffyngau tebycach.

Gellir defnyddio amrywiaeth o dulliau i gynhyrchu plotiau dosbarthu. Yma rydym yn defnyddio dadansoddiad o'r prif gyfesurynnau (PCO), sef dull graddio amlddimensiwn (MDS) a ddefnyddir yn eang ar gyfer cyflwyno data toreithrwydd o gymunedau naturiol o ffyngau/planhigion ac ati.

Mae diagramau dosbarthu yn syml i'w dehongli, er gwaethaf y fathemateg gymhleth sy'n sail iddynt. Mae nifer o dulliau dosbarthu wedi'u datblygu ac yn cael eu defnyddio'n eang gan ecolegwyr/biolegwyr i symleiddio'r gwaith o ddehongli setiau data cymhleth. Ar gyfer setiau data o'r fath, mae'r data'n amlddimensiwn ac ni ellir eu cyflwyno mewn graff 2-D syml. Felly mae'r dulliau hyn yn distyllu'r data amlddimensiwn i echdynnu'r gwahaniaethau allweddol (amrywiannau) rhwng samplau i gyflwyno'r rhain yn y plotiau dosbarthu 2-D. Ni ellir cyflwyno'r holl wybodaeth sy'n bresennol yn y set ddata mewn plotiau dosbarthu, gan mai dim ond dwy ganran bwysicaf yr amrywiant y gellir eu cyflwyno. Fodd bynnag, mae'n ddefnyddiol nodi o'r echlinau pa ganran o gyfanswm yr amrywiant yn y set ddata a gyflwynir ar bob echelin y graff dosbarthu.

Gan mai dim ond 25 o'r 41 rhywogaeth a ganfuwyd a ganfuwyd gan ddefnyddio'r ddau ddull, cynhaliwyd ail broses ddosbarthu gan ddefnyddio'r rhywogaethau hyn yn unig (Ffig. 2.3B), ond roedd y plot dosbarthu canlyniadol yn debyg iawn.

Fel y nodwyd uchod, ni ellir adnabod rhai tacsonau planhigion i lefel rhywogaeth gan ddefnyddio dadansoddiad DNA amgylcheddol o locws ITS2 ac, ym Mrignant, roedd hyn yn wir yn achos *Agrostis capillaris/gigantea*, *Agrostis stolonifera/canina*, *Lolium perenne/multiflorum* a *Ranunculus repens/bulbosus*. Lle cofnodwyd y ddau wrth ddadansoddi llystyfiant, cafodd y ganran gyfan ei chyfrifo yn Nhabl 2.1.

Ni chanfuwyd y chwe rhywogaeth ganlynol trwy DNA amgylcheddol ond fe'u canfuwyd yn yr arolwg llystyfiant. Ym mhob achos, dim ond canran fach o gyfanswm biomas planhigion uwchben y ddaear y maent yn ei chynrychioli, ac, ac eithrio *Euphrasia*, dim ond mewn cyfran fach o'r cwadradau yr oeddent yn bresennol:-

- Campanula rotundifolia* (1%, 1 o 9 cwadrat yn Llain 6)
- Euphrasia officinalis* (1–5%, 7 o 9 cwadrat yn Llain 6)
- Galium saxatile* (1%, 1 o 9 cwadrat yn Llain 6)
- Medicago lupulina* (1%, 1 o 9 cwadrat yn Llain 6)
- Rhywogaeth *Myosotis* (1%, 2 o 9 cwadrat yn Llain 6)
- Potentilla erecta* (1%, 1 o 9 cwadrat yn Llain 6)

Ni chanfuwyd y deg rhywogaeth ganlynol yn yr arolwg llystyfiant ond cawsant eu canfod trwy DNA amgylcheddol. Gweiriau yw'r mwyafrif, yn enwedig y rhai nad oeddent yn blodeuo ar adeg yr arolwg (a fyddai'n debygol o fod yn wir am yr holl weiriau ac eithrio *F. rubra*). Ar gyfer y rhywogaethau eraill, gallai'r rhain fod wedi bod yn eginblanhigion bach a gafodd eu hanwybyddu yn ystod yr arolwg; fodd bynnag, ni ellir eithrio'r posibilrwydd bod y DNA a ganfuwyd yn tarddu o hadau heb eu hegino. Posibilrwydd ychwanegol (mwy tebygol) yw bod y DNA yn tarddu o ddail neu wreiddiau marw sy'n bresennol yn y pridd:-

*Alopecurus pratensis* (<24%, 5/18 cwadrat yn Llain 1/6)

*Crepis capillaris* (<0.6%, 5/9 cwadrat yn Llain 6)

*Festuca rubra* (8–22%, 17/18 cwadrat yn Llain 1/6)

*Leontodon hispidus* (0.44%, 1/9 cwadrat yn Llain 6)

*Phleum pratense* (<0.31%, 2/18 cwadrat yn Llain 1/6)

*Poa pratensis* (<31%, 17/18 cwadrat yn Llain 1/6)

*Poa trivialis* (<63%, 13/18 cwadrat yn Llain 1/6)

*Prunella vulgaris* (0.52%, 1/9 cwadrat yn Llain 6)

*Ranunculus repens/bulbosus* (<4.55%, 10/18 cwadrat yn Llain 1/6)

*Trifolium dubium* (<11%, 3/9 cwadrat yn Llain 6)

Toreithrwydd cymharol gwahanol rywogaethau planhigion yw'r esboniad tebygol am ddsbarthiad ychydig yn wahanol lleiniau a ddadansoddwyd gan DNA amgylcheddol a'r rhai lle dadansoddwyd y llystyfiant. Ar gyfer gweiriau, mae'n debygol ei bod yn anodd amcangyfrif pa ddail sy'n perthyn i ba rywogaeth hyd yn oed pan fo'r rhywogaethau yn eu blodau llawn, ond hyd yn oed ar gyfer rhywogaethau a adnabyddir yn ddiamwys mae gwahaniaethau mawr o hyd. Er enghraifft, canfuwyd *Plantago lanceolata* ar doreithrwydd cymedrig o 52% (amrediad 21–80%) trwy DNA amgylcheddol, ond dim ond 18% (amrediad 10–25%) wrth ddadansoddi llystyfiant. Yn yr un modd, cafodd rhywogaethau *Ranunculus* sgôr o 5% o ran gorchudd cymedrig (amrediad 1–10%) ond 15% (amrediad 0.3–46%) trwy DNA amgylcheddol. Gall gwahaniaethau o'r fath fod oherwydd y ffaith y gall cymarebau gwreiddiau:egin gwahanol rywogaethau planhigion fod yn wahanol a bod y gymhareb hon yn newid yn dymhorol.

## **2C) Cymharu data NVC Kirby Muxloe â data DNA amgylcheddol**

Cynhaliwyd cymhariaeth debyg rhwng dadansoddiad o DNA amgylcheddol a dadansoddiad o llystyfiant trwy ddefnyddio samplau pridd a gymerwyd yn wreiddiol fel rhan o asesiad safle gan The Environmental Development Partnership (EDP; <https://www.edp-uk.co.uk/>), cwmni yr oedd Dr Rob Rowlands yn gyfarwyddwr iddo yn flaenorol.

Casglwyd samplau creiddiau pridd (pum craidd fesul cwadrat 2 x 2 m; gan ddefnyddio digreiddiwr afalau) o bedwar cae cyfagos (wedi'u labelu A i D) ger Kirby Muxloe, Swydd Gaerlŷr (52.629,-1.233), ar 3 Mehefin 2013 gan Mr William Brown (EDP) a chynhaliwyd arolwg llystyfiant gan Dr Grace O'Donovan (Broadview Ecology Ltd) ar yr un pryd. Adroddwyd bod y caeau yn eithaf tebyg o ran llystyfiant ac eithrio bod cae

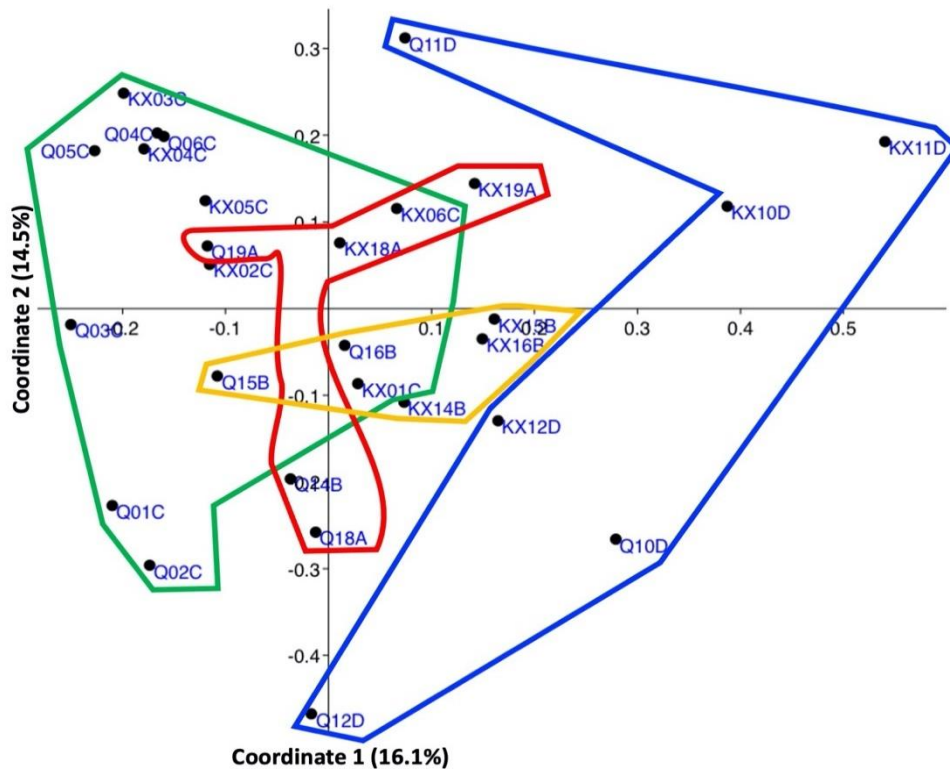
C ychydig yn wlypach, gyda chaeau A ac C yn cael eu rheoli fel gweirgloddiau a chaeau B a D yn cael eu pori drwy'r haf.

Canfuwyd cyfanswm o 34 rhywogaeth yn ystod y dadansoddiad llystyfiant gwreiddiol a 35 rhywogaeth trwy ddadansoddi DNA amgylcheddol. O'r 43 rhywogaeth, darganfuwyd cyfanswm o 26 rhywogaeth trwy'r ddau dull (Tabl 2.2).





Fel ym Mrignant, mae'r gweiriau'n cael eu hadnabod yn well a chafodd mwy o rywogaethau eu canfod trwy DNA amgylcheddol. Mewn cyferbyniad, nododd yr arolwg llystyfiant bresenoldeb nifer o'r perlysiâu anghyffredin na chawsant eu hadnabod gan y DNA amgylcheddol (e.e. *Achillea millefolium*, *Bellis perennis*, *Medicago lupulina*). Canfuwyd un rhywogaeth, *Populus x nigra*, trwy DNA amgylcheddol mewn un cwadrat. Yn debygol iawn, mae hyn yn enghraifft o bresenoldeb dail coed cyfagos sydd wedi'u chwythu yn y pridd. Mewn cyferbyniad, mae'r gwahaniaeth rhwng data'r DNA amgylcheddol a data'r arolwg llystyfiant yn llai amlwg ar y graff dosbarthu (Ffig. 2.4) nag yr oedd yn achos data Brignant (Ffig. 2.3).



**Ffig. 2.4.** Dosbarthiad o brif gyfesurynnau (PCO) cwadradau Kirby Muxloe. Dangosir samplau o gae A (coch), B (oren), C (gwyrd) a D (glas) gan bolygonau. Daw'r pwyntiau data wedi'u rhagddodi gan KX o ddata DNA amgylcheddol a nodir y rhai o'r arolwg llystyfiant gan y llythyren Q.

## 2D) Turlough

Cynhaliwyd trydedd gymhariaeth o ddata arolwg NVC â data DNA amgylcheddol ar lawnt cyfoethog ei rhywogaethau yn Turlough, Swydd Clare, Iwerddon (fel rhan o arbrawf dosbarth taith faes y brifysgol), ar 10 Medi 2018. Gosodwyd saith cwadrat 50 x 50 cm ar draws y lawnt (o fewn ardal tua 3 x 8 m) ac asesodd myfyrwyr israddedig y llystyfiant yn y cwadradau hyn gan ddefnyddio dulliau gorchudd canrannol a gorchudd pwyntiau. Ar ôl cwblhau'r arolwg llystyfiant, cymerwyd creiddiau pridd (naw fesul cwadrat) o bob yn ail gwadrat (1, 3, 5, 7) a'u prosesu gan ddefnyddio ein dull metabarcodio DNA safonol (gweler uchod).

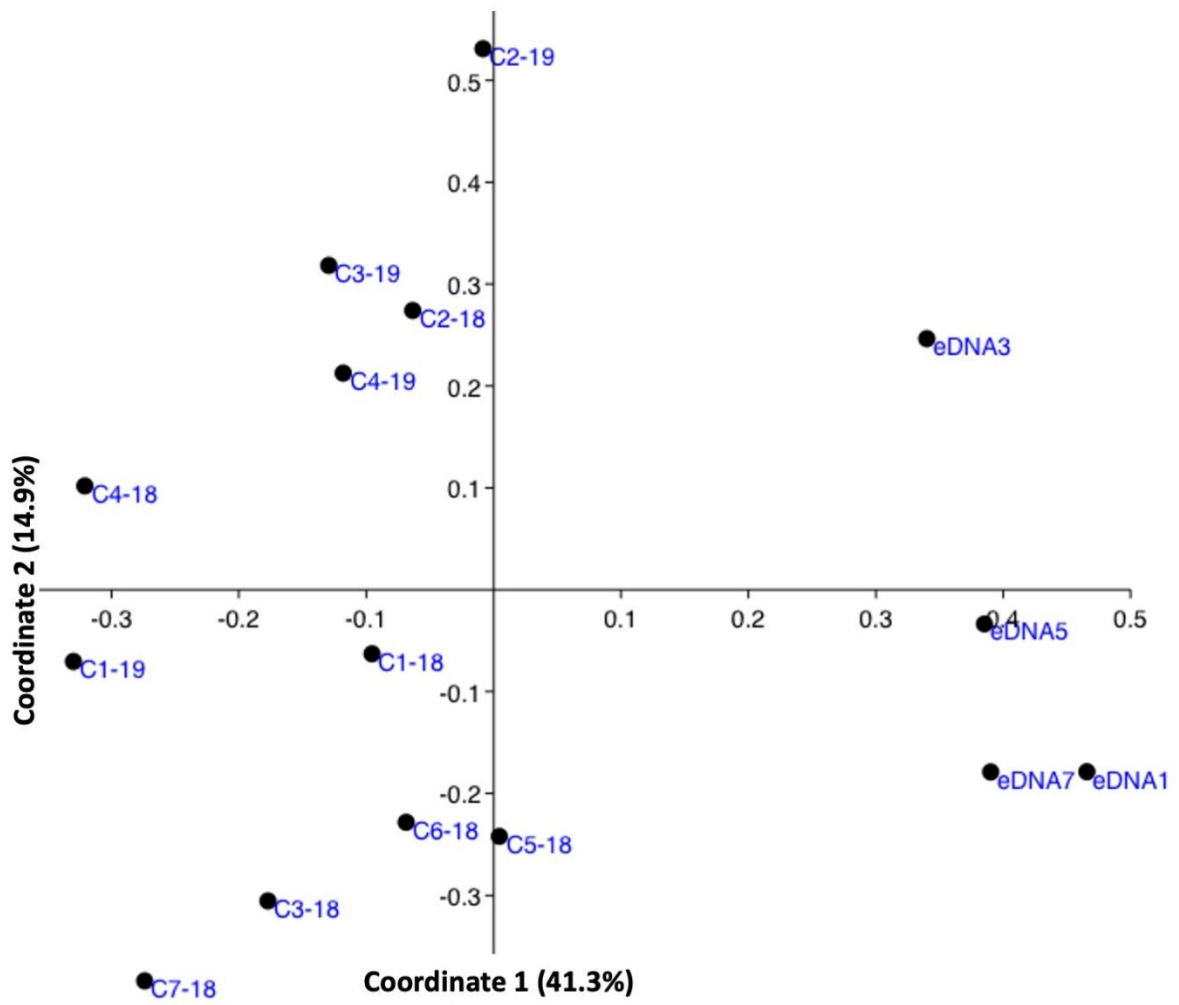
Yn 2019 (5 Medi), cynhaliodd pedwar grŵp o'r daith faes nesaf yr un arbrawf. Er nad oedd lleoliadau'r cwadradau yr un fath, roeddent o fewn yr un ardal 3 x 8 m a astudiwyd y flwyddyn ddiwethaf. Unwyd data arolwg llystyfiant o ddosbarthiadau 2018 a 2019 â'r data DNA amgylcheddol i'w cymharu (Tabl 2.3; Ffig. 2.5).

Canfuwyd cyfanswm o 55 rhywogaeth, gyda'r dull DNA amgylcheddol yn methu â nodi tair rhywogaeth, yr oedd dwy ohonynt (*Geranium sanguineum*, *Gymnadenia conopsea*) yn bresennol mewn niferoedd isel yn unig (1%). Dros y ddwy flynedd, canfu arolygon llystyfiant y myfyrwyr 39 rhywogaeth, a gwelwyd bod 14 rhywogaeth arall yn tyfu ar y lawnt neu'n gyfagos iddi (ond nid o fewn unrhyw un o'r cwadradau). Fodd bynnag, roedd canfod *Quercus robur* a rhywogaeth *Rhododendron* yn y DNA amgylcheddol yn nghwadrat 3 yn llai hawdd ei egluro gan na welwyd y naill rhywogaeth na'r llall mewn unrhyw erddi neu gaeau cyfagos ac ni fyddai disgwyl iddynt fod yn bresennol mewn ardal galchfaen. Ymhlith y rhywogaethau eraill nad oeddent yn bresennol ar y lawnt ond, yn hytrach, mewn cynefinoedd cyfagos roedd rhywogaeth *Prunus*, *Crataegus monogyna* (coed yn bresennol tua 10 m i ffwrdd o ardal yr arolwg) a *Hedera helix* (ar wal gyfagos 2 m i ffwrdd). Yn yr un modd â'r *Populus x nigra* a ganfuwyd mewn pridd glaswelltir yn Kirby Muxloe, mae'n debygol bod y DNA amgylcheddol sy'n gysylltiedig â'r rhywogaethau hyn yn tarddu o ddail a chwythwyd gan y gwynt.

O ran niferoedd cymedrig dilyniannau DNA amgylcheddol, y rhywogaethau mwyaf cyffredin oedd *Pimpinella saxifraga* (cymedr 54%), *Pilosella officinarum* (7.6%), *Linum catharticum* (7.0%), *Leontodon saxatilis* (5.8%) a *Lotus corniculatus* (4.3%), ond ar gyfer yr arolygon llystyfiant, y rhywogaethau mwyaf niferus oedd *Agrostis stolonifera/canina* (cymedr 55%), *Festuca rubra* (43%), *Danthonia decumbens* (30%), *Trifolium repens* (29%) a *Lotus corniculatus* (26%). Yn achos *P. saxifraga*, mae'n bosibl bod y gwahaniaeth mawr mewn toreithrwydd rhwng y dandansoddiadau DNA amgylcheddol a llystyfiant (54% yn erbyn 16%), er gwaethaf ei ddail nodedig, yn arwydd o'i system wreiddiau helaeth.

**Table 2.3:** eDNA and vegetation analysis on the National School Lawn at Turlough, Co. Clare. The vegetation surveys were undertaken by undergraduate students in either 2018 (suffix 18; 7 quadrats) or 2019 (suffix 19; 4 quadrats). Some species were found in both years (2) and others only in one of the survey years (1/0 or 0/1). Several species known to be present at the site but not observed within any of the quadrats are indicated by \*.

eDNA NVC	Both	eDNA1	eDNA3	eDNA5	eDNA7	C1-18	C2-18	C3-18	C4-18	C5-18	C6-18	C7-18	C1-19	C2-19	C3-19	C4-19			
<i>Achillea millefolium</i>	1	2	1	0.01%	0.20%	0.02%													
<i>Agrostis capillaris/gigantea</i>	1	*		0.15%	0.19%	0.02%													
<i>Agrostis stolonifera/canina</i>	1	1/0	1	0.20%	0.52%	0.01%			30%			80%							
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	1	*		0.11%															
<i>Arrhenatherum elatius</i>	1	*		0.06%	0.04%														
<i>Bellis perennis</i>	1	0/1	1	0.01%	0.25%	0.46%										1%			
<i>Briza media</i>	1	2	1	1.83%	1.85%	1.49%	4%	12%	10%	16%	2%			3%		2%			
<i>Carex flacca</i>	1	2	1	0.49%	2.07%	2.22%		1%	4%	71%		14%	40%		5%	3%			
<i>Centaurea nigra</i>	1	2	1	0.16%	2.37%	2.92%	10%	14%	10%	19%			1%	1%	2%	1%			
<i>Centaurea scabiosa</i>	1	2	1	0.55%		0.01%	3%						15%			1%			
<i>Crataegus monogyna</i>	1	*			0.04%														
<i>Cynosurus cristatus</i>	1	2	1	0.11%	0.09%			2%	9%			1%	25%	6%	2%				
<i>Dactylis glomerata</i>	1	1/0	1	0.07%	0.09%					25%		1%	2%						
<i>Danthonia decumbens</i>	1	2	1	0.21%	0.51%	0.55%		1%						30%	50%	40%			
<i>Daucus carota</i>	1	2	1	0.17%	0.09%	0.11%	15%	7%	11%	8%	8%	25%	2%	6%	10%	1%			
<i>Euphrasia</i> agg.	1	0/1	1	0.07%	0.26%	0.12%								1%	5%				
<i>Festuca rubra</i>	1	2	1	0.90%	0.63%	0.94%	70%	12%		33%	48%	51%	55%	30%	6%	80%	40%		
<i>Fraxinus excelsior</i>	1	0/1	1			0.04%								1%	1%				
<i>Gentianella amarella</i>	1	1/0	1	0.04%	0.02%	6.50%						1%							
<i>Geranium sanguineum</i>		2											1%		1%	1%			
<i>Gymnadenia conopsea</i>		2									1%			1%					
<i>Hedera helix</i>	1	*		0.57%	0.58%														
<i>Hieracium castellanum</i>	1	1/0	1	0.74%	6.46%	2.05%		1%	3%										
<i>Holcus lanatus</i>	1	1/0	1	0.19%	0.15%				3%										
<i>Hypochaeris glabra</i>	1	0/1	1	0.23%	0.49%	3.08%									8%	30%			
<i>Jacobaea vulgaris</i>	1	1/0	1		0.18%			5%		5%		2%	7%						
<i>Koeleria macrantha</i>	1	*		0.10%		0.02%													
<i>Lathyrus pratensis</i>	1	*		0.09%		0.15%													
<i>Leontodon hispidus</i>	1	2	1		0.06%		2%			14%				11%	4%				
<i>Leontodon saxatilis</i>	1	1/0	1	0.23%	1.36%	10.43%	2%					6%							
<i>Leucanthemum vulgare</i>	1	2	1		0.48%			1%	6%	15%					1%				
<i>Linum catharticum</i>	1	2	1	0.94%	24.67%	2.21%		2%		14%	18%			4%	10%	3%			
<i>Lolium perenne/multiflorum</i>	1	*			0.01%														
<i>Lotus corniculatus</i>	1	2	1	2.60%	4.92%	3.50%	12%	7%		16%	35%	32%	69%	20%	6%	10%	50%		
<i>Medicago lupulina</i>	1	0/1	1	0.82%	1.42%	0.07%								3%	5%	1%	2%		
<i>Pilosella officinarum</i>	1	2	1	1.87%	19.33%	6.91%			5%	14%				7%	25%	7%			
<i>Pimpinella saxifraga</i>	1	2	1	81.53%	27.86%	50.13%	20%	7%	5%		51%	33%	14%	2%	6%	10%	9%		
<i>Plantago lanceolata</i>	1	1/0	1	0.26%	0.55%	0.22%		1%	6%					35%					
<i>Plantago maritima</i>	1	1/0	1	0.04%		0.04%					9%								
<i>Poa nemoralis/compressa</i>	1	*		0.01%															
<i>Poa pratensis</i>	1	*				0.01%													
<i>Poa trivialis</i>	1	*		0.02%	0.01%	0.01%													
<i>Polygala vulgaris</i>	1	*			0.28%	9.18%													
<i>Potentilla erecta</i>	1	*		0.03%															
<i>Prunella vulgaris</i>	1	2	1	0.31%	0.67%	1.63%	2%	5%	5%	1%		3%	6%	30%	1%	2%	1%		
<i>Prunus</i> sp.	1	*		0.01%	0.05%	0.01%													
<i>Quercus robur</i>	1	*			0.04%														
<i>Ranunculus repens/bulbosus</i>	1	2	1	2.10%	0.02%	0.11%		3%	7%						1%	3%			
<i>Rhinanthus minor</i>	1	0/1	1	0.02%	0.01%								2%	1%	9%	2%			
<i>Rhododendron</i> sp.	1			0.01%															
<i>Succisa pratensis</i>		1/0						15%		30%	18%								
<i>Taraxacum officinale</i> agg.	1	1/0	1			0.09%						1%	10%						
<i>Trifolium pratense</i>	1	2	1	0.58%	0.54%	2.19%						1%	7%	47%	12%	6%	20%	5%	
<i>Trifolium repens</i>	1	2	1	1.55%	0.48%	0.07%	20%	7%		10%	70%	40%	42%	30%	57%	25%	10%	4%	9%
<i>Vicia cracca</i>	1	2	1			1.30%						10%		9%			1%		
	<b>52</b>	<b>39</b>	<b>36</b>																



**Fig. 2.5.** PCO ordination of Turlough quadrats. Only the 33 common to both the eDNA and NVC databasets

### **3) Meintioli cyfradd dadfeilio DNA planhigion mewn priddoedd yr aflonyddwyd arnynt (arbrawf mesocosm [potiau])**

#### **3A) Trosolwg**

Ar ôl sefydlu ei bod yn bosibl adnabod DNA amgylcheddol sy'n deillio o blanhigion (a ffyngau) o briddoedd, byddai'n addysgiadol gwybod a yw DNA amgylcheddol o'r fath yn deillio o fiomas planhigion byw / sydd wedi marw yn ddiweddar, a pha mor hir y mae DNA amgylcheddol yn parhau yn y pridd unwaith y bydd y biomas byw wedi'i dynnu. I archwilio hyn, dyfeisiwyd arbrawf mesocosm dan amodau tŷ gwydr tymherus i brofi effaith arferion amaethyddol cyferbyniol ar ddadfeilio DNA amgylcheddol o laswelltir amrywiol.

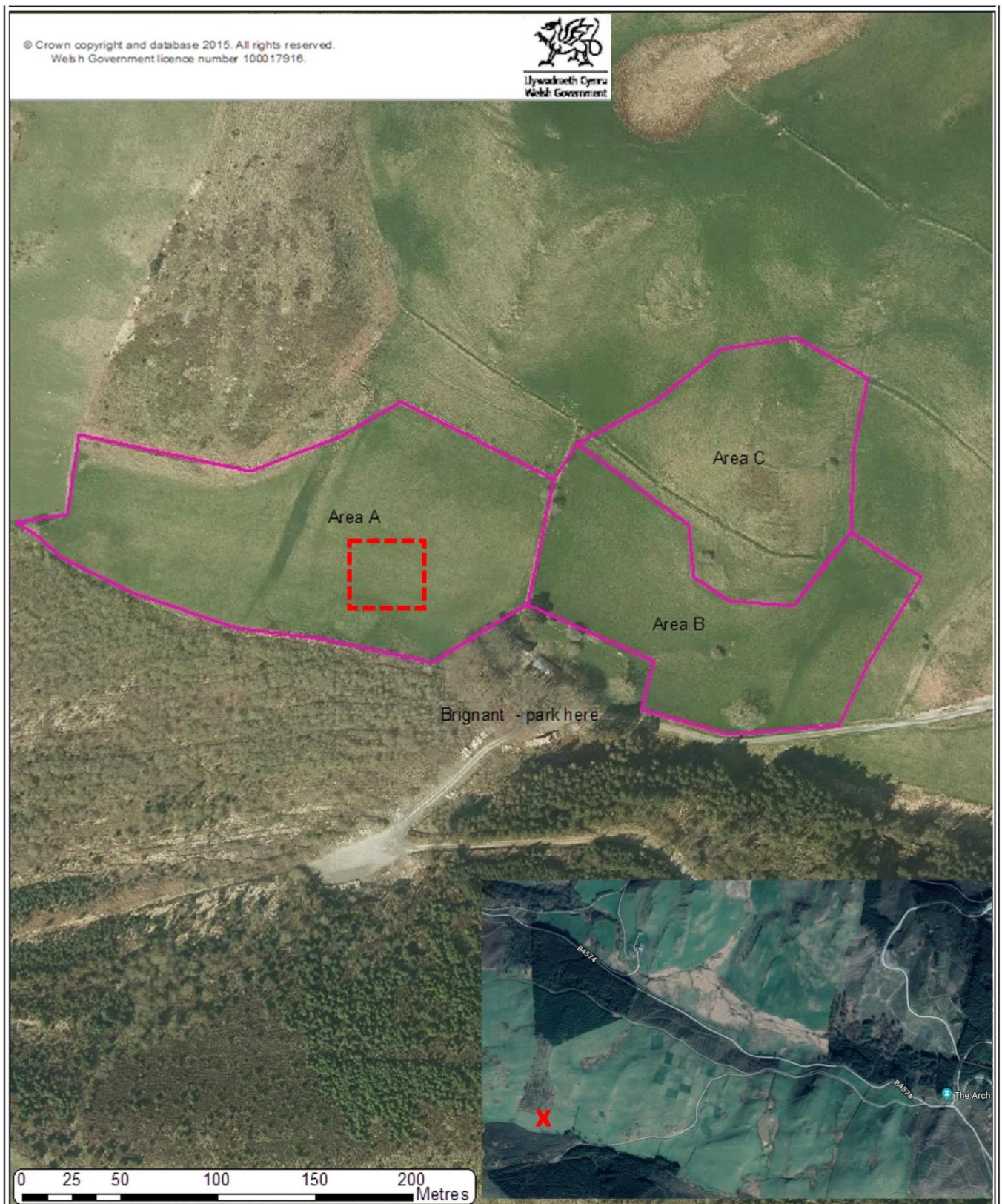
#### **3B) Dull**

Casglwyd uwchbridd ar gyfer yr arbrawf o gwadrat tua 30 x 30 m ym Mrignant (Ffig. 3.1) ar 28/29 Mehefin 2018. Dosbarthwyd yr ardal yn flaenorol fel a ganlyn: "Llain gweddol homogenaidd o laswelltir niwtral yn wynebu'r de gydag arwyddion o fod wedi cael ei rheoli fel gweirglodd yn y gorffennol, a oedd wedi'i rheoli'n flaenorol o dan delerau'r cynllun AAS fel 'gweirglodd Haen 2'"; roedd defaid yn pori'n achlysurol ac roedd rhestr o rywogaethau planhigion ar gael ar gyfer yr ardal hon (Tabl 3.1; Dave Rogerson, LIC, gohebiaeth bersonol). Torrwyd tyweirch (30 x 30 cm x tua 10 cm o ddyfnder) o bob rhan o'r cae a gosodwyd tyweirch yn eu lle o ymyl y cae (cyfanswm pwysau ffres o tua 120 kg).

Wrth gasglu'r pridd, casglwyd 36 craidd pridd o bob rhan o'r cwadrat tua 30 x 30 m a'u cyfuno yn unol â'n protocol safonol.

Cafodd y tyweirch eu torri gan ddefnyddio peiriant rhwygo pridd trydan symudol a'u cymysgu ymhellach mewn cymysgwr sment (Ffig. 3.2). Ar adeg casglu, uchder y glastir ar y tyweirch oedd tua 6 cm; wrth darfu ar y tyweirch, ni chafodd y llystyfiant ei symud a chafodd unrhyw glystyrau mwy eu rhwygo â llaw yn ddarnau llai cyn eu gosod yn y peiriant rhwygo pridd i'w cymysgu â phridd. Ein nod oedd cael cydbwysedd rhwng torri priddellau yn faint digon bach (<3 cm) i osgoi amrywiadau rhwng potiau ac iddynt fod o faint digonol i ddynewared yn realistig effeithiau aredig / palu â pheiriant / ogedu.

Ar ôl cael ei homogoneiddio, cafodd y pridd ei ddsbarthu i 24 o botiau planhigion plastig (cynhwysedd 9.5 l), gyda 3.5 kg o bridd ym mhob un. Cyfaint cychwynnol y pridd yn y potiau oedd 6 l (dwysedd swmp 0.58 g/cm<sup>3</sup>). Sefydlwyd set o bedwar pot dyblyg gan ddefnyddio tair haen o dyweirch cyfan ond gwrthdro (gan ddynewared aredig heb ogedu). Roedd pwysau cymedrig y potiau a oedd yn cynnwys y tyweirch gwrthdro yn uwch (4.8 kg/pot) nag ar gyfer y priddoedd homogenaidd ac roedd y dwysedd swmp cychwynnol hefyd yn uwch (0.69 g/cm<sup>3</sup>). Roedd y pridd yn sych iawn pan gafodd ei gasglu, yn dilyn cyfnod hir heb law. Roedd pH y pridd yn 5.22 gyda'r dargludedd trydanol yn 29.2 µs/cm. Roedd y cynnwys dŵr cychwynnol yn 11% (w/w).



**Fig 3.1.** Location of turves used for the pot experiment from Area A (52.3636,-3.8381) at Brignant, Pwllpeiran. Inset map shows location of the fields in relation to the Brignant Long Term Experiment (marked x) and Hafod Arch. Turves were collected from a ca. 30x30 m area, as outlined in red font. on 28<sup>th</sup> June 2018. Collection and preparation of soil from Area A for the pot experiment

**Table 3.1: List of plants found in AreaA at the Brignant field site**

<b>Habitat descriptions / species lists – Brignant.</b>					
<b>Area A:</b> Fairly homogenous south-facing stand of neutral grassland indicative of past haymeadow management. Was in the ESA scheme as Tier 2 haymeadow.					
<b>Area B:</b> Semi-improved neutral to acid grassland with high sown species content, between 25-35%. Still species-rich although more grassy and more weed species.					
<b>Area C:</b> Bent/fescue acid grassland – partly semi-improved but also species-rich. A good example of this. Includes mountain pansy and devil's bit.					
Low and Neutral Grassland, upland haymeadows and species-rich acid grassland are habitats of principal importance as listed in Section 42 of the Natural Environment & Rural Communities (NERC) Act 2006					
Species found in the grasslands		A	B	C	
		Species-rich neutral grassland	Semi-improved grassland	Acid grassland	
<b>Graminoids</b>	<i>Agrostis canina</i>			X	
<b>Graminoids</b>	<i>Agrostis capillaris</i>	X	X		
<b>Graminoids</b>	<i>Agrostis vinealis</i>			X	
<b>Graminoids</b>	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	X	X	X	
<b>Graminoids</b>	<i>Bromus hordeaceus</i>	X			
<b>Graminoids</b>	<i>Cynosurus cristatus</i>	X	X	X	
<b>Graminoids</b>	<i>Dactylis glomerata</i>	X	X		
<b>Graminoids</b>	<i>Danthonia decumbens</i>			X	
<b>Graminoids</b>	<i>Deschampsia flexuosa</i>	X		X	
<b>Graminoids</b>	<i>Festuca ovina</i>	X		X	
<b>Graminoids</b>	<i>Festuca rubra</i>	X	X		
<b>Graminoids</b>	<i>Holcus lanatus</i>	X	X	X	
<b>Graminoids</b>	<i>Holcus mollis</i>	X	X		
<b>Graminoids</b>	<i>Lolium perenne</i>	X	X	X	
<b>Graminoids</b>	<i>Molinia caerulea</i>			X	
<b>Graminoids</b>	<i>Poa annua</i>	X	X		
<b>Graminoids</b>	<i>Poa pratensis</i>	X	X		
<b>Graminoids</b>	<i>Carex pilulifera</i>			X	
<b>Graminoids</b>	<i>Luzula campestris</i>	X	X		
<b>Graminoids</b>	<i>Juncus effusus</i>	X	X		
<b>Forbs</b>	<i>Achillea millefolia</i>	X	X		
<b>Forbs</b>	<i>Bellis perennis</i>	X	X		
<b>Forbs</b>	<i>Campanula rotundifolia</i>				
<b>Forbs</b>	<i>Cardamine pratensis</i>	X	X		
<b>Forbs</b>	<i>Centaurea nigra</i>	Missing			
<b>Forbs</b>	<i>Cerastium fontanum</i>	X	X	X	
<b>Forbs</b>	<i>Cirsium vulgare</i>		X		
<b>Forbs</b>	<i>Cirsium palustre</i>	X			
<b>Forbs</b>	<i>Digitalis purpurea</i>		X		
<b>Forbs</b>	<i>Galium saxatile</i>		X	X	
<b>Forbs</b>	<i>Heracleum sphondylium</i>	X			
<b>Forbs</b>	<i>Hyacinthoides non-scripta</i>	X			
<b>Forbs</b>	<i>Hypochaeris radicans</i>	X	X		
<b>Forbs</b>	<i>Lathyrus pratensis</i>	X			
<b>Forbs</b>	<i>Leontodon autumnalis</i>	X			
<b>Forbs</b>	<i>Leucanthemum vulgare</i>	X			
<b>Forbs</b>	<i>Lotus comiculatus</i>	X	X	X	
<b>Forbs</b>	<i>Lotus uliginosus</i>	X			
<b>Forbs</b>	<i>Pilosella officinarum</i>			X	
<b>Forbs</b>	<i>Plantago lanceolata</i>	X	X	X	
<b>Forbs</b>	<i>Potentilla anserina</i>	X	X		
<b>Forbs</b>	<i>Potentilla erecta</i>	X	X	X	
<b>Forbs</b>	<i>Prunella vulgaris</i>	X	X	X	
<b>Forbs</b>	<i>Ranunculus acris</i>	X	X	X	
<b>Forbs</b>	<i>Ranunculus ficaria</i>	X			
<b>Forbs</b>	<i>Ranunculus repens</i>	X	X		
<b>Forbs</b>	<i>Rhinanthus minor</i>	X			
<b>Forbs</b>	<i>Rumex acetosa</i>	X	X	X	
<b>Forbs</b>	<i>Rumex acetosella</i>			X	
<b>Forbs</b>	<i>Rumex obtusifolius</i>	X	X		
<b>Forbs</b>	<i>Sanquisorba minor</i>			X	
<b>Forbs</b>	<i>Succisa pratensis</i>			X	
<b>Forbs</b>	<i>Taraxacum spp.</i>	X	X	X	
<b>Forbs</b>	<i>Trifolium dubium</i>	X			
<b>Forbs</b>	<i>Trifolium repens</i>	X	X	X	
<b>Forbs</b>	<i>Trifolium pratense</i>	X			
<b>Forbs</b>	<i>Urtica dioica</i>		X		
<b>Forbs</b>	<i>Vaccinium myrtillus</i>			X	
<b>Forbs</b>	<i>Viola lutea</i>			X	
<b>Forbs</b>	<i>Viola riviana</i>		X	X	
<b>Forbs</b>	<i>Veronica chamaedrys</i>	X	X		
<b>Forbs</b>	<i>Veronica serpyllifolia</i>	X	X	X	
<b>Bryophytes</b>	<i>Pteridium aquilinum</i>	X	X	X	
<b>Bryophytes</b>	<i>Hylocomium splendens</i>			X	
<b>Bryophytes</b>	<i>Hypnum cupressiforme</i>			X	
<b>Bryophytes</b>	<i>Pleurozium schreberi</i>	X	X	X	
<b>Bryophytes</b>	<i>Polytrichum spp.</i>			X	
<b>Bryophytes</b>	<i>Rhytidiadelphus squarrosus</i>	X	X	X	
		<b>SPECIES TOTALS</b>	47	38	35





**Fig 3.2.** Collection and preparation of soil from Area A for the pot experiment

Yna gosodwyd y potiau mewn tŷ gwydr heb ei gynhesu ac wedi'i gysgodi'n rhannol a chafodd y tymheredd ei fonitro yn ystod yr arbrawf gyda chofnodwr data (Ffig. 3.3). Gadawyd y potiau heb eu dyfrio am saith diwrnod ac yna eu dyfrio'n ddyddiol am bedwar diwrnod cyn dechrau'r trefniadau trin (Tabl 3.2) ar 10 Gorffennaf. Nod hyn oedd dynwared ystod o senarios rheoli a hinsoddol ar ôl aredig.

Gosodwyd saith triniaeth (pob un yn cael ei dyblygu bedair gwaith) ar 2 Gorffennaf 2018.

**Tabl 3.2:** Crynodeb o'r triniaethau

Code	Lolium Sown	Watering	Amendment
WF	NO	WET	FERTILISER
WM	NO	WET	LIME
WI	NO	WET	INVERTED
Wx	NO	WET	NONE
Dx	NO	DRY	NONE
WL	YES	WET	NONE
DL	YES	DRY	NONE

Diwygiadau i'r pridd: Ar gyfer y driniaeth â chalch, ychwanegwyd 7.9 g/kg o bridd pwysau sych o galsiwm carbonad ac, ar gyfer y driniaeth â gwrtaith, 220 mg/kg (YaraMila SULPHUR CUT [NPK:22-4-14 + 7.5% SO<sub>3</sub>]) o bridd pwysau ffres. Ychwanegwyd y diwygiadau hyn at wyneb y pridd ac ni chawsant eu cymysgu yn y potiau (gan efelychu arferion amaethyddol).

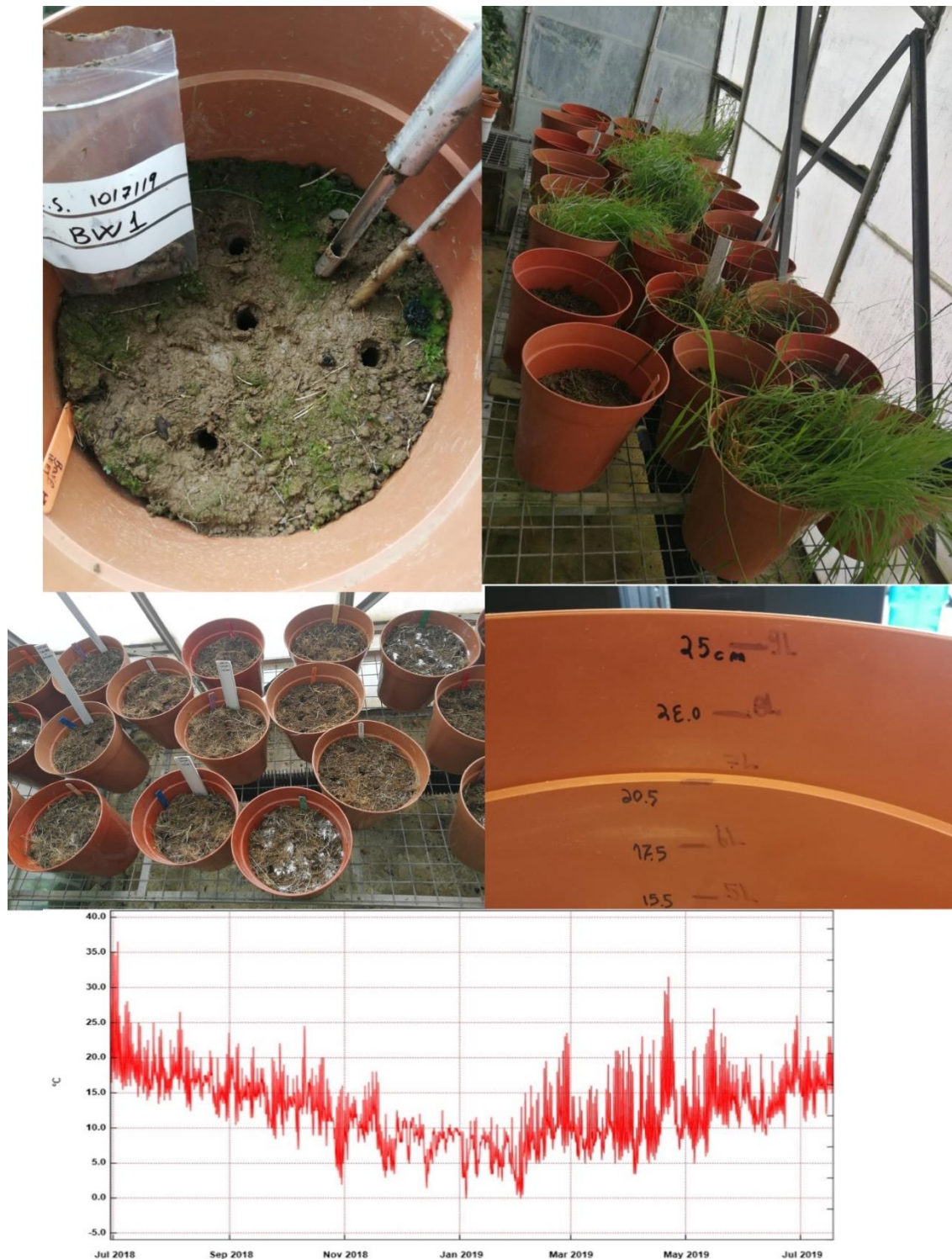
Hadu potiau: Ar gyfer y ddau bot a heuwyd â gweiriau (125 mg o hadau'r pot), roedd hadau *Lolium perenne* (amrywogaeth AberWolf) yn cael eu taenellu ar wyneb y pot a'u gorchuddio â haenen denau o bridd. Cafodd hadau ychwanegol eu hau ym mis Hydref 2019 oherwydd bod y hadau gwreiddiol wedi dangos cyfradd egino wael mewn rhai potiau. Roedd potiau heb eu hadu yn cael eu chwynnu bob pythefnos, gyda'r nod o dynnu'r gwreiddiau hefyd. Ar gyfer potiau a heuwyd â *Lolium*, cafodd eginblanhigion nad oeddent yn weiriau eu tynnu yn yr un modd, ac felly hefyd (pan oedd yn bosibl) unrhyw weiriau a gydnabuwyd fel rhai nad oeddent yn *Lolium*.

Cyfundrefnau dyfrio: Roedd triniaethau GWLYB yn destun dyfrio dyddiol ac, i ddechrau, roedd y triniaethau SYCH yn cael eu dyfrio ddwywaith yr wythnos yn unig. Yn yr hydref (o 14 Tachwedd; pum mis ar ôl dechrau), cafodd y triniaethau SYCH eu dyfrio'n llai aml, sef pob pythefnos, er mwyn ehangu'r cyferbyniad rhwng y triniaethau GWLYB a SYCH, gan ei bod yn ymddangos bod cynhwysedd dal dŵr y priddoedd yn uwch nag a ddisgwyliwyd. Rhoddwyd potiau yn y tŷ gwydr mewn patrwm ar hap a chawsant eu symud ar hap o bryd i'w gilydd.

Samplwyd pridd o'r potiau gan ddefnyddio digreiddiwr afalau (diamedr 11 mm) i ddyfnder o 6 cm gyda phedwar craidd wedi'u cymryd ar draws pob pot (pwysau sych o tua 10 g y pot [= pwysau ffres o 17–21 g]). Cafodd y samplau eu pwyso, eu rhewi ar -80°C a'u sychrewi. Cofnodwyd pwysau sych hefyd, gan ganiatáu cyfrifo colled dŵr. Cafodd pob set o greiddiau ei malu trwy ridyll <0.5 mm a'i chymysgu'n drylwyr, a

chymerwyd 200 mg ar gyfer echdynnu DNA gan ddefnyddio pecyn DNase® PowerSoil® QUIAGEN. Cadwyd yr echdyniad DNA mewn rhewgell ar -20°C cyn cynnal dadansoddiadau.

Ymgwymerwyd â metabarcodio DNA i fwyhau rhanbarth ITS2 â phrimydd ChenF ar gyfer gorchudd planhigion a chymysgedd o brimyddion NGS (Tedersoo, 2014) ar gyfer ffyngau, ynghyd ag ITS4 â chod bar; defnyddiwyd ION Torrent (system PGM Ion ar gyfer dilyniannodi'r genhedlaeth nesaf – Thermo Fisher Scientific) i ddilyniannodi'r data, fel yr uchod.



**Fig 3.3.** Images of the pots *in situ* and temperature profile during the course of the experiment.

Samplwyd y priddoedd yn y potiau ar bedwar pwynt amser er mwyn asesu dadfeiliad DNA amgylcheddol o dan yr amodau amrywiol:- llinell sylfaen (T0; adeg gosod y triniaethau; 11/7/18), sy'n cynrychiol holl bresenoldeb DNA amgylcheddol i ddechrau; ail sampl, un mis ar ôl T0 (10/8/18); trydedd sampl, tri mis ar ôl T0 (10/10/18);

pedwaredd sampl, pum mis ar ôl T0 (heb ei dilyniannodi, wedi'i sychrewi a'i chadw ar -80°C); a phumed sampl, ar ôl 12 mis (11/7/19). Cymerwyd samplau pridd hefyd ym mis Rhagfyr (11/12/18) ond ni chawsant eu dandansoddi ymhellach.

### **3C) Canlyniadau**

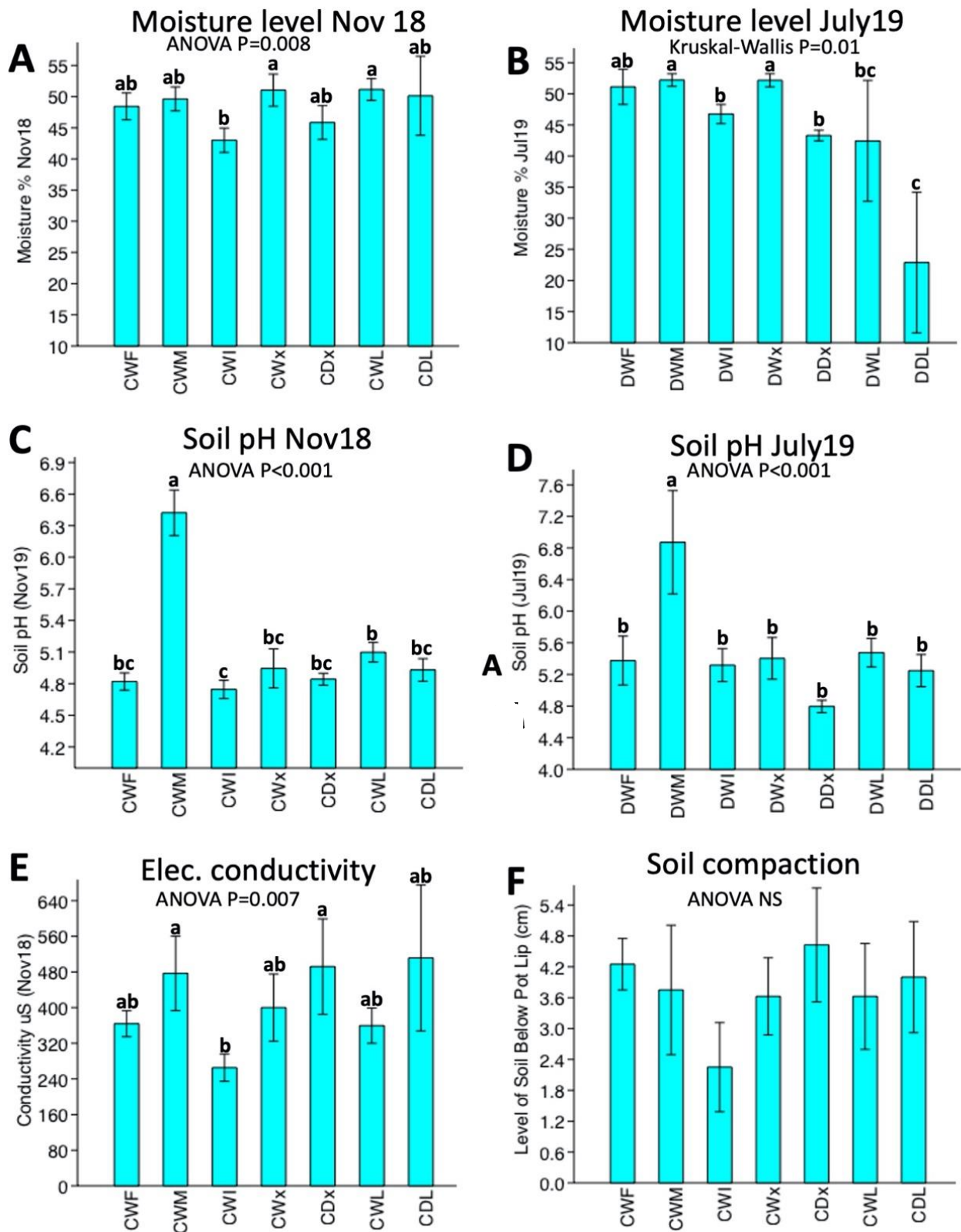
#### **Data'r arbrawf potiau**

Yn ystod yr arbrawf, gwelwyd rhywfaint o setlo yn y priddoedd yn y potiau, yn rhannol o ganlyniad i ddiraddiad y swm mawr o sbwriel planhigion a oedd yn bresennol yn y priddoedd yn wreiddiol. Roedd hyn yn fwy amlwg yn y potiau a oedd yn cynnwys y pridd homogenaidd. Amcangyfrifwyd dwysedd swmp y pridd trwy fesur lefel y pridd o dan wefus y pot, ond nid oedd yn sylweddol wahanol rhwng triniaethau erbyn diwedd yr arbrawf (Ffig. 3.4F).

Profwyd effaith lefelau lleithder gwahanol yn y pridd ar ddiraddio sbwriel planhigion trwy orfodi dwy drefn ddyfrio wahanol, naill ai ym mhresenoldeb planhigion neu yn eu habsenoldeb. Roedd y pum triniaeth a oedd yn destun dyfrio arferol (GWLYB; h.y. arferol ar gyfer planhigion a gedwir mewn tŷ gwydr) yn cael eu dyfrio bob dydd, tra oedd y ddwy driniaeth a oedd yn destun y drefn ddyfrio sychach (SYCH) yn cael eu dyfrio bob yn ail ddiwrnod yn unig. Fodd bynnag, roedd monitro pwysau potiau a lefelau lleithder pridd yn awgrymu nad oedd y systemau dyfrio cyferbyniol hyn yn arwain at unrhyw wahaniaeth arwyddocaol yn lefel lleithder y pridd (Ffig. 3.4A, B). Felly, gostyngwyd y drefn ddyfrio ar gyfer y triniaethau SYCH yn raddol yn ystod y cyfnod rhwng mis Awst a mis Tachwedd 2018. Canfuwyd bod dyfrio bob pythefnos yn rhoi'r cyferbyniad gorau posibl â'r drefn ddyfrio 'WLYB'.

Gostyngodd pH y pridd (5.22 i ddechrau) ychydig yn ystod misoedd cyntaf yr arbrawf (cymedr 4.9 ym mis Tachwedd 2018), ond dychwelodd i 5.2 erbyn diwedd yr arbrawf. Roedd pH y priddoedd wedi'u trin â chalch 1.5 (6.4–6.8) yn uwch nag yn y triniaethau eraill (Ffig. 3.4C, D). Roedd dargludedd pridd o fewn yr amrediad disgwylidig (250–750  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

Gwnaethpwyd ymdrechion i feintioli lefelau resbiradaeth ficrobaidd (cynhyrchu  $\text{CO}_2$  yn y pridd; wedi'i fesur gan ddefnyddio dadansoddwr nwy isgoch) yn y mesocosmau, fel modd o asesu cyfradd pydru'r llystyfiant claddedig, a allai ddangos rhywfaint o gydberthynas â chyfradd diflaniad DNA planhigion. Fodd bynnag, roedd amrywiadau mawr rhwng y potiau dyblyg a dim effaith driniaeth glir (data heb eu dangos), felly ni wnaed mesuriadau resbirometreg y tu hwnt i'r ail gynhaeaf.



**Ffig. 3.4:** Lefel lleithder (A, B), pH (C, D), dargludedd (E) a chywasgiad pridd (F) priddoedd mewn potiau yn ystod yr arbrawf 12 mis. Mae bariau gwallau yn dynodi gwyrriad safonol. Mae triniaethau gyda llythrenniadau uwchysgrif yn sylweddol wahanol (prawf Tukey). Mae codau'r triniaethau fel a ganlyn: llythyren gyntaf: C = trydydd cynhaeaf (Tachwedd 2018) neu D = pedwerydd cynhaeaf (Gorffennaf 2019); ail lythyren: W = wedi'i dyfrio neu D = sych; trydedd lythyren: F = wedi'i gwrteithio, M = calch, x = dim ychwanegiad neu L = *Lolium* wedi'i hau.

## **Metabarcodio DNA: planhigion**

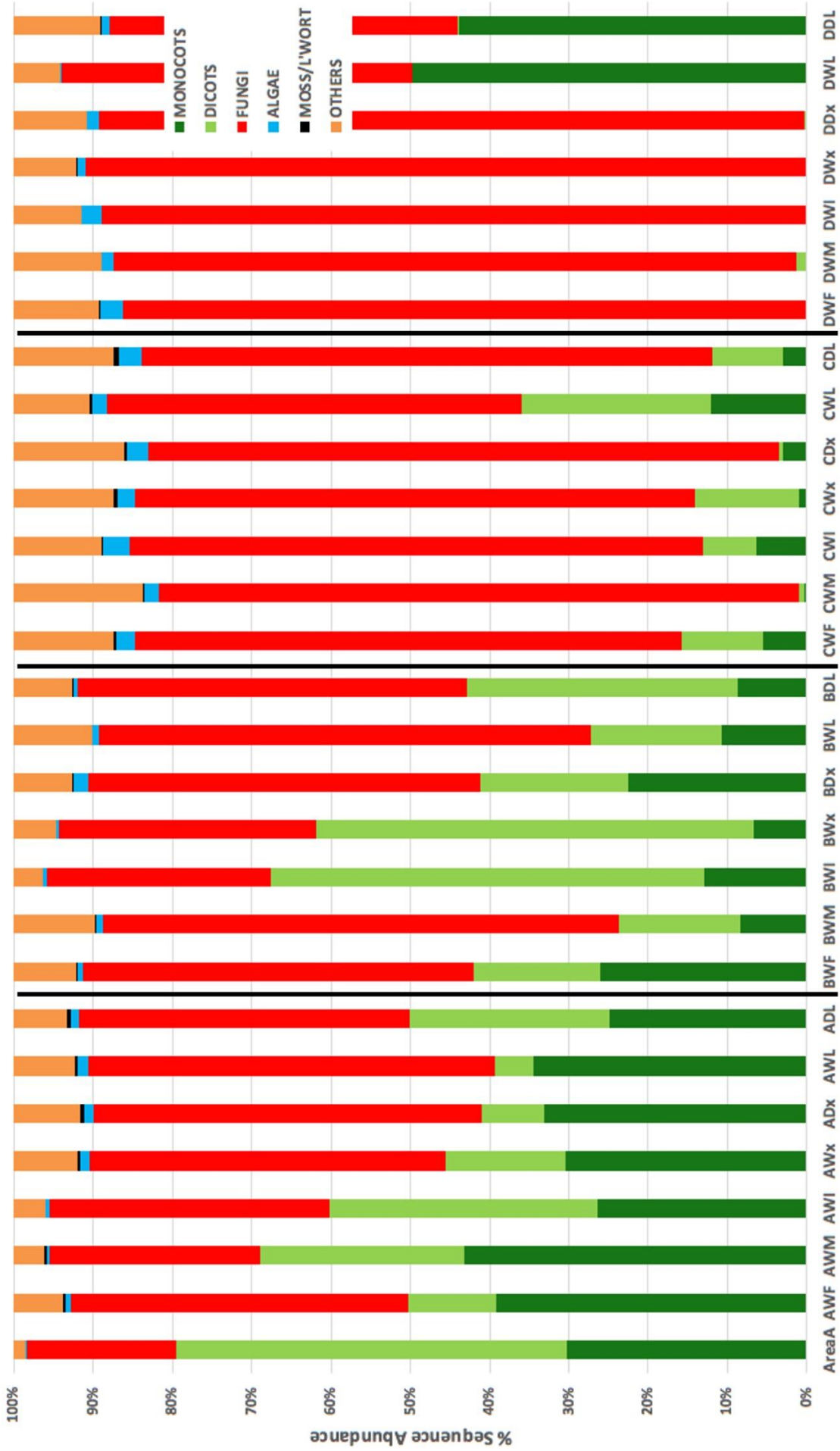
Ymgwymerwyd â metabarcodio DNA ar y 112 o samplau craidd a gymerwyd o'r 28 pot (7 triniaeth x 4 pot dyblyg) a'r pedwar o bwyntiau amser samplu (Gorffennaf 2018, Awst 2018, Tachwed 2018, Gorffennaf 2019), ac ar y sampl graidd a gymerwyd o Ardal A amser casglu'r tyweirch.

Methodd dwy sampl yn y cam dilyniannodi ond gweithiodd y 111 sampl arall yn dda. O'r 5.2 miliwn o ddilyniannau a gafwyd i gyd, pasiodd 4.6 miliwn y camau rheoli ansawdd (cymedr 41,524 fesul sampl [amrediad 7,020–173,968]). Neilltuwyd dilyniannau yn dacsonomaidd gan ddefnyddio RDP, sef ein cronfa ddata fewnol o ddilyniannau planhigion, a chronfeydd data UNITE (v8) o ddilyniannau ffyngau.

Ar gyfer mwyhau cod bar DNA ITS2 trwy broses PCR, defnyddiwyd cymysgedd o brimyddion, wedi'u cynllunio i fwyhau codau bar DNA planhigion a ffyngau. Yn gyffredinol, neilltuwyd 33.6% o ddilyniannau (amrediad 0.7–87.9%) i'r deyrnas Viridiplantae (planhigion), gyda'r gweddill yn perthyn i ffyngau a biota eraill (anifeiliaid [tua 0.03–1.3%], diatomau, protosoa, heb eu neilltuo ac ati). Mae neilltuo dilyniannau i wahanol fathau o blanhigion (monocotyledonau, deugibogion, mwsoglau / glysiau'r afu, algâu), ffyngau a biota eraill yn cael ei gyflwyno fel siart far wedi'i phentyrru (Ffig. 3.5).

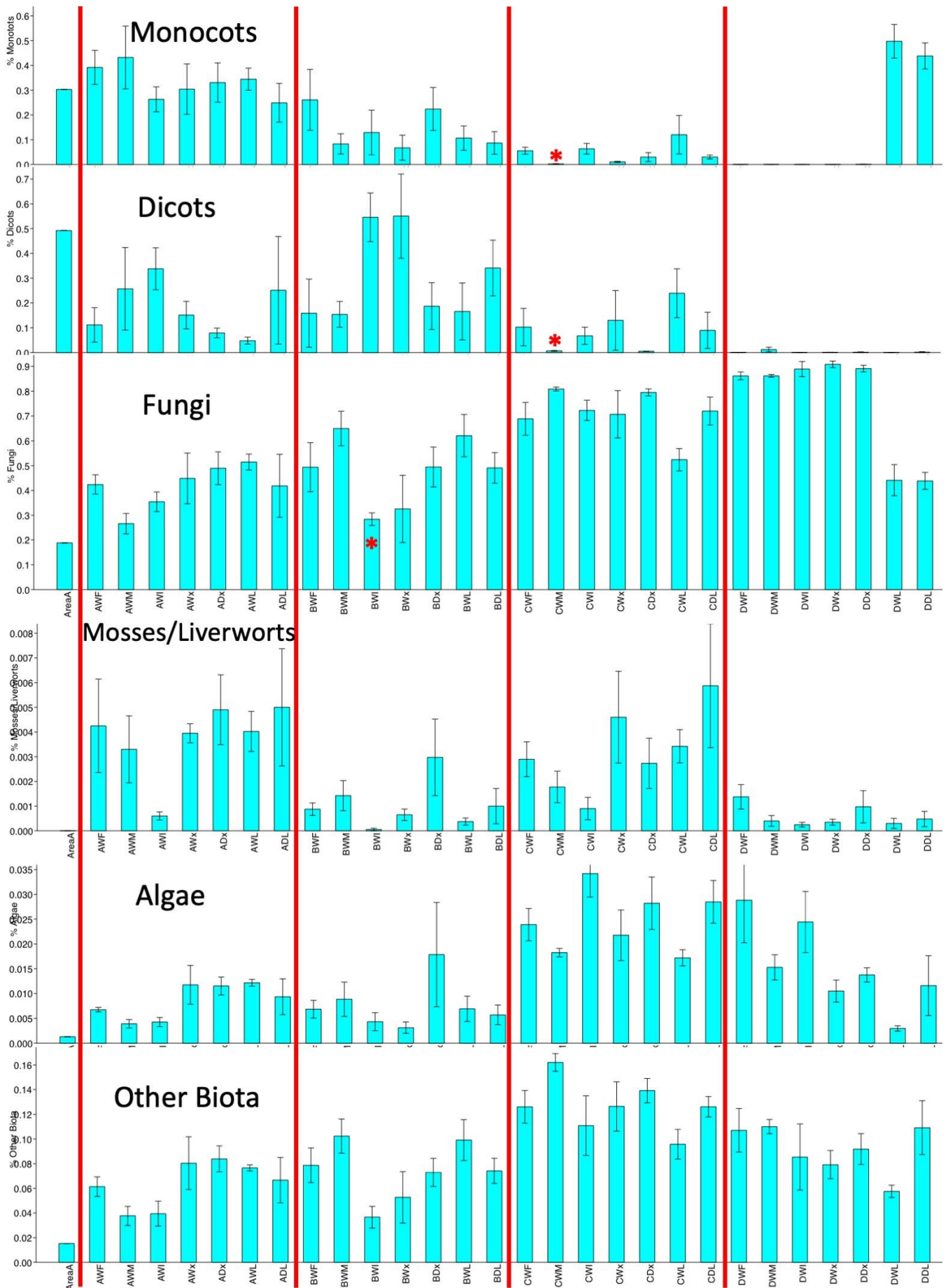
Yn ystod yr arbrawf, gostyngodd cyfran y dilyniannau a briodolwyd i blanhigion uwch (monocotyledonau/deugibogion), o tua 80% yn y priddoedd gwreiddiol i <1% ar ôl 12 mis, ac eithrio'r potiau wedu'u hadu â *Lolium* (triniaethau WL/DL), lle'r oedd 10–50% o ddilyniannau yn blanhigion (monocotyledonau yn bennaf), yn ôl y disgwyl (Ffig. 3.6). Mewn triniaethau eraill, bu gostyngiad i tua 50% yn y samplau sylfaenol (a gymerwyd deg diwrnod ar ôl i'r tyweirch gael eu casglu/homogeneiddio, pedwar diwrnod ar ôl i'r dyfrio ddechrau).

Gan y cafodd y samplau cychwynnol eu cymryd ar yr un pryd â chymhwyso'r trefniadau trin, nid oedd disgwyl unrhyw effaith gan y driniaeth. Er bod gwahaniaethau yn nhrefnwydd cymedrig yr amrywiol dacsonau yn amlwg, nid oes unrhyw effaith sylweddol gan y driniaeth oherwydd yr amrywiadau mawr rhwng y potiau dyblyg a welwyd (Ffig. 3.5, 3.6). Mae'n debygol bod yr amrywiadau hyn rhwng y potiau dyblyg yn sgil heterogenedd y pridd, hyd yn oed ar ôl rhwygo/cymysgu'r pridd ac ati, a'u bod hefyd yn ymwneud â maint bach y samplau a gymerwyd (pedwar craidd, pob un â phwysau ffres o tua 5 g). Disgwyliwyd y byddai'r tyweirch gwrthdro yn wahanol ar y cam hwn i'r triniaethau lle'r oedd y pridd wedi bod yn destun homogeneiddio, ond nid oedd hyn yn wir (ac eithrio bod canran gymedrig y deugibogion yn uwch). O'i gymharu â sampl sengl Ardal A (gan nodi bod hon o 36 o greiddiau cyfun a gymerwyd yn y cae), roedd toreithrwydd ffyngau o'u cymharu â phlanhigion uwch yn is yn Ardal A, sy'n awgrymu bod ffyngau wedi ymledu i ryw raddau yn ystod yr amser a aeth heibio rhwng homogeneiddio'r pridd a dechrau'r triniaethau. Byddai hyn i'w ddisgwyl gan fod homogeneiddio'r tyweirch wedi creu swm mawr o fomas planhigion marw y gallai ffyngau saprotroffig ei gytreffu'n gyflym.



**Fig. 3.5.** Stacked barchart showing the relative abundance of the main groups of plants and fungi (Including oomycetes) in the seven treatments across the four sampling timepoints.





**Fig. 3.6:** % sequence abundance of different taxa in the soils across different treatments and timepoints. Error bars indicate SE (n=4). Significant treatment effects are indicated by \*.

Adeg yr ail gynhaeaf, yr unig effaith sylweddol gan y driniaeth oedd y lleihad mewn toreithrwydd cymharol ffyngau yn y tyweirch gwrthdro (BWI; K-W P = 0.027; Ffig. 3.6). Adeg y trydydd cynhaeaf, roedd toreithrwydd is o fonocotyledonau a deugibogion yn y potiau oedd wedi cael eu trin â chalch (BWM; K-W P = 0.023). Erbyn y cynhaeaf terfynol (Gorffennaf 2019), roedd toreithrwydd dilyniannau planhigion uwch yn isel iawn, ac eithrio monocotyledonau yn y potiau a heuwyd â *Lolium*. Datgelodd archwiliad o'r rhywogaethau a oedd yn bresennol yn y potiau hyn mai *Lolium* oedd y rhywogaeth fwyaf toreithiog yn y triniaethau hyn (DWL, DDL), ond bod gweiriau eraill yn bresennol hefyd (*Holcus lanatus* yn bennaf ond hefyd *Poa trivialis*, *Anthoxanthum odoratum* ac *Agrostis capillaris*). Y rheswm tebygol am hyn yw eu bod wedi ailgyfnewid o hadau neu goesynnau o'r tyweirch gwreiddiol, ac efallai eu bod yn fwy toreithiog o ganlyniad i eginiaid gwael y *Lolium* a heuwyd yn wreiddiol.

Cofnodir cyfanswm o 47 o rywogaethau planhigion o safle maes Ardal A (Tabl 3.1). O'r rhain, canfuwyd 23 mewn DNA amgylcheddol o Ardal A. Dim ond mewn DNA amgylcheddol y canfuwyd rhai rhywogaethau ychwanegol (tair rhywogaeth *Poa* [yn debygol o fod yn anodd eu hadnabod dan amodau maes], *Crepis capillaris* a sawl mwsogl) (Tabl 3.3). Fodd bynnag, yn achos y mwsoglau, mae statws codau bar DNA ar ei hôl hi o'i gymharu â statws planhigion uwch, felly dylid bod yn ofalus wrth drin yr enwau hyn. Canfuwyd tair rhywogaeth annisgwyl (*Castanea sativa*, *Fagus sylvaticus* a *Heliconia bihai*) ar lefelau isel mewn sawl sampl (ond nid Ardal A a'r tyweirch gwrthdro). Mae'r tair rhywogaeth hyn yn bresennol ger yr ardal lle cafodd y pridd ei homogoneiddio (dwy goeden fawr ac *H. bihai* yn doreithiog yn y tŷ gwydr [trofannol] cyfagos), felly mae eu presenoldeb yn debygol o fod yn sgil halogi yn ystod y broses o homogoneiddio'r pridd.

Ni ddatgelodd ddisbarthiad o brif gyfesurynnau'r cymunedau planhigion (gan gynnwys dim ond y rhywogaethau planhigion uwch a restrir yn Nhabl 3.3) unrhyw wahaniaeth clir rhwng unrhyw driniaethau neu bwyntiau amser (Ffig. 3.7). Roedd rhai clystyrau o bwyntiau ar gyfer samplau dyblyg yn amlwg, er enghraifft y potiau DWL/DDL a heuwyd â *Lolium* yn y pedrant ar y dde ar waelod y dosbarthiad, ond byddai patrymau o'r fath i'w disgwyl o ystyried bod y triniaethau WL/DL yn cynnwys niferoedd mawr o weiriau. Nid oedd tynnu'r gweiriau cyn dosbarthu yn datgelu unrhyw batrymau dosbarthu cliriach (Ffig. 3.7B). Ni ddatgelodd dadansoddiadau ystadegol o'r setiau data hyn gan ddefnyddio PERMANOVA unrhyw wahaniaethau sylweddol rhwng triniaethau.

Cadarnhaodd archwiliad o doreithrwydd pedair o'r 15 rhywogaeth nad oeddent yn weiriau (Ffig. 3.8) arsylwadau cynharach fod llawer iawn o amrywiaeth o fewn y triniaethau ac nad oedd unrhyw effeithiau triniaeth cyson yn bresennol ar draws y gyfres o samplau pridd ond bod gostyngiad cyffredinol yn niferoedd yr holl rywogaethau o lysiau dros amser.

Gan nad oedd llawer o dystiolaeth o unrhyw effaith gan y triniaethau (ac eithrio canfod y gweiriau a heuwyd yn y triniaethau DL/WL), archwiliwyd toreithrwydd cymharol y 26 o rywogaethau planhigion uwch a ganfuwyd ar draws pob un o'r pum triniaeth pridd moel (heb eu hadu) (Ffig. 3.9). Ar gyfer pob rhywogaeth, mae gostyngiad yn nifer y dilyniannau canrannol mewn samplau olynol. O ran nifer y rhywogaethau a ganfuwyd (h.y. presenoldeb neu absenoldeb), mae gostyngiad graddol yn nifer y 26 rhywogaeth

a ganfyddir gydag amser. Ar ôl 12 mis, mae 16 rhywogaeth yn dal i gael eu canfod, er mai mewn niferoedd isel.

Archwiliwyd yn fanwl hefyd nifer y potiau o'r pum triniaeth pridd moel (cyfanswm o 20 pot) lle canfuwyd pob un o'r rhywogaethau (Ffig. 3.10; Ffig. 3.11). Yma hefyd gwelir gostyngiad graddol ac, erbyn y pwynt samplu terfynol o 12 mis, dim ond mewn un i dri o'r 20 pot y mae'r rhan fwyaf o'r rhywogaethau sy'n dal i gael eu canfod i'w cael.

**Table 3.3:** Comparison of species detected in AreaA by vegetation surveying compared to those species detected via eDNA

Group	Species	AreaA	eDNA	Notes
Graminoids	<i>Agrostis canina</i>		1	( <i>Agrostis stolonifera/canina</i> )
Graminoids	<i>Agrostis capillaris</i>	1	1	( <i>Agrostis capillaris/gigantea</i> )
Graminoids	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	1	1	
Graminoids	<i>Bromus hordaceaeus</i>	1		
Graminoids	<i>Cynosurus cristatus</i>	1	1	
Graminoids	<i>Dactylis glomerata</i>	1	1	
Graminoids	<i>Deschampsia flexuosa</i>	1		
Graminoids	<i>Festuca ovina</i>	1	1	
Graminoids	<i>Festuca rubra</i>	1	1	
Graminoids	<i>Holcus lanatus</i>	1	1	( <i>Holcus lanatus/mollis</i> )
Graminoids	<i>Holcus mollis</i>	1		*****see above
Graminoids	<i>Juncus effusus</i>	1		
Graminoids	<i>Lolium perenne</i>	1	1	( <i>Lolium perenne/multiflorum</i> )
Graminoids	<i>Luzula campestris</i>	1	1	
Graminoids	<i>Poa annua</i>	1		
Graminoids	<i>Poa nemoralis/compressa</i>		1	
Graminoids	<i>Poa pratensis</i>	1		
Graminoids	<i>Poa trivialis</i>		1	
Forbs	<i>Achillea millefolia</i>	1		
Forbs	<i>Bellis perennis</i>	1		
Forbs	<i>Cardamine pratensis</i>	1	1	
Forbs	<i>Cerastium fontanum</i>	1	1	
Forbs	<i>Cirsium palustre</i>	1		
Forbs	<i>Crepis capillaris</i>		1	
Forbs	<i>Heracleum sphondylium</i>	1		
Forbs	<i>Hyacinthoides non-scripta</i>	1		
Forbs	<i>Hypochaeris radicans</i>	1	1	
Forbs	<i>Lathyrus pratensis</i>	1		
Forbs	<i>Leontodon autumnalis</i>	1		
Forbs	<i>Leucanthemum vulgare</i>	1		
Forbs	<i>Lotus corniculatus</i>	1		
Forbs	<i>Lotus uliginosus</i>	1		
Forbs	<i>Plantago lanceolata</i>	1	1	
Forbs	<i>Potentilla anserina</i>	1		
Forbs	<i>Potentilla erecta</i>	1		
Forbs	<i>Prunella vulgaris</i>	1	1	
Forbs	<i>Ranunculus acris</i>	1	1	( <i>Ranunculus acris/occidentalis</i> )
Forbs	<i>Ranunculus ficaria</i>	1		
Forbs	<i>Ranunculus repens</i>	1	1	( <i>Ranunculus bulbosus/repens</i> )
Forbs	<i>Rhinanthus minor</i>	1		
Forbs	<i>Rumex acetosa</i>	1	1	
Forbs	<i>Rumex obtusifolius</i>	1	1	
Forbs	<i>Taraxacum spp.</i>	1	1	
Forbs	<i>Trifolium dubium</i>	1		
Forbs	<i>Trifolium pratense</i>	1	1	
Forbs	<i>Trifolium repens</i>	1	1	( <i>Trifolium repens/nigrum</i> )
Forbs	<i>Veronica chamaedrys</i>	1		
Forbs	<i>Veronica serpyllifolia</i>	1	1	
Ferns	<i>Pteridium aquilinum</i>	1		
Bryophytes	<i>Pleurozium schreberi</i>	1		
Bryophytes	<i>Rhytidiadelphus squarrosus</i>	1	1	
Bryophytes	<i>Didymodon sinuosus</i>		1	Pottiaceae
Bryophytes	<i>Kindbergia praelonga</i>		1	Brachytheciaceae
Bryophytes	OTU 1320		1	Pottiales
Bryophytes	<i>Tortula mucronifolia</i>		1	Pottiaceae
Bryophytes	<i>Brachythecium rivulare</i>		1	Brachytheciaceae
<b>SPECIES TOTALS</b>		<b>47</b>	<b>32</b>	

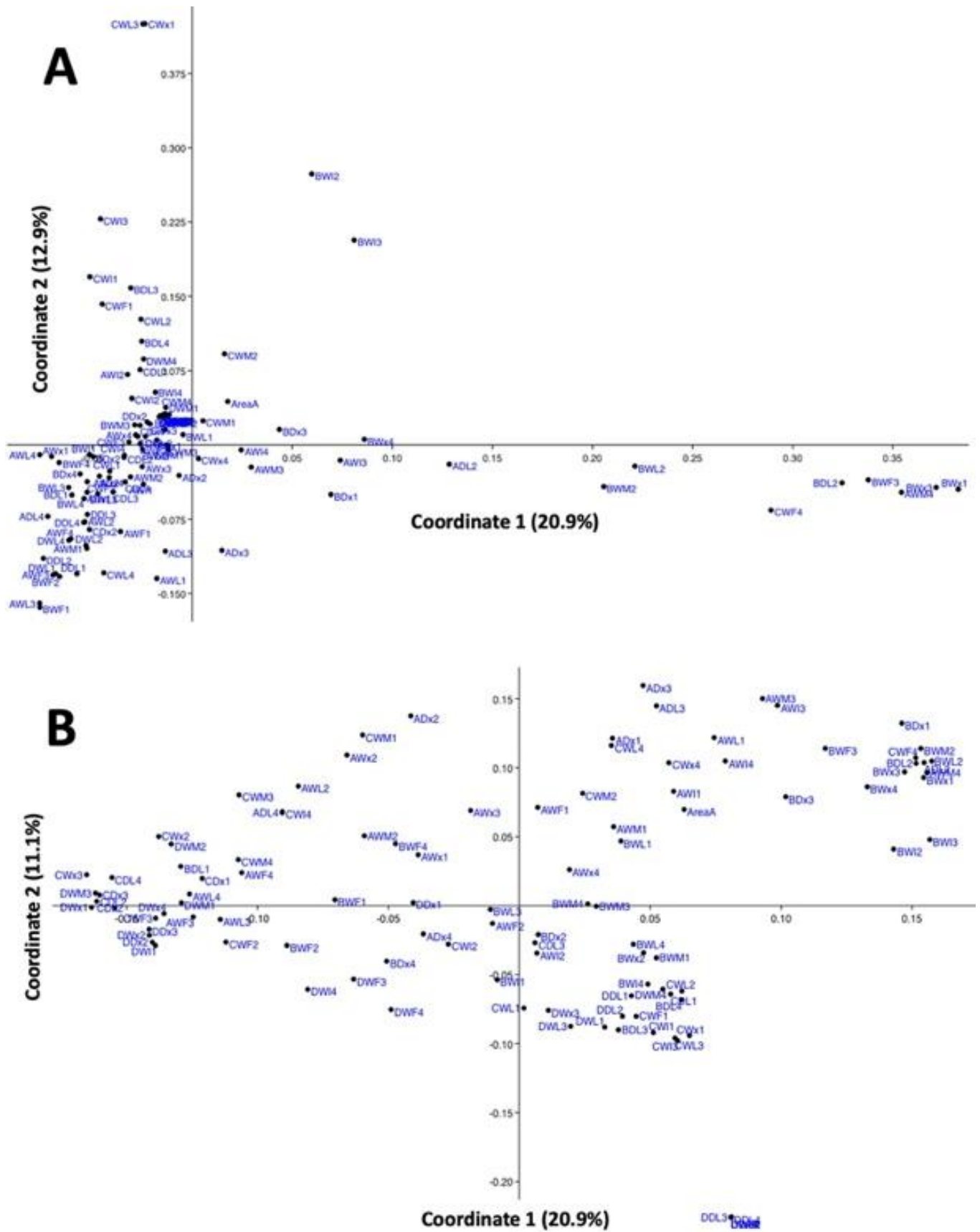
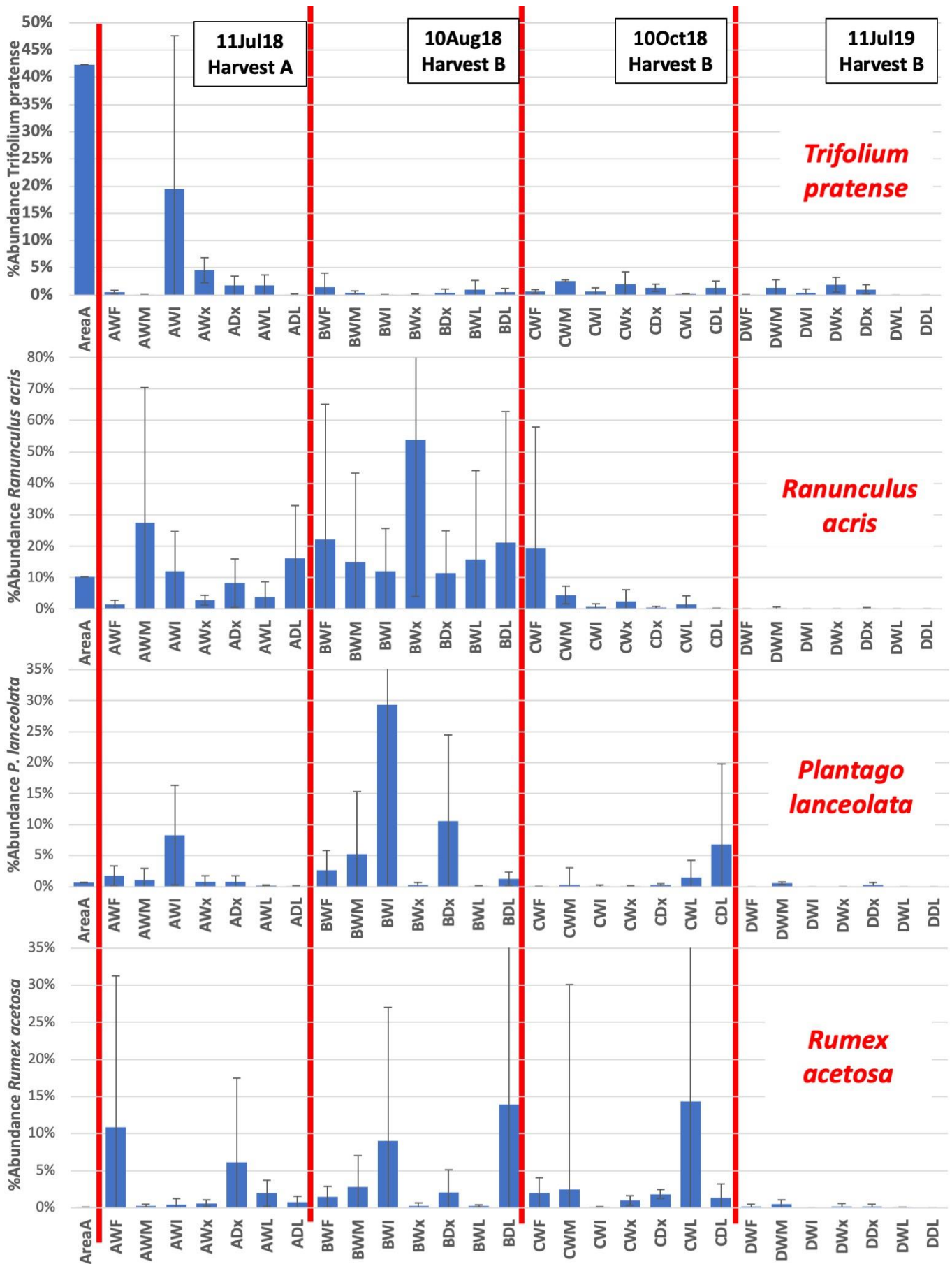
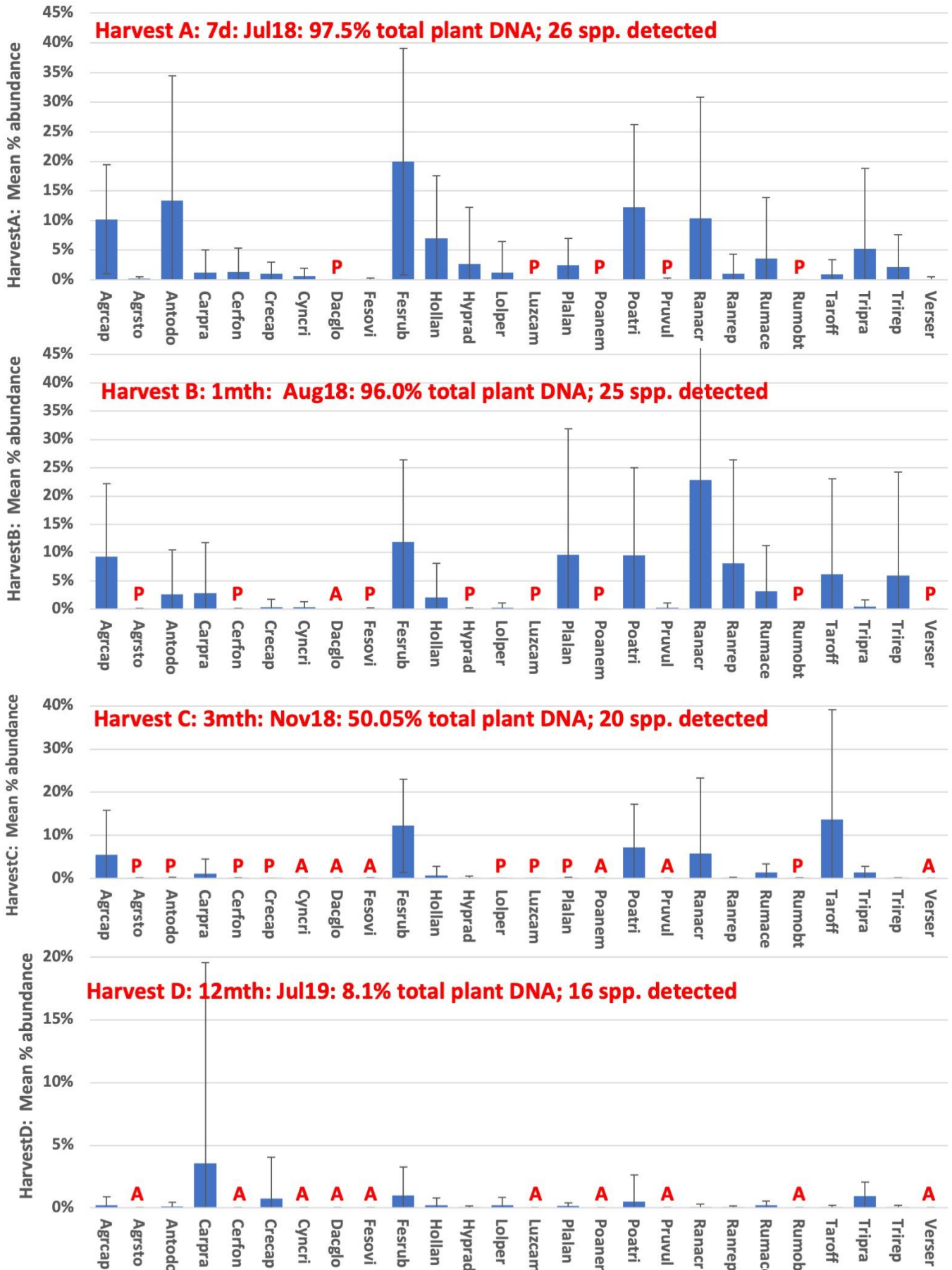


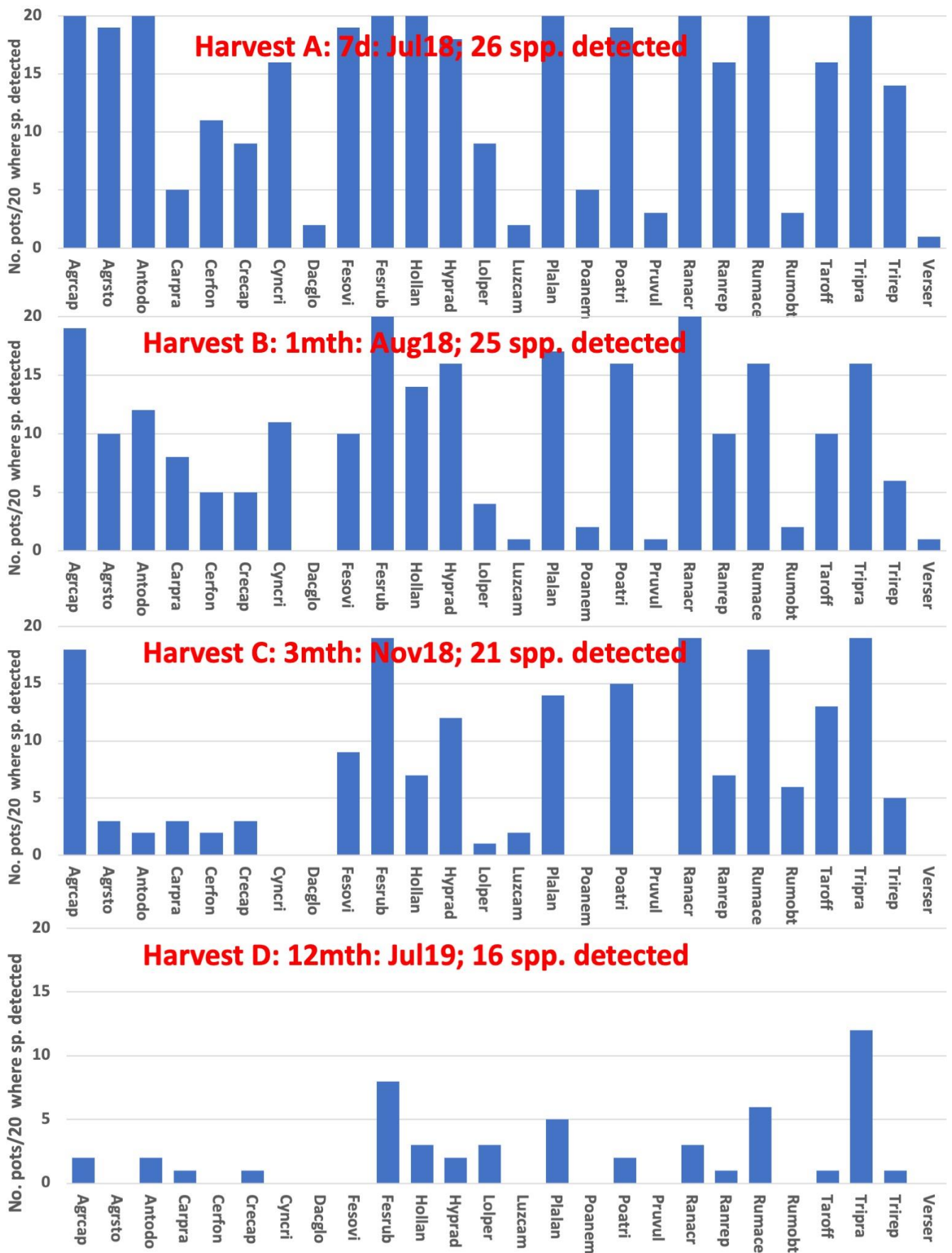
Fig. 3.7: A) Principal coordinates ordination of (A) higher plant populations (grasses + herbs; 26 spp.) and (B) herb populations alone (incl. *Luzula*; 15 spp.)



**Fig. 3.8:** % sequence abundance of four common herb species in the soils. Error bars indicate SD (n=4).

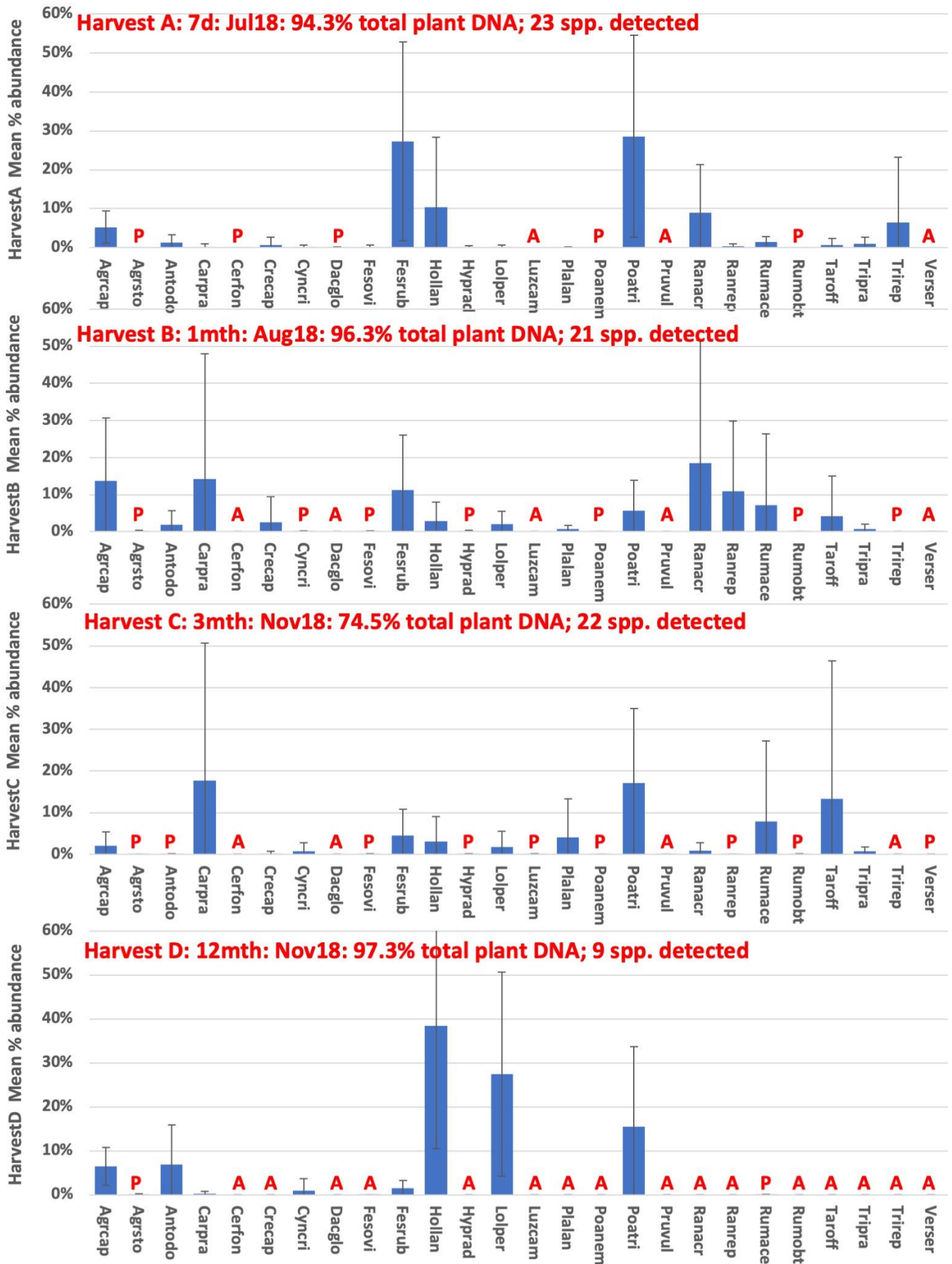


**Fig. 3.9:** Mean percentage abundance (as % of total plant DNA; incl. lower plants) at each harvest timepoint of each of the 26 higher plant detected as eDNA within the pot experiment soils averaged across **five treatments (excluding those pots sown with *Lolium*)**. Where bars are small 'A' indicates the species was absent (no DNA detected) and 'P' indicates present. Bars indicate standard deviation (n=20)



**Fig. 3.10:** Number of pots (/20) in which each 26 higher plant species was detected at each harvest timepoint. Includes only the five bare soil treatments (pots sown with *Lolium* were excluded).





**Fig. 3.11:** Mean percentage abundance (as % of total plant DNA; incl. lower plants) at each harvest timepoint of each of the 26 higher plant detected as eDNA within the pot experiment soils averaged across **ONLY** the two *Lolium*-seeded treatments. Where bars are small 'A' indicates the species was absent (no DNA detected) and 'P' indicates present. Bars indicate standard deviation (n=20)

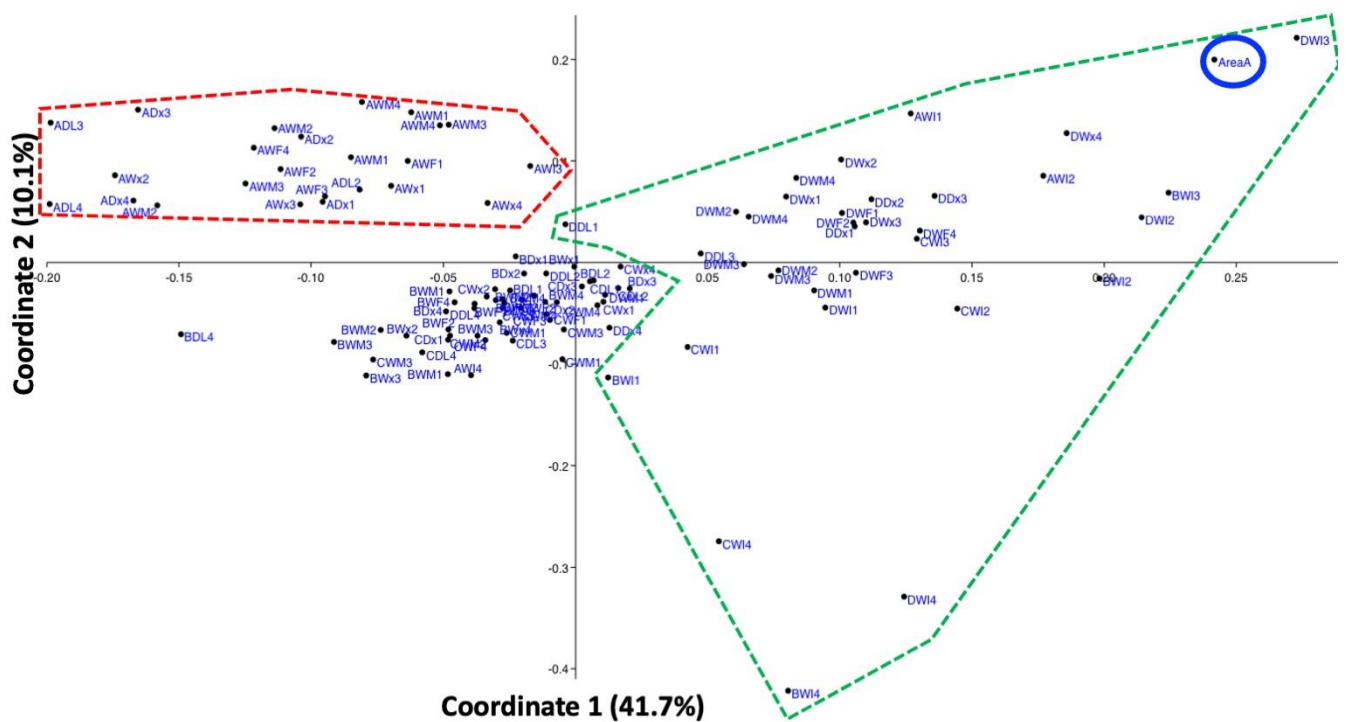
## Metabarcodio DNA: ffyngau

Prif ffocws yr astudiaeth hon oedd tynged DNA amgylcheddol planhigion, ond buom hefyd yn ymchwilio i newidiadau mewn poblogaethau ffyngau yn ystod yr arbrawf potiau. Dangosodd dosbarthiad o'r prif gyfesurynnau (PCO) ar gyfer newidiadau yn y cymunedau ffyngau yn y priddoedd pot batrwm newid ychydig yn gliriach dros amser (Ffig. 3.12) o'i gymharu â phatrwm DNA amgylcheddol y planhigion (Ffig. 3.7).

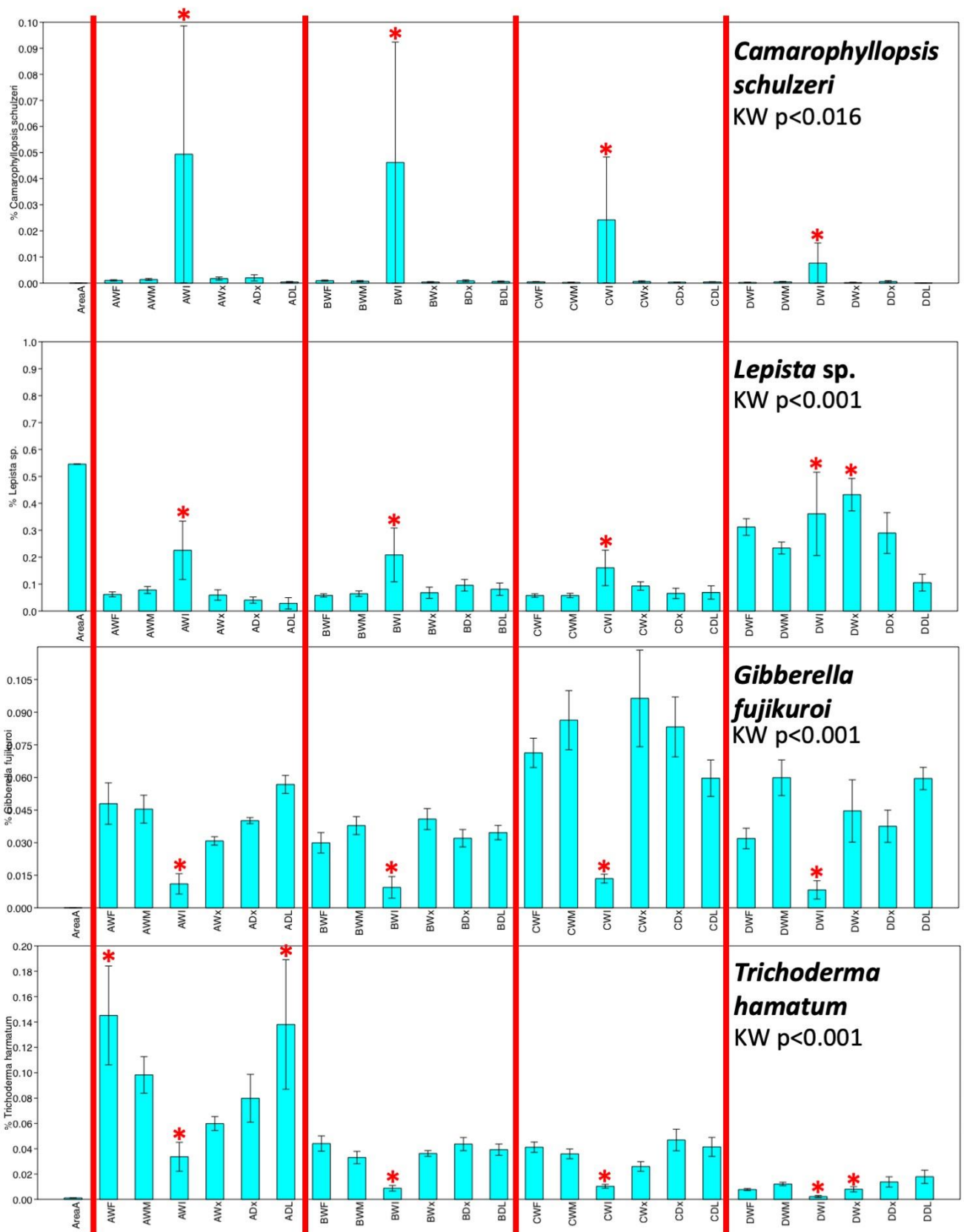
Ar lefel rhywogaethau unigol, roedd y pedair rhywogaeth fwyaf niferus a ganfuwyd (ar draws yr holl samplau) yn dangos patrymau diddordol. Ar gyfer dwy rywogaeth o fasidiomysetau, roedd lefelau DNA amgylcheddol yn sylweddol uwch yn y tyweirch gwrthdro (cyflawn) (Ffig. 3.13) o'u cymharu â'r triniaethau eraill, sy'n gyson â'r ffaith bod y ffyngau hyn yn ffurfio rhwydweithiau myseliol hirhoedlog mawr (ar raddfa o sawl metr) a fyddai'n cael eu difrodi pe bai'r pridd yn cael ei droi. Er enghraifft, mae *Camarophyllopsis schulzeri* yn aelod o'r grŵp CHEGD o ffyngau sy'n nodweddiadol o laswelltir heb ei droi sy'n brin o faethynnau (mae capiau cwyr hefyd yn perthyn i'r grŵp hwn) ac a welwyd yn bennaf yn y driniaeth tyweirch gwrthdro ond a ddangosodd batrwm o ddirywiad yn ystod yr arbrawf. Amheuir bod ffyngau CHEGD yn fycorhisol gyda gweiriau a pherlysiau (Halbwachs ac eraill, 2018), felly byddai disgwyl i absenoldeb unrhyw blanhigion i gysylltu â nhw arwain at ddirywiad cynyddol. Gwelwyd patrwm tebyg iawn ar gyfer y rhan fwyaf o'r ffyngau CHEGD eraill a ganfuwyd yn y priddoedd hyn (data heb eu dangos). Mae rhywogaeth *Lepista* (coes las), y ffwng mwyaf toreithiog sy'n bresennol yn y priddoedd ar draws pob triniaeth, yn fasidiomyset arall sy'n ffurfio cylchoedd tylwyth teg ond, yn wahanol i ffyngau CHEGD, mae'n ffwng saprotroffig daeardrig (ffwng sy'n diraddio sbwriel planhigion yn y pridd). Parhaodd y rhywogaeth hon ar lefelau uwch yn y tyweirch gwrthdro, ond dangosodd adferiad yn y triniaethau lle amharwyd ar y pridd erbyn y cynhaeaf olaf.

Roedd dosbarthiad yr ail a'r pedwerydd ffwng mwyaf toreithiog o'r ffyngau a ganfuwyd yn y pridd yn y potiau (ond prin y canfuwyd y ddau yn sampl wreiddiol Ardal A), *Trichoderma hamatum* a *Gibberella fujikuroi* yn y drefn honno (y ddau yn ffyngau asgomysetau), yn wahanol iawn, gyda niferoedd isel yn unig yn y tyweirch gwrthdro a niferoedd llawer uwch yn y priddoedd yr amharwyd arnynt. Mae'r ddwy rywogaeth yn bathogenau necrotroffig o ffyngau a phlanhigion, yn y drefn honno, sy'n tyfu'n gyflym. Mae'n debyg bod *T. hamatum* yn ymosod ar hyffâu amharedig rhywogaeth *Lepista* yn y cynhaeaf cychwynnol (A), gan ostwng dros amser wrth i'r nifer o ffyngau lletyol addas leihau, tra oedd *G. fujikuroi* yn amlhau trwy ymosod ar feinweoedd planhigion gwan/marw.

Gyda'i gilydd, rhoddodd dosbarthiad y ddau bâr hyn o ffyngau (gyda phatrymau tebyg yn cael eu harddangos gan rywogaethau cysylltiedig) fewnwelediad defnyddiol i'r prosesau a ddigwyddodd yng ngwahanol driniaethau'r potiau, yn enwedig mewn perthynas ag aflonyddwch pridd.



**Fig. 3.12:** Principal coordinates ordination of fungal populations over the course of the pot experiment. Most of the samples from the baseline harvest (A; red dotted polygon) ordinated together, as do most of the samples from the last harvest (D; green dotted polygon).



**Fig. 3.13:** Mean percentage abundance (as % of total fungal DNA) at each harvest timepoint of the four most abundant fungi detected in the pot experiment soils. Error bars indicate SE (n=4). Significant treatment effects are indicated by \*.

## **4) Profi gwahanol ddulliau samplu a storio pridd**

Hyd yn hyn wrth ddefnyddio dulliau DNA amgylcheddol ar gyfer dadansoddi pridd, rydym naill ai wedi samplu pridd ein hunain gan ddefnyddio ein system creiddio pridd grid 6 x 6 safonol, ac wedi cludo'r samplau yn ôl i Aberystwyth ar yr un diwrnod mewn blwch oeri, neu rydym wedi derbyn samplau wedi'u rhewi trwy gludwyr dros nos. Yn ein profiad ni, mae samplau wedi'u rhewi a anfonwyd wedi'u lapio mewn paciau swigod yn parhau i fod wedi'u rhewi'n dda wrth iddynt gael eu cludo.

Fodd bynnag, mae samplu pridd safonol fel y mae LIC yn ei wneud yn cynnwys samplu mewn modd igam-ogam ar draws cae (samplu W) sy'n cwmpasu ardal fwy, ac efallai na fydd data samplau pridd sy'n deillio o ddefnyddio'r dull hwn yn uniongyrchol gymharol â samplau a gasglwyd gan ddefnyddio'r dull grid.

Yn ogystal, mae'r gofyniad i'r casglwr pridd rewi samplau yn ychwanegu cymhlethdod logistaidd ychwanegol at y broses, er enghraifft os yw'r gofod storio yn gyfyngedig neu os cesglir cyfres o samplau dros gyfnod o sawl diwrnod o waith maes. Felly, fe wnaethom gynnal arbrawf i ganfod effaith ystod o ddulliau samplu a storio pridd cyferbyniol ar ganlyniadau metabarcodio DNA canlyniadol.

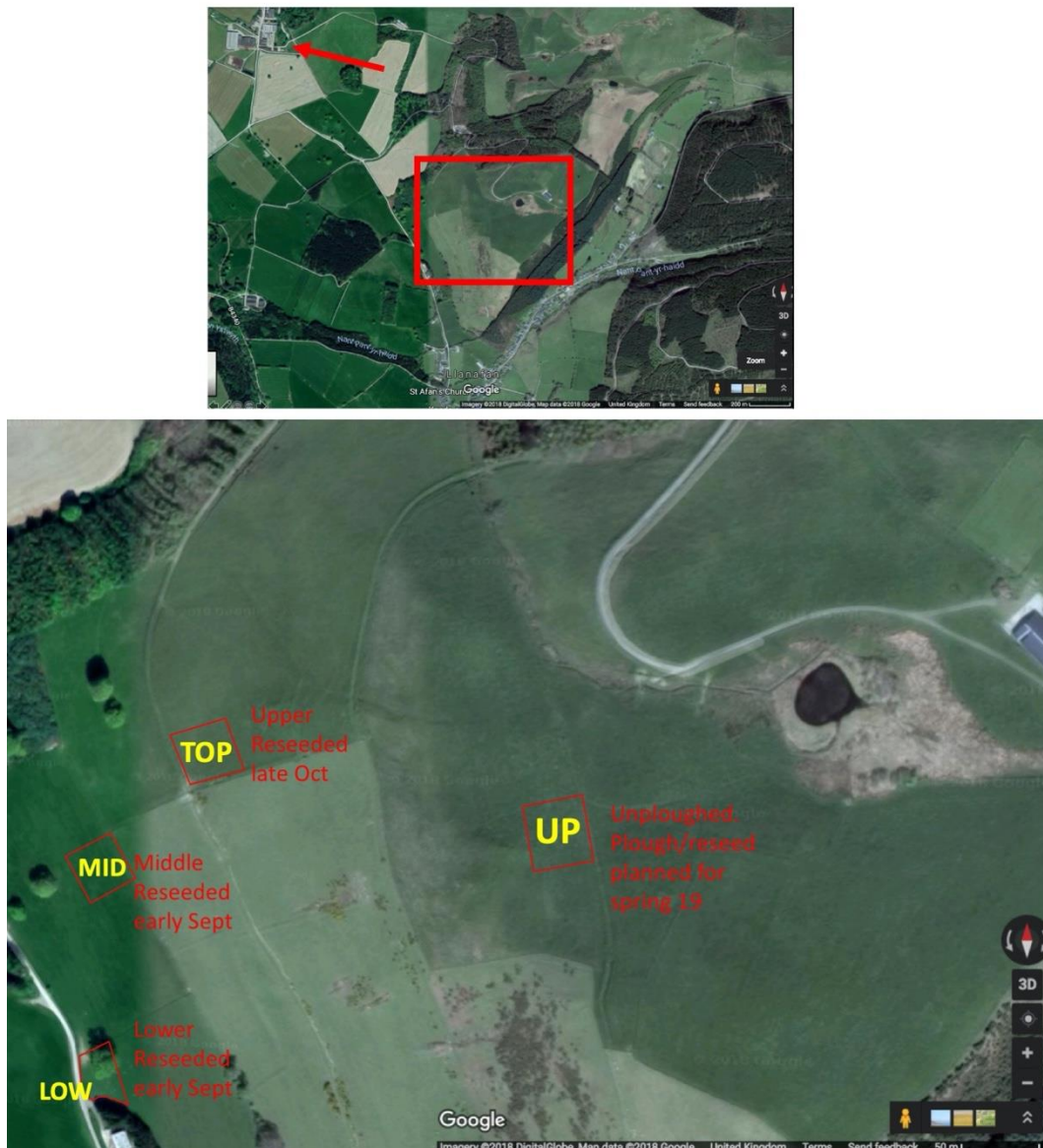
Casglwyd pridd o bedwar cae yn Fferm Prifysgol Aberystwyth Trawsgoed (14 Tachwedd 2018), gyda'r nod o gymharu gwahaniaethau rhwng dau gasglwr gwahanol (GWG a LAC) a rhwng dulliau samplu gwahanol (dull grid yn erbyn trawslun W). Roedd pob un o'r pedwar cae wedi'i wella'n fawr ac wedi'i ddominyddu gan *L. perenne*, ond roedd tri o'r caeau (â'r labelau Uchaf/Canol/Isaf) wedi'u hailhadu'n ddiweddar (Medi/Hydref 2018; Ffig. 4.1; 4.2) yn dilyn aredig/ogedu yn gynharach yr haf hwnnw. Roedd aredig ac ailhadu wedi'u trefnu ar gyfer y pedwerydd cae (UP) yng ngwanwyn 2019.

Gosodwyd cwadrat 30 x 30 m ym mhob un o'r pedwar cae a chasglwyd creiddiau pridd yn unol â'n gweithdrefn safonol mewn grid 5 x 5 m (36 craidd). Yn y pedwerydd cae (UP), samplwyd y cwadrat deirgwaith, dwywaith gan ddefnyddio'r dull grid gan bobl wahanol (GWG/LAC) ac yna eto gan ddefnyddio dull trawslun W. Yn ogystal, samplwyd y cwadrat UP am y pedwerydd tro, gan ddefnyddio dull samplu mwy dwys (cymerwyd creiddiau ar grid tua 2 x 2 m er mwyn cael tua 2.5 kg o bridd ar gyfer yr arbrawf storio (roedd gan y pridd hwn pH o 4.86 a dargludedd trydanol o 278  $\mu$ S).

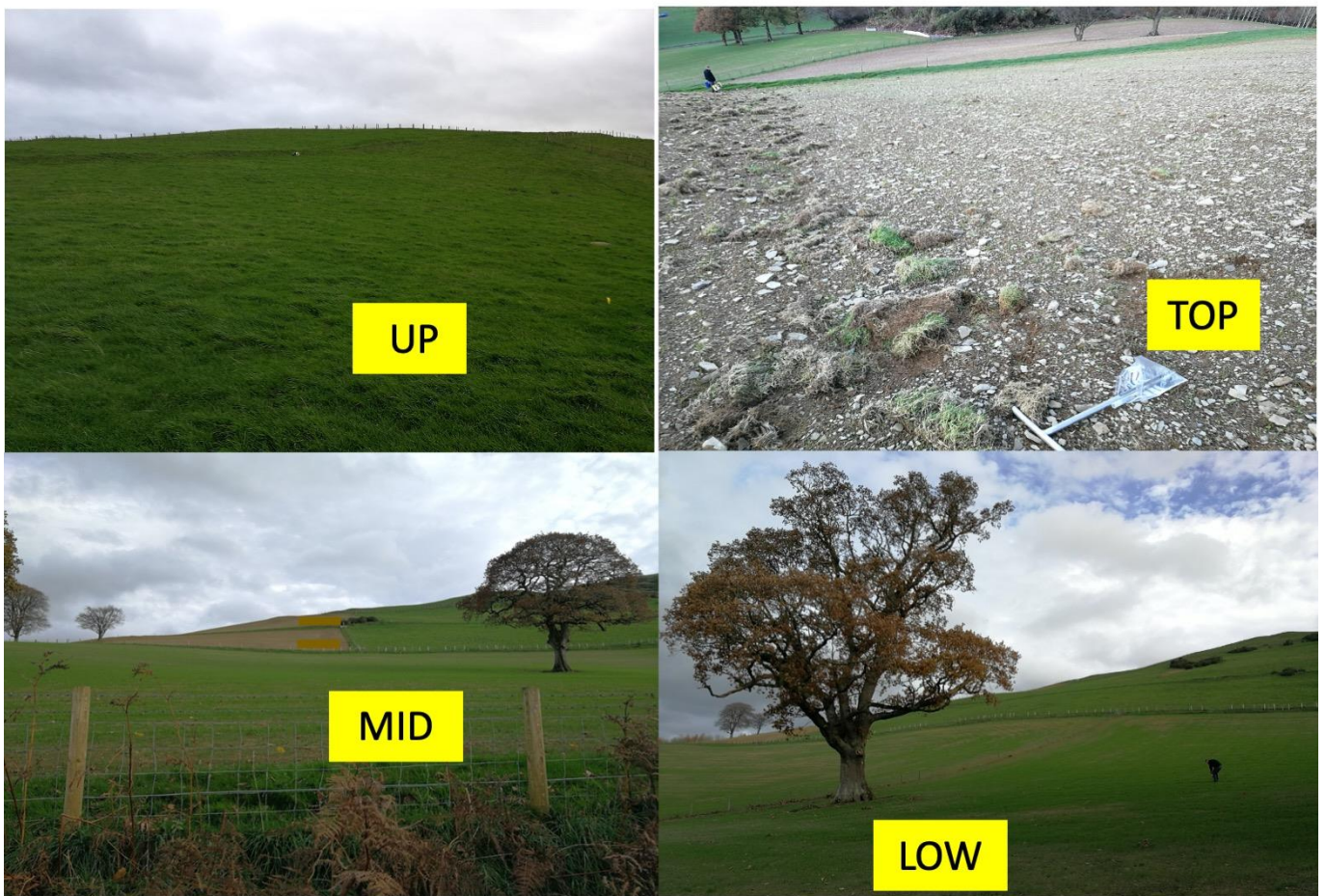
Ar ôl eu casglu, cafodd yr holl samplau ac eithrio'r 3 kg o bridd ar gyfer yr arbrawf storio eu rhewi, eu sychrewi a'u prosesu fel y disgrifir uchod (2). Ar gyfer yr arbrawf storio, cafodd y pridd ei hidlo'n fras i 5 mm a'i gymysgu'n drylwyr, yn syth ar ôl ei gasglu. Storiwyd is-samplau o'r pridd cymysg (200 g) o dan amrywiaeth o amodau cyn eu rhewi ar  $-80^{\circ}\text{C}$  (Tabl 4.1; Ffig. 4.4 A, B, C). Yna cafodd yr holl samplau eu sychrewi a'u malu'n fân ac roeddent yn destun echdynnu DNA yn yr un modd â samplau eraill a ddisgrifir uchod.

**Tabl 4.1:** Amodau storio ar gyfer samplau pridd

Code	Container	Storage Regime			Final Steps	
FZ-80	Sealed ziplock bag	Freeze at -80°C	—	Continuous -80°C freezing	Freeze at -80°C	Freeze-dry
FT14dFR	Sealed ziplock bag	Freeze -20°C overnight	Thaw	14 days in 4°C fridge	Freeze at -80°C	Freeze-dry
FT5dFR	Sealed ziplock bag	Freeze -20°C overnight	Thaw	5 days in 4°C fridge	Freeze at -80°C	Freeze-dry
FT14dRT	Open tray	Freeze -20°C overnight	Thaw	14 days at room temp	Freeze at -80°C	Freeze-dry
FT5dRT	Open tray	Freeze -20°C overnight	Thaw	5 days at room temp	Freeze at -80°C	Freeze-dry
O5dRT	Open tray	No freezing	—	5 days at room temp	Freeze at -80°C	Freeze-dry
O5d37C	Open tray	No freezing	—	5 days on 37°C air-dryer	Freeze at -80°C	Freeze-dry
S14dFR	Sealed ziplock bag	No freezing	—	14 days in 4°C fridge	Freeze at -80°C	Freeze-dry
S14dRT	Sealed ziplock bag	No freezing	—	14 days at room temp	Freeze at -80°C	Freeze-dry
S5dRT	Sealed ziplock bag	No freezing	—	5 days at room temp	Freeze at -80°C	Freeze-dry



**Fig. 4.1.** Map of Tawskoed Farm (A) showing the main farm buildings (arrowed) and the study area. The study area (B) comprised four field, three of which had been ploughed and reseeded a few months (Top, Mid, Low) prior to sampling and the fourth scheduled for reseeding in the following spring.



**Fig. 4.2.** Images of the four field sampled at Tawascoed Farm.

#### **4A) Effaith gwahanol ddulliau samplu pridd**

Roedd cymhariaeth o'r tair sampl a gymerwyd o'r un cwadrat (UP) gan ddau samplwr gwahanol, yn defnyddio'r dull grid (UP-GWG/UP-LAC) neu'r dull trawslun W (UP-W), yn dangos mai sampl UP-W oedd yr allanolyn yn y set pan oedd y data'n destun dosbarthiad o'r prif gyfesurynnau (PCO), a bod ganddi hefyd ychydig yn llai o rywogaethau na'r ddwy sampl o bridd a oedd yn destun dull grid (12 yn erbyn 13) (Tabl 4.2; Ffig. 4.3). Mae'n debygol bod y gwahaniaeth hwn oherwydd y ffaith bod cyfanswm y pridd a gasglwyd gan y dull trawslun W yn is (25 craidd; 496 g) nag ar gyfer y dull grid (36 craidd; 697 g / 860 g).

#### **4B) Cymhariaeth o'r pedwar cae yn Nhrawsgoed**

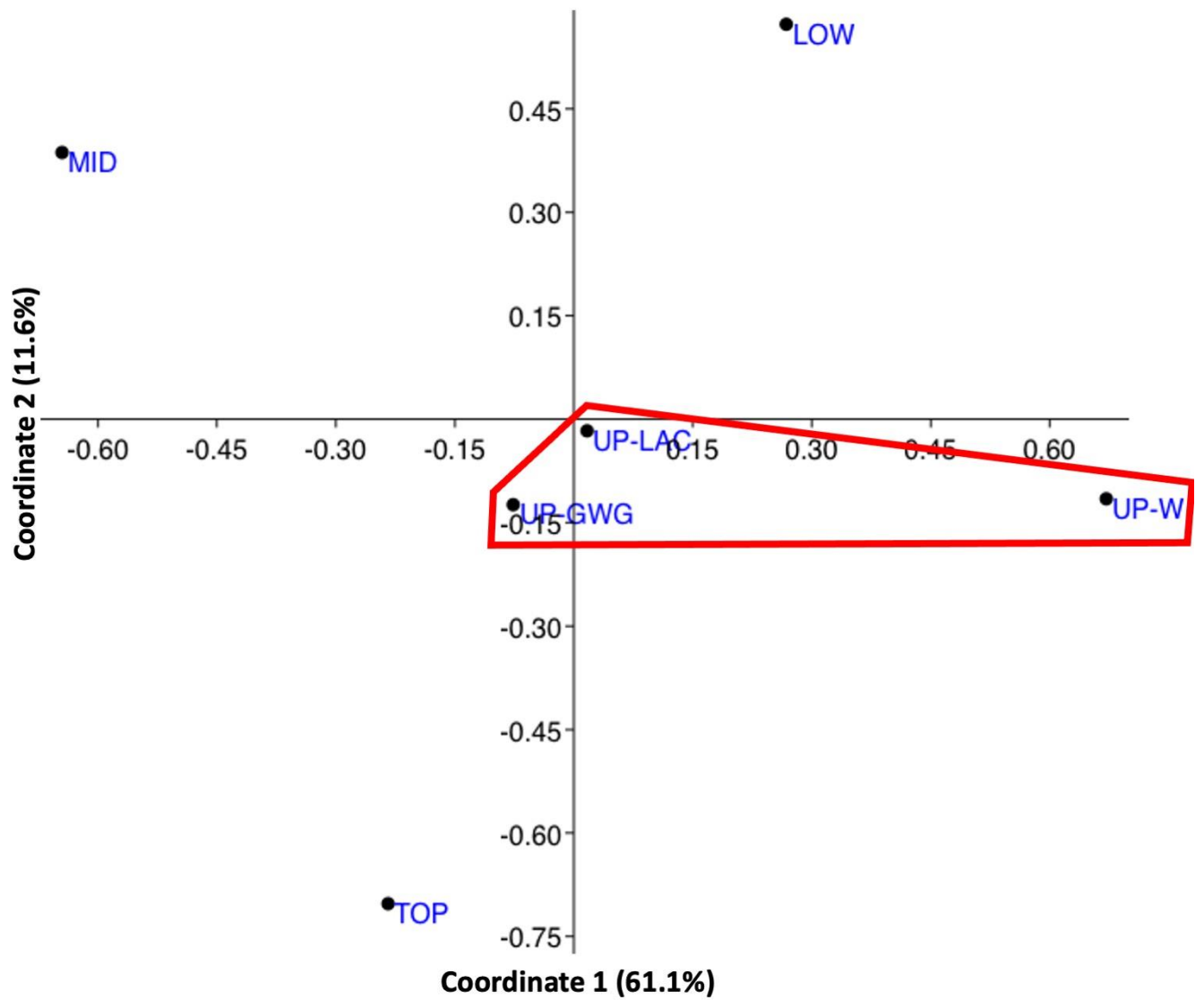
Mae fferm Trawsgoed yn cael ei rheoli'n ddwys ac mae'r rhan fwyaf o'r ardaloedd wedi cael eu haredig a'u hailhadu ar gylchred reolaidd o rhwng pump a deg mlynedd. Fodd bynnag, roedd amheuaeth nad oedd un cae (UCHAF), a leolir ar lethr serth, wedi'i aredig tan yn ddiweddar (2017). Felly cymharwyd y pedwar cae i benderfynu a allai dadansoddi DNA amgylcheddol nodi arwyddion o llystyfiant y gorffennol. Mae'n amlwg bod y tri chae isaf wedi'u hailhadu'n ddiweddar ag *L. perenne*, ac roedd darnau o bridd moel i'w gweld (Ffig. 4.3), yn enwedig yn y cael UCHAF (oherwydd tywydd sych ar ddiwedd yr haf). Roedd yn hysbys bod y cae uchaf (UP) wedi'i ailhadu tua phum mlynedd yn ôl.

Roedd nifer y rhywogaethau o blanhigion a ganfuwyd yn y caeau hyn hefyd yn isel (8/11/12; Tabl 4.1), gan gynnwys presenoldeb rhai *Quercus robur* yn y cae ISAF, lle'r oedd coeden fawr o'r rhywogaeth hon yn tyfu, a phresenoldeb rhai rhywogaethau o chwyn (*Chenopodium album* / *Stellaria media*). Yn annisgwyl, yn y cae UCHAF, canfuwyd tystiolaeth o ddau gnwd nad oeddent yn weiriau, *Brassica napus/oleracea/rapa* a *Secale cereale* (rhyg). Nid oedd modd adnabod yr union rywogaeth *Brassica* oherwydd bod planhigion cnwd (e.e. maip, rêp porthiant, cêl) yn tueddu i gael eu croesfridio'n drwm ac felly mae eu dilyniannau ITS2 yn aml yn gorgyffwrdd. Fodd bynnag, datgelodd trafodaeth ddiweddarach gyda Stephen Jones, rheolwr y fferm, fod rêp porthiant a rhyg wedi'u hau fel cnydau gorchudd i amddiffyn *L. perenne*, oedd wedi cael ei hau'n hwyr. Dywedodd Mr Jones fod y cae wedi cael ei aredig ym mis Medi 2017, ond na chafodd ei ogedu a'i ailhadu tan 12 mis yn ddiweddarach. Cyn iddo gael ei aredig, roedd yn cofio bod y llystyfiant yn cynnwys 'gweiriau chwyn', ysgall a danadl poethion yn bennaf. O'r herwydd, roedd 14 mis wedi mynd heibio ers y digwyddiad aredig ac ni chanfuwyd unrhyw arwydd o'r llyisiau hyn. Fodd bynnag, roedd toreithrwydd cymharol *Agrostis capillaris/gigantea* yn uchel a chanfuwyd peth *Cynosurus cristatus* (ond efallai bod y rhain wedi ailgyfyngu yn y gwanwyn ar ôl yr aredig).



**Table 4.2.** Composition of vegetation as assessed via eDNA in the Trawscoed Farm study area.

	Fresh wt. (g)	860.4	697.3	<b>496.1</b>	907.7	1006.4	1001.0
	Moisture content (%)	42.4%	42.3%	42.5%	27.7%	26.2%	27.2%
Species		<b>UP-GWG</b>	<b>UP-LAC</b>	<b>UP-W</b>	<b>LOW</b>	<b>MID</b>	<b>TOP</b>
1 <i>Agrostis capillaris/gigantea</i>	7.57%	6.55%	8.12%	0.07%	0.72%	17.13%	
2 <i>Agrostis stolonifera/canina</i>	0.18%	0.07%	0.26%	0.04%	0.30%	0.16%	
3 <i>Anthoxanthum odoratum</i>	0.01%	0.02%	0.01%				
4 <i>Brassica oleracea/rapa</i>							11.71%
5 <i>Cerastium fontanum/glomeratum</i>	0.92%	0.12%	0.36%		0.07%		
6 <i>Chenopodium album</i>					0.10%		
7 <i>Cirsium vulgare</i>	1.29%	0.06%	0.03%		0.09%		
8 <i>Cynosurus cristatus</i>							0.12%
9 <i>Festuca rubra</i>	0.21%	0.94%	0.30%		0.01%		
10 <i>Holcus lanatus</i>	2.94%	2.08%	4.06%				0.04%
11 <i>Lolium perenne/multiflorum</i>	70.20%	63.71%	36.96%	50.57%	95.00%	57.86%	
12 <i>Phleum pratense</i>	0.61%	0.77%	1.30%				0.02%
13 <i>Poa annua</i>	0.14%			4.33%	0.42%		
14 <i>Poa pratensis</i>	0.30%	0.13%	0.17%				0.01%
15 <i>Poa trivialis</i>	15.12%	19.09%	19.86%	10.31%	0.28%	4.21%	
16 <i>Quercus petraea</i>				0.03%			
17 <i>Secale cereale</i>							7.46%
18 <i>Stellaria media</i>						0.78%	
19 <i>Taraxacum officinale</i> agg.		0.10%				0.21%	
20 <i>Trifolium pratense</i>					3.56%		
21 <i>Trifolium repens</i>	0.51%	6.36%	28.55%	31.09%	2.03%	1.13%	
No. species detected		<b>13</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>11</b>



**Fig. 4.3.** PCO ordination of Trawscoed quadrats. The three samples taken by different methods/surveyors from the same quadrat in the upper non-reseeded field are contained within the red polygon.

#### **4C) Effaith gwahanol amodau storio pridd**

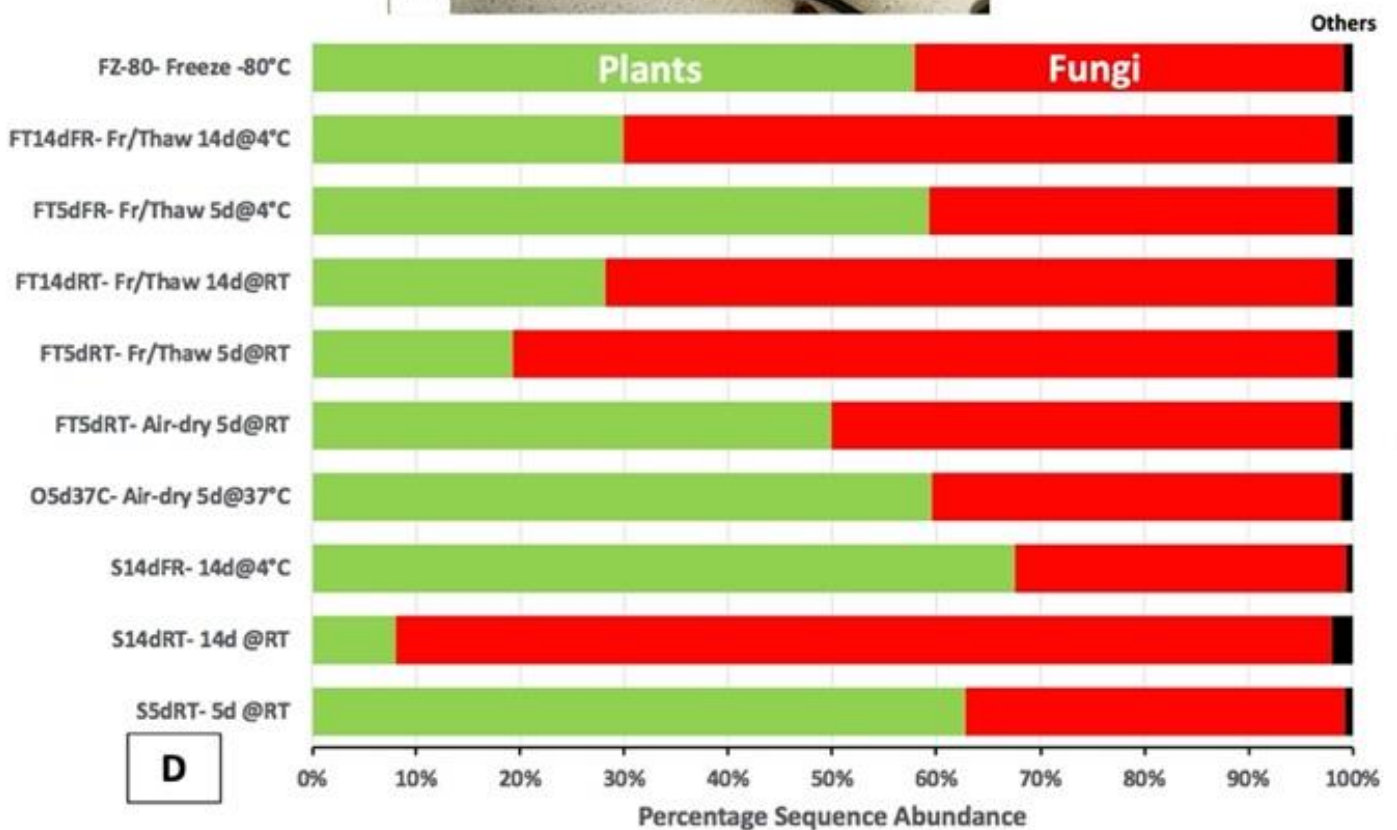
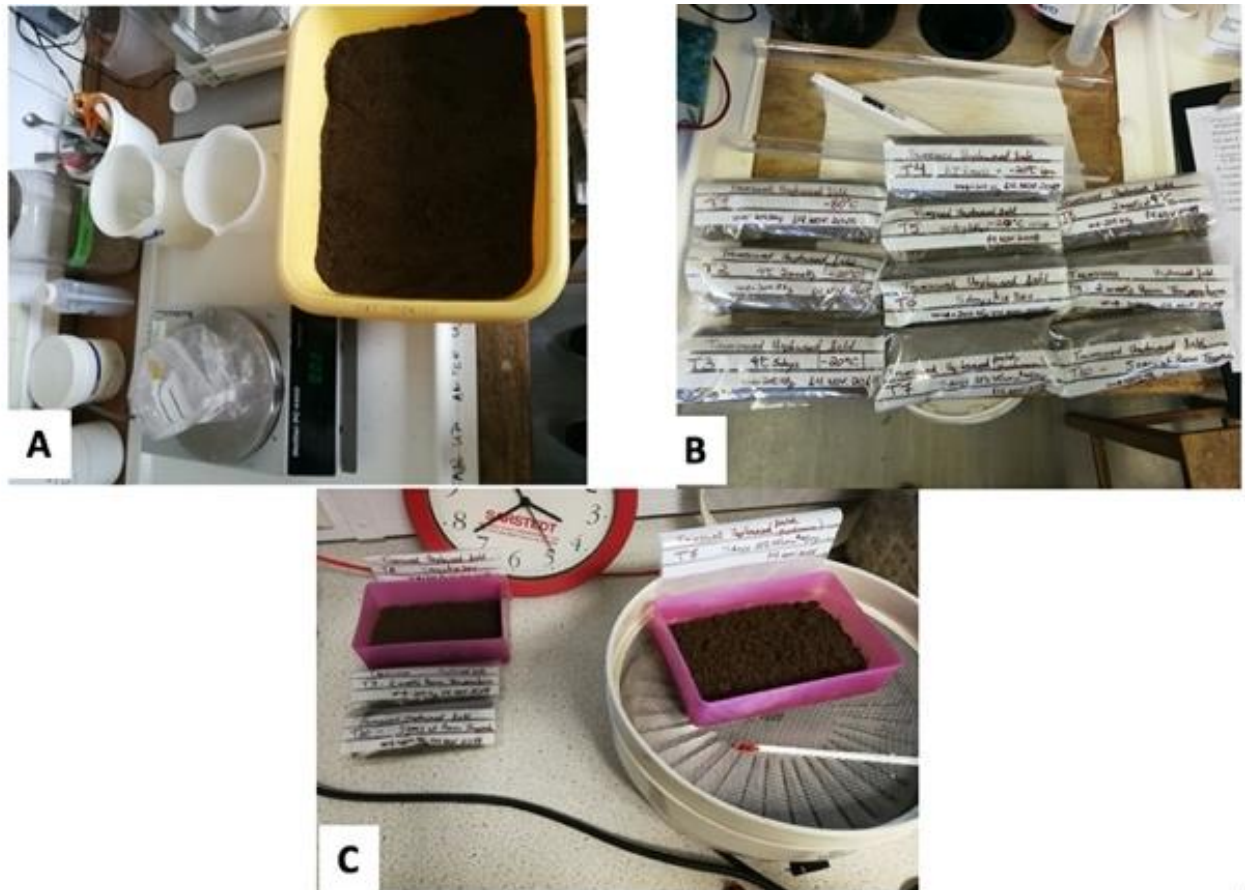
Prif nod yr arbrawf hwn oedd pennu'r amodau lle mae rhewi ar unwaith hyd at sychrewi sydd orau er mwyn cadw DNA amgylcheddol planhigion o samplau pridd. Fodd bynnag, mae monitro newidiadau mewn cymunedau ffyngau hefyd o ddiddordeb, gan y rhagwelir, o dan amodau storio is-optimaid, y bydd niferoedd ffyngau pydredd saprotroffig yn cynyddu. Profwyd ystod o amodau storio pridd, fel y dangosir yn Nhabl 4.1 a Ffig. 4.4A, B, C.

Defnyddiwyd ein cymysgedd safonol o brimyddion planhigion a ffyngau (gweler uchod) ar gyfer y metabarcodio DNA ac roedd yn amlwg bod niferoedd cymharol y dilyniannau planhigion a ffyngau a ddarllenwyd yn amrywio yn ôl y driniaeth. Ar gyfer y sampl a gafodd ei rhewi ar unwaith (T1), mae planhigion uwch yn cyfrif am 58% o'r holl ddilyniannau a gafwyd (Ffig. 4.4D). Fodd bynnag, ar gyfer nifer o'r triniaethau lle cafodd pridd ei rewi a'i ddadmer cyn deori (rhagddodiad FT; FT14dFR, FT14dRT, FD5dRT) ac ar gyfer pridd wedi'i storio ar dymheredd amgylchynol ar gyfer 14 diwrnod (S14dRT), roedd y gyfran hon yn is na 30%, sy'n awgrymu cynnydd yn niferoedd y ffyngau ac, yn sgil hyn yn debygol, dadfeiliad DNA amgylcheddol planhigion. Datgelodd archwiliad o'r ffyngau penodol a ganfuwyd yn y pridd fod *Mortierellomycota* (y ffylwm yr oedd y ddwy rywogaeth ffwngaid fwyaf toreithiog yn perthyn iddo) a *Metarhizium carneum* sawl gwaith yn fwy niferus mewn samplau lle roedd cyfran DNA amgylcheddol planhigion yn llai. Gwyddys bod y rhywogaethau hyn yn rhai citinolytig (Gray a Baxby, 1968; Jackson, 1965), yn amlhau o bosibl yn ystod storio oherwydd eu gallu i ddiraddio citin o hyffâu ffwngaid sy'n diraddio yn ystod y broses storio.

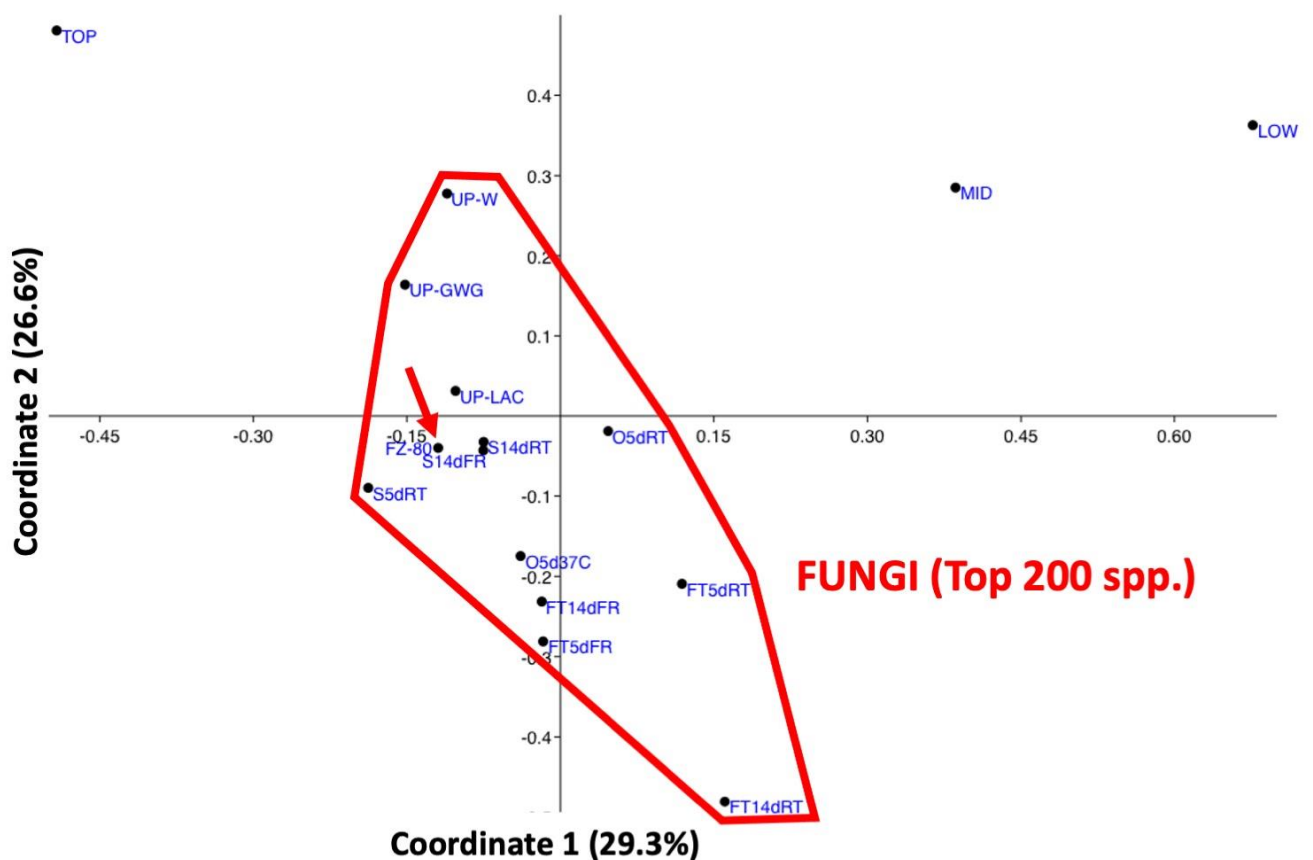
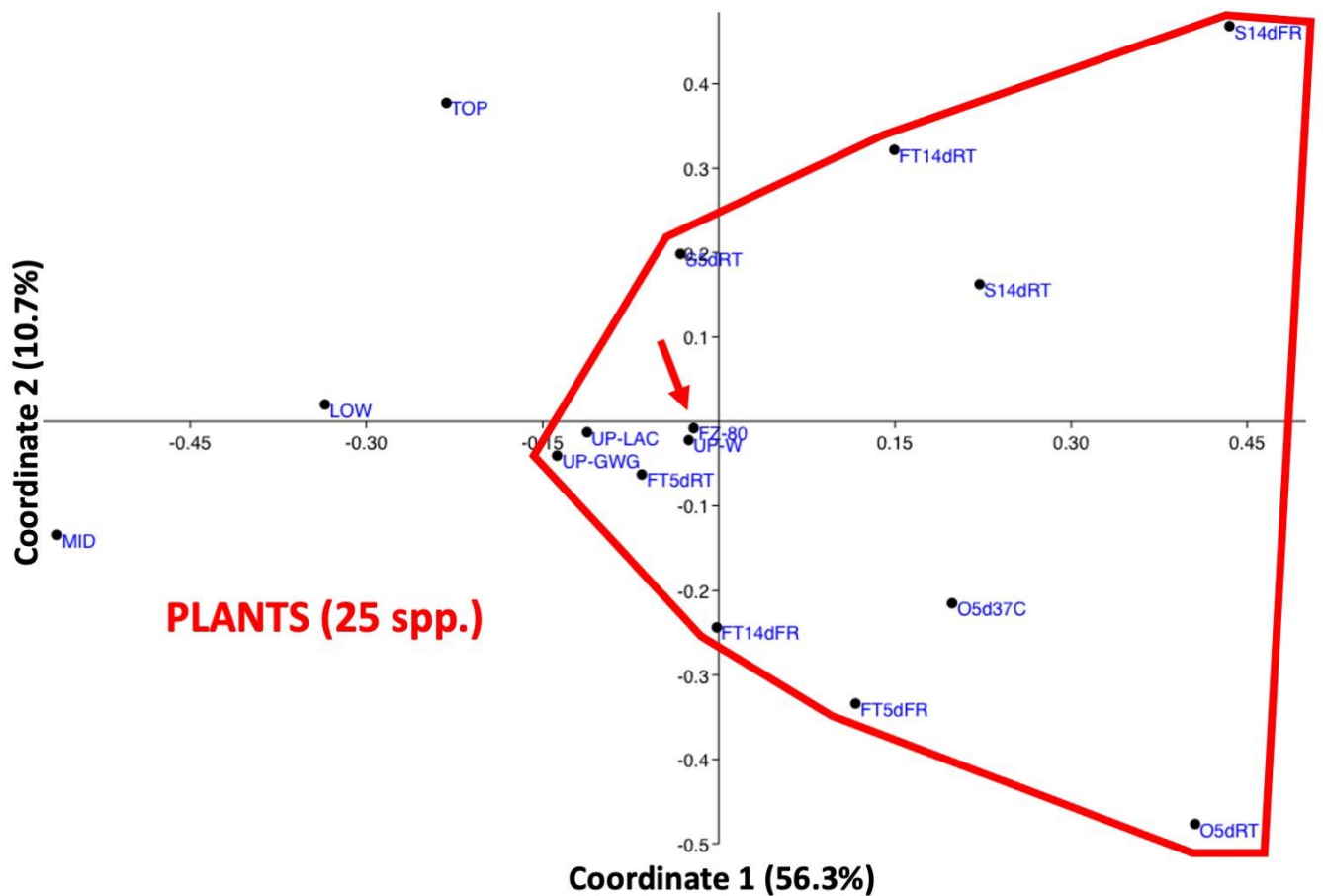
Ac eithrio algâu a bryoffytau, canfuwyd 25 rhywogaeth o blanhigion (uwch) yn y samplau pridd. Felly cynhaliwyd dosbarthiad o'r prif gyfesurynnau (Ffig. 4.5A), ochr yn ochr â'r data a gafwyd o gaeau cyfagos yn Nhrawsgoed (gweler 3D uchod). Roedd y sampl a storiwyd fel rheolydd yn dosbarthu'n agos at samplau a gymerwyd o'r un cwadrat (UP-GWG, UP-LAC-UP-W) a'u rhewi ar unwaith (cyn unrhyw ogru), tra oedd samplau o'r cae arall yn dosbarthu'n eithaf gwahanol i'r samplau eraill.

Ar gyfer cyfansoddiad cymunedol DNA amgylcheddol planhigion, y triniaethau storio mwyaf gwahanol i'r rheolydd (FX-80) oedd storio ar 4°C mewn bag wedi'i selio am bythefnos (S14dRT) ac awyrsychu ar dymheredd ystafell (O5dRT). Roedd samplau a oedd yn destun awyrsychu cynnes (O5d37C) a rhewi-dadmer ac yna storio am gyfnod hir (cyfnodau o 14 diwrnod; FT14dRT/S14dRT) hefyd yn wahanol i'r rheolydd.

Roedd y cymunedau ffyngau a oedd yn bresennol hefyd yn destun dosbarthiad o'r prif gyfesurynnau (PCO), a'r rhesymeg am hyn oedd mai amodau storio lle bu lefelau pydru sylweddol o'r biomas planhigion fyddai'r rhai hefyd lle byddai cymunedau penodol o ffyngau saprotroffig wedi datblygu, ac y byddai hyn yn cyd-fynd â chynnydd cyffredinol mewn toreithrwydd dilyniannau ffwngaid o'u cymharu â dilyniannau planhigion (Ffig. 4.5B).



**Fig 4.4.** Soil from Trawscoed were roughly ground, homogenized and divided into 200g aliquots. The subsamples were subject to a range of storage conditions including freeze-thawing in sealed bags (B), air-drying (C) etc. The relative proportions of plant and fungal DNA also varied across treatments when assessed by via eDNA metabarcoding (D).



**Fig 4.5.** Principal Coordinates ordination of the plant (A) and fungal (B) communities subsequently detected via eDNA metabarcoding shows how the various treatments differ from the original (instant -80°C freezing; red ARROW). All the samples derived from the upper field (UP) are enclosed in the red polygon.

Y triniaethau mwyaf gwahanol i'r rheolydd oedd y rhai hefyd â'r toreithrwydd cymharol isaf o DNA amgylcheddol planhigion (Ffig. 4.4D). Canfu proses ddsbarthu debyg o gymunedau ffyngau (Ffig. 4.5B) hefyd fod yr un triniaethau (T4/T5/T9/T10) yn wahanol i'r rheolydd. Heb astudiaeth fanylach gan ddefnyddio dyblygiad llawn (mae arbrawf o'r fath wedi'i gynllunio ar gyfer y dyfodol), mae'n anodd pennu'n glir pa rai o'r triniaethau eraill a fyddai'n cael eu hargymell, ond ni fyddai storio oer heb rewi am hyd at bum diwrnod yn arwain at golled sylweddol o DNA amgylcheddol planhigion; byddai triniaeth o'r fath yn gydnaws â storio samplau yn yr oergell am gyfnod byr cyn eu postio drwy ddsbarthu dros nos.

**SYLWCH:** Gwnaeth y data diddorol a gafwyd yn ystod yr arbrawf a amlinellwyd uchod ein harwain at gynnal arbrawf wedi'i ddyblygu mwy manwl. Roedd casgliad yr astudiaeth ddiweddarach hon yn gyson, sef bod storio oer yn yr oergell am hyd at wythnos yn arwain at newidiadau bach iawn yn unig i'r DNA amgylcheddol sy'n perthyn i blanhigion/ffyngau a ganfuwyd yn ddiweddarach. Mae'r elfen hon o'r gwaith wedi'i chyhoeddi'n ddiweddar mewn cyfnodolyn a adolygir gan gymheiriaid:- LA Clasen, AP Detheridge, J Scullion, GW Griffith (2020). Soil stabilisation for DNA metabarcoding of plants and fungi. Implications for sampling at remote locations or via third-parties. *Metabarcoding and Metagenomics*, DOI 10.3897/mbmg.@.58365

## **Trafodaeth**

Yn ystod y prosiect hwn, rydym wedi datblygu dull ar gyfer canfod DNA amgylcheddol planhigion a ffyngau o samplau pridd. Roedd y broses hon yn cynnwys nid yn unig datblygu methodolegau ar gyfer samplu yn y maes, echdynnu DNA a mwyhau locws targed ITS2 ond hefyd y llwybrau biowybodol cysylltiedig sy'n caniatáu cysylltu dilyniannau DNA ag enwau rhywogaethau yn ddibynadwy. Cyflawnwyd y cysylltiad hwn yn llwyddiannus, er nad oedd codau bar ITS2 yn caniatáu, mewn rhai achosion, gwahaniaethu parau/clystyrau o rywogaethau â pherthynas agos, fel arfer oherwydd y gwyddys bod y rhywogaethau hyn yn ffurfio hybridau yn y gwyllt.

Nid ydym yn ymwybodol o'r defnydd o ddulliau DNA amgylcheddol mewn cyd-destun rheoleiddio / monitro safle. Mae'n bosibl nad yw deunydd o'r fath a gyhoeddir yn y llenyddiaeth 'lwyd' (adroddiadau'r llywodraeth ac ati) yn hawdd ei ganfod o'i gymharu ag erthyglau yn y llenyddiaeth a adolygir gan gymheiriaid. Bydd y drafodaeth isod yn canolbwyntio'n bennaf ar faterion sy'n ymwneud â defnyddio'r fethodoleg hon mewn cyd-destun rheoleiddio / monitro safle.

### **◆Asesiad o gymunedau planhigion presennol trwy DNA amgylcheddol yn y pridd.**

Er mwyn pennu potensial metabarcodio ar gyfer dadansoddi DNA amgylcheddol sy'n deillio o blanhigion yn y pridd, fe wnaethom ddefnyddio'r dull yn gyntaf mewn glaswelltir lled-naturiol i archwilio pa mor dda y gallai ddadansoddi cymunedau planhigion presennol mewn cynefinoedd heb eu haflonyddu. Cymharwyd y dull â'r dull gorchudd canrannol sydd wedi'i hen sefydlu ac a ddefnyddir yn helaeth wrth ddadansoddi llystyfiant. Gwnaethpwyd cymariaethau mewn tri safle maes gwahanol (Brignant, Kirby Muxloe a Turlough). Roedd y cyfathiant rhwng y ddau dull yn dda ond, yng nghyd-destun dehongli data DNA amgylcheddol mewn cyd-destun rheoleiddio, mae'r pwyntiau canlynol yn berthnasol:

#### **Chwythu llystyfiant yn y gwynt:**

Fe wnaethom nodi sawl achlysur pan oedd dail marw wedi cael eu chwythu i mewn i gae ac wedi mynd i'r system bridd, gan gael eu canfod wedyn yn ein setiau data metabarcodio ar gyfer DNA amgylcheddol yn y pridd. Roedd y niferoedd yn isel iawn ac, yn y rhan fwyaf o achosion, yn gyson â phlanhigion a oedd yn bresennol gerllaw (yn nodweddiadol, coed ar ffin cae cyfagos). Mae'n bosibl y gellid canfod planhigion eraill, mwy egsotig, er enghraifft pe bai compost gardd wedi'i wasgaru ar gae. Fodd bynnag, os yw cyfanswm rhywogaethau egsotig o'r fath yn cynnwys <1%, nid ydynt yn drysu ymdrechion i ail-greu'r gymuned o blanhigion brodorol.

#### **Planhigion prinnach:**

Mae cynefinoedd lled-naturiol yn aml yn cael eu gwerthfawrogi oherwydd presenoldeb rhywogaethau prin arbennig (e.e. tegeirianau), sy'n arwydd o ddiffyg aflonyddwch yn y gorffennol. Efallai mai dim ond mewn niferoedd o ychydig o ddegau neu gannoedd o unigolion y bydd planhigion o'r fath yn bresennol ac felly byddant yn gyfran fach yn unig o'r gymuned gyfan o blanhigion, hyd yn oed yn yr ardaloedd lle maent fwyaf

trwchus. Er mwyn i samplu pridd ganfod y rhywogaethau hyn, byddai angen creiddio rhan o system wreiddiau'r planhigion hyn ac, os yw'r tebygolrwydd y bydd hyn yn digwydd yn isel, yna mae'n debygol na fydd y rhywogaeth yn cael ei chynrychioli yn y DNA sy'n bresennol yng nghraidd y pridd, er y bydd presenoldeb y planhigion yn amlwg i fotanegydd sy'n arsylwi ar y glastir. Er enghraifft, ym Mrignant, cofnodwyd cyfanswm gorchudd mewn un cwadrat o 1% ar gyfer *Campanula rotundifolia*, sydd â blodau glas nodweddiadol, ond ni chanfuwyd ei DNA ym mhridd y cwadrat hwnnw.

### **c) Effeithiau ffurfiant gwreiddiau, banciau hadau, a thoreithrwydd DNA amgylcheddol yn erbyn % gorchudd.**

Mae ffurfiant systemau gwreiddiau rhywogaethau planhigion yn amrywio'n sylweddol (e.e. gweiriau â systemau adwreiddiau yn erbyn llawer o Asteraceae â phrif wreiddiau). Bydd y gwahaniaethau hyn yn dylanwadu ar y ffordd y mae biomas gwreiddiau yn cael ei 'ddal' gan greiddio pridd, a hefyd y gyfradd y mae gwreiddiau marw yn pydru arni (e.e. gellir disgwyl i brif wreiddyn barhau'n hirach ar ôl marwolaeth planhigion). Yn yr un modd, mae planhigion lluosflwydd yn buddsoddi'n drymach mewn meinweoedd gwreiddiau, tra bo planhigion unflwydd yn buddsoddi'n drymach mewn cynhyrchu hadau, a bydd cymarebau gwreiddiau:blagur yn debygol o amrywio'n dymhorol, fel y bydd y banc hadau.

Felly er mwyn graddnodi toreithrwydd DNA amgylcheddol yn erbyn % gorchudd yn seiliedig ar ddadansoddi llystyfiant, byddai angen ymchwilio i rywogaethau unigol sy'n tyfu mewn ungnwd er mwyn cael cydberthynas gywir. Fodd bynnag, mae'r data a gyflwynir uchod ar gyfer DNA amgylcheddol yn erbyn % gorchudd yn nodi rhai nodweddion cyffredin. Un enghraifft yw bod toreithrwydd gweiriau yn gyson uwch mewn arolygon DNA amgylcheddol nag mewn arolygon botanegol; yn ôl pob tebyg, mae hyn oherwydd goddrychedd asesiadau % gorchudd, gyda'r llygad dynol yn cael ei dynnu'n fwy at flodau a siapiau dail nodweddiadol na dail gweiriau. Mae'n amlwg hefyd y gall arolygwyr botanegol ddibynnu'n helaeth ar bresenoldeb pennau blodeuol i ganfod presenoldeb rhywogaeth mewn glastir; ym Mrignant a Kirby Muxloe, canfuwyd *Phleum pratensis*, sy'n blodeuo'n hwyr, trwy DNA amgylcheddol ond ni chafodd ei gofnodi wrth ddadansoddi llystyfiant.

Mae'r niferoedd anarferol o uchel, mewn arolygon DNA amgylcheddol, o rai rhywogaethau sy'n ffurfio prif wreiddiau (e.e. *Taraxacum officinale* [68% yng nghwadrat KX15B o'i gymharu â 2% ar gyfer % gorchudd yn y cwadrat hwnnw; Tabl 2.1]) yn awgrymu y cafodd y prif wreiddyn ei greiddio'n uniongyrchol yn y cwadrat hwn. Ar safle Turlough, roedd *Pimpinella saxifraga* yn cynnwys 27–81% o'r holl DNA amgylcheddol ar draws y pedwar cwadrat, sy'n awgrymu y cafodd prif wreiddiau eu samplu ym mhob cwadrat.

### **Toreithrwydd cymharol rhywogaethau dangosydd allweddol.**

Ar gyfer asesiadau AEA, mae'r pryder allweddol yn ymwneud â chyfanswm toreithrwydd rhywogaethau a heuwyd (rhygwellt yn bennaf [*Lolium* rhywogaethau] a meillion gwyn [*Trifolium repens*]), gyda 25% yn lefel trothwy. Felly mewn archwiliad o'r caeau a ailhadwyd yn ddiweddar ar safle cae Trawsgoed (Tabl 4.2), roedd rhywogaethau *Lolium* yn cynnwys 37–95% o'r holl gwadradau, gyda *T. repens* yn bresennol ar lefelau mwy amrwyiol. Mae dibyniaeth ar *T. repens* fel dangosydd ailhadu



diweddar yn llai dibynadwy, fel y nodir yn Kirby Muxloe, lle roedd dau gwadrat (KX10D a KX11D) yn cynnwys >30% o *T. repens* yn ôl DNA amgylcheddol (5% yn ôl dadansoddiad o'r llystyfiant) ond roedd yr un cwadradau hefyd yn cynnwys dangosyddion o llystyfiant lled-naturiol (*L. corniculatus*).

### ◆ Diraddio DNA planhigion gweddilliol yn y pridd.

Nod y prosiect hwn yn y pen draw oedd sefydlu a oedd yn bosibl adnabod gweddillion planhigion a samplwyd trwy samplu pridd ac felly ail-greu'r cymunedau planhigion a oedd yn bodoli eisoes o safleoedd amaethyddol yr aflonyddwyd arnynt yn ddiweddar. Mae'r gyfradd y mae meinweodd planhigion (gan gynnwys eu DNA) yn diraddio yn y pridd yn dibynnu'n bennaf ar ffactorau hinsoddol (glawiad, tymheredd), ond gall ffactorau edaffig ddylanwadu arni (e.e. lefelau maethynnau) a hefyd dulliau rheoli tir dilynol (e.e. trefn gnydu). Gall ffactorau eraill, megis a ddefnyddir chwynladdwr cyn aredig, amseriad a natur yr aredig/ogedu a wneir, a'r oedi rhwng aredig ac ailhadu, amrywio'n sylweddol hefyd.

Felly ceisiwyd cyfyngu ar y newidynnau hyn trwy gynnal arbrawf mesocosm yn defnyddio pridd o laswelltir lled-naturiol amrywiol a chyflwyno gwahanol driniaethau i'r pridd ar ôl iddo gael ei droi a'i ogru. Unwaith y byddant wedi'i sefydlu, cymerwyd creiddiau pridd o'r potiau mesocosm saith diwrnod, un mis, tri mis a 12 mis ar ôl cychwyn y gweithdrefnau trin. Adroddwyd bod y cynefin ffynhonnell yn cynnwys 47 rhywogaeth o blanhigion uwch / mwsoglau. Datgeloedd dadansoddiad o DNA amgylcheddol bresenoldeb 26 o'r rhywogaethau hyn (ynghyd â phum mwsogl a thri gwair na chawsant eu canfod gan yr NVC). Yn ystod yr arbrawf, bu gostyngiad graddol yn swm y biomas planhigion a ganfuwyd (Ffigurau 3.5/3.6) a chynnydd mewn biomas ffyngau, oherwydd diraddio sbwriel planhigion a'r cynnydd dilynol mewn biomas dadelfenyddion ffwngaid.

Fis ar ôl aflonyddu'r pridd a sefydlu'r potiau, roedd 25 rhywogaeth yn dal i fod i'w canfod yn y potiau ac, ar ôl tri mis, 21 rhywogaeth (Ffigurau 3.9/3.10/3.11). Fodd bynnag, ar ôl 12 mis, dim ond 16 rhywogaeth a ganfuwyd ac, mewn potiau a oedd wedi'u hailhadu â rhygweltt (yn hytrach na'u cadw'n foel), dim ond naw rhywogaeth a ganfuwyd. Yn y potiau oedd yn cynnwys pridd moel, y llyisiau a oedd yn dal i gael eu canfod ar ôl 12 mis oedd *Cardamine pratense*, *Crepis capillaris*, *Hypochaeris radicata*, *Plantago lanceolata*, *Ranunculus acris*, *Ranunculus repens*, *Rumex acetosa*, *Taraxacum officinale* a *Trifolium repens*). Roedd planhigion a oedd yn bresennol ar niferoedd uwch i ddechrau yn fwy tebygol o gael eu canfod ar ôl 12 mis ac mae'n debygol bod rhai planhigion wedi ailgyfyngu i raddau o hadau/rhisomau (er gwaethaf 'chwynnu' rheolaidd). Ar gyfer potiau wedi'u hadu â rhygweltt, dim ond rhywogaethau nad oeddent yn weiriau a gafodd eu tynnu trwy chwynnu, ond canfuwyd DNA gweddilliol rhai planhigion porfa ar ôl 12 mis (*R. acetosa*, *C. pratense*).

Roedd amrywiad mawr rhwng potiau dyblyg yn yr arbrawf, oherwydd anhawster wrth sicrhau homogenedd pridd yn dilyn aflonyddwch, ac, o ganlyniad, ni ddarganfuwyd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol rhwng y gwahanol driniaethau. Serch hynny, roedd gweddillion y rhan fwyaf o'r rhywogaethau llyisiau a ganfuwyd yn wreiddiol yn y pridd yn dal i fod i'w canfod ar ôl 12 mis. Mae'n anodd asesu i ba raddau y mae'r arbrawf hwn yn efelychu'r hyn a fyddai'n digwydd dan amodau maes. Yn yr arbrawf hwn, cafodd y glastir a'r pridd eu torri'n llawer mwy mân nag a fyddai'n digwydd yn

ystod aredig/ogedu (gyda darnau llai o lystyfiant yn debygol o bydru'n gyflymach o ganlyniad) ac ataliwyd tyfiant newydd trwy chwynnu, felly gellid disgwyl, dan amodau amaethyddol safonol, y byddai diraddiad gweddillion cymunedau planhigion a oedd yn bodoli eisoes yn arafach (DS nid yw effeithiau gwaredu glyffosad cyn aredig yn y cyd-destun hwn yn hysbys).

Parhaodd y rhywogaethau a oedd yn bresennol ar niferoedd uwch i ddechrau am fwy o amser, felly efallai y byddai dulliau canfod mwy sensitif wedi canfod mwy o rywogaethau ar ôl 12 mis. Felly byddai dulliau, fel qPCR, sy'n targedu rhywogaethau marcio penodol (e.e. *Lotus corniculatus* / *Luzula campestris* ac ati) yn ddefnyddiol, yn ogystal â metabarcodio (gweler isod).

### ◆ Defnyddioldeb dadansoddi cymunedau ffyngau yn y pridd wrth asesu aflonyddwch ar safle.

Er nad yw mor reddfodol i'r llygwr, gall y cymunedau ffyngau yn y pridd fod yn addysgiadol iawn am lefel yr aflonyddwch yn y gorffennol ac am y gymuned blanhigion bresennol. Mae gan lawer o ffyngau gysylltiad penodol â phlanhigion penodol, fel pathogenau, endoffytau neu bartneriaid mycorhisol, er enghraifft, felly mae canfod ffyngau penodol yn ddangosydd dibynadwy o bresenoldeb planhigion neu fathau o lystyfiant penodol. Yn ogystal, mae llawer o ffyngau mwy (sy'n ffurfio madarch) yn hirhoedlog ac yn tyfu'n araf iawn, felly mae eu presenoldeb yn dangos bod safle wedi bod heb ei droi ers amser maith (h.y. o fewn degawdau yn achos ffyngau capiau cwyr). Dangosodd tystiolaeth o'r astudiaeth bresennol sut, yn dilyn aflonyddwch, mae newidiadau penodol yn digwydd o fewn y gymuned ffyngau y gellir eu monitro dros amser (hyd at 12 mis yn yr achos hwn) ond sy'n dal i gadw gwybodaeth am y cymunedau a oedd yn bresennol cyn y digwyddiad aflonyddu. Oherwydd bod cyfoeth rhywogaethau cymunedau ffyngau mewn priddoedd yn fwy nag ar gyfer planhigion uwch a bod y ffyngau hyn wedi'u dosbarthu'n llai heterogenaidd, gallai rhywfaint o waith asesu o gymunedau ffyngau fod yn ddefnyddiol iawn wrth ddarparu tystiolaeth o natur cymunedau planhigion cyn tarfu arnynt.

### ◆ Samplu a storio.

Ar gyfer defnydd ymarferol, mae angen i fethodolegau samplu pridd fod yn glir, yn syml, ac yn effeithlon o ran amser. Ychydig o wahaniaeth a ganfuwyd wrth gymharu samplu grid â dull samplu trawslun W. Mae pwysau'r pridd a gesglir o ardal benodol yn fwy arwyddocaol, gyda samplu mwy dwys yn arwain at gasglu mwy o greiddiau; er y byddai hyn yn cynyddu nifer y rhywogaethau planhigion sy'n cael eu hadfer mewn creiddiau pridd, byddai'n cymryd mwy o amser ac yn cynyddu'r amser a gymerir i gynnal prosesu eilaidd. Yn nodweddiadol, rydym wedi dewis casglu tua 40 craidd sy'n pwysu tua 800–1,000 g, tasg y gellir ei chwblhau o fewn 30 munud. Canfuom hefyd nad yw samplau pridd yn diraddio'n amlwg os cânt eu storio mewn oergell (NID wedi rhewi) a bod eu danfon o ddrws i ddrws i'r labordy prosesu gan ddefnyddio cludwr diwrnod nesaf yn ddarbodus (y gost yw £1–4 y kg, yn dibynnu ar gyfanswm pwysau'r llwyth [<https://www.parcelhero.com/>]).

## ◆ Datblygiadau yn y dyfodol.

### **Gwella meintioli biomas planhigion yn ôl rhywogaeth**

Rydym wedi trafod uchod y berthynas rhwng gorchudd canrannol cymunedau planhigion (uwchben y ddaear) a DNA amgylcheddol y rhywogaethau hyn a adnabuwyd gan greiddio pridd. Mae natur y gydberthynas hon yn dibynnu ar amrywiol ffactorau, gan gynnwys ffurfiant gwreiddio'r planhigion a ffenoleg twf. Gellid defnyddio ymchwiliadau manylach i gymunedau 'ffug' (cymunedau planhigion synthetig, yn cynnwys meinweoedd gwreiddiau o blanhigion a dyfwyd mewn ungnwd) i raddnodi cymariaethau o'r fath, er enghraifft ar gyfer rhywogaethau o ddiddordeb arbennig, gan gynnwys rhygwellt/meillion, neu ddangosyddion allweddol glaswelltiroedd lled-naturiol (*Lotus corniculatus* ac ati).

### **Gwella sensitifrwydd**

Yn ogystal â metabarcodio DNA amgylcheddol, lle mae'r gymuned gyfan o blanhigion/ffyngau yn cael ei hasesu, gall dulliau eraill sy'n seiliedig ar DNA (e.e. PCR meintiol) ddarparu meintioli cyflymach a mwy sensitif ar gyfer rhywogaethau targed penodol, ac mae'r profion hyn yn addas ar gyfer amblecsu (canfod hyd at chwe rhywogaeth darged ar yr un pryd) ac i ryw raddau ar gyfer eu defnyddio yn y maes (profion LAMP). Gall profion o'r fath fod yn ddefnyddiol ar gyfer canfod pathogenau planhigion penodol (Khaliq ac eraill, 2018) neu blanhigion/anifeiliaid goresgynnol.

### **Cymhwysiadau ychwanegol technoleg metabarcodio DNA amgylcheddol**

Mae gan ddulliau canfod sy'n seiliedig ar DNA botensial aruthrol mewn sawl maes o ymdrech ddynol ac mae hyn yn arbennig o wir yng nghyd-destun cadwraeth natur ym maes amaethyddiaeth. Er enghraifft, rydym eisoes yn cynnal arolygon ar gyfer poblogaethau capiau cwyr mewn glaswelltiroedd ar ran CNC/NE sydd wedi hwyluso'r broses o hysbysu SoDdGA, monitro safleoedd a gwaith cychwynnol i'w sgrinio yn fawr. Ar gyfer dadansoddiadau botanegol, mae'r dulliau safonol o ddadansoddi llystyfiant wedi'u datblygu'n well ac yn fwy effeithlon nag ar gyfer ffyngau ond, fel sy'n amlwg o'r astudiaeth hon, mae canfod ac adnabod gweiriau/mwsoglau trwy DNA amgylcheddol yn hynod effeithiol ac yn well nag arolygon botanegol safonol. Mae metabarcodio DNA amgylcheddol hefyd yn fwy hyblyg gan nad yw cyfnodau arolygu wedi'u cyfyngu i ganol yr haf a gellir cael asesiad cywir o gyfoeth rhywogaethau planhigion a dosbarthiad NVC o samplu pridd yn ystod cyfnod y gaeaf.

## Casgliad

Mae'r gwaith o ddatblygu'r broses ar gyfer DNA amgylcheddol ffyngau wedi'i drosi'n llwyddiannus i gynnwys data ar gyfer planhigion uwch, sef prif nod y prosiect hwn. Fodd bynnag, heb brofi samplau 'byd go iawn' ymhellach, nid 'bwled aur' yw'r dull y gellir ei ddefnyddio ar ei ben ei hun i brofi bod y Rheoliadau AEA (Amaethyddiaeth) wedi'u torri, neu fod safle adfer yn dychwelyd i'w ansawdd dwyster cyn-amaethyddol. Canfu'r prosiect hwn y canlynol:

- Mae data o ddadansoddi DNA amgylcheddol yn gyson â thechnegau arolygu mwy traddodiadol. Fodd bynnag, rhaid bod yn ofalus wrth ystyried ffactorau fel halogi gan y gwynt, peidio â chanfod rhywogaethau prinnach, a ffurfiant gwreiddiau planhigion yn ystumio'r canlyniadau o bosibl. Er hynny, ymddengys fod cywirdeb gorchudd canrannol rhywogaethau gweiriau yn fwy cywir yn y broses DNA amgylcheddol.
- Canfu'r prosiect hefyd fod maint y deunydd planhigion yn diraddio yn y pridd dros amser. Mae hyn yn dangos bod yn rhaid ymyrryd a chasglu pridd cyn gynted â phosibl er mwyn rhoi darlun cywir â phosibl o'r glastir blaenorol.
- Gall chwiliadau penodol am rywogaethau 'dangosyddion allweddol' fod yn fwy llwyddiannus mewn samplau pridd mwy hanesyddol, pan fydd mwy na thri i chwe mis wedi mynd heibio ers y digwyddiad.
- Gall data sy'n deillio o weddillion ffyngau fod yn arwydd mawr o gyfansoddion gwreiddiol y glastir (neu o leiaf arferion rheoli'r gorffennol), hyd yn oed ar ôl i 12 mis fynd heibio ers y digwyddiad.
- Gallai storio amhriodol wrth gludo a diraddiad DNA cysylltiedig newid y cymunedau planhigion a ddarganfuwyd yn ddiweddarach. Felly, profwyd ystod o amodau storio a chanfuwyd mai ychydig iawn o newidiadau yn unig a gafwyd yn sgil storio yn yr oergell am gyfnod o hyd at bythefnos. Nid oes angen rhewi'r pridd yn syth ar ôl samplu er mwyn cadw'r DNA os oes cyfleusterau oeri ar gael.
- Canfuwyd bod y technegau trawslun W presennol a ddefnyddir gan yr Uned AEA yn addas ar gyfer casglu samplau, bod modd casglu 800–1,000 g o bridd mewn 30 munud, a bod hyn yn darparu sampl o faint addas i'w ddadansoddi.

## **Cyfeiriadau**

- Ankenbrand, M.J., Keller, A., Wolf, M., Schultz, J., Förster, F., 2015. ITS2 database V: Twice as much. *Molecular Biology and Evolution* 32, 3030-3032.
- Bell, K.L., Loeffler, V.M., Brosi, B.J., 2017. An rbcL reference library to aid in the identification of plant species mixtures by DNA metabarcoding. *Applications in plant sciences* 5, 1600110.
- Brennan, G.L., Potter, C., De Vere, N., Griffith, G.W., Skjøth, C.A., Osborne, N.J., Wheeler, B.W., McInnes, R.N., Clewlow, Y., Barber, A., 2019. Temperate airborne grass pollen defined by spatio-temporal shifts in community composition. *Nature Ecology & Evolution* 3, 750-754.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one* 5, e8613.
- de Vere, N., Rich, T.C., Ford, C.R., Trinder, S.A., Long, C., Moore, C.W., Satterthwaite, D., Davies, H., Allainguillaume, J., Ronca, S., 2012. DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. *PloS one* 7, e37945.
- Edgar, R.C., 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Meth* 10, 996-998.
- Fahner, N.A., Shokralla, S., Baird, D.J., Hajibabaei, M., 2016. Large-scale monitoring of plants through environmental DNA metabarcoding of soil: recovery, resolution, and annotation of four DNA markers. *PLoS One* 11, e0157505.
- Felsenstein, J., 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annual review of genetics* 22, 521-565.
- Gray, T., Baxby, P., 1968. Chitin decomposition in soil: II. The ecology of chitinoclastic micro-organisms in forest soil. *Transactions of the British Mycological Society* 51, 293-309.
- Griffith, G.W., Cavalli, O., Detheridge, A.P., 2019. REPORT-An assessment of the fungal conservation value of Hardcastle Crags using NextGen DNA sequencing (NECR258). Natural England Commissioned Report NECR258 (<http://publications.naturalengland.org.uk/publication/4543317115404288>).
- Griffith, G.W., Hedger, J.N., Rowland, A., 2020. A comparison of fruitbody and eDNA survey approaches for assessing the distribution of mycelia of macrofungi in the grassland and heathland of Lundy. *Journal of the Lundy Field Society* 7, 87-106.
- Halbwachs, H., Easton, G.L., Bol, R., Hobbie, E.A., Garnett, M.H., Peršoh, D., Dixon, L., Ostle, N., Karasch, P., Griffith, G.W., 2018. Isotopic evidence of biotrophy and unusual nitrogen nutrition in soil-dwelling Hygrophoraceae. *Environmental microbiology* 20, 3573-3588.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., Dewaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270, 313-321.
- Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M.W., Cowan, R.S., Erickson, D.L., Group, C.P.W., 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 12794-12797.
- Jackson, R., 1965. Studies of fungi in pasture soils: III. Physiological studies on some fungal isolates from the root surface and from organic debris. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 8, 878-888.
- Khaliq, I., Hardy, G.E.S.J., White, D., Burgess, T.I., 2018. eDNA from roots: a robust tool for determining *Phytophthora* communities in natural ecosystems. *FEMS microbiology ecology* 94, fiy048.
- Koetschan, C., Förster, F., Keller, A., Schleicher, T., Ruderisch, B., Schwarz, R., Müller, T., Wolf, M., Schultz, J., 2009. The ITS2 Database III—sequences and structures for phylogeny. *Nucleic acids research* 38, D275-D279.
- Koljalg, U., Larsson, K.H., Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Hoiland, K., Kjöller, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A.F.S., Tedersoo, L., Vralstad, T., Ursing, B.M., 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166, 1063-1068.

Kõljalg, U., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A.F., Bahram, M., Bates, S.T., Bruns, T.D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T.M., 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular ecology* 22, 5271-5277.

Leff, J.W., Bardgett, R.D., Wilkinson, A., Jackson, B.G., Pritchard, W.J., Long, J.R., Oakley, S., Mason, K.E., Ostle, N.J., Johnson, D., 2018. Predicting the structure of soil communities from plant community taxonomy, phylogeny, and traits. *The ISME journal*, 1.

Matesanz, S., Pescador, D.S., Pías, B., Sánchez, A.M., Chacón-Labela, J., Illuminati, A., de la Cruz, M., López-Angulo, J., Marí-Mena, N., Vizcaíno, A., 2019. Estimating belowground plant abundance with DNA metabarcoding. *Molecular ecology resources*.

Moorhouse-Gann, R.J., Dunn, J.C., De Vere, N., Goder, M., Cole, N., Hipperson, H., Symondson, W.O., 2018. New universal ITS2 primers for high-resolution herbivory analyses using DNA metabarcoding in both tropical and temperate zones. *Scientific reports* 8, 8542.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 263-273.

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic acids research* 35, 7188-7196.

Pruitt, K.D., Tatusova, T., Maglott, D.R., 2005. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic acids research* 33, D501-D504.

Ratnasingham, S., Hebert, P.D., 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes* 7, 355-364.

Reese, A.T., Kartzinel, T.R., Petrone, B.L., Turnbaugh, P.J., Pringle, R.M., David, L.A., 2019. Using DNA Metabarcoding To Evaluate the Plant Component of Human Diets: a Proof of Concept. *MSystems* 4, e00458-00419.

Rodwell, J.S., 1992. *British Plant Communities, Volume 3: Grasslands and montane Communities*. Cambridge University Press., Cambridge.

Sanger, F., Donelson, J., Coulson, A., Kössel, H., Fischer, D., 1973. Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage f1 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70, 1209-1213.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Consortium, F.B., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6241-6246.

Sickel, W., Ankenbrand, M.J., Grimmer, G., Holzschuh, A., Härtel, S., Lanzen, J., Steffan-Dewenter, I., Keller, A., 2015. Increased efficiency in identifying mixed pollen samples by meta-barcoding with a dual-indexing approach. *BMC ecology* 15, 1-9.

Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Ruiz, L.V., Vasco-Palacios, A.M., Thu, P.Q., Suija, A., 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346, 1256688.

Tedersoo, L., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I., Bahram, M., Bechem, E., Chuyong, G., Kõljalg, U., 2010. 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist* 188, 291-301.

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5261-5267.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18, 315-322.

Williams, N., 2020. Fungal DNA and conservation. *Conservation Land Management* Spring 2020 | Vol. 18 No. 1 9-18, 9-15.

Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5088-5090.

Yoccoz, N.G., Bråthen, K.A., Gielly, L., Haile, J., Edwards, M.E., Goslar, T., von Stedingk, H., Brysting, A., Coissac, E., Pompanon, F., 2012. DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity. *Molecular Ecology* 21, 3647-3655.

Zhang, W., Wendel, J.F., Clark, L.G., 1997. Bamboozled again! Inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bamboos (Poaceae: Bambusoideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8, 205-217.