

Noordse woelmuis inventariseren met eDNA

Jelger Herder, Eva Bellemain, Richard Witte,
Dick Bekker & Maurice La Haye

Technologie bij natuuronderzoek

In deze rubriek laten auteurs zien hoe technologie behulpzaam kan zijn bij natuuronderzoek. De nadruk ligt daarbij op hoe het werkt, welke (uitbreidings)mogelijkheden er zijn en een indicatie van de kosten. Resultaten zijn bedoeld als illustratie.

De Noordse woelmuis (*Microtus oeconomus arenicola*) is een belangrijke Natura 2000-soort waarvoor regelmatig inventarisaties worden verricht in het kader van Flora- en faunawet ontheffingen en landelijke monitoringverplichtingen. Traditioneel wordt geïnventariseerd met inloopvallen, een arbeidsintensieve en daarvoor relatief dure methode. De Zoogdiervereniging, RAVON, Bureau Endemica en SPYGEN hebben onderzocht of het verzamelen van woelmuiskeutels en deze op naam te brengen via environmental DNA (eDNA) analyse een alternatief kan zijn.

De Noordse woelmuis is een zwaar beschermde soort van de Habitatrichtlijn; de in Nederland levende ondersoort komt verder nergens anders voor. De Noordse woelmuis leeft in hoge vegetaties met vooral grasachtige planten. In gebieden waar andere woelmuizen voorkomen, leeft de soort veel in natte terreinen, zoals rietland, moeras, zeer extensief gebruikte weilanden, drassige hooilanden, vochtige duinvalleien en periodiek overstroomde terreinen.

Kennis over de verspreiding van de Noordse woelmuis komt uit tijdrovend veldonderzoek met inloopvallen en braakbalonderzoek. Daarom is gezocht naar een andere,

minder arbeidsintensieve methode. In aquatische milieus is de environmental DNA-methode, waarbij het voorkomen van soorten aangetoond wordt middels DNA sporen uit de omgeving, succesvol ingezet bij soortspecifiek onderzoek naar onder andere de Grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*), Groene glazenmaker (*Aeshna viridis*), Knoflookpad (*Pelobates fuscus*) en Kamsalamander (*Triturus cristatus*) (Herder et al., 2013a) en voor het verkrijgen van een complete soortenlijst van de aanwezige vissoorten uit een enkel watermonster (Herder et al., 2014a).

In terrestrische milieus zijn eDNA-technieken ontwikkeld om o.a. uitwerpselen en vondsten in braakballen te identificeren (Barbosa et al., 2013). Woelmuizen zijn de enige muizen die keutelhoopjes maken. Een eerder onderzoek liet zien dat keutels van de Noordse woelmuis, die op het oog niet te onderscheiden zijn van Aardmuis (*Microtus agrestis*) en Veldmuis (*Microtus arvalis*), via DNA-analyse correct zijn te identificeren (Herder et al., 2013b). Om te kijken of de eDNA-methode als betrouwbaar en efficiënt alternatief kan worden ingezet bij het inventariseren van Noordse woelmuizen, moesten enkele cruciale vragen worden beantwoord. Hoe snel verdwijnt DNA uit de keutels? Wat is de trefkans van de eDNA-methode t.o.v. onderzoek met inloopvallen? Lukt het om voldoende keutels in het veld te vinden? Is het mogelijk om met één test zowel Noordse woelmuis- als Aardmuis- en Veldmuiskeutels succesvol op naam te brengen?

Noordse woelmuis is een belangrijke soort van de Habitatrichtlijn (foto: Jelger Herder).



Afbraaktijd keutels

Om na te gaan hoe snel de afbraak van DNA in keutels plaats vond en hoe lang keutels herkenbaar bleven, zijn in 2013 verse keutels van Noordse woelmuis verzameld. Deze keutels zijn buiten in het veld geplaatst en onder een afdak (regen-vrij). Vervolgens zijn er om de twee dagen eDNA keutelmonsters verzameld. De keutels vrij in het veld bleken na 7 dagen door regen uit elkaar te zijn gevallen en niet meer als keutel te herkennen. De keutels onder het afdakje bleven tot het eind van het experiment (4 weken) nog als muizen-keutels herkenbaar. Zolang keutels herkenbaar waren, waren ze te identificeren met behulp van eDNA. In Nederland, waar het vaak regent, wijst de vondst van keutels daarom op recente aanwezigheid van de soort.

Soorten goed te onderscheiden

Voor het genetisch herkennen van de verschillende woelmuissoorten wordt gebruik gemaakt van universele 'primers' die het in de monsters aanwezige DNA van alle zoogdieren vermeerderd tijdens een PCR analyse (Riaz et al., 2011). Vervolgens is de DNA-code van het vermeerderde DNA uitgelezen en vergeleken met een zelf opgebouwde referentiedatabase. Om de betrouwbaarheid van deze methodiek te testen, zijn 24 controle keutelmonsters geanalyseerd. Deze controlemonsters betroffen keutels afkomstig van met inloopvallen gevangen Noordse woelmuizen (n=8), Veldmuizen (n=8) en Aardmuizen (n=8). Van tevoren is de analisten niet meegedeeld welke soort in welk monster was te vinden. Met de eDNA-methode werden alle 24 controle monsters correct op naam gebracht: een 100% betrouwbare score.

Hogere trefkans met eDNA

De effectiviteit van de eDNA-methode is in het najaar van 2014 getest op tien locaties in het Wormer- en Jisperveld, een Noordse woelmuisrijk gebied. In oktober is met inloopvallen onderzoek gedaan, waarna in november keutels zijn gezocht. Per locatie is één raai van tien vallenparen (10x2 = 20 vallen op onderlinge afstand van 10 meter), na een korte periode waarin de vallen voor de muizen vrij toegankelijk waren (prebait-periode), 4 maal, om de 12 uur, gecontroleerd (Bergers & La Haye, 2000). Binnen een raai kunnen meerdere territoria aanwezig zijn, wat in zeer goede gebieden wel tien Noordse woelmuizen per locatie (per

controle) kan opleveren. Op exact dezelfde locaties als waar de vallenparen stonden, is in november maximaal 10 minuten gezocht naar keutels binnen een cirkel met een straal van 2 meter. Ondanks het beperkte zoekgebied en de beperkte zoek-tijd, lukte het bij 80% van de vallenparen om woelmuiskeutelhoopjes te vinden. Elk hoopje werd verondersteld van één woelmuissoort afkomstig te zijn. Per raai zijn tussen de 7 en 10 eDNA-keutelmonsters (van ieder vijf keutels) geanalyseerd in het laboratorium van SPYGEN. Met de eDNA-methodiek werd Noordse woelmuis in alle tien onderzochte raaien aangetoond (100% trefkans per raai), terwijl met inloopvallen de soort slechts in zeven raaien was gevangen (70% trefkans per raai). Wanneer per vallenpaar gekeken wordt, blijkt de Noordse woelmuis in 42% van de vallenparen gevangen te zijn. Ter vergelijking, bij 80% van alle vallenparen werden keutels gevonden, waarvan 93% van de Noordse woelmuis bleek te zijn en 7% geen uitslag gaf (door degradatie of vermenging van DNA met andere soorten). Dit betekent dat via de keutel/eDNA methode bij 74% van de onderzochte vallenparen Noordse woelmuizen werden aangetoond (fig. 1).

Hoeveel monsters?

De resultaten van deze studie laten zien dat met de eDNA-methode de Noordse woelmuis effectiever te inventariseren is dan met traditioneel veldwerk met inloopvallen. In het onderzochte gebied lijkt het verzamelen en analyseren van 4 à 5 keutel-

monsters per 'locatie' genoeg voor een 100% trefkans. In gebieden waar ook andere woelmuissoorten voorkomen moeten mogelijk meer keutelmonsters verzameld worden, omdat de kans dat verzamelde keutels werkelijk van de Noordse woelmuis zijn afneemt. Dit dient onderzocht te worden, net als de mogelijkheid om dichtheden te bepalen aan de hand van het aantal aangetroffen keutelhoopjes in een gebied. Overigens is het aantonen van Veldmuis of Aardmuis in potentieel Noordse woelmuis habitat ook van grote waarde, omdat de aanwezigheid van deze soorten de kans op aanwezigheid van Noordse woelmuis aanzienlijk verkleint (La Haye & Drees, 2004).

Kostenvergelijking

Een globale berekening laat zien dat de eDNA-methode, uitgaande van het verzamelen en analyseren van vijf keutelmonsters per locatie, het inventariseren ca. 50% goedkoper maakt in vergelijking met inloopvallenonderzoek. Een alternatief is meerdere keutelhoopjes van één locatie samenvoegen in een mengmonster en te analyseren. De analyse kosten van een mengmonster liggen grofweg zeven keer hoger dan die voor individuele monsters, maar uiteindelijk nog altijd ca. 35% goedkoper dan inloopvallenonderzoek. Bij een gelijkblijvend onderzoeksbudget kunnen met behulp van eDNA meer locaties worden geïnventariseerd dan via inloopvallen. Bovendien is de zekerheid over aan- of afwezigheid van de Noordse woelmuis groter, omdat de trefkans per bemonsterde locatie hoger is (fig. 1).

Een bijkomend voordeel van de eDNA-methode boven gebruik van inloopvallen is dat er geen onbedoelde sterfte meer optreedt onder de gevangen Noordse woelmuizen en bijvangst van andere soorten kleine zoogdieren, en dan vooral onder spitsmuizen. Anderzijds wordt er met eDNA geen informatie verzameld over de aanwezigheid van andere kleine zoogdieren.

Naar de toekomst

Dit onderzoek toont aan dat het inventariseren van Noordse woelmuizen met de eDNA-methode een hogere trefkans tegen lagere kosten biedt. Zeker in gebieden waar de Noordse woelmuis onder druk staat en de populaties veelal klein zijn, zoals de Alde Feanen in Friesland, biedt de eDNA-methodiek perspectief voor groot-schalige inventarisaties. Voor projecten

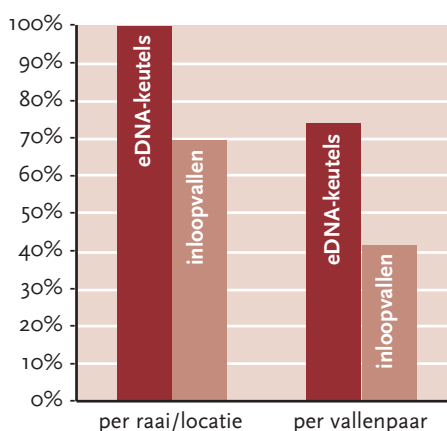


Fig. 1. Trefkansens middels eDNA-methode met keutelmonster en inloopvallen. Per locatie zijn 7 tot 10 eDNA keutelmonsters geanalyseerd en 20 inloopvallen gebruikt. Per vallenpaar gaat het om twee vallen en 1 eDNA keutelmonster, bestaande uit vijf keutels.

waar naast woelmuizen ook andere soorten kleine zoogdieren aangetoond moeten worden, zoals bijvoorbeeld de Waterspitsmuis (*Neomys fodiens*), blijft onderzoek met inloopvallen noodzakelijk. Vooral nog is er geen eDNA methode beschikbaar om ook andere soorten kleine zoogdieren effectief aan te tonen. Meer lezen over de toepassingsmogelijkheden van eDNA? Download op www.environmental-dna.nl het uitgebreide review dat afgelopen zomer is verschenen (Herder et al., 2014b).

Literatuur

Barbosa, S., J. Pauperio, J.B. Searle & P.C. Alves, 2013. Genetic identification of Iberian rodent species using both mitochondrial and nuclear loci: application to noninvasive sampling.

Bergers, P. & M. La Haye, 2000. Kleine zoogdieren betrouwbaarder en efficiënter inventariseren. *De Levende Natuur* 101(2): 52-58.

Haye, M. La & J.M. Drees, 2004. Beschermingsplan Noordse woelmuis. Rapport EC-LNV nr. 270. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. Den Haag.

Herder, J.E., J. van Delft, E. Bellemain & A. Valentini, 2013a. Environmental DNA krachtig gereedschap voor het monitoren van fauna. *De Levende Natuur* 114(3): 108-113.

Herder, J.E., D. Bekker, R. Koelman & E. Bellemain, 2013b. Noordse woelmuis en waterspitsmuis beter in beeld - met eDNA op het goede spoor. *Zoogdier* 24-2: 8-10.

Herder, J.E., J. Kranenbarg, M. Beers, I. Bogerd & B. van der Wal, 2014a. DNA heeft de toekomst – environmental DNA alternatief voor de KRW-visstandbemonstering? *Visionair* 34: 8-11.

Herder, J.E., A. Valentini, E. Bellemain, T. Dejean, J.J.C.W. van Delft, P.F. Thomsen & P. Taberlet, 2014b. Environmental DNA - toepassingsmogelijkheden voor het opsporen van (invasieve) soorten. Stichting RAVON, Nijmegen. Rapport 2013-104.

Noordse woelmuis is beter te inventariseren met eDNA (foto: Jelger Herder).

Riaz, T., W. Shehzad, A. Viari, F. Pompanon, P. Taberlet & E. Coissac, 2011. EcoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 39 (21) e145.

Dankwoord

Natuurmonumenten wordt bedankt voor het onderzoek in haar terreinen. Het onderzoek is medegefinancierd door NEM en LIFE+ project Mehelyi.

MSc. J. E. Herder
RAVON
Postbus 1413
6501 BK Nijmegen
J.Herder@ravon.nl

Dr. E. Bellemain
SPYGEN

Ir. R.H. Witte
Bureau Endemica

Drs. D.L. Bekker & Ir. M.J.J. La Haye
Zoogdiervereeniging

Keutelhoopjes van woelmuizen zijn goed te vinden in het veld; eDNA uit keutelhoopjes vraadt welke woelmuizen voorkomen in een gebied (foto: Jelger Herder).

