

Environmental DNA – een nieuwe inventarisatiemethode

Jelger Herder, Jeroen van Delft & Tony Dejean

Voor bescherming van soorten en evaluatie van beheer- en herstelmaatregelen is kennis nodig over hun verspreiding. Die kennis is, zeker voor een aantal lastig waarneembare aquatische soorten, niet eenvoudig te verzamelen. De methode environmental DNA (eDNA), biedt daarvoor sinds kort een uitkomst. RAVON werkt samen met Spygen, het Franse onderzoeksbureau opgericht uit de onderzoeksgroep die de methode ontwikkeld heeft, aan het ontwikkelen van toepassingen met eDNA. In dit artikel wordt de methode toegelicht aan de hand van de pilot naar het gebruik van eDNA voor het detecteren van grote modderkruipers. Daarnaast illustreren we de kracht ervan aan de hand van enkele voorbeelden en tot slot geven we een inkijkje in ons huidige onderzoek en een blik op de toekomst.

Zoet water behoort tot één van de meest bedreigde habitats ter wereld. Uit de nieuwe Europese Rode Lijsten van de IUCN blijkt dat maar liefst 37% van de Europese vissen en 23% van de amfibieën bedreigd is op Europese schaal (Freyhof & Brooks, 2011; Temple & Cox, 2009). Het inventariseren van soorten die onder de waterspiegel leven, vereist een grote inspanning. In tegenstelling tot bijvoorbeeld vogels zijn deze soorten vaak moeilijk of niet zichtbaar. Ze moeten veelal gevangen worden om hun aanwezigheid aan te tonen. Daarnaast zijn een aantal soorten door hun verborgen levenswijze, of het voorkomen in lage dichtheden, moeilijk in kaart te brengen. Environmental DNA (eDNA), biedt daarvoor een uitkomst.



Onderzoeklocaties eDNA pilot grote modderkruiper

De methode is gebaseerd op het feit dat alle soorten die in het water leven in dat water DNA achter laten via urine, faeces en huidcellen. Door watermonsters te verzamelen en te analyseren op DNA van een specifieke doelsoort, is de aanwezigheid van deze



Grote modderkruiper (Foto: Jelger Herder)

Hoe werkt het?

De eDNA-methode is gebaseerd op het feit dat alle in het water levende organismen in water DNA achterlaten. Dit DNA kan in watermonsters worden aangetoond met behulp van zogenaamde soortspecifieke primers, die voor iedere doelsoort apart ontwikkeld moeten worden. Dit zijn korte stukjes DNA die enkel hechten aan het DNA van de doelsoort. Vervolgens wordt via een Polymerase Chain Reaction (PCR) alleen dat DNA vermenigvuldigd, dat aan de primers gebonden is. Na vermeerdering via de PCR wordt het product aangebracht op een gel, waarop enkel indien er DNA van de soort aanwezig is, een streepje zal verschijnen. Zie voor een uitgebreide beschrijving van de methode en de PCR-reactie de website: www.environmental-dna.nl.

doelsoort aan te tonen (Zie kader “Hoe werkt het?”). De methode is in 2008 voor het eerst beschreven en toegepast door een Franse onderzoeksgroep bij de Amerikaanse brulkikker. In zes wateren waarvan bekend was dat de Amerikaanse brulkikker er voorkwam, werd de aanwezigheid van DNA van deze soort vastgesteld en daarmee het voorkomen van de soort bevestigd (Ficetola *et al.*, 2008). Aanvullend onderzoek toonde aan dat vrij in het water aanwezig DNA, in minder dan drie weken afgebroken is. De aanwezigheid van DNA van een doelsoort in een water, wijst dus op de recente aanwezigheid van deze soort (Dejean *et al.*, 2011).

Pilot environmental DNA grote modderkruiper

Voor onze eerste pilot viel de keuze op de grote modderkruiper, een soort die door haar verborgen levenswijze lastig te inventariseren is. De trefkans bij een éénmalige bemonstering met traditionele methoden zoals schepnet, elektrisch vissen of fuiken is relatief laag, zeker wanneer de soort in lage



dichtheden voorkomt (Spikmans *et al.*, 2008). Voor onze Franse collega's was dit interessant, omdat het ook bij hen een zeldzame soort is en ze er nog geen primers voor hadden.

Voor het ontwikkelen van de primers is DNA verzameld van acht verschillende Nederlandse populaties van de grote modderkruiper. Hierbinnen is gezocht naar een stukje DNA-code dat binnen alle populaties gelijk is, zodat de primers zullen werken bij alle populaties van deze soort. Vervolgens is gezocht naar



De grote modderkruiper blijkt goed aan te tonen met behulp van eDNA
(Foto: Jelger Herder)

een stukje DNA dat uniek is voor de grote modderkruiper. Hiervoor is het DNA van de grote modderkruiper vergeleken met het DNA van 44 andere Nederlandse vissoorten en daarnaast met DNA-codes uit Genbank, een online database met reeds bekende DNA-codes. De gevonden primers zijn vervolgens getest op het weefsel van de grote modderkruiper en de 44 andere vissoorten, waarbij ze goed bleken te werken.

De laatste stap is het testen van deze primers op watermonsters uit het veld. Verspreid over Nederland zijn watermonsters verzameld van vier locaties waar de grote modderkruiper in hoge dichtheid voorkomt, vier locaties waar de soort in lage dichtheid voorkomt en vier locaties waar de soort niet voorkomt. De controlewateren dienen om te testen of er niet onbedoeld DNA van een verkeerde soort vermeerderd wordt door de primers. De grote modderkruiper werd op alle vier de locaties met hoge dichtheid en op drie van de vier locaties met lage dichtheid succesvol aangetoond. Dit komt neer op een trefkans van 87,5% op basis van één kort bezoek om de watermonsters te verzamelen. De controlewateren scoorden, zoals verwacht, negatief. Dat



Het nemen van een eDNA-monster (Foto: Jelger Herder)



De Rijnstrangen bij Zevenaar; zelfs in een dergelijk groot open water, waar met een combinatie van traditionele middelen slechts met moeite een enkele grote modderkruiper kan worden gevangen, werkt de eDNA methode (Foto: Jelger Herder)



bevestigt dat de primers soortspecifiek zijn (Herder, 2011; Herder *et al.*, 2012).

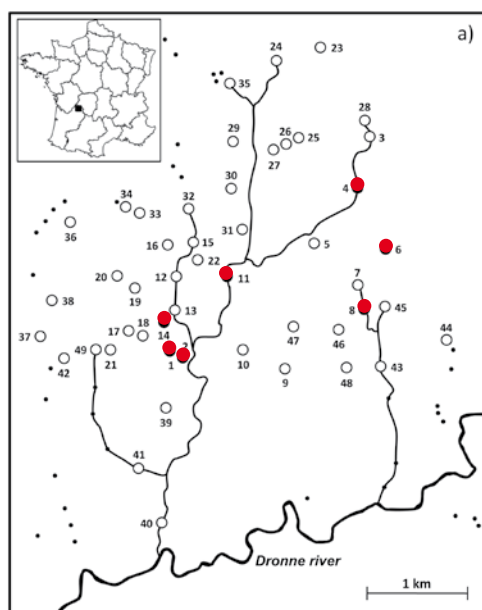
De kracht van environmental DNA

Er zijn inmiddels een aantal studies die de kracht van eDNA aantonen. In de Verenigde Staten werden invasieve grootkopkarpers en zilverkarpers met behulp van eDNA aangetoond, in

groot open water. Dat was voorbij een elektrische barrière die moest dienen om deze exoten tegen te houden. Op basis van traditionele bemonsteringen werd aangenomen dat deze elektrische barrière nog niet door de vissen gepasseerd was. Naar aanleiding van de eDNA-resultaten heeft men maar liefst 93 mandagen elektrisch gevestigd, waarna

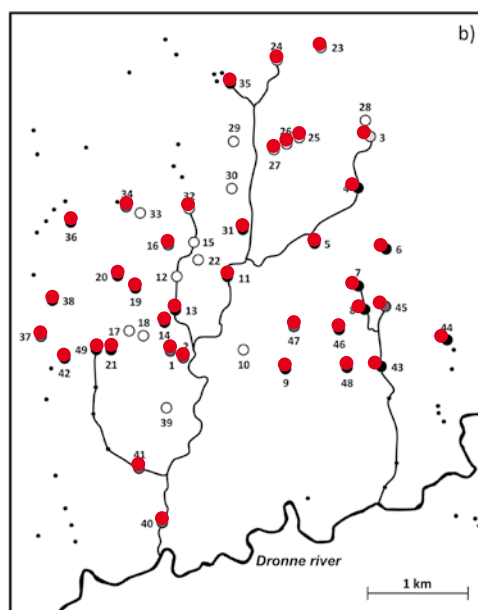
de aanwezigheid voorbij de barrière bevestigd werd met de vangst van een enkele zilverkarp (Jerde *et al.*, 2011). In een Deense studie zijn acht wateren onderzocht waaruit de knoflookpad bekend was, maar in het voorjaar niet was aangetroffen met behulp van traditionele methoden zoals luisteren en het zoeken naar larven. In maar

Eitjes, larven, roepende dieren



7/49 wateren = 14 procent

Environmental DNA



38/49 wateren = 78 procent

De Amerikaanse brulkikker in Midden-Frankrijk. Bij monitoring met behulp van traditionele methoden, zoals het zoeken van (roepende) volwassen dieren, larven en eitjes, werden in 7 van de 49 onderzochte wateren brulkikkers aangetoond (kaartje links). Met behulp van eDNA werd vastgesteld dat maar liefst 38 van de 49 wateren gekoloniseerd waren door brulkikkers (Dejean *et al.*, in press). De kleine stippen betreffen niet-onderzochte poelen.



liefst vijf van de acht wateren bleek met behulp van eDNA dat er toch nog knoflookpadden zaten (Thomsen *et al.*, 2011).

In Frankrijk heeft Spygen een vervolgstudie uitgevoerd naar de verspreiding van de Amerikaanse brulkikker. Deze invasieve exoot werd reeds intensief gemonitord in de regio. Met traditionele methoden, zoals het zoeken van eieren, larven en roepende dieren, waren brulkikkers aangetroffen in zeven van de 49 onderzochte wateren. Een vervolgstudie met eDNA liet zien dat de brulkikker echter in maar liefst 38 wateren voorkwam. Ook werd berekend dat de bemonstering met eDNA 2,5 keer goedkoper en 2,5 keer minder tijd kostte dan de traditionele bemonstering. De berekening is gebaseerd op veldwerk met twee personen en een complete moleculaire analyse (Dejean *et al.*, in press).

Ook in stromend water blijkt de methode succesvol. Bij een studie in een snelstromende beek werden de zeldzame Rocky mountain staartkikker (*Ascaphus montanus*) en de Idaho reuzensalamander (*Dicamptodon aterrimus*) op vijf locaties succesvol aangetoond met een trefkans van

respectievelijk 100% en 80% (Goldberg *et al.*, 2011).

Een stap dicht bij dichtheden

Waar bij de oorspronkelijke toepassing enkel iets was te zeggen over de aan- of afwezigheid van een soort, is het inmiddels ook mogelijk iets te zeggen over relatieve dichtheden. Via kwantitatieve PCR (qPCR) is het nu mogelijk een waarde te krijgen voor de hoeveelheid DNA van de doelsoort in een watermonster. Uit zowel lab- als veldexperimenten blijkt deze hoeveelheid DNA significant positief gecorreleerd te zijn aan de dichtheid van de doelsoort (Thomsen *et al.*, 2011). Hoe een bepaalde hoeveelheid DNA zich verhoudt tot de absolute dichtheid van een doelsoort, wordt nog verder onderzocht. Dit is mede afhankelijk van de hoeveelheid DNA die een doelsoort achterlaat, de tijd van het jaar waarop gemonsterd wordt (bij een hogere activiteit verwachten we meer DNA) en factoren die de afbraak van DNA in een water bepalen, zoals de pH, temperatuur en aanwezige micro-organismen. Wel is het al mogelijk om relatieve dichtheden te bepalen door in dezelfde tijd van het jaar monsters te verzamelen en de onderlinge

verschillen te vergelijken. Hiermee is het mogelijk om kernpopulaties van marginalere populaties te onderscheiden.

Onderzoek en toekomst

De eDNA-methode is een doorbraak in het onderzoek naar in het water levende soorten. De studies tot nu toe laten zien dat de trefkans stukken hoger is dan die bij traditionele methoden. Met name bij lastig te detecteren soorten en soorten die in lage dichtheden voorkomen, kan dit tot forse tijds- en daarmee kostenbesparing leiden. Zeldzame bedreigde soorten kunnen beter in kaart gebracht worden en oprukkende invasieve exoten kunnen al in een vroeg stadium gesignaleerd worden. De methode heeft veel potentie, maar moet voor veel soorten nog ontwikkeld en getest worden. RAVON werkt samen met Spygen en andere PGO's aan de ontwikkeling van primers voor meer soorten. Daarnaast wordt er continu gewerkt aan het verbeteren van de monstermethode en doen we onderzoek naar de precieze relatie tussen de hoeveelheid DNA in het water en de dichtheid van soorten. Tot slot werken we aan een tweede



Uit labexperimenten is gebleken dat de hoeveelheid kamsalamander-DNA in het water significant gecorreleerd is aan de dichtheid van kamsalamanders ter plaatse (Thomsen *et al.*, 2011) (Foto: Jelger Herder)



methode waarmee het mogelijk is een hele soortenlijst te genereren vanuit één watermonster. Hierbij wordt gebruik gemaakt van universele primers. Deze richten zich niet op een doelsoort, maar vermenigvuldigen al het eDNA in een watermonster. Vervolgens worden de DNA-codes van alle losse stukjes DNA uitgelezen met behulp van een multisequencer. Dat is een apparaat dat van alle DNA-moleculen de code ontrafelt en opslaat in een databestand. De gevonden DNA-codes worden daarna geautomatiseerd vergeleken met een databank van bekende DNA-codes. Op deze manier kan een soortenlijst worden gegenereerd. Het genereren van complete soortenlijsten voor vissen en amfibieën uit eDNA-monsters is inmiddels succesvol getest in Frankrijk. Ook hebben onze Franse partners bij een vergelijkbare studie in kaart gebracht van welke plantensoorten bijen nectar verzamelen, door het DNA uit de honing te analyseren (Valentini *et al.*, 2009). Momenteel testen we de methode waarbij een hele soortenlijst gegenereerd wordt ook in Nederland. De verwachting is dat het in de toekomst met deze methode mogelijk is om, naast de soortensamenstelling, ook dichtheden per soort te bepalen. Hiermee zou de eDNA-methode een belangrijke stap zijn bij het nauwkeurig in kaart brengen en monitoren van watergebonden soorten en daarmee een opmaat naar een betere bescherming.

Dit jaar in de praktijk

RAVON zet de eDNA-methode dit jaar bij meerdere projecten in. In het kader van het NEM Verspreidingsonderzoek Reptielen en Amfibieën zullen, in opdracht van de Gegevensautoriteit Natuur, alle historische vindplaatsen van de knoflookpad op het niveau van 10x10 km-hokken worden geactualiseerd met behulp van eDNA. Hierbij zitten ook locaties waarvan wordt aangenomen dat de knoflookpad is uitgestorven. Met dit onderzoek zal een volledig verspreidingsbeeld worden verkregen van de knoflookpad in Nederland, waardoor de soort



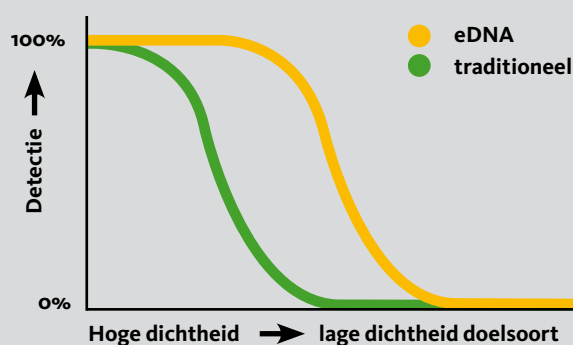
Vrijwilliger op zoek naar de grote modderkruiper in het Rijswijkse Veld
(Foto: Jelger Herder)

Voordelen eDNA

- Hogere detectiekans: eDNA is veel gevoeliger dan traditionele bemonsteringsmethoden, met name bij lage dichtheden en moeilijk te detecteren soorten. Hierdoor zijn ook de nulwaarnemingen waardevoller.
- Kostenefficiënt: het bemonsteren vraagt veel minder tijd dan de traditionele methoden en is inclusief labanalyse daardoor ook goedkoper.
- Nauwkeuriger: door soortspecifieke primers zijn determinatiefouten uitgesloten.
- Geen verstoring: voor het aantonen van kwetsbare soorten is het niet nodig deze te vangen.

Voordelen traditionele methoden

- Verzamelen en monitoren van lengte, leeftijdsopbouw en conditie van soorten.
- Feeling met de soorten: door de soorten werkelijk te vangen, te zien en te fotograferen creëer je draagvlak.
- Enthousiaste en deskundige vrijwilligers: duizenden vrijwilligers doen jaarlijks geweldig werk door het verzamelen van verspreidingsgegevens. Environmental DNA vormt hier een gerichte aanvulling op en kan het werk ondersteunen, maar geenszins vervangen!



Deze grafiek toont schematisch de trefkans met traditionele methoden (groen) en eDNA (oranje) bij een afnemende dichtheid van de doelsoort. Bij lagere dichtheden neemt de trefkans met traditionele methoden veel sneller af dan die met eDNA.



beter beschermd kan worden. Een tweede project waarbij eDNA zal worden ingezet is de monitoring van de Amerikaanse brulkikker in Baarlo. Hier zal in opdracht van het Team Invasieve Exoten met behulp van eDNA onderzocht worden of de soort nog voorkomt buiten het reeds bekende verspreidingsgebied. Daarnaast staan er verscheidene projecten gepland waarbij met behulp van eDNA lokaal de verspreiding van onder andere de grote modderkruiper in kaart zal worden gebracht.

Summary

Environmental DNA: a new technique for the inventory of freshwater species

We describe the use of environmental DNA for detecting the presence of freshwater species. Often, their secretive behavior or low density prevents this. Compared with traditional methods, the presence of a species can be implied with far more certainty. This novel approach is based on the limited persistence of a species' DNA in the environment. The DNA may come from shed skin cells, faeces or urine. By taking a water sample and analysing its DNA content, the presence or absence of a target species can be ascertained. RAVON and the French scientists who developed this technique a few years ago, have collaborated to improve the method with regard to new primers (pieces of DNA that bind and help to amplify the environmental DNA in the sample for further analysis), sampling strategy and other field practices. We give the results of a successful pilot study to detect the rare and secretive Weatherfish (*Misgurnus fossilis*). Using the environmental DNA technique, we were able to detect the fish in all four waters where the species was known to be at a high density and three out of four waters where it was present at a low density. No Weatherfish DNA was found in the samples of four waters in which the fish did not occur. We give an overview of the strength of the new method, as well as our goals for the future.

Literatuur

Dejean, T., A. Valentini, A. Duparc,
S. Pellier-Cuit, F. Pompanon, P. Taberlet



Met behulp van eDNA zal het in de toekomst mogelijk zijn oprukkende exoten, zoals de Kesslers grondel (boven) en zwartbekgrondel (onder) in een vroeg stadium te signaleren (Foto's: Jelger Herder)





Dit jaar zal met behulp van eDNA een grote slag geslagen worden bij het actualiseren van de verspreiding van de knoflookpad (Foto: Jelger Herder)

- & C. Miaud, 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE*, 6, e23398
- Dejean, T., A. Valentini, C. Miquel, P. Taberlet, E. Bellemain & C. Miaud, 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Journal of applied ecology*. In press.
- Ficetola G., C. Miaud, F. Pompanon & P. Taberlet, 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4: 423-425.
- Freyhof, J. & E. Brooks, 2011. European Red List of Freshwater Fishes. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Goldberg, C.S., D.S. Pilliod, R.S. Arkle & L.P. Waits, 2011. Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. *PLoS ONE* 6(7): e22746. doi:10.1371/journal.pone.0022746
- Herder, J. E., 2011. Pilot environmental DNA grote modderkruiper. Stichting RAVON, Nijmegen. Rapport 2011-102.
- Herder, J.E., A. Valentini & J. Kranenbarg, 2012. Detectie van grote modderkruipers met behulp van environmental DNA. *H2O* 45(3): 25-27.
- Jerde, C.L., A.R. Mahon, W.L. Chadderton & D.M. Lodge, 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* 00 (2011) 1-8.
- Spikmans, F., T. de Jong, F.G.W.A. Ottburg & J. Kranenbarg, 2008. Methodiek en richtlijnen voor verspreidingsonderzoek naar bittervoorn, kleine modderkruiper en grote modderkruiper. Stichting RAVON, Nijmegen.
- Temple, H.J. & N.A. Cox, 2009. European Red List of Amphibians. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Thomsen, P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M.T.P. Gilbert, L. Orlando & E. Willerslev, 2011. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x
- Valentini A., F. Pompanon & P. Taberlet, 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trend in Ecology and Evolution* 24, 110-117.

Jelger Herder & Jeroen van Delft

RAVON

Postbus 1413

6501 BK Nijmegen

j.herder@ravon.nl

Tony Dejean

SPYGEN

12, allée du Lac de Garde

Bâtiment House Boat n°7, Savoie

Technolac - BP 274

73375 Le Bourget du Lac Cedex, France

