

environmental DNA

Toepassingsmogelijkheden voor het opsporen van (invasieve) soorten



Colofon

© 2014 Stichting RAVON, Nijmegen

Tekst: Jelger Herder¹, Alice Valentini², Eva Bellemain², Tony Dejean², Jeroen van Delft¹, Phillip Francis Thomsen³ en Pierre Taberlet⁴.

¹ Stichting RAVON

² SPYGEN

³ Center for GeoGenetics - Natural History Museum of Denmark, University of Copenhagen

⁴ Laboratoire d' Ecologie Alpine (LECA)

Foto omslag: eDNA monstername - © Jelger Herder

Overige foto's binnenwerk - © Jelger Herder

Vertaling naar Nederlands - Martijn Schiphouwer & Jelger Herder.

In opdracht van: Bureau Risicobeoordeling & Onderzoeksprogrammering (BuRO), onderdeel van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit.

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

Inhoud

	Samenvatting	5
1	Inleiding	11
	1.1 Waarom dit rapport?	11
	1.2 Definities	12
	1.3 Doel van dit rapport	12
	1.4 Leeswijzer	14
2	Wat is eDNA?	15
	2.1 Oorsprong van eDNA in het milieu	15
	2.2 Persistentie van eDNA in verschillende milieus	15
	2.3 Factoren die de hoeveelheid DNA beïnvloeden	16
	2.4 Beperkingen van eDNA	17
3	Hoe wordt een enkele soort met eDNA gedetecteerd?	19
	3.1 Primerontwerp en -validatie voor soortspecifieke eDNA primers	19
	3.2 Methoden en strategieën van monsternamen	22
	3.3 Belang van ecologische kennis	27
	3.4 Opslag	28
	3.5 Analyse van monsters	28
	3.6 Kwaliteitscontrole en basiseisen aan het lab	32
4	Hoe kan met een eDNA monster een soortenlijst worden gegenereerd?	35
	4.1 Meervoudige soortspecifieke benadering	35
	4.2 Universele benadering via eDNA metabarcoding	36
5	Welke andere potentiële technieken zijn er voor DNA onderzoek?	41
	5.1 Laser Transmission Spectroscopy (LTS)	41
	5.2 Microarray (of DNA chip)	43
6	Kan de dichtheid van soorten worden ingeschat met de eDNA methode?	45
	6.1 Dichtheidsbepalingen met de soortspecifieke benadering	45
	6.2 Dichtheidsbepalingen met de universele benadering	47
7	Wat is de betrouwbaarheid van de eDNA methode?	49
	7.1 Betrouwbaarheid	49
	7.2 Detectie van niet-doelsoorten	50
	7.3 Contaminatie	51
	7.4 Persistentie van DNA in het milieu	51
	7.5 Overige verklaringen voor de aanwezigheid van DNA	51
	7.6 Ontoereikende gevoeligheid	54
	7.7 Het falen van de methode	55
	7.8 Slechte DNA kwaliteit	55
	7.9 Het DNA van de doelsoort is niet verzameld	55
	7.10 Aanbevelingen voor de kwaliteitscontrole en vervolgonderzoek	55

8	Wat is de trefkans met de eDNA methode?	57
	8.1 Trefkans met de eDNA methode	57
	8.2 Analyseren van resultaten met behulp van occupancy modellen	60
	8.3 Trefkansen per soortgroep	60
9	In welke habitats kan de eDNA methode worden toegepast?	62
	9.1 Aquatische habitats	62
	9.1.1 Stilstaand zoetwater	62
	9.1.2 Stromend zoetwater	65
	9.1.3 Zoutwater	66
	9.2 Bodems en sedimenten	67
	9.3 Diersporen	69
	9.4 eDNA verzamelaars	69
	9.5 Factoren die van invloed zijn op de trefkans met eDNA	70
10	Hoe lang duurt de analyse en wat zijn de kosten?	73
	10.1 Tijd van monstername tot resultaat	73
	10.2 Kosten van de eDNA methode	73
	10.3 Kostenefficiëntie eDNA in vergelijking met traditionele methoden	74
11	Invasieve exoten en eDNA	79
	11.1 Het belang van vroege signalering van invasieve exoten	79
	11.2 Vroege signalering met de eDNA methode	80
	11.3 Perspectieven voor de toepasbaarheid eDNA voor invasieve soorten	82
12	Conclusies en aanbevelingen	93
	12.1 Voordelen van de eDNA methode	93
	12.2 Nadelen van de eDNA methode	96
	12.3 De huidige toepasbaarheid van de eDNA methode	98
	12.4 Perspectieven voor de toekomst	98
	12.5 Vervolgonderzoek	100
	Literatuur	101



Samenvatting

Inleiding

De methode om met environmental DNA (eDNA) de verspreiding van soorten te bepalen is een relatief nieuwe benadering. Met deze methode is het mogelijk soorten te detecteren zonder ze daadwerkelijk waar te nemen of te vangen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van zeer gevoelige technieken om soorten te detecteren aan de hand van extracellulair DNA of celrestanten die soorten in het milieu achterlaten. In water breekt eDNA binnen enkele dagen tot een maand af. Het aantonen van eDNA in een watermonster wijst dus op de recente aanwezigheid van de betreffende soort. In andere milieus dan water, zoals bodems en sedimenten, blijft eDNA veel langer detecteerbaar. Afhankelijk van de condities kan dit wel oplopen tot honderdduizenden jaren. Hierdoor is het in deze milieus moeilijker om uitspraken te doen over de recente aanwezigheid van soorten op basis van eDNA (H2.2). Factoren die van invloed zijn op de afbraak van eDNA, en dus ook op de kans op detectie van eDNA, zijn de aanwezigheid van water (middels DNA-hydrolyse), endogene nucleasen, UV-straling, bacteriën en schimmels (H2.3).

eDNA: één soort of een complete soortenlijst?

Er zijn twee benaderingen met de eDNA-methode, een soortspecifieke benadering en een benadering die zich richt op het detecteren van meerdere soorten tegelijk.

De eerste benadering richt zich op een enkele soort (H3). Hierbij wordt eDNA in een monster middels een polymerase-kettingreactie (PCR) of kwantitatieve PCR (qPCR) en met gebruikmaking van soortspecifieke primers geanalyseerd. Enkel wanneer er DNA van de doelsoort in het monster aanwezig was, zal er DNA vermeerderd worden in de PCR. Het ontwikkelen en testen van deze soortspecifieke primers vormt een cruciaal onderdeel van een betrouwbare methode. De primers dienen zich te richten op een kort DNA-fragment, omdat door afbraak van DNA in het milieu de meeste eDNA-fragmenten korter zijn dan 150 basenparen. Dit vergt daarmee een heel andere aanpak dan bij regulier DNA-onderzoek aan planten en dieren, waarbij van een grote hoeveelheid, hoog kwalitatief weefsel, zoals bloed, huid, bladfragment of wangslim, gebruik wordt gemaakt. De primers worden allereerst *in silico* getest: hierbij worden de primers bioinformatisch getest tegen alle bekende sequenties in publieke en private databanken. Gezocht wordt naar primers die enkel DNA van de doelsoort vermeerderen en geen DNA van niet-doelsoorten. Ten tweede worden de primers *in vitro* getest. Hierbij wordt de werking van de primers in het lab getest op weefsel van de doelsoort en weefsel van nauwverwante soorten (controle). Tot slot worden de primers *in situ* getest. Hierbij wordt de eDNA methode idealiter op minimaal drie locaties met een lage dichtheid van de doelsoort, drie locaties met een hoge dichtheid en op drie locaties waar de doelsoort afwezig is, getest. Hiermee kan de werking van de methode worden geëvalueerd en kan de trefkans worden ingeschat (H3.1).

De tweede benadering richt zich op het gelijktijdig detecteren van een (groot) aantal soorten (H4). Hiervoor zijn twee methoden te gebruiken; de meervoudige soortspecifieke benadering en de universele benadering. Bij de meervoudige soortspecifieke benadering wordt gewerkt met enkele soortspecifieke primers. Deze benadering beperkt zich noodzakelijkerwijs tot het gelijktijdig detecteren van slechts enkele soorten, doordat de hoeveelheid eDNA in een monster beperkt is. Daarnaast is een andere belangrijke beperking dat het een *a priori* methode is, waarbij enkel soorten waarvoor soortspecifieke primers ontwikkeld en gebruikt zijn, zullen worden gedetecteerd (H4.1). Bij de universele benadering worden primers gebruikt die het DNA van een complete groep soorten vermeerderen (b.v. vissen, amfibieën of kreeftachtigen). Na vermeerdering van het DNA in de PCR wordt het product gesequenced met een 'Next Generation Sequencer'.

De resulterende sequenties worden vergeleken met een referentiedatabase om een soortenlijst op te stellen, dit wordt eDNA-metabarcoding genoemd (H4.2). eDNA-metabarcoding is een zeer krachtige techniek om een groot aantal soorten van verschillende soortgroepen te detecteren, zonder dat bekend is welke soorten er mogelijk kunnen voorkomen. Hierdoor is de methode zeer geschikt voor exotensurveillance, bijvoorbeeld in ballastwater, slecht geïnventariseerde gebieden of bij soortgroepen waarvan nog weinig kennis bestaat.

Ervaringen in de praktijk

De eDNA-methode is inmiddels voor een groot aantal soorten verdeeld over een groot aantal verschillende soortgroepen succesvol toegepast (H8).

Eenzijds is het succes van de eDNA-methode afhankelijk van de onderzochte habitat. De methode is het best toepasbaar in aquatische habitats, doordat DNA zich in deze habitats door het oplossend vermogen van water over een iets groter oppervlak verspreidt. Daarnaast is de persistentie van eDNA in aquatische habitats relatief laag, waardoor het goed mogelijk is conclusies te trekken over de recente aanwezigheid van een soort. Binnen de aquatische habitats werkt de eDNA-methode beter in kleine en/of stilstaande wateren dan in grote en/of stromende wateren. Dit komt doordat in grote en/of stromende wateren het eDNA sterker verdund wordt, waardoor de trefkans afneemt (H9.1). De eDNA-methode is ook toepasbaar in sedimenten en bodems. In deze habitats kan de persistentie van eDNA echter lang zijn, waardoor het onduidelijk kan zijn of DNA afkomstig is van recente of historische aanwezigheid van een doelsoort. Daarnaast verspreidt eDNA zich niet in bodems, waardoor de kans dat er eDNA van een doelsoort verzameld wordt afneemt (H9.2). Ook is het mogelijk om uitwerpselen van dieren te onderzoeken met eDNA, om vast te stellen van welke soort ze afkomstig zijn (H9.3). Tot slot kunnen ook zogenaamde “eDNA-verzamelaars” gebruikt worden. Dit zijn organismen die zich voeden met andere organismen en zo DNA van soorten verzamelen. Voorbeelden van dergelijke bronnen zijn honing van bijen, bloed uit bloedzuigers en braakballen en uitwerpselen van roofdieren (H9.4).

Anderzijds is het succes van de eDNA-methode afhankelijk van de eigenschappen van de onderzochte soort. Soorten die veel eDNA achterlaten in hun omgeving, zijn beter te detecteren dan soorten die weinig eDNA achterlaten. Zo laten amfibieën en vissen naar verwachting meer eDNA achter door hun slijmerige huid dan geleedpotigen met hun harde exoskelet. Ook speelt de voorkeurshabitat een rol. Soorten die leven in kleine geïsoleerde wateren zijn eenvoudiger te detecteren dan soorten die in grote rivieren leven of een semi-aquatische of terrestrische levenswijze hebben. Ook de dichtheid waarin een soort typisch voorkomt is van invloed. Zo komen territoriale soorten vaak in lage dichtheden voor, waardoor de trefkans lager is (H8.3).

Voordelen van de eDNA-methode

De belangrijkste voordelen van de eDNA-methode ten opzichte van traditionele methoden zijn de vaak hogere trefkans, geringe verstoring van doelsoort én habitat, vermindering van de kans op onbedoelde verspreiding van ziekten en exoten en de soortspecificiteit en potentieel hogere taxonomische resolutie (H12.1). Door de veelal hogere trefkans, met name bij zeldzame (lage dichtheid) en moeilijk waarneembare soorten, is een lagere onderzoeksinspanning nodig. Trefkansen met de eDNA methode liggen niet zelden tussen circa 75% en 98% (o.a. kamsalamander, knoflookpad, grote modderkruiper, Amerikaanse brulkikker, groene glazenmaker en gevlekte witsnuitlibel). Hierdoor is de methode voor veel soorten kosteneffectiever dan traditionele methoden (H10).

Nadelen van de eDNA-methode

De belangrijkste nadelen van de eDNA-methode ten opzichte van traditionele methoden zijn het lastig of niet kunnen vaststellen van dichtheden, geen onderscheid kunnen maken tussen hybriden en hun oudersoorten en het ontbreken van informatie over leeftijd, geslacht en conditie (H12.2). De relatie tussen de hoeveelheid eDNA en de dichtheid van een soort is meermaals onderzocht. In aquaria en mesocosmos-experimenten is een significante relatie gevonden (hoe hoger de dichtheid van de doelsoort, hoe meer eDNA). Onder natuurlijke omstandigheden spelen echter een groot aantal factoren een rol bij de afbraak en verdunning van eDNA. Daarnaast heeft de monsterstrategie ook een grote invloed op de hoeveelheid eDNA in de monsters (kans dat er dicht bij de doelsoort bemonsterd wordt). Tot op heden zijn er daarom in het veld slechts indicaties gevonden voor een verband tussen de hoeveelheid eDNA en de dichtheid van een soort, maar is een absolute dichtheid nog niet te geven. Hierbij dient vermeld te worden dat dit met traditionele methoden, zeker bij lage dichtheden, vaak ook niet mogelijk is (H6).

Toepasbaarheid in het exotenonderzoek

De eDNA-methode leent zich goed om ingezet te worden in onderzoeken naar invasieve exoten. Zoals bij alle soorten spelen ook bij exoten soortspecifieke eigenschappen en de habitats waarin exoten gezocht dienen te worden een rol bij de toepasbaarheid van de eDNA methode (zie onder het kopje “ervaringen in de praktijk” op de vorige pagina). Het vroeg signaleren van invasieve exoten en een snelle respons is cruciaal voor het succesvol voorkomen van vestiging of het verzachten van de negatieve gevolgen van invasies. In een vroeg stadium na de introductie komen soorten vaak nog in lage dichtheden voor, waardoor ze veelal over het hoofd worden gezien. De hoge trefkans met de eDNA-methode kan bijdragen aan een tijdige signalering. Daarnaast kan de eDNA-methode worden ingezet om beheersacties te plannen (waar zit de exoot precies?) en de resultaten van het beheer te evalueren (is een exoot echt weg?). De eDNA-methode is in binnen- en buitenland al succesvol ingezet voor een groot aantal exoten waaronder Amerikaanse brulkikker, Italiaanse kamsalamander en Rode Amerikaanse rivierkreeft. Daarnaast is de methode naar verwachting bruikbaar voor een groot aantal andere soorten (H11).

Toekomst en cruciale kwaliteitsborging

De eDNA-methode biedt grote mogelijkheden voor het monitoren van invasieve exoten en bedreigde inheemse soorten. Het is aannemelijk dat de methode, die reeds succesvol wordt toegepast in een groot aantal projecten, in de nabije toekomst zich nog verder zal ontwikkelen, waardoor de trefkans en betrouwbaarheid verder zal toenemen. Het is echter van belang er op te wijzen dat het werken met dergelijke kleine hoeveelheden DNA uitdagingen met zich meebrengt. Temeer omdat DNA met het blote oog niet waarneembaar is gedurende het proces van monsternamen tot en met analyse. Resultaten die behaald zijn in studies kunnen niet één op één vertaald worden naar andere studies waarbij met andere primers, monstermethoden, lab- en veld protocollen etc. gewerkt wordt. Het is cruciaal dat het hele proces van monsternamen tot en met de analyse voor een soort uitvoerig getest wordt, voordat de methode voor deze soort geïmplementeerd wordt in onderzoeken en toegepaste projecten. Hiernaast is een samenvattende checklist opgenomen met factoren die van invloed zijn op de betrouwbaarheid van eDNA-onderzoek.

Checklist betrouwbaar eDNA-onderzoek

Er zijn een groot aantal factoren die de betrouwbaarheid van de uitkomsten van een eDNA-onderzoek beïnvloeden. Deze worden in dit rapport uitvoerig besproken. Hieronder is een checklist gegeven waarin de belangrijkste factoren bondig benoemd worden. Tussen haakjes wordt het hoofdstuk of de paragraaf gegeven waar meer informatie wordt gegeven. Aanbieders en afnemers van de methode kunnen met behulp van deze checklist de betrouwbaarheid van een onderzoek inschatten.

Gebruikte primers: de gebruikte primers dienen zich te richten op korte DNA-fragmenten aangezien eDNA-fragmenten veelal niet groter zijn dan 150 basenparen. De primers dienen middels drie stappen gevalideerd te zijn (H3.1):

- In Silico: het ontwerpen en testen van de primers op de computer
- In Vitro: het testen van de primers in het lab op weefsel van de doelsoort en nauw verwante soorten
- In Situ: het testen van de primers op monsters uit het veld, verzameld op locaties met hoge en lage dichtheden van de doelsoort en ter controle ook op locaties waar de doelsoort afwezig is.

Trefkans: de kracht van de toegepaste methode, van monsternamen tot aan analyse, dient getest te worden, zodat de trefkans kan worden ingeschat. Deze trefkans is cruciaal voor het interpreteren van nulwaarnemingen (zat de soort er echt niet, of heeft de methode gefaald?). De trefkans dient op een aantal representatieve locaties getest te zijn (zowel bij hoge als lage dichtheden van de doelsoort als in verschillende habitats) (H8).

Aantal PCR-replica's: het aantal PCR-replica's dat wordt uitgevoerd op het monster, is van invloed op de trefkans. Een groot aantal PCR-replica's is aanbevolen (8 tot 12) om de trefkans te verhogen (H3.5).

Controle op inhibitie: organische stoffen kunnen ervoor zorgen dat DNA moeilijker of niet geëxtraheerd wordt. Hierop dient gecontroleerd te worden middels het toevoegen van een synthetisch gen, waarmee de aanwezigheid van inhibitoren kan worden vastgesteld (H3.5).

Negatieve controles extractie en PCR: bij zowel de extractie als de PCR worden negatieve controles meegenomen in de analyse. Op deze manier kunnen besmettingen van de monsters en gebruikte stoffen gedetecteerd worden (H3.6).

Positieve controle PCR: bij de PCR wordt een positieve controle meegenomen met DNA van de doelsoort. Zo kan gecontroleerd worden of de analyse goed is gegaan (H3.6).

Veldkennis / ecologische kennis: kennis van de ecologie van de soort en het daarop aanpassen van de bemonsteringsstrategie (waar en wanneer monsternemen) is cruciaal voor succes. Hoe dichter in de buurt van een soort gemonsterd wordt, hoe hoger de trefkans (H3.3 en kader 3.3).

Vervolg checklist betrouwbaarheid eDNA onderzoek

Lab ingericht voor het werken met eDNA: voor het werken met eDNA dienen dezelfde voorzorgsmaatregelen te worden genomen als die voor het werken met historisch DNA. De verschillende handelingen (extractie, toevoegen controles, PCR etc.) dienen in geïsoleerde, van elkaar gescheiden ruimtes plaats te vinden. Deze ruimtes hebben een eigen overdrukventilatie met voldoende verversing (voorkomt dat DNA uit andere ruimtes binnen kan komen) en UV behandeling (vernietigd DNA) (H3.6).

PCR of qPCR: qPCR heeft de voorkeur boven conventionele PCR, doordat de methode gevoeliger is en soortspecifieker (door het gebruik van een probe wordt het doel-DNA op drie i.p.v. twee locaties gecheckt, wat de kans op het vermeerden van DNA van niet-doelsoorten aanzienlijk vermindert) (Kader 3.4).

Meerdere soorten tegelijk: voor het gelijktijdig detecteren van meerdere soorten in één monster, zijn er twee methoden:

- Soortspecifieke benadering: hierbij worden voor iedere gezochte soort primers gebruikt, die enkel DNA van deze soort vermeerderen. Het nadeel is dat de hoeveelheid DNA dat uit een monster geëxtraheerd wordt beperkt is, waardoor er slechts een beperkt aantal soorten gelijktijdig geanalyseerd kan worden (tot ongeveer drie). Daarnaast is het een a priori benadering waarbij enkel soorten waarvoor primers zijn toegevoegd, gevonden zullen worden. (H4.1)
- Universele benadering: hierbij wordt gewerkt met primers die DNA van een soortgroep (bv. vissen of amfibieën) vermeerderen. Vervolgens wordt dit DNA gesequenced (uitgelezen) met behulp van Next Generation Sequencing en worden de uitgelezen sequenties gematched met een database om zo een soortenlijst te genereren. De voordelen zijn het grote aantal soorten dat gelijktijdig gedetecteerd kan worden en het feit dat ook onverwachte soorten (binnen de soortgroep waarop de primers zich richten) gedetecteerd zullen worden (H4.2).

Referentiedatabases: het gebruik van betrouwbare referentiedatabases is een pré. Publieke online databases met gensequenties zijn bruikbaar, maar bevatten een klein percentage determinatie- en sequencingfouten. Eigen referentiedatabases, mits goed gevalideerd, ondervangen dat (H4.2).

1 Inleiding

1.1 Waarom dit rapport?

De environmental DNA methode (afkorting: eDNA methode) is een relatief nieuwe benadering om de verspreiding van soorten te inventariseren. Hierbij wordt gebruik gemaakt van op DNA gebaseerde identificatie ofwel DNA barcoding om soorten te detecteren aan de hand van extracellulair DNA of celrestanten die in het milieu aanwezig zijn. Dit materiaal is afkomstig van celfbraak, excretie en secretie van levende organismen (Valentini *et al.*, 2009b). Met de eDNA methode is het mogelijk soorten te detecteren zonder deze daadwerkelijk waar te nemen of te vangen.

In 2008 werd de eDNA methode voor het eerst succesvol toegepast in onderzoek naar macroorganismen, waarbij de invasieve Amerikaanse brulkikker in verschillende Franse wateren werd gedetecteerd (Ficetola *et al.*, 2008). Sinds deze publicatie kwam het onderzoek naar de eDNA in een stroomversnelling. Wereldwijd is de methode door verschillende wetenschappers verder ontwikkeld en verbeterd. De toepassing heeft hierbij een steeds breder soortenbereik gekregen. Daarnaast zijn ook fundamentele vragen onderzocht, zoals de persistentie van eDNA in verschillende milieus (zie hoofdstuk 2 en 9), trefkansen (zie hoofdstuk 8) en de relatie tussen eDNA en populatiedichtheden (zie hoofdstuk 6). Verder zijn er multispecifieke eDNA methoden ontwikkeld waarbij, in plaats van een enkele doelsoort, een hele soortgroep of leefgemeenschap wordt geïnventariseerd (zie hoofdstuk 4). Uit verschillende onderzoeken blijkt dat, afhankelijk van de soort, de eDNA methode gevoeliger en kostenefficiënter is dan traditionele inventarisatiemethoden (zie hoofdstuk 10). Vanwege het grote potentieel om zeldzame soorten of invasieve exoten op te sporen is de methode inmiddels opgemerkt door een groot aantal organisaties op het gebied van onderzoek, waterbeheer, waterbeleid en natuurbescherming.

Dit rapport is samengesteld in opdracht van het Bureau Risicobeoordeling & Onderzoeksprogrammering (BuRO). Dit bureau, onderdeel van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit, geeft gevraagd en ongevraagd kennisonderbouwde adviezen aan de ministeries van Economische Zaken en Volksgezondheid, Welzijn en Sport. Het Team Invasieve Exoten (TIE) maakt deel uit van het BuRO en ondersteunt het ministerie van Economische Zaken bij het exotenbeleid. Dit beleid heeft als doelstelling schade door invasieve exoten te voorkomen of te verminderen. Dit wordt gedaan door surveillance en monitoring, risicobeoordeling, advisering, onderzoek, risicocommunicatie en, indien nodig en mogelijk, het initiëren van maatregelen. Wanneer exoten zich vestigen kan dit namelijk leiden tot ecologische, economische en maatschappelijke risico's en schade (zie hoofdstuk 11). Het BuRO is in het bijzonder geïnteresseerd in de eDNA methode als middel om de aanwezigheid en verspreiding van invasieve exoten (kosten)effectiever in kaart te brengen. Wanneer de introductie van een exoot in een vroeg stadium wordt opgemerkt, zijn de kansen het grootst om succesvol maatregelen te treffen. Het is daarom cruciaal om populaties van exoten te detecteren als de populaties nog klein en op beperkte schaal aanwezig zijn. Met de traditionele inventarisatiemethoden is het lastig om soorten te detecteren in dit vroege invasiestadium, de eDNA methode biedt daarom een goede aanvulling of alternatief. Omdat de eDNA methode relatief nieuw is, zijn er nog steeds veel vragen rond de mogelijkheden en beperkingen. In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de toepassingen en beperkingen van de eDNA methode voor het inventariseren van soorten en in het bijzonder voor invasieve exoten. Ook wordt uiteengezet hoe betrouwbaar en kostenefficiënt de methode is (hoofdstuk 10) en met welke voorzorgsmaatregelen en randvoorwaarden gemoeid zijn bij de toepassing van de methode (hoofdstuk 3, 4 en 7).

1.2 Definities

De terminologie omtrent DNA-gebaseerde technieken voor soortenidentificatie kan verwarrend zijn. Daarom worden de belangrijkste termen hier expliciet uiteengezet. De term ‘DNA barcoding’ wordt gebruikt voor soortenidentificatie op basis van DNA. Het woord ‘meta’ wordt toegevoegd wanneer meerdere soorten uit een enkel monster worden geïdentificeerd, bijvoorbeeld DNA metabarcoding (Taberlet *et al.*, 2012). In conventioneel DNA barcoding en DNA metabarcoding worden weefselmonsters of bulk monsters (bijvoorbeeld diatomeeën of macrofaunamonsters) die het gehele organisme bevatten gebruikt. Wanneer complexe milieumonsters (zoals water, bodem of uitwerpselen) worden gebruikt, spreekt men van environmental DNA (meta) barcoding. Hierin wordt gebruik gemaakt van vrij in het milieu aanwezig DNA, bijvoorbeeld uit afgestorven cellen. In dit rapport staat environmental DNA Barcoding en environmental DNA metabarcoding (afgekort eDNA) centraal.

Vergeleken met conventionele barcoding methoden zijn er meer uitdagingen bij het gebruik van milieumonsters. Dit komt doordat het DNA in dit soort monsters zich meestal lastig laat extraheren en gedegradeerd is tot kleine fragmenten (vaak minder dan 150 basenparen) (Deagle *et al.*, 2006). Daarom moeten primerontwerp, monstername, opslag, extractie en analyse hierop aangepast zijn (zie hoofdstuk 3 en 4). Omdat er gewerkt wordt met DNA in extreem lage concentraties moeten er tevens voorzorgsmaatregelen worden getroffen om besmetting van monsters en het daardoor genereren van valse positieven te voorkomen. Deze maatregelen zijn vergelijkbaar met die worden gebruikt in onderzoek met historisch DNA. Daarnaast kan onjuiste uitvoering van de monstername of extractie en analyse leiden tot valse negatieven (hoofdstuk 3 en 7).

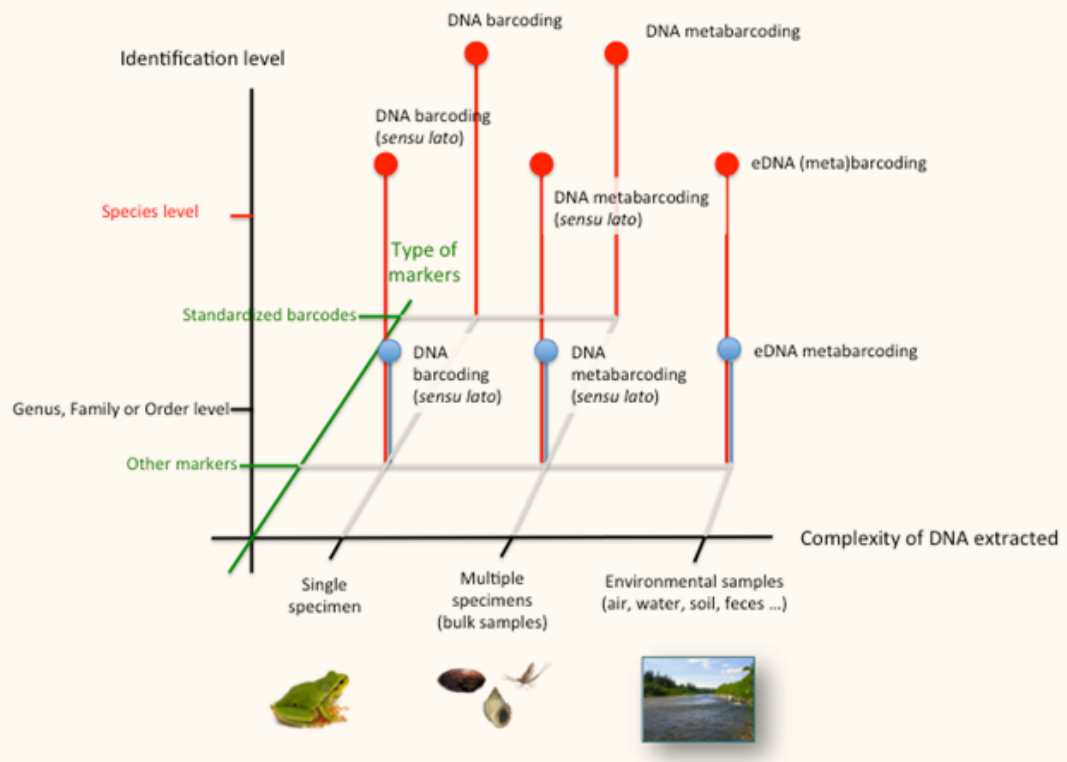
Figuur 1.1: Amerikaanse brulkikker, een soort waarvoor de eDNA methode goed werkt.



1.3 Doel van dit rapport

Dit rapport heeft als doel een objectief overzicht te geven van de huidige mogelijkheden en beperkingen voor monitoring van (invasieve) soorten met de eDNA methode, valkuilen in de toepassing van de methode en toekomstperspectieven. Het rapport is oorspronkelijk in het Engels geschreven door een internationaal team van wetenschappers en, zoals u ziet, ook vertaald naar het Nederlands. Het doel is om kennis over de eDNA methode niet alleen voor wetenschappers toegankelijk te maken, maar ook voor beleidsmakers, beheerders, ecologen en natuurbeschermers. Hierdoor kunnen zij profiteren van de toepassing van eDNA in hun werkveld en onderbouwde beslissingen maken. Daarnaast biedt het rapport een handreiking voor het maken van een goede prijs-kwaliteitafweging tussen verschillende aanbieders.

Kader 1.1: terminologie



Taberlet *et al.* (2012) geven een helder overzicht van de verschillende terminologie in een schema gebaseerd op drie parameters die op verschillende assen zijn gezet:

1 Het type gebruikte primers: gestandaardiseerde barcodes die worden gebruikt in barcoding projecten. Dit soort primers richten zich op een (relatief groot) specifiek deel van het mitochondriale COI gen bij dieren (Hebert *et al.*, 2003) en op twee chloroplast fragmenten (*rbcL* en *matK*) bij planten. Aan de andere kant van het spectrum zijn er andere primers “mini barcodes” die zich richten op kleinere fragmenten, zoals die voorkomen bij gedegradieerd DNA.

2 Het niveau van de identificatie: Sommige primers kunnen slechts identificeren tot op het niveau van geslacht, andere tot familie, orde of zelfs soort niveau.

3 De complexiteit van het monster: Monsters kunnen DNA bevatten van één soort (bijvoorbeeld een weefselmonster) of meerdere soorten (bijvoorbeeld bulkmonsters van macroinvertebraten of watermonsters met DNA).

1.4 Leeswijzer

De hoofdstuktitels zijn geformuleerd als vragen die vervolgens worden beantwoord. Op deze manier ziet de lezer snel waar welke informatie te vinden is. In hoofdstuk 2 wordt in detail beschreven wat eDNA is en waarvoor het kan worden gebruikt. Hoofdstuk 3 en 4 bespreken methoden om één (hoofdstuk 3) of meerdere soorten (hoofdstuk 4) te detecteren met de eDNA methode. Hoofdstuk 5 geeft een overzicht van overige technieken op basis van eDNA. Hoofdstuk 6 geeft inzicht in de relatie tussen de dichtheid van een soort en de hoeveelheid DNA in het milieu. In Hoofdstuk 7 staat een uitgebreid overzicht van de factoren die kunnen leiden tot valse positieven en valse negatieven en maatregelen om ze te voorkomen. Trefkansen voor de verschillende soorten worden besproken in hoofdstuk 8. Hoofdstuk 9 behandelt de verschillende habitats waarin de eDNA methode kan worden toegepast. In hoofdstuk 10 wordt de kostenefficiëntie van de eDNA methode ten opzichte van traditionele methoden besproken. Hoofdstuk 11 zoomt in op de toepassing van de eDNA methode op invasieve exoten. Tenslotte wordt in hoofdstuk 12 ingegaan op de voor- en nadelen van de eDNA methode in vergelijking met traditionele methoden, de perspectieven voor de toekomst en wordt een overzicht gegeven van gebieden waar meer onderzoek nodig is.

2 Wat is eDNA?

2.1 Oorsprong van eDNA in het milieu

Environmental DNA (eDNA) is DNA van een organisme dat is vrijgekomen in het milieu, via bijvoorbeeld uitwerpselen, urine, huid, haar of geslachtscellen. Dit DNA kan worden geëxtraheerd uit milieumonsters zoals bodem, water, uitwerpselen, etc. Het is opgebouwd uit of intracellulair DNA (inhoud van levende cellen) en extracellulair DNA (vrijgekomen bij natuurlijke celdood waarna degradatie van de structuur optreedt). In het milieu wordt eDNA gekarakteriseerd door een complexe mix van nucleair, mitochondriaal en chloroplast DNA van verschillende organismen (Taberlet *et al.*, 2012). Op basis van eDNA kunnen soorten worden gedetecteerd, ongeacht levensstadium of sexe. Ook eDNA afkomstig van dode dieren kan worden gedetecteerd voordat dit volledig is afgebroken. Deze afbraak van eDNA is afhankelijk van het milieu waarin het zich bevindt.

2.2 Persistentie van eDNA in verschillende milieus

Wanneer eDNA zich in het milieu bevindt kan het worden getransformeerd of afgebroken door verschillende biotische en abiotische factoren. Het kan ook geconserveerd worden door absorptie in organische en anorganische stoffen (Levy-Booth *et al.*, 2007). Aquariumexperimenten hebben uitgewezen dat er direct na de plaatsing van soorten eDNA vrijkomt. Na 3 tot 5 uur treedt er tevens afbraak van het DNA op en ontstaat er een evenwicht tussen het vrijkomen van DNA en de afbraak (Pilliod *et al.*, 2014). De DNA persistentie is berekend in aquaria en varieert van één tot twee weken (Piaggio *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2012a) tot bijna een maand (Dejean *et al.*, 2011). De watertemperatuur was tijdens de experimenten constant op kamertemperatuur in een ruimte zonder direct zonlicht. Het verschil tussen de resultaten van Dejean *et al.* (2011) en die van Thomsen *et al.* (2012a) kan worden verklaard door de dichtheden van de proefdieren. In het experiment van Dejean *et al.* (2011) was de minimale dichtheid van brulkikkerlarven circa 1,1 per liter, terwijl in het experiment van Thomsen *et al.* (2012a) de dichtheid van knofflookpadlarven en kamsalamanderlarven ongeveer 90 keer lager was (0,0125 per liter).

Er is veel onderzoek verricht aan DNA persistentie in verschillende natuurlijke mariene, zoetwater en terrestrische milieus en op verschillende substraten (water, bodem en sediment). Afhankelijk van de methode voor eDNA detectie varieert de waargenomen persistentie behoorlijk in mariene en zoetwater milieus, variërend van een aantal uur (Dell'Anno en Corinaldesi, 2004) tot een maand (Deere *et al.*, 1996; Dejean *et al.*, 2011). Het is daarnaast aangetoond dat eDNA persistentie ook kan variëren binnen de waterkolom. Matsui *et al.* (2001) hebben in een gestratificeerd meer een hogere DNA afbraak waargenomen in de warmere bovenste waterlaag waar tevens meer licht indringt vergeleken met de onderste koude waterlaag. In stromende wateren is de persistentie van eDNA lager dan in mariene systemen (Dell'Anno & Corinaldesi, 2004). Pilliod *et al.* (2014) toonden aan dat eDNA tot één uur na de verwijdering van een soort in een stromend water kon worden aangetoond. Deze korte detectietijd wordt eerder veroorzaakt door de waterstroming en gerelateerde verdunning dan door DNA afbraak. Voor de praktische toepassing op exoten in 'vroeg signaleringsprojecten' is het gemeten verschil in persistentie van eDNA nauwelijks relevant, aangezien bij het aantreffen van eDNA recente aanwezigheid van de soort wordt aangetoond.

Persistentie van eDNA varieert met meerdere ordes van grootte tussen verschillende milieumonsters, wat de omstandigheden reflecteert waaronder het DNA wordt bewaard. In het algemeen wordt DNA afbraak sterk afgeremd onder koude, droge omstandigheden, terwijl warme, natte omstandigheden de afbraak juist faciliteren (Willerslev en Cooper 2005). In bodem- en sedimentmonsters kan een lage DNA hoeveelheid voor een lange periode persisteren wanneer het is geab-

sorbeerd door organische en anorganische stoffen en daardoor beschermd wordt tegen meerdere afbraakfactoren. Dell'Anno & Corinaldesi (2004) hebben aangetoond dat in mariene sedimenten de omzetting van extracellulair DNA ongeveer 200 keer langzamer is dan in zeewater (tot 93 dagen in sediment versus 10 uur in zeewater). De DNA persistentie is strikt gerelateerd aan de samenstelling van het sediment, bijvoorbeeld in leemachtige sediment kan de persistentie gelijk zijn aan die in de waterkolom (Deere *et al.*, 1996). Onder specifieke condities kan het zelfs mogelijk zijn dat DNA voor honderdduizenden jaren geconserveerd blijft. Coolen & Overmann (2007) konden bijvoorbeeld DNA analyseren uit zuurstofloze sedimenten van 217.000 jaar oud. In de bodem kan DNA ook voor zeer lange tijd geconserveerd worden. Bijvoorbeeld voor 400.000 jaar in permafrost (Willerslev *et al.*, 2003). In de Groenlandse ijskap zijn historische leefgemeenschappen van planten en dieren gereconstrueerd uit 450.000 tot 800.000 jaar oude ziltige ijsmonsters uit de bodem (Willerslev *et al.*, 2007).

DNA dat bewaard is gebleven in sediment of bodem kan worden gebruikt voor een beeld van de huidige of vroegere biodiversiteit, bijvoorbeeld voor het reconstrueren van veranderingen in arctische vegetatie gedurende de laatste 50 duizend jaar (Willerslev *et al.*, 2014), het effect van overstroming en droogte op de eukaryote biodiversiteit in semi-aride vloedvlaktes (Baldwin *et al.*, 2013), de historie van de veehouderij sinds het Neolithicum (Giguët - Covex *et al.*, 2014) of de floristische geschiedenis van de laatste 10.000 jaar van Lake Comarum in Zuid-Groenland (Pedersen *et al.*, 2013). DNA blijft niet onder alle omstandigheden lang geconserveerd. Voor bodemmonsters uit de bovenste laag in een gematigd klimaat is een empirische studie uitgevoerd op voormalige gecultiveerde alpenweiden (met rotatie van aardappelen en granen) die zijn verlaten tussen 1810 en 1986. Het onderzoek toonde aan dat DNA tientallen jaren persisteert in een gematigd klimaat, waarbij de detectie na 40-50 jaar terugloopt (Yoccoz *et al.*, 2012). Met de lange persistentie in sediment en bodem is het bijvoorbeeld mogelijk om een invasiegeschiedenis te ontrafelen of de historische aanwezigheid van zeldzame of bedreigde soorten.

De relatief korte persistentie van eDNA in aquatische milieus kan worden gebruikt als momentopname van de aanwezige soorten. In deze context kan eDNA daarom worden gebruikt als krachtig middel om vast te stellen welke soorten in het water aanwezig zijn, of dat recent (tot enkele weken terug) waren.

2.3 Factoren die de hoeveelheid DNA beïnvloeden

Kort na het afsterven van een cel begint het afbraakproces van het DNA door de werking van endogene nucleasen, water, UV straling, bacteriën en schimmels (Shapiro, 2008). Endogene nucleasen (enzymen die de nucleïnezuren (DNA) afbreken) zijn de belangrijkste factor die de hoeveelheid DNA in het milieu beïnvloeden (Hebsgaard *et al.*, 2005). Daarnaast komt de inhoud van de cel (inclusief DNA) vrij wanneer de celstructuur uiteen valt. Hierdoor wordt de groei van micro-organismen gestimuleerd, dat tot verdere afbraak leidt met behulp van hun exogene enzymen (DNases) (Hebsgaard *et al.*, 2005; Willerslev & Cooper, 2005).

Micro-organismen gebruiken DNA als voedingsstof (koolstof, stikstof en fosfor) en als bouwstof (Chen & Dubnau, 2004). De werking van endogene nucleasen en micro-organismen wordt vertraagd of zelfs geïnactiveerd bij lage temperaturen (Hofreiter *et al.*, 2001; Zhu, 2006).

Een belangrijk proces voor beschadiging van het DNA in aquatische ecosystemen is DNA hydrolyse en meer specifiek depurinatie. Depurinatie is het verlies van basen (vooral adenine en guanine) door het breken van de suikergroepen waaraan ze gehecht zijn (Lindahl, 1993). DNA hydrolyse treedt alleen op wanneer het milieu of de milieumonsters water bevatten. Om dit proces te stoppen moeten monsters binnen korte tijd worden gedroogd of worden bewaard in een met alcohol verzadigde oplossing.

DNA oxidatie veroorzaakt modificatie van de DNA basen door de directe interactie van ioniserende straling met het DNA en de interactie met vrije radicalen in het water als gevolg van de ioniserende straling (Höss *et al.*, 1996). DNA oxidatie kan worden veroorzaakt door UV straling. Als gevolg van directe absorptie van UV-B fotonen kan UV straling de DNA basepaar bindingen verbreken en schade aan DNA pyrimidine dimeren toebrengen (Ravanat *et al.*, 2001). Het effect van UV straling op de detecteerbaarheid van eDNA is onderzocht door Pilliod *et al.* (2014). Zij toonden aan dat eDNA niet meer kon worden aangetoond in monsters die acht dagen waren blootgesteld aan direct zonlicht, eDNA was nog wel aantoonbaar in de controlemonsters die 11 en 18 dagen in het donker waren opgeslagen.

Tenslotte zijn de kruisbindingen tussen de DNA strengen (inter-strand crosslinks) een andere vorm van DNA schade, veroorzaakt door verschillende milieufactoren. Deze bindingen beïnvloeden de toegankelijkheid voor DNA-polymerase, het enzym dat zorgt voor het verdubbelen van de DNA strengen tijdens de PCR en voorkomen de scheiding van DNA strengen, waardoor DNA replicatie wordt geblokkeerd (Noll *et al.*, 2006). Hierdoor wordt vermeerdering van geëxtraheerd DNA door middel van PCR gehinderd (Hansen *et al.*, 2006) dat kan leiden tot valse negatieven.

De verminderde detectie van DNA in de waterkolom kan worden veroorzaakt door de opname van DNA door sediment en organisch materiaal in het water (Deere *et al.*, 1996). Corinaldesi *et al.* (2008) onderzochten welke omgevingsfactoren (temperatuur, zoutgehalte, zwevende organische stoffen en redoxpotentialen) de beschadiging en afbraak van extracellulair DNA beïnvloeden in mariene sedimenten. Ze toonden aan dat de kans op beschadiging van extracellulair DNA niet afhankelijk is van een enkele factor (bijv. temperatuur) maar van een complexe interactie tussen verschillende factoren. Met kennis over de mogelijke factoren die de hoeveelheid eDNA beïnvloeden kan de persistentie van eDNA ingeschat worden in milieus waarin DNA persistentie nog niet is getest. Bijvoorbeeld in ballastwater, waar de UV-straling verwaarloosbaar is, maar waar DNA-hydrolyse en activiteit van micro-organismen de belangrijkste factoren zijn voor de afbraak van eDNA. Het is aannemelijk dat eDNA in ballastwater een soortgelijke persistentie heeft als in andere aquatische systemen. Het eDNA is dan tot ongeveer een maand te detecteren, maar deze hypothese moet nog bevestigd worden.

2.4 Beperkingen van eDNA

De meerderheid van de eDNA onderzoeken richten hun primers op mitochondriaal DNA. Er zijn slechts twee kopieën van nucleair DNA per cel tegen honderden tot duizenden exemplaren voor mitochondriaal DNA (mtDNA) (Robin en Wong, 1988). Dit hoge aantal kopieën verhoogt de kans om het DNA te detecteren in gedegradeteerde monsters zoals milieumonsters. Bovendien zijn sommige mitochondriale genen (bv. cytochroom oxidase I, cytochroom b, controleregio) ook geëvolueerd waardoor ze geschikter zijn voor de identificatie van soorten op basis van genetische variatie. Niettemin omvat het gebruik van mtDNA nadelen. Afgezien van enkele zeldzame gevallen (bijv. Zouros *et al.*, 1994) wordt mtDNA via de moeder overgeërfd (Giles *et al.*, 1980), hierdoor kan in het geval van hybride organismen alleen de moedersoort worden vastgesteld. Dit kan een belangrijke beperking zijn wanneer een exotische soort met inheemse soort hybridiseert (Van Delft *et al.*, 2013). In milieumonsters is het eDNA vaak ver gedegradet waarbij de fragmentgrootte nog zelden groter is dan 150 basenparen (Deagle *et al.*, 2006). Door de beperkte lengte van de fragmenten bevatten ze soms niet voldoende genetische informatie om onderscheid tussen individuen of soms zelfs tussen soorten mogelijk te maken.

Bij eDNA onderzoek aan feces is het vaak nog wel mogelijk om onderscheid te maken tussen individuen en zelfs het geslacht te bepalen. Dit komt doordat in faeces een relatief hoge hoeveel-

heid DNA zit van het dier waarvan de ontlasting afkomstig is, waardoor het mogelijk wordt met primers te werken die zich op nucleair DNA richten. Dit biedt mogelijkheden om de populatieopbouw en populatiegrootte te onderzoeken.

Figuur 2.1: Larven van de rugstreeppad (Bufo calamita), met traditionele methoden is het mogelijk reproductie succes en levensstadia vast te stellen.



3 Hoe wordt een enkele soort met eDNA gedetecteerd?

De eDNA methode is gebaseerd op het feit dat alle soorten DNA sporen in hun leefomgeving achterlaten. Dit eDNA kan worden verzameld in milieumonsters van onder andere water, bodem en uitwerpselen. Na de monsternamen wordt het DNA geëxtraheerd en geanalyseerd met behulp van een Polymerase-kettingreactie (Polymerase Chain Reaction: PCR) of een kwantitatieve PCR (qPCR) met soortspecifieke primers (zie kader 3.1). In dit hoofdstuk beschrijven we het primerontwerp en validatie, verschillende monsterstrategieën en de opslag, extractie en analyse van monsters. Tenslotte bediscussiëren we de minimale vereisten voor labwerk met eDNA en de kwaliteitscontrole van alle stappen. Dit is nodig om de kans op valse positieven en valse negatieven (onterecht wel of niet aantonen van een soort) te minimaliseren. In hoofdstuk 7 worden de verschillende oorzaken van valse positieven en valse negatieven tot in detail beschreven.

3.1 Primerontwerp en -validatie voor soortspecifieke eDNA primers

Zoals in hoofdstuk 2 is beschreven kan de persistentie van eDNA in bepaalde milieus relatief laag zijn. Lange DNA-fragmenten breken snel af tot kortere fragmenten. Deze korte DNA-fragmenten (meestal minder dan 150 basenparen) worden daarna langzaam verder afgebroken en zijn daarom talrijker in milieumonsters dan langere fragmenten (Deagle *et al.*, 2006). Langere fragmenten, zoals vaak gebruikt in andere genetische velden (o.a. de COI DNA barcode (Hebert *et al.*, 2003)), zijn daarom niet geschikt voor eDNA onderzoek. Om de trefkans te verbeteren moeten primers speciaal worden ontworpen voor een doelsoort en mogen ze geen DNA-gebied langer dan 150 basenparen amplificeren. Voor de toepassing van primers moet de betrouwbaarheid, specificiteit en robuustheid van deze primers worden beoordeeld omdat deze van grote invloed zijn op de uiteindelijke analysesresultaten (bijv. Wilcox *et al.*, 2013). Primers moeten daarom gevalideerd worden door ze eerst *in silico* te testen, vervolgens *in vitro* en tenslotte *in situ* (figuur 3.1).

In silico tests

Het primerontwerp is cruciaal in eDNA onderzoek. Gelukkig is er een programma ontwikkeld speciaal voor het ontwerpen van nieuwe primers, rekening houdend met de beperking van het werken met eDNA (Riaz *et al.*, 2011). De primers kunnen vervolgens *in silico* worden getest tegen alle bekende DNA sequenties in publieke of private databanken. Hierdoor wordt duidelijk welke soorten potentieel kunnen worden geamplificeerd met behulp van deze primers. Deze analyse kan worden uitgevoerd met speciale software, zoals ecoPCR (Bellemain *et al.*, 2010; Ficetola *et al.*, 2010) dat gebruik maakt van primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Het beoogde resultaat maakt amplificatie van de doelsoort mogelijk, terwijl het de amplificatie van niet-doelsoorten minimaliseert.

In vitro tests

In de *in vitro* stap wordt DNA geëxtraheerd van weefselmonsters (ook mogelijk via een uitstrijkje of swab) van verschillende individuen van de doelsoort, bij voorkeur afkomstig uit meerdere populaties vanwege de mogelijke geografische genetische variatie. Bij het testen van de werking van de primers moeten ook weefselmonsters van verschillende nauwverwante soorten worden meegenomen om de specificiteit van de primers te kunnen verifiëren.

Daarnaast moet de minimale hoeveelheid (detectielimiet ofwel LOD) van de DNA-sequentie (marker) waarop de primer werkzaam is worden vastgesteld. Wanneer de analyse wordt uitgevoerd met behulp van een qPCR, dan moet tevens de laagste hoeveelheid DNA (kwantificeringslimiet

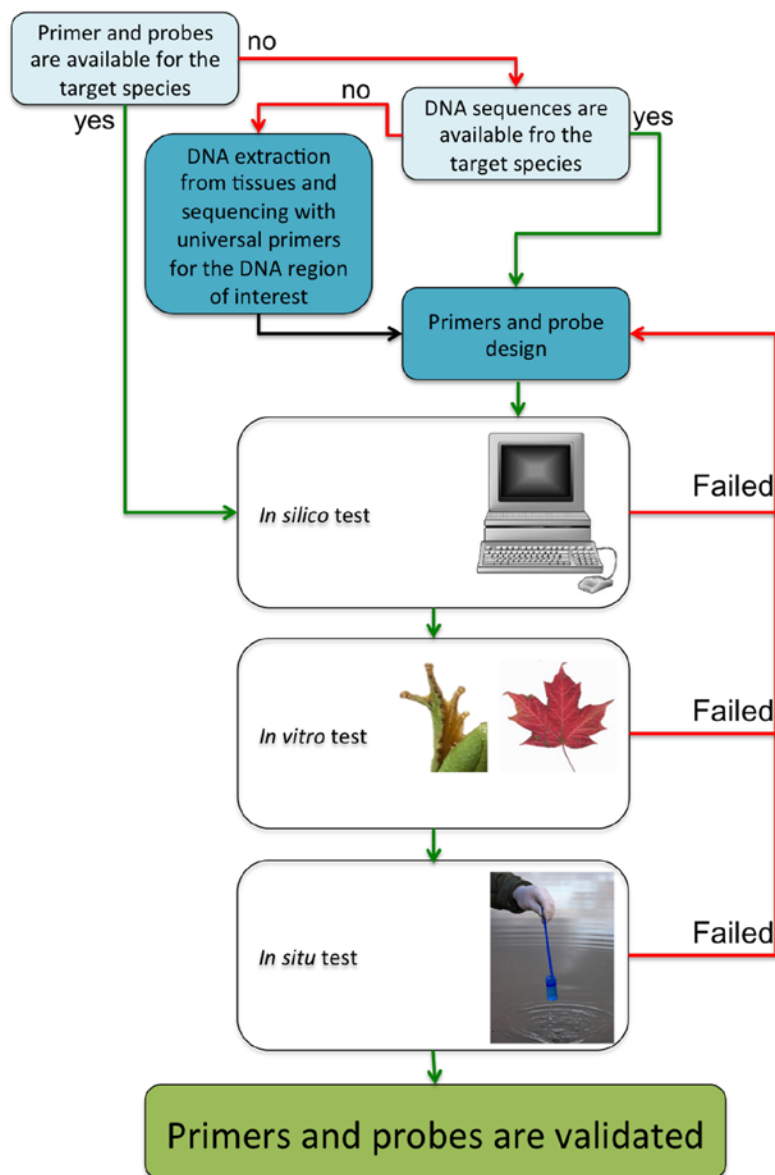
ofwel LOQ) worden bepaald waarbij de resultaten nog een acceptabele precisie en nauwkeurigheid geven. Deze twee parameters kunnen worden bepaald door het testen van een verdunningsreeks van een bekende hoeveelheid DNA met verschillende PCR duplo's per concentratie.

In situ tests

Om primers in de praktijk te testen worden idealiter minimaal drie eDNA monsters verzameld waar de doelsoort in een hoge dichtheid aanwezig is, minimaal drie locaties met een lage dichtheid en drie locaties waar de soort afwezig is. Hiermee kan worden geanalyseerd of de primers (en monsternamen) betrouwbaar zijn onder natuurlijke omstandigheden.

Als de ontworpen primers niet slagen voor alle drie de testen (in silico, in vitro en in situ), dan moeten nieuwe primers ontworpen worden. Indien de analyse via qPCR wordt uitgevoerd met behulp van een probe, dan gelden dezelfde regels voor het ontwerp van de probe.

Figuur 3.1: Procedure voor het testen van de betrouwbaarheid, robuustheid en specificiteit van een primer of probe.



Kader 3.1 - Polymerase-kettingreactie (PCR)

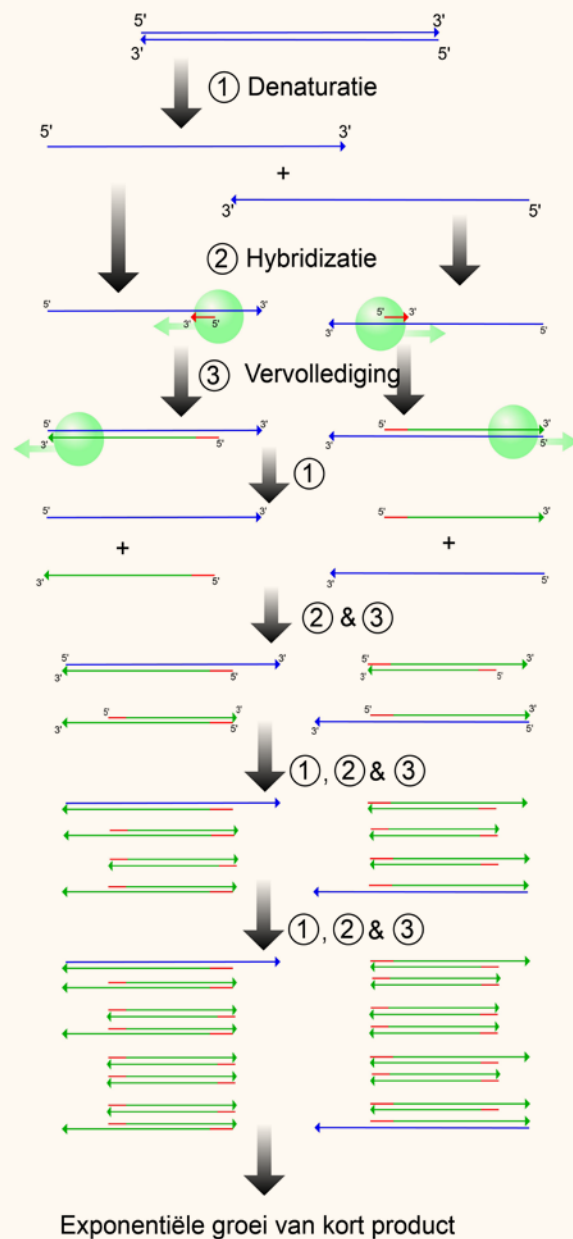
De Polymerase-kettingreactie (PCR) is een biochemische technologie om een beperkt aantal kopieën van een specifiek DNA fragment met meerdere grootteordes te vermeerderen (amplificeren) naar duizenden tot miljoenen kopieën. Op deze manier wordt er genoeg DNA gecreëerd om het te visualiseren in latere stappen, zoals via sequencing of op gel. DNA bestaat uit een dubbele helix waarin twee complementaire strengen liggen die aan elkaar verbonden zijn. Daarbij liggen de nucleotiden A tegenover T en C tegenover G. Als een primer zich bindt aan een van de twee strengen, synthetiseert de polymerase een nieuw DNA-fragment vanaf de primer met een vrije nucleotide uit de PCR-mix. In de figuur wordt dit schematisch weergegeven.

De PCR reactie bestaat uit drie stappen:

Denaturatie; door een oplopende temperatuur naar 90 tot 96 ° C, waarbij de dubbele helix wordt gescheiden in twee enkele DNA strengen.

Hybridizatie (annealing); door het verlagen van de temperatuur tussen 45 en 60°C. Hierbij binden de primers, complementaire DNA fragmenten die specifiek hechten aan een bepaalde DNA doelsequentie, aan het enkelstrengs DNA. Omdat de primers uit korte fragmenten bestaan en in een hoge concentratie zijn toegevoegd bewegen ze sneller door de oplossing dan het lange enkelstrengs DNA. Hierdoor krijgt het lange enkelstrengs DNA niet genoeg kans om zich weer samen te voegen met de complementaire streng, maar hebben de primers voldoende tijd om zich te binden aan het enkelstrengs DNA.

Vervollediging (elongation); het polymerase enzym verlengt het DNA fragment tussen de aangehechte primers. Na deze stap bevat de oplossing twee keer zoveel van het gewenste DNA fragment (het segment tussen de primers). Al het andere aanwezige DNA wordt niet vermeerderd. Door deze stap circa 30 tot 50 keer uit te voeren, neemt het gewenste DNA fragment exponentieel toe. Al het andere DNA krijgt daardoor een verwaarloosbaar aandeel in het eindproduct.



Figuur wikipedia

3.2 Methoden en strategieën van monsternamen

Na de validatie van primers en probes, is het monsterprotocol voor het veldwerk een belangrijke factor in het eDNA onderzoek. Zelfs wanneer alle genetische procedures betrouwbaar zijn, is de eDNA analyse niet te gebruiken zonder betrouwbare monsterstrategie.

Faecale monsters

Wanneer faecale monsters worden genomen is de meest gebruikte methode het individueel verzamelen van de uitwerpselen die gedehydrateerd worden in alcohol, silicagel of een combinatie van beide.

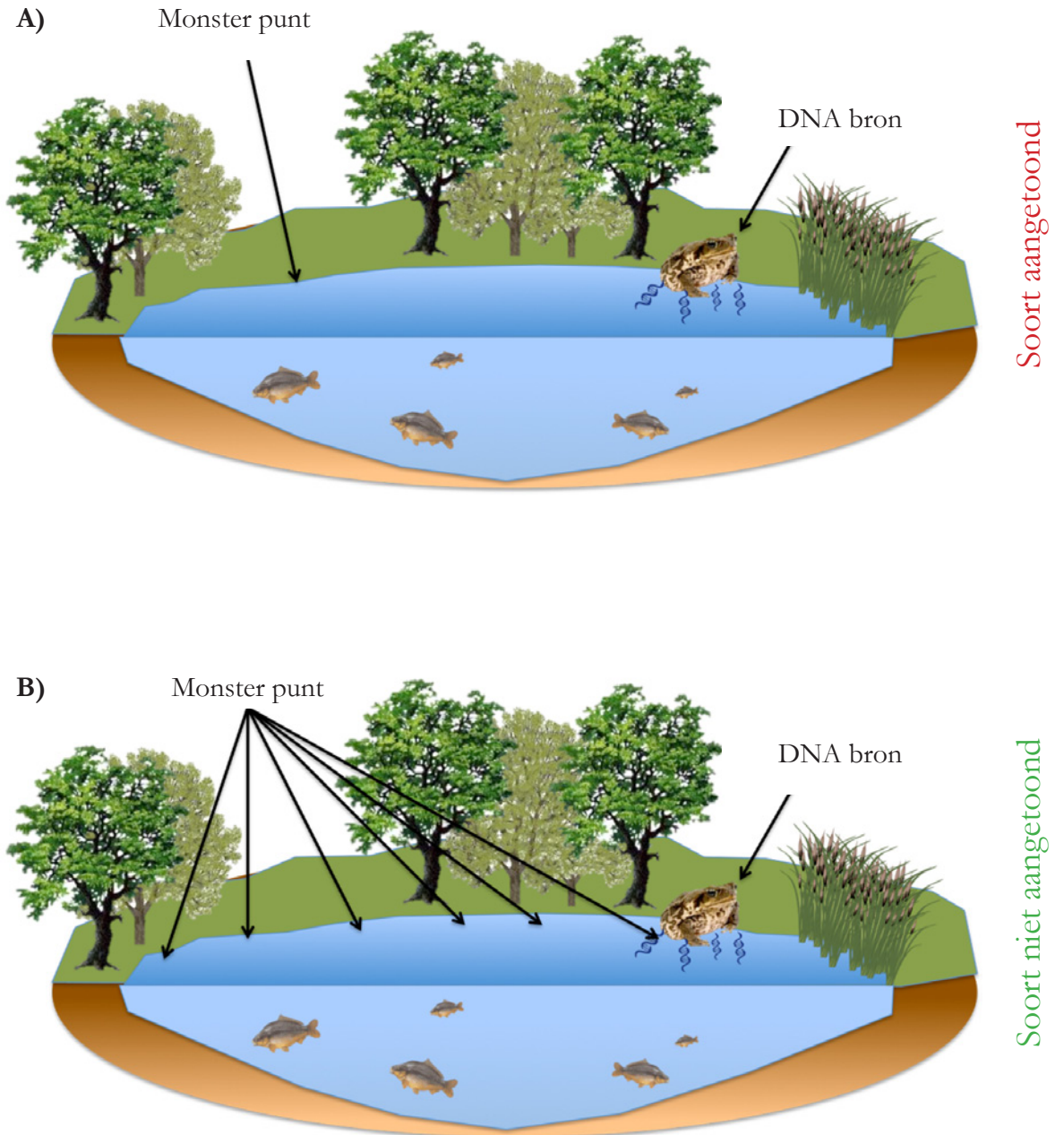
Bodemmonsters

Wanneer bodemonsters worden gebruikt voor het verzamelen van eDNA moeten er meerdere subsamples worden genomen, om een representatief beeld te vormen van de lokale biodiversiteit. Deze monster kunnen individueel (bijv. Yoccoz *et al.*, 2012) of als mengmonster (bijv. Taberlet *et al.*, 2012) worden verzameld. Na de monsternamen worden de monsters direct verwerkt of ingevroren totdat de DNA extractie plaatsvindt (bijv. Taberlet *et al.*, 2012).

Watermonsters

Voor watermonsters is de monsterstrategie wat complexer. In de literatuur worden twee gangbare benaderingen beschreven, die beiden zijn gebaseerd op eDNA concentraties in verschillende watervolumes. Deze methoden worden samengevat in tabel 3.1. De eerste methode is gebaseerd op het neerslaan van DNA met ethanol en natriumacetaat en/of centrifugatie van celrestanten (Ficetola *et al.*, 2008). Ethanol fungeert hierbij als conserveermiddel voor DNA, zodat de monsters voor een paar dagen tot weken kunnen worden opgeslagen bij kamertemperatuur. Dit is handig wanneer de analyse niet direct kan worden uitgevoerd. De belangrijkste beperking van deze methode is dat het bemonsterde volume water betrekkelijk laag is. Wanneer een soort talrijk is en de eDNA concentratie in het water hoog, dan is de kans groot dat de soort met deze methode wordt aangetoond in een klein volume water (bijvoorbeeld 3 keer 15 ml (Ficetola *et al.*, 2008)). Echter bij een lage soortdichtheid of een lage soortmobiliteit is het gebied met aanwezigheid van eDNA in het water erg beperkt. In het water is eDNA meestal niet homogeen verdeeld, waardoor de soort niet kan worden gedetecteerd als de bemonsteringspunten te ver van de eDNA bron liggen (Figuur 3.2a). Hierop wordt ingespeeld met de bemonsteringsstrategie door het aantal monsters per locatie te verhogen. Hierbij kan er voor gekozen worden om op een onderzoekslocatie een groot aantal deelmonsters te nemen die worden gebundeld en gehomogeniseerd in een mengmonster. Van dit mengmonster (met een relatief groot volume) worden vervolgens verschillende monsterbuisjes gevuld met een klein deel van het mengmonster met daarbij als buffer ethanol en natriumacetaat (Herder *et al.*, 2013b & 2013c; Biggs *et al.*, 2014; Piaggio *et al.*, 2014). Op deze manier is de kans groter om eDNA afkomstig van de doelsoorten in het onderzoeksgebied te verzamelen (figuur 3.2b).

Figuur 3.2: Weergave van de strategie van monstername en de efficiëntie wanneer een doelsoort zeldzaam is of een gelimiteerde mobiliteit heeft.



De tweede strategie is gebaseerd op filtratie van verschillende watervolumes en wordt meestal toegepast in grote en/of stromende waterlichamen. Met behulp van filtratie kunnen grotere volumes water worden verwerkt waarmee in theorie de trefkans wordt verhoogd (Wilcox *et al.*, 2013). Dit betekent echter niet dat filtratie altijd betere resultaten geeft dan de hiervoor beschreven neerslagmethode. De filtermethode is tijdrovend en relatief duur (o.a. door filters en pompen). Door grote hoeveelheden water te filtreren, worden er ook inhiberende stoffen geconcentreerd in het monster. Nog belangrijker is dat eDNA vaak sterk is degradeert tot vooral kleine fragmenten (Deagle *et al.*, 2006), waardoor de poriegrootte van de filters te groot kan zijn voor retentie van vrij in het water opgelost eDNA. De trefkans wordt daarmee verlaagd. Op dit moment worden er vier filtertypes gebruikt:

- Glasfiber filter (Jerde *et al.*, 2011)
- Cellulose nitraat filter (Goldberg *et al.*, 2011)
- Carbonaat filter (Takahara *et al.*, 2012)
- Nylon filter (Thomsen *et al.*, 2012b)

De filtratie kan direct in het veld worden uitgevoerd (bijv. Goldberg *et al.*, 2011; Thomsen *et al.*, 2012a). De filters worden vervolgens opgeslagen in alcohol of op ijs en in het laboratorium geanalyseerd. Dit kan een beperking zijn bij grootschalig onderzoek waarbij op veel verschillende locaties door verschillende personen tegelijkertijd wordt gemonsterd, omdat er dan meerdere pompen nodig zijn. Een alternatief is dat de filtratie centraal in een laboratorium plaatsvindt (Jerde *et al.*, 2011). Het water moet dan worden opgevangen in een steriele container, op ijs worden bewaard en direct worden getransporteerd naar een laboratorium voor analyse waar de monsters binnen 24 uur verwerkt worden (Jerde *et al.*, 2013). Dit impliceert dat het eDNA laboratorium praktisch gezien niet te ver van het onderzoeksgebied verwijderd mag zijn. Wanneer het laboratorium meer dan 24 uur van het onderzoeksgebied af ligt, is het mogelijk watermonsters in te vriezen tot het moment van filtratie (e.g. Thomsen *et al.*, 2012b).

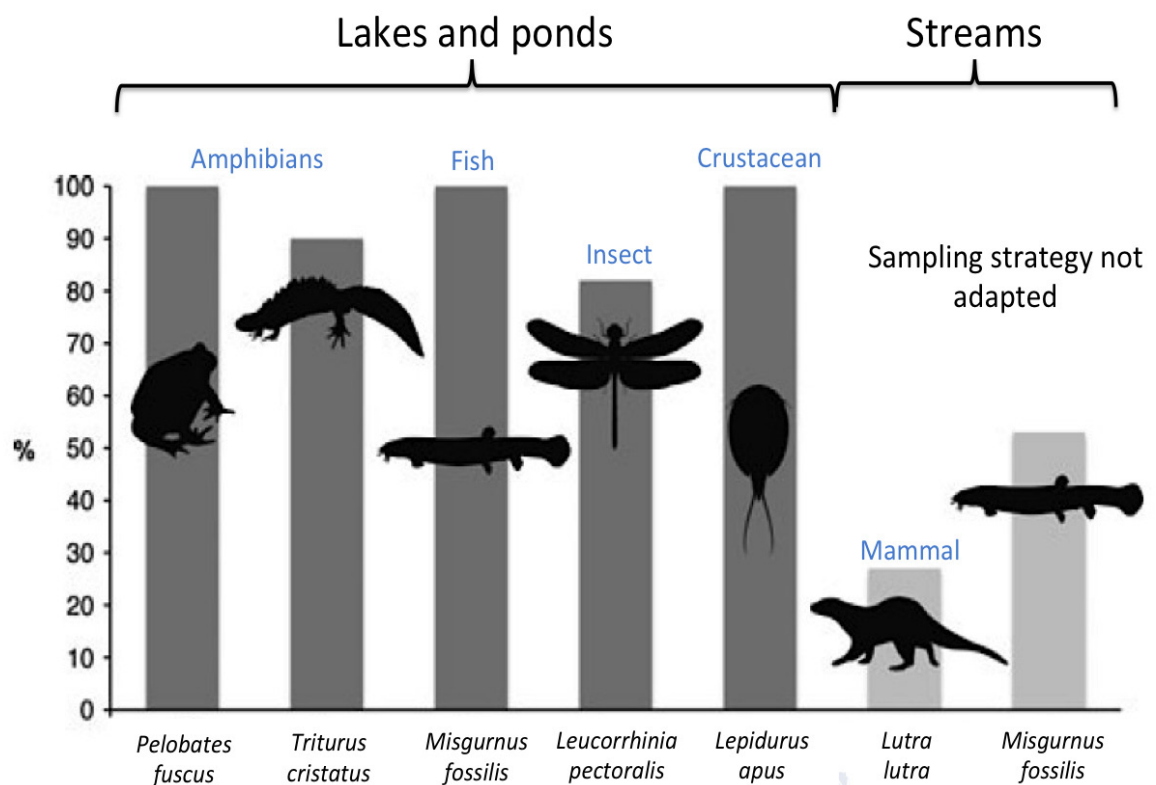
Kader 3.2 - filtratie versus neerslag

Het ligt in de verwachting dat filtratie van grote watervolumes automatisch leidt tot een hogere detectiekans dan die van de kleinere volumes uit de neerslagmethode. De kans dat het gezochte DNA fragment inderdaad wordt verzameld neemt toe wanneer meer watervolume wordt bemonsterd. Echter bij de neerslagmethode wordt al het eDNA in een watermonster verzameld, terwijl bij de filtratiemethode te kleine gedegradeerde DNA fragmenten door het filter kunnen glippen. Turner *et al.* (2014) vonden een grootteverdeling van eDNA door opvolgende filtraties, het bleek bij karper dat eDNA het meest talrijk was bij een grootte van 1-10 μm en dat totaal eDNA het meest talrijk was onder de 0,2 μm . Dit betekent dat de meest gebruikte filters (poriegrootte van 0,45-1,5 μm) de grootste hoeveelheid eDNA niet vasthouden. Dit gemiste DNA zou wel zijn verzameld met de neerslagmethode. Turner *et al.* (2014) stellen daarom voor om filters te gebruiken met een poriegrootte van slechts 0,2 μm . Een nadeel is dat dergelijke filters zeer snel vol zitten en verstopt raken. Daarom wordt tevens voorgesteld een voorfilter te installeren met een grotere poriegrootte. De algemene conclusie is in ieder geval dat er een wisselwerking is tussen het bemonsterde watervolume en het vermogen om alle eDNA te verzamelen. Onderzoek moet nog uitwijzen wat uiteindelijk de beste methode is voor verschillende soorten en watertypen.

De strategie van monstername moet aangepast zijn aan de ecologie van de doelsoort en diens leefomgeving. Thomsen *et al.* (2012a) vonden verschillende detectiekansen tussen twee watertypen (vijvers en beken). De mogelijke oorzaak van dit verschil is dat de ‘neerslagmethode’ en het verzamelen van 3 monsters van 15 ml water wel geschikt is voor eDNA detectie in stilstaand water, maar niet in stromend water (Figuur 3.3). Voor stromende wateren, waar eDNA wordt verdund, lijken filtratiemethoden meer geschikt (bijv. Goldberg *et al.*, 2011).

In tabel 3.1 wordt een samenvatting weergegeven voor verschillende methoden van monstername in aquatische milieus zoals beschreven in de literatuur.

Figuur 3.3: eDNA trefkansen met qPCR in natuurlijke stilstaande zoete (% positieve resultaten eDNA uit aantal locaties waar de soort is waargenomen). Uit Thomsen *et al.* (2012a).



Tabel 3.1: Bemonsteringsmethoden aquatische milieus gebaseerd op het neerslaan van DNA (N) en filtratie (F)

	Methoden van monstername	Soortgroepen	Habitat	Referenties
N	3 monsters van 15 ml per locatie, elk monster wordt neergeslagen met 1,5 ml sodiumacetaat (3 M) en 33 mL pure ethanol.	Amfibieën, vissen, zoogdieren, libellen	Stilstaande wateren, beken, zee	(Dejean <i>et al.</i> , 2012, 2011; Ficetola <i>et al.</i> , 2008; Foote <i>et al.</i> , 2012; Thomsen <i>et al.</i> , 2012a)
N	Verschillende deelmonsters van tientallen ml worden verzameld in een mengmonster. Na homogenisatie van het mengmonster worden hiervan enkele deelmonsters van 15 ml neergeslagen met 1,5 ml sodiumacetaat (3 M) en 33 mL pure ethanol.	Amfibieën, reptielen, vissen, zoogdieren, libellen	Stilstaande sloten, stilstaande wateren, moerassen	(Biggs <i>et al.</i> , 2014; Herder, 2013; Herder <i>et al.</i> , 2013a, 2013b, 2013c, 2013d, 2012; Piaggio <i>et al.</i> , 2014)
F	Watermonsters van 1 tot 8 L worden verzameld, opgeslagen in ijs en worden binnen 6 uur gefilterd in het laboratorium met 1,5 µm poriemaat glasfiber filters.	Amfibieën en vissen	Grote kanelen en rivieren	(Jerde <i>et al.</i> , 2011; Lance and Carr, 2012; Mahon <i>et al.</i> , 2013; Olson <i>et al.</i> , 2012; Santas <i>et al.</i> , 2013)
F	5-10 L water wordt in het veld gefiltreerd met 0,45µm poriemaat cellulose nitraat filters die vervolgens worden geconserveerd met 95% ethanol.	Amfibieën en slakken	Beken en rivieren	(Goldberg <i>et al.</i> , 2013; Caren S. Goldberg <i>et al.</i> , 2011; Pilliod <i>et al.</i> , 2014, 2012)
F	Watermonsters van 1,5 L worden ingevroren op -20°C tot filtratie, waarna 0,5 L wordt gefilterd met 0,45µm poriemaat nylon filters.	Vissen	Zee	(Thomsen <i>et al.</i> , 2012b)
F	1-2L water wordt in het veld gefiltreerd met een 3,0µm poriemaat polycarbonaat filter of een 12µm poriemaat polycarbonaat pre-filter met een 0,8 µm poriemaat polycarbonaat filter. De filters werden opgeslagen op ijs en direct getransporteerd naar een genetisch lab voor opslag -18°C en -25°C.	Vissen	Lagunes	(Takahara <i>et al.</i> , 2013, 2012)

3.3 Belang van ecologische kennis

Omdat eDNA niet homogeen is verdeeld over een waterlichaam, moeten de (deel)monsterlocaties worden geselecteerd op basis van de habitatvoorkeur van de doelsoorten. Op deze manier is de kans op aanwezigheid van doelsoort eDNA het grootst en wordt de grootste trefkans verkregen. Omdat iedere soort specifieke eisen stelt wordt aanbevolen om personen met voldoende ecologische kennis van de doelsoort de monsternamen uit te laten voeren (zie kader 3.3).

Kader 3.3 - eDNA en ecologische kennis grote modderkruiper

In Nederlands onderzoek zijn 40 kilometerhokken met de eDNA methode onderzocht op aanwezigheid van de grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*). In deze gebieden was nog geen kennis voorhanden over de mogelijke verspreiding en aanwezigheid van de soort. De monsternamen zijn uitgevoerd door soortdeskundigen. Binnen elk kilometerhok kon er slechts één monsterlocatie gekozen worden. In het veld is daarom gezocht naar de voor de grote modderkruiper meest geschikte locatie. Het habitat van de locatie werd daarnaast door de deskundige beoordeeld als 'goed' of 'middelmatig'. Uit de eDNA analyse bleek dat op locaties waar het habitat als 'goed' was beoordeeld 2,5 keer vaker grote modderkruiper werd gedetecteerd dan in de 'middelmatig' beoordeelde habitats. Wanneer locatiekeuze willekeurig zou zijn geweest, of uitgevoerd door personen zonder de juiste ecologische kennis, zou het aantal locaties met detectie lager zijn geweest. Dit geeft aan hoe belangrijk de toepassing van ecologische kennis is bij het nemen van monsters voor eDNA (Herder *et al.*, 2013b).



3.4 Opslag

Na de monstername blijft eDNA degraderen door verschillende factoren (zie hoofdstuk 2). Deze factoren moeten bij opslag worden geïnactiveerd om de kans op het verkrijgen van eDNA uit de monsters te maximaliseren. Voor een betere conservering moeten de monsters worden bewaard bij lage temperaturen om het effect van enzymen en micro-organismen te minimaliseren (Jerde *et al.*, 2011; Hofreiter *et al.*, 2001; Zhu, 2006). Een andere mogelijkheid is volledige dehydratatie met silicagel (Shehzad *et al.*, 2012) of door toevoeging van ethanol, waarna het monster wordt ingevroren (Ficetola *et al.*, 2008; Goldberg *et al.*, 2011). Hiermee wordt naast het effect van enzymen en micro-organismen ook de DNA hydrolyse stopgezet.

3.5 Analyse van monsters

Extractie van DNA

Na de monstername en eventuele opslag gaat het monster naar een laboratorium voor de DNA extractie. In deze stap worden DNA en cellen allereerst geïsoleerd door een neerslagreactie met ethanol, centrifugatie of filtratie. Vervolgens wordt de structuur van celmembranen vernietigd zodat het DNA vrijkomt. Hierna wordt het totale aanwezige DNA gezuiverd met een eigen protocol (met behulp van o.a. CTAB buffers of Fenol–chloroform zuivering) of commerciële kits die zijn gebaseerd op het gebruik van minikolommen met een vaste fase die in staat zijn om het DNA te absorberen (bijvoorbeeld Qiagen®, MoBio® en MN®).

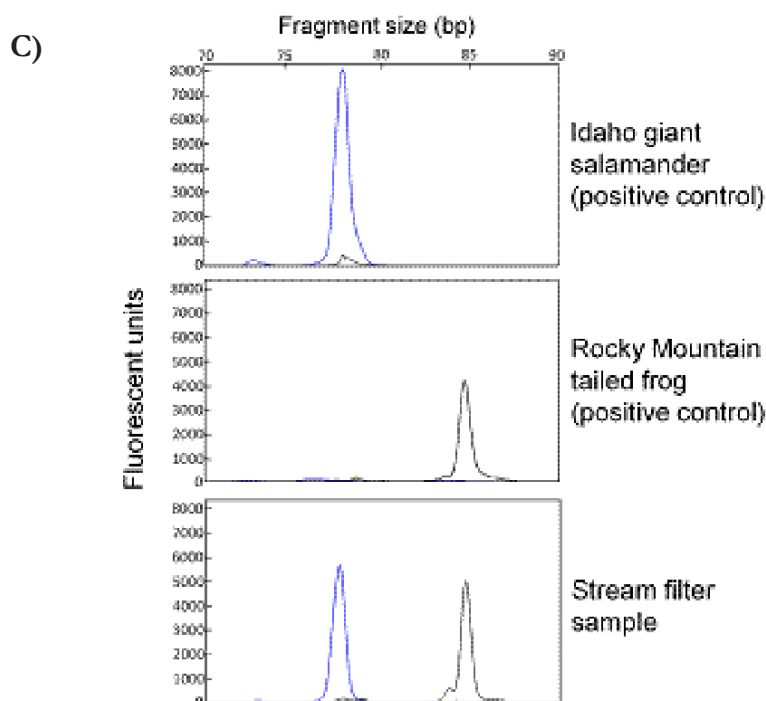
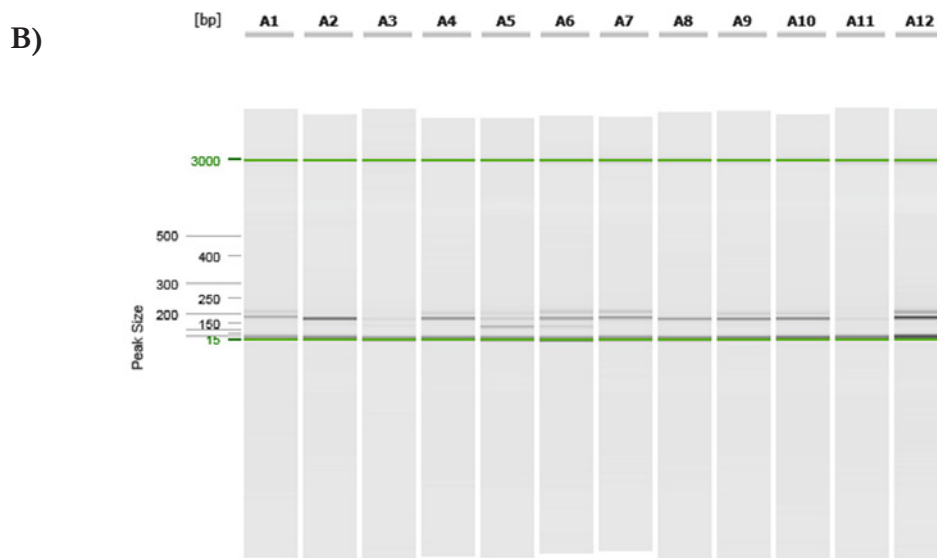
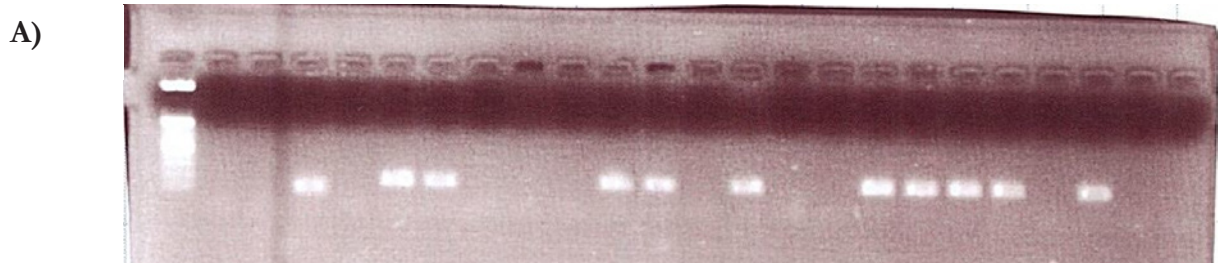
Amplificatie van DNA

Het geëxtraheerde DNA kan worden geamplificeerd met gevalideerde soortspecifieke primers. Omdat tijdens de extractie ook nucleair en mitochondriaal DNA van andere organismen wordt gewonnen is het DNA van de doelsoort meestal slechts een fractie van het totaal geëxtraheerde DNA. Om uiteindelijk het juiste DNA te analyseren worden twee amplificatiemethoden gebruikt; conventionele PCR methoden of qPCR methoden.

Conventionele PCR

Bij de conventionele PCR methode (Dejean *et al.*, 2012; Ficetola *et al.*, 2008; Jerde *et al.*, 2011) worden amplificatieresultaten gevisualiseerd met het gebruik van agarose gel elektroforese (Figuur 3.4a) of door gebruik van capillaire elektroforese (bijvoorbeeld met Qiagen® Qiaxcel, Figure 3.4b). Wanneer de primers fluorescerend gelabeld zijn is het mogelijk om de resultaten te visualiseren met een sequencer (Goldberg *et al.*, 2011; Nichols *et al.*, 2012) (Figuur 3.4c).

Figuur 3.4: Methoden voor visualisatie van de amplificatieresultaten: a) agarose gel elektroforese, b) capillaire elektroforese, c) profielen van een 3130xl capillaire sequencer (Applied Biosystems ®, (Goldberg et al., 2011))



Kwantitatieve PCR (qPCR)

Kwantitatieve PCR (qPCR) methoden worden verkozen boven de conventionele methoden omdat ze over het algemeen een hogere specificiteit hebben (met een op TaqMan® gebaseerde probe) en een hogere gevoeligheid (Pilliod *et al.*, 2014). Een probe is een stukje enkelstrengs DNA dat gelabeld is met fluorescerende moleculen dat bindt op het fragment tussen de primers. Wanneer tijdens de PCR het polymerase enzym de probe bereikt komt deze fluorescentie vrij en dit kan gemeten worden. Hiermee wordt er naast de primers (aan beide uiteinden van het fragment) dus nog een derde verificatie ingebouwd waardoor de methode nog specifiekere wordt. Ook de visualisatie van de amplificatie met een curve maakt het eenvoudiger om een positief resultaat vast te stellen, wanneer dit wordt vergeleken met de reguliere gel visualisatie van PCR (zie kader 3.4). Daarnaast maakt qPCR het mogelijk om de hoeveelheid DNA moleculen van de doelsoort in het monster te kwantificeren. Er zijn twee verschillende technieken voor de qPCR methode. De eerste maakt gebruik van specifieke fluorochromen die zich binden aan dubbelstrengs DNA (SYBR® Green) en zich hierdoor richten op al het dubbelstrengs DNA in een monster. De tweede techniek gebruikt hybridisatieprobes die zich binden aan een specifieke DNA streng van de doelsoort en fluoresceren bij amplificatie, hierdoor wordt alleen een signaal verkregen wanneer de doelsoort aanwezig is (bijvoorbeeld met TaqMan®).

Het gebruik van de specifieke SYBR® Green techniek is eenvoudiger toe te passen omdat het principe vergelijkbaar is met conventionele PCR. Echter heeft deze methode te maken met dezelfde kruisamplificatieproblemen als conventionele PCR. Bij het gebruik van een probe wordt er een aanvullende specificiteit aan de analyse toegevoegd en zijn de resultaten betrouwbaarder. Het ontwerp van een valide probe is echter een hele uitdaging, waardoor de analyse duurder wordt. Het ontwerp moet namelijk net als een primer worden onderworpen aan stevige validatie waarbij getest wordt op betrouwbaarheid, robuustheid, efficiëntie en specificiteit waarbij alleen de doelsoort geamplificeerd wordt (Figuur 3.1).

Aantal PCR cycli en replica's

Omdat eDNA in lage concentraties voorkomt moeten er speciale voorzorgsmaatregelen getroffen worden in de amplificatie stap. Ten eerste moet het aantal PCR cycli verhoogd worden ten opzichte van het traditionele gebruik tot meer dan 50 (Dejean *et al.*, 2012, 2011; Ficetola *et al.*, 2008; Goldberg *et al.*, 2011; Jerde *et al.*, 2011; Thomsen *et al.*, 2012a). Dit omdat de eDNA concentratie soms extreem laag is, en een lager aantal cycli een grotere kans geeft om het DNA van de doelsoort te 'missen'. Men moet echter wel voorzichtig zijn met deze benadering omdat tegelijkertijd de kans op valse positieven wordt verhoogd. Ten tweede moet vanwege de PCR stochasticiteit (de kans dat een PCR reactie faalt doordat de primers niet weten te binden aan doel DNA bij een zeer lage hoeveelheid DNA van de doelsoort) een aantal replica's worden uitgevoerd (multi-tube approach (Taberlet *et al.*, 1996)). Het aantal replica's in eDNA onderzoek varieert van drie (Ficetola *et al.*, 2008) tot twaalf (Herder *et al.*, 2013b; Biggs *et al.*, 2014) per DNA extract. Uit de resultaten blijkt dat regelmatig maar 1 van de 12 replica's positief is, wat indiceert dat de eDNA concentratie van de doelsoort in het monster in dat geval erg laag is. Hiermee wordt de noodzaak van het hoge aantal replica's benadrukt om de resultaten betrouwbaarder te krijgen.

Kader 3.4 - PCR versus qPCR

Naast de mogelijkheid om DNA in monsters te kwantificeren heeft qPCR nog een aantal voordelen boven conventionele PCR.

- Onderscheid tussen fragmenten: Met de conventionele PCR kan het lastig zijn om verschillende fragmenten te onderscheiden, vooral op elektroforetische gels (gebaseerd op visuele observatie). Met qPCR kan onderscheid worden gemaakt in fragmenten die slechts enkele basenparen verschillen in lengte. Verder kan met qPCR techniek bij het gebruik van SYBR® Green door het verschil in smeltpunt in sommige gevallen onderscheid worden gemaakt tussen fragmenten met dezelfde lengte, maar met een andere sequentie (Lay en Wittwer, 1997).
- Kruisamplificatie: het binden van primers aan niet-doel DNA komt vaker voor in conventionele PCR dan in qPCR waarbij hybridisatieprobes worden gebruikt (zie 3.5, kwantitatieve PCR voor uitleg). Door de probes wordt de kans op valse positieven gelimiteerd doordat de probe naast de twee primers een derde check uitvoerd (Smith & Osborn, 2009).
- Gevoeligheid: qPCR methoden zijn gevoeliger dan conventionele PCR omdat er verschillende hulpstoffen worden gebruikt. Daardoor is de kans groter om extreem zeldzaam eDNA te detecteren (Smith & Osborn, 2009).
- Resultaten na de PCR: Bij qPCR zijn de resultaten direct beschikbaar na de PCR, terwijl bij conventionele PCR methoden eerst de gels nog moeten worden geïnterpreteerd. Deze extra stap kost tijd en daarmee geld (Smith & Osborn, 2009). Aan de andere kant wordt bij conventionele PCR echter gebruik gemaakt van goedkopere apparatuur en chemicaliën. Wanneer de post-amplificatiestap (het visueel beoordelen en analyseren van de resultaten op de gel) buiten beschouwing wordt gelaten, kan conventionele PCR goedkoper zijn.

Vanwege de hierboven beschreven hogere betrouwbaarheid wordt het gebruik van qPCR bij eDNA, in het bijzonder met de toepassing van hybridiserende probes, verkozen boven conventionele PCR.

3.6 Kwaliteitscontrole en basiseisen aan het lab

DNA is niet zichtbaar met het blote oog, het is daarom moeilijk om tijdens de analyse fouten op te sporen als contaminatie, laag extractiesucces of primerbinding aan niet-doelsoort DNA. Men moet daarom compleet kunnen vertrouwen op de betrouwbaarheid van de gehele methode, van veldwerk tot analyse. Omdat er met zeer lage concentraties DNA gewerkt wordt, gelden dezelfde voorzorgsmaatregelen als die bij het werken met historisch DNA om contaminatie te voorkomen (Cooper en Poinar, 2000; Willerslev en Cooper, 2005). We beschrijven daarom de basiseisen van het lab, voorzorgsmaatregelen bij monstername en opslag, controles voor inhibitie (het falen van de PCR door stoffen die de reactie tegenwerken), positieve controles en negatieve controles.

Basiseisen aan het lab

Een laboratorium moet zo ingericht zijn dat de kans op contaminatie tot een minimum wordt beperkt. Alle eDNA extracties (van water tot filters) moeten worden uitgevoerd in een geïsoleerde ruimte. Idealiter heeft deze ruimte een eigen overdrukventilatie met voldoende verversing en nachtelijke UV behandeling. Pre- en post-amplificatie werkzaamheden moeten ver uit elkaar in aparte ruimtes worden uitgevoerd, bij voorkeur in aparte gebouwen. DNA extractie en PCR mix preparatie vinden plaats in de pre-amplificatie ruimten. In de post-amplificatieruimte wordt de PCR uitgevoerd en worden de resultaten geanalyseerd. Er moeten ook ‘dummy monsters’ zonder DNA hetzelfde proces doorlopen als de daadwerkelijke monsters, dit zijn de negatieve controles. Positieve PCR controles en qPCR standaarden moeten idealiter in een derde ruimte worden toegevoegd. Deze ruimte heeft een intermediair DNA niveau tussen de pre-amplificatie ruimte (lage concentratie DNA) en de post-amplificatie ruimte (geamplificeerd DNA).

Figuur 3.5: Monstername met DNA steriele materialen



Monsternamen en opslag

Tijdens het veldwerk moeten DNA-steriele materialen worden gebruikt voor iedere locatie en ieder monster, bijvoorbeeld handschoenen en monsterkits. Materialen die op verschillende locaties worden gebruikt moeten tussentijds grondig worden gereinigd. Het reinigen kan plaatsvinden door allereerst afwasmiddel en water te gebruiken en na te spoelen met steriel water, vervolgens moet het materiaal dan voor 5 minuten worden ondergedompeld in een 10% bleek oplossing en tenslotte wordt het gereinigd met alcohol (Lance en Carr, 2012).

Veldwerkers moeten zich bewust zijn van mogelijke contaminatiebronnen, zodat ze hier op preventieve wijze rekening mee houden. Vectoren voor DNA contaminatie zijn bijvoorbeeld boten, netten en waadpakken. Uit voorzorg is het daarom niet verstandig met dezelfde laarzen meerdere aquatische monsterlocaties te betreden zonder te ontsmetten. Opslag moet op een wijze plaatsvinden waarbij de degradatie van DNA tot een minimum wordt beperkt (zie paragraaf 3.2).

Positieve en negatieve controles

Het gebruik van positieve en negatieve controles is cruciaal om de betrouwbaarheid resultaten te kunnen garanderen. Om contaminatie op te sporen doorlopen negatieve controles hetzelfde extractie- en PCR proces als de monsters. Alle typen negatieve controles moeten een negatief resultaat geven na de PCR, zodat vervuiling tijdens het proces uitgesloten kan worden. Als één of meer negatieve controles een positief resultaat geven, zijn de analyseresultaten niet betrouwbaar en moeten de monsters worden vernietigd.

Positieve controles worden ook toegevoegd aan de PCR, deze bevatten een goede kwaliteit DNA van de doelsoort. Een negatief resultaat van één van de positieve controles geeft aan dat er tijdens het experiment iets fout is gegaan. De analyse moet dan in zijn geheel opnieuw worden uitgevoerd.

Inhibitiecheck

Milieu monsters kunnen stoffen bevatten die de PCR inhiberen en worden geextraheerd met eDNA. Verschillende stoffen blijken inhiberend: in uitwerpselen zijn dit galzouten en complexe polysachariden; in dieet- en weefsel monsters is dit collageen en in weefsel verder nog melanine en myoglobine; in bloed is dit haeme; in de bodem zijn het humusstoffen; in planten zijn het polysachariden en tanninezuren; in melk proteïnasen en calcium ionen; in urine ureum (Rådström *et al.*, 2004). Bij water monsters is het waarschijnlijk dat humuszuren en tannines worden geextraheerd en vervolgens de PCR verstoren door zich aan DNA te binden (humuszuren) of de binding van DNA-polymerase te verhinderen (tannines) (Opel *et al.*, 2010). Een andere verstoring kan worden veroorzaakt door de opslag. DNA kan worden opgenomen in organische en anorganische stoffen wanneer water monsters worden geconserveerd met alcohol. Dit beïnvloedt de opbrengst van de extractie omdat het geabsorbeerde DNA niet vrijkomt bij traditionele extractiemethoden. Ook het alcohol zelf kan een bron zijn van PCR inhiberende stoffen. Omdat PCR inhiberende stoffen tot valse negatieven kunnen leiden, moet hun aanwezigheid worden onderzocht. Dit kan worden gedaan door vaste concentratie van een 'controle-gen' toe te voegen aan de monsters. Dit gen komt in de natuur niet voor. Op deze manier kan met qPCR worden gekeken of de vooraf opgeloste concentratie van het gen overeenkomt met het resultaat of dat er inhibitie is opgetreden bij de extractie (o.a. Van Delft *et al.*, 2013; Herder *et al.*, 2013b; Biggs *et al.*, 2014; De Bruin *et al.*, 2014). Wanneer er inhibitie wordt gemeten, moeten er maatregelen genomen worden om de inhibitie weg te nemen (Goldberg *et al.*, 2013).

4 Hoe kan met een eDNA monster een soortenlijst worden gegenereerd?

De methodologie als beschreven in hoofdstuk 3 maakt het mogelijk om één enkele doelsoort te detecteren. Voor het aantonen van meerdere soorten, bijvoorbeeld een soortenlijst van de visstandsamenstelling, wordt een andere analysestrategie gebruikt. Er zijn hiervoor twee benaderingen te gebruiken; de meervoudige soortspecifieke benadering en de universele benadering.

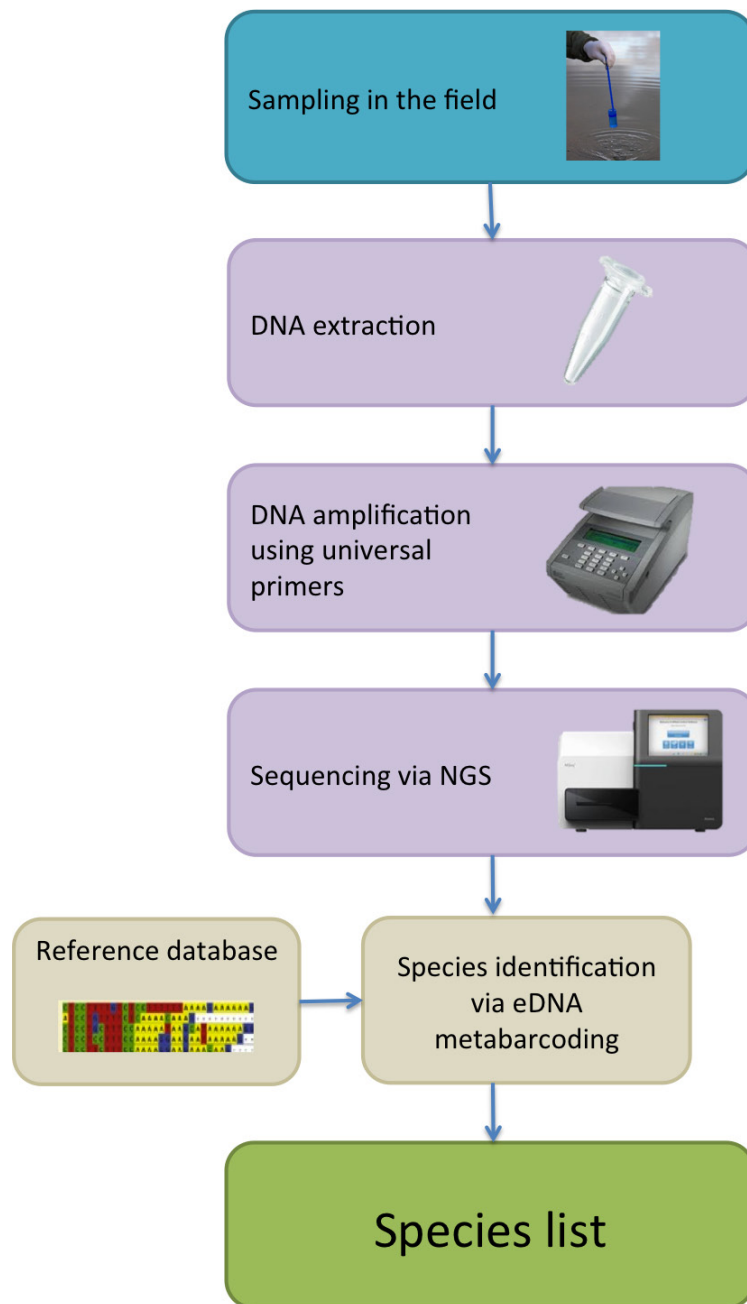
4.1 Meervoudige soortspecifieke benadering

Een manier om te onderzoeken of er DNA van meerdere doelsoorten aanwezig is in een monster is het uitvoeren van verschillende PCRs of qPCRs op hetzelfde monster. Deze benadering kent echter zijn limiet aan aantal soorten dat parallel kan worden geanalyseerd, omdat de hoeveelheid van het geëxtraheerde DNA beperkt is. Om te voorkomen dat de lage hoeveelheid DNA uit het milieumonster teveel wordt verdund, wordt een kleine hoeveelheid loopvloeistof gebruikt tijdens de extractiestap (bijvoorbeeld 100 µl) (Jerde *et al.*, 2011; Thomsen *et al.*, 2012b). Aangezien voor iedere soort meerdere PCR replica's van het monster worden uitgevoerd (multi-tube approach (Taberlet *et al.*, 1996)) is het totaal aantal PCR reacties gelimiteerd. Bijvoorbeeld als er 3 µl DNA wordt gebruikt in de PCR mix en er zijn 12 PCR replica's, is er 36 µl nodig en kunnen er maar tot 3 soorten parallel worden gedetecteerd. Er kan natuurlijk voor gekozen worden om met minder replica's te werken, maar dan neemt de betrouwbaarheid van de resultaten af (zie hoofdstuk 3). Om deze beperking te omzeilen is het ook mogelijk om de verschillende soortspecifieke primers als multiplex (mengsel) toe te voegen in dezelfde (q)PCR mix (Kent & Norris, 2005; Matsunaga *et al.*, 1999). Er zijn voor PCR multiplexing drie opties beschikbaar om de producten te differentiëren tijdens de visualisatiestap. De eerste is het werken met primers die verschillende fluorochromen bezitten en visualisatie via sequencing (Goldberg *et al.*, 2011; Nichols *et al.*, 2012). De tweede is het gebruik van primers die verschillende groottes fragmenten amplificeren waarna via elektroforese gevisualiseerd wordt (Kent en Norris, 2005; Matsunaga *et al.*, 1999). De derde is het gebruik van primers en hybridisatieprobes met verschillende fluorochromen (tot 5 afhankelijk van het qPCR apparaat) en visualisatie via qPCR. Echter voor alle drie de opties gelden dezelfde beperkingen: ten eerste mag de grootte van de verschillende amplicons niet te ver uiteenlopen, omdat kortere fragmenten als eerst worden geamplificeerd (Whale *et al.*, 2012). Daarbij komt ook dat het te amplificeren DNA niet langer mag zijn dan 150 basenparen (vanwege degradatie in milieumonsters). Daardoor is het aantal primers die kunnen worden gemultiplext beperkt, omdat er wel onderscheidend vermogen moet blijven in de grootte van het doelfragment. Ook moeten primers die gelijktijdig worden geamplificeerd in de PCR eenzelfde annealing temperatuur hebben. Verder is het erg lastig om primers niet met elkaar te laten interfereren in de PCR. Een andere belangrijke beperking van de gecombineerde soortspecifieke benadering is dat het een a priori benadering is. Dit betekent dat er alleen soorten kunnen worden aangetoond waarnaar specifiek wordt gezocht en waarvoor reeds gevalideerde primers zijn ontworpen. Het is dan ook niet mogelijk om soorten aan te tonen waarvoor nog geen primers beschikbaar zijn, bijvoorbeeld een onverwachte exoot. Concluderend kan de ontwikkeling van een goed multiplex extreem lastig en tijdrovend zijn, zeker wanneer dit voor een groter aantal soorten wordt gedaan (zoals alle Nederlandse zoetwatervissen, circa 70). Daarom wordt deze gecombineerde soortspecifieke benadering het best gebruikt om tot een handvol soorten tegelijkertijd te detecteren uit één monster. Wanneer men meer dan 3 soorten wil detecteren biedt de universele benadering uitkomst.

4.2 Universele benadering via eDNA metabarcoding

Bij de universele benadering worden primers gebruikt die het DNA van een complete soortgroep vermeerden (bijvoorbeeld amfibieën, planten, vissen of kreeftachtigen). Na de vermeerding van DNA in de PCR wordt het product gesequenced met een 'Next Generation Sequencer'. De resulterende sequenties worden vergeleken met een referentiedatabase om een soortenlijst op te stellen (figuur 4.1), dit wordt eDNA metabarcoding genoemd (Taberlet *et al.*, 2012).

Figuur 4.1: Methode van de universele benadering met analyse via eDNA metabarcoding (figuur aangepast naar Valentini et al., 2009a).



De universele benadering is gebruikt in verschillende onderzoeken, met name bij dieetanalyse (Deagle *et al.*, 2013; Pompanon *et al.*, 2012; Valentini *et al.*, 2009a), analyse van bodembiodiversiteit (Andersen *et al.*, 2012; Bellemain *et al.*, 2012; Bienert *et al.*, 2012; Taberlet *et al.*, 2012), maar ook voor zoogdierbiodiversiteit op basis van de inhoud van parasieten (Calvignac-Spencer *et al.*, 2013; Schnell *et al.*, 2012). In Denemarken werd de methode voor het eerst gebruikt in een aquatisch milieu om soortdiversiteit van amfibieën en vissen in stilstaand water vast te stellen (Thomsen *et al.*, 2012a). Later werd het ook toegepast in zeewatermonsters voor zeevissen (Thomsen *et al.*, 2012b).

Met de universele methode kan een groot aantal soorten parallel worden geanalyseerd. Het was bijvoorbeeld mogelijk om 200 plantentaxa uit 49 bodemmonsters te identificeren in Frans Guyana (Yoccoz *et al.*, 2012). Verschillende universele primers kunnen daarnaast worden gemultiplext om nog meer soorten tegelijkertijd te detecteren. Dit is toegepast door De Barba *et al.* (2013) met verschillende universele primers voor gewervelden, ongewervelden en planten om het omnivore dieet van bruine beren te beschrijven.

De eDNA metabarcoding benadering heeft dezelfde beperkingen als andere eDNA technieken voor wat betreft veldwerk, opslag van monsters en DNA extractie. Het verschil zit hem echter in primerontwerp, amplificatie, sequencing en analyse van de resultaten.

De ideale metabarcoding primer ampificeert korte fragmenten (vanwege DNA degradatie), moet een zeer conservatieve doelsequentie hebben die een sterk onderscheidende regio flankiert en moet specifiek werken voor een bepaalde soortgroep (Riaz *et al.*, 2011). Belangrijk is op te merken dat de universele primers in het traditionele DNA barcoding zich richten op grote fragmenten en daardoor niet geschikt zijn voor eDNA onderzoek. Zoals beschreven in hoofdstuk 3 moeten ook universele primers eerst *in silico* getest worden te onderzoeken of inderdaad alle soorten van de beoogde soortgroep worden geamplificeerd zonder afwijkingen. Hiervoor zijn twee indexen voorgesteld: het primerbereik (percentage van soorten van de soortgroep dat succesvol wordt geamplificeerd, Bc) en de onderscheidend vermogen (het percentage taxa dat te identiek te onderscheiden is op basis van het geamplificeerde fragment, Bs) (Bellemain *et al.*, 2010; Ficetola *et al.*, 2010). Aan de hand van deze indexen wordt getest of er door de primers mogelijke fouten kunnen optreden bij de PCR amplificatie (Bellemain *et al.*, 2010).

Met het *in silico* testen wordt een idee verkregen wat de kwaliteit van de ontworpen universele primer is. Echter om betrouwbaarheid te waarborgen van dergelijke primers voor alle soorten in de doelgroep en in uiteenlopende milieus moeten deze ook nog *in vitro* en *in situ* worden gevalideerd.

Wanneer universele primers gebruikt worden om een eDNA extract te amplificeren wordt een complexe mix verkregen van fragmenten afkomstig van verschillende soorten. Een regulier sequencingapparaat kan daarom niet worden toegepast. Een manier om te differentiëren tussen al deze fragmenten kan klonen zijn, maar dan zou het aantal klonen dat nodig is voor een representatief beeld van de diversiteit gigantisch zijn. Voor een gedegraderd DNA monster zijn minimaal 20 klonen per soort nodig voor een betrouwbare identificatie (Bower *et al.*, 2005). Bij zeer uiteenlopende monsters uit diverse milieus, zou een dergelijke aanpak te duur en tijdrovend zijn. Na de eeuwwisseling is er een nieuwe sequencingmethode ontwikkeld: Next Generation Sequencing (NGS). Met deze methode kunnen individuele DNA moleculen in het uit een mengsel met miljoenen tegelijkertijd worden gesequenced. Tabel 4.1 beschrijft de belangrijkste NGS apparaten die worden gebruikt in eDNA metabarcoding, met hun voor en nadelen. De pyrosequencingtechnologie met een Roche 454 FLX werd voor het eerst toegepast op milieumonsters (Sogin *et al.*, 2006; Valentini *et al.*, 2009a), maar de hoge gebruikskosten en de relatief lage sequencing capaciteit heeft geleid tot het zoeken naar alternatieve technologieën. Op dit moment zijn de Ion Torrent

(e.g. Deagle *et al.* 2013) en Illumina (Kelly *et al.*, 2014; Taberlet *et al.*, 2012) goede kandidaten voor toepassing in de nieuwste en toekomstige eDNA technieken.

Tabel 4.2: Next-Generation Sequencing apparaten: voor- en nadelen.

	Roche 454 FLX (Margulies <i>et al.</i> , 2005) ¹	Ion Torrent (Rothberg <i>et al.</i> , 2011)	Illumina (Bentley <i>et al.</i> , 2008)
Leesbare lengte	tot 700 bp	tot 400 bp	50 tot 300 bp
Sequenties per run	tot 1 miljoen	tot 80 miljoen	tot 6 miljard
Voordelen	Kan lange fragmenten uitlezen, is snel.	Goedkope apparatuur, is snel.	Enorm aantal sequenties waardoor lage kosten per sequentie
Nadelen	Dure runs en foutgevoelig bij repeterende sequenties ((bijv. AAAA).	foutgevoelig bij repeterende sequenties ((bijv. AAAA).	Duur in aanschaf

¹ Platform wordt niet meer ondersteund sinds oktober 2013

Het is mogelijk om verschillende onafhankelijke monsters te multiplexen in een enkele run. Om het aflezen van de sequentie te koppelen aan een uniek monster worden er tijdens de synthese ‘tags’ (in de vorm van een aantal nucleotiden) aan de ‘5 extremiteiten van de primers toegevoegd (Coissac *et al.*, 2012; Valentini *et al.*, 2009a). Voor een betrouwbaar tagging systeem zijn goede voorzieningen en speciale software vereist (Coissac, 2012).

Met de laatste generatie sequencers is het genereren van data geen beperking meer, de echte uitdaging ligt nu in de analyse van de enorme hoeveelheid informatie. Een uitgebreid overzicht van uitdagingen in het veld van bio-informatie voor toepassing in eDNA metabarcoding analyses wordt beschreven door Coissac *et al.* (2012). Eén enkele NGS run met een Illumina HiSeq 2000 geeft als resultaat 6 miljard uitlezingen van 100 basenpaar lange fragmenten. Het is door Coissac *et al.* (2012) berekend dat het printen van deze hoeveelheid data zou resulteren in een 48 kilometer hoge stapel A4 papier. Met klassieke sequencingmiddelen (zoals gebruikt bij sequenties gegenereerd door Sanger technology) is de analyse van een dergelijke hoeveelheid data niet voor te stellen. Het is daarnaast onmogelijk om een dergelijk databestand te openen met reguliere tekstverwerkingsprogramma’s. Recent zijn daarom speciale programma’s ontwikkeld om de output van NGS en metabarcoding analyse te verwerken, zoals Qiime (Caporaso *et al.*, 2010), OBITools (Coissac *et al.*, 2012) en PRINSEQ (Schmieder & Edwards, 2011). Verwerking van de grote hoeveelheid data vraagt van een computer veel RAM en CPU, het wordt daarom aanbevolen om servers te gebruiken die op UNIX werken.

Om te voorkomen dat soorten verkeerd worden geïdentificeerd is het een uitdaging om alle fouten uit te sluiten die worden veroorzaakt door DNA degradatie of tijdens de PCR en sequencing. Er zijn meerdere programma’s beschikbaar die deze fouten kunnen detecteren en verwerken, zie Coissac *et al.* (2012) voor een uitgebreid overzicht.

Wanneer de NGS data geanalyseerd zijn met een bio-informatisch programma kan een vergelijking worden gemaakt met een referentiedatabase. Ook deze referentiedatabase kan een bron van fouten zijn. Bij gebruik van een openbare referentiedatabank voor sequenties (zoals GenBank®) moet men rekening houden met een grote hoeveelheid sequentiefouten (Harris, 2003) en verkeerd gelabelde soorten (Santos en Branco, 2012). Met het opzetten van een eigen database kan dit probleem omzeild worden, waarbij het labelen van soorten en geografische herkomst zeer

nauwkeurig geverifieerd kan worden. Een voorbeeld hiervan is het Consortium Barcoding of Life (BOLD: <http://www.boldsystems.org/>). Helaas is deze databank beperkt tot de sequentie van het mitochondriale COI gen, dat gezien de gegeven criteria niet geschikt is voor toepassing bij eDNA metabarcoding. Een ander voordeel van een eigen databank is dat alleen soorten uit de eigen geografische regio aanwezig zijn waarbij de taxonomische resolutie van de identificatie groter is. Taberlet *et al.* (2007) toonden aan dat wanneer een analyse wordt uitgevoerd op een kleinere sequentiedatabank, de hoeveelheid planten die zonder twijfel konden worden geïdentificeerd toenam van 19% tot bijna 78%. Wanneer een soort niet kan worden geïdentificeerd met de kleine databank kan een zoekopdracht in een grote openbare databank (zoals GenBank®) alsnog uitkomst bieden. Zo is het mogelijk om onverwachte niet thuis te brengen soorten, zoals nieuwe exoten, alsnog te identificeren.

Concluderend is eDNA metabarcoding een zeer krachtige techniek om een groot aantal soorten van verschillende soortgroepen te detecteren, zonder dat bekend is welke soorten er mogelijk kunnen voorkomen. Hierdoor is de methode zeer geschikt voor exotensurveillance, bijvoorbeeld in ballastwater, slecht geïnventariseerde gebieden of bij soortgroepen waar nog weinig kennis van is.

Figuur 4.2 Met metabarcoding kan een hele soortenlijst worden gegenereerd uit een eDNA monster.



5 Welke andere potentiële technieken zijn er voor DNA onderzoek?

Het meeste eDNA onderzoek is gebaseerd op de analysetechnieken die beschreven zijn in hoofdstuk 3 en 4. Er zijn daarnaast ook andere technieken beschikbaar die kunnen worden ingezet om soorten te detecteren op basis van DNA, deze worden in dit hoofdstuk beschreven.

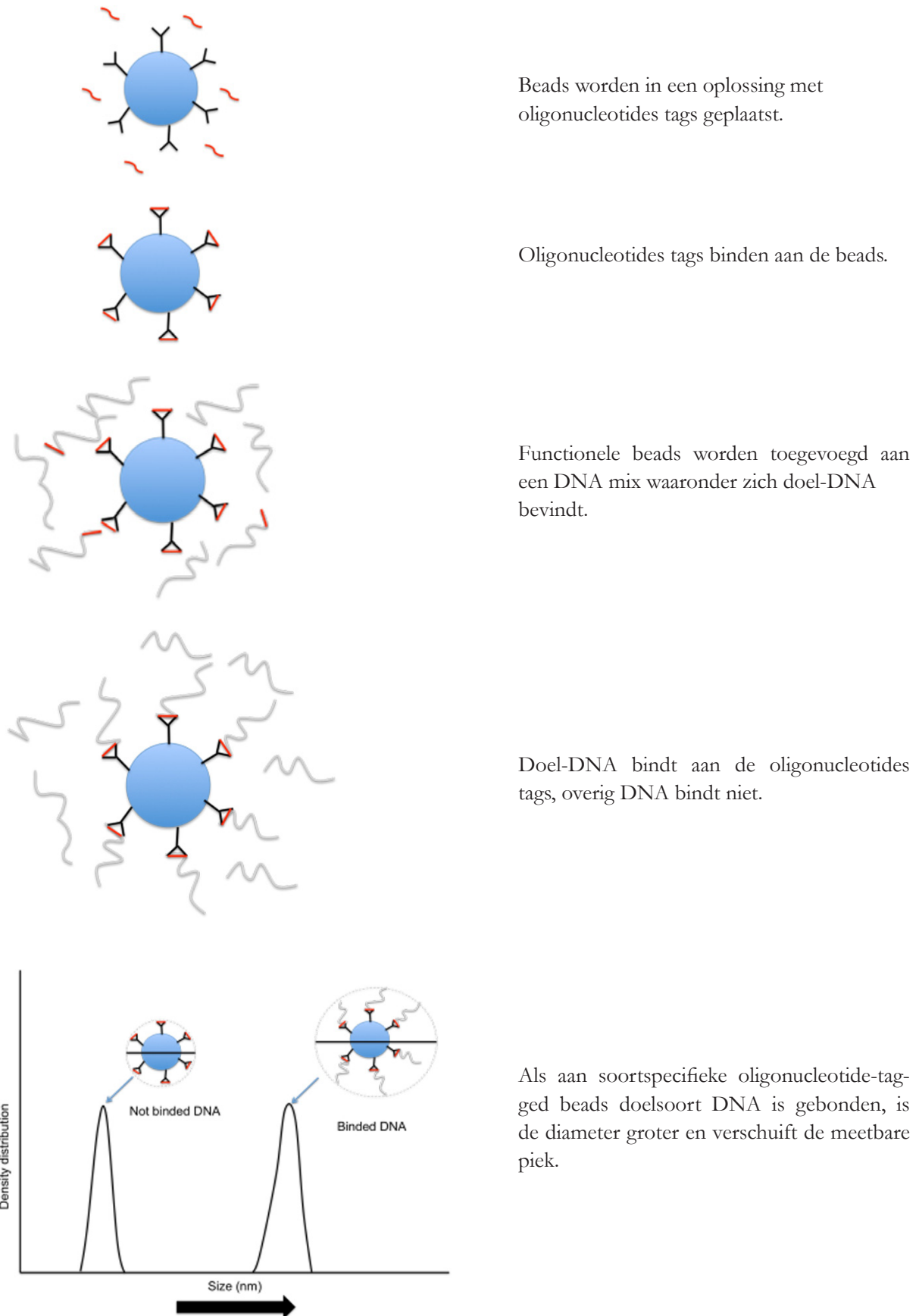
5.1 Laser Transmission Spectroscopy (LTS)

Laser Transmission Spectroscopy (LTS) wordt sinds kort toegepast voor soortendetectie (Li *et al.*, 2011; Mahon *et al.*, 2013a). De methode is gebaseerd op de meting van de golflengte van licht dat door een monster straalt waarin nanodeeltjes zweven. In deze methode wordt DNA geamplificeerd met universele primers en wordt kort gedeneureerd en geïncubeerd met gemerkte (tagged) nanobeads. Het doel-DNA bindt zich aan soortspecifieke oligonucleotide tags, het overige DNA bindt zich niet. Oligonucleotide tags zijn stukjes enkelstrengs DNA van 5-8 nucleotiden die aan de primers worden toegevoegd maar niet functioneren als startpunt voor de PCR.

Het LTS apparaat meet en registreert de lichtdoorlatendheid van de opgeloste monsters en een controle (met alleen oplossing zonder monster). De diameter van de gemerkte nanobeads is verhoogd wanneer er doel-DNA aan is gebonden, waardoor de lichtdoorlatendheid verandert en als piek meetbaar is (Figure 5.1, (Li *et al.*, 2011; Mahon *et al.*, 2013a).

Mahon *et al.* (2013a) verwachten dat LTS uiteindelijk gebruikt kan worden om DNA monsters vrijwel direct onbehandeld te analyseren. Een DNA extractiestap blijft echter altijd noodzakelijk, maar PCR amplificatie wordt mogelijk overbodig. Het is echter de vraag of het mogelijk wordt om monsters direct in het veld te analyseren omdat DNA extractie om specifieke apparatuur vraagt. Daarnaast is de minimale DNA concentratie die nog werd gedetecteerd door Mahon *et al.* (2013a) 10-5 ng/μL, dit is significant hoger dan de concentratie (10-8 ng/μL) die kan worden gedetecteerd met qPCR. Met qPCR kan daarmee een 1000 keer lagere concentratie worden gedetecteerd (Treguier *et al.*, subm). Verder zijn de DNA concentraties in de LTS onderzoeken nog steeds vele malen hoger (door het gebruik van DNA concentraat uit weefselmonsters) dan die in het milieu gevonden wordt. Tot nu toe is er in één onderzoek LTS toegepast op de detectie van exoten in milieu-monsters (Egan *et al.*, 2013). Hierbij werd tussen de DNA extractie en de LTS ook nog een PCR uitgevoerd. Wanneer de extra PCR nodig blijft bij LTS voor milieu-monsters, dan is de werkwijze (zij het met een extra analysestap) vergelijkbaar met qPCR waarbij probes worden gebruikt. Al met al is de LTS methode veelbelovend, maar er is nog onderzoek nodig om het potentieel vast te stellen voor (real-time) toepassing in verschillende habitats en voor verschillende soorten.

Figuur 5.1: Schematische weergave van de werking van LTS.



Beads worden in een oplossing met oligonucleotides tags geplaatst.

Oligonucleotides tags binden aan de beads.

Functionele beads worden toegevoegd aan een DNA mix waaronder zich doel-DNA bevindt.

Doel-DNA bindt aan de oligonucleotides tags, overig DNA bindt niet.

Als aan soortspecifieke oligonucleotide-tagged beads doelsoort DNA is gebonden, is de diameter groter en verschuift de meetbare piek.

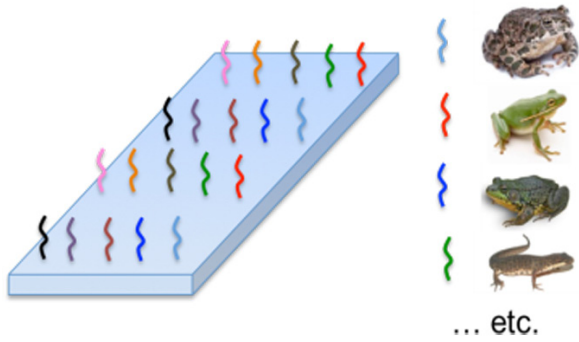
5.2 Microarray (of DNA chip)

In de micro-array technologie worden meerdere (soortspecifieke) probes op een harde plaat gesynthetiseerd of hierop geplaatst. Voorafgaand aan de micro-array analyse wordt het DNA via PCR geamplificeerd met universele primers die zijn gelabeld met een fluorochrome. Het geamplificeerde DNA wordt vervolgens op de plaat geplaatst en de doelfragmenten voegen zich samen (hybridiseren) met de complementaire probes. Fragmenten (niet-doel DNA) die niet zijn gehecht worden van de plaat gespoeld, waarna het signaal van het doel-DNA kan worden gemeten (Figuur 5.2).

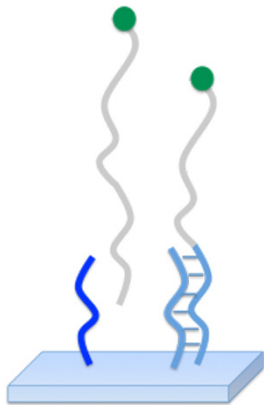
Het grote voordeel van een micro-array is dat in theorie honderden tot duizenden probes parallel kunnen worden geanalyseerd. Deze techniek is nog niet toegepast in eDNA onderzoek, maar wel in het vergelijkbare voedsel- en forensisch onderzoek (Kochzius *et al.*, 2010; Teletchea *et al.*, 2008).

Recent is de techniek gebruikt om diatomeeën te detecteren in een Nederlands zoetwatermilieu (Jaspers *et al.*, 2012). De kosten van de analyse zijn geschat op rond de €250 per monster, inclusief materiaal en verwerkingskosten (Shallom *et al.*, 2011). Deze kosten zijn vergelijkbaar met die van eDNA metabarcoding (zie hoofdstuk 10). Er zijn echter nadelen aan de methode verbonden. De eerste is dat het ontwerpen van goede probes voor iedere individuele soort een grote uitdaging vormt en veel tijd kost. De tweede is dat het een a priori benadering is, waarbij alleen soorten worden gedetecteerd waarvoor er een probe op de plaat is geplaatst. De detectie van onverwachte of nieuwe soorten (zoals exoten) waarvan geen probe is opgenomen in het proces is daarom niet mogelijk.

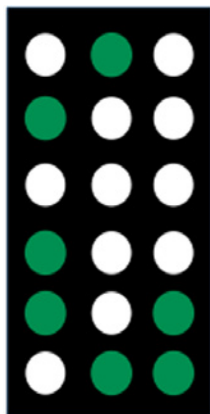
Figuur 5.2 Schematisch overzicht van soortdetectie met een micro-array.



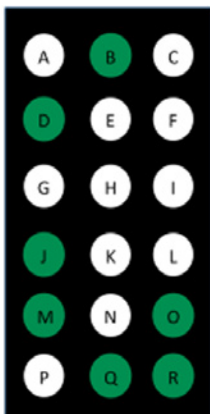
Soortspecifieke oligonucleotide probes (complementair aan doelsoort DNA) worden aan een plaat gehecht



Fluoriserend gelabelde PCR fragmenten worden op de plaat geplaatst, waarbij alleen doel-DNA zich bindt aan de soortspecifieke oligonucleotide probes. Overige fragmenten worden weggespoeld



De fluorescentie wordt gemeten, waarbij alleen de locaties waar het (fluoriserend gelabelde) doel-DNA gebonden is een signaal geven



Aan de hand van de positie van de soortspecifieke probes en vervolgens de fluoriserende locaties is het mogelijk te identificeren welke doelsoorten aanwezig zijn in het monster

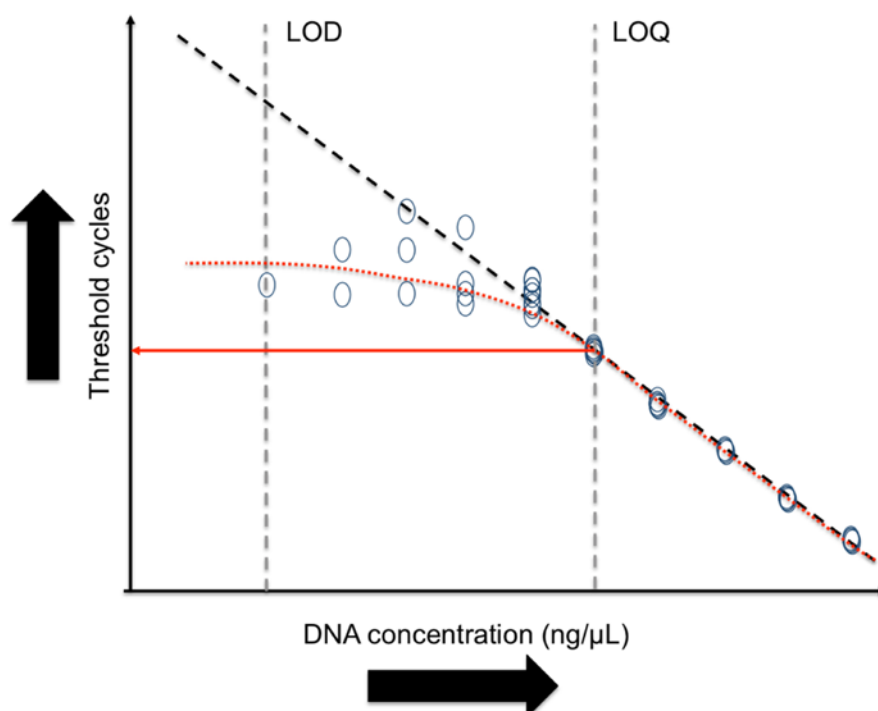
6 Kan de dichtheid van soorten worden ingeschat met de eDNA methode?

Bij de toepassing van eDNA technieken, kan het net als bij veel andere inventarisatietechnieken, belangrijk zijn om een inschatting te maken van de dichtheden waarin een soort aanwezig is. In meerdere onderzoeken is onderzocht of het schatten van dichtheden mogelijk is voor soortspecifieke benaderingen (Biggs *et al.*, 2014; De Bruin *et al.*, 2014; Dejean *et al.*, 2011; Goldberg *et al.*, 2011; Herder *et al.*, 2013d; Mahon *et al.*, 2013b; Pilliod *et al.*, 2013; Takahara *et al.*, 2012; Thomsen *et al.*, 2012a) en voor multi-soort benaderingen (Amend *et al.*, 2010; Deagle *et al.*, 2013; Murray *et al.*, 2011; Pompanon *et al.*, 2012).

6.1 Dichtheidsbepalingen met de soortspecifieke benadering

In soortspecifieke onderzoeken wordt vaak qPCR gebruikt om de eDNA hoeveelheid in te schatten in een milieumonster. Bij qPCR is het belangrijk om de cyclus van drempelwaarde (Ct) vast te stellen die overeenkomt met de kwantificatielimit (LOQ: de laagste hoeveelheid doel-DNA die nog een acceptabele precisie en nauwkeurigheid oplevert, zie hoofdstuk 3). De drempelwaardecyclus (Ct: Threshold cycle) is het cyclusnummer waarbij de gegenereerde fluorescentie in een reactie kruist met de drempelwaarde voor zichtbaarheid van fluorescentie (arbitrair gekozen waarde op basis van de achtergrondfluorescentie). Wanneer de LOQ niet wordt gehaald in het monster (rode lijn in figuur 6.1), mogen de resultaten niet kwantitatief worden geïnterpreteerd maar kwalitatief met het aantal positieve replica's (Biggs *et al.*, 2014; Treguier *et al.*, subm).

*Figuur 6.1: Kwantificatielimit (LOQ) en detectielimit (LOD). De zwarte stippellijn komt overeen met de theoretische correlatie tussen de drempelcyclus (Ct) en de DNA concentratie. De rode stippellijn komt overeen met de werkelijk gevonden correlatie tussen de qPCR drempelcyclus en de DNA concentratie. De rode horizontale lijn indiceert de drempelcyclus waarboven de resultaten niet als kwantitatief geïnterpreteerd mogen worden (Treguier *et al.*, subm).*



In eDNA onderzoek zijn er twee hoofdstromen voor de inschatting van soortdichtheid op basis van eDNA hoeveelheid: absolute kwantificering (Takahara *et al.*, 2012; Thomsen *et al.*, 2012a) en het aantal positieve replica's (Dejean *et al.*, 2011; Herder *et al.*, 2013d; Biggs *et al.*, 2014). In tests in aquaria en mesocosmos experimenten is een significante relatie gevonden tussen het aantal of de biomassa van soorten en de hoeveelheid eDNA dat vrijkwam in het water (Takahara *et al.*, 2012; Thomsen *et al.*, 2012a). Echter in natuurlijke omstandigheden waren de resultaten, onafhankelijke van de gebruikte methode, erg variabel. Variërend van een zwakke correlatie tussen eDNA kwantiteit en de soortdichtheid (Thomsen *et al.*, 2012a; Herder *et al.*, 2013d; Pilliod *et al.*, 2013; Biggs *et al.*, 2014; De Bruin *et al.*, 2014) tot helemaal geen correlatie (Dejean *et al.*, 2011; Goldberg *et al.*, 2011; Mahon *et al.*, 2013b). Dit is waarschijnlijk een gevolg van de vele natuurlijke factoren die van invloed zijn op DNA persistentie, verdunning, dispersie in het milieu (zie hoofdstuk 2) of inhibitie van extractie en PCR (zie hoofdstuk 3). Op dit moment is het daarom erg lastig om de hoeveelheid eDNA in een monster te koppelen aan daadwerkelijke dichtheden van soorten. Wanneer monsternamen daarentegen plaatsvindt in vergelijkbare watertypen, met gebruik van dezelfde methode en in dezelfde periode, dan kunnen relatieve verschillen in soortdichtheid worden gedetecteerd. Zo vonden Biggs *et al.* (2014) dat een lage hoeveelheid eDNA in monsters altijd gerelateerd was aan lage populatiedichtheden. Een hoge hoeveelheid eDNA in monsters kon echter zowel afkomstig zijn populaties met een hoge als van populaties met een lage dichtheid. Dit kan als volgt worden verklaard: een hoge concentratie eDNA in het monster kan worden veroorzaakt door een hoge populatiedichtheid, maar kan ook veroorzaakt worden doordat er bij een lage dichtheid toevallig vlakbij een individu is gemonsterd. Wanneer de populatiedichtheid hoog is is het eDNA waarschijnlijk redelijk homogeen verdeeld waardoor er ook altijd een hoge concentratie in het monster zal komen. Lage concentraties eDNA komen daarom alleen voor bij lage populatiedichtheden. Dit is vergelijkbaar met andere inventarisatiemethoden, waarbij het mogelijk is om veel individuen per toeval aan te treffen zelfs wanneer de populatie een lage dichtheid heeft. Er kan dan onterecht worden verondersteld dat de populatie een hoge dichtheid heeft. De mogelijkheden om met eDNA een absolute inschatting te kunnen doen van de populatiedichtheid moeten nog verder onderzocht worden.

Figuur 6.2 Voor de knoflookpad is een correlatie gevonden tussen de aantal met traditionele methoden waargenomen individuen en de hoeveelheid eDNA in de watermonsters (Thomsen et al., 2012a).



6.2 Dichtheidsbepalingen met de universele benadering

De eDNA metabarcoding techniek (Next Generation Sequencing) geeft het aantal sequenties na de amplificatie. Tot op heden kunnen deze aantallen niet worden gekwantificeerd vanwege verschillende factoren. De resultaten kunnen daarom op dit moment slechts als semi-kwantitatief worden gezien en worden gebruikt om resultaten relatief gezien te vergelijken (Pompanon *et al.*, 2012).

In alle eDNA technieken beïnvloedt de strategie van monstername de hoeveelheid DNA in het monster. Bij gelijke dichtheden van twee verschillende doelsoorten is het aannemelijk dat deze soorten bij de monstername een andere trefkans hebben doordat het aannemelijk is dat de beide doelsoorten op verschillende afstanden van het monsterpunt aanwezig zijn (hoe dichterbij hoe hoger de DNA concentratie). De hoeveelheid van geschikt DNA (bijvoorbeeld chloroplast versus mitochondriaal DNA) is ook nog eens per weefsel verschillend (bijvoorbeeld wortels tegenover bladeren). Daarnaast verschillende eigenschappen van vertering en degradatie per weefsel onder natuurlijke omstandigheden (Deagle en Tollit, 2007). Ook zijn er in experimenten waarbij een mengsel van soorten is gemeten afwijkingen in de PCR en sequencing tussen soorten gemeten (Deagle *et al.*, 2013; Polz en Cavanaugh, 1998).

Door de zeer lage concentraties van eDNA in het milieu is het zo dat elke stap, van monstername, extractie, amplificatie tot sequencing, een afwijking van de stochastische verdeling van de kleine hoeveelheid eDNA met zich meebrengt. In het geval dat eDNA in een relatief hoge concentratie voorkomt, bijvoorbeeld bij een hoge soortdichtheid (van bijvoorbeeld micro-organismen), speelt kans een kleinere rol en kan er mogelijk wel een goede relatie tussen de hoeveelheid eDNA en de soortdichtheid worden vastgesteld.

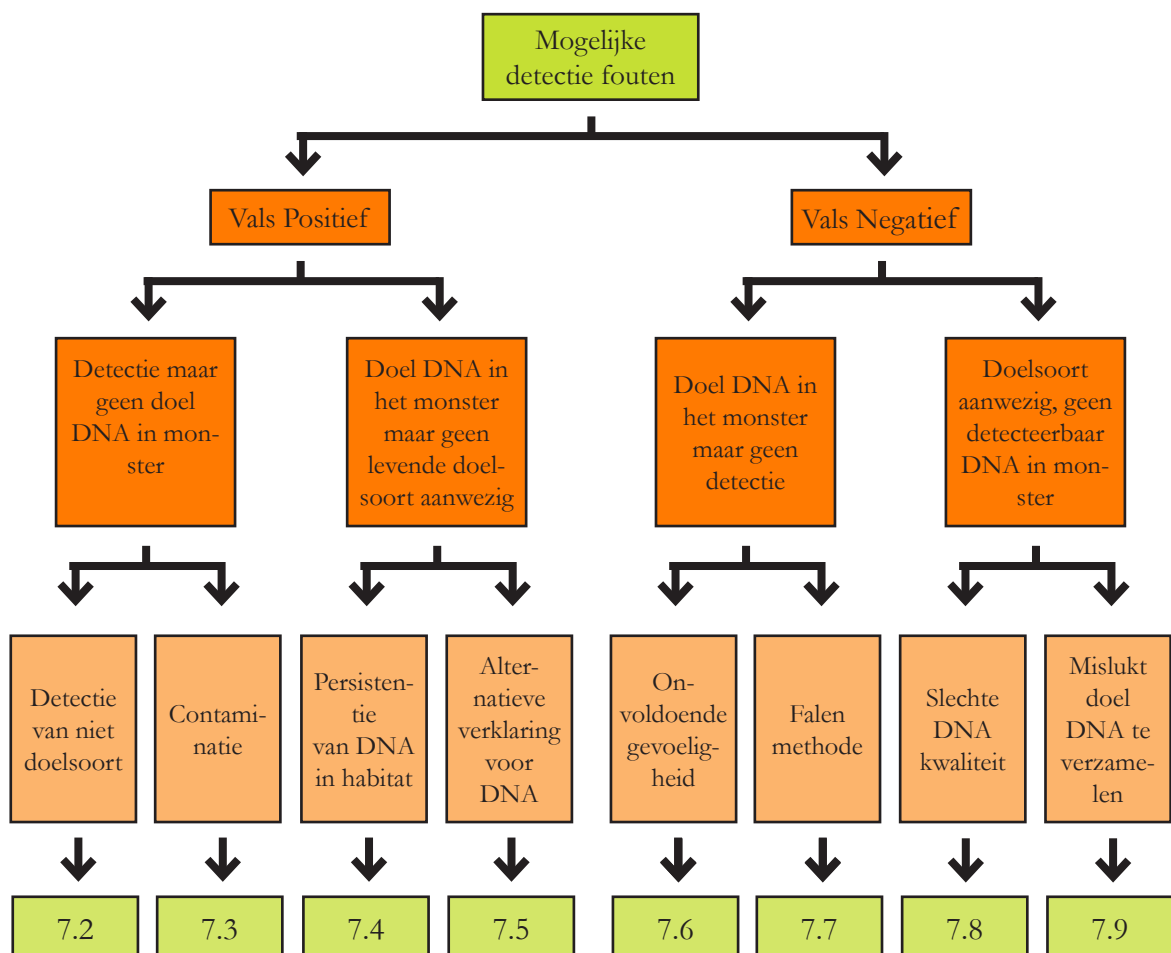
Het is bij dieetonderzoek voorgesteld om de eDNA metabarcoding te koppelen aan klassieke technieken voor een meer accurate kwalitatieve en kwantitatieve analyse (De Barba *et al.*, 2013; Valentini *et al.*, 2009a). Ook is het mogelijk de eDNA metabarcoding te combineren met andere inventarisatietechnieken, bijvoorbeeld het steekproefsgewijs bemonsteren met traditionele methoden om zo een schatting te krijgen van de populatiedichtheid en verhoudingen tussen soorten die vervolgens kan worden geëxtrapoleerd naar de uitkomsten van de eDNA metabarcoding .

7 Wat is de betrouwbaarheid van de eDNA methode?

7.1 Betrouwbaarheid

De betrouwbaarheid van een methode is cruciaal voor de implementatie in beleidsvraagstukken. In tegenstelling tot traditionele inventarisatietechnieken zijn er bij de eDNA methode geen fysieke observaties van de doelsoort. Bij traditioneel veldwerk worden fouten of mogelijke verbeteringen van het protocol vaak tijdens de werkzaamheden al opgespoord en kan er direct wat aan gedaan worden. Bijvoorbeeld als een doelsoort met de standaardinspanning niet wordt gevonden, terwijl deze wel wordt verwacht, kan er een extra inspanning worden gedaan. Bij de eDNA methode is de doelsoort tot aan de analyse van de monsters (nagenoeg) onzichtbaar. Het is daarom van het grootste belang om te werken met strikte protocollen en gevalideerde methoden voor monstername, opslag, DNA extractie en analyse. Voor alle inventarisatiemethoden zijn er meerdere bronnen voor fouten in de procedure die kunnen resulteren in ofwel valse positieven (soort onterecht gedetecteerd) als valse negatieven (soort onterecht niet gedetecteerd). Het is dan ook cruciaal om te begrijpen welke mogelijke bronnen van fouten er zijn om deze uit te kunnen sluiten zodat de uitkomsten betrouwbaar zijn. In figuur 7.1 wordt naar Darling en Mahon (2011) een overzicht gegeven van mogelijke fouten in de procedure. Onderin de figuur worden de paragraafnummers waar de fout in dit hoofdstuk wordt besproken.

Figuur 7.1: Overzicht van potentiële fouten in de eDNA detectie procedure met in de onderste rij het paragraafnummer waarin de fout wordt besproken (naar: Darling en Mahon (2011)).



7.2 Detectie van niet-doelsoorten

Wanneer de gebruikte primers niet soortspecifiek werken, kunnen ze binden aan DNA van andere soorten (kruisamplificatie) en een vals positief veroorzaken. Het primerontwerp en met name de validatie is daarom cruciaal, dit betekent het testen *in silico*, *in vitro* en *in situ* (zie hoofdstuk 3). Het is belangrijk om de primer in een pilotstudie te testen waarbij op meerdere locaties monsters worden genomen, waarvan bij voorkeur meer dan 6 locaties met aanwezigheid van de doelsoort (positieve controle) en meer dan 3 vergelijkbare locaties waar de doelsoort niet aanwezig is (negatieve controle) (Ficetola *et al.*, 2008). Hiermee kan worden gecontroleerd of er geen soort aanwezig is in het voor de doelsoort geschikte habitat die een vals positief veroorzaakt. Andere mogelijkheden zijn het klonen en sequencen van PCR producten (Thomsen *et al.*, 2012a) en het sequencen met behulp van NGS (Ficetola *et al.*, 2008) om zo expliciet de gevonden sequentie te bevestigen.

Figuur 7.2 voorbeelden verschillende watertypen getest voor de in situ validatie van de eDNA methode voor de grtote modderkruiper. Van boven naar beneden: moeras in de Rijnstrangen, Molenbeek en sloot in Rijswijkse Veld.



7.3 Contaminatie

Contaminatie ofwel vervuiling van monsters is zowel in het veld als in het lab een grote zorg, beiden worden daarom apart behandeld.

In het veld

Omdat DNA niet zichtbaar is met het blote oog, moeten er voorzorgsmaatregelen getroffen worden in de vorm van gebruik en het naleven van strikte protocollen. Tijdens de monstername moeten DNA-steriele materialen gebruikt worden, die slechts voor één monster worden gebruikt. Personen die de monstername uitvoeren moeten zeer goed geïnstrueerd zijn over de risico's van vervuiling. De monsters moeten vervolgens gescheiden worden opgeslagen zodat kruisbesmetting niet mogelijk is.

In het laboratorium

In tegenstelling tot traditionele DNA werkzaamheden, waarbij grote hoeveelheden DNA van hoge kwaliteit worden gebruikt, wordt bij eDNA gewerkt met extreem lage concentraties van meestal sterk gedegradieerd DNA. Daardoor kan besmetting met slechts enkele DNA moleculen genoeg zijn om tot een valse positief te leiden. Opgeloste stoffen in de lucht kunnen soms duizenden DNA moleculen bevatten en vormen daarom een serieuze bron van vervuiling. Het laboratorium moet daarom specifiek hierop ingericht zijn. Met gescheiden ruimtes voor extractie (lage concentratie DNA) en PCR (hoge concentratie DNA). Daarbij worden extra maatregelen genomen als overdruk in ruimtes met lage concentraties DNA, zodat vervuilde lucht uit andere ruimtes hier niet kan binnendringen. Daarnaast kunnen ruimtes nachtelijk gereinigd worden met UV radiatie. Zonder deze voorzorgsmaatregelen zijn besmettingen onvermijdelijk, zie voor meer details hoofdstuk 3.

7.4 Persistentie van DNA in het milieu

Wanneer eDNA in het milieu persisteert nadat een soort vertrokken of uitgestorven is, kan dit leiden tot valse positieven. De persistentie van DNA varieert onder verschillende milieufactoren, zie hoofdstuk 2. Verschillende onderzoek toonden aan dat het verval van DNA in het water erg snel gaat en het binnen enkele weken degradeert tot een ondetecteerbaar niveau (Barnes *et al.*, 2013; Dejean *et al.*, 2011; Pilliod *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2012a). De aanwezigheid van eDNA van een soort in het water geeft daarom actuele aanwezigheid aan of aanwezigheid in een korte periode voor de monstername (Dejean *et al.*, 2011). In de bodem (Willerslev *et al.*, 2007; Yoccoz *et al.*, 2012) en waterbodems (Anderson-Carpenter *et al.*, 2011; Coolen enb Overmann, 2007; Parducci *et al.*, 2012) kan DNA voor een veel langere periode persisteren. Afhankelijk van de vraag kan de strategie van monstername hierop worden aangepast. Bijvoorbeeld wanneer men wil weten of een soort ooit heeft voorgekomen, kan bemonstering van de sediment uit de waterbodem een uitkomst bieden.

7.5 Overige verklaringen voor de aanwezigheid van DNA

Er worden hieronder verschillende verklaringen beschreven voor de aanwezigheid van eDNA in een aquatisch milieu zonder dat de doelsoort aanwezig is.

Uitscheiding door roofdieren

Roofdieren zoals visetende vogels kunnen DNA verspreiden door de doelsoort op de ene locatie te consumeren en op een andere locatie resten hiervan uit te scheiden. In een Amerikaans onder-

zoek bleek dat aalscholvers, arenden en pelikanen die zilverkarper gevoerd kregen, tot vijf dagen zilverkarper DNA in hun uitwerpselen hadden (Amberg *et al.*, 2013). Dit betekent dat ze kunnen fungeren als vector voor DNA tussen locaties. Echter dient te worden opgemerkt dat de hoeveelheid en kwaliteit van het DNA dat na verwerking door het maag darmkanaal overblijft erg laag is. Er kan daarom op deze manier slechts een geringe hoeveelheid DNA worden getransporteerd. In combinatie met de grote volumes van oppervlaktewateren, de hoge degradatie van eDNA in het water en de lage volumes die bij monsternamen verzameld worden, wordt de kans op contaminatie met doelsoort DNA van een monster via deze vector zeer laag geacht.

Figuur 7.3: de kans op contaminatie met DNA verspreid via predatoren zoals deze aalscholwer wordt klein geacht.



Transport via vaartuigen, gebruiksvorwerpen en personen

In theorie kunnen materialen als boten, waadpakken en vistuigen als vector dienen voor DNA transport. Ook bij deze vector zijn de hoeveelheden DNA die mogelijk worden getransporteerd zeer klein (aangenomen dat de veldwerkers zelf voorzorgsmaatregelen treffen en dus enkel andere vectoren een rol spelen), waardoor de kans op monstercontaminatie verwaarloosbaar klein is.

Figuur 7.4: in theorie kunnen vistuigen, zoals deze zege, als vector dienen voor DNA transport.



Ballastwater

Sommige schepen maken gebruik van ballastwater om de stabiliteit te waarborgen bij verschillende belading. Dit ballastwater wordt vaak in de ene haven ingelaten en in de volgende haven geloosd. Hierdoor kan DNA (en soms ook soorten) van het ene naar het andere waterlichaam worden verplaatst. Afhankelijk van de persistentie van eDNA in ballastwater kan dit in het laatste waterlichaam leiden tot onterechte detectie van soorten. Dit speelt mogelijk een rol in wateren waar scheepvaart plaatsvindt, maar in de meeste gevallen vindt eDNA inventarisatie plaats in kleine of afgesloten waterlichamen zonder scheepvaart. Wanneer het onderzoek zich richt op grote rivieren, kanalen en mariene milieus moet ballastwater als vector voor DNA worden meegenomen bij interpretatie van de resultaten. Zo kunnen positieven alleen worden geaccepteerd wanneer deze in meerdere tijdvakken kunnen worden gereproduceerd, of wanneer een bepaalde drempelwaarde van de DNA concentratie overschreden wordt.

Rioolwater

In het geval dat de doelsoort wordt geconsumeerd, gefokt of gehouden als huisdier, kan lozing van rioolwater een bron zijn van DNA vervuiling in het oppervlaktewater. Voor de meeste beschermde soorten is deze vorm van vervuiling onwaarschijnlijk, omdat deze meestal niet in gevangenschap gehouden of verhandeld mogen worden. Voor exoten, zoals sommige huisdieren of fokdieren, kan deze bron van vervuiling mogelijk tot valse positieven leiden. Zo is bijvoorbeeld vastgesteld dat smeltwater van ijs waarop Aziatische karpers werden bewaard kon leiden tot onterechte detectie van Aziatische karper in het milieu (ECALS, 2013).

Figuur 7.5: rioolwater kan een bron van vervuiling zijn van DNA in het oppervlakte water.



Verplaatsing door waterstromen

In beken en rivieren, maar ook in grote wateren als oceanen zorgen waterstromen er voor dat eDNA zich van de bron naar andere locaties kan verplaatsen. In Nederland is er bijvoorbeeld veel uitwisseling tussen waterlichamen door het inlaten van water en het bemalen van polders. De afstand die DNA in het water kan afleggen hangt af van de persistentie en de stroomsnelheid. Voor oceanen is berekend dat DNA in theorie 40 tot 600km kan afleggen voordat het is gedegra-

deerd tot beneden het detectieniveau (Thomsen *et al.*, 2012b). Door de hoge verdunning neemt de waarschijnlijkheid van eDNA detectie in mariene milieus echter veel sterker af wanneer de afstand tot de bron toeneemt. Hierdoor is aangetroffen van eDNA het meest waarschijnlijk van lokale origine (Thomsen *et al.*, 2012b). Bij een experiment in de Verenigde Staten werden 5 salamanders in een kooi een experiment in een beek geplaatst en werden er op 5 en op 50 meter afstand eDNA monsters genomen. De monsters op 5 meter afstand scoorden allen positief maar in de monsters genomen op 50 meter afstand werd geen eDNA van de salamanders meer aangetroffen (Pilliod *et al.*, 2014). Als verklaring hiervoor werd de met de afstand tot de bron toenemende verdunning van eDNA gegeven. In het Nederlandse watersysteem moet men zich bedacht zijn van de waterstromen in het onderzoeksgebied, deze zijn sterk afhankelijk van het watertype en habitat. Voor bijvoorbeeld de grote modderkruiper bestaat het habitat uit ondiepe sterk begroeide wateren. In deze wateren is de waterstroming door (o.a. door de weerstand) gering en is de verblijftijd hoog. In dit type habitat is de invloed van gebiedsvreemd water daarom verwaarloosbaar.

Figuur 7.6: in stromend water, zoals de Grensmaas, kan DNA van de bron stroomafwaarts verplaatsen.



Vrijkomen van DNA uit sediment

DNA kan voor duizenden jaren persisteren in waterbodems, bijvoorbeeld het sediment van meren (zie paragraaf 7.4 en hoofdstuk 2). De kans bestaat daarom dat eDNA vrijkomt in de waterkolom wanneer de bodem verstoord wordt en het terecht komt in de monster. Aangetroffen doelsoort DNA behoort in dat geval toe aan wellicht al lang verdwenen populaties. Hoewel deze kans klein is, bouwt zich in sommige vijvers een behoorlijke hoeveelheid organisch materiaal op (o.a. dode organismen). Er moet daarom altijd rekening worden gehouden met deze mogelijke bron van valse positieven en bij de bemonstering dient voorkomen te worden dat sediment van de bodem in de monsters belandt.

7.6 *Ontoereikende gevoeligheid*

Ontoereikende gevoeligheid van de methode kan tot valse negatieven leiden, zelfs als er DNA van de doelsoort in het monster aanwezig is. De eerste mogelijke fout komt voor bij extractie van DNA uit het monster. Organische stoffen kunnen DNA binden, en daardoor de extractie inhiberen (zie hoofdstuk 3 voor inhibitie). DNA extractie uit monsters met een hoge concentratie organische stoffen is daarom uitdagend en vraagt om aanpassing van standaard extractieprotocollen.

De tweede fout kan ontoereikende gevoeligheid van het primer ontwerp zijn. Sommige primers binden beter aan het doel-DNA dan andere, waardoor ze beter presteren bij de amplificatie van DNA bij lage concentraties (SantaLucia, 2007). Het aangetroffen eDNA bestaat meestal uit minder dan 150 basenparen. Wanneer primers zich richten op een te lange doelsequentie, dan bestaat de kans het eDNA te missen (Yoccoz *et al.*, 2012). De gevoeligheid van primers moet daarom naast *in silico* en *in vitro* ook goed *in situ* worden getest (zie hoofdstuk 3).

7.7 Het falen van de methode

Het kan gebeuren er iets in de gehele procedure verkeerd gaat. Bijvoorbeeld wanneer monsters niet goed worden bewaard, waardoor het eDNA te ver degradeert. Ook de extractie en analyse kunnen misgaan. Het is daarom verstandig om positieve controles (met DNA van de doelsoort) in het proces mee te nemen, zodat de kan worden vastgesteld of de procedure naar behoren functioneert (Darling & Mahon, 2011). In het algemeen is het verstandig de (fout)gevoeligheid van de gehele procedure te testen, van monstername tot analyse en zo de trefkans te berekenen (zie hoofdstuk 8). Alleen op deze manier is een bepaald niveau van betrouwbaarheid te garanderen.

7.8 Slechte DNA kwaliteit

Te slechte kwaliteit van het DNA in de monsters kan ook tot valse negatieven leiden, omdat detectie dan onmogelijk is. Daarom moet de opslag en verwerking van de monsters na de monstername optimaal zijn om verdere DNA degradatie te voorkomen. Goede primers spelen uiteraard ook een belangrijke rol, omdat deze zo kort mogelijke fragmenten aan moeten tonen. Deze fragmentlengte is uiteraard in balans met de mogelijkheden tot identificatie van verschillende taxonomische niveaus (te korte fragmenten zijn niet meer onderscheidend genoeg om soorten uit elkaar te kunnen houden)(Thomsen *et al.*, 2012a).

7.9 Het DNA van de doelsoort is niet verzameld

Het komt voor dat het DNA van de doelsoort niet wordt verzameld, terwijl de soort en het eDNA daarvan wel in het onderzoeksgebied aanwezig zijn. Dit is een belangrijke bron van valse negatieven. In stilstaande wateren verspreid het eDNA zich niet ver van de bron. In stromende wateren kan dit wel, maar door de hoge verdunning neemt de detectiekans drastisch af bij een grotere afstand van de bron. Ecologische kennis van het habitat en gedrag van de doelsoort is daarom cruciaal (Herder *et al.*, 2013b). Belangrijke vragen hierbij zijn: waar en in welk habitat verblijft de doelsoort in welke periode? Wanneer heeft de doelsoort de hoogste activiteit? Wanneer zit de soort in het water, zoals bij amfibieën het geval is? De meeste van deze vragen kunnen beantwoord worden door ecologen met voldoende kennis, hun inzet is daarom onmisbaar bij het nemen van de monsters (zie hoofdstuk 3). Daarnaast moet het volume van de genomen deelmonsters worden aangepast op de doelsoort en diens habitat om zo de trefkans te optimaliseren (zie tevens hoofdstuk 3).

7.10 Aanbevelingen voor de kwaliteitscontrole en vervolgonderzoek

De potentiële bronnen voor fouten kunnen worden samengevat in vier categorieën waaraan aandacht moet worden besteed om de mogelijkheid tot fouten te minimaliseren (Darling & Mahon, 2011). Zie volgende pagina.

1 Ontwerp moleculaire analyseprocedure

Het is van het grootste belang dat de gebruikte methoden aan een stevige test- en validatieprocedure zijn onderworpen, voordat ze worden in gezet in projecten waarbij de resultaten worden gebruikt om belangrijke beslissingen te nemen. Een probleem kan zijn dat de benodigde expertise voor dergelijke praktijktesten buiten het vakgebied ligt van een gespecialiseerd eDNA laboratorium (Darling & Mahon, 2011). Zoals eerder genoemd moet de gehele procedure worden getest en zijn er veel factoren die het succes van de eDNA methode bepalen. De technieken die in andere studies zijn beschreven, worden vaak slechts deels openbaar gemaakt. Het is daardoor niet zonder meer mogelijk om bij de toepassing van de eDNA methode te verwijzen naar de gevonden trefkansen in andere onderzoeken. Voor iedere aanbieder moet de gehele werkwijze van monsternamen tot en met analyse daarom worden getest om de gevoeligheid vast te stellen (Herder *et al.*, 2013d).

2 *Kwaliteitscontrole op laboratoria*

Darling & Mahon (2011) stellen dat wanneer eDNA routinematig wordt gebruikt door verschillende laboratoria, er een generieke kwaliteitscontrole moet komen. Op deze manier hebben opdrachtgevers en beleidsmakers een kwaliteitsgarantie. Dit kan plaatsvinden door periodieke accreditatie van laboratoria en partners die de eDNA methode aanbieden, dit is bijvoorbeeld reeds geïmplementeerd bij laboratoria in het werkveld van watergebonden ziekteverwekkers bij mensen en vee. De reproduceerbaarheid van de procedure is daarbij een essentiële voorwaarde.

3 *Protocol van monsternamen*

Het succes van de eDNA methode berust op de kans om DNA van de doelsoort in het milieumonster te krijgen. De strategie van de monsternamen, waarbij rekening wordt gehouden met de soort en het habitat, speelt daarbij een cruciale rol (zie paragraaf 7.9). Het vertrouwen in de uitkomst kan worden versterkt door meerdere herhalingen uit te voeren in tijd en ruimte (Hayes *et al.*, 2005). Hetzelfde geldt voor goed opgezette pilotstudies, waarbij wordt gemonsterd op locaties waar aanwezigheid en afwezigheid van de doelsoort bekend zijn (Ficetola *et al.*, 2008; Herder *et al.*, 2013d).

Wanneer de doelsoort in zeer lage dichtheid voorkomt, is er ook de paradox van het valse positief: het is dan onduidelijk of het resultaat komt door een geringe fout in de methode (valse positieven) of daadwerkelijk door de aanwezigheid van de doelsoort in een zeer lage dichtheid (Madison, 2007). Dit geeft soms moeilijkheden bij zeer lage dichtheden van een soort, bijvoorbeeld bij sterk bedreigde soorten of in een zeer vroeg invasiestadium van een exotische soort (Darling & Mahon, 2011).

4 *Onzekerheid tussen de detectie via eDNA en aanwezigheid van een levende doelsoort*

Persistentie van detecteerbaar eDNA varieert tussen verschillende milieus en omstandigheden (zie hoofdstuk 2). Voor water is de persistentie kort (Dejean *et al.*, 2011; Thomsen *et al.*, 2012a, 2012b), in andere milieus kan dit veel langer zijn maar er is hierover nog veel onbekend. Er zal hiernaar meer onderzoek moeten worden gedaan voor een betere interpretatie van resultaten, bijvoorbeeld bij positieve resultaten zonder recente aanwezigheid van de doelsoort. Het is bijvoorbeeld voorgesteld om RNA sjablonen te gebruiken voor een hogere zekerheid van doelsoortaanwezigheid. De afbraak van RNA gaat namelijk veel sneller. Hierdoor heeft RNA een lagere persistentie dan DNA en kan met meer zekerheid de (recente) aanwezigheid van een levend individu van de doelsoort worden vastgesteld (Bott *et al.*, 2010). Voor eencellige organismen, als bacteriën, worden er methoden voorgesteld die onderscheid kunnen maken tussen levende cellen en intacte dode cellen (Nogva *et al.*, 2003; Soejima *et al.*, 2008). Dit laatste is uiteraard niet toepasbaar op eDNA onderzoek met extracellulair DNA.

8 Wat is de trefkans met de eDNA methode?

8.1 Trefkans met de eDNA methode

De trefkans kan omschreven worden als de kans dat eDNA van de doelsoort gedetecteerd wordt met de eDNA methode, aangenomen dat de doelsoort aanwezig is op een locatie. Deze trefkans is afhankelijk van de bemonsteringsstrategie, dichtheid en ecologie van de doelsoort (lukt het om eDNA in het monster te krijgen?) en daarnaast ook van de extractieprotocollen, analyses en specificiteit van de primers (lukt het om eDNA te detecteren wanneer het in het monster aanwezig is?). Er zijn meerdere potentiële fouten die kunnen leiden tot valse negatieven en daarmee tot een lagere trefkans (zie hoofdstuk 7). Het is daarom niet mogelijk om in het algemeen een trefkans te geven voor een soort aangezien deze sterk afhankelijk is van de gebruikte methoden en ervaring van de partij die de eDNA bemonstering en analyse uitvoeren.

Het is wel mogelijk om een trefkans te geven voor de gebruikte methoden in de onderzochte habitats in een bepaalde tijd van het jaar. Dit kan gedaan worden door de methode te testen op een aantal locaties waarvan van te voren bekend is dat de doelsoort aanwezig is. Hieruit is een trefkans af te leiden. Bijvoorbeeld op 16 van de 20 locaties waar de doelsoort voorkomt is deze succesvol gedetecteerd met behulp van de eDNA methode wat een trefkans geeft van 80%. Kennis over de trefkans van een methode is van belang voor het interpreteren van de resultaten. In het geval dat een soort is aangetroffen is er geen twijfel (aangenomen dat valse positieven zijn voorkomen (zie hoofdstuk 7). In het geval dat een soort niet wordt aangetroffen, een zogenaamde nulwaarneming, is de interpretatie moeilijker. Is een soort werkelijk afwezig of is de soort toch aanwezig maar gemist met de ingezette methode? Juist dan is kennis over de trefkans cruciaal voor het interpreteren van de resultaten. Een hogere trefkans van een methode geeft dan meer zekerheid dat een soort ook daadwerkelijk afwezig is. Dit geldt zowel voor de eDNA methode als voor andere methoden.

Omdat de behaalde resultaten uit andere studies een goede indicatie geven van de mogelijke kracht van de eDNA methode zijn deze studies opgesomd in tabel 8.1 (vertebraten) en tabel 8.2 (overige soorten). Er zijn met name studies opgenomen waarbij de eDNA methode in het veld getest is op locaties waarvan van te voren bekend was dat de doelsoort aanwezig was. Dit omdat alleen op deze manier de uitkomsten te valideren zijn en er dus een trefkans kan worden berekend. Daarnaast zijn ook enkele studies opgenomen die een hoge trefkans vonden zonder dat van te voren bekend was dat de doelsoort aanwezig was. Op locaties waar dan geen eDNA is gevonden is het niet bekend of dat komt doordat de eDNA methode de soort gemist heeft of doordat de soort werkelijk niet voorkomt. Voor deze studies is de minimale trefkans gegeven door het symbool '>' toe te voegen.

De gegeven trefkansen zijn uiteraard sterk afhankelijk van de experimentele opzet van deze studies (bemonsteringsstrategie, bemonsterde habitats, extractie en analyse in het lab etc.). Sommige studies hebben bijvoorbeeld de resultaten van meerdere monsters samengevoegd om de aan- of afwezigheid van een soort op een locatie te bepalen. Er zijn dan bijvoorbeeld 3 monsters per locatie genomen waarmee gezamenlijk een 80% trefkans wordt behaald per locatie. Wanneer er echter naar de trefkans van individuele monsters wordt gekeken ligt deze lager. Daarnaast zijn veel trefkansen berekend vanuit een zeer geringe steekproef. Voor een betere schatting van de trefkans zal het nodig zijn de methode op een groter aantal locaties te testen die representatief zijn voor het voorkomen van de soort. Zo zijn er bijvoorbeeld studies die op alle onderzochte locaties de doelsoort aantreffen met de eDNA methode waarmee de trefkans op 100% komt. Dit betekent uiteraard niet dat de eDNA methode perfect is voor deze soorten wanneer deze wordt toegepast op andere locaties. Voor een verdere interpretatie van de trefkansen verwijzen we naar de artikelen waarin de methoden staan beschreven waarmee deze trefkansen zijn behaald.

Tabel 8.1: Onderzoeken waaruit trefkansen voor vertebraten berekend zijn. De tabel geeft de soort, het bemonsterde habitat, de trefkans (exact wanneer bekend was dat de doelsoort aanwezig was op de monsterlocaties en minimaal (weergegeven met ">") wanneer onzeker was of de doelsoort op alle locaties aanwezig was.

Soort	Wetenschappelijke naam	Habitat	Trefkans	Referentie
Amfibieën				
Klauwkikker	<i>Xenopus laevis</i>	Poelen	100% (n=6)	(Secondi <i>et al.</i> , 2013)
Amerikaanse brulkikker	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Poelen	100% (n=9)	(Ficetola <i>et al.</i> , 2008)
Knoflookpad	<i>Pelobates fuscus</i>	Poelen	100% (n=9)	(Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
Knoflookpad	<i>Pelobates fuscus</i>	Poelen	75% (n=4)	(Herder, 2013)
Modderduivel	<i>Cryptobranchus alleganiensis</i>	Beken	20-70% (n=10) **	(Olson <i>et al.</i> , 2012)
Modderduivel	<i>Cryptobranchus alleganiensis</i>	Beken	85% (n=27)	(Santas <i>et al.</i> , 2013)
Kamsalamander	<i>Triturus cristatus</i>	Poelen	91% (n=11)	(Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
Kamsalamander	<i>Triturus cristatus</i>	Poelen	99,3% (n=140)	(Biggs <i>et al.</i> , 2014)
Kamsalamander	<i>Triturus cristatus</i>	Poelen	91,2% (n=239)	(Biggs <i>et al.</i> , 2014)
Idaho giant salamander *	<i>Dicamptodon aterrimus</i>	Rivieren / Beken	100% (n=6)	(Goldberg <i>et al.</i> , 2011)
Italiaanse kamsalamander	<i>Triturus carnifex</i>	Poelen	100% (n=8)	(van Delft <i>et al.</i> , 2013)
Rocky Mountain tailed frog *	<i>Ascaphus montanus</i>	Rivieren / Beken	83% (n=6)	(Goldberg <i>et al.</i> , 2011)
Vogels				
Struisvogel	<i>Struthio camelus</i>	Bodem / Sediment	14% (n=7)***	(Andersen <i>et al.</i> , 2012)
Vissen				
Zonnebaars	<i>Lepomis macrochirus</i>	Poelen	100% (n=8)	(Takahara <i>et al.</i> , 2013)
Karper	<i>Cyprinus carpio</i>		90% (n=21)	(Takahara <i>et al.</i> , 2012)
Grote modderkruiper	<i>Misgurnus fossilis</i>	Sloten / stilstaand water	> 54% (n=15)	(Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
Grote modderkruiper	<i>Misgurnus fossilis</i>	Poelen	100% (n=11)	(Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
Grote modderkruiper	<i>Misgurnus fossilis</i>	Sloten / stilstaand water	100% (n=9)	(De Bruin <i>et al.</i> , 2014)
Grote modderkruiper	<i>Misgurnus fossilis</i>	Sloten / stilstaand water	87,5% (n=8)	(Herder <i>et al.</i> , 2012)
Grote modderkruiper	<i>Misgurnus fossilis</i>	Sloten / Poelen	75% (n=24)	(Herder <i>et al.</i> , 2013b)
Zoogdieren				
Knaagdieren	<i>Rodentia</i>	Faeces (van de soort zelf)	92% (n = 49)	(Galan <i>et al.</i> , 2012)
Knaagdieren	<i>Rodentia</i>	Faeces (dieet analyse)	> 67% (n=12)	(Galan <i>et al.</i> , 2012)
Knaagdieren	<i>Rodentia</i>	Braakballen	> 82% (n=11)	(Galan <i>et al.</i> , 2012)
Otter	<i>Lutra lutra</i>	Rivieren / Beken	27% (n=15)	(Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
Damhert	<i>Cervus dama</i>	Speeksel	> 75%(n=1044)	(Nichols <i>et al.</i> , 2012)
Bruinvis	<i>Phocoena phocoena</i>	Oceaan	20% (n=5)	(Foote <i>et al.</i> , 2013)
Eland	<i>Alces alces</i>	Speeksel	> 75%(n=1044)	(Nichols <i>et al.</i> , 2012)
Edelhert	<i>Cervus elaphus</i>	Speeksel	> 75%(n=1044)	(Nichols <i>et al.</i> , 2012)
Ree	<i>Capreolus capreolus</i>	Speeksel	> 75%(n=1044)	(Nichols <i>et al.</i> , 2012)
Noordse woelmuis	<i>Microtus oeconomus</i>	Faeces (van de soort zelf)	> 75%(n=8)	(Herder <i>et al.</i> , 2013a)
Noordse woelmuis	<i>Microtus oeconomus</i>	Sloten / stilstaand water	> 50% (n=10)	(Herder <i>et al.</i> , 2013a)
Waterspitsmuis	<i>Neomys fodiens</i>	Sloten / stilstaand water	> 0% (n=10)	(Herder <i>et al.</i> , 2013a)
Meerdere soorten	<i>Mammalia</i>	Bodem / Sediment	75% (n=?)	(Andersen <i>et al.</i> , 2012)
Reptiles				
Tijgerpython	<i>Python bivittatus</i>	Sloten / stilstaand water	100% (n=5)	(Piaggio <i>et al.</i> , 2013)
Europese moerasschildpad	<i>Emys orbiculatus</i>	Poelen	60-100% (n=8)****	(Jean, 2013)

* Geen Nederlandse naam voorhanden

** Afhankelijk van de dichtheid van de soort

*** Alleen aangetoond op 0-2 cm diepte (overige monsters waren dieper verzameld)

**** Afhankelijk van de bemonsteringsstrategie

Tabel 8.2: Onderzoeken waaruit treffkansen voor overige soorten berekend zijn. De tabel geeft de soort, het bemonsterde habitat, de treffkans (exact wanneer bekend was dat de doelsoort aanwezig was op de monsterlocaties en minimaal (weergegeven met ">") wanneer onzeker was of de doelsoort op alle locaties aanwezig was.

Soort	Wetenschappelijke naam	Habitat	Treffkans	Referentie
Libellen				
Groene glazenmaker	<i>Aeshna viridis</i>	Sloten / Poelen	78% (n=9)	(Herder <i>et al.</i> , 2013c)
Gevlekte witsnuitlibel	<i>Leucorrhinia pectoralis</i>	Poelen / Meren	82% (n=11)	(Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
Gevlekte witsnuitlibel	<i>Leucorrhinia pectoralis</i>	Sloten / Poelen	75 % (n=8)	(Herder <i>et al.</i> , 2013c)
Kreeftachtigen				
Rode Amerikaanse rivierkreeft	<i>Procambarus clarkii</i>	Poelen	73% (n=158)	(Treguier <i>et al.</i> , subm)
Humus kieuwpootkreeft	<i>Lepidurus apus</i>	Poelen	100% (n=10)	(Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
Molluscs				
Jenkins' waterhoren	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Rivieren / Beken	83% (n=6)	(Goldberg <i>et al.</i> , 2013)
Driehoeksmossel	<i>Dreissena polymorpha</i>	Meren	10% (n=20) *	(Lance and Carr, 2012)
Driehoeksmossel	<i>Dreissena polymorpha</i>	Meren	51 % (n=37)**	(Lance and Carr, 2012)
Fungi				
Chytride schimmel	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Poelen	90% (n=20) ***	(Hyman and Collins, 2012)
Chytride schimmel	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Poelen	> 67% (n = 42)	(Walker <i>et al.</i> , 2007)
Chytride schimmel	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Bodem / Sediment	> 8% (n=52)	(Walker <i>et al.</i> , 2007)
Virus				
Herpesvirus 3	<i>Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3)</i>	Rivieren / Beken	> 90% (n=103)	(Minamoto <i>et al.</i> , 2012)

* methode 2l water monster in fles, ** Method: 10l water filteren met doek, *** Gebased op 4 monsters per locatie

Figuur 8.1: soorten die succesvol zijn aangetoond met environmental DNA. Met de klok mee vanaf linksboven: kamsalamander, struistvogel, grote modderkruiper, Europese moerasschildpad, otter en rode Amerikaanse rivierkreeft



8.2 Analyseren van resultaten met behulp van occupancy modellen

Bij elke inventarisatie is het onwaarschijnlijk dat alle individuen, populaties of soorten gedetecteerd zullen worden (Schmidt *et al.*, 2013; Yoccoz *et al.*, 2001). Occupancy modellen kunnen dan een uitkomst bieden. Deze modellen gebruiken het patroon van positieve en negatieve waarnemingen (nulwaarnemingen) om trefkansen te berekenen. Door gebruik te maken van deze trefkansen is het mogelijk om het werkelijke aantal locaties waar een soort voorkomt te schatten (MacKenzie *et al.*, 2002). Occupancy modellen kunnen ook gebruikt worden om het aantal eDNA monsters te berekenen dat nodig is voor een cumulatieve trefkans van 95% of meer, hiervoor zijn minimaal 20 testlocaties nodig (Schmidt *et al.*, 2013). Voor veel ecologisch onderzoek kunnen deze modellen bruikbaar zijn omdat ze de mogelijkheid bieden trends in verspreiding te genereren op basis van een lagere inspanning. Het nadeel van occupancy modellen is echter dat ze enkel berekenen op welk deel van de locaties de doelsoort aanwezig is. Het is dus niet mogelijk om met occupancy modellen te berekenen op welke van de locaties, die met de eDNA methode gemist zijn, de doelsoort toch voorkomt (Schmidt *et al.*, 2013). Nieuwe statistische methoden zijn nodig om het volledige potentieel van de eDNA techniek te benutten (Yoccoz, 2012).

8.3 Trefkansen per soortgroep

De trefkans met de eDNA methode is afhankelijk van de ecologische eigenschappen van de doelsoorten. Allereerst is de gemiddelde dichtheid waarin een soort voorkomt van belang voor de trefkans. Soorten die territoriaal zijn komen vaak in veel lagere dichtheden voor, waardoor ze moeilijker aan te tonen zijn. De otter (*Lutra lutra*) heeft bijvoorbeeld een groot territorium waardoor de kans afneemt dat een eDNA monster dicht genoeg bij de otter in de buurt verzameld wordt om de soort aan te tonen (Thomsen *et al.*, 2012a). Micro-organismen komen daarentegen vaak in relatief hoge dichtheden voor en het is aannemelijk dat ze in hun geheel in het monster terecht komen (waardoor het DNA nog intact is en er dus een hogere kans is dat de primers succesvol kunnen binden). Als tweede speelt het voorkeurshabitat waarin een soort voorkomt een belangrijk rol. Soorten die in kleine wateren zoals poelen en sloten leven zijn makkelijker te detecteren dan soorten die in grote wateren zoals rivieren, meren of oceanen leven. Daarnaast is de extractie van eDNA lastiger in sommige habitats (zie hoofdstuk 9). Soorten die semi-aquatisch zijn zullen bijvoorbeeld moeilijker te detecteren zijn dan aquatische soorten omdat ze minder eDNA in het water zullen achterlaten (Herder *et al.*, 2013a). Tot slot spelen soortspecifieke eigenschappen die van invloed zijn op de hoeveelheid eDNA die organismen achterlaten in hun omgeving een rol. Herbivoren consumeren grotere hoeveelheden voedsel dan carnivoren waardoor het aannemelijk is dat ze meer faeces produceren en dus ook meer eDNA achterlaten in hun omgeving (Thomsen *et al.*, 2012a). De larven van amfibieën groeien erg snel en metamorfoserend waarbij ze grote hoeveelheden eDNA afscheiden. Daarnaast is bekend dat de het slijm van amfibieën en vissen een belangrijke bron van DNA vormt (Livia *et al.*, 2006). Treguier *et al.* (subm.) suggereren dat kreeften en andere invertebraten door hun uit chitine bestaande exoskelet waarschijnlijk lagere hoeveelheden eDNA in hun omgeving achterlaten. Voor vogels en zoogdieren is het eveneens waarschijnlijk dat hun veren en haren minder eDNA achterlaten dan de slijmerige huid van vissen en amfibieën.

Voor planten en mossen kan de eDNA methode ook gebruikt worden. Verschillende studies hebben eDNA metabarcoding toegepast voor het in kaart brengen van (historische) plantgemeenschappen (Giguet-Covex *et al.*, 2014; Taberlet *et al.*, 2012; Valentini *et al.*, 2010; Willerslev *et al.*, 2014). In deze meta barcoding studies is het niet altijd mogelijk tot op soort te determineren. Zo ver bij ons bekend zijn er geen publicaties waarin de eDNA is ingezet om een enkele plantensoort op te sporen. Meer onderzoek hiernaar is nodig.

Een trefkans geven voor een hele soortgroep is niet mogelijk. Er dient gekeken te worden naar de individuele eigenschappen van de soorten zoals hierboven beschreven. Over het algemeen kan gesteld worden dat de eDNA methode zeer geschikt is voor het detecteren van amfibieën. Dit komt doordat amfibieën veelal in kleine, vaak geïsoleerde, wateren voorkomen en hoge aantallen larven produceren. Voor vissen zijn de resultaten over het algemeen ook goed maar zijn ze wel afhankelijk van de ecologie van de soort en belangrijker nog, van het voorkeurs habitat waarin de soort voorkomt. Kleine stilstaande wateren geven bijvoorbeeld betere resultaten dan grote stromende wateren (zie hoofdstuk 9). Zoogdieren, reptielen en vogels zijn over het algemeen lastigere te detecteren met eDNA doordat ze veelal op land leven of slechts ten dele in het water, vaak in lagere dichtheden voorkomen en geen slijmerige huid hebben waardoor ze naar verwachting minder eDNA produceren.

Bij de ongewervelden geven de grotere aquatische soorten zoals kreeften en libellen redelijk goede resultaten. De trefkans is echter sterk afhankelijk van de dichtheid van de doelsoort. Voor kleinere aquatische invertebraten is het onzeker of deze genoeg eDNA achter laten in hun omgeving om ook in lagere dichtheden gedetecteerd te kunnen worden. Moleculaire technieken waarbij DNA uit bijvoorbeeld macrofaunamonsters wordt geëxtraheerd en geanalyseerd geven wel goede resultaten. Strikt genomen gaat het hier echter niet om de eDNA methode maar om barcoding (de hele organismen zijn aanwezig in de monsters), daarom worden deze studies hier buiten beschouwing gelaten (zie hoofdstuk 1). Hetzelfde geldt voor micro-organismen zoals bacteriën, schimmels en virussen. Voor deze groepen is het waarschijnlijk dat DNA dat in monsters wordt gevonden afkomstig is van hele organismen. Omdat de monstermethoden voor deze soorten echter gelijk zijn aan die voor eDNA onderzoek en de resultaten over het algemeen goed zijn hebben we enkele voorbeelden opgenomen in tabel 8.2. Tot slot is in hoofdstuk 11 de verwachte toepasbaarheid voor invasieve exoten die in Nederland voorkomen of te verwachten zijn beschreven.

Figuur 8.2: de slijmerige huid van amfibieën en vissen staat bekend als belangrijke bron van DNA. Met de klok mee vanaf linksboven: heikikker, zeelt, kabeljauw en Alpenwatersalamander.



9 In welke habitats kan de eDNA methode worden toegepast?

De eDNA methode kan worden toegepast in een groot aantal verschillende habitats. In dit hoofdstuk beschrijven we de verschillende habitats waarin de eDNA methode kan worden ingezet en de voordelen en beperkingen van deze habitats in relatie tot de eDNA methode. De verschillende habitats kunnen worden onderverdeeld in aquatische habitats (watermonsters) en sedimenten en bodems. Daarnaast kunnen diersporen zoals uitwerpselen, haren of speeksel gebruikt worden om op basis van DNA de soort te achterhalen. Tot slot kunnen organismen dienen als verzamelaars van eDNA (bijv. dieetanalyses van faeces, honing verzameld door bijen en bloed uit bloedzuigers).

9.1 Aquatische habitats

In water kan eDNA zich verspreiden over een groter oppervlak vanaf de bron door het oplosend vermogen van water. Dit vergroot de kans dat eDNA wordt aangetroffen in een watermonster. De persistentie van eDNA in water is relatief laag, variërend van een week tot een maand (zie hoofdstuk 2.2). Wanneer er eDNA in een watermonster wordt aangetroffen wijst dat dus op recente aanwezigheid van de doelsoort (Dejean *et al.*, 2011). Aquatische habitats kunnen worden onderverdeeld in zoet- en zoutwater habitats. Verder kan er onderscheid worden gemaakt tussen stilstaande en stromende wateren, tussen kleine en grote wateren en tussen geïsoleerde en niet-geïsoleerde wateren. Hieronder worden de verschillende aquatische habitats besproken. Een overzicht van studies naar de toepassing van eDNA in aquatische habitats wordt gegeven in tabel 9.1.

9.1.1 Stilstaand zoetwater

Poelen

Poelen zijn kleine geïsoleerde wateren. Door deze isolatie migreren doelsoorten niet naar andere gebieden (zoals bij een netwerk van sloten kan) en door de geringe grootte van poelen is de kans groot dat een monster dichtbij de doelsoort verzameld wordt. Daarnaast is ook de verdunning van het eDNA relatief laag door kleinere watervolumes en het stilstaande water (het water wordt dus niet verdund met eDNA-vrij water van andere locaties). Al deze eigenschappen zijn voordelig voor het toepassen van de eDNA methode. Studies waarin de eDNA methode getest is in poelen waarvan van te voren bekend was dat de doelsoort ervoor kwam waren zeer succesvol. In deze studies werden trefkansen voor de eDNA methode gevonden tussen de 73% en 100% (zie tabel 8.1 en 8.2).

Meren

Meren zijn stilstaande, vaak geïsoleerde wateren. Qua eigenschappen lijken ze enigszins op poelen maar ze zijn vele malen groter. Door de grotere watervolumes in meren en mogelijke stroming veroorzaakt door windwerking wordt eDNA in meren vaak sterker verdund. Voor het succesvol toepassen van de eDNA methode speelt ecologische kennis (binnen welke habitats dient gezocht te worden) en het daarop aanpassen van de bemonsteringsstrategie een cruciale rol. Verschillende studies hebben de eDNA methode getest in meren. Er zijn slechts enkele studies waaruit trefkansen berekend kunnen worden en de gevonden trefkansen zijn over het algemeen lager dan die in kleinere wateren. Er zijn enkel trefkansen bekend voor weekdieren en zoogdieren en deze variëren van 10% tot 51% (Lance en Carr, 2012; Thomsen *et al.*, 2012a) (Zie tabel 8.1 en tabel 8.2).

Tabel 9.1: studies waarin de eDNA methode in aquatische habitats is getest.

Habitat	Soort	Referentie
Stilstaand zoetwater		
Sloten	Amerikaanse brulkikker	(Herder <i>et al.</i> , 2013d)
	Grote modderkruiper	(De Bruin <i>et al.</i> , 2014; Herder <i>et al.</i> , 2012, 2013b; Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
	Groene glazenmaker	(Herder <i>et al.</i> , 2013c)
	Noordse woelmuis	(Herder <i>et al.</i> , 2013a)
	Waterspitsmuis	(Herder <i>et al.</i> , 2013a)
	Gevlekte witsnuitlibel	(Herder <i>et al.</i> , 2013c)
Poelen	Klauwkikker	(Secondi <i>et al.</i> , 2013)
	Amerikaanse brulkikker	(Dejean <i>et al.</i> , 2012, 2011; Ficetola <i>et al.</i> , 2008; Herder <i>et al.</i> , 2013d)
	Zonnebaars	(Takahara <i>et al.</i> , 2013)
	Chytride schimmel	(Hyman and Collins, 2012; Walker <i>et al.</i> , 2007)
	Knoflookpad	(Herder, 2013; Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
	Grote modderkruiper	(Herder <i>et al.</i> , 2012, 2013b; Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
	Kamsalamander	(Biggs <i>et al.</i> , 2014; Herder <i>et al.</i> , 2013d; Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
	Groene glazenmaker	(Herder <i>et al.</i> , 2013c)
	Italiaanse kamsalamander	(van Delft <i>et al.</i> , 2013)
	Rode Amerikaanse rivierkreeft	(Treguier <i>et al.</i> , subm)
	Siberische steur	(Dejean <i>et al.</i> , 2011)
	Humus kieuwpootkreeft	(Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
	Gevlekte witsnuitlibel	(Herder <i>et al.</i> , 2013c; Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
Kanalen	Grootkopkarper	(Jerde <i>et al.</i> , 2011)
	Zilverkarper	(Jerde <i>et al.</i> , 2011)
Meren / Lagunes	Grootkopkarper	(Jerde <i>et al.</i> , 2013)
	Karper	(Takahara <i>et al.</i> , 2012)
	Otter	(Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
	Zilverkarper	(Jerde <i>et al.</i> , 2013)
	Driehoeksmossel	(Lance and Carr, 2012)
Stromend zoetwater		
Beken	Modderduivel	(Olson <i>et al.</i> , 2012; Santas <i>et al.</i> , 2013)
	Otter	(Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
	Idaho giant salamander*	(Goldberg <i>et al.</i> , 2011)
	Rocky Mountain tailed frog*	(Goldberg <i>et al.</i> , 2011)
Rivieren	Grootkopkarper	(Jerde <i>et al.</i> , 2013, 2011; Mahon <i>et al.</i> , 2013)
	Black carp*	(Mahon <i>et al.</i> , 2013)
	Goudvis / Karper	(Mahon <i>et al.</i> , 2013)
	Graskarper	(Mahon <i>et al.</i> , 2013)
	Herpesvirus 3	(Minamoto <i>et al.</i> , 2012a, 2009)
	Vissen	(Minamoto <i>et al.</i> , 2012b)
	Jenkin's waterhoren	(Goldberg <i>et al.</i> , 2013)
Zilverkarper	(Jerde <i>et al.</i> , 2013, 2011; Mahon <i>et al.</i> , 2013)	

* geen Nederlandse naam voorhanden

Vervolg tabel op volgende pagina ...

Vervolg tabel 9.1 (zie vorige pagina)

Habitat	Soort	Referentie
Zoutwater		
Oceanen	Zeepokken	(Jones <i>et al.</i> , 2008)
	Mossel	(Jones <i>et al.</i> , 2008)
	Strandkrab	(Jones <i>et al.</i> , 2008)
	Bruinvis	(Foote <i>et al.</i> , 2013)
	Bacteriën	(Preston <i>et al.</i> , 2011)
	Vissen	(Thomsen <i>et al.</i> , 2012)(Thomsen <i>et al.</i> , 2012)
	Micro-organismes	(Sogin <i>et al.</i> , 2006)
	Borstelwormen	(Jones <i>et al.</i> , 2008)

Figuur 9.1 poel op Wieringen (links) en meer bij Botsbol (rechts)



Sloten

Sloten zijn kleine tot middelgrote door de mens gegraven watergangen. Ze worden vaak gebruikt om water uit laaggelegen gebieden af te voeren of voor irrigatie doeleinden. Sloten zijn zeer algemeen in agrarische gebieden in de lagere delen van West-Europa. Alleen in Nederland al ligt een netwerk van 300.000 kilometer aan sloten. Doordat sloten vaak verbonden zijn via een uitgebreid netwerk kunnen soorten binnen een slootsysteem migreren. Dit verlaagt de trefkans omdat de kans groter wordt dat monsters verder van de doelsoort af worden verzameld. Daarom speelt ook in slootssystemen ecologische kennis over het habitatgebruik van de doelsoort in relatie tot de tijd van het jaar een cruciale rol bij het optimaliseren van de bemonsteringsstrategie met eDNA (Herdler *et al.*, 2013b). Watervolumes in sloten zijn relatief klein en het water in sloten staat over het algemeen stil waardoor er weinig verdunning optreedt. Voor het inzetten van de eDNA methode in sloten is het van belang rekening te houden met de waterhuishouding in deze sloten. Sloten staan vaak in verbinding met boezemwateren en in periodes van droogte wordt in sommige gebieden gebiedsvreemd water ingelaten. Dit zou kunnen leiden tot valse positieven. Dit speelt echter waarschijnlijk enkel een rol in de grotere watervoerende sloten en niet in de kleine doodlopende verlandende sloten die de haarvaten van het systeem vormen omdat gebiedsvreemd water zelden zover door zal dringen. Daarnaast zal eDNA verder van de bron af snel verdunnen waardoor de kans op valse positieven ook sterk afneemt. De met de eDNA methode behaalde resultaten in sloten zijn over het algemeen goed, maar gemiddeld genomen iets lager dan in poelen. Hier dient wel opgemerkt te worden dat de trefkans een onderschatting kunnen zijn omdat soorten binnen

een slootsysteem kunnen migreren en er weinig studies zijn die gelijktijdig de doelsoort hebben gevangen en met eDNA hebben bemonsterd. Hierdoor was de aanwezigheid van de doelsoort op de bemonsterde locaties vaak aannemelijk maar niet honderd procent zeker.

Studies waarin de eDNA methode getest is in sloten komen uit Nederland en Denemarken. De trefkansen in deze studies varieerde tussen de 54% en 100% voor aquatische soorten als vissen (Herder *et al.*, 2012, 2013b; Thomsen *et al.*, 2012a De Bruin *et al.*, 2014;) en libellen (Herder *et al.*, 2013c) en van 0 tot minimaal 50% voor kleine zoogdieren die op de wateroever leven (Herder *et al.*, 2013a) (zie tabel 8.1 en tabel 8.2).

Figuur 9.2 sloot in de Achterhoek (links) en Noordhollands Kanaal (rechts)



Kanalen

Kanalen zijn net als sloten door de mens gegraven watergangen maar dan vele malen groter. Ze zijn vaak aangelegd om rivieren, zeeën en stroomgebieden met elkaar te verbinden voor de scheepvaart.

Qua eigenschappen komen kanalen het dichtst in de buurt bij die van meren, met grote watervolumes en mogelijke stroming. Zo ver bij ons bekend zijn er geen studies bekend waarin meerdere kanalen waarvan van te voren bekend was of de doelsoort aanwezig was onderzocht zijn. Er zijn daarom nog geen trefkansen te berekenen. Wel zijn er in de Verenigde Staten succesvol Aziatische karpers aangetoond met de eDNA methode in kanalen. Maar doordat er geen kennis was over het werkelijk voorkomen van de karpers is het niet mogelijk een trefkans te berekenen.

9.1.2 Stromend zoetwater

Beken

Beken zijn relatief kleine stromende wateren. Door deze stroming wordt eDNA dat in het water wordt losgelaten verspreid over een groter gebied. Met als gevolg dat de eDNA concentratie verdund wordt. Dit maakt eDNA onderzoek in stromende wateren lastiger. Aan de ene kant kan het onzeker zijn of in de monsters aangetroffen eDNA afkomstig is van de monsterlocatie of van verder bovenstrooms. Aan de andere kant zijn de eDNA concentraties lager door continue verdunning. Monsterprotocollen dienen hierop te worden aangepast. Pilliod *et al.* (2014) plaatsten 5 salamanders in een kooi in een beek. Met eDNA monsters genomen op 5 meter afstand konden ze de salamanders detecteren maar op een afstand van 50 meter reeds niet meer. SPYGEN heeft vergelijkbare resultaten geboekt bij een studie waarin een steur in een kooi werd geplaatst in een beek (ongepubliceerde resultaten). Dit suggereert dat het vinden van eDNA dat van ver stroomopwaarts komt onwaarschijnlijk is. Er zijn echter meer studies nodig om dit te bevestigen.

Verscheidende studies hebben de eDNA methode succesvol toegepast in beken. Gevonden trefkansen voor amfibieën varieerden van 20% tot 100%, vaak afhankelijk van de dichtheid van de doelsoort (Goldberg *et al.*, 2011; Olson *et al.*, 2012; Santas *et al.*, 2013). Voor de otter (*Lutra lutra*) is een trefkans van 27% gevonden (Thomsen *et al.*, 2012a) (Zie tabel 8.1. en tabel 8.2).

Rivieren

Rivieren zijn grote natuurlijke wateren die van hun bron naar een zee, meer of andere rivier stromen. Ze zijn vergelijkbaar met beken maar dan een stuk groter. De enorme grootte maakt het toepassen van de eDNA methode nog lastiger. Rivieren kunnen enorme volumes water bevatten, met name tijdens periodes met piekafvoer van bijvoorbeeld smeltwater of overvloedige regen. Verdunning van eDNA zal extreem hoog zijn in deze periodes wat de trefkans aanzienlijk zal verlagen. Het is daarom aanbevolen te monstern in periodes met lage afvoer, uiteraard wel rekening houdend met de ecologie en fenologie van de doelsoort.

Verscheidende studies hebben de toepasbaarheid van de eDNA methode in rivieren getest. Voor soorten die in relatief hoge dichtheden voorkomen zijn goede resultaten behaald. Voor de Jenkins'waterhoren (een invasieve exoot) werd er bijvoorbeeld een trefkans van 83% gevonden wanneer deze voorkwam in dichtheden van 11-144 individuen per m². Voor het herpesvirus 3 werd een trefkans van meer dan 90% gevonden (Minamoto *et al.*, 2012a). Voor organismen die voorkomen in lagere dichtheden zijn er geen trefkansen bekend maar zullen die naar verwachting relatief laag zijn. Meerdere studies hebben succesvol soorten aangetoond met eDNA in rivieren. De bemonsteringsinspanning was echter vaak groot en gegevens over het voorkomen van de doelsoort op het moment van monstern waren niet voorhanden waardoor trefkansen niet kunnen worden bepaald (Jerde *et al.*, 2013, 2011; Mahon *et al.*, 2013a).

Figuur 9.3: beek, de Gulp (links) en rivier, de Loire (rechts)



9.1.3 Zoutwater

Mariene habitats

Zeeën en oceanen vormen de grootste waterlichamen op aarde. Mariene habitats zijn daardoor waarschijnlijk de moeilijkst met eDNA te bemonstern aquatische habitats. Dit komt door de extreme verhouding tussen watervolume en biomassa, het effect van zeestromingen en golfslag op de verspreiding en verdunning van eDNA en het effect van zout op de persistentie en extractie van eDNA (Thomsen *et al.*, 2012b). Verscheidene studies hebben zich gericht op micro-organismen (bijv. Preston *et al.*, 2011; Sogin *et al.*, 2006; Venter *et al.*, 2004) of op de larve van

macro-organismen (Jones *et al.*, 2008). DNA dat gebruikt wordt in deze studies komt naar alle waarschijnlijkheid van hele, levende organismen in de watermonsters. De uitkomsten zijn daarom niet vergelijkbaar met studies naar macro-organismen waarbij enkel echt eDNA (cellen, vrij opgelost DNA etc.) gebruikt wordt (Thomsen *et al.*, 2012a).

Voor macro-organismen zijn er slechts enkele studies uitgevoerd in mariene habitats. Thomsen *et al.* (2012b) toonden met behulp van de eDNA methode 15 vissoorten aan langs de kust van Denemarken. Dit aantal soorten kwam overeen met het aantal soorten dat werd gevangen met traditionele methoden. De precieze soortensamenstelling op de bemonsterde locaties was echter onbekend aangezien het niet duidelijk was hoeveel soorten gemist zijn met beide methoden. Foote *et al.* (2012) onderzochten de toepasbaarheid van de eDNA methode voor bruinvissen (*Phocoena phocoena*) in mariene habitats. Binnen een omheining in zee waarin bruinvissen zwommen wisten ze deze succesvol aan te tonen met de eDNA methode. Op open zee wisten ze echter slechts op 1 van de 5 locaties waar bruinvissen akoestisch werden waargenomen deze aan te tonen met de eDNA methode. Deze eerste studies laten zien dat het een grote uitdaging zal zijn om de eDNA methode toe te passen in mariene habitats. Tegelijk laten ze de potentie van de eDNA methode zien omdat met slechts kleine hoeveelheden water toch reeds soorten aangetoond werden. Door betere monsterprotocollen te ontwikkelen (bijvoorbeeld het filtreren van grote hoeveelheden water) kunnen de resultaten in toekomst mogelijk verbeterd worden.

Figuur 9.5: Noordzee



9.2 Bodems en sedimenten

Net als aquatische habitats kunnen ook bodems en sedimenten DNA bevatten. De persistentie van DNA in bodems en sedimenten kan veel hoger zijn dan in aquatische habitats (zie hoofdstuk 2.2). Historisch DNA tot enkele honderdduizenden jaren oud kan onder sommige omstandigheden geëxtraheerd worden uit bodems en sedimenten om ecosystemen uit het verleden te reconstrueren (Giguët-Covex *et al.*, 2014; Hofreiter *et al.*, 2003; Willerslev *et al.*, 2014, 2003).

Wanneer onderzoeken zich richten op de recente aanwezigheid van soorten levert deze hoge persistentie echter problemen op. Het is namelijk onzeker hoe oud eDNA is dat wordt gevonden in bodems of sedimenten. Hierdoor is het onduidelijk of een soort nog steeds aanwezig is of dat een soort reeds is uitgestorven en er enkel nog historisch DNA van een soort gevonden wordt.

Door deze tragere afbraak zijn concentraties eDNA in sedimenten en bodems ook hoger. In aquatische sedimenten kunnen DNA concentraties een orde drie of vier groter zijn dan die in de waterkolom (Corinaldesi *et al.*, 2005). Daarnaast lost eDNA niet op in bodems en sedimenten waardoor de verspreiding van eDNA vanaf de bron gering is in vergelijking met die in water. Dit

impliceert dat er exact op de plaats waar een organisme DNA heeft achtergelaten gemonsterd moet worden. De trefkans is hierdoor lager dan in aquatische habitats waardoor de eDNA methode minder goed toepasbaar is.

Verschillende studies hebben zich gericht op eDNA in bodems en sedimenten. Enerzijds zijn er studies gericht op kleine organismen, hierbij kan eDNA zowel afkomstig zijn van hele organismen die compleet in het monster komen als van echt eDNA. Anderzijds zijn er eDNA studies die zich richten op grotere organismen waarbij enkel gewerkt wordt met echt eDNA (cellen, vrij DNA etc.). Voorbeelden van de eerstgenoemde zijn studies naar diatomeeën, prokaryoten en schimmels (zie tabel 9.2). Studies die zich richten op de recente aanwezigheid van soorten zijn schaars. Andersen *et al.*, 2012 namen bodemmonsters in verblijven in dierentuinen in Denemarken waarvan precies bekend was welke soorten aanwezig waren geweest. Het lukte ze om 4 van de 5 doelsoorten (4 zoogdieren en de struisvogel) te detecteren in bodemmonsters uit de verblijven. Hier dient echter opgemerkt te worden dat de studie zich richtte op grote dieren die op een klein oppervlak leefden en daardoor in onnatuurlijke hoge dichtheden voorkwamen. Dit zorgde daardoor voor een onnatuurlijk hoge kans dat een monster precies op de locatie van de doelsoort werd verzameld. Onder natuurlijke omstandigheden komen soorten in veel lagere dichtheden voor en zal de kans dat een monster verzameld wordt exact op de plaats waar een soort eDNA heeft achtergelaten klein zijn.

Andere studies naar de toepasbaarheid van eDNA in bodems hebben zich op planten (Taberlet *et al.*, 2012; Yoccoz, 2012) en regenwormen (Bienert *et al.*, 2012) gericht. Tot nu toe hebben we geen studies kunnen vinden die zich hebben gericht op het aantonen van recente aanwezigheid van vertebraten met behulp van de eDNA methode in bodems of sedimenten. Een overzicht van studies die de eDNA methode in bodems of sedimenten hebben toegepast wordt gegeven in tabel 9.2.

Figuur 9.6: Savanne in Zuid-Afrika, in natuurlijke systemen zal het een uitdaging zijn eDNA van dieren in bodemmonsters te verzamelen omdat op de exacte plaats waar een (zeldzaam) dier aanwezig is geweest moet worden gemonsterd.



Tabel 9.2: studies waarin de eDNA methode in andere habitats is getest.

Habitat	Soort	Referentie
Sedimenten en bodems		
Sedimenten	Chytrid schimmel	(Walker <i>et al.</i> , 2007)
	Multispecific – planten - nematoden	(Willerslev <i>et al.</i> , 2014)
	Multispecific – planten - zoogdieren	(Giguët-Covex <i>et al.</i> , 2014)
	Multispecific - diatomeeën	(Stoof-Leichsenring <i>et al.</i> , 2012)
	Multispecific - prokaryoten	(Corinaldesi <i>et al.</i> , 2005)
Bodems	Multispecific - regenwormen	(Bienert <i>et al.</i> , 2012)
	Multispecific - schimmels, mossen, potwormen, kevers en vogels	(Epp <i>et al.</i> , 2012)
	Multispecific - zoogdieren - vogels	(Andersen <i>et al.</i> , 2012)
	Multispecific - planten	(Taberlet <i>et al.</i> , 2012)
Diersporen		
Twijgen	Eland, ree, edelhert en damhart	(Nichols <i>et al.</i> , 2012)
Haar	Bruine beer	(Taberlet and Bouvet, 1992)
Uitwerpselen (soort zelf)	Bruine beer	(Höss <i>et al.</i> , 1992)
	Multispecific - knaagdieren	(Galan <i>et al.</i> , 2012)
	Noordse woelmuis	(Herder <i>et al.</i> , 2013a)
eDNA verzamelaars		
Bijen - honing	Multispecific - planten	(Valentini <i>et al.</i> , 2010)
Bloedzuigers	Multispecific - vertebraten	(Schnell <i>et al.</i> , 2012)
Muggen	Multispecific - zoogdieren	(Kent and Norris, 2005)
Braakballen	Multispecific - knaagdieren	(Galan <i>et al.</i> , 2012)
Uitwerpselen (dieet analyse)	Veel studies hebben universele primers gebruikt om het dieet te analyseren via uitwerpselen van een hele range taxonomische groepen. Pompanon et al (2012). Geven een goed overzicht. Hieronder zijn enkele extra studies opgenomen die niet in het review waren opgenomen.	(Pompanon <i>et al.</i> , 2012)
	Multispecific – planten, vertebraten en invertebraten	(M. De Barba <i>et al.</i> , 2013)
	Multispecific - vissen	(Deagle <i>et al.</i> , 2013)
	Multispecific - knaagdieren	(Galan <i>et al.</i> , 2012)
	Multispecific - insecten	(Bohmann <i>et al.</i> , 2011)
	Multispecific - planten	(Ando <i>et al.</i> , 2013)
	Multispecific - vertebraten	(Shehzad <i>et al.</i> , 2012)

9.3 Diersporen

Veel grotere organismen laten sporen achter in hun omgeving. Sommige van deze sporen kunnen gebruik worden om eDNA uit te extraheren en zo de soort die het spoor heeft achtergelaten te identificeren. De meeste studies hebben zich op faeces monsters gericht. Uitwerpselen zijn niet altijd te onderscheiden van andere soorten op basis van morfologische eigenschappen. Het is dan mogelijk deze te testen op eDNA van de doelsoort. Deze methode is zeer succesvol en is toegepast in een verscheidenheid aan studies. Bijvoorbeeld in studies naar de bruine beer (Höss *et al.*, 1992), naar knaagdieren (Galan *et al.*, 2012) en noordse woelmuis (Herder *et al.*, 2013a). Haren vormen een andere bron van eDNA zoals is aangetoond voor de bruine beer (Taberlet en Bouvet, 1992). Tot slot toonden Nichols *et al.* (2012) aan dat het mogelijk is de bijtsporen van hoefdieren op takken te identificeren met behulp van eDNA uit speeksel dat op de takken wordt achtergelaten.

Het hier gegeven overzicht is niet compleet maar geeft inzicht in de mogelijkheden die genetische technieken bieden voor het identificeren van diersporen. In tegenstelling tot water- en bodemonsters is het wel noodzakelijk om eerst de diersporen zelf te vinden voordat deze geanalyseerd kunnen worden. Hierdoor bieden deze methodes slecht een klein voordeel ten opzichte van traditionele methoden omdat het zoeken van deze diersporen eveneens tijdrovend kan zijn. Voor diersoorten die lastig waarneembaar zijn maar waarvan de sporen wel eenvoudig te vinden zijn (maar niet eenvoudig op naam te brengen) kan de eDNA methode een goede aanvulling vormen. Een overzicht van studies die gebruik maken van eDNA voor het identificeren van diersporen wordt gegeven in tabel 9.2.

*Figuur 9.7: Uitwerpselen van de noorse woelmuis zijn in het veld (links) niet te onderscheiden van die van veldmuis en aardmuis maar kunnen met behulp van eDNA op naam worden gebracht (Herder *et al.*, 2013a)*

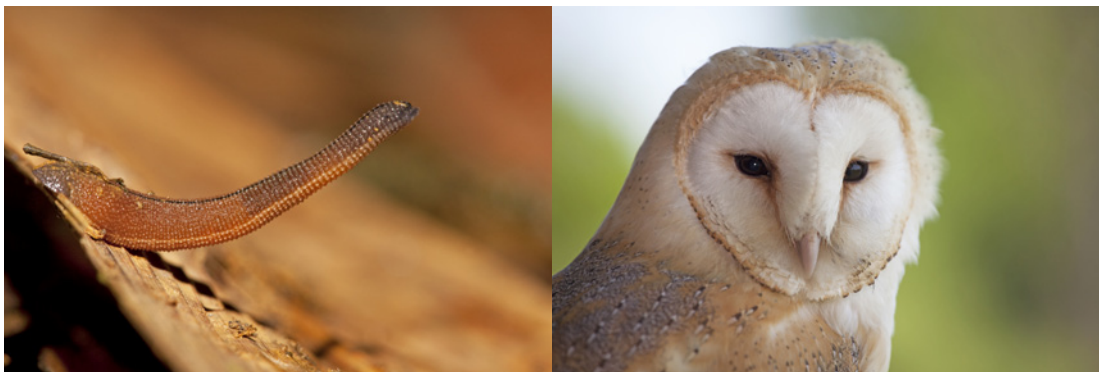


9.4 eDNA verzamelaars

Verschillende organismen verzamelen eDNA van andere soorten door zich ermee te voeden. Onderzoek naar het dieet van soorten via de eDNA methode kan informatie geven over soorten die in de omgeving voorkomen. Zo verzamelen honingbijen nectar van de lokale plantengemeenschap. Door eDNA te extraheren uit de honing is het mogelijk om de lokale plantengemeenschap te reconstrueren (Valentini *et al.*, 2010). Parasieten zuigen bloed van hun gastheren. Kent en Norris (2005) toonden aan dat deze bloedmaaltijden in muggen tot ongeveer 2 dagen na het voeden geïdentificeerd kunnen worden met eDNA. Schnell *et al.* (2012) deden een vergelijkbare studie met bloed uit bloedzuigers afkomstig uit het regenwoud in Vietnam. Ze toonden de aanwezigheid van enkele zeer zeldzame zoogdieren aan met behulp van eDNA uit de bloedzuigers. Daarnaast

bleek dat eDNA in de bloedzuigers tot wel vier maanden detecteerbaar bleef. Tot slot kunnen faeces monsters (Shehzad *et al.*, 2012) en braakballen van uilen (Taberlet en Fumagalli, 1996) gebruikt worden voor een reconstructie van hun dieet en daarmee een indicatie geven van soorten die aanwezig zijn in een gebied. Er zijn een groot aantal van dergelijke studies uitgevoerd. Pompanon *et al.* (2012) geven in hun artikel een uitstekend overzicht en enkele nieuwere studies zijn opgenomen in tabel 9.2. Men dient erop bedacht te zijn dat de “eDNA verzamelaars” vaak soortspecifieke dieetvoorkeuren hebben waardoor niet alle organismen in een gebied gelijkmatig bemonsterd worden. Dit kan leiden tot onder- of overschattingen van de aanwezigheid van soorten. Het is uiteraard ook mogelijk om gebruik te maken van deze dieetvoorkeuren door dieren te selecteren die gespecialiseerd zijn in het type organismen waarvan informatie verzameld moet worden. Een andere beperking van deze methode is dat het niet altijd duidelijk is waar een soort die gevonden wordt in het dieet van een predator vandaan komt. Hiervoor is kennis over de grootte van het leefgebied en de migratiemogelijkheden van de predator cruciaal.

Figuur 9.8: Environmental DNA verzamelaars: terrestrische bloedzuiger (links) en kerkuil (rechts).



9.5 Factoren die van invloed zijn op de trefkans met eDNA

Er zijn veel abiotische factoren (zoals bijv. temperatuur en UV straling) en biotische factoren (bijv. bacteriën en schimmels die DNA afbreken) die van invloed kunnen zijn op de persistentie van eDNA. Als de persistentie van eDNA door deze factoren lager is in een bepaald habitat zal dat een lagere trefkans geven voor de eDNA methode in dat habitat. Daarnaast kan ook binding van eDNA vanuit de waterkolom in sedimenten leiden tot lagere trefkansen (Deere *et al.*, 1996). Door de complexe interactie tussen abiotische en biotische factoren is het moeilijk om hun exacte effect op de afbraak van eDNA te bepalen (Corinaldesi *et al.*, 2008). Daarom is het cruciaal om tijdens pilot studies de eDNA methode voor een doelsoort te valideren in de verschillende habitats waarin deze voorkomt voordat de methode wordt toegepast in andere projecten. Een overzicht van factoren die van invloed kunnen zijn op de persistentie van eDNA wordt gegeven in hoofdstuk 2.

10 Hoe lang duurt de analyse en wat zijn de kosten?

Bij het gebruik van traditionele methoden zijn de resultaten direct in veld zichtbaar. Bij het inzetten van de eDNA methode moeten in het veld verzamelde eDNA monsters eerst worden getransporteerd naar het lab voor verdere analyse voordat de resultaten beschikbaar zijn. Dit kan beperkingen hebben voor de toepasbaarheid van de eDNA methode in situaties waarbij 'real time' informatie nodig is over het voorkomen van soorten (bijv. in ballast water). Momenteel wordt gewerkt aan 'real time' eDNA toepassingen waarbij resultaten direct in het veld gehaald kunnen worden (Mahon *et al.*, 2013, zie hoofdstuk 5). Maar deze toepassingen moeten hun waarde in het veld in termen van gevoeligheid (trefkans) en praktisch gebruik nog bewijzen. Voor de meeste studies is een korte tijd tussen de monsternamen en het verkrijgen van de resultaten echter geen bezwaar. Voor veel zeldzame en lastig waarneembare soorten zijn de trefkansen met de eDNA methode hoger dan die van traditionele methoden (Dejean *et al.*, 2012; Herder *et al.*, 2013b; Thomsen *et al.*, 2012a) waardoor het inzetten van eDNA voor deze soorten voor de hand ligt. Voor soorten die echter eenvoudig waarneembaar zijn met traditionele methoden ligt het juist niet voor de hand eDNA in te zetten. In dit hoofdstuk beschrijven we de benodigde tijd van monsternamen tot resultaat voor de verschillende eDNA methoden en geven we een grove schatting van de kosten. Tot slot beschrijven we enkele uitgewerkte casestudies waarin de kostenefficiëntie van de eDNA methode ten opzichte van traditionele methoden wordt berekend.

10.1 Tijd van monsternamen tot resultaat

De tijd die nodig is van monsternamen tot resultaat omvat de bemonstering zelf, het transport naar het lab en de tijd die nodig is voor de extractie en analyse van de monsters. In theorie kunnen al deze stappen binnen enkele dagen doorlopen worden bij de soortspecifieke methode, gebruikmakend van qPCR, aangenomen dat het lab zich dichtbij de monsterlocatie bevindt en de monsters direct na binnenkomst in het lab verwerkt worden. In de werkelijkheid bevinden labs zich vaak verder weg van de monsterlocatie, wat inhoudt dat het transport meer tijd kost of monsters eerst lokaal worden opgeslagen voordat ze naar het lab verstuurd worden. In het algemeen werken labs gelijktijdig aan vele projecten om zo de kosten voor de analyses te beperken. In de praktijk betekent dit dat de doorlooptijd langer zal zijn omdat de apparatuur en het personeel tussen de verschillende projecten gedeeld moet worden. De tijd van monsternamen tot resultaat ligt daarom in het algemeen tussen de 4 en 6 weken. Sneller is mogelijk maar moet nauwkeurig van tevoren gepland worden.

Voor de universele benadering wordt na de PCR Next Generation Sequencing gebruikt en moeten de ruwe databestanden na afloop vergeleken worden met de referentiedatabase om zo tot een soortenlijst te komen. Door deze extra stappen kost deze benadering meer tijd waardoor de tijd van monsternamen tot resultaat varieert van 2 tot 4 maanden. Deze tijd zal naar verwachting afnemen in de toekomst wanneer nog snellere sequentie technieken beschikbaar worden.

10.2 Kosten van de eDNA methode

Monsternamen

De kosten voor de monsternamen zijn afhankelijk van de arbeidskosten van de veldwerker, de gekozen bemonsteringsstrategie en de daarmee samenhangende benodigde tijd per monster. Ervaring en ecologische kennis van de veldwerker spelen een cruciale rol in het monstersucces (lukt het om DNA van de doelsoort in je monster te krijgen?)(zie hoofdstuk 3.3). Daarnaast zijn er verschillende bemonsteringsstrategieën variërend van het verzamelen van kleine hoeveelheden water tot het filtreren van grote hoeveelheden water. Aan deze verschillende methoden hangen

ook verschillende materiaalkosten (denk aan filters, buffers, etc.). Omdat de bemonsteringsstrategie tegelijk de trefkans beïnvloed is het niet mogelijk om enkel naar de prijs te kijken maar ook naar de betrouwbaarheid van de toegepaste methode. Een bemonsteringsstrategie die twee keer goedkoper is maar een drie keer lagere trefkans heeft zal uiteindelijk duurder zijn.

Analysekosten bij de soortspecifieke benadering

Er bestaat geen standaard eDNA analyse. Iedere aanbieder gebruikt haar eigen veld- en labprotocollen, apparatuur etc. Gemiddeld liggen de prijzen voor een eDNA analyse voor 1 soort op ongeveer €150 per monster gebruikmakend van qPCR. De prijs varieert tussen aanbieders en is in de eerste plaats afhankelijk van de arbeidskosten. Verder is de prijs afhankelijk van verschillende factoren die de kwaliteit en betrouwbaarheid van de analyse en uitkomsten beïnvloeden. Bijvoorbeeld het aantal extracties of PCR reacties dat wordt uitgevoerd op het monster (hoe meer, hoe hoger de trefkans). Positieve en negatieve controles voor de extractie en PCR voegen eveneens kosten toe maar zijn onmisbaar voor een betrouwbare uitkomst (zie hoofdstuk 3). De investering in goede gevalideerde primers die zowel bioinformatisch als in het lab en in het veld getest zijn is eveneens noodzakelijk. Tot slot moet een lab ingericht zijn voor het werken met eDNA (zie hoofdstuk 3) wat inhoudt dat er investeringen gedaan moeten worden die besmetting van monsters voorkomen.

Opdrachtgevers dienen zich bewust te zijn van alle bovengenoemde factoren die de betrouwbaarheid van de eDNA analyse beïnvloeden om zo in staat te zijn verschillende aanbieders te vergelijken om zo tot de beste prijs:kwaliteit verhouding te komen (zie ook checklist in de samenvatting).

Analysekosten voor meerdere soorten tegelijk

Met een meervoudige soortspecifieke benadering kunnen tot ongeveer drie soorten kunnen geanalyseerd worden uit een monster met qPCR en soortspecifieke primers zoals hierboven beschreven. Voor de extra soorten komt er een relatief laag bedrag (~€40 per extra soort) bovenop de analyseprijs omdat een aantal stappen gelijk blijven (bijv. de extractie, qPCR etc.). Voor het detecteren van meer dan drie soorten uit een monster wordt de universele benadering gebruikmakend van Next Generation Sequencing aanbevolen (zie hoofdstuk 4). De prijs per monster wordt dan hoger doordat er extra stappen nodig zijn voor het sequencen van het PCR product en het analyseren en genereren van een soortenlijst met behulp van de referentiedatabase. Vaak wordt er gewerkt met primers die zich richten op een soortgroep. Voor een enkele soortgroep liggen de kosten gemiddeld op ongeveer €350 (inclusief extractie, PCR, sequencing en analyse). Voor additionele soortgroepen komt daar € 100-200 bovenop.

10.3 Kostenefficiëntie eDNA in vergelijking met traditionele methoden

Het is niet mogelijk om in het algemeen te zeggen dat de eDNA methode kostenefficiënter is dan traditionele methoden of omgekeerd omdat dit afhankelijk is van de doelsoort. Voor zeldzame en moeilijk waarneembare soorten zal de eDNA methode bijvoorbeeld vaak kostenefficiënter zijn door de hogere trefkans. Dejean *et al.* (2012) berekenden bijvoorbeeld dat de eDNA methode 2.5 keer goedkoper en 2.5 keer minder tijd kostte dan traditionele methoden voor het opsporen van Amerikaanse brulkickers. Voor soorten die makkelijk waarneembaar zijn met traditionele methoden zal de eDNA methode duurder zijn omdat deze een extra stap toevoegt aan het veldwerk. Verder dient opgemerkt te worden dat de trefkans met traditionele methoden vaak sterk afhankelijk is van de kennis en ervaring van de veldwerkers die het onderzoek uitvoeren. Daardoor kunnen vergelijkingen tussen traditionele methoden en de eDNA methode erg afhankelijk zijn van wie het onderzoek heeft uitgevoerd. Hieronder illustreren we dit met enkele casestudies.

Kader 10.1 - Grote modderkruiper (eDNA is kostenefficiënter)

De grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*) is door haar verborgen levenswijze zeer moeilijk te inventariseren met traditionele methoden. De meest gebruikte methode voor professioneel veldwerk naar deze soort is elektrovissen. De trefkans met elektrovissen is onderzocht in het verleden. Spikmans et al. (2008) vonden een trefkans van 69 procent gebaseerd op 0,5 manuur inspanning per locatie. In deze studie zijn echter slechts 2 locaties, beide met zeer hoge dichtheden grote modderkruipers, onderzocht. Daarom zijn deze resultaten naar verwachting niet representatief voor de gemiddelde situatie in Nederland (waar de soort veelal in lagere dichtheden voorkomt) (Herder et al., 2013b). De Bruin et al. (2014) vonden in een groot onderzoek op 25 locaties een trefkans van 36% voor elektrovissen gebaseerd op een inspanning van 1,5 manuur vissen per locatie, wat een betere schatting lijkt. Om de berekening hier te vereenvoudigen zullen we rekenen met een 50% trefkans op basis van 1,5 manuur inspanning per locatie. Dit is dus waarschijnlijk een overschatting. De door RAVON behaalde trefkans voor grote modderkruiper met eDNA varieert tussen de 75 en 100% (De Bruin et al., 2014; Herder et al., 2013b, 2012a). In de berekening zullen we het gemiddelde gebruiken: 87,5%. Verder maken we gebruik van een veldtarief van €500 voor een velddag. Het verzamelen van een eDNA monster neemt ongeveer 0,5 manuur in beslag.

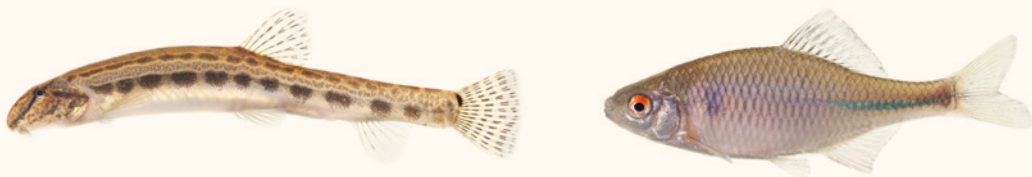
Per locatie zijn de kosten voor eDNA onderzoek € 150 voor de analyse + € 31,25 voor 0,5 uur veldwerk wat samen neerkomt op een totaal van € 181,25. Voor het elektrovissen zijn de kosten €93,75 voor het veldwerk (1,5 manuur). In eerste instantie lijkt het elektrovissen dus goedkoper. Echter, op basis van een enkel bezoek met elektrovissen wordt slechts een trefkans behaald van maximaal 50%. Daarom zijn er meerdere bezoeken nodig om tot dezelfde 87,5% trefkans te komen. Om precies te zijn geeft het eerste bezoek met elektrovissen een trefkans van 50%, twee bezoeken zullen een trefkans van 75% geven (50% + (50% keer 50%)) en 3 bezoeken zullen samen een trefkans geven van 87,5% welke gelijk is aan de trefkans van een enkel bezoek met de eDNA methode.

Dus om een gelijke trefkans van 87,5% te realiseren is er enkel een bezoek nodig met de eDNA methode (kosten € 181,25) terwijl er drie bezoeken nodig zijn met elektrovissen. De kosten voor 3 bezoeken met elektrovissen komen op €281,25 (3 keer €93,75). Daarmee is de eDNA methode minstens anderhalf keer kostenefficiënter dan elektrovissen (merk op dat we de trefkans van elektrovissen hebben overschat om de berekening te vereenvoudigen en dat er niet is gecorrigeerd voor de reistijd die nodig is om de twee voor elektrovissen benodigde extra bezoeken af te leggen).



Kader 10.2 - Kleine modderkruiper en bittervoorn (traditionele methoden zijn kostenefficiënter)

De kleine modderkruiper (*Cobitis taenia*) is nauw verwant aan de grote modderkruiper maar in tegenstelling tot deze soort veel eenvoudiger waar te nemen. Hetzelfde geldt voor de bittervoorn (*Rhodeus amarus*). Dit is de reden waarom RAVON voor deze soorten geen soortspecifieke primers heeft ontwikkeld. Spikmans *et al.* (2008) toonden aan dat beide soorten met de juiste ecologische kennis, eenvoudig te vangen zijn met een inspanning van slechts 15 minuten. Zonder een berekening te maken is het eenvoudig te zien dat traditionele methoden kostenefficiënter zullen zijn voor soortspecifiek onderzoek naar deze soorten. Omdat voor het verzamelen van de eDNA monsters een een gelijke of hogere inspanning nodig is en er vervolgens nog analyse kosten bovenop komen.



Kader 10.3 – Kamsalamander (eDNA is kostenefficiënter)

De kamsalamander (*Triturus cristatus*) is een prioritaire soort in het Verenigd Koninkrijk. Voor de ontwikkeling van een nationaal monitoringsprogramma is in 2013 de bruikbaarheid van de eDNA methode voor het opsporen van kamsalamanders in poelen geëvalueerd (Biggs *et al.*, 2014). Deze studie liet zien dat de eDNA methode beter presteerde dan traditionele methodes zoals zaklamp tellingen, flesvallen, het zoeken naar kamsalamanders overdag en het zoeken naar eieren. Om tot een vergelijkbare trefkans te komen als met de eDNA methode verkregen was het nodig om traditionele methoden als zaklamp tellingen en flesvallen te combineren. Er werd berekend dat het verzamelen van eDNA monsters (2 manuren) veel minder tijd kostte dan traditioneel onderzoek (24 manuur met 2 personen = 48 manuur). Hier uit was af te leiden dat de eDNA methode 6 tot 10 keer kostenefficiënter was dan de traditionele methoden voor het behalen van dezelfde trefkans. Hier dient opgemerkt te worden dat deze berekening is gemaakt voor de situatie in het Verenigd Koninkrijk. In Nederland wordt traditioneel onderzoek bijvoorbeeld meestal uitgevoerd met slechts 1 persoon. Daarnaast wordt ook gebruik gemaakt van het schepnet waardoor er 3 in plaats van 4 bezoeken staan voorgeschreven (DR, 2011).



Kader 10.4 - Knoflookpad (eDNA is kostenefficiënter)

De knoflookpad (*Pelobates fuscus*) is van alle Nederlandse amfibieën met afstand het moeilijkst te inventariseren. Volwassen dieren leven op land en zijn enkel 's nachts actief en verstoppen zich overdag onder de grond. Het voortplantingseizoen is kort en de dieren roepen onderwater waardoor ze moeilijk te vinden zijn. Traditioneel onderzoek richt zich op roepende individuen en op het vangen van larven met schepnet en fuiken. De exacte trefkans voor knoflookpadden met traditionele methoden is onbekend maar in ieder geval laag. Zeker in populaties waar nog slechts enkele roepende dieren over zijn, iets dat vaak het geval is in Nederland.

Voor het aantonen van de aanwezigheid van de soort is het zoeken naar roepende individuen de eenvoudigste methode. Geschat wordt dat met een drietal bezoeken van ongeveer 3 uur de kans redelijk hoog is dat de soort wordt aangetoond mits aanwezig. Veel studies zijn echter geïnteresseerd in het voortplantingssucces en richten zich daarom op de larven. De beste manier daarvoor is het gebruik van amfibieënfuiken. Bij populaties met lage dichtheden is een extreem hoge inspanning nodig om de larven van de knoflookpad aan te tonen. Bijvoorbeeld drie fuikrondes van drie dagen op rij vangen. Inclusief reistijd van en naar de locatie komt dat neer op een inspanning van 48 manuur. In door RAVON uitgevoerde onderzoeken waarin deze inspanning is geleverd, werden uiteindelijk slechts 2 tot 19 individuele larven gevangen. Met de eDNA methode zijn trefkansen gevonden tussen de 75% en 100% op basis van een enkel monster (Herder, 2013; Thomsen *et al.*, 2012a). Wanneer in juni wordt gemonsterd kan worden aangenomen dat de volwassen dieren reeds het water uit zijn en ligt het voor de hand dat in het water aangetroffen eDNA wijst op de aanwezigheid van larven. Dit geeft dus een sterke indicatie voor reproductie. Ook hier is het eenvoudig te zien dat de eDNA methode kostenefficiënter is dan traditionele methoden. Voor het aantonen van de knoflookpad wordt geschat dat de methode zo een 2 keer kostenefficiënter is en voor het (impliciet) vaststellen van reproductie wel 10 tot 15 keer.



11 Invasieve exoten en eDNA

11.1 Het belang van vroege signalering van invasieve exoten

Invasieve exoten vormen een belangrijke bedreiging voor de biodiversiteit en kunnen leiden tot wereldwijde homogenisatie (Ehrenfeld, 2010; Genovesi *et al.*, 2010; Hulme, 2007; Kraus, 2008; Pyšek en Richardson, 2010; Vitousek *et al.*, 1997). Ze kunnen schadelijk zijn voor ecosystemen (Vilà *et al.*, 2009) en van invloed op de Europese economie waar economische verliezen door toedoen van invasieve exoten meer dan € 12 miljard per jaar bedragen (Kettunen *et al.*, 2009). Eenderde van de op de IUCN Rode lijst opgenomen vogelsoorten, 6% van de zoogdieren en 11% van de amfibieën worden bedreigd door invasieve exoten (Genovesi *et al.*, 2010). Invasieve exoten kunnen negatieve effecten hebben op inheemse soorten door middel van competitie, predatie of hybridisatie en kunnen daarnaast als vector dienen voor de verspreiding van ziekten (Kraus, 2008). Er zijn wereldwijd veel voorbeelden waarbij invasieve exoten negatieve effecten hebben op inheemse soorten en ecosystemen. Wilcove en Bean (1994) toonden aan dat in 1991, 68% van de zoetwatervissen die waren uitgestorven op het vaste land van de Verenigde Staten negatief beïnvloed waren door invasieve exoten. Bekende voorbeelden uit Nederland waarbij invasieve exoten schadelijke effecten hebben op inheemse soorten zijn de Amerikaanse brulkikker (Devisser *et al.*, 2012; Goverse *et al.*, 2012; Spitzzen-van der Sluijs en Zollinger, 2010; Van Delft en Creemers, 2013), grote waternavel (*Hydrocotyle ranunculoides*) (Anonymus, 2013), zonnebaars (*Lepomis gibbosus*) (Van Kleef *et al.*, 2013, 2008) en verschillende zoetwaterkreeften, o.a. de Rode Amerikaanse rivierkreeft (*Procambarus clarkii*) (Koese en Evers, 2011; Soes en Koese, 2010; van der Wal *et al.*, 2013).

Als een invasieve exoot zich eenmaal gevestigd heeft kunnen de kosten voor bestrijdingsacties extreem hoog oplopen en is complete uitroeiing niet altijd meer mogelijk (EEA, 2010; Kraus, 2008). In een vroeg stadium na de introductie is het nagenoeg onmogelijk soorten te signaleren totdat de dichtheden boven een bepaalde drempel komen (Harvey *et al.*, 2009; Hulme, 2006). Deze drempel is afhankelijk van de onderzoeksmethode en inspanning die wordt geleverd. Afhankelijk van de soort, insecten worden minder snel opgemerkt dan vogels, wordt een soort vaak pas waargenomen nadat deze zich stevig gevestigd heeft (Myers *et al.*, 2000). Voor een succesvolle bestrijdingactie is de mogelijkheid om invasieve soorten reeds in lage dichtheden aan te kunnen tonen van cruciaal belang. Een vroege signalering verlaagt bovendien de kosten van een eventuele bestrijdingsactie en verlaagt tegelijk de negatieve impact op het ecosysteem (Dejean *et al.*, 2012; Mehta *et al.*, 2007). Er is daarom een grote behoefte aan methoden die de kans op een vroege signalering vergroten (Dejean *et al.*, 2012; Harvey *et al.*, 2009). Het is algemeen erkend dat een effectief kader voor vroegtijdige signalering en een snelle respons (Early Warning & Rapid Response, EWRR) een cruciaal element is binnen elk beleid dat is gericht op het voorkomen van het vestigen van invasieve exoten en het verzachten van de negatieve gevolgen van invasies (Genovesi *et al.*, 2010; Wittenberg en Cock, 2001). Dit is niet alleen wetenschappelijk geaccepteerd maar ook toegepast in internationaal beleid. De Convention on Biological Diversity (CBD) stelt in artikel 8(h): “Elke deelnemende partij zal, zover mogelijk en passend, de introductie van invasieve exoten voorkomen en invasieve exoten die inheemse soorten of ecosystemen bedreigen onder controle houden of uitroeien (CBD, 1992). Nederland heeft dit verdrag geratificeerd. Tijdens de tiende conferentie van de leden van de CBD werd een belangrijk doel aangenomen dat zich bezighoudt met de effecten van invasieve exoten op biodiversiteit: Doel 9: “In 2020 zijn invasieve soorten en hun routes van introductie in kaart gebracht en geprioriteerd; soorten met een hoge prioriteit worden beheerd of uitgeroeid en maatregelen worden genomen om de routes van introductie te beperken en daarmee introducties te voorkomen”(CBD, 2010) (CBD, 2010).

De Europese Commissie heeft formeel de urgentie van het probleem van invasieve exoten erkend in haar rapport ‘Towards an EU Strategy on Invasive Species’ (COM, 2008). Daarmee verbindt de EU zich ertoe beleid te ontwikkelen voor invasieve exoten en vroegtijdige signalering. De raad van Europese ministers heeft deze toezeggingen onderschreven in de conclusies van de 2953st bijeenkomst. De verwachting is dat in 2014 een EU-exotenverordening wordt aangenomen door het Europees Parlement en de lidstaten. Deze verordening schrijft maatregelen voor ten aanzien van invasieve exoten van EU-belang en belangrijke introductieroutes van deze exoten (Lammers, NVWA, persoonlijke mededeling).

Daarnaast hebben de milieuministers van de G8 in 2009 de dringende noodzaak om invasieve soorten te bestrijden onderschreven. Zij riepen op om een wereldwijd systeem voor vroege signalering van invasieve exoten te ontwikkelen (Shine *et al.*, 2010).

11.2 Vroege signalering met de eDNA methode

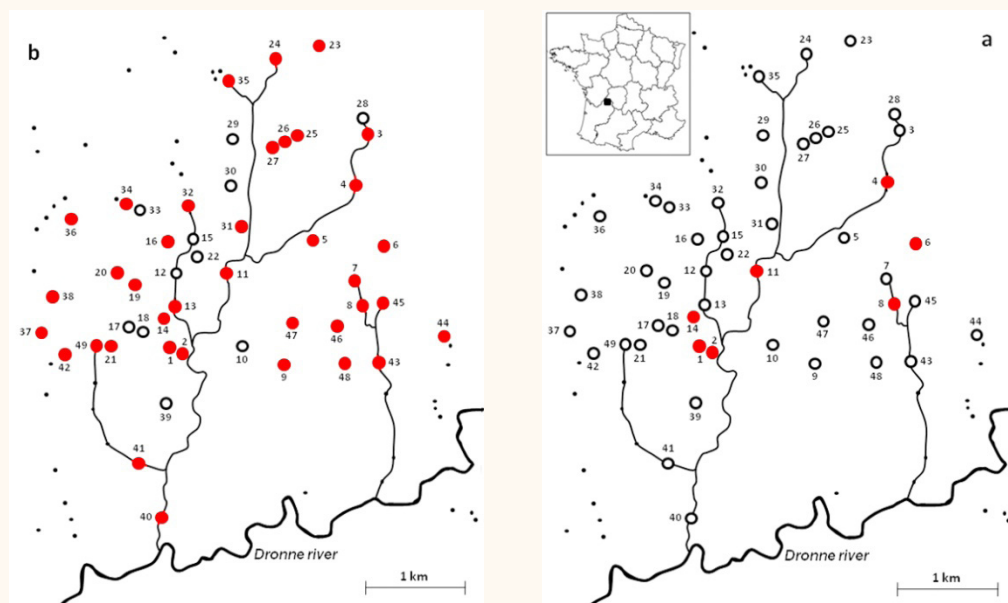
De eDNA methode kan een cruciale rol spelen in dit belangrijke EWRR kader, in het bijzonder in aquatische milieus, omdat het met eDNA mogelijk is invasieve exoten aan te tonen in lage dichtheden en in elk levensstadium (Dejean *et al.*, 2012; Ficetola *et al.*, 2008; Jerde *et al.*, 2011). Dit is aangetoond in verscheidene onderzoeken (zie hoofdstuk 8), van welke de studies naar de zilverkarpers en grootkopkarpers (Jerde *et al.*, 2013, 2011; Mahon *et al.*, 2013b) en naar de Amerikaanse brulkikkers in Frankrijk (Dejean *et al.*, 2012) waarschijnlijk de bekendste voorbeelden zijn.

De trefkans bij populaties met lage dichtheden kan worden verhoogd door de bemonsteringsinspanning te verhogen (bijv. meer veldbezoeken of meer fuiken per locatie). Bij het gebruik van traditionele methoden is het naar verwachting echter niet altijd mogelijk om de bemonsteringsinspanning zover te verhogen dat soorten in lage dichtheid goed gedetecteerd worden (Jerde *et al.*, 2011). De eDNA methode heeft zich reeds bewezen als effectievere methode voor het aantonen van (invasieve) (aquatische) soorten die in lage dichtheid voorkomen (Dejean *et al.*, 2012; Ficetola *et al.*, 2008; Jerde *et al.*, 2011; Mahon *et al.*, 2013b).

Bovendien is de eDNA methode een uiterst krachtig hulpmiddel voor het monitoren en evalueren van de resultaten van beheersacties in het veld. Het toepassen van de methode kan de kennis vergroten die nodig is om te beslissen, waar, wanneer en hoe lang een beheersactie plaats moet vinden. Wanneer deze kennis niet voorhanden is kan dit leiden tot enerzijds het niet in gang zetten van managementacties en anderzijds tot het uitvoeren van ineffectieve of zelfs overdreven en dus onnodig dure beheersacties (Jerde *et al.*, 2011). Bestrijdingsacties kunnen bijvoorbeeld de aantallen Amerikaanse brulkikkers verlagen (Devisscher *et al.*, 2012; Goverse *et al.*, 2012; Guibert *et al.*, 2010; Spitzen-van der Sluijs en Zollinger, 2010; Van Delft en Creemers, 2013) maar de relatie tussen de dichtheid en trefkans bij amfibieën indiceert dat populaties met lage dichtheid een grotere kans hebben om onopgemerkt te blijven (Tanadini en Schmidt, 2011). Dit kan leiden tot een overschatting van het succes van de bestrijdingsacties. Het is daarom belangrijk om de eDNA methode te implementeren in vroege signaleringsprojecten (zie box 11.1, 11.3 en 11.4), voordat beslissingen over beheer worden genomen (zie box 11.2. en 11.4) en om resultaten van bestrijdingsacties te evalueren (zie box 11.1).

Kader 11.1 – Amerikaanse brulkikker

De Amerikaanse brulkikker wordt beschouwd als één van de honderd meest schadelijke invasieve exoten ter wereld (Lowe *et al.*, 2000). Het is het eerste macro-organisme waarvoor de eDNA methode is beschreven in aquatische milieus (Ficetola *et al.*, 2008). Dejean *et al.* (2012) hebben in een groot onderzoek in 49 wateren in Frankrijk de trefkans met traditionele methoden en die met eDNA vergeleken. Hieruit bleek dat de eDNA methode een veel hogere trefkans (78%) had dan traditionele methoden die gebaseerd waren op het visueel of op basis van geluid waarnemen (trefkans 14%), zie figuur 11.1. Door deze veel hogere trefkans is de eDNA methode voor de Amerikaanse brulkikker uitstekend in te passen in vroege signaleringsprojecten. In Nederland is in 2010 in Baarlo een populatie Amerikaanse brulkikkers ontdekt in twee grote particuliere vijvers. Er is een bestrijdingsprogramma opgezet om de soort uit te roeien (Creemers, 2011; Goverse *et al.*, 2012). Het succes van deze bestrijdingsacties in de vijvers is gemonitord met behulp van de eDNA methode. In 2012 werden er nog steeds brulkikkers aangetoond op één locatie (Van Delft en Creemers, 2012). In 2013 werden er geen brulkikkers meer aangetoond wat erop kan duiden dat de bestrijding succesvol is geweest. Omdat juveniele en sub-adulte dieren echter vaak pas later opduiken in het water en dus gemist kunnen zijn tijdens de monitoring in 2013 (Van Delft en Creemers, 2013) wordt deze evaluatie met eDNA de komende jaren opnieuw uitgevoerd (Lammers, NVWA, persoonlijke communicatie). Daarnaast is de eDNA methode ook ingezet bij een project in Noord-Brabant om de Amerikaanse brulkikker vroegtijdig te kunnen signaleren. Net over de grens in België komen namelijk enkele populaties Amerikaanse brulkikkers voor. Aan de Nederlandse kant van de grens zijn 30 locaties bemonsterd met behulp van eDNA. Hierbij werden tot op heden nog geen Amerikaanse brulkikkers aangetroffen (Van Delft en Creemers, 2013).



Locaties in Frankrijk waar Amerikaanse brulkikkers zijn aangetroffen met traditionele methoden (a) en met de eDNA methode (b). Rode stippen zijn de locaties waar de soort is aangetroffen en open cirkels locaties waar de soort niet is aangetroffen. (Figuur uit Dejean *et al.*, 2012).

11.3 Perspectieven voor de toepasbaarheid eDNA voor invasieve soorten

Zoals blijkt uit dit rapport kan de eDNA methode als krachtig hulpmiddel dienen in studies naar invasieve exoten; voor het onderzoeken van routes van introductie, voor het opzetten van vroegtijdige signaleringsprojecten, voor het verzamelen van informatie over invasieve exoten die nodig is voor het nemen van beslissingen over bestrijdingsmaatregelen en voor het evalueren van de resultaten van die maatregelen. Tot nu toe geldt dit met name voor aquatische doelsoorten, door de voordelen die aquatische habitats bieden voor eDNA onderzoek (zie hoofdstuk 9). In andere habitats zijn de trefkansen met eDNA over het algemeen lager (zie hoofdstuk 9) en kan de persistentie van DNA erg hoog zijn waardoor resultaten lastig zijn te interpreteren (is een soort nog aanwezig wanneer eDNA gevonden wordt?). Onderzoeken op basis van eDNA in faeces, honing etc. kunnen informatie verstrekken over de lokale aanwezigheid van soorten maar zijn vaak nog steeds afhankelijk van een hoge bemonsteringsinspanning (je moet bijvoorbeeld eerst uitwerpselen vinden voordat je ze kunt analyseren). Hierdoor zijn deze onderzoeken minder bruikbaar in vroege signaleringsprojecten die snel resultaten moeten leveren.

Tabel 8.1 en 8.2 geven een overzicht van soorten waarvoor de trefkans met de eDNA methode is onderzocht. Tot nu toe richt het meeste eDNA onderzoek zich op beschermde soorten of invasieve exoten. Voor een aantal wereldwijd beruchte invasieve exoten is de eDNA methode reeds ontwikkeld en succesvol gevalideerd. Wereldwijd wordt er gewerkt aan primers voor meer invasieve exoten maar moeten deze primers nog gevalideerd en getest worden (zie hoofdstuk 2) voordat ze inzetbaar zijn. Desondanks is het reeds duidelijk dat de eDNA methode gebruikt kan worden voor een groot aantal soorten en soortgroepen zoals bacteriën, virussen, schimmels, planten, kreeftachtigen, weekdieren, ongewervelden, vissen, amfibieën, zoogdieren en vogels (zie hoofdstuk 8).

In Nederland is de eDNA methode reeds in gezet voor de Amerikaanse brulkikker (Delft en Creemers, 2013; Delft en Creemers, 2012) en Italiaanse kamsalamander (Van Delft en Herder, 2014; Van Delft *et al.*, 2013). Daarnaast zijn er ook gevalideerde primers aanwezig voor de Rode Amerikaanse rivierkreeft (Treguier *et al.*, *subm.*). De eDNA methode is veelbelovend voor andere invasieve exoten in Nederland. In theorie is het mogelijk om voor elke soort primers te ontwikkelen. Er zijn geen genetische eigenschappen bekend in bepaalde families of geslachten die het ontwikkelen van primers van te voren reeds onmogelijk maken. Voor sommige soortgroepen is er echter weinig referentiemateriaal aanwezig in publieke databases waardoor het ontwikkelen van primers bemoeilijkt wordt (zie hoofdstuk 4). Daarnaast is de eDNA methode het meest succesvol in aquatische habitats, met name in de kleinere stilstaande wateren (zie hoofdstuk 9). Aangezien het theoretisch mogelijk is om primers te ontwikkelen voor elke invasieve exoot is het niet nodig in te gaan op de toepasbaarheid van eDNA voor elk van de meer dan 1000 invasieve exoten in Nederland. In plaats daarvan is er hier gekozen om een lijst te maken van invasieve exoten die op de “alarmlijsten” van Waarneming.nl en Waarneming.be staan, op de lijst van soorten waarvan soortteksten zijn opgenomen op de website van het Nederlands soortenregister (Soortenregister.nl) en op de lijst met prioritaire soorten voor het Signaleringsproject Exoten. Deze soorten staan opgesomd in tabel 11.1.

Kader 11.2 - Italiaanse kamsalamander

De Italiaanse kamsalamander (*Triturus carnifex*) is een invasieve exoot in Nederland die nauw verwant is aan de bedreigde inheemse kamsalamander (*Triturus cristatus*) (Habitatrichtlijn bijlage II en IV en bijlage 2 van de conventie van Bern). Italiaanse kamsalamanders hebben meerdere geïntroduceerde populaties buiten hun natuurlijke verspreidingsgebied, wat in sommige regio's leidt tot genetische vervuiling van populaties inheemse kamsalamanders (Arntzen en Thorpe, 1999; Brede *et al.*, 2000; Franzen *et al.*, 2002).

De Italiaanse kamsalamander is voor het eerst aangetroffen in Nederland in 1997. De afgelopen paar jaar hebben intensieve inventarisaties de aanwezigheid van de soort in 34 wateren op de Veluwe aangetoond. Genetisch onderzoek heeft aangetoond dat er naast hybridisatie ook introgressie (genetische menging door terugkruisingen) is bij beide soorten (Meilink *et al.*, 2013).

In 2013 zijn er eDNA primers ontwikkeld en getest voor de Italiaanse kamsalamander. In acht wateren waarvan bekend was dat er Italiaanse kamsalamanders in voorkwamen werden deze aangetoond met de eDNA methode (100% trefkans) en alle vier controlewateren waarin geen Italiaanse kamsalamanders voorkwamen (maar twee met inheemse kamsalamanders) scoorden, zoals verwacht, negatief met de eDNA methode (Van Delft *et al.*, 2013). Vervolgens zijn 56 wateren langs de grens van de bekende verspreiding bemonsterd met behulp van eDNA en getest op zowel de Italiaanse als de inheemse kamsalamander. In 4 wateren, net buiten de oostelijke grens van de bekende verspreiding, is DNA van de Italiaanse kamsalamander gevonden. In een van deze vier wateren samen met DNA van de inheemse kamsalamander, wat wijst op mogelijke hybridisatie (Van Delft en Herder, 2014).

Doordat bij eDNA met name gewerkt wordt mitochondriaal DNA is het niet mogelijk om onderscheid te maken tussen hybriden en beide oudersoorten (omdat de hybriden mitochondriaal DNA van een van hun oudersoorten hebben, zie hoofdstuk 2). Dit onderscheid is echter ook vaak lastig te maken op basis van morfologische eigenschappen waardoor hybriden vaak onopgemerkt blijven (Meilink *et al.*, 2013). Door het gebruik van eDNA kunnen hybriden die afkomstig zijn van de mannelijke lijn van de Italiaanse kamsalamander onopgemerkt blijven omdat die mitochondriaal DNA van de inheemse kamsalamander hebben. Wanneer er naar beide oudersoorten tegelijk gekeken wordt kan dit een goede indicatie geven voor mogelijke hybridisatie, zeker bij soorten waarvan bekend is dat ze veel hybridiseren zoals de kamsalamanders. Een andere voordeel van de eDNA methode is de hogere trefkans, met name langs het invasiefront waar dichtheden nog laag zijn.



Kader 11.3 - Rode Amerikaanse rivierkreeft

De Rode Amerikaanse rivierkreeft wordt beschouwd als één van de honderd meest schadelijke invasieve exoten ter wereld (European Environmental Agency, 2007). Treguier et al (subm) hebben succesvol eDNA primers ontwikkeld en getest voor deze soort. In een groot onderzoek in 158 wateren, waarvan bij de start van het onderzoek geen kennis was over het voorkomen van de Rode Amerikaanse rivierkreeft, is de eDNA methode vergeleken met traditionele methoden (van aas voorziene kreeftenfuike). Voor het berekenen van de trefkans zijn daarom alleen de wateren meegenomen waarin met een van beide methoden kreeften waren aangetoond (78 wateren). In deze wateren werden met traditionele methoden in 51 wateren kreeften gevangen (65% trefkans) en werden met de eDNA methode in 57 wateren kreeften aangetoond (73% trefkans). Hierbij dient echter opgemerkt te worden dat dit waarschijnlijk een overschatting van de trefkans van beide methoden betreft omdat het aannemelijk is dat er ook wateren waren waar wel kreeften voorkwamen maar deze met beide methoden niet gevangen zijn (deze zijn nu buiten beschouwing gelaten). In ondiepe wateren met hoge dichtheden aan kreeften scoorde eDNA beter dan het vangen met fuiken. In diepere wateren met lage dichtheden (minder dan 2 individuen gevangen) scoorde eDNA minder goed. Bij dergelijke lage dichtheden is het aannemelijk dat de fuiken met aas beter scoren omdat ze kreeften actief lokken in tegenstelling tot de eDNA methode die volgens een standaard protocol monsters verzameld. Het combineren van beide methoden leidt waarschijnlijk tot een hogere trefkans .



Kader 11.4 - Aziatische karpers

Voor vissen vormen de studies aan de zilverkarper (*Hypophthalmichthys molitrix*) en grootkopkarper (*H. nobilis*) een goed voorbeeld van het inzetten van de eDNA methode voor het monitoren van invasieve exoten. De eDNA methode is in de Verenigde Staten ingezet om het invasiefront van deze invasieve soorten vast te stellen. Er werd aangetoond dat eDNA een veel hogere trefkans had dan traditionele methoden zoals elektrovisseren. Na de ontdekking van zilverkarper met eDNA werd dit na 93 mandagen elektrovisseren bevestigd met de vangst van een exemplaar (Jerde *et al.*, 2011). De trefkans van de eDNA methode voor beide soorten is verder onderzocht in een studie door Mahon *et al.* (2013b). Zij bemonsterden een 2,6 mijl lange kanaalsectie bij Chicago met de eDNA methode. Vervolgens zijn alle vissen in het zelfde stuk kanaal gedood met behulp van rotenon. Meer dan 50% van de monster bleken positief te zijn voor graskarper terwijl deze soort slechts in lage dichtheid aanwezig was (21 karkassen gevonden en een geschatte populatie van 43 individuen). Ook is de eDNA methode geïmplementeerd in een grootschalig monitoringsprogramma voor de Grote Meren waarbij sinds 2009 minimaal 2822 eDNA monsters zijn verzameld (Jerde *et al.*, 2013). Traditionele methoden zoals elektrovisseren en netten geven slechts een beperkte trefkans (Moy *et al.*, 2011), maar leveren aan de andere kant wel informatie die eDNA niet kan leveren (fysiek bewijs dat de doelsoort aanwezig is en informatie over reproductie). Daarom wordt voorgesteld traditionele methoden en eDNA naast elkaar in te zetten binnen het monitoringsprogramma om zo de voordelen van beide methoden te benutten (Jerde *et al.*, 2013).

Tabel 11.1 geeft een overzicht van de invasieve exoten die op de “alarmlijsten” van *Waarneming.nl* en *Waarneming.be* staan, op de lijst van soorten waarvan soortteksten zijn opgenomen op de website van het Nederlands soortenregister (*Soortenregister.nl*) en op de lijst met doelsoorten voor het Signaleringsproject Exoten 2012-2013 en 2013-2014. Voor elke soort wordt in de tabel weergegeven op welke lijst hij is opgenomen, of de soort aquatisch is of niet (aangezien dit van belang is voor de toepasbaarheid van eDNA; zie hoofdstuk 9) en de verwachte bruikbaarheid van de eDNA methode voor de soort. De bruikbaarheid van de eDNA methode is bewezen voor een klein aantal invasieve soorten, met name amfibieën, kreeftachtigen en enkele weekdieren. Op basis van deze kennis is de bruikbaarheid van de eDNA methode voor andere soorten ingeschat, gebaseerd op expert judgement. Alle terrestrische soorten staan als minder bruikbaar (-) aangemerkt omdat de toepasbaarheid van eDNA in terrestrische systemen beperkt is (zie hoofdstuk 9). De (semi) aquatische soorten zijn ingedeeld met 1 tot 4 “+” wanneer de eDNA methode bruikbaar is.

Wetenschappelijke naam	Nederlandse naam	Lijst?	Aquatisch?	Verwachte bruikbaarheid eDNA
Tracheophyta	Vaatplanten			
<i>Ailanthus altissima</i>	Hemelboom	So	No	-
<i>Akebia quinata</i>	Klimaugurk	W	No	-
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Alsemambrosia	So	No	-
<i>Ambrosia psilostachya</i>	Zandambrosia	So	No	-
<i>Ambrosia trifida</i>	Driedelige ambrosia	So	No	-
<i>Amelanchier spicata</i>	Dwergkrent	W	No	-
<i>Baccharis balimifolia</i>	Struikaster	So	No	-
<i>Cabomba caroliniana</i>	Waterwaaier	So, W	Yes	+++?
<i>Carpobrotus edulis</i>	Hottentotvijg	W	No	-
<i>Cornus sericea</i>	Canadese kornoelje	So	No	-
<i>Cortaderia selloana</i>	Pampasgras	W	No	-
<i>Crassula helmsii</i>	Watercrassula	So	Yes	+++?
<i>Echinocystis lobata</i>	Stekelaugurk	W	No	-
<i>Egeria densa</i>	Egeria	So	Yes	+++?
<i>Eichhornia crassipes</i>	Waterhyacint	So	Yes	-
<i>Fallopia japonica</i>	Japane duizendknoop	So	No	-
<i>Heracleum mantegazzianum</i>	Reuzenberenklauw	So	No	-
<i>Hydrilla verticillata</i>	Hydrilla	W	Yes	+++?
<i>Hydrocotyle ranunculoides</i>	Grote waternavel	So	Yes	+?
<i>Lagarosiphon major</i>	Verspreidbladige waterpest	So	Yes	+++?
<i>Lonicera japonica</i>	Japane kamperfoelie	W	No	-
<i>Ludwigia peploides</i>	Kleine waterteunisbloem	So, W	Yes	+?
<i>Ludwigia grandiflora</i>	Waterteunisbloem	So	Yes	+?
<i>Lysichiton americanus</i>	Moeraslantaarn	So, W	(No)	-
<i>Myriophyllum heterophyllum</i>	Ongelijkbladig vederkruid	So	Yes	+++?
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	Parelvederkruid	So	Yes	+++?
<i>Phytolacca americana</i>	Westerse karmozijnbes	W	No	-
<i>Prunus serotina</i>	Amerikaanse vogelkers	So	No	-
<i>Rhus radicans</i>	Gifsumak	So	No	-
<i>Sagittaria latifolia</i>	Breed pijlkruid	So	Yes	+?
<i>Sicyos angulatus</i>	Stekelige komkommer	So	No	-
<i>Solidago nemoralis</i>	Grauwe guldenroede	So	No	-

Wetenschappelijke naam	Nederlandse naam	Lijst?	Aquatisch?	Verwachte bruikbaarheid eDNA
Aves	Vogels			
<i>Acridotheres cristatellus</i>	Kuifmaina	W	No	-
<i>Aix galericulata</i>	Mandarijneend	So	(Yes)	+
<i>Alopochen aegyptiaca</i>	Nijlgans	So	(Yes)	+
<i>Anser indicus</i>	Indische gans	So	(Yes)	+
<i>Branta canadensis</i>	Grote Canadese gans	So	(Yes)	+
<i>Corvus splendens</i>	Huiskraai	So, W, Si	No	-
<i>Cygnus atratus</i>	Zwarte zwaan	So	(Yes)	+
<i>Oxyura jamaicensis</i>	Rosse stekelstaart	So, W, Si	(Yes)	+
<i>Paradoxornis webbianus</i>	Bruinkopdiksnavelmees	Si	No	-
<i>Phasianus colchicus</i>	Fazant	So	No	-
<i>Psittacula krameri</i>	Halsbandparkiet	So	No	-
<i>Tadorna ferruginea</i>	Casarca	So	(Yes)	+
<i>Threskiornis aethiopicus</i>	Heilige Ibis	W, Si	(Yes)	+
Mammalia	Zoogdieren			
<i>Callosciurus erythraeus</i>	Pallas' eekhoorn	W, Si	No	-
<i>Callosciurus finlaysonii</i>	Thaise eekhoorn	W, Si	No	-
<i>Cervus nippon</i>	Sikahert	W, Si	No	-
<i>Muntiacus reevesi</i>	Muntjak	So, W, Si	No	-
<i>Mustela vison</i>	Amerikaanse Nerts	W, Si	(Yes)	++
<i>Nyctereutes procyonoides</i>	Wasbeerhond	W	No	-
<i>Procyon lotor</i>	Wasbeer	So	(Yes)	+
<i>Sciurus carolinensis</i>	Grijze eekhoorn	So, W, Si	No	-
<i>Sciurus lis</i>	Japanse Eekhoorn	W, Si	No	-
<i>Sciurus niger</i>	Amerikaanse Voseekhoorn	W, Si	No	-
Lissamphibia	Amfibieën			
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Amerikaanse brulkikker	So, W, Si	Yes	++++
<i>Triturus carnifex</i>	Italiaanse kamsalamander	So, W, Si	Yes	++++
Reptilia	Reptielen			
<i>Testudines</i>	Schildpadden, diverse soorten	Si	Yes	++
<i>Trachemys scripta elegans</i>	Roodwangschildpad	So	Yes	++
Actinopterygii	Straalvinnigen			
<i>Babka gymnotrachelus</i>	Naakthalsgrondel	W, Si	Yes	+++
<i>Lepomis cyanellus</i>	Groene zonnebaars	Si	Yes	+++
<i>Lepomis gibbosus</i>	Zonnebaars	So	Yes	+++
<i>Lepomis macrochirus</i>	Bluegill	Si	Yes	+++
<i>Micropterus dolomieu</i>	Zwartbaars	Si	Yes	+++
<i>Micropterus salmoides</i>	Grootbekforelbaars	W, Si	Yes	+++
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Aziatische modderkruiper	Si	Yes	+++
<i>Neogobius melanostomus</i>	Zwartbekgrondel	W	Yes	+++
<i>Percottus glenii</i>	Amoergrondel	W, Si	Yes	+++
<i>Pimephales promelas</i>	Dikkopelrits	W, Si	Yes	+++

Wetenschappelijke naam	Nederlandse naam	Lijst?	Aquatisch?	Verwachte bruikbaarheid eDNA
Decapoda	Tienpotigen			
<i>Orconectes immunis</i>	Calicotrivierkreeft	W, Si	Yes	++
<i>Orconectes virilis</i>	Geknobbelde Amerikaanse Rivierkreeft	W, Si	Yes	++
<i>Procambarus acutus</i> / <i>P. zonangulus</i>	Gestreepte Amerikaanse rivierkreeft	W, Si	Yes	++
<i>Procambarus clarkii</i>	Rode Amerikaanse rivierkreeft	So	Yes	++
Mollusca	Weekdieren			
<i>Crassostrea gigas</i>	Japanse oester	So	Yes	+++
<i>Dreissena polymorpha</i>	Gewone driehoeksmossel	So	Yes	+++
<i>Dreissena rostriformis bugensis</i>	Quaggamossel	So	Yes	+++
<i>Mytilopsis leucophaea</i>	Brakwatermossel	So	Yes	+++
<i>Ocenebrellus inornatus</i>	Japanse oesterboorder	Si	Yes	+++
<i>Rapana venosa</i>	Geaderde stekelhoorn	Si	Yes	+++
<i>Urosalpinx cinerea</i>	Amerikaanse oesterboorder	Si	Yes	+++
Tunicata	Manteldieren			
<i>Didemnum vexillum</i>	Druipzakpijp	Si	Yes	+++
Ctenophora	Ribkwallen			
<i>Mnemiopsis leidyi</i>	Amerikaanse langlob-ribkwal	So	Yes	+++
Insecten	Insecten			
Coleoptera	Kevers			
<i>Anoplophora chinensis</i>	Oost-Aziatische Boktor	W, So, Si	No	-
<i>Agrilus planipennis</i>	Aziatische essenprachtkever	So, Si	No	-
<i>Anoplophora glabripennis</i>	Aziatische boktor	W, So, Si	No	-
<i>Cerambyx cerdo</i>	Heldenbok	So	No	-
<i>Diabrotica virgifera</i>	Maïswortelboorder	W	No	-
<i>Gracilia minuta</i>	Mandenboktor	So	No	-
<i>Harmonia axyridis</i>	Veelkleurig Aziatisch lieveheersbeestje	So	No	-
<i>Monochamus galloprovincialis</i>	Westeuropese dennenboktor	So	No	-
<i>Monochamus spec.</i>	Dennenboktor spec	W	No	-
<i>Monochamus sutor</i>	Sparrenboktor	So	No	-
<i>Nathrius brevipennis</i>		So	No	-
<i>Perigona nigriceps</i>		So	No	-
<i>Plochionus pallens</i>		So	No	-
<i>Syntomus pallipes</i>		So	No	-
Hymenoptera	Vliesvleugeligen			
<i>Lasius neglectus</i>	Plaagmier	So	No	-
<i>Linepithema humile</i>	Argentijnse mier	Si	No	-
<i>Tapinoma melanocephalum</i>	Spookdraaigatje	Si	No	-
<i>Vespa velutina</i>	Aziatische Hoornaar	W, Si	No	-
Diptera	Tweevleugeligen			
<i>Aedes albopictus</i>	Aziatische tijgermug	W	(Yes)	+++
<i>Merodon avidus</i>	Kegelnarcisvlieg	So	No	-
<i>Merodon equestris</i>	Grote narcisvlieg	So	No	-

Wetenschappelijke naam	Nederlandse naam	Lijst?	Aquatisch?	Verwachte bruikbaarheid eDNA
Orthoptera	Sprinkhanen en krekels			
<i>Acheta domesticus</i>	Huiskrekkel	So	No	-
<i>Anacridium aegyptium</i>	Egyptische sprinkhaan	So	No	-
<i>Gryllodes sigilatus</i>	Dierentuinkrekkel	So	No	-
<i>Gryllus bimaculatus</i>	Zuidelijke veldkrekkel	So	No	-
<i>Locusta migratoria</i>	Europese treksprinkhaan	So	No	-
<i>Meconema meridionale</i>	Zuidelijke boomsprinkhaan	So	No	-
<i>Tachycines asynamorus</i>	Kassprinkhaan	So	No	-
Heteroptera	Wantsen			
<i>Corythucha ciliata</i>		So	No	-
<i>Stephanitis pyrioides</i>		So	No	-
<i>Stephanitis rhododendri</i>	Japanse vlieg	So	No	-
<i>Stephanitis takeyai</i>		So	No	-
<i>Closterotomus trivialis</i>		So	No	-
<i>Tropidosteptes pacificus</i>		So	No	-
<i>Tupiocoris rhododendri</i>		So	No	-
<i>Nysius buttoni</i>	Nieuw-Zeelands tarwewants	So	No	-
<i>Leptoglossus occidentalis</i>		So	No	-
Aranaea	Spinnen			
<i>Latrodectus hasselti</i>	Australische Zwarte Weduwe	W, Si	No	-
<i>Latrodectus mactans</i>	Amerikaanse Zwarte Weduwe	W, Si	No	-
Oomycota	Waterschimmels			
<i>Aphanomyces astaci</i>	Rivierkreeftschimmel	So	Yes	+++

So: LAS met uitgebreide beschrijving in Soortenregister

Si: LAS uit Signaleringsproject Exoten 2012-2013 en 2013-2014

W: LAS van alarmlijsten Waarneming.nl en Waarnemingen.be

- niet bruikbaar
- + (mogelijk) bruikbaar (in specifieke gevallen)
- ++ bruikbaar
- +++ zeer bruikbaar
- ++++ zeer bruikbaar met zeer hoge trefkans
- ? meer onderzoek nodig

De tabel geeft geen compleet overzicht van alle invasieve exoten in Nederland. Echter, door gebruik te maken van deze lijst en de informatie uit dit rapport is het mogelijk om de bruikbaarheid van de eDNA methode voor andere soorten zelf in te schatten. De alarmlijsten en ook deze tabel focussen op individuele soorten. Met behulp van de universele benadering (gebruik makend van eDNA en Next Generation Sequencing) is het echter ook mogelijk een complete soortenlijst te genereren uit een eDNA monster voor een bepaalde soortgroep (zie hoofdstuk 4). Voor de toepasbaarheid van deze methode binnen projecten is meer onderzoek nodig maar in potentie biedt het mogelijkheden om hele soortgroepen, bijvoorbeeld vissen of een plantengemeenschap te screenen waarmee vroege signalering van invasieve exoten mogelijk wordt. Ook soorten die niet verwacht worden kunnen op deze manier worden opgemerkt. Deze onverwachte soorten worden uiteraard gemist wanneer gebruik wordt gemaakt van de soortspecifieke primers.

Planten

Er is weinig ervaring met het gebruik van eDNA voor soortspecifiek onderzoek naar planten. Een probleem kan liggen in het feit dat bepaalde plantensoorten pollen produceren. Deze kunnen door de wind worden verspreid over een groot gebied waardoor het aantonen van DNA niet direct is te relateren aan de aanwezigheid van een soort. Mogelijk kan bemonstering in specifieke periodes voorkomen dat pollen van buiten een gebied bemonsterd worden. Er is echter weinig bekend over de persistentie van DNA in pollen in relatie tot het gebruik van de eDNA methode. Deze kennis is echter cruciaal om valse positieven te voorkomen. In aquatische milieus biedt de eDNA methode perspectieven, met name bij soorten die onderwater groeien en/of zeer moeilijk te herkennen zijn doordat ze sterk lijken op andere inheemse of exotische soorten (bijv. *Egeria*, *Hydrilla*, *Lagarosiphon*, *Myriophyllum*). Hierdoor worden dergelijke soorten vaak over het hoofd gezien of niet herkend binnen traditionele monitoringsprogramma's. Terwijl veel van deze soorten grote problemen kunnen veroorzaken voor de waterhuishouding (verstopping van waterafvoer) of natuurbescherming etc. Het is daarom van groot belang nieuwe vestiging vroegtijdig te signaleren. Meer onderzoek naar de toepasbaarheid van eDNA voor (invasieve) planten is daarom sterk aanbevolen. In deze tabel zijn aquatische planten beoordeeld met “++”, wat aangeeft dat er eDNA potentieel bruikbaar is maar dat er een gebrek aan kennis is over de toepasbaarheid. Van verspreidbladige waterpest (*Lagarosiphon major*) zijn buiten de oorspronkelijke verspreiding enkel vrouwelijke planten bekend waardoor geen problemen met pollen zijn te verwachten en de soort beoordeeld is met “+++”. Beide *Ludwigia* soorten groeien in de oeverzone en laten naar verwachting daarom minder eDNA achter in het water. Daarnaast zijn het opvallende soorten waardoor het voordeel van de eDNA methode t.o.v. traditionele methoden klein geacht wordt. De waterhyacinth (*Eichhornia crassipes*) is eveneens makkelijk te herkennen en in de winter vriest deze soort meestal dood (in Nederland) waardoor de toepassing van eDNA minder nodig is. Tot slot is breed pijlkruid (*Sagittaria latifolia*), een grote moerasplant die eveneens makkelijk te herkennen is. In aquatische habitats vormt deze plant echter soms uitsluitend langgerekte bladeren waardoor de soort dan moeilijk te herkennen is.

Vogels

Door het grote aantal vogelaars en de zeer goed gebruikte invoerportalen Waarneming.nl en Telmee.nl worden bijzondere vogels, waaronder invasieve exoten, snel gesignaleerd en doorgegeven. Verder is eDNA methode voor vogels minder bruikbaar omdat vogels grote afstanden af kunnen leggen tijdens hun migratie. In tegenstelling tot een positief eDNA monster bij amfibieën of een insect is een positieve eDNA waarneming van een vogel veel minder informatief. Het is dan namelijk nog niet duidelijk of het een enkele dwaalgast betreft die enkele dagen op een locatie verbleef of dat het om vestiging gaat. Hoewel de eDNA methode voor vogels theoretisch bruik-

baar is, lijkt het in de praktijk geen effectieve methode voor deze soortgroep in vergelijking met traditionele onderzoeksmethoden.

Zoogdieren

De meeste zoogdieren zijn terrestrisch en de eDNA methode is minder geschikt om zoogdieren in terrestrische habitats op te sporen. Het is noemenswaardig dat Thomsen *et al.* (2012a) eDNA vonden van edelhert (*Cervus elaphus*) in een poel binnen het leefgebied van deze soort. Voor andere invasieve hoefdieren zou de methode daarom ook potentie kunnen hebben. Voor de Amerikaanse nerts (*Mustela vison*) is de eDNA methode potentieel bruikbaar doordat deze soort in semi-aquatische habitats leeft. Studies aan de noordse woelmuis (Herder *et al.*, 2013a) en otter (Thomsen *et al.*, 2012a) hebben dit laten zien. Hetzelfde geldt mogelijk voor de wasbeer (*Procyon lotor*) maar tot op heden is er geen ervaring opgedaan met de eDNA methode voor deze soort.

Amfibieën

De eDNA methode is zeer bruikbaar voor amfibieën (zie hoofdstuk 8). Amfibieën leven vaak in kleine wateren en hebben hoge dichtheden aan larven waardoor ze ideale doelsoorten vormen voor eDNA onderzoek (veel DNA en lage verdunning). Voor invasieve exoten in Nederland is de eDNA methode succesvol toegepast voor de Amerikaanse brulkikker en Italiaanse kamsalamander. In potentie is de eDNA methode zeer geschikt voor het opsporen van alle nieuwe invasieve exotische amfibieën die zich mogelijk nog vestigen in Nederland of reeds aanwezig zijn (bijv. Marmersalamander (*Triturus marmoratus*), springkikker (*Rana dalmatina*) of klauwkikker (*Xenopus laevis*)).

Reptielen

Moerasschildpadden zijn de enige aquatische exotische reptielen die in Nederland voorkomen. Reproductie van deze soorten is tot op heden niet vastgesteld maar ze kunnen plaatselijk wel in redelijk hoge dichtheden voorkomen door (illegale) uitzet en de individuen leven lang. In kleine wateren kunnen ze relatief eenvoudig worden waargenomen maar in grotere moerasgebieden kan dat lastig zijn. In dergelijke gebieden kan de eDNA methode een bruikbare aanvulling vormen. Onderzoek aan de Europese moerasschildpad in Frankrijk heeft laten zien dat de eDNA methode goed toepasbaar is voor moerasschildpadden (SPYGEN, ongepubliceerde data).

Vissen

De eDNA methode is zeer geschikt voor het opsporen van vissen en vele studies hebben reeds de hoge trefkans van eDNA voor deze soortgroep aangetoond (zie hoofdstuk 8). In potentie is de eDNA methode bruikbaar voor alle soorten, echter in sommige habitats (bijv. grote rivieren en in zee) zal de bemonstering lastiger zijn dan in kleine wateren zoals poelen en sloten. De perspectieven voor succesvolle bestrijdingsacties van invasieve exotische vissen zijn eveneens hoger in kleinere en meer geïsoleerde watertypen. Naast de vissen die in tabel 11.1 genoemd zijn kan eDNA eveneens bruikbaar zijn voor invasieve exoten die zich reeds gevestigd hebben in Nederland zoals de Kesslers grondel (*Neogobius kessleri*) en marmergrondel (*Proterorhinus semilunaris*). Deze soorten komen reeds wijdverspreid voor in de grote rivieren maar eDNA kan bruikbaar zijn om de kolonisatie van kleinere wateren waarin bedreigde inheemse vissen voorkomen te monitoren. Dergelijke informatie kan van groot belang zijn bij beslissingen over het vispasseerbaar maken van barrières.

Invertebraten

De eDNA methode heeft een grote potentie voor aquatische invertebraten, maar er is meer onderzoek nodig om een goed overzicht te kunnen geven van de mogelijkheden. De methode kan ook bruikbaar zijn om geïmporteerde banden en lucky-bamboe te screenen op de aanwezigheid van de tijgermug (*Aedes albopictus*) en om ballastwater in schepen te screenen op een verscheidenheid van invasieve exoten.

Schimmels en andere ziekteverwekkers

De kreeftenpest (*Aphanomyces astaci*) is de enige ziekteverwekker die op een van de alarmlijsten vermeld staat. De eDNA methode is potentieel bruikbaar om de schimmel op te sporen waarmee de informatie gebruikt kan worden voor beslissingen over het herintroduceren van de sterk bedreigde Europese rivierkreeft. Daarnaast is de eDNA methode naar verwachting ook bruikbaar om de zeer besmettelijke schimmels *Batrachochytrium dendrobatidis*, *B. Salamandrivorans*, het ranavirus en de vissenparasiet *Sphaerotecum destruens* op te sporen. Het ontwikkelen van de eDNA methode voor het opsporen van deze en andere ziekteverwekkers is zeer de moeite waard.

Figuur 11.1: De eDNA methode is naar verwachting bruikbaar om besmettelijke amfibieenziekten op te sporen.



12 Conclusies en aanbevelingen

In dit laatste hoofdstuk worden de voor- en nadelen van de eDNA methode in vergelijking met traditionele methoden samengevat. Daarnaast wordt de huidige toepasbaarheid van de eDNA methode binnen projecten beschreven. Tot slot worden perspectieven voor de toekomst en velden waarin meer onderzoek nodig is beschreven.

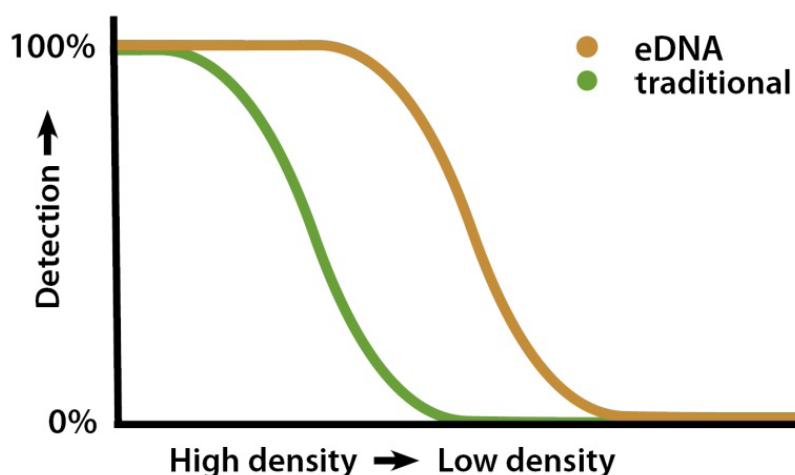
12.1 Voordelen van de eDNA methode

De eDNA methode biedt een aantal voordelen ten opzichte van traditionele methoden. Hieronder staan deze voordelen opgesomd en worden ze kort toegelicht.

Hogere trefkans

In veel onderzoeken bleek eDNA een hogere trefkans te hebben dan traditionele methoden (bijv. Dejean *et al.*, 2012; Herder *et al.*, 2013b; Jerde *et al.*, 2011). Dit geldt met name voor zeldzame soorten (die in lage dichtheden voorkomen) en soorten die moeilijk waarneembaar zijn met traditionele methoden (zie hoofdstuk 8). Figuur 12.1 illustreert schematisch het voordeel van deze hogere detectiekans in vergelijking met traditionele methoden (nagetekend naar Darling en Mahon, 2011). Het laat zien dat de hogere trefkans met eDNA vooral een voordeel geeft ten opzichte van traditionele methoden in gevallen waar soorten in lage dichtheden voorkomen. Dit is precies het geval bij invasieve exoten in een vroeg stadium van de invasie. De eDNA methode leent zich daarom uitstekend om ingezet te worden voor vroegtijdige signalering en monitoring van een deel van de invasieve exoten. Uiteraard wel rekening houdend met de verschillen in trefkans en daarmee de toepasbaarheid van de eDNA methode voor verschillende soorten (hoofdstuk 8) en habitats (hoofdstuk 9). Een bijkomend voordeel van de hogere trefkans met de eDNA methode is dat een nulwaarneming (de conclusie dat een soort niet aanwezig is) betrouwbaarder is. Nulwaarnemingen zijn van groot belang bij onderzoek aan invasieve exoten, met name in signaleringsprojecten en bij de monitoring van het succes van bestrijdingsacties (Van Delft en Creemers, 2013, 2012; Van Delft en Herder, 2014).

Figuur 12.1: Schematische weergave van het voordeel van een hogere trefkans met de eDNA methode in vergelijking tot traditionele methoden (nagetekend naar Darling en Mahon, 2011).



Kostenefficiënt

Zoals in hoofdstuk 10 beschreven kan de eDNA methode significant goedkoper en minder arbeidsintensief zijn dan traditionele methoden. Dit geldt met name voor zeldzame en moeilijk waarneembare soorten en niet voor soorten die eenvoudig zijn waar te nemen met traditionele onderzoeksmethoden, zoals vogels. Ook geldt dit niet voor soorten weinig DNA achterlaten in hun omgeving waardoor ze met eDNA moeilijk zijn op te sporen, zoals sommige zoogdieren (zie hoofdstuk 8).

Soortspecifiek

Doordat bij de eDNA methode met soortspecifieke primers wordt gewerkt behoren determinatiefouten tot het verleden. Voorwaarde is wel dat de ontworpen primers goed gevalideerd zijn en voorzorgsmaatregelen genomen worden voor kwaliteitscontrole (zie hoofdstuk 3). Daarnaast wordt goede taxonomische kennis binnen organisaties, met name van lastige groepen, steeds schaarser waardoor er behoefte is aan nieuwe methoden.

Figuur 12.2: Larven van amfibieën zijn lastig te determineren.



Hogere taxonomische resolutie

Determinatie tot op soortniveau op basis van morfologische kenmerken is in veel taxa lastig of zelfs niet mogelijk. Dit geldt met name voor eieren, larven, juvenielen en sub-adulten omdat de meeste determinatietabellen zich richten op volwassen exemplaren. Op dit punt kunnen traditionele methoden dus een beperkte taxonomische resolutie hebben, die soms beperkt is tot determinatie op geslacht of familie (Ryan M. Caesar, 2006). Determinatie op basis van DNA, afhankelijk van de gebruikte primers, kan in veel gevallen een hogere taxonomische resolutie bieden dan traditionele methoden. Daardoor wordt het mogelijk om onderscheid te maken tussen soorten waar dat op basis van morfologische eigenschappen niet mogelijk is.

Toepasbaar in meer watertypen

Traditionele methoden hebben vaak beperkingen in hun toepasbaarheid binnen verschillende watertypen. Sterk begroeide watertypen zijn bijvoorbeeld erg moeilijk te bemonsteren doordat er geen netten gebruikt kunnen worden en ook elektrovisen lastig is. Elektrovisen is daarnaast alleen toepasbaar in wateren met een laag zoutgehalte. De eDNA methode daarentegen heeft deze beperkingen niet en kan daarom waardevol in watertypen die moeilijk te bemonsteren zijn met traditionele methoden (Bijkerk *et al.*, 2013). Verder kan eDNA op elk moment van de dag verza-

meld worden terwijl in sommige gevallen traditionele methoden beperkt zijn tot bepaalde periodes (bijvoorbeeld het op basis van geluid inventariseren van amfibieën moet meestal in het donker gebeuren). Ook kan de eDNA methode voor sommige soorten in perioden worden ingezet waarin inventarisaties met traditionele methoden niet meer mogelijk zijn. Bijvoorbeeld bij libellen, deze worden traditioneel op zicht geïnventariseerd. Doordat de larven ook buiten de vliegperiode in het water aanwezig zijn wordt de periode waarin geïnventariseerd kan worden groter door het gebruik van de eDNA methode.

Figuur 12.3: Libellen hebben larven in het water waardoor ze met eDNA ook buiten de vliegtijd geïnventariseerd kunnen worden



Geringe verstoring

De eDNA methode is een omgevingsvriendelijke methode. Organismen hoeven niet gevangen te worden om hun aanwezigheid vast te kunnen stellen en de habitats worden nagenoeg niet verstoord. Dit is een belangrijk voordeel ten opzichte van traditionele methoden waarbij stress kan optreden bij de doelsoort en onbedoelde bijvangsten kunnen worden gedaan. Daarnaast kunnen traditionele methoden destructief zijn voor habitats (bijv. de bodemvisserij in zee (Jones, 1992) of intensief gebruik van het schepnet in kwetsbare watervegetaties). Tot slot zijn er geen onthefingen nodig voor het hanteren van beschermde soorten (Flora- faunawet ontheffing) omdat de soorten zelf niet gevangen hoeven te worden.

Vermindering van de kans op het verspreiden van invasieve soorten en ziektes

Bij de eDNA methode wordt gewerkt met DNA-steriele materialen tussen de verschillende locaties en worden daarnaast voorzorgsmaatregelen getroffen om besmetting met DNA tussen locaties te voorkomen. De kans op onbedoelde verspreiding van invasieve exoten of ziektes naar nieuwe gebieden wordt daardoor aanzienlijk verkleind. De amfibieënziekte chytridiomycosis, die wordt veroorzaakt door de schimmel *Batrachochytrium dendrobatidis*, kan bijvoorbeeld via niet ontsmet veldmateriaal in nieuwe gebieden worden geïntroduceerd (St-Amour *et al.*, 2008; St-Hilaire *et al.*, 2009). Ook kleine invasieve exoten of levensvatbare fragmenten van invasieve planten zoals watercrassula (*Crassula helmsii*) kunnen via veldmateriaal als netten en fuiken verplaatst en geïntroduceerd worden. Dit is bij de eDNA methode niet aan de orde.

12.2 Nadelen van de eDNA methode

Zoals geen enkele methode perfect is heeft ook de eDNA methode enkele nadelen ten opzichte van traditionele methoden. Hieronder worden deze nadelen kort beschreven.

Vaststellen van dichtheden

Uit meerdere experimentele onderzoeken in aquaria, mesocosmos opstellingen en ook onder natuurlijke omstandigheden blijkt dat er een verband bestaat tussen de dichtheid van een soort en de hoeveelheid eDNA die de soort achterlaat in haar omgeving (bijv. Takahara *et al.*, 2012; Thomsen *et al.*, 2012a; Pilliod *et al.*, 2013). In het veld zijn er echter veel verschillende factoren die van invloed kunnen zijn op de afbraak en verdunning van eDNA. Doordat eDNA niet homogeen verdeeld is binnen een systeem, maar dicht bij de doelsoort in hogere concentraties voorkomt, kan de monsterstrategie van invloed zijn op de hoeveelheid eDNA in de monsters (bijv. wanneer een monster bij toeval dicht bij de doelsoort verzameld is zullen er hogere eDNA concentraties in het monster worden gevonden dan wanneer het monster verder weg van de doelsoort verzameld is). Daarom kan met eDNA op dit moment alleen een grove schatting worden gegeven voor de dichtheid. Ditzelfde geldt overigens vaak ook voor traditionele methoden (zie hoofdstuk 6).

Levensstadia, leeftijdsopbouw van de populatie en vruchtbaarheid

Met eDNA is het alleen mogelijk om de aan- of afwezigheid van een soort vast te stellen. In tegenstelling tot traditionele methoden kan er geen informatie worden verzameld over levensstadia, leeftijdsopbouw van een populatie, vruchtbaarheid van individuen en hun conditie. Dit kan een belangrijke beperking zijn voor het inzetten van de eDNA methode. Voor invasieve exoten is het bijvoorbeeld van belang vast te stellen of een soort zich succesvol voortplant, wat wijst op vestiging, of niet.

Figuur 12.3: Met traditionele methoden kan ook informatie verkregen worden over voortplanting met de eDNA methode wordt enkel aan- of afwezigheid vastgesteld: bruine kikkers tussen de eiklommen.



Herkennen van hybriden

Omdat de meeste eDNA studies zich richten op mitochondriaal DNA (doordat dit veel talrijker is dan nucleair ribosomaal DNA) kan de eDNA methode geen onderscheid maken tussen hybriden en hun moedersoort. Traditionele methoden kunnen dit soms wel op basis van morfologische kenmerken. Dit is echter in vele gevallen lastig en zeer gevoelig voor fouten doordat de hybriden sterk lijken op een van de oudersoorten (Meilink *et al.*, 2013). Met eDNA kan het in zulke gevallen eenvoudiger zijn om de aanwezigheid van DNA van beide oudersoorten op een locatie vast te stellen. Waaruit afgeleid kan worden dat het aannemelijk is dat er ook hybriden aanwezig zijn (voor soorten waarvan bekend is dat ze gemakkelijk hybridiseren)(Van Delft en Herder, 2014).

Draagvlak voor natuurbescherming

Voor het beschermen van zeldzame en bedreigde soorten is een breed draagvlak in de maatschappij onmisbaar. Om fondsen te werven en medewerking te krijgen voor beschermingsacties is het noodzakelijk dat mensen deze acties steunen. Met de eDNA methode worden soorten zelf niet meer waargenomen. Dit brengt het risico met zich mee dat, als eDNA de enige toegepaste methode zou worden, soorten meer en meer een nummer worden in de administraties van overheden en andere instanties. Daardoor kan het draagvlak voor de bescherming van soorten verloren gaan. Het vergroten van het draagvlak en het creëren van een emotionele band met soorten, door hen te tonen aan het grote publiek, is cruciaal voor een succesvolle bescherming op de lange termijn. Traditionele methoden geven meer betrokkenheid doordat soorten getoond kunnen worden tijdens excursies of op foto's. PGO's zoals RAVON, de Vlinderstichting, de Zoogdiervereniging en FLORON hebben duizenden deskundige vrijwilligers die verspreidingsgegevens verzamelen en zich inzetten voor de bescherming van hun favoriete soorten. Met andere woorden: waarom zou iemand een soort willen beschermen die alleen nog maar zichtbaar is als een DNA-sequentie in een database?

Aanvullende informatie

Doordat eDNA zo efficiënt en soortspecifiek is zal er in de meeste gevallen geen andere informatie worden verzameld dan informatie over de aan- of afwezigheid van de doelsoort (soortspecifieke benadering) of onderzochte soortgroep (universele benadering). Dit in tegenstelling tot traditionele methoden waarvoor intensieve veldbezoeken nodig zijn. Wanneer bijvoorbeeld gevist wordt met schepnetten of fuiken worden er met regelmaat, vaak onverwachte, zeldzame of anderzijds relevante soorten aangetroffen. Ook worden de doelsoorten vaak gevangen waardoor ook hun conditie en gezondheid bekeken kan worden. Op deze manier zijn uitbraken van het ranavirus (Kik *et al.*, 2011) en de nieuwe amfibieënschimmel *Batrachochytrium salamandrivorans* (Martel *et al.*, 2013) ontdekt in Nederland.

Figuur 12.4: Batrachochytrium salamandrivorans is dodelijk voor vuursalamanders en werd uiteindelijk ontdekt doordat dode vuursalamanders gesignaleerd werden door vrijwilligers.



12.3 De huidige toepasbaarheid van de eDNA methode

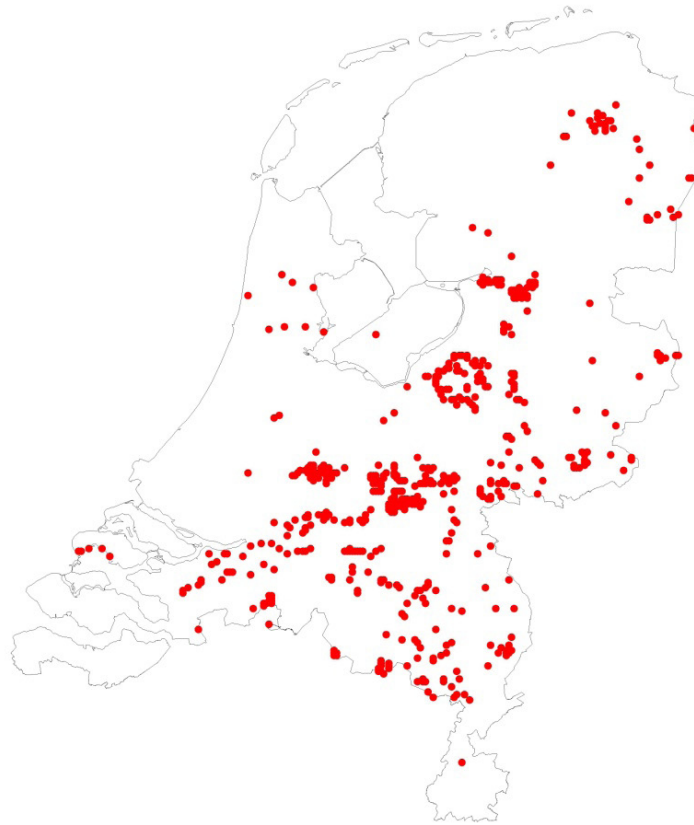
Zoals in dit rapport te lezen is, is de betrouwbaarheid van de eDNA methode en de vaak erg hoge detectiekans aangetoond in vele studies voor verschillende soortgroepen en habitats. Net als met traditionele methoden heeft de eDNA methode enkele beperkingen. Voor sommige soorten en habitats zal meer onderzoek nodig zijn om tot een betrouwbare onderzoeksmethode van bemonsteren tot resultaat te komen. Zoals altijd zijn mensen terughoudend wat betreft het implementeren van nieuwe technieken. Dit heeft natuurlijk een goede reden, aangezien nieuwe methoden eerst goed gevalideerd dienen te worden voordat ze geïmplementeerd kunnen worden in projecten die afhankelijk zijn van hun resultaten. De eDNA methode heeft zich echter reeds bewezen als betrouwbare methode met een zeer hoge trefkans in veel studies (bijv. Goldberg *et al.*, 2011; Herder *et al.*, 2013b; Santas *et al.*, 2013; Thomsen *et al.*, 2012a). Net als bij traditionele methoden kunnen met eDNA soorten gemist worden (valse negatieven) maar door de vaak veel hogere trefkans met eDNA is dat risico in veel gevallen lager dan bij het inzetten van traditionele methoden. Er is daarnaast geen reden om een honderd procent trefkans en absolute zekerheid over welke factoren valse negatieven kunnen veroorzaken te eisen omdat dat ook niet wordt vereist van traditionele methoden. Voor de grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*) wordt de trefkans met traditionele methoden op minder dan 50% geschat (zie hoofdstuk 10). Voor de helft van de gevallen waarbij de grote modderkruiper niet wordt aangetoond terwijl hij wel aanwezig is, is het eveneens onduidelijk waarom de soort niet gevangen wordt. De trefkans met eDNA voor de grote modderkruiper wordt met gemiddeld 87,5% veel hoger geschat (De Bruin *et al.*, 2014; Herder *et al.*, 2013b, 2012a).

Voor soorten waarvoor de eDNA methode van monsternamen tot aan de analyse gevalideerd is door middel van pilotstudies zijn er geen beperkingen om de eDNA methode te implementeren in onderzoeken en monitoring mits dezelfde methoden gehanteerd worden en voorzorgsmaatregelen worden nageleefd (zie de checklist in de samenvatting).

In Nederland is eDNA al succesvol ingezet in projecten voor de grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*) (De Bruin *et al.*, 2014), knoflookpad (*Pelobates fuscus*) (Herder, 2013), kamsalamander (*Triturus cristatus*) (Herder *et al.*, 2013d) en voor twee invasieve exoten: de Amerikaanse brulkikker (*Lithobates catesbeianus*) (Van Delft en Creemers, 2013) en Italiaanse kamsalamander (*Triturus carnifex*) (Van Delft en Herder, 2014). Het kaartje in figuur 12.2 laat zien dat de eDNA methode reeds in heel Nederland is toegepast. Ook uit het buitenland zijn er vele voorbeelden van succesvolle implementatie van de eDNA methode in grootschalige inventarisaties en monitoring (bijv. Jerde *et al.*, 2013; Minamoto *et al.*, 2012a; Santas *et al.*, 2013). Voor andere soorten zal er meer onderzoek nodig zijn om de betrouwbaarheid van de eDNA methode te vergroten (trekkanen). Voor nieuwe soorten waarvoor de eDNA methode nog ontwikkeld moet worden zou deze methode gevalideerd moeten worden volgens de drie stappen die beschreven staan in hoofdstuk 3 (in vitro, in silico en in situ).

12.4 Perspectieven voor de toekomst

Nu meer en meer onderzoeksgroepen en organisaties zich focussen op eDNA zullen er naar verwachting snel voor meer soorten primers beschikbaar komen. Fundamenteel onderzoek naar factoren die van invloed zijn op de afbraak en verspreiding van eDNA zullen naar verwachting de kennis over eDNA verder vergroten. Daarmee kunnen monsterprotocollen verbeterd worden en zal er verder inzicht worden verkregen in de relatie tussen de hoeveelheid eDNA en de dichtheid van een doelsoort. De eDNA methode heeft een groot potentieel voor het vroegtijdig signaleren van invasieve exoten (Dejean *et al.*, 2012; Ficetola *et al.*, 2008; Jerde *et al.*, 2011) en het monitoren



Figuur 12.5: Door RAVON met de eDNA methode bemonsterde wateren tussen 2011 en 2013 voor een verscheidenheid aan soorten, habitats en projecten.

van beschermde soorten (Thomsen *et al.*, 2012a). Universele benaderingen die gebruik maken van Next Generation Sequencing kunnen geïmplementeerd worden voor het opsporen van exoten zonder voorkennis over te verwachten soorten. Daarnaast kunnen uitgebreide datasets voor biodiversiteitstudies gegeneerd worden met mogelijk een hogere taxonomische resolutie voor een lagere prijs. Waar op dit moment vaak gewerkt wordt met indicatorsoorten voor het bepalen van de kwaliteit van een habitat (bijvoorbeeld in de Kader Richtlijn Water) kan het in de toekomst mogelijk worden om te kijken naar de gehele biodiversiteit. Naar verwachting zullen onderzoeken naar veel zeldzame en moeilijk waarneembare soorten (waaronder invasieve exoten) en complexe taxonomische soortgroepen meer en meer gebaseerd worden op eDNA (meta) barcoding. Voor soorten die makkelijk zijn waar te nemen met traditionele methoden zullen naar verwachting, zeker op de korte termijn, traditionele methoden kostenefficiënter blijven. Ook voor studies waarbinnen informatie over de groei, vruchtbaarheid en conditie van soorten nodig is blijven traditionele methoden de enige logische keuze.

Gezien de hierboven besproken voor- en nadelen van de verschillende methoden is het van belang traditionele methoden en taxonomische en ecologische expertise te integreren met het enorme potentieel van eDNA. Het integreren van gedegen soortkennis in eDNA studies is van belang voor goede resultaten en de juiste interpretatie van deze resultaten. Het is van belang om de eDNA methode te zien als een waardevolle toevoeging op de reeds beschikbare traditionele methoden in plaats van als vervanging of concurrent. Op deze manier kan de eDNA methode bijdragen aan een betere bescherming en monitoring van soorten en ecosystemen.

12.5 Vervolgonderzoek

Meer onderzoek is nodig om de monstermethodes te verbeteren. Zowel onderzoek naar de toepasbaarheid in verschillende habitats als soortspecifiek onderzoek dat zich richt op de beste monstermethode voor de doelsoort (bijv. in welke tijd van het jaar of waar binnen een habitat kan er het best gemonsterd worden). Verder dienen de relatie tussen de hoeveelheid eDNA en de dichtheid van een doelsoort en factoren die van invloed zijn op de afbraak en verspreiding van eDNA in verschillende habitats verder onderzocht te worden. Pilotstudies moeten worden uitgevoerd om de eDNA methode te ontwikkelen en te valideren voor meer soorten (zie hoofdstuk 3). Tot slot zal er inspanning moeten worden geleverd om de referentiedatabases te verbeteren. In de publieke databases zitten namelijk niet alleen veel determinatiefouten maar ze bevatten ook vaak sequenties van genen die niet bruikbaar zijn voor eDNA metabarcoding (zie hoofdstuk 4).

Zoals in dit rapport te lezen is biedt de eDNA methode enorme mogelijkheden voor het monitoren van invasieve exoten en bedreigde soorten. Het is aannemelijk dat de eDNA methode, die reeds succesvol wordt toegepast in een aantal projecten, in de directe toekomst zich nog verder zal ontwikkelen waardoor de trefkans en betrouwbaarheid verder zal toenemen. Het is echter van belang er op te wijzen dat het werken met dergelijke kleine hoeveelheden DNA uitdagingen met zich meebrengt. Temeer omdat DNA met het blote oog niet waarneembaar is gedurende het proces van monsternamen tot analyse. Resultaten die behaald zijn in studies kunnen niet één op één vertaald worden naar andere studies waarbij met andere primers, monstermethode, lab- en veld protocollen etc. gewerkt wordt. Het is cruciaal dat het hele proces van monsternamen tot en met de analyse voor een soort uitvoerig getest wordt voordat de methode voor deze soort geïmplementeerd wordt in onderzoeken en andere projecten. In de samenvatting is een checklist opgenomen die gebruikt kan worden als handleiding voor het opzetten van een betrouwbaar eDNA onderzoek.

Literatuur

- Amberg, J.J., McCalla, S., Gaikowski, M., 2013. Understanding Vectors and Fomites and Overcoming Their Challenges in Edna Monitoring.
- Amend, A.S., Seifert, K.A., Bruns, T.D., 2010. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Mol. Ecol.* 19, 5555–5565.
- Andersen, K., Bird, K.L., Rasmussen, M., Haile, J., Breuning-Madsen, H., Kjaer, K.H., Orlando, L., Gilbert, M.T.P., Willerslev, E., 2012. Meta-barcoding of “dirt” DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Mol. Ecol.* 21, 1966–1979.
- Anderson-Carpenter, L.L., McLachlan, J.S., Jackson, S.T., Kuch, M., Lumibao, C.Y., Poinar, H.N., 2011. Ancient DNA from lake sediments: Bridging the gap between paleoecology and genetics. *BMC Evol. Biol.* 11, 30.
- Ando, H., Setsuko, S., Horikoshi, K., Suzuki, H., Umehara, S., Inoue-Murayama, M., Isagi, Y., 2013. Diet analysis by next-generation sequencing indicates the frequent consumption of introduced plants by the critically endangered red-headed wood pigeon (*Columba janthina nitens*) in oceanic island habitats. *Ecol. Evol.* n/a–n/a.
- Anonymus, 2013. Een efficiënte aanpak van invasieve exoten in en rond de waterloop. Eindrapport van de Invexo-casus „Grote waternavel en andere invasieve (water)planten”. Rapport INTERREG-project „Invasieve exoten in Vlaanderen en Zuid-Nederland. Invexo.
- Arntzen, J.W., Thorpe, R.S., 1999. Italian crested newts (*Triturus cristatus*) in the Basin of Geneva: distribution and genetic interactions with autochthonous species. *Herpetologica* 423–433.
- Baldwin, D.S., Colloff, M.J., Rees, G.N., Chariton, A.A., Watson, G.O., Court, L.N., Hartley, D.M., Morgan, M. J., King, A.J., Wilson, J.S., Hodda, M., Hardy, C.M., 2013. Impacts of inundation and drought on eukaryote biodiversity in semi-arid floodplain soils. *Mol. Ecol.* 22, 1746–1758.
- Barnes, M.A., Turner, C.R., Jerde, C.L., Renshaw, M.A., Chadderton, L., Lodge, D.M., 2013. Environmental Conditions Influence eDNA Persistence In Aquatic Systems.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kauserud, H., 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *Bmc Microbiol.* 10, 189.
- Bellemain, E., Davey, M.L., Kauserud, H., Epp, L.S., Boessenkool, S., Coissac, E., Geml, J., Edwards, M., Willerslev, E., Gussarova, G., 2012. Fungal palaeodiversity revealed using high-throughput metabarcoding of ancient DNA from arctic permafrost. *Environ. Microbiol.*
- Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Bignell, H.R., Boutell, J.M., Bryant, J., Carter, R.J., Cheetham, R.K., Cox, A.J., Ellis, D.J., Flatbush, M.R., Gormley, N.A., Humphray, S.J., Irving, L.J., Karbelashvili, M.S., Kirk, S.M., Li, H., Liu, X., Maisinger, K.S., Murray, L.J., Obradovic, B., Ost, T., Parkinson, M.L., Pratt, M.R., Rasolonjatovo, I.M.J., Reed, M.T., Rigatti, R., Rodighiero, C., Ross, M.T., Sabot, A., Sankar, S.V., Scally, A., Schroth, G.P., Smith, M.E., Smith, V.P., Spiridou, A., Torrance, P.E., Tzonev, S.S., Vermaas, E.H., Walter, K., Wu, X., Zhang, L., Alam, M.D., Anastasi, C., Aniebo, I.C., Bailey, D.M.D., Bancarz, I.R., Banerjee, S., Barbour, S.G., Baybayan, P.A., Benoit, V.A., Benson, K.F., Bevis, C., Black, P.J., Boodhun, A., Brennan, J.S., Bridgham, J.A., Brown, R.C., Brown, A.A., Buermann, D.H., Bundu, A.A., Burrows, J.C., Carter, N.P., Castillo, N., Catenazzi, M.C.E., Chang, S., Cooley, R.N., Crake, N.R., Dada, O.O., Diakoumakos, K.D., Dominguez-Fernandez, B., Earnshaw, D.J., Egbujor, U.C., Elmore, D.W., Etchin, S.S., Ewan, M.R., Fedurco, M., Fraser, L.J., Fajardo, K.V.F., Furey, W.S., George, D., Gietzen, K.J., Goddard, C.P., Golda, G.S., Granieri, P.A., Green, D.E., Gustafson, D.L., Hansen, N.F., Harnish, K., Haudenschild, C.D., Heyer, N.I., Hims, M.M., Ho, J.T., Horgan, A.M., Hoschler, K., Hurwitz, S., Ivanov, D.V., Johnson, M.Q., James, T., Jones, T.A.H., Kang, G.-D., Kerelska, T.H., Kersey, A.D., Khrebtukova, I., Kindwall, A.P., Kingsbury, Z., Kokko-Gonzales, P.I., Kumar, A., Laurent, M.A., Lawley, C.T., Lee, S.E., Lee, X., Liao, A.K., Loch, J.A., Lok, M., Luo, S., Mammen,

- R.M., Martin, J.W., McCauley, P.G., McNitt, P., Mehta, P., Moon, K.W., Mullens, J.W., Newington, T., Ning, Z., Ng, B.L., Novo, S.M., O'Neill, M.J., Osborne, M.A., Osnowski, A., Ostadan, O., Paraschos, L.L., Pickering, L., Pike, A.C., Pike, A.C., Pinkard, D.C., Pliskin, D.P., Podhasky, J., Quijano, V.J., Raczky, C., Rae, V.H., Rawlings, S.R., Rodriguez, A.C., Roe, P.M., Rogers, J., Rogert Bacigalupo, M.C., Romanov, N., Romieu, A., Roth, R.K., Rourke, N.J., Ruediger, S.T., Rusman, E., Sanches-Kuiper, R.M., Schenker, M.R., Seoane, J.M., Shaw, R.J., Shiver, M.K., Short, S.W., Sizto, N.L., Sluis, J.P., Smith, M.A., Sohna, J.E.S., Spence, E.J., Stevens, K., Sutton, N., Szajkowski, L., Tregidgo, C.L., Turcatti, G., vandeVondele, S., Verhovsky, Y., Virk, S.M., Wakelin, S., Walcott, G.C., Wang, J., Worsley, G.J., Yan, J., Yau, L., Zuerlein, M., Rogers, J., Mullikin, J.C., Hurles, M.E., McCooke, N.J., West, J.S., Oaks, F.L., Lundberg, P.L., Klenerman, D., Durbin, R., Smith, A.J., 2008. Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry. *Nature* 456, 53–59.
- Bienert, F., De Danieli, S., Miquel, C., Coissac, E., Poillot, C., Brun, J.-J., Taberlet, P., 2012. Tracking earthworm communities from soil DNA. *Mol. Ecol.* 21, 2017–2030.
- Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Griffiths, R.A., Foster, J., Wilkinson, J., Arnett, A., Williams, P., Dunn, F., 2014. Analytical and methodological development for improved surveillance of the Great Crested Newt. (Defra Project No. WC1067). Freshwater Habitats Trust, Oxford.
- Bijkerk, R., Patberg, W., Wannink, J.H., Wallaart, E., Warmink, J., 2013. De toepassing van eDNA in de monitoring van waterorganismen: hoe ver zijn we en wat moeten we nog weten?
- Bohmann, K., Monadjem, A., Lehmkuhl Noer, C., Rasmussen, M., Zeale, M.R.K., Clare, E., Jones, G., Willerslev, E., Gilbert, M.T.P., 2011. Molecular Diet Analysis of Two African Free-Tailed Bats (*Molossidae*) Using High Throughput Sequencing. *PLoS ONE* 6, e21441.
- Bott, N.J., Ophel-Keller, K.M., Sierp, M.T., Herdina, Rowling, K.P., McKay, A.C., Loo, M.G.K., Tanner, J.E., Deveney, M.R., 2010. Toward routine, DNA-based detection methods for marine pests. *Bio-technol. Adv.* 28, 706–714.
- Bower, M.A., Spencer, M., Matsumura, S., Nisbet, R.E.R., Howe, C.J., 2005. How many clones need to be sequenced from a single forensic or ancient DNA sample in order to determine a reliable consensus sequence? *Nucleic Acids Res.* 33, 2549–2556.
- Brede, E.G., Thorpe, R.S., Arntzen, J.W., Langton, T.E.S., 2000. A morphometric study of a hybrid newt population (*Triturus cristatus*/*T. carnifex*): Beam Brook Nurseries, Surrey, U.K. *Biol. J. Linn. Soc.* 70, 685–695.
- Calvignac-Spencer, S., Merkel, K., Kutzner, N., Kühl, H., Boesch, C., Kappeler, P.M., Metzger, S., Schubert, G., Leendertz, F.H., 2013. Carrion fly-derived DNA as a tool for comprehensive and cost-effective assessment of mammalian biodiversity. *Mol. Ecol.* 22, 915–924.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- CBD, 1992. Convention on Biological Diversity. <http://www.cbd.int/>.
- CBD, 2010. COP 10 Decision X/2. Strategic Plan for Biodiversity 2011-2020. <http://www.cbd.int/decision/cop/?id=12268>.
- Chen, I., Dubnau, D., 2004. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 241–249.
- Coissac, E., 2012. OligoTag: A Program for Designing Sets of Tags for Next-Generation Sequencing of Multiplexed Samples, in: *Data Production and Analysis in Population Genomics*. Springer, pp. 13–31.
- Coissac, E., Riaz, T., Puillandre, N., 2012. Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Mol. Ecol.* 21, 1834–1847.
- COM, 2008. Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. Towards an EU strategy on invasive species. Brussels, Belgium.

- Coolen, M.J., Overmann, J., 2007. 217 000-year-old DNA sequences of green sulfur bacteria in Mediterranean sapropels and their implications for the reconstruction of the paleoenvironment. *Environ. Microbiol.* 9, 238–249.
- Cooper, A., Poinar, H.N., 2000. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 289, 1139–1139.
- Corinaldesi, C., Beolchini, F., Dell'anno, A., 2008. Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: implications for the preservation of gene sequences. *Mol. Ecol.* 17, 3939–3951.
- Corinaldesi, C., Danovaro, R., Dell'Anno, A., 2005. Simultaneous Recovery of Extracellular and Intracellular DNA Suitable for Molecular Studies from Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 46–50.
- Creemers, R.C.M., 2011. Brulkickers in Baarlo 2010-2011. RAVON, Nijmegen, the Netherlands.
- Darling, J.A., Mahon, A.R., 2011. From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environ. Res.* 111, 978–988.
- De Barba, M., Miquel, C., Boyer, F., Mercier, C., Rioux, D., Coissac, E., Taberlet, P., 2013. DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 306–323.
- De Bruin, A., Spikmans, F., Kranenbarg, J., Herder, J.E., 2014. Soortmanagementplan grote modderkruiper Waterschap Rivierenland fase 1: actualisatie verspreiding 2013. (No. 2013.074). RAVON, Nijmegen.
- Deagle, B.E., Eveson, J.P., Jarman, S.N., 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples - a case study on DNA in faeces. *Front. Zool.* 3, 11.
- Deagle, B.E., Thomas, A.C., Shaffer, A.K., Trites, A.W., Jarman, S.N., 2013. Quantifying sequence proportions in a DNA-based diet study using Ion Torrent amplicon sequencing: which counts count? *Mol. Ecol. Resour.* 13, 620–633.
- Deagle, B.E., Tollit, D.J., 2007. Quantitative analysis of prey DNA in pinniped faeces: potential to estimate diet composition? *Conserv. Genet.* 8, 743–747.
- Deere, D., Porter, J., Pickup, R., Edwards, C., 1996. Direct analysis of starved *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Dis.* 19, 459–467.
- Deere, D., Porter, J., Pickup, R.W., Edwards, C., 1996. Survival of cells and DNA of *Aeromonas salmonicida* released into aquatic microcosms. *J. Appl. Microbiol.* 81, 309–318.
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., Miaud, C., 2011. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE* 6, e23398.
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., Miaud, C., 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *J. Appl. Ecol.* 49, 953–959.
- Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., 2004. Degradation and Turnover of Extracellular DNA in Marine Sediments: Ecological and Methodological Considerations. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4384–4386.
- Devisscher, S., Adriaens, T., De Vocht, A., Descamps, S., Hoogewijs, M., Joris, R., Van Delft, J.J.C.W., Louette, G., 2012. Beheer van de stierkikker in Vlaanderen en Nederland. (No. 52). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- DR, 2011. Soortenstandaard Kamsalamander *Triturus cristatus*. Dienst Regelingen, Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie.
- ECALS, 2013. Environmental DNA calibration study interim technical review report, February 2013. U.S. Army Corps of Engineers ERDC Environmental Laboratory / U.S. Army Corps of Engineers Great Lakes and Ohio Rivers Division / U.S. Geological Survey / U.S. Fish and Wildlife Service.
- EEA, 2010. Towards an early warning and information system for invasive alien species (IAS) threatening biodiversity in Europe.
- Egan, S.P., Barnes, M.A., Hwang, C.-T., Mahon, A.R., Feder, J.L., Ruggiero, S.T., Tanner, C.E., Lodge, D.M., 2013. Rapid invasive species detection by combining environmental DNA with Light Transmission Spectroscopy. *Conserv. Lett.* n/a–n/a.
- Ehrenfeld, J.G., 2010. Ecosystem Consequences of Biological Invasions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 41, 59–80.

- Epp, L.S., Boessenkool, S., Bellemain, E.P., Haile, J., Esposito, A., Riaz, T., Erseus, C., Gusarov, V.I., Edwards, M.E., Johnsen, A., 2012. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Mol. Ecol.* 21, 1821–1833.
- European Environmental Agency, 2007. Invasive alien species in Europe. Halting the loss of biodiversity by 2010: proposal for a first set of indicators to monitor progress in Europe. (No. EEA Technical report No. 11 2007.). European Environment Agency, Copenhagen.
- Ficetola, G., Coissac, E., Zundel, S., Riaz, T., Shehzad, W., Bessièrè, J., Taberlet, P., Pompanon, F., 2010. An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics* 11, 434.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4, 423.
- Footo, A.D., Thomsen, P.F., Sveegaard, S., Wahlberg, M., Kielgast, J., Kyhn, L.A., Salling, A.B., Galatius, A., Orlando, L., Gilbert, M.T.P., 2012. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PLoS One* 7, e41781.
- Franzen, M., Gruber, H.-J., Heckes, U., 2002. Eine allochtone *Triturus carnifex*-Population in Südbayern (Deutschland). *Salamandra* 3, 149–154.
- Galan, M., Pagès, M., Cosson, J.-F., 2012. Next-Generation Sequencing for Rodent Barcoding: Species Identification from Fresh, Degraded and Environmental Samples. *PLoS ONE* 7, e48374.
- Genovesi, P., Scalera, R., Brunel, S., Roy, D., Solarz, W., 2010. Towards an early warning and information system for invasive alien species (IAS) threatening biodiversity in Europe — European Environment Agency (EEA) (Publication). European Environment Agency, Copenhagen, Denmark.
- Giguet-Covex, C., Pansu, J., Arnaud, F., Rey, P.-J., Griggo, C., Gielly, L., Domaizon, I., Coissac, E., David, F., Choler, P., Poulenard, J., Taberlet, P., 2014. Long livestock farming history and human landscape shaping revealed by lake sediment DNA. *Nat. Commun.* 5, 3211.
- Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., Wallace, D.C., 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 6715–6719.
- Goldberg, C.S., Pilliod, D.S., Arkle, R.S., Waits, L.P., 2011. Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PLoS One* 6, e22746.
- Goldberg, C.S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., Waits, L.P., 2013. Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshw. Sci.* 32, 792–800.
- Goverse, E., Creemers, R.C.M., Spitzen-van der Sluijs, A.M., 2012. Case study on the removal of the American bullfrog in Baarlo, the Netherlands. (No. 2010.139). RAVON, Nijmegen.
- Guibert, S., Dejean, T., Hippolyte, S., 2010. Le Parc naturel régional Périgord-Limousin: territoire d'expérimentation et d'innovation par la mise en place d'un programme d'éradication de la Grenouille tau-reau (*Lithobates catesbeianus*) associé à un programme de recherche sur les maladies émergentes des amphibiens. *Epops* 5–24.
- Hansen, A.J., Mitchell, D.L., Wiuf, C., Paniker, L., Brand, T.B., Binladen, J., Gilichinsky, D.A., Rønn, R., Willerslev, E., 2006. Crosslinks Rather Than Strand Breaks Determine Access to Ancient DNA Sequences From Frozen Sediments. *Genetics* 173, 1175–1179.
- Harris, J.D., 2003. Can you bank on GenBank? *Trends Ecol. Evol.* 18, 317–319.
- Harvey, C.T., Qureshi, S.A., MacIsaac, H.J., 2009. Detection of a colonizing, aquatic, non-indigenous species. *Divers. Distrib.* 15, 429–437.
- Hayes, K.R., Cannon, R., Neil, K., Inglis, G., 2005. Sensitivity and cost considerations for the detection and eradication of marine pests in ports. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 823–834.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 313.
- Hebsgaard, M.B., Phillips, M.J., Willerslev, E., 2005. Geologically ancient DNA: fact or artefact? *TRENDS Microbiol.* 13, 212–220.

- Herder, J.E., 2013. Environmental DNA zet de knoflookpad terug op de kaart. *Schubben Slijm Nieuwsbr. RAVON* 15.
- Herder, J.E., Bekker, D., Koelman, R., Bellemain, E., 2013a. Noordse woelmuis en waterspitsmuis beter in beeld - met eDNA op het goede spoor. *Zoogdier* 24, 8–10.
- Herder, J.E., Kranenbarg, J., De Bruin, A., Valentini, A., 2013b. Op jacht naar DNA Effectief zoeken naar grote modderkruipers. *Visionair* 8–11.
- Herder, J.E., Termaat, T., Valentini, A., 2013c. Environmental DNA als inventarisatiemethode voor libellen. *Vlinders* 22–25.
- Herder, J.E., Valentini, A., Kranenbarg, J., 2012a. Detectie van grote modderkruipers met behulp van Environmental DNA. *H 2 O* 45, 25.
- Herder, J.E., Van Delft, J.J.C.W., Bellemain, E., Valentini, A., 2013d. Environmental DNA, krachtig gereedschap voor het monitoren van fauna. *Levende Nat. jaargang* 114, 108–113.
- Herder, J.E., Van Delft, J.J.C.W., Dejean, T., 2012b. Environmental DNA – een nieuwe inventarisatiemethode. *RAVON* 32–38.
- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., Haeseler, A. von, Pääbo, S., 2001. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res.* 29, 4793–4799.
- Hofreiter, M., Mead, J.I., Martin, P., Poinar, H.N., 2003. Molecular caving. *Curr. Biol. CB* 13, R693–695.
- Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T.H., Dizdaroglu, M., Paabo, S., 1996. DNA Damage and DNA Sequence Retrieval from Ancient Tissues. *Nucleic Acids Res.* 24, 1304–1307.
- Höss, M., Kohn, M., Pääbo, S., Knauer, F., Schröder, W., 1992. Excrement analysis by PCR. *Nature* 359, 199–199.
- Hulme, P.E., 2006. Beyond control: wider implications for the management of biological invasions. *J. Appl. Ecol.* 43, 835–847.
- Hulme, P.E., 2007. Biological Invasions in Europe: Drivers, Pressures, States, Impacts and Responses. *Biol. Invasions* 56–80.
- Hyman, O.J., Collins, J.P., 2012. Evaluation of a filtration-based method for detecting *Batrachochytrium dendrobatidis* in natural bodies of water. *Dis. Aquat. Organ.* 97, 185–195.
- Jaspers, M., Cremer, H., Ee, G. van, Graaf, B. de, Oost, R. van der, Schuren, F., Wijngaart, T. van der, 2012. Hydrochip: de toekomst van monitoring, monitoring van de toekomst (No. 39). STOWA.
- Jean, P., 2013. La détection des espèces par l'ADN environnemental : vers un nouvel outil de veille écologique des milieux aquatiques stagnants. (Master 2). Université Lumière Lyon 2, Lyon, France.
- Jerde, C.L., Chadderton, W.L., Mahon, A.R., Renshaw, M.A., Corush, J., Budny, M.L., Mysorekar, S., Lodge, D.M., 2013. Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 70, 522–526.
- Jerde, C.L., Mahon, A.R., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., 2011. “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv. Lett.* 4, 150–157.
- Jones, J.B., 1992. Environmental impact of trawling on the seabed: A review. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 26, 59–67.
- Jones, W.J., Preston, C.M., Marin Iii, R., Scholin, C.A., Vrijenhoek, R.C., 2008. A robotic molecular method for in situ detection of marine invertebrate larvae. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 540–550.
- Kelly, R.P., Port, J.A., Yamahara, K.M., Crowder, L.B., 2014. Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm. *PLoS ONE* 9, e86175.
- Kent, R.J., Norris, D.E., 2005. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 336–342.
- Kettunen, M., Genovesi, P., Gollasch, S., Pagad, S., Starfinger, U., 2009. Technical Support to EU Strategy on Invasive Alien Species (IAS) Assessment of the impacts of IAS in Europe and the EU. Institute for European Environmental Policy, Brussel and London.

- Kik, M., Martel, A., Sluijs, A.S. der, Pasmans, F., Wohlsein, P., Gröne, A., Rijks, J.M., 2011. Ranavirus-associated mass mortality in wild amphibians, the Netherlands, 2010: a first report. *Vet. J. Lond. Engl.* 197 190, 284–286.
- Kochzius, M., Seidel, C., Antoniou, A., Botla, S.K., Campo, D., Cariani, A., Vazquez, E.G., Hauschild, J., Hervet, C., Hjörleifsdottir, S., Hreggvidsson, G., Kappel, K., Landi, M., Magoulas, A., Marteinson, V., Nölte, M., Planes, S., Tinti, F., Turan, C., Venugopal, M.N., Weber, H., Blohm, D., 2010. Identifying Fishes through DNA Barcodes and Microarrays. *PLoS ONE* 5, e12620.
- Koese, B., Evers, N., 2011. A national inventory of invasive freshwater crayfish in the Netherlands in 2010. Stichting EIS-Nederland and Royal Haskoning,, Leiden and Den Bosch.
- Kraus, F., 2008. Alien Reptiles and Amphibians: a Scientific Compendium and Analysis. Springer.
- Lance, R.F., Carr, M.R., 2012. Detecting eDNA of Invasive Dreissenid Mussels: Report on Capital Investment Project.
- Lay, M.J., Wittwer, C.T., 1997. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin. Chem.* 43, 2262–2267.
- Levy-Booth, D.J., Campbell, R.G., Gulden, R.H., Hart, M.M., Powell, J.R., Klironomos, J.N., Pauls, K.P., Swanton, C.J., Trevors, J.T., Dunfield, K.E., 2007. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2977–2991.
- Li, F., Mahon, A.R., Barnes, M.A., Feder, J., Lodge, D.M., Hwang, C.-T., Schafer, R., Ruggiero, S.T., Tanner, C.E., 2011. Quantitative and Rapid DNA Detection by Laser Transmission Spectroscopy. *PLoS ONE* 6, e29224.
- Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715.
- Livia, L., Antonella, P., Hovirag, L., Mauro, N., Panara, F., 2006. A nondestructive, rapid, reliable and inexpensive method to sample, store and extract high-quality DNA from fish body mucus and buccal cells. *Mol. Ecol. Notes* 6, 257–260.
- Lodge, D.M., n.d. BIOLOGICAL INVASIONS: RECOMMENDATIONS FOR U.S. POLICY AND MANAGEMENT.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., De Poorter, M., 2000. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG).
- MacKenzie, D.I., Nichols, J.D., Lachman, G.B., Droege, S., Royle, J.A., Langtimm, C.A., 2002. Estimating site occupancy rates when detection probabilities are less than one. *Ecology* 83, 2248–2255.
- Madison, B.L., 2007. Mathematical Proficiency for Citizenship, in: *Assessing Mathematical Proficiency*, Mathematical Sciences Research Institute Publications. Cambridge University Press.
- Mahon, A.R., Barnes, M.A., Li, F., Egan, S.P., Tanner, C.E., Ruggiero, S.T., Feder, J.L., Lodge, D.M., 2013a. DNA-based species detection capabilities using laser transmission spectroscopy. *J. R. Soc. Interface* 10.
- Mahon, A.R., Jerde, C.L., Galaska, M., Bergner, J.L., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., Hunter, M.E., Nico, L.G., 2013b. Validation of eDNA Surveillance Sensitivity for Detection of Asian Carps in Controlled and Field Experiments. *PLoS ONE* 8, e58316.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Goodwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.-B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhiyani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M., 2005. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nature* 437, 376–380.

- Martel, A., Sluijs, A.S. der, Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., Pasmans, F., 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201307356.
- Matsui, K., Honjo, M., Kawabata, Z., 2001. Estimation of the fate of dissolved DNA in thermally stratified lake water from the stability of exogenous plasmid DNA. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 95–102.
- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., Shinmura, Y., 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.* 51, 143–148.
- Mehta, S.V., Haight, R.G., Homans, F.R., Polasky, S., Venette, R.C., 2007. Optimal detection and control strategies for invasive species management. *Ecol. Econ.* 61, 237–245.
- Meilink, W., Arntzen, J.W., Wielstra, B., 2013. Genetische vervuiling op de Veluwe: Hybridisatie tussen de inheemse Noordelijke kamsalamander en de invasieve exoot Italiaanse kamsalamander. Naturalis Biodiversity Center in opdracht van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit, Team Invasieve Exoten.
- Minamoto, T., Honjo, M.N., Uchii, K., Yamanaka, H., Suzuki, A.A., Kohmatsu, Y., Iida, T., Kawabata, Z., 2009. Detection of cyprinid herpesvirus 3 DNA in river water during and after an outbreak. *Vet. Microbiol.* 135, 261–266.
- Minamoto, T., Honjo, M.N., Yamanaka, H., Uchii, K., Kawabata, Z., 2012a. Nationwide Cyprinid herpesvirus 3 contamination in natural rivers of Japan. *Res. Vet. Sci.* 93, 508–514.
- Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Honjo, M.N., Kawabata, Z., 2012b. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13, 193–197.
- Moy, P.B., Polls, I., Dettmers, J.M., 2011. The Chicago sanitary ship canal aquatic nuisance species dispersal barrier (No. 74), Edited by D.C. Chapman and M.H. Hoff. American Fisheries Society Special Publication, Bethesda, Maryland.
- Murray, D.C., Bunce, M., Cannell, B.L., Oliver, R., Houston, J., White, N.E., Barrero, R.A., Bellgard, M.I., Haile, J., 2011. DNA-based faecal dietary analysis: a comparison of qPCR and high throughput sequencing approaches. *PLoS One* 6, e25776.
- Myers, J.H., Simberloff, D., Kuris, A.M., Carey, J.R., 2000. Eradication revisited: dealing with exotic species. *Trends Ecol. Evol.* 15, 316–320.
- Nichols, R.V., Königsson, H., Danell, K., Spong, G., 2012. Browsed twig environmental DNA: diagnostic PCR to identify ungulate species. *Mol. Ecol. Resour.* 12, 983–989.
- Nogva, H.K., Drømtorp, S.M., Nissen, H., Rudi, K., 2003. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques* 804:813.
- Noll, D.M., Mason, T.M., Miller, P.S., 2006. Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. *Chem. Rev.* 106, 277–301.
- Olson, Z.H., Briggler, J.T., Williams, R.N., 2012. An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water. *Wildl. Res.*
- Opel, K.L., Chung, D., McCord, B.R., 2010. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR*. *J. Forensic Sci.* 55, 25–33.
- Parducci, L., Jorgensen, T., Tollefsrud, M.M., Elverland, E., Alm, T., Fontana, S.L., Bennett, K.D., Haile, J., Matetović, I., Suyama, Y., Edwards, M.E., Andersen, K., Rasmussen, M., Boessenkool, S., Coissac, E., Brochmann, C., Taberlet, P., Houmark-Nielsen, M., Larsen, N.K., Orlando, L., Gilbert, M.T.P., Kjaer, K.H., Alsos, I.G., Willerslev, E., 2012. Glacial Survival of Boreal Trees in Northern Scandinavia. *Science* 335, 1083–1086.
- Pedersen, M.W., Ginolhac, A., Orlando, L., Olsen, J., Andersen, K., Holm, J., Funder, S., Willerslev, E., Kjaer, K.H., 2013. A comparative study of ancient environmental DNA to pollen and macrofossils from lake sediments reveals taxonomic overlap and additional plant taxa. *Quat. Sci. Rev.* 75, 161–168.

- Piaggio, A.J., Engeman, R.M., Hopken, M.W., Humphrey, J.S., Keacher, K.L., Bruce, W.E., Avery, M.L., 2014. Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 374–380.
- Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P., 2014. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 109–116.
- Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P., Richardson, J., 2013. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 70, 1123–1130.
- Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Laramie, M.B., Waits, L.P., 2012. Application of Environmental DNA for Inventory and Monitoring of Aquatic Species (No. 3146), U.S. Geological Survey Fact Sheet.
- Polz, M.F., Cavanaugh, C.M., 1998. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3724–3730.
- Pompanon, F., Deagle, B.E., Symondson, W.O.C., Brown, D.S., Jarman, S.N., Taberlet, P., 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Mol. Ecol.* 21, 1931–1950.
- Preston, C.M., Harris, A., Ryan, J.P., Roman, B., Marin, R., III, Jensen, S., Everlove, C., Birch, J., Dzenitis, J.M., Pargett, D., Adachi, M., Turk, K., Zehr, J.P., Scholin, C.A., 2011. Underwater Application of Quantitative PCR on an Ocean Mooring. *PLoS ONE* 6, e22522.
- Pyšek, P., Richardson, D.M., 2010. Invasive Species, Environmental Change and Management, and Health. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 35, 25–55.
- Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M., Löfström, C., 2004. Pre-PCR processing. *Mol. Biotechnol.* 26, 133–146.
- Ravanat, J.L., Douki, T., Cadet, J., 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 63, 88–102.
- Riaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P., Coissac, E., 2011. ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 39, e145–e145.
- Robin, E.D., Wong, R., 1988. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* 136, 507–513.
- Rothberg, J.M., Hinz, W., Rearick, T.M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J.H., Johnson, K., Milgrew, M.J., Edwards, M., 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475, 348–352.
- Ryan M. Caesar, M.S., 2006. Integrating DNA data and traditional taxonomy to streamline biodiversity assessment: an example from edaphic beetles in the Klamath ecoregion, California, USA. *Divers. Distrib.* 12, 483 – 489.
- SantaLucia, J.J., 2007. Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design, in: *PCR Primer Design*. Springer, pp. 3–33.
- Santas, A.J., Persaud, T., Wolfe, B.A., Bauman, J.M., 2013. Noninvasive Method for a Statewide Survey of Eastern Hellbenders *Cryptobranchus alleganiensis* Using Environmental DNA. *Int. J. Zool.* 2013.
- Santos, A.M., Branco, M., 2012. The quality of name-based species records in databases. *Trends Ecol. Evol.* 27, 6–7.
- Schmidt, B.R., Kéry, M., Ursenbacher, S., Hyman, O.J., Collins, J.P., 2013. Site occupancy models in the analysis of environmental DNA presence/absence surveys: a case study of an emerging amphibian pathogen. *Methods Ecol. Evol.* 4, 646–653.
- Schmieder, R., Edwards, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863–864.
- Schnell, I.B., Thomsen, P.F., Wilkinson, N., Rasmussen, M., Jensen, L.R.D., Willerslev, E., Bertelsen, M.F., Gilbert, M.T.P., 2012. Screening mammal biodiversity using DNA from leeches. *Curr. Biol.* 22, R262–R263.
- Secondi, J., Miaud, C., Koch, G., Audebaud, B., Cotel, N., Desgranges, S., Dejean, T., 2013. Tracking the expansion of an invasive species *Xenopus laevis* using environmental DNA techniques.

- Shallom, S.J., Weeks, J.N., Galindo, C.L., McIver, L., Sun, Z., McCormick, J., Adams, L.G., Garner, H.R., 2011. A species independent universal bio-detection microarray for pathogen forensics and phylogenetic classification of unknown microorganisms. *BMC Microbiol.* 11, 132.
- Shapiro, B., 2008. Engineered polymerases amplify the potential of ancient DNA. *Trends Biotechnol.* 26, 285–287.
- Shehzad, W., Riaz, T., Nawaz, M.A., Miquel, C., Poillot, C., Shah, S.A., Pompanon, F., Coissac, E., Taberlet, P., 2012. Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. *Mol. Ecol.* 21, 1951–1965.
- Shine, C., Kettunen, M., Genovesi, P., Essl, F., Gollasch, S., Rabitsch, W., Scalera, R., Starfinger, U., ten Brink, P., 2010. Assessment to support continued development of the EU Strategy to combat invasive alien species. Final Report for the European Commission. Institute for European Environmental Policy (IEEP), Brussels, Belgium.
- Smith, C.J., Osborn, A.M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 6–20.
- Soejima, T., Iida, K., Qin, T., Taniai, H., Seki, M., Yoshida, S., 2008. Method To Detect Only Live Bacteria during PCR Amplification. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2305–2313.
- Soes, M., Koese, B., 2010. Invasive freshwater crayfish in the Netherlands: a preliminary risk analysis. Stichting EIS-Nederland and Bureau Waardenburg, Leiden and Cullemborg.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndl, G.J., 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12115–12120.
- Spikmans, F., de Jong, T., Ottburg, F.G.W.A., Kranenburg, J., 2008. Methodiek en richtlijnen voor verspreidingsonderzoek naar bittervoorn, kleine modderkruiper en grote modderkruiper. Stichting RAVON, Nijmegen. RAVON, Nijmegen.
- Spitzen-van der Sluijs, A.M., Zollinger, R., 2010. Risk Assessment on the American bullfrog and the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, RAVON, Nijmegen, the Netherlands.
- St-Amour, V., Wong, W.M., Garner, T.W.J., Lesbarrères, D., 2008. Anthropogenic Influence on Prevalence of 2 Amphibian Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1175–1176.
- St-Hilaire, S., Thrush, M., Tatarian, T., Prasad, A., Peeler, E., 2009. Tool for Estimating the Risk of Anthropogenic Spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* Between Water Bodies. *EcoHealth* 6, 16–19.
- Stoof-Leichsenring, K.R., Epp, L.S., Trauth, M.H., Tiedemann, R., 2012. Hidden diversity in diatoms of Kenyan Lake Naivasha: a genetic approach detects temporal variation. *Mol. Ecol.* 21, 1918–1930.
- Taberlet, P., Bouvet, J., 1992. Bear conservation genetics. *Nature* 358, 197–197.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L.H., 2012. Environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21, 1789–1793.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermet, T., Corthier, G., Brochmann, C., Willerslev, E., 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res.* 35, e14.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., 1996. Owl pellets as a source of DNA for genetic studies of small mammals. *Mol. Ecol.* 5, 301–305.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P., Bouvet, J., 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res.* 24, 3189.
- Taberlet, P., Prud'homme, S.M., Campione, E., Roy, J., Miquel, C., Shehzad, W., Gielly, L., Rioux, D., Choler, P., Clément, J.-C., Melodelima, C., Pompanon, F., Coissac, E., 2012c. Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Mol. Ecol.* 21, 1816–1820.
- Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H., 2013. Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds. *PLoS ONE* 8, e56584.

- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., Kawabata, Z., 2012. Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLoS One* 7, e35868.
- Tanadini, L.G., Schmidt, B.R., 2011. Population Size Influences Amphibian Detection Probability: Implications for Biodiversity Monitoring Programs. *PLoS ONE* 6, e28244.
- Teletchea, F., Bernillon, J., Duffraisse, M., Laudet, V., Hänni, C., 2008. Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. *J. Appl. Ecol.* 45, 967–975.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012a. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.*
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M., Willerslev, E., 2012b. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One* 7, e41732
- Treguier, A., Paillisson, J.-M., Dejean, T., Valentini, A., Schlaepfer, M., Roussel, J.-M., subm. Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *J. Appl. Ecol.*
- Turner, C.R., Barnes, M.A., Xu, C.C.Y., Jones, S.E., Jerde, C.L., Lodge, D.M., 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *bioRxiv*.
- Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M.A., Bellemain, E., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Nascetti, G., Wincker, P., Swenson, J.E., Taberlet, P., 2009a. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 51–60.
- Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., 2010. DNA Barcoding for Honey Biodiversity. *Diversity*.
- Valentini, A., Pompanon, F., Taberlet, P., 2009b. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evol.* 24, 110–117.
- Van Delft, J.J.C.W., Creemers, R.C.M., 2012. Early Warning System en effectmonitoring Amerikaanse brul- kikker in Baarlo en Noord-Brabant.
- Van Delft, J.J.C.W., Creemers, R.C.M., 2013. Early Warning System en effectmonitoring Amerikaanse brul- kikker in Baarlo en Noord-Brabant, 2013.
- Van Delft, J.J.C.W., Herder, J.E., 2014. Analyse eDNA Italiaanse kamsalamander 2013 (No. 2013.108). Stichting RAVON i.o.v. De Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit, Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering, Team Invasieve Exoten., Nijmegen, the Netherlands.
- Van Delft, J.J.C.W., Herder, J.E., Janse, J., 2013. eDNA-primerontwikkeling en bemonstering van wateren ten behoeve van het vaststellen van de Italiaanse kamsalamander. (No. 2013.071). RAVON, Nijme- gen.
- Van der Wal, J.E.M., Dorenbosch, M., Immers, A.K., Vidal Forteza, C., Geurts, J.J.M., Peeters, E.T.H.M., Koese, B., Bakker, E.S., 2013. Invasive Crayfish Threaten the Development of Submerged Macrophytes in Lake Restoration. *PLoS ONE* 8, e78579.
- Van Kleef, H., van der Burg, R., Delft, J.J.C.W., Bosman, W., Bouwman, J., de Kort, N., 2013. Zonnebaars in Noord-Brabant. Onderzoek naar maatregelen tegen negatieve effecten van zonnebaarsen in Brabantse wateren. Bosgroep Zuid Nederland, Stichting Bargerveen, Stichting RAVON, in opdracht van Provincie Noord-Brabant.
- Van Kleef, H., Velde, G. van der, Leuven, R.S.E.W., Esselink, H., 2008. Pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*) invasions facilitated by introductions and nature management strongly reduce macroin- vertebrate abundance in isolated water bodies. *Biol. Invasions* 10, 1481–1490.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H., Smith, H.O., 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66–74.
- Vilà, M., Basnou, C., Pyšek, P., Josefsson, M., Genovesi, P., Gollasch, S., Nentwig, W., Olenin, S., Roques, A., Roy, D., Hulme, P.E., 2009. How well do we understand the impacts of alien species on ecosys- tem services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Front. Ecol. Environ.* 8, 135–144.
- Vitousek, P.M., D’Antonio, C.M., Loope, L.L., Rejmanek, M., Westbrooks, R., 1997. Introduced species: a significant component of human-caused global change. *N. Z. J. Ecol.* 21.

- Walker, S.F., Salas, M.B., Jenkins, D., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Bosch, J., Fisher, M.C., 2007. Environmental detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a temperate climate. *Dis. Aquat. Organ.* 77, 105–112.
- Whale, A.S., Huggett, J.F., Cowen, S., Speirs, V., Shaw, J., Ellison, S., Foy, C.A., Scott, D.J., 2012. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Res.* 40, e82–e82.
- Wilcove, D.S., Bean, M.J., 1994. The big kill : declining biodiversity in America's lakes and rivers. Environmental Defense Fund,, Washington, D.C. :
- Wilcox, T.M., McKelvey, K.S., Young, M.K., Jane, S.F., Lowe, W.H., Whiteley, A.R., Schwartz, M.K., 2013. Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. *PLoS ONE* 8, e59520.
- Willerslev, E., Cappellini, E., Boomsma, W., Nielsen, R., Hebsgaard, M.B., Brand, T.B., Hofreiter, M., Bunce, M., Poinar, H.N., Dahl-Jensen, D., 2007a. Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland. *Science* 317, 111–114.
- Willerslev, E., Cappellini, E., Boomsma, W., Nielsen, R., Hebsgaard, M.B., Brand, T.B., Hofreiter, M., Bunce, M., Poinar, H.N., Dahl-Jensen, D., Johnsen, S., Steffensen, J.P., Bennike, O., Schwenninger, J.-L., Nathan, R., Armitage, S., de Hoog, C.-J., Alfimov, V., Christl, M., Beer, J., Muscheler, R., Barker, J., Sharp, M., Penkman, K.E.H., Haile, J., Taberlet, P., Gilbert, M.T.P., Casoli, A., Campani, E., Collins, M.J., 2007b. Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested Southern Greenland. *Science* 317, 111–114.
- Willerslev, E., Cooper, A., 2005. Ancient DNA. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 272, 3–16.
- Willerslev, E., Davison, J., Moora, M., Zobel, M., Coissac, E., Edwards, M.E., Lorenzen, E.D., Vestergård, M., Gussarova, G., Haile, J., Craine, J., Gielly, L., Boessenkool, S., Epp, L.S., Pearman, P.B., Cheddadi, R., Murray, D., Bråthen, K.A., Yoccoz, N., Binney, H., Cruaud, C., Wincker, P., Goslar, T., Alsos, I.G., Bellemain, E., Brysting, A.K., Elven, R., Sønstebo, J.H., Murton, J., Sher, A., Rasmussen, M., Rønn, R., Mourier, T., Cooper, A., Austin, J., Möller, P., Froese, D., Zazula, G., Pompanon, F., Rioux, D., Niderkorn, V., Tikhonov, A., Savvinov, G., Roberts, R.G., MacPhee, R.D.E., Gilbert, M.T.P., Kjær, K.H., Orlando, L., Brochmann, C., Taberlet, P., 2014. Fifty thousand years of Arctic vegetation and megafaunal diet. *Nature* 506, 47–51.
- Willerslev, E., Hansen, A.J., Binladen, J., Brand, T.B., Gilbert, M.T.P., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D.A., Cooper, A., 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* 300, 791–795.
- Wittenberg, R., Cock, M.J.W., 2001. Invasive alien species: a toolkit of best prevention and management practices. CAB International, Wallingford, Oxon, UK,.
- Yoccoz, N.G., 2012. The future of environmental DNA in ecology. *Mol. Ecol.* 21, 2031–2038.
- Yoccoz, N.G., Bråthen, K.A., Gielly, L., Haile, J., Edwards, M.E., Goslar, T., Von Stedingk, H., Brysting, A.K., Coissac, E., Pompanon, F., Sønstebo, J.H., Miquel, C., Valentini, A., De Bello, F., Chave, J., Thuiller, W., Wincker, P., Cruaud, C., Gavory, F., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Brochmann, C., Willerslev, E., Taberlet, P., 2012. DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity. *Mol. Ecol.* 21, 3647–3655.
- Yoccoz, N.G., Nichols, J.D., Boulinier, T., 2001. Monitoring of biological diversity in space and time. *Trends Ecol. Evol.* 16, 446–453.
- Zhu, B., 2006. Degradation of plasmid and plant DNA in water microcosms monitored by natural transformation and real-time polymerase chain reaction (PCR). *Water Res.* 40, 3231–3238.
- Zouros, E., Ball, A.O., Saavedra, C., Freeman, K.R., 1994. An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 7463–7467.