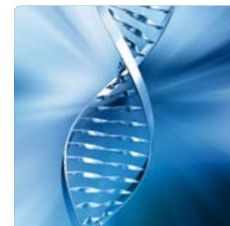


Zoeken naar DNA-sporen



Environmental DNA als nieuwe bemonsteringsmethode voor vissen

Er is een nieuwe methode ontwikkeld om het visbestand in een water te inventariseren: Environmental DNA. De methode is gebaseerd op de detectie van DNA dat in het water voorkomt en afkomstig is van levende soorten. De eerste resultaten wijzen uit dat deze methode een prima aanvulling is op bestaande inventarisatiemanieren en zeer geschikt is voor het detecteren van moeilijk te vangen vissoorten.

Tekst Jelger Herder (RAVON), Jan Kranenbarg (RAVON) en Alice Valentini (Spygen) Fotografie Jelger Herder

De traditionele monitoring van vissen en andere watergebonden organismen is gebaseerd op het vangen en tellen van soorten. Sommige soorten zijn door hun levenswijze of zeldzaamheid echter lastig te vangen waardoor bemonsteringen met traditionele methoden tijdrovend zijn en de uitkomsten niet altijd even betrouwbaar zijn. De nieuwe methode environmental DNA, kortweg eDNA genoemd, kan mogelijk uitkomst bieden. De methode is gebaseerd op de detectie van DNA dat soorten via urine, faeces en huidcellen in het water achterlaten. Door het oplossende vermogen van water worden deze stukjes DNA verspreid over een groot oppervlak. Door watermonsters te verzamelen en deze te analyseren op de aanwezigheid van DNA kan het voorkomen van een doelsoort worden aangetoond zonder dat deze daarvoor daadwerkelijk hoeft te worden gevangen. In 2011 hebben RAVON en Spygen samen een succesvolle pilot uitgevoerd met het gebruik van eDNA voor

het detecteren van grote modderkruipers.

Uitvinding eDNA

In 2008 is de eDNA-methode door Franse onderzoekers voor het eerst beschreven en succesvol toegepast bij Amerikaanse brulkickers. De methode is getest in drie wateren met een lage dichtheid en drie wateren met een hoge dichtheid Amerikaanse brulkickers. In alle wateren toonde eDNA de aanwezigheid van brulkickers aan. Ook bij vervolgonderzoek werd de aanwezigheid van Amerikaanse brulkickers met behulp van eDNA in een groot aantal wateren aangetoond waar de soort met traditionele methoden nog niet eerder was aangetroffen. Vooral bij lage dichtheden van een doelsoort is eDNA trefzekerder dan traditionele methoden omdat zeer kleine hoeveelheden DNA (één deeltje is genoeg) gedetecteerd worden. Onderzoek heeft aangetoond dat vrij in het water aanwezig DNA binnen drie weken wordt afgebroken.

Detectie van eDNA in watermonsters wijst dus op een actuele aanwezigheid van een soort.

Toepassing

De eerste toepassing van eDNA bij vissen betrof de in het stroomgebied van de Mississippi geïntroduceerde grootkopkarper en zilverkarper. Deze soorten vormen een bedreiging voor inheemse soorten doordat ze grote hoeveelheden kleine voedseldeeltjes uit het water filteren en hierdoor andere soorten benadelen. Ook springen deze karpers hoog het water uit als er motorboten naderen, soms zelfs in de boot, waardoor gevaarlijke situaties ontstaan. Grootkopkarper en zilverkarper dreigen via kanalen de grote meren te bereiken. Amerikanen willen dit voorkomen omdat de gevolgen voor de (sport) visserij en recreatievaart groot kunnen zijn.

Elektrische barrières werden in de kanalen aangelegd om kolonisatie van de meren tegen te gaan. Voorbij de barrières werden nog geen ►

De werking van Environmental DNA

Voor het aantonen van eDNA van de doelsoort in een watermonster, wordt gebruik gemaakt van soortspecifieke primers. Dit zijn kleine stukjes DNA-code die enkel hechten aan het DNA van de doelsoort. Vervolgens wordt via een Polymerase Chain Reactie (PCR) alleen dat DNA vermenigvuldigd dat gebonden is aan de primers. Na vermeerdering via de PCR wordt het product aangebracht op een gel. Alleen bij aanwezigheid van DNA van de doelsoort in het watermonster zal op de gel een streepje verschijnen (positieve PCR-reactie). Per soort moeten er dus specifieke primers worden ontwikkeld.

Ontwikkeling van soortspecifieke primers

Omdat DNA van andere soorten voor verkeerde detecties kan zorgen is het essentieel om goede primers te ontwikkelen die enkel aan de doelsoort hechten en niet aan andere soorten. Voor het ontwikkelen hiervan wordt DNA verzameld van meerdere populaties van de doelsoort zodat daarbinnen gezocht kan worden naar een stukje DNA dat binnen alle populaties gelijk is. Vervolgens wordt hierbinnen gezocht naar een stukje DNA dat uniek is voor de doelsoort. Hiervoor gebruiken RAVON en Spygen een eigen database met daarin zelf verzameld DNA. De kans op foutieve determinaties wordt zo uitgesloten. Aanvullend worden reeds bekende DNA-codes gebruikt die zijn opgeslagen in GenBank, een online database met daarin van alle soorten de DNA-codes die reeds bekend zijn.

De primers worden vervolgens in het laboratorium getest op weefsel van de doelsoort (positieve controle) en op weefsel van andere soorten (negatieve controle). De laatste stap is het testen van de primers op watermonsters uit het veld. De monsters worden verzameld op locaties met hoge dichtheid, lage dichtheid en afwezigheid van de doelsoort. Zo kan gekeken worden of de eDNA-methode werkt bij hoge en lage dichtheden van de doelsoort. Op de controlelocaties is de doelsoort afwezig. Dit is van belang om aan te tonen dat de primers specifiek genoeg zijn en niet toevallig DNA van andere soorten vermeerderen tijdens de PCR (valse positieven).

Verzamelen van watermonsters

Voor het verzamelen van de watermonsters wordt gebruikt gemaakt van een speciaal voor eDNA-onderzoek opgesteld gestandaardiseerd protocol dat is ontwikkeld door Spygen. De verzamelde watermonsters worden met een buffervloeistof gemengd zodat het DNA geconserveerd blijft tot de analyse. Er wordt steeds nieuw gesteriliseerd materiaal gebruikt om besmetting van monsters met DNA van andere locaties te voorkomen. Bij het verzamelen van de monsters wordt ook gebruik gemaakt van de aanwezige kennis over het habitatgebruik van de doelsoort om zo op de meest kansrijke plaatsen watermonsters te verzamelen.

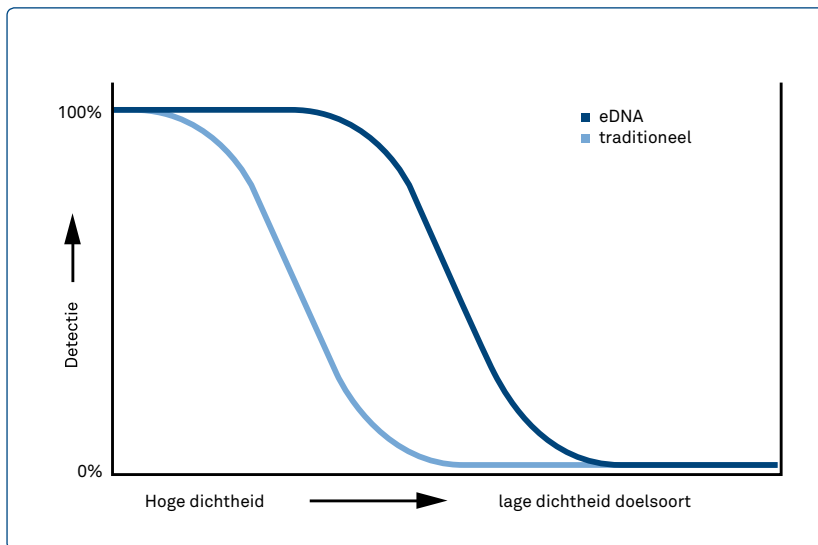
Analyseren van watermonsters

De monsters worden geanalyseerd in een speciaal voor eDNA ingericht laboratorium. Doordat er gewerkt wordt met zeer lage hoeveelheden is het van groot belang onder optimale condities te werken. Besmetting van de monsters moet altijd worden voorkomen en de extracties van DNA uit de monsters moeten optimaal zijn. Als dit onnauwkeurig gebeurt, kan een lage hoeveelheid DNA in de monsters gemist worden waardoor ten onrechte wordt aangenomen dat de doelsoort niet aanwezig was (valse nul-waarneming). Bij het opwerken van het eDNA worden afzonderlijk van elkaar zowel het vrij in het water opgeloste DNA als het aan het organisch materiaal gebonden DNA geëxtraheerd. Per monster en per extractie worden acht afzonderlijke PCR-reacties uitgevoerd en wordt er een positieve controle meegenomen met daarin eerder verzameld DNA van de doelsoort en een aantal negatieve controles zonder DNA. De controles laten zien dat de analyse en primers goed werken (positieve analyse) en dat er geen besmetting van de monsters optreedt tijdens de analyse (negatieve controles). Als er DNA van de doelsoort in het monster aanwezig is zullen de soortspecifieke primers daaraan hechten en het DNA middels de PCR-reactie vermeerderen. Het product van de PCR-reactie wordt vervolgens op een gel gespoten. Alleen als er DNA van de doelsoort aanwezig was, zal hierop een streepje verschijnen (positieve PCR). Hiermee wordt het wel of niet voorkomen van de doelsoort aangetoond.

Kijk voor meer informatie op www.environmental-dna.nl

Zelfdzame soorten als grote modderkruipers zijn te traceren met behulp van DNA sporen in het water





grootkop- en zilverkarpers gevangen bij visbemonsteringen. In 2009 en 2010 werd met behulp van eDNA echter aangetoond dat beide soorten toch voorbij de barrières voor kwamen. Aanvullend onderzoek met traditionele methoden (elektrovissen en netten) bevestigde na een grote inspanning (93 mandagen!) de aanwezigheid van zilverkarper voorbij de barrières.

Samenwerking met Franse onderzoekers

RAVON zag de potentie van de methode en is daarom een samenwerking aangegaan met Spygen, dat is opgericht door de Franse onderzoeksgroep die de methode heeft uitgevonden. Het doel van de samenwerking is om praktijkervaring op te doen met de methodiek en om deze van hieruit verder te ontwikkelen ten behoeve van de ecologische monitoring van wateren. In 2011 is als onderdeel van het Meetnet Beek- en Poldervissen van het Netwerk Ecologische Monitoring (NEM) een succesvolle pilot uitgevoerd waarbij de eDNA methode is getest voor de grote modderkruiper in Nederland. Ook is de methode succesvol getest op een aantal zeldzame amfibiesoorten zoals de knoflookpad en kamsalamander. Daarnaast zijn er plannen om de methode voor meer zeldzame soorten te ontwikkelen zoals de kwabaal, beekprik, rivierprik en een aantal invasieve soorten.

Grote modderkruiper als pilot

Voor de eerste pilot in Nederland is gekozen voor de grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*). Door de verborgen levenswijze en vaak lage dichtheden is deze soort lastig te inventariseren. Uit onderzoek van RAVON blijkt de trefkans, bij een éénmalig bemonstering, met traditionele onderzoeksmethoden relatief laag te zijn. In de zomer van 2011 heeft RAVON DNA van acht populaties grote modderkruipers en 44 andere vissoorten in Nederland verzameld. Hiermee heeft Spygen soortspecifieke primers ontwikkeld die in het veld zijn getest. Er zijn vier locaties met hoge dichtheid, vier locaties met lage dichtheid en vier locaties waar de grote modderkruiper afwezig is bemonsterd. Met behulp van eDNA



Visstandbemonstering nieuwe stijl.



Traditionele bemonsteringsmethoden zijn vaak zeer tijdrovend.

is de grote modderkruiper aangetoond in zeven van de acht wateren. Wateren met een hoge dichtheid aan grote modderkruipers gaven een 100% detectie en wateren met een lage dichtheid grote modderkruipers gaven 75% detectie. Gemiddeld komt dit neer op een detectiescore van 87,5 % op basis van een eenmalig bezoek van zo'n 20 minuten. De vier controlelocaties waar de grote modderkruiper afwezig was, scoorden zoals verwacht negatief in de analyse. Dit geeft aan dat de primers soortspecifiek zijn voor de grote modderkruiper en niet onbedoeld het DNA van andere soorten vermeerderen.

De watermonsters werden genomen in een periode (oktober) dat grote modderkruipers minder actief zijn. De verwachting is dat als de monsters tijdens het groeiseizoen en de voortplantingsperiode (vooral april en mei) genomen worden, de trefkans in wateren met lage dichtheden nog verder toe zal nemen doordat er dan meer DNA in het water aanwezig is door de verhoogde activiteit van de soort.

Voordelen

De hogere trefkans met slechts een geringe inspanning vertaalt zich ook in een kostenbesparing ten opzichte van traditionele methoden waarbij veel meer velddagen nodig zijn voor een vergelijkbaar resultaat. Ook horen determinatie fouten tot het verleden. Verder treedt er geen verstoring op doordat een soort niet gevangen hoeft te worden om de aanwezigheid aan te tonen. Tot slot voorkomt de methode de ongewenste verspreiding van exoten en ziektes (zoals chytridiomycose en het ranavirus) via veldmaterialen.

Kijk op de toekomst

Deze nieuwe methode betekent een doorbraak binnen het veldonderzoek naar het voorkomen van aan water gebonden soorten. Het werken met eDNA kan verder tot forse kostenbesparingen leiden. In samenwerking met Spygen is RAVON momenteel bezig met het ontwikkelen van soortspecifieke primers voor steeds meer soorten. Ook wordt aandacht besteed aan het genereren van een complete

soortenlijst voor vissen en amfibieën uit een watermonster met eDNA. Daarbij worden universele primers gebruikt die zich niet enkel op één soort richten maar al het DNA in een watermonster vermenigvuldigen. De verkregen DNA-codes worden uitgelezen en vergeleken met een database van bekende DNA-codes. Hier komt vervolgens een lijst uit met alle soorten die in het water voorkomen. Deze methode is ook al met succes getest. Momenteel wordt onderzoek uitgevoerd om de hoeveelheid eDNA per soort in de monsters te relateren aan de werkelijke dichtheid van de soorten in een water. Als dit lukt kan, naast de soortensamenstelling, mogelijk ook de dichtheid per soort worden bepaald. De verwachting is dat het hierdoor in de toekomst mogelijk is om met eDNA een KRW-score voor vis in een waterlichaam te bepalen. **V**

Surf voor de geraadpleegde literatuur naar www.invisionair.nl