

Environmental DNA als inventarisatiemethode voor libellen

Tekst: Jelger Herder
RAVON
Tim Termaat
De Vlinderstichting
& Alice Valentini
Spygen

Voor een adequate soortbescherming en evaluatie van beheer- en herstelmaatregelen is kennis nodig over de verspreiding van soorten. Voor soorten die (deels) in het water leven is deze kennis niet altijd even gemakkelijk te verzamelen. De methode environmental DNA (eDNA) biedt daarvoor sinds kort een uitkomst. Door watermonsters te analyseren op de aanwezigheid van DNA is het voorkomen van soorten vast te stellen. De Vlinderstichting heeft in 2012 in samenwerking met RAVON en het Franse Spygen een succesvolle pilot uitgevoerd naar het gebruik van eDNA bij het in kaart brengen van groene glazenmaker en gevlekte witsnuitlibel.

Terwijl zoet water tot de meest bedreigde habitats ter wereld behoort, is er tegelijk in vergelijking met landhabitats relatief weinig informatie over wat zich onder de waterspiegel afspeelt. Doordat in het water levende soorten veelal niet zichtbaar zijn, is er vaak een grote (vangst)inspanning nodig om ze in kaart te brengen. Dit geldt zeker wanneer soorten een verborgen levenswijze hebben of in lage dichtheden voorkomen. Environmental DNA kan hier nu een oplossing voor bieden. De methode is in 2008 voor het eerst beschreven en toegepast voor de Amerikaanse brulkikker in Frankrijk. In zes wateren waarvan de Amerikaanse brulkikker bekend was, werd de aanwezigheid van DNA van deze soort vastgesteld en daarmee het voorkomen van de soort bevestigd (Ficetola *et al.*, 2008). Uit aanvullend onderzoek is gebleken dat vrij in het water opgelost DNA binnen drie weken wordt afgebroken. Het aantonen van DNA van een soort in watermonsters wijst dus op recente aanwezigheid van een soort (Dejean *et al.*, 2011). In Nederland is eDNA voor het

Hoe werkt het?

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

eerst toegepast in 2011 door RAVON in samenwerking met Spygen bij een pilotstudie naar de grote modderkruiper. In deze studie werd de grote modderkruiper op zeven van de acht locaties waar hij voorkwam ook succesvol aangetoond met eDNA (Herder *et al.*, 2012). Eind 2011 is een Deense publicatie verschenen waarin eDNA voor het eerst voor een libel, de gevlekte witsnuitlibel, werd ingezet (Thomsen *et al.*, 2011).

Bemonsteren

Van oudsher worden libellen in kaart gebracht door het zoeken naar imago's. Daarnaast is ook het zoeken naar larvenhuidjes een beproefde methode, die door de recentelijk verschenen fotogids (Brochard *et al.*, 2012) steeds toegankelijker wordt. Het bemonsteren van libellenlarven uit het water wordt in Nederland echter nauwelijks toegepast. Het maakt wel onderdeel uit van de macrofaunamonitoring van waterschappen (vooral stromende wateren), maar verder gebeurt het weinig. Bij het waarnemen van imago's ben je gebonden aan de vliegtijden van de verschillende soorten en tegelijk aan de weersomstandigheden. Daarnaast wor-



Jelger Herder

Het monstere van eDNA in een krabbenscheerveld.

den soorten mogelijk over het hoofd gezien wanneer ze slechts in lage dichtheid voorkomen. Environmental DNA kan daarvoor een uitkomst bieden. Uit onderzoek naar andere soorten zoals de Amerikaanse brulkikker (Dejean *et al.*, 2012) en de knoflookpad (Herder, 2013) bleek onderzoek met eDNA een veel hogere trefkans te geven dan traditionele methoden. Daarnaast zijn libellenlarven jaarrond in het water aanwezig waardoor de periode waarbinnen soorten geïnventariseerd kunnen worden mogelijk kan worden verlengd. Reden voor De Vlinderstichting en RAVON om de methode nader te onderzoeken voor libellen. In 2012 is er daarvoor in het kader van het verspreidingsonderzoek libellen (onderdeel van het Netwerk Ecologische Monitoring (NEM)) een pilot uitgevoerd naar het gebruik van eDNA voor het opsporen van twee beschermde libellensoorten van de Habitatrictlijn: de gevlekte witsnuitlibel (*Leucorrhinia pectoralis*) en groene glazenmaker (*Aeshna viridis*).

Deze pilot is uitgevoerd in opdracht van de Gegevensautoriteit Natuur (GaN) en gefinancierd door het ministerie van EL&I (inmiddels EZ).

Pilotstudies

Voor een succesvolle detectie met behulp van eDNA spelen primers een cruciale rol (zie kader). Voor de gevlekte witsnuitlibel waren er reeds primers voorhanden en we hebben deze getest voor de Nederlandse situatie. Voor de groene glazenmaker moesten nog soortspecifieke primers ontwikkeld worden. Hiervoor is DNA verzameld van drie verschillende populaties van de groene glazenmaker. Hierbinnen is gezocht naar een stukje DNA-code dat binnen alle populaties gelijk is, zodat de primers zullen werken bij alle Nederlandse populaties van deze soort. Vervolgens is getest of dit stukje DNA werkelijk uniek is voor de groene glazenmaker. Hiervoor is het DNA van de groene glazenmaker vergeleken met in Nederland verzameld DNA van andere soorten libellen en met DNA-codes uit Genbank, een online database met reeds bekende DNA-codes van alle soorten. De gevonden primers zijn vervolgens getest op het weefsel van de groene glazenmaker en de andere verzamelde libellen. Ze bleken inderdaad alleen een positieve reactie te geven bij weefsel van de groene glazenmaker. De laatste stap was het testen van de primers op watermonsters uit het veld. Verspreid over Nederland zijn op basis van bekende verspreidingsgegevens en expert judgement locaties gekozen waar een of beide soorten in lage, medium of hoge dichtheid voorkomen. Daarnaast zijn er vier controlewateren meegenomen waar beide soorten met zekerheid afwezig zijn (tabel 1). De controlewateren dienen om te testen of er niet onbedoeld DNA van een verkeerde soort vermeerderd wordt door de primers.

Groene glazenmaker en gevlekte witsnuitlibel

De groene glazenmaker werd met eDNA succesvol op zeven van de negen locaties waarvan de soort bekend



Gevlekte witsnuitlibel.



Groene glazenmaker.

was aangetoond (78% score). De gevlekte witsnuitlibel werd op zes van de acht locaties waar de soort aanwezig was aangetoond met eDNA (75% score). De vier controlelocaties scoorden zoals verwacht voor beide soorten negatief. Geen van beide soorten werd daarnaast aangetroffen op locaties waarvan de soort van tevoren nog niet bekend was (tabel 1).

De twee van de negen locaties waarop het niet is gelukt om met eDNA groene glazenmakers aan te tonen, lagen beiden in het westelijk veenweidegebied waar de voedselrijkdom van het water gemiddeld hoger is dan op de andere locaties. Mogelijk heeft dit invloed op de afbraaksnelheid van DNA in het water en op de extractie van DNA uit de monsters. Dit moet echter nader onderzocht worden. Een andere mogelijke verklaring voor het 'missen' van deze twee locaties kan liggen in het tijdstip van monstern. Deze locaties zijn later in het jaar verzameld dan de overige zeven locaties. Mogelijk dat door een lagere activiteit van de larven minder DNA in het water aanwezig was. Ook hiervoor zullen vervolgonderzoek moeten worden opgezet.

Tabel 1: resultaten van de Environmental DNA-analyses. Van links naar rechts staat per kolom weergegeven: de locatie van het watermonster; de geschatte dichtheid van de populatie (op basis van bestaande waarnemingen); het aandeel van de PCR-reacties (steeds 12 in totaal) dat positief scoorde op eDNA van de soort; en de conclusie of de soort wel of niet is aangetoond met behulp van eDNA.

Locatie	Groene glazenmaker			Gevlekte witsnuitlibel		
	Dichtheid	eDNA	Aangetoond	Dichtheid	eDNA	Aangetoond
Oosterhaar (GR)	hoog	1/12	ja	niet uit te sluiten	0/12	nee
Woudbloem (GR)	hoog	7/12	ja	niet uit te sluiten	0/12	nee
Veendam (GR)	hoog	1/12	ja	niet uit te sluiten	0/12	nee
Wildervank (GR)	hoog	12/12	ja	niet uit te sluiten	0/12	nee
Kalenberg (OV)	hoog	12/12	ja	hoog	12/12	ja
Hengelo (OV)	afwezig	0/12	nee	hoog	9/12	ja
Reeuwijk (ZH)	medium	0/12	nee	niet uit te sluiten	0/12	nee
Meppel (OV)	hoog	1/12	ja	hoog	5/12	ja
Boxtel (NB)	afwezig	0/12	nee	medium	0/12	nee
Ossenzijl (OV)	hoog	1/12	ja	hoog	9/12	ja
Valkenswaard (NB)	afwezig	0/12	nee	laag	8/12	ja
Nijmegen 1 (GE)	afwezig	0/12	nee	medium	6/12	ja
Castricum (NH)	afwezig	0/12	nee	laag	0/12	nee
Ouderkerk a/d IJssel (ZH)	medium	0/12	nee	niet uit te sluiten	0/12	nee
Wageningen 1 (GE)	afwezig	0/12	nee	afwezig	0/12	nee
Wageningen 2 (GE)	afwezig	0/12	nee	afwezig	0/12	nee
Wageningen 3 (GE)	afwezig	0/12	nee	afwezig	0/12	nee
Nijmegen 2 (GE)	afwezig	0/12	nee	afwezig	0/12	nee

De resultaten voor de gevlekte witsnuitlibel zijn met een score van 75% vergelijkbaar met de eerdere eDNA-studie naar de soort in Denemarken (82% score in 11 wateren) (Thomsen *et al.*, 2011). De twee locaties waar de soort 'gemist' is, betroffen een plas bij Bakkum (NH) en een ven bij Boxtel (NB). De populatie bij Bakkum is zeer klein, terwijl het een relatief groot wateroppervlak betreft. In 2012 is de gevlekte witsnuitlibel hier ondanks het zoeken naar larvenhuidjes niet

vastgesteld. Bij het ven bij Boxtel is het niet gelukt de beste locatie te bemonsteren, omdat deze door een diepe sloot niet bereikbaar was. Er is daar in secundair geschikte habitat gemonsterd wat mogelijk heeft bijgedragen aan de negatieve score. Opvallend is de positieve score van een ven bij Valkenswaard (NB), waar ook slechts een heel kleine populatie aanwezig is. Op deze locatie is het watervolume echter wel beduidend kleiner dan bij Bakkum, wat de kans op detectie van eDNA vergroot (minder verdunning van het DNA).



Oosterhaar (Gr.).

Jelger Herder

Verbeteren monstermethode en analyse

De detectiekansen van 75% voor de gevlekte witsnuitlibel en 78% voor de groene glazenmaker bieden goed perspectief voor het inzetten van de methode. Zo kan bijvoorbeeld in grote poldergebieden met veel potentieel geschikte krabbenscheersloten een snelle schifting worden gemaakt van sloten waar de groene glazenmaker zeker wel en waarschijnlijk niet zit. De sloten die positief scoren, hoeven dan in elk geval niet meer met uitgebreid veldwerk in de vliegperiode onderzocht te worden. Momenteel werken we continu aan het verbeteren van de monstermethode en analyse. Ook kijken we naar de relatie tussen de hoeveelheid DNA en de dichtheid van een soort. Uit labexperimenten blijkt daar een duidelijke relatie tussen te zijn. In het veld zijn de resultaten voor sommige soorten (amfibieën bijvoorbeeld) erg goed, maar bij



Volop actie voor Tienvoor12!- soorten

De afgelopen winter zijn er weer heel wat activiteiten geweest om de sterkst bedreigde vlinders te steunen.

Zo is er gewerkt in een veentje in Drenthe voor de veenbesparelmoervlinder en hebben we, in de stromende regen, op het Miljoenenlijntje bij Eys gewerkt in het leefgebied van het bruin dikkopje. Deze activiteit werd uitgevoerd in het kader van de actie Groen en Doen, gesteund door het Ministerie van Economische Zaken.

Een grote happening vond plaats op 16 maart, toen bijna 150 vrijwilligers het leefgebied voor de kleine heivlinder op het Kootwijkerzand hebben aangepakt tijdens een Geocache CITO-event. Er zijn veel boompjes verwijderd en er is kleinschalig geplagd, waardoor er weer meer open zand komt. Dat is waar deze zeldzame soort van houdt. Een aantal studenten zal dit jaar studie doen naar de rupsen van de kleine heivlinder en hopelijk kunnen we door hun resultaten deze soort nog beter beschermen.

Diergaarde Blijdorp heeft ons verrast door twee soorten uit de campagne Tienvoor12 te adopteren. De iepenpage en het veenbesblauwtje worden financieel ondersteund, waardoor we veel gerichte acties kunnen ondernemen. Zo worden er in Heerlen meer iepen geplant, waarbij ook medewerking wordt verkregen van het Hotel Van der Valk, waar de iepenpage aan de rand van de parkeerplaats zijn leefgebied heeft.

De provincie Noord-Brabant heeft de opdracht gegeven om het leefgebied van het spiegeldikopje te verbeteren en dat is hoognodig, want de afgelopen tien jaar zien we deze prachtige vlinder van steeds meer locaties verdwijnen.

In de komende nummers van *Vlinders* leest u meer over deze activiteiten.

Tekst:

Kars Veling

De Vlinderstichting

andere soorten nog niet eenduidig. Er zijn veel factoren van invloed op de concentratie eDNA (hoeveel DNA een soort produceert, hoe actief een soort is in de periode van monstern, het volume van het water, de aanwezigheid van micro-organismen, de voedselrijkdom etc.). Er zal daarvoor per soort en per watertype onderzoek nodig zijn om op basis van eDNA accurate dichtheidsschattingen te kunnen maken. Tot slot richten we ons op een tweede toepassing waarbij met een universele primer het DNA van alle libellen vermeerderd wordt. Dit DNA kan vervolgens via een sequencer worden uitgelezen en worden vergeleken met een aangelegde referentiedatabase op de computer. Het is dan mogelijk om op basis van één watermonster een lijst van de voorkomende libellen te genereren. Voor vissen en amfibieën zijn al positieve resultaten bereikt. Voor libellen willen we dit eveneens gaan ontwikkelen.

Toekomst

In de toekomst kan eDNA een belangrijke rol gaan spelen bij de monitoring van watergebonden soorten. Zeker als het haalbaar en betaalbaar wordt om met watermonsters complete soortenlijsten te genereren en daar ook dichtheden uit te bepalen. Hierdoor kunnen relatief eenvoudig veel verspreidingsgegevens verzameld worden. De methode moet echter vooral als aanvulling worden gezien op bestaand veldwerk. Veel libellensoorten zijn in de vliegtijd eenvoudig waar te nemen. De onschatbare hoeveelheid waarnemingen die door vrijwillige waarnemers verzameld worden, zal niet snel vervangen kunnen worden door eDNA-onderzoek.

Referenties

- Brochard C., D. Groenendijk, E. van der Ploeg en T. Termaat, 2012. Fotogids Larvenhuidjes van Libellen. KNNV Uitgeverij, Zeist.
- Dejean T., A. Valentini, A. Duparc, S. Pellier-Cuit, F. Pompanon, P. Taberlet en C. Miaud, 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE* 6(8): e23398. doi:10.1371/journal.pone.0023398
- Dejean T., A. Valentini, C. Miquel, P. Taberlet, E. Bellemain & C. Miaud, 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology* Volume 49, Issue 4, pag. 953-959.
- Ficetola G., C. Miaud, F. Pompanon & P. Taberlet, 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* nr. 4, pag. 423-425.
- Herder, J.E., A. Valentini & J. Kranenbarg, 2012. Detectie van grote modderkruipers met behulp van environmental DNA. *H2O*, nr 3, pagina 25-27.
- Herder, J.E., 2013. Environmental DNA zet de knofookpad terug op de kaart. *Schubben en Slijm* 15, Stichting RAVON.
- Thomsen, P. F., J. Kielgast, L. L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M. T. P. Gilbert, L. Orlando and E. Willerslev, 2011. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 2565-2573.



De iepenpage is geadopteerd door diergaarde Blijdorp.