

Analyse eDNA Italiaanse kamsalamander 2013



REPTIELEN AMFIBIEËN VISSSEN ONDERZOEK NEDERLAND



Analyse eDNA Italiaanse kamsalamander 2013

Een rapportage van RAVON

in opdracht van De Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit, Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering, Team Invasieve Exoten

J.J.C.W. van Delft & J.E. Herder
februari 2014



STICHTING RAVON
POSTBUS 1413
6501 BK NIJMEGEN
www.ravon.nl

Colofon

© 2014 Stichting RAVON, Nijmegen

Rapportnummer: 2013.108

Tekst: Jeroen van Delft & Jelger Herder

In opdracht van: De Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit, Team
Invasieve Exoten.

Foto kaft: Italiaanse kamsalamanders, Foto Jelger Herder

Wijze van citeren: Delft, J.J.C.W. van & J.E. Herder, 2014. Analyse eDNA Italiaanse kamsalamander 2013. Stichting RAVON i.o.v. De Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit, Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering, Team Invasieve Exoten.

INHOUD

1 INLEIDING	1
2 METHODE	3
3 RESULTATEN	5
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	9
DANKWOORD	13
LITERATUUR	15

1 INLEIDING

In 2013 ontving RAVON van de Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit, Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering, Team Invasieve Exoten opdracht voor de ontwikkeling van primers en het uitvoeren van een pilotstudie voor het vaststellen van de Italiaanse kamsalamander (*Triturus carnifex*) met de environmental DNA-techniek. Dit is nog datzelfde jaar succesvol uitgevoerd met onze Franse samenwerkingspartner SPYGEN (van Delft *et al.*, 2013).

Daarnaast werd opdracht verleend om 56 watermonsters te verzamelen op de Veluwe in de periferie van het huidige bekende verspreidingsgebied van deze soort. Deze monsters zijn door dezelfde medewerker verzameld die ook de monsters voor de primerontwikkeling en pilot verzameld heeft, om zo vergelijkbaar mogelijke resultaten te verkrijgen. Het verzamelde materiaal werd bewaard (van Delft *et al.*, 2013). Voor de analyse van deze monsters met de nieuw ontwikkelde primers, is in november 2013 opdracht verleend. Daarbij is ook gevraagd om de eDNA-primers voor de inheemse kamsalamander (*Triturus cristatus*) op alle monsters toe te passen. De resultaten worden in onderhavige rapportage besproken.

Deze opdracht is een vervolg op het verspreidingsonderzoek dat in 2005, 2011 en 2012 op de Veluwe is uitgevoerd (Vleut & Bosman, 2005; Bosman & van Delft, 2011; Hoogen & Crombaghs, 2012). De verspreidingsonderzoeken hebben aangetoond dat de Italiaanse kamsalamander zich ten opzichte van 2005 sterk heeft uitgebreid. Er is een duidelijke link met tussen dit onderzoek en het gedetailleerde genetische onderzoek dat NCB Naturalis, Leiden, aan de hand van door RAVON in 2012 verzameld genetisch materiaal op de Veluwe, heeft verricht (Meilink *et al.*, 2013). De Italiaanse kamsalamander kan hybridiseren met de inheemse kamsalamander. Op die manier vormt hij een bedreiging voor deze (inter)nationaal strikt beschermde inheemse soort. Door het genetisch onderzoek uit 2013 is de mate van hybridisatie en de verspreiding van dit fenomeen over de Veluwe beter in beeld gekomen. Naast hybridisatie is ook introgressie (gene flow door terugkruisen) naar beide soorten toe aangetoond. De genetische vervuiling reikt verder dan voorheen werd vermoed. Vervuiling is vastgesteld in poelen aan de grens van het, op basis van morfologische identificatie, vermoede verspreidingsgebied. Dit betekent dat genetische vervuiling door *T. carnifex* mogelijk verder reikt dan het in 2011 en 2012 onderzochte gebied (Bosman & van Delft, 2011; Hoogen & Crombaghs, 2012). Deze informatie vraagt om een efficiënte methode om een nog groter aantal potentieel door *T. carnifex* “vervuilde” populaties op te sporen. Dit kan met eDNA.

Verder lezen over eDNA is mogelijk via de website www.environmental-dna.nl die RAVON met SPYGEN heeft opgezet en waarop ook tal van PDF's van wetenschappelijke en meer populaire artikelen staan.

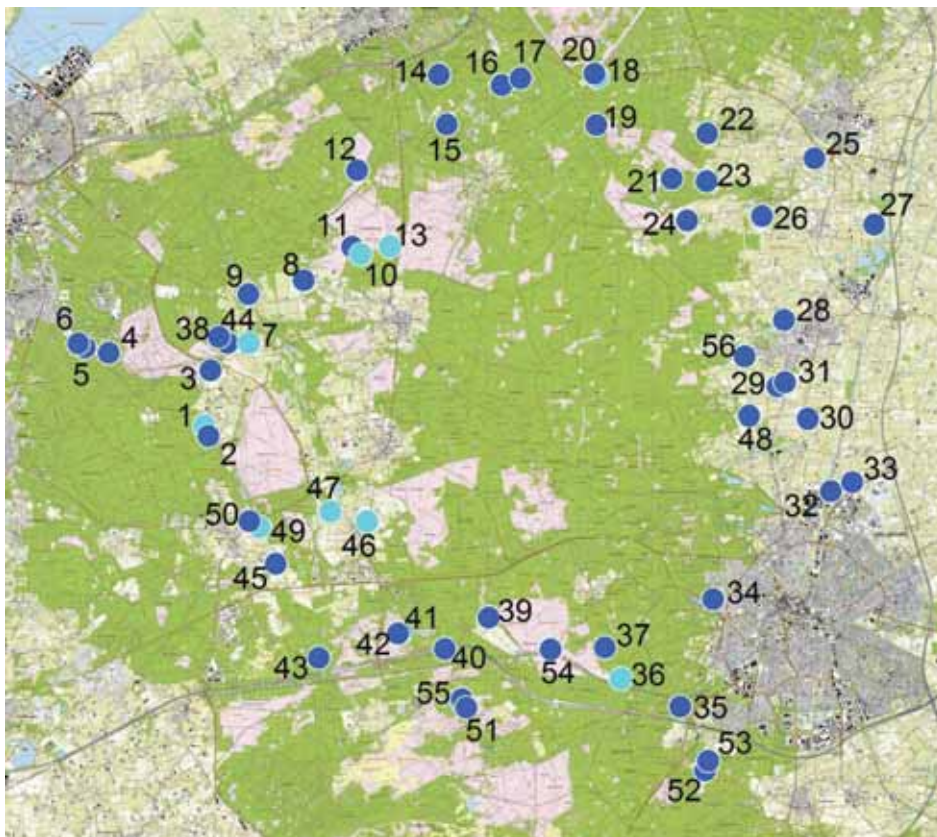
2 METHODE

In 2013 zijn nieuwe eDNA-primers voor de Italiaanse kamsalamander ontwikkeld en zijn 56 watermonsters op de Veluwe verzameld (van Delft *et al.*, 2013). Deze nieuwe primers zijn in het laboratorium van SPYGEN toegepast op de 56 in 2013 verzamelde watermonsters. Daarnaast zijn ook de eDNA-primers voor de inheemse kamsalamander op alle monsters toegepast. Wanneer met eDNA Italiaanse kamsalamander wordt aangetoond, is niet te zeggen of de soort er in een genetisch zuivere vorm voorkomt, of dat er enkel hybriden aanwezig zijn. Dit komt doordat de primers zich richten op mitochondriaal DNA dat enkel via de lijn van de moeder wordt doorgegeven. Wanneer een vrouwtje Italiaanse kamsalamander kruist met een mannetje inheemse kamsalamander zullen de nakomelingen enkel mitochondriaal DNA van de Italiaanse kamsalamander krijgen. Door ook de primers voor de inheemse kamsalamander op alle 56 samples toe te passen, is het wel mogelijk hier een indruk van te krijgen. Uit eerdere onderzoeken van NCB Naturalis blijkt namelijk dat hybridisatie bijna altijd optreedt, wanneer de soorten samen in een water voorkomen. Bijkomend voordeel is dat er mogelijk ook nog onbekende zuivere populaties van de inheemse kamsalamander gevonden worden. Die kennis is waardevol om het verspreidingsbeeld van beide soorten op de Veluwe zo goed mogelijk te schetsen en om eventuele bestrijdingsmaatregelen zo gericht mogelijk in te kunnen zetten.

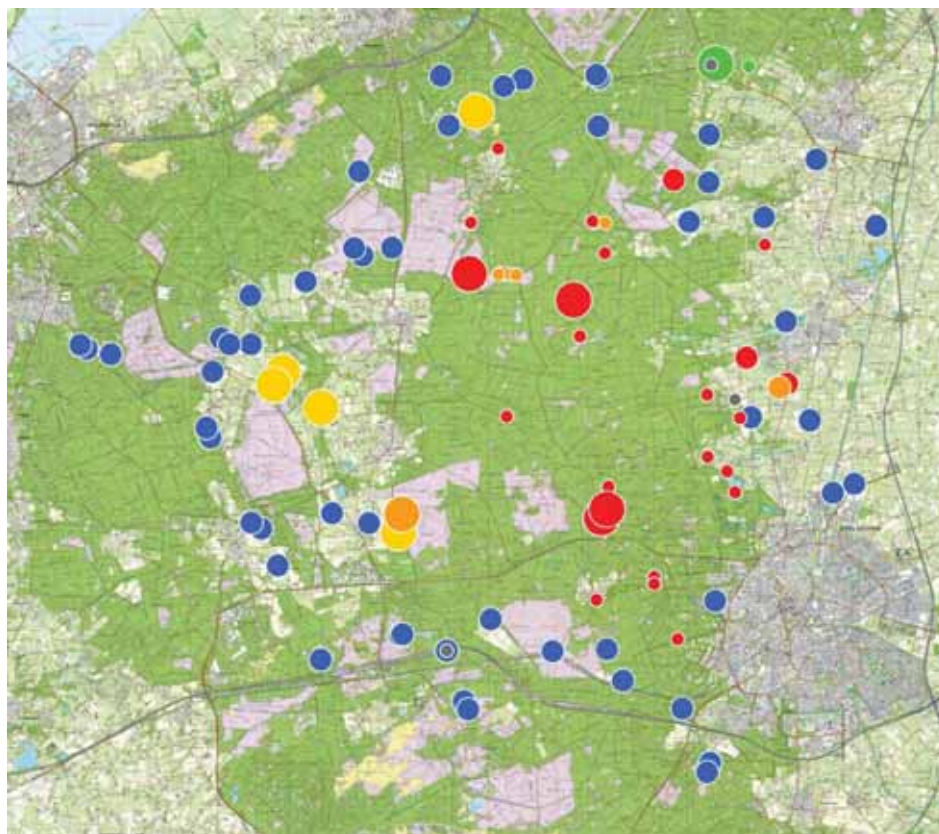
3 RESULTATEN

De ligging van de 56 in 2013 met eDNA onderzochte wateren op de Veluwe is weergegeven in figuur 1. De resultaten van de eDNA-analyse zijn weergegeven in figuur 2. Van de 56 monsters waren er 52 negatief. In vier monsters is eDNA van de Italiaanse kamsalamander aangetoond. In één van deze vier samples (nr. 29) is bovendien DNA van de inheemse kamsalamander aangetoond (tabel 1). De vier positieve wateren betreffen: een ven op de Tongerensche heide (nr. 21) en twee poelen en een beekje nabij Vaassen: poel bij de Waterstraat (nr. 29), poel bij de Kortenbroekweg (nr. 31) en Egelbeek bij de Waterstraat (56).

Bij verzending van de watermonsters naar SPYGEN zijn een aantal buisjes beschadigd geraakt. Het waterverlies dat daardoor is opgetreden heeft voor negen monsters geresulteerd in een minder betrouwbare uitslag van de analyse, hoewel ook een gering volume water kan volstaan om eDNA aan te tonen, aangezien het een subsample uit een groot mengmonster betreft. Deze locaties hebben in figuur 1 een lichtblauwe kleur gekregen.



Figuur 1: Ligging van de 56 in 2013 met eDNA onderzochte wateren op de Veluwe, waarbij lichtblauw staat voor wateren met een minder betrouwbare uitslag van de analyse ten gevolge van waterverlies gedurende transport.



Figuur 2: Ligging van de 56 in 2013 met eDNA onderzochte wateren op de Veluwe in relatie tot de reeds bekende verspreiding van kamsalamanders.

Middelgrote stippen: eDNA-onderzoek; Rood: eDNA Italiaanse kamsalamander aangetoond, oranje: zowel eDNA van Italiaanse als van inbeemse kamsalamander, blauw: eDNA negatief (geen Italiaanse of inbeemse kamsalamander aanwezig).

Grote stippen: genetisch onderzoek individuele salamanders (Meilink et al., 2013); toenemende kleur van lichtgeel via oranje naar rood geeft toenemende hoeveelheid genetisch materiaal van Italiaanse kamsalamander in de populatie weer; groen: zuivere inbeemse kamsalamanderpopulatie.

Kleine stippen: salamanders visueel gedetermineerd (Bosman & van Delft, 2011; Hoogen & Crombaghs, 2012); rood: overwegend Italiaanse kamsalamander, okergeel: ook (sporen van) inbeemse kamsalamander vastgesteld, groen: ogenschijnlijk zuivere inbeemse kamsalamander, grijs: vondst van niet tot op soort te determineren eitjes of larven.

Tabel 1: Overzicht van de vier positieve watermonsters binnen de eDNA-studie.

Water-nummer	Naam	X-Coord.	Y-Coord.	DNA Italiaanse kamsalamander	DNA Inheemse kamsalamander
21	Ven Tongerensche Heide	190,597	482,588	Aanwezig	
29	Poel Waterstraat Vaassen	193,780	476,320	Aanwezig	Aanwezig
31	Egelbeek Waterstraat Vaassen	194,014	476,432	Aanwezig	
56	Poel Kortenbroekweg Vaassen	192,797	477,221	Aanwezig	



Foto 1: Ven op de Tongerensche Heide met positieve uitslag eDNA-analyse Italiaanse kamsalamander.



Foto 2: Poel bij de Waterstraat, in het beekdal van de Egelbeek, met positieve uitslag eDNA-analyse Italiaanse kamsalamander en inbeemse kamsalamander.



Foto 3: Egelbeek bij de Waterstraat met positieve uitslag eDNA-analyse Italiaanse kamsalamander.



Foto 4: Poel bij de Kortenbroekweg met positieve uitslag eDNA-analyse Italiaanse kamsalamander.

4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

De eDNA-analyse op de aanwezigheid van Italiaanse en inheemse kamsalamanders heeft een aantal zaken aan het licht gebracht. Het voorafgaand aan dit onderzoek vastgestelde verspreidingsbeeld blijkt aan de noord- west- en zuidrand van het door de Italiaanse kamsalamander bezette gebied, de grenzen van de verspreiding al goed te schetsen. Hier zijn met behulp van eDNA geen nieuwe wateren met Italiaanse kamsalamanders meer ontdekt. Dit sluit goed aan op de studie van Meilink *et al.* (2013). Daarin is ook sprake van een gradiënt van genetisch materiaal van Italiaanse kamsalamander versus inheemse kamsalamander van Vaassen naar buiten toe. Aan de nu bekende randen van het verspreidingsgebied is de hoeveelheid genetisch materiaal van Italiaanse kamsalamander veel geringer dan in het centrum (Meilink *et al.*, 2013). Dit past goed in het verhaal dat de Italiaanse kamsalamanders circa 40 jaar geleden nabij Vaassen (vijvertuinen Ada Hofman) zijn ontsnapt dan wel losgelaten (Bogaerts *et al.*, 2001; Bogaerts, 2002; Bogaerts, 2009) en zich van daaruit hebben uitgebreid.

Het verspreidingsbeeld aan de oostrand van het onderzoeksgebied (tussen Apeldoorn en Epe) is wél aangescherpt met deze eDNA-studie. Dit was ook precies de regio waar verwacht werd dat er nieuwe vindplaatsen ontdekt zouden kunnen worden. Aan de west- en noordrand bleken de meest excentrisch gelegen onderzochte locaties namelijk een betrekkelijk gering aandeel genetisch materiaal van Italiaanse kamsalamander te herbergen (Meilink *et al.*, 2013). In het noorden van het studiegebied bleek een onderzochte “kamsalamander”-populatie zelfs zuiver inheems (Meilink *et al.*, 2013), wat erop wijst dat deze buiten de huidige invloedssfeer van de Italiaanse kamsalamander ligt. Bovendien zijn er aan de zuid- en westrand belangrijke barrières aanwezig in de vorm van provinciale wegen en de A1.

eDNA geeft een indicatie van dichtheden, maar nauwkeurige aantalschattingen zijn (nog) niet mogelijk (Thomsen *et al.*, 2012; Herder *et al.*, 2013). Een sterk eDNA-sigitaal valt vaak samen met een hoge dichtheid van de doelsoort en vice versa. In dit onderzoek gaven alle monsters een laag eDNA-sigitaal. Bij drie van de vier wateren was slechts 1 van de 12 PCR's positief. Alleen bij het ven op de Tongerensche Heide waren 2 van de 12 PCR's positief; wat nog altijd laag is. Dit kan dus wijzen op een relatief gering aantal aanwezige dieren in de vier positieve wateren. In het onderzoek van Hoogen & Crombaghs (2012) zijn vrij veel wateren rond Vaassen, buiten de hoge zandgronden van de Veluwe, bemonsterd. Zij troffen daar geen (Italiaanse) kamsalamanders aan. Dat zou dus heel goed samen kunnen hangen met deze waarschijnlijk lage dichtheden ter plaatse. Hierdoor is de soort vrijwel uitsluitend met eDNA efficiënt vast te stellen.

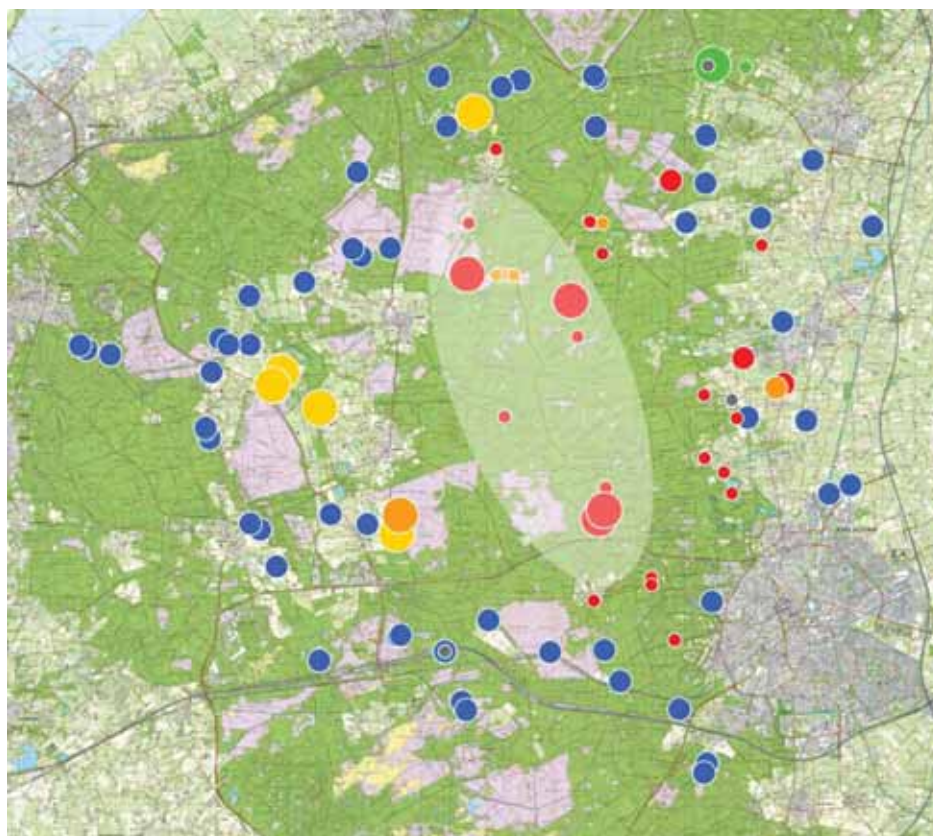
Het is zorgelijk dat nu in twee wateren dichtbij de Egelbeek en zelfs in de Egelbeek eDNA van Italiaanse kamsalamanders is gevonden. Dit kan erop wijzen dat dit kleine beekdal door de soort als verbredingsroute wordt gebruikt vanaf de Veluwe richting de IJssel en dat daarbij ook de beek zelf niet gemedend wordt.

Zoals beschreven bij de resultaten zijn negen monsters tijdens transport naar SPYGEN dusdanig beschadigd geraakt dat veel water is verloren. De uitslag van de analyse is daardoor mogelijk minder betrouwbaar. SPYGEN geeft nadrukkelijk aan dat ook een gering volume water kan volstaan om eDNA aan te tonen. Doordat deze samples verspreid over het

onderzoeksgebied liggen en omgeven zijn door andere negatieve samples, is de invloed op het verspreidingsbeeld gering.

De grenzen van de verspreiding en de genetische samenstelling zijn via inventariserend onderzoek (Bosman & van Delft, 2011; Hoogen & Crombaghs, 2012), genetisch onderzoek (Meilink *et al.*, 2013) en eDNA-onderzoek beter in beeld gebracht. Voor een uiterst nauwkeurig verspreidingsbeeld kan nu nog geopteerd worden voor het met eDNA analyseren van de overige aanwezige wateren in het verspreidingsgebied en langs de randen daarvan. Dat gaat nu nog om grofweg 285 wateren. Hiermee zou een uiterst nauwkeurig verspreidingsbeeld worden verkregen. Dat geldt zowel voor de randen als het centrum van het verspreidingsgebied.

Aangezien op grond van de bekende informatie wordt aangenomen dat de grenzen van de verspreiding aan de zuid-, west- en noordrand alsook de belangrijkste voortplantingswateren bekend zijn, kan ook gekozen worden voor slechts een verfijning van het verspreidingsbeeld aan de oostrand van het gebied. Hier zijn immers met eDNA vier nieuwe wateren met Italiaanse kamsalamanders ontdekt, met verder naar het oosten (vrijwel) geen bemonsterde wateren. Dit geldt met name voor de drie nieuwe vindplaatsen in Vaassen. De nieuwe vindplek op de Tongerensche Heide is omgeven door negatief scorende wateren en ten noorden ervan ligt een water met genetisch zuivere inheemse kamsalamanders (Meilink *et al.*, 2013). De kans is dus reëel dat het gebied tussen Apeldoorn –Noord en Emst nog onontdekte vindplaatsen herbergt. Dit gebied is zeer waterrijk. Om hier een goed beeld van de verspreiding te krijgen is bemonstering van 50-80 aanvullende wateren nodig.



Figuur 3: Ligging van het zwaartepunt van de Italiaanse kamsalamander, wat betreft genetische zuiverheid.

De resultaten van het genetisch onderzoek van Meilink *et al.* (2013) gecombineerd met het recente inventariserend onderzoek (Bosman & van Delft, 2011; Hoogen & Crombaghs, 2012) en deze studie met eDNA, wijzen op een bolwerk van de Italiaanse kamsalamander. Dat omvat een gebied in het centrum van het onderzoeksgebied, met onder meer Noorderheide, Ruitersgat, Prinsenuil en Hoog-Soerensche Bossen (figuur 3). Hier bevinden zich zuivere populaties van de Italiaanse kamsalamander en een populatie met een grote mate van genetisch materiaal van deze soort. Veel van de populaties zijn ook individuentrijk. Ze vormen daarmee een groot risico voor hun omgeving. Indien tot bestrijding wordt overgegaan is het voor de hand liggend om juist bij deze wateren te beginnen met het uittesten en uitvoeren van bestrijdingsmaatregelen.

DANKWOORD

Wij bedanken alle terreinbeheerders en particulieren die toestemming gaven voor de bemonstering van hun wateren. Onze opdrachtgever Wiebe Lammers van de Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit, Team Invasieve Exoten bedanken we voor de prettige samenwerking en het in ons gestelde vertrouwen.

LITERATUUR

- Bogaerts, S., H. van Diepen & H. Karman, 2001. *Triturus carnifex*, een nieuwe exoot in Nederland. Italiaanse kamsalamanders op de Veluwe. RAVON 4(2): 25-30.
- Bogaerts, S., 2002. Italian crested newts, *Triturus carnifex*, on the Veluwe, Netherlands. Zeitschrift für Feldherpetologie 9 (2): 217-221.
- Bogaerts, S., 2009. Italiaanse kamsalamander *Triturus carifex*. In: Creemers, R.C.M. & J.J.C.W. van Delft (RAVON)(redactie), 2009. De amfibieën en reptielen van Nederland. Nederlandse Fauna 9. Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis, European Invertebrate Survey-Nederland, Leiden.
- Bosman, W & J. van Delft, 2011. Verspreiding van de Italiaanse kamsalamander in Nederland en mogelijkheden voor beheersing en eliminatie. Stichting RAVON, Nijmegen in opdracht van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit, Team Invasieve Exoten.
- Delft, J.J.C.W. van, A.M. Spitzen - van der Sluijs & J. Janse, 2012. Veldwerk ten behoeve van genetisch onderzoek inheemse en Italiaanse kamsalamanders op de Veluwe. Stichting RAVON i.o.v. De Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit, Team Invasieve Exoten.
- Delft, J.J.C.W. van, J.E. Herder & J. Janse, 2013. eDNA-primerontwikkeling en bemonstering van wateren ten behoeve van het vaststellen van de Italiaanse kamsalamander. Stichting RAVON i.o.v. De Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit, Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering, Team Invasieve Exoten.
- Herder, J.E., J. van Delft, E. Bellemain and A. Valentini, 2013. Environmental DNA krachtig gereedschap voor het monitoren van fauna. De Levende Natuur 114(3): 108-113.
- Hoogen, D. & B. Crombaghs, 2012. Verspreidingsonderzoek Italiaanse kamsalamander, 2012. Natuurbalans - Limes Divergens BV, Nijmegen.
- Meilink, W., J.W. Arntzen & B. Wielstra, 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.
- Thomsen, P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M.T.P. Gilbert, L. Orlando & E. Willerslev, 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molecular Ecology 21: 2565–2573.
- Vleut, I.J.J. & W. Bosman, 2005. Actuele verspreiding van de Italiaanse kamsalamander (*Triturus carnifex*) in Gelderland en een morfometrische vergelijking met de inheemse kamsalamander (*Triturus cristatus*). Rapport Stichting RAVON, Nijmegen.