

# Genetisch onderzoek kleine modderkruipers Nederland

Voorkomen *Cobitis taenia* en hybriden

Jelger Herder, Kees van Bochove en Jan Kranenbarg



# Genetisch onderzoek kleine modderkruipers Nederland

Voorkomen *Cobitis taenia* en hybriden

Jelger Herder, Kees van Bochove & Jan Kranenbarg



## Colofon

Rapportnummer:	2015-103
Datum uitgave:	31-03-2016
Titel:	Genetisch onderzoek kleine modderkruipers Nederland
Subtitel:	Voorkomen <i>Cobitis taenia</i> en hybriden
Wijze van citeren:	Herder, J.E., K. van Bochove & J. Kranenbarg 2016. Genetisch onderzoek kleine modderkruipers Nederland - Voorkomen <i>Cobitis taenia</i> en hybriden. Rapportnummer 2015-103, Stichting RAVON.
Samenstellers:	Jelger Herder, Kees van Bochove & Jan Kranenbarg
Foto's omslag:	Kleine modderkruiper en Broekse Wielen - Jelger Herder
Aantal pagina's incl. bijlagen:	35
Projectnummer:	2015-103
Projectleider:	Jelger Herder
Naam en adres opdrachtgever(s):	Jenneke Leferink, NWWA, Bureau Risicobeoordeling & Onderzoeksprogrammering (BuRO) Catharijnesingel 59 3511 GG Utrecht
Referentie opdrachtgever(s):	60004781

## Inhoud

Samenvatting:	5
1 Inleiding	7
1.1 Aanleiding	7
1.2 Onderzoeksvragen & hypothesen	9
2 Bekende Europese verspreiding van <i>Cobitis</i> hybriden	10
3 Onderzoeksopzet	12
3.1 Monsterlocaties in het veld	12
3.2 Verzamelen museumexemplaren	14
3.3 Genetische analyses	15
3.4 Extra gegevens eDNA metabarcoding	16
3.5 Onderzoek morfologische kenmerken	17
4 Resultaten	19
4.1 Resultaten genetische analyses	19
4.2 Resultaten morfologisch onderzoek	21
4.2.1 Geslachtsverhouding en Lengte	21
4.2.2 Morfologische verhoudingen: grootte en vorm staartvlek en kop	23
5 Discussie	27
5.1 Verspreiding <i>Cobitis taenia</i> en hybriden	27
5.2 Verhouding <i>Cobitis taenia</i> en hybriden	28
5.3 Morfologisch onderscheid tussen <i>Cobitis taenia</i> en hybriden	29
5.4 Mogelijke impact van hybriden	30
5.5 Ploïdie niveau	31
5.6 Herkomst hybriden in Nederland	31
6 Conclusies & aanbevelingen	33
6.1 Conclusies	33
6.2 Aanbevelingen	33
6.3 Vervolgonderzoek	34
7 Literatuur	35



## Samenvatting

### **Ontdekking hybride modderkruipers in Nederland**

Tot kort geleden werd gedacht dat in Nederland uit het geslacht *Cobitis* enkel de kleine modderkruiper (*Cobitis taenia*) voorkwam. In mei 2015 werd bij toeval, in het kader van DNA onderzoek door Datura, een kleine modderkruiper aangetroffen met mitochondriaal DNA van *Cobitis elongatoides*. Op basis van nucleair DNA bleek het te gaan om (*Cobitis taenia* X *elongatoides* X *tanaitica*). Om meer duidelijkheid te krijgen over de verspreiding van de hybride kleine modderkruipers in Nederland en de mogelijke gevaren voor verdringing van de inheemse kleine modderkruiper is een nader onderzoek uitgevoerd in opdracht van het Bureau Risicobeoordeling & Onderzoeksprogrammering (BuRO) van de NVWA . Binnen dit onderzoek zijn op 16 locaties in Nederland kleine modderkruipers afgenomen en is op basis van DNA-onderzoek bepaald of het *C. taenia* of hybriden betrof. Daarnaast zijn morfologische kenmerken opgemeten en is de geslachtsverhouding bepaald.

### **Klonale voorplanting**

De hybriden hebben een bijzondere vorm van voortplanting. De vrouwtjes klonen zichzelf. Hiervoor moeten ze met een mannetje van één van de oorspronkelijke oudersoorten paren. Het sperma van een oudersoort zet de ontwikkeling van een embryo in de eicel in gang, echter zonder dat er genetische uitwisseling plaats vindt. De nakomelingen van de hybriden zijn dus genetisch identiek aan hun moeder, en daardoor ook allemaal vrouwelijk.

### **Wat is de huidige verspreiding van de hybriden in Nederland?**

*Cobitis* hybriden (type *C. taenia* x *tanaitica* x *elongatoides*) blijken momenteel in een groot deel van Nederland voor te komen. In de regio's die een relatief grote mate van connectiviteit met grote rivieren en met elkaar hebben worden vrijwel overal hybriden aangetroffen. De hybriden waren echter afwezig op geïsoleerde locaties zoals Zeeuws Vlaanderen en de Drentse Aa).

### **Wanneer hebben hybriden modderkruipers zich in Nederland gevestigd?**

Er is DNA afgenomen bij in Naturalis aanwezige museumexemplaren van de kleine modderkruiper. Zodoende kon terug gekeken worden in de tijd. Op vijf middels museumexemplaren (1919-1982) onderzochte locaties werden uitsluitend pure kleine modderkruipers vastgesteld. Op twee locaties uit 1951 (poel langs de Maas) en 2007 (Wageningen) werden hybriden aangetroffen. Op enkele locaties bleken historisch pure kleine modderkruiper populaties voor te komen terwijl in het onderzoek uit 2015 bleek dat er inmiddels voornamelijk hybriden zitten. Dit duidt erop dat de hybriden zich waarschijnlijk relatief recent (100-150 jaar geleden) in Nederland gevestigd hebben. Ook de vondst van pure kleine modderkruipers in de Broekse Wielen wijst daarop. Dit Wiel is 200 jaar geleden ontstaan en sindsdien geïsoleerd. Mogelijk dat de hybriden onbedoeld vanuit Oost-Europa zijn meegekomen met vistransporten.

**Kunnen hybride modderkruipers in het veld herkend worden?**

Morfologisch gezien bleken hybriden en pure kleine modderkruipers nauwelijks van elkaar te onderscheiden. De maximale lengte bleek het beste morfologische kenmerk. De beste manier om, los van genetisch onderzoek, vast te stellen of er hybriden aanwezig zijn is het vaststellen van de geslachtsverhouding (bij populaties met hybriden ligt de geslachtsverhouding veelal boven de 10 vrouwtjes op 1 mannetje).

**Mogelijke impact van hybriden**

De hybriden zijn voor de voortplanting afhankelijk van de kleine modderkruiper. Verdringing van de kleine modderkruiper is dus niet mogelijk. Wel staat vast dat de hybriden zeer dominant kunnen worden over de pure kleine modderkruipers. Dit zou de kwetsbaarheid van populaties voor calamiteiten kunnen vergroten omdat het effectief aantal voortplantende dieren zeer laag is. Het is daarom belangrijk om de zuivere populaties van kleine modderkruiper te behouden.

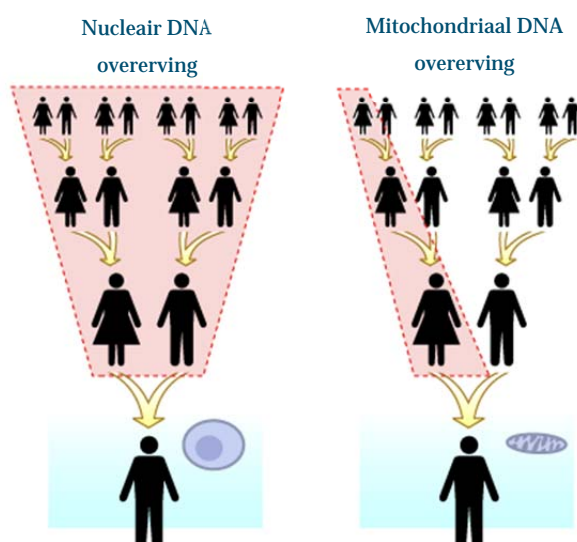
# 1 Inleiding

## 1.1 Aanleiding

Tot kort geleden werd gedacht dat in Nederland uit het geslacht *Cobitis* enkel de kleine modderkruiper (*Cobitis taenia*) voorkwam. De kleine modderkruiper staat vermeld in bijlage II van de EG-Habitatrichtlijn waardoor Nederland een instandhoudings- en monitoringsverplichting heeft voor deze soort. In mei 2015 is er echter bij toeval (in het kader van DNA onderzoek van *Datura*) bij Wageningen een kleine modderkruiper aangetroffen met mitochondriaal DNA van *Cobitis elongatoides*. Vervolgens zijn nog twee eerder verzamelde kleine modderkruipers geanalyseerd. Een exemplaar uit de Hoeksche Waard en een exemplaar uit Delft. Het dier uit de Hoeksche waard bleek ook mitochondriaal DNA van *Cobitis elongatoides* te hebben, het dier uit Delft had mitochondriaal DNA van de inheemse kleine modderkruiper (*Cobitis taenia*). Mitochondriaal DNA is enkel via de moeder overerfbaar (zie figuur 1), hybridisatie is daarom niet waar te nemen enkel op basis van mitochondriaal DNA. Aanvullend is er daarom gekeken naar nucleair DNA van de 3 dieren. Hiermee is het wel mogelijk om de oudersoorten van hybriden vast te stellen. Tabel 1 geeft de uitkomsten van die analyses.

Tabel 1: uitkomsten eerste genetische analyses (voorafgaand aan onderliggend project)

Locatie	Mitochondrial DNA	Nucleair DNA
Wageningen	<i>Cobitis elongatoides</i>	-
Hoeksche Waard	<i>Cobitis elongatoides</i>	Hybride: <i>Cobitis taenia</i> X <i>elongatoides</i> X <i>tanaitica</i> .
Delft	<i>Cobitis taenia</i>	<i>Cobitis taenia</i>



Figuur 1: nucleair DNA (kern DNA) wordt overerft via de vader en de moeder en bestaat daardoor uit een combinatie van het DNA van de vader en de moeder. Mitochondriaal DNA daarentegen wordt enkel overerft via de vrouwelijke lijn en is daarom identiek aan de moeder (en zegt niets over de vader).



Op basis van de hierboven beschreven recente informatie blijkt dat er naast de kleine modderkruiper (*Cobitis taenia*) in Nederland ook sprake is van het voorkomen van hybride vormen met andere *Cobitis* soorten. Het is onduidelijk hoe wijd verspreid deze hybriden in Nederland voorkomen en of er gevaar is voor verdringing van de inheemse kleine modderkruiper. Hiernaast is het belangrijk om te weten of kleine modderkruiper en de hybriden op basis van morfologische kenmerken van elkaar onderscheiden kunnen worden. Om hier inzicht in te verkrijgen heeft het Bureau Risicobeoordeling & Onderzoeksprogrammering (BuRO) van de NVWA aan RAVON en Datura verzocht nader onderzoek te doen.

### **Belang van het onderzoek**

De kleine modderkruiper (*C. taenia*) staat vermeld in bijlage II van de EG-Habitatrichtlijn. Nederland heeft daarom instandhoudings- en monitoringsverplichting voor deze soort. De trend van de laatste jaren was positief maar het is nu onduidelijk of deze positieve trend inheemse kleine modderkruipers betrof of dat er sprake is van een onopgemerkte invasie van hybriden.

### **Kader 1: ontstaan en bijzondere voortplantingswijze hybriden**

De hybride kleine modderkruipers zijn oorspronkelijk ontstaan uit kruisingen tussen de oudersoorten *C. elongatoides*, *C. tanaitica* en *C. taenia*. Deze kruisingen vonden plaats in Oost- en Zuidoost Europa waar de oudersoorten direct met elkaar in contact staan. De mannetjes van deze hybriden zijn steriel en kunnen zich dus niet voortplanten. De vrouwtjes zijn echter in staat zichzelf te klonen. Hiervoor hebben ze echter een spermadonor nodig van één van de oudersoorten (in Nederland dus van *C. taenia*). Het sperma zet de ontwikkeling van een embryo in de eicel in gang zonder dat er genetische uitwisseling plaats vindt. De nakomelingen zijn dus genetisch identiek aan hun moeder, de hybride. Op deze manier hebben de hybriden zich kunnen verplaatsen naar regio's waar slechts 1 van de oudersoorten voorkomt. In deze regio's komen geen eerste generatie hybriden voor omdat directe kruising tussen oudersoorten niet mogelijk zijn. Alle hybriden zijn dan vrouwelijk en ontstaan door zichzelf te klonen. Deze hybriden komen in zogenaamde hybride complexen gezamenlijk voor met één van de oudersoorten. Deze hybride complexen hebben veelal een sterk door vrouwtjes gedomineerde geslachtsverhouding (de enige mannetjes binnen zo een complex zijn namelijk die van de pure *C. taenia*).



*De kleine modderkruiper is een kleine langgerekte bodemvis. foto Jelger Herder*

## 1.2 Onderzoeksvragen & hypothesen

1. Wat is de huidige verspreiding van de inheemse kleine modderkruiper en die van de hybriden en welke soorten hybriden zijn er?
2. In welke verhoudingen komen hybriden en inheemse kleine modderkruipers naast elkaar voor?
3. Zijn er morfologische kenmerken die in het veld te gebruiken zijn om de inheemse kleine modderkruiper van de hybriden te onderscheiden?
4. Zijn de hybriden invasief?
5. Als de hybriden invasief zijn: geeft het ploëdie niveau dan een mogelijke verklaring voor de mate van invasiviteit van de hybriden die ogenschijnlijk gelijk zijn aan de pure kleine modderkruiper? Het ploëdie niveau kan namelijk bijdragen aan eventuele invasiviteit via het gen dosis effect. Dit houdt in dat triploëde en tetraploëde dieren concurrentiekrachtiger worden doordat ze groter kunnen worden dan de zuivere diploëde dieren (Salmon, 2005).

Met betrekking tot de herkomst van de hybriden kleine modderkruipers in Nederland zijn er twee voor de hand liggende mogelijkheden die middels de onderzoeksresultaten getoetst zijn.

### **Hypothese 1: verspreiding van hybriden na laatste ijstijd**

De eerste hypothese is dat de hybriden zich reeds sinds de laatste ijstijd over Noordwest Europa verspreid hebben samen met *C. taenia* zelf (de inheemse kleine modderkruiper). Hierbij zou dan eerst de pure kleine modderkruiper (*C. taenia*) zich vanuit een refugium ten noorden van de Zwarte Zee over Noordwest Europa hebben verspreid gevolgd door de hybriden (nota bene: zie kader 1 voor de bijzondere voortplanting van de hybriden). Mocht deze hypothese juist zijn dan is het aannemelijk dat ook de hybriden reeds duizenden jaren in Nederland aanwezig zijn en zou het complete *Cobitis* hybride complex als inheems beschouwd moeten worden.

### **Hypothese 2: recentere verspreiding van hybriden**

De tweede hypothese is dat de hybriden zich pas recenter hebben verspreid. Bijvoorbeeld na de opening van het Main-Donaukanaal waardoor soorten vanuit het stroomgebied van de Donau in het stroomgebied van de Rijn konden komen. Of onbedoeld via vistransporten, viskweek of ballastwater. Deze hypothese wordt ondersteund doordat de verspreiding van het type hybriden dat in de Rijn voorkomt lijkt op de verspreiding van een aantal invasieve Ponto Caspische grondels die het Rijnsysteem recentelijk gekoloniseerd hebben (Spikmans et al., 2010). Deze uitbreiding is dan onopgemerkt gebleven omdat de hybriden sterk lijken op de inheemse kleine modderkruiper. Een voorbeeld van een eerdere onopgemerkte invasie is die van de witvingrondel die lange tijd voor riviergrondel werd aangezien (Spikmans et al., 2011). Mocht deze hypothese juist blijken dan zouden de hybriden als exoten gezien moeten worden.

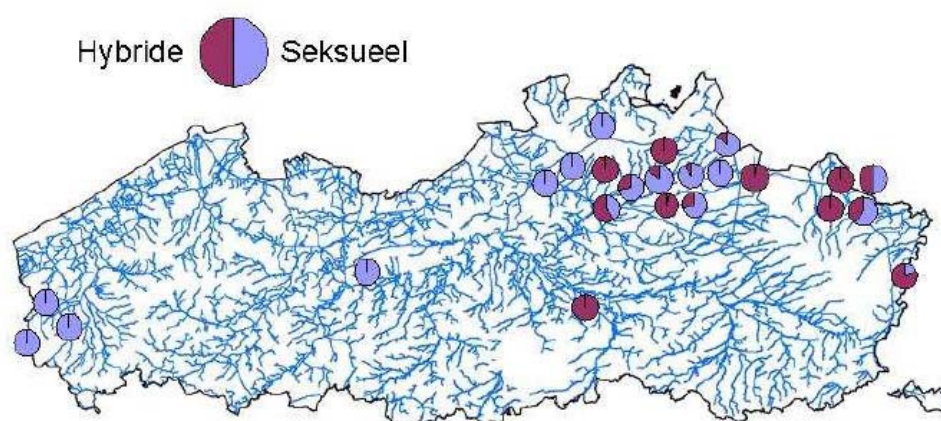
## 2 Bekende Europese verspreiding van *Cobitis* hybriden

Janko et al., (2007) hebben de verspreiding van hybride kleine modderkruipers in Europa onderzocht (figuur 2). Twee soorten hybriden blijken al in Duitsland en België te zijn aangetroffen: *C. taenia* x *elongatoides* x *tanaitica* en *C. elongatoides* x *taenia*. De eerst genoemde hybride vorm is recentelijk aangetroffen in Nederland, de tweede vorm nog niet.



**Figuur 2:** geografische verspreiding van de verschillende hybriden in het *C. taenia* hybride complex. Rood-gele cirkels tonen hybriden tussen *C. elongatoides* en *C. taenia*, blauw-gele cirkels tonen hybriden tussen *C. elongatoides* en *C. tanaitica*, rood-blauw-gele cirkels tonen hybriden tussen *C. elongatoides*, *C. taenia* en *C. tanaitica* en rood-zwart-gele cirkels tonen hybriden tussen *C. elongatoides* en *C. taenia* en *C. taurica* (Bron Janko et al., 2007).

In 2007 is in Vlaanderen eveneens een gedetailleerde studie uitgevoerd naar de genetische diversiteit van *C. taenia* en hybride kleine modderkruipers (Gelas *et al.*, 2007). Hierbij bleek overigens ook een locatie uit Nederland te zijn meegenomen: de Grootte Molenbeek in Limburg. De meeste hybride kleine modderkruipers in Vlaanderen droegen het mitochondriaal haplotype van *C. elongatoides* (42 individuen). Een haplotype is een unieke volgorde van basenparen op een bepaald fragment, individuen met hetzelfde haplotype voor een onderzocht fragment zijn nauwer aan elkaar verwant. Het haplotype zegt hier dus ook iets over de vrouwelijke oudersoort van de hybride. Er werden echter ook hybriden met het haplotype van *C. taenia* (5 individuen) aangetroffen waaronder individuen uit de Grootte Molenbeek in Nederland. Figuur 3 geeft een overzicht van de resultaten uit Vlaanderen waarbij het opvallend is dat West Vlaanderen niet bereikt lijkt te zijn door de hybriden.



*Figuur 3: locaties met seksueel voortplantende populaties (= pure kleine modderkruiper Cobitis taenia) en locaties met hybriden (kaart overgenomen uit Gelas et al. 2007).*

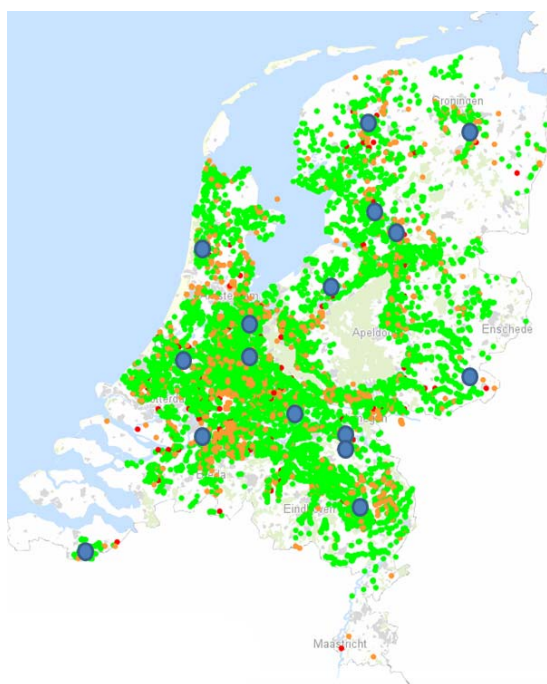
### 3 Onderzoeksopzet

Om te bepalen in hoeverre hybride kleine modderkruiper voorkomen zijn DNA monsters in wateren met verschillende connectiviteit verspreid over Nederland verzameld. Ook is er DNA afgenomen bij de in musea aanwezige exemplaren van de soort. Van de onderzochte populaties zijn tevens de morfologische kenmerken en de geslachtsverhouding bepaald. Hieronder wordt de onderzoeksopzet in detail beschreven.

#### 3.1 Monsterlocaties in het veld

Binnen Nederland zijn 16 locaties bemonsterd op kleine modderkruipers (zie figuur 5 en tabel 2). Bij de selectie van de monsterlocaties is voor een representatieve steekproef rekening gehouden met de volgende punten:

- Voorkomen/verspreiding van kleine modderkruiper voor 1992. Als hypothese 2 (kolonisatie van Nederland door hybriden via Main-Donau kanaal) juist is kan van waarnemingen van voor 1992 verwacht worden dat dit de pure kleine modderkruiper betreft.
- Verspreiding van de marmergrondel: deze soort is invasief en binnen gekomen via het Main-Donau kanaal en kan mogelijk indicatief zijn voor de verspreiding van de hybriden als hypothese 2 juist is.
- Isolatie: er zijn gebieden geselecteerd die geïsoleerd liggen waarbij het aannemelijk is dat deze niet bereikt konden worden via een eventuele invasie via het Main-Donau kanaal. Voorbeelden zijn de Drentse Aa, Zeeuws Vlaanderen en een geïsoleerde wiel in een natuurgebied in de buurt van de Maas. Als hypothese 2 juist is zouden in dergelijke wateren geen hybriden aanwezig zijn.
- Evenwichtige spreiding van de monsterlocaties over Nederland.



*Figuur 5: kaart ligging monsterlocaties. De groene stippen geven recente waarnemingen (laatste 10 jaar) van kleine modderkruipers en de oranje stippen oudere waarnemingen. De grote donkerblauwe cirkels zijn de monsterlocaties.*



Tabel 2: monsterlocaties, habitat en datum bemonstering.

Locatie	X-coördinaat	Y-coördinaat	Watertype	Datum
Castricum	107565	508007	Sloot/vaart	3-10-2015
Nieuwegein	136126	446888	Sloot/vaart	5-10-2015
Muzel (Friesland)	181824	568032	Sloot/vaart	8-10-2015
Broekse Wielen	181080	415607	Afgesloten wiel	9-10-2015
Hertogswetering	176843	418631	Sloot/vaart	9-10-2015
Loosdrecht	137243	467709	Sloot/vaart	12-10-2015
Hoog Zwaluwe	107853	408832	Sloot/vaart	14-10-2015
Drentse Aa	239272	562232	Beek	15-10-2015
Zeeuws Vlaanderen	48257	361488	Sloot/vaart	18-10-2015
Kaweische loop	181343	388896	Sloot/vaart	19-10-2015
Goordiek - Corle	241242	442275	Sloot/vaart	20-10-2015
Zoeterwoude	94778	459245	Sloot/vaart	22-10-2015
Groot Salland	203645	518952	Sloot/vaart	3-11-2015
Flevoland (NOP)	192438	526443	Sloot/vaart	12-11-2015
Flevoland zuid	171601	489824	Sloot/vaart	11-11-2015
Tiel	157559	438260	Sloot/vaart	27-11-2015

Met betrekking tot de genetische analyses (zie 3.3) zijn op alle onderzoekslocaties steeds de twee meest uiteenlopende dieren per locatie gekozen om zo de kans op het goed in beeld brengen van hybriden en inheemse kleine modderkruipers te optimaliseren. Het ging hierbij om:

- Het grootste vrouwelijke dier van de populatie. Hybriden zijn per definitie vrouwelijk (zie kader 1), daarnaast kunnen hybriden groter kunnen worden dan inheemse kleine modderkruipers. Het grootste vrouwelijke dier geeft daarom de maximale kans op het aantreffen van hybriden.
- Een mannelijk dier. Aangezien er geen mannelijke hybriden zijn (zie kader 1) zou dit om een pure kleine modderkruiper moeten gaan. Indien op een locatie enkel vrouwtjes gevangen werden is gekozen voor een klein vrouwelijk dier met een kleine staartvlek (hybriden hebben mogelijk een grotere staartvlek).

Het onderscheid tussen mannelijke en vrouwelijke dieren is gemaakt op basis van de borstvin (zie paragraaf 3.5).

Binnen het project was er budget om op twee locaties 10 dieren genetisch te bemonsteren met behulp van swaps (diepteanalyse). Bij de keuze van deze twee locaties is getracht een locatie te kiezen die geïsoleerd ligt van de grote rivieren, hiervoor is de locatie in Zeeuws Vlaanderen gekozen. De andere locatie is gekozen op een plaats die niet geïsoleerd ligt van de grote rivieren. Om hier zeker van te zijn is er gekozen voor een water dat gekoloniseerd is door de marmergrondel, hiervoor is de locatie in de Noordoostpolder gekozen.

De kleine modderkruipers zijn gevangen met een RAVON-schepnet (70 x 55 cm groot schepnet), elektrovisserij of in combinatie met het baggeren of schonen van sloten waarbij veel kleine modderkruipers op de kant terecht komen en zo eenvoudig te verzamelen zijn. Per locatie is getracht minimaal 25 kleine modderkruipers met een minimale lengte van 40 mm te vangen.

### 3.2 Verzamelen museumexemplaren

Om inzicht te krijgen in het historisch voorkomen van de kleine modderkruiper en hybriden in Nederland is onderzoek gedaan in de collectie van Naturalis. Wanneer hiertussen hybriden worden gevonden geeft dat informatie over hoe lang de hybriden reeds minimaal in Nederland in Nederland aanwezig zijn. Er is formeel toestemming verkregen en op 9 december 2015 zijn er DNA samples verzameld (weefselmonsters) in de collectie van Naturalis.

Bij het samplen van dieren uit de collectie is de keuze gemaakt op basis van de volgende factoren:

- Aantal dieren in een pot: enkel bij een groter aantal dieren in een pot is het mogelijk iets te zeggen over de geslachtsverhouding in het verleden.
- Ouderdom: er is rekening gehouden met de ouderdom van de dieren in de potten om zo maximaal terug te kunnen kijken in het verleden.
- Geslacht: wanneer er slechts 1 of enkele dieren in een pot zaten zijn enkel vrouwtjes bemonsterd. Dit omdat hybriden per definitie vrouwtjes zijn (zie kader 1) en zo de kans vergroot wordt dat er een eventueel aanwezige hybride bemonsterd wordt.
- Geografische spreiding: de monsters zijn zo gekozen dat er een maximale spreiding van historische samples over Nederland was.

Ter plaatste bleek dat in een aantal potten enkel vrouwtjes zaten of zulke kleine individuen dat het geslacht niet te bepalen was en/of ze niet waren te bemonsteren zonder het exemplaar grof te beschadigen. Uiteindelijk bleek het mogelijk van 6 historische locaties monsters te verzamelen waarbij van 5 locaties 1 DNA sample verzameld is en van 1 locatie 6 DNA samples (Zoeterwoude). Daarnaast zijn er ook nog 2 genetische samples verzameld uit een pot met recent (2007) verzamelde dieren uit Wageningen. Doordat in deze pot 17 exemplaren zaten was het ook mogelijk hiervan een goede bepaling te doen van de geslachtsverhouding.

Tabel 3: bemonsterde museumexemplaren (*Naturalis*). \* van de 6 geanalyseerde dieren uit Zoeterwoude lukte het van 2 dieren niet meer om het DNA te analyseren (te oud).

Locatie	X-coördinaat	Y-coördinaat	Aantal dieren DNA geanalyseerd	Datum	Geslachtsverhouding	Verzameld door
Lang Weer	177	552	1	1919	3 vrouw - 0 man	H.C. Redeke
Maastricht	176	315	2	1951	2 vrouw - 0 man	Arnout Broeder
Kerkdriel	148	420	1	1982	1 vrouw	P.P.J. Versteegh
Bots hol	122	474	1	1944	1 vrouw	ZMA
Wageningen	171	444	2	2007	8 vrouw - 9 man	Menno Soes
Zoeterwoude	94	459	6*	1919	6 vrouw - 4 man	A. de Heer
Naardermeer	137	478	1	1928	2 vrouw - 0 man	ZMA

### 3.3 Genetische analyses

Door Datura is middels genetische analyses gekeken naar:

- Mitochondriaal DNA → Mitochondriaal DNA erft over via de vrouwelijke lijn. Mitochondriaal DNA wordt dus ook in seksuele populaties klonaal overgeërfd. Ondanks dat het 1 op 1 wordt doorgegeven door de moeder zijn er in het verleden mutaties ontstaan waardoor er verschillende mitochondriale haplotypen zijn ontstaan. Dus ook verschillende populaties van dezelfde soort kunnen kleine verschillen in het mitochondriaal DNA hebben.
- Nucleaire merkers → Op basis van nucleair DNA kan vastgesteld worden van welke modderkruipersoorten er een kopie in het genoom aanwezig is. Bij zuivere individuen van *C. taenia* zijn uitsluitend twee kopieën van het nucleair genoom van *C. taenia* aanwezig. Bij de hybride modderkruipers zijn één of meerdere kopieën van het nucleair genoom aanwezig van twee of drie verschillende oudersoorten. Voor de analyse is gebruik gemaakt van het DNA dat codeert voor het '40S ribosomaal eiwit, S7 intron 1' en de 'ATP synthase beta subunit' (Janko *et al.* 2007). Deze genen vertonen veel genetische variatie tussen soorten, maar weinig variatie binnen de soort. Dat maakt deze genen geschikt voor het achterhalen van de oudersoorten waaruit de hybride onderstaan is.
- Van dood verzamelde individuen (o.a. op de kant beland tijdens baggeren) zijn weefselmonsters onderzocht doormiddel van Flow Cytometry. Door middel van deze techniek kan vast gesteld worden wat het polyploïde niveau van het individu is.



Triploïde en tetraploïde dieren zijn mogelijk concurrentiekrachtiger door het gen-dose effect (zie 1.2)

- Tenslotte is het mitochondriale 12s gen gesequenced van 4 hybride modderkruipers en 4 pure kleine modderkruipers. Dit gen wordt gebruikt door SPYGEN en Datura voor metabarcoding van vissen. Met deze techniek kan op basis van eDNA afkomstig uit watermonsters een soortenlijst gegenereerd worden van de voorkomende vissoorten. Op basis van de 12s sequenties bleek dat het mogelijk is om hybriden van pure kleine modderkruipers te onderscheiden op basis van eDNA metabarcoding (zie paragraaf 3.4).

Voor het sequencen van de nucleaire en mitochondriale genen is gebruikt gemaakt van PCR. Met marker-specifieke primers kon gericht het fragment doel DNA vermeerderd worden. Dit vermeerderde DNA is vervolgens gesequenced door middel van Sanger sequencing. Op basis van de verkregen DNA sequenties konden de mitochondriale haplotypen en de oudersoorten vastgesteld worden.

Het DNA is non-invasief afgenomen met swabs. Het nadeel van het gebruik van swabs is dat ook andere organismen bemonsterd worden, zoals bacteriën (o.a. *Pseudomonas*) die aanwezig zijn op de huid. Datura heeft daarom nieuwe, soort-specifieke primers ontwikkeld waarmee uitsluitend DNA van modderkruipers vermeerderd wordt. Zodoende kon voorkomen worden dat er ruis in de verkregen DNA sequenties ontstond door de aanwezigheid van bacteriën.

### 3.4 Extra gegevens eDNA metabarcoding

In 2015 heeft RAVON i.s.m. de STOWA en 11 waterschappen een grootschalig onderzoek uitgevoerd naar de toepassing van environmental DNA metabarcoding voor het in kaart brengen van de visgemeenschap. De methode is gebaseerd op het feit dat soorten die in het water leven DNA achterlaten via huidcellen, feces en urine. Door dit DNA te verzamelen in watermonsters en te analyseren in het lab kan de aanwezigheid van een soort worden vastgesteld. Bij eDNA-metabarcoding wordt met behulp van universele primers en PCR al het DNA van vissen vermeerderd. Vervolgens worden de vermeerderde fragmenten via Next Generation Sequencing uitgelezen en gematched met een referentiedatabase. Op basis hiervan kan een soortenlijst gegenereerd worden (Valentini *et al.*, 2016). Het bleek mogelijk om de kleine modderkruiper (*C. taenia*) te onderscheiden van de hybriden met mitochondriale haplotype van *C. taenia x elongatoides x tanaitica*. Hierdoor is er aanvullend op het onderzoek vanuit BuRO informatie over het voorkomen van hybriden beschikbaar gekomen van 26 locaties (van de in totaal 55 met eDNA metabarcoding bemonsterde locaties). Bij een vergelijkbaar eDNA-metabarcoding project van Datura werd eveneens op 1 van de 5 locaties eDNA van een hybride modderkruipers gedetecteerd. Deze gegevens zijn ook verwerkt in onderhavig rapport.

### 3.5 Onderzoek morfologische kenmerken

Van iedere populatie zijn van alle aangetroffen dieren de lengte en het geslacht bepaald. Vanaf 4 cm groot zijn mannetjes herkenbaar aan een verdikte schub op hun borstvinnen, het zogenaamde 'schild van Canestrini'. Daarnaast zijn 25 voor de populatie representatieve dieren gefotografeerd. Vanaf de foto's is de grootte van de kop en staartvlek t.o.v. de lengte van het hele dier bepaald. Oorspronkelijk was het ook een idee om naar het vlekkenpatroon te kijken, hier is van afgezien omdat in de praktijk bleek dat het type ondergrond waarop de kleine modderkruipers gevangen werden zeer bepalend was voor (de contrastrijkheid van) hun vlekkenpatroon. Het vlekkenpatroon lijkt in de praktijk geen bruikbaar kenmerk.



*Figuur 5: Mannetjes zijn herkenbaar aan de verdikte schub op de borstvin.*

#### **Geslachtsverhouding**

Middels de geslachtsbepaling is het mogelijk de geslachtsverhouding tussen mannetjes en vrouwtjes voor een populatie te berekenen. Deze geeft een indicatie voor de aanwezigheid van hybriden. Aangezien hybriden altijd vrouwelijk zijn (zie kader 1) is een scheve geslachtsverhouding met (veel) meer vrouwtjes dan mannetjes te verwachten in populaties met hybriden (bijvoorbeeld 1:9). In populaties zonder hybriden is een normale geslachtsverhouding te verwachten in de buurt van 1:1.

#### **Lengte**

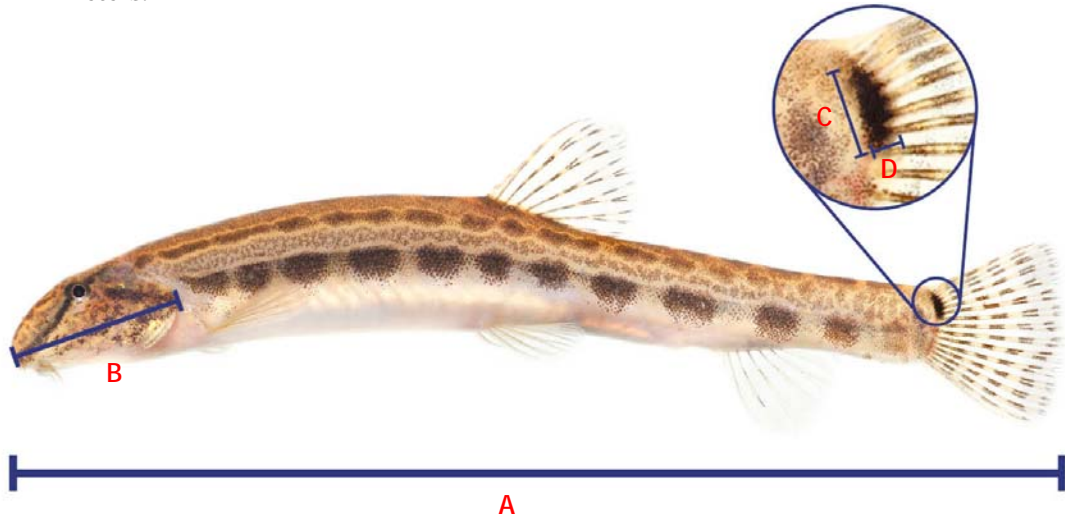
Uit de literatuur is bekend dat hybriden groter kunnen worden dan de pure kleine modderkruiper. Door de dieren op te meten is onderzocht of er mogelijk op basis van lengte uitspraken kan worden gedaan over de aanwezigheid van hybriden. Bijvoorbeeld wanneer blijkt dat inheemse kleine modderkruipers nooit boven een bepaalde lengte uitgroeien en hybriden wel dan kan deze grens gebruikt worden als onderscheidend kenmerk voor de aanwezigheid van hybriden.

#### **Morfologische verhoudingen: grootte en vorm staartvlek en kop**

In de literatuur wordt vermeld dat oudersoorten en dus mogelijk ook de hybriden een grotere staartvlek hebben dan de pure kleine modderkruipers. Door de grootte van de staartvlek (breedte en hoogte) ten opzichte van de lichaamslengte te bepalen kan gekeken worden of dit een bruikbaar kenmerk is voor determinatie in het veld. Ook is er gekeken naar de vorm van de staartvlek door de hoogte van de staartvlek te delen door de breedte. Tot slot is gekeken naar de relatieve grootte van de kop (lichaamslengte/lengte kop). Deze

maat is ook meegenomen omdat gedurende het onderzoek het gevoelsmatig leek dat hybriden een andere vorm kop hadden.

De maten zijn zeer nauwkeurig opgemeten door de dieren in een aquarium te plaatsen en voorzichtig met een spons tegen de ruit te drukken zodat ze in 1 vlak lagen. Met een meetlat is de lengte in millimeters bepaald. Daarna is van ieder dier een hoge resolutie foto gemaakt. Vervolgens is in Photoshop met het liniaal gereedschap gemeten hoeveel pixels de verschillende maten (zie figuur 5) waren. Via de lichaamslengte die zowel in millimeters in het veld als in pixels in Photoshop is gemeten is de omrekenfactor bepaald voor pixels naar millimeter. Daarmee zijn alle in pixels gemeten maten omgezet naar millimeters.



*Figuur 5: gemeten lengtematen modderkruiper. A is de totale lichaamslengte, B is de lengte van de kop (snuut tot punt kieuwdeksel), C is de hoogte van de staartvlek en D is de breedte van de staartvlek.*

Er zijn statistische analyses gedaan met enkel via DNA gecheckte dieren en los daarvan met alle vrouwelijke dieren waarbij de niet genetisch gecheckte vrouwelijke dieren zijn toegewezen tot hybriden of *C. taenia* op basis van de uitkomst van de wel op DNA gecheckte dieren uit de populatie:

- Enkel metingen waarvan de oudersoort met zekerheid was vastgesteld middels de DNA analyses. Hierbinnen zijn drie subgroepen vergeleken
  - Via DNA bevestigde *C. taenia* (man + vrouw samen)
  - Via DNA bevestigde *C. taenia* (enkel vrouwtjes)
  - Via DNA bevestigde Hybriden (zijn altijd vrouwtjes)
- Alle metingen van vrouwtjes, dus ook die van individuen die niet genetisch gecheckt zijn. Er is gekozen om enkel te kijken naar de vrouwtjes omdat er bij de hybriden geen mannetjes voorkomen. Hiermee wordt voorkomen dat eventueel geslacht specifieke morfologische kenmerken de uitkomst beïnvloeden. In deze vergelijking zijn individuen van een populatie toegewezen aan *C. taenia* als alle middels DNA gecheckte individuen binnen de populatie tot *C. taenia* behoorden. De aanname daarbij is dan dat de hele populatie puur is. De vrouwtjes uit populaties waarbinnen dus hybriden zijn aangetroffen middels DNA onderzoek zijn toegewezen aan het Hybride complex. Dit Hybride complex bestaat voornamelijk uit hybriden maar zal naar verwachting ook enkele vrouwtjes van *C. taenia* bevatten (let op: mannetjes zijn buiten deze analyse gelaten).

## 4 Resultaten

### 4.1 Resultaten genetische analyses

De resultaten van de genetische analyses van de in het veld en het museum verzamelde DNA monsters zijn gezamenlijk met de resultaten van de eDNA metabarcoding studie weergegeven in figuur 6. Hieronder worden ze besproken.

#### **In het veld verzamelde monsters**

De in 2015 bemonsterde populaties staan met ronde stippen weergegeven in figuur 6. De pure kleine modderkruiper populaties werden aangetroffen op de geïsoleerde locaties Drentse Aa, Zeeuw Vlaanderen en de Broekse Wielen (geïsoleerd Wiel ongeveer 200 jaar geleden ontstaan na een dijkdoorbraak bij de Maas). Daarnaast werden ook pure kleine modderkruipers aangetroffen in minder geïsoleerde locaties zoals in Noord-Holland bij Castricum en in Flevoland.

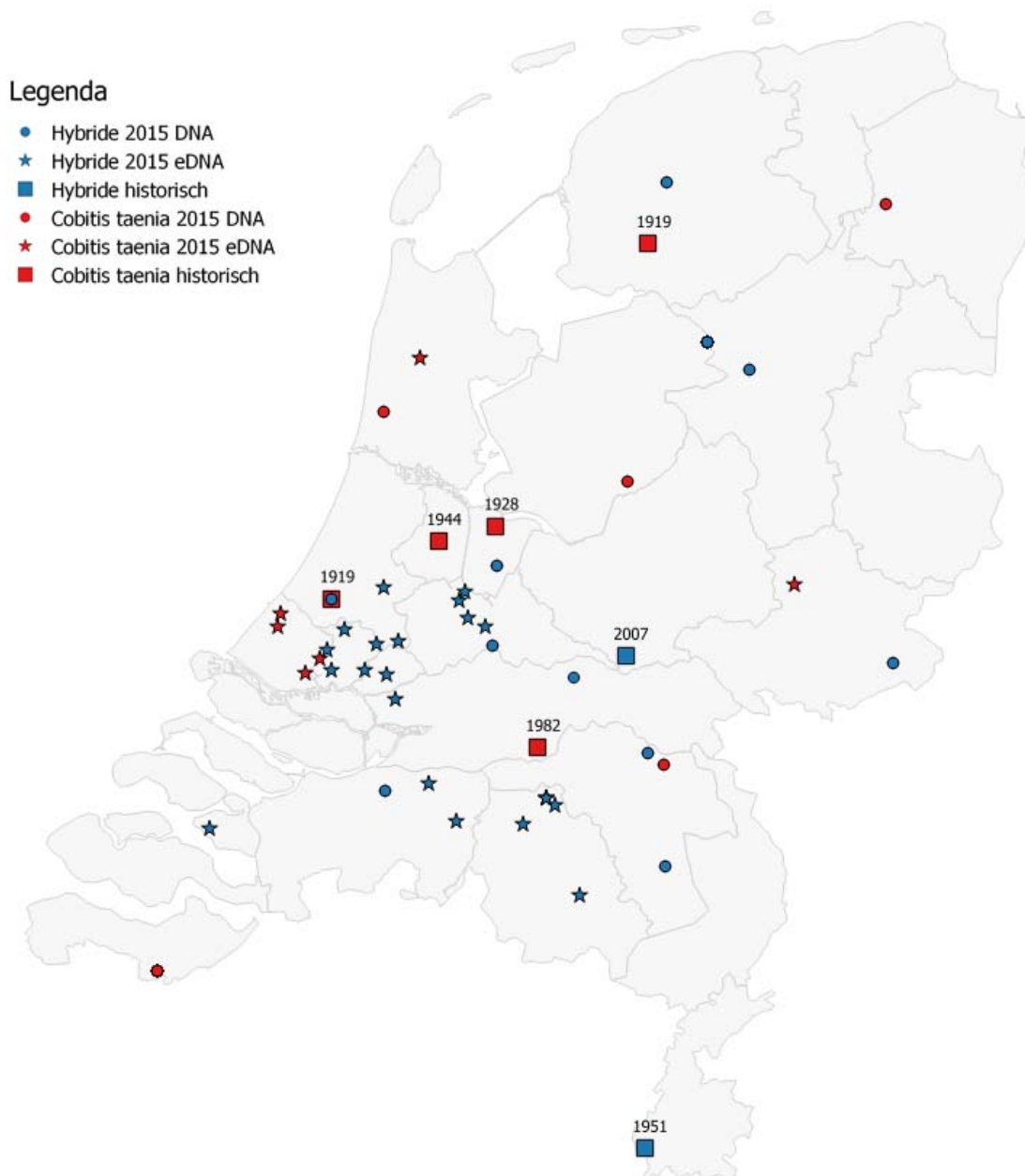
De populaties met hybriden (complex) werden aangetroffen in het rivierengebied en daarmee in verbinding staande locaties tot aan Friesland toe. In het Goordiek bij Corle werden ook hybriden aangetroffen. Deze locatie ligt geïsoleerd van de grote rivieren door meerdere stuwen (het betreft een afwatering van het Korenburgerveen).

#### **Extra gegevens eDNA metabarcoding**

De resultaten uit het in 2015 uitgevoerde eDNA metabarcoding onderzoek staan met kruisjes weergegeven in figuur 6. De pure kleine modderkruiper populaties werden aangetroffen op de meer geïsoleerde locaties in het Westen van Nederland (in en rondom Den Haag) en Noord-Holland (Broek op Langedijk). Daarnaast werd in de Berkel nabij Zutphen een pure populatie aangetroffen. De Berkel is pas onlangs vismigreerbaar gemaakt vanuit de IJssel.

#### **Monsters van museumexemplaren**

De resultaten van de DNA analyses van de museumexemplaren staan in figuur 6 weergegeven met vierkanten met daarnaast het jaartal waarop de locatie bemonsterd is. Op dieren van twee locaties na, bleken alle geanalyseerde individuen pure kleine modderkruiper te zijn. Ook de populatie bij Zoeterwoude bestond in 1919 nog uit pure kleine modderkruipers terwijl er in 2015 bij het veldonderzoek voornamelijk hybriden werden aangetroffen. De locatie bij Wageningen stamt uit 2007 en is daarmee meer recent. Hier werd in 2007 reeds een hybride aangetoond ondanks dat de geslachtsverhouding in de pot min of meer gelijk was en daarmee meer wees op een pure populatie (zie tabel 3). Op een locatie bij Maastricht (poel langs de Maas) werden twee hybriden aangetoond uit 1951. Daarmee komt vast te staan dat de hybriden in ieder geval al sinds 1951 in Nederland voorkomen.



*Figuur 6: resultaten genetische analyses: de kleur geeft aan of er hybriden (blauw) of pure kleine modderkruipers (rood) zijn aangetroffen. De vorm van de stippen geeft aan vanuit welke analyse de gegevens komen. De ronde stippen zijn afkomstig uit het veldonderzoek uit 2015, de sterretjes zijn afkomstig uit de eDNA metabarcoding studie en de vierkanten zijn afkomstig van de analyses van de museum exemplaren uit Naturalis (met daarnaast het jaartal van verzamelen).*

## 4.2 Resultaten morfologisch onderzoek

### 4.2.1 Geslachtsverhouding en Lengte

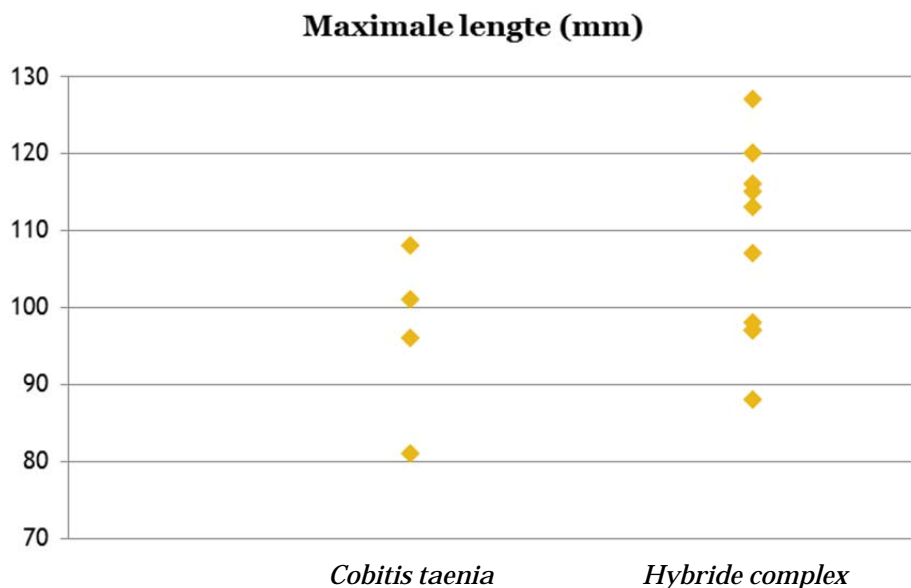
Tabel 4 geeft een overzicht van de verschillende verzamelde en gemeten variabelen. Per locatie wordt het totaal aantal dieren gegeven, het aantal mannetjes, het aantal vrouwtjes, de geslachtsverhouding (= #vrouw/#man). Daarnaast worden de maximale lengte en gemiddelde lengte binnen een populatie in millimeter gegeven. In de laatste drie kolommen is te zien van hoeveel dieren per geslacht middels DNA analyse de soort is vastgesteld. De laatste kolom geeft de inschatting of een populatie uit pure *C. taenia* bestaat of uit een Hybride complex.

#### Geslachtsverhouding

De geslachtsverhouding (vrouw : man) in de pure *C. taenia* populaties varieerde van 0,7 in tot 6. De geslachtsverhoudingen op locaties met het Hybride complex varieerde van 0,9 tot >80 (enkel vrouwtjes gevonden).

#### Lengte

De gemiddelde lengte varieerde in pure *C. taenia* populaties van 54 mm tot 79 mm. Op locaties met het Hybride complex varieerde de gemiddelde lengte van populaties van 67 mm tot 94 mm. De maximale lengte varieerde in pure *C. taenia* populaties van 81 mm tot 108 mm. Op locaties met het Hybride complex varieerde de maximale lengte van populaties van 88 mm tot 127 mm.



*Figuur 7: maximaal aangetroffen lengte per populatie. Verschil tussen pure kleine modderkruipers (C. taenia) en populaties met hybriden.*

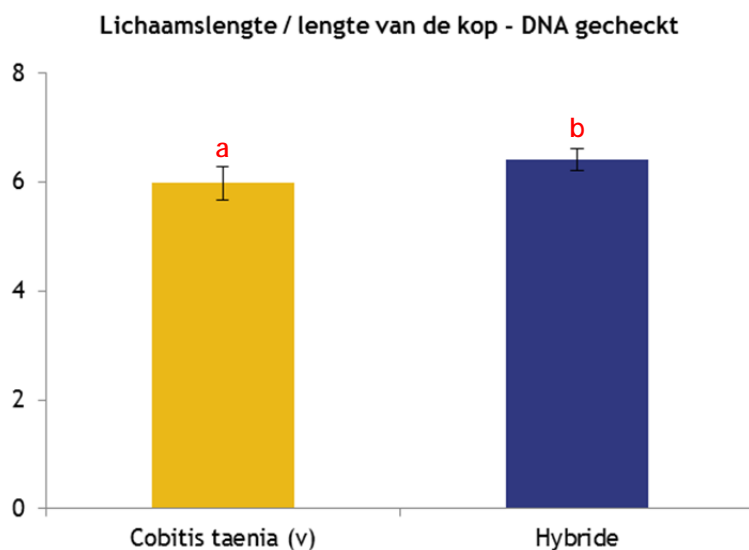
*Tabel 4: resultaten geslachtsbepaling en metingen. In de eerste kolom staan de locaties weergegeven, gevolgd door het aantal gevangen dieren, het aantal mannetjes en vrouwtjes en de geslachtsverhouding. In de 6<sup>e</sup> en 7<sup>e</sup> kolom staan de maximale en gemiddelde lengtes. In de laatste kolommen staat van hoeveel dieren middels genetisch analyse de soort is bepaald en tot slot of de locatie op basis van de genetische analyses wordt aangemerkt als een pure *C. taenia* populatie of als een Hybride complex.*

Locatie	# dieren gevangen	# man	# vrouw	Geslachtsverhouding	Max lengte (mm)	Gemiddelde lengte (mm)	# DNA sample man	# DNA sample vrouw	C. taenia of Hybride
Drentse Aa	25	5	20	4,0	81	54	1	1	<i>C. taenia</i>
Zeeuws Vlaanderen	41	9	32	3,6	96	62	4	6	<i>C. taenia</i>
Castricum	35	5	30	6,0	101	79	1	1	<i>C. taenia</i>
Broekse Wielen	25	15	10	0,7	108	76	1	1	<i>C. taenia</i>
Loosdrecht	33	12	21	1,8	88	72	1	1	Hybride complex
Flevoland (NOP)	25	2	23	11,5	97	67	2	8	Hybride complex
Wageningen	17	9	8	0,9	97	68	1	1	Hybride complex
Goordiek - Corle	33	1	32	32,0	98	82	1	1	Hybride complex
Zoeterwoude	39	2	37	18,5	107	76	1	1	Hybride complex
Kawesche loop	36	2	34	17,0	113	87	1	1	Hybride complex
Groot Salland	22	1	21	21,0	115	80	1	1	Hybride complex
Muzel (Friesland)	25	1	24	24,0	116	94	1	1	Hybride complex
Hertogswetering	25	0	25	>25	120	67	-	2	Hybride complex
Nieuwegein	80	0	80	>80	120	90	-	2	Hybride complex
Hoog Zwaluwe	44	3	41	13,7	127	81	1	1	Hybride complex

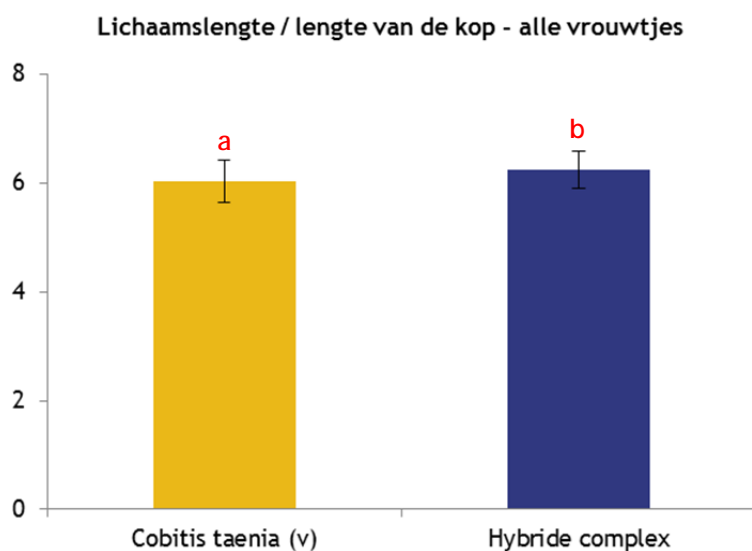
## 4.2.2 Morfologische verhoudingen: grootte en vorm staartvlek en kop

**Relatieve grootte kop**

De lengte van de kop t.o.v. de totale lichaamslengte is kleiner bij de hybriden. Dit verschil was significant bij zowel de met DNA gecheckte dieren als de grotere steekproef met alle vrouwtjes die als *C. taenia* zijn aangemerkt en alle vrouwtjes uit het Hybride complex.



*Figuur 8: relatieve grootte van de kop (Lichaamslengte gedeeld door de lengte van de kop). Berekend met enkel vrouwtjes waarvan de soort middels DNA bepaald is. C. taenia (v): n=9 en Hybride: n=17). Er is een significant verschil tussen C. taenia (v) en de Hybriden ( $p < 0,001$ ).*

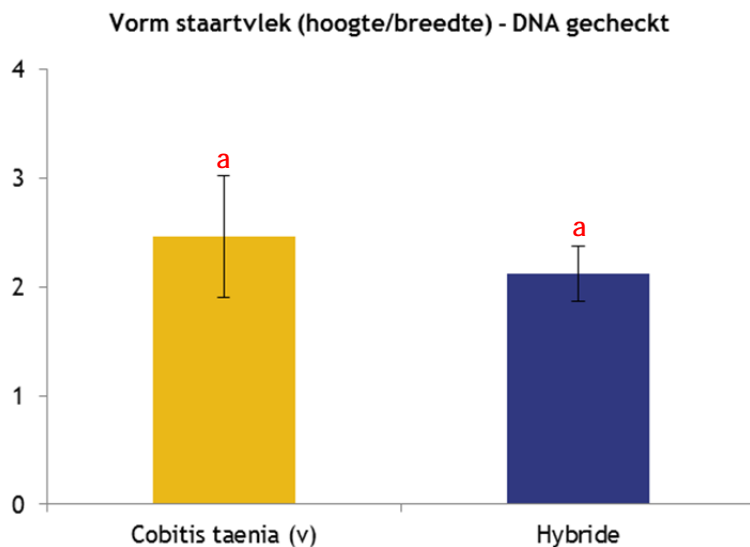


*Figuur 9: relatieve grootte van de kop (Lichaamslengte gedeeld door de lengte van de kop). Berekend met alle gemeten C. taenia (v): n=63 en Hybride complex: n=204). Er is een significant verschil tussen C. taenia (v) en het Hybride complex ( $p < 0,001$ ).*

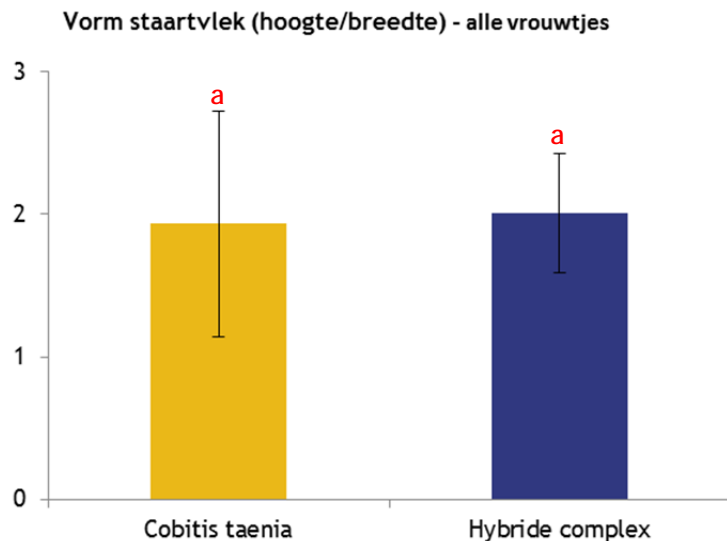


### Vorm van de staartvlek

De vorm van de staartvlek verschilde niet significant tussen *C. taenia* en de hybriden. Dit geldt zowel bij zowel de met DNA gecheckte dieren als bij de grotere steekproef met alle vrouwtjes die als *C. taenia* zijn aangemerkt en alle vrouwtjes uit het Hybride complex.



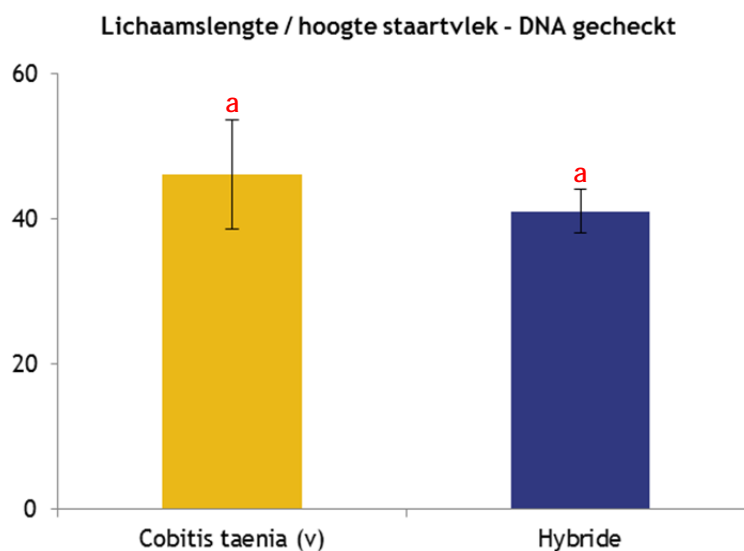
*Figuur 10: vorm van de staartvlek (hoogte gedeeld door de breedte). Berekend met enkel vrouwtjes waarvan de soort middels DNA bepaald is. C. taenia (v): n=9 en Hybride: n=17). Er is geen significant verschil tussen C. taenia (v) en de Hybriden ( $p < 0,12$ ).*



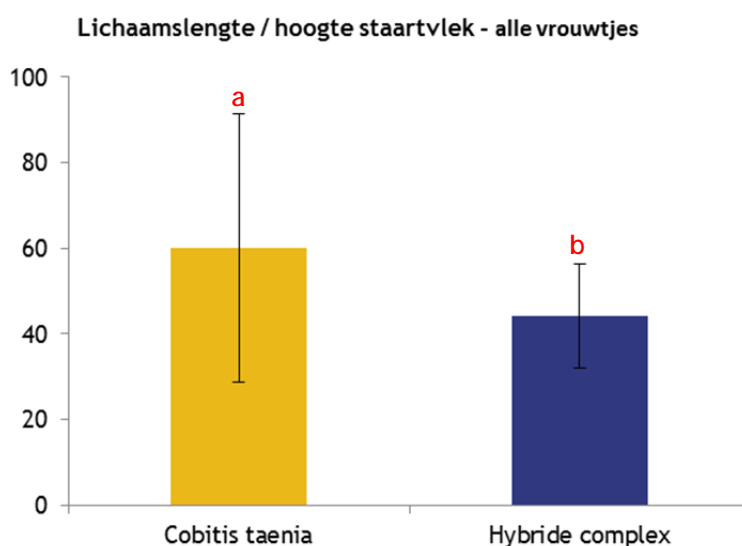
*Figuur 11: vorm van de staartvlek (hoogte gedeeld door de breedte). Berekend met alle gemeten C. taenia (v): n=63 en Hybride complex: n=204). Er is geen significant verschil tussen C. taenia (v) en het Hybride complex ( $p < 0,46$ ).*

### Relatieve hoogte van de staartvlek

De hoogte van de staartvlek verschilde niet significant tussen *C. taenia* en de hybriden bij de met DNA gecheckte individuen. Bij de grotere steekproef met alle gemeten vrouwtjes was de hoogte van de staartvlek t.o.v. de totale lichaamslengte groter bij de het Hybride complex dan bij *C. taenia*.



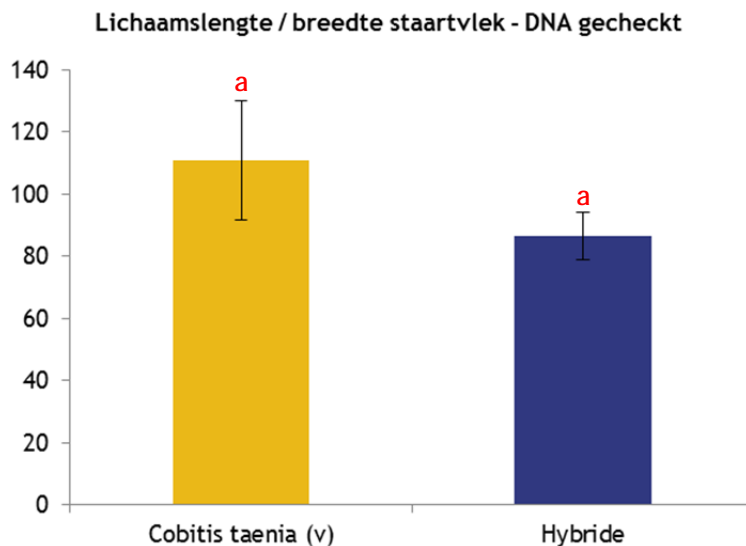
*Figuur 12: relatieve hoogte van de staartvlek (hoogte gedeeld door de lichaamslengte). Berekend met enkel vrouwtjes waarvan de soort middels DNA bepaald is. C. taenia (v): n=9 en Hybride: n=17). Er is geen significant verschil tussen C. taenia (v) en de Hybriden ( $p < 0,08$ ).*



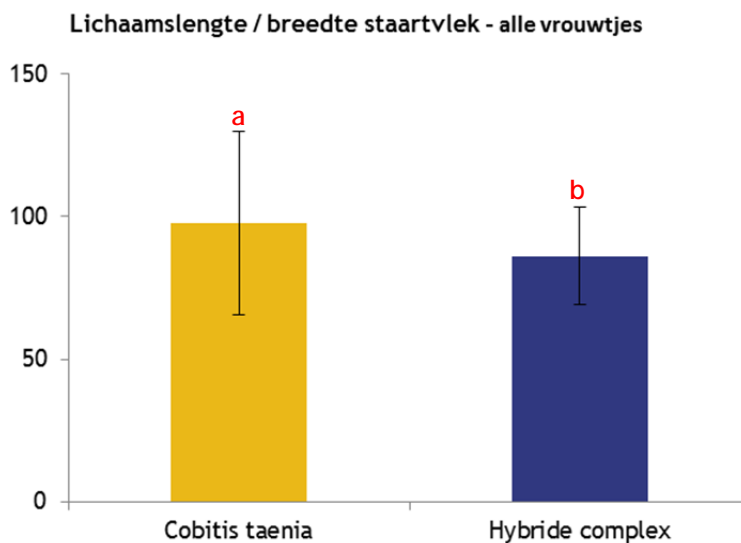
*Figuur 13: relatieve hoogte van de staartvlek (hoogte gedeeld door de lichaamslengte). Berekend met alle gemeten C. taenia (v): n=63 en Hybride complex: n=204). Er is een significant verschil tussen C. taenia (v) en het Hybride complex ( $p < 0,001$ ).*

### Relatieve breedte van de staartvlek

De hoogte van de staartvlek verschilde niet significant tussen *C. taenia* en de hybriden bij de met DNA gecheckte individuen. Bij de grotere steekproef met alle gemeten vrouwtjes was de hoogte van de staartvlek t.o.v. de totale lichaamslengte groter bij de het Hybride complex dan bij *C. taenia*.



*Figuur 14: relatieve breedte van de staartvlek (hoogte gedeeld door de lichaamslengte). Berekend met enkel vrouwtjes waarvan de soort middels DNA bepaald is. C. taenia (v): n=9 en Hybride: n=17). Er is geen significant verschil tussen C. taenia (v) en de Hybriden ( $p=1$ ).*



*Figuur 15: relatieve hoogte van de staartvlek (hoogte gedeeld door de lichaamslengte). Berekend met alle gemeten C. taenia (v): n=63 en Hybride complex: n=204). Er is een significant verschil tussen C. taenia (v) en het Hybride complex ( $p<0,001$ ).*

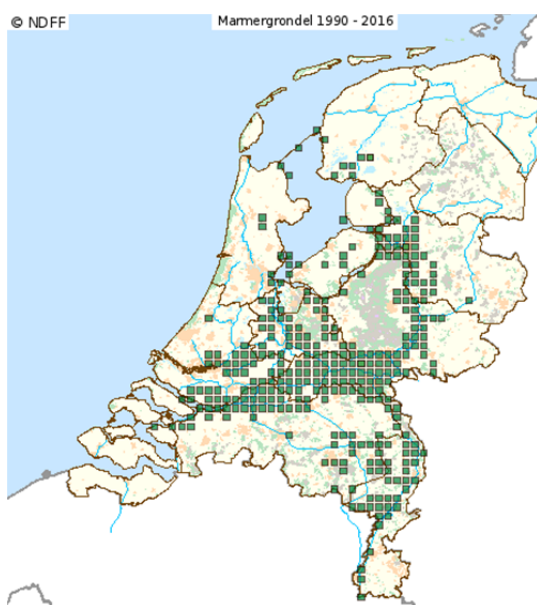
## 5 Discussie

In paragraaf 1.2 zijn vijf onderzoeksvragen geformuleerd en twee hypothesen over de herkomst van de hybriden. In de onderstaande paragrafen worden deze stuk voor stuk beantwoord.

### 5.1 Verspreiding *Cobitis taenia* en hybriden

De grote rivieren vormen doorgaans de verspreidingsassen waarlangs vissen koloniseren. Vanuit dit oogpunt zijn monsterlocaties in regio's verspreid over Nederland met een verschillende mate van connectiviteit ten opzichte van de Rijn en Maas geselecteerd. Uit het onderzoek komt naar voren dat pure kleine modderkruiper populaties met name gevonden worden in min of meer geïsoleerde regio's en wateren (figuur 6). Het gaat daarbij om echt geïsoleerde gebieden en regio's zoals de Drentse Aa, Zeeuws Vlaanderen en de geïsoleerde plas in de Broekse Wielen. Uit de eDNA metabarcoding studie blijkt dat ook in het Westen van Nederland in de omgeving rondom Den Haag nog populaties pure kleine modderkruipers voorkomen.

In de regio's die een relatief grote mate van connectiviteit met grote rivieren en met elkaar hebben worden vrijwel overal hybriden aangetroffen. Opvallende uitzonderingen hierop vormen locaties in Noord-Holland ten noorden van het Noordzeekanaal, bij Den Haag, in Flevoland en bij de Berkel. Op al deze locaties werden pure populaties aangetroffen. Deze gebieden lijken op basis van het kolonisatiepatroon van de marmergrondel (figuur 16) in eerste instantie relatief snel (10-20 jaar) koloniseerbaar te zijn vanuit het Nederlandse deel van de Rijn. In tweede instantie blijkt hun connectiviteit met de Rijn toch gering. Zo is de locatie in Flevoland moeilijk bereikbaar door sterke verstuwings. De gebieden ten Noorden van het Noordzeekanaal en rond Den Haag wateren af op de zee en staan in beperkte mate in verbinding met het achterland. De locatie in de Berkel bij Zutphen lag lange tijd geïsoleerd als gevolg van een stuw en is onlangs pas vispasseerbaar geworden door de aanleg van een vistrap.



*Figuur 16: kaart verspreiding marmergrondel als maat voor connectiviteit Nederlandse wateren. Bron NDFF + 2 stippen toegevoegd uit Waarneming.nl.*

Bij bovenstaande resultaten dient in het achterhoofd te worden gehouden dat in het veldonderzoek per populatie slechts twee dieren genetisch geanalyseerd zijn. Hierbij is het grootste vrouwelijke dier gesampled waarmee de kans op het aantonen van hybriden groot is. Het is echter niet uit te sluiten dat in populaties die op basis van het veldonderzoek als puur zijn aangewezen toch (in lage dichtheid) hybriden bevatten. De gelijktijdig verzamelde gegevens over de geslachtsverhouding ondersteunen de uitkomsten van het DNA onderzoek (locaties die als puur zijn aangemerkt hebben een min of meer gelijke geslachtsverhouding). Van de populatie in Zeeuws Vlaanderen zijn 10 dieren bemonsterd waardoor de zekerheid hier groot is dat het een pure populatie betreft. De resultaten van de eDNA metabarcoding geven daarnaast mogelijk een nog vollediger beeld doordat er gelijktijdig gekeken is naar de aanwezigheid van eDNA van hybriden en pure kleine modderkruipers in het water. Daarmee wordt dus een hele populatie in één keer bemonsterd via het DNA dat ze in het water achterlaten. Bij het niet aantreffen van hybride eDNA maar wel aantreffen van *C. taenia* eDNA kan er daarom met een relatief grote betrouwbaarheid gesteld worden dat er geen hybriden aanwezig zijn (de trefkans met eDNA ligt naar schatting rond de 90%).

### **Type hybriden**

In dit onderzoek is er in Nederland slechts één type hybride aangetroffen namelijk *C. taenia x tanaitica x elongatooides*. Het type hybride is enkel vanuit de DNA analyses te bepalen en niet vanuit de eDNA metabarcoding. Deze hybriden dragen mitochondriaal DNA van *Cobitis elongatooides*, een type dat zeer beperkt verspreid is in West-Europa. In de omgeving van Nederland zijn ook nog andere typen hybriden aangetroffen, namelijk *C. taenia x elongatooides* van het type TE, TTE, TEE, TTTE (waarbij een T staat voor een kopie van het genoom van *C. taenia*, en E voor een kopie van *C. elongatooides*). De kans is aanwezig dat enkele van deze typen ook in Nederland aanwezig zijn maar door de relatief kleine steekproef (22 locaties, inclusief museumexemplaren) niet zijn aangetroffen. Deze typen hebben op *C. taenia* gelijkende mitochondriale haplotypen. Deze haplotypen zijn wijdverspreid in West-Europa en dat wijst erop dat deze typen zich vrij snel na de ijstijd hebben verspreid over West-Europa.

## **5.2 Verhouding *Cobitis taenia* en hybriden**

Van geen van de populaties zijn alle dieren genetisch onderzocht. Daarom kan alleen een inschatting gemaakt worden van de verhouding tussen de pure *C. taenia* en de hybriden op basis van de vastgestelde geslachtsverhouding. Wanneer wordt aangenomen dat in een pure populatie evenveel mannetjes als vrouwtjes voorkomen kan bij een scheve geslachtsverhouding worden berekend hoeveel hybriden er in een populatie voorkomen. Hierbij dient opgemerkt te worden dat dit mogelijk een overschatting is van het aantal hybriden omdat in de populaties die in deze studie als pure *Cobitis* populaties zijn aangemerkt de geslachtsverhouding afweek van 1:1. In Castricum werd zelfs 1:6 vastgesteld, dit is echter deels een samplingeffect. Op deze locatie werden heel veel dieren gevangen en is er bij het doormeten gekozen voor de grootste exemplaren (waarvan makkelijker het geslacht te bepalen is). Dit heeft er onbewust voor geleid dat er onbedoeld op vrouwtjes is voorgeselecteerd (die worden groter dan mannetjes). Bij de andere populaties is dat voorkomen door standaard de eerste 25 dieren te meten boven de 4 cm zonder enige verdere voorselectie. De populaties uit Zeeuws Vlaanderen en de Drentse Aa laten desondanks een scheve geslachtsverhouding zien met grofweg 4 vrouwtjes op 1 mannetje.

Van de populaties met hybriden lieten Wageningen (2007) en de Loosdrechtse Plassen een geslachtsverhouding van grofweg 1 mannetje op 1 vrouwtje zien. Dit wijst erop dat er destijds in deze populaties nog zeer weinig hybriden aanwezig waren. Mogelijk komt dit door een recente invasie met hybriden op deze locaties waardoor het evenwicht zich nog moet instellen. In de overige populaties met hybriden is een zeer scheve geslachtsverhouding gevonden van 11,5 vrouwtjes op 1 mannetje in de Noordoostpolder tot enkel vrouwtjes in de Hertogswatering en bij Nieuwegein. Uitgaande van een 1:1 geslachtsverhouding bij de pure *C. taenia* in deze populaties kan berekend worden dat het aandeel hybriden varieert van 84% hybriden in de Noordoostpolder tot (nagenoeg) 100% hybriden in de Hertogswatering en bij Nieuwegein. In een grote genetische studie in Vlaanderen werd in 17 hybride populaties gemiddeld een aandeel van 63% hybriden gevonden variërend van 10% tot 100% (Gelas et al., 2007). Geconcludeerd kan worden dat in hybride populaties de hybriden doorgaans een bijzonder groot deel van de populatie uitmaken. De pure *C. taenia* is duidelijk in de minderheid in dergelijke populaties.

### 5.3 Morfologisch onderscheid tussen *Cobitis taenia* en hybriden

#### **Geslachtsverhouding**

De geslachtsverhouding lijkt het sterkste kenmerk om op basis van morfologie onderscheid te maken tussen pure *C. taenia* populaties en populaties met hybriden. In de populaties met pure *C. taenia* lag deze laag: 4 vrouwtjes of minder op 1 mannetje (zie discussie onder 4.2 over de locatie bij Castricum waar een verhouding van 6:1 werd gevonden maar dit waarschijnlijk het gevolg is van selectie op grotere dieren bij het monstereen). In populaties met hybriden lag de verhouding veelal hoog, variërend van 11,5:1 tot zelfs enkel vrouwtjes. De populaties bij Wageningen (2007) en Loosdrecht vormen daar een uitzondering op met nagenoeg gelijke geslachtsverhoudingen. Mogelijk is dat een gevolg van een recente invasie met hybriden op die locaties waardoor het evenwicht zich nog niet heeft ingesteld. Op dezelfde locatie in Wageningen is in 2016 opnieuw bemonsterd, alle negen gevangen individuen bleken vrouwtjes te zijn. Dit ondersteunt de hypothese dat de locatie in 2007 net gekoloniseerd was door de hybriden en dat het evenwicht zich nog moest instellen (in 2016 wel typische geslachtsverhouding voor een hybride populatie).

Een recente kolonisatie kan niet worden vastgesteld op basis van de geslachtsverhouding. De geslachtsverhouding kan echter wel een goede indicatie geven voor de aanwezigheid van hybriden:

- Geslachtsverhouding lager dan 4 vrouwtjes op 1 mannetje → wijst op een pure *C. taenia* populatie met de kanttekening dat recente kolonisatie door hybriden niet te zien is.
- Geslachtsverhouding hoger dan 10 vrouwtjes op 1 mannetje → wijst op de aanwezigheid van hybriden.

### **Maximale lengte**

Bij de pure *C. taenia* is het grootste aangetroffen dier 10,8 cm groot. Dit overlapt deels met de maximale lengte die in enkele hybride populaties is aangetroffen. Desondanks kan de maximale lengte bruikbaar zijn. In grofweg de helft van de hybride populatie werden maximale lengtes vastgesteld van 11,5 cm of hoger. Het aantreffen van dergelijk grote dieren wijst op het voorkomen van hybriden. De maximale lengte van de pure kleine modderkruiper wordt namelijk op 11 cm gehouden (Kottelat & Freyhof, 2007), iets wat ondersteund wordt door de metingen in dit onderzoek.

### **Verhoudingen: grootte en vorm staartvlek en kop**

Bij het zeer nauwkeurig opmeten van een groot aantal dieren zijn significante verschillen gevonden tussen hybriden en pure *C. taenia* voor de relatieve grootte van de kop en relatieve lengte en breedte van de staartvlek. De verschillen waren echter zeer subtiel en enkel meetbaar bij een zeer nauwkeurige meting van een zeer groot aantal individuen. Het verschil in de relatieve grootte van de kop t.o.v. de lichaamslengte is bijvoorbeeld slechts 1mm bij een dier van 100mm lang. Dit maakt dat deze kenmerken in het veld weinig houvast zullen geven bij het bepalen van de aanwezigheid van hybriden. De geslachtsverhoudingen en maximale lengte lenen zich hier beter voor.

## 5.4 Mogelijke impact van hybriden

Over de mogelijke impact van de vestiging van hybriden in pure populaties is weinig bekend. Janko et al. (2005) stellen dat gemengde populaties met hybriden zich minder snel kunnen verspreiden dan pure populaties. Vast staat dat de hybriden zeer dominant kunnen worden over de pure kleine modderkruipers door hun klonale voortplanting. Uit literatuuronderzoek blijkt dat de hybriden zich enkel kunnen voortplanten met behulp van een mannetje van één van de oudersoorten, in Nederland *C. taenia* (zie kader 1). Ze kunnen de kleine modderkruipers daarom niet totaal doen uitsterven zonder daar zelf ook slachtoffer van te worden. Echter, in een door hybriden gedomineerde populatie zijn er relatief weinig seksueel voortplantende kleine modderkruipers aanwezig. Kleine populaties zijn gevoeliger voor verstoring. Bovendien is de genetische diversiteit in kleine populaties kleiner. Om deze redenen is een kleine seksueel voortplantende populatie van kleine modderkruipers gevoeliger voor het optreden van calamiteiten. Zonder onderscheid te maken tussen de kleine modderkruiper en de hybriden wordt de robuustheid van de populatie dus overschat.

### **Invloed op de trend van de kleine modderkruiper**

De trend van de kleine modderkruiper was de laatste jaren positief. Na de ontdekking van de hybriden was het onduidelijk of deze positieve trend aan de kleine modderkruiper zelf was toe te schrijven of aan de hybriden. De trend wordt bepaald middels occupancy modellen. Deze modellen kijken naar de aan of afwezigheid op km-hok niveau en bereken, rekening houdend met de trefkans, of de soort toe- of afneemt in verspreiding. De hybriden zijn voor de voortplanting afhankelijk van de kleine modderkruiper (zie kader 1). Dit betekent dat in theorie overal waar “kleine modderkruipers” zijn gevangen er dus ook pure *C. taenia* aanwezig moet zijn (nota bene hybriden kunnen zichzelf niet in stand houden). Daarmee geven de verzamelde gegevens dus wel een goed beeld van de verspreiding van de kleine modderkruiper. Mogelijk speelt wel mee dat de trefkans hoger wordt wanneer er na de vestiging van hybriden hogere dichtheden kleine modderkruipers

voorkomen dan in pure populaties. Hiervoor zijn echter geen aanwijzingen (bij de pure *C. taenia* populaties en populaties met hybriden werden geen opvallende verschillen in dichtheid aangetroffen).

## 5.5 Ploidie niveau

Alle hybriden individuen waarvan de ploidy bepaald is waren triploïd. Hoogst waarschijnlijk zijn alle hybrides van het type *Cobitis taenia x elongatoides x tanaitica* in Nederland triploïd. Dit houdt in dat ze genetisch materiaal van 3 sets chromosomen bevatten (normale seksuele dieren zijn diploïd (1 set van de vader, 1 set van de moeder). *C. elongatoides*, één van de oudersoorten van de in Nederland voorkomende triploïde modderkruipers is een stuk forser dan *C. taenia*. Bovendien kunnen polyploïde hybride vanwege het gendosis effect (2 in plaats van 3 sets chromosomen) nog forser worden dan de oudersoorten. Dit is ook teruggevonden bij de morfologische kenmerken. Dit maakt ze potentieel concurrentie krachtiger (Salmon 2005). Dit zou een mogelijke verklaring kunnen zijn voor het feit dat hybride zo sterk de overhand kunnen nemen. Echter, totale verdringing van de oudersoort is theoretisch niet mogelijk gezien de hybriden voor de voorplanting afhankelijk zijn van sperma van de oudersoort.

## 5.6 Herkomst hybriden in Nederland

Voorafgaand aan dit onderzoek zijn er twee hypothesen opgesteld voor de herkomst van de hybriden in Nederland:

- Hypothese 1: De eerste hypothese is dat de hybriden zich reeds sinds de laatste ijstijd over Noordwest Europa verspreid hebben samen met *C. taenia* zelf (de inheemse kleine modderkruiper).
- Hypothese 2: De tweede hypothese is dat de hybriden zich recenter hebben verspreid, bijvoorbeeld via het in 1992 geopende Main-Donaukanaal, vistransporten, viskweek of ballastwater.

De eerste hypothese veronderstelt dat de hybriden zich sinds de laatste ijstijd, vanaf 7500 jaar geleden, over Noordwest Europa hebben verspreid. Rond 7500 jaar geleden vulde de Noordzee zich en konden de hybriden zich niet meer via die route verspreiden. Engeland is niet bereikt en ook het uiterste Westen van Vlaanderen, Zeeuws Vlaanderen en de Drentse Aa zijn niet bereikt door de hybriden. Echter, bij een vestiging duizenden jaren geleden zou verwacht mogen worden dat binnen Nederland de hybriden ook plaatsen waar nu pure kleine modderkruiper populaties gevonden zijn, zoals in Noord-Holland, Flevoland en rondom Den Haag gekoloniseerd zouden hebben. Opvallend is ook het voorkomen van een pure populatie kleine modderkruipers in de Broekse Wielen terwijl er verder in de hele omgeving alleen maar hybride populaties aangetroffen zijn. Deze geïsoleerde plassen zijn ontstaan door dijkdoorbraken zo'n twee honderd jaar geleden.



Dit kan er op wijzen dat er ten tijden van de dijkdoorbraak nog geen hybriden aanwezig waren.

Verder zijn er opvallende verschuivingen te zien op locaties waarvan museumexemplaren zijn geanalyseerd. Zo bleek de populatie bij Zoeterwoude in 1919 een pure kleine modderkruiper populatie te zijn (zowel qua gelijke geslachtsverhouding als qua DNA analyses). In 2015 is er opnieuw bemonsterd bij Zoeterwoude en werden er voornamelijk hybriden gevonden en een compleet scheve geslachtsverhouding van 18,5 vrouwtjes op 1 mannetje. Dit wijst erop dat er tussen 1919 en 2015 kolonisatie met hybriden heeft plaats gevonden. Vergelijkbaar werd in 1982 in de Bommelwaard bij Kerkdriel nog pure kleine modderkruiper aangetroffen terwijl er in 2015 in het rivierengebied enkel nog hybride populaties gevonden worden. Tot slot bleek een in 2007 verzamelde populatie bij Wageningen reeds een hybride te bevatten (grootste dier) maar was de geslachtsverhouding toen nog gelijk. In 2016 is er op dezelfde locatie met het schepnet bevestigd en werden er enkel nog vrouwtjes gevangen (9 stuks) wat wijst op een toename van de hybriden op deze locatie.

Op basis van deze uitkomsten lijkt de tweede hypothese aannemelijker: de hybriden hebben zich relatief recent in Nederland gevestigd en niet reeds duizenden jaren terug zoals de eerste hypothese veronderstelde. Vestiging via het Main-Donau kanaal kan worden uitgesloten door de vondst van 2 in 1951 verzamelde hybriden exemplaren (uit de collectie van Naturalis). Daarnaast komt het type hybriden dat in dit onderzoek in Nederland is aangetroffen ook niet voor in de Donau maar zijn ze bekend vanuit het stroomgebied van de Odra (op de grens van Duitsland en Polen) (pers. med. Ladislav Pekarik).

Mogelijk zijn de hybriden in de laatste 100 a 150 jaar onbedoeld vanuit Oost Europa meegekomen met vistransporten voor de kweek en het uitzetten van vissen ten behoeve van de beroeps- en/of sportvisserij. Vanaf circa 1900 werden door de Nederlandse Heidemaatschappij op grote schaal vissen geïmporteerd. Dit betrof onder andere karper, snoekbaars, houting, zalm, elft en zeelt. Het broedmateriaal was o.a. afkomstig uit Oost-Europa. Een soort die op een vergelijkbare manier in delen van Europa geïntroduceerd is de blauwband (Gozlan et al. 2010). Ook worden kleine modderkruipers (illegaal) gehouden in door aquariumliefhebbers, berichten op internetfora wijzen hierop. Mogelijk gaat het hierbij om uitheemse soorten. Via een dergelijke route zijn ook andere vissoorten in Nederland terecht gekomen zoals de zonnebaars (Soes *et al.*, 2011).

## 6 Conclusies & aanbevelingen

### 6.1 Conclusies

- *Cobitis* hybriden (type *C. taenia x tanaitica x elongatoides*, met mitochondriaal DNA van *C. elongatoides*) blijken in een groot deel van Nederland voor te komen. Het is aannemelijk dat deze hybriden zich relatief recent (100-150 jaar geleden) in Nederland gevestigd hebben.
- Pure kleine modderkruiper (*C. taenia*) wordt hoofdzakelijk aangetroffen in de van de Rijn en Maas geïsoleerde regio's of locaties.
- In dit onderzoek is er in Nederland slechts één type hybride aangetroffen namelijk *C. taenia x tanaitica x elongatoides*. De steekproef was relatief klein waardoor het voorkomen van andere typen hybriden niet is uit te sluiten.
- Onderscheid tussen *C. taenia* en hybriden in het veld kan het best gemaakt worden op basis van de geslachtsverhouding van populaties.
- Op locaties waar zowel *C. taenia* als hybriden werden aangetroffen werd op basis van de geslachtsverhouding geconstateerd dat de hybride vorm de overhand had.
- In theorie kunnen de *Cobitis* hybriden de pure kleine modderkruipers niet verdrijven omdat ze deze soort nodig hebben voor hun voortplanting (zie kader 1).

### 6.2 Aanbevelingen

Uit het onderzoek is gebleken dat in geïsoleerde gebieden in Nederland nog pure populaties kleine modderkruipers voorkomen. Het is belangrijk hiermee rekening te houden bij het verbinden van watersystemen en het verplaatsen van kleine modderkruipers (bijvoorbeeld in het kader van de zorgplicht van de Flora- en Faunawet). Ook dient men er alert op te zijn dat de soort niet onbedoeld meelift met vistransporten en uitzettingen. Voorkomen dient te worden dat hybriden onbedoeld in regio's of gebieden geïntroduceerd worden waar tot op heden enkel pure kleine modderkruipers voorkomen. Het risico is extra groot doordat de hybriden via één enkel individu middels klonale voortplanting een populatie kan starten op deze locaties.

### 6.3 Vervolgonderzoek

Op basis van de resultaten uit onderliggend onderzoek zijn er twee mogelijke richtingen voor vervolgonderzoek naar voren gekomen.

#### **1) Monitoren geslachtsverhoudingen populatie in het veld**

Door geslachtsverhoudingen te monitoren in het veld kunnen wijzigingen door de jaren heen gevolgd worden. Wanneer een min of meer gelijke geslachtsverhouding verschuift naar een sterk vrouwelijk gedomineerde geslachtsverhouding kan dit er op wijzen dat kolonisatie met hybriden aan de gang is (waarna zich een nieuw evenwicht instelt). Interessant is ook om te zien of zeer scheve geslachtsverhoudingen weer meer richting 1:1 verschuiven. Dat zou een indicatie kunnen zijn dat er een complexere relatie is tussen de hybriden en de pure kleine modderkruipers en de verhoudingen tussen beide soorten mogelijk cyclisch veranderen zoals ook bij een predator prooi verhouding.

RAVON wil haar achterban vragen de geslachtsverhoudingen van populaties kleine modderkruipers in kaart te brengen en de komende jaren te volgen. Zo kan een beeld worden verkregen waar hybride populaties aanwezig zijn.

#### **2) Genetische diversiteit van hybride populaties vergelijken**

De hoeveelheid genetische variatie in een populatie geeft aan of een populatie recent door een bottleneck gegaan is. Een bottleneck is een concept uit de populatiebiologie dat beschrijft hoe op basis van enkele individuen een grote populatie ontstaat. Omdat slechts enkele individuen aan de voet gestaan hebben van deze populatie is er weinig genetische diversiteit in dergelijke populatie. Door mutaties kan op langere termijn weer meer genetische diversiteit ontstaan.

De studie uit Vlaanderen (Gelas *et al.* 2007) heeft de genetische diversiteit van de daar voorkomende hybriden onderzocht. Zij vonden dat de populatie triploïde hybriden in Vlaanderen bestaat uit twee belangrijke klonale lijnen met ieder een wijde verspreiding in Vlaanderen. Gelas *et al.* trekken hieruit de conclusie dat de kolonisatie ofwel recent heeft plaats gevonden, of dat de kolonisatie slechts door een beperkt aantal klonale lijnen heeft plaats gevonden, of door een combinatie van beide. Om hier betrouwbaardere uitspraken over te doen zou de genetische diversiteit van populaties in Nederland en Vlaanderen vergeleken moeten worden met de genetische diversiteit van hybride populaties uit Oost-Europa. Er is echter geen data voorhanden van de genetische diversiteit van hybride modderkruipers in Oost-Europa. In een vervolgonderzoek kan genetische diversiteit van *C. taenia x elongatoides x tanaitica* in Oost-Europa en Nederland in kaart gebracht worden (de genetische diversiteit in Vlaanderen is al voldoende in kaart). Met deze informatie kan de genetische diversiteit in Oost-Europa vergeleken worden met de genetische diversiteit in Vlaanderen en Nederland. Wanneer de hybride *C. taenia x elongatoides x tanaitica* zich recent heeft uitgebreid (bijvoorbeeld door introductie in het Rijn systeem) dan is de verwachting dat de hoeveelheid genetische diversiteit in Nederland en Vlaanderen veel lager zal zijn dan in Oost-Europa.

## 7 Literatuur

- Gelas, K. de, J. van Houdt, D. de Charleroy & F.A.M. Volckaert, 2007. Onderzoek naar de populatiegenetica van kleine modderkruiper (*Cobitis taenia*) in Vlaanderen in het kader van het behoud en herstel van natuurlijke populaties. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Linkebeek, België.
- Gozlan RE, Andreou D, Asaeda T, Beyer K, Bouhadad R, Burnard D, Caiola N, Cakic P, Djikanovic V, Esmaeili H.R, Falka I, Golicher D, Harka Á, Jeney G, Kovac V, Musil J, Nocita A, Porz M, Poulet N, Virbickas T, Wolter C, Tarkan SA, Tricarico E, Trichkova T, Verreycken H, Witkowski A, Zhang CG, Zweismueller I, Britton RJ (2010) Pancontinental invasion of *Pseudorasbora parva*: towards a better understanding of freshwater fish invasions. *Fish and Fisheries* 11: 315–340.
- Janko K, P. Rab, M.A. Culling & P. Kotlik, 2005. Ice age cloning—comparison of quaternary evolutionary histories of sexual and clonal forms of European loaches (Cobitis; Teleostei) using the analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 14, 2991–3004.
- Janko K, J. Bohlen, D. Lamatsch et al., 2007. The gynogenetic reproduction of diploid and triploid hybrid spined loaches (Cobitis: Teleostei), and their ability to establish successful clonal lineages—on the evolution of polyploidy in asexual vertebrates. *Genetica*, 2, 185-194.
- Kottelat, M. & J. Freyhof, 2007. Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland en Freyhof, Berlin, Germany.
- Ritterbush D & J. Bohlen, 2000. On the ecology of spined loach in Lake Miiggelsee Folia. *Zoologica*, 49 (suppl. 1), 187-192.
- Salmon A, ML. Ainouche & F. Wendel, 2005. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular ecology* 14(4): 1163-1175.
- Soes, M., S.J. Cooke, H.H. van Kleef, P.B. Broeckx & P. Veenvliet, 2011. A risk analysis of sunfishes (Centrarchidae) and pygmy sunfishes (Elassomatidae) in the Netherlands. BUWA.
- Spikmans, F., J.E. Herder, N. van Kessel en R.S.E.W. Leuven, 2010. Opmars van de grondels. *Visionair – het vakblad van Sportvisserij Nederland*. Nr 18: 4-7.
- Spikmans, F., J. Kranenbarg & N. van Kessel, 2011. Witvinggrondel: een invasieve exoot in Rijn en Maas? *De Levende Natuur*, 112(3): 97-100.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., Peroux, T., Crivelli, A. J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P. R., Willerslev, E. and Dejean, T. (2016), Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol*, 25: 929–942. doi:10.1111/mec.13428

## **RAVON**

Reptielen **A**mfibieën **V**issen **O**nderzoek **N**ederland

Natuurplaza

Toernooiveld 1 - 6525 ED Nijmegen

Postbus 1413 - 6501 BK Nijmegen

T: 024 - 7 410 600 (alg.)

[www.ravon.nl](http://www.ravon.nl)

