



Soort- en individuele herkenning van noordse woelmuis met eDNA: een pilot langs het kanaal Omval- Kolhorn

Maurice La Haye & Arjen de Groot



In samenwerking met Wageningen Environmental Research (ALTErrA)

2017.05

Rapport van de Zoogdierverseniging

In opdracht van de provincie Noord-Holland

Soort- en individuele herkenning van noordse woelmuis met eDNA: een pilot langs het kanaal Omval-Kolhorn

Rapport nr.:	2017.05
Datum uitgave:	17-02-2017
Status	Concept/Definitief
Auteur:	Maurice La Haye & Arjen de Groot (WEnR Alterra)
Illustraties:	Foto voorkant Sil Westra
Kwaliteitscontrole:	Hans Hollander
Productie:	Steunstichting VZZ, in rapport vermeld als de Zoogdiervereniging Bezoekadres: Toernooiveld 1 6525 ED Nijmegen Postadres: Postbus 6531 6503 GA Nijmegen Tel.: 024 7410500 secretariaat@zoogdiervereniging.nl www.zoogdiervereniging.nl
Gegevens opdrachtgever:	Provincie Noord-Holland Beleidsadviseur – Natuur, Recreatie en Landschap Mira Heesakkers Houtplein 33 2012 DE Haarlem
Contactpersoon opdrachtgever	Mira Heesakkers

De Steunstichting VZZ is onderdeel van de Zoogdiervereniging

Dit rapport kan geciteerd worden als:

La Haye M. & Groot G.A. de, 2017. Soort- en individuele herkenning van noordse woelmuis met eDNA: een pilot langs het kanaal Omval-Kolhorn. Rapport 2017.05 Zoogdiervereniging, Nijmegen.

De Steunstichting VZZ, onderdeel van de Zoogdiervereniging, is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van de Zoogdiervereniging; opdrachtgever vrijwaart de Stichting VZZ voor aanspraken van derden in verband met deze toepassing. Niets uit dit rapport mag worden veeleenvoudigd en/of openbaar gemaakt worden d.m.v. druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgever hierboven aangegeven en de Zoogdiervereniging, noch mag het zonder een dergelijke toestemming worden gebruikt voor enig ander werk dan waarvoor het is vervaardigd.

INHOUDSOPGAVE

Voorwoord	2
1 Inleiding.....	3
1.1 Aanleiding	3
1.2 Doelstelling	4
1.3 Onderzoeksvragen	4
2 Werkwijze	6
3 Resultaten	7
3.1 Inloopvallen versus eDNA	7
3.2 Genetische variatie van keutelmonsters	7
3.3 Uitvoering volgens protocol	9
4 Discussie	10
4.1 Onderzoeksvragen	10
4.2 Praktijkervaring met vaststellen individuele profielen.....	12
5 Conclusies en aanbevelingen.....	13
6 Literatuurlijst	14
Bijlage 1 Protocol veldbemonstering voor het project Omval-Kolhorn ..	15
Bijlage 2 Nieuw protocol veldbemonstering eDNA, versie 170217	18

Voorwoord

De provincie Noord-Holland heeft de Zoogdierverseniging gevraagd om door middel van een praktijktest na te gaan of in suboptimale leefgebieden de eDNA methodiek kan worden ingezet om de aanwezigheid van noordse woelmuizen vast te stellen en om te testen of uit keutels van noordse woelmuizen DNA voor identificatie en vaststelling van individuele genetische profielen kan worden verkregen. De genetische analyses zijn uitgevoerd in het laboratorium van Wageningen Environmental Research (Alterra).

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

In de vorige eeuw is het voorkomen van de noordse woelmuis (*Microtus oeconomus arenicola*) in Nederland sterk afgenomen (Broekhuizen et al. 2016). In Nederland heeft de soort een beschermde status, omdat de noordse woelmuis in Nederland een aparte ondersoort vormt die alleen in ons land voorkomt. Om te voldoen aan Wet Natuurbescherming maakt de provincie gebruik van een gedragscode. Een van de voorwaarden is om de verspreiding van beschermde soorten binnen de provinciegrenzen te kennen.

De gangbare inventarisatie van (spits)muizen gebeurt met inloopvallen. Door nieuwe onderzoeksmethodieken, zoals bijvoorbeeld eDNA, is het tegenwoordig in veel gevallen mogelijk om vergelijkbare informatie te verzamelen op basis van zogenaamde non-invasieve monsters, zoals keutels of haren. Dit maakt direct contact met of het vangen van de dieren overbodig, en maakt het mogelijk om in kortere tijd meer gegevens te verzamelen.

Het gebruik van DNA-analyse voor verspreidingsonderzoek maakt het in potentie tevens mogelijk om gelijktijdig individuele genetische profielen te verkrijgen. Dit zou een waardevolle kans bieden om populatieonderzoek uit te voeren, bijvoorbeeld gericht op populatieomvang en *genetische vitaliteit*, en zo zicht te krijgen op de duurzaamheid van populaties zonder ze te verstoren. Een grote genetische variatie in populaties is belangrijk ter voorkoming van schadelijke gevolgen van inteelt, en om aanpassing aan veranderende omgevingscondities mogelijk te maken.

De Zoogdierverseniging en Wageningen Environmental Research (Alterra) passen dergelijke methoden gebaseerd op eDNA uit keutelmonsters regelmatig toe voor onderzoek aan zoogdieren, zoals de noordse woelmuis (La Haye & Westra 2015), de otter (Kuiters et al. 2016) en de boommarter (De Groot et al. 2015).

In 2013 startte de Zoogdierverseniging met verspreidingsonderzoek naar noordse woelmuizen op basis van keutels, waarbij een DNA-test wordt gebruikt om de keutels tot op soort te identificeren (Herder et al. 2015). Deze techniek is veelbelovend; het lijkt er op dat met grote zekerheid in korte tijd veel verspreidingsgegevens kunnen worden verzameld. In veenweidegebieden met kwalitatief hoogwaardig habitat bleek deze methode effectiever, efficiënter en goedkoper dan het traditionele onderzoek met inloopvallen en waarschijnlijk is deze methode ook in andere leefgebieden, zoals de rietlanden langs kanalen in Noord-Holland-Noord goed inzetbaar. Een mogelijk probleem kan echter zijn dat het in deze setting lastiger is om keutels te verzamelen doordat het oppervlak geschikt habitat veel kleiner (smaller) is.

Een praktijktest is nodig om na te gaan of ook in deze gebieden gemakkelijk keutels kunnen worden verzameld en of uit dergelijke keutels DNA van

voldoende kwaliteit kan worden gewonnen voor identificatie, en voor het vaststellen van een individuele genetische profielen voor onderzoek naar de genetische diversiteit.

Een hiermee samenhangende vraag is in hoeverre aangetroffen keutelhoopjes (die voor verspreidingsonderzoek normaliter als een mengmonster worden geanalyseerd) door één of meerdere individuen worden geproduceerd. In het laatste geval moeten losse keutels worden bemonsterd om individuele genetische profielen te verkrijgen.

Langs het kanaal Omval-Kolhorn zijn in september 2016 de kleine zoogdieren volgens de gangbare methode geïnventariseerd. Hiervoor werd door onderzoeks- en adviesbureau Van der Goes en Groot een 10-tal raaien met life-traps geplaatst langs de oever van het kanaal. Dit bood een goede mogelijkheid om gelijktijdig een onderzoek op basis van eDNA uit te voeren, en vervolgens de betrouwbaarheid en efficiëntie van beide methoden direct te vergelijken.

1.2 Doelstelling

De huidige praktijktest had tot doel om na te gaan of ook in suboptimale gebieden voor de noordse woelmuis de eDNA methodiek ingezet kan worden en of uit woelmuis keutels DNA van voldoende kwaliteit kan worden gewonnen voor identificatie, en voor het vaststellen van een individuele genetische profielen voor onderzoek naar de genetische diversiteit van populaties van de noordse woelmuis.

1.3 Onderzoeksvragen

Voor deze pilotstudie werden de volgende onderzoeksvragen geformuleerd:

1. Waar langs het kanaal Omval-Kolhorn kan de noordse woelmuis worden aangetroffen middels de eDNA-methode?
2. Zijn alle verzamelde keutelmonsters (eDNA monsters) geïdentificeerd als noordse woelmuis, of worden ook andere (woel)muizensoorten aangetroffen? En zo ja, welke soorten betreft dit?
3. Laten de keutels die geïdentificeerd zijn als afkomstig van noordse woelmuis ook onderlinge genetische variatie zien of is er geen sprake van genetische variatie tussen de gevonden keutels? (zie ook vraag 6)
4. Is identificatie van keutels verzameld in rietlanden een alternatief voor vangsten met val-raaien, om de aanwezigheid van noordse woelmuizen in oeverlanden te bepalen?

5. Dient het huidige protocol (zoals gebruikt door de Zoogdierverseniging) voor onderzoek naar noordse woelmuizen via eDNA te worden aangepast, en zo ja, op welke wijze?
6. Is het mogelijk om op basis van keutelhoopjes individuele genetische profielen van noordse woelmuizen te bepalen?
 - A) Is de monsterkwaliteit voldoende om naast soortidentificatie ook genetische profielen te bepalen op basis van microsatelliet-merkers?
 - B) Wordt per keutelhoopje inderdaad slechts het profiel van één enkel individu waargenomen?
 - C) In hoeverre blijkt (op basis van de binnen deze pilotstudie verkregen individuele profielen) sprake van genetische variatie binnen de regio Omval-Kolhorn?
 - D) Welke conclusies zijn er te trekken op basis van de praktijktest om genetische profielen te bepalen aan de hand van keutels, ten behoeve van een mogelijk toekomstig onderzoek naar de genetische diversiteit in en mate van isolatie van (deel)populaties van noordse woelmuizen in de provincie Noord-Holland?

2 Werkwijze

Monsterverzameling

Veldmedewerkers van bureau Van der Goes en Groot hebben tijdens het inloopvallenonderzoek keutels verzameld in de vallen-raaien langs het kanaal Omval Kolhorn. In tien raaien met inloopvallen is bij elk vallen-paar in een omtrek van 2 meter gezocht naar keutels. Gevonden keutels (keutelhoopjes) zijn bewaard in een apart monsterbuisje, maar de keutels zijn als mengmonster geanalyseerd (resultaat: aan/afwezigheid van de noordse woelmuis in een raai). De exacte verzamelmethode (zie protocol in bijlage 1), tijdsplanning en locaties van de monsternamen zijn voorafgaande aan het veldonderzoek afgestemd met Van der Goes en Groot.

Tijdens het veldwerk door Van der Goes en Groot bleek al snel dat het lastig was om woelmuiskeutels te vinden. Als backup zijn toen woelmuiskeutels verzameld in de Vlaardingse Vlietlanden (gebied beheer van Natuurmonumenten). Enerzijds om te dienen als referentie, anderzijds om bij gebrek aan woelmuiskeutels uit Noord-Holland toch onderzoeksvraag 6 te kunnen beantwoorden.

In alle analyses zijn ook enkele weefselmonsters van dood gevonden noordse woelmuizen meegenomen (voor dit onderzoek zijn geen woelmuizen dood gemaakt).

DNA extractie

DNA-extractie heeft plaats gevonden op basis van bestaande protocollen voor woelmuizen, in het genetisch laboratorium van Wageningen Environmental Research (Alterra). Monsters met lage DNA-kwaliteit (keutels) en hoge DNA-kwaliteit (weefsel) worden daarbij gescheiden verwerkt.

Validatie soortidentificatie

Voor de soortidentificatie is gebruik gemaakt van een generieke genetische merker, die aangrijpt op een DNA-fragment dat in alle zoogdieren aanwezig is, maar waarvan de exacte code per soort verschilt. Per monster is dit fragment vermeerderd, waarna de code is uitgelezen en vergeleken met een database met referentiecodes van alle relevante in het gebied voorkomende muizensoorten.

Validatie genereren van individuele genetische profielen

Voor het genereren van individuele genetische profielen is gebruik gemaakt van een set van zes zogenaamde microsatelliet-merkers. Deze merkers vermenigvuldigen elk een klein DNA-fragment, waarvan de exacte lengte sterk verschilt tussen individuele muizen. Door de aangetroffen fragmentlengtes per merker samen te voegen is een (genetisch) profiel verkregen van individuele keutels en de referentie-samples. De keutelmonsters zijn tenminste in drievoud geanalyseerd (een zogenaamde 'multi-tube approach', zie o.a. Koelewijn *et al.* 2010).

3 Resultaten

3.1 Inloopvallen versus eDNA

In september 2016 werd duidelijk dat langs het kanaal Omval Kolhorn weinig kleine zoogdieren werden gevangen en dat slechts weinig keutels van woelmuizen konden worden verzameld. Het inloopvallen-onderzoek door Van der Goes & Groot, heeft géén vangsten van de noordse woelmuis opgeleverd langs het kanaal Omval Kolhorn (Van der Straaten 2016). Tijdens het inloopvallenonderzoek zijn op 17 locaties vallen voor kleine zoogdieren geplaatst, waarbij op vijf locaties wel een andere woelmuissoort is gevangen: op de vanglocaties 2, 3, 12, 16 en 17 is de veldmuis (*Microtus arvalis*) gevangen. Na afloop van het inloopvallenonderzoek is op 10 van de 17 vanglocaties is naar woelmuiskeutels gezocht, dat is gebeurd op de vanglocaties 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 13, 15, en 16.

Op slechts 2 van de 10 locaties is het uiteindelijk gelukt om woelmuiskeutels te verzamelen, d.w.z. om keutels te verzamelen die vermoedelijk afkomstig waren van één van de volgende woelmuissoorten: veldmuis, noordse woelmuis, aardmuis (*Microtus agrestis*) of rosse woelmuis (*Myodes glareolus*).

Het minimale aantal samples wat per locatie (minimaal 5 samples) nodig is om met een behoorlijke mate van zekerheid de aan- of afwezigheid van noordse woelmuis vast te stellen, is nergens gehaald (zie ook bijlage 1). In raai 3 werden vier samples verzameld en in raai 16 slechts één sample. In een derde raai (raai 9) werd ook een keutel verzameld (en genetisch geanalyseerd), maar gezien de grootte van de keutel werd 'woelmuis' als producent van de keutel uitgesloten. De genetische analyse wees uit dat de gevonden keutels in raai 3 en raai 16 afkomstig waren van veldmuizen (die in dezelfde raai ook waren gevangen) en niet van de noordse woelmuis. De keutel uit raai 9 was zoals verwacht niet van een woelmuis, maar bleek afkomstig van een bruine rat (*Rattus norvegicus*).

3.2 Genetische variatie van keutelmonsters

In het onderzoek langs het Kanaal Omval-Kolhorn zijn geen keutels van noordse woelmuizen zijn gevonden, waarna als alternatief keutels van de noordse woelmuis zijn verzameld in de Vlaardingse Vlietlanden. De Vlaardingse Vlietlanden is een nat veengebied in beheer bij Natuurmonumenten, waar de noordse woelmuis van oudsher voorkomt. In dit gebied zijn door boswachter Guus van Oostwaard in oktober 2016 op vijf locaties keutels verzameld. Met behulp van deze keutels konden alsnog de onderzoeksvragen worden beantwoord met betrekking tot het *genereren van individuele genetische profielen* van noordse woelmuizen op basis van keutels.

Op vijf locaties in de Vlietlanden werd een mengmonster verzameld van een geheel keutelhoopje. Op drie van deze locaties werden tevens telkens twee

andere keutelhoopjes in detail bemonsterd (vijf losse keutels per hoopje). Een deel van deze aanvullende keutels was erg vochtig en/of waarschijnlijk al enkele dagen oud (pers. comm. Guus van Oostwaard). In tabel 1 staat een overzicht van alle monsters.

Uit de soort-specifieke analyse (stap 1) bleken alle mengmonsters uit de Vlaardingse Vlietlanden afkomstig te zijn van de noordse woelmuis (100% succes). Vervolgens is getracht van de mengmonsters goede microsatelliet-profielen te krijgen (stap 2). Dat is gelukt in drie van de vijf mengmonsters (60% succes).

In de volgende stap is gekeken of soortidentificatie mogelijk is met losse keutels (stap 3) en of losse keutels ook mooie genetische microsatelliet profielen opleveren (stap 4). Op drie locaties zijn twee extra keutelhoopjes gezocht en per keutelhoopje zijn vijf losse keutels verzameld en geanalyseerd (3 locaties x 2 hoopjes x 5 losse keutels = 30 analyses). In alle keutelhoopjes (van de losse keutels) was DNA van de noordse woelmuis aanwezig (één of meerdere keutels was van noordse woelmuis): 22 keutels waren afkomstig van de noordse woelmuis (73%), terwijl van 8 keutels de DNA-kwaliteit te laag was om de soort vast te stellen (27%). Bij drie van de vijf mengmonsters van keutelhoopjes was het mogelijk om een duidelijk microsatelliet profiel vast te stellen. Een profiel opstellen op basis van individuele keutels bleek echter slechts mogelijk voor 4 keutels (13%), allen afkomstig uit hetzelfde keutelhoopje. Opvallend was dat de keutels *twee duidelijk verschillende* profielen vertoonden, twee keutels met het ene profiel en 2 keutels met het andere profiel.

Tabel 1. Overzicht van de aantallen keutelmonsters uit de Vlaardingse Vlietlanden die zijn gebruikt om individuele genetische profielen te verkrijgen van noordse woelmuizen met behulp van een keutelhoopje of losse keutels.

Monster	Type monster	Soort_ID	Msat profiel
Locatie A hoopje 1	Keutelhoopje	Noordse woelmuis (NW)	Nee
Locatie B hoopje 1	Keutelhoopje	Noordse woelmuis (NW)	Ja
Locatie C hoopje 1	Keutelhoopje	Noordse woelmuis (NW)	Ja
Locatie D	Keutelhoopje	Noordse woelmuis (NW)	Ja
Locatie E	Keutelhoopje	Noordse woelmuis (NW)	Nee
Locatie A hoopje 2	5x losse keutel	3x NW, 2x te weinig DNA	Nee
Locatie A hoopje 3	5x losse keutel	4x NW, 1x te weinig DNA	Nee
Locatie B hoopje 2	5x losse keutel	5x NW	Nee
Locatie B hoopje 3	5x losse keutel	4x NW, 1x te weinig DNA	Nee
Locatie C hoopje 2	5x losse keutel	1x NW, 4x te weinig DNA	Nee
Locatie C hoopje 3	5x losse keutel	5x NW	Ja (4x)

Ter vergelijking zijn ook enkele referentie-monsters meegenomen bij het bepalen van de microsatelliet-profielen, waaronder verse keutels uit een inloopval. Deze keutels (n=3) leverden mooie profielen.

3.3 Uitvoering volgens protocol

Het verzamelen van keutels bleek in de praktijk (veel) lastiger dan verwacht. Op een aantal locaties was de vegetatie erg dicht, was de bodem heel drassig en/of was een dikke laag van organisch materiaal of mossen aanwezig. In dat laatste geval moest eerst een flinke laag materiaal worden weggehaald om gangen van kleine zoogdieren te vinden. Aangezien dit tijd kost, is een zoektijd van 10 minuten conform het gevolgde protocol (bijlage 1) aan de krappe kant. Het lijkt in de praktijk dan ook beter om een onderzoekslocatie volledig en systematisch af te zoeken (om het minimum van 5 keutelhoopjes te verzamelen), dan om een tijdslimiet te hanteren (zie ook het bijgestelde protocol in bijlage 2).

4 Discussie

Op basis van de resultaten van het onderzoek in 2016 langs het kanaal Omval-Kolhorn was het goed mogelijk om een groot aantal van de onderzoeksvragen te beantwoorden, met uitzondering van vraag 4 en 6C.

Het verzamelen en analyseren van noordse woelmuis keutels afkomstig uit de Vlaardingse Vlietlanden heeft belangrijke inzichten opgeleverd over de mogelijkheden om individuele genetische profielen vast te stellen met behulp van keutels (onderzoeksvraag 6) en hoe de kans op succes kan worden vergroten: door sterk te selecteren op versheid.

4.1 Onderzoeksvragen

1. *Waar langs het kanaal Omval-Kolhorn kan de noordse woelmuis worden aangetroffen middels de eDNA-methode?*

De noordse woelmuis is niet aangetroffen langs het kanaal Omval-Kolhorn: de soort is niet aangetoond met het inloopvallenonderzoek en is eveneens niet aangetoond met behulp van de eDNA methode. Het aantal verzamelde samples per locatie was erg laag (0-4 per locatie), waardoor het mogelijk is dat de soort is gemist op een aantal onderzoekslocaties.

2. *Zijn alle verzamelde keutelmonsters (eDNA monsters) geïdentificeerd als noordse woelmuis, of worden ook andere (woel)muizensoorten aangetroffen? En zo ja, welke soorten betreft dit?*

De noordse woelmuis is niet aangetroffen in de eDNA monsters die verzameld zijn langs het kanaal Omval Kolhorn. Wel zijn in twee raaien veldmuizen aangetroffen in de eDNA monsters. In dezelfde raaien zijn ook veldmuizen gevangen. In drie raaien waar wel veldmuizen zijn gevangen met inloopvallen is het niet gelukt om keutels te verzamelen.

3. *Laten de keutels die geïdentificeerd zijn als afkomstig van de noordse woelmuis ook onderlinge genetische variatie zien of is er geen sprake van genetische variatie tussen de gevonden keutels? (zie ook vraag 6)*

Let op, het gaat hier dus om de fundamentele vraag of er überhaupt verschil is in genetische variatie tussen keutels, niet zozeer hoe groot die eventuele genetische variatie is.

De keutels waarvan genetische profielen zijn vastgesteld waren afkomstig uit de Vlaardingse Vlietlanden. De gevonden profielen op basis van de keutels uit de Vlaardingse Vlietlanden verschillen tussen, maar ook in de keutelhoopjes. Zie ook vraag 6.

4. *Is identificatie van keutels verzameld in rietlanden een alternatief voor vangsten met valraaien, om de aanwezigheid van noordse woelmuizen in oeverlanden te bepalen?*

Gezien het ontbreken (ook in de vallen) van vondsten van noordse woelmuis in het onderzochte rietland (Omval Kolhorn) kan op basis van dit onderzoek niet worden vastgesteld of het vaststellen van de aanwezigheid van noordse woelmuizen met behulp van keutels een alternatief is voor vangsten met valraaien (maar zie La Haye 2017; La Haye & Dijkstra 2017).

5. *Dient het huidige protocol (zoals gebruikt door de Zoogdierverseniging) voor onderzoek naar noordse woelmuizen via eDNA te worden aangepast, en zo ja, op welke wijze?*

Op basis van de veldervaringen in 2016 is duidelijk geworden dat het hanteren van een tijdslijm niet handig is en dat beter gestreefd kan worden naar het verzamelen van *minimaal* vijf keutelhoopjes per locatie. Daarnaast is het aan te bevelen dat al in het veld gericht wordt gezocht naar verse keutels. Het neerleggen van keutelplankjes kan daarbij wellicht behulpzaam zijn.

6. *Is het mogelijk om op basis van keutelhoopjes individuele genetische profielen van noordse woelmuizen te bepalen?*

Uit dit onderzoeksproject is gebleken dat het mogelijk is om microsatelliet profielen vast te stellen op basis van genetische analyse van keutels.

A) *Is de monsterkwaliteit voldoende om naast soortidentificatie ook genetische profielen te bepalen op basis van microsatelliet-merkers?*

Ja, de monsterkwaliteit was in een aantal gevallen voldoende om genetische profielen vast te stellen, maar het succespercentage was aan de lage kant (13%). Het vaststellen van een profiel is mogelijk als de kwaliteit van het DNA in de keutels hoog genoeg is. Dat betekent dat keutels zo vers mogelijk moeten zijn.

B) *Wordt per keutelhoopje inderdaad slechts het profiel van één enkel individu waargenomen?*

Nee. In de meeste gevallen lijken keutelhoopjes slechts één profiel op te leveren, maar uit de analyse kwam ook één keutelhoopje waarvan de keutels twee verschillende profielen lieten zien. Het is dus mogelijk dat een keutelhoopje uit keutels van meerdere individuen bestaat en dat het profiel van een keutelhoopje daarmee ook afkomstig is van meerdere individuen.

C) *In hoeverre blijkt (op basis van de binnen deze pilotstudie verkregen individuele profielen) sprake van genetische variatie binnen de regio Omval-Kolhorn?*

Deze vraag kan niet worden beantwoord, omdat er geen noordse woelmuizen zijn aangetroffen.

D) Welke conclusies zijn er te trekken op basis van dit onderdeel, ten behoeve van een mogelijk toekomstig onderzoek naar de diversiteit in en mate van isolatie van (deel)populaties van noordse woelmuizen in de Provincie Noord-Holland?

Met behulp van de keutelmonsters is het goed mogelijk om de noordse woelmuis aan te tonen en met behulp van keutels kunnen microsatelliet-profielen worden vastgesteld. Voorwaarde is wel dat verse losse keutels worden verzameld. Oude keutels hebben enerzijds een lagere kwaliteit DNA en (oudere) keutelhoopjes kunnen zijn gemaakt door meerdere individuen.

Een studie naar de genetische diversiteit en mate van isolatie van (deel)populaties is prima uit voeren op basis van genetische analyse van keutelmonsters. Voorwaarde is dat in de verschillende (deel)populaties minimaal 20 onafhankelijke genetische profielen kunnen worden vastgesteld.

4.2 Praktijkervaring met vaststellen individuele profielen

Het blijkt in de praktijk lastig om keutels te verzamelen die voldoende vers zijn. Het verzamelen van zo vers mogelijke keutels is essentieel, omdat bekend is dat met name in natte keutels de DNA kwaliteit snel terugloopt (als gevolg van afbraak door microben). De wisselende resultaten met betrekking tot het vermogen om microsatelliet profielen op te stellen zijn dan ook te verklaren op basis van een combinatie van de *hoeveelheid* en *kwaliteit* van het beschikbare DNA in de keutels. In geval van mengmonsters van een keutelhoopje lijkt de totale hoeveelheid DNA in een meerderheid van de hoopjes voldoende om nog een profiel te kunnen vaststellen, zelfs bij geringe versheid van de keutels. Het feit dat bij één hoopje meerdere profielen werden vastgesteld geeft echter aan dat het belangrijk is om individuele keutels te bemonsteren (omdat een profiel van een hoopje uit meerdere individuele profielen kan bestaan).

Referentiemonsters van verse keutels leverden een 100% succes, maar bij geringe versheid blijkt de slagingskans voor individuele keutels lager.

Vermoedelijk was het keutelhoopje uit de Vlietlanden waarbij dit voor vier van de vijf losse keutels wel lukte wat verser.

Een dergelijk resultaat is overigens niet opvallend. Uit andere onderzoeken met keutelmonsters weten we dat, met name onder vochtige omstandigheden, een significant percentage van de keutels uitvalt in de analyse wegens een te slechte monsterkwaliteit. Bij otterkeutels (spraints) ligt de slagingskans standaard beneden de 50% (zie o.a. Kuiters et al. 2016).

Al met al is het dus van belang om bij bemonstering van woelmuizenkeutels al in het veld sterk te selecteren op versheid en waar mogelijk meerdere losse keutels per hoopje te bemonsteren (wegens zowel kans op uitval als kans op meerdere individuen per hoopje). Relevant is verder om de mogelijkheden te verkennen om de kans op verse keutels te vergroten, bijvoorbeeld door keutelplankjes neer te leggen (La Haye & Dijkstra 2017).

5 Conclusies en aanbevelingen

Langs het kanaal Omval Kolhorn zijn, ondanks een inloopvallenonderzoek en DNA analyse van gevonden keutels, in 2016 géén noordse woelmuizen aangetroffen. De gevonden keutels van woelmuizen bleken in alle gevallen toe te behoren aan veldmuizen.

Het zoeken van keutels in het veld bleek niet gemakkelijk, omdat op diverse locaties een dikke strooisellaag moest worden verwijderd om de muizengangetjes te vinden. Op andere plekken was de vegetatie zeer dicht of bemoeilijkte een dikke moslaag het zoeken naar keutels.

Het is mogelijk om op basis van verse keutels microsatelliet profielen van individuele noordse woelmuizen vast te stellen, maar hoopjes met keutels kunnen van meerdere individuen afkomstig zijn. Om individuele genetische profielen te bepalen is het noodzakelijk dat losse keutels worden verzameld. Het verzamelen van verse keutels vergroot de kans op resultaat in belangrijke mate.

Geconcludeerd kan worden dat het verzamelen van verse keutels de grootste uitdaging is voor het inventariseren van noordse woelmuizen in (potentieel) leefgebied. Het toepassen van keutelplankjes (La Haye & Dijkstra 2017) biedt het meeste perspectief op het snel en efficiënt verzamelen van (verse) keutels op basis van een gestandaardiseerde methodiek. Als een gestandaardiseerde inventarisatie-inspanning minder belangrijk is, dan is het aan te bevelen een onderzoekslocatie volledig en systematisch af te zoeken om voldoende (verse) keutels te verzamelen zonder dat er een tijdslimiet wordt gehanteerd.

6 Literatuurlijst

Broekhuizen S., Spoelstra K., Thissen J.B.M., Canters K.J., Buys J.C. (redactie) (2016) Atlas van de Nederlandse zoogdieren. Natuur van Nederland 12. Naturalis Biodiversity Center & EIS Kenniscentrum Insecten en andere ongewervelden, Leiden.

De Groot G.A., Hofmeester T.R., La Haye M., Jansman H.A.H., Perez-Haro M., Koelewijn H.P. (2015) Hidden dispersal in an urban world: genetic analysis reveals occasional long-distance dispersal and limited spatial substructure among Dutch pine martens. *Conservation Genetics*, 17, p. 111-123.

Herder J., Bellemain E., Witte R., Bekker D. & M. La Haye (2015) Noordse woelmuis inventariseren met eDNA. *De Levende Natuur*, 116, p. 67-69.

Koelewijn H.P., Pérez-Haro M., Jansman H.A.H., Boerwinkel M.C., Bovenschen J., Lammertsma D.R., Niewold F.J.J., Kuiters A.T. (2010) The reintroduction of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) into the Netherlands: hidden life revealed by noninvasive genetic monitoring. *Conservation Genetics* 11, p. 601–614.

Kuiters A.T., De Groot G.A., Lammertsma D.R., Jansman H.A.H., Bovenschen J. (2016) Genetische monitoring van de Nederlandse otterpopulatie - ontwikkeling van populatieomvang en genetische status 2015/2016. Wageningen: Alterra Wageningen UR, WOt-technical report 81.

La Haye, M. & Westra S. (2015) Veldonderzoek noordse woelmuis in het Oostzanerveld met eDNA. Rapport 2015.040. Bureau van de Zoogdierverseniging, Nijmegen.

La Haye, M. (2017) eDNA Noordse woelmuis Kop van Schouwen. Notitie N2017004, Zoogdierverseniging.

La Haye, M. & Dijkstra, V. (2017) Zoogdieren in Zuid-Holland: noordse woelmuis, bever in N2000-gebieden en konijntellingen. Rapport 2016.36. Zoogdierverseniging, Nijmegen.

Van der Straaten, M. (2016) Inventarisatie zoogdieren Omval-Kolhorn en Schermerringvaart. Rapport 2016-65. Van der Goes & Groot.

Bijlage 1 Protocol veldbemonstering voor het project Omval-Kolhorn

Protocol veldbemonstering keutels noordse woelmuis zoals toegepast voor (e)DNA-analyse in het project kanaal Omval-Kolhorn. Voor nieuwe onderzoeken die het protocol uit bijlage 2 te worden gebruikt.

Opgesteld door de Zoogdierverseniging & Alterra op 23 augustus 2016.

Het voorliggend protocol beschrijft de wijze waarop woelmuiskeutels in het veld verzameld moeten worden voor het genetisch onderzoek naar de noordse woelmuis langs het kanaal Omval-Kolhorn.

Benodigde materialen per voor het verzamelen van keutels:

- voldoende 5 ml eppendorf tubes (epjes/buisjes), gevuld met 3 ml ethanol (concentratie >96%)
- zip-lock plastic zakje
- pincet
- aansteker
- monsterformulier/veldboekjes (om gegevens over vegetatie en locatie op te schrijven)
- stokken om je zoekgebied af te bakenen
- GPS

1) de onderzoeklocatie(s)

Onderzoeksbureau Van der Goes en Groot heeft 10 vanglocaties (10 raaien) geselecteerd langs het kanaal Omval-Kolhorn om de aanwezigheid van noordse woelmuis aan te tonen ten behoeve van een project van de provincie Noord-Holland. Op dezelfde vanglocaties zullen ook keutels worden verzameld ten behoeve van het genetisch onderzoek van Alterra & de Zoogdierverseniging.

Uitgangspunt is dat gevangen zal gaan worden in het geschikt habitat voor de noordse woelmuis: kruidenrijke rietlanden/randen en natte graslanden langs het kanaal Omval-Kolhorn.

2) aantal keutelhoopjes per vanglocatie

Per vanglocatie hoeven, in principe, slechts 5 woelmuis-keutelhoopjes verzameld te worden, maar als de tijd het toelaat is het wenselijk en aan te bevelen zoveel mogelijk keutelhoopjes te verzamelen. Een vanglocatie is hetzelfde als een 'vallen-raai' bestaande uit 10 vallenparen (er vanuit gaande dat een raai bestaat uit 10 vangpunten, met op ieder vangpunt 2 vallen). Bij elk vallenpaar kan (moet) gezocht worden naar keutels. Per raai wordt bij minimaal 5 verschillende vallenparen naar woelmuiskeutels gezocht. *Doel is om minimaal 5 hoopjes te verzamelen.* Lukt het niet op bij een vallenpaar keutels te vinden, probeer het dan bij een ander vallenpaar. Woelmuis-keutelhoopjes zijn herkenbaar als een 'klein keutelhoopje', meestal gelegen op een 'wissel' of 'looppaadje' in de vegetatie, soms met vers afgebeten plantenstengels. Let op, bemonster waar mogelijk altijd zo vers mogelijke keutels. Hoe ouder de keutels zijn, hoe lager de kwaliteit van het DNA en hoe lager de kans op resultaat.

3) zoeken per vallenpaar in de 10 geselecteerde raaien

Bij elke vallenpaar (minimaal 5, maximaal 10) wordt in een straal van 2 meter rondom het vallenpaar gedurende maximaal 10 minuten gezocht naar een hoopje keutels. Het is handig om met stokken globaal het zoekgebied af te bakenen. Als binnen 10 minuten (stel de tijd in op je telefoon!) geen keutelhoopje gevonden is, dan geldt de zoekactie als een 0-waarneming (woelmuizen afwezig). Als er wel een keutelhoopje is gevonden, dan kan het zoeken direct worden gestaakt en de keutels worden verzameld. Als meerdere keutelhoopjes aanwezig zijn, kies dan voor het op het oog meeste verse keutelhoopje. Noteer de GPS-coördinaten van de puntlocatie en het nummer van de locatie op het veldformulier of in je veldboek. Schrijf ook de *verzamel-datum* op het formulier/boek en maak eventueel een inschatting van de ouderdom van de keutels. Het noteren van 0-waarnemingen (geen keutels) en net zo belangrijk als het noteren dat er wel keutels zijn verzameld. Registreer a.u.b. bij welke vallenparen is gezocht. Voor dit onderdeel zijn 100 gelabelde epjes beschikbaar.

4) verzamelen van extra keutels in 3 raaien

Bij een 3-tal raaien waar keutels gevonden zijn, worden 2 keutelhoopjes per raai in meer detail verzameld. Per individueel hoopjes worden 5 losse keutels in aparte epjes verzameld (dus 1 keutel per epje). De keus voor deze 3 raaien is aan de veldmedewerkers. Het ligt voor de hand te kiezen voor een raai waar gemakkelijk veel keutelhoopjes zijn te vinden. Voor dit onderdeel zijn 30 aparte gelabelde epjes beschikbaar.

5) verzamelen van de keutels

De gevonden keutels worden verzameld in een monsterbuisje (eppendorf tube van minimaal 5 ml), gevuld met 3 ml 96% ethanol. Zorg altijd voor voldoende ethanol in het buisje zodat alle vocht aan de keutels wordt onttrokken. Pak met de pincet een willekeurige keutel uit het hoopje en stop deze in de buis. Herhaal dit tot je in totaal *5 keutels hebt bemonsterd (met uitzondering van de extra hoopjes in de 3 raaien waar losse keutels worden verzameld)*. Bemonster alleen complete, niet verbrokkelde keutels. Zorg altijd voor een overmaat aan ethanol: 80% ethanol + 20% keutels. Zorg voor schoon materiaal dat bij het verzamelen slechts 1-malig wordt gebruikt (om kruisbesmetting te voorkomen) of *ontsmet je pincet na gebruik* (aansteker). Gebruik desnoods elke keer een verse (riet)stengel om keutels in het buisje te deponeren.

Doe de deksel terug op het epje/buisje en controleer of deze goed dicht zit. Keer de buis vervolgens voorzichtig een paar keer om, zodat alle keutels goed doordrenkt zijn van ethanol. Voorkom te hard schudden, zodat de keutels intact blijven.

Let op, watervaste stift kan uitgeveegd worden op plastic buisjes en lost op in ethanol. Stop daarom van tevoren een stukje papier met de codering van de puntlocaties alvast in het monsterbuisje.

Schrijf de codering met **potlood**. Alle epjes/buisjes van dezelfde raai worden samen bewaard in een ZIP-lock zakje. Stop in de zip-lock wederom een papiertje met het raai, datum en de locatie (potlood).

6) Bewaren en opslaan samples

Wanneer de monsters binnen 48 uur worden verstuurd naar de Zoogdierverseniging, bewaar de zak met epjes/tubes dan in de koeling (4°C). Worden monsters voor langere tijd opgespaard alvorens ze worden verstuurd, bewaar ze dan in de vriezer (-18°C).



Soort- en individuele herkenning van noordse woelmuis met eDNA

7) Versturen van de keutels

Stuur de 130 epjes in een doosje of in een envelop met bubbeltjesplastic naar:

*Zoogdiervereniging
t.a.v. eDNA onderzoek / Maurice La Haye
Antwoordnummer 98198
6500 VA Nijmegen*

Bijlage 2 Nieuw protocol veldbemonstering eDNA, versie 170217

Protocol veldbemonstering keutels noordse woelmuis voor (e)DNA-analyse.

Het voorliggende protocol beschrijft de wijze waarop woelmuiskeutels in het veld verzameld moeten worden om een non-invasief genetisch onderzoek naar de noordse woelmuis uit te voeren. Vooralnog is de methode van verzamelen specifiek gericht op de noordse woelmuis en de habitattypen waarin deze soort voorkomt. Of ook andere woelmuissoorten op deze wijze kunnen worden geïnventariseerd is (nog) niet bekend en vergt nader onderzoek.

Benodigde materialen per voor het verzamelen van keutels:

- voldoende 5 ml eppendorf tubes (buisjes), gevuld met 3 ml ethanol (concentratie >96%)
- zip-lock plastic zakje
- monsterformulier/veldboekjes (om gegevens over vegetatie en locatie op te schrijven)
- stokken om je zoekgebied af te bakenen
- GPS

1) selecteer van tevoren de onderzoeklocatie(s)

Net als bij vallenonderzoek is het nuttig en handig om van tevoren de te bemonsteren onderzoeklocaties te kiezen. Ga daarbij uit van het meeste geschikte habitat voor de noordse woelmuis: kruidenrijke rietlanden en natte graslanden.

2) aantal keutelhoopjes per meetlocatie

Per meetlocatie moeten 5 (liefst 10) woelmuis-keutelhoopjes gezocht en verzameld worden. Een meetlocatie is vergelijkbaar met een 'vallen-raai'. Ga bij het vaststellen van de meetlocaties uit van 'logische eenheden': een rietkraag, een eilandje, een specifiek grasveld of zegge-vegetatie. Per meetlocatie wordt op minimaal 5 (liefst 10) puntlocaties naar woelmuiskeutels gezocht. Woelmuis-keutelhoopjes zijn herkenbaar als een 'klein keutelhoopje', meestal gelegen op een 'wissel' of 'looppaadje' in de vegetatie, soms met vers afgebeten plantenstengels. Geadviseerd wordt om minimaal 10 meter afstand te houden tussen de puntlocaties. Let op, bemonster waar mogelijk altijd zo vers mogelijke keutels. Hoe ouder de keutels zijn, hoe lager de kwaliteit van het DNA en hoe lager de kans op resultaat. Als het doel is om individuele genetische profielen vast te stellen, dan dienen per keutelhoopje verschillende losse keutels verzameld te worden (meerdere individuen kunnen gebruik maken van hetzelfde keutelhoopje).

3) zoeken per puntlocatie

Op elke puntlocatie wordt in een straal van 2 meter rondom het gekozen punt gezocht naar een hoopje keutels of naar losse keutels. Het is handig om met stokken globaal het zoekgebied af te bakenen. In de praktijk blijkt dat de ene locatie meer zoektijd vergt dan een andere locatie. Neem de tijd om goed te zoeken. Als na een grondige zoekactie geen keutels worden gevonden, dan kan de zoekactie als een 0-waarneming worden genoteerd (woelmuizen afwezig). Het is momenteel nog niet goed mogelijk om aan te geven wat de minimaal zoekinspanning moet zijn voor een 'harde' 0-waarneming. Als er wel een keutelhoopje is gevonden, dan kan het zoeken worden gestaakt en de

keutels worden verzameld. Als meerdere keutelhoopjes aanwezig zijn, kies dan voor het op het oog meeste verse keutelhoopje.

Een alternatieve wijze van keutels verzamelen is het gebruik van keutelplankjes. Woelmuizen vinden het aantrekkelijk om op in het veld neergelegde plankjes te gaan markeren door middel van keutels. Door een raai met plankjes uit te leggen (bijvoorbeeld 10 plankjes van 10 cm x 10 cm die 20 meter uit elkaar liggen) kunnen op een gestandaardiseerde wijze keutels worden verzameld. Voordeel is bovendien dat de keutels dan met zekerheid 'vers' zijn.

In alle gevallen dienen de GPS-coördinaten van de meet- en puntlocaties te worden genoteerd op een veldformulier, in een veldboek of op een andere wijze. Schrijf ook de *verzamel-datum* op het formulier/boek en maak eventueel een inschatting van de ouderdom van de keutels.

4) verzamelen van de keutels

De gevonden keutels worden verzameld in monsterbuisje (eppendorf tube van minimaal 5 ml), gevuld met 3 ml 96% ethanol. Zorg altijd voor voldoende ethanol in het buisje zodat alle vocht aan de keutels wordt onttrokken. Pak met vers stengeltje of blaadje de meest verse complete keutel(s) uit het hoopje en stop deze in het buisje. Bij mengmonsters kan je dit herhalen tot je in totaal 5 keutels hebt bemonsterd. Voor het bepalen van individuele genetische profielen mag slechts 1 keutel per buisje worden verzameld. Bemonster alleen complete, niet verbrokkelde keutels en gebruik voor elke keutel een nieuw schoon stengeltje of blaadje om kruisbesmetting te voorkomen.

Zorg altijd voor een overmaat aan ethanol: 80% ethanol + 20% keutels. Zorg voor schoon materiaal dat bij het verzamelen slechts 1-malig wordt gebruikt (om kruisbesmetting te voorkomen. Gebruik bijvoorbeeld elke keer een verse (riet)stengel om keutels in het buisje te deponeren.

Doe de deksel terug op het buisje en controleer of deze goed dicht zit. Keer de buis vervolgens voorzichtig een paar keer om, zodat alle keutels goed doordrenkt zijn van ethanol. Voorkom te hard schudden, zodat de keutels intact blijven.

Gebruik voor elke puntlocatie een apart monsterbuisje, waarbij het handig is om de buisjes al van tevoren te merken en te vullen met ethanol (96%). Let op, watervaste stift kan uitgeveegd worden op plastic buisjes en lost op in ethanol. Stop daarom van tevoren een stukje papier met de codering van de puntlocaties alvast in het monsterbuisje. Schrijf de codering met **potlood**. De buisjes met keutels kunnen per meetlocatie of keutelhoopje gezamenlijk bewaard worden in een ZIP-lock zakje.

5) Bewaren en opslaan samples

Wanneer de monsters binnen 48 uur worden verstuurd naar de Zoogdiervereniging (of een andere organisatie), bewaar de zak met buizen dan in de koeling (4°C). Worden monsters voor langere tijd opgespaard alvorens ze worden verstuurd, bewaar ze dan in de vriezer (-18°C).

6) Versturen van de keutels

Stuur de buisjes in een doosje of in een envelop met bubbeltjesplastic naar:

Zoogdiervereniging
t.a.v. eDNA onderzoek / Maurice La Haye
Antwoordnummer 98198
6500 VA Nijmegen

Op welke wijze de verzamelde samples worden geanalyseerd, als mengmonster, als individueel monster, voor individuele genetische profielen of alleen op aan/afwezigheid noordse woelmuis en/of ook andere (woelmuis)soorten is afhankelijk van de onderzoeksvraag. De wijze van verzamelen en opslag van de keutels is echter in alle gevallen gelijk aan het bovenstaande protocol.

In de praktijk blijkt het verzamelen van keutels in het veld de belangrijkste bottleneck. Zorg voor goed geïnstrueerde veldmedewerkers die enerzijds weten wat geschikt habitat is voor de noordse woelmuis en die gemotiveerd zijn om daadwerkelijk keutels te vinden. Op sommige locaties zal letterlijk met de neus op de grond de bodem moeten worden afgespeurd op aanwezigheid van keutels.

Veel succes in het veld en met het verzamelen.