

## Themanummer

# Bieden nieuwe technologieën en innovatieve concepten de oplossing voor biodiversiteitsbehoud?



**Drones** en natuurbeheer • **eDNA** barcoding • Citizen science • Herintroducties  
Bedrijven en biodiversiteit • Natuurcompensaties

# eDNA barcoding

## Een vernuftige techniek met veelzijdige toepassingen in het huidige ecologische onderzoek en natuurbeheer

Rein Brys, David Halfmaerten, Hans Jacquemyn & Joachim Mergeay

eDNA barcoding is een moleculaire techniek die gebruikt wordt om ecologische en evolutionaire vragen te beantwoorden, maar die ook meer en meer kan worden toegepast in natuurbeheer en -behoud. In deze bijdrage proberen we bondig het principe en de werking van deze techniek toe te lichten en aan de hand van enkele voorbeelden te illustreren waartoe hij in staat is en waarvoor hij zoal kan worden gebruikt in het huidige ecologische onderzoek en natuurbeheer.

### eDNA barcodes: wat en hoe

De term 'DNA barcode' wordt gebruikt om een gestandaardiseerd kort DNA-fragmentje (ook wel sequentie genoemd) aan te duiden dat kan fungeren als een unieke merker voor de identificatie en detectie van om het even welk organisme op aarde. Deze fragmentjes kunnen rechtstreeks bekomen worden uit het weefsel of een afscheiding van een organisme (zoals haar, slijm, faeces ...). Daarnaast kunnen deze DNA-fragmentjes indirect via verfijnde isolatietechnieken worden opgepikt uit het milieu waarin een organisme heeft vertoefd. Ze worden dan met de term 'eDNA' (environmental DNA) aangeduid (Taberlet et al. 2012a, Yoccoz et al. 2012). In beide gevallen moet na isolatie het (e)DNA in een volgende stap worden vermeerderd (amplificatie) via het gebruik van soortspecifieke primers (voor een of enkele soorten) of universele primers (voor een grotere groep aan organismen) in een polymerasekettingreactie (PCR) (Bohmann et al. 2014). Zo worden voldoende hoge concentraties van het betreffende (e)DNA bekomen, waarmee op een betrouwbare manier identificatie of detectie van de soorten kan gebeuren door deze barcode(s) te vergelijken met een referentiebibliotheek van DNA barcodes (**Figuur 1**). De ontwikkeling van zulke referentiebibliotheken is cruciaal voor een vlotte identificatie van organismen, en wereldwijd worden op deze manier algemeen toegankelijke referentiebibliotheken aangelegd, zoals de Barcode of Life Database (BOLD) of de UNITE database voor schimmels (Köljalg et al. 2013). Wanneer DNA barcoding wordt aangewend om een hele groep van soorten uit een staal te identificeren, spreekt men van (e)DNA metabarcoding. Het spreekt voor zich dat het hierbij dan gaat om een veel groter aantal DNA barcodes die moeten worden getypeerd en geanalyseerd. Door de snelle ontwikkeling van Next Generation Sequencing technieken (kortweg NGS) zijn de mogelijkheden hierin de laatste jaren enorm toegenomen (Taberlet et al. 2012b, Bohmann et al. 2014).

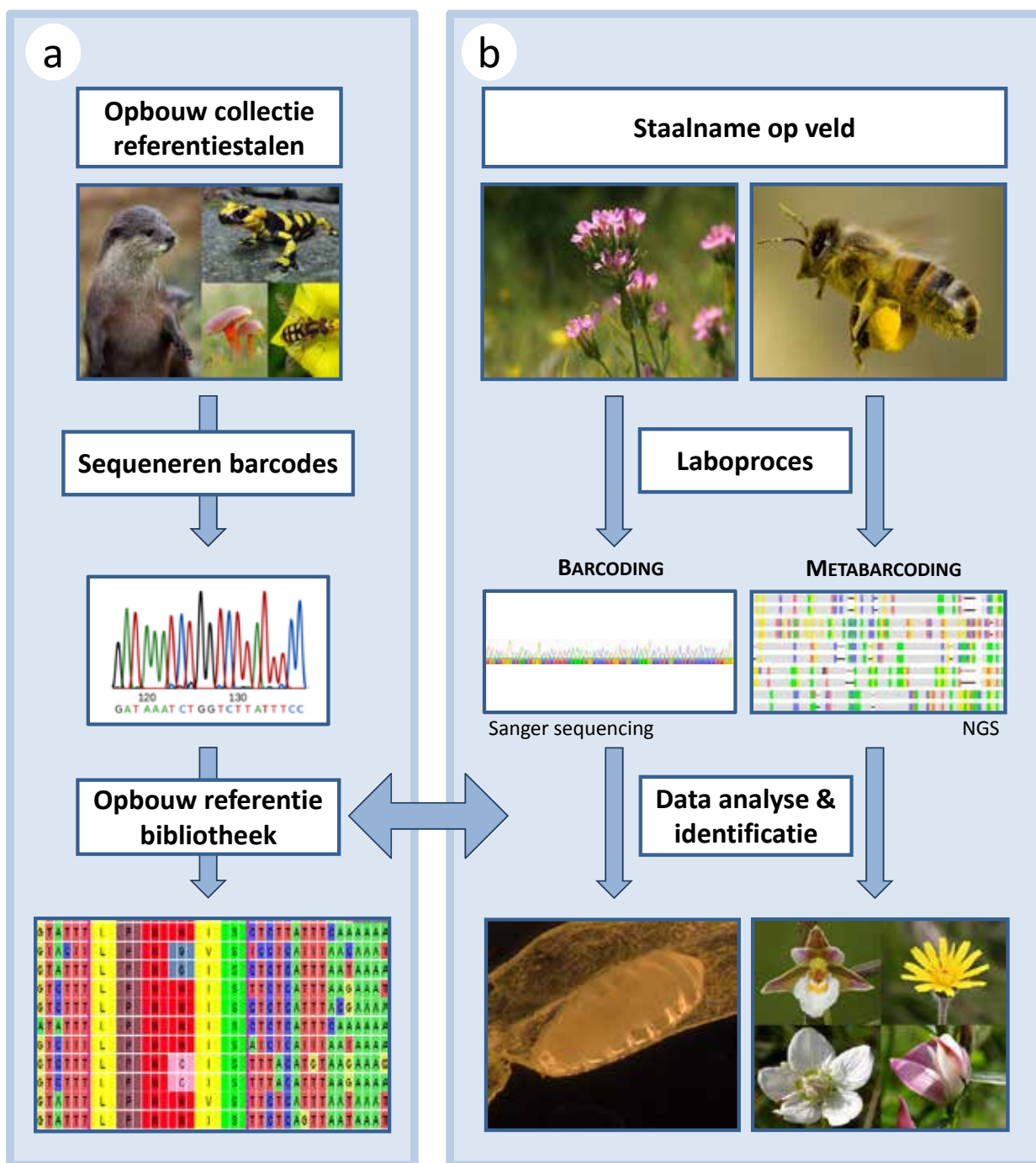
Algemeen bestaat het werkingsprotocol van DNA barcoding uit twee belangrijke stappen. Ten eerste moet voor elke gekende of onderzochte soort een correcte en betrouwbare referentie DNA barcode worden bekomen, die wordt gebundeld in een DNA barcodebibliotheek of referentiedatabank (**Figuur 1a**). Deze

bibliotheek van barcodes is met andere woorden een collectie van DNA-fragmenten waarvan men zeker is om welke soorten het gaat en waarbij idealiter ook het organisme wordt bewaard waarvan het staal werd genomen. Wanneer dan in een tweede stap een staal van een of meerdere ongeïdentificeerde organismen via barcoding moet worden geanalyseerd, kunnen deze naast deze referentiebibliotheek worden gelegd om tot de identificatie van de soort te kunnen komen (**Figuur 1b**). Wanneer het om een nieuwe onbeschreven soort gaat, kan via deze techniek info bekomen worden om uit te maken tot welk genus of welke soortengroep deze nieuwe soort kan worden ondergebracht. Deze laatste stap van toewijzing gebeurt via specifieke bio-informatische softwarepakketten, die gebruik maken van complexe algoritmes om op zoek te gaan naar de overeenstemmingen tussen vaak duizenden barcodes. Hoewel DNA barcoding met zijn afgeleide methoden nog in volle ontwikkeling is en kinderziektes en noodzakelijke verfijningen doormaakt, zijn de huidige mogelijkheden en toepassingen vandaag de dag al enorm. Voor de bepaling van eDNA zitten de grote uitdagingen en beperkingen vooral in een vlotte en betrouwbare extractie van de kleine hoeveelheden eDNA uit het milieu (water, bodem, lucht) en een goede opzuivering van deze DNA extracten om in een volgende stap de DNA barcodes gericht te kunnen amplificeren en uiteindelijk te kunnen identificeren en kwantificeren.

### Detectie en identificatie van soorten

DNA barcoding kan een erg efficiënte methode zijn om op een directe manier, op basis van weefsel, haar, slijm of faeces., soorten te detecteren en identificeren. Deze toepassing is uitermate bruikbaar wanneer het om soorten gaat die moeilijk te detecteren zijn en waarvoor een gedegen expertise noodzakelijk is of wanneer het soorten betreft die er een verborgen levenswijze op nahouden.

Zo wordt DNA barcoding reeds geruime tijd toegepast om soorten te identificeren die in een welbepaald levensstadium erg moeilijk op naam te brengen zijn. Dit soort problemen duikt bijvoorbeeld regelmatig op bij insecten die in hun larvale stadium vaak erg moeilijk te onderscheiden zijn, zoals veel minerende larven van vliegen, wespen en vlinders die zich

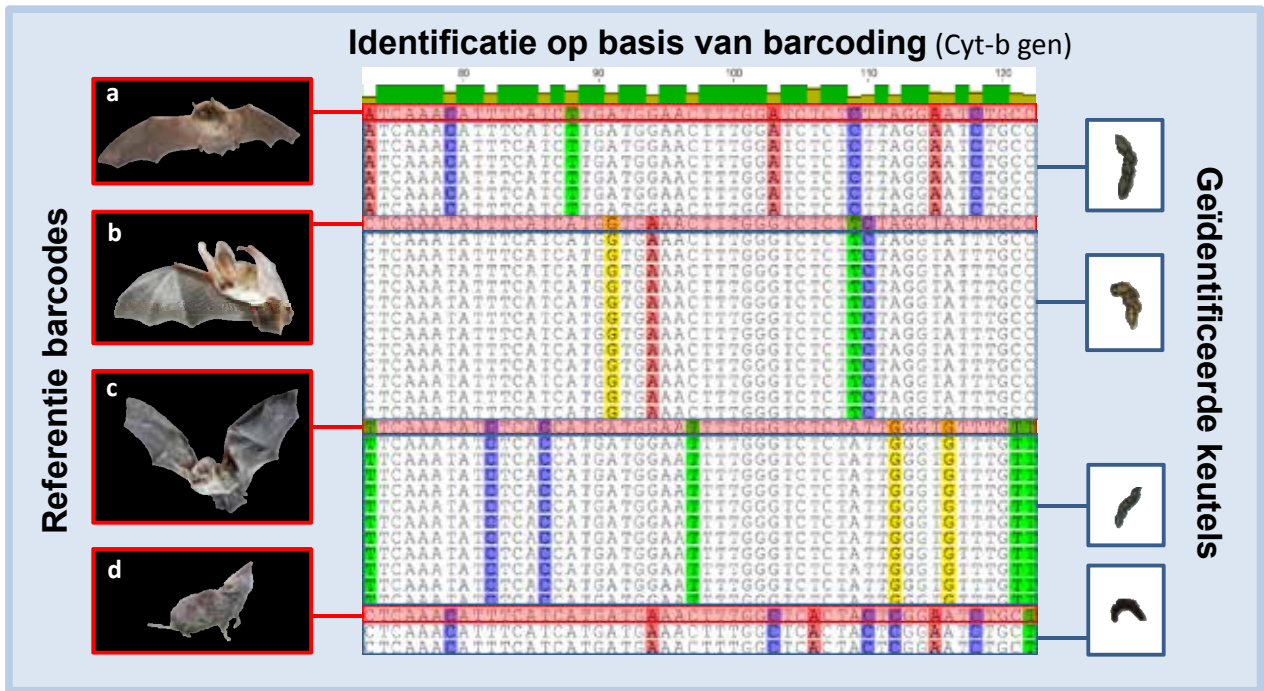


Figuur 1. Schematische voorstelling van a) de opbouw van een referentiedatabank bestaande uit DNA barcodes van gekende soorten en b) het vergelijken en linken van DNA barcodes afkomstig van ongekende soorten (links) of een mengstaal van soorten (rechts) met deze referentiedatabank ter identificatie van de betreffende ongekende soorten. In het linkse voorbeeld (barcoding) worden bladstalen genomen voor de identificatie van specifieke mineerders in de bladeren van een plant. In het rechtse voorbeeld worden pollenladingen op insecten verzameld en onderworpen aan het metabarcodingproces om de totale gemeenschap van planten die door het insect bezocht werden te bepalen, om betere inzichten te verwerven in de structuur van de associaties tussen bestuivers en planten.

voeden met het inwendige weefsel van planten (García-Robledo et al. 2013) (Figuur 1b).

Een ander mooi voorbeeld waarbij DNA barcoding erg bruikbaar is om dieren met een verborgen levenswijze te identificeren, zijn vleermuizen die op basis van hun keutels op naam kunnen worden gebracht. De waarneming en monitoring van vleermuizen is traditioneel een zeer moeilijke en tijdrovende klus die in combinatie met een gedegen expertise veel werk vereist tijdens

de nachtelijke uren. Het inzamelen van hun keutels daarentegen is een pak eenvoudiger en op basis van barcoding kan via hun DNA dat ze daarin hebben achtergelaten relatief eenvoudig worden achterhaald van welke soort deze keutels afkomstig zijn. Recent heeft het INBO op deze manier een barcodingprotocol uitgewerkt, waarmee op basis van individuele keutels alle in België voorkomende vleermuizen eenduidig op naam kunnen worden gebracht (Figuur 2). Hiermee werden in opdracht van Natuurpunt reeds honderden keutels onderzocht. Deze waren



Figuur 2. Schematisch overzicht van hoe ongeïdentificeerde keutels via DNA barcodes tot soorten kunnen worden toegewezen: a) Nimfvleermuis, b) Gewone grootoorvleermuis, c) Grijsje grootoorvleermuis en d) Huisspitsmuis.

afkomstig van rust- en verblijfplaatsen zoals oude gebouwen of kerkzolders en werden verzameld om te kunnen achterhalen welke soorten op deze verschillende locaties aanwezig zijn (Willems & Yskout 2014). Dit geeft de mogelijkheid om bijvoorbeeld bij renovatie of beheer van oude gebouwen op een vlotte manier na te gaan welke vleermuizen er mogelijk aanwezig zijn om indien nodig passende maatregelen te kunnen nemen. Deze methode heeft recent ook geleid tot de bevestiging van de eerste waarnemingen van de Nimfvleermuis *Myotis alcaethoe* in België (Nyssen et al. 2015).

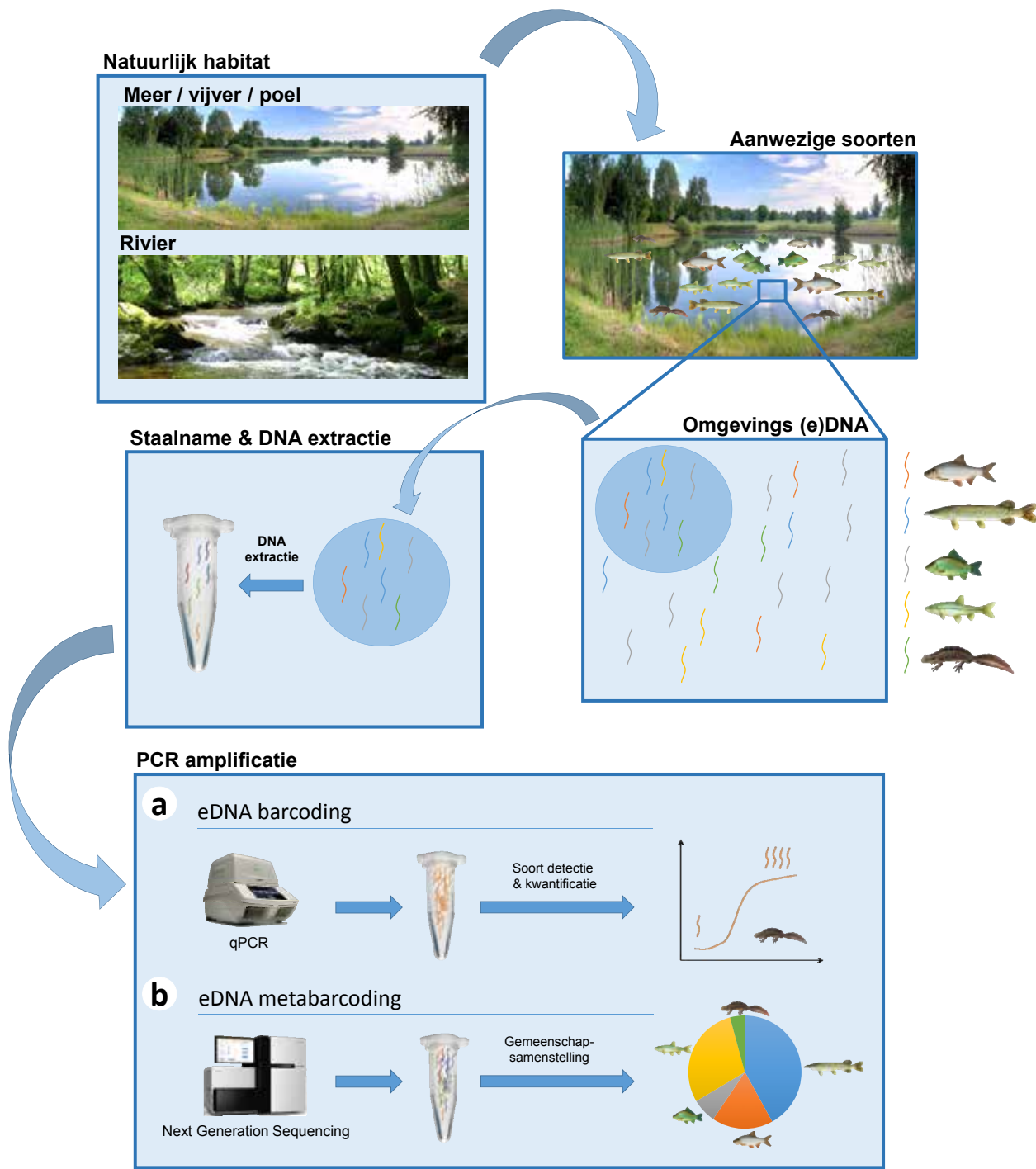
Zoals eerder aangehaald laten de meeste organismen in de omgeving waarin ze vertoeven sporen na onder de vorm van eDNA. Barcoding kan dan ook worden toegepast om de aanwezigheid van welbepaalde doelsoorten in het milieu te detecteren en zelfs hun abundantie of dichtheid in te schatten via afgeleide technieken zoals bijvoorbeeld kwantitatieve PCR (qPCR) of droplet digital PCR (ddPCR) technieken. Deze methoden zijn zeer gevoelig, waardoor ze erg geschikt zijn om de aanwezigheid en verspreiding van zeldzame soorten na te gaan of invasieve soorten vroegtijdig op te sporen, zodat ze op een passende en efficiënte manier respectievelijk kunnen worden beschermd of bestreden. Doordat het eDNA dat door een organisme in de omgeving wordt vrijgesteld vaak ook weer snel wordt afgebroken, door bijvoorbeeld UV-straling of microbiële activiteit, geeft de aanwezigheid van eDNA in de meeste gevallen een relatief betrouwbare inschatting van de effectieve huidige aanwezigheid van deze soort(en). Voor organismen die zich in water ophouden kan deze toepassing erg interessant zijn omdat de detectie van aquatische soorten en de inschatting van hun populatiegroottes vaak moeilijk en arbeidsintensief is. Daarbij komt dat de traditionele vangstechnieken erg ingrijpend kunnen zijn voor de betreffende populaties en slechts ruwe schattingen opleveren rond de aan- of afwezigheid van een soort en de grootte van de

populaties. Het gebruik van qPCR methoden op basis van eDNA heeft de laatste jaren zijn efficiëntie bewezen voor de detectie en kwantificatie van invasieve soorten zoals de Amerikaanse stierkikker *Lithobates catesbeianus* (Dejean et al. 2012) of erg zeldzame habitatrichtlijnsoorten zoals de Kamsalamander *Triturus cristatus* (Biggs et al. 2015) en de Grote modderkruiper *Misgurnus fossilis* (Sigsgaarde et al. 2015) (Figuur 3a), waarvoor we ook in Vlaanderen verplicht zijn deze soorten op regelmatige tijdstippen te monitoren en te rapporteren.

Een ander voorbeeld waarvoor deze techniek erg bruikbaar zou kunnen zijn, is dat van de huid-etende Aziatische ‘moordschimmel’ chytride *Batrachochytrium salamandrivorans*. Deze schimmel is de laatste jaren in West-Europa verantwoordelijk voor massale sterfte bij salamanders (Martel et al. 2014, Spitzen-van der Sluijs et al. 2016). Zo zou in Nederland nog slechts minder dan 0,1 % van de totale populatie Vuursalamanders in leven zijn in vergelijking met de status in 2010. Op basis van een kleine hoeveelheid slijm afkomstig van de huid van de betreffende dieren (d.m.v. swabstalen) is men reeds in staat om via PCR snel te kunnen nagaan of een individu of populatie al dan met deze schimmel geïnfecteerd is (Bloom et al. 2013). Men is nu koortsachtig aan het werk om een detectieprotocol te ontwikkelen dat grootschalige screening van omgevingsstalen (van zowel water als bodem) op eDNA resten van deze schimmel toelaat. Dit kan dan hopelijk helpen om deze epidemie op een efficiëntere manier op te volgen en waar mogelijk in te perken, en zo onze inheemse salamanderpopulaties voor uitsterven te behoeden.

### Bepaling van soortenrijkdom en structuur van gemeenschappen

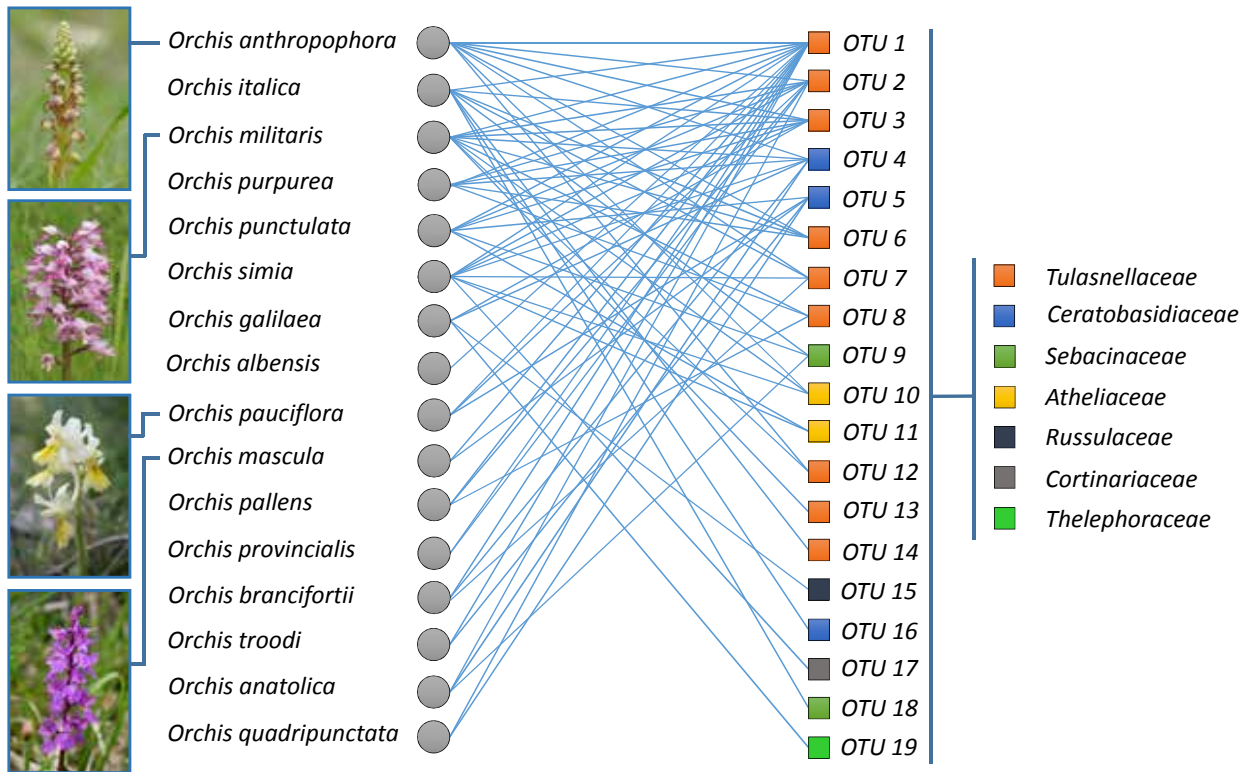
In veel gevallen is de volledige diversiteit aan soorten in een bepaald habitat of biotoop nog onvolledig gekend of



Figuur 3. Schematisch overzicht van hoe via eDNA barcoding één doelsoort of via eDNA metabarcoding een volledige soortengemeenschap in aquatische milieus kan worden opgepikt, geïdentificeerd en gekwantificeerd. Via (a) de kwantitatieve PCR methode kan aan de hand van amplificatie-curves de abundantie van een welbepaald organisme worden ingeschat, terwijl via (b) Next Generation Sequencing het (e)DNA van een soortengroep wordt geamplificeerd om van elke soort een beeld te bekomen van de aanwezigheid en het relatieve aandeel in het staal en de omgeving.

onvoldoende in kaart gebracht. Hierbij gaat het doorgaans om erg soortenrijke biotopen zoals het tropische regenwoud of oceanen, omgevingen die moeilijk in kaart te brengen zijn zoals de bodem, water of boomkruinen, of om soortengroepen waarbij het moeilijk en erg arbeidsintensief is om de soortenrijkdom te bepalen (invertebraten, schimmels ...). Hiervoor is de ontwikkeling van metabarcoding via NGS een erg geschikte techniek, aangezien dit de mogelijkheid geeft om een groot aantal barcodes van veel soorten in een keer te kunnen analyseren (Taberlet et

al. 2012b) (**Figuur 1b**). Hierbij kan zowel een mengstaal van het weefsel van een groot aantal organismen (bv. een bulk aan gevangen insecten) of eDNA uit omgevingsstalen (zoals bodem, water of lucht) in detail worden geanalyseerd om de totale aanwezige soortenrijkdom te bepalen. Deze methodiek heeft de laatste jaren al tot veel nieuwe inzichten geleid rond de ecologie en het voorkomen van diverse soortengroepen en de soortenrijkdom van veel biotopen (Yinju et al. 2013, Yu et al. 2012).



Figuur 4. Voorbeeld van hoe via DNA metabarcoding orchidee-schimmel interacties in kaart kunnen worden gebracht. Lijnen vertegenwoordigen paarsgewijze interacties tussen de schimmel (hier aangeduid met OTU (Operational Taxonomic Unit)) en de orchidee, waarbij de schimmels gerangschikt zijn volgens het aantal interacties dat ze hebben met de verschillende orchideeën. (bron Jacquemyn et al. 2011)

Eén daarvan zijn de mycorrhizale bodemschimmels, of simpelweg paddenstoelen, waarbij door het inzetten van eDNA metabarcoding niet langer de vruchtlichamen (paddenstoelen) nodig zijn om hun soortenrijkdom in te schatten. Door gebruik te maken van deze methode volstaat het om bodemstalen te verzamelen en deze te analyseren (Öpik & Davison 2016). Inzichten rond de ecologie, het voorkomen en de soortenrijkdom van deze mysterieuze tak van organismen zijn dankzij de opkomst en verfijning van deze techniek de laatste jaren dan ook exponentieel toegenomen (Urbina et al. 2016). Er wordt verwacht dat de klassieke veldmethoden in de mycologie de komende jaren bijna volledig zullen worden overgenomen door eDNA metabarcoding (Hart et al. 2015). Een ander mooi voorbeeld dat de kracht en inzetbaarheid van deze methodiek illustreert, komt van Deense onderzoekers die op basis van bodemstalen afkomstig van uiteenlopende biotopen in staat waren de taxonomische diversiteit aan dieren in kaart te brengen die er bovengronds in rondliepen (Andersen et al. 2011).

Het gebruik van eDNA metabarcoding geeft de mogelijkheid om, naast de identificatie en detectie van een groot aantal organismen, ook een inschatting te bekomen van het relatieve aandeel van elk van deze soorten in de betreffende soortenpool. Recent onderzoek door het INBO heeft bijvoorbeeld aangetoond dat de samenstelling van volledige visgemeenschappen op deze manier accuraat in kaart kan worden gebracht. Op basis van gecontroleerde experimenten in grote bassins, in combinatie met complete afvissingen van natuurlijke vijvers die voordien werden afgelaten, bleek namelijk dat naast nauwkeurige detectie van de aanwezige vissoorten ook een betrouwbaar beeld kon worden bekomen van de relatieve biomassa waarin de verschillende vissoorten

voorkwamen (Figuur 3b). Het spreekt voor zich dat deze methodologie op termijn enorme mogelijkheden schept om poelen, meren, rivieren en zelfs zeeën op een efficiënte en weinig versturende manier grondig te screenen. Zo kunnen ook beheeringrepen en de status van het habitat in de tijd worden gemonitord. Hierbij moet echter wel opgemerkt worden dat uit deze soort informatie moeilijk conclusies kunnen getrokken worden naar aantal individuen van de betreffende soorten, aangezien het moeilijk is te schatten is of het eDNA afkomstig is van één groot exemplaar dan wel van verschillende kleine of jonge individuen.

### In kaart brengen van biotische interacties en netwerken

DNA metabarcoding levert ook de mogelijkheid om voedselrelaties of 'trofische interacties' tussen soorten, zoals plant-schimmel, plant-insect of predator-prooi, in kaart te brengen. Het is opnieuw erg geschikt om dit te doen voor omgevingen of soortengroepen die moeilijk te doorgronden zijn, zoals moeilijk te onderzoeken interacties tussen boven- en ondergrondse gemeenschappen.

Recent onderzoek aan de KU Leuven naar de symbiotische associaties tussen orchideeën en hun noodzakelijke bodemschimmels heeft aangetoond dat de Duinwespenorchis *Epipactis neerlandica*, waarvan niet duidelijk is of het nu om een aparte soort gaat dan wel om een ondersoort van Breedbladige wespenorchis *E. helleborine*, associeert met volledig andere schimmelgemeenschappen dan de Breedbladige wespenorchis (Jacquemyn et al. 2016). Bijkomend hebben inzaai-experimenten aangetoond dat de zaden van beide soorten enkel succesvol kiemen met de

schimmels waarmee de ouderplanten in het veld associëren en dat ze niet of moeizaam kiemen op locaties waar de andere (onder)soort voorkomt. Onderzoek in het geslacht *Orchis* toonde dan weer aan dat sommige soorten zoals Mannetjesorchis *Orchis mascula* erg specialistisch en dus selectief zijn in de associaties die ze aangaan met mycorrhizale schimmels, terwijl andere soorten zoals Soldaatje *Orchis militaris* en Poppenorchis *Orchis anthropophora* er net een erg generalistische houding op nahouden en met een groot aantal schimmels een samenwerkingsverband aangaan (Jacquemyn et al. 2011) (Figuur 4). De beperkte aanwezigheid van de noodzakelijke schimmels in de bodem is in veel gevallen dan ook verantwoordelijk voor het typische geclusterde karakter en vaak erg beperkte voorkomen van orchideeën (Jacquemyn et al. 2012, Waud et al. 2016).

DNA metabarcoding kan ook worden aangewend om het dieet van grote grazers, invertebraten, frugivore vogels en zelfs roofdieren in kaart te brengen (Deagle & Tollit 2007, Pompanon et al. 2012). Het spreekt echter voor zich dat degradatie van DNA tijdens het verteringsproces hierin wel een beperkende factor kan zijn en de betrouwbaarheid van dit soort toepassingen kan beïnvloeden. Hierbij kan DNA van de gastheer of prooi rechtstreeks uit de maaginhoud worden bekomen, maar kunnen ook de faeces van de betreffende soorten worden onderzocht op sporen van hun prooien. Zo waren González-Varo et al. (2014) recent in staat om een netwerk op te stellen van frugivore vogels die verantwoordelijk waren voor de verbreiding van de zaden van een groot aantal besdragende plantensoorten. Een ander, gelijkaardig toepassingsveld waarin eDNA metabarcoding op termijn erg nuttig kan zijn, is het ontrafelen van plant-bestuiver interacties (Pornon et al. 2016). Metabarcoding kan hierbij een erg geschikte methode zijn om op een efficiënte manier na te gaan van welke plantensoorten de bloembezoekende insecten pollen meedragen (Keller et al. 2015) (Figuur 1b). Dit soort informatie zal ongetwijfeld erg bruikbare inzichten kunnen aanleveren in het onderzoek naar de consequenties van de algemene bestuivercrisis of bij het in kaart brengen van ecosysteemdiensten.

Doordat parasitaire bloedzuigende invertebraten (zoals luizen, vlooien, teken, vliegen en muggen) zich vaak voeden met een groot aantal potentiële gastheersoorten, en de sporen van deze gastheren vaak weken tot maanden in het spijsverteringsstelsel van deze parasitaire soorten bewaard blijven, kan men hun aanwezigheid indirect bepalen door de maaginhoud van deze soorten via eDNA metabarcoding te onderzoeken. Een mooi voorbeeld hiervan werd geleverd in het tropische regenwoud van Vietnam. Daar hebben onderzoekers via deze weg de aanwezigheid van het erg zeldzaam endemisch Annamitisch gestreept konijn *Nesolagus timminsi* en de Chinese zonnedas *Melogale moschata* kunnen aantonen in de maaginhoud van terrestrische bloedzuigers, terwijl ze niet in staat waren de aanwezigheid van deze soorten te bevestigen na analyse van beelden die werden genomen met cameravallen die gedurende verschillende jaren in hetzelfde gebied werden opgesteld (Schnell et al. 2012).

### (On)beperkte mogelijkheden?

Hoewel (e)DNA (meta)barcoding een beloftevolle techniek is, kent ze echter ook beperkingen en is er nog veel onderzoek nodig

om de methode op grotere schaal inzetbaar te maken en de betrouwbaarheid verder te verfijnen.

Hierbij is een van de grote uitdagingen in natuurlijke systemen het regelmatig voorkomen van vals positieve (detectie van de soort terwijl ze er in werkelijk niet is) of vals negatieve (geen detectie van de soort terwijl ze wel degelijk aanwezig is) resultaten. Vals positieve detectie kan bijvoorbeeld worden veroorzaakt door historisch eDNA aanwezig op een bepaalde locatie, door eDNA afkomstig van een andere locatie (bijvoorbeeld in stromende wateren), of door contaminatie tijdens staalname of aansluitende analyses. En vals negatieve resultaten kunnen voorkomen bij een te lage concentratie van het eDNA, als de primers die het eDNA moeten amplificeren niet specifiek of efficiënt genoeg zijn, of als er inhibitie optreedt doordat de DNA extracten niet voldoende zuiver zijn. Hierbij moet worden opgemerkt dat de nauwkeurigheid van deze techniek ook bepaald wordt door de volledigheid van de referentiebibliotheek waartegen de stalen worden vergeleken. Wanneer de DNA barcodes van bepaalde soorten in deze referentiebibliotheek ontbreken, of wanneer ze tot een verkeerde soort worden toegewezen, zullen soorten worden gemist of fout worden geïdentificeerd, wat eveneens tot vals negatieve of vals positieve resultaten kan leiden.

Wanneer (e)DNA (meta)barcoding wordt toegepast om de aanwezigheid van soortengroepen correct te kwantificeren, wordt het hoe langer hoe meer duidelijk dat bijkomende informatie rond soortspecifieke productie en afgifte van eDNA nodig is. Op basis hiervan kunnen dan correctiefactoren worden ingebouwd om tot een juistere inschatting van de werkelijke dichtheden te komen. Het mag echter duidelijk zijn dat hoe complexer de soortensamenstelling en dus het DNA-extract, hoe moeilijker het is om een correcte inschatting van de gemeenschapsstructuur te maken.

Verder is er ook een groeiende noodzaak voor de afbakening van gestandaardiseerde werkprotocollen en richtlijnen op het niveau van staalname, moleculaire analyses, uiteindelijke verwerking, opbouw van referentiedatabanken, etc. Dit is noodzakelijk opdat stalen op een reproduceerbare manier uniform door verschillende labo's kunnen worden onderzocht, om zo op een betrouwbare manier aan ruimtelijke en temporele monitoring van de biodiversiteit te kunnen doen.

Tot slot spreekt het voor zich dat door de complexiteit van de moleculaire- en biostatistische protocollen een gespecialiseerde infrastructuur en voldoende expertise vereist zijn. Ook zijn de toestellen, het materiaal en de reagentia voor de toepassing van (e)DNA (meta)barcoding voorlopig nog erg kostelijk, waardoor slechts een beperkt aantal labo's in staat is dit soort onderzoek uit te voeren.

### Conclusie

Uit het voorgaande mag duidelijk zijn dat (e)DNA (meta)barcoding voor verschillende facetten van het hedendaagse natuurbeheer en -beleid velerlei toepassingen kan hebben. Vooral in het licht van biodiversiteitsonderzoek en de monitoring van doelsoorten en soortengemeenschappen die moeilijk te identificeren zijn of zich in moeilijk te onderzoeken biotopen ophouden, is deze methode erg geschikt om op termijn te worden ingezet. Bijkomend voordeel

hierbij is dat de waarnemer niet noodzakelijk in het veld hoeft te gaan op het moment dat de doelorganismen actief zijn. Ook hoeven de betreffende organismen zich niet noodzakelijk in de juiste levensfase te bevinden om gedetermineerd te kunnen worden, en zijn de staalnameprotocollen vaak redelijk eenvoudig. Hierdoor is er dus slechts een beperkte expertise nodig om het veld in te trekken, wat toelaat om een groot aantal mensen in te schakelen om op staalname te gaan ('citizen science', zie Herremans

in dit nummer, p. 102-107). Doordat ook de toepassingen van NGS steeds toegankelijker en kosteneffectiever zullen worden, zal dit op termijn ongetwijfeld de mogelijkheid bieden om met een grotere resolutie, frequenter en diepgaander de biodiversiteit in kaart te brengen. Ondanks deze beloftevolle mogelijkheden mag het duidelijk zijn dat (e)DNA (meta)barcoding een techniek is die ook zijn beperkingen heeft en dus helaas geen allesomvattende heilige graal is voor het toekomstige natuurbeheer.

## SUMMARY

**Brys R., Halfmaerten D., Jacquemyn H. & Mergeay J. 2016. eDNA barcoding. An ingenious technique with versatile applications in current ecological research and nature conservation. *Natuur.focus* 05(3): 114-120 [in Dutch]**

Extraction of DNA fragments directly from a target organism (DNA barcodes) or from an environmental sample (eDNA barcodes) has proven to be very useful for the identification and detection of a large number of species in variable environments. This methodology not only allows to determine species diversity and to quantify community composition, it is also a very useful tool for detecting rare species or difficult-to-sample taxa. Here we examine the current frontiers of (e)DNA, outline key aspects requiring improvement and suggest its potential for ecological research and nature conservation. Although there are still numerous technical challenges that need to be taken into account, we believe that eDNA barcoding represents a valuable addition to the toolkit of the 21st century ecologist and conservationist.

## AUTEURS

Rein Brys, David Halfmaerten en Joachim Mergeay zijn werkzaam aan het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek binnen de onderzoeksgroep Genetische Diversiteit.

Hans Jacquemyn is professor aan het labo voor plantendiversiteit en populatiebiologie van het departement Biologie (KU Leuven).

## CONTACT

Rein Brys, Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Gaverstraat 4, 9500 Geraardsbergen

E-mail: rein.brys@inbo.be

## REFERENTIES

Andersen K., Bird K.L., Rasmussen M., Haile J., Breuning-Masen H., Kjaer K.H. et al. 2011. Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology* 21: 1966-1979.

Biggs J., Ewald N., Valentini A., Gaboriaud C., Dejean T., Griffiths R.A. et al. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the Great Crested Newt *Triturus cristatus*. *Biological Conservation* 183: 19-28.

Blooi M., Pasmans F., Longcore J.E., Spitzen-van der Sluij A., Vercammen F. & Martel A. 2013. Duplex real-time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 4173-4177.

Bohmann K., Evans A., Thomas M., Gilbert P., Carvalho G.R., Creer S. et al. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology and Evolution* 29: 358-369.

Deagle B.E. & Tollit D.J. 2007. Quantitative analysis of prey DNA in pinniped faeces. Potential to estimate diet composition? *Conservation Genetics* 8: 743-747.

Dejean T., Valentini A., Miquel C., Taberlet P., Bellemain E. & Miaud C. 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding. The example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology* 49: 953-959.

García-Robledo C., Erickson D.L., Staines C.L., Erwin T.L. & Kress W.J. 2013. Tropical plant-herbivore networks. Reconstructing species interactions using DNA barcodes. *Plos ONE* <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052967>.

González-Varo J.P., Arroyo J.M. & Jordano P. 2014. Who dispersed the seeds? The use of DNA barcoding in frugivory and seeds dispersal studies. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 806-814.

Hart M., Aleklett K., Chagnon P.L., Egan C., Ghignone S., Helgason T. et al. 2015. Navigating the labyrinth. A guide to sequence-based, community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 207: 235-247.

Jacquemyn H., Merckx V., Brys R., Tyteca D., Cammue B.P.A., Honnay O. et al. 2011. Analysis of network architecture reveals phylogenetic constraints on mycorrhizal specificity in the genus *Orchis*. *New Phytologist* 192: 518-528.

Jacquemyn H., Brys R., Honnay O., Roldán Ruiz I., Lievens B. & Wiegand T. 2012. Nonrandom spatial structuring of orchids in a hybrid zone of three *Orchis* species. *New Phytologist* 193: 454-464.

Jacquemyn H., Lievens B., Waud M. & Brys R. 2016. Differences in mycorrhizal communities between *Epipactis palustris*, *E. helleborine* and its presumed sister species *E. neerlandica*. *Annals of Botany* 118: 105-114.

Keller A., Danner N., Grimmer G., Ankenbrand M., von der Ohe K., von der Oh, W. et al. 2015. Evaluating multiplexed next-generation sequencing as a method in palynology for mixed pollen samples. *Plant Biology* 17: 558-566.

Köjalg U., Larsson K.H., Abarenkov K., Nilsson R. H., Alexander I.J., Eberhardt U. et al. 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi.

Martel A., Spitzen-van der Sluijs A., Blooi M., Bert W., Ducatelle R., Fisher M.C. et al. 2014. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 15325-15329.

Nyssen P., Smits Q., Van de Sijpe M., Vandendriessche B., Halfmaerten D. & Dekeukeleire D. 2015. First records of *Myotis alcaethoe* in Belgium. *Belgian Journal of Zoology* 145: 130-136.

Öpik M. & Davison J. 2016. Uniting species- and community-oriented approaches to understand arbuscular mycorrhizal fungal diversity. *Fungal Ecology* (in druk).

Pompanon F., Deagle B.E., Symondson W.O.C., Brown D.S., Jarman S.N. & Taberlet P. 2012. Who is eating what? Diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology* 21: 1931-1950.

Pornon A., Escaravage N., Burrus M., Holota H., Khimoun A., Mariette J. et al. 2016. Using metabarcoding to reveal and quantify plant-pollinator interactions. *Scientific Reports* 6: 27282.

Schnell I.B., Thomsen P.F., Wilkinson N., Rasmussen M., Jensen L.R.D., Willerslev E. et al. 2012. Screening mammal biodiversity using DNA from leeches. *Current Biology* 22: R262-R263.

Siggsgaarde E.E., Carlb H., Møller P.R. & Thomsen P.F. 2015. Monitoring the near-extinct European Weather Loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation* 183: 46-52.

Spitzen-van der Sluijs A., Martel A., Asselberghs J., Bales E.K., Beukema W., Bletz M.C. et al. 2016. Expanding distribution of lethal amphibian fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 22: 1286-1288.

Taberlet P., Coissac E., Hajibabaei M. & Rieseberg L.H. 2012a. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 1789-1793.

Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Brochmann C. & Willerslev E. 2012b. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 21: 2045-2050.

Urbina H., Scofield D.G., Cafaroc M. & Rosling A. 2016. DNA-metabarcoding uncovers the diversity of soil-inhabiting fungi in the tropical island of Puerto Rico. *Mycoscience* 57: 217-227.

Waud M., Wiegand T., Brys R., Lievens B. & Jacquemyn H. 2016. Nonrandom seedling establishment corresponds with distance-dependent decline in mycorrhizal abundance in two terrestrial orchids. *New Phytologist* 211: 255-264.

Willems W. & Yskout S. 2014. Vleermuizen op (kerk)zolders in Vlaams-Brabant. Onderzoek naar voorkomen en potenties, met adviezen voor beheer van historische gebouwen en omliggende landschappen. Rapport Natuurpunt Studie 2014/22, Mechelen.

Yingqi J., Ashton L., Pedley S.M., Edwards D.P., Tang Y., Nakamura A. et al. 2013. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters* 16: 1245-1257.

Yoccoz, N.G. 2012. The future of environmental DNA in ecology. *Molecular Ecology* 21: 2031-2038.

Yu D.W., Ji Y., Emerson B.C., Wang X., Ye C., Yang C et al. 2012. Biodiversity soup. Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 613-623.