



Datura

Environmental Solutions

eDNA qPCR-assay ontwikkeling van zes gewassen ten behoeve van monitoring van emissies naar het oppervlaktewater van het glastuinbouwgebied.



Colofon

Titel	eDNA qPCR-assay ontwikkeling van zes gewassen ten behoeve van monitoring van emissies naar het oppervlaktewater van het glastuinbouwgebied.
Tekst, foto's en samenstelling	L. Kool, K. van Bochove
In opdracht van	Hoogheemraadschap Delfland
Naam opdrachtgever	D. van der Gaag
Naam partner	Waterschappen fonds Stimuleringsbudget Emissiebeperking Glastuinbouw
Intern projectnummer opdrachtgever	BA23137
Rapportnummer	RA21223
Datum oplevering rapport	23 juni 2023
Aantal pagina's	15
Wijze van citeren	Kool L, van Bochove K, 2023. eDNA qPCR-assay ontwikkeling van zes gewassen ten behoeve van monitoring van emissies naar het oppervlaktewater van het glastuinbouwgebied. Rapport RA21223, Datura, Wageningen.
Laboratorium analist	X. van der Haak, J. Rook



Datura Molecular Solutions BV

Agro Business Park 10
6708 PW, Wageningen
The Netherlands

www.datura.nl
info@datura.nl

lindy.kool@datura.nl
0031(0)618441781

Inhoudsopgave

1. Inleiding.....	4
1.1 Aanleiding.....	4
1.2 Doelstelling.....	4
1.3 Leeswijzer.....	4
2. Analyse proces qPCR onderzoek.....	5
2.1 Meetproces.....	5
2.2 Veldbemonsteringen.....	5
2.3 DNA extractie.....	5
2.4 qPCR detectie werkingsprincipe.....	6
2.5 Kwaliteitswaarborging bij eDNA onderzoek.....	6
2.5.1. Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden.....	6
2.5.2. Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden.....	7
3. Ontwikkeling qPCR techniek voor zes gewassen.....	8
3.1 Proces ontwikkeling qPCR techniek.....	8
3.2 Opzetten referentiedatabase.....	8
3.3 Ontwerpen primers en probes.....	8
3.4 Validatie in het laboratorium.....	8
3.4.1 Testen van de gevoeligheid van de qPCR-assays.....	8
3.4.2 Testen van de specificiteit van de qPCR-assays.....	8
3.5 Testen methode op veldmonsters.....	9
4. Discussie en conclusie.....	12
4.1 eDNA methode toepasbaar?.....	12
4.2 Bemonsteringsstrategie en data interpretatie.....	12
4.3 Conclusie.....	13
4.4 Aanbevelingen.....	13
6. Bijlage.....	15

1. Inleiding

1.1 Aanleiding

Regelmatig worden verhoogde concentraties van nutriënten en gewasbeschermingsmiddelen gemeten in het oppervlaktewater. Het is vaak niet mogelijk om vast te stellen welk bedrijf verantwoordelijk is voor de betreffende emissies. Uit eerder onderzoek (van Bochove et al. 2021) is gebleken dat DNA-screening van de geteelde gewassen in het oppervlaktewater hierbij kan helpen. Aangetoond is dat een emissie van nutriënten gepaard gaat met een emissie van DNA van de gewassen die geteeld worden. Het DNA van deze gewassen in het oppervlaktewater wordt eDNA (environmental DNA) genoemd. Een verhoging van de concentratie gewas-eDNA in het oppervlaktewater kan een aanwijzing zijn dat een emissie afkomstig is van een bepaalde kwekerij. De detectie van eDNA kan gerealiseerd worden door middel van een qPCR analyse. Op dit moment zijn er qPCR methodes beschikbaar voor tomaat en paprika.

1.2 Doelstelling

In dit onderzoek is de focus gelegd op het detecteren van eDNA van zes gewassen door middel van een soort-specifieke qPCR detectie. Het doel van het huidige project is om de geteelde gewassen die gedetecteerd kunnen worden middels deze methode uit te breiden met zes andere gewassen, namelijk: roos, chrysanth, hippeastrum (*amaryllis*), komkommer, gerbera en phalaenopsis (orchidee).

Dit project is uitgevoerd in opdracht van Hoogheemraadschap Delfland en co-financier 'Stimuleringsbudget Emissiebeperking Glastuinbouw'. De ontwikkelde qPCR assays zijn toe te passen door andere laboratoria. Gedetailleerde pipetteerschema's en PCR protocollen zal uitgewisseld worden met laboratoria die de methode willen toepassen zodat resultaten van de analyses vergelijkbaar zijn tussen laboratoria.

1.3 Leeswijzer

Het rapport is opgebouwd uit vier hoofdstukken:

1. Inleiding;
2. In het tweede hoofdstuk wordt het algemene werkproces beschreven van eDNA monsternamen tot en met laboratoriumverwerking;
3. In het derde hoofdstuk wordt het beschreven welke stappen genomen zijn om nieuwe qPCR detectiemethodes te ontwikkelen voor roos, chrysanth, *Hippeastrum (Amaryllis)*, komkommer, *Gerbera* en *Phalaenopsis*. De resultaten van de testen zijn hier direct in verwerkt;
4. In het vierde hoofdstuk worden de resultaten bediscussieerd en worden handreikingen gedaan voor het toepassen van de qPCR-detectie methode.

2. Analyse proces qPCR onderzoek

2.1 Meetproces

Een analyse bestaat uit vier stappen (zie figuur 1). In de volgende paragrafen wordt de bemonstering en het laboratoriumproces in meer detail toegelicht.



Figuur 1. Schematische weergave van een concentratie bepaling van eDNA uit oppervlaktewater.

2.2 Veldbemonsteringen

De veldbemonsteringen zijn uitgevoerd door een medewerker van Datura Molecular Solutions B.V. en door een medewerker van Hoogheemraadschap van Delfland, volgens het bemonsteringsprotocol van Datura.

Er zijn 46 monsters verzameld van het oppervlaktewater binnen het glastuinbouwgebied van Delfland ten behoeve van de validatie van de ontwikkelde methodes. Verder zijn er tien controlemonsters verzameld door medewerkers van Datura in een aantal poelen door heel Nederland. Vanwege de geïsoleerde ligging van deze poelen en de afwezigheid van invloeden van glas/agrarische activiteit is de verwachting dat de concentratie eDNA van gewassen laag zal zijn.

Meerdere submonsters zijn verzameld van 40 ml. Datura houdt een standaard aan van 28 submonsters. De 28 submonsters zijn vermengd tot één monster. Het totale volume per monster is één liter water. Het monster is in het veld gefiltreerd met behulp van een polyethersulfone filter met een porie grootte van 0,22 µm. Het eDNA van de gewassen blijft achter op het filter. Het filter wordt geconserveerd in een CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) buffer totdat het DNA geëxtraheerd wordt in het laboratorium van Datura. Een uitgebreidere beschrijving van de bemonstering is beschikbaar in het bemonsteringsprotocol (opvraagbaar).

2.3 DNA extractie

De watermonsters zijn vervolgens in het laboratorium geanalyseerd op de aanwezigheid van het eDNA van de vier gewassen waarvoor de ontwikkeling van een qPCR methode succesvol was. De eerste stap in het laboratoriumproces is het extraheren van het eDNA. Tijdens de extractie worden storende stoffen zo goed mogelijk verwijderd door middel van een phenol-chloroform extractie. Het resultaat is een buisje water met daarin zuiver opgelost DNA.

Vervolgens is een controle analyse uitgevoerd om te testen of DNA-detectie in een monster eventueel geïnhibeerd (onderdrukt) kan worden, waardoor het eDNA van de doelsoort niet gedetecteerd wordt. Dit kan optreden doordat alsnog teveel humuszuren of andere storende stoffen in het monster zijn achtergebleven. Dit is gedaan door een bekende hoeveelheid van een fragment artificieel DNA toe te voegen. Vervolgens wordt de concentratie gemeten van dit fragment artificieel DNA. Dit wordt zowel gedaan in een reactie waar een hoeveelheid monster aan toegevoegd wordt, als in een reactie waar geen monster aan toegevoegd wordt. Als DNA-detectie in een monster geïnhibeerd wordt, dan is de gemeten concentratie artificieel DNA in de reactie waar een monster toegevoegd wordt lager ten opzichte van de reactie waar geen monster aan toegevoegd is. Met name in zuur water (bijvoorbeeld in vennen waar de pH vaak lager ligt dan 4,5), waarin veel organische deeltjes aanwezig zijn kan inhibitie optreden. Om een betrouwbare kwantificatie te garanderen is er gekozen om de monsters standaard 5 maal te verdunnen.

2.4 qPCR detectie werkingsprincipe

De concentratie eDNA van gewassen in een geëxtraheerd eDNA monster kan bepaald worden met de qPCR methodiek. Een kwantificering van het eDNA met de qPCR techniek is zeer specifiek. Alleen het eDNA van een specifieke doelsoort kan worden gemeten.

De afkorting 'PCR' staat voor Polymerase Chain Reaction. Het betreft een enzymatische reactie waarbij DNA geamplificeerd (vermeerderd) wordt. Bij PCR wordt gebruik gemaakt van twee DNA primers. DNA primers zijn artificiële stukjes DNA, die zo ontworpen zijn dat ze uitsluitend aan het DNA van de doelsoort hechten. Tussen de beide primers bevindt zich een fragment DNA van ongeveer 100 nucleotiden (DNA bouwstenen). Dit stuk DNA wordt in de PCR geamplificeerd door een polymerase die het DNA-fragment tussen de twee primers gaat kopiëren. De PCR wordt in gang gezet door de temperatuur te beïnvloeden. Een PCR-cyclus bestaat uit volgende onderdelen:

- De primers hechten bij 54-62 °C aan het DNA;
- Het vermeerderen van het DNA door een polymerase vindt plaats bij 72 °C;
- De primers en het gekopieerde DNA laten los bij 95 °C;
- Vervolgens wordt de temperatuur teruggebracht tot 54-62 °C waardoor het proces opnieuw begint.

In elke PCR-cyclus wordt de hoeveelheid DNA verdubbeld. De hoeveelheid DNA neemt tijdens een PCR dus exponentieel toe. De hoeveelheid DNA die geamplificeerd is kan gemeten worden door een fluorescente probe toe te voegen. Zodra deze probe zich hecht aan het vermeerderde DNA van de doelsoort ontstaat er een fluorescent signaal. Dit signaal is gedetecteerd met behulp van een qPCR platform (CFX96 Touch™ van Bio-Rad). De 'q' hierin staat voor 'quantitative'. De hoeveelheid DNA kan namelijk gekwantificeerd worden. Hoe meer DNA er oorspronkelijk aanwezig was in een monster, hoe minder cycli er nodig zijn om de hoeveelheid DNA een bepaalde drempelwaarde (Ct-waarde) te laten passeren. Een laag aantal cycli (en dus een lage Ct-waarde) indiceert een hoge concentratie DNA. Een hoge Ct-waarde indiceert dus een lage concentratie DNA. Door naast de DNA-monsters met onbekende DNA-concentraties ook een DNA-monster mee te runnen waarvan de DNA-concentratie bekend is (de zogenaamde DNA standaard), kan berekend worden hoeveel DNA-moleculen er aanwezig zijn in de DNA monsters.

2.5 Kwaliteitswaarborging bij eDNA onderzoek

Om de kwaliteit van de analyses te kunnen waarborgen worden eDNA analyses uitgevoerd volgens strikte protocollen van Datura. Zodoende kan gegarandeerd worden dat het optreden van vals positief en vals negatieve waarnemingen tot het minimum beperkt worden.

2.5.1. Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden

Laboratoriumprocedures:

1. Verschillende onderdelen van de analyse workflow worden uitgevoerd in fysiek gescheiden laboratorium ruimtes. Het samenstellen van de eDNA sample kits en het voorbereiden van de qPCR reagentia vindt plaats in een **DNA clean room**. Dit is een ruimte waarin geen DNA-samples aanwezig zijn. Met deze aanpak kunnen we garanderen dat er geen DNA aanwezig is in de eDNA sample kits en de reagentia (zoals de primers en probes) die later gebruikt worden in de eDNA analyses. Het extraheren van de eDNA samples gebeurt in een **eDNA laboratorium**. Dit is een ruimte waarin uitsluitend lage concentraties DNA aanwezig zijn. Vervolgens worden hier de eDNA samples samen met de qPCR reagentia in een 96-well plaat gepipetteerd. Deze plaat wordt luchtdicht afgesloten. Tenslotte wordt de qPCR uitgevoerd in een **post-PCR laboratorium**. In dit laboratorium wordt het eDNA vermeerderd en hier zijn dus hoge concentraties DNA aanwezig.
2. Er wordt een **unidirectionele workflow** gehanteerd om contaminatie van de DNA clean room en het eDNA laboratorium te voorkomen. Dit houdt in dat materialen die eenmaal in het post-PCR laboratorium geweest zijn niet meer terug mogen naar de DNA clean room en het eDNA laboratorium. Ook mogen medewerkers van Datura niet dezelfde week van een post-PCR laboratorium terug naar de DNA clean room en het eDNA laboratorium.
3. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd. Zo worden er samples geëxtraheerd waaraan

geen slotwater wordt toegevoegd (zogenaamde extractie controles). In de qPCR worden naast de extractie controles ook negatieve PCR-controles meegenomen. Zodoende kan heel nauwkeurig gemonitord worden of er inderdaad geen contaminatie optreedt.

Contaminatie voorkomen in het veld:

1. Het **sampling protocol** van Datura wordt gevolgd. Dit protocol schrijft een specifieke werkwijze voor. In de praktijk is gebleken dat er geen contaminatie plaats vindt als dit protocol gevolgd wordt;
2. Er dient rekening gehouden te worden met **waterverplaatsingen**. Als er veel stroming is, kun je eDNA detecteren dat van tientallen tot honderden meters stroomopwaarts afkomstig is. De sampling wordt daarom uitgevoerd op een moment dat er weinig stroming is. Zo worden eDNA samples niet verzameld direct na (hevige) regenval. Ook wordt er rekening gehouden met kunstmatig opgewekte stroming, bijvoorbeeld bij wisseling van zomer- naar winterpeil.

2.5.2. Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden

Naast vals positieve waarnemingen kunnen ook vals negatieve waarnemingen optreden. Daarnaast is uit diverse validatie studies gebleken dat het eDNA in sommige gevallen niet gedetecteerd wordt, ook al is de doelsoort wel aanwezig. Maatregelen die genomen worden om vals negatieve waarnemingen te voorkomen:

1. Per sample worden **28 subsamples** verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA in het sample terecht komt.
2. De **qPCR detectie** wordt uitgevoerd met behulp van **2 replica's**. Wanneer minder replica's uitgevoerd worden kan er minder gevoelig gedetecteerd worden.
3. Gebruik van een **korte merker** van ongeveer 100 basepaar;
4. Van ieder sample wordt **vastgesteld of de qPCR detectie geïnhibeerd** wordt door storende stoffen. Als dit het geval is, wordt er een extra zuiveringstap uitgevoerd of wordt een monster verdund. Vervolgens wordt nogmaals getest of er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);
5. Er wordt altijd een **positieve controle** reactie van doelsoort DNA meegenomen in de qPCR detectie. Deze controle reactie moet altijd resulteren in positieve detectie. Ook als alle samples negatief zijn, kan zodoende vastgesteld worden dat de detectie juist is uitgevoerd.

3. Ontwikkeling qPCR techniek voor zes gewassen

3.1 Proces ontwikkeling qPCR techniek

Om specifiek het eDNA van de zes gewassen te kunnen detecteren is een soort-specifiek qPCR assay (=primers en probe) nodig. Om tot een betrouwbaar qPCR-assay te komen zijn de volgende ontwikkelings- en validatiestappen doorlopen:

1. Opzetten referentiedatabase
2. Ontwerpen primers en probes
3. Validatie in het laboratorium
4. Testen van de methode op veldmonsters

3.2 Opzetten referentiedatabase

Er zijn referentiedatabases van chloroplast DNA-sequenties opgezet van de rozenfamilie (Rosaceae), de composietenfamilie (Asteraceae), de komkommerfamilie (Cucurbitaceae), de narcisfamilie (Amaryllidaceae) en de orchideeënfamilie (Orchidaceae). Deze DNA-sequenties zijn afkomstig van de openbaar beschikbare data op GenBank.

3.3 Ontwerpen primers en probes

Met behulp van diverse software zijn er op basis van de referentiedatabases locaties geselecteerd waarop soort-specifieke primers en probes (qPCR-assay) zijn ontwikkeld. Hierbij is er gekeken naar een locatie waar de DNA sequentie specifiek is voor de doelsoort maar veel variatie vertoont voor andere verwante soorten ten opzichte van de doelsoort. Er zijn meerdere primers ontwikkeld om te testen welke primercombinatie een optimaal resultaat geeft. Op basis van de software genaamd 'primer-blast' en visuele inspectie van de DNA sequentie alignments is geëvalueerd welke soorten potentieel geamplificeerd kunnen worden door middel van de primers.

3.4 Validatie in het laboratorium

3.4.1 Testen van de gevoeligheid van de qPCR-assays

De qPCR-assays zijn in het laboratorium getest op DNA van komkommer, roos, chrysanth, *Amaryllis*, *Gerbera* en *Phalaenopsis*. Op basis hiervan zijn de meest gevoelige qPCR-assays voor de soorten geselecteerd. Het qPCR-assay dat ontwikkeld is voor *Amaryllis* bleek niet te werken op het DNA-extract van een amaryllis. We hebben geconstateerd dat planten die gekweekt en verkocht worden als amaryllis doorgaans soorten uit het genus *Hippeastrum* betreft en niet soorten uit het genus *Amaryllis*. Voor *Amaryllis* hebben we vervolgens de ontwikkeling van een qPCR-assay uitgevoerd op een regio van het chloroplast DNA van *Hippeastrum*. Het qPCR-assay voor *Gerbera* bleek ook niet voldoende effectief, hiervoor zijn ook nieuwe primers en probes ontwikkeld. Uiteindelijk zijn er voor alle soorten qPCR-assays ontwikkeld die de betreffende soort gevoelig genoeg kunnen detecteren.

3.4.2 Testen van de specificiteit van de qPCR-assays

Met behulp van DNA-extracten van andere soorten binnen de families is getoetst of inderdaad uitsluitend DNA van komkommer, roos, chrysanth, *Hippeastrum*, *Gerbera* en *Phalaenopsis* gedetecteerd kan worden met de ontwikkelde qPCR-assays. In tabel S1 in de bijlage is een overzicht opgenomen van de verwante soorten, welke zijn verzameld in de omgeving Doornenburg, waarop de specificiteit van de ontwikkelde qPCR-assays getest is.

Helaas bleken de qPCR-assays ontwikkeld voor *Gerbera* en *Phalaenopsis* niet specifiek te zijn. Meerdere keren zijn er nieuwe qPCR-assays ontwikkeld op andere regio's van het chloroplast DNA. Ook deze qPCR-assays resulteerde in een positief signaal op DNA-extracten van verwante soorten, wat aangeeft dat de qPCR-assays voor *Gerbera* en *Phalaenopsis* niet specifiek genoeg zijn.

- De qPCR-assays die ontwikkeld zijn voor *Phalaenopsis* bleken niet specifiek genoeg, en konden ook DNA van brede wespenorchis (*Epipactis helleborine*) detecteren, een in Nederland algemeen voorkomende orchidee. Hoewel niet getest, is het zeer waarschijnlijk dat ook rietorchis (*Dactylorhiza praetermissa*)

gedetecteerd kan worden met het ontwikkelde qPCR-assay. Beide genoemde soorten komen verspreid over het Westland en Oostland voor. Daarmee is het *Phalaenopsis* qPCR-assay in de huidige vorm niet in de praktijk toepasbaar, of dienen de resultaten in ieder geval met grote voorzichtigheid geïnterpreteerd te worden.

- Ook de qPCR-assays voor *Gerbera* bleken niet voldoende specifiek. Diverse andere soorten uit de familie van Asteraceae konden gedetecteerd worden met het assay. Hoewel hoge concentraties DNA van niet-doelsoorten slechts leidde tot een laag signaal, betreft het zoveel soorten dat we de betrouwbaarheid bij toepassing in de praktijk niet kunnen garanderen. Het assay voor *Gerbera* is in de huidige vorm dus niet toepasbaar in de praktijk.

De qPCR-assays voor komkommer, roos, chrysant en *Hippeastrum* bleken wel voldoende specifiek te zijn. Hieronder wordt de specificiteit van de ontwikkelde qPCR-assays per soort toegelicht.

- Het qPCR-assay voor komkommer detecteert uitsluitend komkommer (*Cucumis sativus*).
- Het qPCR-assay voor amaryllis detecteert soorten uit het geslacht *Hippeastrum* (meestal verkocht als *Amaryllis*) en van de soort *Zephyranthes candida* (Westenwindlelie). Deze plant komt van nature niet in Nederland voor. Wel wordt de soort (op zeer kleine schaal) geteeld. Hij is niet winterhard, en overleefd dus niet in het Nederlandse klimaat.
- Het qPCR-assay voor chrysant detecteert soorten uit het geslacht *Chrysanthemum*. Daarnaast kunnen ook soorten de genera *Ajania pacifica* en *Opisthopappus* gedetecteerd worden. *Opisthopappus* komt van nature niet in Nederland voor, en wordt niet geteeld. Ook *Ajania pacifica* komt van nature niet in Nederland voor maar wordt wel op kleine schaal geteeld, mogelijk ook door chrysanten kwekers. *Ajania* lijkt qua uiterlijk sterk op chrysant en wordt in webshops verkocht als knoopjeskruid of als chrysant 'Gold and Silver'.

Uit de specificiteitstesten op weefselmonsters bleek tevens dat bij zeer gevoelige detectie (ct-waarde >45; 0,05 moleculen/PCR reactie) ook bijvoet (*Artemisia vulgaris*) gedetecteerd kan worden (terwijl een weefselmonster van chrysant al signaal geeft bij een ct-waarde van 16 (18094691 moleculen/PCR reactie). Bij 100X verdunning van het weefselmonster van bijvoet werd geen signaal waargenomen. Het is zeer onwaarschijnlijk dat bijvoet in een eDNA monster een positief signaal zal geven. Als er toch een signaal optreedt door bijvoet (in het hypothetische geval dat er een stuk plantmateriaal van bijvoet in het eDNA monster terecht komt) dan zal dit signaal resulteren in een zeer lage eDNA concentratie (<50 moleculen per liter). Daarmee achten we het assay voor *Chrysanthemum* toepasbaar in de praktijk.

- Het qPCR-assay voor roos detecteert soorten uit het geslacht *Rosa* en mogelijk ook *Fallugia spec* en *Sanguisorba alpina*. *Fallugia spec* en *Sanguisorba alpina* komen echter niet in Nederland voor, en worden niet geteeld. In de praktijk betekent dit dat een signaal van dit assay afkomstig moet zijn van rozen.

3.5 Testen methode op veldmonsters

Om de werking van de qPCR-assays in de praktijk te testen zijn er diverse veldmonsters (watermonsters) verzameld. Er zijn locaties bemonsterd waar de verwachting was dat er eDNA van de betreffende gewassen in het oppervlaktewater daadwerkelijk aanwezig is (positieve controle). Daarnaast zijn er locaties bemonsterd waar de verwachting was dat er geen eDNA in het oppervlaktewater aanwezig is (negatieve controle). Omdat er binnen het huidige project geen voldoende specifiek qPCR-assay ontwikkeld kon worden voor *Gerbera* en *Phalaenopsis*, zijn er geen veldtesten uitgevoerd met deze assays. Alleen de qPCR-assays voor roos, chrysant, komkommer en *Hippeastrum* zijn getest op zowel de positieve als de negatieve controle monsters.

Er zijn in totaal 46 monsters verzameld naast of in kassen in Delfland van de zes gewassen gedurende de maanden juni, juli, september en november als positieve controle (zie tabel 1). De eerste drie monsters bij de *Hippeastrum* kas bleken op een verkeerd moment bemonsterd te zijn. De kas was leeg en bovendien lag het water naast de kas hoger dan de kas zelf en is de kans klein dat eDNA naar het betreffende waterlichaam zou uitspoelen. Daarom heeft Hoogheemraadschap van Delfland nog drie extra monsters uit een andere kas aangeleverd om alsnog een goede validatie te kunnen doen. Als negatieve controle zijn er in totaal 10 monsters

verzameld gedurende de maand juni in poelen op verschillende plekken in Nederland waar we verwachten geen van de gewassen te kunnen detecteren. Een uitgebreid overzicht van de monsters en hun locaties is te vinden in tabel 2.

Tabel 1. Overzicht van aantal verzamelde veldmonsters per soort.

Soort	Aantal
Roos	11
Chrysant	10
<i>Hippeastrum (Amaryllis)</i>	6
Komkommer	2
<i>Phalaenopsis</i>	5
Gerbera	12
Negatieve controle	10

Voor alle vier geteste soorten (roos, chrysant, komkommer en *Hippeastrum*) is er in tweeëntwintig positieve controle monsters eDNA gedetecteerd met de ontwikkelde assays (zie tabel 2). In drie monsters getest op *Hippeastrum* werd geen eDNA aangetroffen vanwege de ligging van de watergang. In monsters die naast de kassen zijn bemonsterd is, in lijn met de verwachting, meer eDNA aangetroffen dan monsters die 500 meter stroomafwaarts zijn verzameld. In de meeste monsters die extern zijn bemonsterd, is de betreffende doelsoort gedetecteerd, echter is hier beperkte informatie beschikbaar over hoe en waar precies de monsters genomen zijn.

Alle negatieve controle monsters zijn getest op aanwezigheid van eDNA van alle 4 ontwikkelde eDNA-assays. In de negatieve controle monsters werd geen eDNA gedetecteerd met het *Hippeastrum* assay. Het komkommer en het chrysant qPCR-assay gaven in één van de tien monsters een positief signaal en het roos qPCR-assay in twee van de tien monsters (zie tabel 2). Om uit te sluiten dat we geen verwante soorten amplificeerde maar er daadwerkelijk eDNA van de betreffende soorten aanwezig was in de monsters, zijn de positief scorende monsters gesequenced. Dit is het uitlezen van een bepaalde DNA-sequentie. Hieruit bleek dat we enkel de doelsoorten hebben geamplificeerd en de ontwikkelde qPCR-assays voldoende specifiek zijn. Dit geeft aan dat we ervanuit mogen gaan dat (als er gebruikt gemaakt wordt van de hier ontwikkelde eDNA techniek) er geen eDNA van de doelsoorten in het oppervlaktewater gedetecteerd wordt tenzij eDNA van de doelsoorten via een bron in het oppervlaktewater terecht komt.

Tabel 2. Overzicht van de verzamelde veldmonsters en resultaten van de eDNA analyses op veldmonsters waarvoor de assay ontwikkeling succesvol was. Gerbera en *Phalaenopsis* zijn niet getest vanwege het ontbreken van een werkend assay. De soort waarvoor een negatieve controle positief scoorde staat achter het aantal DNA moleculen/liter vermeld. Een deel van de locaties is geanonimiseerd.

Monster nr	Teeltsoort	DNA moleculen/liter	Locatie/coördinaten	Omschrijving	Bemonsterd door
27743	<i>Hippeastrum</i>	0	52.027660, 4.503302	500m stroomafwaarts	Datura
27514	<i>Hippeastrum</i>	0	51.985675, 4.290897	Watergang naast kas, water lag hoger dan kas	Datura
27476	<i>Hippeastrum</i>	0	51.983305, 4.291767	Watergang naast kas, water lag hoger dan kas	Datura
22246	<i>Hippeastrum</i>	1125	Monsterseweg 82 te 's-Gravenzande	Drainwater uit drainsilo	Hoogheemraadschap van Delfland
22249	<i>Hippeastrum</i>	555	Monsterseweg 82 te 's-Gravenzande	Drainwater uit drainsilo	Hoogheemraadschap van Delfland
22266	<i>Hippeastrum</i>	2352	Monsterseweg 82 te 's-Gravenzande	Watergang naast kas	Hoogheemraadschap van Delfland
27555	Komkommer	4110	52.020366, 4.499659	Watergang naast kas, lege kas	Datura
27883	Komkommer	511	52.016400, 4.497142	500m stroomafwaarts	Datura
27476	Roos	0	51.980309, 4.288326	500m stroomafwaarts	Datura
27511	Roos	110	51.981123, 4.286113	Watergang naast kas	Datura
27384	Roos	348	Locatie 1	Watergang naast kas	Extern
26981	Roos	607	Locatie 2	Watergang naast kas	Extern
26985	Roos	702	Locatie 3	Voedings/drainwater	Extern

27383	Roos	162	Locatie 4	Voedings/drainwater	Extern
27380	Roos	0	Locatie 5	Voedings/drainwater	Extern
27385	Roos	9346	Locatie 6	Voedings/drainwater	Extern
27547	Roos	5070	Locatie 7	Voedings/drainwater	Extern
27125	Roos	116	Locatie 8	Voedings/drainwater	Extern
27378	Roos	8180	Locatie 9	Voedings/drainwater	Extern
27002	Chrysant	0	Locatie 10	Watergang naast kas	Extern
26990	Chrysant	190	Locatie 11	Watergang naast kas	Extern
26983	Chrysant	5	Locatie 12	Voedings/drainwater	Extern
27381	Chrysant	345	Locatie 13	Watergang naast kas	Extern
27382	Chrysant	3534	Locatie 14	Voedings/drainwater	Extern
27379	Chrysant	0	Locatie 15	Voedings/drainwater	Extern
27545	Chrysant	44	Locatie 16	Watergang naast kas	Extern
26991	Chrysant	403	Locatie 17	Watergang naast kas	Extern
26997	Chrysant	6421	Locatie 18	Voedings/drainwater	Extern
27546	Chrysant	511	Locatie 19	Voedings/drainwater	Extern
27161	Negatieve controle	570 (chrysant)	52.332966, 6.580138	Dakhorst (OVR014)	Datura
27164	Negatieve controle	28 (roos)	52.312694, 6.147083	Diepenveen (OVR017)	Datura
27166	Negatieve controle	0	52.309755, 6.142963	Diepenveen (OVR017)	Datura
27167	Negatieve controle	0	52.521628, 6.194434	Vechterweerd (OVR005)	Datura
27171	Negatieve controle	0	52.306308, 6.144126	Diepenveen (OVR017)	Datura
27175	Negatieve controle	0	52.307148, 6.144813	Diepenveen (OVR017)	Datura
27177	Negatieve controle	237 (komkommer)	52.311225, 6.143993	Diepenveen (OVR017)	Datura
27188	Negatieve controle	45 (roos)	52.168697, 6.557007	Nieuwegein (UTR021)	Datura
27201	Negatieve controle	0	52.168908, 6.550141	Noordijkerveld (GLD009)	Datura
27223	Negatieve controle	0	52.020464, 5.069108	Nieuwegein (UTR021)	Datura
27877	Gerbera		52.015812, 4.594242	500m stroomafwaarts	Datura
27885	Gerbera		52.016086, 4.590675	Watergang naast kas	Datura
27498	Gerbera		52.019944, 4.502924	Watergang naast kas, volle kas	Datura
27512	Gerbera		52.017663, 4.503010	500m stroomafwaarts	Datura
26999	Gerbera		Locatie 20	Watergang naast kas	Extern
26998	Gerbera		Locatie 21	Voedings/drainwater	Extern
26986	Gerbera		Locatie 22	Voedings/drainwater	Extern
27548	Gerbera		Locatie 23	Watergang naast kas	Extern
27570	Gerbera		Locatie 24	Watergang naast kas	Extern
27567	Gerbera		Locatie 25	grondwater kas (202, 203 en 204)	Extern
27564	Gerbera		Locatie 26	voedingswater	Extern
27572	Gerbera		Locatie 27	referentie gerbera	Extern
27868	Phalaenopsis		52.017796, 4.498916	Watergang naast kas	Datura
27512	Phalaenopsis		52.017663, 4.503010	500m stroomafwaarts, volle kas	Datura
27517	Phalaenopsis		52.017796, 4.498916	Watergang naast kas	Datura
27895	Phalaenopsis		51.981417, 4.276298	500m stroomafwaarts	Datura
27896	Phalaenopsis		51.979847, 4.272680	Watergang naast kas	Datura

4. Discussie en conclusie

4.1 eDNA methode toepasbaar?

In eerder onderzoek (van Bochove et al. 2021) is middels de qPCR-methode aangetoond dat een emissie van water uit kassen leidt tot verhoogde concentraties eDNA in het oppervlaktewater. Dit illustreert dat de qPCR-methode gebruikt kan worden bij het opsporen van bronnen van vervuiling. Een voordeel van de qPCR techniek is het snelle analyseproces. Technisch gezien kan een monster binnen een dag geanalyseerd worden. In de praktijk moet de analyse ingepast worden in de laboratoriumplanning en zal het resultaat binnen enkele dagen geleverd kunnen worden.

Het alternatief is de toepassing van eDNA metabarcoding. Hiermee kan in één analyse de concentratie eDNA van alle gewassen en andere planten bepaald worden. Niet alle gemeten DNA-sequenties kunnen echter tot op soort geïdentificeerd worden, maar de identificatie is voor de meeste teelten nauwkeurig genoeg voor toepassing van de techniek. Nadeel is dat de doorlooptijd van een metabarcoding analyse vrij lang is (minimaal 1 tot maximaal 2 maanden) en de kosten relatief hoog zijn. De kosten voor een qPCR analyse op vijf soorten is vergelijkbaar met de kosten voor een metabarcoding analyse waarbij in één analyse de eDNA concentraties bepaald worden van alle gewassen. Een metabarcoding analyse heeft vooral meerwaarde als de resultaten niet noodzakelijk direct beschikbaar hoeven te zijn en de verhoogde nutriënten concentraties afkomstig kunnen zijn van een groot aantal verschillende teelten.

Voor roos, chrysant, komkommer en *Hippeastrum* kon een qPCR-assay ontwikkeld worden dat in de praktijk toepasbaar is. De qPCR-assays die ontwikkeld zijn voor *Gerbera* en *Phalaenopsis* bleken niet specifiek genoeg. Aanwezigheid van eDNA van andere soorten zou kunnen leiden tot een vals positief signaal. Binnen de planning en budget van het huidige project was het niet mogelijk om de mogelijkheden voor qPCR-assay ontwikkeling voor *Gerbera* en *Phalaenopsis* verder te onderzoeken.

Mogelijk zou het *Phalaenopsis*-assay toepasbaar zijn in delen waar geen grote aantallen orchideeën voorkomen, maar bij de interpretatie zal altijd de mogelijkheid opgehouden moet worden dat ook inheemse orchideeën voor positief signaal kunnen zorgen. Voor *Gerbera* zijn er alternatieve locaties in het chloroplast genoom aanwezig waarop mogelijk wel een goed werkend qPCR-assay ontwikkeld kan worden. Het zal waarschijnlijk niet mogelijk zijn om op basis van chloroplast DNA een qPCR-assay te ontwikkelen waarmee uitsluiten eDNA van *Phalaenopsis* gedetecteerd kan worden. Het assay dient namelijk aan de volgende twee eisen te voldoen. Enerzijds moet het qPCR-assay alle soorten *Phalaenopsis* kunnen detecteren, gezien er verschillende soorten geteeld worden. Daarnaast mogen geen andere orchideeën soorten gedetecteerd worden met het qPCR-assay. Gebleken is echter dat er in het chloroplast-DNA genetische verschillen zijn tussen *Phalaenopsis*-soorten. Om een primer te ontwikkelen die alle *Phalaenopsis*-soorten detecteert moet een regio gevonden worden waar geen variatie aanwezig is. Tegelijk dienen er in deze regio wel voldoende genetische verschillen aanwezig te zijn tussen *Phalaenopsis* en andere orchideeënsoorten. Alle locaties in het chloroplast DNA waar genetische verschillen gevonden zijn tussen *Phalaenopsis* en andere orchideeën toonde ook genetische verschillen te tussen *Phalaenopsis*-soorten. Daardoor bleek het niet haalbaar om een primer te ontwikkelen die uitsluitend (maar wel alle) *Phalaenopsis*-soorten detecteert. Wel zal het waarschijnlijk mogelijk zijn om een qPCR-assay te ontwikkelen waarmee *Phalaenopsis* en een aantal andere soorten uit de onderstam van de Aeridinae gedetecteerd kunnen worden. In Nederland komen in het wild geen soorten uit de onderstam Aeridinae voor. Een signaal van dergelijk qPCR-assay moet dus afkomstig zijn van *Phalaenopsis* of een andere gekweekte orchideeënsoort.

4.2 Bemonsteringsstrategie en data interpretatie

Bij het opsporen van emissies is het belangrijk om te weten vanaf hoeveel moleculen het aannemelijk is dat er sprake is van een tijdelijke emissie of continue lekkage. De inschatting is dat er sprake is van een verhoogde concentratie eDNA vanaf 600 moleculen per liter. Aanwezigheid van dergelijke lage concentraties eDNA in een monster zou ook veroorzaakt kunnen worden door een vervuiling van het oppervlaktewater, of van een monster

via de lucht. Echter is nader onderzoek nodig om een beter beeld te krijgen van de concentratie eDNA dat in het oppervlaktewater terecht komt zonder dat er sprake is van een emissie, en dus vanaf welke concentratie eDNA er wel sprake is van een emissie. Daarnaast is het ook van belang om onderscheid te kunnen maken tussen een tijdelijke emissie en een structurele lekkage.

Vaststellen tijdelijke emissie

Emissies worden veelal opgemerkt in het veld doordat de nitraatwaardes in het oppervlaktewater verhoogd zijn. Een strategie om de bron van een tijdelijke emissie vast te stellen is bijvoorbeeld om over tijd meerdere eDNA bemonsteringen uit te voeren. Nemen zowel de eDNA concentratie als de nitraatwaarde na verloop van tijd af, dan is er een verband aangetoond tussen de nitraatpiek en het eDNA. Het is dan aannemelijk dat de nitraatpiek veroorzaakt wordt vanuit een bepaalde teelt. Op deze manier kan er een beeld gevormd worden van 'achtergrond' eDNA van bepaalde gewassen (de hoeveelheid eDNA dat in het oppervlaktewater aanwezig is zonder dat er sprake is van een noemenswaardige emissie) en de hoeveelheid eDNA die vrijkomt bij een emissie en/of lekkage. Met meer inzicht van 'achtergrondwaarden' is het op termijn eenvoudiger om op basis van één of twee metingen te constateren of er sprake is van een verhoogde eDNA concentratie.

Vaststellen continue lekkage

Daarnaast kan er sprake zijn van een continue lekkage vanuit een kwekerij. In dergelijke situatie is er geen sprake van een nitraatpiek (nitraat zal continu verhoogde waardes geven) en zal ook de eDNA concentratie vermoedelijk continu verhoogd zijn. Aanvullend op het nemen van monster direct naast een kwekerij kunnen er monsters op meerdere afstanden van de kwekerij verzameld worden. Nemen zowel de nitraat concentratie op grote afstand van de kwekerij af, alsook de eDNA concentratie en is aannemelijk dat er sprake is van een continue lekkage. Echter is een continue lekkage op dit moment waarschijnlijk minder hard te maken dan een opreden van tijdelijke emissies. Het is daarom nuttig om te weten wat concentraties eDNA zijn bij kwekerijen waar geen sprake is van noemenswaardige emissie/lekkage om zodoende een beeld te vormen van de achtergrondconcentratie eDNA. Zodoende kan aannemelijker gemaakt worden dat bij kwekerijen met een verhoogde concentratie, inderdaad sprake is van een lekkage. Zeker in combinatie met ander 'bewijs' als bijvoorbeeld verhoogde nitraatwaardes.

4.3 Conclusie

De ontwikkelde qPCR-methodes kan in de praktijk ingezet worden om eDNA concentraties van chrysanthe, roos, komkommer en hippeastrum (*amaryllis*) te meten in het oppervlaktewater. Met de juiste bemonsteringsstrategie kan deze techniek bijdragen aan het opsporen van emissies en lekkages bij bedrijven. Ook kunnen tuinbouwbedrijven die maatregelen nemen om lekkage te voorkomen de techniek gebruiken om de effectiviteit van de genomen maatregelen te bepalen.

Om de toepasbaarheid van de methode door te ontwikkelen is het van belang om een beter inzicht te krijgen vanaf welke eDNA concentraties er sprake is van een emissie of continue lekkage. Dit inzicht kan verkregen worden door zowel in de tijd, als in de ruimte meer eDNA monsters in combinatie met bijvoorbeeld nitraat monsters te verzamelen.

4.4 Aanbevelingen

1. Verder ontwikkelen van de twee resterende qPCR-assays (*Gerbera* en *Phalaenopsis*).
 - a. Er zijn voor beide soorten al twee nieuwe locaties geselecteerd om op door te ontwikkelen. Voor de *Gerbera* is het nog steeds mogelijk een assay te ontwikkelen die uitsluitend *Gerbera* detecteert. Voor *Phalaenopsis* is een locatie geselecteerd voor een qPCR-assay waarmee *Phalaenopsis* en een aantal andere soorten uit de onderstam van de Aroidae gedetecteerd kunnen worden.
2. Het nemen van meerdere monsters over tijd of in de ruimte om een beeld te krijgen van de 'achtergrond'.
 - a. Bij een tijdelijke emissie is het raadzaam om meerdere monsters over tijd te nemen. Wordt er bij het vinden van een nitraatpiek ook een piek in eDNA concentratie gedetecteerd, en nemen

beide af naar mate er na enkele weken op dezelfde plek weer bemonsterd wordt, is een emissie aannemelijker.

- b. Bij continue lekkages is het raadzaam om meer monsters in de ruimte te nemen. Continue lekkages zullen over tijd weinig veranderen in nitraat en eDNA concentraties. Door het nemen van meerdere monsters op verschillende afstanden kan aangetoond worden of de concentraties verder afnemen naar mate je verder van de kas af bemonsterd, waardoor het aannemelijk is dat de lekkage van die specifieke kas afkomstig is.
3. Uitgevoerde bemonsteringen vastleggen in een overzicht.
 - a. Het is aan te raden om een database bij te houden van alle bemonsteringen met daarin minimaal de volgende informatie:
 - i. Locatie
 - ii. Datum
 - iii. Tijd
 - iv. Resultaat van eDNA analyse (per type qPCR-assay)
 - v. Indien beschikbaar (in het veld) gemeten nitraatwaarden
 - vi. Opmerkingen veld met achtergrond info zoals informatie of er vermoedelijk sprake is van een emissie of lekkage.
 4. Alle labs dienen dezelfde methode te gebruiken zodat de resultaten vergelijkbaar zijn.

5. Literatuur

Van Bochove K, 2021. eDNA monitoring van tomaat en paprika in oppervlaktewater van het glastuinbouwgebied in Delfland. Rapport RA2019045, Datura, Wageningen.

6. Bijlage

Tabel S1. Overzicht van de verwante soorten getest voor de specificiteit van de ontwikkelde assays.

Doelsoort	Soorten getest op specifieke amplificatie	
	<i>Wetenschappelijke naam</i>	<i>Nederlandse naam</i>
<i>Phalaenopsis</i>	<i>Epipactis helleborine</i>	Brede wespenorchis
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Bryonia dioica</i>	Heggenrank
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Cucurbita moschata</i>	Flespompoen
<i>Rosa</i>	<i>Geum macrophyllum</i>	Groot nagelkruid
<i>Rosa</i>	<i>Fragaria</i>	Aardbij
<i>Rosa</i>	<i>Potentilla reptans</i>	Vijfvingerkruid
<i>Rosa</i>	<i>Cotoneaster horizontalis</i>	Dwergmispel
<i>Rosa</i>	<i>Alchemilla</i>	Vrouwenmantel
<i>Rosa</i>	<i>Comarum palustre</i>	Wateraardbei
<i>Rosa</i>	<i>Crataegus monogyna</i>	Meidoorn
<i>Rosa</i>	<i>Malus sylvestris</i>	Appel
<i>Rosa</i>	<i>Prunus domestica</i>	Pruim
<i>Rosa</i>	<i>Rubus idaeus</i>	Framboos
<i>Rosa</i>	<i>Rubus</i>	Braam
<i>Chrysanthemum/ Gerbera</i>	<i>Artemisia vulgaris</i>	Bijvoet
<i>Chrysanthemum/ Gerbera</i>	<i>Cirsium arvense</i>	Akkerdistel
<i>Chrysanthemum/ Gerbera</i>	<i>Glebionis segetum</i>	Gele ganzenbloem
<i>Chrysanthemum/ Gerbera</i>	<i>Leucanthemum vulgare</i>	Margriet
<i>Chrysanthemum/ Gerbera</i>	<i>Achillea millefolium</i>	Duizendblad
<i>Chrysanthemum/ Gerbera</i>	<i>Anthemis arvensis</i>	Valse kamille
<i>Chrysanthemum/ Gerbera</i>	<i>Tripleurospermum maritimum</i>	Reukeloze kamille
<i>Amaryllis</i>	<i>Allium cepa</i>	Ui
<i>Amaryllis</i>	<i>Galanthus nivalis</i>	Sneeuwklokje
<i>Amaryllis</i>	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	Narcis