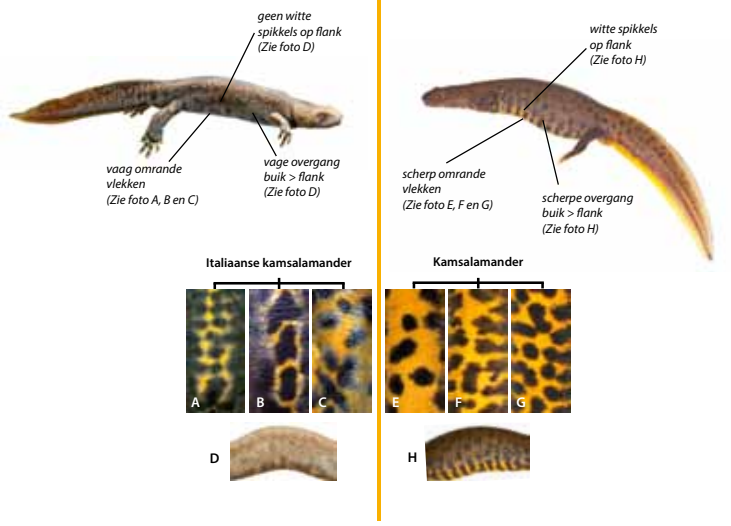


# Genetische vervuiling op de Veluwe

## Hybridisatie tussen een inheemse en een exotische kamsalamandersoort

**Ben Wielstra, Pim Arntzen, Jeroen van Delft & Willem Meilink**

**Wereldwijd worden soorten buiten hun natuurlijke verspreidingsgebied geïntroduceerd. Zulke exoten kunnen een bedreiging vormen voor inheemse soorten door competitie, predatie en het overbrengen van ziektes. Hybridisatie vormt een minder bekend risico. Hybridisatie heeft echter belangrijke gevolgen voor natuurbescherming, omdat het leidt tot een verlies van biodiversiteit op genniveau. Omdat hybridiserende soorten, en zeker hun nakomelingen, qua uiterlijk veelal moeilijk te onderscheiden zijn is zulke 'genetische vervuiling' een verborgen proces. Om genetische vervuiling bloot te leggen moet je daarom direct naar de genetische opmaak van individuen kijken.**



**Figuur 1.** Bruikbare uiterlijke kenmerken om de Italiaanse van de inheemse kamsalamander te onderscheiden zijn: een gele rugstreep bij juvenielen en vrouwtjes, de afwezigheid van witte vlekjes op de flanken, een onduidelijke overgang van het buikpatroon naar de flank en vaag begrensde zwarte vlekken op de gele buik (Foto's: Sergé Bogaerts & Jelger Herder).

### Inleiding

Het verspreidingsgebied van de kamsalamander (*Triturus cristatus*) strekt zich uit van het Verenigd Koninkrijk in het westen tot de Oeral in het oosten en van halverwege Scandinavië in het noorden tot en met de Karpaten in het zuiden. De Italiaanse kamsalamander (*Triturus carnifex*) komt voor in Italië, op de Balkan en rond de oostelijke helft van de Alpen. De twee soorten ontmoeten elkaar op natuurlijke wijze in een nauwe contactzone in Zuidoost-Duitsland, Oostenrijk en Tsjechië (Mikulíček *et al.*, 2012; Wielstra *et al.*, 2014b). De Italiaanse kamsalamander lijkt goed te aarden buiten haar natuurlijke verspreidingsgebied. Dankzij menselijk handelen heeft ze bijvoorbeeld de Azoren weten te koloniseren (Malkmus, 2004). Ook is de soort op verschillende locaties in het verspreidingsgebied van de kamsalamander geïntroduceerd

(Arntzen, 2001; Brede *et al.*, 2000; Maletzky *et al.*, 2008). Oplettende vrijwilligers van stichting RAVON ontdekten eind jaren 90 dat de Italiaanse kamsalamander zich eveneens op de Veluwe gevestigd heeft (Bogaerts *et al.*, 2001).

### Competitie en hybridisatie

Competitie met de geïntroduceerde Italiaanse kamsalamander vormt een risico voor de bedreigde inheemse kamsalamander. Echter, de historische verspreiding van de inheemse kamsalamander op de Veluwe is niet goed bekend (Spitzen - van der Sluijs *et al.*, 2007). Om de situatie op de Veluwe beter in beeld te krijgen volgde er onderzoek naar de verspreiding van beide kamsalamandersoorten, waaruit bleek dat de Italiaanse kamsalamander zich over de jaren heen heeft uitgebreid (Bogaerts, 2009; Bosman & van Delft, 2011; van Delft & Herder, 2014; van Hoogen & Crombaghs, 2012; Vleut & Bosman, 2005). Dieren werden op basis van uiterlijke kenmerken geïdentificeerd (zie figuur 1). Al snel werd echter duidelijk dat dieren 'op het oog' determineren niet nauwkeurig genoeg was om de verspreiding goed in beeld te brengen. Omdat een deel intermediair leek, rees het vermoeden dat er hybridisatie tussen de twee soorten optrad (Vleut & Bosman, 2005). Hybriden en/of hun nageslacht hebben doorgaans een lagere fitness dan de oudersoorten. Klassieke kruisings-experimenten hebben aangetoond dat dit ook in de kamsalamandergroep het geval is (Callan & Spurway, 1951; Spurway & Callan, 1950). Toch is het evident dat de genetische isolatie niet compleet is: niet alleen in het laboratorium, maar ook in de natuurlijke contactzone tussen de twee kamsalamandersoorten vindt hybridisatie en terugkruisen plaats (Maletzky *et al.*, 2008). Hybridisatie en terugkruisen bemoeilijkt het classificeren van individuele



salamanders op basis van uiterlijke kenmerken (Arntzen *et al.*, 2014) en sluit aan bij de ervaring in de praktijk op de Veluwe. De oplossing voor dit determinatieprobleem is om direct naar het DNA van de dieren te kijken.

#### Genetisch onderzoek op de Veluwe

Op verzoek van Team Invasieve Exoten hebben RAVON en Naturalis de genetische samenstelling van kamsalamanderpopulaties op de Veluwe in kaart gebracht (Meilink *et al.*, 2015). RAVON heeft weefselmonsters verzameld op de Veluwe en Naturalis had in haar collectie reeds samples van beide oudersoorten vanuit het natuurlijke verspreidingsgebied beschikbaar (zie tabel 1 en figuur 2). Allereerst werd de DNA-code voor een stukje mitochondriaal DNA vastgesteld (Wielstra *et al.*, 2013). Vervolgens werd met behulp van een verfijnd laboratoriumprotocol de base-volgorde voor vijftig nucleaire genen bepaald (Wielstra *et al.*, 2014a). De zo verkregen krachtige genetische dataset, stelde ons in staat om de volgende vragen te beantwoorden:

- Waar binnen het natuurlijke verspreidingsgebied komen de exotische Italiaanse kamsalamanders op de Veluwe vandaan?
- Hoe ver heeft de soort zich op de Veluwe verspreid?
- Vindt er hybridisatie plaats met de inheemse kamsalamander?
- Treedt er genetische vervuiling van de inheemse kamsalamander door de Italiaanse op?

De geografische herkomst van de bronpopulatie kon getraceerd worden door mitochondriaal DNA van de Veluwe te vergelijken met een dataset verzameld over het gehele natuurlijke verspreidingsgebied van de Italiaanse kamsalamander (Canestrelli *et al.*, 2012; Wielstra *et al.*, 2013). Hieruit bleek dat de voorouders van de Veluwse Italianen afkomstig zijn uit Kroatië. Waarschijnlijk werd de soort tot in de jaren 1970 verkocht door een tuincentrum nabij Vaassen, maar toen een wetswijziging de verkoop verbodt zijn de resterende salamanders in de vijvers alhier uitgezet (Bogaerts, 2002; 2009; Bogaerts *et al.*, 2001). De Veluwse

Nr.	Naam	Uitheems	Gemengd	Inheems
1	Hoog Soerensche Bossen	12	0	0
2	Ruitersgat	12	0	0
3	Prinsenkuil	11	1	0
4	Noorderheide	3	9	0
5	Groot Zeilmeer	0	12	0
6	Klein Zeilmeer	0	12	0
7	Leemkuilen Staverden	0	12	0
8	Leemkuilen Staverden	0	11	1
9	Leemkuilen Staverden	0	12	0
10	Mosterdveen, Andromedaven	0	11	1
11	Leemkuil Tongeren	0	0	12

**Tabel 1. De onderzochte wateren op de Veluwe en het aantal individuen geïdentificeerd als uitheems, genetisch gemengd en inheems. Nummers voor wateren komen overeen met figuur 2.**

populatie zou van deze dieren afstammen. Vanuit Vaassen gerekend, behoren de dichtstbijzijnde populaties op de Veluwe inderdaad tot de 'camifexkern', in overeenstemming met het scenario van een kolonisatie vanuit het tuincentrum.

Het gedetailleerde genetische profiel voor een groot aantal individuele salamanders op basis van de nucleaire genen bevestigt niet alleen dat de twee soorten hybridiseren op de Veluwe, maar ook dat hun nageslacht vruchtbaar is. Hierdoor is er een mengeling van de twee kamsalamandersoorten ontstaan (zie tabel 1 en figuur 2). De genetische compositie van populaties toont een gradiënt van compleet exotisch (puur Italiaanse kamsalamander), via verschillende maten van genetisch gemengd, naar compleet inheems (puur kamsalamander). Italiaanse genen worden tot op een afstand van zo'n 10 kilometer van Vaassen gevonden. De genetische vervuiling reikt daarmee verder dan vermoedt werd op basis van morfologie (Van Delft *et al.*, 2012). Met andere woorden: sommige individuen die uiterlijk puur inheems leken, bleken toch Italiaanse genen te bezitten.

De uitheemse Italiaanse kamsalamander en genetisch gemengde kamsalamanders hebben zich uitgebreid ten koste van de inheemse kamsalamander. Dit is af te leiden uit genetische sporen van de



**Italiaanse kamsalamander.  
(Foto: Jelger Herder)**

inheemse kamsalamander die achtergebleven zijn in populaties die nu verder voornamelijk genetisch materiaal van de Italiaanse kamsalamander bevatten.

Waarom zou de Italiaanse kamsalamander de inheemse kamsalamander lokaal verdringen? De Italiaanse kamsalamander heeft een bredere ecologische voorkeur en een hogere tolerantie voor menselijke verstoring (Arntzen, 2003). De relatief droge, voedselarme en in cultuur gebrachte Veluwe is misschien wel nooit bijzonder geschikt geweest voor de inheemse kamsalamander, waardoor de Italiaanse kamsalamander de overhand kreeg. Hoewel de Italianen en hun hybriden slechts in een relatief klein gebied zijn vastgesteld, is verdere uitbreiding niet uitgesloten. Inmiddels is echter typisch habitat voor de inheemse kamsalamander bereikt. Mogelijk zal dit de overname vertragen en misschien zelfs de hybridezone stabiliseren. Maar zelfs als de hybridezone stabiel zou blijven, dan kunnen exotische genen nog steeds doorsijpelen in de inheemse kamsalamander (Fitzpatrick & Shaffer, 2007).



### Bescherming

De inheemse kamsalamander staat als 'kwetsbaar' op de Nederlandse Rode Lijst, op bijlage 2 van de Conventie van Bern en is ook in EU Habitatrichtlijn bijlage II en IV opgenomen (Creemers & van Delft, 2009; van Delft *et al.*, 2007). Onze resultaten bevestigen dat de uitheemse Italiaanse kamsalamander de inheemse kamsalamander bedreigt, niet alleen door competitie, maar ook door hybridisatie en daarmee gepaard gaande genetische vervuiling. Deze uitkomsten zijn cruciaal voor een goede bescherming van onze inheemse kamsalamander.

Hoewel in theorie mogelijk, is het stoppen en terugdraaien van genetische vervuiling lastig in de praktijk. Een bijkomstigheid is de onduidelijke juridische status van hybriden en terugkruisingen. De aanpak van genetische vervuiling vereist samenwerking tussen wetenschappers, natuurbeschermers, terreinbeheerders, overheden en de wetgever. We hopen dat de kamsalamander-casus een handvat

**Figuur 2.** Het natuurlijke verspreidingsgebied van de Italiaanse en inheemse kamsalamander (A), de locatie van de elf onderzochte poelen op de Veluwe (B), en de genetische samenstelling van de 12 individuen per poel (C). Het verspreidingsgebied van de Italiaanse kamsalamander is in blauw en van de kamsalamander in rood weergegeven (de andere leden van het genus *Triturus* zijn in grijs weergegeven). De genetische samenstelling van de 132 onderzochte individuen op de Veluwe is geordend op poelnummer. Van poel 1 tot 11 neemt de proportie genetisch materiaal van de uitheemse Italiaanse kamsalamander (blauw) af en de proportie inheemse kamsalamander (rood) toe. De blauwe ster geeft de locatie weer van de vermoedelijke initiële introductie van Italiaanse kamsalamanders. Ten oosten van Vaassen is niet verzameld, omdat de snelweg A50 als onneembare barrière gezien wordt.

biedt voor het opstellen van algemene richtlijnen voor het beheer van het ingewikkelde maar reële beschermingsvraagstuk van genetische vervuiling.

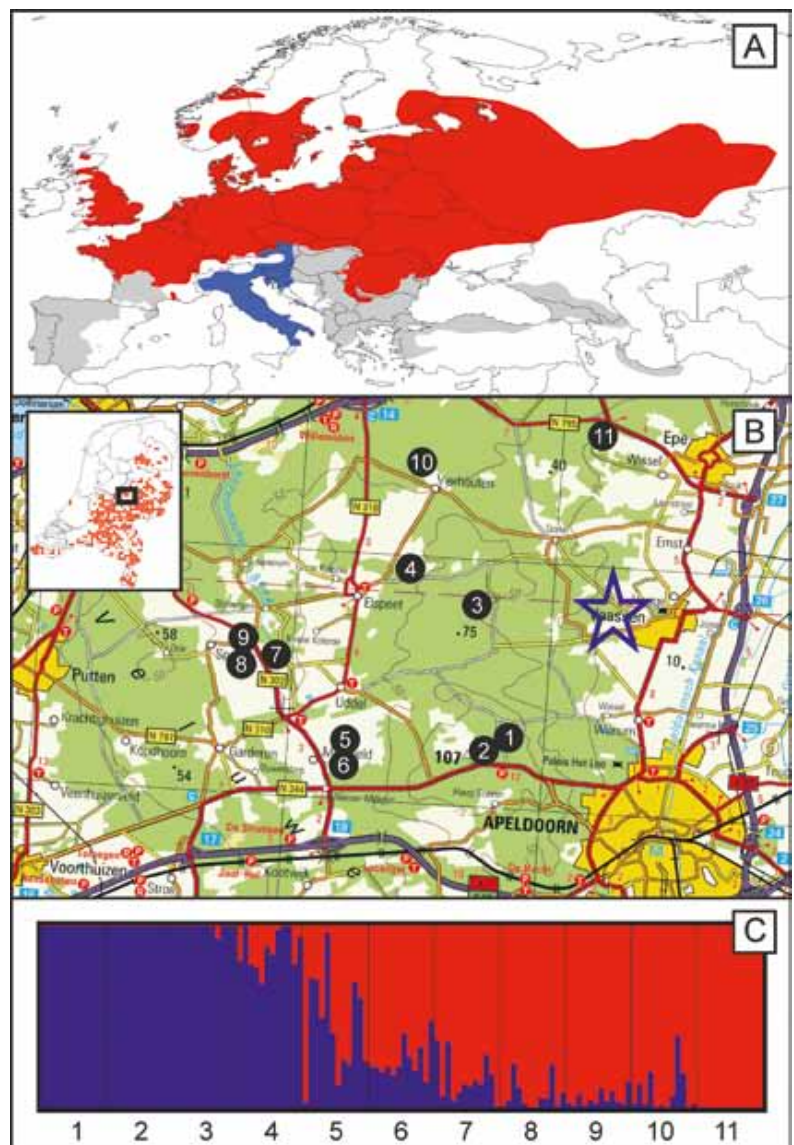
### Dankwoord

Dit onderzoek werd gefinancierd door het Bureau Risicobeoordeling en Onderzoeksprogrammering van de Nederlandse Voedsel en Warenautoriteit (Team Invasieve Exoten). Willem Meilink voerde het onderzoek uit als afstudeerproject bij Naturalis Biodiversity Center in het kader van een Master-studie 'Herpetology' aan de Vrije Universiteit Brussel, georganiseerd door Prof. F. Bossuyt.

### Summary

#### Genetic pollution on the Veluwe: hybridization between a native and an invasive crested newt species

The Italian Crested Newt (*Triturus cristifex*) has been introduced in the range of the Northern Crested Newt (*T. cristatus*) on the Veluwe in centre of the Netherlands. To determine the distribution of the Italian Crested Newt and test whether hybridization with and genetic pollution of the Northern Crested Newt occurs, we collected a comprehensive dataset comprising a mitochondrial and 50 nuclear genetic markers for eleven Crested Newt populations from the Veluwe (sampling twelve individuals per population) and additional populations from the natural



distribution of the two species involved. Based on the mitochondrial DNA marker the ancestors of the Italian Crested Newts on the Veluwe derive from Croatia. The genetic data are in line with a scenario of an initial introduction of Italian Crested Newts near the town of Vaassen. Populations show a gradient from purely Italian to purely Northern Crested Newt from Vaassen outwards, with different degrees of genetic admixture in between. The observed genetic admixture confirms that the Italian and Northern Crested Newts hybridize and backcross. Populations that are genetically mostly Italian Crested Newt show traces of Northern Crested Newt DNA, in line with displacement with hybridization by the Italian Crested Newt. Genetic pollution reaches up to circa 10 kilometre from Vaassen. The complex but legitimate issue of hybridization with genetic pollution needs to be considered in the conservation of the threatened, native Northern Crested Newt. We hope that the Crested Newt case will assist the formulation of guidelines on managing hybridization and genetic pollution in general.

#### Literatuur

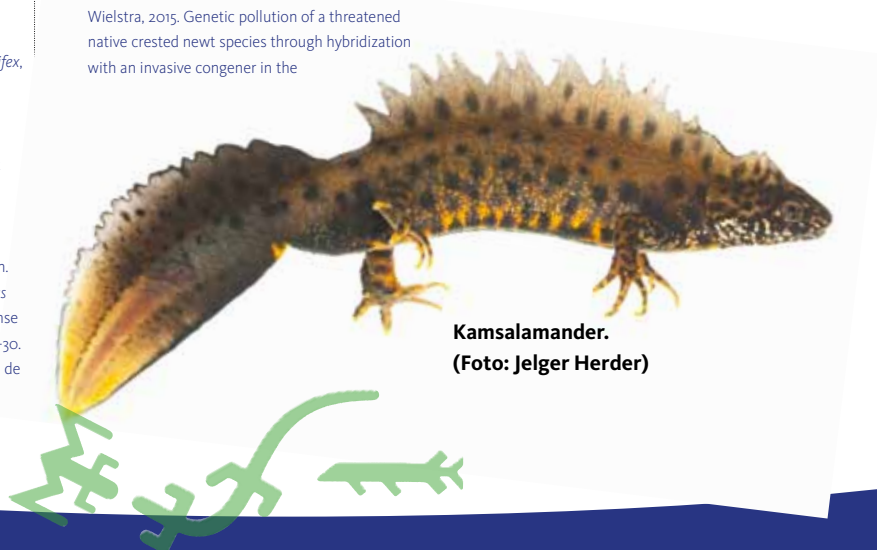
- Arntzen, J.W., 2001. Genetic variation in the Italian crested newt, *Triturus cristatus*, and the origin of a non-native population north of the Alps. *Biodiversity and Conservation* 10: 971-987.
- Arntzen, J.W., 2003. *Triturus cristatus* Superspecies - Kammolch-Artenkreis (*Triturus cristatus* (Laurenti, 1768) - Nördlicher Kammolch, *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768) - Italienischer Kammolch, *Triturus dobrogicus* (Kiritzescu, 1903) - Donau-Kammolch, *Triturus karelinii* (Strauch, 1870) - Südlicher Kammolch). In: Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Schwanzlurche IIA (eds. K. Grossebacher & B. Thiesmeier): 421-514. Aula-Verlag, Wiebelsheim.
- Arntzen, J.W., B. Wielstra & G.P. Wallis, 2014. The modality of nine *Triturus* newt hybrid zones, assessed with nuclear, mitochondrial and morphological data. *Biological Journal of the Linnean Society* 113: 604-622.
- Bogaerts, S., 2002. Italian crested newts, *Triturus cristatus*, on the Veluwe, Netherlands. *Zeitschrift für Feldherpetologie* 9: 217-226.
- Bogaerts, S., 2009. Italiaanse kamsalamander *Triturus cristatus*. In: Creemers, R.C.M. & J.J.C.W. van Delft (RAVON)(redactie), 2009. De amfibieën en reptielen van Nederland. Nederlandse Fauna 9. Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis, European Invertebrate Survey-Nederland, Leiden.
- Bogaerts, S., H. van Diepen & H. Karman, 2001. *Triturus cristatus*, een nieuwe exoot in Nederland, Italiaanse kamsalamanders op de Veluwe. *RAVON* 4(2): 25-30.
- Bosman, W. & J.J.C.W. van Delft, 2011. Verspreiding van de Italiaanse kamsalamander in Nederland en mogelijkheden voor beheersing en eliminatie. *RAVON*, Nijmegen.
- Brede, E.G., R.S. Thorpe, J.W. Arntzen & T.E.S. Langton, 2000. A morphometric study of a hybrid newt population (*Triturus cristatus*/*T. cristatus carnifex*): Beam Brook Nurseries, Surrey, U.K. *Biological Journal of the Linnean Society* 70: 685-695.
- Callan, H.G. & H. Spurway, 1951. A study of meiosis in interracial hybrids of the newt, *Triturus cristatus*. *Journal of Genetics* 50: 235-249.
- Canestrelli, D., D. Salvi, M. Maura, M.A. Bologna & G. Nascetti, 2012. One Species, three Pleistocene evolutionary histories: phylogeography of the Italian crested newt, *Triturus cristatus carnifex*. *PLoS ONE* 7: e41754.
- Creemers, R.C.M. & J.J.C.W. van Delft (RAVON) (Redactie), 2009. De amfibieën en reptielen van Nederland. Nederlandse fauna 9. Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis, European Invertebrate Survey - Nederland, Leiden.
- Delft, J.J.C.W. van, R.C.M. Creemers & A.M. Spitzen-van der Sluijs, 2007. Basisrapport Rode Lijst amfibieën en reptielen volgens Nederlandse en IUCN-criteria. *RAVON*, Nijmegen.
- Delft, J.J.C.W. van & J.E. Herder, 2014. Analyse eDNA Italiaanse kamsalamander 2013. *RAVON*, Nijmegen.
- Delft, J.J.C.W. van, A.M. Spitzen - van der Sluijs & J. Janse, 2012. Veldwerk ten behoeve van genetisch onderzoek inheemse en Italiaanse kamsalamanders op de Veluwe. *RAVON*, Nijmegen.
- Fitzpatrick, B.M. & H.B. Shaffer, 2007. Hybrid vigor between native and introduced salamanders raises new challenges for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 15793-15798.
- Hoogen, D. van & B. Crombaghs, 2012. Verspreidingsonderzoek Italiaanse Kamsalamander 2012. *Natuurbalans - Limes Divergens* BV, Nijmegen.
- Maletzky, A., P. Mikulíček, M. Franzen, A. Goldschmid, H.J. Gruber, A. Horák & M. Kyek, 2008. Hybridization and introgression between two species of crested newts (*Triturus cristatus* and *T. cristatus carnifex*) along contact zones in Germany and Austria: morphological and molecular data. *The Herpetological Journal* 18: 1-15.
- Malkmus, R., 2004. Amphibians and reptiles of Portugal, Madeira and the Azores archipelago: distribution and natural history notes. *A.R.G. Gantner Verlag* K.G.
- Meilink, W.R.M., J.W. Arntzen, J.J.C.W. van Delft & B. Wielstra, 2015. Genetic pollution of a threatened native crested newt species through hybridization with an invasive congener in the Netherlands. *Biological Conservation* 184: 145-153.
- Mikulíček, P., A. Horák, V. Zavadil, J. Kautman & J. Piálek, 2012. Hybridization between three crested newt species (*Triturus cristatus* superspecies) in the Czech Republic and Slovakia: Comparison of nuclear markers and mitochondrial DNA. *Folia Zoologica* 61: 202-218.
- Spitzen-van der Sluijs, A.M., G.W. Willink, R. Creemers, F.G.W.A. Ottburg, R.J. de Boer, P.M.L. Pfaff, W.W. de Wild, D.J. Stronks, R.J.H. Schröder, M.T. de Vos, D.M. Soes, P. Frigge & R.P.J.H. Struijk, 2007. Atlas reptielen en amfibieën in Gelderland, 1985-2005. Stichting RAVON, Nijmegen.
- Spurway, H. & H.G. Callan, 1950. Hybrids between some members of the Rassenkreis *Triturus cristatus*. *Experientia* 6: 95-96.
- Vleut, I. & W. Bosman, 2005. Actuele verspreiding van de Italiaanse kamsalamander (*Triturus cristatus carnifex*) in Gelderland en een morfometrische vergelijking met de inheemse kamsalamander (*Triturus cristatus*). *RAVON*, Nijmegen.
- Wielstra, B., J. Crnobrnja-Isailovic, S.N. Litvinchuk, B.T. Reijnen, A.K. Skidmore, K. Sotiropoulos, A.G. Toxopeus, N. Tzankov, T. Vukov & J.W. Arntzen, 2013. Tracing glacial refugia of *Triturus* newts based on mitochondrial DNA phylogeography and species distribution modeling. *Frontiers in Zoology* 10: 13.
- Wielstra, B., E. Duijm, P. Lagler, Y. Lammers, W.R.M. Meilink, J.M. Ziermann & J.W. Arntzen, 2014a. Parallel tagged amplicon sequencing of transcriptome-based genetic markers for *Triturus* newts with the Ion Torrent next-generation sequencing platform. *Molecular Ecology Resources* 14: 1080-1089.
- Wielstra, B., N. Sillero, J. Vörös, J.W. Arntzen, 2014b. The distribution of the crested and marbled newt species (Amphibia: Salamandridae: *Triturus*) – an addition to the New Atlas of Amphibians and Reptiles of Europe. *Amphibia-Reptilia* 35: 376 –381.

#### Ben Wielstra, Pim Arntzen en Willem Meilink

Naturalis Biodiversity Center  
Ben.Wielstra@naturalis.nl,  
Pim.Arntzen@naturalis.nl,  
W.R.M.Meilink@gmail.com

#### Jeroen van Delft

Stichting RAVON  
j.v.delft@ravon.nl



**Kamsalamander.**  
**(Foto: Jelger Herder)**