

# MtDNA barcoding van exotische amfibieën in de duinen

Ben Wielstra, Ingrid den Boer, James France, Manon de Visser & Richard P.J.H. Struijk

Van boomkikkers, vroedmeesterpadden en kamsalamanders zijn duinpopulaties van dubieuze herkomst bekend in Nationaal Park Hollandse Duinen. Leidse biologiestudenten hebben aan de hand van DNA de geografische oorsprong van deze populaties getraceerd. Hun resultaten zijn onlangs gepubliceerd als een reeks artikelen in het wetenschappelijke tijdschrift *Amphibia-Reptilia* en we vatten ze hier samen.

## Exoten en natuurbescherming

Door toenemende globalisatie kunnen soorten zich gemakkelijker vestigen op voorheen ontoegankelijke plekken (Simberloff, 2013; Ricciardi *et al.*, 2017). Soms gebeurt dit per ongeluk (een soort lift bijvoorbeeld mee als verstekeling), maar vaak ook bewust (iemand laat bijvoorbeeld een 'leuke' soort vrij omdat deze gezien wordt als verrijking van de inheemse biodiversiteit). Exotische soorten vormen één van de grootste risico's voor de biodiversiteit: ze kunnen inheemse soorten met uitsterven bedreigen via bijvoorbeeld predatie, competitie, infectie en hybridisatie (Rhymer & Simberloff, 1996; Mooney & Cleland, 2001; Pimentel *et al.*, 2001).

Voordat natuurbeschermers over beheersmaatregelen kunnen nadenken, is het van belang om een goed beeld van de verspreiding van exotische soorten te verkrijgen. Een belangrijke onderzoeksvraag is daarom: Komt deze soort hier van nature voor of is ze geïntroduceerd? Het antwoord op deze vraag is niet altijd vanzelfsprekend: er is vaak geen goed beeld over de historische verspreiding van soorten en daarnaast kunnen inheemse en exotische soorten sterk op elkaar lijken.

## De kracht van genetica

Met genetische data kan meer duidelijkheid verkregen worden over de herkomst en identiteit van organismen (Avice, 2000). Dit komt omdat verschillende soorten, maar ook verschillende geografische populaties van dezelfde soort, variatie in hun DNA vertonen. Een bijzonder bruikbare genetische merker is het mitochondriaal (mt) DNA, een stuk DNA waarvan de lettervolgorde (sequentie) al voor veel soorten over het gehele natuurlijke verspreidingsgebied in kaart is gebracht (Hebert *et al.*, 2003). De verschillende varianten van zo'n mtDNA merker, gekenmerkt door verschillen in de sequentie, worden haplotypes genoemd. Als er een database van mtDNA haplotypes beschikbaar is, kan de mtDNA sequentie van een individu daarmee vergeleken worden.

Een individu met een sequentie die overeenkomt met die van een niet-Nederlandse populatie of soort, wijst met zekerheid op een introductie. De genetische data levert daarnaast ook inzicht in waar uit het natuurlijke verspreidingsgebied de (voorouders van) desbetreffende exoten vandaan komen. Een inheems individu daarentegen móet een sequentie bezitten die van nature voorkomt in Nederland. Let op, de mogelijkheid van een introductie van een soort

vanuit elders in Nederland (een inheemse soort, maar een 'lokale exoot' of 'pseudo-exoot' buiten het natuurlijke verspreidingsgebied in Nederland) is op basis van mtDNA niet te achterhalen (omdat ze genetisch identiek zullen zijn). Er kan dus met mtDNA wel positief bewijs voor introductie worden gevonden, maar geen negatief bewijs.

## Een exotische amfibieënmix

De amfibieëngemeenschap in het duingebied Nationaal Park Hollandse Duinen is gedeeltelijk exotisch. Soorten die als inheems gezien worden, zijn: de bruine kikker (*Rana temporaria*), de 'groene kikker' (*Pelophylax ridibundus* | *P. lessonae* | *P. klepton esculentus complex*), de gewone pad (*Bufo bufo*), de rugstreeppad (*Epidalea calamita*) en de kleine watersalamander (*Lissotriton vulgaris*). Bij de kamsalamander (*Triturus cristatus*) wordt niet uitgesloten dat de soort in het verleden door de mens is geïntroduceerd. De vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) en de 'boomkikker' ('*Hyla*', zie beneden) zijn overduidelijk uitgezet. Binnen het onderzoek is gebruik gemaakt van de 'mtDNA barcoding' techniek om de geografische oorsprong van de kamsalamander, vroedmeesterpad en 'boomkikker' te bepalen.

In het voorjaar van 2021 hebben Bachelor studenten Biologie onderzoek gedaan in Nationaal Park Hollandse Duinen. Zij voerden hun eindstage uit aan de Universiteit Leiden, in samenwerking met RAVON en Naturalis. De bezochte gebieden zijn: Solleveld, Westduinpark, Meijndel, Berkheide en Lentevreugd.

**Figuur 1. Kaart van Nationaal Park Hollandse Duinen met daarop aangegeven de gebieden genoemd in de tekst: Solleveld, Westduinpark, Meijndel, Berkheide en Lentevreugd.**



**Figuur 2. Een wolkje DNA, gewonnen uit een swab sample. (Foto: I. den Boer)**

Westduinpark, Meijndel, Berkheide en Lentevreugd (Figuur 1). Amfibieën werden gevangen en op niet-invasieve wijze bemonsterd door wang- of huidslimvlies af te nemen met 'swabs' (wattenstaafjes) (Broquet *et al.*, 2007; Prunier *et al.*, 2012). Van deze monsters is DNA geëxtraheerd (Figuur 2) en vervolgens is de sequentie van een bepaald stukje mtDNA bepaald. Als laatste zijn de in Nationaal Park Hollandse Duinen gevonden sequenties vergeleken met de beschikbare internationale database van de doelsoorten. Eind 2022 zijn de bevindingen van de studenten gepubliceerd in het internationale vaktijdschrift *Amphibia-Reptilia* (de Brouwer *et al.*, 2023; Kuijt *et al.*, 2023; Vliegthart *et al.*, 2023). In dit artikel worden de samengevatte resultaten gepresenteerd.

## Kamsalamander: relict of introductie?

Kamsalamander (Figuur 3) was in Nationaal Park Hollandse Duinen bekend uit Meijndel sinds de jaren zeventig (Wanders, 2002). Sinds 2020 wordt de soort ook vanuit het Westduinpark gemeld (Nationale Databank Flora en Fauna (NDDFF)). Binnen Meijndel bleek de soort wijder verspreid dan bekend en is nu aangetroffen aan de zuidrand nabij TNO en aan de noordkant van de Kikkervalleien (tegen de Ganzenhoekplas aan). De soort blijkt ook nog verder noordelijk in terrein van Staatsbosbeheer te komen, namelijk de Ezelenweide, net ten zuiden van de Wassenarsse Slag; hier zijn eities aangetroffen. Het mtDNA haplotype aangetroffen in zowel Meijndel als het Westduinpark komt van nature in het zuiden van Nederland voor (maar niet in de rest van Nederland). Een autochtone (relict)populatie in Meijndel is daarmee niet uit te sluiten. Dat de eerste kamsalamandervondsten in het geïsoleerde Westduinpark van zeer recent dateren (na natuurherstelwerkzaamheden in de eerste helft van het vorig decennium), doet wel sterk vermoeden dat de soort hier recentelijk is uitgezet.

## Vroedmeesterpad: geïntroduceerd, maar waarvandaan?

In Meijndel bevindt zich een vroedmeesterpaddenpopulatie bij de Klip (Figuur 4); de eerste geregistreerde waarneming dateert uit 2006 en voortplanting is in recente jaren meermaals aangetoond (NDDFF). Aanwezigheid bij de Kievit, waar de soort in het verleden is waargenomen, kon niet meer bevestigd worden. Natuurlijk voorkomen van deze populatie kan op basis van geografie uitgesloten worden aangezien de soort in Nederland van nature uitsluitend in Zuid-Limburg voorkomt (van den Broek & Frissen In: Creemers & van Delft, 2009). Op basis van mtDNA barcoding bleek het niet mogelijk



**Figuur 3. Een larve van een kamsalamander wordt geswabt om een DNA sample te verkrijgen. 3 augustus 2021, Westduinpark. (Foto: I. den Boer)**

om de herkomst van de voorouders van deze dieren te pinpointen. Hoewel vroedmeesterpad veel genetische variatie vertoont in Spanje, is de soort in het gros van het verspreidingsgebied ten noorden van de Pyreneeën genetisch homogeen. Het mtDNA haplotype dat is aangetroffen komt van nature in Nederland voor, maar ook in Frankrijk, België en Duitsland.

## Boomkikker: meerdere exotische soorten

Sinds 2000 worden er boomkikkers gemeld uit Meijndel (Oppentocht, 2002; Zuiderwijk, 2004). Deze populatie is exponentieel toegenomen en sinds 2005 zijn ook de aangrenzende gebieden Berkheide en Lentevreugd bezet (Teunissen, 2007). Vanaf 2017 worden boomkikkers in het Westduinpark waargenomen en sinds 2019 in Solleveld (NDDFF). Van de boomkikkerpopulatie in Nationaal Park Hollandse Duinen is altijd aangenomen dat het de inheemse boomkikkersoort *Hyla arborea* betrof (Figuur 5). Deze soort is echter niet binnen het onderzoeksgebied aangetroffen. Wel bleken er, tot ieders grote verbazing, twee andere soorten voor te komen, namelijk de oostelijke boomkikker (*H. orientalis*) (Figuur 6) en de Italiaanse boomkikker (*H. intermedia*) (Figuur 7). De oostelijke boomkikker is op alle onderzochte locaties aangetroffen. In het Westduinpark is daarnaast ook mtDNA van de Italiaanse boomkikker aangetroffen. Het mtDNA haplotype van de oostelijke boomkikkers is te herleiden naar het Griekse eiland Lesbos. Dat van de Italiaanse boomkikkers is van nature wijdverspreid in Centraal-Italië, van de Apennijnen in het noorden tot en met Calabrië in het zuiden.



**Figuur 4. Een mannetje vroedmeesterpad met eisnoer. 29 juni 2021, Scheveningen. (Foto: I. den Boer)**



#### Wat betekent dit voor natuurbescherming?

Op basis van de mtDNA gegevens wijkt de kamsalamander niet af van de dichtstbijzijnde natuurlijke populaties (maar ook niet van die in bijvoorbeeld Frankrijk). Daarmee is geen onomstotelijk verband aangetoond met een uitzettingsoorsprong. De vraag of er sprake is van een relict of uitzetting kan op basis van het huidige onderzoek dus nog niet eenduidig worden beantwoord (de Brouwer *et al.*, 2023). Toch is het opvallend dat deze populatie zo geïsoleerd ligt ten opzichte van andere natuurlijke Nederlandse populaties en dat de soort relatief recentelijk pas is ontdekt. De optie van een introductie door de mens blijft daarmee bestaan.

De situatie rond de vroedmeesterpad stelt ons voor een natuurbescherming-paradox (Marchetti & Engstrom, 2016). Eigenlijk moet de populatie in Meijendel als exoot gezien worden, maar deze status wordt typisch op landelijk niveau bepaald (Koster *et al.*, 2023). Omdat de soort ook inheems voorkomt in Nederland in Zuid-Limburg, en hier bovendien zeldzaam is, is het wettelijk gezien onduidelijk hoe vroedmeesterpaden in Meijendel behandeld moeten worden (Kuijt *et al.*, 2023).

Van de twee waargenomen boomkikkersoorten is de situatie duidelijk: deze komen van nature niet in Nederland voor en hun status als exoot staat buiten kijf (Kuijt *et al.*, 2023). Ook over een impact op de lokale biodiversiteit valt niet te twisten: oostelijke boomkikkers zijn sinds het begin van deze eeuw explosief toegenomen in Nationaal Park Hollandse Duinen. Losstaand van de andere vormen van impact die hand in hand gaan met exoten, zullen deze uitheemse boomkikkers op zijn minst inheemse soorten (hoofdzakelijk insecten) opeten en daarmee ook met andere (amfibie)soorten concurreren. In beheerplannen hoeft er vanwege de exotische status in principe geen rekening gehouden te worden met boomkikkers. Sterker nog, vanuit het oogpunt van natuurbescherming zou actief ingrijpen goed denkbaar zijn. Zo kunnen dergelijke grote exotenpopulaties een bron vormen voor secundaire verspreiding (door de mens) naar autochtone boomkikkerpopulaties, waar hybridisatie vervolgens nadelige gevolgen kan hebben op de inheemse soort (*H. arborea*) – een aanzienlijk risico dat maar weinig aandacht krijgt.



**Figuur 5 t/m 7. Onder boomkikkers bevinden zich zogenaamde 'cryptische soorten': soorten die eigenlijk alleen op basis van DNA van elkaar te onderscheiden zijn. Van links naar rechts: boomkikker *Hyla arborea* (Foto: J. Herder), oostelijke boomkikker *H. orientalis* (Foto: I. den Boer) en Italiaanse boomkikker *H. intermedia* (Foto: J. Herder).**

Wij raden aan om de situatie rond de boomkikkers, maar ook de kamsalamander en vroedmeesterpad, tenminste goed te volgen, om vanuit een biodiversiteitsstrategie objectief te kunnen oordelen. Beleidsmakers dienen situaties als deze ook direct na ontdekking op de agenda te zetten en eventueel ingrijpen op zijn minst bespreekbaar te maken. Dit omdat het helaas inherent is aan de exotenproblematiek dat er pas over ingrijpen wordt nagedacht als het eigenlijk al te laat is.

#### Dankwoord

De studentenprojecten werden uitgevoerd vanuit het Institute of Biology Leiden (IBL) van de Universiteit Leiden en Naturalis Biodiversity Center, in nauwe samenwerking met RAVON (Reptielen Amfibieën Vissen Onderzoek Nederland), Marit Kuijt en Liam Oskam werkten aan boomkikkers, Chris Vliegthart en Maurits van de Vrede aan vroedmeesterpaden en Jurian de Brouwer en Bas Helder aan kamsalamanders. Terreintoegang is verleend door Duina, Staatsbosbeheer en de gemeente Den Haag.

#### Summary

##### Mitochondrial DNA barcoding exotic amphibians in Dutch coastal dunes

In the Dutch coastal dunes, in the National Park Hollandse Duinen, outlier populations of crested newts, midwife toads and tree frogs are known, far removed from other Dutch populations. For the two Anurans, an introduction history is beyond doubt, while for the crested newt a natural relict is a possibility. Biology students from Leiden University have traced the geographical origin of these amphibian populations using mitochondrial DNA barcoding. The crested newts share the same haplotypes with unambiguously native populations from the south (but not the north) of the Netherlands, meaning the mtDNA data does not provide positive evidence for an introduction. The midwife toads show the same mtDNA haplotype that occurs across genetically homogeneous France, Belgium, Germany and The Netherlands, which hampers definition of the exact source of origin. The tree frogs turn out not to concern the species that is native to the Netherlands (*Hyla arborea*) but two closely related, cryptic species (*H. orientalis* and *H. intermedia*). Issues for conservation raised by these results are discussed.

#### Literatuur

- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.
- Broek van den, T.G.Y. & D.P.E.M. Frissen, 2009. Vroedmeesterpad *Alytes obstetricans*. In: Creemers, R., J.J.C.W. van Delft (RAVON) 2009. De amfibieën en reptielen van Nederland. In: Nederlandse fauna 9. Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis & European Invertebrate Survey – Nederland, Leiden.
- Broquet, T., L. Berset-Braendli, G. Emarsi & L. Fumagalli, 2007. Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics* 8: 509-511.
- Creemers, R., J.J.C.W. van Delft, 2009. De amfibieën en reptielen van Nederland. In: Nederlandse fauna 9. Leiden, Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis & European Invertebrate Survey.
- Brouwer de, J., B. Helder, J. France, M.C. de Visser, R.P.J.H. Struijk & B. Wielstra, 2023. An isolated crested newt population in Dutch coastal dunes: distribution relict or introduction? *Amphibia-Reptilia* 44(1): 19-26.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, J.R. de Waard, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313-321.
- Koster, S., N. Prins, C. Dufresnes, J. France, M.C. de Visser, R.P.J.H. Struijk & B. Wielstra, 2023. The conservation paradox of an introduced population of a threatened species: spadefoot toads in the coastal dunes of the Netherlands. *Amphibia-Reptilia* 44(1): 11-18.
- Kuijt, M., L. Oskam, I. den Boer, C. Dufresnes, J. France, M. Gilbert, M.C. de Visser, R.P.J.H. Struijk & B. Wielstra, 2023. The introduction of three cryptic tree frog species in the Dutch coastal dunes challenges conservation paradigms. *Amphibia-Reptilia* 44(1): 1-10.
- Marchetti, M.P., T. Engstrom, 2016. The conservation paradox of endangered and invasive species. *Conservation Biology* 30: 434-437.
- Mooney, H., E. Cleland, 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 98: 5446-5451.
- Oppenocht, J.P., 2002. Vestiging van de boomkikker (*Hyla arborea*) in Meijendel. *Holland's Duinen* 44: 27-29.



**Figuur 8. Voortplantingswater oostelijke boomkikker in Meijendel (R. Struijk)**

- Pimentel, D., S. McNeil, J. Janacka, J. Wightman, C. Simmonds, C. O'Connell, E. Wong, L. Russel, J. Zern, T. Aquino, T. Tsomondo, 2001. Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 84: 1-20.
- Prunier, J., B. Kaufmann, O. Groleat, F. Pompanon, P. Joly, 2012. Skin swabbing as a new efficient DNA sampling technique in amphibians, and 14 new microsatellite markers in the alpine newt (*Ichthyosaura alpestris*). *Molecular Ecology Resources* 12: 524-531.
- Rhymer, J.M., D. Simberloff, 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 83-109.
- Ricciardi, A., T.M. Blackburn, J.T. Carlton, J.T.A. Dick, P.E. Hulme, J.C. Iacarella, J.M. Jeschke, A.M. Liebhold, J.L. Lockwood, H.J. MacIsaac, P. Pyšek, D.M. Richardson, G.M. Ruiz, D. Simberloff, W.J. Sutherland, D.A. Wardle, D.C. Aldridge, 2017. Invasion science: a horizon scan of emerging challenges and opportunities. *Trends in Ecology & Evolution* 32: 464-474.
- Simberloff, D., 2013. *Invasive species: what everyone needs to know*, Oxford University Press.
- Teunissen, W., 2007. Boomkikkers in Berkheide. *De Duinstag* 22: 12-15.
- Vliegthart, C., M. van de Vrede, I. den Boer, M. Gilbert, P. Lemmers, J. France, M.C. de Visser, R.P.J.H. Struijk & B. Wielstra, 2023. The limits of mtDNA analysis for determining the provenance of invasive species: a midwife toad example. *Amphibia-Reptilia* 44(1): 27-33.
- Wanders, R., 2002. Kamsalamander na 30 jaar nog steeds in Meijendel. *Holland's Duinen* 41: 24-26.
- Zuiderwijk, A., 2004. Boomkikkers en kamsalamanders in duinen Zuid-Holland. *Meetnet Amfibieën* 15: 8-9.

#### Ben Wielstra

Institute of Biology Leiden, Leiden University  
Naturalis Biodiversity Center, ben.wielstra@naturalis.nl

#### Ingrid den Boer

RAVON vrijwilliger, idb@ziggo.nl

#### James France

Institute of Biology Leiden, Leiden University  
Naturalis Biodiversity Center, james.france@naturalis.nl

#### Manon de Visser

Institute of Biology Leiden, Leiden University  
Naturalis Biodiversity Center, manon.devisser@naturalis.nl

#### Richard Struijk

RAVON, rstruijk@ravon.nl