

# Routinematige screening van genetische barcodes bij groene kikkers legt verborgen invasies bloot

**Exotische invasieve soorten vormen een reëel probleem voor de biodiversiteit en de economie. Een grote hinderpaal voor een efficiënte preventie en bestrijding van exoten is hun herkenning in een vroeg stadium van de invasie. Sommige soorten exoten zijn met traditionele identificatietechnieken nauwelijks te onderscheiden van inheemse soorten. Van groene kikkers weten we dat er een handelscircuit bestaat, onder meer voor siervijvers. De herkomst van deze dieren is veelal obscuur ('Egyptische', 'Italiaanse', ...) en hun lot na importering is slecht bekend, te meer omdat het onderscheid met inheemse soorten zeer moeilijk kan zijn. Aan de hand van genetische identificatie van groene kikkers via DNA-barcodes proberen we na te gaan in welke mate exotische kikkers zich in het wild gevestigd hebben in Vlaanderen, over welke soorten het gaat en wat hun oorsprong is.**

De vestiging van uitheemse soorten wordt als onwenselijk beschouwd, omdat ze potentieel ecologische en economische schade veroorzaken. Bestrijding van ongewenste exoten vereist wel dat het onderscheid tussen inheems en uitheems bekend moet zijn. Voor vele soortengroepen bestaan er echter wereldwijd slechts een handvol experts. Bovendien is een groot deel van de globale soortendiversiteit nog onontdekt.

Een nieuwe universele techniek die zich bij uitstek leent tot het snel herkennen en op naam brengen van soorten zonder een brede taxonomische voorkennis, is de zogenaamde DNA barcoding (Hebert et al., 2003; kader 1).

## Genetische identificatie van groene kikkers in België

In deze studie maken we gebruik van DNA-barcoding om de identiteit van

groene kikkers na te gaan. Groene kikkers binnen en buiten Europa zijn moeilijk van elkaar te onderscheiden louter op basis van hun uiterlijk, gedrag en geluid. De moeilijkheid wordt versterkt door het voorkomen van hybriden tussen de soorten. Afhankelijk van de opvattingen, komen in de Westelijke Palearctis zo'n 11-13 soorten 'groene' kikker voor. Tegenwoordig worden deze geïntroduceerd in een apart geslacht, *Pelophylax*. Dé groene kikker bestaat aldus niet.

De groene kikkers die in België inheems zijn, zijn de Poelkikker (*Pelophylax lessonae*) en de Bastaardkikker (*P. klepton esculentus*). Daarnaast komt sinds de jaren 1970 een derde, geïntroduceerde soort voor, de Europese meerkikker (*P. ridibundus*). Zowel de Bastaardkikker als de Poelkikker hebben duchtig te vrezen van de Europese meerkikker, omdat deze laatstelijk zowel beide soorten ecologisch kan verdringen, maar ook omdat deze door hybridisatie beide soorten kan doen verdwijnen (Holsbeek & Jooris, 2010).

## Kader 1. DNA barcoding

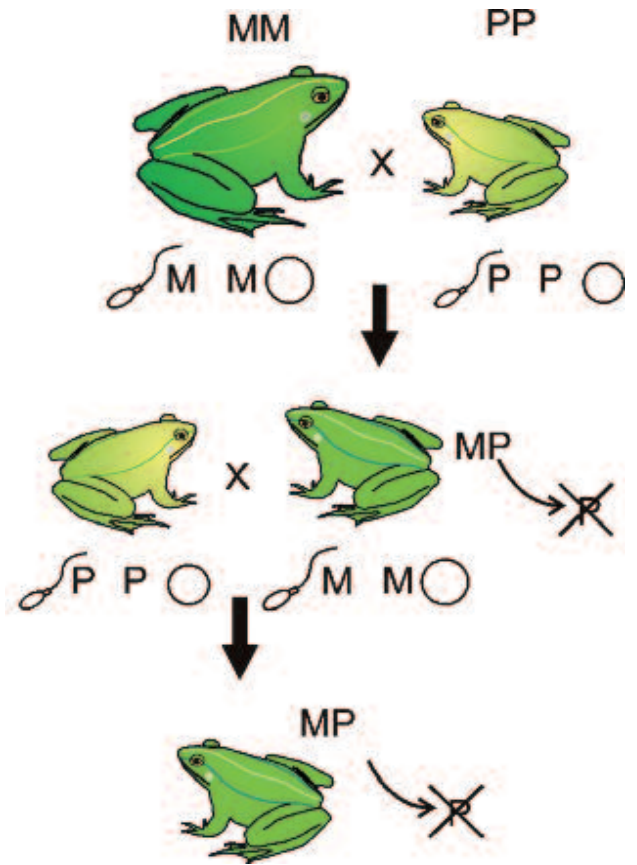
Aan de hand van de genetische vierlettercode (de nucleotiden A, C, T en G) wordt van een bepaald genfragment de exacte code van een stuk DNA bepaald; meestal is dat het eerste deel van het gen dat codeert voor een eiwit dat het Cytochroom Oxidase wordt genoemd (Cox1 of COI) (althans voor dierlijke organismen). Het principe is gestoeld op het feit dat individuen van eenzelfde soort doorgaans een nauwere genetische verwantschap vertonen met elkaar dan met individuen van andere soorten. Zo'n DNA streepjescode telt meestal  $\pm 700$  nucleotiden; dit betekent dat er in principe voor zo'n fragment  $4^{700}$  mogelijke combinaties zijn, waardoor de kans dat twee niet-verwante soorten door toeval dezelfde DNA-sequentie hebben onbestaande

is. Door van een onbekend organisme de DNA-sequentie van het COI-gen te bepalen, kan deze in vergelijking met een databank aangeven hoe sterk het DNA-fragment van dit organisme lijkt op DNA-fragmenten uit die databank. Is er een quasi perfecte match ( $>95\%$ ) dan is de kans groot dat de identiteit van het organisme bekend is. Intussen is er rond deze techniek een reusachtig netwerk van wetenschappers ontstaan, die allen hun steentje bijdragen tot het beschrijven van de biodiversiteit en het catalogiseren van de DNA barcodes in een databank van "The Barcode of Life" (<http://www.barcodeoflife.org/>). Dit laat toe om organismen die op naam gebracht moeten worden direct te vergelijken met vele duizenden DNA-sequenties van referentiestalen.

DNA barcoding is waarschijnlijk één van de meest revolutionaire innovaties in het biodiversiteitsonderzoek van het laatste decennium. Aan de hand van deze techniek is men plots wereldwijd nieuwe soorten beginnen te 'ontdekken'. In sommige gevallen bleek wat tot dan toe als één soort met een breed ecologisch spectrum werd beschouwd, in feite bestond uit minstens tien sterk gespecialiseerde soorten (Hebert et al., 2004). Zo blijken de Europese rivierdonderpadden (*Cottus* sp.) uit minimaal negen soorten te bestaan, waarvan er twee in België voorkomen (Freyhof et al., 2005; Raeymaekers et al., dit nummer). Voor de detectie van invasieve soorten die sterk lijken op inheemse soorten is dit van groot nut, alsook om de oorsprong te bepalen van de invasies: de geschie-

denis van de evolutie van soorten maakt vaak dat in één regio andere genetische varianten van een soort voorkomen dan elders. Indien men de geografische genetische variatie ('fylogeografie') van een soort nauwkeurig kan bepalen, dan kan men relatief eenvoudig de oorsprong van bepaalde individuen bepalen. Hierdoor zijn deze technieken ook interessant om illegale handel in beschermde dieren en planten bloot te leggen. Zo blijkt dat walvisvlees in Koreaanse en Japanse winkels, gevangen onder het mom van wetenschappelijk onderzoek op Dwergvinvis (*Balaenoptera acuturostrata*), afkomstig te zijn van veel verschillende walvisachtigen, en zelfs illegaal verhandeld te worden naar de Verenigde Staten (Baker et al., 2010).

**Fig. 1.** Het ontstaan van Bastaardkikkers wordt geschat op ca 10 000 jaren geleden, toen een eerste kruising ontstond van Europese meerkikker (MM) met Poelkikker (PP) (generatie 0). Europese meerkikkers hebben een gen dat in hybriden (hier Bastaardkikker, MP) ervoor zorgt dat het genetisch materiaal van de andere soort bij de aanmaak van geslachtscellen wordt vernietigd. Deze hybriden kunnen dus enkel geslachtscellen van Meerkikkers aanmaken (generatie 1). Bij terugkruising met de tweede oudersoort (hier Poelkikker) wordt opnieuw een hybride Bastaardkikker gevormd (generatie 2), enzovoort. In populaties die enkel uit Bastaardkikkers bestaan, zijn bepaalde Bastaardkikkers (triploïden, met drie in plaats van twee chromosomensets) in staat tot het omgekeerde: zij verwijderen het M-gedeelte voor de voortplanting, en produceren dus geslachtscellen van Poelkikker. Los daarvan is het mitochondriaal DNA altijd afkomstig van het wijfje, en kan dus gebruikt worden om de oorsprong van de moederlijn te achterhalen.

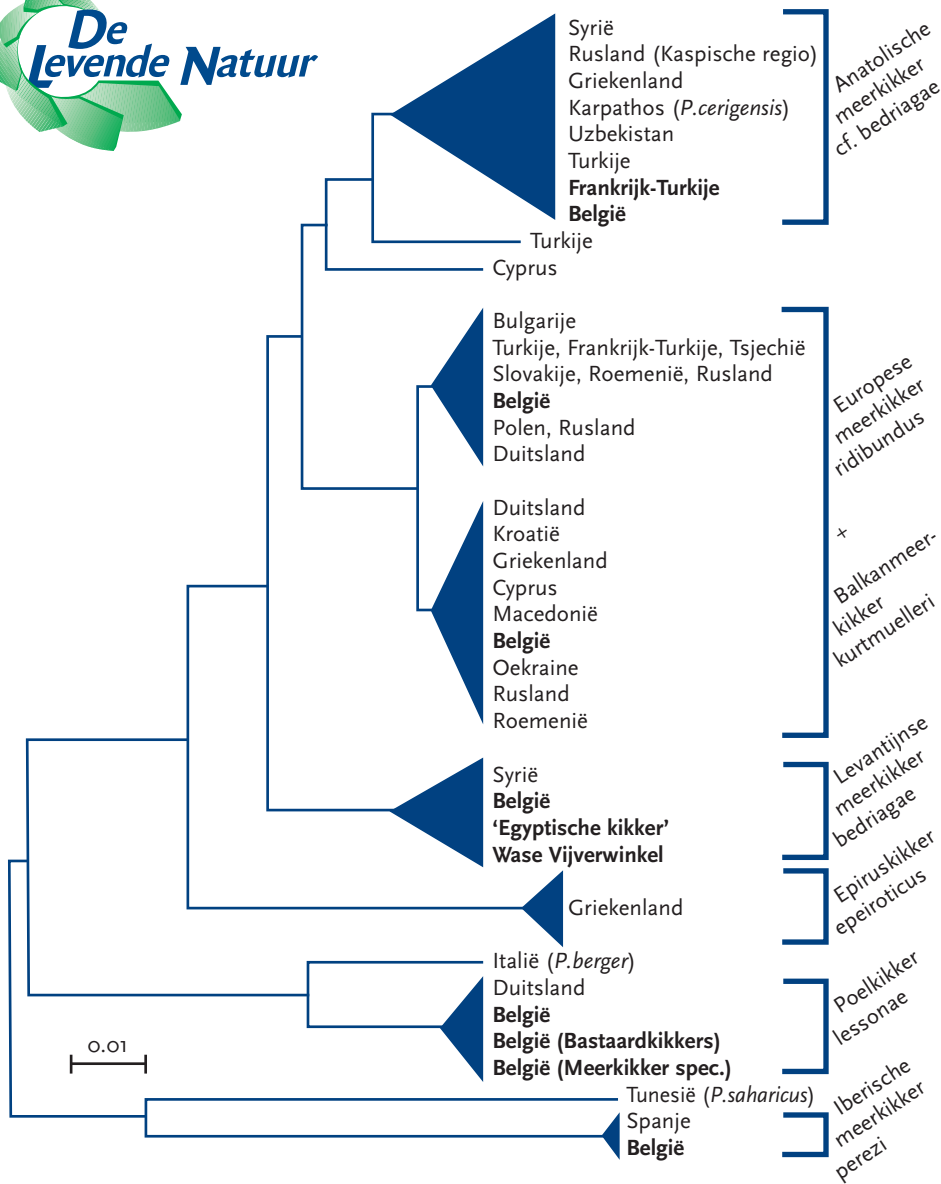


In feite is de Bastaardkikker geen echte soort, maar bestaat deze uit een reeks van min of meer stabiele hybriden tussen Poelkikker en Europese meerkikker, die reeds duizenden jaren in afzondering leeft van de Europese meerkikker (fig. 1), althans in West-Europa. Via een complex voortplantingsmechanisme kruist de Bastaardkikker telkens weer met andere Poelkikkers of andere Bastaardkikkers, hetgeen opnieuw Bastaardkikkers oplevert (fig. 1). In feite parasiteert de Bastaardkikker op een deel van de genen van Poelkikkers, maar hij geeft in de regel aan zijn nageslacht enkel de genen van de Europese meerkikker door, niet de Poelkikker genen. Het 'klepton' in zijn wetenschappelijke naam (van het Griekse 'kleptein', stelen) slaat daar op.

Wanneer een Bastaardkikker echter kruist met een Europese meerkikker, bestaat het nageslacht enkel uit Europese meerkikkers (fig. 1). Door de recente invasie van de Europese meerkikker is dus een situatie ontstaan waarin dit opmerkelijke asymmetrische voortplantingssysteem danig verstoord wordt: Europese meerkikkers kunnen nu plots weer kruisen met Poelkikkers, hetgeen nieuwe Bastaardkikkers oplevert. Een generatie later kruisen deze nieuwe Bastaardkikkers weer met Europese meerkikkers die nieuwe Europese meerkikkers opleveren, en uiteindelijk blijft enkel deze laatste soort nog over. De kans bestaat dus dat binnen afzienbare tijd zowel de Poelkikker als de Bastaardkikker zo goed als verdwenen zullen zijn als gevolg van deze



**Foto 1.** De Bastaardkikker, tot voor kort de meest algemene van de groene kikkers in België is in gevaar door kruisingen met uitheemse soorten (foto's: Joachim Mergeay).



**Fig. 2.** Verwantschapsboom op basis van DNA sequenties (NADH<sub>1</sub>-gen) van Europese groene kikkers (excl. *P. shqipericus* en *P. cretensis*), en de daaruit volgende identificatie van Belgische stalen, Franse stalen van Turkse afkomst, en stalen uit een vijverwinkel (in vet).

Het maatstreepje (0.01) geeft een genetisch verschil van één percent weer. De gedetailleerde verwantschapsrelaties zijn hier niet weergegeven, maar zijn per groep vervangen door zwarte driehoeken, ter vereenvoudiging. Deze figuur toont aan dat de Belgische stalen behoren tot minstens vijf verschillende soorten. Bastaardkikkers uit onze contreien hebben typisch mitochondriaal DNA van Poelkikker, omdat dat de primaire hybridisatie gebeurde tussen een wijffe Poelkikker en een mannetje Europese meerkikker (fig. 1). De Anatolische meerkikker is een soort waarvan de exacte naam ter discussie staat. Wel geven genetische analyses als deze aan dat het een aparte soort is, die duidelijk verschilt van de Levantijnse meerkikker (*P. bedriagae*) waartoe hij lange tijd gerekend werd. Op het Griekse eiland Karpathos komt echter ook een endemische kikker voor, die relatief recent (Laat-Pleistoceen) ontstaat is uit de Anatolische meerkikker, *P. cerigensis*. Ook de Franse kikkers die geïmporteerd waren uit Turkije bestonden uit Anatolische en Europese meerkikkers. Tegenwoordig wordt van de Europese meerkikker de Balkanmeerkikker (*P. kurtmuelleri*), die in ZO-Europa voorkomt, afgesplitst. Ook bepaalde Belgische kikkers waren zeer nauw verwant met ZO-Europese exemplaren die waarschijnlijk behoren tot de Balkanmeerkikker, hoewel hierover geen absolute zekerheid bestaat.

Meerkikkers met het mitochondriaal DNA van Poelkikker vormen het bewijs van genetische opslokking van Bastaardkikkers door Meerkikkers. Het staal van Tunesië (*P. saharicus*) behoort tot de Egyptische groene kikker, terwijl het Italiaanse staal (*P. bergeri*) behoort tot de Italiaanse poelkikker. Het onderscheid tussen de Europese meerkikker en de Balkanmeerkikker is met deze genetische merker niet eenduidig. Zie fig. 3 voor details binnen de Anatolische, Europese en Balkanmeerkikkers. Eén staal uit Turkije en een ander staal uit Cyprus (9e en 10e staal van boven) zijn zodanig genetisch verschillend van de andere stalen dat ze mogelijk behoren aan nieuwe, onbeschreven soorten.

bizarre 'genetische opslokking', behalve in gebieden die niet geschikt zijn voor de Europese meerkikker, zoals heidegebieden. Hoewel de Europese meerkikker feitelijk een exoot is van Centraal- en Oost-Europese afkomst, genieten alle drie de soorten volledige bescherming, zowel in België als Nederland. Als gevolg van de populariteit van kikkers voor zowel culinaire doeleinden (kikkerbiljetjes) als sierdieren in tuinvijvers, werden en worden allerlei groene kikkers nog steeds verhandeld. Soms gebeurt dit in flagrante illegaliteit, soms omdat men de kantjes van legaliteit afloopt, maar even vaak uit onwetendheid (Mergeay, 2009).

Aangezien de drie soorten hier beschermd zijn, omzeilen handelaars dit door nauw verwante uitheemse soorten te verkopen. Deze worden immers veelal niet beschermd in Europa, noch in hun land van herkomst. Eenmaal binnen de Schengen-zone, is handel in deze dieren volledig legaal. Aangezien uitheemse groene kikkers zeer sterk gelijkend op onze inheemse groene kikkers, en zelfs door specialisten zeer moeilijk te onderscheiden zijn, is het van belang om eventuele invasies van exotische kikkers in een vroeg stadium te ontdekken en te kunnen ingrijpen aan de bron van het probleem.

### Bemonstering

Om een idee te krijgen van de omvang van dit potentiële probleem, bemonsterden we van 2006 tot 2008 DNA van 1450 groene kikkers afkomstig van 88 locaties in België. Daarnaast bemonsterden we vier exemplaren die we gekocht hadden in een vijverwinkel in Sint-Niklaas, en 22 exemplaren afkomstig van een kweekcentrum in Arternay (centraal-Frankrijk) dat in het verleden kikkers importeerde vanuit Turkije (Frankrijk-Turkije) voor kikkerbiljetjes. We identificeerden de soort aan de hand van DNA-barcoding (toegepast op het NADH<sub>1</sub>-gen) en vergelijking met het DNA van andere soorten van het genus *Pelophylax*, bemonsterd in de Westelijke Palearctis en met DNA uit online databanken. Dit NADH<sub>1</sub>-gen is net als bij COI een deel van het mitochondriaal DNA, en dat heeft als gevolg dat het enkel via de moeders wordt doorgegeven aan de nakomelingen. Aan de hand van de DNA sequenties maakten we een stamboom die de verwantschap tussen de belangrijkste soorten aangeeft (fig. 2). Deze analyse toont dat de Belgische stalen behoorden aan minstens vijf verschillende soorten, waarvan vier uit-

heems zijn. Naast exemplaren met Poelkikker-DNA (Bastaardkikker, Poelkikker) vonden we exemplaren met DNA van Europese meerkikker, Anatolische meerkikker (*P. cf. bedriagae*), Levantijnse meerkikker (*P. bedriagae*) en Iberische meerkikker (*P. perezi*) (fig. 2).

Het staal van de vijverwinkel uit Sint-Niklaas bleek uitsluitend te bestaan uit Levantijnse meerkikkers (*P. bedriagae*), net als zes genetisch identieke kikkerstalen uit Hamme, zo'n 10 kilometer verderop. Intussen is deze soort nog op meerdere andere plaatsen in de omgeving van Sint-Niklaas opgedoken (Jooris & Holsbeek, 2010). Deze winkel is daardoor een zeer waarschijnlijke oorzaak van de expansie van deze soort in België. Eén Belgisch staal uit West-Vlaanderen werd geïdentificeerd als Iberische meerkikker (*P. perezi*). In totaal was 53% van de onderzochte poelen en vijvers bevolkt door uitheemse soorten, waarvan weliswaar 70% behoorde tot Europese meerkikkers, en 26% tot Anatolische meerkikkers. De verspreiding van de verschillende kikkerensoorten in de onderzochte gebieden is weergegeven in figuur 3.

Een zeer opmerkelijke waarneming is dat in zes stalen die qua uiterlijk duidelijk behoorden aan één van de meerkikkersoorten (grote soorten met lange poten, en gereduceerde hielknobbel), we mitochondriale DNA van Poelkikker vonden (fig. 2, bij Poelkikker). Aangezien mitochondriaal DNA enkel via de moederlijn wordt doorgegeven is dit het gevolg van een kruising van vijfje Bastaardkikker met mannetje Europese meerkikker: omdat Bastaardkikkers het mitochondriaal DNA van Poelkikker doorgeven, maar voor de rest enkel de genen van Europese meerkikker kunnen

doorgeven, levert zulk een kruising een kikker op die voor 99,9% identiek is aan een normale Europese meerkikker, op het mitochondriale DNA na, dat afkomstig is van Poelkikker. Omdat kikkermantjes in de regel verkiezen om met grotere wijfjes te paren, komen kruisingen van een vijfje Bastaardkikker met een mannetje Meerkikker zelden voor. Het vinden van een restant Poelkikker-DNA in Europese meerkikkers toont echter aan dat meerkikkers (Europese zowel als Anatolische) de inheemse soorten effectief genetisch opslorpen. Omgekeerd vonden we in gemengde populaties van Bastaardkikker en meerkikkersoorten ook Bastaardkikkers met mitochondriaal DNA van Europese meerkikker en zelfs van Anatolische meerkikker (niet weergegeven in fig. 2).

### Geografische oorsprong achterhaald

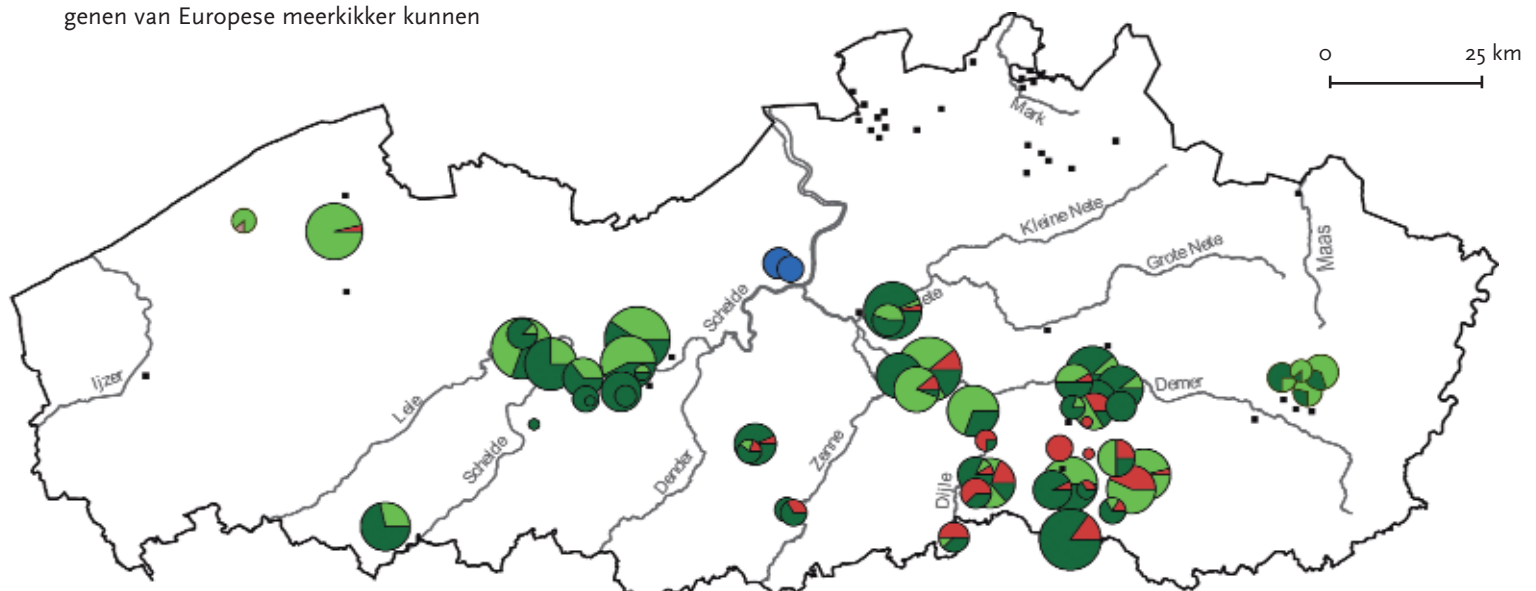
Naast deze identificatie op soortniveau probeerden we te achterhalen welke de geografische oorsprong is van de kikkers die geïdentificeerd werden als Europese meerkikker of als Anatolische meerkikker. Met deze informatie kan gepreciseerd worden waar actie moet ondernomen worden voor preventie. Het principe is dat bepaalde genetische varianten vaak geografisch gescheiden zijn. Hiervoor werd

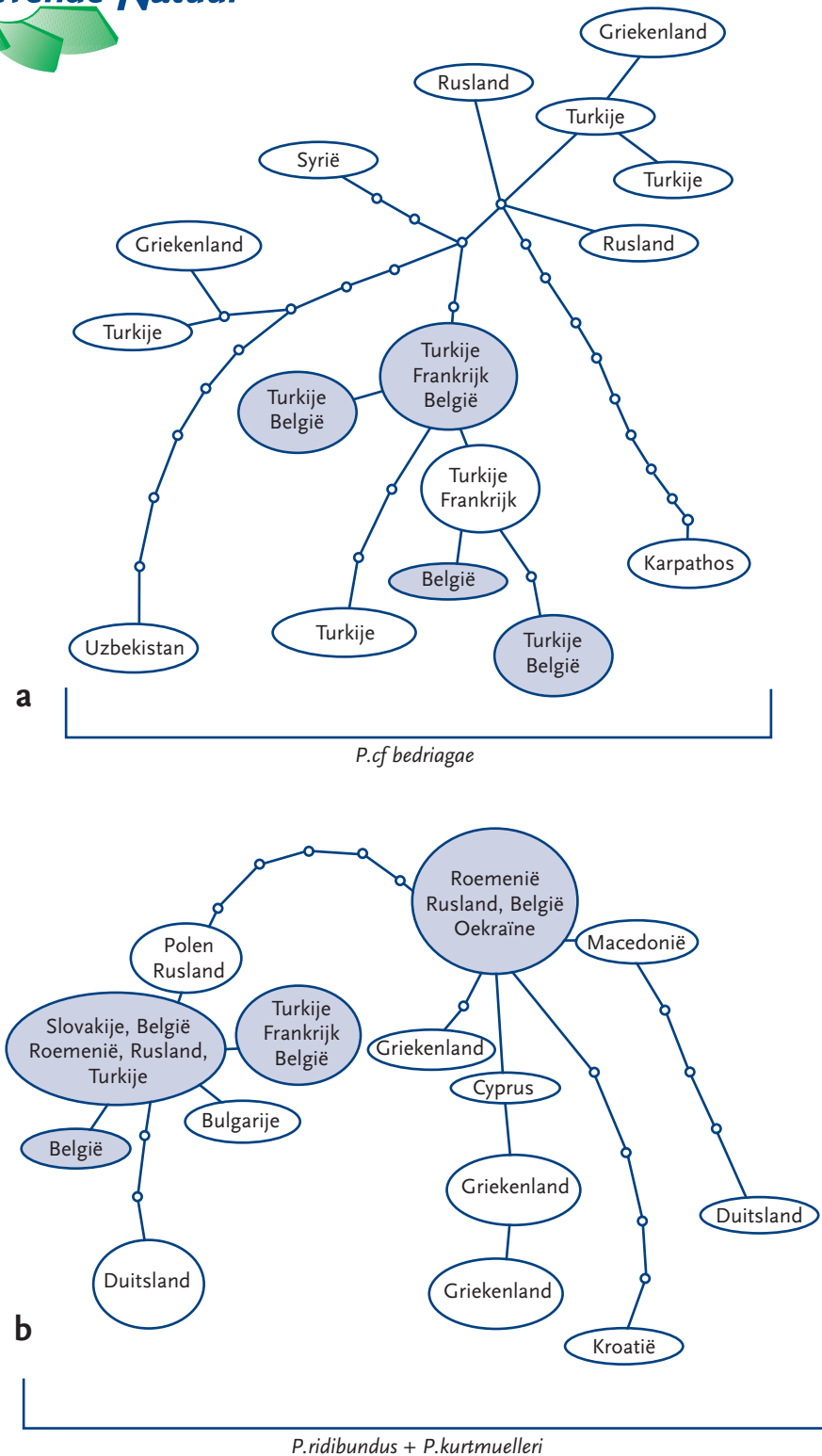
een zogenaamd netwerk van verwantschapsrelaties gemaakt tussen de verschillende DNA-sequenties voor beide soorten afzonderlijk. Dit geeft snel weer hoe nauw verwant onze kikkers zijn met kikkers uit de rest van het verspreidingsgebied.

Het principe achter het maken van een netwerk is eenvoudig: we bekijken de specifieke mutaties en bepalen hoe elke DNA-sequentie van een andere is afgeleid door mutaties. Elke verandering in de code van opeenvolgende letters (een vervanging van een letter door een andere) wordt als één mutatiestap beschouwd (bv. AACCTGG is AAACCTGG in een ander exemplaar). Kikkers uit verschillende locaties en landen kunnen dezelfde DNA-sequentie hebben voor het onderzochte gen; deze worden dan tesamen in een grotere ovaal weergegeven. De grootte van de ovaal geeft dan grafisch weer hoe vaak een DNA-sequentie gevonden was (fig. 4). Omgekeerd kan één land ook meerdere verschillende DNA-sequenties hebben wanneer er kikkers met diverse oorsprong in voorkomen.

Figuur 4 toont aan dat Anatolische meerkikkers gevangen in België bestaan uit vier verschillende sequenties, die duidelijk nauw verwant zijn met (en soms identiek zijn aan) stalen uit Turkije. Ook de Franse stalen waarvan we wisten dat ze uit Turkije

**Fig. 3.** Verspreidingskaart van de uitheemse groene kikkerensoorten in Vlaanderen en het Brussels Gewest op basis van DNA-barcoding. De gemengde populaties van Poelkikker-Bastaardkikker en populaties met enkel Bastaardkikkers zijn aangeduid met zwarte vierkantjes, en bevatten geen uitheemse soorten. De populaties aangeduid met taartdiagrammen geven het aandeel van uitheemse groene kikkerensoorten aan (lichtgroen: Bastaardkikker/Poelkikker; donkergroen: Europese meerkikker; rood: Anatolische meerkikker; blauw: Levantijnse meerkikker; violet: Iberische meerkikker). De grootte van de taart is relatief tot de grootte van het staal (3-40 ind.).





**Fig. 4.** Netwerk van verwantschapsrelaties binnen Anatolische meerkikkers (a), en binnen Europese en Balkanmeerkikkers (b). De grote ellipsen geven reële sequenties weer, de kleine bolletjes op de verbindingslijnen geven ontbrekende sequenties weer die mutaties weergeven tussen de verschillende gevonden sequenties. Elke ellips stelt een unieke DNA-sequentie voor, elk verbindingsstreefje stelt één mutatie voor. Blauw gevulde ellipsen geven sequenties weer die in België zijn waargenomen. Het staal van het mediterrane eiland Karpathos behoort tot een andere soort; de Karpathosmeerkikker (*P. cerigensis*). Deze heeft zich in afzondering van andere kikkers op het eiland ontwikkeld. Europese meerkikker en Balkanmeerkikker zijn volgens deze analyse zeer sterk verwant aan elkaar en niet eenduidig te onderscheiden, aangezien de Balkanmeerkikker uitsluitend (inheems) in Griekenland, Albanië en Macedonië voorkomt en de DNA-sequenties van (vermoedelijk) deze soort uit deze regio geen duidelijk afgesplitste groep vormden.

geïmporteerd waren vallen in deze groep. Voor Europese meerkikkers vinden we geen éénduidige geografische oorsprong, omdat bepaalde sequenties identiek zijn over een grote geografische afstand. De Belgische sequenties zijn wel meer verwant met sequenties uit oostelijk Europa en het Midden-Oosten, dan met sequenties uit naburige regio's. Dit geeft aan dat de invasie van Europese meerkikker niet op natuurlijke wijze tot stand is gekomen vanuit aanpalende regio's. Dit komt ook overeen met de hypothese dat de eerste Europese meerkikkers in België zijn geraakt met kikkertransporten vanuit Bulgarije bestemd voor Frankrijk (Jooris & Holsbeek, 2010). Voor beide soorten geven onze data ook aan dat het gaat om meerdere onafhankelijke introducties. Dit onderzoek gebaseerd op DNA-barcoding geeft aan dat meer dan de helft van de Belgische groene-kikkerpopulaties uitheemse soorten herbergt, en dat minimaal vier uitheemse soorten zich gevestigd hebben, waarvan sommige reeds een brede geografische verbreiding kennen (fig. 3), en een impact hebben op inheemse soorten via hybridisatie. Uit verder onderzoek (Holsbeek, 2010; Mergeay et al., in voorbereiding) blijkt dat Bastardkikkers achteruitgaan en genetisch veranderen als gevolg van deze invasies.

#### Het wettelijke kader en de Zwarte Lijst voldoen niet

Beheerders staan machteloos tegenover zulke invasies, omdat 1) één van de exoten (de Europese meerkikker) wettelijk beschermd is in België en Nederland, 2) bestrijding in de praktijk onmogelijk is zonder gevolgen voor andere soorten amfibieën en de rest van het ecosysteem, en 3) een preventief beleid zo goed als afwezig is. Alle resultaten hier wijzen in de verantwoordelijkheid van internationale handel in kikkers of andere organismen als oorzaak van deze invasies, en tonen dat het wettelijke kader van het Europese, Belgische en Vlaamse exotenbeleid (welk exotenbeleid?) in de praktijk faalt.

In Europa is er een duidelijk gebrek aan een proactief exotenbeleid (Scalera, 2009). Nochtans wordt de jaarlijkse economische schade (deriving van inkomsten van landbouw en andere sectoren, kosten van bestrijding van exoten), veroorzaakt door invasieve uitheemse soorten in Europa geschat op 12 miljard euro per jaar (Kettunen et al., 2008). Lidstaten of deelregeringen voeren onafhankelijk van elkaar wetten



**Foto 2.** De Poelkikker komt meest van al voor in waterplantrijke en niet-geëutrofeerde poelen en vennen. Hij komt meestal samen voor met de Bastaardkikker (foto: Hugo Willocx).

**Foto 3.** De Europese meerkikker is een stuk forser gebouwd dan de inheemse soorten. Hij is regelmatig grotendeels bruin gekleurd, zoals dit exemplaar (foto: Hugo Willocx).

in om exoten in te dammen. Volgens de Vlaamse wetgeving is het verboden om uitheemse soorten in het wild uit te zetten. Het is echter niet verboden om uitheemse kikkers te verhandelen. Wie dus groene kikkers in zijn tuinvijver wil hebben, mag legaal exotische soorten (niet de inheemse) kopen en lossen in zijn vijver. Je moet wél vermijden dat deze zich kunnen verspreiden buiten je vijver of tuin. In de praktijk wordt de verantwoordelijkheid zodoende bij de consument gelegd, die voor een omheining moet zorgen. In realiteit is het onmogelijk om te bewijzen dat er sprake is van opzettelijke uitzetting van uitheemse soorten; elkeen kan zich verschuilen achter de stelling dat de dieren (of planten) vanzelf in zijn tuin zijn geraakt, tenzij je op heterdaad betrapt wordt bij het uitzetten in een niet-omheinde omgeving. Er is bovendien, behalve voor vogels, nergens vastgelegd welke soorten inheems zijn, en welke soorten daardoor als uitheems moeten worden beschouwd.

Er is weliswaar een Zwarte Lijst (Federale wetgeving) van ca 20 soorten invasieve exotische planten en dieren, waarvoor is aangetoond of vermoed wordt dat ze in België een sterke ecologische en economische impact hebben, en die effectief niet mogen verhandeld worden. Maar dat is mosterd na de maaltijd: de soorten waarover het gaat hebben zich reeds gevestigd en verspreid, en zijn vaak niet meer afhankelijk van handel om zich verder te verspreiden. Het concept van Zwarte Lijsten is dat elke soort als onschadelijk wordt beschouwd, tenzij de praktijk het tegen-



deel aantoon, maar dan is het al te laat voor preventie. Dit is in strijd met (het voorzichtigheidsbeginsel van) de Conventie voor de Biodiversiteit van Rio de Janeiro, die ook door de Europese Unie en al haar lidstaten is onderschreven, en intussen is geïmplementeerd in Europese regelgeving EC338-97. De tekst van de conventie stelt letterlijk dat gebrek aan wetenschappelijke kennis omtrent de potentiële schadelijkheid van uitheemse soorten geen reden is tot uitstel van preventieve maatregelen. Vrij vertaald stelt deze tekst, dat er proactief moet opgetreden worden. Intussen groeit de Lijst met nieuwe exoten veel sneller dan de Zwarte Lijst, die aldus

gedoemd is om altijd achter de feiten aan te hollen (Mergeay, 2009). Van preventie van invasies is aldus geen sprake, nochtans de meest efficiënte manier van exotenbeheer (Simberloff, 1997). Daarenboven is deze wetgeving strijdig met de hiërarchisch superieure Europese wetgeving aangaande vrije handel binnen de landen van de Schengen-zone. Elke handelaar kan in principe dit conflict inroepen om verder exoten, ook deze op de Belgische Zwarte Lijst, te verhandelen, tenzij ze op de Europese Zwarte Lijst staan. Bovendien kunnen Zwarte Lijsten zelfs een omgekeerd effect hebben, wanneer sequentieel invasieve soorten op de Zwarte Lijst komen, en han-

delaars steeds weer andere soorten zoeken om te verhandelen waardoor steeds meer nieuwe soorten zich kunnen vestigen. Dit is bijvoorbeeld reeds het geval met exotische waterschildpadden.

Dat het echt wel anders kan, tonen landen zoals Australië. Zij gebruiken het omgekeerde principe: enkel soorten waarvan is aangetoond dat ze onschadelijk zijn mogen ingevoerd worden. Deze soorten zijn expliciet opgenomen in een zogenaamde Witte Lijst. Alle andere soorten zijn per definitie verboden. Dit is natuurlijk veel gemakkelijker te implementeren in één enkele soevereine eilandstaat dan in een unie van continentale staten met vage overkoepelende bevoegdheden. Er zijn nog wel meer situaties die een wettelijk probleem vormen: wat te doen, zoals in het geval van de Anatolische meerkikker, met soorten waarvan de status niet duidelijk is, maar die wel invasief zijn? Ook dat probleem wordt feitelijk door het principe van een Witte Lijst opgelost, omdat onbekende soorten onmogelijk op deze lijst kunnen staan.

Samenvattend kan men stellen dat zonder gecoördineerde Europese aanpak van een probleem dat een Europese inslag heeft (vrijhandel in de Schengen-zone) alle pogingen om exoten te bestrijden waarschijnlijk slechts druppels op een hete plaat zijn, temeer omdat politieke grenzen geen biologische relevantie hebben. Het risico beperkt zich dus ook niet tot België, en heeft waarschijnlijk parallele consequenties in Nederland en andere Europese landen (bv. Schmeller et al., 2007).

De gigantische kostprijs van invasieve exoten indachtig lijkt het dus hoog tijd voor een overkoepelend preventief Europees exotenbeleid.

#### Literatuur

- Baker, C. S., D. Steel, Y. Choi, H. Lee, K. S. Kim, S. K. Choi, Y.-U. Ma, C. Hambleton, L. Psihoyos, R. L. Brownell, and N. Funahashi, 2010.** Genetic evidence of illegal trade in protected whales links Japan with the US and South Korea. *Biology Letters* 6:647-650.
- Freyhof, J., M. Kottelat & A. Nolte, 2005.** Taxonomic diversity of European Cottus with description of eight new species (Teleostei: Cottidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 16: 107-172.
- Hebert, P.D.N., S. Ratnasingham &**

**J.R. DeWaard, 2003.** Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* (supplements).

**Hebert, P.D.N., E.H. Penton, J.M. Burns, D.H. Janzen & W. Hallwachs, 2004.** Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 14812-14817.

**Holsbeek G, 2010.** Sneaky introductions in European Water frogs (doctoraatsverhandeling). Faculteit Wetenschappen, Katholieke Universiteit Leuven.

**Holsbeek, G. & R. Jooris, 2010.** Potential impact of genome exclusion by alien species in the hybridogenetic water frogs (*Pelophylax esculentus* complex). *Biological Invasions* 12: 1-13.

**Jooris, R. & G. Holsbeek, 2010.** Groene kikkers in Vlaanderen en het Brussels Hoofdstedelijk Gewest. Rapport Natuur.studie 2010/2 Mechelen.

**Kettunen, M., P. Genovesi, S. Gollasch, S. Pagad, U. Starfinger, P. Ten Brink & C. Shine, 2008.** Technical support to EU

strategy on invasive species (IS)—assessment of the impacts of IS in Europe and the EU (Final module report for the European Commission). Brussels.

**Mergeay, J., 2009.** The Rio convention, CITES, European legislation and invasive amphibians: are we doomed to lag behind forever? *Froglog* (Newsletter of the Amphibian Specialist Group, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) 90: 8-12.

**Scalera, R., 2009.** How much is Europe spending on invasive alien species? *Biological Invasions* 12: 173-177.

**Schmeller, D. S., A. Pagano, S. Plenet, and M. Veith, 2007.** Introducing water frogs – Is there a risk for indigenous species in France? *Comptes Rendus Biologies* 330:684-690.

**Simberloff, D., 1997.** Eradication. In: D. Simberloff, D.C. Schmitz & T.C. Brown (ed.). *Strangers in Paradise: Impact and Management of Nonindigenous Species in Florida*. Island Press, Washington, DC: 221-228.

#### Summary

##### Genetic barcoding reveals multiple cryptic invasions in Water frogs

Trade in water frogs results in the importation of non-native species of unknown origin in Europe and with poor information on the risk of invasion by these species. Since many water frog species are very hard to distinguish from native species based on morphological criteria alone, we used a DNA-barcoding approach to identify water frogs (*Pelophylax* spp.) caught in a series of ponds and lakes in N-Belgium. We found that more than half of the water bodies contain non-native species, belonging to at least four species. In three of them we have clear evidence for a causal relationship with trade in frogs. We discuss the role of the current legislation in Europe and its member states in the fight against non-native invasive species.

Dr. J. Mergeay<sup>1,2</sup>, Dr. G. Holsbeek<sup>2,3</sup>,  
Prof.dr. F.A.M. Volckaert<sup>3</sup>,  
Prof.dr. L. De Meester<sup>2</sup>



**Foto 4.** De Turkse meerkikker is nauw verwant met de Europese en Levantijnse meerkikkers. Af en toe worden blauwgroene exemplaren gevonden. Ze worden nog steeds uitgezet in tuinvijvers, zoals hier in Hoegaarden (België), waar ze als 'Italiaanse groene kikker' werden aangekocht door de eigenaar van de vijver (foto: Griet Holsbeek).

<sup>1</sup>Onderzoeksgroep Genetische Diversiteit, Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Gaverstraat 4, 9500 Geraardsbergen, België  
<sup>2</sup>Laboratorium voor Aquatische Ecologie en Evolutiebiologie, KULeuven, Deberiotstraat 32, 3000 Leuven, België  
<sup>3</sup>Laboratorium voor Diversiteit en Systematiek van Dieren, KULeuven, Deberiotstraat 32, 3000 Leuven, België