



Vlaanderen
is wetenschap



Ontwikkeling van een monitoringsprotocol voor heikikker

Bepaling van de aanwezigheid en verhouding
bruine en heikikker via (e)DNA-barcoding en
opstart genetische monitoring

Rein Brys, Karen Cox & Sabrina Neyrinck

**INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK**

Auteurs:

Rein Brys, Karen Cox & Sabrina Neyrinck
Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Reviewers:

Jeroen Speybroeck
Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Het INBO is het onafhankelijk onderzoeksinstituut van de Vlaamse overheid dat via toegepast wetenschappelijk onderzoek, data- en kennisontsluiting het biodiversiteitsbeleid en -beheer onderbouwt en evalueert.

Vestiging:

INBO Geraardsbergen
Gaverstraat 4
9050 Geraardsbergen
www.inbo.be

e-mail:

rein.brys@inbo.be

Wijze van citeren:

Brys, R., Cox, K. & Neyrinck S. (2020). Ontwikkeling van een monitoringsprotocol voor heikikker: bepaling van de aanwezigheid en verhouding bruine en heikikker via (e)DNA-barcoding en opstart genetische monitoring. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2020 (8). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
DOI: doi.org/10.21436/inbor.17686189

D/2020/3241/060

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2020 (8)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Maurice Hoffmann

Foto cover:

Yves Adams / Vildaphoto

ONTWIKKELING VAN EEN MONITORINGSPROTOCOL
VOOR HEIKIKKER

**Bepaling van de aanwezigheid en verhouding bruine en
heikikker via (e)DNA-barcoding en opstart genetische
monitoring**

Rein Brys, Karen Cox & Sabrina Neyrinck

doi.org/10.21436/inbor.17686189

Dankwoord

We danken Jeroen Speybroeck, Koen Van Muylem en Maurice Hoffmann voor hun hulp bij de staalname en/of het nalezen van het rapport, en Quentin Mauvisseau voor de ondersteuning bij de ontwikkeling van de ddPCR assays. Graag willen we ook An Van Breusegem hartelijk danken voor de hulp bij de DNA-extractie van eitjes en larven. Tot slot zijn we Afdeling Natuur en Bos erkentelijk voor het verschaffen van de toegang en toelating (nr. ANB/BL-FF/V17-000035) om op hun terreinen het voorliggende onderzoek te kunnen uitvoeren.



Samenvatting

Heikikker (*Rana arvalis*) is een Habitatrictlijnsoort die binnen Vlaanderen op gewestelijk niveau gemonitord moet worden. Dit brengt met zich mee dat de aanwezigheid van de soort in het landschap accuraat in kaart moet worden gebracht en dat populatiegroottes van de soort in de tijd dienen opgevolgd te worden. Hierbij stellen zich echter praktische problemen omdat de soort erg moeilijk is waar te nemen en bepaling van eilegels een verkeerd beeld kan geven doordat ook bruine kikker (*Rana temporaria*) op deze locaties vaak eitjes afzet.

Binnen deze studie onderzochten we in eerste instantie in hoeverre (e)DNA-barcoding technieken zouden kunnen helpen bij de bepaling van de aanwezigheid van heikikker in een waterpartij. Hiervoor werden enkele vijvers en vennen onderzocht in het Nationaal Park Hoge Kempen en het Midden Limburgs vijvergebied. Ook gingen we na of deze methodiek kan helpen bij het inschatten van de verhouding heikikker versus bruine kikker eilegels op plaatsen waar de soort aan reproductie doet en populatiegroottes via eitelingen worden opgevolgd. Dit gebeurde op verschillende locaties in het Klein Schietveld. Uit de eDNA-resultaten afkomstig van waterstalen genomen doorheen het jaar in verschillende vijvers en vennen waar heikikker al is waargenomen, blijkt dat we met eDNA ddPCR-analysen de aanwezigheid van heikikker vroeg in het voorjaar perfect kunnen aantonen (eind maart – begin april). Op locaties waar aan reproductie wordt gedaan is op basis van dezelfde eDNA methodiek het echter veel minder vanzelfsprekend om de verhouding aan heikikker versus bruine kikker eilegels te bepalen. Deze resultaten matchen ook niet altijd even goed met de werkelijke verhouding aan beide soorten. Deze informatie kan veel efficiënter en accurater worden bekomen door van elk eilegsel één eitje te bemonsteren, dit te mixen en van het resulterende DNA extract via ddPCR-analyse de verhouding aan heikikker en bruine kikker DNA te bepalen.

In tweede instantie gingen we binnen deze studie na of een geselecteerd panel aan genetische merkers bruikbaar zou kunnen zijn voor de genetische monitoring van de Vlaamse heikikker populaties. Dit werd getest op dezelfde heikikkerpopulatie van het Klein Schietveld. Hierbij bleken de geselecteerde merkers voldoende variabel om heikikkerpopulaties genetisch te karakteriseren. Zo bleek de omvangrijke populatie van het Klein Schietveld een grote genetische variatie te herbergen met een groot aantal effectieve ouders.

We kunnen besluiten dat de gebruikte (e)DNA barcoding methodieken en de geselecteerde genetische merkers beide bruikbare instrumenten zijn om op termijn heikikkerpopulaties in het landschap te detecteren, en hun grootte, genetische diversiteit en onderlinge connectiviteit adequaat te kunnen bepalen.



Aanbevelingen voor monitoring en beheer

Dit onderzoek heeft aangetoond dat eDNA-gebaseerde technieken erg geschikt kunnen zijn om de aanwezigheid van heikikker in een waterpartij te bepalen. Veel moeilijker is het een exacte maat voor populatiegrootte te bepalen. Hiervoor blijkt het tellen van eilegels nog steeds een goede optie, tenminste als het aandeel legsels van bruine kikker mee in rekening wordt genomen. Uit de geteste methodes komt naar voor dat dit het meest efficiënt bepaald kan worden door van elk legsel (of een representatief aandeel van het totaal aantal legsels) op een welbepaalde locatie één eitje te nemen. Op basis van het resulterende DNA-extract van het mengsel van deze eitjes, kunnen we in een volgende stap via ddPCR analyses de verhouding tussen beide soorten accuraat achterhalen. Het aantal heikikkermoeders op een welbepaalde locatie kan op die manier erg nauwkeurig bepaald worden door de telling van de eilegels met de bekomen DNA-verhouding te vermenigvuldigen. Hierbij dient opgemerkt te worden dat dit uiteraard geen volledig non-invasieve methode is, waardoor steeds de afweging moet worden gemaakt of het voor een welbepaalde situatie wenselijk is om poelen en eilegels op deze manier (beperkt) te verstoren.

Verder heeft deze studie aangetoond dat met behulp van de geteste genetische merkers een genetische karakterisatie en/of monitoring van heikikkerpopulaties verwezenlijkt kan worden. Zeker voor populaties waar men bijvoorbeeld twijfelt aan de conservatiestatus, waar recent ingrepen in de omgeving gebeurden, of waar kennis van de onderlinge connectiviteit van populaties ontbreekt, kan dit zeker een meerwaarde hebben.



English abstract

Moor frog (*Rana arvalis*) is listed in the Habitats Directive, which implies that its populations must be monitored over time. Therefore, the species distribution range needs to be regularly mapped, in combination with an accurate temporal monitoring of the size of its present populations. In case of Moor frog this is, however, very difficult given the hidden behaviour of this species. Although counting the number of egg clutches can offer a good proxy of the population size of Moor frog, it is frequently documented that also Common frog (*Rana temporaria*) lays its egg clutches at the same locations.

Within this study, we initially tested to what extent eDNA barcoding based on water samples can help to determine the presence of Moor frog within a waterbody and which period of the year is most optimal to do so. For this purpose we regularly sampled (from winter until summer) several ponds and fens located at the Hoge Kempen National Park and the Midden Limburg pond area. Based on these analyses, it appeared that we can detect the presence of Moor frog most accurately early in the spring (late March - early April).

Secondly, we determined whether eDNA or DNA barcoding can additionally help to obtain a ratio of the density of Moor frogs versus Common frogs, when sexual reproduction takes place and egg clutches are deposited at a certain spot. This part of the study was performed at Klein Schietveld. The eDNA results obtained from water sampled around the egg clutches revealed that this method is quite inaccurate in predicting the actual ratio of Moor versus Common frog eggs. In contrast, ddPCR analyses on tissue material of a pooled sample of eggs, through the collection of one egg per clutch, showed that the DNA ratio of both species perfectly predicts the actual number of clutches that are present per species. In other words, combining the count number of egg clutches with the ratio of both species by means of ddPCR analyses on a pooled sample of eggs thus offers an adequate method to monitor population sizes of both species.

Finally, we investigated whether a selected panel of genetic markers could prove useful for the genetic monitoring of the Flemish Moor frog populations. The selected markers (microsatellites) were found to be sufficiently variable to genetically characterize Moor frog populations located at the area of Klein Schietveld. Based on this result we can conclude that this population is characterized by high genetic variation together with a large effective number of breeders.

In conclusion, both the DNA barcoding methodologies and the selected genetic markers are useful instruments for appropriately detecting Moor frog populations in the landscape, determining the size of their (sub)populations and finally examining genetic diversity and the level of connectivity.



Inhoudstafel

1	Inleiding.....	9
2	Materiaal en methode	11
2.1	Studiegebieden	11
2.1.1	Temporele detectie van bruine en heikikker via eDNA	11
2.1.2	Soortidentificatie en populatiegenetica.....	12
2.2	Staalname.....	13
2.2.1	Temporele detectie	13
2.2.2	Soortidentificatie en populatiegenetica.....	14
2.2.3	eDNA-afgifte onder gecontroleerde condities	15
2.3	eDNA-extractie uit water	15
2.4	DNA-extractie uit eitjes en larven	15
2.5	ddPCR-analysen.....	16
2.6	Soortidentificatie van de eilegels via RFLP	16
2.7	Populatiegenetische analyses	17
2.7.1	Genotyping.....	17
2.7.2	Genetische structuur.....	18
2.7.3	Genetische variatie en effectief aantal ouders	19
3	Resultaten en discussie	21
3.1	eDNA afgifte van hei- en bruine Kikker.....	21
3.1.1	Temporele detectie onder veldcondities	21
3.1.2	eDNA-afgifte onder gecontroleerde condities.....	22
3.2	Bepaling van de verhouding bruine kikker- en heikikkereilegels	24
3.2.1	Soortidentificatie van de eilegels via RFLP	24
3.2.2	Bepaling van de soortenverhouding op basis van mengstalen van eitjes	25
3.2.3	Bepaling van de soortverhouding op basis van eDNA uit water.....	27
3.3	Populatiegenetisch onderzoek.....	28
4	Conclusies.....	35
5	Referenties	36
6	Bijlagen.....	38

Lijst van figuren

- Figuur 1: Parende heikikkers (*Rana arvalis*) vroeg in het voorjaar (foto: Remo Schulze – met licentie onder CC BY-SA 3.0)..... 9
- Figuur 2: Voorbeeld van (a) een koor van roepende heikikker mannetjes (foto: Christian Fischer, met licentie onder CC BY-SA 3.0) en (b) eilegels die door heikikker worden afgezet in een ondiepe plas (b, foto: Christian Fischer, met licentie onder CC BY-SA 3.0). 10
- Figuur 3. Locaties van de vijvers in het Vijvergebied Midden-Limburg, waar doorheen het jaar staalname werd uitgevoerd voor eDNA-detectie van heikikker en bruine kikker.... 11
- Figuur 4. Locaties van de vennen in het Nationaal Park Hoge Kempen, waar doorheen het jaar staalname werd uitgevoerd voor eDNA detectie van heikikker en bruine kikker. ... 11
- Figuur 5 Locaties van vennen en poelen met eilegels van hei- of bruine kikker. * is een poel waar referentiestalen van heikikker werden genomen voor de soortidentificatie en die ook in het mesocosmexperiment werden ingezet (zie verder). 12
- Figuur 6. Waterpartijen die doorheen het seizoen werden bemonsterd in functie van de temporele detectie van heikikker en bruine kikker via eDNA in respectievelijk het Nationaal Park de Hoge Kempen (a) en het Vijvergebied Midden-Limburg (b). 13
- Figuur 7. Illustraties van de staalnamecampagne op 23/03/2017 op het Klein Schietveld. (a) Typische cluster van eilegels van heikikker en/of bruine kikker, (b) staalname van een drietal eitjes uit elk van de verschillende legsels per cluster, en c) staalname van water rondom de cluster van legsels voor het eDNA-onderzoek. 14
- Figuur 8 Resultaat van een RFLP-analyse met duidelijke amplificatie en opsplitsing van de verschillende DNA-fragmentjes in gescheiden bandjes na gelelectroforese. Elke verticale kolom is een staal. 17
- Figuur 9. Temporeel eDNA-profiel (gemeten via ddPCR) (gemiddelde van twee analyses per staal $\pm SE$) van bruine kikker en heikikker in het water van twee vennen en vijvers in respectievelijk het Nationaal Park de Hoge Kempen (a-b) en het Vijvergebied Midden-Limburg (c-d). Waterstalen werden driewekelijks genomen vanaf eind februari t.e.m. eind juli 2018..... 21
- Figuur 10. Temporeel profiel van de watertemperatuur (C°) gemeten op elk van de eDNA bemonsteringen in twee vennen 3a en 3b en vijvers 4A en 4b in het Nationaal Park Hoge Kempen en het Vijvergebied Midden-Limburg. Stalen werden driewekelijks genomen vanaf eind februari t.e.m. eind juli 2018. 22
- Figuur 11. Relatie tussen het aantal bruine kikker- (a) en heikikkerlarven (b) in elk van de 11 mesocosmen en het eDNA signaal gemeten via ddPCR. 23
- Figuur 12. Relatie tussen het aandeel (%) heikikker legsels en de pH gemeten in het water rondom de clusters van eilegels. 25
- Figuur 13. Verband tussen a) het totaal aantal eDNA-kopieën van bruine kikker en heikikker (bepaald via ddPCR) (gemiddelde van twee analyses $\pm SE$) en b) de proportionele verhouding bepaald op basis van het gemiddelde van het eDNA-signaal tussen beide soorten binnen elk staal, en dit in functie van een voor bruine kikker aflopend en voor heikikker oplopend aandeel eitjes op een totaal van 10 eitjes per staal. ... 26
- Figuur 14. Verband tussen het percentage heikikker eDNA (t.o.v. de totale eDNA-concentratie van bruine kikker en heikikker, gemeten via ddPCR) en het aandeel heikikkereilegels op de onderzochte locaties in het Klein Schietveld..... 27
- Figuur 15. Verband tussen het totaal aantal heikikker eilegels die op elk van de locaties in het Klein Schietveld aanwezig waren het totaal aantal heikikker eDNA moleculen gemeten in het omliggende water (via ddPCR). 28
- Figuur 16. De eerste twee assen van de principale coördinaten analyse, die respectievelijk 30 en 23% van de variatie verklaren. De analyse is gebaseerd op de F_{st} -waarden tussen

poelen met meer dan 10 stalen van heikikker, exclusief de genotypes van broers/zussen. De nummers in de codes komen overeen met deze in Figuur 5..... 29

Figuur 17. Grafische weergave van de sPCA resultaten met (a) de globale structuur en (b) de lokale structuur t.o.v. de x- en y-coördinaten van de locaties. De blokjes geven de waarde van lagged scores volgens grootte en kleur: zwart is positief, wit is negatief. 30

Figuur 18. Spatiale autocorrelatie van genetische verwantschap en geografische afstand voor (a) de totale dataset en (b) de dataset zonder broers/zussen..... 31

Figuur 19 Verwachte heterozygositeit (gendifersiteit) \pm standaarddeviatie per poel. 32

Figuur 20 Visualisatie van het GLM model met het briggse logaritme van de LD schattingen van het effectief aantal ouders als respons. De voorspelde waarden worden weergegeven door de rechte. Het logaritme van de zuurstofconcentratie wordt weergegeven op de x-as en de oppervlakte van de poelen in kleurschakering van donker- naar lichtblauw (van klein naar groot). 34

Lijst van tabellen

Tabel 1. Lijst van aantal getelde en bemonsterde eilegels per poel op het Klein Schietveld. De code van de poel komt overeen met de codes gegeven in Figuur 5. Het percentage legels van heikikker werd berekend rekening houdend met de soortbepaling van larven (poelen 1 en 24). Ook het aantal legels waarbij de RFLP-analyse geen resultaat gaf zijn gegeven. 24

Tabel 2 Schattingen van effectief aantal ouders (N_b) volgens twee methodes: de linkage disequilibriummethode (LD) en de verwantschapsmethode met bijhorende betrouwbaarheidsintervallen tussen haakjes. De aangepaste waarde van N_b LD is N_b *adjust*. Het aantal ouders bepaald met COLONY wordt gegeven. Door het aantal bemonsterde legels (dus het aantal moeders) te delen door het aantal ouders, kan de verhouding moeders/vaders berekend worden..... 33

Tabel 3 Modelsamenvatting van het glm met $\log_{10}(N_b)$ als responsvariabele. 34

1 INLEIDING

Sinds 2016 voert Natuurpunt soortmonitoring uit in opdracht van INBO en ANB om te voorzien in de noden voortvloeiend uit de Habitatrichtlijn. Eén van de soorten die in deze richtlijn in de Bijlagen II en IV staat vermeld, is de heikikker (*Rana arvalis*) (Figuur 1). Dit houdt in dat deze soort op gewestelijk niveau dient te worden gemonitord. Voor de kikkers en padden die binnen deze context onder de aandacht vallen, stelden De Bruyn et al. (2015) een monitoringsprotocol op. Doordat heikikker (net zoals poelkikker) een erg moeilijke soort is om op te volgen, werd het betreffende meetnet voor deze soort tot dusver nog niet opgestart, omdat men van oordeel was dat deze soort te moeilijk zou zijn om te laten monitoren door het vrijwilligersnetwerk van Natuurpunt.

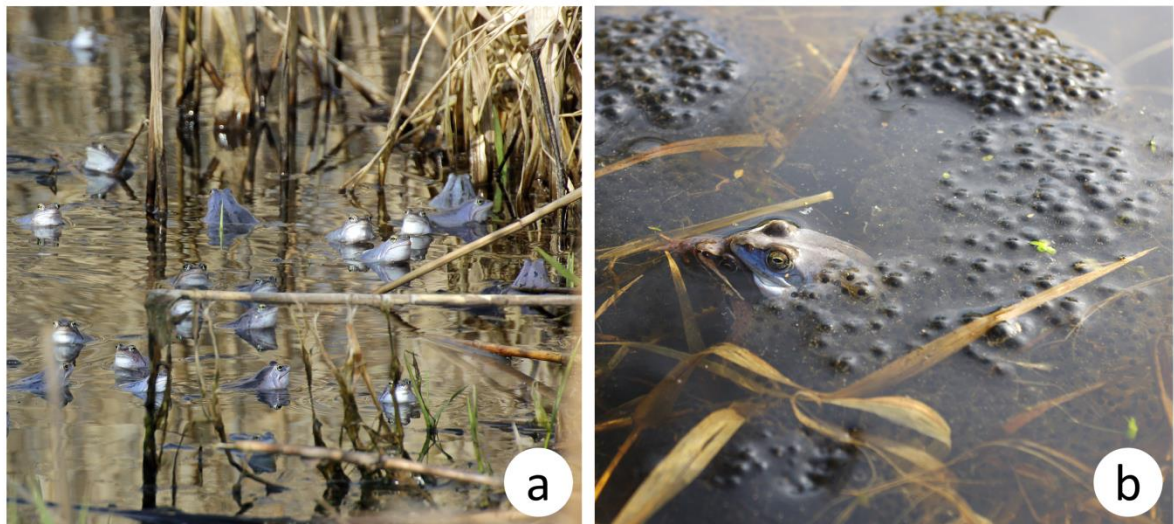


Figuur 1: Parende heikikkers (*Rana arvalis*) vroeg in het voorjaar (foto: Remo Schulze – met licentie onder [CC BY-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/))

Daarom werd voorgenomen om binnen het INBO een pilotstudie uit te voeren, waarin we onderzoeken in hoeverre, met het inzetten van de technieken van (e)DNA-barcoding, een oplossing kan worden gevonden om voor deze soort een accuratere inschatting te kunnen maken van 1) zijn aanwezigheid en 2) de populatiegrootte.

Traditioneel wordt de aanwezigheid en inschatting van de populatiegroottes van kikkers en padden gemaakt op basis van tellingen van het aantal roepende mannetjes (Figuur 2a), legsels en/of larven (Figuur 2b). Bij heikikker stelt zich hierbij het probleem dat de kooractiviteit van deze soort zeer kort is (vaak maar één of enkele dagen op uitzonderlijk mooi weer in de periode tussen 15 maart en 15 april), vaak op locaties gebeurt die erg moeilijk bereikbaar zijn en dat de kikkers dan erg gevoelig zijn aan verstoring. Heikikker komt vaak samen voor met bruine kikker (*Rana temporaria*), een soort die morfologisch sterke gelijkenissen vertoont met

heikikker, waardoor ook zichtwaarnemingen moeilijk bruikbaar zijn om correcte kwantitatieve inschattingen van de aanwezigheid van heikikker te bekomen. De bruine kikker deponert eilegels bovendien vaak in dezelfde poelen en vennen als heikikker. Omdat het onderscheiden van de legsels van beide soorten ook al moeilijk is, is de inschatting van populatiegroottes op basis van de eilegels evenmin een betrouwbare methode.



Figuur 2: Voorbeeld van (a) een koor van roepende heikikker mannetjes (foto: Christian Fischer, met licentie onder [CC BY-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/)) en (b) eilegels die door heikikker worden afgezet in een ondiepe plas (b, foto: Christian Fischer, met licentie onder [CC BY-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/)).

Om toch een gestandaardiseerd meetnet te kunnen ontwikkelen wilden we daarom nagaan of het mogelijk zou zijn de monitoring uit te voeren aan de hand van genetische methodes. In eerste instantie werd besloten om na te gaan in hoeverre we via eDNA de aanwezigheid van heikikker en bruine kikker in waterpartijen accuraat kunnen aantonen. We willen hierbij eveneens onderzoeken wanneer tijdens het jaar we dit via deze methodiek het best onderzoeken. Daarnaast willen we met dit onderzoek nagaan of er een afgeleide methodiek/protocol kan worden bekomen door eilegeltellingen te combineren met DNA barcoding-methodieken op basis van weefsel (eitjes) en/of eDNA. Hierbij willen we onderzoeken of: 1) we op basis van het nemen van een reeks eitjes (1 eitje per legsel, waarbij een legsel rond de 500 à 3000 eitjes kan bevatten), via moleculaire technieken kunnen komen tot een soortbepaling van deze eitjes, en dus de verhouding aan bruine- en heikikkereitjes in een cluster van legsels, en/of 2) deze informatie even goed uit de eDNA (environmental DNA) patronen van het omringende water kan worden gehaald, met het oog op een zo eenvoudig, minst invasieve/versturende en betaalbaar mogelijke monitoring.

Tot slot willen we binnen deze pilootstudie de heikikkereitjes die worden bemonsterd eveneens benutten voor een genetische karakterisering van de onderzochte populatie. Omdat nog geen panel van bruikbare genetische merkers werd samengesteld voor de genetische monitoring van de Vlaamse heikikkerpopulaties, werd deze set van stalen daarvoor ingezet. Aan de hand van de populatie-genetische analyses probeerden we specifiek voor de onderzochte populatie een idee te krijgen over de spatiale structuur en de genetische variatie. Deze waarden kunnen dan als verdere referentie benut worden bij toekomstige genetische monitoring van Vlaamse heikikkerpopulaties.

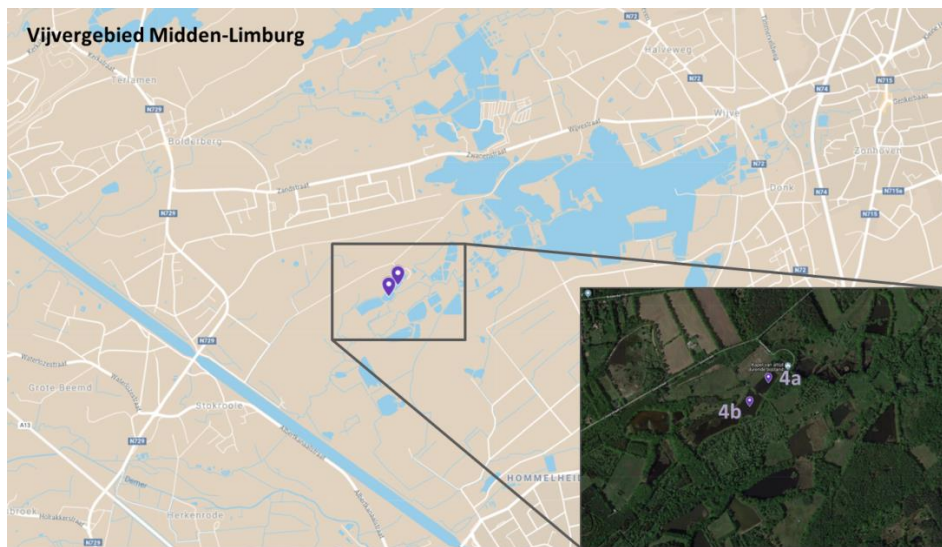


2 MATERIAAL EN METHODE

2.1 STUDIEGEBIEDEN

2.1.1 **Temporele detectie van bruine en heikikker via eDNA**

Om te onderzoeken of we via eDNA de aanwezigheid van heikikker en/of bruine kikker in het water kunnen aantonen en wanneer dit doorheen het seizoen (lente – zomer) het best wordt uitgevoerd, werd in 2018 een selectie gemaakt van vier vijvers/vennen die verspreid lagen over twee deelgebieden waarvan geweten is dat beide soorten er zich ophouden.



Figuur 3. Locaties van de vijvers in het Vijvergebied Midden-Limburg, waar doorheen het jaar staalname werd uitgevoerd voor eDNA-detectie van heikikker en bruine kikker.



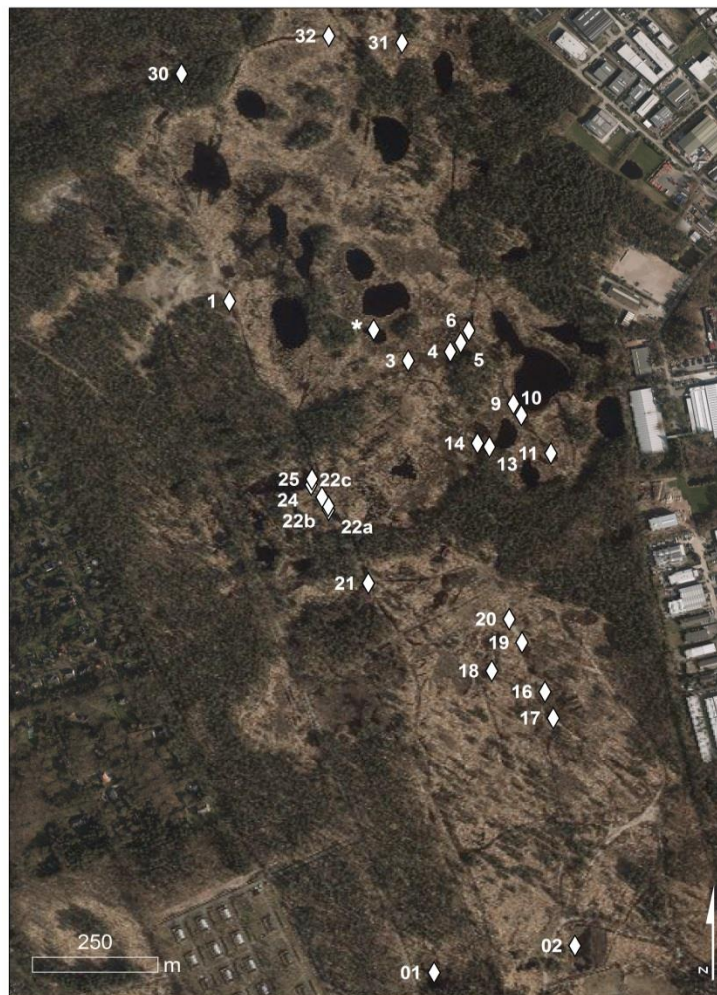
Figuur 4. Locaties van de venen in het Nationaal Park Hoge Kempen, waar doorheen het jaar staalname werd uitgevoerd voor eDNA detectie van heikikker en bruine kikker.



Twee vijvers waren gelegen in Vijvergebied Midden-Limburg (Figuur 3) en de twee andere (vennen) bevonden zich in het Nationaal Park Hoge Kempen, nabij de bron van de Kikbeek (Figuur 4).

2.1.2 Soortidentificatie en populatiegenetica

Voor de inschatting van de populatiegrootte en populatiegenetica, werd het Klein Schietveld (gelegen op grondgebied van de gemeentes Brasschaat, Kalmthout en Kapellen) als studiegebied geselecteerd, omdat van dit gebied geweten is dat ze een grote heikikker (meta)populatie herbergt en het een overzichtelijk en redelijk toegankelijk heidegebied is. Hier werd half maart 2017 een gebiedsdekkende screening ondernomen om zo veel mogelijk locaties met eilegels van heikikker of bruine kikker in kaart te brengen. In totaal werden op deze manier 26 locaties langsheen poelen en vennen geselecteerd, waar op het moment van de opname één of meerdere eilegels in clusters waren afgezet (Figuur 5). Locaties 22a, 22b en 22c zijn delen van eenzelfde poel waar aparte clusters van eilegels te vinden waren, die duidelijk in ruimte van elkaar gescheiden lagen.

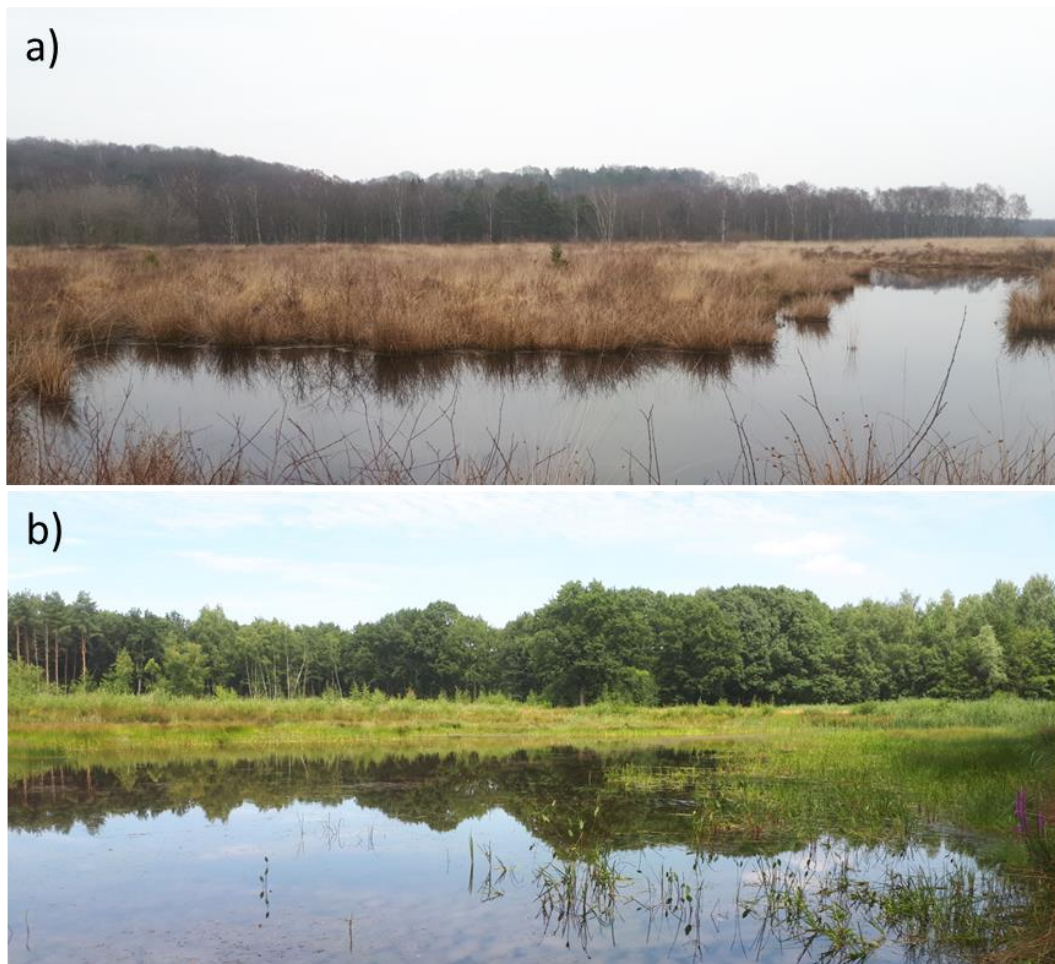


Figuur 5 Locaties van vennen en poelen met eilegels van hei- of bruine kikker. * is een poel waar referentiestalen van heikikker werden genomen voor de soortidentificatie en die ook in het mesocosmexperiment werden ingezet (zie verder).

2.2 STAALNAME

2.2.1 Temporele detectie

Voor de temporele screening van heikikker en bruine kikker via eDNA werden de daarvoor geselecteerde vijvers en vennen vanaf eind februari (20/02/2018) tot eind juli (27/07/2018) om de drie weken bezocht en bemonsterd. Van elk waterlichaam werd telkens een “gebiedsdekkende” bemonstering uitgevoerd. Dit bestond erin een groot aantal sub-stalen (0,5 l) langs de oever (elke 2 meter) te nemen d.m.v. een lange stok waaraan op het einde een steriel zakje werd bevestigd. Het bemonsterde water van elke ven of vijver werd voor elke bemonsteringsronde samengevoegd tot één groot mengstaal. Op deze manier werd elk van de geselecteerde vijvers en vennen van winter tot zomer 10 maal bemonsterd (Figuur 6). Van elk mengstaal werd dan nadien een deel van het water gefilterd. Hiervoor werd een filter (type Sterlitech) gebruikt, waarbij het water met behulp van een peristaltische pomp onder grote druk door de filter wordt geperst zodat alle mogelijke eDNA partikels op de filter achterblijven. (zie verder). Na saturatie van de filters werden ze droog geblazen en onmiddellijk bij -20°C ingevroren tot verdere analyse.

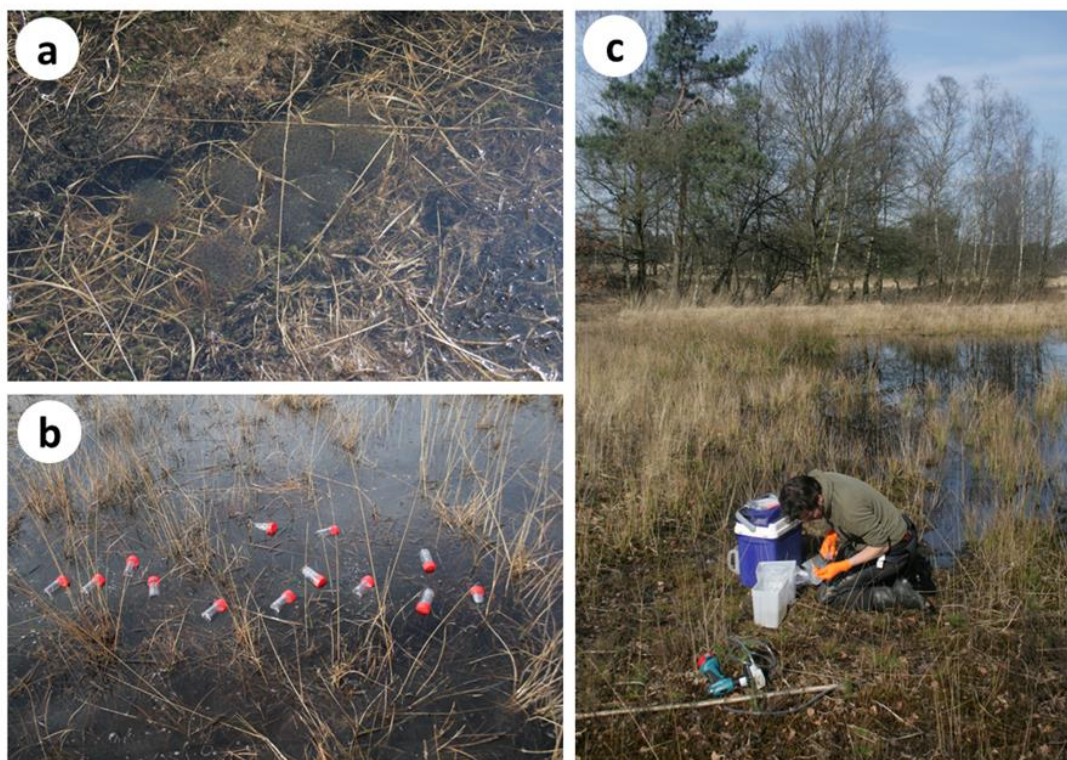


Figuur 6. Waterpartijen die doorheen het seizoen werden bemonsterd in functie van de temporele detectie van heikikker en bruine kikker via eDNA in respectievelijk het Nationaal Park de Hoge Kempen (a) en het Vijvergebied Midden-Limburg (b).

2.2.2 Soortidentificatie en populatiegenetica

Voor de bepaling van de populatiegroottes via soortidentificatie en genetische screening van de populaties in het Klein Schietveld werden enkele dagen na de eerste screening van het gebied eitjes bemonsterd op al de locaties waar eilegels van hei- en of bruine kikker werden waargenomen. Per locatie werden hiervoor telkens een drietal eitjes per legsel en minimum 4 tot maximaal 51 legfels genomen, afhankelijk van het aantal aanwezige legfels (Figuur 7a-b). Deze werden gekoeld in het water bewaard waarin ze zich bij staalname bevonden. Op enkele plaatsen waar de larven al uitgekomen waren, werden willekeurig minimaal 30 individuen bemonsterd. Voor de bemonstering van eitjes en/of larven werd voordien een afwijking op het Soortenbesluit (ANB/BL-FF/17-000035) verkregen van het Agentschap voor Natuur & Bos. Tijdens deze tweede bemonsteringsronde werd een telling van het totaal aantal aanwezige eilegels uitgevoerd, en indien verschillend van de vorige telling (in sommige gevallen waren er in tussentijd nog enkele legfels bijkomend afgezet) werd dit aantal bijgesteld.

Tot slot werd voor een selectie van 20 locaties een liter water bemonsterd rondom de legfels (Figuur 7c), om dit in een later stadium te kunnen onderwerpen aan eDNA analyses. Alle waterstalen werden zo snel mogelijk na staalname ingevroren (-20°C), om degradatie van het eDNA zoveel mogelijk te beperken. Drie weken later, wanneer alle eitjes in het veld ontwikkeld waren tot kikkervisjes, werd deze procedure van waterstaalname op exact dezelfde locaties herhaald. Tegelijkertijd werden enkele parameters van het water gemeten zoals: pH, temperatuur, zuurstofgehalte en conductiviteit. De ingevroren waterstalen zijn later gefilterd over een Sterivex filter.



Figuur 7. Illustraties van de staalnamecampagne op 23/03/2017 op het Klein Schietveld. (a) Typische cluster van eilegels van heikikker en/of bruine kikker, (b) staalname van een drietal eitjes uit elk van de verschillende legfels per cluster, en c) staalname van water rondom de cluster van legfels voor het eDNA-onderzoek.

2.2.3 eDNA-afgifte onder gecontroleerde condities

Om onder gecontroleerde condities in het water de eDNA afgifte van heikikker en bruine kikker op het stadium van kikkervisjes te kunnen bepalen, werden in het voorjaar van 2017 in het veld 120 eitjes per soort verzameld. Voor heikikker werden hiervoor eitjes genomen op het Klein Schietveld, op een locatie waar we 100% zeker waren dat het om heikikker ging. Voor bruine kikker werden eitjes bemonsterd in een polderlandschap (Bazel), zodat er eveneens 100% zekerheid was dat we met bruine kikker te maken hadden. Deze kikkervisjes werden vervolgens in de volgende ratio's per soort verdeeld over 11 bakken: 0:10, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 en 10:0. Elk van deze bakken (70 x 70 x 50 cm) werd twee dagen voor aanvang van het experiment gevuld met 20 l leidingwater en buiten opgesteld zodat de temperatuur min of meer overeenkwam met de veldcondities, en mogelijke chloorresten uit het water konden verdampen, waarna de kikkervisjes onder de verschillende ratio's in de bakken werden uitgezet. Nadat de kikkervisjes 48 uur in de bakken vertoefden werd per bak 0,5 l water genomen en onmiddellijk gefilterd over een filter (type Sterivex). Deze procedure werd per bak twee maal herhaald zodat in totaal 22 filters werden bekomen. Na filtering werden de filters onmiddellijk ingevroren bij -20°C tot verdere analyse (eDNA-extractie en uiteindelijke detectie).

2.3 eDNA-EXTRACTIE UIT WATER

Alle eDNA-filters en afgeleide eDNA-stalen werden bewaard en behandeld in het labo in onze vestiging in Geraardsbergen dat speciaal voor eDNA-onderzoek, en dus lage DNA-concentraties, is ingericht. De eDNA-filters werden allen volgens het licht gewijzigde SXCAPSULE-extractieprotocol geëxtraheerd. Dit protocol is ontwikkeld voor filters zonder preservatiebuffer, zoals beschreven in Spens et al. 2017. Doorheen de eDNA workflow in het labo bouwen we een reeks testen of controlestappen in die moeten toelaten de betrouwbaarheid van het volledig proces en de uiteindelijke kwaliteit van de resultaten te toetsen. Dit geeft ons onder andere inzichten over de efficiëntie van de eDNA-extractie en de kwaliteit van het geëxtraheerde eDNA, voordat tot effectieve interpretatie van de resultaten wordt overgegaan. Om vals-negatieve detectie uit te sluiten, zowel bij eDNA-extractie als op het niveau van de PCR amplificatie, werd aan de Sterlitech filters, genomen voor de temporele screening, systeemvreemd DNA toegevoegd.

2.4 DNA-EXTRACTIE UIT EITJES EN LARVEN

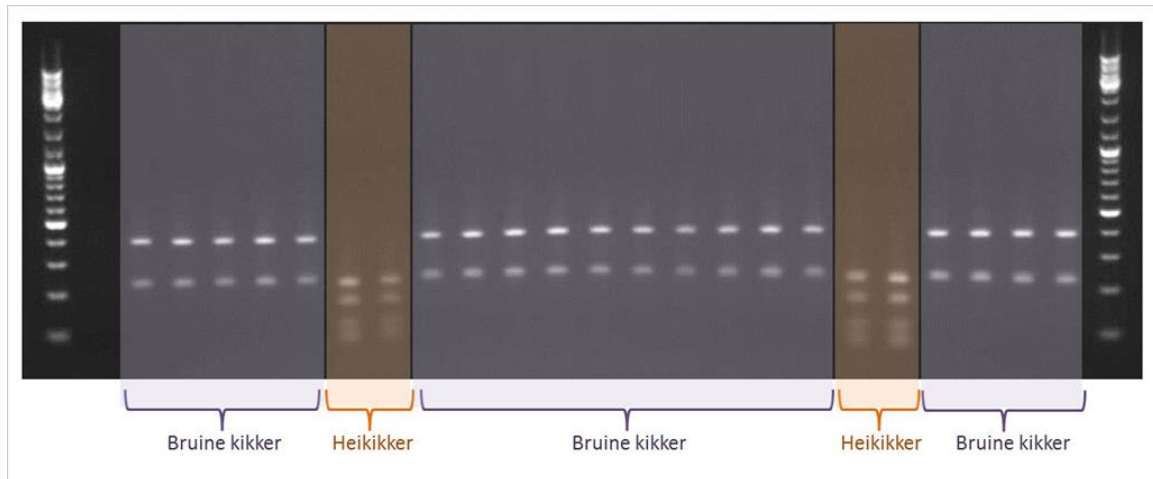
Omdat extractie op enkel het embryo een merkkelijk betere DNA-opbrengst opleverde bij voorafgaande testen, werd eerst het uitwendige geleimembraan van elk eitje met een scalpel van het embryo gescheiden. Per eilegsel werden twee individuele eitjes geëxtraheerd. De overgebleven eitjes werden op ethanol en koel bewaard. De extractie gebeurde met de Blood & Tissue Kit (Qiagen) met een lysisstap van 1 uur. Het verkregen extract werd geëlueerd in 70 μl buffer (elutie twee maal uitgevoerd). De extractie van de larven gebeurde ook met de Blood & Tissue Kit en elutie in 140 μl . DNA-extracten die bestemd waren voor ddPCR-analyse werden, na DNA concentratiebepaling, verdund naar 1 ng / μl vooraleer binnen te brengen in het labo voor eDNA-onderzoek.

Naast het extraheren van individuele eitjes, werd een bijkomende test uitgevoerd waarbij mengstalen van eitjes werden genomen. Dit waren elf mengstalen met telkens 10 eitjes, met



bemonsterde eitjes kan een duidelijk onderscheid worden gemaakt tussen heikikker en bruine kikker (Figuur 8).

De PCR werd uitgevoerd op 2 µl onverdund DNA in een totaal volume van 20 µl (1x PCR buffer, 250 µM dNTPs, 0,1 µM van elke primer, 1 U Taq polymerase en 1,5 mM MgCl₂). De PCR-amplificatie werd gecontroleerd door middel van horizontale agarose gelelectroforese (2% agarose). De PCR-condities beschreven door Palo & Merilä (2003) werden aangepast als volgt: initiële stap van 3 min bij 94 °C, gevolgd door 35 cycli van 30 s bij 94°C, 30 s bij 49 °C waarbij de primers aan het DNA zullen hechten en 30 s bij 72 °C (annealing temperatuur).



Figuur 8 Resultaat van een RFLP-analyse met duidelijke amplificatie en opsplitsing van de verschillende DNA-fragmentjes in gescheiden bandjes na gelelectroforese. Elke verticale kolom is een staal.

Tenslotte volgde een finale elongatiestap van 5 min bij 72 °C. Aan 10 µl PCR product werd 1 U HaeIII, 2 µl 10x Buffer R (Thermo Scientific) en 7 µl ultra-puur water (Milli-Q van Millipore Corporation) toegevoegd. Deze oplossing werd gedurende 2 uur geïncubeerd bij 37 °C. De restrictie werd gecontroleerd door middel van horizontale agarose gelelectroforese (2% agarose). In totaal werd 11% van de stalen een tweede keer geanalyseerd ter controle.

2.7 POPULATIEGENETISCHE ANALYSES

2.7.1 Genotyping

Verschiede gepubliceerde microsatellietmerkers werden uitgetest op een beperkt aantal stalen met als doel een voldoende aantal polymorfe merkers te verkrijgen voor deze studie, die bovendien in een optimaal aantal multiplexsets gelopen kunnen worden. Van de uiteindelijke set van 19 merkers werden er twee in simplex en de overige in twee multiplexsets gelopen (Bijlage 3). Naast het specifieke volume aan primers met een concentratie van 10 µM, zoals vermeld in Bijlage 3, werd in elke multiplex- en simplexmix 1 µl DNA met een concentratie van c. 5 ng/µl en 5 µl Multiplex Master Mix (Qiagen) toegevoegd en verder aangevuld met ultra-puur water tot een totaal volume van 10 µl.

De PCR-condities waren voor de eerste multiplex als volgt: 15 min bij 95°C gevolgd door 35 cycli met telkens 30 s bij 95°C, 45 s bij 50°C (annealing temperatuur) en 45 s bij 72°C; na een elongatiestap van 10 min bij 72°C wordt de temperatuur op 4°C gebracht gedurende 15 min waarna een temperatuur van 15°C aangehouden wordt. Voor multiplex 2 werden dezelfde condities gebruikt maar met een annealing temperatuur van 55°C. Voor merker RA13 werd een touch-down procedure gevolgd met het volgende programma: 15 min bij 94°C, 22 cycli van 30 s bij 94°C, 30 s beginnend bij 60°C met een afname van een halve °C per cyclus, 30 s bij 72°C gevolgd door 15 cycli van 30 s bij 94°C, 30 s bij 50°C en 30 s bij 72°C, eindigend met 10 min bij 72°C en 15 min bij 4°C. Het PCR product wordt dan op 15°C bewaard. Voor merker RtU4 gelden dezelfde condities met uitzondering van de touch-down cycli. Hier zijn 35 cycli gebruikt met telkens 30 s bij 94°C, 30 s bij 46°C en 30 s bij 72°C. De genotyping gebeurde op een ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) waarbij een verdunning van de PCR-producten van 1/10 werd gehanteerd voor beide multiplexsets. De simplexsets werd in poolplex geanalyseerd met een verdunning van 1/50. Het identificeren van de allelen gebeurde met het programma GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems). Doorgaans werden twee eitjes per legsel geanalyseerd. Circa 3% van de stalen werd twee tot vijf maal herhaald binnen en/of tussen platen. Wanneer eitjes een slechte amplificatie gaven, werden ze vervangen door genotypes van nieuwe eitjes van hetzelfde legsel.

De merkers werden gecontroleerd op afwijkingen van het Hardy-Weinberg evenwicht, op de aanwezigheid van nulallelen en op linkage disequilibrium (d.i. de niet-toevallige associatie tussen allelen van verschillende loci binnen een populatie) met genepop 4.6 (Rousset, 2008). Voor de beoordeling van het percentage nulallelen kozen we de methode van grootste aannemelijkheid (maximum likelihood) volgens het Expectation Maximization algoritme van Dempster et al. (1977). Ter vergelijking werd ook het aandeel nulallelen bepaald met ML-NullFreq (Kalinowski & Taper, 2006). Omdat er een sterke mogelijkheid bestaat op het overbemonsteren van sterk verwante individuen (broers of zussen) en deze een invloed kunnen hebben op de voornoemde analyses, werden de tests herhaald met enkel één per koppel broers/zussen over te houden in de dataset. De broers/zussen werden geïdentificeerd met behulp van het programma COLONY 2.0.6.5 (Jones & Wang, 2010). Enkel de combinaties met een probabilliteit hoger dan 0,9 werden als zeker beschouwd. De analyse gebeurde met hoge precisie, drie runs en met een polygaam paringssysteem. De informatie dat eitjes afkomstig van hetzelfde legsel afkomstig waren van dezelfde moeder en omgekeerd kon in de analyse mee opgenomen worden.

2.7.2 Genetische structuur

We hebben de spatiale structuur binnen de populatie onderzocht met behulp van paarsgewijze differentiatie volgens Weir & Cockerham (1984) (F_{st} ; met 1000 bootstraps) tussen poelen en met een spatiale principale componenten analyse (sPCA) met respectievelijk de R pakketten *diversity* 1.9.90 (Keenan et al., 2013) en *adegenet* 2.1.0 (Jombart, 2008) in de R omgeving versie 3.5.2 (R Core Team, 2018). De F_{st} resultaten werden gevisualiseerd in een principale coördinaten analyse (PCoA). Een sPCA maakt gebruik van allelfrequenties en brengt hun genetische variabiliteit en spatiale autocorrelatie in rekening met Moran's I (Moran, 1948; Moran, 1950). Als netwerk gebruikten we een *neighbourhood-by-distance* netwerk met 0 m als minimale afstand (binnen een poel) en 1 km als maximale afstand, een afstand die als maximale afstand tijdens de lentemigratie werd gevonden voor de soort (Kovar et al., 2009). We onderzochten of er een relatie bestaat tussen genetische en geografische afstand (*isolation by distance*; IBD) via een Manteltest, geïmplementeerd in *adegenet*, met 9999 permutaties. Daarnaast werd de spatiale autocorrelatie geanalyseerd van de genotypes met

SPAGeDi 1.5a (Hardy & Vekemans, 2002). Vooreerst werd nagegaan welke maat van verwantschap een goede schatter zou zijn via simulaties in COANCESTRY 1.0.1.9 (Wang, 2011). De gesimuleerde populatie bestond uit 100 paren voor elk van vier specifieke relaties: ouder-kind, broer/zus, halfbroer/halfzus en neef/nicht. Tegelijkertijd krijg je paren van onverwanten gesimuleerd. De simulaties gebeuren op basis van de beschikbare genotypes, rekening houdend met de gevonden fout per merker en mogelijke allel drop-out. Dat laatste werd bepaald met het programma Pedant op basis van de dubbele stalen (Johnson & Haydon, 2007a; Johnson & Haydon, 2007b).

Als schatter voor verwantschap werd deze van Lynch & Ritland (1999) gekozen, die tegelijkertijd relatief goed scoorde in de simulaties (zie resultaten) en ook door SPAGeDi berekend kon worden. We lieten het programma een optimale verdeling van afstanden over acht klassen bepalen (10 klassen voor de set zonder broers/zussen), waarbij rekening wordt gehouden met het aantal paren, de proportie van alle individuen en het aantal keer dat elk individu in elke klasse opgenomen is. We stelden 1000 permutaties in.

2.7.3 Genetische variatie en effectief aantal ouders

Genetische variatie onder de vorm van geobserveerde en verwachte heterozygositeit (H_o en H_e), allelische rijkdom (A_r ; met rarefactie) en de fixatie-index (F_{is}) werden geschat met het R pakket hierfstat 0.04-22 (Goudet, 2005).

Daarnaast werd de genetische effectieve populatiegrootte bepaald via een paar momentschatters. Omdat we enkel eitjes bemonsterd hebben binnen eenzelfde voortplantingsseizoen, bepalen we hier eerder het effectief aantal ouders (N_b) dan de effectieve populatiegrootte. De ene methode baseert zich op de verwantschap tussen de individuen via het programma COLONY en de andere op de mate van linkage disequilibrium (LD) genaamd LDNe (Waples & Do, 2008) met behulp van de software NeEstimator 2.01 (Do et al., 2014). Zeldzame allelen worden best buiten beschouwing gelaten in deze laatste schatting (hier met grenswaarde 0,02). We hebben N_b bepaald per poel en over de hele populatie heen. De schattingen bekomen met de LD-methode werden aangepast zoals voorgesteld door Waples et al. (2014). Met behulp van twee levensgeschiedenissenkenmerken, volwassen leeftijd en volwassen levensduur, kan een betere schatting van N_b van een enkele cohorte gemaakt worden wanneer we met overlappende generaties te maken hebben. We gebruikten daarvoor een leeftijd van twee jaar waarop heikikker seksueel rijp is (Lardner & Loman, 2009; Söderman, 2006) en een maximale leeftijd van 11 jaar (Ishchenko, 2005). We noemen deze aangepaste schatting N_b *adjust*.

De analyse met COLONY bepaalde naast effectieve grootte ook het aantal ouders van de onderzochte cohorte. Het totaal aantal legsels van heikikker is daarnaast een indicatie van het aantal voortplantende vrouwtjes. Dit aantal werd per poel berekend aan de hand van de resultaten van de soortbepaling, waarbij de proportie bemonsterde legsels van heikikker werd vermenigvuldigd met het totaal aan getelde legsels. Door het aantal bemonsterde legsels te vergelijken met het aantal ouders kan de verhouding tussen mannetjes en vrouwtjes benaderd worden en bijgevolg het totaal aantal reproducerende adulten.

De potentiële invloed van de in het veld gemeten abiotische kenmerken van de poelen (pH, temperatuur, zuurstofgehalte en conductiviteit) op de schattingen van N_b en op het aantal genkopieën/ μ l gemeten via ddPCR op waterstalen werd bepaald met generalised linear models (GLM). Als extra covariate werd de geschatte oppervlakte van de poel toegevoegd. Deze werd berekend met behulp van luchtfoto's van 2017 (Informatie Vlaanderen) en ArcGIS

10.4.1 (Esri). In het model met ddPCR-resultaten als respons werd tevens het aantal reproducerende adulten van heikikker als verklarende variabele toegevoegd. Via achterwaartse eliminatie werd op basis van het Akaike Informatie Criterium (AIC) een finaal model geselecteerd. Vooraleer de volledige modellen werden gevormd, controleerden we of er geen collineariteit bestond tussen variabelen met behulp van Variantie Inflatie Factor (VIF) met R pakket usdm 1.1-18 (Naimi et al., 2014), waarbij we een grenswaarde van drie hanteerden. De analyses werden uitgevoerd met R pakket nlme 3.1-137 (Pinheiro et al., 2016).

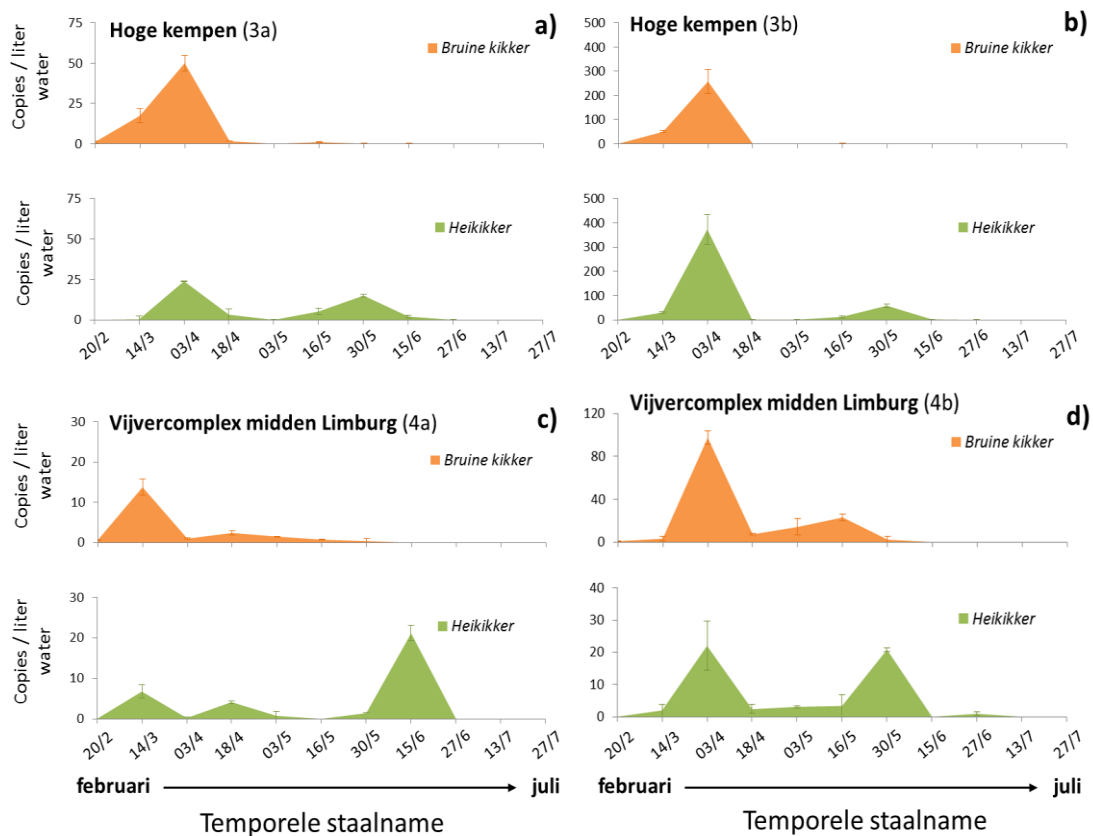


3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 EDNA AFGIFTE VAN HEI- EN BRUINE KIKKER

3.1.1 Temporele detectie onder veldcondities

De temporele eDNA-patronen in de vier verschillende vijvers en vennen met gekende heikikker- en bruine kikker populaties, tonen aan dat we via het nemen van een mengstaal in staat zijn om de aanwezigheid van beide soorten duidelijk aan te tonen (Figuur 9). Het temporele eDNA profiel van beide soorten geeft een duidelijke eerste piek vroeg in het voorjaar (vanaf half maart tot begin april). Deze valt samen met het actief worden van de adulte individuen na de winter en de periode van reproductie wanneer de temperaturen van het water in het voorjaar stijgen (zie Figuur 10).

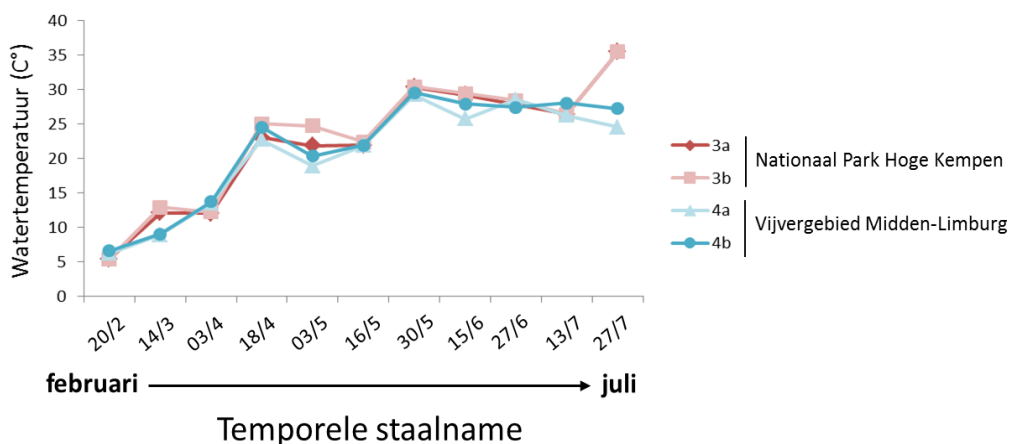


Figuur 9. Temporeel eDNA-profiel (gemeten via ddPCR) (gemiddelde van twee analyses per staal \pm SE) van bruine kikker en heikikker in het water van twee vennen en vijvers in respectievelijk het Nationaal Park de Hoge Kempen (a-b) en het Vijvergebied Midden-Limburg (c-d). Waterstalen werden driewekelijks genomen vanaf eind februari t.e.m. eind juli 2018.

Een vergelijking van het temperatuurverloop van het water (gemeten op elk van de bemonsteringen) met de temporele eDNA-profielen geeft aan dat wanneer de



watertemperatuur na de winter boven de 10°C stijgt, dit beide soorten lijkt aan te zetten om tot reproductie over te gaan (Figuur 9 en 10).

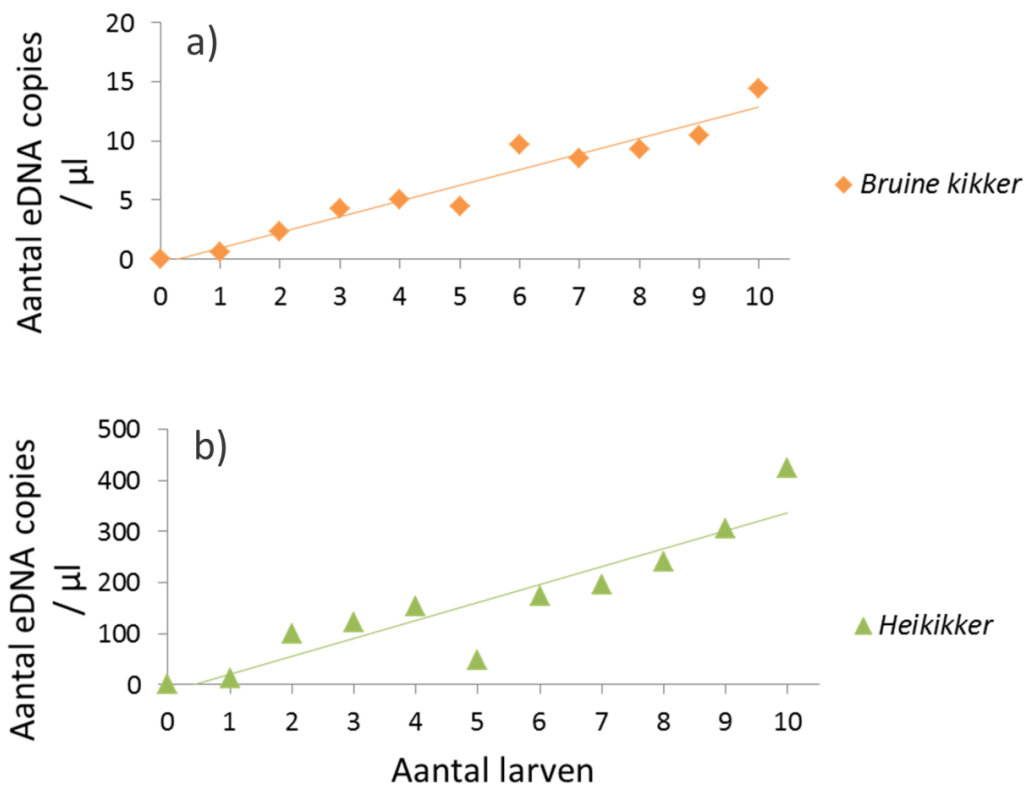


Figuur 10. Temporeel profiel van de watertemperatuur (°C) gemeten op elk van de eDNA bemonsteringen in twee vennen 3a en 3b en vijvers 4A en 4b in het Nationaal Park Hoge Kempen en het Vijvergebied Midden-Limburg. Stalen werden driewekelijks genomen vanaf eind februari t.e.m. eind juli 2018.

Drie weken na het bereiken van de eerste eDNA-piek, valt het eDNA-sigitaal even snel weer terug als dat het verscheen, wat allicht te verklaren is door het feit dat de adulte individuen zich na de paring en het afzetten van de eitjes niet langer in het water ophouden. Verder valt bij heikikker ook op dat de sterke terugval van de eerste piek gevolgd wordt door een graduele eDNA-toename in het water met een duidelijke tweede piek rond eind mei – begin juni. Deze wordt mogelijk veroorzaakt door de opgroeiende juvenielen, die daarna ook in metamorfose gaan en het water verlaten. Opmerkelijk hierbij is echter wel dat een tweede piek zich niet of nauwelijks voordoet bij bruine kikker. Dit opmerkelijke verschil tussen beide soorten is mogelijk te verklaren doordat: bruine kikker een snellere metamorfose van zijn larven vertoont en juvenielen sneller het water verlaten (Loman et al., 2002), grotere sterfte van bruine kikker eitjes/larven omdat de habitat voor de soort mogelijk suboptimaal is, bruine kikkerlarven een lagere eDNA-afgifte vertonen dan heikikker, wat eveneens naar voor kwam in het mesocosmexperiment (zie verder, Figuur 11).

3.1.2 eDNA-afgifte onder gecontroleerde condities

De eDNA-afgifte van heikikker- en bruine kikkerlarven in het mesocosmexperiment toont voor beide soorten een significant positief verband aan tussen de graduele toename van elke soort en concentratie eDNA van beide soorten ($r = 0,969$; $P = 0,0001$ voor bruine kikker en $r = 0,915$; $P = 0,003$ voor heikikker; Figuur 11a-b).



Figuur 11. Relatie tussen het aantal bruine kikker- (a) en heikikkerlarven (b) in elk van de 11 mesocosmen en het eDNA signaal gemeten via ddPCR.

Verrassend is echter wel het opmerkelijk significante verschil in eDNA-afgifte tussen beide soorten ($t = -4,001$; $P = 0,0007$), waarbij heikikker gemiddeld genomen 25 maal meer eDNA in het water lijkt af te geven dan bruine kikker. Dit is opmerkelijk aangezien de larven die voor dit experiment werden gebruikt zich allen in hetzelfde levensstadium bevonden en ook in grootte erg gelijkaardig waren. Of dit sterke verschil een natuurlijk verschil in eDNA-afgifte is dat zich ook onder natuurlijke condities voordoet, is niet duidelijk. Het zou bijvoorbeeld kunnen dat dit verschil deels in de hand zou zijn gewerkt door een hogere stress bij heikikkerlarven door in dit experiment gebruik te maken van leidingwater. Het is namelijk niet ondenkbaar dat het sterke verschil in pH (in vergelijking met de condities in hun natuurlijke leefgebied), een stressfactor heeft veroorzaakt die een verhoogde eDNA afgifte in de hand kan werken.

3.2 BEPALING VAN DE VERHOUDING BRUINE KIKKER- EN HEIKIKKEREILEGSELS

3.2.1 Soortidentificatie van de eilegseis via RFLP

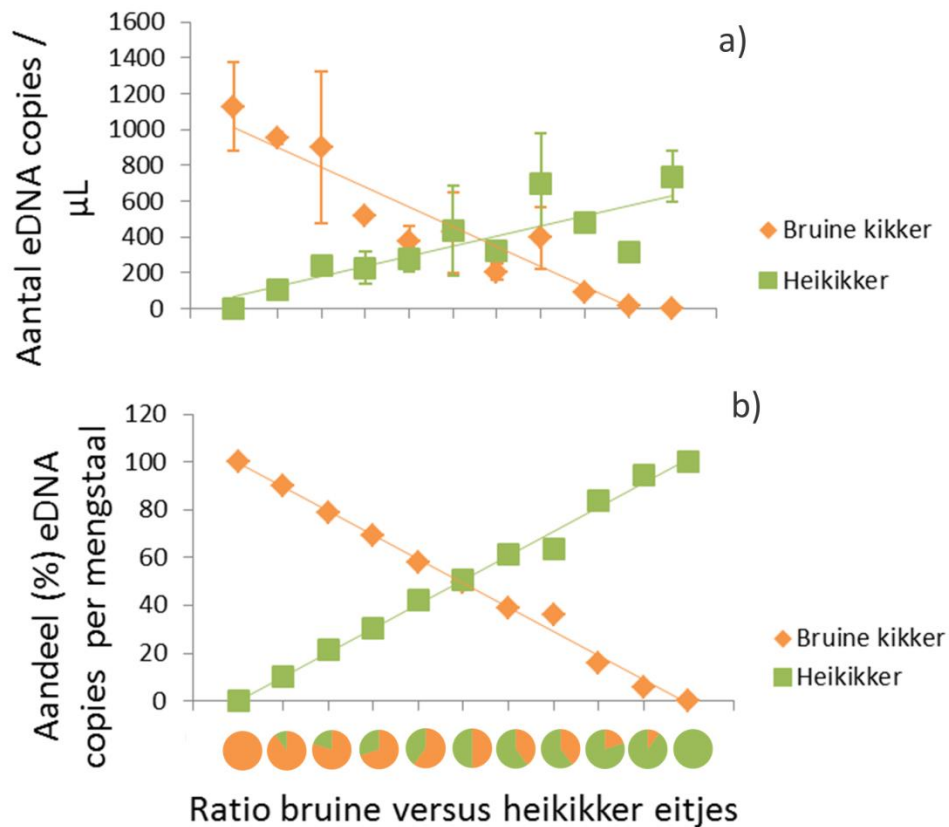
In Tabel 1 worden de resultaten van de RFLP-analyse gegeven. De proportie legseis van heikikker per bemonsterde poel varieert van 0 tot 100% met een gemiddelde van 76%. In bepaalde gevallen was er geen amplificatie of amplificatie van slechte kwaliteit. Omdat deze in aantal beperkt waren, werden ze niet herhaald.

Tabel 1. Lijst van aantal getelde en bemonsterde eilegseis per poel op het Klein Schietveld. De code van de poel komt overeen met de codes gegeven in Figuur 5. Het percentage legseis van heikikker werd berekend rekening houdend met de soortbepaling van larven (poelen 1 en 24). Ook het aantal legseis waarbij de RFLP-analyse geen resultaat gaf zijn gegeven.

Code poel	Aantal legseis	Aantal legseis bemonsterd (aantal larven)	Aantal legseis zonder soortbepaling	Aantal legseis bruine kikker	Aantal legseis heikikker	% heikikker
01	13	13	0	0	13	100
02	70	31	1	27	3	10
1	75-85	9 (30 ^a)	0	6	3	4
10	37	17	1	0	16	100
11	16	12	1	0	11	100
13	47	18	0	2	16	89
14	35	14	0	0	14	100
16	60-65	37	0	27	10	27
17	35	21	1	13	7	33
18	50-55	51	0	1	50	98
19	20-25	21	1	0	20	100
20	4	4	0	0	4	100
21	20-25	18	1	10	7	41
22a	100-	13	0	1	12	92
22b	70-80	17	0	1	16	94
22c	38	15	0	0	15	100
24	500	0 (30 ^a)				0
25	50-55	25	0	0	25	100
3	14	14	0	0	14	100
30	42	36	0	36	0	0
31	50	19	2	1	16	89
32	3	3	1	0	2	100
4	40	21	1	0	20	100
5	9	9	0	0	9	100
6	85	41	1	0	40	100
9	17	13	0	0	13	100

^a Alle bemonsterde larven waren bruine kikkers

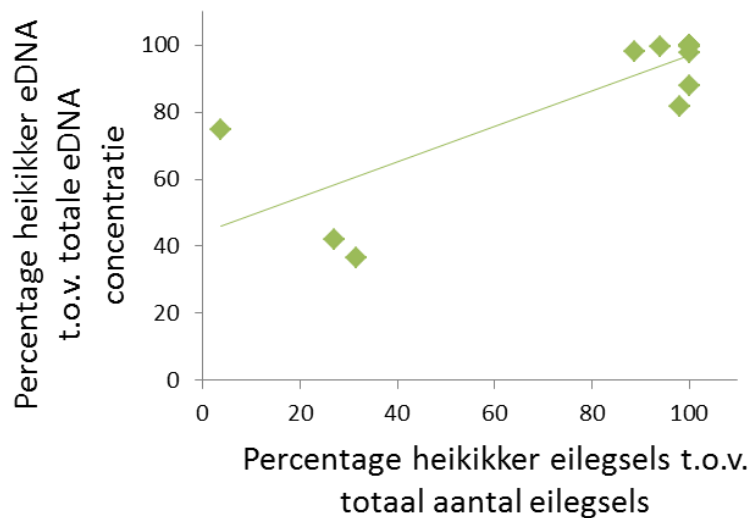
deze variatie tussen de verschillende stalen bijna volledig verdwijnt en we erg accurate inschattingen krijgen die bijna perfect overeenstemmen met de verhouding aan heikikker en bruine kikker eitjes (Figuur 13b). Dit geeft dus aan dat deze methode op termijn erg efficiënt zou kunnen zijn voor de bepaling van het aandeel heikikker versus bruine kikker eilegels in functie van de monitoring van de heikikkerpopulaties.



Figuur 13. Verband tussen a) het totaal aantal eDNA-kopieën van bruine kikker en heikikker (bepaald via ddPCR) (gemiddelde van twee analyses \pm SE) en b) de proportionele verhouding bepaald op basis van het gemiddelde van het eDNA-signaal tussen beide soorten binnen elk staal, en dit in functie van een voor bruine kikker aflopend en voor heikikker oplopend aandeel eitjes op een totaal van 10 eitjes per staal.

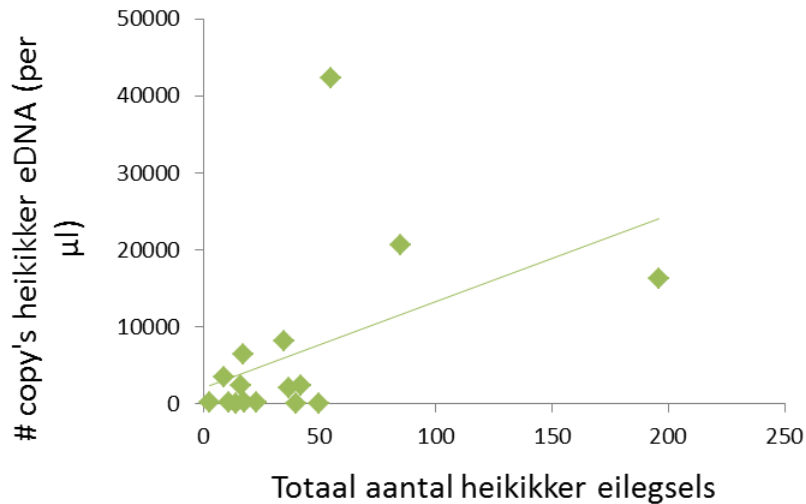
3.2.3 Bepaling van de soortverhouding op basis van eDNA uit water

De eDNA-concentraties van heikikker en bruine kikker die werden aangetroffen in het water dat werd bemonsterd rondom de eilegels in het Klein Schietveld, bleken voor beide soorten hoog te zijn. Over alle onderzochte locaties heen werden er van heikikker gemiddeld 6541,2 kopieën per μl eDNA-extract gemeten, terwijl dit er voor bruine kikker 607,8 waren (op de locaties waar deze soort aanwezig was). Wanneer we kijken naar het aandeel (%) heikikker eDNA (t.o.v. van de totale eDNA-concentratie van beide soorten), dan blijkt dit significant gerelateerd te zijn ($r = 0,820$; $P = 0,0001$) met het werkelijk aandeel heikikkereilegels op deze locaties (bepaald via de RFLP-analyses zie paragraaf 3.2.1.) (zie Figuur 14).



Figuur 14. Verband tussen het percentage heikikker eDNA (t.o.v. de totale eDNA-concentratie van bruine kikker en heikikker, gemeten via ddPCR) en het aandeel heikikkereilegels op de onderzochte locaties in het Klein Schietveld.

Wanneer we kijken naar de absolute heikikker eDNA-concentratie die wordt opgepikt op de locaties waar heikikker eilegels heeft afgezet, lijkt er zich een zwakke trend voor te doen met het totaal aantal heikikkereilegels dat op deze plaatsen werd afgezet, hoewel niet significant ($r = 0,440$; $P = 0,0874$; Figuur 15). In beide gevallen, zowel bij de proportionele als de absolute data, valt echter op dat er een aanzienlijke variatie bestaat tussen de opgemeten eDNA-concentraties en het werkelijke aandeel heikikkereilegels bepaald via de RFLP-analyses. Het is met andere woorden wel mogelijk om een ruwe inschatting te bekomen van het aandeel heikikkerlegsels op basis van eDNA uit het omringende water, maar een accurate inschatting kan via deze methode niet worden bekomen. Hiervoor kunnen verschillende factoren worden aangehaald die hier mogelijk verantwoordelijk voor zijn. Zo is het niet evident, zeker op plaatsen waar veel eilegels zijn afgezet, om op een gehomogeniseerde manier water rondom de eilegels te bemonsteren en dragen ingesloten legsels allicht weinig bij aan de totale eDNA concentratie. Belangrijker is allicht de impact die adulte individuen op de eDNA patronen veroorzaken en die niet kan worden uitgesloten noch ingeschat worden. Dit alles doet dan ook de vraag rijzen of eDNA-bepalingen wel de meest nauwkeurige en efficiënte manier is om het aandeel heikikker versus bruine kikkereilegels te kunnen bepalen (zie verder).



Figuur 15. Verband tussen het totaal aantal heikikker eilegels die op elk van de locaties in het Klein Schietveld aanwezig waren het totaal aantal heikikker eDNA moleculen gemeten in het omliggende water (via ddPCR).

3.3 POPULATIEGENETISCH ONDERZOEK

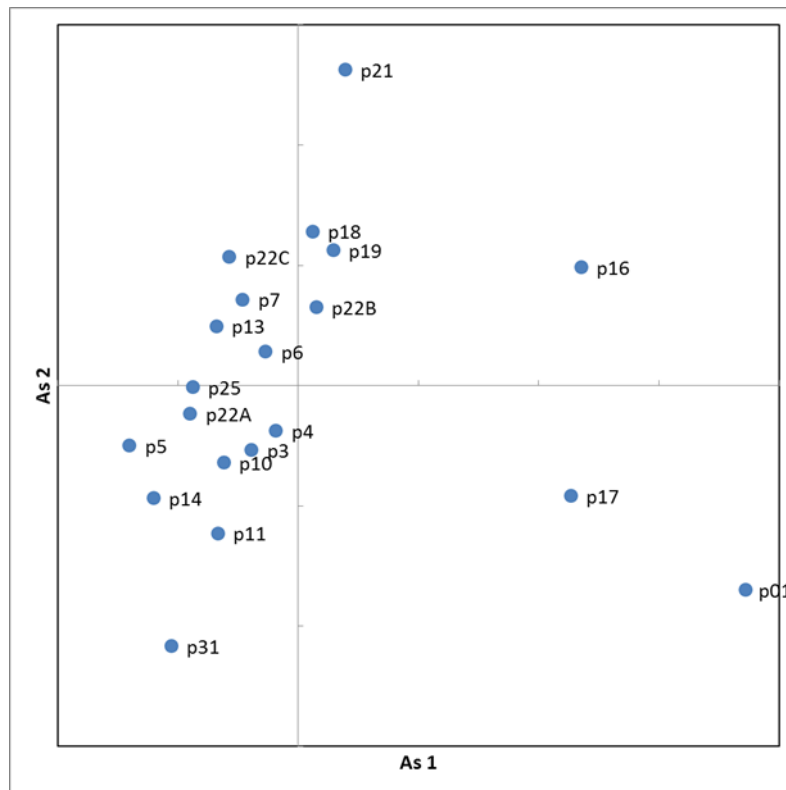
Enkele loci bleken op de totale dataset geen variatie te vertonen binnen het Klein Schietveld: Rtemp μ 4, Rtemp μ 5 en Rt2Ca2-22. De loci RECALQ en RlatCa41 zijn niet in Hardy-Weinberg-evenwicht ($P < 0,0001$), ook na exclusie van broers/zussen. Bovendien bevatten ze vele nulallelen, respectievelijk gemiddeld 22% en 17% volgens de genepop-resultaten. Hoge proporties nulallelen komen ook voor in RCIDII (gemiddeld 57%) en RNTYR2 (gemiddeld 24%), maar niet wanneer berekend met ML-NullFreq. Tegelijkertijd vertonen RECALQ en RlatCa41 per poel problematische hoeveelheden nulallelen. De proporties zakken slechts licht wanneer we één individu per koppel broers/zussen overhouden in de dataset. Er waren enkele paren loci in LD (vijf combinaties) in maximaal twee poelen. Door exclusie van broers/zussen zakte het aantal significante combinaties naar twee: RA11 versus R13 in poel 3, RlatCa18 versus RA13 in poel 6. Vanwege het Hardy-Weinberg-onevenwicht en de hoge proportie nulallelen, lieten we loci RECALQ en RlatCa41 achterwege voor de verdere analyses. De fout op de resterende merkers ligt op 0,6%.

Door stalen met slechte amplificatie (> 50% ontbrekende waarden) te herhalen of te vervangen door stalen afkomstig van dezelfde legfels, zijn alle bemonsterde legfels vertegenwoordigd in de uiteindelijke dataset met minimaal een staal.

De range van fragmentgroottes voor de merkers RRD590 en Rt μ P bleek te overlappen. De multiplexset zal dus in de toekomst aangepast moeten worden wanneer een bredere staalname zou gebeuren, bijvoorbeeld in verschillende populaties, met een verhoogde kans op meer allelen voor beide loci.

Paarsgewijze F_{st} -waarden varieerden tussen -0,0037 en 0,1113 (exclusief broers/zussen: -0,0023 en 0,1057). De poelen 32, 1 en 02 waren het sterkst gedifferentieerd (resultaten niet weergegeven). Hoewel de waarden significant verschillen van nul; hoewel dit logisch lijkt vanwege hun ligging aan de uiterste rand van de populatie, blijkt dit minder sterk op te gaan voor poelen 01 en 31. Vermoedelijk heeft het lage aantal stalen van poelen 32, 1 en 02 hiermee te maken. De F_{st} -waarden voor deze poelen hadden dan ook zeer ruime

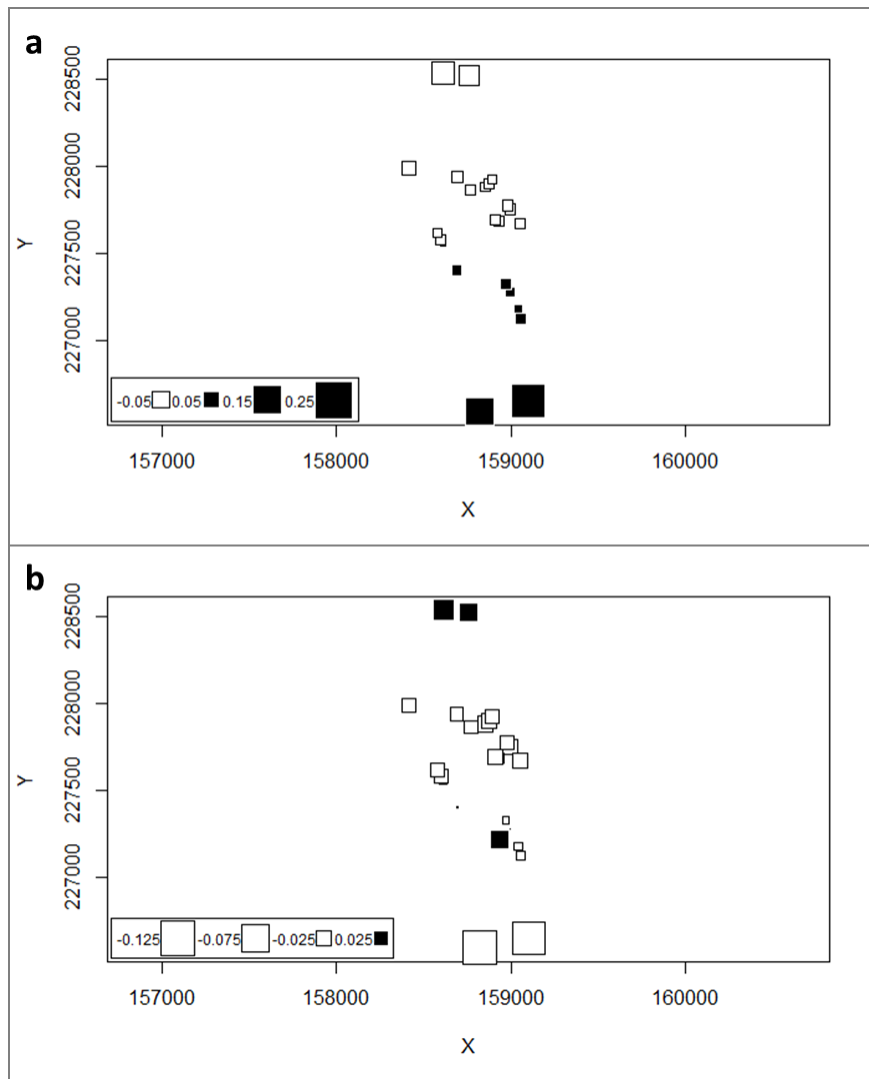
betrouwbaarheidsintervallen. Als we bijgevolg de poelen met staalgroottes kleiner dan 10 weglaten, zijn poelen 01, 17, 16, 21 en 31 het sterkste gedifferentieerd (Figuur 16), met een maximale F_{st} -waarde van 0,057. Poelen 01 en 31 liggen opnieuw aan de respectievelijke zuidelijke en noordelijke rand van de populatie. Bijgevolg lijken toch eitjes in de zuidelijke en noordelijke poelen te verschillen van elkaar en van de centraal gelegen eilegels. De individuen in poelen 16, 17 en 21 wijken van dit patroon af.



Figuur 16. De eerste twee assen van de principale coördinaten analyse, die respectievelijk 30 en 23% van de variatie verklaren. De analyse is gebaseerd op de F_{st} -waarden tussen poelen met meer dan 10 stalen van heikikker, exclusief de genotypes van broers/zussen. De nummers in de codes komen overeen met deze in Figuur 5.

De Mantel r waarde van 0,11 was significant ($P = 0,0001$). De aanwezigheid van IBD werd ook vastgesteld uit de sPCA resultaten (Figuur 17a), waarbij de globale structuur (positieve spatiale autocorrelatie) een noord-zuid trend vertoonde. Deze werd bepaald door een enkele principale component. Enkel poel 18 leek hiervan af te wijken. Deze poel is niet zichtbaar in de Figuur 17a omdat hij een zeer kleine positieve *lagged* score heeft. Ook de lokale structuur (negatieve spatiale autocorrelatie) werd voornamelijk bepaald door één principale component (Figuur 17b). In plaats van een trend vertoonde de structuur eerder vier groepen elk bestaande uit nabijgelegen poelen, al lijken de centraal gelegen poelen ook hier meer op elkaar. Opnieuw wijkt poel 18 af en in mindere mate ook 19 en 21.

Samenvattend kunnen we stellen dat er globaal een IBD-structuur is, met enkele poelen die lokaal lijken af te wijken. Mogelijk heerst daar een iets andere sociale structuur die spatiaal beïnvloed wordt door het landschap of andere omgevingsfactoren.

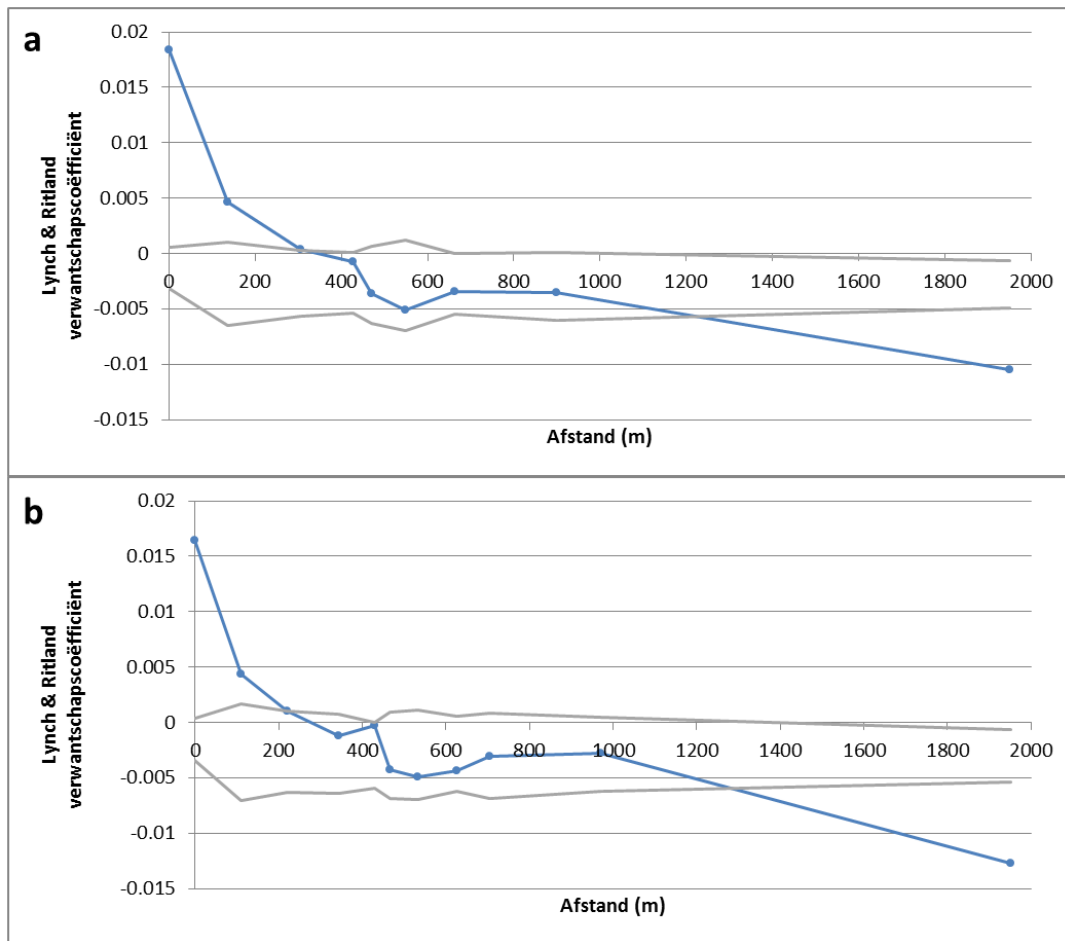


Figuur 17. Grafische weergave van de sPCA resultaten met (a) de globale structuur en (b) de lokale structuur t.o.v. de x- en y-coördinaten van de locaties. De blokjes geven de waarde van lagged scores volgens grootte en kleur: zwart is positief, wit is negatief.

De beste schatter van verschillende types verwantschappen uit de simulaties van COANCESTRY bleek TrioML te zijn. Deze leverde de meest nauwe betrouwbaarheidsintervallen voor de gesimuleerde waarden en de hoogste correlatie tussen gesimuleerde en echte waarden ($r = 0,11$, $P < 0,0001$). Deze schatter komt niet voor in SPAGeDi en werd dus vervangen door de coëfficiënt van Lynch & Ritland (1999) die de hoogste correlatie met TrioML had ($r = 0,756$) en een gelijkaardige correlatie tussen de gesimuleerde en geschatte waarden ($r = 0,086$, $P < 0,0001$).

De resultaten van de spatiale autocorrelatie gaven aan dat tot en met een maximale afstand van 305m de verwantschappen significant verschilden van random paring (Figuur 18a). Bij grotere afstanden werden ze niet-significant. In de laatste afstandsklassen van 900-1950m was de relatie significant negatief, maar deze moet met voorzichtigheid behandeld worden vanwege een hoge coëfficiënt van variatie voor het aantal keer dat elk individu is vertegenwoordigd in die klasse (> 1). Wanneer broers/zussen verwijderd werden uit de dataset is de relatie tussen verwantschap en afstand nog significant tot een afstand van 219m, maar is opnieuw niet significant tussen 343m en 431m ($P = 0,035$) (Figuur 18b).

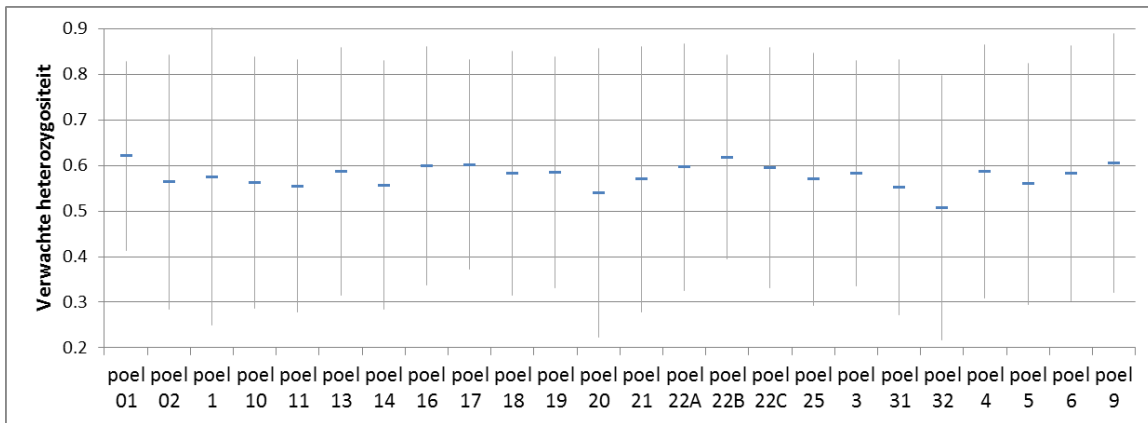




Figuur 18. Spatiale autocorrelatie van genetische verwantschap en geografische afstand voor (a) de totale dataset en (b) de dataset zonder broers/zussen.

Het IBD-patroon wordt dus hoogst waarschijnlijk bepaald door de gemiddelde dispersieafstand die heikikker aflegt binnen het Klein Schietveld. Hier lijkt dat rond 300m te liggen, al is er waarschijnlijk spatiale variatie door de omgeving, lokale dichtheden van individuen en door de ligging van de poelen (centraal of aan de periferie).

De genetische variatie verandert weinig na verwijdering van de broers/zussen. Ze is bovendien gelijkaardig in alle poelen ($H_o = 0,51 - 0,66$; $H_e = 0,51 - 0,62$ (Figuur 19); $A_r = 3,1 - 3,7$). Hoewel F_{is} varieert van -0,09 tot 0,13 is ze nergens significant verschillend van nul. Hoewel we hier grotendeels ander microsatellieten gebruiken, lijken de waarden van genetische variatie gelijkaardig aan deze in andere populaties (bijv. Arens et al., 2007).



Figuur 19 Verwachte heterozygositeit (gendiversiteit) ± standaarddeviatie per poel.

Zoals eerder vermeld kunnen een abnormaal aantal broers/zussen in de steekproef een effect hebben op de schattingen, ook op N_b . Soms wordt aangeraden om die stalen van broers/zussen te verwijderen, maar uit recent onderzoek lijkt dit niet altijd tot de juiste resultaten te leiden (Waples & Anderson, 2017). Omdat we hier telkens twee eitjes per legsel hebben bemonsterd en er dus een dominantie aan één of enkele families niet mogelijk is, hebben we voor de schattingen van N_b alle stalen behouden.

Het effectief aantal ouders werd per poel maar ook over de hele dataset heen bepaald (Tabel 2). In enkele gevallen kon geen eindelijk betrouwbaarheidsinterval bekomen worden voor de schattingen. Dit is vooral wanneer de staalgrootte laag is. Als we een som nemen van de schattingen per poel, dan liggen de totalen dicht bij elkaar en relatief dicht bij de schatting van N_b met de verwantschapsmethode voor de totale populatie. De LD-schatting van N_b voor de totale populatie ligt beduidend lager (409 na aanpassing). Omdat er IBD aanwezig is in de populatie, kan de geschatte N_b gebaseerde op de gehele dataset een onderschatting zijn van de echte waarde door de aanwezigheid van mixture-LD wanneer je staalname meerdere nabuurschappen bevat (Neel et al., 2013; Waples & England, 2011). Met een genetische nabuurschap bedoelen we hier een groep van individuen die sterk interageren. Hier bleek sterke interactie of verwantschap aanwezig te zijn binnen een afstand van ongeveer 300 m.

De schattingen van N_b via de verwantschapsmethode zullen daarentegen steeds blijven stijgen naarmate meer legsels bemonsterd worden. Zo is gebleken dat de schattingen van N_b met de verwantschapsmethode vooral dicht bij de echte waarde ligt als het aantal stalen de werkelijke N_b benaderd of overstijgt (Ackerman et al., 2017). We hebben niet alle legsels bemonsterd, laat staan alle poelen. Op basis van de getelde legsels zouden we een totaal aantal van c. 725 legsels van heikikker geteld hebben. De verhouding tussen aantal moeders en vaders bleek gemiddeld 0,41 te zijn per poel. Wanneer we over de totale populatie heen kijken, ligt deze ratio op 0,59. Als we bijgevolg een gemiddelde ratio van 0,5 nemen, zouden er minstens 1450 reproducerende adulten aanwezig zijn geweest in Klein Schietveld in 2017.



Tabel 2 Schattingen van effectief aantal ouders (N_b) volgens twee methodes: de linkage disequilibriummethode (LD) en de verwantschapsmethode met bijhorende betrouwbaarheidsintervallen tussen haakjes. De aangepaste waarde van N_b LD is $N_{b \text{ adjust}}$. Het aantal ouders bepaald met COLONY wordt gegeven. Door het aantal bemonsterde legsels (dus het aantal moeders) te delen door het aantal ouders, kan de verhouding moeders/vaders berekend worden.

Poel-code	N_b LD	$N_{b \text{ adjust}}$	N_b verwantschap	Aantal ouders	Aantal eilegels	Moeders/vaders
01	16,1 (10,3-28)	17,3	26 (14-52)	28	13	0,46
02	6,4 (2,4-32,7)	6,9	7 (2-41)	7	3	0,43
1	2,9 (2,1-6,9)	3,1	10 (4- ∞)	7	3	0,43
10	31,8 (21,7-51,5)	34,1	29 (17-54)	42	17	0,4
11	24,6 (16,8-40,2)	26,4	15 (7-34)	30	12	0,4
13	29,8 (20,9-46,1)	32	31 (18-55)	43	16	0,37
14	22,3 (14,7-37,7)	23,9	24 (13-47)	38	14	0,37
16	21 (12,9-41,6)	22,5	18 (10-39)	26	10	0,38
17	8,2 (5,2-13)	8,8	17 (9-39)	17	7	0,41
18	54 (40,7-74,1)	58	95 (69-129)	112	50	0,45
19	48,7 (31,5-88,6)	52,3	33 (20-56)	57	21	0,37
20	2,8 (2-7)	3	9 (4-28)	10	4	0,4
21	15 (9,5-26,5)	16,1	17 (8-41)	20	8	0,4
22A	55,7 (31,1-172,2)	59,8	19 (10-39)	33	12	0,36
22B	31 (22-47,1)	33,3	29 (17-51)	37	16	0,43
22C	18,5 (13,2-27,2)	19,9	36 (20-71)	38	15	0,39
25	41,6 (32,3-55,8)	44,6	45 (29-69)	58	25	0,43
3	19,6 (12,7-33,6)	21	28 (14-60)	34	14	0,41
31	34,8 (23,3-58,1)	37,3	38 (24-64)	42	18	0,43
32	16,9 (3,8- ∞)	18,1	5 (2-32)	8	3	0,38
4	40,3 (24,5-80,5)	43,3	41 (26-68)	55	21	0,38
5	38,3 (18,3-278,8)	41,1	12 (6-28)	26	9	0,35
6	75,4 (50,2-128,2)	80,9	64 (46-95)	91	41	0,45
7	21,2 (15,6-30,3)	22,8	22 (12-43)	27	13	0,48
Som	676,9	726,5	670		Gemidd.	0,41
KS	381,3 (290,1-519,1)	409,2	615 (541-691)	619	365	0,59

Om N_b te benutten als monitoringstool, zouden we om praktische redenen het aantal stalen moeten kunnen reduceren. Met de verwantschapsmethode zou dit echter leiden tot onderschatte waarden enerzijds, met de LD methode tot schattingen nog steeds beïnvloed door mixture-LD anderzijds. De optie om volwassen dieren van verschillende leeftijden te bemonsteren voor een schatting van generationele effectieve populatiegrootte moet nog onderzocht worden voor deze soort. Niettemin zal je ook daar mogelijk een effect ondervinden van mixture-LD op de schatting. Eventueel kunnen temporele methodes additionele schattingen van N_e geven.

Er werden geen modellen bekomen met significante covariaten die het aantal gedetecteerde eDNA-genkopieën/ μ l konden verklaren. Er is met andere woorden geen duidelijke link tussen het aantal genkopieën en het aantal reproducerende adulten. Dit aantal werd immers afgeleid van het aantal eilegels van heikikker en daarmee kon ook geen significant verband gevonden



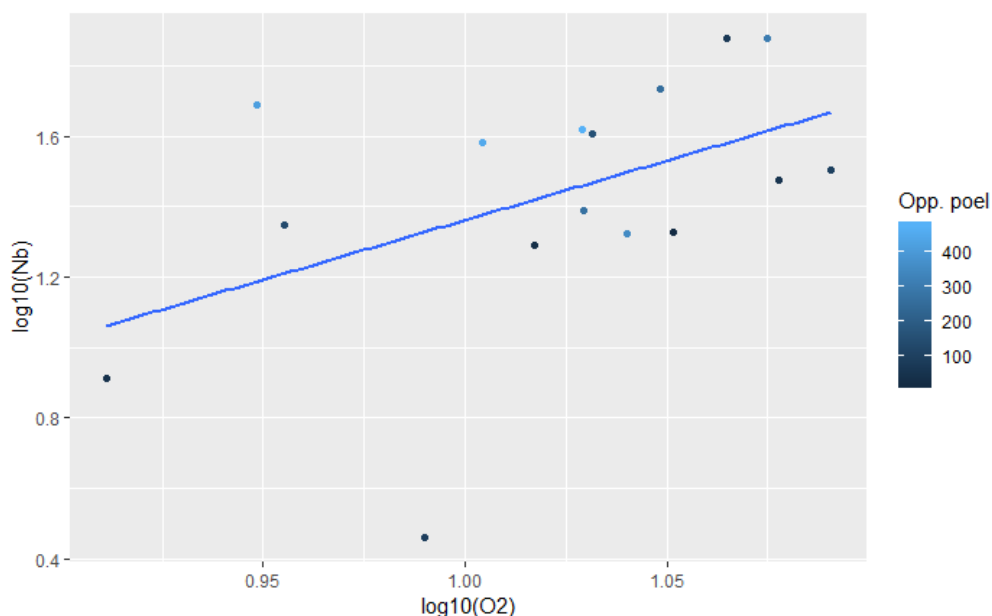
worden (zie 3.2.3 en Figuur 15), zelfs niet met inbegrip van de poeloppervlakte in het model. Deze laatste is mogelijk niet nauwkeurig genoeg, want vele poelen waren moeilijk te identificeren op luchtfoto en bleken op terrein soms in verbinding te staan met andere wateren bij een stijgend waterpeil. Bovendien leggen heikikkers vaak bij voorkeur eitjes in (vanuit de lucht slecht zichtbare) ondiepe, grasrijke zones af.

Met N_b (LD schatting) als responsvariabele leek zuurstofgehalte van belang (AIC= 25,14; Tabel 3, Figuur 20). Ook de oppervlakte van de poel zat nog in het model, maar was net niet significant. De outlier in Figuur 20 wordt veroorzaakt door het lage aantal eilegels van heikikker (3). Voor de N_b schattingen met de verwantschapsmethode kwam het model met het zuurstofgehalte als verklarende variabele als beste uit de bus, maar dan met een net niet-significante coëfficiënt ($P = 0,0833$).

Het aantal eilegels van heikikker per poel is natuurlijk sterk gecorreleerd met de schattingen van N_b . Het is dus mogelijk dat zuurstofrijkere poelen worden verkozen voor ovipositie door heikikkervrouwtjes (Pintar & Jr, 2017).

Tabel 3 Modelsamenvatting van het glm met $\log_{10}(N_b)$ als responsvariabele.

	Waarde	S.E.	t-waarde	P
Intercept	-2,438684	1,5393259	-1,584254	0,1372
log10(O2)	3,595641	1,4940956	2,406567	0,0317
Opp. poel	0,000984	0,0004682	2,100860	0,0557



Figuur 20 Visualisatie van het GLM model met het briggse logaritme van de LD schattingen van het effectief aantal ouders als respons. De voorspelde waarden worden weergegeven door de rechte. Het logaritme van de zuurstofconcentratie wordt weergegeven op de x-as en de oppervlakte van de poelen in kleurschakering van donker- naar lichtblauw (van klein naar groot).

4 CONCLUSIES

Uit het uitgevoerde onderzoek blijkt dat we via eDNA-analysen de aanwezigheid van zowel heikikker als bruine kikker in een waterpartij eenduidig kunnen aantonen. Het temporele eDNA-patroon vertoont hierbij een sterke piek vroeg in het voorjaar (eind maart – begin april), die voor beide soorten sterk overlappend is. Dit is dan ook de beste periode om in ongekende systemen via eDNA na te gaan of de soorten er al dan niet aanwezig zouden zijn.

Om een idee te bekomen van de verhouding heikikker versus bruine kikker eilegels op locaties waar er zich natuurlijke afzet van eitjes voordoet, noodzakelijk voor een adequate inschatting van de populatiegroottes van heikikker, blijkt dat een indirecte benadering via eDNA uit het omliggende water voor deze doelstelling een omslachtige en weinig accurate methode is. Een veel efficiëntere manier bestaat erin om van elk eilegsel 1 eitje te bemonsteren deze te mengen tot één staal per waterpartij, en op het DNA extract (afkomstig van dit mengstaal) een (ddPCR) meting te doen van de concentratie DNA-moleculen van heikikker versus bruine kikker. Dit onderzoek heeft namelijk aangetoond dat de proportionele verhouding van deze concentraties een nagenoeg exacte weerspiegeling is van het aandeel heikikker- versus bruine kikkereitjes. Ook de individuele soortidentificatie van elk eitje afzonderlijk via de RFLP-methode is erg nauwkeurig, maar uiteraard veel arbeidsintensiever en ook qua analysekost duidelijk duurder aangezien alle eitjes in het veld afzonderlijk dienen opgeslagen te worden en verder afzonderlijk dienen te worden geanalyseerd in het labo. Voor zowel de RFLP-methode per eitje als de ddPCR-methode op een mengstaal van eitjes moet een representatieve steekproef van de legfels genomen worden om een degelijke uitspraak te kunnen maken over de verhouding tussen de soorten binnen een poel.

De genetische merkers zijn hier samengesteld om verder op een routineuze wijze te gebruiken voor de genetische monitoring van Vlaamse heikikkerpopulaties. Ze blijken variabel genoeg om ook een enkele populatie genetisch te karakteriseren. Klein Schietveld bevat zoals verwacht een gezonde heikikkerpopulatie met een relatief hoge genetische variatie en een groot aantal effectieve ouders voor het jaar 2017. Ook al kan dat aantal in de tijd variëren, het lijkt groot genoeg om jaren van mindere reproductie op te vangen. Hoe het zit met de overleving van de larven werd hier niet onderzocht. De populatie in het Klein Schietveld lijkt op basis van waarnemingen een eerder geïsoleerde populatie, maar ook dat kan enkel besloten worden na onderzoek van omringende populaties. Dezelfde merkers kunnen benut worden om connectiviteit te onderzoeken.

Voor genetische monitoring van heikikkerpopulaties zijn de maten voor genetische variatie hier gebruikt, zoals verwachte heterozygositeit, zeker nuttig en bruikbaar ook wanneer de staalname minder dekkend zou gebeuren. Uit onze analyses blijkt immers dat die parameters niet sterk variëren per poel binnen een populatie waar voornamelijk IBD de spatiale structuur bepaalt (ofwel geografische afstand) en voor het overige de poelen gelegen zijn in goed verbonden habitat. Dus ook bij bemonstering van een selectie van poelen zouden we dezelfde waarden verkregen hebben. Voor het effectief aantal ouders lijkt dit anders te liggen en zal (samen met het gebruik van generationele effectieve populatiegrootte) verder onderzocht moeten worden.



5 REFERENTIES

- Ackerman M.W., Hand B.K., Waples R.K., Luikart G., Waples R.S., Steele C.A., Garner B.A., McCane J., Campbell M.R. (2017). Effective number of breeders from sibship reconstruction: empirical evaluations using hatchery steelhead. *Evol Appl* 10(2):146-160.
- Arens P., van der Sluis T., van't Westende W.P.C., Vosman B., Vos C.C., Smulders M.J.M. (2007). Genetic population differentiation and connectivity among fragmented Moor frog (*Rana arvalis*) populations in The Netherlands. *Landscape Ecol* 22(10):1489-1500.
- Berlin S., Merilä J., Ellegren H. (2000). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the common frog, *Rana temporaria*. *Mol Ecol* 9(11):1938-1939.
- De Bruyn L., Speybroeck J., Maes D., De Knijf G., Onkelinx T., Piesschaert F., Pollet M., Van Calster H., Westra T., Quataert P. (2015). Monitoringsprotocol Amphibia: kikkers en padden. INBO.R.2015.11336466.
- Dempster A.P., Laird N.M., Rubin D.B. (1977). Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J Roy Stat Soc B Met*:1-38.
- Do C., Waples R.S., Peel D., Macbeth G.M., Tillett B.J., Ovenden J.R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Mol Ecol Resour* 14(1):209-214.
- Garner T.W.J., Tomio G. (2001). Microsatellites for use in studies of the Italian Agile Frog, *Rana latastei* (Boulenger). *Conserv Genet* 2(1):77-80.
- Goudet J. (2005). hierfstat, a package for r to compute and test hierarchical F-statistics. *Mol Ecol Notes* 5(1):184-186.
- Hardy O.J., Vekemans X. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2(4):618-620.
- Ishchenko V.G. Growth of brown frogs of fauna of Russia: some problems of study of growth in amphibians. In: N. A., Tsinenko O., (editors); (2005) August 12-16 2003; St. Petersburg, Russia. *Russ J Herpetol.* p 153-157.
- Johnson P.C.D., Haydon D.T. (2007a). Maximum-likelihood estimation of allelic dropout and false allele error rates from microsatellite genotypes in the absence of reference data. *Genetics* 175(2):827-842.
- Johnson P.C.D., Haydon D.T. (2007b). Software for quantifying and simulating microsatellite genotyping error. *Bioinform Biol Insights* 1:71-75.
- Jombart T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24(11):1403-1405.
- Jones O.R., Wang J. (2010). COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol Ecol Resour* 10(3):551-555.
- Kalinowski S., Taper M. (2006). Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conserv Genet* 7(6):991-995.
- Keenan K., McGinnity P., Cross T.F., Crozier W.W., Prodöhl P.A. (2013). diveRsity: an R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods Ecol Evol* 4(8):782-788.
- Kovar R., Brabec M., Bocek R., Vita R. (2009). Spring migration distances of some Central European amphibian species. *Amphibia-Reptilia* 30(3):367.
- Lardner B., Loman J. (2009). Does landscape and habitat limit the frogs *Rana arvalis* and *Rana temporaria* in agricultural landscapes? A field experiment. *Appl Herpetol* 6(3):227.
- Loman, J. (2002). Temperature, genetic and hydroperiod effects on metamorphosis of brown frogs *Rana arvalis* and *R. temporaria* in the field. *Journal of Zoology* 258: 115-129.

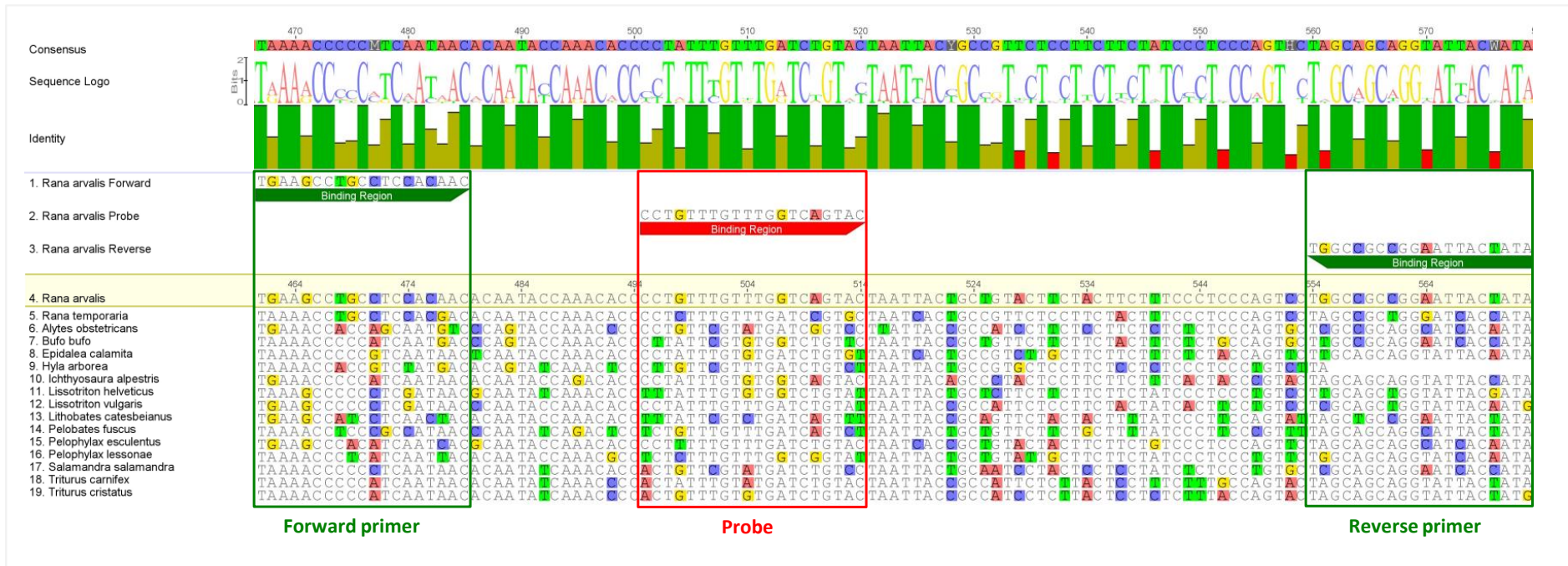
- Lynch M., Ritland K. (1999). Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152(4):1753-1766.
- Moran P.A.P. (1948). The interpretation of statistical maps. *J Roy Stat Soc B Met* 10(2):243-251.
- Moran P.A.P. (1950). Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika* 37(1/2):17-23.
- Naimi B., Hamm N.A.S., Groen T.A., Skidmore A.K., Toxopeus A.G. (2014). Where is positional uncertainty a problem for species distribution modelling? *Ecography* 37(2):191-203.
- Neel M.C., McKelvey K., Ryman N., Lloyd M.W., Short Bull R., Allendorf F.W., Schwartz M.K., Waples R.S. (2013). Estimation of effective population size in continuously distributed populations: there goes the neighborhood. *Heredity* 111(3):189-199.
- Palo J.U., Merilä J. (2003). A simple RFLP method for identification of two ranid frogs. *Conserv Genet* 4(6):801-803.
- Pidancier N., Gauthier P., Miquel C., Pompanon F. (2002). Polymorphic microsatellite DNA loci identified in the common frog (*Rana temporaria*, Amphibia, Ranidae). *Mol Ecol Notes* 2(3):304-305.
- Pinheiro J., Bates D., DebRoy S., Sarkar D., Team R.C. (2016). Linear and nonlinear mixed-effects models. R package version 3.1-127 ed.
- Pintar M.R., Jr W.J.R. (2017). Out with the old, in with the new: oviposition preference matches larval success in Cope's gray treefrog, *Hyla chrysoscelis*. *J Herpetol* 51(2):186-189.
- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rousset F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8(1):103-106.
- Rowe G., Beebee T.J.C. (2001). Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the common frog *Rana temporaria*. *Mol Ecol Notes* 1(1-2):6-7.
- Söderman F. (2006). Comparative population ecology in moor frogs with particular reference to acidity. Uppsala: Acta Universitatis Upsalensis.
- Spens J., Evans A.R., Halfmaerten D., Knudsen S.W., Sengupta M.E., Mak S.S.T., Sigsgaard E.E., Hellström M. (2017) Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8: 635-645.
- Vos C.C., Jong A.D., Goedhart P., Smulders M. (2001). Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). *Heredity* 86(5):598-608.
- Wang J. (2011). COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Mol Ecol Resour* 11(1):141-145.
- Waples R.S., Anderson E.C. (2017). Purging putative siblings from population genetic data sets: a cautionary view. *Mol Ecol* 26(5):1211-1224.
- Waples R.S., Antao T., Luikart G. (2014). Effects of overlapping generations on linkage disequilibrium estimates of effective population size. *Genetics* 197(2):769-780.
- Waples R.S., Do C. (2008). LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol Ecol Resour* 8(4):753-756.
- Waples R.S., England P.R. (2011). Estimating contemporary effective population size on the basis of linkage disequilibrium in the face of migration. *Genetics* 189(2):633-644.
- Weir B.S., Cockerham C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38(6):1358-1370.



6 BIJLAGEN

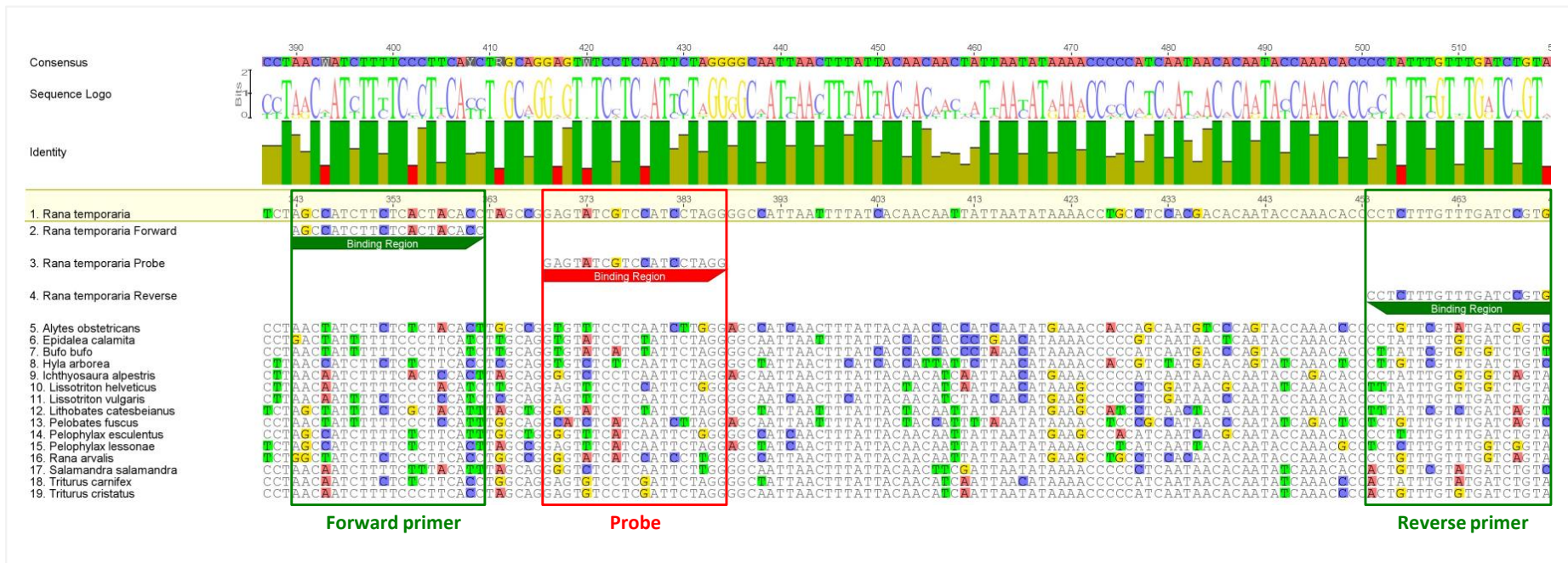
Bijlage 1

Schematisch overzicht van de positie van de primers en probe voor amplificatie van heikikker (*Rana arvalis*) DNA op het COI fragment, met de respectievelijke forward en reverse primer (donkergroen), en de locatie van de regio waarop de probe bindt (rood), t.o.v. andere amfibiesoorten die in Vlaanderen kunnen worden aangetroffen.



Bijlage 2

Schematisch overzicht van de positie van de primers en probe voor amplificatie van bruine kikker (*Rana temporaria*) DNA op het COI-fragment, met de respectievelijke forward en reverse primer (donkergroen), en de locatie van de regio waarop de probe bindt (rood), t.o.v. een heel aantal andere amfibiesoorten die in Vlaanderen kunnen worden aangetroffen.



Bijlage 3

Informatie over de gebruikte microsatellietmerkers.

Naam merker	Multiplexnr.	Fluorescent label	Volume (μ l)	Originele bron/ GenBank acc. nr.
RCIDII	1	PET	0,2	(Vos et al., 2001)
RNTYR2	1	PET	0,6	(Vos et al., 2001)
RA14	1	NED	0,2	EU871714
RtsB14	1	VIC	0,2	(Berlin et al., 2000)
RlatCa41	1	FAM	0,2	(Garner & Tomio, 2001)
RECALQ	1	PET	0,2	(Vos et al., 2001)
RC08604	1	FAM	0,4	(Vos et al., 2001)
RRD590	2	NED	0,2	(Vos et al., 2001)
RlatCa18	2	VIC	0,2	(Garner & Tomio, 2001)
Rtemp μ 9	2	FAM	0,05	(Rowe & Beebee, 2001)
RA11	2	PET	0,2	EU871712
Rt2Ca2-22	2	FAM	0,2	(T. Garner, niet gepubliceerd)
Rt μ P	2	NED	0,2	(Pidancier et al., 2002)
Rtemp μ 4	2	NED	0,05	(Rowe & Beebee, 2001)
Rtemp μ 5	2	PET	0,4	(Rowe & Beebee, 2001)
RA03	2	FAM	0,4	EU871710
RA04	2	VIC	0,2	EU871711
RA13	3 (simplex)	VIC	0,4	EU871713
RtU4	4 (simplex)	FAM	0,4	(Berlin et al., 2000)

N.B.: de primers werden verdund volgens volgend recept: 10 μ l forward primer + 2,5 μ l reverse primer + 37,5 μ l ultra-puur water.

