



Vlaanderen
is wetenschap




Ex situ kweek van de vroedmeesterpad in Vlaanderen

i.o.v. Agentschap Natuur en Bos
LIFE14 IPE BE 002 BNIP

Johan Auwerx, Zoë De Corte, Joachim Mergeay, Bruno Picavet, Jeroen Speybroeck,
Loïc van Doorn, Niels Wagemaker

vlaanderen.be/inbo
vlaanderen.be/natuurenbos

Auteurs:

Johan Auwerx, Zoë De Corte, Joachim Mergeay , Bruno Picavet, Jeroen Speybroeck , Loïc van Doorn , Niels (C.A.M.) Wagemaker

Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Reviewers:

Daan Van Eenaeme

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 Linkebeek
Dwerboschstraat 28, 1630 Linkebeek
www.inbo.be

e-mail:

johan.auwerx@inbo.be

Wijze van citeren:

Auwerx J, De Corte Z, Mergeay J, Picavet B, Speybroeck J, van Doorn L, Wagemaker N (2021). Ex situ kweek van de vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) in Vlaanderen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2021 (32). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. DOI: doi.org/10.21436/inbor.39518999

D/2021/3241/202

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2021 (32)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Maurice Hoffmann

Foto cover:

Mannetje vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) met eitjes – © Jeroen Speybroeck

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:

Agentschap Natuur en Bos



Dit werk valt onder een [Creative Commons Naamsvermelding-GelijkDelen 4.0 Internationaal-licentie](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

EX SITU KWEEK VAN DE VROEDMEESTERPAD
(ALYTES OBSTETRICANS) IN VLAANDEREN
(2019-2021)

i.o.v. Agentschap Natuur en Bos - LIFE14 IPE BE 002 BNIP

Johan Auwerx, Zoë De Corte, Joachim Mergeay, Bruno Picavet, Jeroen Speybroeck, Loïc van Doorn, Niels (C.A.M.) Wagemaker

doi.org/10.21436/inbor.39518999

Dankwoord

We bedanken Dries Desloover, leidend ambtenaar voor ANB in deze opdracht, voor de fijne samenwerking en de leden van de stuurgroep voor hun positieve en constructieve bijdragen.

We bedanken Sam Van de Poel (Natuurpunt Studie), Thomas Vandenberghe (Natuurpunt afdeling Druivenstreek / Hyla werkgroep), Danny Zeevaert (ANB), Pim Lemmers (Bureau Natuurbalans Limes Divergens), Jöran Janse (RAVON), Jelger Herder (RAVON), Maarten Gilbert (RAVON), Pascal Dupriez (DEMNA) en Thierry Kinet (Natagora) voor hulp en ondersteuning bij het veldwerk en An Martel en Frank Pasmans (UGent) voor de analyse van de monsters met betrekking tot screening op ziektes.



Samenvatting voor beheer/beleid

Het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) voert een kweekprogramma vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) uit. We doen dit om de natuurdoelstellingen te realiseren en als onderdeel van het soortbeschermingsprogramma voor deze soort. Het doel is bestaande populaties te versterken (door bijplaatsing) en nieuwe populaties te stichten (door (her)introductie). We kiezen voor een ex situ kweek met gescheiden kweekgroepen, naar gelang hun geografische herkomst en genetische verwantschap. We hebben drie Vlaamse, twee Waalse en twee Nederlandse kweekgroepen. Om de genetische diversiteit en verwantschap te onderzoeken, werden diverse populaties in binnen- en buitenland (Nederland, Frankrijk, Duitsland) bemonsterd. Dankzij dit genetisch onderzoek kunnen we de in de kweek betrokken populaties goed onderscheiden. De genetische diversiteit van de populaties varieert aanzienlijk. De populatie van de Nederlandse ENCI-groeve vertoont de hoogste genetische diversiteit, maar de padden lijken af te stammen van buiten Noordwest-Europa.

We verwachten het eigenlijk uitzetbare kweekresultaat vanaf 2021. De uitzetstrategie en mate van menging van de verschillende kweekgroepen bij deze uitzet zitten in de vervolgopdracht (2021-2024).



English abstract

As part of the Flemish common midwife toad (*Alytes obstetricans*) species protection programme, the Research Institute for Nature and Forest (INBO) runs a breeding project. Goals are to sustain existing populations (through supplementation) and to found new populations (through (re)introduction). Ex situ breeding is conducted in several breeding groups, separated according to their geographical origin and genetic relationships. Wild populations in Belgium and abroad (Netherlands, France, Germany) were sampled for genetic analysis. Results of this analysis allowed adequate distinction of the different populations used in the ex situ breeding efforts. Genetic diversity differed significantly between populations. The Dutch so-called ENCI population showed highest diversity, but seems to originate from outside of north-western Europe. First actual produce of the breeding programme is to be expected from 2021 onwards. Three Flemish, two Walloon and two Dutch breeding groups are kept separately. Development of a release strategy and the degree of mixing of the different breeding groups will be part of the subsequent, second project (2021-2024).



Inhoudstafel

1	Beschrijving van het project.....	6
2	Kweekprogramma.....	8
2.1	Aantallen en herkomst	8
2.2	Bioveiligheidsprotocol	10
2.3	Kweek	10
2.3.1	Huisvesting	11
2.3.2	Voeding	13
2.4	Metamorfose	14
2.5	Bijplaatsing 2019	14
2.6	Kweekgroepen	15
3	Genetisch diversiteit en structuur.....	17
3.1	Materiaal en methoden	17
3.2	Dataverwerking	17
3.2.1	Ruwe DNA-reads	17
3.2.2	Genetische diversiteit	19
3.2.3	Genetische structuur	19
3.2.4	Toewijzingen	19
3.3	Resultaten	20
3.3.1	Diversiteit	20
3.3.2	Ordinaties	21
3.3.3	Toewijzingen	23
3.4	Relevantie voor het kweekprogramma	25
4	Vervolgproject.....	26
5	Referenties.....	27



De gewestelijke instandhoudingsdoelstellingen beogen het realiseren van 20 populaties met minstens 200 roepende dieren (Lommaert et al., 2020). De opdracht stelt zich tot doel de helft van deze populaties aan te pakken. Deels wordt hiertoe bijplaatsing in bestaande populaties gekozen, deels ontwikkelen van nieuwe populaties in geschikt leefgebied.

We verwijzen voor het plan van aanpak naar het verslag van de eerste stuurgroepvergadering (3 april 2019) en de op dat moment door INBO getoonde slides, waarbij in geval van verschilpunten het verslag als geldend dient te worden beschouwd. Daarin staat het plan van aanpak voor verzamelen, kweken en uitzetten alsook de bijhorende planning toegelicht.

De in het bestek vooropgestelde aanpak bestond erin jaarlijks larven te verzamelen, die in INBO Linkebeek optimaal te laten opgroeien en tenslotte grote larven (met poten) en/of metamorfen uit te zetten op de doellocaties. Met goedkeuring van opdrachtgever en stuurgroep werd hiervan afgeweken. Er werd gekozen om slechts éénmalig larven te verzamelen in 2019 om hieruit adulte dieren te bekomen waarmee een volledige kweek wordt opgezet, inclusief huisvesting van adulte dieren.



2 KWEEKPROGRAMMA

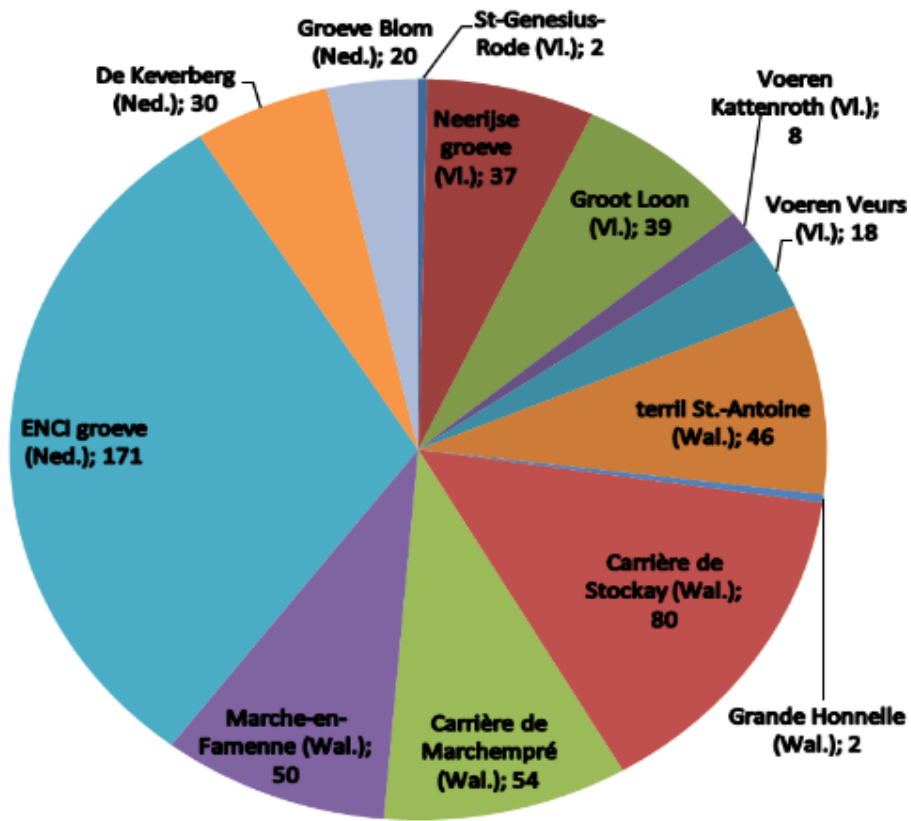
2.1 AANTALLEN EN HERKOMST

De actuele situatie van de Vlaamse populaties van de vroedmeesterpad is zeer ongunstig, zowel naar populatiegroottes als naar genetische diversiteit, waardoor deze maar zeer beperkt kunnen worden gebruikt als bronpopulaties om larven uit te oogsten. Om bijkomende larven in het kweekprogramma te kunnen betrekken uit nabijgelegen, robuustere populaties, werden de nodige vergunningen aangevraagd bij de Waalse en Nederlandse autoriteiten.



Figuur 2-1 Herkomstlocaties van de voor de kweek verzamelde larven van vroedmeesterpad.

In de maanden juni en juli 2019 werden in de 13 verschillende herkomstgebieden voortplantingspoelen van de vroedmeesterpad gesampeld op larven (Figuur 2-1). Om een goede genetische samenstelling van de toekomstige kweekgroepen te bekomen, werd getracht om uit elk gebied 30 larven te betrekken. Dit bleek bij meerdere bronpopulaties niet haalbaar (cf. Figuur 2-2). Per locatie werden larven van verschillende leeftijden ingezameld om maximale genetische variatie te verkrijgen. Veelal werd een variabel overschot aan larven verzameld omdat rekening gehouden werd met mogelijke mortaliteit. In totaal werden tijdens deze vangstrondes 557 larven verzameld en overgebracht naar het kweekcentrum in Linkebeek.



Figuur 2-2 Aantal verzamelde larven per herkomstlocatie.



Figuur 2-3 Inzameling van vroedmeesterpadlarven, Terril Saint-Antoine, juni 2019.



Het gros van de larven werd ingezameld in 2019. Enkel in Groot-Loon en de Voerstreek werden aanvullende larven verzameld in 2020 om een voldoende grote kweekgroep te bekomen.

2.2 BIOVEILIGHEIDSPROTOCOL

Wereldwijd hebben ziekten een grote impact op wilde amfibieënpopulaties. Bij kweekprojecten is het daarom van het grootste belang dat de kweekdieren gezond blijven en dat de kweekdieren geen vector worden voor ziekten naar wilde populaties.

Om de kans op besmetting te minimaliseren wordt een streng hygiëneprotocol gehandhaafd. Bij de aankomst van de larven in het onderzoekscentrum worden deze ondergebracht in een aparte quarantaineruimte en vervolgens behandeld tegen mogelijke besmettelijke virussen, schimmels en/of bacteriën. Ze ondergaan een bad met het krachtige antimycoticum Voriconazol (1.25 mg/liter) en de watertemperatuur wordt gedurende 10 dagen boven 25°C gebracht.

Dieren van verschillende origine worden apart gehuisvest en de gekweekte dieren komen niet in contact met wilde amfibieën. De medewerkers van het INBO beperken de kans op contaminatie tussen verschillende terraria, door handen en materiaal te ontsmetten na elke handeling. Zie bioveiligheidsprotocol van ANB - https://www.natuurenbos.be/sites/default/files/inserted-files/2015-bioveiligheid_bd_bs_r_amfibie.pdf.

Alle verdachte dode dieren van het kweekprogramma worden ingevroren en overgebracht voor verder onderzoek bij de Faculteit Diergeneeskunde van de UGent te Merelbeke. Dertien dode dieren worden onderzocht en negatief getest voor Batrachochytrium dendrobatidis en Ranavirose.

Vooraleer tot een uitzet wordt overgegaan worden de dieren nogmaals gescreend op besmettelijke ziekten.

2.3 KWEEK

De opgroei en kweek van de vroedmeesterpadden wordt uitgevoerd in het onderzoekscentrum voor aquatische fauna te Linkebeek. In deze vestiging van het INBO zijn de faciliteiten en kennis aanwezig om het project uit te voeren. Bovendien beschikt de kwekerij over eigen bronwater en ligt ze vrij geïsoleerd, waardoor er een verminderde kans is op contaminaties.



2.3.1 Huisvesting



Figuur 2-4 Larven worden tot aan de metamorfose in 12 liter-bassins gehouden.

Het opkweken van de larven gebeurt bij voorkeur in kleine bassins (12 liter) op een hoge temperatuur (20 tot 25°C) met een dichtheid van maximaal 5 larven/liter. Het water (leidingwater of bronwater) wordt belucht en regelmatig ververs. Larven van eenzelfde herkomstlocatie werden samen opgekweekt tot metamorfen om deze te kunnen opvolgen en gericht genetische lijnen te kunnen uitzetten.

De geregistreerde sterfte tijdens de larvale fase bleef beperkt tot 6%.

De metamorfose is een precaire fase in de ontwikkeling van amfibieën.

Vroedmeesterpadlarven die volgroeide voor- en achterpoten hebben worden overgebracht naar 'uitsluiterraria', waar ze met een verlaagde waterstand en voldoende schuilmogelijkheden de ontwikkeling tot jonge vroedmeesterpadden ongestoord kunnen voltooien. Hierna worden ze in tijdelijke opgroeiterraria geplaatst, gelijkaardig aan de binnen- en buiterterraria, maar makkelijker controleerbaar omdat ze kleiner zijn.

De huisvesting van juveniele en adulte vroedmeesterpadden staat in het teken van hun ecologie. De soort komt aan de noordgrens van haar areaal voor in warme, open microhabitats. Om dit na te bootsen worden de padden in droge terraria met fijnkorrelig zand gehuisvest. De individuen graven zelf gangen in het substraat en creëren hiermee ook vochtgradiënten. Een bak water is altijd aanwezig in het terrarium. Dit water wordt meerdere malen per week ververs.

Om de dieren onder gecontroleerde omstandigheden op te laten groeien, werden de kweekgroepen in 2019 en 2020 apart gehuisvest in een afsluitbare loods in binnenterraria. Tijdens deze fase is het belangrijk de dieren goed op te volgen. Dieren die merkelijk trager groeiden werden tijdens de winter van 2019-2020 apart geplaatst in een warmere omgeving om een snellere groei te promoten.

In 2021 worden de kweekgroepen overgeplaatst naar buiterterraria. De buiterterraria worden gebruikt om het natuurlijke seizoenaal verloop te repliceren. De terraria zijn specifiek voor de kweek van de vroedmeesterpad ontworpen en geplaatst. Ze zijn zuidwestwaarts georiënteerd om gebruik te maken van de namiddagzon en het warme microklimaat. Ze zijn onderaan en bovenaan afgesloten om het indringen van andere diersoorten te voorkomen, tegelijkertijd laten de afsluitingen wel (regen)water door, zodat een optimale vochthuishouding nagestreefd wordt.



Figuur 2-5 Uitsluiterraria per kweekgroep. Om stress te beperken wordt een beperkt aantal dieren samen geplaatst.





Bij de inrichting van de buitenterraria (Figuur 2-6) is getracht een temperatuur- en vochtgradiënt aan te brengen. Reliëf is gecreëerd door fijn zand in te brengen. In het zand zijn verschillende holtes aangebracht waar de dieren zich kunnen verstoppen. Water voor de afzet van de larven is uitneembaar voorzien, wat het oogsten en controleren van de larven vergemakkelijkt.

De terraria worden dagelijks bekeken. Uitwerpselen worden individueel via 'spot cleaning' verwijderd en de bakken worden om de paar maanden volledig verschoond. Om het gedrag van de vroedmeesterpadden te monitoren wordt ook verschillende keren per week na zonsondergang in de bakken gekeken. Op deze momenten zijn de dieren actief en kunnen ze eenvoudig gecontroleerd worden.

Figuur 2-6 Buitenterrarium met inrichting die rekening houdt met ecologische vereisten van de vroedmeesterpad.



2.3.2 Voeding

De dieren worden ad libitum gevoed. De larven worden gevoerd met geblancheerde andijvie en courgette van biologische oorsprong. Ook krijgen ze algenflakes en diepgevroren rode muggenlarven toegediend. Na de metamorfose van de larven wordt overgestapt op een



Figuur 2-7 Voeren van de kweekgroep met behulp van voedingsbakjes, waarbij de conditie van de dieren opgevolgd kan worden.

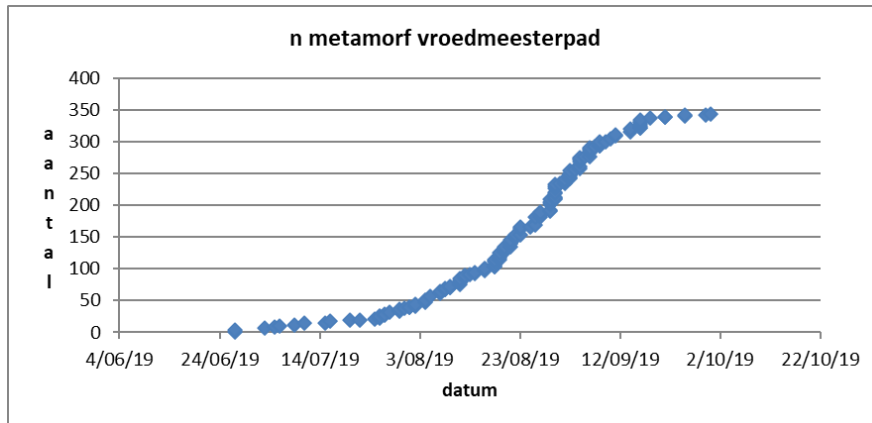
gemengd dieet van springstaarten (*Collembola*), fruitvliegen (*Drosophila melanogaster*) en krekels (*Acheta domesticus*). Jonge vroedmeesterpadden groeien snel en eten navenant. Vanaf dat de dieren een gewicht van twee gram bereikt hebben worden ze uit kleinere opgroeibakken naar de binnenterraria overgeplaatst.

Hier krijgen ze hoofdzakelijk kleine stadia kakkerlakken (*Shelfordella lateralis*) en grotere stadia krekels. De voedseldieren worden telkens

met een met calcium aangerijkt vitaminepoeder gemengd om een optimale voedingswaarde voor de groeiende dieren te verkrijgen. In de terraria worden de dieren gevoed met behulp van porseleinen voedingsbakjes, wat toelaat de voedselopname te monitoren voor de verschillende kweekgroepen (Figuur 2-7).

2.4 METAMORFOSE

Het moment waarop de jonge dieren aan land gaan werd geregistreerd voor alle larven van elk van de 13 bronpopulaties. Opvallend zijn de 19 metamorfen die reeds in juli aan land gaan. Deze eerste dieren zijn overwinterende larven die door hun grootte zich reeds bij de inzameling lieten herkennen als dieren van een oudere cohorte. Bij vroedmeesterpad komt overwintering van larven frequent voor, deze larven metamorfoserend in het volgende jaar.

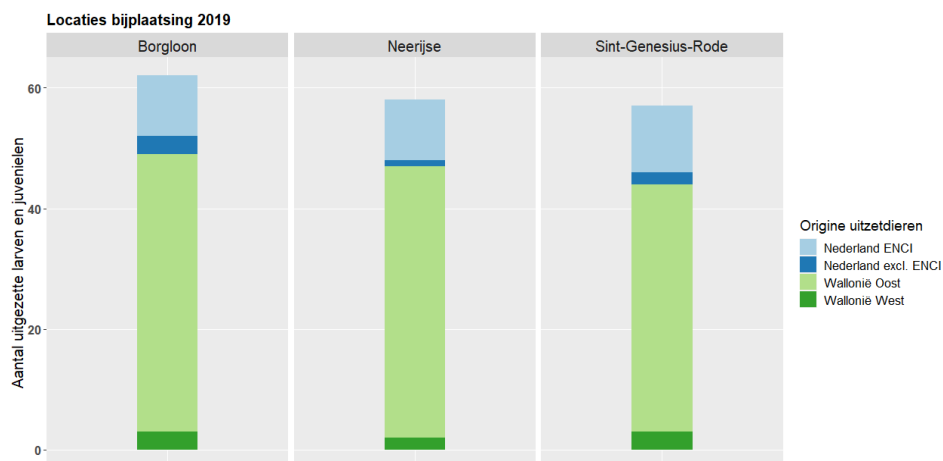


Figuur 2-8 Cumulatief verloop van de metamorfose, als groeiend aantal post-metamorfe dieren.

Het merendeel van de dieren (85%) ging aan land tussen 25 juli en 10 september. Door de dalende watertemperaturen zijn nadien nog slechts 33 dieren aan land gegaan. Na begin oktober zijn er geen dieren meer gemetamorfoseerd.

2.5 BIJPLAATSING 2019

In de herfst van 2019 werd het surplus van de verzamelde larven uitgezet. 113 van de 557 verzamelde larven (20%) metamorfoseerden niet tijdig vóór de start van de winter. Vooral de larven uit de Waalse populaties (Marche-en-Famenne, Stockay en Marchempré) begonnen later aan hun metamorfose, waardoor er van deze kweekgroepen nog veel larven overbleven. Deze larven, aangevuld met juvenielen zijn uitgezet in drie Vlaamse populaties (Figuur 2-9).



Figuur 2-9 Verdeling van het aantal dieren (inzake herkomst en bestemming) van de eerste beperkte uitzet herfst 2019.

2.6 KWEEKGROEPEN

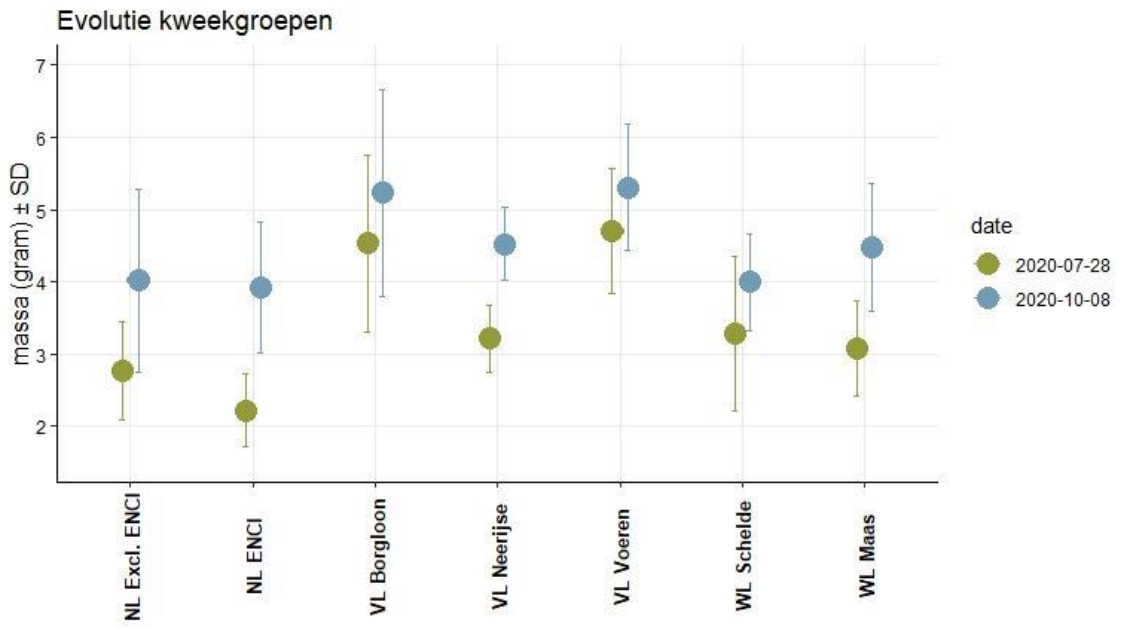
De kweekgroepen, samengesteld op basis van de genetische resultaten (zie hoofdstuk 3), werden apart gehuisvest (Tabel 2-1). De samenstelling van de genetische lijnen voor de uitzetlocaties is op deze manier eenvoudig zonder verdere genetische screening mogelijk. Genetische menging van verschillende herkomstgebieden gebeurt in situ bij de vorming van de volgende generatie.

De kweekgroepen zijn in 2020 verder doorgeroeid (Figuur 2-10) en naar verwachting zal dit in 2021 leiden tot de eerste nakomelingen. Vroedmeesterpadden worden geslachtsrijp bij een leeftijd van 2-3 jaar.

Mede op basis van het genetisch onderzoek (zie verder) werden de verschillende herkomstlocaties in de kwekerij gegroepeerd in 6 kweekgroepen. De dieren afkomstig van de ENCI-groeve in Nederland worden uit het kweekprogramma gehouden omdat twijfels bestaan over de herkomst van deze populatie (zie hoofdstuk 3).

Tabel 2-1 Samenstelling van de kweekgroepen.

Kweekgroep	Locatie	Ingezameld	2019		2020 Kweekdieren
			Uitgezet	Mortaliteit	
Vlaanderen Vlaams-Brabant	Sint-Genesius-Rode	2	47	0	20
	Neerijse	45			
Vlaanderen Borgloon	Groot loon	39	39	0	21
Vlaanderen Voerstreek	Voeren Kattenroth	8	62	0	16
	Voeren Veurs	54			
Wallonië West	Terril St. Antoine	46	48	8	13
	Grande Honelle	2			
Wallonië Oost	Carrière de Stockay	80	184	132	14
	Carrière de Marchempré	54			
	Marche-en-Famenne	50			
Nederland ENCI	ENCI groeve	171	171	31	76
Nederland excl. ENCI	Keверberg	30	60	7	16
	Groeve Blom	30			



Figuur 2-10 Massa van metamorfen van de verschillende herkomstgebieden.

3 GENETISCH DIVERSITEIT EN STRUCTUUR

3.1 MATERIAAL EN METHODEN

Larven van locaties uit België (Wallonië en Vlaanderen) en Nederland waar larven werden verzameld voor het kweekprogramma, werden gevangen met een schepnet en levend getransporteerd naar INBO te Linkebeek voor integratie in een kweekprogramma (Tabel 3-1). Daarnaast werden larven uit Duitsland, Nederland en Frankrijk die niet bijdroegen aan het kweekprogramma met een schepnet gevangen en ter plaatse verder behandeld (zie Tabel 2.1 in Lemmers et al. 2020). Van elk individu werd een staartpunt afgeknipt voor DNA-extractie (Lemmers et al. 2020). Hoewel het de bedoeling is om met deze staalnames een beeld te krijgen van de genetische diversiteit uit elk bemonsterd gebied, vonden we in sommige gebieden slechts in één enkele poel larven, en soms slechts een zeer laag aantal individuen. Voor algemene patronen van genetische diversiteit geeft een staalgrootte van 5 een redelijke inschatting, maar beter is om te streven naar 30.

Tabel 3-1 Overzicht bemonstering

locatie	provincie	datum	lat	lon	aantal
Groot-Loon	Limburg	25/06/2019	50.794	5.362	30
Voeren - Kattenroth	Limburg	25/06/2019	50.757	5.802	7
Voeren - Veurs	Limburg	25/06/2019	50.736	5.851	19
St Genesius Rode	Vl.-Brabant	26/06/2019	50.732	4.362	2
Terril St-Antoine	Henegouwen	04/07/2019	50.413	3.772	30
Grande Honnelle	Henegouwen	04/07/2019	50.342	3.726	2
Camp militaire de Marche-en-Famenne	Luxemburg	26/07/2019	50.290	5.371	30
Carrière de Stockay	Luik	26/07/2019	50.577	5.379	30
C. de Marchempré	Namen	31/07/2019	50.476	5.022	30

Genotypering gebeurde volgens de methode van Genotyping By Sequencing (Elshire et al. 2011). Het volledige protocol is beschreven in Lemmers et al. (2020).

3.2 DATAVERWERKING

3.2.1 Ruwe DNA-reads

Algemene kwaliteit van ruwe DNA-data werd beoordeeld met de FastQC software v0.11.5 (Andrew, 2010). Demultiplexing van de ruwe sequentiedata gebeurde met de process_radtags module in Stacks v 2.53 (Catchen et al., 2013; Catchen et al., 2011; Rochette et al., 2019). Fragmenten met ambigue barcodes, ambigue knipplaatsen of met lage scores voor kwaliteit werden verwijderd uit de dataset. PCR duplicaten werden verwijderd via de clone_filter module op basis van de wobble. DNA-stalen met minder dan 0.5 miljoen reads (N=42) werden verwijderd. SNPs werden geïdentificeerd met de denovo_map pipeline in Stacks, op basis van een minimum dekking van drie reads per stack (m = 3), een maximaal van 2 paarsgewijze

////////////////////////////////////

NOOR	14	Noorbeek	Nederland
PUTB	5	Putberg	Nederland
ROOT	12	Groeve 't Rooth	Nederland
SCHA	4	Schaelsberg	Nederland
STOC	28	Carrière de Stockay	België
TERR	28	Terril Saint-Antoine	België
UBAC	5	Ubachsberg-Zuid	Nederland
VEVE	19	Veursbos Voeren	België

3.2.2 Genetische diversiteit

Parameters van genetische diversiteit werden bepaald met behulp van R-programma's Adegenet (Jombart 2008) en Hierfstat (Goudet 2005). We bepaalden de proportie polymorfe loci (PPL), het gemiddelde aantal allelen per populatie (MNA), de verwachte heterozygositeit (H_e) en het daarvan afgeleide effectieve aantal allelen ($NEA=1/(1-H_e)$), en de gemiddelde individuele heterozygositeit (H_o). Omdat we hier werken met SNPs, die doorgaans maar 2 allelen per locus hebben, varieert het aantal allelen doorgaans maar tussen 1 en 2. Deze diversiteitsmaten geven allen complementaire informatie, en hebben een verschillende gevoeligheid voor een verschil in staalgrootte N. Bijvoorbeeld MNA is zeer gevoelig aan de staalgrootte, en is typisch nogal positief gecorreleerd met de staalgrootte N. NEA en H_o zijn daarentegen weinig gevoelig aan de staalgrootte. De waardes voor Genesius-Rode en Grande Honnelle (N=1 en N=2, respectievelijk) moeten dan ook in die context bekeken worden.

3.2.3 Genetische structuur

De relaties tussen individuen en populaties kunnen we weergeven aan de hand van ordinaties, die genetische afstanden tussen genotypes in een multidimensionele ruimte weergeven. Hiervoor berekenen we eerst paarsgewijze genetische afstanden tussen genotypes, die daarna aan een PCoA worden blootgesteld in Adegenet v. 2.1.3 (Jombart 2008). We maken vervolgens gebruik van een discriminant-analyse op de principale componenten (DAPC; Jombart et al. 2010) om een ordinatie te bekomen die de binnengroep-variantie minimaliseert en de tussen-groepvariantie maximaliseert. Het aantal te behouden PCo-assen (14) werd bepaald aan de hand van de a-score (Jombart et al. 2015). Groepen werden a priori bepaald aan de hand van de 32 bemonsterde sites.

3.2.4 Toewijzingen

Aan de hand van toewijzingen kunnen we nagaan hoe goed populaties van elkaar kunnen onderscheiden worden met de beschikbare genetische merkers. We maken hier gebruik van de GeneClass 2 (Piry et al. 2004), waarbij we het criterium gebruiken van Rannala & Mountain (1997) met een minimale allelfrequentie van 0.05. Hierbij worden individuen toegewezen aan alle mogelijke populaties. Aan de hand van de allelfrequenties van de populatie (uitgezonderd het ene individu dat moet worden toegewezen) wordt nagegaan bij welke populatie een bepaald genotype het best aansluit. Wanneer een staal slechts bestaat uit enkele individuen werkt deze methode uiteraard niet goed, omdat het staal geen goede weergave is van de werkelijke allelfrequenties.



3.3 RESULTATEN

3.3.1 Diversiteit

Voor de verschillende diversiteitsmaten valt onmiddellijk op dat ENCI-groeve met kop en schouders boven alle andere populaties uitsteekt: waar het gemiddelde aantal polymorfe loci 27.1% is, is dit bij ENCI-groeve 76.2%. De eerste met zekerheid inheemse populatie (Carrière de Marchempré) heeft een PPL van 44.5%. Ook Schaelsberg en Brenne (Fr) hebben een zeer hoge genetische diversiteit, gezien het kleine staal (N=4 en N=5). Van ENCI-groeve en Schaelsberg is geweten dat ze een uitheemse doch heel verschillende oorsprong hebben (Lemmers et al. 2020).

De grote, stabiele Waalse populaties uit de Maasvallei (Marchempré, Marche-en-Famenne, Stockay) zitten allen bovenaan het klassement voor alle diversiteitsparameters. De populatie van Groot-Loon is weliswaar niet zeer groot, maar heeft toch voor alle parameters een hoge diversiteit, vergelijkbaar met de grote Waalse Maasvalleipopulaties. De grote Henegouwse Waalse populatie (Terril St-Antoine, Scheldevallei) zit in de middenmoot.

Helemaal onderaan vinden we consistent de populatie Kattenroth terug. Deze populatie valt binnen dispersie-afstand van de verschillende poelen van Noorbeek en Mheer, net over de Nederlandse grens. Deze populaties zijn echter een stuk diverser. Ook onderaan vinden we enkele geïsoleerde en zeer kleine Zuid-Limburgse populaties terug: Eckelrad, Curfsgroeve, Gerendal, Kloosterbosch, ... Voor een meer gedetailleerd overzicht van de toestand van de Nederlandse populaties verwijzen we naar Lemmers et al. (2020), die een subset van deze data hebben geanalyseerd.

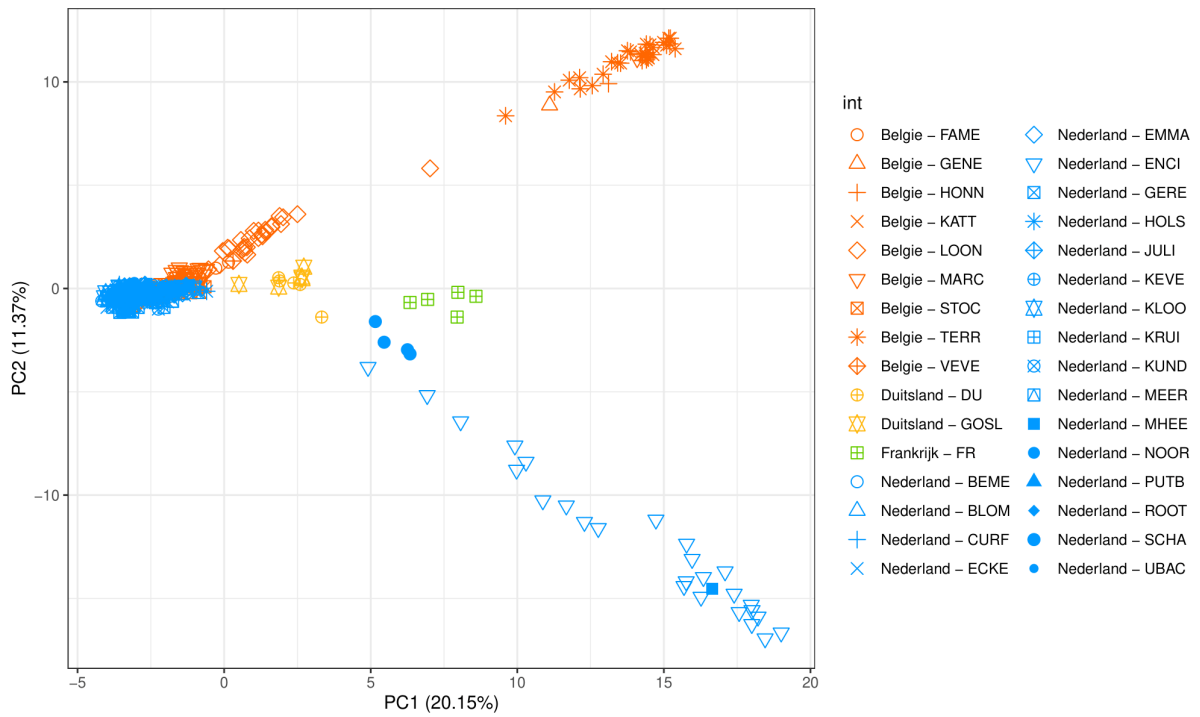
Tabel 3-3 Diversiteitsmaten in aflopende volgorde gesorteerd.

pop	PPL	pop	MNA	pop	NEA	pop	Ho
ENCI-groeve	0.762	ENCI-groeve	1.223	ENCI-groeve	1.288	ENCI-groeve	0.217
Mheer	0.513	Schaelsberg	1.189	Schaelsberg	1.237	Schaelsberg	0.170
C. de Marchempré	0.445	Brenne (F)	1.168	Brenne (F)	1.206	Brenne (F)	0.149
Schaelsberg	0.416	Mheer	1.130	Mheer	1.156	Mheer	0.121
Brenne (F)	0.413	Groot-Loon	1.113	Groot-Loon	1.128	Groot-Loon	0.111
Groot-Loon	0.407	C. de Marchempré	1.104	C. de Marchempré	1.116	C. de Marchempré	0.101
Marche-en-Famenne	0.361	Marche-en-Famenne	1.090	Marche-en-Famenne	1.099	Marche-en-Famenne	0.088
Terril Saint-Antoine	0.322	Carrière de Stockay	1.090	Carrière de Stockay	1.099	Carrière de Stockay	0.088
Carrière de Stockay	0.321	Wulfrath (D)	1.089	Wulfrath (D)	1.098	Wulfrath (D)	0.079
Holset	0.303	Genesius-Rode	1.089	Noorbeek	1.090	Noorbeek	0.078
Meertsengroeve	0.286	Noorbeek	1.081	Meertsengroeve	1.087	Holset	0.076
Veursbos Voeren	0.286	Meertsengroeve	1.079	Veursbos Voeren	1.085	Veursbos Voeren	0.076
Noorbeek	0.272	Veursbos Voeren	1.078	Holset	1.085	Terril Saint-Antoine	0.075
Wulfrath (D)	0.258	Holset	1.078	Terril Saint-Antoine	1.083	Meertsengroeve	0.074
Kruisbos	0.243	Terril Saint-Antoine	1.077	Groeve 't Rooth	1.081	Groeve 't Rooth	0.071
Groeve 't Rooth	0.235	Grande Honnelle	1.077	Julianagroeve	1.081	Genesius-Rode	0.071
Julianagroeve	0.228	Groeve 't Rooth	1.075	Goslar (D)	1.075	Julianagroeve	0.070
Emmaberg	0.218	Julianagroeve	1.074	Emmaberg	1.072	Emmaberg	0.064
Kloosterbosch	0.199	Goslar (D)	1.068	Ubachsberg-Zuid	1.072	Grande Honnelle	0.062
Keverberg	0.198	Emmaberg	1.067	Grande Honnelle	1.072	Bemelenberg	0.062
Bemelenberg	0.197	Bemelenberg	1.066	Bemelenberg	1.071	Keverberg	0.061
Eckelrade	0.195	Ubachsberg-Zuid	1.066	Keverberg	1.071	Goslar (D)	0.061
Gerendal	0.189	Keverberg	1.066	Kruisbos	1.063	Ubachsberg-Zuid	0.058
Kunderberg	0.187	Kruisbos	1.059	Groeve Blom	1.061	Kruisbos	0.058
Groeve Blom	0.184	Groeve Blom	1.057	Kunderberg	1.058	Groeve Blom	0.055
Goslar (D)	0.177	Kunderberg	1.055	Kloosterbosch	1.058	Kloosterbosch	0.053
Ubachsberg-Zuid	0.164	Kloosterbosch	1.055	Putberg	1.054	Kunderberg	0.052
Curfsgroeve	0.150	Putberg	1.052	Curfsgroeve	1.052	Curfsgroeve	0.045
Putberg	0.124	Curfsgroeve	1.049	Gerendal	1.045	Putberg	0.045
Grande Honnelle	0.119	Gerendal	1.043	Eckelrade	1.043	Gerendal	0.042
Kattenroth	0.100	Eckelrade	1.041	Kattenroth	1.036	Eckelrade	0.040
Genesius-Rode	0.089	Kattenroth	1.035	Genesius-Rode	NA	Kattenroth	0.032

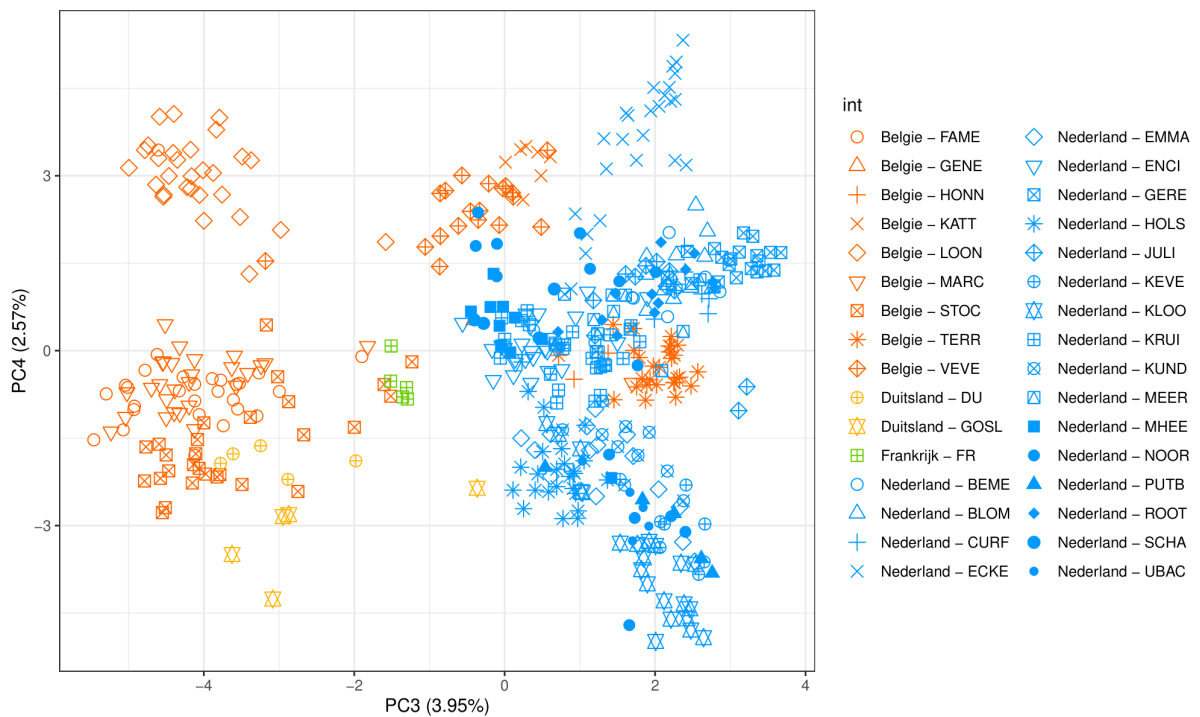
3.3.2 Ordinaties

Onderstaande figuren geven de PCoA ordinaties weer voor de eerste vier assen van variatie (Figuur 3-1, Figuur 3-2).





Figuur 3-1 PCoA op assen 1 en 2. Blauwe genotypes: Nederland. Rode genotypes: België. Oranje genotypes: Duitsland. Groene genotypes: Frankrijk.



Figuur 3-2 PCoA op assen 3 en 4. Blauwe genotypes: Nederland. Rode genotypes: België. Oranje genotypes: Duitsland. Groene genotypes: Frankrijk.

Figuur 3-1 geeft een zeer duidelijke scheiding weer van ENCI-groeve van alle andere populaties. Deze populatie wordt bovendien lineair uitgesmeerd over een groot deel van de ruimte, wat zou kunnen wijzen op een recente vermenging van populaties. De fylogenetische analyse van Lemmers et al. (2020) wijst op een zeer sterk verschillende oorsprong van de ENCI-groevepopulatie. Opvallend is ook dat er één individu van Mheer zeer duidelijk ingebed zit in de genetische structuur van ENCI-groeve. We zien verder dat de populatie van Schaelsberg zeer dicht clustert bij de Franse populatie uit de Brenne.

De ordinatie toont verder twee sterk gescheiden clusters met een duidelijke geografische oorsprong: enerzijds een grote cluster van individuen die allen kunnen beschouwd worden als behorende tot de Maasvallei (Z-Limburg, Voeren, Luik, Namen, Luxemburg), en anderzijds een groep behorende tot de Scheldevallei (Henegouwen, Vlaams-Brabant). De populatie van Groot-Loon is waterkundig te rekenen tot de Scheldevallei, maar ligt fysiek dichterbij de Maasvallei. In de ordinatie zien we dan ook een intermediaire positie van deze populatie.

Zoomen we verder in op assen 3 en 4, dan worden de populaties verder uitgesplitst volgens locatie.

3.3.3 Toewijzingen

Van de 468 unieke genotypes werd 93% correct toegewezen aan zijn populatie van oorsprong. Voor populaties waarvan er slechts enkele genotypes gekend waren en die niet sterk gedifferentieerd zijn van andere populaties is de kans op een correcte toewijzing uiteraard klein. Dit was bijvoorbeeld het geval bij Grande Honnelle (N=2) dat werd toegewezen aan het naburige Terril St-Antoine, Genesius-Rode (N=1, toewijzing aan zichzelf niet mogelijk), en Ubachsberg-Zuid (N=5) en Putberg (N=5) (beiden volledig toegewezen aan het naburige Keeverberg).

In vele gevallen werden individuen uit een bepaalde populatie integraal correct toegewezen aan de werkelijke populatie van oorsprong.

Tabel 3-4 Aantal correct toegewezen genotypes. Indien incorrect toegewezen wordt de foutief toegewezen populatie weergegeven.

bronpopulatie	aantal	aantal correct	toegewezen aan
Bemelenberg	10	7	Groeve Blom
Groeve Blom	13	13	
Curfsgroeve	9	9	
Wolfsrath	5	5	
Eckelrade	25	25	
Emmaberg	16	15	Kloosterbosch
ENCI-groeve	27	26	Julianagroeve
Marche-en-Famenne	28	27	Groot-Loon
Brenne, France	5	5	
Genesius-Rode	1	0	Terril St-Antoine
Gerendal	24	24	
Goslar (De)	5	5	



Holset	24	24	
Grande Honnelle	2	0	Terril St-Antoine
Julianagroeven	11	9	Groeve 't Rooth
Kattenroth	7	7	
Keerbergen	8	7	Kloosterbosch
Kloosterbosch	22	22	
Kruisbos	25	25	
Kunderberg	10	10	
Groot-Loon	29	29	
Carrière de Marchempré	28	27	Terril St-Antoine
Meertsengroeven	9	9	
Mheer	10	7	ENCI, Noorbeek, Emmagroeven
Noorbeek	14	8	Kloosterbosch, Groeve 't Rooth, Keerbergen
Putberg	5	0	Keerbergen
Groeve 't Rooth	12	12	
Schaelsberg	4	4	
Carrière de Stockay	28	28	
Terril Saint-Antoine	28	28	
Ubachsberg-Zuid	5	0	Keerbergen, Kunderberg
Veursbos Voeren	19	18	Groot-Loon

De toewijzingsanalyses bevestigt enkele patronen die al uit de DAPC bleken (Fig. 1 en 2): De toewijzing van een individu van Mheer aan Noorbeek (dat vlakbij ligt) verbaast niet sterk. Een individu uit Mheer wordt met absolute zekerheid toegewezen aan ENCI-groeve. Dat is onverwacht. De toewijzing van een derde individu aan Emmaberg, dat toch een eind verwijderd is, doet eveneens vragen rijzen, en wijst mogelijk op niet-natuurlijke migratie. Ook uit het naburige Noorbeek zijn er zes individuen die niet worden toegewezen aan zichzelf, maar aan Keerbergen (1), Kloosterbosch (4), en Groeve 't Rooth (1). Geen enkele van die populaties ligt binnen dispersie-afstand. We zien verder enkele Zuid-Limburgse populaties recurrent terugkomen als oorsprong van toewijzing van andere Zuid-Limburgse individuen (Kloosterbosch, Emmaberg, Keerbergen, Groeve 't Rooth). Alles tezamen lijkt dit toch te wijzen op occasionele bijplaatsingen binnen de regio.

Een individu uit Marchempré (Maasvallei) dat wordt toegewezen aan Terril St-Antoine (Scheldevallei) wijst waarschijnlijk op een verwisseling van stalen tijdens de staalverwerking. We kunnen niet uitsluiten dat het individu van Mheer dat toegewezen wordt aan ENCI ook niet het gevolg is van een menselijke fout.

Het valt op dat ook in Zuid-Limburg, waar alle populaties op een kluitje bij elkaar liggen in een gebied van 15km x 15km, de meeste genotypes correct werden toegewezen aan hun bronlocatie. Dit wijst erop dat de meeste populaties zeer geïsoleerd zijn van elkaar: zelfs Kattenroth, dat op minder dan 1 km afstand ligt van bemonsterde individuen van Noorbeek, wordt volledig correct toegewezen aan zichzelf, en geen enkel ander individu wordt toegewezen aan Kattenroth.



3.4 RELEVANTIE VOOR HET KWEEKPROGRAMMA

Op basis van de resultaten van de genetische diversiteit kunnen we concluderen dat van de Vlaamse populaties die we voldoende bemonsterd hadden (Groot-Loon, Veursbos, Kattenroth) de genetische diversiteit in Groot-Loon en Veursbos nog behoorlijk hoog tot hoog is. De populatie van Kattenroth lijkt genetisch sterk geïsoleerd en verarmd te zijn. De overige populaties (Sint-Genesius-Rode, Tervuren) konden nog niet voldoende bemonsterd worden.

Opvallend is de duidelijke scheiding tussen Maasbekken en Scheldebekken. Of het werkelijk relevant is om deze gescheiden te houden in de kweekpopulaties is niet duidelijk. Gezien deze afstammen van duidelijk verschillende biogeografische regio's valt er iets voor te zeggen om ze gescheiden te houden. Anderzijds is de populatie die het momenteel het meest succesvol lijkt in Zuid-Limburg een populatie die zo genetisch divers is dat ze van gemengde oorsprong lijkt, en bovendien van allochtone oorsprong is. De wetenschappelijke literatuur geeft aan dat het gescheiden houden van populaties geen doel op zich mag zijn, en dat de voordelen van vermengen van populaties vaak groter zijn dan verwacht (Ralls et al., 2020 ; Liddell et al., 2021). Alvast binnen de Maasvallei lijkt er geen hindernis om populaties te vermengen met elkaar, op basis van de criteria van Frankham et al. (2011).

De populatie van ENCI-groeve zal gezien de niet-gekende maar duidelijk uitheemse oorsprong niet opgenomen worden in het kweekprogramma.

Het is zeer duidelijk dat de populaties van de Maasvallei (inclusief Z-Limburg) een relatief homogeen geheel vormen, ondanks de capaciteit van de toewijzingsanalyse om zowat elk individu correct toe te wijzen aan zijn werkelijke plaats van oorsprong, op een handvol genotypes uit Zuid-Limburgse populaties na. Uit onderzoek blijkt echter dat er in Zuid-Limburg al tientallen jaren legaal en illegaal translocaties gebeuren van vroedmeesterpad (zie Lemmers et al. 2020), die een mogelijke verklaring vormen voor deze waarnemingen. Daarnaast is de relatief recente genetische isolatie van de meeste populaties als gevolg van fragmentatie van leefgebied en inkrimpen van populaties (wat intrinsiek de genmigratie doet dalen) een mogelijke verklaring voor de nog niet compleet succesvolle toewijzing.



4 VERVOLGPROJECT

Vanaf 2021 loopt een driejarig vervolgproject. Hierin zullen gekweekte larven doelgericht worden uitgezet (bijplaatsing en (her)introductie). Aangezien de hier bij te volgen uitzetstrategie (selectie van uitzetgebieden na toetsing habitatgeschiktheidscriteria, graad van inmenging van verschillende origines, ...) nog voor een groot deel te ontwikkelen zijn, zullen de geleverde acties en producten hiervan voorwerp uitmaken van het eindrapport van de vervolgopdracht.



5 REFERENTIES

- Andrew, S. (2010). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Auwerx, J., Picavet, B. & Speybroeck, J., (2020). Can a breeding program save the Common Midwife Toad in Flanders, Belgium? *Amphibian Ark Newsletter*. 50: 2-4.
- Catchen, J., Hohenlohe, P. a., Bassham, S., Amores, A., & Cresko, W. a. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 3124–3140. <https://doi.org/10.1111/mec.12354>
- Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., Postlethwait, J. H., & De Koning, D.-J. (2011). Stacks: Building and Genotyping Loci De Novo From Short-Read Sequences. *G3*, 1(3), 171–182. <https://doi.org/10.1534/g3.111.000240>
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., & Durbin, R. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156–2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- Frankham R, Ballou JD, Eldridge MDB, Lacy RC, Ralls K, Dudash MR, Fenster CB (2011). Predicting the probability of outbreeding depression. *Conserv Biol* 25: 465-475.
- Jombart, T. (2008). Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jombart, T., & Collins C. (2015). A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 2.0.0.
- Jombart, T., Devillard, S. & Balloux F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *Bmc Genetics* 11: 94.
- Lemmers, P., Gilbert, M.J., Wagemaker, C.A.M., Crombaghs, B.H.J.M. (2020). De genetische diversiteit, vitaliteit en authenticiteit van voedmeesterpadpopulaties in Limburg. *Natuurabalans - Limes Divergens BV, Stichting RAVON & Radboud Universiteit, Nijmegen.*
- Liddell E, Sunnucks P, Cook CN (2021). To mix or not to mix gene pools for threatened species management? Few studies use genetic data to examine the risks of both actions, but failing to do so leads disproportionately to recommendations for separate management. *Biol Conserv* 256: 109072.
- Lommaert L., Adriaens D., Pollet M. (red.) (2020). *Criteria voor de beoordeling van de lokale staat van instandhouding van de Habitatrichtlijnsoorten in Vlaanderen. Versie*

2.0. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2020 (28). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. DOI: doi.org/10.21436/inbor.8193367

Mergeay, J., Auwerx, J., Speybroeck, J. (2018). Advies betreffende de ex-situ kweek van vroedmeesterpad. Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek INBO.A.3669.

Mergeay, J., Speybroeck, J. (2017). Advies betreffende twee translocatiestrategieën voor de vroedmeesterpad. Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek INBO.A.3535.

Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, Paetkau D, Baudouin L & Estoup A (2004). GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95: 536-539.

Ralls K, Sunnucks P, Lacy RC, Frankham R (2020). Genetic rescue: A critique of the evidence supports maximizing genetic diversity rather than minimizing the introduction of putatively harmful genetic variation. *Biol Conserv* 251: 108784.

Rannala, B. & Mountain, J.L. (1997). Detecting Immigration by Using Multilocus Genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 9197-9201.

Rochette, N. C., Rivera-Colón, A. G., & Catchen, J. M. (2019). Stacks 2: Analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology*, 28(21), 4737–4754. <https://doi.org/10.1111/mec.15253>

Speybroeck, J., Auwerx, J. (2019). Advies betreffende de criteria voor habitatgeschiktheid voor de vroedmeesterpad in het kader van bijplaatsing en introductie. Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek INBO.A.3719.



Bijlage 1 – verslag stuurgroepvergadering 1 (3 april 2019)

KWEEKPROGRAMMA VROEDMEESTERPAD

verslag stuurgroepvergadering 1 – 3 april 2019, INBO Linkebeek

Aanwezig: Dries Desloover (ANB), Johan Auwerx (INBO), Joachim Mergeay (INBO), Jeroen Speybroeck (INBO), Sam Van De Poel (Natuurpunt.Studie), Sam Bennekens (Natuurpunt Druivenstreek), Pieter Moysons (Regionaal Landschap Dijleland), Sarah Hublou (Regionaal Landschap Pajottenland & Zennevallei), An Martel (UGent), Frank Pasmans (UGent)

Verontschuldigd: Muriel Vervaeke (ANB), Veerle Versteirt (ANB)

Agenda

1. De vergadering volgt de presentatie van INBO als leidraad. Hieronder worden enkel aanvullende, besproken details vermeld: voor de ruggengraat - zie presentatie.
2. Deze presentatie zal integraal deel uit maken van het door INBO in te dienen **aanvangsverslag**. Het aanvangsverslag zal verder o.m. een herschikking van het budget en een aangepaste planningstabel bevatten (zie volgend punt).
3. INBO stelt voor Taak 1 uit de overeenkomst grotendeels te laten vervallen. Zo zullen slechts eenmalig larven worden verzameld en dit enkel met als doel de autonome kweekgroep op te bouwen. Belangrijke voordelen zijn (1) logistieke en administratieve vereenvoudiging, (2) reductie van het risico op uitbraak van ziekte en (3) kleinere impact op de bronpopulaties (Nederland). De stuurgroep stemt in met deze gewijzigde aanpak.
4. ADMINISTRATIE
 - o De nodige vergunningsaanvragen voor zowel Vlaanderen (ingediend), Nederland (in opmaak) als Wallonië (ingediend) zijn lopend.
5. VERZAMELEN en GENETISCHE BEMONSTERING
 - o Vlaanderen:
 - § Lokale spelers van de RLn, ANB, NP, ... dragen op vraag van ANB en INBO aan de voorbereiding en uitvoering van de bemonstering bij, incl. het bekomen van de toelating van betrokken privé-eigenaars.
 - In Vlaams-Brabant vond reeds een terreinbezoek plaats op 15 maart 2019.
 - In Limburg staat een terreinbezoek gepland op 29 april 2019.
 - § Lokale vrijwilligers van Groeve Ganzeman worden gevraagd vanaf begin mei na te gaan hoe de voortplanting verloopt. Hierop enten we de timing van het verzamelen van larven. Benaderend vangen de veldactiviteiten ten vroegste aan op 15 mei.
 - § 2 bemonsteringstijdstippen (indicatief): 1) 15/5-30/6; 2) 1/7-31/7 – 1 van beide bezoeken samen met de larvenschepronde van de dit jaar startende monitoring (nog aan te kondigen aan wie dit gegund werd)

§ 10 larven per poel per bezoek verzamelen voor transport naar kweek in Linkebeek

§ max. 30 larven bemonsteren voor genetisch onderzoek (knip staartpunt) + aanvullend mondswabs nemen van eventueel aangetroffen adulte dieren

§ Uitgezette urbane populaties in Gent en Brussel worden in eerste instantie niet bemonsterd.

○ Wallonië en Nederland:

§ 1 bemonsteringstijdstip, (hopelijk) vanaf begin juni

6. Genetische analyses

- Aangezien in Nederland een gelijkaardige oefening bezig is (Ravon, Natuurbalans, Radboud Univ), is het plan opgevat om genetische analyses volgens een zelfde methodiek te doen, teneinde de data samen te kunnen voegen. We opteren voor Genotyping By Sequencing in eerste fase. We zoeken daarbij naar duizenden plaatsen in het genoom die variabel zijn op één base, een single nucleotide polymorphism. Dit wordt waarschijnlijk door Radboud Univ. uitgevoerd.
- In tweede instantie is het de bedoeling om een genome assembly te doen van vroedmeesterpad (volledig genoom in kaart brengen). Dit is nodig om zekerheid te hebben over de onafhankelijkheid van de verschillende SNPs, aangezien dit een assumptie is van veel statistische tests die we gebruiken.
- De combinatie van de GBS-SNPs en het volledige genoom laat ons toe om op termijn een vast panel van SNP-merkers te gebruiken voor monitoringdoeleinden.
- De genetische data uit de wilde populaties en in kweek vormen de ijklijn waartegen we de monitoring in de toekomst zullen moeten uitvoeren. Genetische monitoring van de uitzettingen zal een hoeksteen vormen voor de evaluatie van het succes van de maatregelen.
- Informatie over genetische verschillen tussen de herkomsten (diversiteit binnen en tussen populaties) zal in 2020 beschikbaar zijn. Meer diepgaande analyses en resultaten zullen pas later volledig uitgevoerd zijn.

7. KWEKEN

- In afwachting van de resultaten van het genetisch onderzoek (te verwachten 2020), worden de verzamelde larven regionaal gescheiden opgekweekt.
 1. Vlaams-Brabant (**Sint-Genesius-Rode + Huldenberg**)
 2. Limburg s.s. (**Groot-Loon + Rijkel**)
 3. Voeren (**Veursvallei**)
 4. Henegouwen (3 locaties – niet noodzakelijk allemaal te bemonsteren)
 5. Overige Wallonië (4 locaties – niet noodzakelijk allemaal te bemonsteren; Luik (2), Namen (1), Luxemburg (1))
 6. Nederland (2 of 3 locaties)

8. UITZETTEN

- We verkiezen eerder grote larven dan metamorfen (juvenielen) uit te zetten. Larven die (indicatief) eind oktober nog niet gemetamorfoseerd zijn worden op één van de doellocaties uitgezet.
- PLANNING

- § JAAR 1: Er worden 6 kweekgroepen opgezet volgens de herkomstgroepen (zie hoger). Alle dieren die niet nodig zijn voor het samenstellen van de kweekgroepen, kunnen worden uitgezet op de doellocaties (= plaatsen waar larven in Vlaanderen geoogst werden (in **vet** gedrukt onder 6. KWEKEN) + nieuwe locaties die aan de criteria voor habitatgeschiktheid voldoen (in eerste instantie denken we aan: Blaivie en Altenbroek)).
- § JAAR 2: In principe worden in dit jaar geen dieren uitgezet. De in J1 verzamelde dieren bevinden zich in de kweekopzet in Linkebeek, in afwachting van hun reproductieve activiteit die in principe van J3 te verwachten is.
- § JAAR 3 e.v.: streefdoel gedurende drie opeenvolgende jaren telkens 50 larven uitzetten per locatie

Presentaties

<https://drive.google.com/open?id=13HxOk1l3gKIQxUBBK2JUkpi2ah7j27J6>

<https://drive.google.com/open?id=13JyOrR4OmAVfQdNZhD0AT--7ERmGCeVy>

Bijlage 2 – verslag stuurgroepvergadering 2 (10 oktober 2019)

KWEEKPROGRAMMA VROEDMEESTERPAD verslag stuurgroepvergadering 2 – 10 oktober 2019, INBO Linkebeek

Aanwezig: Dries Desloover (ANB), Johan Auwerx (INBO), Jeroen Speybroeck (INBO), Sam Van De Poel (Natuurpunt.Studie), Pieter Moysons & een stagiaire wiens naam me ontglipt (Regionaal Landschap Dijleland), Sarah Hublou (Regionaal Landschap Pajottenland & Zennevallei), An Martel (UGent)

Verontschuldigd: Muriel Vervaeke (ANB), Veerle Versteirt (ANB), Frank Pasmans (UGent), Joachim Mergeay (INBO), Sam Bennekens (Natuurpunt Druivenstreek)

STAND VAN ZAKEN

De vergadering volgde de presentaties van [Jeroen](#) en [Johan](#) als leidraad, waarin de resultaten van het reeds geleverde werk te vinden zijn.

BESLISSINGEN

Zie mail van Jeroen van 7 oktober 2019 voor de discussiepunten of [hier](#). Het gros van de vergadering ging op naar het wikken en wegen van deze issues, met finaal onderstaande beslissingen als resultaat.

DISCUSSIEPUNT 1: Kunnen/Mogen de dieren in zekere mate worden samengevoegd? Zo ja, (a) in de zes voorziene groepen of (b) 1 groep?

De stuurgroep beslist dat de verzamelde dieren mogen worden samengevoegd in 7 groepen, zijnde de op de eerste stuurgroep afgesproken 6 groepen, plus een afzonderlijke groep voor de locatie ENCI-groeve (gezien het grote aantal dieren van deze dieren en de vermoede allochtone oorsprong van deze populatie). Er werd ingegaan op wat wel en wat niet verwacht kan worden van de resultaten van de genetische analyse.

=>

- 1) Vlaams-Brabant (Sint-Genesius-Rode + Huldenberg)
- 2) Limburg s.s. (Groot-Loon)
- 3) Voeren
- 4) Henegouwen (Terril St-Antoine + Grande Honnelle)
- 5) Overige Wallonië (Marchempré, Marche-en-Famenne, Stockay)
- 6) Nederland 1 (Keerbergen, Groeve Blom)
- 7) Nederland 2 (ENCI-groeve)

DISCUSSIEPUNT 2: Kunnen mogen dieren die niet nodig zijn voor het samenstellen van de kweekgroepen worden uitgezet op de doellocaties?

Er werd beslist om van elke locatie waarvan we meer dan 40 dieren hebben erop te mikken om ongeveer 40 dieren over te houden (= metamorfen + overwinterende larven). De overmaat aan (enkel) metamorfen willen we reeds uitzetten op verschillende Vlaamse, reeds bezette locaties (= bijplaatsen). In concreto gaat het wellicht om 100-120 dieren die zo snel mogelijk (voordat nachtvorst etc. optreedt) zouden moeten uitgezet worden.

Pieter, Sarah, Sam VDP en Dries zullen de beheerders van alle huidige Vlaamse locaties bevragen.

Conform de eerder gemaakte afspraken moeten deze dieren voorafgaandelijk worden gescreend op ziektes door UGent (a rato van één swab per vijf dieren).

Hoeveel dieren willen/moeten we bewaren als stichters?

We wensen 200 adulte dieren over te houden. Dit is duidelijk meer dan de eerder vooropgestelde 50 en is gebaseerd op voortschrijdend inzicht – een introductie kan pas effect hebben als we ruim voldoende larven kunnen uitzetten en dit is geen sinecure gezien de kleine legselgrootte van de soort.

COMMUNICATIE

- Dries benadrukt dat de informatie die binnen de stuurgroep wordt verspreid vertrouwelijk is en dat externe communicatie in overleg met hem dient te gebeuren.
- Hij geeft ook mee dat er binnen de BNIP-middelen financiële ruimte is voorzien voor het maken van een promotiefilmje.
- Hij stelt ook voor om bij het uitzetten van de metamorfen dit jaar (zie 2.b.) een persmoment te organiseren. Organisatie door ANB en INBO i.s.m. NP; voorgestelde locatie = Neerijse, te bevestigen door Sam VDP. Het ontwerp persbericht zal worden rondgestuurd naar de stuurgroepleden.
- Sarah stelt voor om in 2020 ook een informatiemoment te organiseren voor alle partners en betrokkenen.

VERVOLGPROJECT

Het huidige project loopt tot 1 maart 2021. Het vervolgproject dient echter nog in 2019 financieel te worden vastgelegd. Jeroen, Johan en Joachim leveren hiervoor Dries zo snel mogelijk de nodige input.

VOLGENDE VERGADERING

De 3^{de} stuurgroepvergadering is gepland voor **donderdag 26 maart 2020, 13h00, zelfde locatie.**

De samenstelling van de op te zetten kweekgroep(en) zal onder meer op de agenda staan, in de verwachting dat we mogelijk reeds in 2020 geslachtsrijpe dieren zouden hebben.



Bijlage 3 – verslag stuurgroepvergadering 3 (23 september 2020)

Stuurgroep 3 kweek vroedmeesterpad - 23 september 2020

Aanwezig: Johan Toebat (ANB), Pieter Moysons (RL Dijleland), Sarah Hublou (RL Pajottenland en Zennevallei), Loïc van Doorn (INBO), Joachim Mergeay (INBO), Johan Auwerx (INBO), Zoë De Corte (INBO), Dries Desloover (ANB - leidend ambtenaar opdrachtgever), Sam Van De Poel (NP Studie), Jeroen Speybroeck (INBO - projectleider opdrachthouder)

Verontschuldigd: Joost Proesmans (ANB - Voeren), Frank Pasmans (UGent)

Verslag: Loïc en Jeroen

Presentatie INBO

De door INBO tijdens de vergadering vertoonde presentatie geldt als bijlage en leidraad bij het verslag. Enkel de aspecten waar dieper op ingegaan werd zijn apart in dit verslag opgenomen.

Wat met de dieren afkomstig uit de Nederlandse ENCI-groeve?

Context: Voorafgaand aan de DNA-analyse zijn een aantal larven en metamorfen die niet nodig waren voor het opstellen van kweekgroepen eind 2019 uitgezet op drie locaties (Groot-Loon, Neerijse groeve Ganzeman en Sint-Genesius-Rode). DNA-analyse lijkt uit te wijzen dat de populatie in de ENCI-groeve echter (gedeeltelijk) met uitheemse vroedmeesterpadden is bevolkt (zie figuur 'Uitzetting eind 2019' in de presentatie).

Vraag 1: Is dit een probleem voor de uitzetlocaties waar telkens een tiental dieren zijn bijgeplaatst?

Aangezien de populatie in ENCI het zeer goed stelt en, zoals toegelicht, de genetische diversiteit groot is, lijkt de kans op negatieve impact op de bestaande populaties niet groot. Omdat het over een klein aantal dieren gaat, zijn er waarschijnlijk voornamelijk positieve effecten op de lokale diversiteit, ervan uitgaand dat de dieren effectief volwassen worden en bijdragen aan de voortplanting. Dit kan over een paar jaar duidelijk worden door middel van genetische monitoring.

Vraag 2: Wat met de ENCI-dieren in Linkebeek?

Aangezien de diversiteit van sommige andere gebieden (Borgloon, Veursbos, Oost- en West-Wallonië) waar larven verzameld werden voldoende hoog is, lijkt het niet nodig ENCI-nakomelingen te mengen met inheemse dieren, of toch niet voordat hun herkomst is uitgeklaard. Ze worden apart gehouden tot nader orde. Kruisingen tussen ENCI en niet-ENCI dieren kunnen later d.m.v. fitnesstests eventueel opgevolgd worden om positieve dan wel negatieve effecten te kwantificeren.

Uitzetstrategie

Context: Alle onderzochte gebieden zijn op basis van genetische kenmerken van elkaar te onderscheiden. Zijn de verschillen in genetica een reden om het mengen van nakomelingen van de kweek in Linkebeek te beperken?

Niet klaar voor 2022.

Herne:

Inrichtingen gepland dit najaar. Een bezoek ter plaatse is gepland. Uitzet in 2021?

Schaveys, kwekerij INBO en gemeente Linkebeek:

Een ambitieus plan om een metapopulatie op grotere schaal uit te bouwen. Vraag hoe de financiering in het Schaveyspark en op grondgebied INBO gefinancierd kan worden. Niet klaar voor uitzet in 2021.

Borgloon:

Betonpoel op de planning en connectie naar Bollebergen. Uitzetting in 2021.

Bollebergen:

Nieuw gebied in de buurt van de bestaande populatie te Borgloon dat ontwikkeld wordt. Uitzet zou hier kunnen gebeuren in 2021.

Voerstreek-Veurs:

Bakken reeds geplaatst. Klaar voor uitzet

Voerstreek-Altenbroek:

Klaar voor uitzet.

VARIA

Joost Proesmans (ANB) vroeg om (meer) op de hoogte gehouden te worden van de beslissingen omtrent de Voerstreek.

De opmerking wordt gemaakt dat habitatherstel in gebieden opgelijst in het SBP erg veel financiële middelen zal vragen en of het niet logischer is om het zoekgebied uit te breiden buiten SBP-gebieden. Herne bv. valt hier buiten. Dries geeft aan dat dit voor het vervolg-SBP is. Het provinciaal domein Huizingen wordt als nieuwe locatie aangedragen.

Pieter Moysons zal voor een aantal locaties in Vlaams-Brabant een nieuw terreinbezoek plannen.



Persaandacht

<https://www.natuurpunt.be/nieuws/redt-kweekprogramma-de-vlaamse-vroedmeesterpad-20190807>

<https://www.natuurenbos.be/pers-nieuws/nieuws/bedreigde-vroedmeesterpad-werkt-aan-comeback>

<https://dailyscience.brussels/nl/uitzet-van-vroedmeesterpadden-in-neerijse-is-een-europese-primeur/30/10/2019/>

https://www.nieuwsblad.be/cnt/dmf20190816_04560530

https://www.hbvl.be/cnt/dmf20190809_04552025

<https://www.vrt.be/vrtnws/nl/2018/04/12/translocatie-dieren/>