

Wetenschappelijke ondersteuning herstelprogramma's 2008: genetica van de kweekdieren van kopvoorn, snoek en serpeling

Koen De Gelas, Johan Auwerx, Yves Ceusters, Daniel De Charleroy, Dirk Hennebel, Sabrina Neyrinck, Bruno Picavet, Davy verspeet, An Van Breusegem, Inne Vught, Johan Coeck & Janine van Vessem

INBO.R.2009.41

Auteurs:

Koen De Gelas, Johan Auwerx, Yves Ceusters, Daniel De Charleroy, Dirk Hennebel, Sabrina Neyrinck, Bruno Picavet, Davy verspeet, An Van Breusegem, Inne Vught, Johan Coeck & Janine van Vessem

Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) is het Vlaams onderzoeks- en kenniscentrum voor natuur en het duurzame beheer en gebruik ervan. Het INBO verricht onderzoek en levert kennis aan al wie het beleid voorbereidt, uitvoert of erin geïnteresseerd is.

Vestiging:

INBO Linkebeek
Dwersbos 28, 1630 Linkebeek
www.inbo.be

e-mail:

Koen.degelas@inbo.be

Wijze van citeren:

Koen De Gelas, Johan Auwerx, Yves Ceusters, Daniel De Charleroy, Dirk Hennebel, Sabrina Neyrinck, Bruno Picavet, Davy verspeet, An Van Breusegem, Inne Vught, Johan Coeck & Janine van Vessem(2009). Wetenschappelijke ondersteuning herstelprogramma's 2008: genetica van de kweekdieren van kopvoorn, snoek en serpeling. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2009 (INBO.R.2009.41). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

D/2009/3241/388

INBO.R.2009.41

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Jurgen Tack

Druk:

Managementondersteunende Diensten van de Vlaamse overheid

Foto cover:

Yves Adams / Vilda

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:

het Visserijfonds en het Agentschap voor Natuur en Bos



Wetenschappelijke ondersteuning herstelprogramma's 2008: genetica van de kweekdieren van kopvoorn, snoek en serpeling.

Koen De Gelas, Johan Auwerx, Yves Ceusters, Daniel De Charleroy, Dirk Hennebel, Sabrina Neyrinck, Bruno Picavet, Davy verspeet, An Van Breusegem, Inne Vught, Johan Coeck & Janine van Vessem.

**Rapport van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek
INBO.R.2009.41**

Studie in opdracht van het Visserijfonds en het Agentschap voor Natuur en Bos in het kader van de onderzoeksopdracht "Wetenschappelijke onderbouwing en ondersteuning van het visserijbeleid en het visstandbeheer"

Inhoudstafel

Samenvatting	4
Abstract	4
Deel I: Genetische analyses kopvoorn (<i>Squalius cephalus</i>)	6
1. Inleiding	6
1.1 <i>Kopvoorn (<i>Squalius cephalus</i>) Habitat en verspreiding</i>	6
1.2 <i>Genetische structuur van kopvoorn</i>	6
2. Materiaal en methode	9
2.1 <i>Stalen</i>	9
2.2 <i>DNA extractie, amplificatie en sequentiereactie</i>	9
2.3 <i>Mitochondriale merker amplificatie cytochroom b</i>	9
2.4 <i>Kwaliteitscontrole, alignering en data analyse cytochroom b</i>	11
2.5 <i>Microsatelliet analyse: DNA amplificatie</i>	11
2.6 <i>Genotypering en diversiteitsanalyse</i>	14
2.7 <i>Stuctuuranalyse, detectie van verschillende groepen</i>	14
2.8 <i>Simulatie ouderschapsanalyse</i>	14
3. Resultaten	15
3.1 <i>Variatie cytochroom b en haplotype diversiteit</i>	15
3.2 <i>Microsatellieten: stuctuuranalyse, detectie van verschillende groepen</i>	16
3.3 <i>Vergelijking resultaten microsatellieten en cytochroom b</i>	19
3.4 <i>Diversiteit van de kweekpopulatie van kopvoorn</i>	20
3.5 <i>Simulatie ouderschapsanalyse</i>	20
4. Discussie	22
4.1 <i>Detectie van uitheemse genetische lijnen</i>	22
4.2 <i>Diversiteit van de kweekpopulatie</i>	23
4.3 <i>Aanvullen van de kweekpopulatie</i>	24
4.4 <i>Risico's verbonden aan het herbepoten met uitheemse genetische lijnen</i>	25
Deel II: Microsatelliet analyse snoek (<i>Esox lucius</i>)	32
1. Inleiding	32
1.1 <i>Snoek(<i>Esox lucius</i>): habitat en voorkomen</i>	32
1.2 <i>Genetische structuur van snoek</i>	32
2. Materiaal en methode	35
2.1 <i>Staalname</i>	35
2.2 <i>DNA extractie en amplificatie</i>	35

2.3	<i>Genotypering en diversiteitsanalyse</i>	39
2.4	<i>Simulatie ouderschapsanalyse</i>	40
3.	Resultaten	41
3.1	<i>Verkennde data-analyse</i>	41
3.2	<i>Diversiteit van de kweekpopulatie</i>	47
3.3	<i>Vergelijking met eerdere studie Maes et al. 2004</i>	48
3.4	<i>Simulatie ouderschapsanalyse</i>	51
4.	Discussie	52
4.1	<i>Algemeen</i>	52
4.2	<i>Genetische merkers</i>	52
4.3	<i>Genetische diversiteit van de kweekpopulatie</i>	52
4.4	<i>Uitheimse genetische lijnen</i>	53
4.5	<i>Genetische differentiatie tussen temporele stalen</i>	54
4.6	<i>Resolutie genetische merkers voor ouderschapsanalyse</i>	55
5.	Advies voor het beheer van de kweekpopulatie van snoek	56
5.1	<i>Aanwezigheid van buitenlands teeltmateriaal</i>	56
5.2	<i>verlies van genetische diversiteit in de kweekpopulatie</i>	56
5.3	<i>Doorkweken van generaties ter vervanging van de broedstock</i>	57
Deel III: Microsatelliet analyse serpeling (<i>Leuciscus leuciscus</i>)		62
1.	Inleiding	62
1.1	<i>Serpeling (<i>Leuciscus leuciscus</i>): habitat en verspreiding</i>	62
1.2	<i>Genetische structuur van serpeling</i>	62
2.	Materiaal en methode	64
2.1	<i>Stalen</i>	64
2.2	<i>DNA-extractie en amplificatie</i>	64
2.3	<i>Microsatelliet analyse: DNA amplificatie</i>	64
3.	Resultaten	67
3.1	<i>Genetische diversiteit van de kweekpopulatie</i>	67
3.2	<i>Simulatie ouderschapsanalyse</i>	67
4.	Discussie	69
4.1	<i>Genetische diversiteit</i>	69
4.2	<i>Ouderschapsanalyse</i>	69
5.	Advies beheer van de kweekpopulatie van Serpeling	70
5.1	<i>Beheer Schelde- en Maasbekken</i>	70
Deel IV: adviesverlening en genetisch onderzoek als aanvulling bij eerder uitgevoerde genetische studies: analyse extra stalen kleine modderkruiper (<i>Cobitis taenia</i>)		74

1. Stalen	75
2. Materiaal en methode	75
2.1 DNA extractie, amplificatie en genotypering	75
2.2 Analyse genetische verwantschap	75
3. Resultaten	76
3.1 Ploidie en soortbepaling	76
3.2 Toewijzingsanalyse en genetische verwantschap	76
4. Discussie	77
4.1 Aanwezigheid van hybriden	77
4.2 Toewijzingsanalyse en genetische verwantschap	78
5. Advies	79
Referenties	81

Samenvatting

Dit rapport bevat de resultaten van het uitgevoerde genetische onderzoek in het kader van soortherstelprogramma's ten behoeve van de wetenschappelijke ondersteuning van het visserijbeleid 2008. De geselecteerde soorten zijn kopvoorn, snoek en serpeling. Het onderzoek heeft tot doel om na te gaan of de kweekdieren een inheemse origine hebben en of de gebruikte kweekpopulaties een voldoende grote genetische variatie bezitten om het overleven van uitgezette populaties op een duurzame manier te garanderen.

We ontdekten een aantal uitheemse genetische lijnen in de kweekpopulatie van kopvoorn. Deze dieren kunnen niet meer worden gebruikt voor het kweken van pootvis. Nieuwe kweekdieren afkomstig uit de Maas bleken geen uitheemse genetische lijnen te bevatten. Ook de diversiteit van deze populatie is hoog. De populatie uit de Maas kan daarom als bronpopulatie fungeren voor de opbouw van een nieuwe kweekpopulatie.

In de kweekpopulatie van snoek werden een aantal dieren teruggevonden die ingekruist zijn met uitheemse (Poolse) genetische lijnen. We raden aan om deze dieren uit de kweekpopulatie te verwijderen om verdere introductie van uitheems materiaal in de pootvis te vermijden. Een vergelijking tussen de kweekpopulatie in 1999 en 2006 toonde een significant verlies aan van genetische diversiteit. Het is daarom van belang dat de kweekpopulatie af en toe wordt aangevuld met nieuwe individuen.

Bij serpeling werden geen uitheemse lijnen teruggevonden. De kweekpopulatie van het scheldebekken vertoont een voldoende grote genetische diversiteit. De populatie uit het Maasbekken vertoont een lage genetische diversiteit en dient te worden vervangen. Mogelijke bronpopulatie kan de populatie uit de Maas zijn.

Abstract

This report presents the results of the genetic research carried out within the framework of species recovery programmes for the scientific support of the fisheries policy in Flanders, 2008. The selected species are Chub (*Squalius cephalus*), Pike (*Esox lucius*) and dace (*Leuciscus leuciscus*). The aim of the study was to determine whether the breeding animals have an indigenous origin and breeding populations have a sufficiently large genetic variation for the survival of the re-introduced population in a sustainable way.

We discovered a number of non-native genetic lines in the breeding population of Chub. These animals can no longer be used for the cultivation of fish spawn. The wild population from the Meuse river did not contain non-native genetic lines. Also the diversity of this population is high. The population from the Meuse river is therefore suitable as a source population for the build-up of a new breeding population.

In the breeding population of Pike a number of animals have been found to contain alien (Polish) genes. We recommend that these animals are removed from the breeding population in order to avoid further release of non-native material. A comparison of the breeding population in 1999 and 2006 showed a significant loss of genetic diversity. It is therefore important that the breeding population is regularly supplemented with new individuals.

With Dace, no alien lineages have been detected. The breeding population of the Scheldt basin has a sufficiently large genetic diversity. The population from the Meuse Basin has a low genetic diversity and should be replaced. A possible source population could be the population from the Meuse river.

Deel I: Genetische analyses kopvoorn (*Squalius cephalus*)

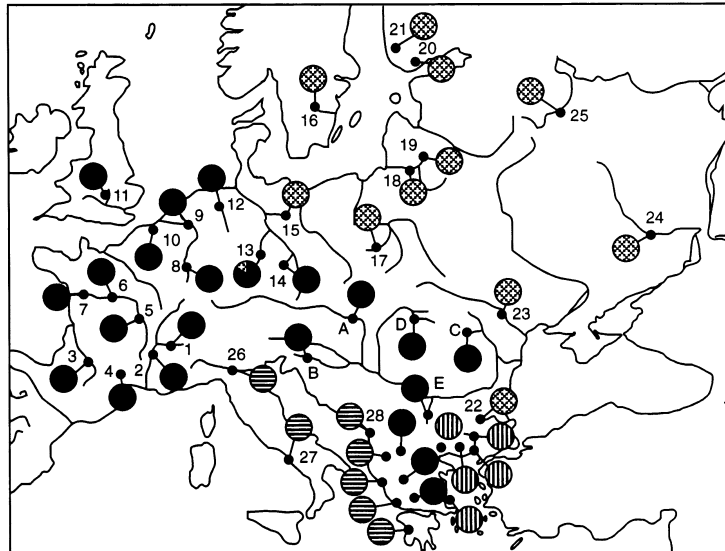
1. Inleiding

1.1 Kopvoorn (*Squalius cephalus*) Habitat en verspreiding

Kopvoorn is een soort die voorkomt van de vlagzalmzone tot de brasemzone. Dit houdt in dat het een stroominnende soort is die een voorkeur heeft voor rivieren en beken met een matige stroomsnelheid en voedselrijkheid en met een structuurrijke bedding. Voor een uitgebreide beschrijving van de habitatvereisten en de ecologie van kopvoorn verwijzen we naar Dillen et al. (2005). De soort kent een ruime verspreiding in west en centraal Europa ten westen van de Kaspische zee. De noordelijke verspreiding is beperkt tot de 56^e breedtegraad. De soort is afwezig ten zuiden van de Pyreneeën en ten zuiden van de Alpen (Kottelat & Freyhof 2007). In Vlaanderen komt de soort nog maar op een beperkt aantal plaatsen voor en meestal gaat het om uitgezette populaties. Het aantal populaties met een natuurlijke voortplanting is zeer gering. Voor een gedetailleerde verspreiding van kopvoorn in Vlaanderen verwijzen we naar de V.I.S databank van INBO (<http://vis.milieuinfo.be/>).

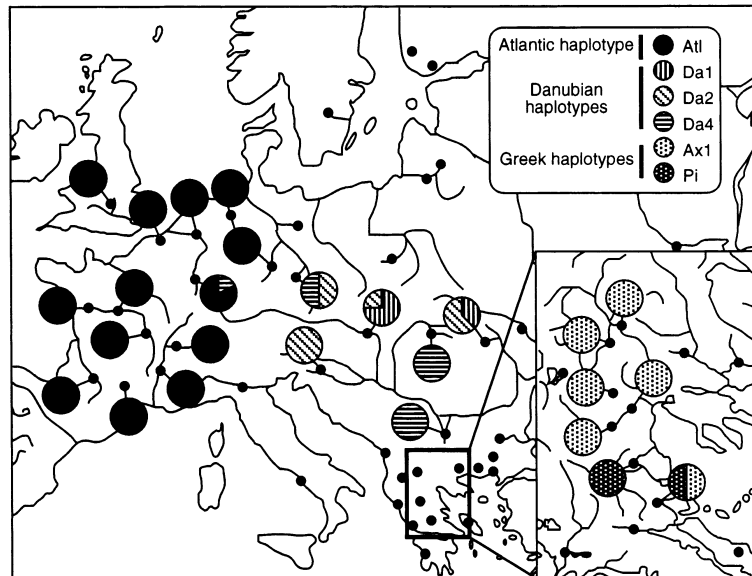
1.2 Genetische structuur van kopvoorn

De fylogeografie van kopvoorn in Europa is beschreven aan de hand van een fragment van het mitochondriaal genoom: cytochroom b (Durand et al. 1997; Durand et al. 1999a, b). Uit deze studies blijkt dat er in Europa vier divergente evolutionaire lijnen voorkomen (Figuur 1.1). Een eerste is een Adriatische lijn met een verspreidingsgebied dat zich beperkt tot rivierbekkens die uitmonden in de Adriatische Zee en rivieren in Italië. Een tweede lijn bevindt zich in de rivieren die uitmonden in de Egeïsche Zee en wordt de Egeïsche lijn genoemd. De Oostelijke lijn wordt teruggevonden in rivierbekkens die uitmonden in de Zwarte zee en de Baltische Zee. De Westelijke lijn tenslotte komt voor in grote delen van West-Europa met de rivieren van het Donaubecken, de rivierbekkens die uitmonden in de noordelijke Middellandse Zee en de rivierbekkens die uitmonden in de Atlantische Oceaan als belangrijkste verspreidingsgebied.



Figuur 1.1: verspreiding van de vier evolutionaire lijnen bij kopvoorn. Westelijke lijn: donkere cirkels; Adriatische lijn: horizontaal gearceerd; Egeïsche lijn: vertikaal gearceerd; Oostelijke lijn: kruislingse arcering (uit Durand et al. 1999a).

Binnen de westelijke evolutionaire lijn kan er nog een verdere opdeling worden gemaakt in een Griekse groep, een Donau-groep en een groep met Atlantische haplotypes. De naam van deze evolutionair significante eenheden komt overeen met de geografische verspreiding van de haplotypes die in elk van deze regio's worden aangetroffen (Figuur 1.2). De Atlantische groep zou ontstaan zijn uit de Donau groep en hoewel de onderlinge genetische verschillen niet erg groot zijn, zijn ze toch als onafhankelijke eenheden te beschouwen. De scheiding tussen de Atlantische groep en de Donau groep zou immers al dateren van 100 000 jaar geleden met een snelle expansie ongeveer 10 000 jaar geleden (Durand et al. 1999a).



Figuur 1.2: verspreiding van de sub-groepen binnen de westelijke genetische lijn bij kopvoorn. Atlantische groep: donkere cirkels; Donau groep: gearceerde cirkels; Griekse groep: gestippelde cirkels (uit Durand et al. 1999a).

Enkel in de bovenloop van de Elbe en de Rijn zijn haplotypes van zowel de Atlantische als de Donau groep vertegenwoordigd. Dit is een aanwijzing dat er in deze rivierbekkens secundair contact is geweest tussen de verschillende genetische lijnen. Dit werd ook voor andere soorten geobserveerd. Voor kwabaal (*Lota lota*) werden er in de bovenloop van de Rijn in het Bodensee zowel Centraal-Europese als West-Europese genetische lijnen teruggevonden (Van Houdt et al. 2003; Barluenga et al. 2006). Ook voor kleine modderkruiper zijn er aanwijzingen dat er contacten geweest zijn tussen het Donau rivierbekken en dat van de Elbe (Janko & De Gelas, niet gepubliceerde gegevens).

In 2007 werden door Vyskocilova et al. 13 microsatelliet merkers ontwikkeld voor kopvoorn. Deze werden ontwikkeld en getest op 20 stalen van individuen afkomstig uit de Odra in Tsjechië. Er werden twee tot 17 allelen per locus aangetroffen met een verwachte heterozygositeit van 0.05 tot 0.90. Deze resultaten tonen aan dat de ontwikkelde microsatelliet merkers bruikbaar zijn in populatie-genetisch onderzoek. We zullen deze merkers dan ook gebruiken in onze studie naar de genetische variatie van de kweekpopulatie van kopvoorn. Door de recente beschikbaarheid van deze hoog variabele merkers zijn er echter nog geen referentiegegevens beschikbaar over natuurlijke populaties waarmee we onze resultaten kunnen vergelijken.

2. Materiaal en Methode

2.1 Stalen

Alle kweekdieren aanwezig op de kwekerij van het INBO in Linkebeek werden voorzien van een pit-tag met een uniek nummer (zie Appendix 1). Hierdoor is ieder individu traceerbaar. Tegelijk werd een vinknip genomen voor DNA analyse. De bekomen genotypes van de stalen kunnen op die manier ondubbelzinnig aan een kweekvis gekoppeld worden. De weefselstalen werden bewaard in 100% ethanol tot op het moment van verdere analyse. De herkomst van de onderzochte kweekvissen is verschillend. Een deel van de kweekvissen (24 individuen) is afkomstig van de experimentele viskwekerij in Tihange. De andere vissen zijn afkomstig van verschillende staalnames op de Maas in samenwerking met het Agentschap Natuur en Bos (zie Appendix 1).

2.2. DNA extractie, amplificatie en sequentiereactie

In totaal werden voor 81 individuen DNA extracties uitgevoerd met behulp van een Qiagen DNA extractie kit volgens de specificaties van de fabrikant. Het DNA gehalte werd gemeten en de kwaliteit van het DNA werd bepaald door middel van fotospectrometrie. Voor amplificatie werd het DNA verdund tot 5ng/µl.

2.3 Mitochondriale merker amplificatie cytochroom b

Om onze resultaten te kunnen vergelijken met eerder uitgevoerd onderzoek (Durand et al. 1997, Durand et al 1999a, b) kiezen we ervoor om een fragment van het cytochroom b van het mitochondriale genoom van kopvoorn te onderzoeken. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat de variatie in deze merker toelaat om de verschillende fylogeografische groepen te herkennen die in Europa voorkomen. Er werd gebruik gemaakt van de primers L15267 en H15891 (Durand et al. 1997). De samenstelling van de pcr-mix voor amplificatie van het fragment is weergegeven in Tabel 2.1. Het reactieverloop is weergegeven in Tabel 2.2.

Tabel 2.1: samenstelling pcr-mix voor amplificatie van het fragment cytochroom b. C: concentratie werkoplossing; sMQ H₂O: water; dNTP nucleotiden; Taq: DNA polymerase.

	1 reactie	C
sMQ H ₂ O	14.80 µl	
PCR buffer Roche (10x)	2.5 µl	1x
dNTP mix (10 mM)	0.5 µl	200 µM
L15267 primer (10 µM)	1 µl	400 nM
H15891 primer (10 µM)	1 µl	400 nM
Taq Roche (5 U/µl)	0.20 µl	1 U
DNA	5µl	1:100
Totaal Mix	20 µl	

Tabel 2.2: PCR reactieverloop amplificatie cytochroom b fragment

Stap	Temperatuur	Tijdsduur
Activatie	94°C	2 minuten
Denaturatie	94°C	30 seconden
Annealing	53°C	30 seconden
Elongatie	72°C	1 minuut
Polymerisatie	72°C	10 minuten
	4°C	10 minuten
Bewaring	15°C	pauze

Noot: Stap 2 tot en met vier wordt 35 keer herhaald

Na amplificatie van het fragment wordt er een opzuivering uitgevoerd met een DNA Clean & Concentrator kit (Zymo Research Corporation) volgens de instructies van de fabrikant. Ter controle wordt het opgezuiverde fragment op een agarose gel gevisualiseerd. Bij een positieve amplificatie wordt een sequentiereactie uitgevoerd in 20 µl reactievolume. Er wordt gebruik gemaakt van een BigDye V3.1 terminator kit. De samenstelling van de pcr-mix voor de sequentiereactie is weergegeven in Tabel 2.3. Het reactieverloop is weergegeven in Tabel 2.4.

Tabel 2.3: samenstelling pcr-mix voor sequentiereactie van het fragment cytochroom b met BigDye V3.1 terminator kit. sMQ H₂O: water; PCR template: opgezuiverd fragment cytochroom b.

	1 reactie
sMQ H ₂ O	13.60 µl
Buffer (5x)	3.50 µl
Ready Reaction Mix	1.00 µl
primer forward/reverse (10 µM)	0.40 µl
PCR template	1.50 µl
Totaal Mix	20.00 µl

Tabel 2.4: reactieverloop sequentiereactie cytochroom b fragment

Stap	Temperatuur	Tijdsduur
Activatie	96°C	1 minuut
Denaturatie	96°C	20 seconden
Annealing	50°C	20 seconden
Bewaring	4°C	pauze

Noot: Stap 2 tot en met vier wordt 35 keer herhaald

2.4 Kwaliteitscontrole, alignering en data analyse cytochroom b

Varianten van sequenties kunnen natuurlijk ontstaan door mutaties maar kunnen ook het gevolg zijn van afleesfouten door de gebruikte software of door het niet 100 procent correct verlopen van de pcr-reactie. Om deze toevallige fouten zo veel mogelijk te vermijden wordt een kwaliteitscontrole uitgevoerd. De kwaliteit van de bekomen sequenties werd op verschillende manieren nagegaan. De doelsequentie werd zowel in voorwaartse richting (forward:3'-5') als in achterwaartse richting (reverse: 5'-3') gesequeneerd. Het complement van de reverse sequentie werd bepaald met behulp van het programma Geneious en gealigneerd met de forward sequentie. De forward sequentie en het complement van de reverse sequentie is binnen één individu gelijk. Als er verschillen werden vastgesteld werden de piekenpatronen van beide sequenties nagekeken en de nodige correcties werden uitgevoerd. Voor sequenties met een singleton, dit is een sequentie met een variant die slechts één keer in de dataset voorkomt, werden de piekenpatronen extra nagekeken. Varianten die meerdere keren in de dataset voorkomen kunnen als betrouwbaar worden beschouwd. Immers, de kans op het meerdere keren voorkomen van een variant door een fout in het aflezen van het piekenpatroon is quasi nul. Ook dit is een bijkomende vorm van kwaliteitscontrole.

2.5 Microsatelliet analyse: DNA amplificatie

Er werd gebruik gemaakt van dezelfde DNA stalen als deze gebruikt voor de analyse van de cytochroom b merker. Op basis van de beschikbare literatuur werden in totaal 13 merkers geselecteerd (Tabel 2.5). De merkers werden opgedeeld in twee multiplex pcr-reacties. Amplificatie gebeurt met behulp van de Qiagen® Multiplex PCR kit volgens de instructies van de fabrikant in een 10 µl reactiemengsel. De specifieke reactiemengsels en reactiecondities voor elke multiplex reactie zijn weergegeven in Tabel 2.6, Tabel 2.7 en Tabel 2.8.

Tabel 2.5: Benaming en eigenschappen van de gebruikte primers. Locus: benaming van de primer; F-primer: sequentie van de forward primer; R-primer: sequentie van de reverse primer; range: verwachte lengte van de fragmenten; dye: gebruikte kleurstof voor de F-primer; motief: motief van de repeat (naar Vyskocilova et al. 2007).

Locus	F-primer	R-primer	range	dye	motief
LC32	CCTTCTGCATCCATCTCCTC	TCAGGGGTTTTAGCTCATGG	100–142	HEX	(AC)16
LC52	TGGGAGGGTTGTAATGCTTC	TGTATGAATTTGTTGTGTAGTC	98–108	FAM	(GT)9ATGC(AT)7C(AT)2
LC93	GTATCCAAGAAGCCACAACCA	TCTGCCGATCAATGCCGAAGC	242–248	FAM	(CTC)4N29(CT)10(CA)2
LC128	ACGCTGAGTGTTAGTTCTGTT	AGCCAGACGACAATAAATAT	153–203	NED	(CT)4GTCTTT(CT)24
LC254	CTGCGGTGCACAACATCCT	ACAATGCCCTAATTGCGAAG	161–163	FAM	(TG)3TATCTA(TG)2TCTA(TG)3
LC288	AAGAGCAGAGGAGAGCAGGG	TACCTGCAGGGGCATAGGC	178–237	HEX	(GA)3N19(GA)3N16(CT)3CA(CT)13(CA)44
LC27	TCCAGTTCTTCCTTCCTAATT	GCGGAGGGAGAGTATGTCAA	150–181	FAM	(CT)22(CACT)3(CT)2
LC45-1§	ACGACCTCTGTGCCGAAC	AGAGGTCAGGGGTCAGTAATG	174–189	HEX	(CT)5(GT)11TT(GT)4
LC45-2§	LC45 amplificeert twee loci		213–278	HEX	
LC94	GTATGTTTTGTGCCCGTGCC	ACACTCCGTCAACTCGCACT	252–306	NED	++
LC166	CACCCAAACACAACAGATGC	GAAGACCTGTGGCGCTAAAC	117–188	NED	(CT)3N12(CA)24
LC290	CCCTAATGGCCCTCAATACA	ACTTCGCTGGCTTGACAAAT	225–298	FAM	**
LC293	TTGCCCTCACCACACTAACA	CACAGATGCAGATCGAGGAG	100–146	HEX	(CT)5TTTTCTTT(CT)16

++(CA)27N37(TCAC)3(TC)3(AC)3G(CA)10N37(TC)10CC(TC)13N9(GT)3

**(GA)4N49(CT)13TT(CT)15CC(CT)2CC(CT)11CC(CT)3

Tabel 2.6: reactiemengsel voor multiplex 1 voor kopvoorn (10µl reactiemengsel)

Produkt	1 reactie	Eindconcentratie
Quiagen MM (2x)	5 µl	1x
LC32	0,1	1 µM
LC52	0,3	3 µM
LC93	0,1	1 µM
LC128	0,2	2 µM
LC254	0,05	0,5 µM
LC288	0,4	4 µM
DNA	1 µl	
mQ water	3,4	

Noot: Werkoplossingen primers 10µM**Tabel 2.7:** reactiemengsel voor multiplex 2 voor kopvoorn (10 µl reactiemengsel)

Produkt	1 reactie	Eindconcentratie
Quiagen MM (2x)	5 µl	1x
LC27	0,2	2 µM
LC45-1&2	0,2	2 µM
LC94	0,6	6 µM
LC166	0,1	1 µM
LC290	0,2	2 µM
LC293	0,2	2 µM
DNA	1 µl	
mQ water	3,15	

Noot: Werkoplossingen primers 10µM**Tabel 2.8:** PCR reactieverloop multiplex 1 en 2 voor kopvoorn

Stap	Temperatuur	Tijdsduur
Activatie	95°C	15 minuten
Denaturatie	95°C	30 seconden
Annealing	58°C	1 minuut 30 seconden
Elongatie	72°C	1 minuut
Polymerisatie	60°C	30 minuten
Bewaring	4°C	

Noot: Stap 2 tot en met vier wordt 30 keer herhaald

2.6 Genotypering en diversiteitsanalyse

De fragmenten worden gescheiden op een ABI 3130 capillaire sequencer van Applied Biosystems in de laboratoria van INBO Geraardsbergen. De data worden gegenotypeerd met behulp van het programma SAGA. De registratie van de allelen gebeurt gedeeltelijk automatisch maar wordt manueel nagekeken en zo nodig bijgestuurd. De meeste analyses met betrekking tot genetische variabelen worden uitgevoerd met het programma GENETIX v4.05.02 (Belkhir et al. 1986) tenzij anders aangegeven.

2.7 Structuuranalyse, detectie van verschillende groepen

Aan de hand van een structuuranalyse in het programma STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) werd nagegaan of de kweekpopulatie bestaat uit één homogene populatie of meerdere deelpopulaties. Er werd een analyse gedaan met een stijgend aantal groepen K van 1 tot en met 4. Telkens werd de waarschijnlijkheid van het aantal groepen berekend.

2.8 Simulatie ouderschapsanalyse

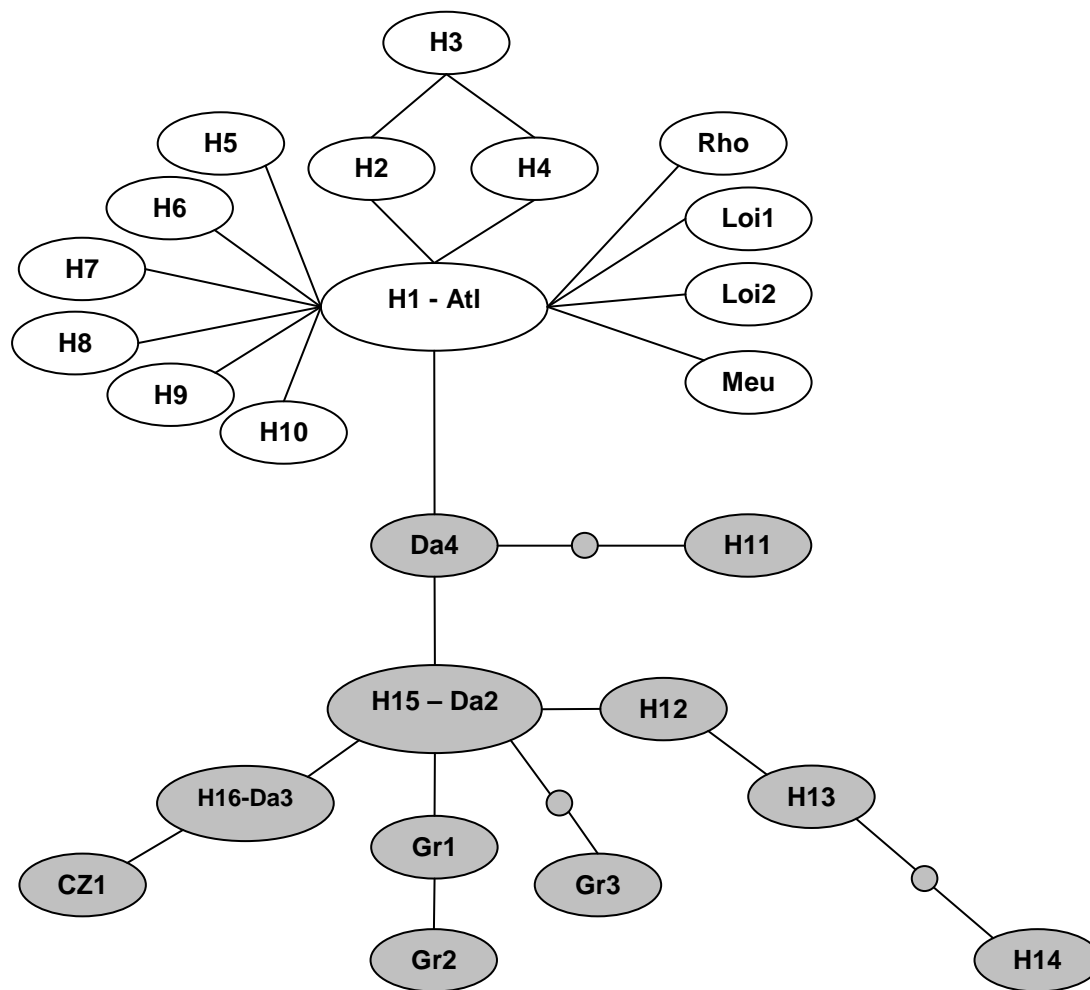
Om na te gaan of de resolutie van de geanalyseerde merkers hoog genoeg is om een ouderschapsanalyse uit te voeren werd een simulatie uitgevoerd in CERVUS 3.0. Hierbij gaan we ervan uit dat het geslacht van de ouders gekend is. We voeren een analyse uit met een stijgend aantal loci waarbij de volgorde bepaald wordt door de variabiliteit van de loci. Het meest variabele locus wordt als eerste opgenomen omdat dit het meeste resolutie geeft voor een ouderschapsanalyse, daarna wordt het locus toegevoegd met de op één na hoogste variabiliteit. Deze procedure wordt iteratief toegepast tot alle loci zijn opgenomen. Er werden 40 ouderdieren van elk geslacht gebruikt in de simulatie en het aantal nakomelingen werd op 1000 gehouden. Er wordt verondersteld dat de genotypes van alle mogelijke ouderdieren gekend zijn.

3. Resultaten

3.1 Variatie cytochroom b en haplotype diversiteit

In de 71 geanalyseerde individuen werden 15 verschillende haplotypes geobserveerd. De onderlinge genetische verschillen zijn gering. Deze sequenties werden vergeleken met gepubliceerde cytochroom b sequenties van kopvoorn bekend in Genbank.

Uit de literatuur zijn verschillende evolutionaire lijnen bekend met een specifieke geografische verspreiding binnen Europa (figuur 1.1): een Adriatische lijn, een Egeïsche lijn, een oostelijke lijn en een westelijke lijn. Alle door ons geanalyseerde individuen zijn verwant aan de westelijke lijn. Binnen deze westelijke lijn zijn er echter nog subtiele verschillen aanwezig, meer bepaald tussen het Donaubekken en het Atlantische bekken (Figuur 1.2). Het zijn deze verschillen die ons toelaten om niet-inheemse individuen met een Centraal-Europese origine te detecteren in de kweekpopulatie van kopvoorn. In figuur 3.1 zijn de genetische relaties tussen de verschillende haplotypes van de westelijke lijn weergegeven met behulp van een netwerk. Omwille van de kleine genetische verschillen tussen de haplotypes is een netwerk informatiever dan een boomstructuur om de relaties tussen de haplotypes voor te stellen.



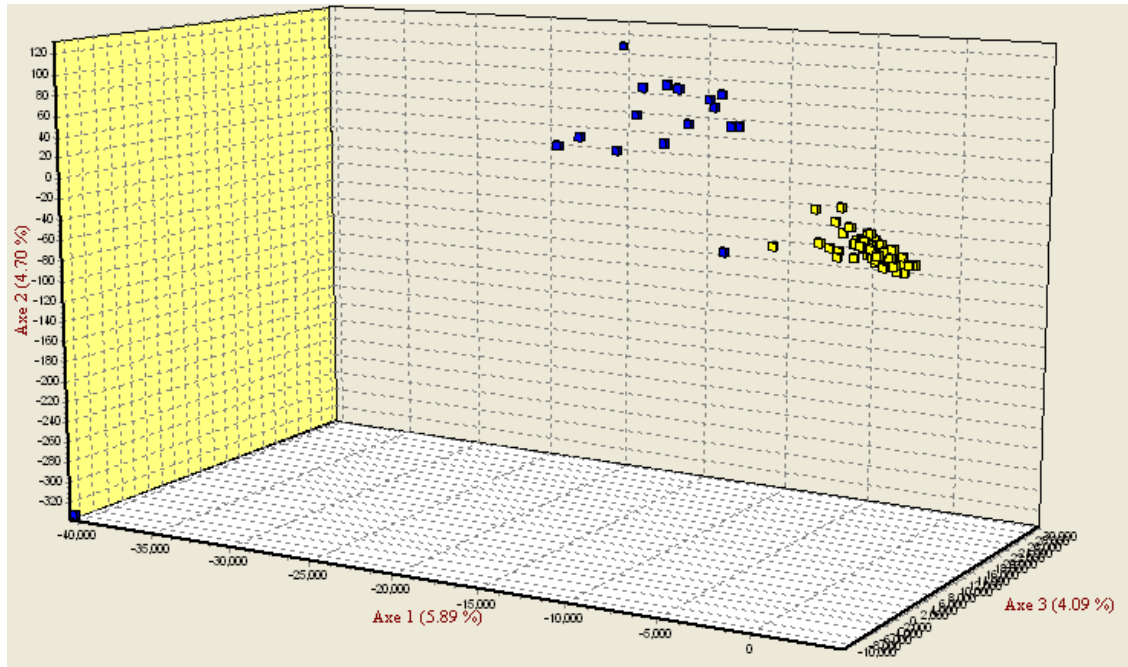
Figuur 3.1: Genetische relaties tussen de haplotypes van de westelijke lijn. Cirkels stellen elk één haplotype voor, verbindingslijnen wijzen op een mutatie tussen de haplotypes. Grijs cirkels staan voor de haplotypes van de Donau-groep, witte cirkels geven de haplotypes van de Atlantische groep weer. Lege cirkels staan voor theoretische haplotypes die niet werden bemonsterd. Haplotypes H1-H15 zijn haplotypes die in deze studie werden geobserveerd, de andere haplotypes werden gerapporteerd door Durand et al. (1997) en Durand et al. (1999a, b). Da: Donau; Gr: Grieks; CZ: Tsjechië; Atl: Atlantisch; Rho: Rhône; Meu: Maas; Loi: Loire.

De meeste onderzochte kweekvissen (61/71) zijn genetisch verwant met de Atlantische groep. Enkele vissen (10/71) toonden verwantschap met de Donau-groep. Een overzicht van tot welk haplotype elke geanalyseerde vis behoort is gegeven in appendix 1.

3.2 Microsatellieten: stuctuuranalyse, detectie van verschillende groepen

Een verkennende data-analyse van onze gegevens wijst uit dat de kweekpopulatie niet genetisch homogeen is (Figuur 3.2). De factoriële correspondentie analyse op basis van

de microsatelliet gegevens doet vermoeden dat er twee groepen in de dataset aanwezig zijn.



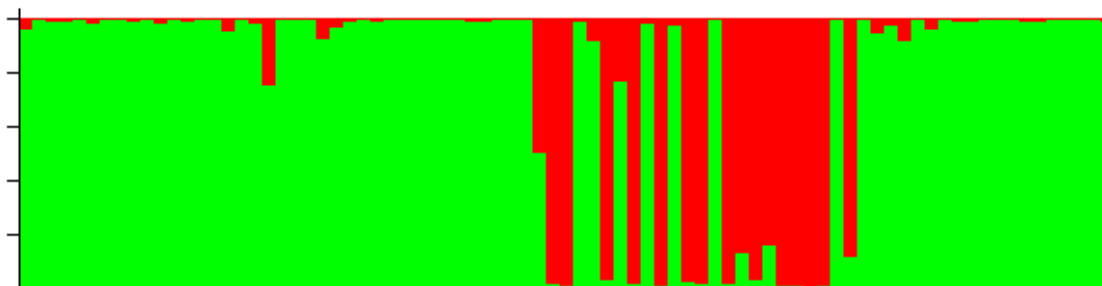
Figuur 3.2: resultaat van de factoriële correspondentie analyse. Groep 1 is in het geel weergegeven, Groep 2 in het blauw.

Er wordt een structuuranalyse uitgevoerd met het programma STRUCTURE om het aantal groepen in de dataset te bepalen. Op basis van de uitgevoerde analyse is het meest waarschijnlijke aantal groepen in onze dataset twee. Hiermee wordt het vermoeden van de factoriële correspondentie analyse bevestigd. In Tabel 3.1 zijn de resultaten van de structuuranalyse weergegeven voor één tot vier groepen. Het is duidelijk dat voor $K=2$ de hoogste (minst lage) waarschijnlijkheid wordt gevonden.

Tabel 3.1: resultaten van de structuuranalyse met K, aantal geteste groepen; LnP(D), maat voor de waarschijnlijkheid van het observeren van K-aantal groepen gegeven de dataset. LnP(D) is het gemiddelde van twee analyseruns met een burn-in van 100 000 en een daaropvolgende run van 100 000.

K	LnP(D)
1	-3808
2	-3657
3	-3687
4	-3766

STRUCTURE laat ook toe om te detecteren tot welke van de twee groepen de geanalyseerde individuen behoren. Er werden 64 individuen gevonden die tot Groep 1 behoren en 16 individuen die tot Groep 2 behoren (Figuur 3.3). Eén individu werd met gelijke kans aan beide groepen toegewezen. Alle individuen die door de factoriële correspondentieanalyse als afwijkend werden gevonden werden in een aparte groep ondergebracht. Welke stalen tot welke groep behoren is te vinden in appendix 1.



Figuur 3.3: resultaten van de structuuranalyse voor K=2. Elke verticale balk stelt een individu voor. De kleur van balken is representatief voor de groep waartoe een individu behoort. Groene balken staan voor Groep 1, rode balken voor Groep 2. Gemengde balken wijzen mogelijk op hybride of teruggekruiste individuen.

Op basis van de gevonden resultaten splitsen we de dataset op in twee groepen. Groep 1 bevat het grootste aantal individuen: 64. Groep 2 bestaat uit de individuen met een afwijkend genotype en het individu dat met gelijke kans aan beide groepen werd toegewezen: 17 individuen.

3.3 Vergelijking resultaten microsatellieten en cytochroom b.

Op basis van de cytochroom b analyse hadden we tien individuen gedetecteerd die een haplotype vertoonden dat verwant was met haplotypes van de Donau-groep. Op basis van de microsatelliet analyse onderscheiden we 17 individuen die afwijken van de andere individuen. Om na te gaan wat het verband is tussen het haplotype en de resultaten van de microsatelliet analyse maken we een vergelijking tussen beide. Alle individuen die op basis van de microsatellieten tot Groep 1 behoren hebben een haplotype dat verwant is met de Atlantische groep (Appendix 1). Voor de individuen van Groep 2 vinden we zowel haplotypes terug die verwant zijn met de Donau-groep, als haplotypes die tot de Atlantische groep behoren (Tabel 3.2).

Tabel 3.2: Overzicht van de haplotypes voor cytochroom b van de individuen die op basis van de microsatellieten tot Groep 2 behoren. De haplotypes die verwant zijn met de Donau-groep zijn in grijs gearceerd.

pittag	soort	labocode	haplotype	microsat groep	Herkomst
00-066D-EBF6	<i>S. cephalus</i>	C/08/1456	H11	2	Tihange
00-0671-287D	<i>S. cephalus</i>	C/08/1457	H1 - Atl	2	Tihange
00-066E-278D	<i>S. cephalus</i>	C/08/1458	H15 - Da2	2	Tihange
00-0671-2302	<i>S. cephalus</i>	C/08/1461	H1 - Atl	2	Tihange
00-066E-0BDA	<i>S. cephalus</i>	C/08/1463	H12	2	Tihange
00-0671-1BE9	<i>S. cephalus</i>	C/08/1465	H3	2	Tihange
00-066D-EB7B	<i>S. cephalus</i>	C/08/1467	H13	2	Tihange
00-066D-D799	<i>S. cephalus</i>	C/08/1468	H16 - Da3	2	Tihange
00-0670-097B	<i>S. cephalus</i>	C/08/1470	H2	2	Tihange
00-066D-DBE9	<i>S. cephalus</i>	C/08/1471	H4	2	Tihange
00-0670-14E1	<i>S. cephalus</i>	C/08/1472	no data	2	Tihange
00-066F-F0C8	<i>S. cephalus</i>	C/08/1473	H11	2	Tihange
00-066D-DD3C	<i>S. cephalus</i>	C/08/1474	H11	2	Tihange
00-0671-1C7F	<i>S. cephalus</i>	C/08/1475	H14	2	Tihange
00-066D-DF4A	<i>S. cephalus</i>	C/08/1476	H11	2	Tihange
00-0671-0E2C	<i>S. cephalus</i>	C/08/1477	H11	2	Tihange
00-0671-3723	<i>S. cephalus</i>	C/08/1479	no data	2	Tihange

Het is duidelijk dat niet alle individuen die op basis van de microsatellieten afwijken van de meerderheid van de stalen ook afwijken op basis van de mitochondriale merker. Minstens vijf van de 17 individuen die afwijken voor microsatelliet gegevens vertonen een haplotype dat verwant is met de Atlantische groep. Tien individuen die een haplotype vertonen dat verwant is met de Donau-groep zijn eveneens afwijkend op basis van de microsatellieten. Voor twee individuen die afwijken op basis van de microsatellieten werden geen gegevens bekomen voor de mitochondriale merker cytochroom b.

3.4 Diversiteit van de kweekpopulatie van kopvoorn

Met uitzondering van locus LC254 zijn alle geanalyseerde loci polymorf in de onderzochte kweekpopulatie. Tussen de polymorfe loci varieert het aantal allelen van 4 tot 22 (Tabel 3.3). De heterozygositeit varieert van 0,105 tot 0,886. Het gemiddeld aantal allelen en de gemiddelde heterozygositeit van zowel Groep 1 als Groep 2 is hoog. Rekening houdend met het relatief laag aantal individuen mogen we de genetische diversiteit van Groep 2 zelfs hoger inschatten dan die van Groep 1.

Tabel 3.3: diversiteitsparameters voor alle onderzochte kweekdieren van kopvoorn. # allelen: aantal verschillende allelen per locus; H_e : verwachte heterozygositeit. De gegevens zijn telkens weergegeven voor de twee groepen en voor het aantal allelen ook voor beide groepen samen (totaal).

Merker	# allelen			H_e	
	Groep 1	Groep 2	Totaal	Groep 1	Groep 2
LC27	8	8	12	0,672	0,855
LC32	11	13	16	0,831	0,893
LC45_1	7	9	10	0,523	0,843
LC45_2	6	10	10	0,553	0,853
LC52	3	5	5	0,105	0,356
LC93	4	6	6	0,671	0,479
LC94	22	11	24	0,883	0,860
LC128	20	13	25	0,743	0,886
LC166	16	9	21	0,832	0,600
LC254	1	1	1	monomorf	monomorf
LC288	15	14	24	0,851	0,896
LC290	19	12	26	0,814	0,886
LC293	9	9	13	0,809	0,832
gemiddeld	10,84	9,23	14,85	0,690	0,770

3.5 Simulatie ouderschapsanalyse

De resultaten van de simulatie van de ouderschapsanalyse zijn weergegeven in Tabel 3.4. Voor een stijgend aantal loci dat wordt geanalyseerd is telkens het percentage ouderparen weergegeven dat ondubbelzinnig aan een nakomeling kan worden toegewezen.

Tabel 3.4: resultaten toewijzingsanalyse. # loci: gebruikt aantal loci met toevoeging van telkens het meest variabele van de overblijvende variabele loci; % toewijzing ouderpaar: aantal ouderparen dat ondubbelzinnig kon worden toegewezen aan de nakomelingen.

# loci	% toewijzing ouderpaar
1	0
2	2
3	18
4	40
5	82
6	95
7	97
8	100
9	100
10	100
11	100
12	100

Vanaf acht loci kan een ouderschapsanalyse worden uitgevoerd waarbij ondubbelzinnig het ouderkoppel kan worden toegewezen. Deze resultaten tonen aan dat het aantal allelen en hun frequentie een gedetailleerde ouderschapsanalyse toelaat.

4. Discussie

4.1 Detectie van uitheemse genetische lijnen

4.1.1 *Cytochrom b*

Binnen Europa zijn verschillende evolutionaire lijnen van kopvoorn bekend. Er is een duidelijke geografische indeling tussen de verschillende evolutionaire lijnen waarbij de oostelijke lijn beperkt is tot rivierbekkens die uitmonden in de Zwarte en de Baltische Zee. De Egeïsche lijn komt slechts in een beperkt gebied voor in het oosten van Griekenland en de Adriatische lijn is terug te vinden in rivierbekkens die in de Adriatische zee uitmonden. De Westelijke lijn kent de ruimste verspreiding en komt voor van Griekenland doorheen het Donaubekken en in de rivieren die uitmonden in de Noordzee, het noordelijke deel van de Middellandse Zee en de Atlantische Oceaan. Binnen de Westelijke lijn bestaan er subtiele genetische verschillen tussen het Griekse deel en het Donaubekken enerzijds en het Mediterrane en Atlantische bekken anderzijds. Er zijn drie groepen te herkennen: de Griekse groep, de Donau-groep en de Atlantische groep. De geografische spreiding tussen de Donau-haplotypes en de Atlantische haplotypes is erg strikt. Enkel in de bovenloop van de Rijn en de Elbe vinden we beide types terug. Alle andere populaties worden gekenmerkt door de aanwezigheid van slechts één genetische variant waarbij de Atlantische haplotypes in het westen voorkomen en de Donau haplotypes in het oosten en het zuiden van het verspreidingsgebied.

Op basis van de mitochondriale analyses werden tien individuen met een haplotype gedetecteerd dat verwant is aan de haplotypes van de Donau-groep. Het voorkomen van Donau-haplotypes in de kweekpopulatie wijst op de artificiële introductie van poot- of kweekvis uit het Donaubekken naar onze regio. De Donau-haplotypes werden enkel aangetroffen in een aantal kweekdieren met herkomst Tihange. In de recente stalen uit de Maas werden geen uitheemse haplotypes teruggevonden.

De aanwezigheid van uitheemse lijnen in onze rivieren werd overigens enkele jaren geleden al vastgesteld. De analyse van een staal pootvis van kopvoorn bestemd voor uitzetting in de Nete in 2000 bevatte eveneens Donau-haplotypes (Maes et al. 2000). Ook de aankoop van pootvis in het verleden waarvan de afkomst onduidelijk was of waarvan de afkomst Centraal-Europees was kan ertoe hebben bijgedragen dat natuurlijke populaties in Vlaanderen uitheemse haplotypes kunnen bevatten. Momenteel is het niet duidelijk hoeveel uitheemse haplotypes aanwezig zijn in onze rivieren en of deze zich hebben kunnen handhaven en of ze uitkruisen met inheemse haplotypes.

4.1.2 *Microsatelliet analyse*

Ook op basis van de microsatelliet merkers stelden we vast dat we verschillende genetische groepen kunnen onderscheiden in de onderzochte kweekdieren. In Groep 2

vinden we 17 individuen die genetisch afwijken van Groep 1 met 64 individuen. Net als voor cytochroom b hebben alle afwijkende individuen van Groep 2 de herkomst Tihange. Alle kweekdieren gevangen in de Maas behoren tot Groep 1.

Een aantal individuen die tot Groep 2 behoren, vertonen een haplotype dat kenmerkend is voor genetische lijnen die tot de Donau-groep behoren. Het is dus logisch dat deze individuen ook een afwijkend genotype voor microsatellieten vertonen. Wat we echter ook vaststellen is dat er individuen zijn die tot Groep 2 behoren voor de microsatellieten maar die toch een haplotype hebben dat tot de Atlantische groep behoort. De meest waarschijnlijke hypothese is dat de individuen met een afwijkend genotype voor de microsatellieten hybriden zijn tussen Donau-lijnen en Atlantische lijnen. Afhankelijk van wat het haplotype van de moeder van deze hybriden was kunnen ze zowel een Atlantisch als een Donau-haplotype bezitten.

4.1.3 Detectie van uitheemse lijnen aan de hand van moleculaire merkers

Als conclusie kunnen we stellen dat de analyse van cytochroom b niet voldoende is om uitheemse lijnen of hybriden tussen inheemse en uitheemse individuen te detecteren. Microsatellieten geven een hogere resolutie en kunnen wel een onderscheid tussen de genetische groepen aantonen. Bovendien geven microsatellieten extra informatie over diversiteit en is het mogelijk om aan de hand van microsatellieten meer gedetailleerde analyses te doen zoals bijvoorbeeld ouderschapsanalyses. We raden daarom aan om de kweekdieren en eventuele nieuwe individuen op de kwekerij te screenen met microsatellieten.

4.2 Diversiteit van de kweekpopulatie

De kweekpopulatie die in de toekomst zal worden gebruikt voor de kweek van kopvoorn bestaat uit de dieren van Groep 2. De dieren van Groep 1 bevatten uitheems materiaal en kunnen enkel nog voor experimentele doeleinden worden gebruikt. De bespreking van de diversiteit van de kweekpopulatie omvat dan ook enkel de resultaten voor Groep 2.

Er zijn geen gegevens beschikbaar over de diversiteit van natuurlijke onverstoorde populaties van kopvoorn in Vlaanderen of in regio's die aan Vlaanderen grenzen. Dit is de eerste studie die gebruik maakt van de recent ontwikkelde microsatelliet merkers.

Ook zonder de individuen met een uitheems karakter varieert het aantal allelen van 5 tot 14 per locus met een gemiddelde van 9,23 allelen per locus. De heterozygositeit varieert tussen 0,356 en 0,886 met een gemiddelde van 0,770. Dit zijn hoge waarden voor deze parameters. Op basis van de hoge diversiteit van de onderzochte individuen en gegeven de oorsprong van het overgrote deel van de kweekdieren uit de Maas vermoeden we dat

de genetische diversiteit van de kweekpopulatie de referentietoestand van een gezonde populatie benadert. Uiteraard is het nuttig om het onderzoek te voeren op een ruimere Europese schaal om een meer gedetailleerde inschatting van de situatie te maken.

Ook een onderzoek van de toestand in de Belgische populaties lijkt ons interessant. Een dergelijk onderzoek zal een beter inzicht geven in de toestand van de Belgische populaties. Het is aangetoond dat er in het verleden in de Grote Nete pootvis is uitgezet van uitheemse origine en ook in de Dijle werden uitheemse lijnen aangetroffen (Maes et al. 2000). Nu zijn de merkers beschikbaar om een gedetailleerd onderzoek uit te voeren naar de graad van introgressie van deze uitheemse genotypes in de natuurlijke populaties. Het kan ook interessant zijn om de evolutie van de genetische samenstelling in een aantal Vlaamse populaties na te gaan aan de hand van microsatelliet merkers. Er zijn immers stalen van 2000 beschikbaar (Maes et al. 2000). Een analyse van deze 'historische' stalen met de recent beschikbare microsatelliet merkers en een vergelijking met stalen van de huidige populatie laat toe een inschatting te maken van de temporele wijzigingen in de genetische structuur van deze populaties.

Indien een aantal buitenlandse referentiepopulaties worden onderzocht kan mogelijk de bron van het uitheems materiaal dat zich in onze rivieren bevindt gedetecteerd worden. Er kan dan ook een vergelijking gemaakt worden tussen de genetische diversiteit van populaties in verschillende regio's binnen het verspreidingsgebied van de soort.

4.3 Aanvullen van de kweekpopulatie

Kopvoorn kent een hoge mortaliteit bij de vrouwelijke dieren na het afpaaien, zowel in natuurlijke als in kweekpopulaties. Hierdoor zal in kwekerijen het aantal broeddieren regelmatig moeten worden aangevuld. Hiervoor kan een deel van de gekweekte vis worden doorgekweekt tot ouderdieren of men kan ouderdieren uit rivieren onttrekken om mee te kweken. Onze analyses tonen aan dat er onder de kweekdieren van de kwekerij van het INBO uitheemse genetische lijnen aanwezig zijn. Nakomelingen van kruisingen waarbij deze uitheemse lijnen betrokken zijn, zijn niet geschikt voor een duurzame kweek in het kader van soortbeschermings- of soortherstelprogramma's. Momenteel is het zo dat op de kwekerij van het INBO een 250-tal 3-jarige kopvoorns aanwezig zijn. We raden aan om deze enkel voor experimentele doeleinden te gebruiken wegens een hoge kans op aanwezigheid van uitheems materiaal. Bovendien is de genetische basis van deze populatie vermoedelijk vrij laag.

In afwachting van een betrouwbare kweekpopulatie die genetisch gescreend is en waarvan de origine gedocumenteerd is zal het noodzakelijk zijn om nieuwe ouderdieren

te introduceren uit rivieren. Het is uiterst belangrijk om kweekdieren die uit rivieren in Vlaanderen worden verzameld genetisch te analyseren om te voorkomen dat pootvis wordt gekweekt vertrekkende van uitheemse genetische lijnen die in onze rivieren aanwezig kunnen zijn. Uit onze resultaten blijkt dat alle in 2006 en 2007 gevangen kweekdieren voor de kwekerij van INBO-Linkebeek uit de Maas behoren tot de Atlantische haplotypes. Ook de microsatellieten wijzen op een genetisch homogene populatie in de Maas met een zeer hoge diversiteit. De Maas kan dus worden beschouwd als een zuivere Atlantische populatie, of het aandeel aan uitheemse lijnen is ondetecteerbaar met de huidige aantallen stalen. Op basis van de genetische analyses kan de Maas beschouwd worden als een veilige bronpopulatie voor het verzamelen van nieuwe kweekdieren ter vervanging van eerder gebruikte kweekdieren of ter vervanging van kweekdieren met een uitheems genetisch profiel. Het uitzetten van uitsluitend inheemse haplotypes zal er verder toe bijdragen dat de vroeger uitgezette uitheemse haplotypes verdund worden en dat de oorspronkelijk aanwezige genetische lijnen kunnen blijven voortbestaan.

4.4 Risico's verbonden aan het herbepoten met uitheemse genetische lijnen

Het meest voor de hand liggende risico is dat de uitgezette uitheemse dieren weinig of niet aangepast zijn aan de lokale omstandigheden. Zij hebben immers een andere historische en evolutionaire geschiedenis dan lokale populatie en zullen mogelijk andere aanpassingen vertonen. Voorbeelden zijn: een hogere vatbaarheid voor parasieten en ziekte, slecht aangepast aan seizoenaal gebonden factoren (temperatuursverschillen, zuurstofschommelingen, afwijkend dag-nacht ritme bij bepalen van de paaiperiode...) of slecht aangepast aan predatoren. Dit zal leiden tot een beperkte overleving en een beperkte of afwezige voortplanting van de uitheemse lijnen. Vanuit een herbepotingsstrategie is het dus weinig duurzaam om uitheemse lijnen te gebruiken vanwege de onzekerheid over de overlevingskansen en het voortplantingssucces van de uitgezette populatie.

Daarnaast is er een tweede risico bij het uitzetten van uitheemse lijnen. Het kan gebeuren dat er weinig of geen negatieve effecten worden ondervonden door de uitgezette individuen. In dat geval kunnen de uitgezette individuen zich voortplanten. Indien er een lokale populatie aanwezig is en het aantal uitgezette individuen groot is ten opzichte van de lokale individuen zullen een groot aantal nakomelingen bestaan uit hybride individuen (kruisingen tussen in- en uitheemse lijnen). Hierbij wordt het inheemse genetische materiaal zo veel verdund dat het risico bestaat dat het op termijn verdwijnt. Bij uitkruising worden ook zogenaamde ge-co-adapteerde gencomplexen

verbroken. Dit zijn complexen van meerdere genen die wanneer bepaalde varianten samen voorkomen een gunstig effect hebben op de fitness. Bij het verbreken van deze complexen door uitkruisen lopen de nakomelingen het risico om minder goed aangepast te zijn dan elk van hun ouders, zoi het inheems of uitheems. Dit fenomeen noemt men *outbreeding depression*. Dit zal een bijkomend negatief effect hebben op de duurzame overleving van de populatie.

Dit genetisch verdunningseffect werkt natuurlijk ook in de omgekeerde richting. In populaties waar *accidenteel* uitheemse lijnen werden uitgezet kan dit genetisch materiaal verdund worden door het stockeren van inheemse lijnen. Door relatief grote aantallen inheemse individuen uit te zetten ten opzichte van het aantal uitheemse individuen en de uitzettingsinspanning gedurende langere tijd vol te houden kan het risico op *outbreeding depression* beperkt blijven omdat het aandeel van hybride vissen op die manier laag wordt gehouden. Door voortdurende kruising met inheemse individuen zullen de uitheemse lijnen op termijn geen invloed meer hebben op de lokale lijnen.

Appendix 1: Overzicht van de geanalyseerde kopvoorns. De code van de pittag is weergegeven, evenals de code gebruikt bij de analyse in het laboratorium en het haplotype waartoe de vis behoort.

pittag	soort	labocode	haplotype	microsat groep	Herkomst
00-066D-EBF6	<i>S. cephalus</i>	C/08/1456	H11	2	Tihange
00-0671-287D	<i>S. cephalus</i>	C/08/1457	H1 - Atl	2	Tihange
00-066E-278D	<i>S. cephalus</i>	C/08/1458	H15 - Da2	2	Tihange
00-066D-E683	<i>S. cephalus</i>	C/08/1459	H1 - Atl	1	Tihange
00-066D-D5C5	<i>S. cephalus</i>	C/08/1460	H1 - Atl	1	Tihange
00-0671-2302	<i>S. cephalus</i>	C/08/1461	H1 - Atl	2	Tihange
00-066E-05E2	<i>S. cephalus</i>	C/08/1462	H1 - Atl	1	Tihange
00-066E-0BDA	<i>S. cephalus</i>	C/08/1463	H12	2	Tihange
00-066D-EE30	<i>S. cephalus</i>	C/08/1464	H2	1	Tihange
00-0671-1BE9	<i>S. cephalus</i>	C/08/1465	H3	2	Tihange
00-066D-E347	<i>S. cephalus</i>	C/08/1466	H1 -Atl	1	Tihange
00-066D-EB7B	<i>S. cephalus</i>	C/08/1467	H13	2	Tihange
00-066D-D799	<i>S. cephalus</i>	C/08/1468	H16 -Da3	2	Tihange
00-066E-27F9	<i>S. cephalus</i>	C/08/1469	H1 -Atl	1	Tihange
00-0670-097B	<i>S. cephalus</i>	C/08/1470	H2	2	Tihange
00-066D-DBE9	<i>S. cephalus</i>	C/08/1471	H4	2	Tihange
00-0670-14E1	<i>S. cephalus</i>	C/08/1472	no data	2	Tihange
00-066F-F0C8	<i>S. cephalus</i>	C/08/1473	H11	2	Tihange
00-066D-DD3C	<i>S. cephalus</i>	C/08/1474	H11	2	Tihange
00-0671-1C7F	<i>S. cephalus</i>	C/08/1475	H14	2	Tihange
00-066D-DF4A	<i>S. cephalus</i>	C/08/1476	H11	2	Tihange
00-0671-0E2C	<i>S. cephalus</i>	C/08/1477	H11	2	Tihange
00-0670-083F	<i>S. cephalus</i>	C/08/1478	H1 - Atl	1	Tihange
00-0671-3723	<i>S. cephalus</i>	C/08/1479	no data	2	Tihange
00-068B-GE8E	<i>S. cephalus</i>	C/07/4162	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-068B-06F0	<i>S. cephalus</i>	C/07/4163	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-68B-5697	<i>S. cephalus</i>	C/07/4164	no data	1	MAAS BDN 2007
00-68B-76CB	<i>S. cephalus</i>	C/07/4165	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-68B-794E	<i>S. cephalus</i>	C/07/4166	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-068B-8AB1	<i>S. cephalus</i>	C/07/4167	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-68A-B444	<i>S. cephalus</i>	C/07/4168	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-68A-E323	<i>S. cephalus</i>	C/07/4169	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-068A-C594	<i>S. cephalus</i>	C/07/4170	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-68B-8DA8	<i>S. cephalus</i>	C/07/4171	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-066D-E950	<i>S. cephalus</i>	C/07/4172	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-066D-C72E	<i>S. cephalus</i>	C/07/4173	H8	1	MAAS BDN 2007
00-0671-3466	<i>S. cephalus</i>	C/07/4174	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-066E-2AE9	<i>S. cephalus</i>	C/07/4175	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-066D-CEF0	<i>S. cephalus</i>	C/07/4176	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-066E-1787	<i>S. cephalus</i>	C/07/4177	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-066E-0DD1	<i>S. cephalus</i>	C/07/4178	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-0671-15DA	<i>S. cephalus</i>	C/07/4179	H1 - Atl	1	MAAS BDN 2007
00-066E-2203	<i>S. cephalus</i>	C/08/1480	H9	1	maas, borgharen NL
00-066E-0696	<i>S. cephalus</i>	C/08/1481	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL
00-0670-0434	<i>S. cephalus</i>	C/08/1482	H4	1	maas, borgharen NL
00-0671-25BE	<i>S. cephalus</i>	C/08/1483	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL
00-066D-FE3F	<i>S. cephalus</i>	C/08/1484	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL

00-066D-F29A	<i>S. cephalus</i>	C/08/1485	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL
00-066D-C442	<i>S. cephalus</i>	C/08/1486	H10	1	maas, borgharen NL
00-066E-034A	<i>S. cephalus</i>	C/08/1487	H10	1	maas, borgharen NL
00-0671-2BD2	<i>S. cephalus</i>	C/08/1488	H3	1	maas, borgharen NL
00-066D-E089	<i>S. cephalus</i>	C/08/1489	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL
00-066D-E85E	<i>S. cephalus</i>	C/08/1490	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL
00-0671-3649	<i>S. cephalus</i>	C/08/1491	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL
00-066E-0C8E	<i>S. cephalus</i>	C/08/1492	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL
00-0671-40BB	<i>S. cephalus</i>	C/08/1493	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL
00-0671-3954	<i>S. cephalus</i>	C/08/1494	H3	1	maas, borgharen NL
00-066D-CA7D	<i>S. cephalus</i>	C/08/1495	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL
00-066D-D49A	<i>S. cephalus</i>	C/08/1496	no data	1	maas, borgharen NL
00-066D-55F4	<i>S. cephalus</i>	C/08/1497	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL
00-066D-D5EA	<i>S. cephalus</i>	C/08/1498	no data	1	maas, borgharen NL
00-068A-DE64	<i>S. cephalus</i>	C/07/4180	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-066D-EA84	<i>S. cephalus</i>	C/07/4181	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-066D-CB98	<i>S. cephalus</i>	C/07/4182	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-066B-9C9D	<i>S. cephalus</i>	C/07/4183	H6	1	maas, borgharen NL 2007
00-068A-A144	<i>S. cephalus</i>	C/07/4184	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-068B-929B	<i>S. cephalus</i>	C/07/4185	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-068B-212B	<i>S. cephalus</i>	C/07/4186	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-068B-4EC6	<i>S. cephalus</i>	C/07/4187	H2	1	maas, borgharen NL 2007
00-068B-81AB	<i>S. cephalus</i>	C/07/4188	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-068B-7401	<i>S. cephalus</i>	C/07/4189	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-068B-1858	<i>S. cephalus</i>	C/07/4190	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-068B-57E3	<i>S. cephalus</i>	C/07/4191	H2	1	maas, borgharen NL 2007
00-068B-6738	<i>S. cephalus</i>	C/07/4192	H7	1	maas, borgharen NL 2007
00-068A-D474	<i>S. cephalus</i>	C/07/4193	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-068B-7452	<i>S. cephalus</i>	C/07/4194	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-068A.C94C	<i>S. cephalus</i>	C/07/4195	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-068B-73FD	<i>S. cephalus</i>	C/07/4196	H5	1	maas, borgharen NL 2007
00-068A-CE67	<i>S. cephalus</i>	C/07/4197	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-068B-9524	<i>S. cephalus</i>	C/07/4198	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007
00-068B-8690	<i>S. cephalus</i>	C/07/4199	H1 - Atl	1	maas, borgharen NL 2007

Appendix 2: Genotypes van alle onderzochte kweekdieren van kopvoorn voor de onderzochte merkers. De codes van de individuen van Groep 2 zijn grijs gearceerd.

Pittag code	Soort	Labocode	LC27	LC32	LC45_1	LC45_2	LC52	LC93	LC94	LC128	LC166	LC254	LC288	LC290	LC293
00 068B GE8E	<i>S. cephalus</i>	C_07_4162	166166	109111	177177	272272	100100	243249	274296	179195	113113	162162	212224	233239	111113
00 068B 06F0	<i>S. cephalus</i>	C_07_4163	170170	109111	177177	272272	100100	242245	294298	185189	143155	162162	188224	235235	107109
00 68B 5697	<i>S. cephalus</i>	C_07_4164	166192	121129	177193	272286	100100	245249	272298	179181	123143	162162	220228	223233	105111
00 68B 76CB	<i>S. cephalus</i>	C_07_4165	166166	111129	177187	272284	100100	243249	270270	179241	113159	162162	188208	233311	105107
00 68B 794E	<i>S. cephalus</i>	C_07_4166	154166	121125	177187	272284	100100	242242	270296	185185	123159	162162	222224	233271	097117
00 068B 8AB1	<i>S. cephalus</i>	C_07_4167	166170	109121	177185	272286	100100	243245	270304	189209	123185	162162	228230	233233	105107
00 68A B444	<i>S. cephalus</i>	C_07_4168	166166	111125	177187	272284	100100	242245	270270	179185	113143	162162	224232	239239	097103
00 68A E323	<i>S. cephalus</i>	C_07_4169	166190	109125	177187	272284	100100	243243	296296	185187	113123	162162	228228	237239	107107
00 068A C594	<i>S. cephalus</i>	C_07_4170	166170	111125	177177	272272	100100	243245	270304	179205	113113	162162	230230	233235	109111
00 68B 8DA8	<i>S. cephalus</i>	C_07_4171	166166	109121	189193	282286	100100	243249	272282	179179	123143	162162	230232	239305	105107
00 066D E950	<i>S. cephalus</i>	C_07_4172	154154	119129	177177	272272	100100	243245	292296	179185	123181	162162	208224	239239	103111
00 066D C72E	<i>S. cephalus</i>	C_07_4173	166166	109125	177177	272272	100100	242249	272290	179185	113113	162162	226228	235239	097105
00 0671 3466	<i>S. cephalus</i>	C_07_4174	166166	117129	177177	272272	104104	243245	262270	179203	159159	162162	228232	233235	097105
00 066E 2AE9	<i>S. cephalus</i>	C_07_4175	166166	111129	177177	272272	100100	243249	296296	179205	113159	162162	222228	233308	105113
00 066D CEF0	<i>S. cephalus</i>	C_07_4176	166174	109109	177177	272272	100100	243245	296300	179181	165165	162162	228228	239239	105107
00 066E 1787	<i>S. cephalus</i>	C_07_4177	166190	117125	177189	272282	100100	245245	276308	173185	113159	162162	224228	239271	105111
00 066E ODD1	<i>S. cephalus</i>	C_07_4178	190192	109109	177177	272272	100100	243249	270296	177185	123123	162162	228228	235235	105105
00 0671 15DA	<i>S. cephalus</i>	C_07_4179	154170	123125	177193	272286	100100	242243	270284	179189	123143	162162	226240	235235	107111
00 068A DE64	<i>S. cephalus</i>	C_07_4180	166170	119125	177183	272278	100100	245245	292292	179201	113173	162162	208230	233235	097105
00 066D EA84	<i>S. cephalus</i>	C_07_4181	166166	111125	185193	286286	100100	243245	290296	179179	123181	162162	226228	235235	111113
00 066D CB98	<i>S. cephalus</i>	C_07_4182	166192	121125	177177	272272	100100	243245	270290	179179	123143	162162	214224	271281	103107
00 066B 9C9D	<i>S. cephalus</i>	C_07_4183	190190	111111	177177	272272	100100	245245	270296	181185	123143	162162	220228	271271	097107
00 068A A144	<i>S. cephalus</i>	C_07_4184	154190	121129	177187	272284	100100	245245	280280	181185	113159	162162	228232	233243	105107
00 068B 929B	<i>S. cephalus</i>	C_07_4185	166172	109109	177189	272282	100100	245245	270298	179179	159163	162162	188230	235239	107107
00 068B 212B	<i>S. cephalus</i>	C_07_4186	154166	111129	177189	272282	100100	243249	274274	179179	123143	162162	214226	233239	105105
00 068B 4EC6	<i>S. cephalus</i>	C_07_4187	166166	111125	187193	284286	100100	243243	270296	185185	113113	162162	226230	233235	105107
00 068B 81AB	<i>S. cephalus</i>	C_07_4188	166170	117117	177177	272272	100100	245245	272282	179185	113173	162162	226228	271305	105113
00 068B 7401	<i>S. cephalus</i>	C_07_4189	166170	109133	177177	272272	100100	243249	296296	179179	113159	162162	226228	239239	097111
00 068B 1858	<i>S. cephalus</i>	C_07_4190	190190	109111	177177	272272	100100	245245	282288	185185	123181	162162	226228	239271	097111

00 068B 57E3	<i>S. cephalus</i>	C_07_4191	166170	121125	177177	272272	100100	242245	270296	179179	113123	162162	220228	235271	107107
00 068B 6738	<i>S. cephalus</i>	C_07_4192	166166	111125	177187	270284	100100	243249	268292	179179	113123	162162	226228	239301	103107
00 068A D474	<i>S. cephalus</i>	C_07_4193	166190	129129	177187	272284	100100	243243	268300	179179	123133	162162	220232	235239	097105
00 068B 7452	<i>S. cephalus</i>	C_07_4194	154166	109111	177177	272272	104104	243245	290296	179179	159159	162162	220222	235239	097097
00 068A.C94C	<i>S. cephalus</i>	C_07_4195	166190	129129	177185	272286	100100	243245	278278	185185	143185	162162	224226	233239	097109
00 068B 73FD	<i>S. cephalus</i>	C_07_4196	166166	109109	177177	272272	100100	245249	270270	171189	143181	162162	224226	239314	105113
00 068A CE67	<i>S. cephalus</i>	C_07_4197	166192	109121	177187	272284	100100	243245	274296	179185	113123	162162	224228	239239	105113
00 068B 9524	<i>S. cephalus</i>	C_07_4198	166174	109111	177193	272286	100100	245249	288300	185185	113159	162162	220228	235301	097105
00 068B 8690	<i>S. cephalus</i>	C_07_4199	166174	109117	177177	272272	100102	249249	272296	179197	123123	162162	224232	239239	107111
00 066D EBF6	<i>S. cephalus</i>	C_08_1456	166174	125129	185185	286286	100100	242245	270274	179179	137183	162162	190256	227233	107113
00 0671 287D	<i>S. cephalus</i>	C_08_1457	154166	9195	183183	278278	100100	237245	266272	181203	113143	162162	196220	233245	105115
00 066E 278D	<i>S. cephalus</i>	C_08_1458	154172	121123	187191	282286	100100	243245	270278	149183	113113	162162	194216	230245	107137
00 066D E683	<i>S. cephalus</i>	C_08_1459	166170	125129	177185	272286	100100	243245	270282	173185	113183	162162	222224	233233	107111
00 066D D5C5	<i>S. cephalus</i>	C_08_1460	166174	121121	177177	270272	100100	243245	258284	183199	113187	162162	188228	235301	107107
00 0671 2302	<i>S. cephalus</i>	C_08_1461	154164	95141	189189	282282	100100	245245	270272	145175	113113	162162	214228	235249	113137
00 066E 05E2	<i>S. cephalus</i>	C_08_1462	154194	125125	191193	286286	100100	245249	276282	179185	143151	162162	216226	233271	107107
00 066E OBDA	<i>S. cephalus</i>	C_08_1463	160172	119121	177185	270286	100104	243245	276304	181181	113177	162162	190192	239249	111113
00 066D EE30	<i>S. cephalus</i>	C_08_1464	166166	121131	185193	286286	100100	243245	268298	179179	123123	162162	226240	239301	097105
00 0671 1BE9	<i>S. cephalus</i>	C_08_1465	154172	9195	183183	220278	102104	237245	266278	179179	127143	162162	196196	233275	111137
00 066D E347	<i>S. cephalus</i>	C_08_1466	154166	121125	177189	272282	100100	243249	270276	179197	113181	162162	188232	231271	107107
00 066D EB7B	<i>S. cephalus</i>	C_08_1467	166188	95101	183195	278290	98100	245249	270274	181201	113137	162162	210234	239265	135141
00 066D D799	<i>S. cephalus</i>	C_08_1468	154174	117141	187195	280290	100100	242245	266276	175195	123123	162162	216220	227230	113137
00 066E 27F9	<i>S. cephalus</i>	C_08_1469	166170	109121	177189	272282	100100	243243	272292	189207	143143	162162	224228	271281	097113
00 0670 097B	<i>S. cephalus</i>	C_08_1470	154164	91128?	177203	272304	100100	243245	270304	175181	113113	162162	196196	233233	111137
00 066D DBE9	<i>S. cephalus</i>	C_08_1471	160166	105131	177179	272272	100102	245245	300306	189195	113113	162162	190254	235245	105107
00 0670 14E1	<i>S. cephalus</i>	C_08_1472	172188	119123	177177	272272	100100	245245	272276	149157	113113	162162	192194	227249	107113
00 066F F0C8	<i>S. cephalus</i>	C_08_1473	154168	105141	177177	272272	100100	243247	270278	145185	113113	162162	194220	245255	105137
00 066D DD3C	<i>S. cephalus</i>	C_08_1474	168172	95119	189191	282286	100100	245245	270290	145183	113123	162162	214216	243279	113137
00 0671 1C7F	<i>S. cephalus</i>	C_08_1475	168174	131141	187187	284284	100100	245245	266278	179195	113113	162162	196220	230233	105123
00 066D DF4A	<i>S. cephalus</i>	C_08_1476	160172	95119	177185	270286	100104	245245	276276	181183	113115	162162	196234	239249	111113
00 0671 0E2C	<i>S. cephalus</i>	C_08_1477	164168	123123	185187	284286	100110	245245	270270	183195	113113	162162	216222	235245	111137
00 0670 083F	<i>S. cephalus</i>	C_08_1478	166166	109109	177189	272282	100100	243243	270270	179185	113143	162162	188224	233235	105111
00 0671 3723	<i>S. cephalus</i>	C_08_1479	166166	111131	187187	282282	100100	245245	300308	153179	139177	162162	254262	245249	107111
00 066E 2203	<i>S. cephalus</i>	C_08_1480	166166	109129	177189	272282	100100	243243	272272	173185	163185	162162	226228	239307	105109

00 066E 0696	<i>S. cephalus</i>	C_08_1481	166174	109129	189189	282282	100100	243243	274312	181187	113143	162162	202220	235239	107113
00 0670 0434	<i>S. cephalus</i>	C_08_1482	154192	111111	187187	284284	100104	243245	270296	179201	113143	162162	224228	235239	097105
00 0671 25BE	<i>S. cephalus</i>	C_08_1483	154174	111123	177187	272284	100100	243245	270290	189199	123143	162162	188222	275299	105113
00 066D FE3F	<i>S. cephalus</i>	C_08_1484	154166	109125	177177	272272	100100	243245	312312	185185	123143	162162	226228	235275	107113
00 066D F29A	<i>S. cephalus</i>	C_08_1485	166170	109131	193193	286286	100100	243245	272272	199221	143161	162162	200228	235235	105113
00 066D C442	<i>S. cephalus</i>	C_08_1486	166166	109127	177177	272272	100100	243243	272298	185193	123165	162162	188226	233235	107107
00 066E 034A	<i>S. cephalus</i>	C_08_1487	154166	129129	177189	272282	100100	243245	262262	179197	123159	162162	226228	239293	107111
00 0671 2BD2	<i>S. cephalus</i>	C_08_1488	166170	121125	177177	272272	100102	242243	294296	179185	143163	162162	226230	233239	107115
00 066D E089	<i>S. cephalus</i>	C_08_1489	166190	125125	177177	272272	100100	243243	270270	179185	143161	162162	228232	239271	097113
00 066D E85E	<i>S. cephalus</i>	C_08_1490	154166	109125	177177	272272	100100	243249	270270	179185	113173	162162	226228	233271	105107
00 0671 3649	<i>S. cephalus</i>	C_08_1491	154166	121129	177177	272272	100100	243245	294296	179197	143159	162162	222224	239239	103111
00 066E 0C8E	<i>S. cephalus</i>	C_08_1492	166192	109111	177187	272284	100100	245249	000000	179185	143173	162162	226228	273287	097107
00 0671 40BB	<i>S. cephalus</i>	C_08_1493	166170	127129	177177	270272	100100	243245	278278	179189	123143	162162	226228	235239	105111
00 0671 3954	<i>S. cephalus</i>	C_08_1494	166174	111121	177177	272272	100100	242245	290296	179185	113159	162162	220224	235301	111113
00 066D CA7D	<i>S. cephalus</i>	C_08_1495	154174	111111	177177	270272	100100	245249	270296	179185	133159	162162	222232	233239	107111
00 066D D49A	<i>S. cephalus</i>	C_08_1496	166174	111125	177177	272272	100100	245249	270290	179179	113143	162162	188224	233235	103105
00 066D 55F4	<i>S. cephalus</i>	C_08_1497	154170	111111	177177	272272	100100	243243	270286	173197	143143	162162	226228	235301	107111
00 066D D5EA	<i>S. cephalus</i>	C_08_1498	166166	111125	177185	272286	100100	245245	270282	179179	113179	162162	226228	235271	105107

Deel II: Microsatelliet analyse snoek (*Esox lucius*)

1. Inleiding

1.1 Snoek(*Esox lucius*): habitat en voorkomen

Snoek komt voor in traag stromende of stilstaande wateren. Het verspreidingsgebied omvat heel Eurasië met een zuidelijke grens iets ten zuiden van de Zwarte Zee. In Ierland en in Spanje is snoek geïntroduceerd door de mens. Omwille van commerciële en recreatieve belangen is snoek onderhevig aan grootschalige introducties en translocaties. Snoek is een visuele predator die prooien vanuit de beschutting van de planten verrast. Ook voor de voortplanting is vegetatie essentieel. De eieren worden afgezet op waterplanten of in overstromde gebieden met landvegetatie. Het aandeel waterplanten in een aquatisch habitat bepaalt dan ook in grote mate het succes van de snoekpopulatie. Het voedsel bestaat uit larven en insecten in de vroege levensfase, maar al snel wordt overgeschakeld naar gewerveld voedsel. In grote mate bestaat het dieet uit vis maar ook zoogdieren, vogels en amfibieën behoren tot het dieet. Indien snoek in hoge densiteiten aanwezig is wordt er ook vaak kannibalisme waargenomen. Dit kan reeds op jonge leeftijd optreden.

1.2 Genetische structuur van snoek

1.2.1 Fylogeografie van snoek aan de hand van mitochondriale merkers

De fylogeografie van snoek in Europa is onderzocht aan de hand van variatie in het D-loop fragment van het mitochondriale DNA (Maes et al. 2004). De genetische variatie voor de D-loop merker is erg gering en wijst op een relatief recente expansie vanuit één ancestrale populatie. Het grootste deel van Europa wordt gedomineerd door één cluster van nauw verwante haplotypes. Enigszins meer gedifferentieerde haplotypes worden teruggevonden ten zuiden van de Alpen, in Griekenland en in Hongarije en Roemenië (zie Maes et al. 2004). Op basis van de variatie voor de onderzochte mitochondriale merker worden vier ESE onderscheiden door Maes et al. (2004) (Figuur 1.1). De eerste ESE omvat de meeste West-Europese populaties. De tweede omvat de Centraal- en Noord-Europese populaties. Daarnaast vinden we nog twee ESE terug in het zuiden van Europa, respectievelijk in Italië en Griekenland. Voor deze studie is enkel de eerste ESE van belang.



Figuur 1.1: Evolutionair Significante Eenheden (ESE) en BeheerEenheden (BE) binnen Europa op basis van mitochondriaal DNA en microsatelliet DNA (uit Maes et al. 2004)

1.2.2 Microsatelliet variatie in snoek

De genetische structuur van snoek voor microsatelliet merkers is beschreven door Maes et al. (2004) en gepubliceerd door Jacobsen et al. (2005). De genetische variatie voor microsatelliet merkers is over het algemeen laag. Zeker in Noordwest Europa vinden we slechts een beperkt aantal allelen per locus. Deze lage variatie is vermoedelijk het gevolg van historische processen zoals een flessenhals tijdens de laatste ijstijd of van stichterseffecten van populaties bij de herkolonisatie (Jacobsen et al. 2005). Het is dus niet het gevolg van lage effectieve populatiegroottes in hedendaagse natuurlijke populaties, althans niet in de populaties die door Jacobsen et al. (2005) werden onderzocht. Het meest extreme geval van lage variatie is te vinden in Ierland waar geen enkele variabiliteit voor microsatelliet merkers aanwezig is. Elk locus dat werd onderzocht is gefixeerd voor één allel. Snoek werd geïntroduceerd in Ierland in de zestiende eeuw. De lage variatie in Ierland is dus het gevolg van een sterk stichterseffect dat bovendien niet natuurlijk is maar een menselijke oorsprong kent.

Ondanks de zeer beperkte variatie voor microsatelliet merkers is de differentiatie tussen populaties in Europa erg hoog. Deze differentiatie kan door twee factoren worden verklaard. Ten eerste is de afstand tussen de verschillende onderzochte populaties groot zodat er geen genmigratie tussen deze populaties optreedt. Ten tweede is de effectieve populatiegrootte van snoek relatief klein in de meeste populaties waardoor de effecten van genetische drift prominenter aanwezig zijn in deze soort.

Binnen de eerste ESE op basis van mitochondriale merkers zijn er een aantal beheereenheden te herkennen wanneer de populaties onderzocht worden met microsatelliet merkers. De analyses van Maes et al. (2004) onderscheiden binnen de eerste ESE drie verschillende beheereenheden: Frankrijk-Ierland; Denemarken-Nederland en tenslotte Polen (Figuur 1.1). Bij gebrek aan stalen van onverstoorde Belgische populaties is het onmogelijk te zeggen tot welke beheereenheid onze populaties behoren. Bovendien is het zo dat er in de Belgische wateren gedurende vele jaren uitzettingen zijn gebeurd waarvan de oorsprong onduidelijk is. Omdat België zich tussen twee beheereenheden bevindt kunnen we ervan uitgaan dat zowel de Iers-Franse als de Deens-Nederlandse BE op natuurlijke wijze in België vertegenwoordigd kunnen zijn. Omwille van genetische verschillen, de afstand en de afwezigheid van natuurlijke verbindingen tussen de Belgische en de Poolse populaties beschouwen we de Poolse beheereenheid als uitheems in België.

2. Materiaal en methode

2.1 Staalname

De kweekpopulatie van de kwekerij van het INBO te Linkebeek bevindt zich het grootste gedeelte van het jaar in de Ganzepoot vijver te Groenendaal. Wegens werken die door het Agentschap Natuur en Bos aan de vijvers stroomafwaarts van de Ganzepoot vijver was het niet mogelijk om deze kweekpopulatie in 2008 af te vissen en te gebruiken voor de kweek. Het was dus ook niet mogelijk om van de kweekdieren een vinknip te nemen. Een gedeelte van deze kweekdieren (paarijpe vrouwtjes) werd echter in 2006 al gemerkt met een PIT-tag en er werd een weefselstaal genomen. Ook van de mannetjes die tijdens de kweek in 2006 werden gebruikt werd een weefselstaal genomen. Deze laatste werden niet gemerkt met een PIT-tag. Slechts een tiental individuen werden door middel van hengelen van de Ganzepoot vijver afgevist en gebruikt bij de kweek van 2008. Er werden wel nieuwe kweekdieren bekomen uit de Dender (A. Dillen) en uit Zonhoven (Gebr. Vandeput). In totaal beschikken we voor 117 kweekdieren uit de Ganzepoot over een weefselstaal. Nog 18 bijkomende kweekdieren uit de Dender en uit Zonhoven werden gemerkt en hiervan werd eveneens een weefselstaal genomen. De weefselstalen werden bewaard in zuivere ethanol tot verdere analyse. In totaal beschikken we over 135 stalen van kweekdieren voor genetische analyse.

2.2 DNA extractie en amplificatie

In totaal werden voor 135 stalen DNA extracties uitgevoerd met behulp van een Qiagen DNA extractie kit volgens de specificaties van de fabrikant. Het DNA gehalte werd bepaald en de kwaliteit van het DNA werd bepaald door middel van fotospectrometrie. Voor amplificatie werd het DNA verdund tot 5ng/ μ l. Uit deze analyse blijkt dat voor de stalen van de Ganzepoot genomen in 2006 de kwaliteit van het DNA variabel is en merkbaar lager dan de kwaliteit van de stalen die in 2008 werden genomen. Toch bleek het in de meeste gevallen mogelijk om een betrouwbare amplificatie voor de geanalyseerde microsatelliet merkers te bekomen.

Op basis van de beschikbare literatuur en in functie van de vergelijkbaarheid met eerder uitgevoerd onderzoek (Maes et al. 2004) werden twaalf microsatelliet merkers geselecteerd (Tabel 2.1). Voor negen van deze merkers zijn gegevens beschikbaar. Ook de kweekpopulatie uit de Ganzepoot vijver werd voor deze merkers onderzocht in 2004 zodat een vergelijking mogelijk is met de populatie bemonsterd in 2006 en 2008. De merkers werden opgedeeld in twee multiplex pcr-reacties. Amplificatie gebeurt met behulp van de Qiagen® Multiplex PCR kit volgens de instructies van de fabrikant in een

10 µl reactiemengsel. De specifieke reactiemengsels en reactiecondities voor elke multiplex reactie zijn weergegeven in Tabel 2.2, Tabel 2.3 en Tabel 2.4.

Tabel 2.1: Benaming en eigenschappen van de gebruikte primers. Locus: benaming van de primer; F-primer: sequentie van de forward primer; R-primer: sequentie van de reverse primer; range: verwachte lengte van de fragmenten; dye: gebruikte kleurstof voor de F-primer; motief: motief van de repeat.

Locus	F-primer	R-primer	Range	Dye	motief
Multiplex 1					
Elu02	5*-GCAGACTTGTTTACTTTCCCTT-3*	5*-GTGTGCTTTCCATTTCCAT-3*	147-215	PET	
Elu25	5*-CATGGTGGAGTCTTTGGTGAG - 3*	5*-CACCAGCCAGACTGAACCAG-3*	146-160	VIC	
Elu51	5*-GTGGGCATTGAGCCGATATAGC-3*	5*-CTGTCTCATTACTGCCTGGCTC-3*	111-143	PET	(AC)16
Elu78	5*-CTAGAGGGGGAAAACAAACC-3*	5*-CACTGTCCATCATCACCCCTCTC-3*	129-141	VIC	(AC)13
Elu276	5*- CTGTCACAGTTCAAAGATGGC-3*	5*-TCTTTAAACTGGGGGGGAGGAAAG -3*	119-201	NED	
<i>Elu108</i>	5* - TCATCAGAAACATGACTGCTTG - 3*	5*- GCACACGGCGATATTATCC - 3*	135-143	FAM	(TG)19
Multiplex 2					
Elu19	5*-CATCATGAACATTCAGACGC-3*	5*-GAGATGCTAATTCATCCACTG-3*	116-230	PET	
<i>Elu38</i>	5* - TGTCAGTGTGACTTGCTCC - 3*	5*-GTATTGTCAGCATTTCAGCTC-3*	170-188	NED	(TG)11
Elu64	5*-GGTAAGACCAGTATCTGGAG-3*	5*-CAAAGGGAGTGATGATTGGCTTC-3*	113-133	NED	(AC)15
Elu76	5'-ACCACATTCCACATCTGATGG-3*	5*-AATCCCTTATTCTGACCCTGC-3*	135-203	FAM	
Elu87	5*-AGCACTGCCACACATGACGTG-3*	5*-CCAGCTGCCTCAGATTGCTCCCC-3*	133-159	VIC	(AC)20(N)14(AC)4TT(AC)5
Elu252	5*-CACCGACAATATGCGCACACC-3*	5*-GGATTTACCCTGTCATACAG-3*	107-129	FAM	(AC)18

Tabel 2.2: reactiemengsel voor multiplex 1 voor snoek (10µl reactiemengsel)

Produkt	1 reactie	Eindconcentratie
Quiagen MM (2x)	5 µl	1x
Elu02	0,1	1 µM
Elu25*	0,1	0,5 µM
Elu51	0,1	1 µM
Elu78	0,1	1 µM
Elu108	0,1	1 µM
Elu276	0,1	1 µM
DNA	1 µl	
mQ water	3,4	

Noot: Werkoplossingen primers 10µM, behalve * 5µM

Tabel 2.3: reactiemengsel voor multiplex 2 voor snoek (10 µl reactiemengsel)

Produkt	1 reactie	Eindconcentratie
Quiagen MM (2x)	5 µl	1x
Elu19	0,1	1 µM
Elu38	0,1	1 µM
Elu64	0,1	1 µM
Elu76	0,1	1 µM
Elu87	0,05	0,5 µM
Elu252	0,4	4 µM
DNA	1 µl	
mQ water	3,15	

Noot: Werkoplossingen primers 10µM

Tabel 2.4: PCR reactieverloop multiplex 1 en 2 voor snoek

Stap	Temperatuur	Tijdsduur
Activatie	95°C	15 minuten
Denaturatie	95°C	30 seconden
Annealing	59 (multi1) °C 58 (multi2) °C	1 minuut 30 seconden
Elongatie	72°C	1 minuut
Polymerisatie	60°C	30 minuten
Bewaring	4°C	

Noot: Stap 2 tot en met vier wordt 23 keer herhaald

2.3 Genotypering en diversiteitsanalyse

De fragmenten worden gescheiden op een ABI 3130 capillaire sequencer van Applied Biosystems. De data worden gegenotypeerd met behulp van het programma Genemapper® (Applied Biosystems). De registratie van de allelen gebeurt gedeeltelijk automatisch maar wordt manueel nagekeken en zo nodig bijgestuurd. De meeste analyses met betrekking tot genetische variabelen worden uitgevoerd met het programma GENETIX v4.05.02 (Belkhir et al. 1986) tenzij anders aangegeven. De analyses van snoek door Maes et al. (2004) werden uitgevoerd op een LICOR systeem waarbij de fragmenten werden gescheiden op een acrylamide gel. Hierdoor zijn beide gegevens niet rechtstreeks met elkaar vergelijkbaar. Identieke fragmenten zullen niet dezelfde lengte vertonen wanneer ze geanalyseerd worden met beide systemen. De oorzaak hiervan is een verschil in scheidingsmedium en het gebruik van verschillende kleurstoffen om de detectie mogelijk te maken. Door het analyseren van een aantal dezelfde stalen op beide systemen is het echter wel mogelijk om een correctie door te voeren en de gegevens alsnog met elkaar te vergelijken. Er werden 20 stalen van de studie van Maes et al. (2004) onderworpen aan een analyse op het ABI 3130 systeem en de resultaten werden met elkaar vergeleken. Op basis hiervan is het mogelijk om onze stalen te corrigeren en te vergelijken met de gegevens van Maes et al. (2004). Voor de gecorrigeerde dataset is het slechts mogelijk om negen merkers te gebruiken in plaats van 12 omdat Maes et al. (2004) niet rapporteren over de merkers Eu38, Elu87 en Elu108. De gebruikte correcties zijn weergegeven in Tabel 2.5.

Tabel 2.5: Omzettingstabel voor de lengte van de fragmenten bekomen na scheiding op ABI. De aanpassing geeft weer hoe de fragmenten dienen te worden aangepast om compatibel te zijn met de data bekomen op het LICOR toestel door Maes et al. (2004). Enkel de relevante allelen voor deze studie zijn weergegeven. Bij 'geen data' werd de correctie geëxtrapoleerd.

	ABI	LICOR	Aanpassing		ABI	LICOR	Aanpassing
ELU2	191	187	-4	ELU76	141	141	0
	195	191	-4		159	157	-2
	199	geen data	-4		163	161	-2
	215	211	-4		178	geen data	-1
	219	215	-4		182	geen data	-1
ELU19	117	116	-1	Elu78	135	135	0
	125	124	-1		137	geen data	0
	127	126	-1				
	129	geen data	-1				
Elu25	151	148	-3	ELU276	119	119	0
	153	150	-3		124	geen data	0
	155	geen data	-3		158	155	-3
	157	154	-3		171	167	-4
ELU51	112	111	-1		187	183	-4
	114	113	-1		191	geen data	-4
ELU64				ELU252	109	111	+2
	116	117	+1		111	113	+2
	118	119	+1		113	115	+2
	122	123	+1		115	117	+2

2.4 Simulatie ouderschapsanalyse

Om na te gaan of de resolutie van de geanalyseerde merkers hoog genoeg is om een ouderschapsanalyse uit te voeren werd een simulatie uitgevoerd in CERVUS 3.0. Hierbij gaan we ervan uit dat het geslacht van de ouders gekend is. We voeren een analyse uit met een stijgend aantal loci waarbij de volgorde bepaald wordt door de variabiliteit van de loci. Het meest variabele locus wordt als eerste opgenomen omdat dit het meeste resolutie geeft voor een ouderschapsanalyse, daarna wordt het locus toegevoegd met de op één na hoogste variabiliteit. Deze procedure wordt iteratief toegepast tot alle loci zijn opgenomen. Er werden 75 ouderdieren van elk geslacht gebruikt in de simulatie en het aantal nakomelingen werd op 1000 gehouden. Er wordt verondersteld dat de genotypes van alle mogelijke ouderdieren gekend zijn.

3. Resultaten

3.1 Verkennende data-analyse

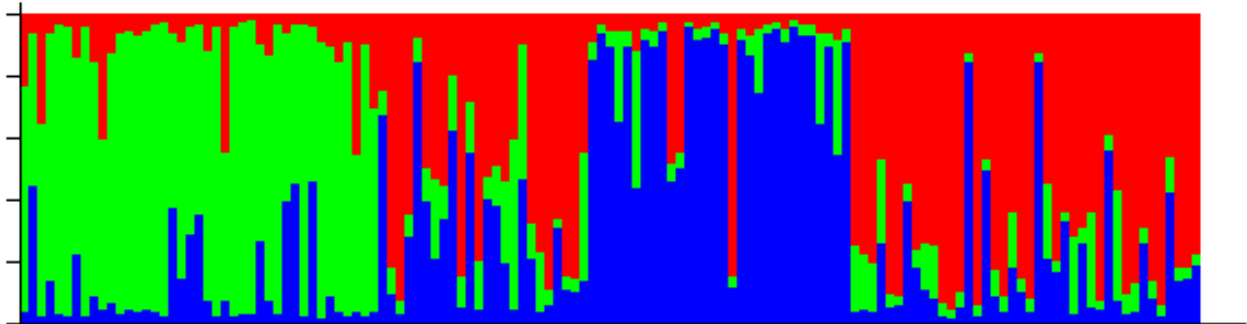
Omdat er op basis van eerdere gegevens een vermoeden bestaat van de mogelijke aanwezigheid van uitheemse genotypes wordt er eerst een verkennende data-analyse uitgevoerd op de onderzochte stalen. Hierbij wordt nagegaan of er bepaalde groepen van individuen kunnen worden gevonden die afwijken van de rest van de stalen.

Met behulp van het programma STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) wordt nagegaan of er groepen in de dataset zijn te herkennen. We maken gebruik van de totale dataset bekomen door analyse op de ABI capillaire sequencer met een totaal van 12 loci en 135 individuen. We laten het aantal mogelijke groepen variëren van 1 tot en met 5 en kijken wat het meest waarschijnlijke aantal groepen in de dataset is (Tabel 3.1).

Tabel 3.1: resultaten van de structuuranalyse met K, aantal geteste groepen; LnP(D), maat voor de waarschijnlijkheid van het observeren van K-aantal groepen gegeven de dataset. LnP(D) is het gemiddelde van twee analyseruns met een burn-in van 100 000 en een daaropvolgende run van 100 000.

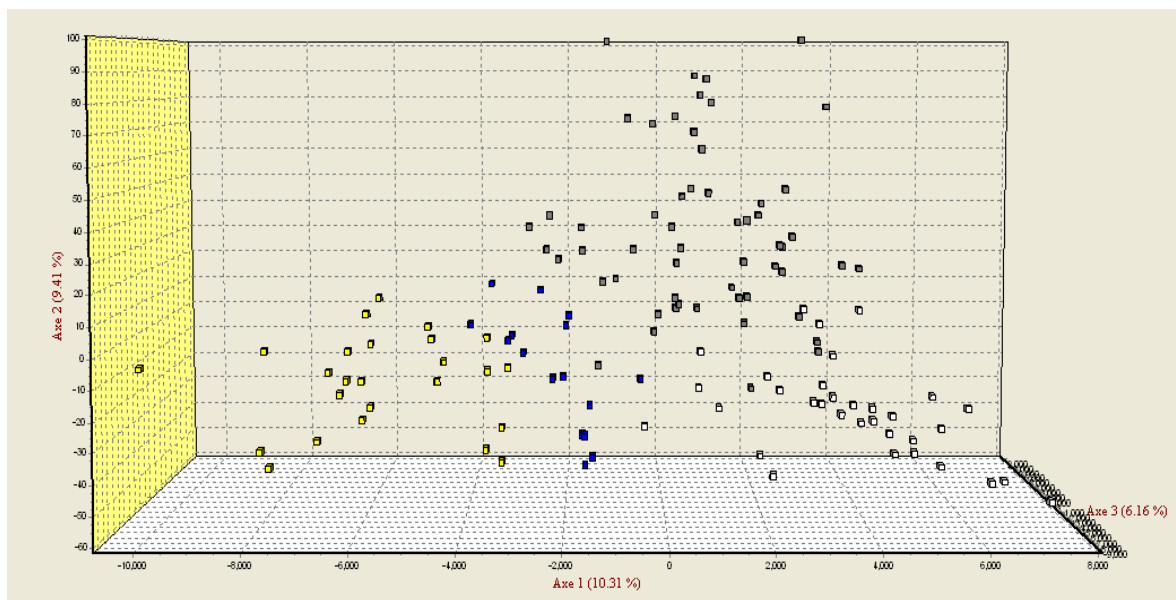
K	LnP(D)
1	-2145
2	-2017
3	-1891
4	-1895
5	-1938

De resultaten suggereren drie groepen in de dataset als meest waarschijnlijke structuur. De groepen zijn visueel weergegeven in Figuur 3.1.



Figuur 3.1: resultaten van de structuuranalyse voor K=3. Elke verticale balk stelt een individu voor. De kleur van balken is representatief voor de groep waartoe een individu behoort. Groene balken staan voor Groep 1, blauwe voor Groep 2 en rode balken voor Groep 3.

De individuen die in STRUCTURE tot dezelfde groep behoren worden gegroepeerd en onderworpen aan een factoriële correspondentie analyse in GENETIX. In Figuur 3.2 zijn de onderlinge relaties tussen de genotypes visueel weergegeven. Groep 1 wordt opgedeeld in Groep 1a en Groep 1b (zie verder).



Figuur 3.2: resultaat van de factoriële correspondentie analyse na indeling volgens verschillende groepen gevonden met STRUCTURE. Groep 1a: geel; Groep 1b: blauw; Groep 2: grijs; Groep 3: wit.

Om na te gaan of er verwantschap van onze kweekdieren is met uitheemse genotypes doen we een toewijzingsanalyse in GENECLASS. We maken gebruik van de gegevens van Maes et al. (2004). Als referentiepopulaties voor de toewijzing gebruiken we de populatie uit Denemarken (DEN), Frankrijk (FRA), Ierland (IR), Nederland (NET), Polen (POL) en Hongarije (HUN) uit Maes et al. (2003). Er is geen Belgische referentiepopulatie beschikbaar omdat het onduidelijk is welke populaties in België als oorspronkelijke inheemse populatie kunnen worden beschouwd. Door de uitzetting van uitheemse pootvis is het mogelijk dat er introgressie van uitheemse allelen is opgetreden in de Belgische populaties waardoor de toewijzingsanalyse mogelijk wordt vertekend. We kiezen er dus noodgedwongen voor om de toewijzingsanalyse zonder Belgische referentiepopulatie uit te voeren.

De stalen die worden toegewezen bestaan uit alle onderzochte individuen van de kweekpopulatie met een correctie op de allelgrootte om compatibiliteit met de gegevens van Maes et al. (2004) te garanderen. Dit houdt ook in dat we gebruik maken van 9 loci in plaats van 12 waardoor we een iets lagere resolutie hebben.

GENECLASS geeft de waarschijnlijkheid weer in welke mate het staal tot een bepaalde referentiepopulatie behoort. Indien een staal aan de referentiepopulaties uit Denemarken (DEN), Frankrijk (FRA), Ierland (IR) of Nederland (NET) wordt toegewezen beschouwen we het als inheems. Deze populaties behoren immers tot beheerseenheden die waartoe ook natuurlijke Belgische populaties behoren (Maes et al. 2004). Indien een staal aan een referentiepopulatie uit Polen (POL) of Hongarije (HUN) wordt toegewezen dan beschouwen we dat als uitheems omdat de Poolse populatie een aparte beheerseenheid vormt (Maes et al. 2004).

In Tabel 3.2 zijn de resultaten van de GENECLASS analyse weergegeven voor de stalen uit Groep 1a en Groep 1b. Alle stalen van Groep 2 en Groep 3 worden toegewezen aan de referentiepopulaties uit Denemarken (DEN), Frankrijk (FRA), Ierland (IR) of Nederland (NET) en kunnen als inheems worden beschouwd. De stalen uit Groep 1a worden aan de Poolse referentiepopulatie toegewezen. In een aantal gevallen is dit niet zo, maar dan verschilt de waarschijnlijkheid tussen een 'inheemse' populatie en de Poolse populatie niet erg veel.

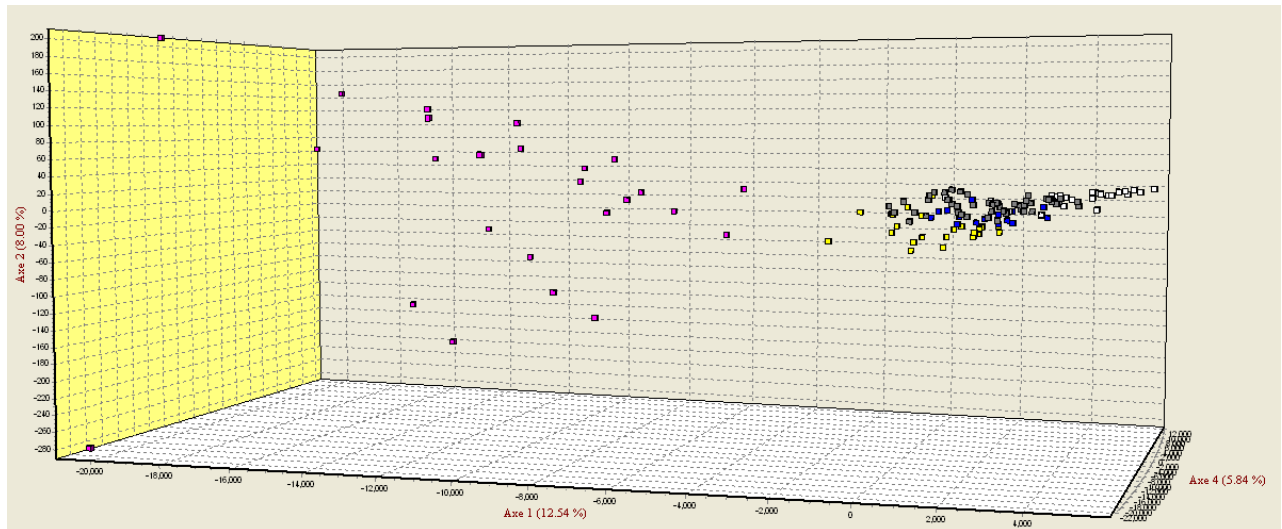
Ondanks de genetische verwantschap, volgens de structuuranalyse, van de stalen uit Groep 1b met de stalen uit Groep 1a, worden deze toch niet toegewezen aan de Poolse referentiepopulatie (Tabel 3.2).

Tabel 3.2: Resultaten van de toewijzingsanalyse voor de stalen uit groep 1a en 1b. De hoogste waarschijnlijkheid van toewijzing is vetgedrukt weergegeven.

Staalcode	DEN	FRA	IR	NET	POL	HUN	GROEP
eslu_0952	0	0.046	0	0.177	0.728	0.016	1a
eslu_0955	0.112	0.47	0.049	0.183	0.342	0.112	1a
eslu_0958	0	0.053	0.005	0.114	0.541	0.031	1a
eslu_0960	0.008	0.038	0	0.045	0.071	0.03	1a
eslu_0962	0.003	0.052	0	0.128	0.158	0.043	1a
eslu_0965	0.112	0.714	0.049	0.245	0.706	0.032	1a
eslu_0967	0	0.352	0.134	0.332	0.443	0.127	1a
eslu_0975	0	0.003	0	0.049	0.274	0.007	1a
eslu_0976	0.147	0.659	0.049	0.288	0.55	0.05	1a
eslu_0987	0	0.119	0.005	0.216	0.24	0.057	1a
eslu_0992	0	0.003	0	0.014	0.56	0.002	1a
eslu_0993	0	0.003	0	0.017	0.3	0.005	1a
eslu_1004	0.024	0.168	0	0.204	0.209	0	1a
eslu_1007	0.003	0.034	0	0.169	0.061	0	1a
eslu_1015	0.003	0.052	0	0.128	0.158	0.043	1a
eslu_1016	0	0.001	0	0.013	0.12	0	1a
eslu_1018	0.003	0.052	0	0.128	0.158	0.043	1a
eslu_1021	0	0.002	0	0.008	0.405	0.001	1a
eslu_1022	0	0.002	0	0.008	0.405	0.001	1a
eslu_1028	0.015	0.021	0	0.028	0.217	0.013	1a
eslu_1035	0.019	0.127	0.005	0.129	0.205	0.038	1a
eslu_1038	0	0.001	0	0.007	0.567	0.001	1a
eslu_1040	0	0.145	0.005	0.104	0.873	0.005	1a
eslu_1058	0.059	0.151	0.005	0.075	0.598	0.01	1a
eslu_1061	0	0.006	0	0.017	0.22	0.029	1a
eslu_1064	0	0.003	0	0.023	0.323	0.007	1a
eslu_0953	0	0.007	0	0.204	0.039	0	1b
eslu_0964	0	0.086	0.02	0.251	0.168	0.026	1b
eslu_0974	0.012	0.606	0.136	0.314	0.801	0.031	1b
eslu_0986	0.955	0.941	0.678	0.378	0.398	0.125	1b
eslu_0989	0.825	0.62	0.297	0.209	0.411	0.069	1b
eslu_0995	0.072	0.503	0.02	0.438	0.021	0.02	1b
eslu_0996	0.223	0.32	0.005	0.274	0.008	0.009	1b
eslu_1002	0.296	0.233	0.049	0.165	0.158	0.03	1b
eslu_1009	0.161	0.733	0.439	0.392	0.196	0.162	1b
eslu_1024	0.073	0.179	0	0.273	0.004	0.01	1b
eslu_1026	0.395	0.789	0.439	0.3	0.578	0.086	1b
eslu_1030	0	0.025	0	0.207	0.052	0.001	1b
eslu_1034	0	0	0	0.037	0.021	0	1b
eslu_1036	0	0.058	0	0.208	0.082	0.001	1b
eslu_1042	0.525	0.922	0.297	0.341	0.276	0.21	1b
eslu_1077	0.016	0.676	0.374	0.394	0.21	0.253	1b
eslu_1078	0.392	0.854	0.287	0.265	0.262	0.343	1b

We formuleren twee mogelijke hypothesen waarom de individuen van groep 1b niet aan de Poolse referentiepopulatie worden toegewezen ondanks de verwantschap met de stalen van groep 1a die wel grotendeels aan de Poolse referentiepopulatie worden toegewezen. Een eerste mogelijkheid is dat omwille van de overlap van de allelfrequenties tussen de Franse, Nederlandse en de Poolse populatie het mogelijk is dat de stalen ook met een hoge waarschijnlijkheid aan de Nederlandse of Franse populaties worden toegewezen. Bovendien verliezen we een stuk resolutie door de correctie van onze dataset van 12 naar 9 loci. Een tweede hypothese is dat de stalen van groep 1b terugkruisingen zijn van hybriden (Pools x Belgisch) met Belgische individuen of met andere hybriden. Hierdoor ontstaat een verdunning van het aandeel Poolse allelen en worden deze stalen eerder toegewezen aan de Franse of Nederlandse referentiepopulatie.

Argumenten voor de tweede hypothese zijn te vinden als we de kwekerij stalen vergelijken met de Poolse stalen (Maes et al. 2003). We zien dat de Poolse stalen duidelijk gedifferentieerd zijn van de kwekerij stalen (Figuur 3.3). We zien ook dat de variatie een stuk groter is in de Poolse stalen. Geen van de aan de Poolse referentiepopulatie toegewezen stalen bevindt zich in de Poolse cluster, maar ze leunen eerder aan bij de andere stalen van de kwekerij (en de Nederlandse en Franse stalen, niet weergegeven op de figuur). De stalen van groep 1a (geel) leunen het dichtste aan bij de Poolse referentiepopulatie en zijn er dus het meest mee verwant, de stalen van groep 1b leunen iets minder dicht aan bij de Poolse populatie en zijn er minder aan verwant. Dit wijst op een hogere graad van verdunning van de Poolse allelen in deze stalen.



Figuur 3.3: resultaat van de factoriële correspondentie analyse na indeling volgens verschillende groepen gevonden met STRUCTURE. Groep 1a: geel; groep 1b: blauw; groep 2: grijs; groep 3: wit en de poolse stalen uit Maes et al. (2003): paars.

Nog een argument voor de verwantschap van Groep1a en Groep1b met de Poolse referentiepopulatie is de hoge frequentie van het allel 181 in de stalen van Groep1a & b (Tabel 3.3). Dit allel is aanwezig in de Poolse populatie en quasi afwezig in Nederland en Frankrijk en we verwachten het dan ook niet in België. Toch is het in hoge frequentie aanwezig in de groepen waarvoor we eerder een verwantschap met de Poolse referentiepopulatie observeerden. De observatie dat we dit slechts voor één allel van dit locus vaststellen en bijvoorbeeld niet voor allel 169 is een aanwijzing dat de introgressie van Pools materiaal in de kweekpopulatie van een beperkt aantal individuen is gestart (founder effect).

Tabel 3.3: Allelfrequenties van de allelen voor locus ELU76 voor de onderscheiden groepen en de referentiepopulaties. FRA: Frankrijk; NET: Nederland; POL: Polen; N: aantal individuen.

ELU76	Groep1a	Groep1b	Groep2	Groep3	FRA	NET	POL
(N)	26	16	36	55	31	56	21
141	0,038	0,218	0,652	0,263	0,048	0,366	0
155	0	0	0	0	0	0	0,023
157	0,403	0,625	0,305	0,645	0,826	0,62	0,404
159	0	0	0	0	0,048	0	0
161	0	0	0	0,0091	0,048	0	0,071
165	0	0	0	0	0	0	0,023
167	0,019	0	0	0,036	0	0	0
169	0	0	0	0	0	0	0,166
171	0	0	0	0	0,032	0	0,023
173	0	0	0	0	0	0	0,047
177	0	0	0	0,009	0	0	0,023
179	0	0	0	0	0	0	0,142
181	0,538	0,156	0,041	0,036	0	0,01	0,071

3.2 Diversiteit van de kweekpopulatie

Met uitzondering van de merker Elu38 bij beide populaties en Elu78 bij de populatie van de kweek 2008 vertoonden alle microsatelliet merkers genetische variatie. Het aantal allelen voor de variabele merkers schommelt tussen 2 en 7 (Tabel 3.4). Het aantal allelen in de populatie van de Ganzepoot vijver is voor een aantal merkers groter dan het aantal allelen in de kweekpopulatie van 2008. Alle allelen die in deze laatste populatie aanwezig zijn komen ook voor in de populatie van de Ganzepoot vijver. Het aantal allelen en het gemiddeld aantal allelen van de Ganzepoot populatie is dan ook gelijk aan het totaal van beide populaties. Het totaal aantal allelen voor de populatie uit de Ganzepoot bedraagt 46, het totaal aantal allelen voor de populatie gebruikt voor de kweek in 2008 bedraagt slechts 36.

De verwachte heterozygositeit varieert van 0 (Elu38) tot 0,668 (Elu 276) (Tabel 3.4). Er worden enkele zeer lage waarden geobserveerd. Deze worden enerzijds verklaard door een laag aantal allelen en/of anderzijds de aanwezigheid van één allel met een zeer hoge frequentie. De andere allelen hebben in dit geval een zeer lage frequentie en dragen in zeer geringe mate bij tot de genetische diversiteit. Er zijn geen uitgesproken verschillen tussen de kweekpopulatie van de Ganzepoot vijver en de kweekpopulatie gebruikt in 2008. De verwachte heterozygositeit van de totale kweekpopulatie ligt iets hoger dan van beide populaties afzonderlijk.

Tabel 3.4: diversiteitsparameters voor alle onderzochte kweekdieren van snoek (135 individuen). # allelen: aantal verschillende allelen per merker; H_e : verwachte heterozygositeit; dominant allel: frequentie van het meest voorkomende allel. De gegevens zijn telkens weergegeven voor de populatie uit de Ganzepoot bemonsterd in 2006, de populatie gebruikt bij de kweek in 2008 en het totaal van deze twee populaties.

Merker	# allelen			H_e			dominant allel		
	eslu-GAN	kweek 2008	Totaal	eslu-GAN	kweek 2008	Totaal	eslu-GAN	kweek 2008	Totaal
Elu2	5	5	5	0,392	0.336	0,487	0,769	0.800	0,688
Elu19	3	3	3	0,487	0.475	0,512	0,653	0.667	0,604
Elu25	4	3	4	0,534	0.500	0,491	0,593	0.611	0,667
Elu38	1	1	1	0,000	0.000	0,000	1,000	1	1,000
Elu51	2	2	2	0,124	0.198	0,092	0,933	0.957	0,952
Elu64	3	2	3	0,052	0.05	0,037	0,973	0.977	0,982
Elu76	6	5	6	0,571	0.570	0,62	0,587	0.617	0,504
Elu78	2	1	2	0,013	0.000	0,007	0,993	1	0,996
Elu87	7	3	7	0,701	0.389	0,662	0,358	0.750	0,431
Elu108	5	4	5	0,626	0.662	0,593	0,480	0.444	0,493
Elu252	2	2	2	0,241	0.278	0,358	0,860	0.830	0,767
Elu276	6	5	6	0,664	0.662	0,668	0,478	0.455	0,434
gemiddeld	3,83	3	3,83	0,367	0.343	0,377	0,723	0.753	0,710

Als we enkel de merkers als polymorf beschouwen waar het meest frequente allel een frequentie heeft die lager ligt dan 0,950 dan zijn slechts 8 van de twaalf merkers polymorf in de totale kweekpopulatie. Bij de populatie van de Ganzepoot vijver 9 merkers en bij de populatie kweek 2008 zijn in dat geval 8 merkers polymorf.

3.3 Vergelijking met eerdere studie Maes et al. 2004

De kweekpopulatie van het INBO uit de Ganzepoot werd al eerder onderzocht door Maes et al. (2004). Het gaat hier om stalen van de kweekpopulatie genomen in 1998 (code: EL-GRO-xx). In totaal werden 60 individuen bemonsterd voor genetische analyse. Zoals hierboven vermeld beschikken we over 75 stalen van de huidige Ganzepoot populatie (code eslu-GAN). De stalen die tijdens de huidige studie werden onderzocht werden gecorrigeerd omwille van verschillen in analysemethoden. Slechts negen van de twaalf merkers uit onze studie werden door Maes et al. (2004) gebruikt. Het is dan ook slechts mogelijk om de temporele stalen van dezelfde populatie voor negen merkers te vergelijken. Na een toewijzingsanalyse bleek dat ook tien jaar geleden al stalen voorkwamen in de kweekpopulatie van de Ganzepoot die een verwantschap vertoonden

met Poolse stalen. In totaal werden 19 van de 60 stalen aan de Poolse referentiestalen toegewezen. Daarnaast waren er een aantal stalen die met een vergelijkbare waarschijnlijkheid aan de Franse, Nederlandse of Poolse referentiepopulatie werden toegewezen. We hebben er echter voor gekozen om zowel de stalen van de Ganzepoot uit 1998 als de stalen uit de Ganzepoot van 2006 met elkaar te vergelijken voor alle beschikbare individuen. Voor deze vergelijking zijn we in de eerste plaats geïnteresseerd in de mogelijke verandering (toename, afname) van de diversiteit van de kweekpopulatie over deze tijdsperiode en niet zozeer in het aandeel individuen met uitheemse profielen.

3.3.1 Genetische diversiteit Ganzepoot 1998-2006

Het aantal allelen verschilt tussen beide geanalyseerde populaties (Tabel 3.5). Meestal is het zo dat EL-GRO meer allelen bevat dan eslu-GAN. Enkel voor merker Elu64 zien we het omgekeerde, namelijk een groter aantal allelen voor eslu-GAN (3) dan voor EL-GRO (2). Wanneer we het totale aantal allelen beschouwen over alle merkers heen dan zien we dat er in de populatie EL-GRO in totaal 41 allelen aanwezig zijn en in de populatie eslu-GAN slechts 33. Tussen de eerste en de tweede staalname van de kweekpopulatie is er een netto verlies van 8 allelen. Dit wordt ook weerspiegeld in het verschil in gemiddeld aantal allelen.

Tussen de verwachte heterozygositeit en de allelfrequentie van het dominante allel is het verschil minder uitgesproken. Toch zien we een lichte afname van de gemiddelde heterozygositeit in de recente stalen en ook een lichte toename in de gemiddelde frequentie van het meest dominante allel (Tabel 3.5).

Tabel 3.5: diversiteitsparameters voor alle onderzochte kweekdieren van snoek voor de populatie EL-GRO (60 individuen) en eslu-GAN (75 individuen). # allelen: aantal verschillende allelen per merker; H_e : verwachte heterozygositeit; dominant allel: frequentie van het meest voorkomende allel.

Merker	# allelen		H_e		dominant allel	
	EL-GRO	eslu-GAN	EL-GRO	eslu-GAN	EL-GRO	eslu-GAN
Elu2	6	5	0,337	0,392	0,805	0,769
Elu19	4	3	0,472	0,487	0,700	0,653
Elu25	5	4	0,418	0,534	0,750	0,593
Elu51	2	2	0,167	0,124	0,908	0,933
Elu64	2	3	0,150	0,052	0,918	0,973
Elu76	10	6	0,704	0,571	0,447	0,587
Elu78	2	2	0,017	0,014	0,992	0,993
Elu252	2	2	0,356	0,241	0,769	0,860
Elu276	8	6	0,711	0,658	0,368	0,486
gemiddeld	4,56	3,67	0,370	0,341	0,739	0,760
totaal	41	33				

3.3.2 Genetische differentiatie tussen temporele stalen

Om na te gaan of er een significante effecten van genetische drift zijn waar te nemen naast het verlies van allelen kwantificeren we de verschillen in allelfrequenties aan de hand van F_{ST} . Significantie wordt bepaald aan de hand van een randomisatietest in *Genetix* (Belkhir et al. 1996). In Tabel 3.6 zijn de F_{ST} waarden per locus en over loci weergegeven.

Tabel 3.6: F_{ST} waarden per locus en over loci. De significantietest gebeurde aan de hand van 1000 randomisaties.

Merker	F_{ST}
Elu2	0,00
Elu19	0,00
Elu25	0,07
Elu51	0,00
Elu64	0,03
Elu76	0,03
Elu78	0,00
Elu252	0,02
Elu276	0,07
over loci	0,02

Vijf van de negen loci vertonen een F_{ST} waarde die verschilt van nul. Dit wijst op een globaal verschil in allelfrequenties tussen beide onderzochte populaties. Ook over loci wordt een verschil in allelfrequenties geobserveerd. Dit verschil is significant ($p < 0,001$). We merken wel op dat het verschil in allelfrequenties weliswaar significant is maar het is ook relatief gering.

3.4 Simulatie ouderschapsanalyse

De resultaten van de simulatie van de ouderschapsanalyse zijn weergegeven in Tabel 3.7. Voor een stijgend aantal loci dat wordt geanalyseerd is telkens het percentage ouderparen weergegeven dat ondubbelzinnig aan een nakomeling kan worden toegewezen. Het is duidelijk dat de resolutie van de gebruikte merkers niet hoog genoeg is om een ouderschapsanalyse uit te voeren.

Tabel 3.7: resultaten toewijzingsanalyse. # loci: gebruikt aantal loci met toevoeging van telkens het meest variabele van de overblijvende variabele loci; % toewijzing ouderpaar: aantal ouderparen dat ondubbelzinnig kon worden toegewezen aan de nakomelingen.

# loci	% toewijzing ouderpaar
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	1
7	4
8	5
9	6
10	6
11	6

4. Discussie

4.1 Algemeen

Kennis over de genetische diversiteit van een kweekpopulatie laat toe om in te schatten of de diversiteit afwijkt van de onverstoorde situatie. Het is immers het doel om te herbepoten met een pootvis met een hoge genetische diversiteit. Bovendien schept deze kennis de mogelijkheid om uitheemse genetische lijnen te detecteren en te vermijden dat hiermee zou worden gekweekt voor herbepoting. Snoek is een populaire soort voor recreatieve doeleinden, met name de sportvisserij. De populaties van snoek zijn de voorbije tientallen jaren dan ook aangevuld met pootvis waarvan de origine niet altijd even duidelijk gedocumenteerd is of met uitheemse pootvis. Bovendien laat het ontbreken van een gedocumenteerde collectie van historische stalen niet toe om een beeld te schetsen van de genetische karakteristieken van onverstoorde inheemse populaties. Op basis van de beschikbare informatie en eerder uitgevoerd onderzoek werd de huidige kweekpopulatie van de kwekerij van het INBO genetisch onderzocht.

4.2 Genetische merkers

In functie van de vergelijkbaarheid van onze stalen met de stalen van Maes et al. (2004) werd ervoor gekozen om dezelfde merkers op te nemen in deze studie. Om de resolutie nog te verhogen en omdat nieuwe merkers beschikbaar zijn werden er drie additionele merkers geanalyseerd (ELU87, Hansen et al. 1999; ELU38 en ELU108, Launey et al. 2003). Op één locus na vertoonden alle merkers variatie. In onze stalen bleek locus ELU38 geen variatie te vertonen, waardoor deze merker voor onze stalen geen hogere resolutie oplevert. Dit in tegenstelling tot Franse populaties van snoek waar deze merker wel variabel is (Launey et al. 2003, 2006). De integratie van 12 merkers in twee multiplex reacties laat een kost- en tijdsefficiënte analyse toe. Bovendien verhoogt de resolutie van de merkers door van 9 naar twaalf merkers over te schakelen.

4.3 Genetische diversiteit van de kweekpopulatie

De genetische variatie die in onze stalen wordt teruggevonden is matig tot laag. Het gemiddeld aantal allelen bedraagt slecht 3,85 en de gemiddelde heterozygositeit bedraagt 0,377. Dit is een algemeen gegeven voor snoek in West-Europa. De genetische diversiteit van de Belgische en de kweekpopulaties wordt verhoogd ten opzichte van de natuurlijke situatie door de introgressie van buitenlands (Pools) genetisch materiaal. Door het uitzetten van pootvis van uitheemse origine werden uitheemse allelen in onze populaties geïntroduceerd. Door het uitkruisen met inheemse vissen zijn deze allelen

momenteel ruim verspreid in onze inheemse populaties. Door het ontbreken van historisch referentiemateriaal valt echter niet uit te maken wat de natuurlijke genetische structuur van snoek in onze regio was.

Omwille van beheerswerken stroomafwaarts van de stockage-vijver voor snoek (Ganzepoot vijver) was het in 2008 niet mogelijk om deze kweekdieren te gebruiken. Met de hulp van het Agentschap Natuur en Bos (ANB) werden alternatieve kweekdieren gebruikt afkomstig van de Dender (3 mannetjes, 6 vrouwtjes) en van viskwekers gebroeders Vandeput (5 mannetjes, 4 vrouwtjes) uit Limburg. Bovendien konden er dankzij een samenwerking tussen ANB en de Vlaamse Roofvisfederatie toch nog elf snoeken van de Ganzepoot vijver (6M, 5V) worden gevestigd met de hengel.

De genetische diversiteit van de nieuwe kweekdieren lag duidelijk lager dan de populatie van de Ganzepoot vijver. Bij de eerste vonden we slechts 36 allelen terug, bij de laatste werden 46 allelen waargenomen. Een gereduceerde diversiteit van ruim 22% wat betreft het aantal allelen. Dit wil zeggen dat de pootvis afkomstig van de kweek in 2008 hoogst waarschijnlijk een lagere diversiteit kent dan de pootvis van de voorgaande jaren afkomstig van de Ganzepoot populatie. Dit is vermoedelijk te wijten aan het kleinere aantal kweekdieren. Onze resultaten tonen bovendien aan dat het toevoegen van snoek in 2008 uit de Dender en van de gebroeders Vandeput niet heeft geleid tot een toename in de genetische diversiteit van de totale kweekpopulatie als we alle 135 vissen samen beschouwen. Er kwamen namelijk geen allelen voor die nog niet aanwezig waren binnen de populatie van de Ganzepoot vijver. Uiteraard kunnen we er wel van uitgaan dat er ook positieve effecten te verwachten zijn van de nieuwe introductie. Zo zal de gemiddelde verwantschap tussen de individuen worden verminderd door het introduceren van individuen uit een onafhankelijke populatie.

4.4 Uitheemse genetische lijnen

Onze resultaten tonen een aanwezigheid aan van Pools genetisch materiaal in de kweekpopulatie. Het is echter zo dat deze genetische vervuiling reeds dateert van minstens tien jaar geleden (vergelijking met Maes et al 2003) en dat het genetisch materiaal van de uitheemse vissen ondertussen is ingekruist met inheems genetisch materiaal. De situatie in natuurlijke populaties is niet anders. Maes et al. (2003) beschreven de aanwezigheid van uitheemse allelen in onderzochte populaties van het Schelde- en het Maasbekken. Indien het kweken met uitheemse kweekdieren of het herbepoten met uitheems materiaal gestopt wordt dan zal het aanwezige uitheems genetisch materiaal over de loop der jaren verdund worden.

4.5 Genetische differentiatie tussen temporele stalen

De wet van Hardy-Weinberg stelt dat in een ideale populatie de allelfrequenties constant blijven in de tijd. Een ideale populatie houdt in dat de populatie voldoende groot is, dat er willekeurige paring optreedt tussen de individuen, dat er geen mutaties optreden en dat er geen genmigratie is. Indien één of meerdere van deze voorwaarden niet zijn vervuld bestaat de mogelijkheid dat de allelfrequenties variëren in de tijd. Dit verschijnsel wordt genetische drift genoemd. De richting waarin een allelfrequentie varieert is willekeurig. Dit wil zeggen dat de frequentie van een specifiek allel kan toenemen of afnemen van één generatie op de andere. Samen met de genetische drift ontstaat het risico op 'toevallig' verlies van allelen. De frequentie van een willekeurig allel kan immers in die mate wijzigen dat ze tot nul wordt teruggebracht. Uiteraard is de kans dat een allel verdwijnt het grootst bij zeldzame allelen. Deze hebben immers weinig of geen buffer tegen toevallige veranderingen en zullen dan ook als eerste verdwijnen. Genetische drift leidt dus tot een onherroepelijk verlies aan genetische diversiteit. De enige manier waarop verloren allelen terug in de populatie kunnen verschijnen is door genmigratie. De absolute voorwaarde is dan wel dat deze allelen nog aanwezig zijn in andere populaties.

De invloed van genetische drift is duidelijk in onze dataset. De stalen van de Ganzepoot kweekpopulatie die 8 jaar eerder genomen zijn bevatten een duidelijk hoger aantal allelen. In de loop van de tijd en over generaties zien we een significant verlies van genetische variatie. De grootte van dit verlies is aanzienlijk: met een verlies van acht van de 41 allelen zien we een terugval van de genetische diversiteit van bijna 20%.

Verschillen in allelfrequenties, gekwantificeerd met F_{ST} , zijn minder uitgesproken tussen beide temporele stalen, voornamelijk omdat de meeste loci gedomineerd worden door één allel dat in hoge frequentie aanwezig is. Door de hoge frequentie zal dit allel een effectieve buffer vormen tegen al te grote veranderingen in allelfrequenties binnen de populatie. Dit wordt bevestigd door significante maar lage F_{ST} waarden.

Verlies van genetische variatie door toevalseffecten valt niet uit te sluiten. Zeker niet als er met een beperkt aantal kweekdieren wordt gewerkt. Een mogelijke strategie om dit verlies aan diversiteit te compenseren is het regelmatig introduceren van nieuwe kweekdieren in de kweekpopulatie. Indien de genetische structuur van de natuurlijke populaties gekend is en indien ook de kweekdieren genetisch gekarakteriseerd zijn kan men streven naar een gerichte introductie van nieuwe kweekdieren met een specifiek genetisch profiel.

4.6 Resolutie genetische merkers voor ouderschapsanalyse

De resolutie van de gebruikte merkers is onvoldoende om een gedetailleerde ouderschapsanalyse uit te voeren. Amper zes procent van de gesimuleerde nakomelingen kan ondubbelzinnig aan een ouderpaar worden toegewezen. De reden hiervoor is de eerder beperkte resolutie van de merkers voor snoek in de kweekpopulatie, enerzijds door een laag aantal allelen en anderzijds door de dominantie van sommige allelen. Voor verdere toepassingen zoals het analyseren van de overleving van specifieke familiegroepen of gerichte een ouderschapsanalyse om inteelt bij doorkweek te vermijden is de resolutie van de gebruikte merkers te laag. Mogelijk kan informatie over de kruisingen hier gedeeltelijk een oplossing bieden. Als er geweten is welke specifieke kruisingen zijn uitgevoerd dan is het mogelijk om een aantal kandidaat ouderparen uit te sluiten en zo de analyse te verfijnen. De resolutie is echter zo laag dat we denken dat dit nog steeds een hoge graad van onzekerheid en eventuele fouten met zich mee zou brengen. Een tweede mogelijkheid om de resolutie te vergroten is het verhogen van het aantal merkers. Voor snoek zijn er nog een aantal microsatelliet merkers beschikbaar die kunnen gebruikt worden (Miller & Kapuscinski 1996; Hansen et al. 1999; Launey et al. 2003). Ook voor de verwante soort *Esox masquinongy* zijn er microsatelliet merkers ontwikkeld die mogelijk bruikbaar zijn bij *Esox lucius*. Het aantal merkers verhogen biedt echter geen absolute garantie op het verhogen van de resolutie voor ouderschapsanalyse. Zo is het niet vooraf gekend of de nieuwe merkers in de kweekpopulatie variatie zullen vertonen. Een dergelijk fenomeen werd vastgesteld bij het gebruik van locus ELU38 dat in deze studie geen variatie vertoont maar bijvoorbeeld wel in Franse populaties (Launey et al. 2003). Bovendien is het zo dat snoek in West-Europa voor microsatelliet merkers een relatief lage variatie vertoont. Het is dus mogelijk dat er een groot aantal merkers moet worden gebruikt om een geschikte resolutie voor ouderschapsanalyse te bekomen. Dit maakt de genetische analyses duur en arbeidsintensief.

5. Advies voor het beheer van de kweekpopulatie van snoek

5.1 Aanwezigheid van buitenlands teeltmateriaal

De hoge resolutie van microsatelliet merkers laat toe om een gedetailleerde analyse door te voeren van het genetisch materiaal dat in de kweekpopulatie van snoek aanwezig is. Onze resultaten tonen aan dat de origine van de niet-inheemse allelen in de kweekpopulatie Pools is. Een verwantschap van snoek uit Belgische rivieren met deze Poolse genetische lijnen werd ook eerder aangetoond door Maes et al. (2003, 2004). Vermoedelijk is dit het resultaat van het uitzetten van uitheems pootmateriaal of de translocatie van volwassen snoek van Polen naar ons land. We vonden echter geen zuiver uitheemse individuen (meer) maar eerder individuen die het resultaat zijn van kruisingen tussen in- en uitheemse individuen. Bovendien suggereren onze gegevens dat de introgressie van uitheems materiaal eerder beperkt is geweest wat het aantal individuen betreft.

Om de uitbreiding van uitheemse genetisch materiaal in de toekomst verder te beperken is het aan te raden om niet meer verder te kweken met de ouderdieren uit groep 1a. Deze bevatten immers het grootste aandeel Pools genetisch materiaal.

Het spreekt voor zich dat er geen pootvis mag worden uitgezet waarvan de origine onbekend of onzeker is. Bij de controle van uitzettingen in 2003, aangekocht bij kwekerij Beynens in Langerloo, bleek dat een deel van de pootvis aan de Poolse referentiepopulatie werd toegewezen (Maes et al. 2004). Er kan bijvoorbeeld worden gestreefd naar een kwaliteitslabel voor kwekerijen die pootvis leveren. Hierbij kan de ouderpopulatie worden gescreend op het inheems karakter en kan een substaal van de pootvis genetisch worden gecontroleerd op de genetische diversiteit en de inheemse oorsprong.

5.2 verlies van genetische diversiteit in de kweekpopulatie

Door de beperkte omvang van de kweekpopulatie in de Ganzepoot vijver en de hoge graad van isolatie (geen uitwisseling met andere populaties) treedt er genetische drift op van de ene generatie op de andere. Dit wil zeggen dat er door toeval allelen verdwijnen uit de populatie en dat hierdoor ook de genetische diversiteit daalt. Tegelijk stijgt de onderlinge verwantschap tussen de kweekdieren waardoor de graad van inteelt toeneemt. Om deze negatieve effecten tegen te gaan is het wenselijk om regelmatig nieuwe dieren aan de kweekpopulatie toe te voegen. We stellen voor om jaarlijks vijf tot tien nieuwe individuen te introduceren. Hierdoor wordt het verlies door (natuurlijke) sterfte gecompenseerd en worden er regelmatig nieuwe allelen in de populatie gebracht. Tegelijk zal ook de verwantschap tussen de individuen van de kweekpopulatie afnemen,

waardoor de kans op inteelt kleiner wordt. De nieuwe individuen kunnen uit natuurlijke populaties komen maar moeten genetisch worden gescreend op hun inheems karakter. Dit wil zeggen dat ze ofwel aan de Nederlandse, Deense of aan de Franse referentiepopulatie worden toegewezen. Eventueel kunnen kweekdieren uit Nederland of Frankrijk worden gehaald.

5.3 Doorkweken van generaties ter vervanging van de broedstock

In de praktijk is het vaak zo dat een deel van de kweek van een bepaald jaar wordt doorgekweekt om te dienen als broedstock in de toekomst. Dit biedt het voordeel dat er slechts één jaarklasse wordt doorgekweekt waardoor alle individuen ongeveer dezelfde grootte hebben en samen kunnen worden opgekweekt zonder al te veel gevaar voor kanibalisme. Het nadeel is dat de verwantschap tussen de individuen vrij snel toeneemt. Wij pleiten er echter voor om jaarlijks een klein aantal individuen door te kweken als toekomstige broedstock. De verwantschap in de kweekpopulatie zal hierdoor minder snel toenemen. Als er op regelmatige basis nog externe kweekdieren in de populatie worden gebracht dan is het risico op inteelt uiterst klein.

Appendix 1: genotypes voor snoek met PIT-tag codes en lab-codes

Soort	PIT-tag code	lab-code	Elu51	Elu78	Elu25	Elu2	Elu252	Elu19	Elu64	Elu108	Elu276	Elu38	Elu76	Elu87
<i>E. lucius</i>	00 0671 31FC	C/08/0949	112112	135135	151155	219219	113113	125125	116116	131135	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	00 066E 103A	C/08/0950	112114	135135	153153	215219	113113	125125	116116	131137	187187	179179	159159	142154
<i>E. lucius</i>	00 066D CC2D	C/08/0951	112112	135135	153155	219219	113113	125125	116116	131135	187191	179179	159159	154160
<i>E. lucius</i>	00 066D CBF5	C/08/0952	112114	135135	153155	219219	113113	125127	116116	131131	158158	179179	159182	142154
<i>E. lucius</i>	00 066E 24DD	C/08/0953	112114	135135	153153	215219	113113	125127	116116	131131	119158	179179	141182	155155
<i>E. lucius</i>	00 066E 211D	C/08/0954	112112	135135	153155	219219	113113	125127	116116	131137	119187	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00 066D D141	C/08/0955	112114	135135	153153	219219	115115	125125	116116	135137	187000	179179	159167	155155
<i>E. lucius</i>	00 066D E7F8	C/08/0956	112112	135135	153153	219219	113113	125127	116116	131131	119119	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00 066E 06A8	C/08/0957	112112	135135	153155	219219	113113	125125	116116	131131	119187	179179	141159	142000
<i>E. lucius</i>	00 0671 0E20	C/08/0958	112112	135135	153153	219000	113113	127127	116116	131135	158158	179179	159182	142155
<i>E. lucius</i>	00 066D FE83	C/08/0959	112112	135135	155155	199219	113113	125125	116116	131135	119158	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00 066E 0CF7	C/08/0960	112112	135135	153153	219219	115115	127127	116116	131135	158187	179179	159182	155155
<i>E. lucius</i>	00 066D F737	C/08/0961	112112	135135	155155	219219	113113	125127	116116	131135	119187	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00 066E 16A1	C/08/0962	112112	135135	153155	219219	115115	125127	116116	131135	158187	179179	159182	155155
<i>E. lucius</i>	00 066D FCFA	C/08/0963	112112	135135	151153	199219	113113	125127	116116	131131	119187	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00 066D F908	C/08/0964	112112	135135	153153	215219	113113	125127	116116	131131	158187	179179	159182	155155
<i>E. lucius</i>	00 066E 01F0	C/08/0965	112114	135135	153153	219219	115115	125125	116116	131135	158187	179179	159159	155155
<i>E. lucius</i>	00 066E 050C	C/08/0966	112112	135135	153153	219219	113113	127129	116116	131137	187187	179179	159159	155155
<i>E. lucius</i>	00 066D E12A	C/08/0967	112114	135135	153153	219219	113113	125127	116116	131135	187000	179179	159182	155155
<i>E. lucius</i>	00 066D D122	C/08/0968	112112	135135	153153	219219	113113	125125	116116	135135	000000	179179	141159	155155
<i>E. lucius</i>	00 066D F07C	C/08/0969	112112	135135	155155	219219	113113	125125	116116	135135	187187	179179	159159	155155
<i>E. lucius</i>	00 066D E619	C/08/0970	112112	135135	153155	219219	113113	125125	116116	135135	000000	179179	141159	142150
<i>E. lucius</i>	00 0671 16AF	C/08/0971	112112	135135	153153	219219	113115	125127	116118	137137	119000	179179	141141	142142
<i>E. lucius</i>	00 066D C59A	C/08/0972	112112	135135	153155	219219	113113	125125	116116	135135	000000	179179	159159	142155
<i>E. lucius</i>	00 066E 140D	C/08/0973	112112	135135	153153	219000	115115	125125	116122	135139	187187	179179	159000	142155
<i>E. lucius</i>	00 066D BD9D	C/08/0974	112112	135135	153155	199219	113113	125125	116116	131135	158187	179179	159159	155155
<i>E. lucius</i>	00 066E 1EFF	C/08/0975	112114	135135	155155	219219	113113	127127	116116	135135	158158	179179	159182	142155
<i>E. lucius</i>	00 066D C234	C/08/0976	112112	135135	153155	219219	115115	125125	116116	131135	158187	179179	159159	142155
<i>E. lucius</i>	00 0671 3773	C/08/0977	112112	135135	153155	219219	113113	127127	116116	131135	119158	179179	141182	142155
<i>E. lucius</i>	00 066E 13F8	C/08/0978	112112	135135	153153	199219	113113	125127	116116	131137	119187	179179	141159	155155
<i>E. lucius</i>	00 066E 0E94	C/08/0979	112112	135135	153155	219219	113113	125127	116116	131137	158187	179179	159167	155155

<i>E. lucius</i>	00 066D D70C	C/08/0980	112112	135135	153155	215219	113113	125125	116116	133137	187187	179179	159159	155155
<i>E. lucius</i>	00 066E 0491	C/08/0981	112112	135135	153153	219219	113113	125129	116116	137137	119119	179179	141141	155155
<i>E. lucius</i>	00 066D C3FD	C/08/0982	112112	135135	153153	195219	113113	125129	116116	131137	119187	179179	141159	155155
<i>E. lucius</i>	00 0671 2248	C/08/0983	112112	135135	155155	219219	113113	125127	116116	131131	119191	179179	141159	155160
<i>E. lucius</i>	00 066D D810	C/08/0984	112112	135135	153153	219219	113113	125127	116116	131135	158187	179179	159178	142155
<i>E. lucius</i>	00-068A F39A	C/08/0985	112112	135135	153153	215215	113113	125125	116116	131131	119187	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00-068A A425	C/08/0986	112112	135135	153153	219219	115115	125125	116116	131131	187187	179179	159159	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 6B39	C/08/0987	112112	135135	153155	219219	113115	125127	116116	131131	158187	179179	159182	142155
<i>E. lucius</i>	00-068A F628	C/08/0988	112112	135135	153153	215219	113113	125127	116116	135135	119119	179179	141141	142155
<i>E. lucius</i>	00-068B 9F86	C/08/0989	112112	135135	153153	199219	115115	125125	116116	131135	187187	179179	159159	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 1ADB	C/08/0990	112112	135135	153153	219219	113113	127127	116116	135135	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 2276	C/08/0991	112112	135135	151155	215219	113113	127127	116116	135135	119158	179179	141182	142155
<i>E. lucius</i>	00-068B 4496	C/08/0992	112112	135135	153153	199219	113115	125127	116116	131131	158158	179179	182182	142155
<i>E. lucius</i>	00-068B 0DB1	C/08/0993	112112	135135	153155	219219	115115	125127	116116	131135	158158	179179	182182	142155
<i>E. lucius</i>	00-068B 814B	C/08/0994	112112	135135	153153	215219	113113	125127	116116	131135	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	00-068A F862	C/08/0995	112112	135135	153153	219219	113115	125127	116116	131135	119187	179179	141159	155155
<i>E. lucius</i>	00-068B A4C0	C/08/0996	112112	135135	153153	219219	115115	125127	116116	131135	119187	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00-068A A005	C/08/0997	112112	135135	151153	219219	113113	127127	116116	135135	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 534F	C/08/0998	112112	135135	151153	215219	113113	125127	116116	131131	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	00-068A B656	C/08/0999	112112	135135	153153	215215	113113	125127	116116	131135	119119	179179	141141	142155
<i>E. lucius</i>	00-068A FFAB	C/08/1000	112112	135135	153155	215219	113113	127129	116116	131131	119187	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00-068B 7037	C/08/1001	112112	135135	153155	215219	113113	127129	116116	131135	119187	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00-068A FB5D	C/08/1002	112112	135135	153153	199215	115115	125125	116116	131135	187187	179179	159159	142155
<i>E. lucius</i>	00-068B 2929	C/08/1003	112112	135135	153153	215215	113113	125127	116116	135135	119119	179179	141141	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 2B53	C/08/1004	112112	135135	153153	219219	115115	125125	116116	131131	119158	179179	141182	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 809A	C/08/1005	112112	135135	151153	215219	113113	127127	116116	135135	119187	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00-068B 6EA3	C/08/1006	112112	135135	153153	215219	113113	127127	116116	135135	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 1C93	C/08/1007	112112	135135	153153	215219	115115	125125	116116	131131	119158	179179	141182	142155
<i>E. lucius</i>	00-068A B728	C/08/1008	112112	135135	151153	215219	113113	125127	116116	135135	119119	179179	141141	142142
<i>E. lucius</i>	00-068A D456	C/08/1009	112112	135135	153153	219219	113115	125127	116116	131131	187187	179179	159159	142155
<i>E. lucius</i>	00-068B 0C71	C/08/1010	112112	135135	151153	215215	113113	125125	116116	131135	119187	179179	141159	142000
<i>E. lucius</i>	00-068B 9C5E	C/08/1011	112112	135135	153155	195219	113113	125129	116116	131137	119187	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00-068A C484	C/08/1012	112112	135135	151153	215219	113113	125127	116116	131135	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 3D9D	C/08/1013	112112	135135	151153	219219	113113	127127	116116	131135	119187	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00-068B 7A75	C/08/1014	000000	135135	151153	215219	113113	125127	116116	131131	119000	179179	141182	142155

<i>E. lucius</i>	00-068B 8117	C/08/1015	112112	135135	153155	219219	115115	125127	116116	131131	158187	179179	159182	155155
<i>E. lucius</i>	00-068B 8C54	C/08/1016	112112	135135	153155	215219	113113	127129	116116	135137	158158	179179	182182	155155
<i>E. lucius</i>	00-068A C4E5	C/08/1017	112112	135135	153153	215219	113113	125127	116116	135135	119119	179179	141141	142155
<i>E. lucius</i>	00-068A E42D	C/08/1018	112112	135135	153155	219219	115115	125127	116116	131131	158187	179179	159182	142155
<i>E. lucius</i>	00-068B 6761	C/08/1019	112112	135135	151153	215219	113113	125127	116116	135135	119119	179179	141141	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 96AD	C/08/1020	112112	135135	153153	215219	113113	125127	116116	135135	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 2881	C/08/1021	112112	135135	153153	199219	115115	125127	116116	131131	158158	179179	182182	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 6B47	C/08/1022	112112	135135	153153	199219	115115	125127	116116	131131	158158	179179	182182	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 0CAA	C/08/1023	112112	135135	151153	215215	113113	125127	116116	135135	119119	179179	141141	142142
<i>E. lucius</i>	00-068A F1BC	C/08/1024	112112	135135	153155	219219	115115	125127	116116	131131	119187	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00-068A C07B	C/08/1025	112112	135135	153153	215215	113113	125125	116116	131131	119119	179179	141141	142155
<i>E. lucius</i>	00-068A B01E	C/08/1026	112112	135135	153153	199219	113115	125125	116116	131131	187187	179179	159159	142142
<i>E. lucius</i>	00-068B 976A	C/08/1027	112112	135135	151153	219219	113113	127127	116116	131131	119119	179179	141141	142155
<i>E. lucius</i>	00-066D E724	C/08/1028	112112	135135	153153	199219	115115	125127	116116	131135	158187	179179	159182	142155
<i>E. lucius</i>	00-0670 162A	C/08/1029	112112	135135	153153	215219	113115	125127	116116	131135	119187	179179	141159	142155
<i>E. lucius</i>	00-068B 3993	C/08/1030	112112	135135	153155	219219	113115	125127	116116	131135	119158	179179	141182	142142
<i>E. lucius</i>	00-066E 2D5F	C/08/1031	112112	135135	153153	215219	113113	125127	116116	131135	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	00-066D CEA2	C/08/1032	112112	135135	153153	199215	113115	125125	116116	131131	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	00-066D FFBB	C/08/1033	112112	135135	153153	215219	113113	127127	116116	131135	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	00-066D DC0C	C/08/1034	112112	135135	153153	199215	113115	125127	116116	131135	119158	179179	141182	142155
<i>E. lucius</i>	00-066D D213	C/08/1035	112112	135135	153153	219219	115115	125127	116116	131131	158187	179179	159182	155155
<i>E. lucius</i>	00-066D CDF3	C/08/1036	112112	135135	153153	219219	113115	125127	116116	131135	119158	179179	141182	142142
<i>E. lucius</i>	00 066E 00B3	C/08/1037	112112	135135	153155	219219	113113	125125	116116	135137	158187	179179	159159	155155
<i>E. lucius</i>	00 066E 2E11	C/08/1038	112114	135135	153155	191199	115115	125125	116116	135135	158158	179179	159182	155155
<i>E. lucius</i>	00 066D C38F	C/08/1039	112114	135135	153155	219219	113113	125125	116116	135135	187187	179179	159167	155155
<i>E. lucius</i>	00 066E 12A8	C/08/1040	112114	135135	153153	199219	113113	125127	116116	135135	158158	179179	159159	142155
<i>E. lucius</i>	00 066D DF4D	C/08/1041	112112	135135	153155	219219	113113	125127	116116	131137	158187	179179	159167	155000
<i>E. lucius</i>	00 0670 0D88	C/08/1042	112112	135135	153157	219219	115115	125125	116116	131135	187187	179179	159159	142155
<i>E. lucius</i>	00 066F ECF1	C/08/1043	112112	135135	153153	219219	113113	125125	116116	135135	187187	179179	159159	142155
<i>E. lucius</i>	00 068A E3C8	C/08/1044	112112	135135	153155	199219	113113	125125	116118	135137	124187	179179	141000	155000
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1045	112112	135135	153155	195219	113113	125129	116116	131131	119187	179179	141159	137154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1046	112112	135137	153155	219219	113113	125125	116116	131135	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1047	112112	135135	153153	199219	113113	125125	116116	131137	119187	179179	141159	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1048	112112	135135	153155	195219	113113	125125	116116	131137	119158	179179	141182	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1049	112112	135135	153157	199219	113113	125127	116116	131135	187187	179179	159159	142156

<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1050	112112	135135	153153	195199	113113	125125	116116	131137	187187	179179	159159	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1051	112112	135135	155155	191219	113113	125129	116116	131137	187187	179179	159159	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1052	112112	135135	153155	000000	113113	125127	116116	131135	187187	179179	159159	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1053	112112	135135	153153	219219	113113	125125	116116	135135	119119	179179	141141	142150
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1054	112112	135135	155155	219219	113113	125129	116116	137137	187187	179179	159159	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1055	112112	135135	151153	215219	113113	125127	116116	131131	119187	179179	141159	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1056	112112	135135	153155	199219	113113	125125	116116	131135	119158	179179	141159	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1057	112112	135135	153155	219219	113113	125127	116116	131135	187191	179179	159159	154160
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1058	112112	135135	153153	199219	115115	125125	116116	131131	158187	179179	159182	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1059	112112	135135	153155	215219	113113	125127	116116	131135	158187	179179	159159	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1060	112112	135135	155155	219219	113113	125125	116116	131137	119187	179179	141159	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1061	112112	135135	153157	191219	113113	125127	116116	135135	158158	179179	182182	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1062	112112	135135	153153	000000	113113	125127	116116	131137	171187	179179	159159	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1063	112112	135135	151153	000000	113113	125127	116116	131135	119119	179179	141141	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1064	112114	135135	155155	219219	115115	125127	116116	131135	158158	179179	159182	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1065	112112	135135	151153	215219	113113	125127	116116	131131	158187	179179	159182	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1066	112112	135135	153155	219219	113113	125127	116116	131135	119187	179179	141159	154160
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1067	112112	135135	153155	000000	113113	125125	116116	135137	119187	179179	141141	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1068	112112	135135	153155	219219	113113	125127	116116	131131	158191	179179	159182	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1069	112112	135135	153153	000000	113113	125127	116116	131131	119187	179179	141159	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1070	112114	135135	155155	219219	115115	125127	116118	131135	119187	179179	141159	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1071	112112	135135	155155	219219	113113	125129	116116	135137	124191	179179	141159	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1072	112112	135135	153153	195219	113113	125125	116116	131135	119187	179179	141159	142142
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1073	112112	135135	153153	199219	113113	125125	116116	131135	158187	179179	159159	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1074	112114	135135	153155	000000	113113	125127	116116	131131	187191	179179	159159	154160
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1075	112112	135135	153155	195215	113113	125129	116116	131137	158187	179179	159182	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1076	112112	135135	151155	215219	113113	125125	116116	131135	187187	179179	159159	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1077	112112	135135	153153	219219	113113	125127	116118	135137	187187	179179	159159	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1078	112112	135135	153157	000000	115115	125125	116116	131135	187187	179179	159159	142154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1079	112112	135135	153153	195199	113113	125129	116116	131137	187187	179179	159159	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1080	112112	135135	153157	199219	113113	125127	116116	131135	119187	179179	141163	142142
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1081	112112	135135	151153	000000	113113	125127	116116	131135	187187	179179	159167	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1082	112112	135135	153155	219219	113113	125125	116116	135135	119187	179179	141159	154154
<i>E. lucius</i>	nb	C/08/1083	112112	135135	153155	219219	113113	127127	116116	131135	119191	179179	141159	154154

Deel III: Microsatelliet analyse serpeling (*Leuciscus leuciscus*)

1. Inleiding

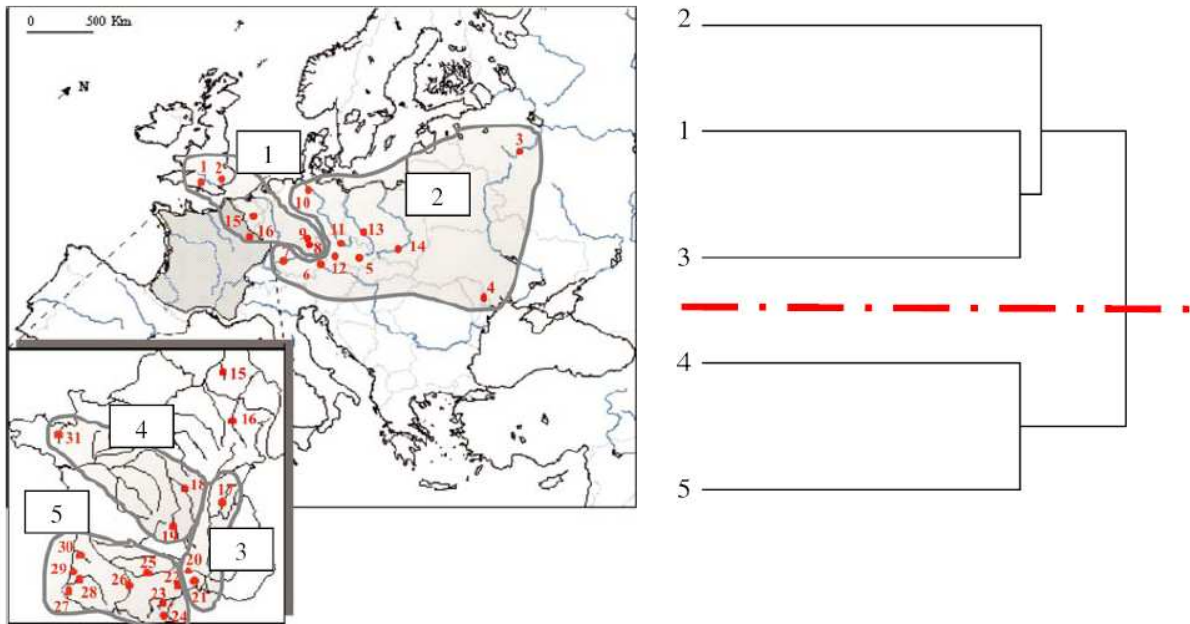
1.1 Serpeling (*Leuciscus leuciscus*): habitat en verspreiding

Serpeling komt voor in matig tot snel stromende rivieren met kiezelbodemp. Het paaihabitat bevindt zich vaak in nevenstroompjes met ondiepe kiezelbodemp. De soort kent een ruime verspreiding in West en Centraal Europa, met uitzondering van de zuidelijke landen Spanje, Italië en Griekenland. In Vlaanderen komt de soort nog op een aantal plaatsen voor. Het betreft hier bijna uitsluitend gekweekte en uitgezette populaties.

1.2 Genetische structuur van serpeling

1.2.1 Fylogeografie

In Europa zijn vijf Evolutionair Significante Eenheden (ESE) aanwezig (Costedoat et al. 2008) (Figuur 1.1). De genetische verschillen tussen deze eenheden zijn aanzienlijk en vallen in de grootte-orde van de verschillen die soms tussen soorten worden waargenomen. Binnen een ESE is de genetische variatie relatief gering wat wijst op een recente expansie vanuit het refugium. Voor Vlaanderen werden enkel haplotypes van ESE 1 waargenomen (De Gelas et al. 2007). Er zijn dus geen aanwijzingen van grootschalige translocaties van individuen uit andere ESE naar onze regio.



Figuur 1.1: Evolutionair Significante Eenheden van serpeling in Europa (uit Costedoat et al. 2008)

1.2.2 Microsatelliet merkers

De genetische structuur van de Vlaamse populaties werd onderzocht aan de hand van microsatelliet merkers (De Gelas et al. 2007). Er werden genetische verschillen waargenomen tussen het Maasbekken en het Scheldebekken. De populaties van de respectievelijke bekkens worden gestockeerd met pootvis afkomstig van twee verschillende kweekpopulaties. Alle gestockeerde populaties vertoonden een grote genetische verwantschap met de kweekpopulatie.

2. Materiaal en methode

2.1 Stalen

Alle kweekdieren van de kweekpopulatie van het Scheldebekken aanwezig op de kwekerij van het INBO in Linkebeek werden voorzien van een pit-tag met een uniek nummer (zie Appendix 1). Hierdoor is ieder individu traceerbaar. Tegelijk werd een vinknip genomen voor DNA analyse. De bekomen genotypes van de stalen kunnen met behulp van de PIT-tag ondubbelzinnig aan een kweekvis gekoppeld worden. De weefselstalen werden bewaard in 100% ethanol tot op het moment van verdere analyse.

Vorig onderzoek (De Gelas et al. 2007) heeft uitgewezen dat de kweekpopulatie voor het Maasbekken genetisch minder variabel is dan een referentiepopulatie uit het Maasbekken in Nederland (Thornbeek). Er werd daarom geadviseerd om de huidige kweekpopulatie aan te vullen met vissen uit een natuurlijke populatie uit het Maasbekken (De Gelas et al. 2007). Tot nog toe werden echter nog geen nieuwe kweekvissen in de kweekpopulatie van het Maasbekken opgenomen in de kweekpopulatie. De resultaten van de genetische analyse voor de kweekpopulatie van het Maasbekken zijn te vinden in De Gelas et al. (2007). Deze kweekdieren werden echter nog niet voorzien van een PIT-tag.

2.2 DNA-extractie en amplificatie

In totaal werden 72 vissen uit de kweekpopulatie van het Scheldebekken voorzien van een PIT-tag. Van deze vissen werd eveneens een weefselstaal genomen. Voor de DNA-extractie werd gebruik gemaakt van de commerciële NucleoSpin® extraction kit (Macherey-Nagel), volgens de instructies van de fabrikant. De helft van de vinknip werd gebruikt voor DNA extractie. De andere helft wordt bewaard als archiefmateriaal. Bij kleine vinknippen werd de hele vinknip gebruikt.

2.3 Microsatelliet analyse: DNA amplificatie

Voor de keuze en amplificatie van de microsatelliet merkers werd uitgegaan van de merkers geoptimaliseerd in De Gelas et al. (2007). Merkers specifiek ontwikkeld voor serpeling zijn momenteel niet beschikbaar, daarom werd gebruik gemaakt van merkers die ontwikkeld zijn voor andere soorten en die geoptimaliseerd werden voor serpeling (Tabel 2.1). In totaal werden elf merkers geamplificeerd.

Tabel 2.1: microsatelliet merkers voor serpeling. De F-primer is gemerkt met een kleurstof. De naam van het locus geeft de oorsprong weer van de gebruikte merker: Lid *Leuciscus idus*, Rru *Rutilus rutilus*, Lce *Leuciscus cephalus*, Lele *Leuciscus leuciscus*; nb: niet beschikbaar.

Locus	Primer	range	Repeat	Kleur	Multiplex
Lid_1	F: TAA AAC ACA TCC AGG CAG ATT R: GGA GAG GTT ACG AGA GGT GAG	220-250	CT/CA	FAM	1
Lid_2	F: CCA CTC CTC AGC CGA CAG A R: AAA TGC TGG CGG GGA AAT A	170-250	CA/T/CA		2
Lid_4	F: AAA GGA CCA CCC AAA AAT R: AAA ACA AGA GCA GCA AAA AG	187-200	GT	VIC	1
Lid_11	F: CTC CTG ATT CTT TGT CTG ACT R: TTA TTA TTT CCT GTG GTG ATT G	260-310	CT/CA	VIC	1
Rru_3	F: TTC CAG CTC AAC TCT AAA GA R: GCA CCA TGC AGT AAC AAT	170-230	GT/TG	NED	1
Rru_4	F: TAA GCA GTG ACC AGA ATC CA R: CAA AGC CTC AAA AGC ACA A	180-200	CA	PET	1
Lce_A149	F: TAT TCA ACA ATA CTA AAT ACA TGC R: AAA GAT TAG CCT TCC ACT G	78	nb	PET	2
Lce_C1	F: AGG TGT TGG TTC CTC CCG R: TGT TAT CTC GGT TTC ACG AGC	89-119	nb	FAM	2
Lce_H37	F: CAC ACC ATC AGA CAG GGA AC R: GTT ATC GCA GTA TTC GTC CG	139-199	nb	PET	2
Lele_21R2	F: TGG CCC ACT TAT CCA ACC GGA GG R: TGG GGC CAC TTC GAC ACT TCA CG	150-174	nb	FAM	2
Lele_32	F: GTA GCG GGC TTT TTG TGG CCG TG	336-372	nb	NED	2

Lid & Rru: Barinova et al. 2004, Lce: Larno et al. 2005, Lele: De Gelas et al. 2007

De merkers worden verdeeld over twee multiplex PCR reacties (Tabel 2.1). Amplificatie gebeurt met behulp van de Qiagen® Multiplex PCR kit volgens de instructies van de fabrikant in een 10 µl reactiemengsel. In tabel 2.2 en Tabel 2.3 worden de reactiemengsels voor respectievelijk multiplex 1 en multiplex 2 weergegeven. In Tabel 2.4 wordt het reactieverloop voor beide multiplex reacties weergegeven (uit De Gelas et al. 2007).

Tabel 2.2: reactiemengsel voor multiplex 1 serpeling (10µl reactiemengsel)

Produkt	1 reactie	Eindconcentratie
Quiagen MM (2x)	5 µl	1x
Q	1 µl	
Lid_1	0,8 µl	0,8 µM
Lid_2	0,4 µl	0,4 µM
Lid_4*	0,025 µl	0,025 µM
Lid_11	0,2 µl	0,2 µM
Rru_3	0,2 µl	0,2 µM
Rru_4	0,4 µl	0,4 µM
DNA	1 µl	
mQ water	1,975 µl	

Noot: Werkoplossingen primers 10µM, behalve * 5µM

Tabel 2.3: reactiemengsel voor multiplex 2 serpeling (10 µl reactiemengsel)

Produkt	1 reactie	Eindconcentratie
Quiagen MM (2x)	5 µl	1x
Q	1 µl	
Lce_C1	0,1 µl	0,1 µM
Lele_21R2	0,2 µl	0,2 µM
Lele_32	0,2 µl	0,2 µM
Lce_A149	0,2 µl	0,2 µM
Lce_H37	0,1 µl	0,1 µM
DNA	1 µl	
mQ water	2 µl	

Noot: Werkoplossingen primers 10µM

Tabel 2.4: PCR reactieverloop multiplex 1 en 2 voor serpeling

Stap	Temperatuur	Tijdsduur
Activatie	95°C	15 minuten
Denaturatie	95°C	30 seconden
Annealing	54°C	1 minuut 30 seconden
Elongatie	72°C	1 minuut
Polymerisatie	60°C	30 minuten
Bewaring	10°C	

Noot: Stap 2 tot en met vier wordt 26 keer herhaald voor multiplex 1 en 35 keer voor multiplex 2

3. Resultaten

3.1 Genetische diversiteit van de kweekpopulatie

Van de onderzochte microsatelliet merkers vertoonde enkel LceA149 geen variatie. Dit locus kan echter wel gebruikt worden als diagnostisch locus. Bij serpeling komt enkel allel 78 voor. Afwijkingen hiervan in de stalen laten toe om vissen te herkennen die per vergissing als serpeling werden gedetermineerd, bijvoorbeeld juveniele exemplaren van gelijkende soorten zoals blankvoorn en kopvoorn. Alle andere microsatelliet loci vertoonden wel variatie (Tabel 3.1). Het aantal allelen varieert van vijf (Lid1) tot 13 allelen per locus (Lele32). De verwachte heterozygositeit varieert van 0.607 (Rru4) tot 0.841 (LceC1).

Tabel 3.1: diversiteitsparameters voor de kweekpopulatie serpeling van het Scheldebekken. # allelen: aantal allelen; H_e : verwachte heterozygositeit.

Merker	# allelen	H_e
LceA149	1	monomorf
LceC1	11	0.841
LceH37	12	0.723
Lele21R2	8	0.676
Lele32	13	0.756
Lid11	8	0.705
Lid4	7	0.611
Rru4	8	0.607
Lid1	5	0.698
Lid2	8	0.691
Rru3	5	0.745
Gemiddeld	7.82	0.705

3.2 Simulatie ouderschapsanalyse

De resultaten van de toewijzingsanalyse zijn weergegeven in Tabel 3.2. Voor een stijgend aantal loci is telkens het succes van de simulatie van de ouderschapsanalyse weergegeven. Indien alle polymorfe loci in beschouwing worden genomen dan kan voor elke nakomeling ondubbelzinnig het ouderpaar worden bepaald.

Tabel 3.2: resultaten toewijzingsanalyse. # loci: gebruikt aantal loci met toevoeging van telkens het meest variabele van de overblijvende variabele loci; % toewijzing ouderpaar: aantal ouderparen dat ondubbelzinnig kon worden toegewezen aan de nakomelingen.

# loci	% toewijzing ouderpaar
1	0
2	2
3	9
4	22
5	38
6	57
7	70
8	89
9	97
10	100

4. Discussie

4.1 Genetische diversiteit

De kweekdieren voor serpeling van de kweekpopulatie van het Scheldebekken zijn afkomstig van de Grote Nete. Eerder onderzoek wees uit dat in de kweekpopulatie aan de hand van een mitochondriale merker geen uitheemse genetische lijnen werden gevonden (De Gelas et al. 2007). Ook aan de hand van microsatellieten werden geen afwijkende stalen waargenomen. De genetische diversiteit is hoog. Tien van de elf onderzochte loci vertoonden variatie met een gemiddeld aantal allelen van 7.82. Ook de gemiddelde verwachte heterozygositeit ligt met 0.705 vrij hoog. Toch zijn er in de kweekpopulatie een aantal allelen aanwezig die in lage frequentie aanwezig zijn. Eerder onderzoek (De Gelas et al. 2007) en onderzoek bij snoek in deze studie tonen aan dat het gevaar voor verlies van deze allelen door drift vrij groot is bij kweek en uitzetting. Een gericht kruisingschema met aandacht voor de zeldzame allelen kan helpen om de genetische diversiteit van de gekweekte populatie te maximaliseren.

4.2 Ouderschapsanalyse

De variatie van de gebruikte merkers is voldoende om een ouderschapsanalyse uit te voeren. Hierdoor kan men gebruik maken van overlappende generaties in de kweekpopulatie en toch vermijden dat verwante individuen met elkaar worden gekruist.

5. Advies beheer van de kweekpopulatie van Serpeling

5.1 Beheer Schelde- en Maasbekken

Zoals eerder beschreven (De Gelas et al. 2007) worden het Schelde- en het Maasbekken in Vlaanderen best als twee afzonderlijke beheerseenheden beheerd. Bepoting gebeurt dan ook enkel met pootvis van een kweekpopulatie met de juiste oorsprong.

Het beheer van de kweekpopulatie kan volledig analoog gebeuren zoals beschreven voor snoek: het regelmatig inbrengen van nieuwe individuen uit natuurlijke populaties en een beperkte doorkweek met de kweekpopulatie. Voor het Scheldebekken zijn er misschien nog authentieke natuurlijke populaties in de bovenlopen van de Schelde op Frans grondgebied. Voor de kweekpopulatie van de Maas werd in 2007 al aangeraden om de hele huidige kweekpopulatie te vervangen. We adviseren om kweekdieren uit de Maas zelf te vangen en te gebruiken als nieuwe broedstockpopulatie. Naar analogie met kopvoorn en op basis van vorig onderzoek (De Gelas et al. 2007) verwachten we dat de populatie uit de Maas zeer groot is en een grote diversiteit vertoont. Indien het moeilijk is om de kweekdieren rechtstreeks op de Maas te vangen kan er gebruik gemaakt worden van zijlopen van de Maas die een rechtstreekse verbinding met de rivier hebben. In het voorjaar zal een deel van de Maaspopulatie deze zijbeken gebruiken om te paaien. Dit kan zowel van de Belgische als de Nederlandse kant van de rivier.

Appendix 1: Genotypes en PIT-tag codes voor de onderzochte serpeling stalen

Soort	PIT-tag	LceA149	LceC1	LceH37	Lele21R2	Lele32	Lid11	Lid4	Rru4
<i>L. leuciscus</i>	00 064D-210E	78078	95097	157169	162166	340345	000000	000000	000000
<i>L. leuciscus</i>	00 064D-5CC7	78078	99101	157161	000000	340363	268307	186186	184193
<i>L. leuciscus</i>	00 064D-BF55	78078	97109	157169	162162	340340	000000	000000	000000
<i>L. leuciscus</i>	00 064D-D28D	78078	97109	157171	162166	340351	262311	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00 064E-0411	78078	97109	157169	162166	340351	262264	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00 064E-28B8	000000	000000	000000	000000	000000	262264	186188	184193
<i>L. leuciscus</i>	00 064E-F6FD	78078	107109	157171	162162	340340	262264	186188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-BA1B	78078	103103	169177	158158	340345	000000	000000	000000
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-BE44	000000	000000	000000	000000	000000	262264	186186	193200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-BE52	78078	91101	159159	150166	000000	262266	186188	187200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-BEFC	78078	99111	179179	158166	340351	264266	186188	191193
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-BF96	78078	97103	169169	158162	354363	262266	186188	184200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-C054	78078	95097	157169	162162	351363	262262	186188	000000
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-C873	000000	000000	000000	000000	000000	262262	186188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-CAF6	78078	95097	157171	162162	340351	262264	188188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-D037	78078	97097	157157	162176	336363	266311	186188	191200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-D216	000000	000000	000000	000000	000000	262266	188190	200200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-D365	78078	97097	157157	162162	340352	262311	186188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-D481	78078	107109	157171	162166	340342	262264	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-D4D8	78078	95097	169169	162166	345363	264311	182188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-D4F8	78078	97101	169169	148162	344363	262311	188188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-D7E9	78078	107109	157157	160162	340340	262264	186186	193200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-D7FC	78078	95105	169177	160162	000000	000000	000000	000000
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-DE75	000000	000000	000000	000000	000000	262311	186186	193200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-DF19	78078	95095	169169	162166	340345	266311	182186	200200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-E39C	78078	97109	157171	162166	340363	262311	186188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-E4B0	000000	000000	000000	000000	000000	262264	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-E7F4	78078	107107	157157	162162	340363	262264	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00 066D-EE96	78078	107109	157169	162162	340363	262311	186186	193200

<i>L. leuciscus</i>	00	066D-EF90	78078	000000	000000	000000	000000	262311	186186	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	066D-F3FA	78078	95101	163167	160160	342347	264264	184184	187187
<i>L. leuciscus</i>	00	066D-F458	78078	107109	157171	160162	342351	262264	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	066D-F462	78078	95097	157171	162162	340351	262311	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	066D-F52C	78078	101111	149163	160160	342342	262266	188190	187203
<i>L. leuciscus</i>	00	066D-FD75	78078	103103	171179	150160	342342	262274	188201	184190
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-0048	78078	95103	171189	150160	336336	000000	000000	000000
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-06CE	78078	97107	157157	162166	340340	262264	186186	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-07B0	78078	107109	157171	162166	351363	262311	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-0A86	78078	107107	157169	162162	340340	262262	186186	193200
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-0C31	78078	95095	157169	000000	340351	000000	000000	000000
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-0CDF	78078	103111	157157	160166	340340	266266	184186	187187
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-107E	78078	95107	157171	162166	340340	262264	186186	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-11B2	78078	101101	159163	160160	338344	264274	188192	184187
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-13AD	78078	109109	157157	160162	340363	262311	186188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-145B	78078	97109	157171	162166	340352	262311	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-16B1	78078	97109	157171	162166	340363	000000	000000	000000
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-1D51	78078	97109	157169	160162	351363	262311	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-2633	000000	000000	000000	000000	000000	262311	186188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-2ADC	78078	95097	157169	162166	340340	262311	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-2E8E	78078	000000	000000	000000	000000	262311	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	066E-31E6	78078	101101	157169	154160	336372	264274	188192	190200
<i>L. leuciscus</i>	00	066F-E50C	78078	95097	157169	160166	340340	262311	186186	193200
<i>L. leuciscus</i>	00	066F-EC1F	000000	000000	000000	000000	000000	262311	186188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00	066F-FBB3	78078	103103	171179	150160	340363	262274	188201	184190
<i>L. leuciscus</i>	00	0670-01C2	000000	000000	000000	000000	000000	262262	186188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00	0670-0C27	78078	101115	169177	158162	347370	262264	186188	184193
<i>L. leuciscus</i>	00	0670-0F07	78078	109109	157157	160162	340340	262311	186186	193200
<i>L. leuciscus</i>	00	0670-11C6	000000	000000	000000	000000	000000	262264	186188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00	0670-15DA	78078	95095	157157	162166	336363	262264	186188	191200
<i>L. leuciscus</i>	00	0670-36AD	78078	101103	139171	160166	342345	266299	184184	184193
<i>L. leuciscus</i>	00	0671-1127	78078	000000	157171	162166	340340	262262	186186	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	0671-14AC	000000	000000	000000	000000	000000	264311	186188	200200

<i>L. leuciscus</i>	00	0671-153E	000000	000000	000000	000000	000000	264274	182186	184195
<i>L. leuciscus</i>	00	0671-1627	78078	107109	157171	162162	340363	262262	186188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00	0671-1B8C	78078	97109	157169	162166	340351	262264	188188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	0671-1C7D	78078	107109	157169	162162	352363	262311	188188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00	0671-2967	78078	95101	157167	160160	336347	264264	184184	187187
<i>L. leuciscus</i>	00	0671-296E	78078	97097	157169	162166	340363	262262	186188	200200
<i>L. leuciscus</i>	00	0671-2ABF	78078	97097	157169	162162	340363	262311	186188	193200
<i>L. leuciscus</i>	00	0671-3148	78078	107109	157169	162162	340340	262311	188188	193200

Deel IV: adviesverlening en genetisch onderzoek als aanvulling
bij eerder uitgevoerde genetische studies: analyse extra stalen
kleine modderkruiper (*Cobitis taenia*)

Originele aanvraag:

Ontvangen op 21/10/2008
Stalen ontvangen op 23/10/2008

Tekst e-mail dd 21/10/2008:

Koen,

Zoals afgesproken op de vorige stuurgroepvergadering zend ik je vandaag per estafette de stalen (vinclips) van kleine modderkruiper uit Frankrijk. Het betreft 5 stalen uit de IJzer te Bambeque (9/7/07) en 3 stalen uit de Leie te Erquinghem (4/9/07). Er werden geen lengtes van de vissen genoteerd.

Kan je de genetische structuur nagaan (zuivere populatie of hybride, genetische isolatie,...) en een vergelijking maken met de stalen uit Vlaanderen (IJzer en eventuele andere bekkens voor wat betreft de vergelijking met de Leie-FR)?

Deze opdracht past in de uitvoering van de overeenkomst tussen ANB-INBO-Visserijfonds (luik genetica, punt d: Adviesverlening en genetisch onderzoek als aanvulling bij eerder uitgevoerde genetische studies).

vriendelijke groeten
Kristof Vlietinck

Ir. Kristof Vlietinck
Agentschap voor Natuur en Bos
Centrale Diensten
Ferrarisgebouw
Koning Albert II-laan 20 bus 8 te 1000 Brussel
Tel. 02-553 81 50 Fax 02-553 81 05
E-mail: kristof.vlietinck@lne.vlaanderen.be

1. Stalen

Stalen (vinknip) van kleine modderkruiper, *Cobitis taenia*, werden ontvangen van Kristof Vlietinck, Agentschap Natuur en Bos. Vijf stalen zijn afkomstig van de bovenloop van de IJzer in Frankrijk ter hoogte van Bambecque (staalcode LR). Drie stalen werden verzameld in het Franse deel van de Leie ter hoogte van Erquinghem (staalcode LEI).

2. Materiaal en methode

2.1 DNA extractie, amplificatie en genotypering

Voor de DNA-extractie werd gebruik gemaakt van de commerciële NucleoSpin® extraction kit (Macherey-Nagel), volgens de instructies van de fabrikant. De weefselstalen (vinknip) waren erg klein waardoor het hele weefselstaal werd gebruikt voor DNA extractie. Amplificatie gebeurde met behulp van de Qiagen® Multiplex PCR kit volgens de instructies van de fabrikant in een 10 µl reactiemengsel. Het protocol gebruikt in project B&G/26/2005 werd toegepast. Voor details aangaande reactiemengsels en amplificatiecondities verwijzen we naar dit projectverslag (De Gelas et al. 2007). De data werden gegenotypeerd met behulp van het programma Genemapper® (Applied Biosystems). De registratie van de allelen gebeurt gedeeltelijk automatisch maar wordt manueel nagekeken en zo nodig bijgestuurd.

2.2 Analyse genetische verwantschap

Omdat vergelijkingen op het niveau van populaties weinig zinvol zijn door het kleine aantal stalen dat werd onderzocht voor elk van de twee populaties werd gekozen voor een toewijzingsanalyse op het niveau van het individu met behulp van het programma GENECLASS (Pritchard et al 2000). Alle stalen van populaties met seksuele individuen die in het project B&G/26/2005 beschreven staan werden als referentiepopulaties gebruikt. De nieuw verzamelde stalen werden met deze gegevens vergeleken. GENECLASS laat toe een waarschijnlijkheid te berekenen voor de kans dat een individu tot een bepaalde populatie behoort. Daarnaast werd een factoriële correspondentie analyse gedaan op basis van de genotypes in GENETIX. De nieuw geanalyseerde stalen werden vergeleken met stalen uit het Nete- en IJzerbekken, het bekken van het Groot Schijn en het Damvalleimeer.

3. Resultaten

3.1 Ploidie en soortbepaling

Alle onderzochte stalen bleken afkomstig van diploïde individuen. Er werden geen tri- of tetraploïde individuen aangetroffen. Na vergelijking van de genotypes met genotypes van morfologisch verwante soorten (*C. taenia*, *C. elongatoides*, *C. tanaitica*, De Gelas *niet gepubliceerde gegevens*) kunnen we stellen dat de onderzochte stalen afkomstig zijn van *Cobitis taenia*. De genotypes zijn weergegeven in appendix 1.

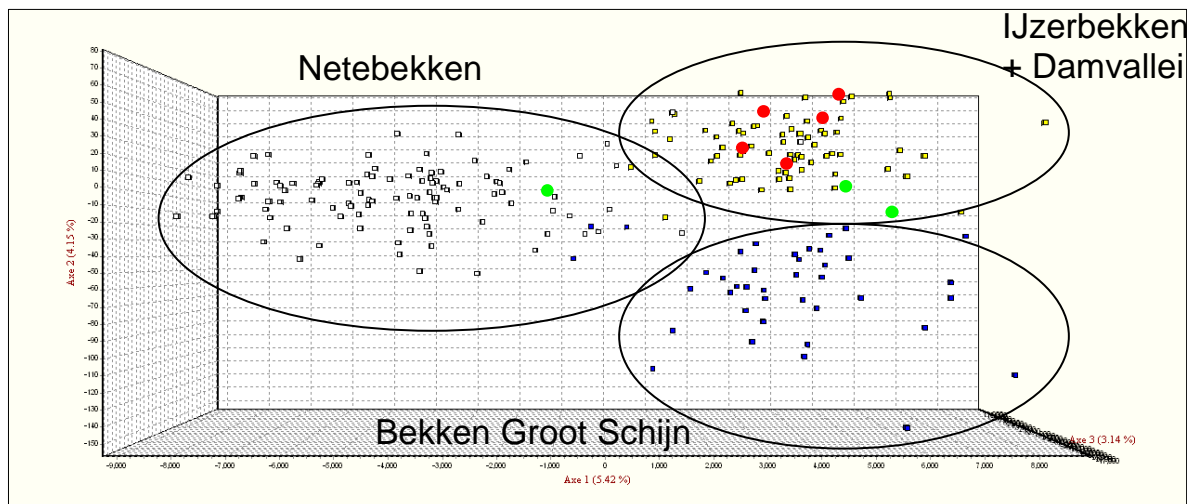
3.2 Toewijzingsanalyse en genetische verwantschap

De resultaten van de toewijzingsanalyse zijn weergegeven in tabel 3.1. De stalen van de Leie worden toegewezen aan de eerder onderzochte populatie uit de Breiloop (BRE) en aan de populatie uit het Damvalleimeer (DAM). Eén van de drie stalen kon niet worden toegewezen. De stalen van de IJzer worden voornamelijk toegewezen aan referentiepopulaties uit het IJzerbekken: de IJzer en de Heidebeek (IJZ en HEI) en aan de populatie uit het Damvalleimeer (DAM). Ook hier kon één staal aan geen enkele referentiepopulatie worden toegewezen.

Tabel 3.1: Toewijzing van de stalen aan de referentiepopulatie. De waarschijnlijkheid van de toewijzing is tussen haakjes weergegeven.

Staalcode	Populatie
LEI_01	geen toewijzing
LEI_02	BRE (0.625), DAM (0.325)
LEI_03	DAM (0.590)
LR_01	IJZ (0.564), HEI (0.326), DAM (0.326)
LR_02	DAM (0.982), IJZ (0.736), HEI (0.436)
LR_03	HEI (0.646), IJZ (0.527)
LR_04	geen toewijzing
LR_05	IJZ (0.298)

De factoriële correspondentie analyse groepeert de stalen uit het Franse deel van de Leie en de IJzer eerder bij de stalen van het IJzerbekken en de Damvallei dan bij andere bekkens (met uitzondering van één staal uit de Leie) (Figuur 3.1).



Figuur 3.1: Situering van de geanalyseerde individuen van kleine modderkruiper uit de Leie (groen) en de IJzer (rood) ten opzichte van eerder geanalyseerde individuen uit het Nete- en IJzerbekken, het bekken van het Groot Schijn en het Damvalleimeer.

4. Discussie

Het aantal onderzochte stalen van de hier geanalyseerde populaties uit het Franse deel van de Leie en de IJzer is zeer gering. Het gaat respectievelijk over 3 en 5 stalen. Deze beperkte staalname laat niet toe om uitspraken te doen over de diversiteit van beide populaties of om statistisch onderbouwd onderzoek te doen naar de genetische differentiatie tussen deze populaties en de eerder onderzochte populaties in het project B&G/26/2005. De resultaten zijn dan ook vooral oriënterend te beschouwen en hebben slechts een indicatief karakter.

4.1 Aanwezigheid van hybriden

Er werden geen hybriden teruggevonden in de stalen afkomstig uit het Franse deel van de Leie en de IJzer. Het aantal geanalyseerde individuen is echter zeer laag zodat we niet kunnen uitsluiten dat er toch hybriden kunnen voorkomen in deze populaties. De afwezigheid van hybriden ligt echter in dezelfde lijn als de resultaten gevonden in project B&G/26/2005 (De Gelas et al. 2007). In voorgaande studie werden er enkel in het centrale en het oostelijke deel van Vlaanderen hybriden aangetroffen en bleken deze afwezig te zijn in het Westelijke deel van Vlaanderen. Dit patroon wordt door de bijkomende stalen uit de Leie en de IJzer bevestigd. Een mogelijke hypothese is een verschil in het tijdstip van kolonisatie na de laatste ijstijd waarbij Vlaanderen eerst gekoloniseerd werd door de zuiver seksuele vorm van *Cobitis taenia*, daarna werden deze

populaties geïnvadeerd door clonale hybriden. Het is echter nog onduidelijk of de kolonisatie door hybriden een recent fenomeen (enkele tientallen tot honderden jaren) is of een meer historisch fenomeen (duizenden jaren). Een gedetailleerde studie van de verspreiding van de clonale lijnen in Europa kan hier meer inzicht in verschaffen. Het patroon in Vlaanderen is intrigerend omdat er in Frankrijk (Loire), ten Westen van de Vlaamse populaties wel nog hybriden voorkomen (*De Gelas, niet gepubliceerde gegevens*). Het is dus niet zo dat het oosten van Vlaanderen de grens vormt van het verspreidingsgebied van hybriden van kleine modderkruiper in Europa.

Momenteel is het niet duidelijk wat de precieze interactie is tussen de hybriden en de seksuele populaties en hoe dynamisch de aanwezigheid en verspreiding van hybriden is. Noch is bekend welke factoren (parasitisme, voedselniche, seksuele selectie, ...) het evenwicht bepalen tussen het aantal hybride en seksuele individuen. Bij een geografische uitbreiding van de populaties uit het Oosten van Vlaanderen in Westelijke richting is het dus mogelijk dat ook de hybriden zich uitbreiden. Dit hoeft op zich geen negatief gegeven te zijn aangezien het voorkomen van hybriden in seksuele populaties een wijd verspreid fenomeen is in Europa.

4.2 Toewijzingsanalyse en genetische verwantschap

De stalen van de IJzer (Bambecke, Fr: LR1 tot LR5) clusteren samen met de stalen van de Vlaamse kant van de IJzer. In essentie kunnen we dus spreken van dezelfde (grensoverschrijdende) populatie. Uiteraard is dit niet geheel onverwacht omdat de staalnamepunten vrij dicht bij elkaar gelegen zijn en omdat de wettelijke grens tussen Frankrijk en Vlaanderen geen obstakel vormt voor de uitwisseling van individuen. De stalen van de Leie (Fr) clusteren voornamelijk samen met de stalen van het Damvalleimeer. Beide vertonen ook een affiniteit met het IJzerbekken maar er bestaat toch een zeker genetisch verschil. De affiniteit met de stalen van het Damvalleimeer steunt de hypothese dat de populatie in het Damvalleimeer een populatie is die in die streek haar oorsprong kent. In het rapport van het project van kleine modderkruiper (2007) werd nog uitgegaan van de mogelijkheid van een introductie uit het IJzerbekken in het Damvalleimeer. Aan de hand van de stalen uit de Leie blijkt nu dat dit waarschijnlijk niet het geval is geweest en dat de populatie in het Damvalleimeer een oorspronkelijke populatie is.

Algemeen kunnen we stellen dat de geanalyseerde stalen genetisch het meeste verwantschap vertonen met de populaties uit het IJzerbekken en het Damvalleimeer. Voorgaande studie toonde ook reeds enige genetische verwantschap aan tussen deze populaties (De Gelas et al. 2007). Echter, de aanwezigheid van individuen die niet

kunnen worden toegewezen is een indicatie dat de hier geanalyseerde populaties tot op zekere hoogte als onafhankelijke entiteiten kunnen worden beschouwd. Dit wordt voor de populatie uit de IJzer (LR) ondersteund door de aanwezigheid van twee private allelen: allel 372 voor locus Cota_041 en allel 331 voor locus Cota_093 (zie ook appendix). Deze allelen komen alleen in de populatie LR voor en niet in de andere bemonsterde populaties uit Vlaanderen. Ook allel 343 voor locus Cota_006 is een zeldzaam allel en komt slechts in één andere populatie in Vlaanderen voor (Groot Schijn). Voor de populatie uit de Leie (LEI) werden geen private allelen geobserveerd, maar we wijzen hier nog eens op het zeer gering aantal individuen. Of de toewijzing van één staal aan de populatie uit de Breiloop op toeval berust of niet kan op basis van dit kleine aantal individuen niet worden achterhaald.

5) Advies

Concluderend kunnen we stellen dat de geanalyseerde stalen een zekere genetische affiniteit vertonen met andere geanalyseerde populaties uit het Westen van Vlaanderen. Er zijn echter ook indicaties voor het op zichzelf staan van deze populaties. Voor kleine modderkruiper als soort in Vlaanderen geldt dat de totale genetische diversiteit verdeeld is over alle populaties en dat elke populatie een deel van de genetische variatie bevat. Het is dus van belang dat elke populatie wordt beschermd en dat de mogelijkheid aanwezig is om de populaties zowel demografisch als geografisch te laten uitbreiden. Grote aantallen individuen en een ruime geografische spreiding van deze individuen vormen een effectieve buffer tegen incidenteel verlies van individuen en genetische variatie door drift. Hoewel het op basis van het lage aantal individuen moeilijk is om in te schatten of de populaties aan de Franse kant van de IJzer en Leie als beheerseenheden kunnen worden beschouwd, pleiten wij ervoor om, uit voorzorg, ze als dusdanig te behandelen. Een maximale bescherming van de huidige populatie en een streven naar een demografische en geografische uitbreiding zijn hierbij prioritair.

Appendix 1: Genotype van de onderzochte stalen van kleine modderkruiper uit de Leie (Fr) en de IJzer (Fr)

Staalcode/locus	006	010	025	027	032	033	037	041	068	093	111
cota_lei_01	355355	138138	144156	287302	232232	211211	272276	374374	199199	341341	264270
cota_lei_02	371374	138138	144156	287287	232232	211231	274276	374374	199199	337353	264264
cota_lei_03	355355	138138	144156	287302	232232	211231	272274	374374	199199	357357	250254
cota_lr_01	367367	138138	156156	287287	232232	211231	272272	374374	199199	331355	250250
cota_lr_02	359363	138138	144144	287287	232232	211231	272272	374378	199199	341353	250264
cota_lr_03	351382	138138	156156	287287	232232	211231	272272	374374	199199	353355	250270
cota_lr_04	362362	138138	144156	292292	232232	211211	272272	372374	199199	353353	264270
cota_lr_05	343363	138138	156156	287287	232232	211211	272272	372374	199199	353355	250270

Referenties

Barinova A, Yadrenkina E, Nakajima M, Taniguchi N (2004). Identification and characterization of microsatellite DNA markers developed in the *Leuciscus idus* and Siberian roach *Rutilus rutilus*. *Molecular Ecology Notes* 4, 86–88.

Barluenga M, Sanetra M, Meyer A. Genetic admixture of burbot (Teleostei: *Lota lota*) in Lake Constance from two European glacial refugia. *Molecular Ecology* 15, 3583-3600

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) *GENETIX 4.02. Logiciel Sous Windows Pour la Genetique Des Populations*. Laboratoire Genome, Populations, Interactions. CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Briolay J, Galtier N, Brito M, Bouvet Y. (1998) Molecular phylogeny of cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9, 100-108

Costedoat C, Chappaz R, Barascud B, Guillard O, Gilles A (2007) Heterogeneous colonization pattern of European Cyprinids, as highlighted by the dace complex (Teleostei: Cyprinidae)

De Gelas K, Van Houdt J, De Charleroy D & Volckaert F.A.M 2007. Onderzoek naar de populatiegenetica van kleine modderkruiper (*Cobitis taenia*) in Vlaanderen in het kader van het behoud en herstel van natuurlijke populaties. Eindverslag in opdracht van: Vlaamse overheid, Departement LNE, Agentschap Natuur en Bos, Bestek B&G/26/2005.

De Gelas K, Van Houdt J, De Charleroy D & Volckaert F.A.M 2007. Onderzoek naar de populatiegenetica van serpeling (*Leuciscus leuciscus*) in Vlaanderen in het kader van het behoud en herstel van natuurlijke populaties. Eindverslag in opdracht van: Vlaamse overheid, Departement LNE, Agentschap Natuur en Bos, Bestek B&G/26/2005

Dillen A., Martens S., Baeyens R., Van Gils W. & Coeck J. 2005. Habitatievaluatie en biotoopherstel ten behoeve van de visfauna in zones van de habitatrictlijn. Rapport van het Instituut voor Natuurbehoud IN.R.2005.03, Brussel

Durand, J.D., Persat, H., Bouvet, Y., 1999a. Phylogeography and postglacial 1 dispersion of the chub *Leuciscus cephalus* in Europe. *Mol. Ecol.* 8, 989-997.

Durand, J.D., Templeton, A.R., Guinand, B., Imsiridou, A., Bouvet, Y., 1999b. Nested clade and phylogeographic analyses of the chub, *Leuciscus cephalus* Teleostei, Cyprinidae, in Greece: Implications for Balkan Peninsula biogeography. *Mol. Phyl. Evol.* 13, 566-580.

Hansen, M.M., Taggart, J.B. en Meldrup, D. (1999) Development of new VNTR markers for pike and assessment of variability at di- and tetranucleotide repeat microsatellite loci. *Journal of Fish Biology*, 55: 183-188.

Kottelat M & Freyhof J (2007) Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.

Larno V, Launey S, Devaux A, Laroche J (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci from chub *Leuciscus cephalus* (Pisces: Cyprinidae). *Molecular Ecology Notes* 5, 752-754.

Launey S, Krieg F, Morin J, Laroche F (2003) Five microsatellite markers for Northern pike (*Esox lucius*). *Molecular Ecology Notes*, 3, 366-368

Maes, G. Van Houdt, J., Pinceel, J., Baret, P., Flamand, C., De Charleroy, D. en Volckaert, F. (2000) *Populatiegenetisch onderzoek van een aantal zeldzame of bedreigde vissoorten in het Vlaamse Gewest*. TWOL-AMINAL Project AMINAL/BG/V 97.2, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, pp70

Maes G, Van Houdt J, De Gelas K, De Charleroy D, Volckaert F. (2004) Conservatiegenetische aspecten van snoek (*Esox lucius*) in Europa en in het Vlaamse Gewest: Opvolging van natuurlijke en gekweekte Vlaamse populaties.

Miller, L.M. en Kapuscinski, A.R. (1997) Historical analysis of Genetic Variation Reveals Low Effective Population Size in a Northern Pike (*Esox lucius*) Population. *Genetics*, 147: 1249-1258

Pritchard, J.K., Stephens, M., en Donnelly, P. (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155:945-959.

Van Houdt JKJ, Hellemans B & Volckaert FAM (2003). Phylogenetic relationships among Palearctic and Nearctic burbot (*Lota lota*): Pleistocene extinctions and recolonization. *Mol. Phylogen. Evol* 599-612.

Vandelanoote A, Yseboodt R, Bruylants B et al. (1998) Atlas van de Vlaamse beek- en riviervissen. Water Energik Vlario

Vyskočilová M, Šimková A, Martin J-F (2007) Isolation and characterisation of microsatellites in *Leuciscus cephalus* (Cypriniformes, Cyprinidae) and cross-species amplification within the family Cyprinidae. *Molecular Ecology Notes*, 5, 752-754.