

Advies over de translocatie van een populatie kamsalamander

Adviesnummer:	<u>INBO.A.3387</u>
Datum advisering:	28 januari 2016
Auteur(s):	Joachim Mergeay, An Vanden Broeck, Sabrina Neyrinck, Johan Coeck, Johan Auwerx
Contact:	Niko Boone (niko.boone@inbo.be)
Kenmerk aanvraag:	ANB-INBO-BEL-2015-60
Geadresseerden:	Agentschap voor Natuur en Bos Provinciale Dienst Antwerpen T.a.v. Hans De Schryver Lange kievitstraat 111-113 bus 63 2018 Antwerpen hans.deschryver@lne.vlaanderen.be
Cc:	Agentschap voor Natuur en Bos Koen Deheegher (koen.deheegher@lne.vlaanderen.be) Joris Janssens (joris.janssens@lne.vlaanderen.be)

Aanleiding

In het kader van het Sigmaplan zal bij de Dijlemonding ter hoogte van het Zennegat (Mechelen) een gereduceerd getijdegebied aangelegd worden. In het gebied werd in 2010 melding gemaakt van het voorkomen van kamsalamander. Bij een inventarisatie in 2015 nam het Agentschap voor Natuur en Bos (ANB) in de zuidelijke Oude Dijlemeander 15 exemplaren van deze Europees beschermde soort waar.

Omdat het gebied in de toekomst onder invloed van het getij komt te staan, zal het biotoop van de kamsalamander verdwijnen. Het ANB stelt daarom voor de populatie meer stroomopwaarts te verplaatsen naar het gebied Pikhaken op de grens van Bonheiden en Boortmeerbeek. Hiervoor werd een translocatievoorstel uitgewerkt. Dit voorstel omvat ook een kweekprogramma. Het doel daarvan is om gedurende meerdere jaren te beschikken over nakomelingen van de Zennegatpopulatie om de nieuwe locatie te bevolken.

Vraag

1. Hoe genetisch divers is de Vlaamse populatie kamsalamander en wat betekent dit voor de te volgen werkwijze van de translocatie?
2. Wat is de kostprijs van genetisch onderzoek van de Vlaamse populatie (indien nog niet beschikbaar)?
3. Wat is de kostprijs van genetisch onderzoek van de Zennegatpopulatie in functie van het kweekprogramma en om in de toekomst een evaluatie mogelijk te maken van de genetische toestand van de getransloceerde populatie?
4. Kan het INBO instaan voor het opkweken van kamsalamanders van de Zennegatpopulatie?

Toelichting

1 Genetische diversiteit van kamsalamander in Vlaamse populaties

De kamsalamander komt nog sterk verspreid voor over grote delen van Vlaanderen, maar vormt allerm minst een homogene populatie of metapopulatie¹. De meeste populaties zijn extreem versnipperd en slechts zeer weinig metapopulaties lijken op het eerste zicht in een goede staat van instandhouding te zijn (Mergeay & Vanhove, 2013). Op basis van genetische criteria voor een duurzaam behoud moet een metapopulatie kamsalamander bestaan uit ongeveer 1400 adulte kamsalamanders. Het optimale leefgebied voor dergelijke populatie is een bocagelandschap (houtkanten, heggen, bosranden, poelen, gevarieerd grasland, ...) van minstens 12-15 ha met bij voorkeur meer dan 10 visloze poelen.

Het INBO voert in 10 metapopulaties in Vlaanderen genetisch onderzoek uit. Het doel ervan is om na te gaan hoe de genetische diversiteit verdeeld is, hoe groot de effectieve populaties zijn en in welke mate die parameters zich verhouden tot ecologische parameters en de grootte en kwaliteit van het leefgebied. We namen ook een grote referentiepopulatie uit Wallonië (militair domein Marche-en-Famenne) mee op in het onderzoek. Die populatie

¹ Een metapopulatie is een set van verbonden deelpopulaties die minstens één effectieve migrant per generatie met elkaar uitwisselen.

bevindt zich met zekerheid in een gunstige staat van instandhouding voor alle mogelijke criteria (aantal ideale poelen, oppervlakte, connectiviteit, hoge dichtheid van kamsalamander, ...) (Adriaens *et al.*, 2008). We kunnen er ook van uitgaan dat de effectieve grootte van die Waalse populatie ruim voldoende is voor het duurzaam behoud van de genetische diversiteit (Mergeay, 2012). De parameters van genetische diversiteit en de schattingen van effectieve grootte kunnen we aftoetsen aan deze referentiepopulatie.

Uit huidige (niet gepubliceerde) INBO-data en eerdere analyses (Schön *et al.*, 2011) blijkt dat de genetische diversiteit in de meeste Vlaamse populaties nog behoorlijk hoog is en relatief weinig verschilt tussen zeer kleine en zeer grote populaties. De minst diverse populatie, een zeer kleine populatie in Peer, heeft een gemiddelde heterozygositeit (H_e)² van 0,402, terwijl de waarde van de meest diverse populatie, de goed gekende en zeer grote populatie van het militaire domein van Marche-en-Famenne, 0,606 bedraagt. Alle andere populaties die nu nog bestudeerd worden (Hasselt-Tommelen, De Brand-Maaseik, Temse, Hoogstraten, Wervik, Wetteren, De Panne, Ieper, Zemst en Herent) hadden een heterozygositeit tussen 0,509 en 0,603. Het INBO zal de resultaten van deze analyses in 2016 publiceren. Ter vergelijking, Vlaamse populaties van rivierdonderpad variëren zeer sterk in heterozygositeit tussen zeer kleine en zeer grote populaties ($0.08 < H_e < 0.684$) (Knaepkens *et al.*, 2004).

Ondanks de nog hoge genetische diversiteit in de meeste populaties, zijn de langetermijnperspectieven voor de meeste populaties slecht (Mergeay & Van Hove, 2013). Dit is het gevolg van het verlies van leefgebied tijdens de afgelopen decennia. De resterende populaties komen daardoor steeds meer geïsoleerd te liggen. Dat de genetische diversiteit nog steeds hoog is, is niet verrassend voor een soort die een lange generatietijd en een lange levensduur heeft, en waarbij de achteruitgang in het leefgebied zich relatief recent heeft gemanifesteerd. Hierdoor bevinden zich vele populaties in een situatie van een genetische extinctionschuld. We verwachten dat ze bij onveranderd beleid een sterk verlies van genetische diversiteit zullen ondergaan en daardoor mogelijk zullen verdwijnen. Op dit moment lijkt de belangrijkste oorzaak van het lokaal uitsterven van populaties kamsalamander eerder het rechtstreekse verlies van geschikt leefgebied. Op lange termijn kan ook een verlies aan fitness en reproductiecapaciteit als gevolg van een te lage genetische diversiteit en van inteelt, bijdragen aan lokale extinctie.

2 Aanbevelingen voor de grootte van een kweekpopulatie.

Bij een translocatie is het de bedoeling de genetische diversiteit van een populatie maximaal te behouden. Omdat het niet mogelijk of wenselijk is om alle individuen te verplaatsen, kan een kweekprogramma uitkomst bieden. Populatiegenetische inzichten kunnen daarbij helpen om het aantal individuen te bepalen dat in kweek gebracht moet worden en hoe de kweek zelf moet gebeuren.

Het is essentieel om binnen kweekpopulaties inteelt maximaal te voorkomen en de variantie in reproductiesucces tussen individuen te minimaliseren. Genetische diversiteit wordt maximaal behouden wanneer elk individu hetzelfde aantal nakomelingen heeft.

Tien stichtende adulte individuen (5 ouderparen) volstaan in theorie om 95% van de heterozygositeit te behouden (Cox *et al.*, 2015). Het is vervolgens zaak om die genetische diversiteit ook in de daaropvolgende generatie maximaal te behouden. Dat kan door het aantal nakomelingen te maximaliseren en het aantal uitgezette nakomelingen per ouderpaar minimaal te laten variëren. Elk ouderpaar heeft daardoor een zo gelijk mogelijk aandeel in de genetische diversiteit van de totale pool van nakomelingen. We gaan er hier van uit dat de

² Heterozygositeit is een index van genetische diversiteit en kan een waarde tussen 0 en 1 aannemen.

nakomelingen van de eerste set ouderparen enkel dienen om uitgezet te worden en dat het niet de bedoeling is er verder mee te kweken in gevangenschap. Hierbij is het aangewezen om gedurende meerdere jaren met dezelfde ouders te kweken en jaarlijks nieuwe ouderparen samen te stellen. Deze herhaalde herstockering laat toe om jaarlijkse variatie in translocatiesucces te bufferen. Om ook mortaliteit bij de ouders of slechte reproductie bij sommige ouderparen te bufferen, raden we aan om zo mogelijk tien ouderparen (in plaats van vijf) te gebruiken. De nakomelingen van elk ouderpaar worden gedurende de hele kweek gescheiden gehouden van nakomelingen van andere ouderparen. Zo kan controle gehouden worden op het aantal uitgezette dieren per ouderpaar.

$$N_e = \frac{\bar{k}N-1}{\bar{k}-1+\frac{V_k}{\bar{k}}} \text{ (Vergelijking 1)}$$

Vergelijking 1 geeft de relatie weer tussen de effectieve grootte van een populatie (N_e), de gemiddelde familie grootte (het aantal nakomelingen k per ouderpaar) en de variantie hiertussen (V_k). In gevangenschap is het mogelijk de variantie in familie grootte strikt te controleren, te minimaliseren en zelfs te reduceren tot nul. Van elk individu kunnen exact evenveel nakomelingen uitgezet worden. Wanneer de variantie effectief nihil is ($V_k=0$), is de effectieve grootte van de populatie maximaal.

3 Kostprijs van genetische analyses en van opkweek

3.1 Genetische analyses

Het is aangewezen om alle gevangen dieren die ingezet worden in de kweekpopulatie te genotyperen. De genetische diversiteit van de kweekpopulatie vormt dan de referentie waarmee deze van de getransloceerde populatie kan vergeleken worden. Hierbij is het aangewezen elke 4-5 jaar per (deel)populatie 25-30 individuen te monitoren.

Het INBO bepaalt momenteel de genetische diversiteit van kamsalamander in het kader van een toekomstige genetische monitoring voor de Habitatrictlijn. Deze typering gebeurt op 25 verschillende microsatellietmerkers. De kostprijs van een analyse hangt af van de methode van DNA-collectie en -extractie. Dit verschilt voor swabs (uitstrijkjes) van adulten en larven, en voor weefselstaal versus swabstaal. Voor een standaardanalyse op 25 merkers ligt de laboratoriumkost (enkel werkingsmiddelen) op 24,00 €/staal. Inclusief laboratoriumpersoneel bedraagt de kostprijs 51,5 €/staal. Het aantal merkers kan eventueel teruggebracht worden tot 9, wat de prijs reduceert naar 13,00 €/staal en 26,25 €/staal (respectievelijk exclusief en inclusief kosten voor laboratoriumpersoneel). Dit kleinere aantal merkers gaat ten koste van resolutie, maar volstaat waarschijnlijk wel om de belangrijkste parameters van genetische diversiteit te schatten en om familieverbanden in de eerste graad te herkennen tussen uitgezette individuen. De vermelde kostprijs betreft enkel dataverzameling. Indien interpretatie van de gegevens gevraagd wordt, is bijkomend werk door wetenschappers nodig. De kostprijs daarvan hangt af van de vraag.

In een minimaal scenario bestaat de analyse van de Zennegatpopulatie uit een genotypering van de 20 adulte exemplaren waarmee gekweekt zal worden. Vervolgens wordt jaarlijks ook een substaal van 30 juveniele, reeds gemetamorfoseerde dieren die uitgezet zullen worden, gegenotypeerd op negen merkers. Dit doen we drie opeenvolgende jaren. In het vijfde jaar na de eerste translocatie worden 30 larven of juveniele exemplaren (nakomelingen van de uitgezette dieren) gegenotypeerd. Daarenboven wordt 10% van de totale analyses herhaald als kwaliteitscontrole. Dit brengt de minimale kost voor laboratoriumanalyses op 4042,5 €. Afhankelijk van de precieze vraag naar data-analyse en rapportering, is er nog een variabel

bedrag voor wetenschappelijke data-analyses. Dat moet in overleg met de opdrachtgever besproken worden.

Tabel 1. Kostenoverzicht voor het bepalen van genetische diversiteit van kamsalamander. Excl. L = exclusief kosten voor laboratoriumpersoneel. Incl. L = inclusief kosten voor laboratoriumpersoneel

Voorwerp van analyse	Methode	Excl. L	Incl. L
Kamsalamander larve (huid)	Extractie van DNA, swabmethode (katoen)	€ 2,50	€ 4,50
Kamsalamander adult (cloaca)	Extractie van DNA, uit swabs (nylon) Concentratiebepaling DNA met picogreen	€ 7,50 € 1,50	€ 11,50 € 3,00
	Aanmaak platen (DNA, PCR, SEQ, meting)	€ 0,00	€ 0,50
Kamsalamander weefsel (staarttip of teen)	Extractie van DNA, weefsel en bloed Concentratiebepaling DNA met picogreen	€ 6,00 € 1,50	€ 10,00 € 3,00
	Aanmaak platen (DNA, PCR, SEQ, meting)	€ 0,00	€ 0,50
Microsatellietloci, 25 stuks (9 + 9 + 7 loci)	Voorbehandeling Microsatellieten: multiplexmethode Microsatellieten, meting elektroforese	€ 6,00 € 10,50	€ 9,00 € 16,50
	Microsatellieten, scoren 25 loci	€ 0,00	€ 12,50

3.2 Kweek en translocatie

De Italiaanse kamsalamander (*Triturus carnifex*) is een soort die relatief gemakkelijk in gevangenschap te houden is en zich goed voortplant (zie Engels (1998) voor een beschrijving van de kweek). We gaan ervan uit dat dit ook geldt voor de gewone kamsalamander omdat dit zeer nauw verwante soorten zijn. De INBO-site van Linkebeek beschikt over de nodige infrastructuur om de kweek van deze soort toe te passen. Kweek met adulten in 2016 lijkt slechts biologisch haalbaar indien de dieren reeds in het vroege voorjaar worden gevangen.

We gaan ervan uit dat we in staat zijn om adulte kamsalamanders te vangen en deze te laten voortplanten in gevangenschap. De personeelsinzet voor de opkweek van 10 ouderparen in gescheiden bakken/aquaria en de opkweek van de nakomelingen in aparte aquaria tot metamorfose, wordt geschat op ca. 300 werkuren per jaar (40 dagen). Hierbij worden de larven dagelijks naar behoefte gevoederd en pas uitgezet na metamorfose. Deze strategie maximaliseert de kans op een succesvolle translocatie. Het is aangewezen om de uitgezette dieren te monitoren. Dit kan met vangst-herkenning-hervangstmethode waarbij de herkenning gebeurt via het unieke vlekkenpatroon op de buik. Dit vereist wel dat de dieren die worden uitgezet in een post-larvaal stadium zitten. Aangezien de mortaliteit van amfibieën vooral te situeren is in het larvale stadium, raden we dan ook aan om geen larven, maar reeds volledig gemetamorfoseerde juveniele exemplaren (> 4-6 maanden oud) uit te zetten.

Dezelfde ouderdieren worden gedurende drie opeenvolgende jaren ingezet in het kweekprogramma. De adulte dieren overwinteren in gevangenschap en worden in het voorjaar gebruikt voor voortplanting. Elk jaar worden de ouderparen opnieuw samengesteld, waarbij we er op letten nieuwe combinaties van ouderparen te vormen. Na afloop van de kweek worden de adulte dieren ook uitgezet in het doelhabitat.

Conclusie

1. Nagenoeg alle Vlaamse populaties van kamsalamander zijn genetisch sterk divers, ondanks de slechte staat van instandhouding van de soort. We verwachten op korte termijn geen sterke genetische verarming van de doelpopulatie. Voor het opzetten van een kweekprogramma moet de kweekpopulatie voldoende groot zijn. In theorie volstaan 10 stichtende adulte individuen (5 ouderparen). Om mortaliteit bij de ouders of slechte reproductie bij sommige ouderparen te bufferen, raden we aan om zo mogelijk 10 ouderparen te gebruiken. Dit moet garanderen dat tenminste 95% van de heterozygositeit van de Zennegatpopulatie behouden blijft na translocatie.
2. Het INBO monitort momenteel de genetische diversiteit van kamsalamander in Vlaanderen op basis van een steekproef in 10 metapopulaties. Het resultaat daarvan zal in 2016 gepubliceerd worden. Het doel van dit onderzoek ligt voornamelijk in het vergelijken van methodes om de staat van instandhouding te bepalen, eerder dan een globaal beeld te geven van de genetische toestand van kamsalamander in Vlaanderen. Dat zou een bredere steekproef vragen.
3. In een minimaal scenario is de laboratoriumkostprijs voor genetische monitoring van de translocatie ca. 4000 €, inclusief kosten van laboratoriumpersoneel en exclusief kosten voor data-analyse en rapportage.
4. De INBO-vestiging in Linkebeek kan instaan voor de kweek. De personeelsinzet voor de opkweek van 10 ouderparen in gescheiden bakken/aquaria en de opkweek van de nakomelingen in aparte aquaria tot metamorfose, wordt geschat op ca. 300 werkuren per jaar (40 dagen).

Referenties

- Adriaens D., Adriaens T. & Ameeuw G. 2008. Ontwikkeling van criteria voor de beoordeling van de lokale staat van instandhouding van de habitatrichtlijnsoorten. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Cox K., Speybroeck J. & Mergeay J. 2015. Advies over de opzet van een ex situ kweek van vuursalamander in Vlaanderen. INBO.A.2015.48. Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Engels F. 1998. Houden en kweken van de Italiaanse kamsalamander (*Triturus carnifex*). *Lacerta* 56:210-214.
- Knaepkens G., Bervoets L., Verheyen E. & Eens M. 2004. Relationship between population size and genetic diversity in endangered populations of the European bullhead (*Cottus gobio*): implications for conservation. *Biological Conservation* 115:403-410.
- Mergeay J. 2012. Afwegingskader voor de versterking van populaties van Europees beschermde soorten. Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. INBO.A.2012.141. Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Mergeay J. & Van Hove M. 2013. Analyse van de duurzaamheid van populaties van Europees beschermde amfibieën en reptielen (deel 2). Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. INBO.A.2013.104, Brussel.
- Schön I., Raepsaet A., Goddeeris B., Bauwens D., Mergeay J., Vanoverbeke J. & Martens K. 2011. High genetic diversity but limited gene flow in Flemish populations of the crested newt, *Triturus cristatus*. *Belgian Journal of Zoology* **141**:3-13.