

Advies in het kader van de opmaak van een soortenbeschermingsprogramma voor de knoflookpad in Vlaanderen

Nummer:	INBO.A.3139
Datum advisering:	26 mei 2014
Auteur(s):	Joachim Mergeay
Contact:	Lieve Vriens (lieve.vriens@inbo.be)
Kenmerk aanvraag:	ANB-INBO-BEL-2014-31
Geadresseerden:	Agentschap voor Natuur en Bos T.a.v. Véronique Verbist Centrale Diensten Koning Albert II-laan 20 bus 8 1000 Brussel veronique.verbist@Ine.vlaanderen.be
Cc:	Agentschap voor Natuur en Bos Carl De Schepper (carl.deschepper@Ine.vlaanderen.be)

AANLEIDING

De knoflookpad is een bedreigde soort in Vlaanderen. In uitvoering van artikel 24 (Afdeling I, Beschermden soorten) van het Soortenbesluit wordt een soortenbeschermingsprogramma voor de knoflookpad ontworpen. Een soortenbeschermingsprogramma wordt opgemaakt op basis van een rapport dat o.a. een synthese van de kennis over deze soort in kwestie bevat. In zo'n rapport worden de concrete doelstellingen voor het bereiken van een gunstige staat van instandhouding vastgelegd en wordt onder meer nagegaan wat de mogelijkheden of knelpunten zijn om dit doel te bereiken. Een te lage genetische diversiteit binnen de bestaande populaties vormt mogelijk een knelpunt.

VRAAGSTELLING

1. Hoe waarschijnlijk is het dat de Vlaamse populaties knoflookpad aan genetisch verarming lijden? Indien dit het geval is, bestaat er een methode om dit te kwantificeren?
2. Welke techniek is meest aangewezen voor de bepaling van het genetische profiel van de soort in Vlaanderen, met eventuele referentie tot populaties buiten onze grenzen?
3. Is vanuit wetenschappelijk oogpunt een kweek- en uitzetprogramma aangewezen met het oog op het bekomen van een gunstige staat van instandhouding voor de knoflookpad in Vlaanderen? Indien noodzakelijk, wat is dan de best gevolgde methodiek?

TOELICHTING

1 Verwachte toestand genetische diversiteit knoflookpad in Vlaanderen

De knoflookpad is een soort van ondiepe, heldere, relatief ionenarme mesotrofe poelen, vijvers en meren in een dynamisch landschap met losse opengewerkte bodem. Van oorsprong is deze soort in onze contreien voornamelijk gebonden aan rivierduinen en afgesloten riviermeanders en rivierbegeleidende vijvers, poelen en waterhoudende depressies. Elders in Europa komt de soort ook voor in natuurlijke heldere en ondiepe meertjes die gevormd zijn door beverdammen (Rannap *et al.* 2011). Mogelijk vormden stuwmeertjes gevormd door beverdammen vroeger ook bij ons het leefgebied van de knoflookpad.

De knoflookpad is een bedreigde soort in Vlaanderen (Jooris *et al.* 2012), met nog slechts een handvol relictpopulaties die in allen een onvoldoende staat van instandhouding (SVI) zijn. De laatste huidige schatting (2008-2010) geeft aan dat er nog slechts op vier locaties met zekerheid kleine populaties zijn, met name in De Maten (Genk), Het Welleken (Zonhoven) en Bomerhei (Peer). Recent is een belangrijke populatie na 20 jaar herontdekt, te Kolberg-Zonderik. Op de volgende historische vindplaatsen is de soort waarschijnlijk uitgestorven, en is monitoring aangewezen om dit te controleren: Mullerbeemden (Peer), De Teut (Zonhoven), Smeetshof (Bocholt), Marmorithgroeve (Houthalen) en Het Wik/Bokrijk (Genk) (Lewylle 2009, Lewylle & Roosen 2009).

In België vereist deze soort drastische ingrepen in het landschap om imminente uitsterving te voorkomen. Knoflookpadden komen vaak voor in hoge densiteiten, en kunnen dan behoorlijke afstanden (2-3 km) afleggen. In vergelijking met soorten als rugstreeppad en boomkikker is ze echter veel minder dispersief. Populaties hebben soms de neiging om cyclisch sterk te fluctueren, waarbij ze kunnen crashen. Ze zijn dan ook afhankelijk van een behoorlijk aantal geschikte waterpartijen voor voortplanting binnen één gebied, om zodoende bufferend te werken op de cyclische populatiedynamieken (Rannap *et al.* 2011).

Momenteel zijn de voornaamste risico's voor de resterende populaties knoflookpad terug te brengen op toevalsprocessen waaraan kleine populaties inherent blootstaan. Hieronder vallen ook genetische toevalsprocessen die ervoor zorgen dat de genetische diversiteit in kleine populaties sneller afneemt dan dat er terug bijkomt door genetische uitwisseling tussen de relictpopulaties en door mutaties.

Uit eerdere analyses (Mergeay 2012, 2013, Mergeay & Van Hove 2013) blijkt dat de verwachte genetische verarming in alle populaties zeer groot is. Bij een populatiegrootte knoflookpad kleiner dan c. 3250 individuen is de hoeveelheid genetische verarming onaanvaardbaar hoog. Geen enkele van de relictpopulaties voldoet aan dit criterium, en men kan stellen dat alle populaties blootstaan aan sterke genetische verarming (zie Mergeay & Van Hove 2013 voor een evaluatie van de toestand per populatie).

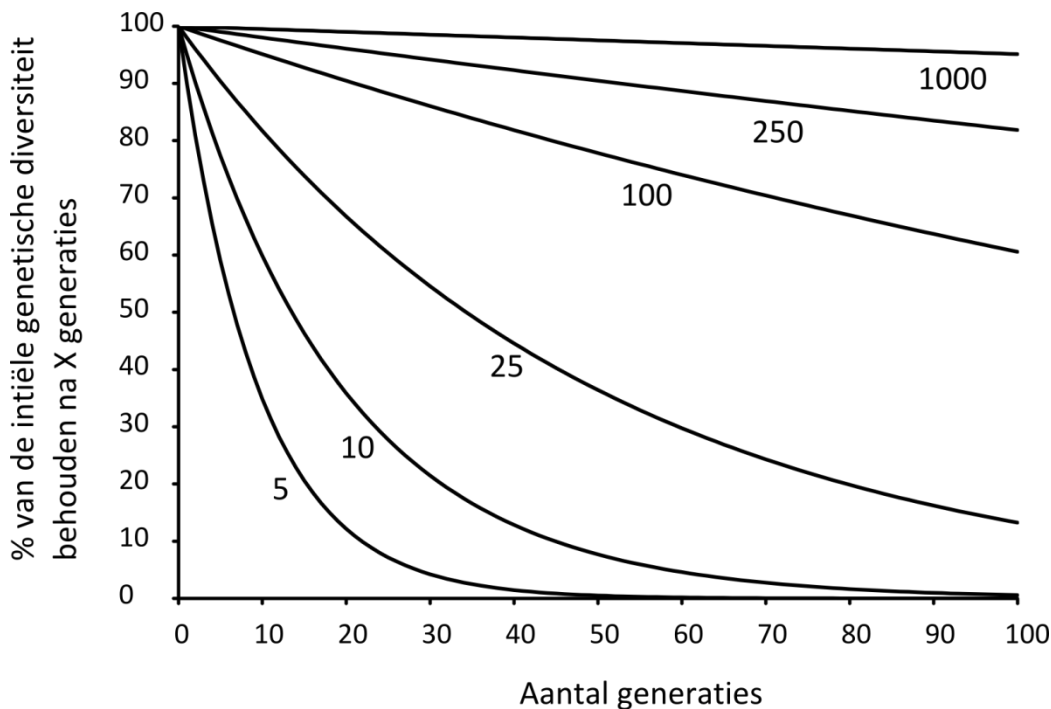
Het verwachte verlies aan genetische diversiteit per generatie is $1/2N_e$ (Hamilton 2009). Een populatie van 200 volwassen knoflookpadden heeft een verwachte effectieve populatiegrootte van 20 individuen, een populatie van 50 individuen zal een verwachte effectieve grootte hebben van c. 5-10 individuen. Na tien generaties (c. 30 jaar bij knoflookpad) heeft de grotere populatie bijna een kwart van haar initiële genetische diversiteit verloren, terwijl de tweede, kleinere populatie twee vijfde tot twee derde van de genetische diversiteit verloren heeft, en een evenredige toename heeft gekend van de graad van inteelt.

Alle resterende populaties knoflookpad zijn al geruime tijd klein tot zeer klein (verwachte $N_e < 20$), en de verwachte genetische verarming is dan ook zeer beduidend.

2 Analyse van genetische diversiteit

2.1 Inteelt, inteeltdepressie en genetische diversiteit

Inteelt is het resultaat van voortplanting tussen verwante individuen. Hoe kleiner een populatie is, hoe groter de kans dat twee ouders nauw verwant zijn met elkaar en dus ingeteelde nakomelingen hebben. De graad van inteelt neemt ook toe met de tijd, en deze toename kan zeer sterk zijn in kleine populaties (Fig. 1).



Figuur 1. Relatie tussen het aantal generaties dat verloopt en het behoud van genetische diversiteit voor populaties van verschillende effectieve grootte N_e . Hoe kleiner de effectieve populatie, hoe sneller het verlies. Typisch is het aantal volwassen dieren in de populatie tienmaal groter dan de effectieve grootte.

Elk normaal organisme heeft zijn genetische informatie dubbel: van ieder ouder één volledig kopie van het genoom. Wanneer een organisme twee (doorgaans zeer licht) verschillende kopijen (allelen) draagt van een bepaald locus (gen), is de toestand heterozygoot. Als er twee dezelfde allelen zijn, is de toestand homozygoot. Wanneer een mutatie optreedt in de loop van de evolutie, en deze ervoor zorgt dat het gen niet meer functioneert naar behoren (een recessief allel), heeft een drager van dat recessieve allel vaak geen nadelig effect hiervan, indien er nog een normaal functioneel allel is dat de taken naar behoren kan uitoefenen. Wanneer twee verwanten die datzelfde allel dragen nakomelingen hebben, is een kwart van de nakomelingen homozygoot op het recessieve allel. Er is nu geen functioneel allel meer aanwezig in die individuen, en de recessieve allelen komen tot uiting in het fenotype. Indien het een zeer belangrijke functie betreft kan een homozygote recessieve toestand dodelijk (lethaal) zijn. Een mens is doorgaans drager van ongeveer tien lethale recessieve allelen, verspreid over zijn genoom. Dit fenomeen, het dragen van x aantal recessieve lethale of sublethale mutaties, noemt men de mutatielading.

In vele gevallen is de homozygote toestand van een recessief allel wel levensvatbaar, maar verlaagt het de algemene fitness. Inteelt leidt dan ook doorgaans tot een geleidelijke afname van de overlevingskans van organismen, waarbij een kritisch kantelpunt kan worden bereikt waaronder overleving dramatisch afneemt (Saccheri *et al.* 1998, Reed & Frankham 2003, Frankham 2005, Charlesworth & Willis 2009, Frankham 2010). Dit fenomeen, de afname van overleving en fitness door inteelt heet inteeltdepressie. In natuurlijke populaties kan het optreden van een kantelpunt van inteeltdepressie leiden tot een plots ineensinken van een populatie.

Sterk verwante individuen hebben een gelijkaardige mutatielading geërfd van hun gemeenschappelijke voorouders. Wanneer deze nakomelingen hebben, is de kans groot dat deze homozygoot zijn voor lethale recessieve allelen die in normale populaties bijna enkel in heterozygote toestand voorkomen.

De verwachting is dat in de Belgische populaties knoflookpad inteeltdepressie een duidelijke impact heeft op de overlevingskansen van individuen, en daardoor ook een negatief effect heeft op langtermijnskansen voor de verschillende populaties. Ondanks recente herstelmaatregelen voor het leefgebied is de respons van de populaties zeer matig te noemen (Lewylle & Roosen 2009). Dit wijst mogelijk op een sterk negatief effect van inteeltdepressie op de populaties als gevolg van geaccumuleerde effecten van inteelt en genetische drift, maar is mogelijk ook een gevolg van onvoldoende habitatherstel.

2.2 Referentiegegevens

Het bepalen van de genetische diversiteit van knoflookpad, binnen en tussen populaties, kan op verschillende manieren gebeuren die elk hun voor- en nadelen hebben. Alle manieren hebben echter gemeen dat het essentieel is om de parameters van genetische diversiteit van de Belgische relictpopulaties te vergelijken met die van referentiepopulaties in een goede of alleszins betere staat van instandhouding, en met een gelijkaardige fylogeografische oorsprong aan de rand van het areaal (NO-Frankrijk, Duitsland, Nederland, Denemarken, ...) (Crottini *et al.* 2007). Een gelijkaardige fylogeografische oorsprong is essentieel, omdat ook de achtergrond van postglaciale herkolonisatie een sterke invloed kan hebben op parameters van neutrale genetische diversiteit, zoals het geval is bij rugstreeppad (Rowe *et al.* 2006).

2.3 Representatieve bemonstering

In elke studie is het belangrijk dat het staal dat genomen wordt uit de populatie een goede schatter is van de werkelijke parameter die bestudeerd wordt. Voor parameters van genetische diversiteit vindt men doorgaans dat dit behaald wordt met een staalgrootte van 20 tot 30 individuen per populatie. De feitelijke benodigde staalgrootte kan echter best worden bepaald via een curve die de relatie uitzet tussen staalgrootte en de geschatte genetische diversiteit. Wanneer er een saturatie bereikt wordt (genetische diversiteit neemt niet meer significant toe met staalgrootte) is het staal groot genoeg. Indien de werkelijke populatie kleiner is, is het nuttig om zo veel mogelijk individuen te bemonsteren.

Wanneer men door omstandigheden slechts een zeer beperkt aantal individuen kan bemonsteren is het zeer sterk aangewezen om een zeer groot aantal genetische merkers te gebruiken. Een bredere analyse van het genoom van een individu kan dan deels compenseren voor het gebrek aan voldoende stalen (bv. Waples & Do 2010).

Bij amfibieën is het doorgaans makkelijker om larven te bemonsteren dan volwassen exemplaren. Het risico daarbij is dat de genetische diversiteit binnen de aanwezige larven geen representatief beeld geeft van de diversiteit in de gehele populatie, bv. wanneer er jaren zijn met slechte voortplanting of wanneer een aanzienlijk deel van de populatie zich in het staalnamejaar niet voortplant maar wel overleeft, of wanneer door toeval een groot deel van de bemonsterde larven afkomstig zijn van hetzelfde eisnoer. Hels (2002) vond dat de maximale reproductie plaatsvindt in vijfjarige exemplaren, maar deze stellen minder dan 7% voor van de volwassen knoflookpadden als gevolg van een relatief lage overleving van jaar tot jaar in volwassen exemplaren (c. 31%).

Hierdoor is het aangewezen om zowel volwassen als larvale exemplaren te bemonsteren, en de genetische diversiteit in beide cohortes te vergelijken.

2.4 Welke parameters zijn van belang om te vergelijken binnen en tussen populaties?

Om in te schatten of een populatie genetisch verarmd is, is het aangewezen om volgende parameters te bepalen op nucleaire loci:

De basisparameters bestaan uit genetische diversiteit en genetische rijkdom binnen en tussen populaties (Hamilton 2009). Daarvan kunnen andere parameters afgeleid worden, gegeven bepaalde assumpties: de effectieve populatiegrootte kan geschat worden aan de hand van linkage disequilibrium (Waples & Do 2008) en van de graad van verwantschap van verschillende individuen in de populatie (Jones & Wang 2010, Wang 2011). Deze laatste methode laat bij een voldoende groot aantal merkers ook toe om een schatting te maken van de effectieve graad van inteelt.

F-statistieken geven ook de graad van inteelt weer over verschillende niveaus (Fis: tussen individuen binnen een populatie; Fit: tussen individuen binnen de totale set van populaties; Fst: tussen populaties). Deze methode laat toe om de genetische differentiatie tussen populaties te schatten. Doorgaans zijn vier processen bepalend voor de hoeveelheid genetische diversiteit: drift, gemeten door de effectieve grootte van de populatie; migratie, de hoeveelheid genetische uitwisseling tussen populaties; selectie: een verandering in diversiteit doordat bepaalde varianten bevoorrecht of benadeeld worden en mutatie. Hiervan zullen vooral drift en in mindere mate selectie bepalend zijn voor de uiteindelijke genetische diversiteit (Hamilton 2009). Het effect van selectie (bv. de verwachting dat in ingeteelde populaties heterozygote individuen bevoorrecht worden) is relatief moeilijk te bepalen, omdat een correcte inschatting

van de genoom-wijde heterozygositeit van een individu een analyse vereist op honderden tot duizenden genetische merkers (Pemberton 2004).

Een bijkomend nuttige parameter, is de fitness van individuen (gemeten als reproductiesucces of als gemiddelde overleving van ei tot metamorf) te schatten in relatie tot hun genetische diversiteit, of tot de genetische diversiteit van de gehele populatie. Dit vereist echter een kweek in een gemeenschappelijke gecontroleerde omgeving ("common garden"). Indien er beslist wordt om over te gaan tot bijplaatsingen van dieren uit een kweekprogramma is dit een haalbare optie. Daarnaast is het nuttig om (individuen uit) populaties in een goede staat van instandhouding te vergelijken met (individuen van de) Belgische populaties. Hiermee is het in principe mogelijk om te testen of de Belgische populaties leiden aan inteeltdepressie. Dit zou blijken indien er een positief verband is tussen de gemiddelde genetische diversiteit van elke populatie en de gemiddelde fitness van de individuen uit elke populatie. Dat laat toe om in te schatten of een genetische vermenging tussen relictpopulaties noodzakelijk is voor populatieherstel.

2.5 Welke methode en hoeveel genetische merkers?

Grosso modo zijn er drie types van genetische merkers die in principe bruikbaar zijn om 'het genetisch profiel' te bepalen van populaties. Deze verschillen in kostprijs en de tijd die nodig is voor de ontwikkeling van de merkers, in de hoeveelheid merkers die je voor eenzelfde kostprijs kan analyseren per staal en in de kwaliteit en kwantiteit van DNA die er nodig is om de analyse uit te voeren. Tabel 1 geeft een overzicht. De drie methodes en merkers worden hier kort toegelicht.

2.5.1 Microsatellieten

Microsatellieten zijn veruit de meest variabele merkers en geven daardoor met een relatief klein aantal merkers een redelijke schatting van de genetische diversiteit binnen een populatie. Meestal streeft men naar merkers met een tiental allelen per locus. Meer is mogelijk maar vraagt grotere stalen per populatie om een betrouwbare schatting te krijgen van de genetische parameters. Doorgaans gebruikt men 10-20 merkers. Om individuele verwantschapsanalyses in de eerste graad (ouder-nakomeling, broer-zus) uit te voeren is een minimum van 15 merkers vereist. Microsatellieten vragen een behoorlijke investering voor de ontwikkeling, die doorgaans van begin tot einde uitmondt in een totaal kost van c. 10 000 euro voor c. 15 merkers. Doordat ook de analysekost per merker relatief hoog is, is het zelden kostenefficiënt om zeer grote aantallen merkers te analyseren. Het grote voordeel van microsatellieten is dat ze geen hoge eisen stellen aan de kwaliteit en kwantiteit van het DNA, waardoor we met eenvoudige huidstrijkjes DNA-stalen kunnen nemen. Een belangrijk nadeel van microsatellieten is dat de analyse sterk afhankelijk is van een specifiek toestel en dat de allele-calling (de exacte identificatie van een allel) sterk afhankelijk is van het toestel. De identificatie van allelen gebeurt immers op basis van de geschatte lengte van het locus (bv. 162 nucleotiden), maar deze schatting kan van toestel tot toestel verschillen met enkele nucleotiden. Dit maakt dat uitwisseling van gegevens tussen onderzoeksgroepen sterk bemoeilijkt wordt. Dit probleem is niet aanwezig bij SNPs of DNA sequencing via GBS. Daarenboven is er per merker een belangrijke startkost, die bestaat in de aankoopprijs voor fluorescent gelabelde DNA-primers.

2.5.2 SNPs via KASP

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) geven de variatie in DNA weer op individuele DNA-nucleotiden, verspreid over het genoom. Doordat er doorgaans maar twee allelen per locus zijn is de genetische diversiteit met SNPs gemeten kleiner, en is de resolutie per merker ook kleiner dan bij microsatellieten. Men heeft doorgaans viermaal meer SNPs nodig dan microsatellieten om een vergelijkbare statistische power te bekomen. Het grote voordeel van SNPs is dat de identificatie van de allelen niet toestelafhankelijk is: een base C wordt altijd als C gelezen, een T als een T etc. De goedkoopste methode om relatief kleine aantallen SNPs (10 tot 1000 loci) te analyseren is via KASP (competitive allele-specific PCR). Voorafgaand aan de genotypering is een SNP-ontwikkeling vereist, die best gebeurt via restriction-associated DNA sequencing (RAD-sequencing). De ontwikkelingskost geassocieerd met dit type SNPs is een stuk lager dan voor microsatellieten, en levert ineens honderden tot vele duizenden SNPs op, waaruit de gewenste SNPs kunnen worden geselecteerd voor analyse. Per merker is er een belangrijke startkost, die grotendeels bestaat in de aankoopprijs voor fluorescent gelabelde DNA-primers. Met c. 150 tot 200 merkers kan men relatief betrouwbaar familiale verwantschappen tot in de tweede graad (bv. grootouderkleinkind) bepalen.

2.5.3 SNPs via GBS

Dit is een zeer recent ontwikkelde techniek die in principe gelijkaardig is aan RAD-sequencing, met enkele vereenvoudigingen en ook met minder opties (Elshire *et al.* 2011). Ze laat toe om zonder voorkennis en merkerontwikkeling direct duizenden merkers te genotyperen via next-generation sequencing op een kleine tot grote set stalen. Het grote voordeel van deze methode is het grote aantal merkers dat voor een relatief

goedkope prijs kan worden gegenereerd. Dit grote aantal merkers is in conservatiegenetica zeer nuttig om op individueel niveau een goede schatting te geven van de heterozygositeit en werkelijke inteelt (Kristensen *et al.* 2010), hetgeen niet voldoende betrouwbaar mogelijk is met microsatellieten of met tientallen tot een paar honderd SNPs. Dit grote aantal merkers is ook zeer nuttig om in detail de familiale verwantschap tussen individuen in te schatten. Deze methode heeft een lineair toenemende kostencurve: de netto prijs per staal is altijd dezelfde, onafhankelijk van het aantal stalen. Dit staat in tegenstelling tot de twee vorige methodes, waar een behoorlijke startkost is voor ontwikkeling van de merkers en de aankoop van fluorescent gemerkte DNA-primers. Zolang het aantal te analyseren stalen in totaal kleiner is dan 400, is dit in totaal de goedkoopste methode, die ook de meeste gedetailleerde genetische informatie oplevert. Tot een totale grootte van 1000 stalen is de kostprijs voor deze methode vergelijkbaar aan die met c. 15 microsatellieten terwijl ze een veelvoud van de genetische informatie oplevert. Ze vereist echter DNA van uitstekende kwaliteit, die enkel betrouwbaar kan bekomen worden via weefselstalen, niet via huidstrijkjes.

Tabel 1. Overzicht van de voorwaarden en geschatte kosten voor analyse van verschillende types genetische merkers. DNA kwantiteit & kwaliteit: laag: swab larves; matig: swab adulten. Hoog: weefselstaal (staartpunt larve/ teenkoot adult) nodig. 60 SNPs hebben ongeveer dezelfde resolutie als 15 microsatellieten. DNA uit swabs bij adulten lijkt voldoende voor 150 SNPs, maar niet voldoende uit swabs op de staartheid van larven. Prijs voor DNA extractie is nog niet meegerekend en hangt af van aard van materiaal.

		Microsat	SNP 60	SNP 150	GBS
vereiste DNA kwantiteit en kwaliteit		laag	matig	matig	hoog
ontwikkelingskost (€)		10000	5000	5000	1000
startkost per merker (€)		120	127	118	0
aantal merkers		15	60	150	>2000
startkost voor X merkers (€)		1800	7623	17769	0
kost per staal (excl. ontwikkel- en startkosten, in €)		27.0	4.4	14.5	32.6
geraamde totaalcost voor X aantal stalen (euro; excl. DNA-extractie) (€)	100	14500	13063	24219	4265
	200	17200	13503	25669	7529
	400	22600	14383	28569	14058
	1000	38800	17023	37269	33646
	2000	65800	21423	51769	66292

2.6 Bemonstering in functie van de analysemethode

De verschillende genetische merkers en analysemethodes hebben andere eisen wat betreft de bron van DNA:

2.6.1 Huidstrijkjes (swabs)

Een huidstrijkje wordt genomen met een speciaal daartoe bestemde dunne wattenstaaf. Door met het staafje te draaien over het slijmvlies in de cloaca, in de mond (volwassen exemplaren) of op de staartheid van larven worden cellen afgenomen. Op volwassen individuen is de impact van een huidstrijkje relatief beperkt (Broquet *et al.* 2007, Prunier *et al.* 2012), op larven is deze niet gekend. Bij een huidstrijkje op een larvehuid wordt de slijmlaag beschadigd en worden huidcellen afgeschraapt. Dit geeft mogelijk een groot oppervlak waarlangs infecties mogelijk zijn, maar dit is niet gekend. De opbrengst van DNA uit cloacale swabs bij salamanders is relatief goed, en laat toe om zeker 100 tot 150 SNPs te analyseren via KASP. De opbrengst van DNA uit larvale huidstrijkjes laat enkel een analyse via microsatellieten toe.

2.6.2 Weefselstaal: staartpunt

Een staartpuntje van 3-5 mm (c. 5 mg weefsel) van een larve kan afgeknipt worden met een steriele schaar en kan daarna een weefselstaal opleveren dat een hoge DNA kwaliteit heeft, en een relatief grote hoeveelheid DNA oplevert (2000-5000 ng DNA). Bij larven van kamsalamander bleek dit geen significant negatieve impact te hebben op de overleving van de larven (Krupa *et al.* 2002). Het vereist echter wel voldoende grote larven (>5 cm). Met dit type staal kunnen zowel microsatellieten, SNPs via KASP als via GBS geanalyseerd worden.

2.6.3 Weefselstaal: teen

Bij volwassen exemplaren is het mogelijk om een teenkootje met een steriele schaar af te knippen en hieruit DNA te halen. Dit levert ook DNA van een hoge kwaliteit en kwantiteit op. Het wegnippen van het uiterste teenkootje van één teen heeft doorgaans geen negatieve impact op de overleving van volwassen amfibieën (Perry *et al.* 2011). Met dit type staal kunnen zowel microsatellieten, SNPs via KASP als via GBS geanalyseerd worden.

3 Naar een gunstigere SVI voor knoflookpad

3.1 Is er nood aan een kweek- en uitzetprogramma?

Knoflookpad is bij uitstek een soort met sterke fluctuaties in populatiegrootte doorheen de tijd, waardoor in kleine populaties fluctuaties makkelijk kunnen leiden tot extinctie (Hels & Nachmann 2002). Alle in Vlaanderen resterende populaties lijken een hoog risico te hebben op uitsterven op korte termijn. Prioritair moeten deze populaties drastisch vergroot worden om toekomstige genetische drift te minimaliseren en om effecten van verdere inteelt tot een minimum te reduceren.

Daarnaast moeten de resterende populaties genetisch terug aangevuld worden om het recente verlies aan genetische diversiteit en de daarmee gepaard gaande effecten van inteelt te compenseren. Dit garandeert geen voldoende staat van instandhouding, maar reduceert de kans op uitsterven op zeer korte termijn.

Mergeay (2013) geeft criteria voor de minimale metapopulatiegrootte van knoflookpad, rekening houdend met behoud van genetische diversiteit, en de daarmee gepaard gaande grootte van geschikt leefgebied. Daaruit blijkt dat voor knoflookpad een totale metapopulatiegrootte van c. 3250 volwassen dieren vereist is, en een totaal leefgebied, eventueel verdeeld over functioneel verbonden deelgebieden van c. 160 ha.

Hoewel knoflookpad voorkomt in natuurgebieden die ruim voldoen aan die grootte, bestaat slechts een fractie van die gebieden effectief uit geschikt leefgebied voor knoflookpad. Dit is enerzijds te wijten aan degradatie van voormalig geschikt leefgebied (bv. door aanwezigheid van vis), maar anderzijds doordat de gebieden ook bestaan uit een mozaïek van andere natuurdoeltypes die niet altijd verenigbaar zijn met doelen voor knoflookpad. Een gunstigere staat van instandhouding kan in principe gerealiseerd worden via:

- verbetering van de lokale habitatkwaliteit en uitbreiding van het leefgebied van de soort in de onmiddellijke omgeving van het huidige leefgebied (binnen de grenzen van de SBZ)
- de genetische verbinding van populaties via ecologische verbindingen
- een éénmalige toevoeging van genetische diversiteit door bijplaatsing van weinig-verwante individuen.

De vergroting van de populaties tot een voldoende lokale staat van instandhouding lijkt, op basis van de hoeveelheid beschikbaar potentieel leefgebied, mogelijk binnen de beschikbare grenzen van de huidige SBZ in De Maten. Ter vergelijking, Hels & Nachmann (2002) voerden levensvatbaarheidsanalyses uit op een metapopulatie (c. 1000 individuen) in vijf nabijgelegen vijvers (kortste afstand tussen vijvers < 400 m; totale oppervlakte leefgebied c. 35 ha) en concludeerden dat deze, ondanks herhaaldelijke extinctie van individuele deelpopulaties (gevolgd door herkolonisatie vanuit de andere vijvers) de metapopulatie een lage kans op extinctie heeft over een periode van 100 jaar. Deze analyse hield evenwel geen rekening met nadelige effecten van inteelt (Frankham 2005, Frankham 2010). Essentieel is dat geschikt leefgebied wordt bijgemaakt in de buurt van bestaande populaties, om zodoende de populaties te versterken.

Ook de piste van herintroducties kan onderzocht te worden. De IUCN¹ heeft hiervoor richtlijnen opgesteld (IUCN Species Survival Commission 2012). Knoflookpad komt nog maar voor op een handvol locaties in België, en een uitbreiding van het aantal populaties lijkt daardoor een te onderzoeken optie. Enkele jaren geleden werden knoflookpadden uitgezet in Nederland nabij de landsgrens met Hoogstraten. Het is waarschijnlijk interessant om de soort ook aan Belgische zijde kansen te geven en ecologische

¹ The International Union for Conservation of Nature

verbindingen met de Nederlandse populatie te voorzien om kolonisatie en naderhand genetische connectiviteit mogelijk te maken.

3.2 Bijplaatsingen

Bijplaatsing bestaat erin om individuen te verplaatsen van de ene locatie en te introduceren in een andere populatie (IUCN Species Survival Commission 2012). Bijplaatsingen beogen de leefbaarheid van populaties te verhogen door een vergroting van de populatie, door de genetische diversiteit te verhogen of door de leeftijdsopbouw van een populatie te optimaliseren.

Eenzijdig kan men dieren uit de eigen populatie isoleren en ze in gevangenschap onder gunstige condities laten voortplanten, waarna de nakomelingen teruggeplaatst worden in de populatie van oorsprong. Dit kan nuttig zijn om onderpopulatie-effecten tegen te gaan (allegeffecten). Bij allegeffecten is er een positief verband tussen de populatiegrootte en de gemiddelde fitness van individuen. Bijplaatsingen zijn dan enkel bedoeld om allegeffecten te doorbreken, en hebben geen effect op de graad van inteelt. Anderzijds kan men dieren of nakomelingen ervan verplaatsen naar andere populaties, met als doel om natuurlijke genmigratie te imiteren en daardoor negatieve effecten van inteelt te verzwakken. Deze praktijk is in het verleden succesvol toegepast in populaties van verschillende soorten planten en dieren, waaronder adders (zie Frankham 2005 §2.4 voor enkele voorbeelden). Momenteel worden bijplaatsingen in Nederland uitgevoerd bij knoflookpad.

3.2.1 Voor- en nadelen van bijplaatsingen

De vermenging van natuurlijke populaties via bijplaatsingen brengt ook enige risico's met zich mee. Wanneer populaties op een andere manier genetisch aangepast zijn aan hun omgeving, bestaat het risico dat kruisingen tussen individuen van deze verschillende populaties, of hun latere nakomelingen slecht aangepast zijn aan hun omgeving en daardoor een fitnessverlies vertonen. Dit fenomeen heet 'outbreeding depression'. Doorgaans schat men in dat negatieve effecten van outbreeding minder belangrijk zijn dan de positieve effecten ervan, zeker wanneer het populaties betreft uit dezelfde biogeografische regio, die nog maar recent gescheiden zijn door antropogene barrières en die uit gelijkaardige omgevingen komen (Frankham *et al.* 2011).

Onder natuurlijke condities is de verwachte genmigratie tussen verschillend aangepaste populaties niet onbestaande, maar de resulterende vermenging zal er gering zijn omdat de hoeveelheid migranten beperkt is. In het geval van outbreeding depression zal het relatieve aandeel individuen in de populatie met dit fitnessverlies dan ook gering zijn, waardoor effecten op de populatie verwaarloosbaar zijn. Indien de uitkruising wel positieve effecten heeft op fitness, wordt verwacht dat natuurlijke selectie zorgt voor een snelle verspreiding van deze positieve genetische variatie doorheen de populatie (zie bv. Pimm *et al.* 2006). De concrete langetermijncosten en -baten van uitkruising zijn echter zelden a priori gekend (Edmunds 2007). Om eventuele risico's op outbreeding depression te beperken en toch de genetische baten van uitkruising (maskeren van recessieve allelen) te hebben, lijkt het verstandig om bijplaatsingen vanuit andere populaties, ook die uit dezelfde regio, te beperken tot minder dan 10% van de eigen populatiegrootte per generatie. Op die manier geeft men natuurlijke selectie de kans om in te werken op zowel positieve als negatieve gevolgen van bijplaatsingen, met een minimaal risico voor de langetermijnoverleving.

3.2.2 Welk levensstadium gebruiken voor bijplaatsing?

Omdat overleving van de larven in sterke mate beperkend is (Hels 2002), is het aangewezen om bijplaatsingen niet te doen met larven. Adulten hebben daarentegen een zeer sterke trouw aan hun eigen stek, waardoor een emigratie uit de populatie waarin een individu is bijgeplaatst niet denkbeeldig is. Het lijkt daarom aangewezen om uitzettingen of bijplaatsingen te doen met het levensstadium dat ook van nature uit het meest dispersieve is, namelijk de juveniele knoflookpadden die net gemetamorfoseerd zijn (Hels 2002, Hels & Nachmann 2002).

Onder natuurlijke condities speelt natuurlijke selectie doorgaans sterk in op fitness-effecten van inteelt, waardoor van nature inteeltdepressie deels wordt weggewerkt (bv. Ficetola *et al.* 2011). In gevangenschap zijn condities veel gunstiger, en is er een relaxatie van de selectie op fitnesskenmerken. Daardoor is ook de overleving van ingeteelde individuen veel hoger dan in het wild, waardoor de mutatielast van een kweekpopulatie hoger kan zijn dan gewenst (Frankham 2008). Daarnaast is aangetoond dat er zelfs binnen één generatie sterke aanpassing kan optreden aan condities in gevangenschap (Christie *et al.* 2012). Daarom is het belangrijk om condities in gevangenschap zo kort mogelijk te houden en de condities zo nauw mogelijk te laten aanleunen bij natuurlijke condities (Frankham 2008). Dit gegeven pleit dan weer voor het gebruik van larven als stadium voor de bijplaatsing.

3.2.3 Mogelijke partners

In Nederland is stichting RAVON betrokken bij een kweekprogramma knoflookpad. Het is aangewezen om de betrokkenen daar te consulteren en eventueel bij dat kweekprogramma aan te sluiten alvorens zelf met een eigen kweekprogramma te starten. Bijplaatsingen vanuit de Nederlandse populaties moeten niet a priori uitgesloten worden.

4 Wetenschappelijke opvolging

Een essentieel aspect van bijplaatsingen en herintroducties is een zeer gedegen voorbereiding, uitvoering en wetenschappelijk opvolging krachtens de IUCN richtlijnen voor herintroductie (IUCN Species Survival Commission 2012). Dit vraagt een zeer zorgvuldig uitgestippeld plan van aanpak, en financiële ondersteuning voor zowel de uitvoering als voor de wetenschappelijke opvolging, teneinde het soortenbeschermingsprogramma en eventuele bijplaatsingen of herintroducties degelijk te kunnen onderbouwen, te evalueren en bij te sturen indien nodig. Bij de wetenschappelijke opvolging is het ook nuttig om na te gaan of er in gevangenschap inderdaad sprake is van een lagere selectiedruk (zie punt 3.3) op heterozygote individuen (larven, metamorfen, juvenielen). Deze informatie kan belangrijk zijn om een bijplaatsings- of herintroductieprogramma bij te sturen.

CONCLUSIE

1. Knoflookpad is in Vlaanderen quasi zeker sterk genetisch sterk verarmd. Dit kan via een analyse op moleculaire genetische merkers in detail onderzocht worden.
2. Verschillende types genetische merkers zijn voorhanden om de genetische diversiteit binnen en tussen populaties te bestuderen, waarbij de meest aangewezen methode vereist dat er ook DNA van zeer hoge kwaliteit en in zeer hoge hoeveelheid moet worden geanalyseerd. Dit vereist weefselstalen eerder dan huidstrijkjes. Om de toestand van de resterende populaties te interpreteren is het nodig om ook populaties uit de rest van het verspreidingsgebied, die zich in een goede staat van instandhouding bevinden, op te nemen in de analyse.
3. Indien een initiële screening van de genetische diversiteit uitwijst dat de huidige populaties knoflookpad onderhevig zijn aan inteelt en inteeltdepressie, is het zinvol niet-verwante individuen bij te plaatsen in bestaande populaties en de effecten hiervan nauwgezet wetenschappelijk op te volgen. Deze ingrepen zijn slechts aan te raden als aan de nodige internationaal geldende voorwaarden is voldaan voor herintroducties en bijplaatsingen. Een beperkte bijplaatsing met translocaties (<10% van de populatiegrootte per generatie) kan zonder grote risico's op outbreeding depression gebeuren.

REFERENTIES

- Broquet, T., L. Berset-Braendli, G. Emaresi, & L. Fumagalli. 2007. Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics* 8:509-511.
- Charlesworth, D., & J. H. Willis. 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics* 10:783-796.
- Christie, M. R., M. L. Marine, R. A. French, & M. S. Blouin. 2012. Genetic adaptation to captivity can occur in a single generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:238-242.
- Crottini, A., F. Andreone, J. Kosuch, L. J. Borkin, S. N. Litvinchuk, C. Eggert, & M. Veith. 2007. Fossorial but widespread: the phylogeography of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*), and the role of the Po Valley as a major source of genetic variability. *Molecular Ecology* 16:2734-2754.
- Edmunds, S. 2007. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology* 16:463-475.
- Elshire, R. J., J. C. Glaubitz, Q. Sun, J. A. Poland, K. Kawamoto, E. S. Buckler, & S. E. Mitchell. 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE* 6:e19379.
- Ficetola, G. F., T. W. J. Garner, J. Wang, & F. De Bernardi. 2011. Rapid selection against inbreeding in a wild population of a rare frog. *Evolutionary Applications* 4:30-38.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126:131-140.
- Frankham, R. 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology* 17:325-333.

- Frankham, R. 2010. Inbreeding in the wild really does matter. *Heredity* 104:124-124.
- Frankham, R., J. D. Ballou, M. D. B. Eldridge, R. C. Lacy, K. Ralls, M. R. Dudash, & C. B. Fenster. 2011. Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation Biology* 25:465-475.
- Hamilton, W. D. 2009. *Population Genetics*. Wiley-Blackwell, Chichester UK.
- Hels, T. 2002. Population dynamics in a Danish metapopulation of spadefoot toads *Pelobates fuscus*. *Ecography* 25:303-313.
- Hels, T., & G. Nachmann. 2002. Simulating viability of a spadefoot toad *Pelobates fuscus* metapopulation in a landscape fragmented by a road. *Ecography* 25:730-744.
- IUCN Species Survival Commission. 2012. *IUCN Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations*.
- Jones, O. R., & J. Wang. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10:551-555.
- Jooris, R., Engelen, P., Speybroeck, J., Lewylle, I., Louette, G., Bauwens, D. & Maes, D. 2012. De IUCN Rode Lijst van de amfibieën en reptielen in Vlaanderen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek INBO.R.2012.22. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Kristensen, T. N., K. S. Pedersen, C. J. Vermeulen, & V. Loeschcke. 2010. Research on inbreeding in the 'omic' era. *Trends in Ecology & Evolution* 25:44-52.
- Krupa, A. P., R. Jehle, D. A. Dawson, L. K. Gentle, M. Gibbs, J. W. Arntzen, & T. Burke. 2002. Microsatellite loci in the crested newt *Triturus cristatus* and their utility in other newt taxa. *Conservation Genetics* 3:85-87.
- Lewylle, I. 2009. Bescherming van de knoflookpad in Limburg. *Natuur.Focus* 8:103.
- Lewylle, I., & R. Roosen. 2009. Knoflookpad in Limburg: het tij gekeerd? *Hyla-Flits*:1-2.
- 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. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Mergeay, J. 2013. Analyse van de mogelijke verbindingen voor amfibieën en reptielen in de S-IHD rapporten. Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. INBO.A.2013.66. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Mergeay, J., & M. Van Hove. 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. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Pemberton, J. 2004. Measuring inbreeding depression in the wild: the old ways are the best. *Trends in Ecology & Evolution* 19:613-615.
- Perry, G., M. C. Wallace, D. Perry, H. Curzer, & P. Muhlberger. 2011. Toe Clipping of Amphibians and Reptiles: Science, Ethics, and the Law. *Journal of Herpetology* 45:547-555.
- Pimm, S. L., L. Dollar, & O. L. Bass. 2006. The genetic rescue of the Florida panther. *Animal Conservation* 9:115-122.
- Prunier, J., B. Kaufmann, O. Grolet, D. Picard, F. Pompanon, & P. Joly. 2012. Skin swabbing as a new efficient DNA sampling technique in amphibians, and 14 new microsatellite markers in the alpine newt (*Ichthyosaura alpestris*). *Molecular Ecology Resources*.
- Rannap, R., T. Kaart, L. Briggs, & W. De Vries. 2011. Habitat requirements of *Pelobates fuscus* and *Leucorrhinia pectoralis*. Project report "Securing *Leucorrhinia pectoralis* and *Pelobates fuscus* in the northern distribution area in Estonia and Denmark". LIFE08NAT/EE/000257., Tallin, Estonia.
- Reed, D. H., & R. Frankham. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17:230-237.
- Rowe, G., D. J. Harris, & T. J. C. Beebee. 2006. Lusitania revisited: A phylogeographic analysis of the natterjack toad *Bufo calamita* across its entire biogeographical range. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39:335-346.

Saccheri, I., M. Kuussaari, M. Kankare, P. Vikman, W. Fortelius, & I. Hanski. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392:491-494.

Wang, J. 2011. coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11:141-145.

Waples, R. S., & C. Do. 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8:753-756.

Waples, R. S., & C. Do. 2010. Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications* 3:244-262.