



Genetische beoordeling van potentiële bronpopulaties rugstreeppad voor herintroductie in Zwinstreek

Karen Cox en Joachim Mergeay

Redacteurs:

Karen Cox en Joachim Mergeay
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 Geraardsbergen
Gaverstraat 4, 9500 Geraardsbergen
www.inbo.be

e-mail:

karen.cox@inbo.be

Wijze van citeren:

Cox, K. & Mergeay, J. (2015). Genetische beoordeling van potentiële bronpopulaties rugstreeppad voor herintroductie in Zwinstreek. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2015 (INBO.R.2015.9091964). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

D/2015/3241/217

INBO.R.2015.9091964

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Jurgen Tack

Druk:

Managementondersteunende Diensten van de Vlaamse overheid

Foto cover:

Rugstreeppadlarven in de ondiepe oeverzone van een poel in Noorddduinen (Floris Verhaeghe)

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:

Agentschap voor Natuur en Bos



Agentschap voor
Natuur en Bos

Genetische beoordeling van potentiële bronpopulaties rugstreeppad voor herintroductie in Zwinstreek

Karen Cox en Joachim Mergeay

INBO.R.2015.9091964

Dankwoord

We willen in de eerste plaats de mensen van ANB Beheerregio Kust bedanken voor de vlotte samenwerking. De staalname vroeg veel inzet, zowel overdag als 's nachts. De terreinkennis en hulp van Guy Vileyn en Johan Lamaire kwamen goed van pas. Vele arbeiders van ANB hebben mee uitgekeken naar rugstreeppadden. Ook konden we rekenen op de vrijwillige hulp van Hans De Blauwe. Zonder deze mensen was er geen genetische studie mogelijk. Een extra steun in de rug was Floris Verhaeghe die alles op het veld zeer goed coördineerde, opvolgde en hielp bij de staalname. Hij leverde ook de nodige extra informatie die het mogelijk maakt om de data op een behoorlijke manier te interpreteren. Tevens las hij het rapport grondig na. Tenslotte nog dank aan ons labopersoneel, waaronder Sabrina Neyrinck, An Van Breusegem en Nancy Van Liefveringe. Zij zorgden voor de laboanalyses en voerden een eindeloze reeks testen uit om dit project tot een goed einde te brengen.



Floris Verhaeghe neemt een huidswab van een volwassen rugstreeppad in de Fluihoekduinen (Noordduinen) (foto: Hans De Blauwe)

Samenvatting

Aan de Belgische Oostkust dateert de laatste waarneming van rugstreepd (*Epidalea calamita*) uit 1988. De voorbije jaren gebeurden er in de Zwinstreek heel wat natuurinrichtingswerken die er het vroegere leefgebied van de rugstreepd opnieuw hebben hersteld. Wil men echter in de Zwinstreek opnieuw een rugstreepdpopulatie dan is dat enkel mogelijk door de soort te introduceren. Daarvoor moet eerst de geschikte bronpopulatie gevonden worden.

Met behulp van microsatellieten onderzochten we aan de hand van larvenstalen de genetische conditie van de resterende populaties aan de Westkust. Op basis van de analyse van de genetische structuur en van migratie lijken er drie verschillende subpopulaties te bestaan, verdeeld volgens de locaties Noordduinen in combinatie met Oosthoek, Ter Yde en Westhoek. Hun genetische variatie (heterozygositeit) ligt grotendeels binnen de verwachtingen binnen Europese context. Enkel Noordduinen-Oosthoek heeft een iets lagere genetische diversiteit. De effectieve populatiegroottes (of beter het effectief aantal ouders) zijn eerder klein en dan vooral in Noordduinen-Oosthoek. We kunnen spreken van een meta-populatie, of toch gedeeltelijk aangezien niet alle naburige subpopulaties bemonsterd werden, maar migratie gebeurt zeer asymmetrisch. Er is vermoedelijk genenuitwisseling van Westhoek naar Ter Yde en in mindere mate vanuit deze beide subpopulaties naar Noordduinen-Oosthoek. Deze laatste subpopulatie lijkt dan ook het minst geschikt om als bronpopulatie te fungeren. De Westhoekpopulatie lijkt hiervoor de beste keuze, maar we opteren ervoor om eerder een mix uit de drie subpopulaties te nemen als startpopulatie voor de herintroductie. De genetische variatie van de startpopulatie wordt op die manier gemaximaliseerd wat een betere kans op slagen zal opleveren. Proportioneel zouden het minst aantal individuen uit de Noordduinen-Oosthoek moeten genomen worden, om de druk op deze populatie te minimaliseren. Verdere richtlijnen worden in dit rapport kort besproken.

Aanbevelingen voor beheer

Hier volgt een korte samenvatting van aanbevelingen die ook in de discussie terug te vinden zijn.

- Gebaseerd op de genetische resultaten lijkt Noordduinen-Oosthoek de minst geschikte subpopulatie van de drie om te fungeren als bronpopulatie voor de herintroductie van rugstreeppad in de Zwinstreek. Toch adviseren wij een meer gespreide staalname voor latere uitzetting. De drie subpopulaties bevatten private allelen die bijdragen tot de totale allelische rijkdom. Deze kunnen belangrijk zijn voor een snelle adaptatie aan veranderende omstandigheden. Hoe groter de gemiddelde fitness en adaptieve variatie van de donorpopulatie, hoe beter.
- Proportioneel zouden de meeste dieren uit de Westhoek en Ter Yde mogen komen en en minder uit Noordduinen-Oosthoek. Maar om de druk op Noordduinen-Oosthoek te minimaliseren, zouden bijvoorbeeld enkel juvenielen en/of eitjes weggevangen kunnen worden, dit om de ouderpopulatie niet verder af te zwakken.
- Door ook individuen uit Noordduinen en Oosthoek te nemen voor de startpopulatie, kan tegelijkertijd de genetische variatie van deze subpopulaties bewaard worden in de Zwinstreek.
- De herintroductie dient men met bijdrage van genetica op te volgen. Een genetisch referentiepunt hoort bepaald te worden van de nieuwe populatie. Idealiter moet deze startpopulatie 95% van de genetische variatie van de bronpopulatie bevatten.
- Berekeningen van de nodige populatiegrootte om verlies aan genetische variatie doorheen de tijd te beperken en in relatie met de oppervlakte leefgebied kunnen gevonden worden in het advies van (Mergeay, 2013). De nieuwe populatie in het Zvingebied zal geen buurpopulaties kennen, noch aan de Belgische zijde, noch aan de Nederlandse zijde, en zal dus niet kunnen profiteren van mogelijke migranten. Hiermee dient men rekening te houden bij de beoordelen van de leefbaarheid van de startpopulatie.
- Later kan men dan nagaan of de nieuwe populatie onderhevig is aan genetische verarming en inteelt, en kan zonodig het proces van de herintroductie bijgestuurd worden. Een eerste onderzoek na translocatie kan minimum na twee generaties (ongeveer acht jaar) uitgevoerd worden. Na twee à drie generaties dient dit proces herhaald te worden.

English abstract

Since 1988, the Natterjack toad (*Epidalea calamita*) has disappeared from the Belgian east coast. After a intensive habitat restoration project in the Zwin region, the opportunity now exists to reintroduce the species. Potential source populations should therefore be screened for their suitability. In this study, we examined the genetic condition of the remaining natterjack toad populations on the Belgian west coast using microsatellite markers. Based on the analysis of the genetic structure and of recent gene flow, locations Noordduinen together with Oosthoek, Ter Yde and Westhoek can be considered as three different subpopulations, and part of one meta-population. The level of genetic variation of Westhoek and Ter Yde is comparable to the level found in other Northwestern European populations. Noordduinen-Oosthoek shows a reduced genetic diversity. The effective population sizes, or rather effective number of breeders, are relatively small, especially of Noordduinen-Oosthoek. Gene flow occurs asymmetrical, with migration from Westhoek to Ter Yde and to a lesser extent from both these subpopulations to Noordduinen-Oosthoek. Based on the results of this study, this last subpopulation seems to be the least appropriate source population. The Westhoek subpopulation is the best choice, but we recommend to use a mixture of individuals of the three subpopulations as a starting population. This way, a maximum of available genetic variation can be obtained, which delivers a higher success rate. The start population should, however, contain the lowest number of individuals from Noordduinen-Oosthoek to minimize further pressure on this subpopulation. Further guidelines are discussed in this report.

Inhoudstafel

Dankwoord	4
Samenvatting.....	5
Aanbevelingen voor beheer	6
English abstract	7
Lijst van figuren.....	9
Lijst van foto's	9
Lijst van tabellen	9
1 Introductie	11
2 Materiaal en methode.....	12
2.1 Staalname	12
2.2 Genotypering	13
2.3 Dataverwerking	14
2.3.1 Analyse loci	14
2.3.2 Genetische structuur.....	14
2.3.3 Migratie.....	15
2.3.4 Genetische diversiteit.....	16
2.3.5 Effectieve populatiegrootte.	16
3 Resultaten	17
3.1 Staalname en genotypering	17
3.2 Genetische structuur.....	18
3.3 Migratie.....	23
3.4 Genetische diversiteit en effectieve populatiegrootte.....	24
4 Discussie	26
Referenties	28

Lijst van figuren

Figuur 1 Aanduiding van de ligging van zones voor de staalname van rugstreeppad aan de Westkust. Deze ellipsen geven geen absolute grenzen weer.....	12
Figuur 2 Staalnamelocaties van larven en eitjes. De code van de locaties zijn in blauw, de naam van de zones in rood.....	17
Figuur 3 Grafische weergave van de eerste principale component van de sPCA (<i>lagged</i> scores, zie legende), met 4,4 km als maximale afstand in het "Neighbourhood by distance" netwerk, t.o.v. de x- en y-coördinaten van de locaties (resp. xx en yy). Achtergrond: digitale versie van topografische kaart 1/10.000, raster, kleur, NGI, (AGIV).....	19
Figuur 4 Grafische weergave van de tweede principale component van de sPCA (<i>lagged</i> scores, zie legende), met 4,4 km als maximale afstand in het "Neighbourhood by distance" netwerk, t.o.v. de x- en y-coördinaten van de locaties (resp. xx en yy). Achtergrond: digitale versie van topografische kaart 1/10.000, raster, kleur, NGI, (AGIV).....	20
Figuur 5 Grafische weergave van de eerste principale component van de sPCA (<i>lagged</i> scores, zie legende), met 10 km als maximale afstand in het "Neighbourhood by distance" netwerk, t.o.v. de x- en y-coördinaten van de locaties (resp. xx en yy). Achtergrond: digitale versie van topografische kaart 1/10.000, raster, kleur, NGI, (AGIV).....	21
Figuur 6 Grafische weergave van de laatste principale component van de sPCA (<i>lagged</i> scores, zie legende), met 10 km als maximale afstand in het "Neighbourhood by distance" netwerk, t.o.v. de x- en y-coördinaten van de locaties (resp. xx en yy). Achtergrond: digitale versie van topografische kaart 1/10.000, raster, kleur, NGI, (AGIV).....	21
Figuur 7 Fragment van de clusteranalyseresultaten met BAPS voor de Vlaamse dataset; enkel de resultaten voor de kustpopulaties worden weergegeven. Elke verticale lijn is een individu en elke kleur is een groep waartoe individuen worden gewezen. NOD: Noordduinen; HOS: Oosthoek; TYD: Ter Yde; WES: Westhoek. ...	22

Lijst van foto's

Foto 1 Poel in Noordduinen (foto: Floris Verhaeghe).....	13
--	----

Lijst van tabellen

Tabel 1 Lijst met het aantal bemonsterde larven per locatie, het aantal full-sib (FS) families met meer dan één lid gedetecteerd met Colony (inclusief het aantal bemonsterde eisnoeren) en het overblijvende aantal larven wanneer maar één lid van elke full-sib familie wordt behouden.	18
Tabel 2 De verschillende parameters voor genetische differentiatie tussen de subpopulaties. De 95% betrouwbaarheidsintervallen, bepaald met 1000 bootstraps, staan tussen haakjes.	22
Tabel 3 Proportie migrantenallelen (moduswaarden) geschat met behulp van het programma BIMr. De bovenste helft geeft de resultaten met Oosthoek en Noordduinen als één subpopulatie, de onderste zonder Oosthoek.....	23

Tabel 4 Geobserveerde (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e), effectief aantal allelen (A_e), allelische rijkdom (A_r), telkens met de standaardfout tussen haakjes, en de fixatie-index (F_{IS}) met het 95% betrouwbaarheidsinterval tussen haakjes.	24
Tabel 5 Gemiddelde waarden voor N_b berekend volgens de verwantschapsmethode met Colony, de linkage disequilibriummethode (LD) en de moleculaire co-verwantschapsmethode (MC). De waarden berekend voor de dataset zonder full sibs behalve één (excl. FS) als voor de volledige dataset (incl. FS) worden gegeven voor de LD- en MC-methode. De jackknife schatting van het betrouwbaarheidsinterval wordt tussen haakjes gegeven.....	25

1 Introductie

De Zwinstreek behoorde tot 1988 nog tot de regio's waar rugstreeppad (*Epidalea* (voormalig *Bufo*) *calamita*) voorkwam (Hyla-databank). Maar sindsdien werden er geen individuen meer waargenomen. Lewylle et al. (2010) stellen dan ook dat de soort er enkel kan terugkomen door middel van herintroductie.

Enkele decennia geleden kwamen meerdere populaties van rugstreeppad verspreid voor langs de kust (Bauwens & Claus, 1996). Het is dan ook mogelijk dat in de toenmalige ecoregio van de kustduinen grotere populaties voorkwamen die met elkaar in contact stonden via migrerende individuen. Zowel juveniele als adulte rugstreeppadden zijn immers in staat om meerdere kilometers af te leggen (Miaud et al., 2000; Sinsch, 1992; Sinsch et al., 2012; Smith & Green, 2005). Enkel duidelijke, natuurlijke barrières, zoals de IJzer, zouden migratie onmogelijk gemaakt hebben. Een historische verbinding met de populaties in het Schelde-estuarium werd nooit aangetoond. Daarom lijken de nog resterende populaties aan de Westkust de beste keuze als mogelijke bronpopulaties voor de herintroductie in de Zwinstreek. Bovendien is de verwachting dat deze populaties beter aangepast zijn aan het zoutgehalte in het water (Gomez-Mestre & Tejedo, 2003; Gomez-Mestre & Tejedo, 2004). Er is echter geen referentiemateriaal meer aanwezig van de Oostkust om de vergelijking met de huidige populaties aan de Westkust mogelijk te maken.

Bijgevolg wordt in deze studie enkel nagegaan wat de genetische conditie is van de populaties aan de Westkust. Daarbij kijken we naar de genetische variatie, aanwijzingen op inteelt, de effectieve populatiegroottes en mogelijke historische wijzigingen in die groottes. Tegelijkertijd gaan we na of deze populaties genetisch met elkaar in verbinding staan en dus eerder als subpopulaties binnen een metapopulatie mogen beschouwd worden. Op basis van deze resultaten geven we aanbevelingen betreffende welke populaties als bronpopulaties kunnen fungeren voor de herintroductie in de Zwinstreek.

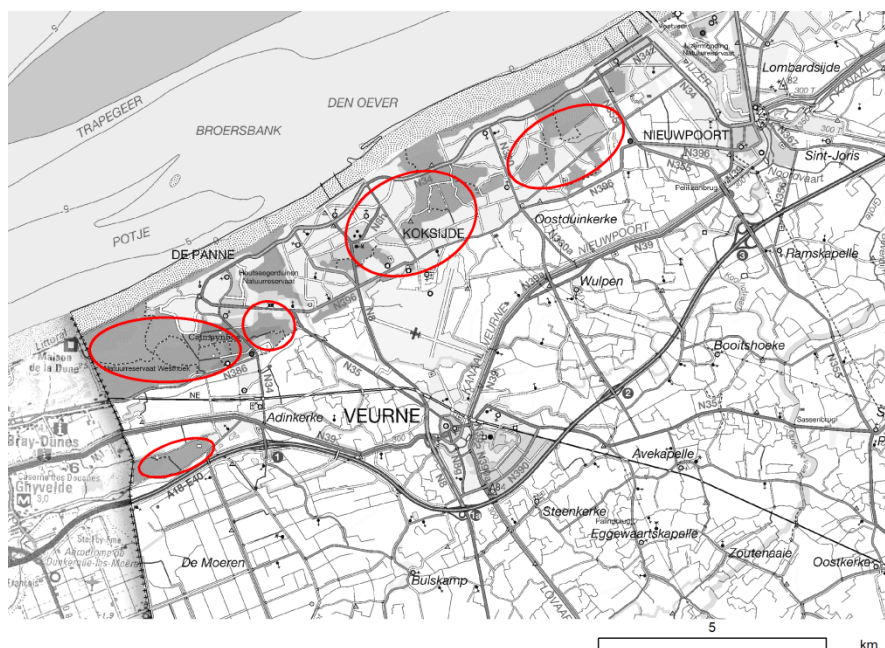
In verscheidene studies op rugstreeppad werd getracht een link te leggen tussen genetische diversiteit en vitaliteit en weerbaarheid. Rowe et al. (1999) vonden voor Britse populaties een relatie tussen heterozygositeit en fitness (grootte van larven), maar ook tussen heterozygositeit en census populatiegrootte. Een van de onderzochte populaties vertoonde verder een lagere fitness door een hoge genetische belasting (*genetic load*), vermoedelijk door de kleine populatiegrootte en isolatie van andere populaties (Rowe & Beebe, 2003). Wanneer ze in contact komen met individuen met beduidend hogere heterozygositeit, blijken ze ook competitief zwakker te zijn (Rowe & Beebe, 2005).

Naast genetische diversiteit, onder andere weergegeven door de mate van heterozygositeit, kan ook effectieve populatiegrootte (N_e) een belangrijk inzicht geven over de levensvatbaarheid van een populatie. Genetische drift leidt altijd tot verlies aan genetische variatie (d.i. verlies aan genetische diversiteit door toevalseffecten). De grootte en aard van het verlies is afhankelijk van allerlei factoren, zoals uiteraard populatiegrootte. Instinctief zou je zeggen dat een grote populatie minder sterk onderhevig is aan genetische drift. Maar niet elke grote populatie, in de zin van censusgrootte (N_c), gedraagt zich als een grote populatie. Drift staat met andere woorden niet in verhouding tot de censusgrootte, maar tot N_e . N_e is de grootte van een theoretisch ideale populatie, die in gelijke mate onderhevig is aan genetische drift als de populatie in kwestie. Deze maat laat ons toe om te beoordelen of een populatie voldoende weerbaar is tegen drift en inteelt. N_e is gewoonlijk veel kleiner dan N_c (Frankham, 1995).

2 Materiaal en methode

2.1 Staalname

Tijdens de periode april-juni 2014 werden in de kustregio stalen verzameld. Een afwijking op het Soortenbesluit (d.i. Besluit van de Vlaamse Regering van 15 mei 2009 met betrekking tot soortenbescherming en soortenbeheer (BS: 13/08/2009)) werd hiervoor aangevraagd en verkregen. Vooraf werden zones gedefinieerd op basis van waarnemingen van de soort, de leeftijd van de waarnemingen (liefst niet ouder dan 5 jaar) en het onderliggende landschap (aanwezigheid van straten, bebouwing, e.d. die mogelijk bijdragen tot een spatiale populatiestructuur). Deze gegevens zijn afkomstig van www.waarnemingen.be, de website voor natuurinformatie van Natuurpunt en Stichting Natuurinformatie met kenmerk 290-004-divers-wbe-HR Rapportage, en uit de HYL-databank. Ze werden beschikbaar gesteld door Natuurpunt Studie¹. Figuur 1 geeft de verschillende zones weer.



Figuur 1 Aanduiding van de ligging van zones voor de staalname van rugstreeppad aan de Westkust. Deze ellipsen geven geen absolute grenzen weer.

Per zone werd getracht om van minstens 50 larven, verdeeld over verschillende poelen (Foto 1), de staartpunt te knippen, waarna deze werd overgebracht op 100% ethanol. Na elke staalname werd de schaar en pincet ontsmet met 3% waterstofperoxideoplossing, schoongespoeld met water en afgedroogd. Bepaalde voortplantingspoelen waren droog. Daar konden soms vers dode larven/embryo's worden verzameld die volledig op ethanol werden gebracht. Daarnaast werden minimum 30 adulten per zone bemonsterd. Zowel een swabstaal in de cloaca als op de rug werd van elk individu genomen, daarbij werden de handschoenen tussen individuen verwisseld. De keuze om zowel swabstalen in de cloaca en op de huid te nemen, was om het risico op contaminatie door paring met andere individuen te spreiden. De weefselstalen (staartpunten) werden koel bewaard, de swabstalen werden na enkele uren drogen aan de lucht, op kamertemperatuur en op een donkere plek bewaard. De dieren werden direct na staalname terug vrij gelaten op hun vindplaats.

¹ De basisgegevens voor de kennis van de verspreiding van de rugstreeppad zijn intellectuele eigendom van de veldwaarnemers.



Foto 1 Poel in Noordduinen (foto: Floris Verhaeghe).

Tevens werden per zone enkele eitjes van eenzelfde eisnoer verzameld in een beker met poelwater. Deze eieren werden opgekweekt tot het larvaal stadium waarna ze in ethanol bewaard werden. Deze stalen dienen als controle bij het detecteren van full-sibs (dit zijn individuen met dezelfde vader en moeder).

Wanneer mogelijk werden de coördinaten van de vindplaatsen genoteerd alsook het geslacht van de adulten. Tijdens de staalname werd het veiligheidsprotocol opgesteld door ANB in 2014 gevolgd om overdracht van pathogenen tussen poelen te voorkomen.

In dezelfde periode gebeurde ook een staalname in andere gebieden in Vlaanderen. De genotypering van die stalen gebeurde samen met deze van de kust, maar de rapportering over de resultaten in verband met de andere populaties rugstreeppad volgt later. Omdat bepaalde analyses op deze volledige dataset gebeurde, zullen we hiernaar in de volgende paragrafen en hoofdstukken als volgt verwijzen: "de Vlaamse dataset".

2.2 Genotypering

De hoeveelheid DNA die we konden verkrijgen uit de swabstalen bleek zeer laag te zijn. Ondanks dat verschillende extractiemethodes en optimalisaties van verdere analysestappen werden uitgetest, waren de genetische profielen onbetrouwbaar. Deze werden bijgevolg achterwege gelaten en zullen ook niet verder besproken worden.

Het DNA uit de weefselstalen werd geëxtraheerd met de DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) en opgelost in 100 µl AE buffer. De DNA-kwaliteit van circa 10% van de Vlaamse dataset werd gecontroleerd met behulp van horizontale gelelectroforese op 1% agarosegels. De hoeveelheid DNA werd voor alle stalen bepaald met de Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Life Technologies) op een Synergy HT plate reader (BioTek).

Na het uittesten van zestien gepubliceerde microsatellietmerkers bleven de volgende elf merkers over: Bcalµ1, Bcalµ2, Bcalµ3, Bcalµ4, Bcalµ5, Bcalµ6, Bcalµ7, Bcalµ8 (Rowe et al., 1997), Bcalµ10, Bcalµ11 (Rowe et al., 2000), Buca2 en Buca5 (Rogell et al., 2005). Twee multiplexsets met respectievelijk de eerste zeven en de laatste vier microsatellieten werden gebruikt. Enkel Bcalµ8 werd in simplex gelopen. De multiplex PCR voor het eerste panel bevatte 5 µl Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), 0,20 µl van elke primerset (10 µM) behalve

voor de loci Bcal μ 2 en Bcal μ 7, waarvan 0,10 μ l werd toegevoegd, 1 μ l van verdund DNA (5 ng/ μ l), aangevuld met geautoclaveerd ultrapuur water (Milli-Q, Millipore Corporation) tot een totaal volume van 10 μ l. De PCR-condities waren 15' op 94°C, 35 cycli van 30" op 94°C, 30" op 60°C en 30" op 72°C. De finale extensiestap werd uitgevoerd gedurende 10' op 72°C om dan te eindigen op 4°C gedurende 15'. Daarna werd de temperatuur op 15°C gehouden. Voor het tweede panel is de samenstelling hetzelfde, behalve dat 0,40 μ l van Bcal μ 11 en 0,20 μ l van de overige primersets werden toegevoegd. De annealing temperatuur was hier 56°C. Voor de locus in simplex werden de reacties uitgevoerd in een totaal volume van 15 μ l met 1,5 μ l 10x PCR buffer inclusief 500 mM KCl, 1,25 μ l MgCl₂ (25mM), 0,6 μ l van elke primer (10 μ M), 0,38 μ l dNTP (10 mM), 0,6 U Taq DNA polymerase (Fermentas, Thermo Scientific) en 5 μ l DNA (5 ng/ μ l). Een touch down annealing protocol van 29 cycli werd gevolgd, waarbij elke cyclus startte met 1' op 94°C en eindigde met 1' op 72°C. De 29 cycli werden voorafgegaan met 3' op 94°C en afgesloten met 10' op 72°C, 15' op 4°C. De eerste drie cycli hadden een annealing temperatuur van 66°C gedurende 1'. Bij elke volgende twee cycli zakte de temperatuur met 2°C tot 60°C bereikt werd. Daarna volgden 21 cycli van 1' op 58°C. De genotypering gebeurde op een automatische ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Van de Vlaamse dataset werd 5% van de stalen twee tot zes maal herhaald, gedeeltelijk vertrekkende uit weefsel, gedeeltelijk uit DNA.

2.3 Dataverwerking

Bij het bemonsteren van larven is het mogelijk dat er voornamelijk families per pool worden verzameld, dan wel bij een meer heterogene en toevallige bemonstering van een populatie (Goldberg & Waits, 2010). Dit kan de allelfrequenties en bijgevolg de populatiegenetische analyses beïnvloeden wat een vertekend beeld kan opleveren. Daarom werd eerst een verwantschapsanalyse uitgevoerd met het programma Colony 2.0.5.8 (Jones & Wang, 2010) om full-sib families te detecteren (Wang, 2004). Het werkt volgens een maximum likelihood aanpak. De parameterinstellingen waren: full likelihood, een polygaam paringssysteem voor de mannetjes en een monogaam systeem voor de vrouwtjes (tijdens één voortplantingsseizoen), een medium runlengte, zes runs, geen aanpassing van de allelfrequenties. De larven afkomstig uit de eitjes van eenzelfde eisnoer werden als gekende maternale sibs ingegeven. Larven bemonsterd in verschillende poelen, kunnen niet dezelfde moeder hebben (binnen de bemonsteringsperiode), wat ook als randvoorwaarde in de berekeningen meegenomen werd. De foutenmarge per merker werd aan de hand van dubbele genotypen bepaald, maar met een minimum van 0,01. Individuen werden vanaf een probabiliteit vanaf 0,95 beschouwd als full-sibs.

2.3.1 Analyse loci

Of loci in Hardy-Weinberg evenwicht verkeren, werd getest met het R package adegenet 1.4-2 (Jombart, 2008). We voerden een correctie uit voor *multiple testing* met behulp van *False Discovery Rate* (FDR) (Benjamini & Hochberg, 1995). De aanwezigheid van nulallelens werd onderzocht met behulp van Genepop 4.3 (Rousset, 2008) met de maximum likelihood methode, waarbij het EM algoritme van Dempster et al. (1977) gebruikt wordt, en met de Brookfield (1996) methode geïmplementeerd in het R package PopGenReport 1.6.6 (Adamack & Gruber, 2014). Genepop werd ook gebruikt voor het testen van linkage disequilibrium tussen loci.

2.3.2 Genetische structuur

We hanteerden verschillende methodes om de relatie tussen subpopulaties en de spatiale structuur te achterhalen. Vooreerst werd een principale componenten analyse (PCA) uitgevoerd wat de variantie in allelfrequentie weergeeft, gevolgd door een spatiale PCA (sPCA) om het bestaan van een spatiale structuur te onderzoeken (Jombart et al., 2008), beiden uitgevoerd met adegenet. Deze methode is onafhankelijk van assumpties zoals deze van Hardy-Weinberg en van linkage disequilibrium. Het maakt gebruik van allelfrequenties

en brengt hun genetische variabiliteit en spatiale autocorrelatie in rekening met *Moran's I* (Moran, 1948; Moran, 1950). Als netwerk voor de sPCA werd een "Neighbourhood by distance" netwerk gekozen, waarbij verschillende maximale afstanden werden gebruikt: 2,6 km, 4,4 km en 10 km. Deze afstanden werden bepaald op basis van bestaande literatuur (Miaud et al., 2000; Sinsch, 1992; Sinsch et al., 2012; Smith & Green, 2005). De resultaten hieruit werden vergeleken met de resultaten bekomen uit de analyse met een Bayesiaanse clusteringstechniek in het programma BAPS 6 (Corander et al., 2008a) waarbij de spatiale context in rekening werd gebracht. We gebruikten de optie van spatiale, individuele clustering in de populatie-mixture-analyse en eindigden met een admixture-analyse. Het mixture-model in BAPS definieert de omgeving van elk individu gebaseerd op een Voronoidiagram van het studiegebied (Corander et al., 2008b). Deze analyse werd op de Vlaamse dataset uitgevoerd. We lieten de K-waarde (d.i. het optimaal aantal clusters) klimmen van 1 tot en met 25, een waarde hoger dan het aantal subpopulaties (d.i. 18 binnen de Vlaamse dataset). Voor elke K-waarde werd de analyse tien keer herhaald. De admixture analyse verliep met 100 iteraties voor de schatting van de admixturecoëfficiënten, 200 referentie-individueen voor elke populatie en 20 iteraties voor het schatten van hun admixturecoëfficiënten. De minimale populatiegrootte werd ingesteld op vijf individuen.

Als maten van populatiedifferentiatie werden de volgende parameters berekend: F_{ST} (Wright, 1943), D_{est} (Jost, 2008) en G_{STest} (Nei, 1973; Nei & Chesser, 1983). Hiervoor werden de R packages hierfstat (Goudet, 2005) en mmod (Winter, 2012) gebruikt. Met behulp van de software SPAGeDi (Hardy & Vekemans, 2002) werd een permutatietest van allel-grootte uitgevoerd (1000 permutaties) op de Vlaamse dataset waarbij nagegaan werd of stapsgewijze mutaties in belangrijke mate hebben bijgedragen tot de differentiatie, en dus of R_{ST} (Chakraborty & Nei, 1982; Slatkin, 1995) een betere schatter is dan F_{ST} (Hardy et al., 2003). Deze testen waren niet significant na correctie voor multiple testing (resultaten niet inbegrepen). Bijgevolg kan mutatie als onbelangrijk beschouwd worden ten opzichte van drift, waardoor F_{ST} een betere parameter is voor het bepalen van de populatiestructuur en van migratie. Een schatting voor R_{ST} werd achterwege gelaten.

2.3.3 Migratie

De mogelijkheid van recente gene flow werd onderzocht met behulp van GeneClass2 (Piry et al., 2004). Dit programma bepaalt welke individuen eerste generatie migranten zijn. Omdat we met larven werken, bepalen we hier welke ouders migranten zijn. We voerden toewijzingstesten uit gebruik makende van de criteria $L = L_{home}/L_{max}$, de ratio van de likelihood berekend voor de populatie waar het individu werd bemonsterd op de maximale likelihood berekend onder alle populaties, en $L = L_{home}$ Paetkau et al. (2004). Het eerste criterium geldt als alle subpopulaties bemonsterd werden, het tweede als er mogelijk nog niet-bemonsterde subpopulaties bestaan, wat hier potentieel het geval is. In één zone werden geen stalen genomen (zie verder), bovendien stopt de staalname aan de Franse grens. De partieel Bayesiaanse methode van Rannala & Mountain (1997) samen met het herbemonsteringsalgoritme van Paetkau et al. (2004) werden gebruikt waarbij 10.000 individuen werden gesimuleerd ($\alpha = 0,05$).

Een andere Bayesiaanse methode om recente migratie te detecteren, zit vervat in het programma BIMr 1.0 (Faubet & Gaggiotti, 2008). Het bepaalt de proportie migrantenallelen tijdens de laatste generatie en maakt de assumptie dat staalname gebeurde na reproductie en voor migratie. Vanwege de overlappende generaties en het waarschijnlijke onevenwicht tussen drift en migratie, zullen we de resultaten interpreteren als relatieve schattingen van recente genenuitwisseling. 10 replicate runs met telkens 20 piloot runs van 1.000 iteraties werden gelopen. 100.000 iteraties golden als burnin en 50.000 als staalgrootte met 100 als dunningsinterval (dus 5.120.000 iteraties in totaal per run). We kozen de run met de laagste toewijzingscomponent ten opzichte van de totale afwijking (D_{assign}). Omdat Oosthoek te weinig stalen bevat voor deze analyse, werd deze populatie samengevoegd met Noordduinen, gebaseerd op de resultaten van de analyse van genetische structuur (zie verder). Ter vergelijking werd de analyse herhaald zonder de subpopulatie Oosthoek.

2.3.4 Genetische diversiteit

We bepaalden een aantal schatters voor genetische diversiteit met het R package hierfstat voor de (sub)populaties gedefinieerd volgens de voorgaande structuuranalyse: effectief aantal allelen (A_e), allelische rijkdom (A_r), geobserveerde (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e ; d.i. wanneer een populatie in Hardy-Weinberg evenwicht verkeert), fixatie-index (F_{IS}). A_e geeft het aantal allelen met gelijke frequentie die nodig zijn om hetzelfde niveau van heterozygositeit op elk locus te bereiken als van de populatie in kwestie. Het laat toe om populaties te vergelijken die sterk in aantal en distributie van allelen verschillen. A_r is eerder een maat voor het aantal allelen per locus maar met een correctie voor ongelijkheid in staalgrootte. In hierfstat wordt de rarefaction techniek gebruikt waarbij een waarde voor het aantal allelen moet gekozen worden waarover ze worden gecorrigeerd ('rarefied'). We hielden het bij de standaardwaarde, namelijk het minimum aantal individuen maal twee voor diploïden. De waarde van F_{IS} is een maat voor inteelt.

2.3.5 Effectieve populatiegrootte.

Er bestaan verschillende methodes om N_e te berekenen, elk met hun eigen assumpties. Omdat aan deze assumpties zelden volledig voldaan is en omdat niet al deze assumpties kunnen getest worden, is het vergelijken van resultaten uit meerdere technieken aangewezen. Omdat we niet met temporele data werken, maar met larven uit één jaar, kunnen enkel de zogenaamde "single-sample estimators" gebruikt worden. Daarnaast is rugstreeppad een soort met overlappende generaties waardoor de schattingen van N_e met deze methodes eerder het aantal effectieve ouders (N_b) benadert dan wel N_e (Beebee, 2009). We gebruikten onder andere de verwantschapsanalyse methode Colony zoals eerder beschreven. We gebruikten de waarden onder random paring. Daarnaast gebruikten we NeEstimator 2.01 (Do et al., 2014) waarin de linkage disequilibrium methode met een biascorrectie (Waples & Do, 2008), de heterozygositeitsexcessmethode (Zhdanova & Pudovkin, 2008) en de moleculaire co-verwantschapsmethode (Nomura, 2008) opgenomen zijn. De berekeningen van N_e werden met verschillende kritische waarden voor minimum allelfrequentie uitgevoerd. Allelen met frequenties onder deze waarden worden uitgesloten in de berekeningen. De dataset met maar één lid per full-sib familie diende als input. De linkage disequilibriummethode werd onder de setting "random paring" gelopen.

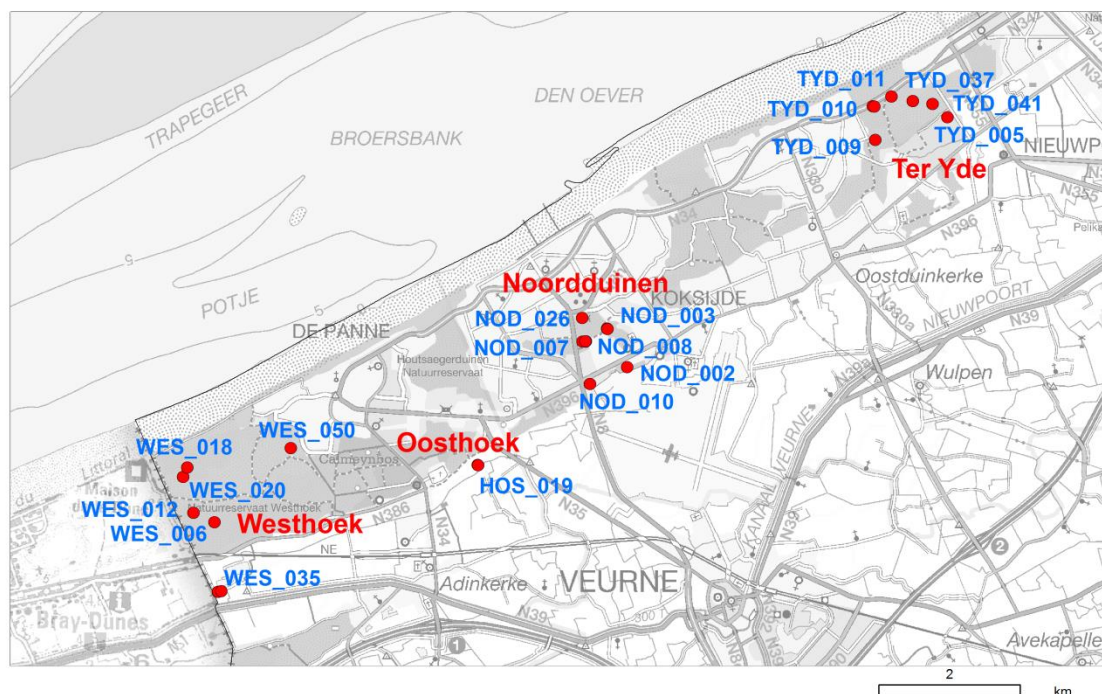
Naast waarden voor N_e te bepalen, kunnen we ook achterhalen of populaties al dan niet een reductie dan wel een expansie hebben ondergaan. Met behulp van het programma Bottleneck 1.2.02 van Piry et al. (1999) testen we of de beschouwde populaties afwijken van migratie-driftevenwicht, en of ze dus recent verkleind zijn of een sterke reductie in gene flow hebben meegemaakt. Hiervoor gebruiken we het infinite-allele-model (IAM), dat geen assumpties maakt aangaande verwantschap tussen allelen (Swaegers et al., 2014).

3 Resultaten

3.1 Staalname en genotypering

Van 84 individuen werd zowel een swabstaal van de cloaca als van de huid (rug) genomen. Helaas konden hier geen betrouwbare genetische profielen van ontwikkeld worden, zoals al eerder vermeld werd.

In vier van de vijf zones werden larven gevonden (Figuur 2). Een totaal van 256 larven werd bemonsterd, waarvan 38 opgekweekt werden uit eitjes van vijf eisnoeren (Tabel 1). Locus Bcalp8 vertoonde veel uitval en werd uitgesloten van verdere analyses. Enkel stalen met een genotype voor minimaal zes van de elf overblijvende loci werden behouden in de Vlaamse dataset. Stalen van de kust hadden een genotype voor minimaal acht loci. Aan de hand van de dubbele stalen konden we een fout van gemiddeld 0,01 berekenen per locus. Na het verwijderen van de full-sibs behalve één, op basis van de resultaten uit Colony, behielden we 152 individuen.



Figuur 2 Staalnamelocaties van larven en eitjes. De code van de locaties zijn in blauw, de naam van de zones in rood.

Enkel voor zes combinaties tussen subpopulatie en locus zijn de loci niet in Hardy-Weinberg evenwicht ($p < 0,0001$). Maar dit is niet steeds dezelfde locus of dezelfde subpopulatie. Drie van die combinaties hebben te maken met subpopulaties aan de kust: Oosthoek – locus Bcalp1, Oosthoek – locus Bcalp3 en Westhoek – locus Bcalp11. Na correctie voor meerdere testen, zijn er geen significante combinaties.

Slechts voor vier van de achttien subpopulaties uit de Vlaamse dataset kunnen nulallelen berekend worden met package PopGenReport, waaronder Ter Yde en Westhoek. Ter Yde heeft een significant aantal nulallelen voor locus Bcalp4 (mediaan frequentie = 0,11; BI = 0,02 – 0,20) en Westhoek voor Bcalp6 (mediaan frequentie = 0,11; BI = 0,01 – 0,21). Er is geen locus dat over de hele lijn eruit springt qua aantal nulallelen. Met de methode van Genepop blijkt locus Buca2 een problematisch locus te zijn in de meerderheid van de subpopulaties, inclusief in deze aan de kust. Wanneer we echter naar de gekende full-sibs

kijken, zijn er zelden individuen die homogzygoot zijn voor een ander allel dan de allelen die gedragen worden door de overige leden van dezelfde full-sib familie. Dit is niet onmogelijk maar bij de sterke aanwezigheid van nulallelen zou dit gegeven meer voorkomen. Omdat inclusie van loci met nulallelen de analyse van de (vooral fijnschalige) structuur kan beïnvloeden, werd de sPCA (met maximale afstand = 10 km) herhaald zonder deze locus, maar dit gaf dezelfde resultaten. Ook bij het achterhalen van recente migranten met BIMr lijkt deze locus geen grote invloed te hebben op de resultaten.

Linkage disequilibrium komt enkel voor tussen Bcal μ 1 en Bcal μ 6, maar dit blijkt enkel van tel in twee subpopulaties (o.a. Noordduinen).

Tabel 1 Lijst met het aantal bemonsterde larven per locatie, het aantal full-sib (FS) families met meer dan één lid gedetecteerd met Colony (inclusief het aantal bemonsterde eisnoeren) en het overblijvende aantal larven wanneer maar één lid van elke full-sib familie wordt behouden.

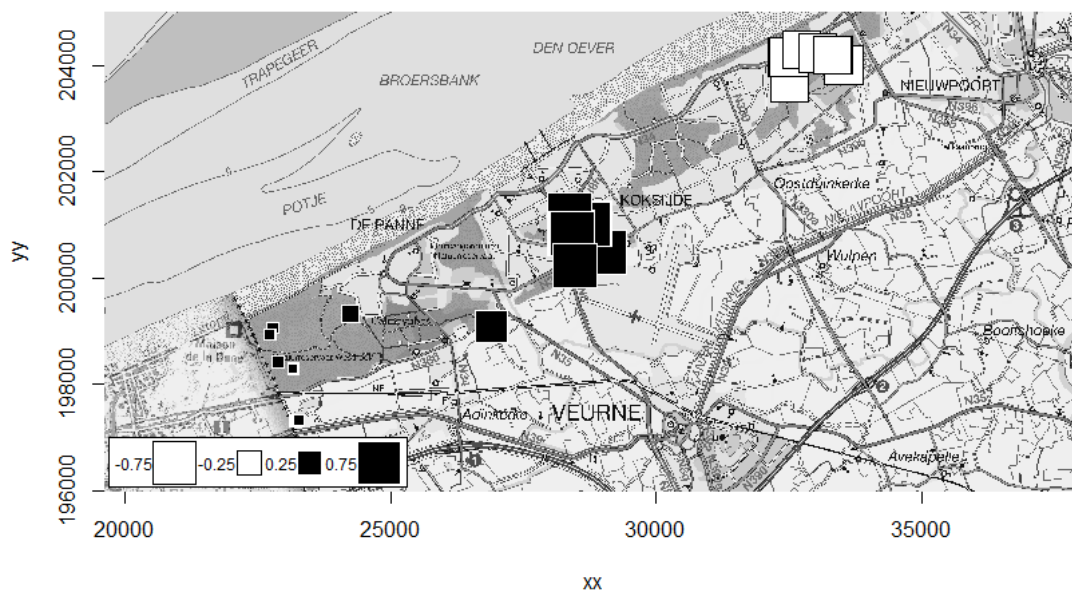
Zone	Locatie	aantal individuen	aantal FS families	aantal excl. FS
Ter Yde	TYD_005	6	0	6
	TYD_009	6	0	6
	TYD_010	7	0	7
	TYD_011	6	0	6
	TYD_037	19	0	19
	TYD_041	35	6	19
	<i>totaal</i>			63
Noordduinen	NOD_002	3	0	3
	NOD_003	33	4	8
	NOD_007 - NOD_008	58	6	24
	NOD_026	4	0	4
	NOD_010	8	1	1
	<i>totaal</i>			40
Oosthoek	HOS_019	10	1	7
Westhoek	WES_006	10	2	5
	WES_012	10	0	10
	WES_018	10	1	9
	WES_020	10	2	6
	WES_035	10	3	6
	WES_041	6	1	5
	WES_050	5	1	1
	<i>totaal</i>			42
Totaal		256		152

3.2 Genetische structuur

De eerste twee assen van de PCA leveren de meeste informatie, hoewel ze samen ook maar 16% van de variatie verklaren. Op basis van deze twee assen zijn de verschillende zones te onderscheiden, behalve Oosthoek. Deze laatste vertoont vooral overlap met Noordduinen en in mindere mate met Westhoek. Ook de overige zones overlappen gedeeltelijk, maar dan vooral Westhoek en Ter Yde. Noordduinen en Ter Yde zijn duidelijk te onderscheiden.

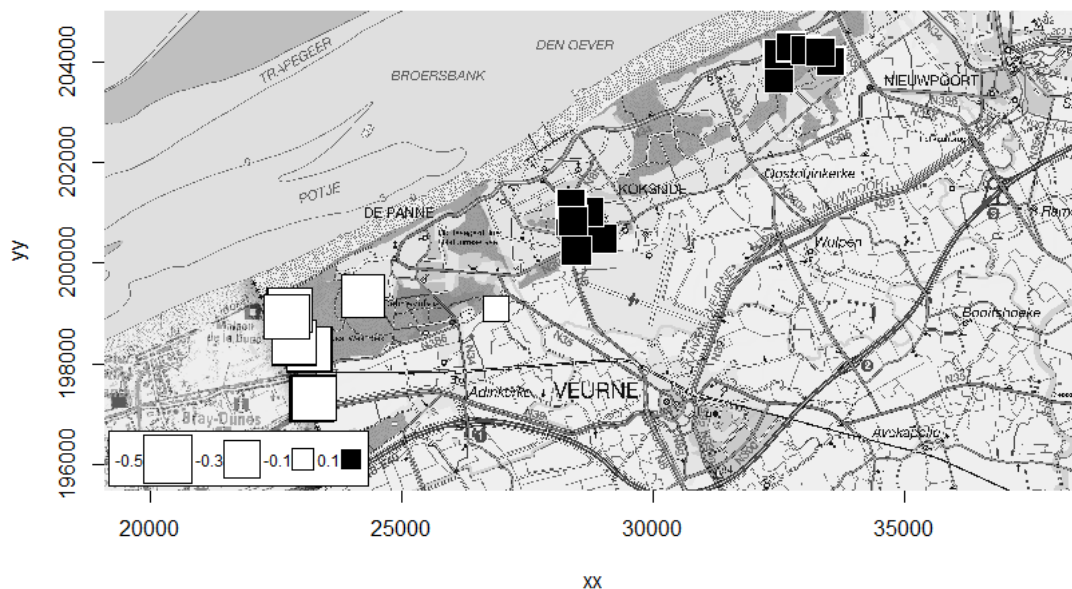
Daarnaast lijken de stalen van locatie NOD_026 af te wijken van de rest van Noordduinen (vooral één staal wijkt sterk af). De overige assen leveren geen bijkomende informatie.

De resultaten voor de sPCA met maximale afstanden 2,6 en 4,4 km zijn sterk gelijkend. Daarom stellen we enkel de resultaten voor de tweede afstand en 10 km voor. Het netwerk met 4,4 km als maximale afstand zorgt ervoor dat Ter Yde niet verbonden is met de overige zones, in tegenstelling tot het netwerk met 10 km als maximale afstand. Voor het netwerk met maximale afstand 4,4 km werd enkel een globale structuur gevonden, met slechts twee positieve factoren (Monte-Carlotest met 999 iteraties: $p = 0,001$). De eerste principale component geeft een duidelijk onderscheid tussen Ter Yde, Noordduinen en Westhoek, waarbij de twee laatste zones wel meer gelijkenis vertonen met elkaar dan elk van hen met Ter Yde (Figuur 3). Oosthoek vormt dan eerder een intermediaire zone tussen Westhoek en Noordduinen, met een grotere gelijkenis aan Noordduinen. De tweede principale component geeft een grotere differentiatie van Westhoek weer ten opzichte van de overige zones en in mindere mate geldt dit ook voor Oosthoek (Figuur 4).



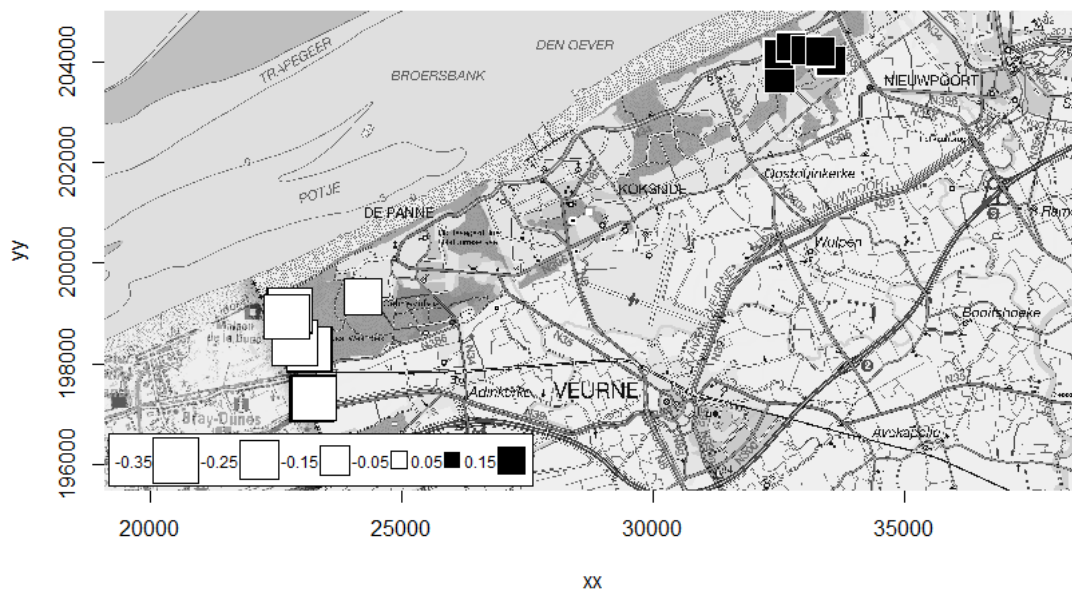
Figuur 3 Grafische weergave van de eerste principale component van de sPCA (*lagged scores*, zie legende), met 4,4 km als maximale afstand in het "Neighbourhood by distance" netwerk, t.o.v. de x- en y-coördinaten van de locaties (resp. xx en yy). Achtergrond: digitale versie van topografische kaart 1/10.000, raster, kleur, NGI, (AGIV).²

² Deze gegevens zijn eigendom van het NGI (Nationaal Geografisch Instituut) en zijn beschermd door de wetgeving inzake auteursrechten.

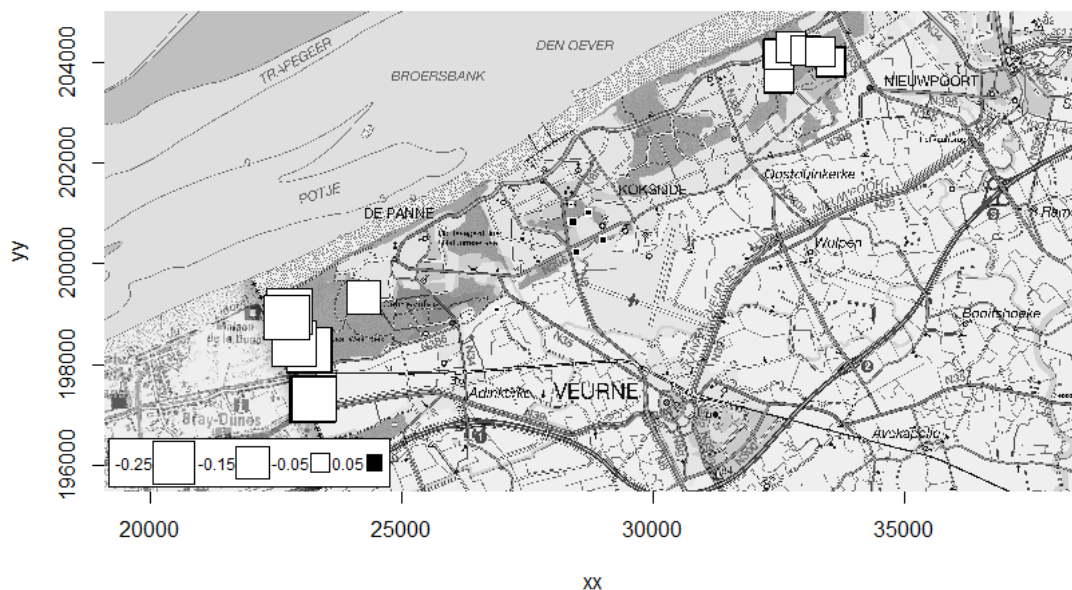


Figuur 4 Grafische weergave van de tweede principale component van de sPCA (*lagged scores*, zie legende), met 4,4 km als maximale afstand in het "Neighbourhood by distance" netwerk, t.o.v. de x- en y-coördinaten van de locaties (resp. xx en yy). Achtergrond: digitale versie van topografische kaart 1/10.000, raster, kleur, NGI, (AGIV).

Wanneer we echter de resultaten voor de maximale afstand van 10 km bekijken, zien we zoals verwacht een hogere mate aan connectiviteit tussen de zones. Opnieuw zijn er slechts twee positieve eigenwaarden, waarvan de eerste het meest uitgesproken is. De daarmee geassocieerde principale component bepaalt de globale structuur ($p = 0,001$). Deze toont drie duidelijk te onderscheiden groepen: Ter Yde, Westhoek en Noordduinen-Oosthoek (Figuur 5). Ook één principale component bepaalt daarnaast de lokale structuur (negatieve eigenwaarde; $p = 0,001$). Deze geeft aan dat WES_050 duidelijk te onderscheiden is van de overige locaties (Figuur 6). Maar tegelijkertijd is er een link tussen een gedeelte van Ter Yde en Westhoek, en in veel mindere mate tussen een gedeelte van Noordduinen en Westhoek, en tussen een gedeelte van Ter Yde en een gedeelte van Noordduinen.



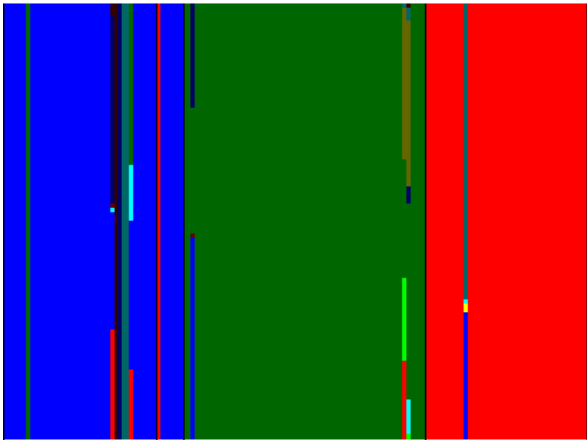
Figuur 5 Grafische weergave van de eerste principale component van de sPCA (*lagged scores*, zie legende), met 10 km als maximale afstand in het "Neighbourhood by distance" netwerk, t.o.v. de x- en y-coördinaten van de locaties (resp. xx en yy). Achtergrond: digitale versie van topografische kaart 1/10.000, raster, kleur, NGI, (AGIV).



Figuur 6 Grafische weergave van de laatste principale component van de sPCA (*lagged scores*, zie legende), met 10 km als maximale afstand in het "Neighbourhood by distance" netwerk, t.o.v. de x- en y-coördinaten van de locaties (resp. xx en yy). Achtergrond: digitale versie van topografische kaart 1/10.000, raster, kleur, NGI, (AGIV).

De BAPS admixture analyse gaf $K = 13$ als resultaat voor de Vlaamse dataset. Voor de locaties aan de kust zien we vooral drie groepen (Figuur 7) die sterk overeen komen met de globale structuur uit de sPCA, vooral deze met 10 km als maximale afstand. Enkele individuen uit Noordduinen worden aan andere, niet tot de bemonsterde kustpopulaties behorende groepen toegewezen. Het Voronoidiagram uit de mixture analyse geeft hetzelfde

resultaat (wordt niet getoond). De afwijkende stalen komen uit NOD_026, zoals reeds eerder werd aangegeven.



N	H	T	W
O	O	Y	E
D	S	D	S

Figuur 7 Fragment van de clusteranalyseresultaten met BAPS voor de Vlaamse dataset; enkel de resultaten voor de kustpopulaties worden weergegeven. Elke verticale lijn is een individu en elke kleur is een groep waartoe individuen worden gewezen. NOD: Noordduinen; HOS: Oosthoek; TYD: Ter Yde; WES: Westhoek.

De genetische structuur tussen deze subpopulaties wordt weergegeven in Tabel 2. De waarden voor F_{ST} en D_{est} zijn gelijkaardig en die voor G_{STest} zijn wat lager. Maar de onderlinge relaties tussen de subpopulaties zijn gelijk voor alle parameters. Tussen Ter Yde en Westhoek is er weinig differentiatie, terwijl er een drievoudige waarde voor genetische differentiatie bestaat tussen Ter Yde en Noordduinen. Ook is er weinig differentiatie tussen Noordduinen en Oosthoek. Vanwege het lage aantal stalen in Oosthoek zijn de betrouwbaarheidsintervallen breed voor waarden met betrekking tot deze subpopulatie.

Tabel 2 De verschillende parameters voor genetische differentiatie tussen de subpopulaties. De 95% betrouwbaarheidsintervallen, bepaald met 1000 bootstraps, staan tussen haakjes.

Populatie 1	Populatie 2	F_{ST}	D_{est}	G_{STest}
Noordduinen	Oosthoek	0,086 (0,010 - 0,206)	0,058 (0,011 - 0,117)	0,040 (0,006 - 0,084)
Noordduinen	Ter Yde	0,185 (0,110 - 0,287)	0,170 (0,144 - 0,200)	0,106 (0,089 - 0,126)
Noordduinen	Westhoek	0,119 (0,078 - 0,165)	0,107 (0,081 - 0,137)	0,064 (0,048 - 0,082)
Oosthoek	Ter Yde	0,133 (0,044 - 0,269)	0,145 (0,086 - 0,210)	0,074 (0,038 - 0,113)
Oosthoek	Westhoek	0,070 (0,017 - 0,126)	0,082 (0,033 - 0,137)	0,040 (0,013 - 0,073)
Ter Yde	Westhoek	0,059 (0,032 - 0,097)	0,064 (0,043 - 0,087)	0,030 (0,020 - 0,041)

3.3 Migratie

We vonden veertien migranten met GeneClass onder het criterium L_{home}/L_{max} met $p < 0,05$: in Noordduinen vier (drie in NOD_026 en één in NOD_003) afkomstig uit Ter Yde en twee afkomstig uit Oosthoek, in Noordduinen NOD_008 één afkomstig uit Westhoek, in Oosthoek HOS_019 één afkomstig uit Noordduinen, in Ter Yde vijf (twee in TYD_009, één in TYD_010 en twee in TYD_041) afkomstig uit Westhoek, en in Westhoek twee (WES_018 en WES_006) uit Ter Yde. Vijf dezelfde migranten werden ook gevonden onder het L_{home} criterium (gevonden in NOD_026 en HOS_019) en één extra migrant in HOS_019 afkomstig uit Westhoek. De overige migranten gevonden onder het L_{home}/L_{max} criterium, behalve deze gevonden in WES_006, kregen nu een probabiliteit $< 0,1$.

De proporties genenuitwisseling berekend door BIMr worden weergegeven in Tabel 6. Door veelal asymmetrische verdelingen van de parameterschattingen kiezen we meestal voor de modus in plaats van het gemiddelde als immigratieprobabiliteit. Hierdoor is het moeilijk om de betrouwbaarheidsintervallen te vergelijken om een richting van genenuitwisseling te bepalen. We kijken dus eerder naar het verschil in moduswaarden om asymmetrische migratie te kunnen detecteren. Er lijkt geen migratie naar Westhoek te gebeuren. In Noordduinen-Oosthoek komen ongeveer 3% van de allelen zowel uit Ter Yde als uit Westhoek. Deze laatste proportie verandert als Oosthoek uit de analyse wordt gelaten (0,5%). Een verrassend resultaat is de hoge geschatte genmigratie vanuit Westhoek naar Ter Yde (modus= 19%). Als we locus Buca2 weglaten vanwege potentiële nulallelen, zakt enkel de proportie migrantengenen van Ter Yde naar Noordduinen(-Oosthoek) verder onder 0,001 (moduswaarde).

Tabel 3 Proportie migrantenallelen (moduswaarden) geschat met behulp van het programma BIMr. De bovenste helft geeft de resultaten met Oosthoek en Noordduinen als één subpopulatie, de onderste zonder Oosthoek.

Van/naar	Noordduinen-Oosthoek	Ter Yde	Westhoek
Noordduinen-Oosthoek	0,911	0,003	2,16E-12
Ter Yde	0,029	0,799	5,95E-14
Westhoek	0,035	0,187	1
Van/naar	Noordduinen	Ter Yde	Westhoek
Noordduinen	0,942	0,004	6,21E-13
Ter Yde	0,025	0,797	6,96E-3
Westhoek	0,005	0,192	1

Om meer zekerheid te verkrijgen over de richting van de genmigratie, werd het verschil in proporties van migrantengenen voor elke 100^{ste} iteratie bepaald, exclusief voor de iteraties in de burninfase (d.i. over 50.000 iteraties). Voor 83% van de iteraties is genmigratie van Ter Yde naar Noordduinen-Oosthoek groter dan in omgekeerde richting. Voor 87% van de iteraties is de genmigratie van Westhoek naar Ter Yde groter dan omgekeerd en voor 76% van de iteraties gaan er meer genen van Westhoek naar Noordduinen-Oosthoek dan in omgekeerde richting. Zonder de locatie Oosthoek, worden deze percentages respectievelijk 80%, 89% en 72%.

Omdat 19% migrantenallelen van Westhoek naar Ter Yde toch wel zeer hoog is, doen we een controle op basis van de volgende formule: $F_{ST} = 1/(4N_e m + 1)$ met m als fractie migranten van elke populatie (Wright, 1931). Deze formule geldt wanneer de kans op uitwisseling van migranten voor elke populatie even groot is en wanneer migratie zeldzaam is. We beschouwen deze controle dan ook louter als indicatief. De waarden van N_e waren deze berekend met Colony (zie verder). We hebben de m -waarden genomen uit de analyse met

Noordduinen en Oosthoek als één subpopulatie, met de volgende paarsgewijze F_{ST} waarden als gevolg (de waarden berekend volgens Wright (1943) staan tussen haakjes): 0,165 (0,171) voor Noordduinen-Oosthoek versus Ter Yde, 0,182 (0,105) voor Noordduinen-Oosthoek versus Westhoek, 0,028 (0,059) voor Ter Yde versus Westhoek. De eerste waarde benadert de berekende waarde volgens Wright (1943), de tweede waarde is veel hoger en de derde iets lager. Vermoedelijk is er dus substantiële migratie van Westhoek naar Ter Yde, alhoewel deze mogelijk lager ligt dan 19%. Daarnaast lijkt er meer genenuitwisseling te zijn tussen Noordduinen-Oosthoek en Westhoek dan geschat met GeneClass en BIMr. Maar de F_{ST} waarde kan ook wijzen op een historische, betere connectie tussen beide subpopulaties.

3.4 Genetische diversiteit en effectieve populatiegrootte

Tabel 3 toont de gemiddelde waarden van genetische diversiteit voor de verschillende subpopulaties geïdentificeerd in de analyse van de genetische structuur en van migratie. We beschouwen daarom Noordduinen en Oosthoek als één subpopulatie. Omdat vele genetische studies op rugstreeppad werden uitgevoerd met loci Bcalμ1 tot en met Bcalμ8, en om de vergelijking met deze studies mogelijk te maken, werden dezelfde parameters opnieuw berekend voor loci Bcalμ1 tot en met Bcalμ7, daar locus Bcalμ8 niet bruikbaar bleek in deze studie. Het leverde net iets hogere waarden op dan deze uit Tabel 3 (resultaten niet inbegrepen). De waarden voor H_e zijn vergelijkbaar met die van de overige populaties binnen de Vlaamse dataset (hier niet getoond) en met die van populaties uit Centraal- en West-Europa (Beebe & Rowe, 2000; Frantz et al., 2009; Frei, 2014; May & Beebe, 2010; Rowe et al., 1998; Rowe et al., 2006). Een uitzondering is Noordduinen-Oosthoek waar de waarden van alle parameters, behalve voor A_r , eerder laag te noemen zijn, hoewel ze niet significant verschillen van de waarden van de andere populaties (Mann-Whitney U test, $p > 0,1$). Bovendien is de fixatie-index hier significant verschillend van nul. Dit kan te wijten zijn aan de substructuur in de populatie; als we de F_{IS} waarden voor Noordduinen en Oosthoek apart berekenen, krijgen we de respectievelijke waarden 0,05 en 0,12, en zijn ze niet significant verschillend van nul.

Tabel 4 Geobserveerde (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e), effectief aantal allelen (A_e), allelische rijkdom (A_r), telkens met de standaardfout tussen haakjes, en de fixatie-index (F_{IS}) met het 95% betrouwbaarheidsinterval tussen haakjes.

Subpopulatie	H_o	H_e	A_e	A_r	F_{IS}
Noordduinen-Oosthoek	0,340 (0,082)	0,378 (0,086)	2,142 (0,413)	3,950 (0,553)	0,1 (0,045 - 0,189)
Ter Yde	0,456 (0,074)	0,487 (0,081)	2,491 (0,365)	3,735 (0,492)	0,037 (-0,024 - 0,139)
Westhoek	0,505 (0,064)	0,527 (0,066)	2,519 (0,327)	4,182 (0,585)	0,031 (-0,038 - 0,115)

Bepaalde allelen zijn bijna gefixeerd; ze hebben met andere woorden een frequentie van meer dan 95% binnen een populatie. Zo is er een allel van Bcalμ2 en van Bcalμ5 met dergelijke frequenties in Noordduinen-Oosthoek, een allel van Bcalμ11 in alle subpopulaties behalve Westhoek en een allel van Buca5 in alle subpopulaties. Loci Bcalμ11 en Bcalμ2 zijn binnen de Vlaamse dataset weinig polymorf, maar voor de andere loci lijken de kustpopulaties toch al duidelijke invloeden van drift te vertonen. Vooral Noordduinen-Oosthoek lijkt daaraan onderhevig te zijn. Daarnaast hebben de drie subpopulaties allen vijf private allelen binnen de context van de kustpopulaties, wat eerder wijst op een vermoedelijk beperkte genenuitwisseling tussen subpopulaties.

De waarden voor N_b berekend volgens de verschillende methodes worden weergegeven in Tabel 4 met 0,01 als laagste allelfrequentie. De waarden verkregen door de heterozygositeitsexcessmethode bleken allemaal oneindig groot en worden niet getoond. Dit is niet ongevoel (bijv. Beebe, 2009). De waarden voor N_b berekend met de linkage

disequilibriummethode zijn lager dan die van Colony, behalve voor Westhoek (199). Wanneer we echter meer zeldzame allelen buiten beschouwing laten, stijgt het aantal effectieve ouders, terwijl het omgekeerde verwacht wordt (resultaten niet getoond). Als we dezelfde berekening doen op de totale stalenset voor Westhoek, dan zakt het aantal tot 30,9, dit terwijl er maar gemiddeld twee leden per full-sib familie zijn in 10 families met meer dan twee leden. Een dergelijke kleine verandering in allelfrequenties heeft dus een onverwacht groot effect op de schatting van N_b berekend met de linkage disequilibriummethode. Hetzelfde effect werd waargenomen voor de co-verwantschapsmethode: N_b zakte daar van oneindig groot naar 12 voor Westhoek. Voor de overige subpopulaties geeft deze methode steeds zeer lage resultaten (Tabel 4).

Tabel 5 Gemiddelde waarden voor N_b berekend volgens de verwantschapsmethode met Colony, de linkage disequilibriummethode (LD) en de moleculaire co-verwantschapsmethode (MC). De waarden berekend voor de dataset zonder full sibs behalve één (excl. FS) als voor de volledige dataset (incl. FS) worden gegeven voor de LD- en MC-methode. De jackknife schatting van het betrouwbaarheidsinterval wordt tussen haakjes gegeven.

Subpopulatie	Colony	LD excl. FS	LD incl. FS	MC excl. FS	MC incl. FS
Noordduinen-Oosthoek	25 (15 - 43)	16,4 (10,3 - 26,8)	9,7 (6,3 - 13,7)	3,5 (1,7 - 5,8)	4,1 (1,6 - 7,9)
Ter Yde	54 (37 - 81)	26,6 (18,3 - 40,1)	18,4 (14 - 24,2)	5 (1,6 - 10,2)	7,6 (1,3 - 19,6)
Westhoek	39 (25 - 63)	199,1 (59,9 - ∞)	30,9 (20,5 - 50,1)	∞	12 (2,5 - 29)

De verwantschapsmethode geeft de hoogste waarde van N_b aan Ter Yde, terwijl de andere methodes de hoogste waarden leveren voor de Westhoek. Over alle methodes heen zijn het aantal effectieve ouders niet hoog en dan vooral in Noordduinen-Oosthoek.

Subpopulaties Ter Yde en Westhoek hebben licht significante p-waarden voor de Wilcoxon-test voor excess in heterozygositeit, resp. 0,034 en 0,033. Deze waarden worden echter niet-significant na correctie voor multiple testing. Er is ook geen mode shift in allelfrequenties waar te nemen (d.i. de distributie van allelfrequenties volgt een L-vorm.) Er zijn bijgevolg geen duidelijke indicaties dat de subpopulaties een afname in grootte of in genenuitwisseling hebben ondergaan. De test werd herhaald voor Noordduinen en Oosthoek apart, maar gaf opnieuw geen significante p-waarde. Het aantal stalen in Oosthoek is vermoedelijk wel te laag voor deze test. Een bottleneck is nog meerdere generaties erna te detecteren. Hoeveel generaties is sterk afhankelijk van N_e na de bottleneck (Luikart & Cornuet, 1998). Voor deze soort met een generatietijd van ongeveer 4 jaar en met bijv. een post-bottleneck N_e van 25, kan je de bottleneck slechts 25 tot 400 jaar terugvinden in genetische data, vooraleer er een nieuw evenwicht is.

4 Discussie

De spatiale genetische structuur van de kustpopulaties geeft aan dat we Ter Yde, Westhoek en Noordduinen in combinatie met Oosthoek als enigszins drie subpopulaties mogen beschouwen. Een vergelijking van de genetische diversiteit op basis van deze onderverdeling toont dat zowel Ter Yde als Westhoek niet afwijken van de verwachtingen. De postglaciale kolonisatie vanuit de refugia had een afname in genetische variatie in noordelijke richting als gevolg, met hoge waarden in Spanje en lage waarden aan de rand van het verspreidingsgebied (Rowe et al., 2006). Andere populaties met vergelijkbare genetische variatie werden gevonden in Wallonië (Stevens et al., 2006), in het Groothertogdom Luxemburg (Frantz et al., 2009) en Zwitserland (Frei, 2014). Noordduinen-Oosthoek echter lijkt hiervan af te wijken. De gemiddelde heterozygositeit en het effectief aantal allelen liggen lager, maar zijn niet significant verschillend van de waarden van Ter Yde en Westhoek (Mann-Whitney U test, $p > 0,1$). Als we echter naar de loci afzonderlijk kijken, is de heterozygositeit voor vier van de elf loci substantieel lager in deze populatie ten opzichte van de twee andere kustpopulaties.

Uit de resultaten blijkt dat migratie mogelijk is tussen de verschillende subpopulaties. Zo is er zoals verwacht genenuitwisseling tussen Oosthoek en Noordduinen. De genenuitwisseling gebeurt binnen de metapopulatie wel asymmetrisch en proportioneel niet in gelijke mate. Er is echter wat onenigheid tussen de resultaten uit GeneClass en BIMr. Westhoek zou geen migranten ontvangen volgens de BIMr resultaten, terwijl twee individuen in Westhoek toegewezen waren aan Ter Yde volgens de GeneClass resultaten. Ook komt de uitwisseling van genen vanuit de Westhoek naar Ter Yde proportioneel minder sterk naar voren in de GeneClass resultaten. De controle met de formule voor F_{ST} op basis van N_e en m (Wright, 1931), lijkt dit te bevestigen. Migratie lijkt dus mogelijk vanuit Westhoek naar Ter Yde. Ook is er migratie vanuit Westhoek en Ter Yde naar Noordduinen-Oosthoek, maar in mindere mate. Tenslotte is er geen migratie vanuit Noordduinen-Oosthoek. Een landschappelijke reden voor deze asymmetrie in gene flow hebben we hier niet onderzocht.

De asymmetrie in migratie heeft waarschijnlijk niet enkel met het omringende landschap te maken, maar ook met de densiteit van de subpopulaties. Uit de berekeningen van N_b blijkt Noordduinen-Oosthoek de laagste waarde te dragen. Het zou dus kunnen dat de draagkracht van het leefgebied voor de populatie nog voldoende groot is, waardoor er nog geen noodzaak om te emigreren bestaat (Sutherland et al., 2002). Bovendien lijkt volgens twee van de drie methodes voor het bepalen van N_b de Westhoek de grootste effectieve populatie te bevatten. De subpopulatie in de Westhoek loopt waarschijnlijk voort over de Franse grens in het duinengebied van Bray-Dunes, waar verder nog connecties mogelijk zijn met andere Franse subpopulaties verder zuidelijk. Hoe groot N_b van de totale meta-populatie (meta- N_b) is, is hier niet te bepalen. We missen data van potentiële Franse subpopulaties. Daarnaast kan je de meta- N_b niet bepalen door een simpele optelsom van de N_b waarden van de verschillende subpopulaties. Wanneer er duidelijk een asymmetrische genenuitwisseling bestaat, kan de meta- N_b lager liggen dan de optelsom (Gomez-Uchida et al., 2013).

Gebaseerd op bovenstaande resultaten lijkt Noordduinen-Oosthoek de minst geschikte subpopulatie van de drie om te fungeren als bronpopulatie voor de herintroductie van rugstreeppad in de Zwinstreek. Naast een lagere genetische diversiteit en effectieve populatiegrootte, lijkt er minder migratie naar de subpopulatie te gebeuren (o.b.v. de sPCA en BIMr resultaten). Reproductiesucces kan sterk variëren tussen locaties en tussen verschillende jaren (Aubry et al., 2012), waardoor deze studie je mogelijk enkel een momentopname geeft van de situatie in de populaties. Toch lijken alle genetische parameters in dezelfde richting te wijzen. Zo zijn de waarden voor genetische diversiteit vergelijkbaar voor Westhoek en Ter Yde, alhoewel ze voor de eerste doorgaans iets hoger liggen. Ook N_b is in twee van de drie methodes hoger in de Westhoek. Dit lijkt dan ook de beste uitgangspopulatie. Toch opteren wij voor een meer gespreide staalname voor latere uitzetting. Alle drie de populaties bevatten private allelen die bijdragen tot de totale

allelische rijkdom. Deze kunnen belangrijk zijn voor een snelle adaptatie aan veranderende omstandigheden, zoals je bij een translocatie kan verwachten. Tegelijkertijd kan de genetische variatie van deze subpopulatie bewaard worden in de Zwinstreek door deze herintroductie. Maar om de druk op Noordduinen-Oosthoek te minimaliseren, zouden bijvoorbeeld enkel juvenielen en/of eitjes weggevangen mogen worden, dit om de ouderpopulatie niet verder af te zwakken. Proportioneel zouden de meeste dieren uit de Westhoek en Ter Yde mogen komen en minder uit Noordduinen-Oosthoek. Zeisset & Beebee (2013) suggereerden dat de grootte van de donorpopulatie meer van belang was dan de oorsprong voor een succesvolle translocatie van gewone pad (*Bufo bufo*). Translocatie vanuit lokale, kleinere populaties bleek in dat geval niet te lukken. Bijgevolg, hoe groter de gemiddelde fitness en adaptieve variatie van de donorpopulatie, hoe beter.

De herintroducties van rugstreeppad in Groot-Brittannië leken sinds de jaren '80 meer succesvol te zijn dan deze uitgevoerd in de jaren '70 (Beebee et al., 2012; Denton et al., 1997). Voor ongeveer 70% van 23 translocaties bleken voldoende adulten nakomelingen voort te brengen. Deze translocaties werden uitgevoerd met eitjes verzameld over verschillende eisnoeren, maar met een equivalent van totaal acht eisnoeren, en dit tijdens twee opeenvolgende jaren. Kans op slagen was bovendien hoger in de kustduinen (85% geslaagd) dan in de heidegebieden (57% geslaagd). Ook zijn er voorbeelden met uitzetting van larven of een mengsel van larven en eitjes (Rowe et al., 1998). McGrath & Lorenzen (2010) vonden dat populaties gesticht door translocaties een hogere populatiegroei vertoonden dan de natuurlijke populaties. Het aantal translocaties per site, samen met het correcte habitatbeheer en de afwezigheid van gewone pad, hadden eveneens een positief effect. Herintroducties en translocaties van rugstreeppad werden ook uitgevoerd in Estland (Rannap, 2004) en in Frankrijk (Beebee et al., 2012).

Van belang is dat de herintroductie met bijdrage van genetica gemonitord wordt. Zoals ook Lewy et al. (2010) stellen, dient er een genetisch referentiepunt bepaald te worden van de nieuwe populatie. Idealiter moet deze startpopulatie 95% van de genetische variatie van de bronpopulatie bevatten (Weeks et al., 2011). Berekeningen van de nodige populatiegrootte om verlies aan genetische variatie doorheen de tijd te beperken en in relatie met de oppervlakte leefgebied kunnen gevonden worden in het advies van (Mergeay, 2013). De nieuwe populatie in het Zwingebied zal geen buurpopulaties kennen, noch aan de Belgische zijde, noch aan de Nederlandse zijde, en zal dus niet kunnen profiteren van mogelijke migranten. Hiermee dient men rekening te houden bij de beoordelen van de leefbaarheid van de startpopulatie.

Later kan men dan nagaan of de nieuwe populatie onderhevig is aan genetische verarming en inteelt, en kan zonodig het proces van de herintroductie bijgestuurd worden (bijv. Ottewell et al., 2014). Een eerste onderzoek na translocatie kan minimum na twee generaties (ongeveer acht jaar) uitgevoerd worden. Deze tijd is minimaal nodig om reducties in populatiegrootte te detecteren met behulp van een 10-tal genetische markers (Luikart et al., 1998). Na twee à drie generaties dient dit proces herhaald te worden.

Referenties

- Adamack A.T., Gruber B. (2014). PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in Ecology and Evolution* 5(4):384-387.
- Aubry A., Bécart E., Davenport J., Lynn D., Marnell F., Emmerson M. (2012). Patterns of synchrony in natterjack toad breeding activity and reproductive success at local and regional scales. *Ecography* 35(8):749-759.
- Bauwens D., Claus K. (1996). Verspreiding van amfibieën en reptielen in Vlaanderen. Turnhout: De Wielewaal.
- Beebee T. (2009). A comparison of single-sample effective size estimators using empirical toad (*Bufo calamita*) population data: genetic compensation and population size-genetic diversity correlations. *Mol Ecol* 18(23):4790-4797.
- Beebee T.J.C., Cabido C., Eggert C., Gomez-Mestre I., Iraola A., Garin-Barrio I., Griffiths R.A., Miaud C., Oromi N., Sanuy D. et al. (2012). 40 years of natterjack toad conservation in Europe. *Froglog* 101:40-43.
- Beebee T.J.C., Rowe G. (2000). Microsatellite analysis of natterjack toad *Bufo calamita* Laurenti populations: consequences of dispersal from a Pleistocene refugium. *Biol J Linn Soc* 69(3):367-381.
- Benjamini Y., Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 57(1):289-300.
- Brookfield J.F.Y. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol Ecol* 5(3):453-455.
- Chakraborty R., Nei M. (1982). Genetic differentiation of quantitative characters between populations or species: I. Mutation and random genetic drift. *Genetics Research* 39(03):303-314.
- Corander J., Marttinen P., Siren J., Tang J. (2008a). Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics* 9.
- Corander J., Siren J., Arjas E. (2008b). Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computational Statistics* 23(1):111-129.
- Denton J.S., Hitchings S.P., Beebee T.J.C., Gent A. (1997). A recovery program for the natterjack toad (*Bufo calamita*) in Britain. *Conserv Biol* 11(6):1329-1338.
- Do C., Waples R.S., Peel D., Macbeth G.M., Tillett B.J., Ovenden J.R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14(1):209-214.
- Faubet P., Gaggiotti O.E. (2008). A new Bayesian method to identify the environmental factors that influence recent migration. *Genetics* 178(3):1491-1504.
- Frankham R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetics Research* 66:95-107.
- Frantz A.C., Proess R., Burke T., Schley L. (2009). A genetic assessment of the two remnant populations of the natterjack toad (*Bufo calamita*) in Luxembourg. *The Herpetological Journal* 19(2):53-59.
- Frei M. (2014). Landscape-genetic analysis of Natterjack toad (*Epidalea calamita*) populations in the Suhre valley (Switzerland) [Master thesis]. Zurich, Switzerland: Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich. 26 p.
- Goldberg C.S., Waits L.P. (2010). Quantification and reduction of bias from sampling larvae to infer population and landscape genetic structure. *Molecular Ecology Resources* 10(2):304-313.
- Gomez-Mestre I., Tejedo M. (2003). Local adaptation of an anuran amphibian to osmotically stressful environments. *Evolution* 57(8):1889-1899.
- Gomez-Mestre I., Tejedo M. (2004). Contrasting patterns of quantitative and neutral genetic variation in locally adapted populations of the natterjack toad, *Bufo calamita*. *Evolution* 58(10):2343-2352.
- Gomez-Uchida D., Palstra F.P., Knight T.W., Ruzzante D.E. (2013). Contemporary effective population and metapopulation size (N_e and meta- N_e): comparison among three salmonids inhabiting a fragmented system and differing in gene flow and its asymmetries. *Ecology and Evolution*:569-580.
- Goudet J. (2005). hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Mol Ecol Notes* 5(1):184-186.

- Hardy O.J., Charbonnel N., Freville H., Heuertz M. (2003). Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163(4):1467-1482.
- Hardy O.J., Vekemans X. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2(4):618-620.
- Jombart T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24(11):1403-1405.
- Jombart T., Devillard S., Dufour A.B., Pontier D. (2008). Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. *Heredity* 101(1):92-103.
- Jones O.R., Wang J. (2010). COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10(3):551-555.
- Jost L. (2008). G(ST) and its relatives do not measure differentiation. *Mol Ecol* 17(18):4015-4026.
- Lewylle I., Goddeeris B., Herremans M., Paulussen J., Vantorre R. (2010). Actieprogramma Boomkikker, Rugstreeppad en Kamsalamander in de Zwinstreek. Mechelen, België: Natuurpunt Studie.
- Luikart G., Cornuet J.-M. (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv Biol* 12(1):228-237.
- Luikart G., Sherwin W., Steele B., Allendorf F. (1998). Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Mol Ecol* 7(8):963-974.
- May S., Beebee T.J. (2010). Recent introduction or ancient ancestry? Use of genetic evidence to investigate the origins of range edge populations in natterjack toads (*Bufo calamita*). *Conserv Genet* 11(1):293-300.
- McGrath A.L., Lorenzen K. (2010). Management history and climate as key factors driving natterjack toad population trends in Britain. *Anim Conserv* 13(5):483-494.
- Mergeay J. (2013). Analyse van de mogelijke verbindingen voor amfibieën en reptielen in de S-IHD rapporten. Brussel: Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek.
- Miaud C., Sanuy D., Avriillier J.-N. (2000). Terrestrial movements of the natterjack toad *Bufo calamita* (Amphibia, Anura) in a semi-arid, agricultural landscape. *Amphibia-Reptilia* 21(3):357-369.
- Moran P.A.P. (1948). The interpretation of statistical maps. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 10(2):243-251.
- Moran P.A.P. (1950). Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika* 37(1/2):17-23.
- Nei M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70(12):3321-3323.
- Nei M., Chesser R.K. (1983). Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics* 47(3):253-259.
- Nomura T. (2008). Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample. *Evolutionary Applications* 1(3):462-474.
- Ottewill K., Dunlop J., Thomas N., Morris K., Coates D., Byrne M. (2014). Evaluating success of translocations in maintaining genetic diversity in a threatened mammal. *Biol Conserv* 171(0):209-219.
- Paetkau D., Slade R., Burden M., Estoup A. (2004). Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Mol Ecol* 13(1):55-65.
- Piry S., Alapetite A., Cornuet J.M., Paetkau D., Baudouin L., Estoup A. (2004). GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *J Hered* 95(6):536-539.
- Piry S., Luikart G., Cornuet J.M. (1999). BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered* 90(4):502-503.
- Rannala B., Mountain J.L. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17):9197-9201.
- Rannap R. (2004). Boreal Baltic coastal meadow management for *Bufo calamita*. In: Rannap R., Briggs L., Lotman K., Lepik I., Rannap V. (editors). Coastal meadow management: best practice guidelines. Tallinn, Estonia: Ministry of the Environment of the Republic of Estonia.
- Rogell B., Gyllenstrand N., Höglund J. (2005). Six polymorphic microsatellite loci in the natterjack toad, *Bufo calamita*. *Mol Ecol Notes* 5(3):639-640.

- Rousset F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8(1):103-106.
- Rowe G., Beebee T., Burke T. (2000). A further four polymorphic microsatellite loci in the natterjack toad *Bufo calamita*. *Conserv Genet* 1(4):371-373.
- Rowe G., Beebee T.J.C. (2003). Population on the verge of a mutational meltdown? Fitness costs of genetic load for an amphibian in the wild. *Evolution* 57(1):177-181.
- Rowe G., Beebee T.J.C. (2005). Intraspecific competition disadvantages inbred natterjack toad (*Bufo calamita*) genotypes over outbred ones in a shared pond environment. *J Anim Ecol* 74(1):71-76.
- Rowe G., Beebee T.J.C., Burke T. (1997). PCR primers for polymorphic microsatellite loci in the anuran amphibian *Bufo calamita*. *Mol Ecol* 6(4):401-402.
- Rowe G., Beebee T.J.C., Burke T. (1998). Phylogeography of the natterjack toad *Bufo calamita* in Britain: genetic differentiation of native and translocated populations. *Mol Ecol* 7(6):751-760.
- Rowe G., Beebee T.J.C., Burke T. (1999). Microsatellite heterozygosity, fitness and demography in natterjack toads *Bufo calamita*. *Anim Conserv* 2(2):85-92.
- Rowe G., Harris D.J., Beebee T.J. (2006). Lusitania revisited: a phylogeographic analysis of the natterjack toad *Bufo calamita* across its entire biogeographical range. *Mol Phylogen Evol* 39(2):335-346.
- Sinsch U. (1992). Structure and dynamic of a natterjack toad metapopulation (*Bufo calamita*). *Oecologia* 90(4):489-499.
- Sinsch U., Oromi N., Miaud C., Denton J., Sanuy D. (2012). Connectivity of local amphibian populations: modelling the migratory capacity of radio-tracked natterjack toads. *Anim Conserv* 15(4):388-396.
- Slatkin M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139(1):457-462.
- Smith M.A., Green D.M. (2005). Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography* 28(1):110-128.
- Stevens V.M., Verkenne C., Vandewoestijne S., Wesselingh R.A., Baguette M. (2006). Gene flow and functional connectivity in the natterjack toad. *Mol Ecol* 15(9):2333-2344.
- Sutherland L.J., Gill J., Norris K. (2002). Density-dependent dispersal in animals: concepts, evidence, mechanisms and consequences. In: Bullock J.M., Kenward R.E., Hails R., Hails R.S. (editors). *Dispersal ecology: 42nd symposium of the British Ecological Society*. Cambridge: Cambridge University Press. p 134-151.
- Swaegers J., Mergeay J., Therry L., Bonte D., Larmuseau M.H., Stoks R. (2014). Unravelling the effects of contemporary and historical range expansion on the distribution of genetic diversity in the damselfly *Coenagrion scitulum*. *J Evol Biol* 27(4):748-759.
- Wang J. (2004). Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* 166(4):1963-1979.
- Waples R.S., Do C. (2008). LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8(4):753-756.
- Weeks A.R., Sgro C.M., Young A.G., Frankham R., Mitchell N.J., Miller K.A., Byrne M., Coates D.J., Eldridge M.D.B., Sunnucks P. et al. (2011). Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments: a genetic perspective. *Evolutionary Applications* 4(6):709-725.
- Winter D.J. (2012). mmod: an R library for the calculation of population differentiation statistics. *Molecular Ecology Resources* 12(6):1158-1160.
- Wright S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16(2):97-159.
- Wright S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* 28(2):114-138.
- Zeisset I., Beebee T.J.C. (2013). Donor population size rather than local adaptation can be a key determinant of amphibian translocation success. *Anim Conserv* 16(3):359-366.
- Zhdanova O.L., Pudovkin A.I. (2008). Nb_HetEx: a program to estimate the effective number of breeders. *J Hered* 99(6):694-695.