

Vlaanderen
is wetenschap

Toestand van Vlaamse rugstreeppadpopulaties op basis van genetische data

Karen Cox, An Vanden Broeck, Joachim Mergeay

INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK

Auteurs:
Karen Cox, An Vanden Broeck, 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., Vanden Broeck, A. & Mergeay, J. (2015). Toestand van Vlaamse rugstreeppadpopulaties op basis van genetische data. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2015 (10767598). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

D/2015/3241/322
INBO.R.2015.10767598
ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:
Maurice Hoffmann

Druk:
Managementondersteunende Diensten van de Vlaamse overheid

Foto cover:
Rugstreeppad (Yves Adams/Vildaphoto.net)

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:
Agentschap van Natuur en Bos

AGENTSCHAP
NATUUR & BOS

© 2015, Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Toestand van Vlaamse rugstreeppadpopulaties op basis van genetische data

Karen Cox, An Vanden Broeck en Joachim Mergeay

INBO.R.2015.10767598
D/2015/3241/322

INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK

Dankwoord

We willen in de eerste plaats de mensen van ANB bedanken voor de vlotte samenwerking. Hans De Schryver in het bijzonder, zorgde voor de algemene coördinatie en doorstroom van informatie. De staalname vroeg veel inzet, zowel overdag als 's nachts. Vele mensen (zowel binnen als buiten ANB) hebben meegeholpen met hun terreinkennis en met de staalname, waaronder: Floris Verhaeghe, Guy Villeyn, Johan Lamaire, Hans De Blauwe, Sam Provoost, Chris Van Liefferinge, Wim Deblier, Marcel Van Waerebeke, Elfriede Schotmans, Corina Cools, Ivan Schoemans, Hans De Schryver, Frank Buysse, Karel Molenberghs, Robert Jooris, Marc Schuermans, Dirk Leyssens, Leo Norda, Guy Heutz, Harry Thys, Jurgen Melis, Bert Goyens en Joke Maes. Ook bedankt aan degenen die mogelijk ontsnapt zijn aan deze lijst. Vele arbeiders van ANB hebben mee uitgekeken naar rugstreeppadden. Joke Maes zouden we ook willen bedanken voor haar vrijgevigheid en fijne samenwerking. Ze zorgde voor stalen die het mogelijk maakte om de eerste testen in het labo uit voeren en die onze dataset sterk aanvulden met bijkomende populaties. Ook bedankt aan degenen die zorgden dat de stalen in het labo geraakten, waaronder Kristof Haneca (als tussenpersoon in Brussel). Zonder al deze mensen was er geen genetische studie mogelijk. Ten slotte nog dank aan ons labopersoneel, waaronder Sabrina Neyrinck, An Van Breusegem en Nancy Van Liefferinge. Zij zorgden voor de laboanalyses en voerden een eindeloze reeks testen uit om dit project tot een goed einde te brengen. Ook nog een extra bedanking aan Hans De Schryver en Robert Jooris voor het nalezen van het rapport.

Samenvatting

Vele amfibiesoorten gaan achteruit in Vlaanderen, waaronder ook de rugstreeppad (*Epidalea* (voormalig *Bufo*) *calamita*). Zoals voor vele andere amfibieën is het niet eenvoudig om met behulp van traditionele methodes de staat van rugstreeppadpopulaties te beoordelen. Genetisch onderzoek kan hier een oplossing bieden. Genetisch onderzoek kan bijvoorbeeld helpen om te bepalen of er sprake is van een lokale populatiestructuur of eerder van verschillende deelpopulaties die met elkaar verbonden zijn door migratie (metapopulatiestructuur). Inzicht in de populatiestructuur is noodzakelijk voor de evaluatie van populaties en het opstellen van instandhoudingsdoelen. Daarom werd in een selectie van 19 potentiële subpopulaties van verschillende grootte (van klein naar groot) stalen van rugstreeppadden genomen voor genetische analyse met 11 microsatellietmerkers. In 18 van deze locaties werden voldoende genetische profielen van rugstreeppadlarven verzameld. Aan de hand van de genetische informatie definieerden we de (sub)populaties en de structuren zowel binnen als over subpopulaties heen. Vervolgens werd onderzocht of er recente migratie tussen subpopulaties aanwezig was. Het niveau van de genetische diversiteit en de effectieve populatiegrootte (N_e) werden eveneens bepaald. N_e laat ons toe om te beoordelen of een populatie voldoende weerbaar is tegen drift en inteelt. We bestudeerden ook de relatie tussen genetische diversiteit en effectieve populatiegrootte enerzijds, en tussen de laatste en de oppervlakte van het leefgebied anderzijds. Aan de hand van de resultaten schatten we de toestand van elke onderzochte populatie in.

Uitgaande van onze resultaten blijken er meerdere populaties in een mindere goede toestand te verkeren. De populaties die de grootste problemen vertonen zijn Klein Schietveld en Landen. De genetische variatie binnen de populatie van Klein Schietveld is opmerkelijk laag, desondanks de grootte van het leefgebied. Een verdere studie van deze populatie aan de hand van een uitgebreidere staalname (eventueel ook van naburige populaties), is sterk aan te bevelen. In Landen lijkt het duidelijk dat deze populatie sterk onder druk staat. Door haar geïsoleerde staat en klein leefgebied zal deze populatie verder achteruitgaan onder invloed van drift. Uitbreiden van het leefgebied in combinatie met herintroductie van individuen uit naburige populaties lijkt hier aangewezen. Populaties die misschien in een minder kritieke toestand verkeren, maar die toch minder genetische variatie, kleinere effectieve populatiegroottes en/of weinig gene flow ondervinden, zijn Noordduinen-Oosthoek, Krekelenberg, Wienerberger, Kikbeekbron, Oude en Nieuwe Groeve. Ook zijn er populaties die het ogenschijnlijk wel goed doen, maar die tekenen van sterke drift vertonen (Ter Yde) of waar er een daling in populatiegrootte dan wel in immigratie is voorgevallen (Militair Domein Leopoldsburg, maar deze populatie bevat nog een hoge diversiteit en effectieve populatiegrootte).

Effectieve populatiegrootte blijkt positief gecorreleerd met genetische variatie en met oppervlakte leefgebied. De ratio van de eerste parameter met schattingen van census populatiegrootte hebben we helaas niet kunnen onderzoeken omwille van het ontbreken van data omtrent deze laatste parameter. Enkel voor Landen hadden we een betrouwbare schatting van zowel de effectieve als de census grootte. Het is belangrijk een goede maat voor effectieve populatiegrootte te verkrijgen en deze regelmatig, bijvoorbeeld om de twee generaties (of acht jaar), opnieuw te bepalen om een (verdere) achteruitgang van (meta)populaties snel te detecteren en tijdig gepaste maatregelen te kunnen nemen om de levensvatbaarheid van populaties te bevorderen. Deze genetische screening combineren met schattingen van census populatiegrootte, zou inzicht verschaffen in de relatie tussen effectieve en census grootte. Dit zou bijgevolg nuttig kunnen zijn voor de monitoring van de populaties, omdat het dan mogelijk zou zijn om de effectieve populatiegrootte in te schatten aan de hand van de census grootte en omgekeerd.

Aanbevelingen voor beheer en verdere genetische opvolging

Er is een duidelijke spatiale, genetische structuur. Bijna elke subpopulatie, vooraf gedefinieerd op basis van clusters van waarnemingen en de landschappelijke context, kan genetisch ook als een (sub)populatie beschouwd worden. Enkel voor Noordduinen en Oosthoek enerzijds en de subpopulaties aan Schelde-Linkeroever anderzijds lijkt deze vaststelling niet op te gaan. Op basis van deze onderverdeling in zogenaamde (sub)populaties kunnen conservatiemaatregelen en richtlijnen voor monitoring gedefinieerd worden.

Deze studie is een momentopname. Zoals verder aangegeven, kunnen schattingen van het aantal effectieve ouders variëren van jaar tot jaar. Om een betere inschatting van deze parameter te kunnen maken, is bijgevolg een herhaling van de staalname nodig. Daarnaast kan een herhaalde staalname, na bijvoorbeeld twee generaties, gebruikt worden voor een temporele methode die een bijkomende schatting van de effectieve populatiegrootte toelaat. Binnen deze studie werd een staalname- en lab-protocol opgezet dat als praktische handleiding kan dienen voor verdere monitoring van rugstreeppadpopulaties. Ook is een schatting van censuspopulatiegrootte wenselijk, zodat de verhouding met effectieve populatiegrootte voor de Vlaamse rugstreeppadpopulaties kan onderzocht worden. Hieronder volgen enkele vaststellingen per subpopulatie op basis van de huidige resultaten (min of meer in de volgorde van slechte naar goede staat van instandhouding), met daaruit voortvloeiende aanbevelingen voor beheer en verder onderzoek.

- Klein Schietveld lijkt een sterk geïsoleerde en kleine populatie die sterk genetisch verarmd is, ondanks een ogenschijnlijk voldoende aanbod aan leefgebied voor een veel grotere populatie. Verdere opvolging is noodzakelijk, inclusief een evaluatie van de kwaliteit van het leefgebied. Indien deze populatie verder achteruitgaat en geen uitwisseling met naburige populaties vertoont, kan geopteerd worden voor *genetic rescue*. Door individuen van een andere populatie toe te voegen, voeg je ook andere genen toe en kan je inteeltdepressie tijdelijk mitigeren. Bij het overwegen van *genetic rescue*, is het aan te raden een duidelijk monitoringsplan op te stellen, zoals ook wordt aanbevolen door de IUCN (IUCN/SSC, 2013).
- Ook de populatie Landen is bijzonder klein en heeft een eerder lage genetische diversiteit. Hier is het leefgebied zeer klein en is de isolatiegraad bijzonder hoog. Uitbreiding van leefgebied en *genetic rescue* lijken hier aangewezen. Indien het vergroten van het huidig leefgebied niet mogelijk is, kunnen individuen overgebracht worden naar een ander leefgebied, eventueel reeds bewoond door een populatie rugstreeppad. Het is echter precair om het evenwicht tussen de genetische variatie van de populatie uit Landen en deze van de al aanwezige populatie te bewaren en dus verder op te volgen.
- Noordduinen-Oosthoek vertoont een vrij lage genetische diversiteit en een laag aantal effectieve ouders. Door de beheerswerken heeft de populatie in censusgrootte een groei gekend. Om ook de effectieve populatiegrootte en genetische variatie te laten toenemen, zou er meer connectiviteit moeten zijn met de andere kustpopulaties. Landschappelijke ingrepen die deze connectiviteit bevorderen, zijn dan ook aangewezen. Dit zou ook de totale metapopulatie aan de Westkust ten goede komen.
- Hoewel Krekelenberg als bronpopulatie fungeerde voor de populatie op het Noordelijk Eiland, lijkt ze in verdrukking. Het leefgebied is klein en er lijkt geen genenuitwisseling met andere populaties te bestaan. In tegenstelling tot het Klein Schietveld, waar er voldoende leefgebied lijkt te zijn, kan *genetic rescue* in Krekelenberg geen blijvende oplossing bieden. Vergroting van leefgebied en/of van connectiviteit zijn vooreerst noodzakelijk. Er werden reeds rugstreeppadden van Krekelenberg (2010) naar het provinciaal recreatiedomein De Schorre verplaatst. Opvolging van de populaties op beide locaties is aanbevolen.
- Zoals Krekelenberg, lijkt de populatie Wienerberger eerder geïsoleerd. Naast de eerder beperkte oppervlakte leefgebied en de lage effectieve populatiegrootte, vertoont de populatie mogelijk sterke invloeden van genetische drift. Het provinciaal recreatiedomein De Schorre is nabij de groeve van Wienerberger. Het is mogelijk dat er uitwisseling plaats vindt tussen beide subpopulaties. Verdere opvolging is wenselijk.
- Oude Groeve bevat een klein aantal effectieve ouders. Genenuitwisseling met de subpopulatie Nieuwe Groeve lijkt aanwezig, en dan vooral vanuit de laatste naar de eerste. Of er nog uitwisseling bestaat met andere naburige populaties niet opgenomen in deze studie, wordt best onderzocht om zicht te krijgen op de effectieve populatiegrootte van de hele metapopulatie.
- De subpopulatie in de Nieuwe Groeve lijkt eveneens beperkt in effectieve grootte. Bovendien vertoont ze tekenen van een genetische bottleneck en sterke drift. Het is onduidelijk of deze populatie al dan niet immigranten ontvangt van de twee andere bestudeerde subpopulaties, Kikbeekbron en Oude Groeve,

maar dit lijkt eerder niet het geval. Zoals ook voor Oude Groeve werd vermeld, zou een studie op ruimere schaal waarbij de overige, naburige populaties worden opgenomen, nuttig zijn.

- Deze laatste aanbeveling geldt natuurlijk ook voor Kikbeekbron, aangezien deze deel uitmaakt van de metapopulatie. Hier is de genetische variatie hoog te noemen in vergelijking met de meeste andere onderzochte subpopulaties. Het aantal effectieve ouders is echter vrij laag en wel voor twee opeenvolgende generaties. Immigratie vanuit andere subpopulaties lijkt er nauwelijks te zijn, ondanks de nabijheid van het ecoduct Kikbeek.
- Momenteel lijken de resultaten voor de subpopulatie De Liereman positief. Het leefgebied lijkt wel sterk versnipperd. Toename in versnippering en de daaropvolgende afname in oppervlakte leefgebied wordt best vermeden.
- De resultaten voor subpopulatie Ter Yde zijn zeker optimistisch. Het aantal effectieve ouders is niet bijzonder hoog, maar er blijkt immigratie vanuit de Westhoek plaats te vinden. Hier dient minimaal de connectiviteit en het huidige leefgebied te worden gewaarborgd.
- De Kalmthoutse Heide bevat een hoge genetische variatie. Om een betere schatting van de effectieve populatiegrootte te kunnen maken, is een nieuwe, grotere staalname nodig (meer ruimtelijk verspreid en op ruimere schaal).
- De geïntroduceerde populatie op het Noordelijk Eiland doet het vrij goed wat genetische diversiteit betreft. Het aantal effectieve ouders is daarentegen relatief laag. Omdat genenuitwisseling met naburige populaties hier eerder onmogelijk lijkt, is opvolging nodig om achteruitgang van de populatie tijdig op te sporen.
- De metapopulatie in het havengebied van Linkeroever (met subpopulaties Haasop, Grimaldi en Blikken) verkeert in een zeer goede toestand. Indien de connectiviteit tussen de verschillende subpopulaties behouden blijft naast de grootte en het dynamisch karakter van het leefgebied, kan deze populatie zich verder handhaven.
- De populatie in het Militair Domein Leopoldsburg vertoont de hoogste waarden voor genetische diversiteit en aantal effectieve ouders. Deze populatie verkeert momenteel dan ook in goede staat.
- Ten slotte lijkt ook de Westhoek tot deze categorie te behoren. Indien ook data vanuit Frankrijk zouden toegevoegd kunnen worden, kan een beter oordeel over de effectieve populatiegrootte en de metapopulatiestructuur gegeven worden.

English abstract

Many amphibian species are declining in Flanders, as is natterjack toad (*Epidalea calamita*). It is usually not easy to monitor the status of amphibians using traditional methods. Genetic research can be a helpful tool here. It can for instance help define a local and a meta-population structure. Knowledge of the population structure is essential to be able to evaluate the status of a population and to compile conservation objectives. We therefore sampled natterjack toads in 19 potential subpopulations, differing in size, for genetic analysis using microsatellite markers. In 18 of these locations we succeeded to collect a sufficient number of tadpole genotypes. Based on the genetic information we defined the (sub)populations and the structure within and among subpopulations. Furthermore, the levels of migration between subpopulations were calculated, as well as the level of genetic diversity and the effective population size. The latter allows us to evaluate a population's resilience against genetic drift and inbreeding. We also studied the relationship between genetic diversity and effective population size. Based on the results we evaluated the genetic status of each studied population.

Our results showed that several populations exhibited a less than favourable condition. Populations Klein Schietveld and Landen were the most problematic. To obtain a reliable conclusion about the former, we need a higher sample size and samples from the neighbouring populations. However, the population showed a very low level of genetic variation, despite the adequate size of its habitat, which justifies further monitoring. In Landen it seems obvious that the natterjack toad population is under extreme pressure. Because of its state of isolation and small habitat, this population will continue to detiorate under the influence of genetic drift. Populations that seemed to be in a less critical state, but that showed relatively low genetic diversity, smaller effective population sizes and/or little gene flow, were Noordduinen-Oosthoek, Krekelenberg, Wienerberger, Kikbeekbron, Oude and Nieuwe Groeve. There were also populations that appear to be doing well, but still showed signs of genetic drift (Ter Yde) or experienced a reduction in population size or in gene flow (Military Base of Leopoldsburg, but this population still holds high genetic variation and effective population size).

Effective population size seemed to be positively correlated with genetic variation and habitat size. Unfortunately, we were unable to study the ratio of the former and the estimates of the census population size. We only had a reliable estimate of the two parameters for the population in Landen. to obtain a good approximation of the effective population size on a regular basis, for instance every two generations (or eight years), to be able to counteract a further decline of (meta-)populations of natterjack toad. Combining the genetic screening with estimations of census population size could deliver insight on the relation between census and effective population size. This could be useful for monitoring purposes as the effective size might potentially be derived from the census size and vice versa.

Inhoudstafel

Dankwoord 4

Samenvatting 5

Aanbevelingen voor beheer en verdere genetische opvolging 6

English abstract 8

Lijst van figuren 10

Lijst van foto's 10

Lijst van tabellen 10

1 Introductie 12

2 Materiaal en methode 14

2.1 Staalname 14
2.1.1 Introductie Noordelijk Eiland 15
2.2 Genotypering 18
2.3 Dataverwerking 18
2.3.1 Analyse loci 18
2.3.2 Afbakening metapopulaties 18
2.3.2.1 Genetische structuur 18
2.3.2.2 Migratie 19
2.3.3 Genetische diversiteit 19
2.3.4 Effectieve populatiegrootte 20

3 Resultaten 21

3.1 Staalname en genotypering 21
3.2 Afbakening metapopulaties 21
3.2.1 Genetische structuur 21
3.2.2 Migratie 25
3.2.2.1 Linkeroever 25
3.2.2.2 Rupelregio 26
3.2.2.3 Mechelse Heide 27
3.3 Genetische diversiteit en effectieve populatiegrootte 27

4 Discussie 33

5 Besluit 37

Referenties 38

Bijlage 1: Populatiedifferentiatietabellen 42

Lijst van figuren

Figuur 1 Kaart van Vlaanderen, met weergave van de provincies, met de ligging van de vindplaatsen van de larven (rode sterren) en adulten (zwarte kruisen; niet op de inzetkaarten) van rugstreeppad. De vindplaatsen werden gegroepeerd in verschillende zones/subpopulaties (voor de codes: zie Tabel1). De grotere gebieden KU (blauwe inzet), LO (groene inzet) en MH (paarse inzet) bestaan uit meerdere zones. De groene kruisen zijn zones waar vermoedelijk rugstreeppadden voorkomen, maar die niet bezocht werden. 17

Figuur 2 PCA-plot van de eerste twee assen die samen 9% van de totale variatie verklaren. Elke subpopulatie wordt aangeduid in een verschillende kleur en met een verschillend symbool. Zie Tabel 1 voor de codes van de subpopulaties. 21

Figuur 3 PCA-plot van de eerste en de derde as die samen 8% van de totale variatie verklaren. Elke subpopulatie wordt aangeduid in een verschillende kleur en met een verschillend symbool. Zie Tabel 1 voor de codes van de subpopulaties. 22

Figuur 4 Grafische weergave van de globale structuur bepaald door sPCA met gebruik van “Neighbourhood by distance” netwerk. De x- en y-as geven de Lambert coördinaten. De kleur die elk individu krijgt correspondeert met de combinatie van de eerste drie *lagged* scores volgens het rood-groen-blauw systeem (RGB). Zie Tabel 1 voor de codes van de subpopulaties. 23

Figuur 5 Grafische weergave van de lokale structuur bepaald door de derde tot en met de vijfde principale component van de sPCA met gebruik van “Neighbourhood by distance” netwerk. De x- en y-as geven de Lambert coördinaten. De kleur die elk individu krijgt correspondeert met de combinatie van de drie *lagged* scores volgens het rood-groen-blauw systeem (RGB). Zie Tabel 1 voor de codes van de subpopulaties. 24

Figuur 6 Clusteranalyseresultaten uit spatiale BAPS analyse. Elke verticale lijn is een individu en elke kleur (13 in totaal) is een groep waartoe individuen worden gewezen. Zie Tabel 1 voor de codes van de subpopulaties. 25

Figuur 7 Relatie tussen effectieve populatiegrootte (hier eerder N_b, het aantal effectieve ouders, logaritmisch getransformeerd) en allelische rijkdom. De onderste X-as geldt voor de N_b schattingen bepaald met de linkage disequilibriummethode, de bovenste voor deze met Colony bepaald. 31

Figuur 8 Relatie tussen oppervlakte leefgebied (ha) en effectieve populatiegrootte (hier eerder N_b, het aantal effectieve ouders, logaritmisch getransformeerd). De linkse Y-as geldt voor de N_b schattingen bepaald met de linkage disequilibriummethode, de rechtse voor deze met Colony bepaald. 32

Lijst van foto’s

Foto 1 Rugstreeppadden en hun holen in Krekelenberg (foto: Frank Buysse) 12

Foto 2 Larven rugstreeppad klaar voor staalname in Noordduinen (foto: Floris Verhaeghe) 14

Foto 3 Rugswab van rugstreeppad in de Fluithoekduinen (Noordduinen) (foto: Hans de Blauwe). 15

Foto 4 Ingegraven rugstreeppad in de zeereep (foto: Koen Verschoore). 34

Lijst van tabellen

Tabel 1 Lijst met de vindplaatsen van de larven en adulten. Het aantal larven per zone met een genotype voor minimum zes microsatellieten wordt weergegeven, alsook het overblijvende aantal wanneer één lid van elke full-sib (FS) familie wordt behouden. [A] Deze stalen werden in 2008 verzameld; [B] 49 van de

91 stalen werden in 2010 verzameld, waarvan er 34 overbleven bij behoud van één lid per FS familie. 16

Tabel 2 Proportie migrantenallelen voor Linkeroever geschat met behulp van het programma BIMr. De gemiddelde waarden staan boven, de moduswaarden onder. 26

Tabel 3 Proportie migrantenallelen voor de Rupelregio geschat met behulp van het programma BIMr. De gemiddelde waarden staan boven, de moduswaarden onder. 26

Tabel 4 Proportie migrantenallelen voor de Rupelregio (exclusief Noordelijk Eiland) geschat met behulp van het programma BIMr. De gemiddelde waarden staan boven, de moduswaarden onder. 27

Tabel 5 Proportie migrantenallelen voor de Mechelse Heide geschat met behulp van het programma BIMr. De gemiddelde waarden staan boven, de moduswaarden onder. 27

Tabel 6 Geobserveerde (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e), aantal private allelen (A_p), 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. 28

Tabel 7 Gemiddelde waarden voor N_b berekend volgens de verwantschapsmethode met Colony en de linkage disequilibriummethode (LD). De waarden berekend voor de dataset zonder full-sibs behalve één per familie (excl. FS) als voor de volledige dataset (incl. FS) worden gegeven voor de LD-methode en dan zowel voor de 0,01 als de 0,05 grenswaarde voor minimum allelfrequentie (MAF). De jackknife schatting van het 95% betrouwbaarheidsinterval wordt tussen haakjes gegeven. 30

Tabel 8 Schatting van N_e voor Kikbeekbron berekend met temporele methodes. De waarden werden berekend voor de dataset zonder full-sibs behalve één per familie (excl. FS) als voor de volledige dataset (incl. FS)....30

Tabel 9 Correlatiecoëfficiënten tussen genetische diversiteitsparameters (H_e en A_r), oppervlakte leefgebied en de verschillende schattingen van N_b, berekend met verwantschapsmethode met Colony en de linkage disequilibriummethode (LD) die werd toegepast op de dataset zonder full-sibs behalve één per familie (excl. FS) en op de volledige dataset (incl. FS) en dan zowel met 0,01 als met 0,05 als grenswaarde voor minimum allelfrequentie (MAF). $: p < 0,1; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001. 31

Tabel 10 Differentiatie tussen subpopulaties berekend als F_{ST} (Wright, 1943), weergegeven onder de diagonaal. De 95% betrouwbaarheidsintervallen staan boven de diagonaal. 42

Tabel 11 Differentiatie tussen subpopulaties berekend als G_{STest} (Nei, 1973; Nei & Chesser, 1983), weergegeven onder de diagonaal. De 95% betrouwbaarheidsintervallen staan boven de diagonaal. 43

Tabel 12 Differentiatie tussen subpopulaties berekend als D_{est} (Jost, 2008), weergegeven onder de diagonaal. De 95% betrouwbaarheidsintervallen staan boven de diagonaal. 44

1 Introductie

Vele amfibiesoorten gaan achteruit in Vlaanderen, waaronder ook de rugstreeppad (*Epidalea* (voormalig *Bufo*) *calamita*). De soort kent internationale bescherming, door de Conventie van Bern en de Habitatrichtlijn, alsook lokale bescherming door het Soortenbesluit en de formulering van natuurdoelen voor de relevante speciale beschermingszones, naast allerlei gemeentelijke en provinciale initiatieven die het behoud van de soort beogen. De vermelding van de soort op Rode lijst geeft verder het signaal dat de soort zeldzaam en kwetsbaar is (Jooris et al., 2012). Zoals voor vele andere amfibieën is het niet eenvoudig om met behulp van traditionele methodes de staat van rugstreeppadpopulaties te beoordelen. Amfibieën zijn vaak moeilijk te observeren, vanwege hun nachtelijke leefwijze en vanwege de grote proportie van hun leven dat ze ondergronds, onder water of in cryptische habitats doorbrengen (McCartney-Melstad & Shaffer, 2015). Genetisch onderzoek kan hier een oplossing bieden. Genetisch onderzoek kan bijvoorbeeld helpen om te bepalen of er sprake is van een lokale populatiestructuur of eerder van verschillende deelpopulaties die met elkaar verbonden zijn door migratie. Inzicht in de populatiestructuur is noodzakelijk voor de evaluatie van populaties en het opstellen van instandhoudingsdoelen.

De rugstreeppad komt in Vlaanderen voor in de duinen aan de Westkust van de Westhoek tot Nieuwpoort, op Linkeroever in het havengebied aan de Schelde, in de kleigroeven van de Rupelregio (Foto1), verschillende heidegebieden in de provincies Antwerpen en Limburg, enkele groeven in de Hoge Kempen en op enkele geïsoleerde plaatsen in Vlaams-Brabant. De kustpopulatie kwam vroeger over nagenoeg de hele kustlijn voor (Bauwens & Claus, 1996; De Fonseca, 1980). Het huidig verspreidingsgebied van de kustpopulatie is de laatste jaren beperkt tot enkele duingebieden ten noordwesten van de IJzer (Jooris et al., 2013). De populatie in Temse en Tielrode (voormalige steenbakkerij) is meer dan waarschijnlijk uitgestorven daar er de laatste jaren tijdens herhaalde inventarisaties geen rugstreeppadden werden gevonden. Andere Oost-Vlaamse populaties zoals in Stekene , Sint-Gillis-Waas en de 'Molsbergen' in Lokeren verdwenen eerder. De staalname gebeurde in een selectie van potentiële subpopulaties van verschillende grootte (van klein naar groot). Aan de hand van deze steekproef wilden we eerst de subpopulaties definiëren en hoe hun relatie is ten opzichte van elkaar. Genetische informatie laat toe om (sub)populaties te definiëren en structuren zowel binnen als over subpopulaties heen te ontdekken. Vervolgens wilden we weten hoe het zit met de verbondenheid tussen de subpopulaties. Is er met andere woorden migratie tussen de subpopulaties? Verbondenheid tussen subpopulaties creëert metapopulaties. Deze kennis geeft ook inzichten in de dispersiemogelijkheden en –afstanden van de soort.



Foto 1 Rugstreeppadden en hun holen in Krekelenberg (foto: Frank Buysse)

Uiteindelijk was het doel om dieper te graven in de genetische achtergrond van elke sub- en metapopulatie. Het niveau van de genetische diversiteit en de effectieve populatiegrootte (N_e) werden bepaald. N_e is de grootte van een theoretisch ideale populatie, die in gelijke mate onderhevig is aan genetisch drift (d.i. het toevallig verlies van genetische diversiteit) als de populatie in kwestie. De sterkte van genetische drift is omgekeerd evenredig met N_e. Bijgevolg laat deze maat ons toe om te beoordelen of een populatie voldoende weerbaar is tegen drift en inteelt. Kleine populaties zijn sterker onderhevig aan toevalseffecten dan grote populaties, waardoor de leefbaarheid van kleine populaties op lange termijn veel onzekerder is. Dit is zeker het geval bij geïsoleerde populaties die niet

kunnen genieten van voldoende genenuitwisseling (door immigratie) om het effect van genetische drift tegen te gaan. Te veel genetische drift leidt op termijn tot een hogere graad van inteelt, wat bij vele soorten via een inteeltdepressie een hypotheek legt op de duurzaamheid en lange-termijn leefbaarheid van de populaties (Caughley, 1994). N_e is gewoonlijk veel kleiner dan census populatiegrootte (Frankham, 1995). We bestudeerden ook de relatie tussen genetische diversiteit en effectieve populatiegrootte. Aan de hand van de resultaten schatten we de toestand van elke onderzochte populatie in.

2 Materiaal en methode

2.1 Staalname

Tijdens het voortplantingsseizoen, gewoonlijk van laat april tot augustus, werden gedurende de maanden april tot en met augustus in 2014 zowel larven als adulten bemonsterd op verscheidene locaties in Vlaanderen. 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. Zowel grotere als kleinere populaties werden vooraf geselecteerd. Deze selectie werd omgezet in verschillende zones, mogelijke subpopulaties als het ware. De zones werden 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 HYLA-databank. Ze werden beschikbaar gesteld door Natuurpunt Studie[1]. Een opsomming van de zones wordt gegeven in Tabel 1 en weergegeven in Figuur 1. De subpopulaties aan de Westkust vormen een onderdeel van deze studie, maar werden reeds uitvoerig besproken in het rapport van (Cox & Mergeay, 2015) in functie van de herintroductie in het Zwingebied.

Per zone werd getracht om van minstens 50 larven, verdeeld over verschillende poelen, de staartpunt te knippen, waarna deze werd overgebracht op 100% ethanol (Foto 1). Na elke staalname werden schaar en pincet ontsmet met 3% waterstofperoxideoplossing, schoongespoeld met water en afgedroogd. Bepaalde voortplantingspoelen vielen droog waar niet-overlevende larven of embryo's konden worden verzameld. Deze werden volledig op ethanol gebracht. Daarnaast werden minimum 30 adulten op non-invasieve manier per zone bemonsterd. Zowel een swabstaal in de cloaca als op de rug werd van elk individu genomen, waarbij de handschoenen tussen individuen werden verwisseld (Foto 2). 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 in te kunnen schatten aan de hand van de genetische profielen bekomen uit beide swabstalen van een enkel individu. 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.

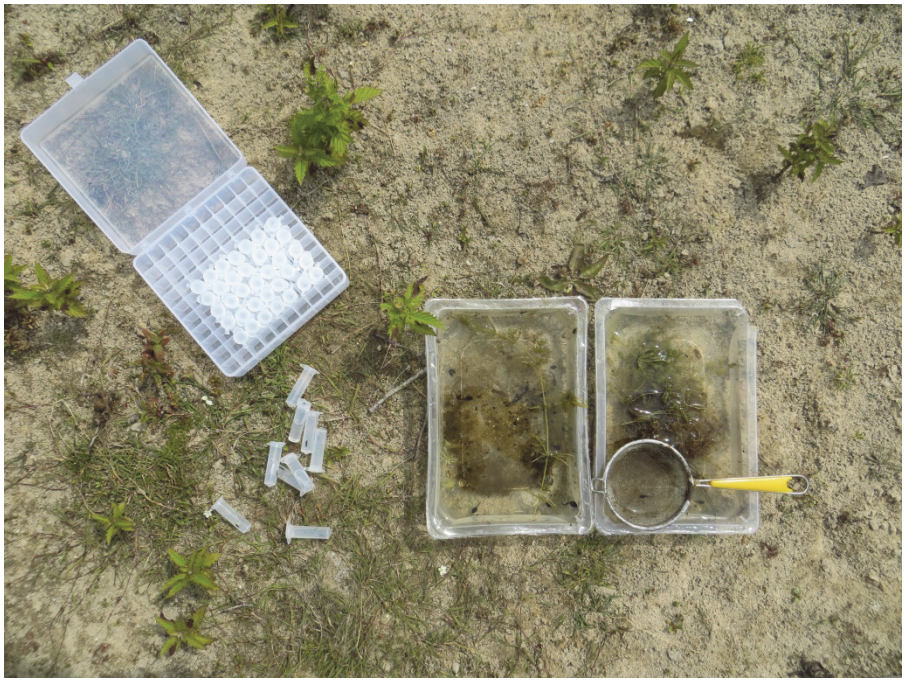


Foto 2 Larven rugstreeppad klaar voor staalname in Noordduinen (foto: Floris Verhaeghe)

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

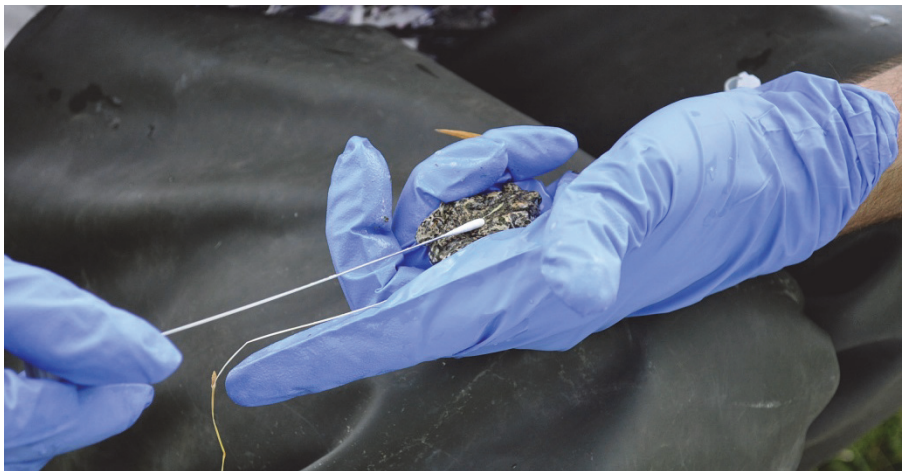


Foto 3 Rugswab van rugstreeppad in de Fluithoekduinen (Noordduinen) (foto: Hans de Blauwe).

Van 14 mei tot en met 13 juli werd in het natuurgebied De Liereman (Oud-Turnhout) het aantal eisnoeren geteld. Dit gebeurde ook in Landen in de periode van 5 mei tot 18 augustus. De tellingen gebeurden ongeveer om één à twee weken. De meeste vrouwtjes (gewoonlijk > 70%) leggen gewoonlijk elk jaar één eisnoer elk (> 90%). De verhouding tussen mannetjes en vrouwtjes is ook dikwijls 1/1 (Denton & Beebee, 1993). Daarom hebben we net zoals Beebee (2009) het aantal eisnoeren maal twee gedaan als schatter voor de census populatiegrootte op deze twee locaties. Daarnaast werden minimaal vijf eitjes van eenzelfde eisnoer verzameld in verschillende poelen aan de kust (1 poel in Westhoek, 1 in Oosthoek, 1 in Ter Yde en 2 in Noordduinen) en in één poel in Landen volgens de verhouding van 1 eisnoer per poel. Deze eitjes werden bewaard in een beker met poelwater en opgekweekt tot het larvaal stadium waarna de larven in ethanol bewaard werden. Deze stalen dienen als controle bij het detecteren van full-sibs (dit zijn individuen met dezelfde vader en moeder) en vormen tegelijkertijd een test voor de resolutie van de genetische merkers.

Wanneer mogelijk werd bij staalname de coördinaten van de vindplaats 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.

Naast de stalen verzameld in 2014, werden ook nog stalen geanalyseerd die verzameld werden in 2008 en 2010 door Joke Maes in het kader van haar doctoraat (Tabel 1). Het betrof weefselmateriaal van larven (volledige larve, staart of hoofd) op ethanol bewaard en doorgaans opgekweekt uit eitjes. De eisnoeren werden zoals hierboven beschreven, bemonsterd. Tijdens het opkweken werden de eisnoeren gescheiden gehouden. Een selectie van twee individuen per eisnoer werd gemaakt.

2.1.1 Introductie Noordelijk Eiland

De subpopulatie van rugstreeppad op het Noordelijk Eiland te Wintam (Bornem) is enigszins uitzonderlijk. Ze is ontstaan door herhaaldelijke introducties vanuit twee afzonderlijke populaties. Hieronder volgen de respectievelijke data en brongebieden van introductie. De gegevens zijn afkomstig uit de HYLA-databank.

- Oorsprong 1: terrein Katoen Natie in Antwerpen (Linkeroever)
    - 15/05/2005: 19 adulten
    - 15/07/2005: 70 juvenielen en 1 adult
- Oorsprong 2: Krekelenberg in Boom
    - 15/05/2005: 19 adulten
    - 25/08/2005: 7 adulten
    - 10/09/2008: 4 juvenielen en 4 adulten
    - 28/09/2008: 2 juvenielen
    - 17/06/2009: 3 juvenielen en 7 adulten
    - 28/06/2009: 1 adult wijfe
    - 14/07/2009: 4 juvenielen
    - 28/07/2009: 1 juveniel en 1 adult

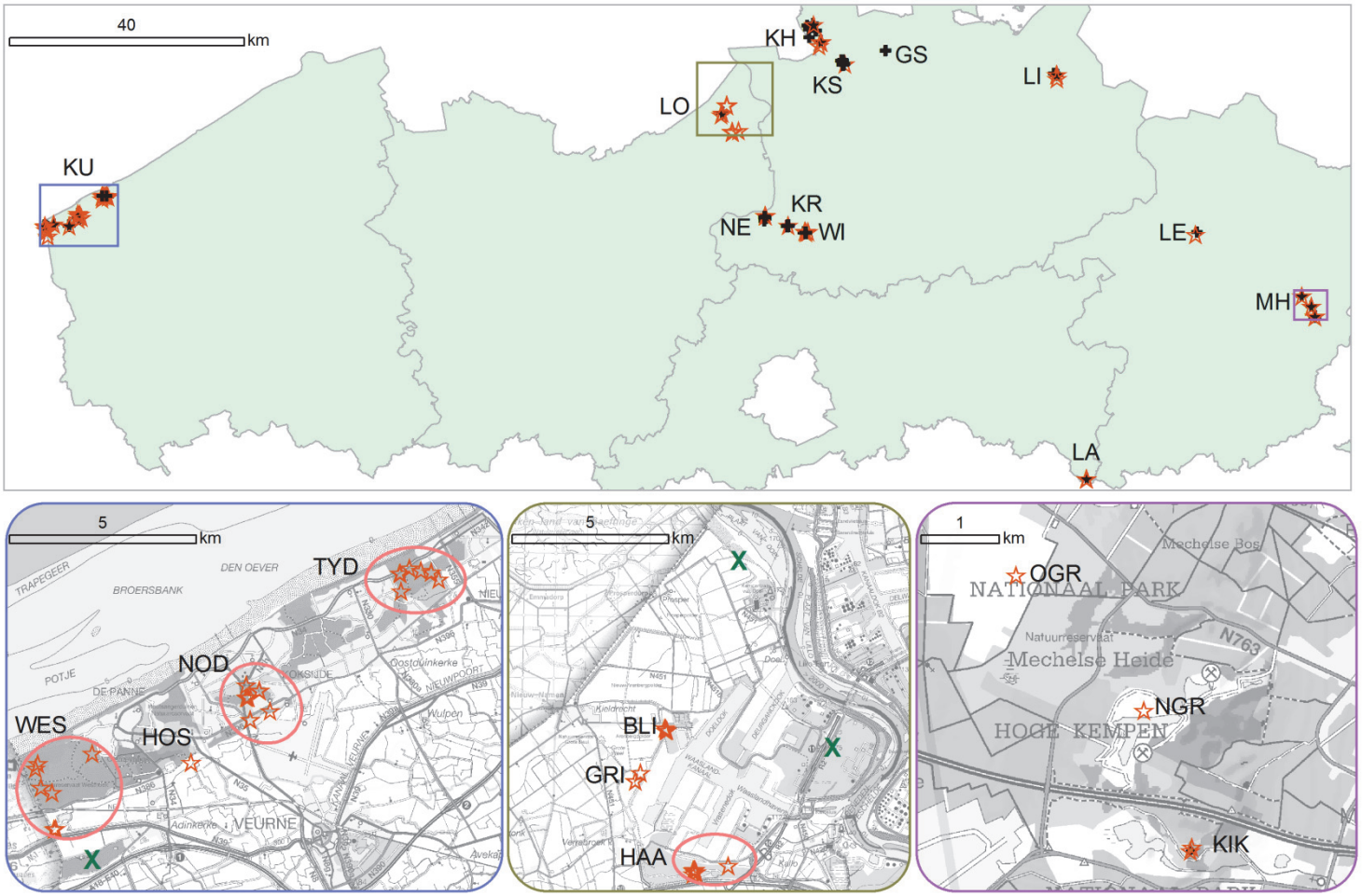
- 29/08/2009: 9 juvenielen en 1 adult
- 29/09/2009: 4 juvenielen
- 30/05/2010: 16 juvenielen en 2 adulten
- 04/06/2010: 1 juveniel
- 10/09/2010: 2 juvenielen en 2 adulten

In totaal werden dus 20 adulten en 70 juvenielen vanuit Linkeroever, en 44 adulten en 46 juvenielen vanuit Krekelenberg uitgezet op het Noordelijk Eiland.

Tabel 1 Lijst met de vindplaatsen van de larven en adulten. Het aantal larven per zone met een genotype voor minimum zes microsatellieten wordt weergegeven, alsook het overblijvende aantal wanneer één lid van elke full-sib (FS) familie wordt behouden. [A] Deze stalen werden in 2008 verzameld; [B] 49 van de 91 stalen werden in 2010 verzameld, waarvan er 34 overbleven bij behoud van één lid per FS familie.

Zonecode	Naam	Gebied (code)	Aantal larven	Aantal excl. FS
TYD	Ter Yde	Westkust (KU)	79	63
NOD	Noordduinen	Westkust (KU)	106	40
HOS	Oosthoek	Westkust (KU)	10	7
WES	Westhoek	Westkust (KU)	61	42
BLI	Blikken	Linkeroever(LO)	18 [A]	10
GRI	Grimaldi	Linkeroever(LO)	12 [A]	7
HAA	Haasop	Linkeroever(LO)	30 [A]	16
KH	Kalmthoutse Heide		21	13
KS	Klein Schietveld		10	10
GS	Groot Schietveld		0	
NE	Noordelijk Eiland		50	36
KR	Krekelenberg		44	19
WI	Wienerberger		50	29
LI	De Liereman		32 [A]	19
LE	Militair domein Leopoldsburg		52	45
OGR	Oude Groeve (LBU groeve[2])	Mechelse Heide (MH)	22	13
NGR	Nieuwe Groeve (Salamander Groeve)	Mechelse Heide (MH)	32	27
KIK	Kikbeekbron	Mechelse Heide (MH)	91 [B]	53 [B]
LA	Landen		70	10
totaal			**790**	**459**

[2] *Groeve van de Limburgse Berggrind Uitbating N.V.*



Figuur 1 Kaart van Vlaanderen, met weergave van de provincies, met de ligging van de vindplaatsen van de larven (rode sterren) en adulten (zwarte kruisen; niet op de inzetkaarten) van rugstreeppad. De vindplaatsen werden gegroepeerd in verschillende zones/subpopulaties (voor de codes: zie Tabel1). De grotere gebieden KU (blauwe inzet), LO (groene inzet) en MH (paarse inzet) bestaan uit meerdere zones. De groene kruisen zijn zones waar vermoedelijk rugstreeppadden voorkomen, maar die niet bezocht werden.

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 uitgeprobeerd, waren de genetische profielen onbetrouwbaar. Deze werden bijgevolg achterwege gelaten en zullen ook niet verder besproken worden.

Het DNA uit de weefselstalen verzameld in 2014 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 een test met zestien gepubliceerde microsatellieten bleven er elf 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). De PCR-condities zijn dezelfde als deze beschreven door Cox & Mergeay (2015).

De conditie van de stalen verzameld door Joke Maes bleek niet optimaal meer te zijn. De DNA-opbrengst was beduidend lager. De stalen werden eerst geanalyseerd onder dezelfde PCR-condities als de overige stalen. Het hoge aantal stalen met uitval over meerdere loci werd drie maal herhaald met een aanpassing in de PCR-condities: in plaats van 35 cycli werden er nu 55 gebruikt. Voor deze individuen werd, indien mogelijk, een consensus genotype bepaald.

2.3 Dataverwerking

Zoals vermeld werd in de studie van Goldberg & Waits (2010), bestaat de kans dat er vooral families werden bemonsterd bij het nemen van stalen per poel. Dit geeft een andere verdeling van allelfrequenties dan bij een meer heterogene en toevallige bemonstering van een populatie. Deze mogelijks atypische allelfrequenties kunnen de populatiegenetische analyses beïnvloeden, waardoor een vertekend beeld ontstaat van de genetische samenstelling van de populaties. Zoals ook vermeld in de studie van Cox & Mergeay (2015), werd eerst een verwantschapsanalyse uitgevoerd met het programma Colony 2.0.5.8 (Jones & Wang, 2010) om full-sib families te identificeren met behulp van de maximum likelihood methode (Wang, 2004). De programmainstellingen waren: full likelihood, een polygaam paringssysteem voor de mannetjes en een monogaam systeem voor de vrouwtjes (zoals hier tijdens één voortplantingsseizoen), een medium runlengte, zes runs, geen aanpassing van de allelfrequenties. De analyse werd per locatie uitgevoerd. Voor de locaties met larven opgekweekt uit eitjes van eenzelfde eisnoer werd eerst nagegaan of de analyse, zonder deze voorkennis, de gekende full-sibs kon detecteren. Daarna werd de analyse herhaald waarbij deze stalen als gekende maternale sibs werden ingegeven. Dat larven afkomstig uit verschillende poelen, niet dezelfde moeder kunnen hebben binnen de bemonsteringsperiode, werd als randvoorwaarde in de analyse meegenomen. De foutenmarge per merker werd aan de hand van dubbele genotypen bepaald, maar met een minimum van 0,01. De fout per merker voor locaties met stalen verzameld in 2008 en 2010 werd opgetrokken naar 0,05, omdat deze hier niet op dezelfde manier bepaald kon worden (zie verder). Individuen werden vanaf een probabiliteit vanaf 0,95 beschouwd als full-sibs.

2.3.1 Analyse loci

Eerst werd getest of loci in Hardy-Weinbergevenwicht verkeerden met het package adegenet 1.4-2 (Jombart, 2008) in R (R Development Core Team, 2010). We voerden een correctie uit voor meervoudig testen met behulp van *False Discovery Rate* (FDR) (Benjamini & Hochberg, 1995) in R. Daarnaast bepaalden we de aanwezigheid van nulallelen met het programma Genepop 4.3 met de maximum-likelihood-methode (Rousset, 2008), 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). Het testen van linkage disequilibrium tussen loci gebeurde met Genepop.

2.3.2 Afbakening metapopulaties

2.3.2.1 Genetische structuur

Verschillende methodes om de relatie tussen genetische structuur van de subpopulaties te linken aan hun spatiale context werden gebruikt. Eerst 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) met adegenet. In tegenstelling tot vele andere methodes is sPCA onafhankelijk

van assumpties zoals deze van Hardy-Weinbergevenwicht en van het ontbreken van linkage disequilibrium tussen merkers. Gebruik makende van allelfrequenties brengt het de 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 volgende maximale afstanden werden uitgetest op basis van bestaande literatuur: 2,6 km, 4,4 km en 10 km (Miaud et al., 2000; Sinsch, 1992; Sinsch et al., 2012; Smith et al., 2005). We vergeleken deze resultaten met die bekomen met BAPS 6 (Corander et al., 2008a) waarbij de ligging van de vindplaatsen van de larven in rekening werd gebracht. We selecteerden 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). De K-waarde (d.i. het optimaal aantal clusters) klom van 1 tot en met 25, een waarde hoger dan het aantal subpopulaties. Elke K-waarde binnen deze range werd tien keer herhaald. De admixture analyse verliep met 100 iteraties voor de schatting van de admixturecoëfficiënten, 200 referentie-individuen 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 diveRsity (Keenan et al., 2013) gebruikt. Een schatting voor R_{ST} werd achterwege gelaten zoals aangegeven door Cox & Mergeay (2015).

2.3.2.2 Migratie

De mogelijkheid van recente gene flow (d.i. genenuitwisseling) werd enkel onderzocht voor die subpopulaties die binnen een straal van 10 km van elkaar gelegen zijn: ten eerste de kustpopulaties, ten tweede de subpopulaties van Linkeroever en ten derde deze in de Mechelse Heide. Twee programma's werden gebruikt. Het eerste, GeneClass2 (Piry et al., 2004), 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 mogelijks nog niet-bemonsterde subpopulaties bestaan. 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 ($\alpha = 0,05$).

De tweede methode, een Bayesiaanse methode, werd uitgevoerd met 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 pilootruns 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*).

2.3.3 Genetische diversiteit

Verschillende schatters voor genetische diversiteit werden in R met package hierfstat voor elke subpopulatie berekend. De subpopulaties werden bepaald aan de hand van de resultaten van de structuur- en migratieanalyse. Het betreft de volgende parameters: 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 is in feite een afgeleide van H_e. 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 aantal bemonsterde individuen. 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 schatter voor de graad van inteelt in de vorige generatie.

2.3.4 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. Enkel van de locatie Kikbeekbron beschikken we over stalen uit twee jaren, 2010 en 2014, wat neerkomt op stalen die één generatie verwijderd zijn. Hier is het mogelijk om temporele schatters te gebruiken die de verandering in allelfrequenties doorheen de tijd gebruiken om de effectieve populatiegrootte te berekenen. Van de overige subpopulaties hebben we enkel larven uit één jaar en 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). Onder de gebruikte temporele methodes zijn deze van Pollak (1983), van Waples (1989), Nei & Tajima (1981) en van Jorde & Ryman (2007). Deze methodes zijn geïntegreerd in de software NeEstimator 2.01 (Do et al., 2014). Verder gebruikten we nog het programma MLNe 1.0 (Wang & Whitlock, 2003) alsook package NB (Hui & Burt, 2015) die werken met de maximum-likelihood-methode. Bij beide methodes werd als maximale waarde voor N_e 1.000 gekozen. MLNe houdt rekening met migratie, maar hiervoor heb je ook temporele data van de omringende populaties nodig. Bij gebrek aan dergelijke gegevens werd Kikbeekbron als een geïsoleerde populatie beschouwd.

NeEstimator berekent ook "single-sample estimators" met de linkage disequilibrium methode (LDNe) met een biascorrectie (Waples & Do, 2008), de heterozygositeitsexcessmethode (Zhdanova & Pudovkin, 2008) en de moleculaire co-verwantschapsmethode (Nomura, 2008). Enkel de eerste werd hier gebruikt, vanwege de vaak onbetrouwbare schattingen met de twee laatste schatters (Cox & Mergeay, 2015; Gilbert & Whitlock, 2015). De berekeningen van N_b werden met verschillende kritische waarden voor minimum allelfrequentie uitgevoerd. Allelen met frequenties onder deze waarden worden uitgesloten in de berekeningen. Zowel de dataset met maar één lid per full-sib familie als de volledige dataset diende als input. De linkage disequilibriummethode werd onder de setting "random paring" gelopen. Daarenboven werd N_b ook geschat met de verwantschapsanalysemethode Colony zoals eerder beschreven.

Beebee (2009) vond voor de Britse rugstreeppadpopulaties een duidelijk verband tussen N_b en de genetische diversiteit. We gingen dus na of onze schattingen van N_b positief correleren met de parameters H_e en A_r met behulp van een Pearson test. De N_b schatters worden daarbij log10-getransformeerd. Tegelijkertijd bekeken we of er een relatie is tussen N_b en de oppervlakte van het leefgebied. De oppervlakte werd benaderd door een selectie van karteringseenheden van de Biologische Waarderingskaart versie 2.2 (De Saeger et al., 2010) te maken die overeenkomen met rugstreeppadhabitat binnen een buffer van 5 km rond elke observatie in de bestudeerde subpopulaties met behulp van ArcGIS 10.0 (ESRI). Aan de had van luchtfoto's werd deze selectie nog verder verfijnd.

Of subpopulaties recent verkleind zijn of een sterke afname in gene flow hebben ondergaan, werd getest met behulp van het programma Bottleneck 1.2.02 (Piry et al., 1999). Beebee & Rowe (2001) gaven reeds aan dat dit programma zeker bruikbaar is voor de detectie van bottlenecks bij amfibieën. Wij kozen het infinite-allele-model (IAM), omdat het niet onderhevig is aan assumpties aangaande verwantschap tussen allelen (Swaegers et al., 2014).

3 Resultaten

3.1 Staalname en genotypering

In totaal werden 461 adulten en 816 larven, inclusief de larven opgekweekt uit eitjes en 186 stalen uit 2008 en 2010, bemonsterd. Zoals eerder vermeld werd, konden uit de swabstalen geen betrouwbare genetische profielen bekomen worden en werden verdere analyses enkel met de larvenstalen uitgevoerd. Loci Bcalμ11 en Bcalμ2 bleken weinig polymorf binnen de bemonsterde subpopulaties. Locus Bcalμ8 vertoonde veel uitval en werd uitgesloten van verdere analyses. Enkel stalen met een genotype voor minimaal zes van de elf overblijvende loci werden behouden (Tabel 1). Slechts twee stalen vielen daardoor weg uit de set van 2014, maar uit de set van 2008/2010 vielen er 24 stalen weg. Aan de hand van de dubbele stalen konden we een fout van gemiddeld 0,01 berekenen per locus voor de stalen van 2014. Na het verwijderen van de full-sibs behalve één, op basis van de resultaten uit Colony, behielden we 459 individuen (Tabel 1).

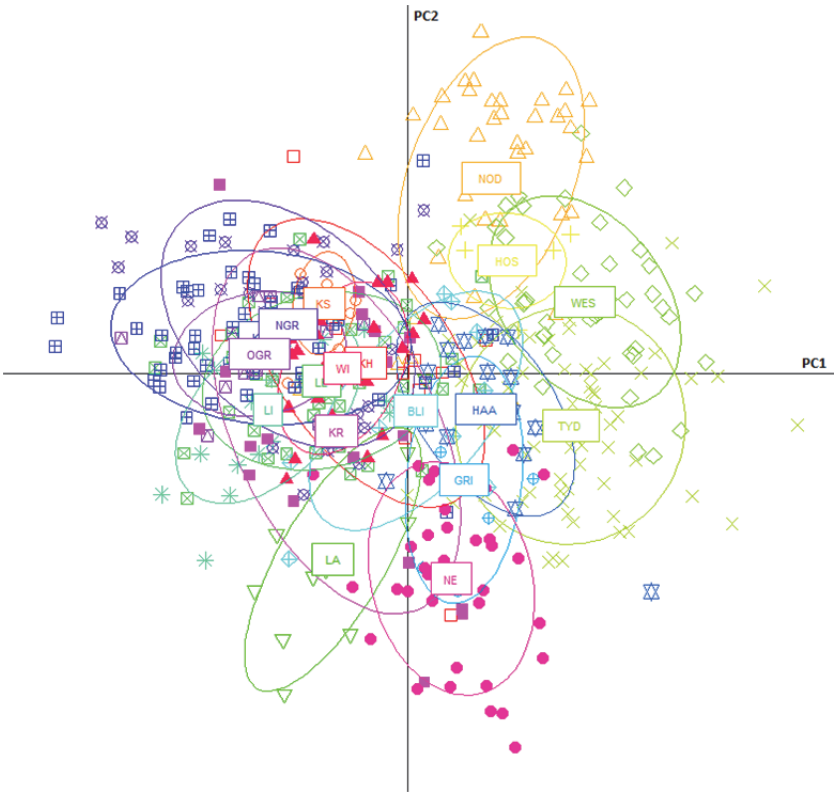
Zoals vermeld in de studie over de populaties aan de Westkust (Cox & Mergeay, 2015) zijn er geen merkers die in Hardy-Weinbergonevenwicht zijn na correctie voor meervoudige testen en die problematisch veel nullallelen bevatten. Verder komt linkage disequilibrium voor tussen Bcalμ1 en Bcalμ6, maar enkel in de subpopulaties Noordduinen en Wienerberger.

In Landen werden in totaal 12 eisnoeren geteld en in De Liereman 30. Dit resulteert in een geschatte census populatiegrootte van respectievelijk 24 en 60.

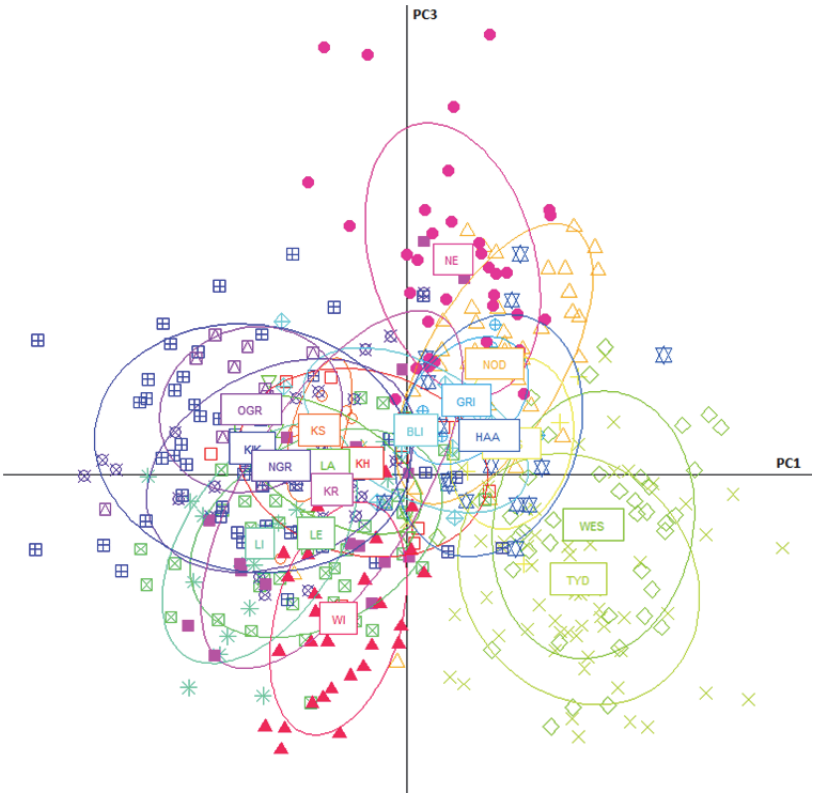
3.2 Afbakening metapopulaties

3.2.1 Genetische structuur

Wanneer we alle subpopulaties in een PCA plot met de eerste twee assen opnemen, zijn vooral de kustpopulaties, de subpopulatie in Landen en deze van het Noordelijk Eiland te onderscheiden (Figuur 2). In het PCA-plot van de eerste en derde as, differentieert Wienerberger zich ook iets meer (Figuur 3).

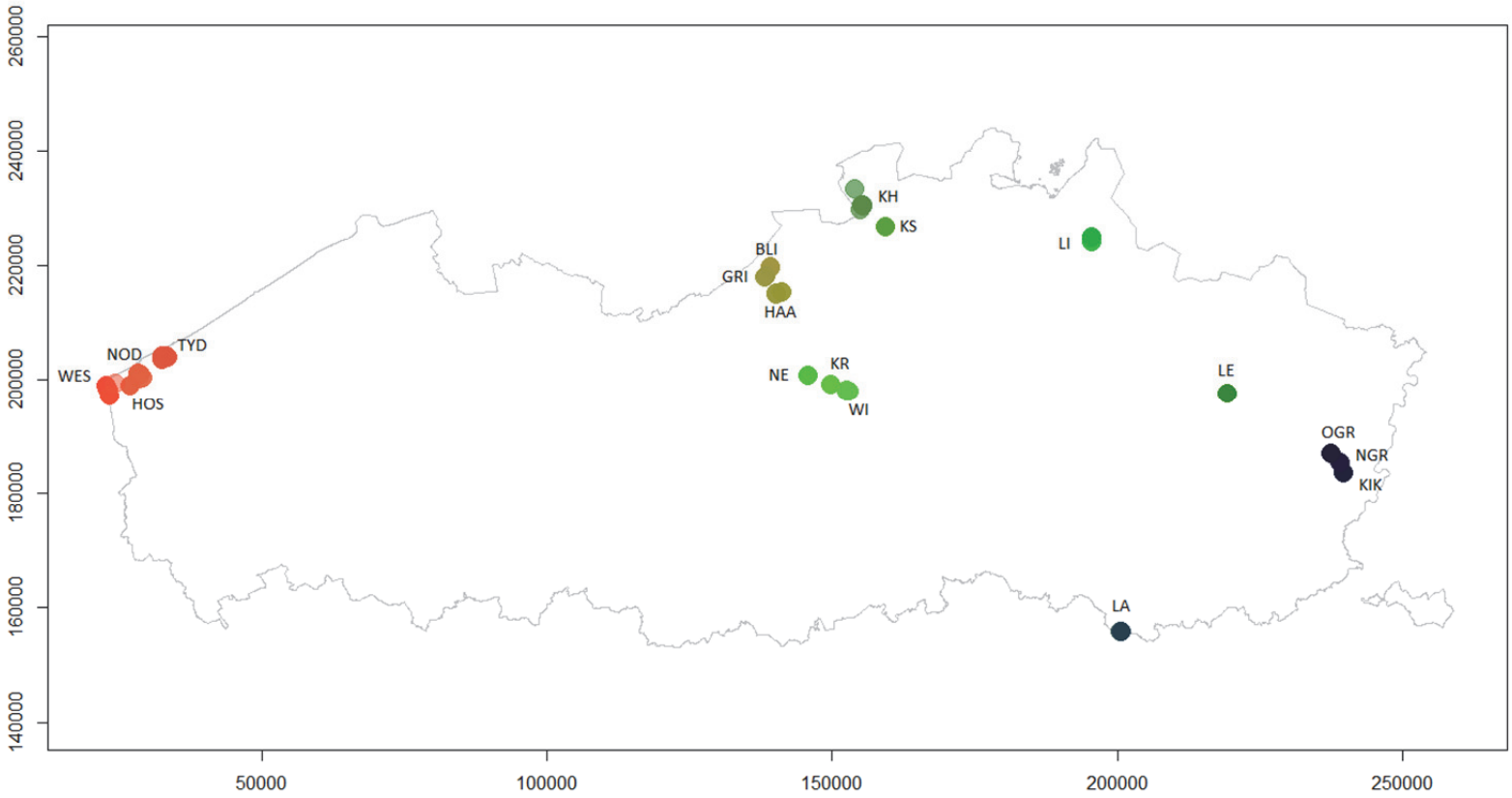


Figuur 2 PCA-plot van de eerste twee assen die samen 9% van de totale variatie verklaren. Elke subpopulatie wordt aangeduid in een verschillende kleur en met een verschillend symbool. Zie Tabel 1 voor de codes van de subpopulaties.

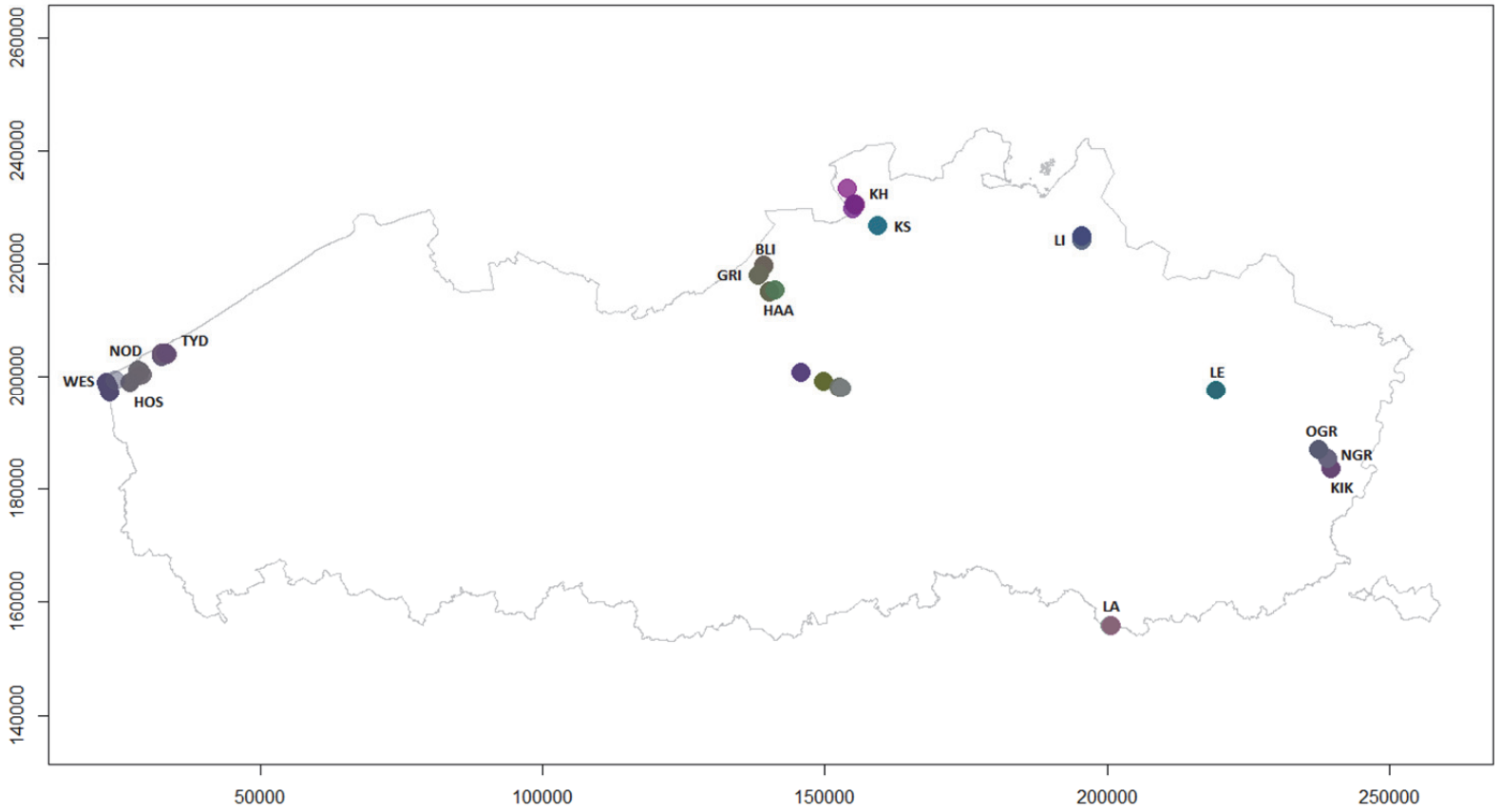


Figuur 3 PCA-plot van de eerste en de derde as die samen 8% van de totale variatie verklaren. Elke subpopulatie wordt aangeduid in een verschillende kleur en met een verschillend symbool. Zie Tabel 1 voor de codes van de subpopulaties.

Volgens de resultaten in de studie van Cox & Mergeay (2015) over de Westkustpopulaties, sloten de sPCA resultaten met 10 km als maximale afstand, nauwer aan bij de resultaten uit de overige analyses van de populatiestructuur. Dezelfde conclusie kan ook voor de andere gebieden getrokken worden. Daarom dat we bij de resultaten ons beperken tot deze verkregen met 10 km als maximale afstand in het netwerk. Met deze afstand werd zowel een globale structuur, met slechts twee principale componenten met positieve eigenwaarden (Monte-Carlotest met 999 iteraties: p= 0,001), als een lokale structuur gevonden. Deze laatste werd verklaard door vier principale componenten met negatieve eigenwaarden (Monte-Carlotest met 999 iteraties: p= 0,003). De globale structuur wordt weergegeven in Figuur 4. Het verschil tussen de kust en de overige populaties, aangegeven door de verschillende kleuren, valt opnieuw op, wat vooral door eerste globale score bepaald wordt. Verder is er een onderverdeling per regio. De subpopulaties in Antwerpen samen met het Militair Domein Leopoldsburg zijn meer aan elkaar verwant dan met de overige subpopulaties. De lokale structuur geeft eerder een verdeling per subpopulatie weer, behalve voor de subpopulaties van Linkeroever (Figuur 5). Blikken, Grimaldi en Haasop lijken aan elkaar verwant, met toch een iets afwijkende verwantschap voor Haasop, voornamelijk door de stalen uit de meest oostelijke locatie. De PCA- en sPCA-resultaten die verkregen werden per regio (met een maximale afstand van het netwerk voor de sPCA net onder de maximale afstand tussen locaties binnen de regio) bevestigden deze verdeling grotendeels (resultaten niet inbegrepen; voor de kust: Cox & Mergeay, 2015). In het PCA resultaten clusteren een klein deel van de stalen van Krekelenberg nauw samen met deze van het Noordelijk Eiland. Ze wijken bovendien af van de rest van Krekelenberg. Zo is er ook een staal van Oude Groeve dat sterk verschilt van de overige individuen uit deze subpopulatie, maar dat nauw verwant lijkt aan individuen van Nieuwe Groeve. Verder lijkt er een link te bestaan tussen Oude Groeve en Kikbeekbron en tussen Ter Yde en de Westhoek (beschreven in Cox & Mergeay, 2015). Er is bovendien een substructuur in de Kalmthoutse Heide die een verschil aangeeft tussen de noordelijke individuen (nabij Biezenkuilen) en de meer zuidelijke individuen in Oasis (Van Ganzenven) en in een gebied ten zuid-oosten van de Putse Moer.



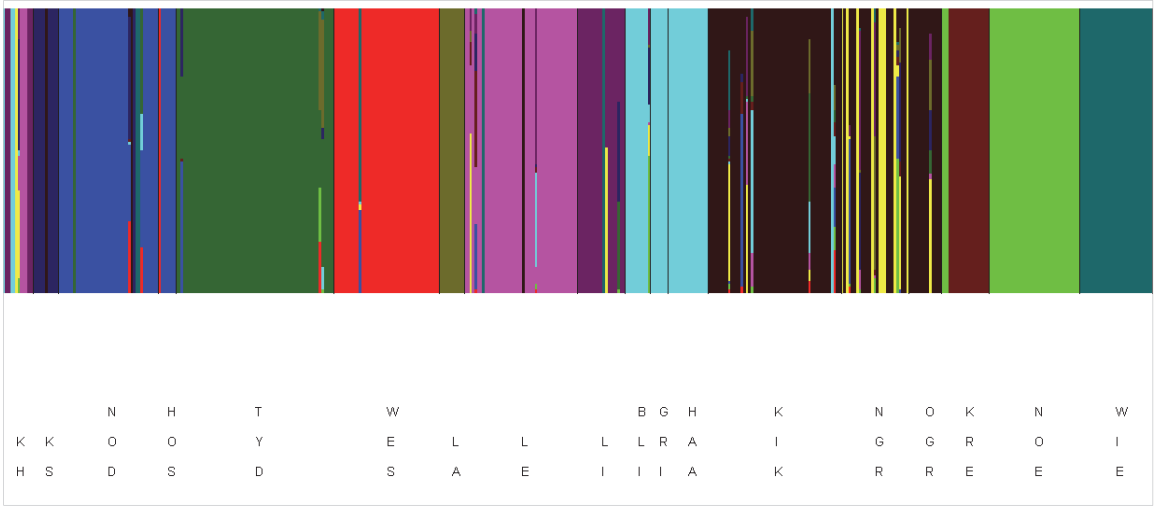
Figuur 4 Grafische weergave van de globale structuur bepaald door sPCA met gebruik van "Neighbourhood by distance" netwerk. De x- en y-as geven de Lambert coördinaten. De kleur die elk individu krijgt correspondeert met de combinatie van de eerste drie *lagged* scores volgens het rood-groen-blauw systeem (RGB). Zie Tabel 1 voor de codes van de subpopulaties.



Figuur 5 Grafische weergave van de lokale structuur bepaald door de derde tot en met de vijfde principale component van de sPCA met gebruik van “Neighbourhood by distance” netwerk. De x- en y-as geven de Lambert coördinaten. De kleur die elk individu krijgt correspondeert met de combinatie van de drie *lagged* scores volgens het rood-groen-blauw systeem (RGB). Zie Tabel 1 voor de codes van de subpopulaties.

De BAPS resultaten waarbij een optimale clustering gevonden werd met K = 13 voor de admixture analyse, sluiten hierbij aan (Figuur 6). Elke subpopulatie wordt hoofdzakelijk aan een aparte cluster toegewezen, behalve voor de subpopulaties van Linkeroever (Blikken, Grimaldi en Haasop), voor Noordduinen en Oosthoek, en voor Kikbeekbron en Oude Groeve. Ook zijn er vele individuen van Nieuwe Groeve die tot deze laatste cluster behoren, maar ook vele tot een andere. Daarnaast clusteren enkele individuen van Krekelenberg samen met deze van Noordelijk Eiland.

De subpopulatie van de Kalmthoutse Heide lijkt in tegenstelling tot de rest uit een sterke genetische mix te bestaan. Wanneer we de analyse uitvoeren zonder de spatiale context, met K = 20, neemt het aantal verschillende clusters binnen Kalmthoutse Heide nog toe (resultaten niet inbegrepen). Deze onderverdeling van individuen binnen Kalmthoutse Heide volgt echter niet de substructuur gevonden met sPCA. Uit de niet-spatiale BAPS analyse blijkt ook dat de subpopulatie van het Noordelijk Eiland niet enkel gerelateerd is aan deze van de Krekelenberg, maar ook aan de subpopulaties van Linkeroever en dan voornamelijk aan Grimaldi.



Figuur 6 Clusteranalyseresultaten uit spatiale BAPS analyse. Elke verticale lijn is een individu en elke kleur (13 in totaal) is een groep waartoe individuen worden gewezen. Zie Tabel 1 voor de codes van de subpopulaties.

De paarsgewijze waarden voor populatiedifferentiatie (F_{ST}, D_{est} en G_{STest}) worden in bijlage 1 vermeld. De waarden van G_{STest} zijn het laagst, die van F_{ST} het hoogst en deze van D_{est} liggen tussenin. Toch geven ze alle drie dezelfde onderlinge relaties weer. Bekijken we 95% betrouwbaarheidsintervallen van deze waarden, dan blijkt opnieuw dat de subpopulaties van Linkeroever, alsook de subpopulaties Oosthoek en Noordduinen nauwelijks tot niet significant van elkaar verschillen. Analoog met de BAPS resultaten, verschilt de subpopulatie van de Kalmthoutse Heide genetisch niet of nauwelijks van deze in het Militair Domein Leopoldsburg, De Liereman en Linkeroever. Daarentegen is er geen nauw verband met het nabijgelegen Klein Schietveld.

3.2.2 Migratie

Details over de resultaten van de analyses voor de kustpopulaties zijn te vinden in het rapport van Cox & Mergeay (2015). Samenvattend is er vermoedelijk substantiële genenuitwisseling van Westhoek naar Ter Yde en in mindere mate vanuit deze beide subpopulaties naar Noordduinen-Oosthoek.

3.2.2.1 Linkeroever

Uit de resultaten van GeneClass bleek dat ongeacht het criterium, er geen recente gene flow detecteerbaar was naar de subpopulatie Blikken vanuit Grimaldi of Haasop. Onder het *L_home/L_max* criterium waren er in Haasop en Grimaldi telkens één migrant vanuit de andere twee subpopulaties aanwezig. Van deze vier migranten bleef er maar een enkele over onder het *L_home* criterium, namelijk in Grimaldi vanuit Blikken. Een tweede, nieuwe migrant in Haasop vanuit Blikken met $p < 0,05$ had onder het vorige criterium een probabiliteit van 0,067.

Er was weinig verschil tussen de runs uitgevoerd met BIMr analyses. De verdelingen van de allelenmigratieschattingen naar Haasop zijn sterk asymmetrisch waardoor de modus in plaats van het gemiddelde een betere schatter is. Hierdoor is het moeilijk om de betrouwbaarheidsintervallen te vergelijken om een richting

van genenuitwisseling te bepalen. We kijken dus eerder naar het verschil in waarden om asymmetrische migratie te kunnen detecteren. In tegenstelling tot de GeneClass resultaten is er nu substantiële migratie naar alle subpopulaties (Tabel 2). Er is quasi evenveel genenuitwisseling in beide richtingen tussen Grimaldi en Blikken (28-30%). De genenmigratie naar Haasop is beduidend lager, maar deze subpopulatie lijkt ongeveer voor 24% (moduswaarde) van de allelen in Blikken en 31% (moduswaarde) in Grimaldi te hebben gezorgd. Om meer zekerheid te verkrijgen over de richting van de genenmigratie, werd het verschil in proporties van migrantengenen voor elke 100ste iteratie bepaald, exclusief voor de iteraties in de burninfase (d.i. over 50.000 iteraties). Voor 53% van de iteraties is de genenmigratie van Grimaldi naar Blikken groter en voor 74% van de gevallen is deze groter zowel van Haasop naar Blikken, als van Haasop naar Grimaldi, dan in beide omgekeerde richtingen. Deze hoge mate van genenuitwisseling lijkt de resultaten verkregen uit de verschillende structuuranalyses te ondersteunen. Bovendien kan de lagere migratieschattingen vanuit Haasop te maken hebben met de substructuur die in deze subpopulatie aanwezig bleek te zijn (zie eerder).

Tabel 2 Proportie migrantenallelen voor Linkeroever geschat met behulp van het programma BIMr. De gemiddelde waarden staan boven, de moduswaarden onder.

Van/naar	Blikken	Grimaldi	Haasop
Blikken	0,442 0,393	0,283 0,218	0,157 0,049
Grimaldi	0,301 0,272	0,414 0,444	0,166 0,045
Haasop	0,256 0,237	0,303 0,313	0,677 0,849

3.2.2.2 Rupelregio

Omdat het Noordelijk Eiland ontstaan is na meerdere recente introducties vanuit Krekelenberg en Linkeroever, zal dit mogelijks de analyses beïnvloeden. Daarom hebben we de analyses met en zonder deze subpopulatie uitgevoerd. GeneClass gaf aan dat er vanuit Noordelijk Eiland twee of drie migranten in Krekelenberg zouden zijn, afhankelijk van het onderhevige criterium, respectievelijk *L_home* en *L_home/L_max*. Dit wordt bevestigd door de BIMr resultaten (Tabel 3). Alle runs van BIMr gaven bovendien nagenoeg dezelfde resultaten (met asymmetrische verdelingen van de parameterschattingen). Wanneer we de subpopulatie Noordelijk Eiland weglaten uit de analyses, blijkt er uit de BIMr resultaten toch enige migratie te zijn van Krekelenberg naar Wienerberger, namelijk 1% allelenmigratie (moduswaarde vanwege de erg asymmetrische verdeling; Tabel 4). Ook hier waren de runs zeer gelijkaardig. Dit lijkt echter volgens de Genclass resultaten onwaarschijnlijk.

De migratie van Noordelijk Eiland naar Krekelenberg geeft hoogst waarschijnlijk de geassisteerde migratie in omgekeerde richting weer, bij de introductie van de soort op het Noordelijk Eiland. Zoals ook in de structuuranalyse gebleken is, is er maar een klein gedeelte van de Krekelenbergsubpopulatie dat genetisch sterk verwant is aan individuen van Noordelijk Eiland.

Tabel 3 Proportie migrantenallelen voor de Rupelregio geschat met behulp van het programma BIMr. De gemiddelde waarden staan boven, de moduswaarden onder.

Van/naar	Noordelijk Eiland	Krekelenberg	Wienerberger
Noordelijk Eiland	0,999 1	0,128 0,107	9,40E-4 2,66E-15
Krekelenberg	7,41E-4 4,02E-13	0,852 0,878	0,003 1,02E-14
Wienerberger	6,04E-4 1,10E-12	0,021 0,004	0,996 1

Tabel 4 Proportie migrantenallelen voor de Rupelregio (exclusief Noordelijk Eiland) geschat met behulp van het programma BIMr. De gemiddelde waarden staan boven, de moduswaarden onder.

Van/naar	Krekelenberg	Wienerberger
Krekelenberg	0,97 0,994	0,057 0,011
Wienerberger	0,031 0,006	0,943 0,988

3.2.2.3 Mechelse Heide

Er werd enkel met data verzameld in 2014 gewerkt. Onder het criterium *L_home/L_max* met $p < 0,05$ vonden we met GeneClass niet minder dan vijf migranten: in Kikbeekbron en Oude Groeve telkens één uit Nieuwe Groeve, in Nieuwe Groeve twee uit Kikbeekbron en één uit Oude Groeve. Slechts één migrant bleef over onder het *L_home* criterium, namelijk in Oude Groeve afkomstig uit Nieuwe Groeve, en één nieuwe kwam erbij in Oude Groeve uit dezelfde richting. Deze laatste die tevens in de PCA duidelijk samen clusterde met de individuen van Nieuwe Groeve, had onder het *L_home/L_max* criterium een p-waarde van 0,064. Vermoedelijk wordt hier niet aan het *L_home/L_max* met criterium voldaan, omdat er nog populaties in de omgeving aanwezig zijn (bijvoorbeeld in Waterschei en in Lanklaar).

De proporties genenuitwisseling berekend door BIMr worden weergegeven in Tabel 5. Ook hier zijn de parameterschattingen doorgaans asymmetrisch verdeeld en zal voornamelijk de modus en niet het gemiddelde van tel zijn. Er is nagenoeg geen migratie naar Kikbeekbron en naar Nieuwe Groeve. Enkel in Oude Groeve blijken allelen aanwezig afkomstig uit Kikbeekbron en Nieuwe Groeve, maar nog steeds beneden 1%. Er is minder consensus over migratie van Kikbeekbron naar Nieuwe Groeve tussen runs en kan oplopen tot gemiddeld 16% of een moduswaarde van 1,6%. De moduswaarden in Tabel 5 komen echter meer overeen met de GeneClass resultaten onder het *L_home* criterium.

Tabel 5 Proportie migrantenallelen voor de Mechelse Heide geschat met behulp van het programma BIMr. De gemiddelde waarden staan boven, de moduswaarden onder.

Van/naar	Kikbeekbron	Nieuwe Groeve	Oude Groeve
Kikbeekbron	0,965 0,999	0,040 3,14E-14	0,044 0,004
Nieuwe Groeve	0,020 3,42E-12	0,938 1	0,083 0,007
Oude Groeve	0,014 9,96E-13	0,022 1,67E-13	0,868 0,988

Het verschil in proporties van migrantengenen voor elke 100ste iteratie van een totaal van 50.000 iteraties werd bepaald. Voor 59% van de iteraties is genenmigratie van Nieuwe Groeve naar Kikbeekbron groter dan in omgekeerde richting. Voor 75% van de iteraties is de genenmigratie van Kikbeekbron naar Oude Groeve en voor 80% van de Nieuwe naar de Oude Groeve groter dan in de omgekeerde richtingen.

3.3 Genetische diversiteit en effectieve populatiegrootte

De gemiddelde waarden van genetische diversiteit voor de verschillende subpopulaties zijn te vinden in Tabel 6. Locaties Blikken, Haasop en Grimaldi werden gegroepeerd als één subpopulatie zoals ook wel uit de structuur- en migratieanalyses bleek. Dit geldt ook zo voor Noordduinen en Oosthoek. Vele genetische studies op rugstreeppad werden uitgevoerd met dezelfde loci, namelijk Bcalμ1 tot en met Bcalμ8. Om onze resultaten te kunnen vergelijken met vorige studies, hebben we dezelfde parameters opnieuw berekend voor deze merkers uitgezonderd Bcalμ8. Doorgaans leverde het gelijkaardige of hogere waarden op, behalve voor Kikbeekbron, waar ze zakten (resultaten niet inbegrepen). Hieruit kunnen we afleiden dat, vooral op basis van H_e, de hier onderzochte populaties vergelijkbaar zijn met de populaties uit Centraal- en West-Europa (Beebee & Rowe, 2000; Frantz et al., 2009; Frei, 2014; May & Beebee, 2010; Rowe et al., 1998; Rowe et al., 2006). Zoals uitvoerig besproken door Cox & Mergeay

(2015), blijkt Noordduinen-Oosthoek hiervan af te wijken. De indices zijn voor deze subpopulatie eerder laag te noemen, wat in significante mate ook geldt voor Klein Schietveld (Mann-Whitney U test, $p < 0,05$). Na correctie voor meervoudige testen, blijft er echter geen significant verschil tussen populaties in genetische diversiteit meer over. Hoe lager H_e bovendien is, hoe kleiner de lange-termijn N_e (want dit wordt berekend op basis van de mutatiesnelheid – een constante – en H_e, gesteld dat de populatie in mutatie-drift equilibrium is). Noordduinen-Oosthoek en Klein Schietveld zijn dus waarschijnlijk ooit door een stevige bottleneck gegaan, of zitten er nog in. De populaties waar we min of meer van weten of kunnen vermoeden dat ze al lange tijd relatief groot zijn (Kalmthout, Westhoek, Leopoldsburg, Kikbeekbron) hebben effectief een hoge H_e.

De fixatie-index is slechts in twee gevallen significant hoger dan nul: Noordduinen-Oosthoek en Kikbeekbron (Tabel 6). In het eerste geval bleek dit te wijten aan de substructuur in de subpopulatie, zoals aangetoond werd door Cox & Mergeay (2015). Mogelijks is dit ook de oorzaak in Kikbeekbron, maar vermoedelijk heeft dit eerder te maken met samenstelling van de stalen die immers in twee verschillende jaren werden verzameld. Als we de F_{IS} waarde berekenen voor de stalen van 2014 is deze niet meer significant verschillend van nul (gemiddelde F_{IS} = 0,026 en een 95% betrouwbaarheidsinterval van -0,062 tot 0,139). Er zijn daarentegen wel subpopulaties met een significant negatieve F_{IS} waarde, namelijk Klein Schietveld, Wienerberger, Oude Groeve en Landen. Dit kan te wijten zijn aan secundair contact tussen voormalig gescheiden subpopulaties of door zeer sterke genetische drift (lage N_e).

Tabel 6 Geobserveerde (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e), aantal private allelen (A_p), 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_p	A_e	A_r	F_{IS}
Noordduinen-Oosthoek	0,340 (0,082)	0,378 (0,086)		2,142 (0,413)	2,888 (0,442)	0,1 (0,045 - 0,189)
Ter Yde	0,456 (0,074)	0,487 (0,081)		2,491 (0,365)	3,075 (0,382)	0,037 (-0,024 - 0,139)
Westhoek	0,505 (0,064)	0,527 (0,066)	3	2,519 (0,327)	3,194 (0,372)	0,031 (-0,038 - 0,115)
Blikken-Grimaldi-Haasop	0,432 (0,075)	0,476 (0,074)	2	2,267 (0,278)	3,317 (0,395)	0,086 (-0,007 – 0,194)
Kalmthoutse Heide	0,528 (0,082)	0,590 (0,066)	1	3,432 (0,711)	4,209 (0,563)	0,133 (-0,003 – 0,244)
Klein Schietveld	0,364 (0,131)	0,257 (0,082)		1,584 (0,226)	1,96 (0,296)	-0,276 (-0,648 - -0,049)
Noordelijk Eiland	0,482 (0,062)	0,484 (0,055)	1	2,141 (0,205)	2,824 (0,241)	0,003 (-0,099 – 0,107)
Krekelenberg	0,433 (0,054)	0,495 (0,060)	1	2,254 (0,244)	3,220 (0,235)	0,081 (-0,033 – 0,261)
Wienerberger	0,476 (0,085)	0,439 (0,075)		2,295 (0,459)	3,080 (0,469)	-0,070 (-0,162 - -0,001)
De Liereman	0,510 (0,073)	0,497 (0,073)	1	2,441 (0,358)	3,408 (0,400)	-0,043 (-0,113 – 0,047)
Militair Domein Leopoldsburg	0,506 (0,071)	0,532 (0,075)	3	3,059 (0,719)	3,551 (0,619)	0,043 (-0,007 – 0,113)
Oude Groeve	0,524 (0,108)	0,430 (0,084)	1	2,273 (0,380)	3,182 (0,468)	-0,181 (-0,314 - -0,115)
Nieuwe Groeve	0,433 (0,054)	0,481 (0,084)		2,515 (0,395)	3,087 (0,468)	0,064 (-0,035 – 0,223)
Kikbeekbron	0,457 (0,075)	0,518 (0,075)	3	2,803 (0,555)	3,679 (0,523)	0,118 (0,037 – 0,206)
Landen	0,536 (0,094)	0,446 (0,075)	2	2,150 (0,283)	2,952 (0,409)	-0,202 (-0,298 - -0,087)

Bepaalde allelen zijn gefixeerd binnen een populatie of bijna gefixeerd omdat ze een respectievelijk frequentie van 100% of meer dan 95% hebben. Populaties met dergelijke allelen, vertonen invloeden van sterke (historische of huidige) genetische drift. Drift heeft binnen een populatie een homogeniserend effect waarbij de genetische variatie binnen de populatie afneemt. Naast de weinig polymorfe loci Bcalμ11 en Bcalμ2, werd een allel van locus Buca5 waargenomen die in de subpopulaties aan de Westkust en aan Linkeroever bijna volledig gefixeerd is. Noordduinen-Oosthoek heeft nog een tweede bijna gefixeerd allel van locus Bcalμ5, dat volledig gefixeerd is in Klein Schietveld. Deze laatste subpopulatie heeft nog een gefixeerd allel van Bcalμ7 en twee bijna gefixeerde allelen van loci Bcal μ4 en Buca2. Hetzelfde allel van Bcalμ7 is ook bijna gefixeerd in subpopulaties Wienerberger en Nieuwe Groeve. Rest nog een bijna gefixeerd allel van locus Bcalμ6 in Oude Groeve. Bijgevolg blijken vooral subpopulaties Noordduinen-Oosthoek en Klein Schietveld onderhevig aan drift te zijn geweest. Daarnaast hebben verscheidene subpopulaties één tot drie private allelen. Dit aantal kan stijgen binnen een meer lokale context, wat kan wijzen op een eerder beperkte genenuitwisseling tussen subpopulaties. Dit geldt bijvoorbeeld zeker voor Kikbeekbron, wanneer we deze subpopulatie enkel vergelijken met Nieuwe en Oude Groeve, alsook voor de kustpopulaties (Cox & Mergeay, 2015). De meeste private allelen (12 van de 18) zijn zeldzaam (frequentie < 0,05 binnen de populatie). Hogere frequenties van private allelen worden vooral gevonden in Landen (0,1 – 0,2) en Westhoek (2 allelen met frequenties 0,095 en 0,134). Deze laatste populatie ontvangt mogelijks nog migranten vanuit Frankrijk, waar we geen staalname hebben uitgevoerd. Landen lijkt daarentegen een sterk geïsoleerde populatie.

De geschatte waarden voor N_b zijn doorgaans laag (Tabel 7). Niet onverwacht zijn de laagste waarden (< 10) te vinden in Klein Schietveld en Landen, maar daarnaast scoren ook Oude Groeve, Wienerberger en Krekelenberg zeer laag. Schattingen worden lager wanneer de volledige dataset in de linkage disequilibriummethode wordt gebruikt. Toename in aantal nauw verwante individuen zal het aantal associaties tussen allelen van verschillende loci doen toenemen, wat N_b vermoedelijk doet dalen. Dat door het uitsluiten van full-sibs, geschatte waarden voor N_b minder nauwkeurig worden (zeer hoge tot oneindig grote bovengrens van het betrouwbaarheidsinterval), heeft waarschijnlijk te maken met een daling in aantal allelen (Waples & Do, 2008). De linkage disequilibriummethode geeft ook minder nauwkeurige schattingen wanneer er veel migratie is in combinatie met een hoge populatiegrootte, wat mogelijks een verklaring biedt voor de betrouwbaarheidsintervallen verkregen voor het Militair Domein van Leopoldsburg. Laikre et al. (2010) en Gilbert & Whitlock (2015) gaven ook aan dat bij bemonstering van een gehele metapopulatie deze methode onderpresteerde. De staalname in Leopoldsburg is echter met een maximale afstand van 150 m tussen locaties uitgevoerd. Het is dus onwaarschijnlijk dat hier een metapopulatie werd bemonsterd, maar eerder een subpopulatie.

De temporele methodes toegepast op Kikbeekbron geven doorgaans zeer lage schattingen van N_e, behalve MLNe waarbij de bekomen waarde meer in de buurt komt van de *single sample* schattingen (Tabel 8).

Tabel 7 Gemiddelde waarden voor N_b berekend volgens de verwantschapsmethode met Colony en de linkage disequilibriummethode (LD). De waarden berekend voor de dataset zonder full-sibs behalve één per familie (excl. FS) als voor de volledige dataset (incl. FS) worden gegeven voor de LD-methode en dan zowel voor de 0,01 als de 0,05 grenswaarde voor minimum allelfrequentie (MAF). De jackknife schatting van het 95% betrouwbaarheidsinterval wordt tussen haakjes gegeven.

Subpopulatie	Colony	LD excl. FS MAF = 0,01	LD excl. FS MAF = 0,05	LD incl. FS MAF = 0,01	LD incl. FS MAF = 0,05
Noordduinen-Oosthoek	25 (15 - 43)	16,4 (10,3 - 26,8)	14,8 (7,9 – 27,8)	9,7 (6,3 - 13,7)	5,2 (3,3 – 8,5)
Ter Yde	54 (37 - 81)	26,6 (18,3 - 40,1)	29,7 (19,4 – 48,5)	18,4 (14 - 24,2)	20,4 (15,3 – 27,3)
Westhoek	39 (25 – 63)	199,1 (59,9 - ∞)	332,8 (52,2 - ∞)	30,9 (20,5 – 50,1)	27,3 (17,4 – 45,5)
Blikken-Grimaldi-Haasop	59 (39 – 91)	70,9 (24,4 - ∞)	32,5 (12,1 – 956,3)	37 (22,9 – 68,5)	46,6 (16,8 – 1415)
Kalmthoutse Heide	38 (21 – 87)	113,6 (21,9 - ∞)	30,8 (11,8 - ∞)	25,7 (14,5 – 64,2)	16,1 (10 – 29,8)
Klein Schietveld	8 (3 – 37)	0,5 (0,4 – 0,6)	0,5 (0,4 – 0,6)	0,5 (0,4 – 0,6)	0,5 (0,4 – 0,6)
Noordelijk Eiland	33 (31 – 55)	32,7 (18,9 – 71,3)	21,7 (10,2 – 60,7)	23,5 (14,8 – 40)	16,3 (8 – 34)
Krekelenberg	9 (4 – 23)	6 (3,1 – 9,7)	9,8 (5,2 – 19)	2,7 (2,2 – 3,3)	2,3 (1,7 – 3,1)
Wienerberger	19 (11 – 38)	13,5 (7,5 – 26,7)	10,3 (4,8 – 22,1)	5,7 (3,5 – 8,8)	3,3 (2,5 – 4,8)
De Liereman	43 (26 – 78)	∞ (24,4 - ∞)	1088,7 (25,1 - ∞)	78,6 (30,1 - ∞)	77,6 (24,5 - ∞)
Militair Domein Leopoldsburg	84 (56 – 131)	247,9 (73,5 - ∞)	481,6 (43,2 - ∞	140 (61,8 - ∞)	125 (35,5 - ∞)
Oude Groeve	7 (3 – 23)	6,5 (2,5 – 20,1)	6,1 (2,3 – 19,7)	2,4 (1,7 – 3,4)	2 (1,5 – 2,7)
Nieuwe Groeve	31 (16 – 68)	15,3 (8,9 – 29,9)	8,8 (4,6 – 16)	11,4 (6,6 – 19,3)	6,7 (3,4 – 12)
Kikbeekbron 2010	20 (12 -38)	42,2 (22,2 – 139,8)	24,3 (11,3 – 89,7)	17,2 (12,6 – 23,8)	10,2 (6,2 – 15,5)
Kikbeekbron 2014	22 (12 – 42)	47,1 (17,1 - ∞)	27,5 (12,4 – 200)	14,8 (10,1 – 22)	11 (7 – 16,5)
Landen	7 (4 – 21)	5 (2,4 – 12,2)	5 (2,4 – 12,2)	2,6 (2,1 – 3,3)	2,2 (1,7 – 2,8)

Tabel 8 Schatting van N_e voor Kikbeekbron berekend met temporele methodes. De waarden werden berekend voor de dataset zonder full-sibs behalve één per familie (excl. FS) als voor de volledige dataset (incl. FS).

Methode		Excl. FS	Incl. FS
NeEstimator	**Pollak**	7,8 (3,5 - 18,6)	7,8 (4,8 - 12,5)
	Nei & Tajima	8,7 (4 – 21,1)	8,4 (5,2 – 13,2)
	Jorde & Ryman	5,7 (3 – 53,9)	7,2 (4,7 – 15,8)
MLNe		25,3 (14,6 – 65,1)	21 (15– 32)
NB		8 (4,1 – 16,4)	6,2 (4 – 11)

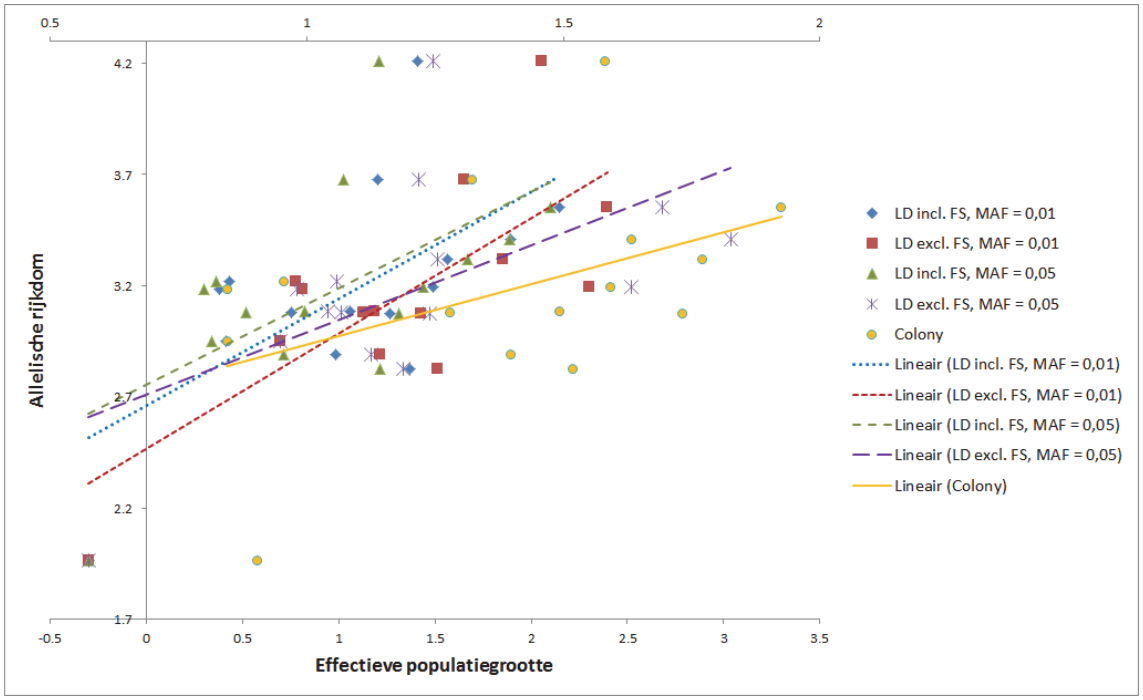
De relatie N_b/ N_c voor Landen werd 0,29 met N_b berekend met Colony of 0,09 met N_b berekend op de volledige dataset met de linkage disequilibriummethode met een grenswaarde van 0,05 voor minimum allelfrequentie. Voor subpopulatie De Liereman werd dit 0,72 met N_b berekend met Colony. De vergelijking met N_b uit de linkage disequilibriummethode werd niet gemaakt, omdat hiervoor geen eindig betrouwbaarheidsinterval werd bekomen (Beebee, 2009).

De diversiteitsindex H_e correleert het best met de verschillende maten van N_b (Tabel 9). Allelische rijkdom zou echter meer het adapatieve potentieel voor kwantitatieve kenmerken representeren dan heterozygositeit (Vilas et al., 2015). We geven daarom de relaties uit Tabel 9 enkel grafisch weer voor deze met A_r (Figuur 7). Er is dus zeker een positief, lineair verband tussen effectieve populatiegrootte en genetische diversiteit. De subpopulatie die het sterkst afwijkt van deze lineaire regressie is deze van de Kalmthoutse Heide, die ook in andere analyses sterk afwijkend was. De hoogste correlatiecoëfficiënt wordt bekomen met de N_b schatter verkregen met de linkage disequilibriummethode toegepast op de dataset zonder full-sibs behalve één en met een minimale grenswaarde van 0,01 voor allelfrequenties. Vooral deze grenswaarde lijkt vooral van tel: hoe lager hoe duidelijker de relatie.

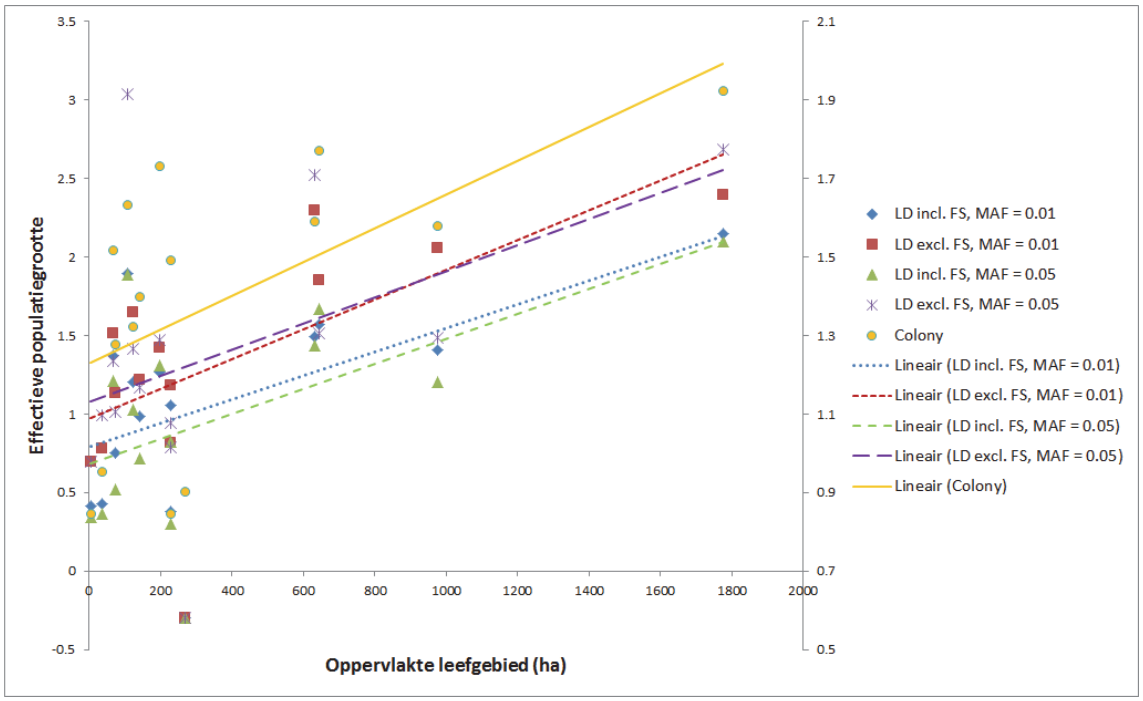
Een zwakkere relatie tussen N_b en de oppervlakte van het leefgebied werd eveneens gevonden (Tabel 9). De correlatie met de verschillende schattingen van N_b wordt weergegeven in Figuur 8. Opnieuw wordt de hoogste correlatiecoëfficiënt verkregen met de N_b schatter berekend met de linkage disequilibriummethode toegepast op de dataset zonder full-sibs behalve één en met een minimale grenswaarde van 0,01 voor allelfrequenties.

Tabel 9 Correlatiecoëfficiënten tussen genetische diversiteitsparameters (H_e en A_r), oppervlakte leefgebied en de verschillende schattingen van N_b, berekend met verwantschapsmethode met Colony en de linkage disequilibriummethode (LD) die werd toegepast op de dataset zonder full-sibs behalve één per familie (excl. FS) en op de volledige dataset (incl. FS) en dan zowel met 0,01 als met 0,05 als grenswaarde voor minimum allelfrequentie (MAF). $: p < 0,1; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

	Colony	LD excl. FS MAF = 0,01	LD excl. FS MAF = 0,05	LD incl. FS MAF = 0.01	LD incl. FS MAF = 0,05
H_e	0,5577*	0,8298***	0,6846**	0,7309**	0,6981**
A_r	0,4524$	0,7474**	0,5856*	0,6390*	0,5937*
Oppervlakte leefgebied	0,5823*	0,6295*	0,4838$	0,5591*	0,5796*



Figuur 7 Relatie tussen effectieve populatiegrootte (hier eerder N_b, het aantal effectieve ouders, logaritmisch getransformeerd) en allelische rijkdom. De onderste X-as geldt voor de N_b schattingen bepaald met de linkage disequilibriummethode, de bovenste voor deze met Colony bepaald.



Figuur 8 Relatie tussen oppervlakte leefgebied (ha) en effectieve populatiegrootte (hier eerder N_b, het aantal effectieve ouders, logaritmisch getransformeerd). De linkse Y-as geldt voor de N_b schattingen bepaald met de linkage disequilibriummethode, de rechtse voor deze met Colony bepaald.

De volgende subpopulaties hadden significante p-waarden voor de Wilcoxontest voor overschot in heterozygositeit (p-waarde tussen haakjes): Ter Yde (0,034), Westhoek (0,034), Landen (0,024), Militair Domein Leopoldsburg (0,0005), Nieuwe Groeve (0,003) en Noordelijk Eiland (0,008). Na een FDR correctie voor meervoudig testen, blijven enkel de laatste drie subpopulaties over met de respectievelijke aangepaste p-waarden 0,009, 0,031 en 0,048. Daarnaast vertoont Landen ook een afwijking van een normale verdeling van allelfrequenties, wat opnieuw kan wijzen op een recente bottleneck (Luikart et al., 1998).

4 Discussie

Uit de resultaten van deze studie blijkt dat de meeste locaties vooraf gedefinieerd als subpopulaties als zodanig mogen beschouwd worden. Er is met andere woorden een duidelijke spatiale, genetische structuur. Enkel voor Noordduinen en Oosthoek enerzijds en de subpopulaties aan Schelde-Linkeroever anderzijds lijkt deze vaststelling niet op te gaan. Er is proportioneel zodanig veel uitwisseling tussen de verschillende subpopulaties op deze locaties dat ze als een geheel mogen beschouwd worden. Als we dan kijken naar de genetische diversiteit van de bemonsterde subpopulaties, dan blijkt deze in lijn van de verwachtingen te liggen. Door de postglaciale kolonisatie vanuit de refugia neemt de genetische variatie in noordelijke richting af, met hoge waarden in Spanje en lage waarden aan de rand van het verspreidingsgebied als gevolg (Oromi et al., 2012; Rowe et al., 2006). Vergelijkbare genetische variatie werd bijgevolg gevonden in Wallonië (Stevens et al., 2006b), Frankrijk (Rowe et al., 2006), het Groothertogdom Luxemburg (Frantz et al., 2009) en Zwitserland (Frei, 2014). De subpopulaties die hiervan lijken af te wijken zijn Noordduinen-Oosthoek en Klein Schietveld. De situatie van de eerste wordt in detail uitgelegd door Cox & Mergeay (2015). Klein Schietveld lijkt een sterk geïsoleerde en kleine populatie, hoewel er potentieel voldoende leefgebied lijkt voor een grote populatie (Mergeay & Van Hove, 2013). Naast de lage diversiteit vertoont de subpopulatie gefixeerde allelen, een negatieve fixatie-index, lijkt ze sterk gedifferentieerd van de dichtstbijzijnde populatie Kalmthoutse Heide en bevat ze een zeer laag aantal effectieve ouders. Hierbij moet wel de kanttekening gemaakt worden dat deze resultaten steunen op een staalnamegrootte van slechts tien larvenstalen. Bovendien kon een analyse van recente genenuitwisseling met de Kalmthoutse Heide niet uitgevoerd worden vanwege het tijdsverschil tussen de staalnames in beide gebieden. Evenmin kon een vergelijking met het nabijgelegen Groot Schietveld gemaakt worden. H_e is echter minder gevoelig voor staalgrootte en is bijzonder laag. Daarom is het noodzakelijk deze populatie verder op te volgen.

De populatie Landen lijkt ook in een gelijkaardige genetische situatie te verkeren als het Klein Schietveld, maar heeft een sterk gebrek aan geschikt leefgebied (Mergeay & Van Hove, 2013). Hoewel de verwachte heterozygositeit nog relatief hoog is, is de allelische rijkdom eerder aan de lage kant, wat op zich een indicatie is voor een recente reductie in populatiegrootte ten opzichte van de historische situatie. Ook verklaart een afname in populatiegrootte en/of in genenuitwisseling het hoge aantal private allelen. Er is bij ons weten ook geen andere subpopulatie aanwezig in de directe omgeving. Daarnaast is het aantal effectieve ouders opnieuw bijzonder laag. Als we dit aantal vergelijken met de geschatte census populatiegrootte, dan bekomen we een verhouding van 0,09 tot 0,29 afhankelijk van de methode voor schatting van N_b. Beebee (2009) vond daarentegen voor populaties met een census grootte onder 50 verhoogde waarden voor de ratio, terwijl dit bij grotere populaties eerder in de buurt ligt van 0,09 wat gewoonlijk bij natuurlijke populaties verondersteld wordt (Frankham, 1995). Indien men uitgaat van een correcte inschatting van de census grootte, zou het dus kunnen dat genetische compensatie aan de basis ligt van hoge N_b/N_c waarden. Beebee (2009) dacht daarnaast dat minder competitie tussen mannetjes in kleine populaties en een potentieel hoger aandeel van vrouwtjes resulteerde in een gelijkaardig voortplantingssucces voor elk individu. In Landen is het leefgebied vermoedelijk dermate klein, met een evenredig klein aantal voortplantingswateren, dat er geen verminderde competitie tussen mannetjes mogelijk is. Enkel nog in De Liereman werd het aantal eisnoeren geteld. De schattingen voor N_b lagen echter ver uiteen, waardoor er geen een consensus was voor de verhouding N_b/N_c. Bovendien was de schatting van N_b berekend met genetische data uit 2008, terwijl een betere relatie verkregen wordt tussen N_b. en N_c van hetzelfde jaar (Beebee, 2009). Het voortplantingsseizoen van rugstreeppad loopt doorgaans van laat april tot augustus, maar het is niet onmogelijk dat er nog eisnoeren buiten de telperiode waren, met natuurlijk een onderschatting van de censusgrootte tot gevolg. Dit lijkt echter voor de populatie in Landen onwaarschijnlijk, omdat er vanaf 30 mei tot en met 18 augustus geen nieuwe eisnoeren meer werden waargenomen.

Tussen Krekelenberg en Wienerberger is er waarschijnlijk geen migratie. Het landschap lijkt dit ook niet toe te staan, terwijl aan de Westkust afstanden van 10 km overbrugd kunnen worden (Cox & Mergeay, 2015). Rugstreeppadden worden hier soms aangetroffen op het strand. Vermoedelijk migreren de rugstreeppadden langs de duinvoet en het hoogstrand van de Westhoek naar Ter Yde (Foto 4). Noordduinen (en Oosthoek) wordt daarentegen niet door een duincorridor verbonden met strand en zee. Er is ook een zekere isolatiegraad waar te nemen bij de populaties in de Rupelregio. Krekelenberg heeft in vergelijking met de overige subpopulaties een lage waarde voor N_b. Wienerberger vertoont een negatieve fixatie-index, wat kan verklaard worden door een zeer lage effectieve grootte (Luikart & Cornuet, 1999). Uitkruising (*outbreeding)* als mogelijke verklaring van een negatieve F_{IS} is eerder onwaarschijnlijk, tenzij er toch gene flow plaats vindt met niet-gekende en sterk genetisch verschillende

naburige populaties. Maar niet alle loci vertonen een overschot aan heterozygositeit (zo ook bij de andere populaties met gemiddeld negatieve F_{IS}), waardoor deze hypothese minder steek houdt. Naast genetische drift en uitkruising, kan een exces aan heterozygoten veroorzaakt worden door selectie tegen homozygoten (of tegen inteelt). Ficetola et al. (2011) toonden aan dat in een kleine en geïsoleerde populatie van *Rana latastei* (Italiaanse springkikker) er selectie gebeurde in de jonge levensstadia tegen ingeteelde individuen. Dit had een lagere F_{IS} waarde en een hogere heterozygositeit als gevolg tussen het larvale stadium (net uit het ei) en metamorfose. Ook Richter & Nunziata (2014) vonden een daling van F_{IS} voor *Lithobates sevosus* van het eistadium tot metamofose en Rowe & Beebee (2005) vonden in hun studie indicaties van intraspecifieke competitie in het larvaal stadium bij rugstreeppad dat ingeteelde individuen helpt elimineren.



Foto 4 Ingegraven rugstreeppad in de zeereep (foto: Koen Verschoore).

Zoals verwacht vinden we de link tussen de subpopulatie op het Noordelijk Eiland en deze in Krekelenberg en Linkeroever nog terug in de genetische data. Onder de subpopulaties van Linkeroever lijkt vooral Grimaldi nauw verwant te zijn met individuen op het Noordelijk Eiland. De staalnamelocaties in Grimaldi liggen dan ook het dichtst bij het terrein van Katoen Natie, waar de dieren voor de introductie vandaan kwamen. Dit weerspiegelt zich niet enkel in de resultaten van de clusteranalyse, maar ook in de waarden voor populatiedifferentiatie. Ze zijn eerder laag tussen Noordelijk Eiland en Linkeroever, maar hoog in relatie met Krekelenberg (zie Bijlage 1). Uit de PCA-analyse van de subpopulaties in de Rupelregio blijkt dat de drie individuen uit Krekelenberg die duidelijk samenclusteren met individuen van Noordelijk Eiland sterk verschillen van de overige larven van Krekelenberg (resultaten niet getoond). Beide subpopulaties hebben met andere woorden relatief weinig allelen gemeenschappelijk. Door de recente introductie van Noordelijk Eiland zien we dat deze populatie een bottleneck heeft ondergaan. Wat betreft genetische variatie ligt deze van de nieuwe populatie in lijn met deze van de bronpopulaties. N_b ligt daarentegen beduidend hoger dan deze in Krekelenberg, waarvan de meeste en de meest recent geïntroduceerde individuen afkomstig zijn. Of de nieuwe populatie op lange termijn haar genetische variatie kan behouden, zal moeten blijken. De populatie leeft immers gescheiden van andere populaties door de Rupel en het Zeekanaal.

In de zoektocht naar mogelijke metapopulaties onder de bemonsterde subpopulaties, kwam ook de Mechelse Heide aan bod. Er was echter geen uitsluitsel over migratie tussen Kikbeekbron, Nieuwe en Oude Groeve met behulp van de methodes die de proportie van recente migratie bepalen. Andere analyses wijzen echter in de richting van geen tot beperkte genenuitwisseling. Kikbeekbron bevat vele private allelen, vooral in vergelijking met de andere subpopulaties binnen de Mechelse Heide, ondanks dat er toch rugstreeppadden worden waargenomen op het ecoduct over de E314 dat Kikbeekbron en Nieuwe Groeve verbindt (Lambrechts et al., 2014). Ook de voortplanting in de waterplas op het ecoduct houdt sinds 2006 stand. De Nieuwe en Oude Groeve wisselen potentieel nog genen uit met andere, hier niet-onderzochte subpopulaties. Nieuwe Groeve vertoont echter tekenen

van een bottleneck (reductie in populatiegrootte en/of in immigratie). Mogelijk bereiken migranten vanuit Nieuwe Groeve de subpopulatie in de Oude Groeve. Niettemin is hier N_b laag. Ook is er een negatieve fixatie-index.

Ondanks de hogere waarden voor N_b en genetische diversiteit heeft de subpopulatie in het Militair Domein van Leopoldsburg een reductie in populatiegrootte en/of in immigratie ondergaan. Ook de aanwezigheid van meerdere private allelen wijst in die richting. Omdat de effectieve populatiegrootte hoog is, kunnen we niet bepalen of de bottleneck een historisch, dan wel recent fenomeen is. De Kalmthoutse Heide heeft daarentegen een lagere N_b, maar een hogere genetische diversiteit. Deze populatie wijkt met andere woorden sterker af van de lineaire relatie tussen het aantal effectieve ouders en genetische variatie. De populatie vertoont een substructuur die deels niet spatiaal te verklaren lijkt te zijn. Het negeren van die structuur in de berekening van N_b kan tot gevolg hebben dat deze sterk afwijkt van de echte waarde (Gilbert & Whitlock, 2015; Neel et al., 2013). Bovendien kan een introductie van vele vreemde allelen via migratie een signaal van drift geven, waardoor de effectieve populatiegrootte onderschat wordt (Gilbert & Whitlock, 2015). Of de subpopulatie in de Kalmthoutse Heide al dan niet migranten ontvangt van sterk gedifferentieerde populaties, eventueel aan Nederlandse zijde, kunnen we momenteel niet beoordelen. Dit vereist een ruimere staalname in alle omliggende populaties. Tegelijkertijd zou een grotere staalname verspreid binnen het gebied nodig zijn om de substructuur in de populatie in kaart te brengen.

Ondanks dat vele subpopulaties veelal een laag aantal effectieve ouders bevatten en dikwijls duidelijke invloeden van drift en bottlenecks vertonen, liggen de parameters voor genetische variatie doorgaans binnen de verwachtingen voor populaties in een gunstige toestand. Niettemin vonden wij een positief lineaire relatie tussen genetische diversiteit en het aantal effectieve ouders, zoals ook Beebee (2009) vond voor de populaties in Groot-Brittannië. De graad van genetische variatie (veelal heterozygositeit) is dikwijls gelinkt aan de gezondheid van een populatie (Allentoft & O'Brien, 2010), zoals ook bij rugstreeppad werd aangetoond (Rowe & Beebee, 2005; Rowe et al., 1999). Hoe lager deze genetische variatie, hoe slechter de populaties scoren op bepaalde fitnesskenmerken, zoals de groeisnelheid bij larven. Doorgaans draagt een "kleine" populatie (kleine effectieve populatiegrootte) een lagere genetische diversiteit, wat potentiële gezondheidsproblemen met zich meebrengt. Waarden voor effectieve populatiegrootte onder 100 (of zelfs $N_b < 50$) zijn echter dikwijls te vinden onder amfibieën (Phillipsen et al., 2011; Richmond et al., 2014; Schmeller & Merilä, 2007). Binnen een gezonde metapopulatiecontext hoeft dit niet problematisch te zijn: zolang de totale metapopulatie groot genoeg is en de verschillende subpopulaties voldoende verbonden zijn, mogen subpopulaties een lage effectieve grootte hebben (zie Mergeay, 2013 voor meer achtergrond). N_b kan sterk variëren van jaar tot jaar afhankelijk van de condities voor de voortplanting. Goede jaren met hoge N_b kunnen de slechte jaren met lage N_b bufferen (Schmeller & Merilä, 2007). Onverwacht hogere genetische variatie (H_e) in kleine populaties kan te wijten zijn aan de recente veranderingen in effectieve grootte, want na een bottleneck duurt het nog enige generaties vooraleer H_e sterk geërodeerd is. Een voorbeeld hiervan is de populatie op het Noordelijk Eiland. Selectie tegen negatieve allelen en dus pro heterozygoten (d.i. *genetic purging*) kan ook de hoge genetische variatie in kleine populaties verklaren. Dit kan een positiever beeld scheppen dan wanneer we enkel kijken naar de effectieve populatiegrootte en de algemene limieten die daarvoor worden opgesteld (Garcia-Dorado, 2015). In de zeer kleine populatie Klein Schietveld lijkt dit potentieel effect onvoldoende om de populatie tegen drift en inteelt te beschermen. Maar zelfs in de populaties die in tegenstelling tot Klein Schietveld nog een vrij hoge variatie maar zeer kleine N_b vertonen, bestaat de reële kans dat ze verder achteruit gaan door de afname in geschikt leefgebied en het gebrek aan connectiviteit met andere subpopulaties. Wat betreft oppervlakte leefgebied werd eveneens een positieve correlatie met N_b gevonden. Oppervlakte leefgebied werd hier ruwweg benaderd. Met meer aangepaste indices die oppervlakte en graad van fragmentatie van het leefgebied weergeven, zou een beter inzicht in de relatie met het effectief aantal ouders kunnen geven.

Een landschappelijke reden voor de asymmetrie of het ontbreken van migratie hebben we niet onderzocht. Volgens Stevens et al. (2004) verkiest de rugstreeppad in subadulte fase open landschappen voor dispersie (zand en wegen), maar in een latere studie van Stevens et al. (2006a) naar de interactie met grenzen tussen verschillende landschapstypes blijken ze ook bossen te prefereren boven akkers. De auteurs geven als mogelijke verklaring het geschikte microklimaat van bossen voor subadulten, zeker wat de vochtigheidsgraad betreft, die helpt voorkomen dat deze jonge dieren uitdrogen. De voorkeur voor bepaalde habitats leek ook het best de genetische afstanden te verklaren tussen rugstreeppadden in Wallonië (Stevens et al., 2006b). Hoewel wegen tot de verkozen landschapsoppervlaktes behoren voor dispersie, kan toenemende mortaliteit langs deze verkeersassen een rem betekenen voor migratie (Beebee, 2013; Franz et al., 2013; Frei, 2014; Garriga et al., 2012).

De asymmetrie in migratie heeft waarschijnlijk niet enkel met het omringende landschap te maken, maar ook met de densiteit van de subpopulaties. Het zou dus kunnen dat de draagkracht van een leefgebied voor een populatie

nog voldoende groot is, waardoor er nog geen noodzaak om te emigreren bestaat (Sutherland et al., 2002). Hoe groot N_b van de totale metapopulaties (meta-N_b) is, is hier niet te bepalen. We missen data van potentiële subpopulaties die hiervan deel uitmaken. 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).

5 Besluit

Uitgaande van onze resultaten blijken er toch meerdere populaties in een minder goede toestand te verkeren. De populaties die de grootste problemen vertonen zijn Klein Schietveld en Landen. Om over de eerste populatie een betrouwbaar oordeel te vellen, is er een hoger aantal stalen nodig. In Landen lijkt het echter duidelijk dat deze populatie sterk onder druk staat. Door haar geïsoleerde staat en klein leefgebied zal deze populatie verder achteruitgaan onder invloed van drift. Populaties die misschien in een minder kritieke toestand verkeren, maar die toch minder genetische variatie, kleinere effectieve populatiegroottes en/of weinig gene flow ondervinden, zijn Noordduinen-Oosthoek, Krekelenberg, Wienerberger, Kikbeekbron, Oude en Nieuwe Groeve. Hoewel de soort een sterke uitbreiding heeft gekend in de Noordduinen door de aanleg van poelen en depressies (Provoost et al., 2015), lijken de genetische variatie en de effectieve populatiegrootte achterop te hinken. Ook zijn er populaties die het ogenschijnlijk wel goed doen, maar die tekenen van drift vertonen (Ter Yde) of waar er een daling in populatiegrootte dan wel in immigratie is voorgevallen (Militair Domein Leopoldsburg). In Groot-Brittannië bleek de achteruitgang van rugstreeppadpopulaties sterker te zijn in heidegebied dan in de duinen (Beebee et al., 2012). De oorzaak was vermoedelijk te vinden in de verandering van landgebruik in heidegebieden, waardoor het landschap minder dynamisch werd en aantrekkelijker voor gewone pad (*Bufo bufo*) die in competitie staat met rugstreeppad. Ook kan de draagkracht van een leefgebied overschreden zijn. Dit is niet onwaarschijnlijk gezien de sterk versnipperde leefgebieden van deze soort. Dit wordt enigszins weergegeven in de positieve relatie tussen N_b en oppervlakte leefgebied. Het zou echter nuttig zijn om de link tussen effectieve populatiegrootte (of het aantal effectieve ouders) en de oppervlakte en graad van fragmentatie van het leefgebied verder te onderzoeken met behulp van aangepaste maten. Omgekeerd, populaties die op basis van een ruwe screening van de grootte van het leefgebied voldoende potenties leken te hebben om een duurzame (meta)populatie te huisvesten (zie Mergeay & Van Hove, 2013), bleken vaak ook in een relatief gunstige toestand te zijn op vlak van H_e en/of N_e-schatters (bijvoorbeeld Westhoek en Militair domein Leopoldsburg). In bepaalde gevallen was de inschatting echter onjuist (bijvoorbeeld Mechelse Heide) of werden onzekerheden door het genetisch onderzoek opgeklaard (bijvoorbeeld de Rupelregio en Klein Schietveld).

Er is een duidelijke positieve relatie tussen de effectieve populatiegrootte en de genetische variatie van subpopulaties. De ratio van de eerste parameter met schattingen van census populatiegrootte hebben we helaas niet kunnen onderzoeken. Enkel voor Landen hadden we een betrouwbare schatting van zowel N_b als N_c. Het is belangrijk een goede maat voor effectieve populatiegrootte te verkrijgen en deze regelmatig, bijvoorbeeld om de twee generaties (of acht jaar), opnieuw te bepalen om een (verdere) achteruitgang van (meta)populaties snel te detecteren en tijdig gepaste maatregelen te kunnen nemen om de levensvatbaarheid van populaties te bevorderen. Deze genetische screening combineren met schattingen van census populatiegrootte, zou inzicht verschaffen in de relatie tussen effectieve en census grootte. Dit zou bijgevolg nuttig kunnen zijn voor de monitoring van de populaties, omdat het dan mogelijk zou zijn om de effectieve populatiegrootte in te schatten aan de hand van de census grootte en omgekeerd.

Referenties

Adamack A.T., Gruber B. (2014). PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. Methods in Ecology and Evolution 5(4):384-387.

Allentoft M., O'Brien J. (2010). Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: a review. Diversity 2(1):47.

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., Rowe G. (2001). Application of genetic bottleneck testing to the investigation of amphibian declines: a case study with natterjack toads. Conserv Biol 15(1):266-270.

Beebee T.J.C. (2013). Effects of road mortality and mitigation measures on amphibian populations. Conserv Biol 27(4):657-668.

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.

Caughley G. (1994). Directions in conservation biology. J Anim Ecol 63(2):215-244.

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.

Cox K., Mergeay J. (2015). Genetische beoordeling van potentiële bronpopulaties rugstreeppad voor herintroductie in Zwinstreek. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek Brussel 2015 (9091964). Brussel: Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek.

De Fonseca P. (1980). De herpetofauna in Oost- en West-Vlaanderen: verspreiding in functie van enkele milieufactoren. 1980.

De Saeger S., Ameeuw G., Berten B., Bosch H., Brichau I., De Knijf G., Demolder H., Erens G., Guelinckx R., Oosterlynck P. et al. (2010). Biologische Waarderingskaart versie 2.2. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek Brussel 2010 (36). Brussel: Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek.

Dempster A.P., Laird N.M., Rubin D.B. (1977). Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. Journal of the royal statistical society Series B (methodological):1-38.

Denton J.S., Beebee T.J.C. (1993). Density-related features of natterjack toad (*Bufo calamita*) population in Britain. J Zool 229(1):105-119.

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 (Ne) 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.

Ficetola G.F., Garner T.W., Wang J., De Bernardi F. (2011). Rapid selection against inbreeding in a wild population of a rare frog. Evolutionary Applications 4(1):30-38.

Frankham R. (1995). Efective 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.

Franz K.W., Romanowski J., Johst K., Grimm V. (2013). Ranking landscape development scenarios affecting natterjack toad (*Bufo calamita*) population dynamics in Central Poland. PLoS One 8(5):e64852.

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.

Garcia-Dorado A. (2015). On the consequences of ignoring purging on genetic recommendations for minimum viable population rules. Heredity 115(3):185-187.

Garriga N., Santos X., Montori A., Richter-Boix A., Franch M., Llorente G. (2012). Are protected areas truly protected? The impact of road traffic on vertebrate fauna. Biodivers Conserv 21(11):2761-2774.

Gilbert K.J., Whitlock M.C. (2015). Evaluating methods for estimating local effective population size with and without migration. Evolution 69(8):2154-2166.

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-Uchida D., Palstra F.P., Knight T.W., Ruzzante D.E. (2013). Contemporary effective population and metapopulation size (Ne and meta-Ne): 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.
Hui T.-Y.J., Burt A. (2015). Estimating effective population size from temporally spaced samples with a novel, efficient maximum-likelihood algorithm. Genetics 200(1):285-293.
IUCN/SSC. (2013). Guidelines for reintroductions and other conservation translocations. Version 1.0. Gland, Switzerland.
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.
Jooris R., Engelen P., Speybroeck J., Lewylle I., Louette G., Bauwens D., Maes D. (2012). De IUCN Rode Lijst van amfibieën en reptielen in Vlaanderen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2012 (22). Brussel: Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek.
Jooris R., Engelen P., Speybroeck J., Lewylle I., Louette G., Bauwens D., Maes D. (2013). De amfibieën en reptielen van Vlaanderen recente verspreiding en toelichting bij de nieuwe rode lijst. Rapport Natuurpunt Studie 2013 (6). Mechelen: Natuurpunt Studie.
Jorde P.E., Ryman N. (2007). Unbiased estimator for genetic drift and effective population size. Genetics 177(2):927-935.
Jost L. (2008). G(ST) and its relatives do not measure differentiation. Mol Ecol 17(18):4015-4026.
Keenan K., McGinnity P., Cross T.F., Crozier W.W., Prodöhl P.A. (2013). diveRsity: an R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. Methods in Ecology and Evolution 4(8):782-788.
Laikre L., Allendorf F.W., Aroner L.C., Baker C.S., Gregovich D.P., Hansen M.M., Jackson J.A., Kendall K.C., McKelvey K., Neel M.C. et al. (2010). Neglect of genetic diversity in implementation of the Convention on Biological Diversity. Conserv Biol 24(1):86-88.
Lambrechts J., Lewylle I., Vercayie D., Jacobs M., Lefevre A. (2014). Monitoring ecoduct 'Kikbeek' over de E314 in Maasmechelen. Resultaten van het zevende jaar na aanleg (T7: 2013) en vergelijking met de T3 en T1. Mechelen.
Luikart G., Cornuet J.M. (1999). Estimating the effective number of breeders from heterozygote excess in progeny. Genetics 151(3):1211-1216.
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.
McCartney-Melstad E., Shaffer H.B. (2015). Amphibian molecular ecology and how it has informed conservation. Mol Ecol: in press.
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 2013 (66). Brussel: Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek.
Mergeay J., Van Hove M. (2013). Analyse van de duurzaamheid van populaties van Europees beschermde amfieën en reptielen. Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2013 (104). Brussel: Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek.
Miaud C., Sanuy D., Avrillier 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.
Neel M.C., McKelvey K., Ryman N., Lloyd M.W., Short Bull R., Allendorf F.W., Schwartz M.K., Waples R.S. (2013). Estimation of effective population size in continuously distributed populations: there goes the neighborhood. Heredity 111(3):189-199.
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.

Nei M., Tajima F. (1981). Genetic drift and estimation of effective population size. Genetics 98(3):625-640.
Nomura T. (2008). Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample. Evolutionary Applications 1(3):462-474.
Oromi N., Richter-Boix A., Sanuy D., Fibla J. (2012). Genetic variability in geographic populations of the natterjack toad (*Bufo calamita*). Ecology and Evolution 2(8):2018-2026.
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.
Phillipsen I.C., Funk W.C., Hoffman E.A., Monsen K.J., Blouin M.S. (2011). Comparative analyses of effective population size within and among species: ranid frogs as a case study. Evolution 65(10):2927-2945.
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.
Pollak E. (1983). A new method for estimating the effective population size from allele frequency changes. Genetics 104(3):531-548.
Provoost S., Van Gompel W., Vercruysse E., Packet J., Denys L. (2015). Permanente inventarisatie van de Natuurreservaten aan de kust, PINK II. Eindrapport periode 2012-2014. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2015 (8890955). Brussel: Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek.
R Development Core Team. (2010). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
Rannala B., Mountain J.L. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. Proc Natl Acad Sci U S A 94(17):9197-9201.
Richmond J.Q., Backlin A.R., Tatarian P.J., Solvesky B.G., Fisher R.N. (2014). Population declines lead to replicate patterns of internal range structure at the tips of the distribution of the California red-legged frog (*Rana draytonii*). Biol Conserv 172:128-137.
Richter S.C., Nunziata S.O. (2014). Survival to metamorphosis is positively related to genetic variability in a critically endangered amphibian species. Anim Conserv 17(3):265-274.
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. (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.
Schmeller D.S., Merilä J. (2007). Demographic and genetic estimates of effective population and breeding size in the amphibian *Rana temporaria*. Conserv Biol 21(1):142-151.
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.
Smith B.M., Diaz A., Winder L., Daniels R. (2005). The effect of provenance on the establishment and performance of *Lotus corniculatus* L. in a re-creation environment. Biol Conserv 125(1):37-46.
Stevens V.M., Leboulengé É., Wesselingh R.A., Baguette M. (2006a). Quantifying functional connectivity: experimental assessment of boundary permeability for the natterjack toad (*Bufo calamita*). Oecologia 150(1):161-171.
Stevens V.M., Polus E., Wesselingh R.A., Schtickzelle N., Baguette M. (2004). Quantifying functional connectivity: experimental evidence for patch-specific resistance in the Natterjack toad (*Bufo calamita*). Landscape Ecol 19(8):829-842.
Stevens V.M., Verkenne C., Vandewoestijne S., Wesselingh R.A., Baguette M. (2006b). 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.

Vilas A., Pérez-Figueroa A., Quesada H., Caballero A. (2015). Allelic diversity for neutral markers retains a higher adaptive potential for quantitative traits than expected heterozygosity. Mol Ecol 24(17):4419-4432.

Wang J. (2004). Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. Genetics 166(4):1963-1979.

Wang J., Whitlock M.C. (2003). Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. Genetics 163(1):429-446.

Waples R.S. (1989). A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. Genetics 121(2):379-391.

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.

Wright S. (1943). Isolation by distance. Genetics 28(2):114-138.

Zhdanova O.L., Pudovkin A.I. (2008). Nb_HetEx: a program to estimate the effective number of breeders. J Hered 99(6):694-695.

Bijlage 1: Populatiedifferentiatietabellen

Tabel 10 Differentiatie tussen subpopulaties berekend als F_{ST} (Wright, 1943), weergegeven onder de diagonaal. De 95% betrouwbaarheidsintervallen staan boven de diagonaal.

	KH	KS	NOD	HOS	TYD	WES	LA	LE	LI	BLI	GRI	HAA	KIK	NGR	OGR	KR	NE	WI
KH		0,12-0,25	0,11-0,21	0,02-0,12	0,04-0,16	0,04-0,09	0,06-0,25	0,004-0,05	0,006-0,07	-0,003-0,08	0,01-0,09	0,04-0,13	0,04-0,11	0,03-0,08	0,07-0,21	0,03-0,11	0,05-0,18	0,05-0,10
KS	0,187		0,15-0,35	0,18-0,39	0,18-0,30	0,17-0,33	0,24-0,46	0,12-0,23	0,14-0,30	0,09-0,34	0,18-0,44	0,14-0,32	0,08-0,25	0,10-0,25	0,16-0,30	0,10-0,29	0,16-0,35	0,16-0,32
NOD	0,156	0,263		0,01-0,21	0,11-0,30	0,08-0,17	0,18-0,40	0,10-0,27	0,17-0,31	0,12-0,26	0,15-0,34	0,10-0,26	0,09-0,27	0,08-0,26	0,13-0,38	0,20-0,30	0,18-0,31	0,15-0,35
HOS	0,070	0,282	0,086		0,05-0,28	0,02-0,13	0,08-0,30	0,03-0,21	0,06-0,24	0,07-0,24	0,07-0,30	0,03-0,25	0,05-0,28	0,06-0,22	0,08-0,38	0,10-0,25	0,10-0,27	0,07-0,25
TYD	0,089	0,232	0,185	0,133		0,03-0,09	0,07-0,23	0,06-0,12	0,10-0,25	0,02-0,14	0,03-0,13	0,03-0,12	0,08-0,20	0,08-0,20	0,08-0,21	0,09-0,22	0,08-0,21	0,09-0,19
WES	0,067	0,251	0,119	0,070	0,059		0,08-0,29	0,05-0,13	0,09-0,19	0,04-0,15	0,05-0,14	0,04-0,12	0,09-0,18	0,08-0,18	0,11-0,23	0,10-0,23	0,10-0,19	0,08-0,17
LA	0,151	0,352	0,296	0,198	0,152	0,187		0,06-0,18	0,10-0,21	0,03-0,30	0,04-0,32	0,09-0,34	0,06-0,21	0,05-0,22	0,07-0,24	0,12-0,28	0,10-0,23	0,09-0,32
LE	0,024	0,177	0,183	0,103	0,086	0,086	0,122		0,03-0,10	0,03-0,11	0,02-0,13	0,04-0,11	0,03-0,10	0,03-0,07	0,06-0,15	0,07-0,16	0,08-0,17	0,03-0,08
LI	0,034	0,234	0,244	0,153	0,166	0,146	0,159	0,066		0,06-0,19	0,09-0,22	0,08-0,27	0,07-0,16	0,06-0,15	0,07-0,29	0,06-0,18	0,08-0,28	0,08-0,17
BLI	0,032	0,211	0,191	0,151	0,074	0,096	0,173	0,070	0,123		-0,04-0,03	0,02-0,13	0,03-0,20	0,02-0,16	0,07-0,24	0,05-0,24	0,05-0,12	0,07-0,20
GRI	0,051	0,294	0,230	0,180	0,070	0,095	0,190	0,079	0,162	-0,013		-0,006-0,07	0,04-0,20	0,06-0,17	0,10-0,25	0,08-0,26	0,04-0,12	0,06-0,22
HAA	0,086	0,241	0,172	0,136	0,076	0,076	0,212	0,083	0,185	0,069	0,034		0,07-0,18	0,06-0,15	0,06-0,22	0,11-0,23	0,06-0,16	0,08-0,23
KIK	0,072	0,164	0,163	0,152	0,135	0,136	0,125	0,065	0,116	0,105	0,114	0,126		0,02-0,07	0,04-0,08	0,08-0,19	0,10-0,21	0,09-0,19
NGR	0,061	0,184	0,169	0,139	0,135	0,123	0,138	0,051	0,109	0,082	0,107	0,105	0,044		0,04-0,13	0,09-0,24	0,11-0,20	0,05-0,17
OGR	0,142	0,235	0,233	0,206	0,148	0,178	0,156	0,109	0,181	0,159	0,183	0,150	0,059	0,082		0,11-0,24	0,11-0,27	0,13-0,25
KR	0,070	0,201	0,243	0,168	0,156	0,165	0,198	0,112	0,112	0,147	0,170	0,168	0,129	0,152	0,183		0,11-0,25	0,08-0,27
NE	0,122	0,265	0,237	0,183	0,137	0,152	0,173	0,129	0,189	0,085	0,076	0,113	0,154	0,156	0,193	0,192		0,12-0,29
WI	0,075	0,238	0,255	0,173	0,135	0,125	0,211	0,057	0,125	0,133	0,143	0,161	0,132	0,110	0,189	0,163	0,205	

Tabel 11 Differentiatie tussen subpopulaties berekend als G_{STest} (Nei, 1973; Nei & Chesser, 1983), weergegeven onder de diagonaal. De 95% betrouwbaarheidsintervallen staan boven de diagonaal.

	KH	KS	NOD	HOS	TYD	WES	LA	LE	LI	BLI	GRI	HAA	KIK	NGR	OGR	KR	NE	WI
KH		0,06-0,16	0,059-0,10	0,01-0,09	0,03-0,07	0,02-0,05	0,06-0,12	-0,002-0,03	-0,003-0,05	-0,006-0,05	0,0007-0,07	0,02-0,08	0,01-0,06	0,007-0,06	0,04-0,11	0,01-0,07	0,04-0,09	0,02-0,06
KS	0,106		0,12-0,21	0,09-0,24	0,11-0,20	0,13-0,21	0,13-0,28	0,08-0,16	0,10-0,19	0,07-0,16	0,10-0,23	0,09-0,21	0,06-0,16	0,06-0,17	0,07-0,20	0,07-0,18	0,13-0,22	0,10-0,20
NOD	0,074	0,163		0,004-0,10	0,08-0,13	0,05-0,08	0,12-0,21	0,08-0,13	0,10-0,17	0,06-0,15	0,07-0,17	0,06-0,13	0,07-0,11	0,06-0,12	0,09-0,16	0,09-0,17	0,11-0,16	0,11-0,18
HOS	0,042	0,154	0,040		0,03-0,13	0,01-0,09	0,06-0,17	0,03-0,10	0,05-0,13	0,04-0,15	0,05-0,17	0,03-0,14	0,05-0,14	0,04-0,13	0,06-0,18	0,05-0,16	0,07-0,15	0,06-0,14
TYD	0,044	0,157	0,105	0,074		0,02-0,04	0,06-0,11	0,03-0,06	0,07-0,11	0,02-0,08	0,01-0,07	0,02-0,07	0,06-0,09	0,06-0,09	0,07-0,10	0,06-0,11	0,06-0,09	0,06-0,09
WES	0,034	0,170	0,064	0,040	0,030		0,08-0,14	0,04-0,06	0,06-0,10	0,03-0,09	0,03-0,09	0,02-0,07	0,06-0,09	0,05-0,09	0,08-0,13	0,06-0,12	0,07-0,10	0,05-0,08
LA	0,083	0,207	0,162	0,108	0,085	0,108		0,05-0,10	0,06-0,12	0,06-0,13	0,07-0,15	0,08-0,16	0,05-0,10	0,05-0,11	0,05-0,12	0,08-0,16	0,07-0,12	0,09-0,15
LE	0,012	0,118	0,102	0,059	0,045	0,045	0,069		0,02-0,05	0,02-0,07	0,03-0,08	0,03-0,07	0,02-0,05	0,01-0,05	0,04-0,08	0,04-0,09	0,06-0,09	0,02-0,05
LI	0,017	0,142	0,131	0,085	0,090	0,079	0,086	0,035		0,04-0,10	0,06-0,13	0,07-0,14	0,04-0,08	0,04-0,09	0,07-0,13	0,03-0,09	0,09-0,13	0,05-0,09
BLI	0,019	0,112	0,095	0,084	0,040	0,053	0,091	0,038	0,066		-0,03-0,04	0,0002-0,09	0,04-0,09	0,02-0,07	0,05-0,12	0,04-0,12	0,02-0,07	0,04-0,11
GRI	0,030	0,158	0,117	0,102	0,038	0,053	0,101	0,044	0,088	-0,007		-0,02-0,08	0,04-0,11	0,03-0,10	0,06-0,15	0,05-0,15	0,01-0,08	0,05-0,11
HAA	0,047	0,143	0,089	0,076	0,041	0,042	0,119	0,046	0,103	0,037	0,019		0,04-0,10	0,03-0,09	0,05-0,11	0,05-0,14	0,04-0,09	0,06-0,12
KIK	0,036	0,109	0,09	0,087	0,072	0,072	0,071	0,033	0,062	0,058	0,064	0,071		0,01-0,04	0,02-0,05	0,05-0,10	0,07-0,10	0,05-0,09
NGR	0,031	0,115	0,09	0,078	0,073	0,067	0,075	0,027	0,058	0,043	0,059	0,057	0,023		0,02-0,08	0,05-0,12	0,06-0,11	0,04-0,08
OGR	0,076	0,131	0,125	0,111	0,083	0,103	0,080	0,061	0,099	0,082	0,095	0,080	0,033	0,043		0,07-0,14	0,09-0,13	0,08-0,13
KR	0,037	0,123	0,131	0,096	0,085	0,091	0,112	0,061	0,060	0,081	0,096	0,094	0,070	0,083	0,102		0,06-0,15	0,06-0,12
NE	0,062	0,174	0,133	0,103	0,074	0,082	0,096	0,070	0,104	0,044	0,040	0,061	0,084	0,085	0,109	0,106		0,10-0,13
WI	0,035	0,148	0,144	0,092	0,074	0,068	0,115	0,030	0,065	0,068	0,073	0,087	0,072	0,058	0,103	0,088	0,114	

Tabel 12 Differentiatie tussen subpopulaties berekend als D_{est} (Jost, 2008), weergegeven onder de diagonaal. De 95% betrouwbaarheidsintervallen staan boven de diagonaal.

	KH	KS	NOD	HOS	TYD	WES	LA	LE	LI	BLI	GRI	HAA	KIK	NGR	OGR	KR	NE	WI
KH		0,07-0,2	0,08-0,16	0,004-0,12	0,02-0,10	0,03-0,10	0,05-0,17	-0,01-0,05	-0,02-0,07	-0,03-0,06	-0,02-0,10	0,01-0,13	0,02-0,13	0,002-0,12	0,02-0,17	-0,001-0,11	0,05-0,15	0,02-0,11
KS	0,132		0,09-0,13	0,08-0,17	0,13-0,20	0,16-0,24	0,14-0,25	0,08-0,16	0,08-0,17	0,04-0,12	0,07-0,21	0,06-0,16	0,04-0,12	0,05-0,13	0,06-0,13	0,05-0,13	0,10-0,18	0,10-0,17
NOD	0,119	0,109		-0,007-0,06	0,09-0,15	0,06-0,11	0,14-0,24	0,11-0,18	0,13-0,21	0,06-0,17	0,06-0,20	0,05-0,12	0,07-0,13	0,07-0,13	0,08-0,15	0,13-0,22	0,13-0,21	0,11-0,19
HOS	0,049	0,121	0,018		0,02-0,12	-0,003-0,10	0,04-0,17	0,003-0,11	0,04-0,14	0,007-0,16	0,02-0,17	0,007-0,11	0,02-0,12	0,02-0,14	0,04-0,16	0,07-0,20	0,06-0,18	0,06-0,15
TYD	0,054	0,169	0,122	0,061		0,03-0,06	0,05-0,13	0,04-0,09	0,09-0,16	-0,01-0,09	-0,01-0,07	0,01-0,07	0,06-0,11	0,05-0,12	0,07-0,13	0,08-0,14	0,07-0,13	0,07-0,13
WES	0,056	0,197	0,081	0,034	0,044		0,08-0,17	0,05-0,09	0,09-0,15	0,006-0,12	0,02-0,13	0,02-0,08	0,08-0,15	0,07-0,14	0,10-0,19	0,08-0,16	0,10-0,16	0,08-0,13
LA	0,109	0,198	0,189	0,099	0,084	0,122		0,06-0,13	0,08-0,16	0,02-0,11	0,03-0,12	0,06-0,17	0,05-0,11	0,04-0,12	0,04-0,12	0,10-0,21	0,07-0,16	0,07-0,16
LE	0,010	0,123	0,141	0,044	0,062	0,069	0,088		0,03-0,08	0,01-0,09	0,02-0,10	0,02-0,10	0,02-0,07	0,01-0,08	0,04-0,11	0,05-0,13	0,08-0,14	0,02-0,06
LI	0,014	0,119	0,171	0,082	0,121	0,117	0,122	0,05		0,03-0,13	0,06-0,18	0,07-0,17	0,05-0,12	0,04-0,14	0,06-0,14	0,04-0,11	0,09-0,15	0,06-0,12
BLI	0,006	0,074	0,107	0,07	0,024	0,051	0,054	0,039	0,073		-0,02-0,04	-0,01-0,09	0,01-0,08	0,004-0,06	0,05-0,14	0,03-0,13	0,02-0,09	0,03-0,12
GRI	0,031	0,127	0,125	0,09	0,023	0,061	0,063	0,051	0,115	-0,004		-0,02-0,08	0,02-0,12	0,02-0,13	0,06-0,18	0,05-0,17	0,005-0,09	0,04-0,10
HAA	0,063	0,101	0,076	0,050	0,035	0,040	0,110	0,058	0,116	0,026	0,010		0,03-0,13	0,02-0,12	0,04-0,11	0,07-0,18	0,04-0,11	0,05-0,13
KIK	0,066	0,082	0,100	0,06	0,082	0,112	0,077	0,044	0,085	0,039	0,055	0,075		0,01-0,06	0,01-0,07	0,07-0,15	0,08-0,15	0,07-0,14
NGR	0,050	0,093	0,094	0,067	0,083	0,105	0,077	0,038	0,082	0,027	0,060	0,064	0,029		0,01-0,08	0,05-0,17	0,08-0,17	0,03-0,08
OGR	0,105	0,098	0,118	0,095	0,096	0,142	0,079	0,073	0,095	0,091	0,116	0,068	0,040	0,043		0,08-0,16	0,10-0,16	0,07-0,15
KR	0,043	0,087	0,176	0,126	0,108	0,119	0,157	0,083	0,072	0,071	0,105	0,123	0,110	0,105	0,12		0,09-0,19	0,06-0,13
NE	0,094	0,135	0,167	0,115	0,097	0,130	0,109	0,109	0,117	0,051	0,044	0,070	0,110	0,124	0,13	0,137		0,11-0,17
WI	0,057	0,134	0,153	0,102	0,097	0,101	0,111	0,036	0,092	0,066	0,064	0,088	0,104	0,050	0,11	0,096	0,138	