



Vlaanderen
is wetenschap



Translocaties van knoflookpad in Vlaanderen van 2020 t.e.m. 2022

**Kweek, uitzet, genetica, translocatiestrategie en
habitatgeschiktheidscriteria**

Loïc van Doorn, Johan Auwerx, Joachim Mergeay, Caroline Mouton, Bruno Picavet, Daan Van Eenaeme, Jeroen Speybroeck

**INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK**

Auteurs:

Loïc van Doorn , Johan Auwerx , Joachim Mergeay , Caroline Mouton , Bruno Picavet, Daan Van Eenaeme, Jeroen Speybroeck 

Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Reviewer:

Rhea Maesele

Het INBO is het onafhankelijk onderzoeksinstituut van de Vlaamse overheid dat via toegepast wetenschappelijk onderzoek, data- en kennisontsluiting het biodiversiteitsbeleid en -beheer onderbouwt en evalueert.

Vestiging:

Herman Teirlinckgebouw
INBO Brussel
Havenlaan 88, 1000 Brussel
vlaanderen.be/inbo

e-mail:

loic.vandoorn@inbo.be

Wijze van citeren:

Van Doorn L., Auwerx J., Mergeay J., Mouton C., Picavet B., Van Eenaeme D., Speybroeck J. (2023). Translocaties van knoflookpad in Vlaanderen van 2020 t.e.m. 2022: Kweek, uitzet, genetica, translocatiestrategie en habitatgeschiktheidscriteria. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2023 (50). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
DOI: doi.org/10.21436/inbor.99150090

D/2023/3241/389

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2023 (50)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Hilde Eggermont

Foto cover:

Uitzetten van larven van knoflookpad in het Merkske.
(Jeroen Speybroeck).

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:

Agentschap Natuur en Bos

AGENTSCHAP
NATUUR & BOS



Dit werk valt onder een [Creative Commons Naamsvermelding-GelijkDelen 4.0 Internationaal-licentie](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

TRANSLOCATIES VAN KNOFLOOKPAD IN
VLAANDEREN VAN 2020 T.E.M. 2022

**Kweek, uitzet, genetica, translocatiestrategie en
habitatgeschiktheidscriteria**

Loïc van Doorn, Johan Auwerx, Joachim Mergeay, Caroline Mouton, Bruno
Picavet, Daan Van Eenaeme, Jeroen Speybroeck

doi.org/10.21436/inbor.99150090

Dankwoord/Voorwoord

Een translocatie komt tot stand door de onvermoeibare inzet van velen. In het geval van de knoflookpad is dit proces reeds geruime tijd geleden in gang gezet en zijn professionele medewerkers van diverse beleids- en natuurorganisaties al jarenlang bezig met de voorbereidingen van deze ambitieuze onderneming.

We staan echter nog maar aan het begin van dit uitdagende project. De komende jaren zullen bepalend zijn voor het voortbestaan van de knoflookpad in Vlaanderen. Een translocatie is niet eenvoudig en geen wondermiddel, maar we zijn overtuigd dat zolang we de moed niet verliezen en de ingeslagen weg blijven bewandelen, we deze unieke soort kunnen behouden en terug een plaats bieden in ons landschap.

Aan de wil en inzet van de betrokken personen zal het alvast niet liggen en we willen eenieder die zich professioneel en/of vrijwillig heeft ingezet van harte bedanken. Op naar de komende jaren van intensieve maar vervullende samenwerking.



Samenvatting

De knoflookpad is een amfibiesoort die in Vlaanderen op het punt staat uit te sterven. Om dit te voorkomen voeren we, in navolging van het Soortenbeschermingsprogramma, translocaties uit. Het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek voert de opkweek en translocaties uit in opdracht van het Agentschap voor Natuur en Bos. Daarnaast is ook de genetische status onderzocht en wordt een translocatiestrategie uitgeschreven, met habitatgeschiktheidscriteria waaraan leefgebieden moeten voldoen.

De opkweek van de in het wild verzamelde eisoorten in het Onderzoekscentrum voor Aquatische Fauna verliep voorspoedig gedurende de eerste driejarige periode van 2020-2022. We voerden Bijplaatsingen uit in twee bronlocaties (Peer en Vijvergebied), en startten met een herintroductie in Welleke. De eerste stappen zijn gezet voor geassisteerde herkoloniaties in Wortel en het Merkske. In totaal zijn in deze periode 15.001 knoflookpadden uitgezet. Echter, de aantallen uitgezette dieren fluctueren sterk van jaar tot jaar (2020: 11.645, 2021: 556 en 2022: 2.800) omdat de bronpopulaties te klein zijn om te dienen als basis voor een translocatie.

De genetische status van de Vlaamse knoflookpadden is onderzocht en vergeleken met die van omliggende landen. De populaties van Peer en Vijvergebied scoren laag tot gemiddeld qua diversiteit en zijn nauw verwant aan elkaar en aan populaties in de omliggende landen. De kans op uitkruisingsdepressie wordt als zeer laag ingeschat. Om de genetische diversiteit te vergroten en de kans op inbreeding te minimaliseren, stellen we voor om buitenlandse knoflookpadpopulaties te betrekken in de Vlaamse translocaties. Het gebruik van buitenlands materiaal is ook belangrijk om de jaarlijkse fluctuaties in de aantallen te stabiliseren en om de druk op de kritiek bedreigde bronpopulaties te verminderen.

De potentiële translocatiegebieden moeten zo breed mogelijk binnen het historische areaal gezocht worden. Hierbij is het belangrijk om prioriteit te geven aan het ontwikkelen van voldoende robuuste metapopulaties voordat geprobeerd wordt deze te verbinden met andere leefgebieden, omdat de knoflookpad vrij honkvast is en de huidige staat van de populaties kritiek is. Een uitzet moet je minstens vier en liefst zes jaar volhouden, waarbij de aantallen per jaar voldoende moeten zijn om de kiem van een populatie in het gebied te introduceren, zonder overstocking te veroorzaken. We stellen kort monitoringstechnieken voorgesteld en bespreken ze. De habitatcriteria waaraan een leefgebied voor knoflookpad moet voldoen zijn strikt maar noodzakelijk voor deze soort die hoge eisen stelt aan de verschillende habitats. We maken een onderscheid tussen water- en landhabitat. De belangrijkste punten hieruit zijn de aanwezigheid van minstens vier grote, visvrije, voedselrijke en pH-neutrale waterpartijen die pas laat in de zomer droogvallen en de aanwezigheid van grote oppervlakten vergraafbare bodem in de onmiddellijke omgeving van de waterpartijen.

//

English abstract

The European spadefoot toad is an amphibian species that is on the brink of extinction in Flanders. In an effort to reverse this trend, translocations are being carried out according to the Species Protection Program. The Research Institute for Nature and Forest carries out the breeding and translocations on behalf of the Agency for Nature and Forest. Additionally, the genetic status of the species has been studied, a translocation strategy is being developed and habitat suitability criteria are described for potential release sites.

Rearing of spadefoot toad egg clutches collected from the wild at the Aquatic Fauna Research Center was successful during the first three-year period from 2020-2022. Supplementary releases were carried out at two source locations (Peer and Vijvergebied), a reintroduction was started in Welleke, and the first steps were taken towards assisted recolonization in Wortel and Merkske. In total, 15,001 garlic toads were released during this period. However, the number of released animals fluctuated widely between years (2020: 11,645, 2021: 556, and 2022: 2,800) because the source populations are too small to serve as a basis for translocation.

The genetic status of the Flemish spadefoot toads has been studied and compared to surrounding countries. The populations of Peer and Vijvergebied score low to average in terms of diversity and are closely related to each other and populations in the surrounding countries. The risk of outbreeding depression is considered very low, and to increase genetic diversity and minimize the risk of inbreeding, it is proposed to involve foreign spadefoot toad populations in Flemish translocations. The use of foreign egg clutches is also important to stabilize annual fluctuations in numbers and reduce pressure on the critically endangered source populations.

Potential translocation areas should be sought as broadly as possible within the historical range. It is important to prioritize the development of sufficiently robust metapopulations before attempting to connect them with other populations, as garlic toads are relatively sedentary and the current state of the populations is critical. Releases should be maintained for at least four and preferably six years, with sufficient numbers per year to introduce a population nucleus into the area without overstocking. Monitoring techniques are briefly presented and discussed. The habitat criteria that a living area for spadefoot toad must meet are strict but necessary for this species that has high demands on its habitats. A distinction is made between water and land habitat. The most important points include the presence of at least four large, fish-free, nutrient-rich and pH neutral water bodies that dry up late in the summer and the presence of large areas of burrowable soil in the immediate vicinity.



Inhoudstafel

Dankwoord/Voorwoord	2
Samenvatting	3
English abstract.....	4
Lijst van figuren.....	7
Lijst van tabellen	8
1. Inleiding	9
2. Kweek en uitzet 2020-2022.....	12
2.1 Methodiek.....	12
2.1.1 Onderzoekscentrum voor Aquatische Fauna (INBO)	12
2.1.2 Verzamelen van legsels.....	13
2.1.3 Eieren en eerste larvale fase	14
2.1.4 Larvale ontwikkeling	14
2.1.5 Metamorfose.....	15
2.1.6 Hygiëneprotocol	16
2.1.7 Uitzet	16
2.2 Resultaten	17
2.2.1 Legseloogst.....	17
2.2.2 Opkweek.....	17
2.2.3 Uitzet	19
2.2.4 Monitoring.....	20
2.2.5 Kweekgroep.....	20
3. Genetica.....	22
4. Translocatiestrategie.....	23
4.1 Bronpopulaties	23
4.1.1 Materiaal van Vlaamse origine	23
4.1.2 Materiaal van buitenlandse origine	23
4.1.3 Genetisch mengen bij translocatie.....	24
4.1.3.1 Genetisch mengen voor bijplaatsingen	24
4.1.3.2 Genetisch mengen voor geassisteerde herkolonisaties en herintroducties	25
4.2 Uitzet.....	25
4.2.1 Vlaams areaal voor translocatie.....	25
4.2.2 Uitzet op niveau van de doellocatie.....	26
4.3 Monitoring	27
4.3.1 Klassieke monitoring.....	27
4.3.1.1 Waterhabitat	27



4.3.1.2	Landhabitat	27
4.3.2	Genetische monitoring	27
5.	Habitatgeschiktheidscriteria.....	29
	Referenties	32



Lijst van figuren

- Figuur 1: A: De huidige verspreiding van de knoflookpad in het groen. De zwarte pijl duidt relictpopulaties in Centraal-Frankrijk aan. Oost- en zuidwaarts komen andere soorten voor (weergegeven zijn *P. vespertinus* (lichtgroen) en *P. balcanicus* (donkergroen)) (Dufresnes et al., 2019). B: Het gekende Vlaamse voorkomen van de knoflookpad in de periode 1856-1979 (ANB, 2015, met toevoeging van de waarneming uit Koksijde van de Witte (1948)). C: Het sterk gereduceerde areaal van de knoflookpad in Vlaanderen in de periode 2000-2020. De groene gebieden zijn de anno 2020 twee overblijvende populaties: Kolberg (Vijvergebied in dit rapport) en Bomerhei (Peer in dit rapport). De rode gebieden zijn populaties die de voorbije twintig jaar zijn uitgestorven. De knoflookpad bevindt zich duidelijk in een extinctiespiraal in Vlaanderen en zonder actie wordt verwacht dat de soort op korte termijn zal uitsterven. Speciale Beschermingszones zijn rood gearceerd (ANB, 2015). 10
- Figuur 2: Vrouwelijke knoflookpad *Pelobates fuscus*. De pijlvormige tekening op de rug is kenmerkend voor deze soort. 11
- Figuur 3: Het aquacultuursysteem in de broedhal van het Onderzoekscentrum voor Aquatische Fauna bestaat uit verschillende brongevulde eenheden die via een mechanische en biologische filter gescheiden functioneren. 13
- Figuur 4: Knoflookpadlegsels verzameld op 16/04/2022. A) Een klein legsel gevonden in het Vijvergebied. Het legsel is rond holpijp afgezet en integraal verzameld door de stengel boven en onder het legsel door te knippen. Let op de embryo's die aan de buitenkant van het legsel hangen. B) Een groot legsel verzameld in Peer. Het legsel was vastgezet rond riet, dat losgeknipt is, voordat het legsel onder water naar de emmer overgebracht is. 14
- Figuur 5: Kweekopstelling in een serre, aangesloten op een bron. Elk van de 17 bakken in dit recirculatiesysteem heeft een capaciteit van 250 liter. 15
- Figuur 6: De densiteit aan pre-metamorfe en juveniele knoflookpadden kan hoog zijn. Zodra de staart zich terugtrekt worden de dieren overgezet naar een bak gevuld met zuiver zand. 16
- Figuur 7: Verhouding tussen lengte en gewicht van knoflookpadlarven uit de kweek. Op verschillende momenten doorheen de groeiseizoenen zijn larven gemeten en gewogen, verspreid over de verschillende legsels. 18
- Figuur 8: Opgekweekte metamorfen uit het kweekseizoen van 2020, herkomst Vijvergebied Midden-Limburg, met gedrongen lichaamsbouw en magere ledematen. 24

Lijst van tabellen

Tabel 1:	Legseloogst gedurende de periode 2020-2022 voor elk van de herkomstgebieden. De staat van de legsels is weergegeven. Volledige legsels zijn ingezameld zonder verlies van embryo's, in tegenstelling tot incomplete legsels, waar delen van eisnoeren niet ingezameld zijn doordat embryo's loskwamen bij inzameling.	17
Tabel 2:	Aantal en overleving van de knoflookpadlarven. In 2020 zijn geen accurate tellingen van de overleving genoteerd, waardoor een overlevingspercentage van de start van de opkweek (knoflookpadden begin) tot aan de uitzet (knoflookpadden einde) niet voorhanden is.	18
Tabel 3:	Uitzettingen in de periode 2020-2022 per bronpopulatie, doelpopulatie en translocatietype. De weergegeven aantallen zijn de som van juvenielen en larven.	19
Tabel 4:	Opdeling tussen larven en juvenielen uitgezet in de periode 2020-2022.	20
Tabel 5:	Aantal dieren bijgehouden voor de kweekgroep per herkomstgebied en jaar.	21
Tabel 6:	Habitatgeschiktheidscriteria voor translocatie van knoflookpad.	30



1. INLEIDING

In uitvoering van de acties voorgeschreven in het eerste soortbeschermingsprogramma voor de knoflookpad (*Pelobates fuscus*) in Vlaanderen (ANB, 2015), kende het Agentschap Natuur en Bos (ANB) een opdracht toe aan het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO). De opdracht omvat het opkweken van knoflookpadden voor translocatie, het genetisch onderzoeken van de wilde populaties en het ontwikkelen van een uitzetstrategie. Deze strategie heeft als doel een oordeelkundige uitzet te begeleiden, waarbij de kwalitatieve en kwantitatieve uitzet van de kweekopbrengst en de habitatgeschiktheidscriteria waaraan de potentiële uitzetgebieden moeten voldoen aan bod komen.

De knoflookpad (Figuur 2) heeft een groot verspreidingsgebied (Figuur 1A). De voormalige Europese areaalgrens van de soort bevond zich verder zuidwestwaarts, mogelijk tot in centraal Frankrijk, waar nog enkele geïsoleerde populaties voorkomen (Figuur 1A, zwarte pijl). De westelijke grens van het huidige areaal loopt doorheen de Belgische provincie Limburg (Dufresnes et al., 2019). Waarnemingen uit de periode 1856-1979 geven aan dat de knoflookpad ook in de andere Vlaamse provincies aanwezig was (Figuur 1B, de Witte 1948, Bauwens & Claus 1996, Roosen 2008). Waarnemingen van knoflookpad zijn schaars door de verborgen levenswijze, waardoor het (historisch) areaal slecht gekend is. De aan- of afwezigheid van de knoflookpad is niet eenvoudig vast te stellen doordat de voortplanting zich onder water afspeelt en de voortplantingsroep stil is in vergelijking met andere kikkersoorten. Bovendien is de knoflookpad de rest van het jaar nachtactief en graaft ze zich overdag in de bodem in. Recente ontwikkelingen in environmental DNA (eDNA) technieken hebben monitoring van larven en adulte dieren, als deze zich in het water bevinden, vereenvoudigd (Brys et al., 2022).

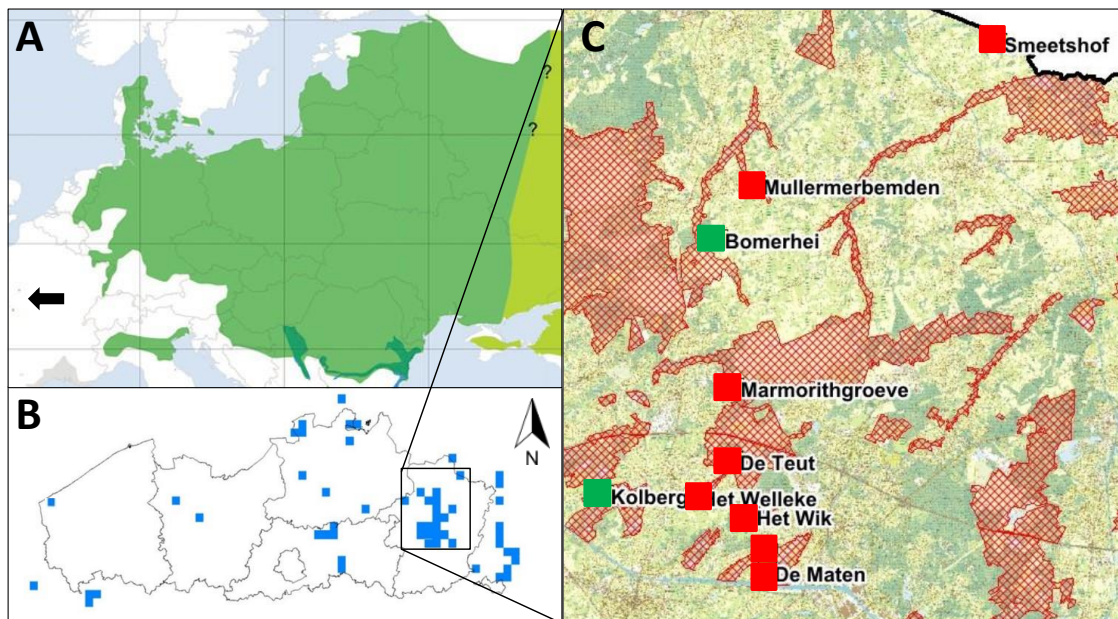
De knoflookpad is een soort die zich heeft aangepast aan het overleven in dynamische leefgebieden rond rivieren. De schrale, opgeworpen rivierduinen vormen de landhabitat. In de zandige stukken met open grond kan de soort zich ingraven met haar graafknobbels. De lager gelegen overstromingsvlakten vormen de voortplantingshabitat. In deze periodiek waterhoudende gebieden ondervinden de larven weinig last van competitie of predatie. Waar deze dynamiek intact is kan de knoflookpad op landschapsschaal de meest abundante amfibieënsoort zijn. Naast het primair leefgebied heeft de knoflookpad ook secundaire leefgebieden gekoloniseerd. Deze liggen doorgaans in de nabijheid van de primaire leefgebieden. De secundaire leefgebieden, hoewel ogenschijnlijk sterk verschillend van de primaire leefgebieden, kennen ook de nodige dynamiek. In Vlaanderen zijn vanuit de huidige verspreiding twee types secundaire leefgebieden gekend. Ten eerst vormt extensieve, kleinschalige landbouw voor pionierssituaties inzake landhabitat door menselijke handelingen. De aanwezige veedrinkpoelen binnen deze leefgebieden vormen de waterhabitat. Een tweede leefgebied zijn viskweekvijversystemen, ontstaan uit het indijken van waterlopen in zandige milieus. Hoewel vis en amfibieën in de regel slechts in beperkte mate samengaan, laat het dynamische vijverbeheer toe dat de knoflookpad in viskweekvijvers kan voorkomen.

Echter, zowel primaire als secundaire leefgebieden zijn door een verandering en intensivering van het landgebruik in grote delen van West-Europa verdwenen, wat heeft geleid tot lokale extinctions, een inkrimping van het areaal en een ongunstige beschermingsstatus in verschillende West-Europese landen ([European Environment Agency](http://www.europeanenvironmentagency.com)).

Deze problematiek maakt van de knoflookpad een Europees beschermd soort (Bijlage IV van de Habitatrichtlijn). Op de Vlaamse Rode Lijst (Jooris et al., 2012) valt de knoflookpad onder de weinig benijdenswaardige categorie 'ernstig bedreigd'. Het aantal populaties is de laatste jaren



sterk afgenomen en in 2020 komt de knoflookpad nog slechts voor op twee locaties (Figuur 1C). Om deze neerwaartse trend te keren is voor de knoflookpad in 2016 een soortbeschermingsprogramma (SBP) opgemaakt (ANB, 2015).



Figuur 1: A: De huidige verspreiding van de knoflookpad in het groen. De zwarte pijl duidt relictpopulaties in Centraal-Frankrijk aan. Oost- en zuidwaarts komen andere soorten voor (weergegeven zijn *P. vespertinus* (lichtgroen) en *P. balcanicus* (donkergroen)) (Dufresnes et al., 2019). B: Het gekende Vlaamse voorkomen van de knoflookpad in de periode 1856-1979 (Roosen, 2008, met toevoeging van de waarneming uit Koksijde van de Witte (1948)). C: Het sterk gereduceerde areaal van de knoflookpad in Vlaanderen in de periode 2000-2020. De groene gebieden zijn de anno 2020 twee overblijvende populaties: Kolberg (Vijvergebied in dit rapport) en Bomerhei (Peer in dit rapport). De rode gebieden zijn populaties die de voorbije twintig jaar zijn uitgestorven. De knoflookpad bevindt zich duidelijk in een extinctiespiraal in Vlaanderen en zonder actie wordt verwacht dat de soort op korte termijn zal uitsterven. Speciale Beschermingszones zijn rood gearceerd (ANB, 2015).

In het SBP zijn verschillende maatregelen opgesomd die de instandhouding van de soort ten goede moeten komen. Het SBP beoogt een toename van het verspreidingsgebied en het versterken van de bestaande populaties tot een minimum van 50 roepende mannetjes per populatie in één of meer voortplantingswateren. Daarnaast dient de kwaliteit van het leefgebied te worden verbeterd. Dit wordt aangepakt door het terugdringen van verzuring en eutrofiëring, het verwijderen van vis uit de voortplantingswateren, het in stand houden van duinen of andere open zandige plekken met geringe begroeiing met poelen in de onmiddellijke omgeving en het opheffen van migratiebarrières. Ook wordt er ingezet op onderzoek, monitoring, communicatie en sensibilisering. Omdat verwacht wordt dat toegespitst beheer niet voldoende zal zijn om de gewestelijke instandhoudingsdoelstellingen (G-IHDs) te halen, wordt daarnaast de opkweek en uitzet van knoflookpadden via een ex situ kweek aanbevolen om de doelen te halen. Vanzelfsprekend heeft een uitzet pas kans op slagen als de initiële oorzaken van de achteruitgang aangepakt worden. Hierbij is het van belang om de habitatvereisten van de soort goed te kennen. Gezien de zeer schaarse Vlaamse populaties, die zich bovendien enkel in

secundair habitat bevinden, is het essentieel hierbij de blik ook te richten op leefgebieden in het buitenland.

Het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) voert de opkweek en uitzet in opdracht van het Agentschap Natuur en Bos (ANB) uit. Het voorliggende rapport beschrijft de resultaten van 2020 tot en met 2022, de eerste drie jaren waarin werd opgekweekt. Daarnaast werd ook de genetische diversiteit van onze en buitenlandse populaties onderzocht. De criteria voor habitatgeschiktheid en de INBO-visie op de (toekomstige) translocaties worden later in het rapport bediscussieerd.



Figuur 2: Vrouwelijke knoflookpad *Pelobates fuscus*. De pijlvormige tekening op de rug is kenmerkend voor deze soort.

2. KWEEK EN UITZET 2020-2022

2.1 METHODIEK

De knoflookpad is een weinig mobiele soort (Rannap & Rannap, 2016), waardoor geschikte leefgebieden niet gekoloniseerd worden als deze buiten dispersie-afstand van de bronpopulaties liggen. Translocaties vormen in dergelijke context de enige optie om de soort potentieel leefgebied te laten koloniseren. Daarnaast lopen kleine, geïsoleerde populaties na verloop van tijd de kans om negatieve effecten van inbreeding te ondervinden en ten gevolge daarvan uit te sterven (Goovaerts et al., 2018). Door middel van bijplaatsing kan genetische verarming in bestaande relictpopulaties tegengegaan worden.

Het kweken en uitzetten van knoflookpadden wordt ook in het buitenland (Denemarken, Duitsland, Nederland) toegepast (Rannap & Rannap, 2016). Hiervoor worden over het algemeen eisnoeren, verzameld in wilde populaties, opgekweekt (headstarting). Kweek met adulte knoflookpadden die zich in gevangenschap voortplanten is ook een mogelijkheid, echter met wisselend succes.

In Vlaanderen zijn translocaties vergunningsplichtig en volgen de translocatieleidraad (Mergeay & Verbist 2021).

2.1.1 Onderzoekscentrum voor Aquatische Fauna (INBO)

Het Onderzoekscentrum voor Aquatische Fauna te Linkebeek, heeft de faciliteiten om grote hoeveelheden knoflookpadden op te kweken. De jaarlijkse capaciteit wordt geraamd op ongeveer een 20.000 pre-metamorfe knoflookpadden, wat overeenkomt met een maximale biomassa van ongeveer 200 kg. Het onderzoekscentrum beschikt over permanente bronnen waardoor hoogwaardig pathogenenvrij water quasi ongelimiteerd ter beschikking staat. Gecombineerd met state-of-the-art recirculatiesystemen en ervaren personeel leidt dit jaarlijks tot goede groei en overleving van de knoflookpadlarven (Figuur 3).



Figuur 3: Het aquacultuursysteem in de broedhal van het Onderzoekscentrum voor Aquatische Fauna bestaat uit verschillende brongevulde eenheden die via een mechanische en biologische filter gescheiden functioneren.

2.1.2 Verzamelen van legsels

De natuurlijke Vlaamse verspreiding van de knoflookpad is in de periode 2020-2022 herleid tot twee populaties (Figuur 1). In april en, in beperkte mate, maart en mei worden legsels in de gekende voortplantingspoelen en -vijvers in beide leefgebieden (Vijvergebied: twee vijvers, Peer: twee poelen) verzameld. Legsels worden 's nachts met een waadpak en hoofdlamp door zowel professionele medewerkers als vrijwilligers gelokaliseerd. De snoeren, die onder het wateroppervlak rond vegetatie worden afgezet (Figuur 4), zijn op deze manier makkelijker te lokaliseren dan overdag. Eisnoeren worden in emmers verzameld en dezelfde nacht naar het Onderzoekscentrum voor Aquatische Fauna te Linkebeek gebracht.

De embryo's verplaatsen zich kort na de afzet naar de buitenkant van het eisnoer. Ze komen makkelijk los bij verstoring, wat het verzamelen van complete eisnoeren bemoeilijkt. Om verse legsels te kunnen verzamelen wordt frequent (twee- tot driemaal per week) in beide gebieden gezocht. Deze zoekinspanning is nodig, want bij 15 graden zwemmen de larven na zeven dagen reeds vrij rond (Kowalewski 1974). Bij het zoeken wordt erop gelet de verstoring minimaal te houden door een gestandaardiseerde zoekmethodiek te hanteren, waarbij verschillende personen met drie meter tussenafstand de zoekzone parallel met de oever afzoeken. Hierbij wordt traag en voorzichtig voortbewogen.





Figuur 4: Knoflookpadlegsels verzameld op 16/04/2022. A) Een klein legsel gevonden in het Vijvergebied. Het legsel is rond holpijp afgezet en integraal verzameld door de stengel boven en onder het legsel door te knippen. Let op de embryo's die aan de buitenkant van het legsel hangen. B) Een groot legsel verzameld in Peer. Het legsel was vastgezet rond riet, dat losgeknipt is, voordat het legsel onder water naar de emmer overgebracht is.

2.1.3 Eieren en eerste larvale fase

Na aankomst in het Onderzoekscentrum voor Aquatische Fauna worden de legsels overgebracht naar broedgoten, met een constante lichte stroming en een temperatuur van 15 graden Celsius. De legsels worden elk apart in een container gehuisvest, waardoorheen het water van de stroomgoot vloeit. Dit zorgt voor optimale beluchting, afvoer van afvalstoffen en ontwikkeling van de legsels. Sterfte van embryo's is éénmaal vastgesteld in 2022. Een deel van het eisnoer was beschimmeld bij inzameling, de schimmel heeft zich verspreid over de andere embryo's in het legsel wat voor sterfte heeft gezorgd. Het protocol bepaalt nu dat eventuele beschimmelde delen van de legsels verwijderd worden voor de overdracht naar de stroomgoot.

De ontwikkeling bij 15 graden Celsius verloopt snel en afhankelijk van de ouderdom van het legsel bij inzamelen beginnen de larven na enkele dagen rond te zwemmen. In dit stadium hebben de larven nog uitwendige kieuwen. Ze worden gevoerd met geblancheerde andijvie (3-5 minuten koken) en vermalen plantaardig visvoer. Zodra de dieren goed eten en de inwendige kieuwen zijn ontwikkeld, worden de larven uit de stroomgoot gehaald. Bij deze overdracht, ongeveer 14 dagen nadat de legsels ingezameld zijn, worden ze voor de eerste maal geteld. De uiteindelijke overleving van de larven wordt op deze eerste telling gebaseerd.

2.1.4 Larvale ontwikkeling

Zodra de larven worden overgeplaatst vanuit de stroomgoot (begin mei) beginnen ze aan hun groeispuurt. Vanaf dan, tot de metamorfose in juli, komen ze ongeveer 10 gram lichaamsmassa aan en groeien ze meer dan 10 cm. Net zoals bij andere amfibieën is de groei plastisch en in grote mate afhankelijk van de watertemperatuur, dichtheid en voedselaanbod. Om de natuurlijke ritmiek in temperatuur en daglicht te behouden worden de larven in de eerste fase



gehuisvest in een specifiek ontworpen recirculatiesysteem in een serre (Figuur 5), zodat de temperatuur en het daglicht kunnen fluctueren op het ritme van het seizoen. In deze serre worden de verschillende legsels in aparte bakken gehuisvest, bij een densiteit van ongeveer 5 larven per liter water. Het recirculatiesysteem is gevoed door een bron, zodat het water in de bakken bijkomend ververscht wordt. De larven krijgen verschillende keren per dag en zeven dagen op zeven voedsel. Dit is van belang, want larven van knoflookpadden worden zeer groot en verbruiken veel energie. Met continu beschikbaar voedsel worden ze in optimale conditie gehouden en wordt hun overleving gemaximaliseerd. Ze worden gevoerd met plantenrijk visvoer, eiwitrijk visvoer en geblancheerde andijvie en brandnetel. Ze nemen het aangeboden voedsel in korte tijd op. Een correct gedimensioneerde biologische filter is dan ook van het grootste belang om de vuillast om te kunnen zetten en de larven een gezonde omgeving te bieden. Bij een te hoge densiteit aan larven neemt de groei af en metamorfoserende de knoflookpadden bij kleinere groottes (INBO, niet gepubliceerd). Het aantal larven dat per watervolume kan gehuisvest worden daalt terwijl ze groter worden. Het in de serre beschikbare watervolume (ca. 4250 liter) wordt begin juni ontoereikend. Op dit moment worden de larven overgebracht naar het recirculatiesysteem in de broedhal, bestaande uit vijf gescheiden filtersystemen met een totaal volume van meer dan 17.000 liter. Hier blijven de larven groeien tot wanneer de metamorfose start in juli. Op dit moment worden alle aanwezige larven, op 1500 na, uitgezet in de geselecteerde leefgebieden. De 1500 dieren die worden bijgehouden worden na de metamorfose als juveniele dieren uitgezet.



Figuur 5: Kweekopstelling in een serre, aangesloten op een bron. Elk van de 17 bakken in dit recirculatiesysteem heeft een capaciteit van 250 liter.

2.1.5 Metamorfose

Het Onderzoekscentrum voor Aquatische Fauna heeft de capaciteit om 1500 knoflookpadlarven gecontroleerd te laten metamorfoserende tot juvenielen. Hiervoor wordt het water in de recirculatiesystemen verlaagd tot enkele centimeters boven de bodem van de tanks. Zo kunnen de larven niet verdrinken. Door voldoende structuur aan te brengen in de bakken is er nagenoeg geen sterfte (Figuur 6, de structuur bestaat hier uit groene takken van hazelaar en filterschuim). De juvenielen worden overgebracht naar bakken gevuld met 10 centimeter zuiver zand zodra ze

zich op het droge bevinden en de staart begint te verdwijnen. In deze bakken kunnen ze enkele dagen gehouden worden. Ze worden bijgevoerd met krekels die worden aangerijkt met vitamine- en calciumhoudend poeder. Via deze werkwijze is uitval tijdens en na de metamorfose zeer laag.



Figuur 6: De densiteit aan pre-metamorfe en juveniele knoflookpadden kan hoog zijn. Zodra de staart zich terugtrekt worden de dieren overgezet naar een bak gevuld met zuiver zand.

2.1.6 Hygiëneprotocol

Omwille van verschillende besmettelijke amfibieënziekten wordt een strikt hygiëneprotocol gevolgd bij de opgroei en uitzet. Door bronwater te gebruiken wordt de kans op contaminatie door in de omgeving van het kweekcentrum levende wilde amfibieën geminimaliseerd. Daarnaast worden ook de handen ontsmet na elke handeling, om kruiscontaminatie te voorkomen. De larven worden in juli of augustus, vlak voor de uitzet, gecontroleerd met huidswabs, waarbij vijf larven per recirculatiesysteem bemonsterd worden en de aanwezigheid van ranavirose en de amfibieschimmel *Batrachochytrium dendrobatidis* via qPCR worden nagegaan door de Universiteit Gent (Faculteit Diergeneeskunde). Pas als deze resultaten gekend zijn worden de dieren uitzet.

2.1.7 Uitzet

Larven worden geteld en overgebracht naar transportcontainers. Hierbij is het van belang om voldoende water te voorzien en bij hoge densiteit extra zuurstof toe te voegen. De larven worden in de containers in de wateren geplaatst waar ze worden vrijgelaten. Water van de ontvangende poel wordt toegevoegd zodat de larven kunnen wennen aan het uitzetwater. Na ongeveer een halfuur worden de larven over het uitzetwater verdeeld.

Juveniele knoflookpadden worden 's nachts bij vochtig weer in de nabijheid van de uitzetwateren uitzet.

2.2 RESULTATEN

2.2.1 Legseloogst

De legseloogst in 2020-2022 verliep met wisselend succes. In 2020 konden 18 legsels verzameld worden in de twee natuurlijke populaties, terwijl in 2021 en 2022 amper legsels gevonden werden (respectievelijk 1 en 3 legsels, Tabel 1). De reproductieve output van amfibieën fluctueert van nature tussen jaren. Bij erg kleine populaties kan dit leiden tot voorliggende situatie waarbij weinig of geen legsels ingezameld kunnen worden en er dus onvoldoende materiaal ter beschikking staat om de jaarlijkse opkweek- en translocatiecapaciteit alsook de beoogde doelen te realiseren.

Om afsterven te voorkomen zijn geen tellingen van eieren uitgevoerd. De eerste larventelling bij overdracht naar de serre is een goede indicatie van het potentieel aantal nakomelingen bij succesvolle ontluiking van de eieren. Het aantal larven verschilt tussen de legsels. In 2022 werden twee complete legsels verzameld die beiden volledig ontloken zijn (Figuur 4). Het legsel van het Vijvergebied bevatte 383 larven, dit van Peer 3042. Deze waarden komen overeen met de minimale en maximale waarden uit de literatuur. De conditie en grootte van het moederdier zijn de bepalende factoren voor de legselgrootte (Cogălniceanu et al., 2013). Bij legsels die al verder in de ontwikkeling zijn wanneer ze in het wild gevonden worden, wordt een variabel deel van embryo's niet ingezameld doordat deze zijn losgekomen van de rest van het snoer (incomplete legsels, Tabel 1).

Tabel 1: Legseloogst gedurende de periode 2020-2022 voor elk van de herkomstgebieden. De staat van de legsels is weergegeven. Volledige legsels zijn ingezameld zonder verlies van embryo's, in tegenstelling tot incomplete legsels, waar delen van eisnoeren niet ingezameld zijn doordat embryo's loskwamen bij inzameling.

jaar	herkomst	# legsels	volledige legsels	incomplete legsels
2020	Vijvergebied	11	2	9
2020	Peer	7	4	3
2021	Vijvergebied	1	0	1
2021	Peer	0	0	0
2022	Vijvergebied	1	1	0
2022	Peer	2	2	0
2020-2022	Vijvergebied	13	3	10
2020-2022	Peer	9	6	3
2020-2022	samengeteld	22	9	13

2.2.2 Opkweek

De opkweek van de legsels was succesvol. Het eerste opkweekjaar (2020) werd voornamelijk gebruikt om ervaring op te doen met de verzorging en huisvesting van de knoflookpadlarven. De overleving van de larven was hoog (Tabel 2), met een gemiddelde overleving voor de periode 2020-2022 van 82% van de eerste telling tot uitzet (uitzet kan in deze context zowel pre-metamorfe larf als juveniel betekenen).

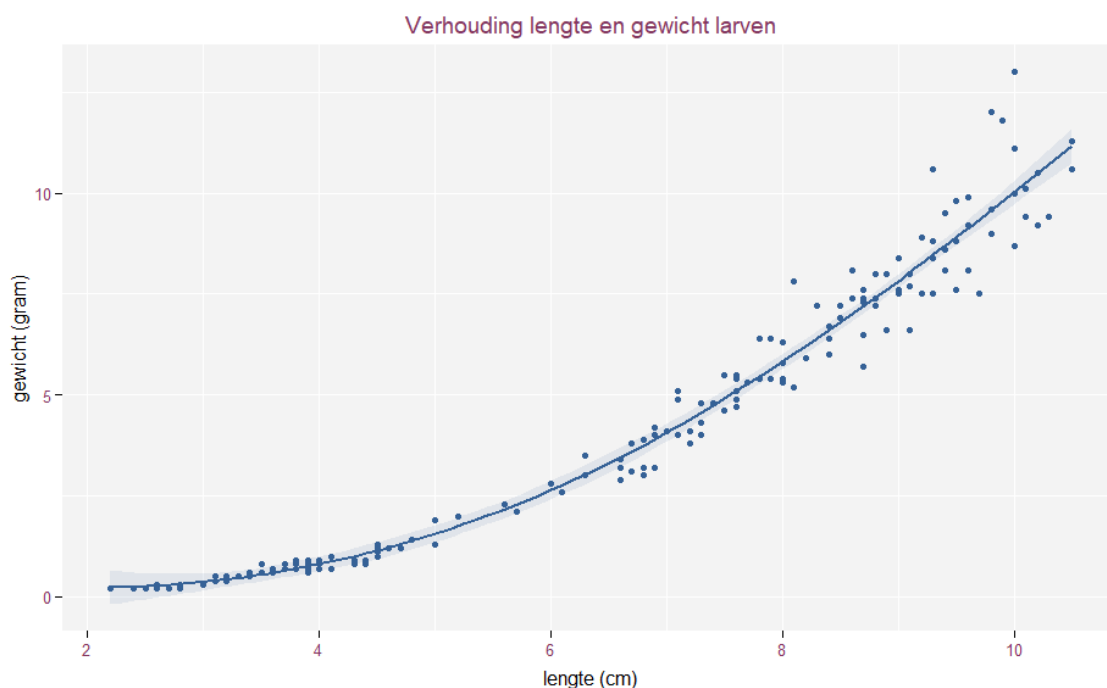


Tabel 2: Aantal en overleving van de knoflookpadlarven. In 2020 zijn geen accurate tellingen van de overleving genoteerd, waardoor een overlevingspercentage van de start van de opkweek (knoflookpadden begin) tot aan de uitzet (knoflookpadden einde) niet voorhanden is.

jaar	herkomst	# legfels	knoflookpadden begin	knoflookpadden einde	overleving (%)
2020	Vijvergebied	11	niet geteld	5350	/
2020	Peer	7	niet geteld	6115	/
2021	Vijvergebied	1	789	742	71*
2021	Peer	0	/	/	/
2022	Vijvergebied	1	383	308	80
2022	Peer	2	3142	2507	80

* In 2020 en 2021 werden bij larven van het Vijvergebied misvormingen vastgesteld (Figuur 8). In 2021 zijn deze larven doorgeweekt tot juveniele knoflookpadden en werd besloten om de misvormde juvenielen te euthanaseren (23%). Het percentage dieren van Vijvergebied dat uitzet werd bedroeg 71%.

Naast overleving werd ook de groei van de larven opgevolgd (Figuur 7). Om maximale slaagkansen van de translocaties te verkrijgen wordt gestreefd om zo groot mogelijke larven en juvenielen uit te zetten. Grootte bij metamorfose blijkt uit onderzoek vooral afhankelijk te zijn van de temperatuur en in mindere mate de densiteit (INBO, niet gepubliceerd). Bij een temperatuur tussen 15 en 20 graden Celsius wordt de groei gemaximaliseerd en zijn de knoflookpadden in juli klaar voor de metamorfose.



Figuur 7: Verhouding tussen lengte en gewicht van knoflookpadlarven uit de kweek. Op verschillende momenten doorheen de groeiseizoenen zijn larven gemeten en gewogen, verspreid over de verschillende legfels.

2.2.3 Uitzet

In de periode 2020-2022 zijn knoflookpadden uitgezet in vijf leefgebieden. De terminologie van de translocatieleidraad (Mergeay & Verbist 2021) volgend, bestaan de translocaties uit twee bijplaatsingen in de oorspronkelijke populaties (Peer en Vijvergebied), twee geassisteerde herkoloniaties in Wortel en Merkske, waar de uitzettingen aanleunen bij de geïntroduceerde populatie langs de Nederlandse zijde, en een herintroductie in een voormalig leefgebied, Welleke (Tabel 3). Elke jaar werden de larven en juvenielen onderzocht op de aanwezigheid van pathogenen. In 2020-2022 werden geen besmettingen vastgesteld.

Tabel 3: Uitzettingen in de periode 2020-2022 per bronpopulatie, doelpopulatie en translocatietype. De weergegeven aantallen zijn de som van juvenielen en larven.

jaar	bronlocatie	#legsels	# uitgezet	type translocatie				
				bijplaatsing		herintroductie	geassisteerde herkolonisatie	
				Peer	Vijvergebied	Welleke	Wortel	Merkske
2020	Peer	7	6233	638	0	0	2247	3348
	Vijvergebied	11	5412	0	4212	1200	0	0
	som	18	11645	638	4212	1200	2247	3348
2021	Peer	0	0	0	0	0	0	0
	Vijvergebied	1	556	0	426	130	0	0
	som	1	556	0	426	130	0	0
2022	Peer	2	2498	228	0	0	1028	1242
	Vijvergebied	1	302	0	200	102	0	0
	som	3	2800	228	200	102	1028	1242
2020-2022	Peer	9	8731	866	0	0	3275	4590
	Vijvergebied	13	6270	0	4838	1432	0	0
	som	22	15001	866	4838	1432	3275	4590

Om door legseloogst geen negatief effect op de bronpopulaties uit te oefenen zijn hoge aantallen larven teruggebracht (38% van het totale larvenbudget).

Er werd in de periode 2020-2022 niet gemengd bij de uitzettingen. Zowel de bijplaatsingen, de herkoloniaties als de herintroductie gebeurden met individuen afkomstig van slechts één bronpopulatie, waarbij voor de bijplaatsingen enkel individuen van de bronpopulatie zelf gebruikt werden.

De aantallen uitgezet per doellocatie fluctueren sterk tussen de jaren, bijkomend werden in 2021 geen dieren uitgezet in Wortel en Merkske. Deze verschillen tussen jaren zijn een gevolg van de fluctuaties in jaarlijkse legseloogst.

Omwille van de verwachte hogere overleving van juvenielen t.o.v. larven is ervoor gekozen om in de jaren met schaarse legseloogst (2021 en 2022) maximaal in te zetten op dit levensstadium (Tabel 4).



Tabel 5: Aantal dieren bijgehouden voor de kweekgroep per herkomstgebied en jaar.

jaar	herkomst	# juvenielen
2020	Vijvergebied	30
2020	Peer	30
2021	Vijvergebied	5
2021	Peer	0
2022	Vijvergebied	5
2022	Peer	5
2020-2022	Vijvergebied	40
2020-2022	Peer	35



3. GENETICA

Om na te gaan welke buitenlandse populaties potentieel geschikt zijn voor translocaties in Vlaamse populaties werd de genetische structuur van de Belgische populaties vergeleken met data van Europese populaties afkomstig van Prof. Matthias Stöck (IGB Berlin). We kunnen omwille van een embargo op publicatie van de gegevens momenteel niet in detail treden over de resultaten; deze worden verwerkt in een wetenschappelijk manuscript. Voorlopig beperken we ons tot algemene beschouwingen over de genetische toestand van de Vlaamse populaties ten opzichte van andere Europese populaties en hoe dit de keuze voor bronpopulaties beïnvloedt.

Op basis van clusteringanalyses en ordinatietechnieken lijken de knoflookpadpopulaties uiteen te vallen in drie groepen: een Noordwest-Europese groep, een Italiaanse groep en een Oost-Europese groep. Binnen Noordwest-Europa zien we een genetische structuur die niet eenduidig te verklaren valt op basis van geografische structuur: populaties uit de Elzas, de Lorraine, Noord-Nederland en heel Duitsland (behalve de meest westelijke populaties) clusteren samen, terwijl populaties uit het uiterste westen van Duitsland, België en de rest van Nederland een tweede losse groep vormen. Qua genetische diversiteit zien we grote verschillen tussen de populaties, waarbij deze uit de Lorraine het meest verarmd zijn. De populaties uit Peer en het Vijvergebied hebben een genetische diversiteit die licht onder het Noordwest-Europese gemiddelde ligt. Binnen Nederland zijn de populaties met de hoogste diversiteit te vinden in Gorssel (bij Apeldoorn) en Overasselt (Nijmegen, een bronpopulatie, zie verder). De populatie uit Valthe, eveneens een bronpopulatie, heeft een gemiddelde diversiteit. De populatie van de Kaaistoep (Tilburg, een bronpopulatie) is niet mee opgenomen in deze reeks: deze populatie is recent geïntroduceerde, gesticht met bronmateriaal uit verschillende Nederlandse populaties. Naar verwachting zal de genetische diversiteit omwille van deze menging hoog zijn.

Op basis van dezelfde clusteringanalyses en ordinatietechnieken kunnen we ook zien dat de geografische structuur en genetische verwantschap tussen Belgische, Nederlandse en Duitse populaties vermenging toelaat. Daarnaast geven ook de resultaten uit Nederlandse herintroducties (zoals deze in Kaaistoep) aan dat vermenging van verschillende populaties allerm minst een belemmering vormt voor een succesvolle herintroductie. We opperen dan ook om omwille van kwalitatieve (genetische diversiteit) en kwantitatieve (aantal larven) redenen materiaal uit Nederland en/of Duitsland te halen.

De keuze van de bronpopulaties wordt voornamelijk bepaald door het effect van het weghalen van eisnoeren op de bronpopulaties en de verwachte toename van genetische diversiteit bij vermenging met de Vlaamse genetica. Als voorbeeld geven we een menging van 50% individuen uit Valthe met 50% uit Peer. Dit zou een geschatte toename van gendiversiteit van 64% veroorzaken ten opzichte van de huidige gendiversiteit van de populatie in Peer. Eenzelfde menging van Valthe met de populatie van het Vijvergebied zorgt voor een toename van 82%. De verwachting is dat een dergelijke menging niet alleen de diversiteit en daarmee samenhangende fitness van de populaties zou verhogen, maar dat dit ook de gevolgen van de vermoedde inteeltdepressie kan counteren.

4. TRANSLOCATIESTRATEGIE

4.1 BRONPOPULATIES

4.1.1 Materiaal van Vlaamse origine

De twee resterende natuurlijke Vlaamse populaties zijn geïsoleerd en klein (www.meetnetten.be; Van Dingenen, 2018). In 2020-2022 werden deze twee populaties uit noodzaak gebruikt voor het stichten van nieuwe populaties. Beide zijn omwille van de lage genetische diversiteit, de zeer lage aantallen dieren in beide populaties en de daarmee samengaan slechte staat van instandhouding niet geschikt als bronpopulaties. Uit noodzaak is in 2020-2022 wel gebruik gemaakt van deze populaties. Om zo veel mogelijk de resterende genetische diversiteit te kunnen betrekken in de translocaties, geniet het de voorkeur een zo groot mogelijk aantal verschillende legfels in de kweek te betrekken.

Voor de bijplaatsingen, waarbij in 2020-2022 enkel larven en/of juvenielen zijn getransloceerd naar de bronpopulaties vanwaar ze afkomstig zijn, is m.a.w telkens een deel van de jaarlijkse nakomelingen bevoordeeld t.o.v. de nakomelingen uit legfels die niet werden ingezameld (hoewel naar een complete inzameling werd gestreefd, laat de grootte van de voortplantingswateren waarschijnlijk niet toe elk legfel op tijd te vinden). De kleinere genenpool van de nakomelingen uit de kweek wordt bevoordeeld t.o.v. de natuurlijke aanwas van de populatie. Dit laatste versnelt de genetische verarming van de populaties.

Het zuiver houden van bronpopulaties is een keuze die in dit geval niet onderbouwd kan worden vanuit de populatiegenetische kennis. Om beide zeltogende populaties op lange termijn te behouden is genetische inmenging nodig. Daarnaast is het verzamelen van legfels uit deze populaties een riskante onderneming, doordat het de genetische diversiteit verder laat afnemen en de populaties dermate klein zijn dat elke vorm van impact op de reeds zeer beperkte voortplanting de extinctiespiraal kan doen versnellen. Grootschalig habitattherstel gecombineerd met inmenging van gebiedsvreemde genen en geen/beperkte inzameling voor translocatie is in het geval van de twee overblijvende Vlaamse populaties de veiligste optie.

4.1.2 Materiaal van buitenlandse origine

Gezien de geringe grootte van de twee resterende Vlaamse populaties en de genetische toestand van de knoflookpad in West-Europa, is het raadzaam de genetische diversiteit van de uit te zetten dieren op te krikken door het inmengen van materiaal uit andere populaties. Hiervoor moeten we de landsgrenzen over.

Naast het beogen van een genetisch zo gezond mogelijke uitzet, wordt de nood aan bijkomende legfels ook onderstreept door de grote verschillen in het aantal Vlaamse legfels doorheen de jaren (Tabel 1). Een uitzet met een dergelijke variabiliteit in de (lage) output is niet gewenst omwille van verschillende strategische redenen (zie verder). Een oplossing voor dit kwantitatief probleem is het verkrijgen van materiaal uit het buitenland. Naar de toekomst toe kan dit eventueel afgebouwd worden als de kweekgroep (Tabel 5) een betrouwbare bijdrage kan leveren.

In samenwerking met Nederlandse partners voorziet ANB om vanaf 2023 knoflookpadlegfels vanuit Nederland te betrekken in de Vlaamse translocaties.



4.1.3 Genetisch mengen bij translocatie

4.1.3.1 Genetisch mengen voor bijplaatsingen

Uiterlijke kenmerken van met name de in 2020 opgekweekte larven met origine Vijvergebied laten zien dat deze merkkelijk kleiner zijn dan deze uit Peer. Een deel van de larven uit het Vijvergebied was misvormd en de dieren bleken na metamorfose zich niet zelfstandig te kunnen voeden (Figuur 8). Deze situatie was ook te zien in het ene legsel dat werd verzameld in 2021, waarbij misvormde dieren ongeveer 25% van het totaal uitmaakten. Bij de larven en metamorfen afkomstig van de drie legsels die werden verzameld in 2022 werden geen misvormingen vastgesteld, maar doken wel afwijkende kleurvormen op binnen een van de legsels van Peer.



Figuur 8: Opgekweekte metamorfen uit het kweekseizoen van 2020, herkomst Vijvergebied Midden-Limburg, met gedrongen lichaamsbouw en magere ledematen.

Mogelijk wijzen deze observaties, met inachtnaam van de voorgeschiedenis, kleine populatiegrootte en isolatiegraad, op inteelt-gerelateerde afwijkingen. Naast inteelt is door de lage genetische diversiteit het inmengen van gebiedsvreemde genetica een aan te raden strategie. Op de kleine biogeografische schaal is sterke lokale adaptatie zeer onwaarschijnlijk en uitkruisingsdepressie (of uitbreiding depression) niet te verwachten (Edmands, 2007; Hoffmann et al., 2020).

Uitkruisingsdepressie ontstaat wanneer populaties dermate genetisch aangepast zijn aan hun omgeving dat nakomelingen van kruisingen tussen individuen van verschillende populaties slechter aangepast zijn aan hun omgeving en daardoor een verlies aan fitness vertonen (Mergeay, 2014). In de recente wetenschappelijk literatuur heerst een groeiende consensus dat de kans op uitkruising ondergeschikt is aan het voordeel van mengen in het geval van populaties uit dezelfde biogeografische regio (Frankham et al., 2011; Ralls et al., 2018). In een recent verschenen reviewartikel concluderen Liddell et al. (2021) dat wanneer zowel inteelt als

uitkruisingsdepressie worden beschouwd het mengen van de genenpoelen duidelijk de voorkeur geniet. Als besluit achten we dat het via bijplaatsing inmengen van minstens 5 % (zoals ook voorgedragen door Mergeay & Verbist, 2021) gebiedsvreemd materiaal in de twee overgebleven populaties aan te raden is. Het inmengen van 5 % gebiedsvreemde genen houdt zeer weinig risico in voor de aanwezige populatie op uitbreiding depression, terwijl het de potentie heeft om met minimale inmenging de populatie genetisch betekenisvol te versterken (Liddell et al., 2021).

4.1.3.2 Genetisch mengen voor geassisteerde herkoloniserings en herintroducties

Voor geassisteerde herkoloniserings en herintroducties is het raadzaam een meer evenredige verdeling van materiaal van verschillende bronpopulaties uit te zetten. Omdat de doellocatie nog onbezet is, zullen de verschillende genetische herkomsten door kans en selectie worden beïnvloed en tot een evenwicht komen. Een hoge genetische startdiversiteit is dan ook vereist om de resulterende gestichte populatie genetisch divers te houden.

4.2 UITZET

Succesvolle kweekprogramma's worden gekenmerkt door aangehouden inspanningen over langere termijn (Griffiths & Pavajeau, 2008). Het uitzetten van larven gebeurt op elke locatie (= gebied, maar ook waterpartij) best gedurende minstens vier opeenvolgende jaren - zo wordt gedurende de loop van één generatietijd het ontwikkelen van een volledige leeftijdsopbouw betracht (Mergeay & Verbist, 2021). Vier jaar geldt hierbij als ondergrens: de overleving van de larven tussen jaren kan sterk fluctueren door tal van factoren, waardoor een langer volgehouden uitzet van zes jaar de voorkeur geniet.

De uitzetinspanningen moeten echter ook een eindpunt kennen. Niet elke uitzet slaagt. Indien ondanks het ondernemen van alle stappen voor het welslagen, zich geen zelfstandige populatie ontwikkelt, moet men durven de uitzetinspanning te staken en het realiseren van de IHDs in andere gebieden betrachten. Dergelijke evaluatie dient te steunen op adequate monitoring (zie verder).

Gezien de maximale capaciteit van het Onderzoekscentrum voor Aquatische Fauna zal niet naar alle potentiële locaties gelijktijdig getransloceerd kunnen worden. In functie van de habitatgeschiktheid (zie onder) kan best een prioritering/volgorde opgemaakt worden van de doelgebieden. De actuele en historische leefgebieden werden omstandig geëvalueerd door Verhees et al. (2020). Helaas beslaan deze slechts een klein deel van het actueel potentieel relevant leefgebied van de soort (Maes et al., 2017) en werd de aanwezigheid van (invasieve) vissoorten in de waterlichamen niet nagegaan.

In functie van de realisatie van duurzame knoflookpadpopulaties is het van belang de juiste gebieden te kiezen. De feitelijke selectie valt buiten de scope van dit rapport.

4.2.1 Vlaams areaal voor translocatie

Bij selectie van potentiële uitzetlocaties geldt het historisch areaal (Figuur 1) als uitgangspunt (Mergeay & Verbist, 2021). Oude literatuurbronnen geven het verspreide voorkomen van de knoflookpad aan op de pleistocene zandgronden in de Antwerpse en Limburgse Kempen, van Kalmthout tot op en langs de randen van het Kempens Plateau, met overige waarnemingen uit onder meer de Druivenstreek (Bierbeek) en de Demervallei in Vlaams-Brabant (Boortmeerbeek, Haacht, Rotselaar, Tremelo) en de omgeving van Gent en Koksijde. Kortom, het historisch areaal



van de knoflookpad omvat ongeveer het volledige Vlaams grondgebied (de Witte, 1948; Sparreboom, 1981; Parent, 1984; Bauwens & Claus, 1996).

Op lange termijn lijkt het streven naar ruime herkolonisatie van het historisch leefgebied aan te bevelen om het duurzaam behoud van de soort te verzekeren. Op kortere termijn lijkt het echter raadzaam om vooreerst een handvol levenskrachtige populaties met hoge genetische diversiteit te realiseren. Hiervoor komen niet noodzakelijkerwijs de recent verlaten leefgebieden in aanmerking, maar dient binnen het volledig areaal gekeken te worden waar de kansen voor het uitbouwen van een gezonde (meta)populatie zich bevinden, de leefgebiedenstudie (Verhees et al., 2020) schiet in dit aspect te kort, door een te beperkte zoekzone.

4.2.2 Uitzet op niveau van de doellocatie

Duurzaam voortbestaan van populaties heeft de grootste slaagkans wanneer een netwerk van populaties mogelijke calamiteiten in één deelgebied kan opvangen door natuurlijke herkolonisatie vanuit naburige gebieden. Er wordt m.a.w. gewerkt aan de ontwikkeling van metapopulaties. De gewenste connectiviteit is echter een moeilijk punt voor de knoflookpad. Enkel gezonde populaties slagen erin nieuwe geschikte waterpartijen over afstanden van ca. 200 m zonder noemenswaardige dispersieknelpunten te koloniseren (Rannap & Rannap, 2016). Dit levert in het huidige Vlaamse landschap ernstige beperkingen op. Het verdient dan ook overweging of connectiviteit tussen gebieden überhaupt realiseerbaar zal zijn. Gezien de toestand van de soort in Vlaanderen wordt de focus in eerste instantie dan ook best gelegd op veiligstellen en versterken van huidige en nieuw te stichten populaties, en pas in een latere fase op verbinden en verbreiden.

Meer dan bij de andere inheemse amfibiesoorten is de reproductieve output en overleving van de knoflookpad beduidend laag en onderhevig aan stochastische processen. Dit betekent niet alleen dat een uitzet een meerjarige inspanning in goedgekozen (potentiële) leefgebieden vereist, maar ook dat het welslagen binnen een bepaald gebied afhangt van hoe het beschikbare materiaal wordt verdeeld over de beschikbare waterpartijen. Ook binnen één waterlichaam wordt daarom best getracht de larven van verschillende bronpopulaties uit te zetten. Naast de af te toetsen criteria voor habitatgeschiktheid (zie verder), geldt hierbij de (ook in Nederland gehanteerde) stelregel dat binnen een gebied wordt uitgezet in minstens vier geschikte waterpartijen die zich binnen een straal van 500 m bevinden.

Het aantal larven dat per waterpartij kan worden uitgezet hangt af van de variabele opbrengst van de kweek. Zoals onze noorderburen adviseren we hierin voor kleinere waterpartijen jaarlijks minimaal 300 en voor grotere waterpartijen minimaal 600 grote larven uit te zetten. Vooral in nieuw te koloniseren gebieden is het van belang voldoende dieren uit te zetten opdat een deel de geslachtsrijpe leeftijd kan bereiken en vervolgens zelf tot voortplanting kan overgaan. Dit deel dient groot genoeg te zijn om de populatie te kunnen laten aangroeien. Hoewel dit slechts richtwaarden zijn en de lokale situatie (poelaanbod, -grootte, ...) dient te worden beschouwd, raden we anderzijds aan deze waarden niet in veelvoud te overschrijden. Een overmaat aan larven kan leiden tot ongewenste dichtheidseffecten (Hels, 2002), beperkt het aantal gebieden waarin simultaan aan populatieontwikkeling kan gewerkt worden en kan uitmonden in een overschatting van het uitzetsucces op korte of middellange termijn. Beter is om de uitzet als een kiem te zien die zelf (mits geschikte leefgebied etc.) zich kan ontwikkelen in functie van de draagkracht van elke specifiek leefgebied. We pleiten dan ook voor voldoende ruime uitzet eerder dan 'overstocking'. Jaarlijks vergelijkbare aantallen in de verschillende waterpartijen

binnen een gebied uitzetten is niet essentieel, maar biedt wel de gelegenheid de populatieontwikkeling beter te kunnen interpreteren.

4.3 MONITORING

4.3.1 Klassieke monitoring

Terwijl een Vlaams monitoringsmeetnet reeds operationeel is voor het opvolgen van de toestand en trend van de soort op gewestelijk niveau (systeemmonitoring - Speybroeck et al., 2020), vereist een uitzetproject meer specifieke opvolging (projectmonitoring). Vanaf het moment dat de uitzet stopgezet wordt én de populatie zich op eigen houtje verder ontwikkelt, kan ze worden toegevoegd aan de systeemmonitoring. Vóór die tijd is intensievere opvolging aangewezen. Deze wordt ook als essentieel aangeduid in de Leidraad Translocaties (Mergeay & Verbist, 2021) om het al dan niet welslagen van de uitzet conform de IUCN-richtlijnen voor translocaties (IUCN/SCC, 2013) te kunnen rapporteren. Zo kan kennis verzameld worden ter voorbereiding van toekomstige uitzetacties en hoe deze dienen te worden uitgevoerd.

Hieronder geven we een beknopt overzicht van verschillende mogelijke onderdelen van de projectmonitoring. Monitoring is wenselijk voor elke uitzetlocatie. Methodologische aspecten worden deels beschreven door Speybroeck et al. (2020), al is voor projectmonitoring een hogere frequentie van opvolging aangewezen. In gebieden waar het tellen van roepende dieren bemoeilijkt wordt door de aanwezigheid van roepkoren van boomkikker (*Hyla arborea*) is het tellen met hydrofoon alsook de inzet van aanvullende methodes aan te raden. Hieronder geven we een beknopt overzicht van de diverse monitoringsmethodologie.

4.3.1.1 Waterhabitat

- Tellen van roepende dieren met een draagbare dan wel ter plekke gestationeerde hydrofoon
- Larven bemonsteren met schepnet en (eventueel met lokaas voorziene) fuiken
- Met behulp van eDNA de aanwezigheid van larven en adulten (kwantitatief) nagaan
- Schermenonderzoek, met mogelijkheid tot vangst-merk-hervangst onderzoek (ter bepaling van populatiegrootte, overleving en detectiekans)
 - Voorjaar - adulten
 - Zomer - juvenielen

4.3.1.2 Landhabitat

- Gestandaardiseerde tellingen van (eventueel daartoe optimaal ingerichte) zoekzones op actieve dieren, inclusief door middel van het zoeken naar oogreflectie met een hoofdlamp. Ook hierbij kan (mits voldoende veldinspanning) vangst-merk-hervangst worden overwogen, eventueel samensprekend met schermenonderzoek.

4.3.2 Genetische monitoring

Genetische monitoring geeft cruciale informatie over de evolutionaire processen waaraan populaties onderworpen zijn: verlies van genetische variatie (weergegeven door de effectieve populatiegrootte N_e en veranderingen in gendiversiteit en allelenrijkdom), genetische uitwisseling tussen deelgebieden van een metapopulatie en inteelt. Phillips et al. (2020) illustreren de meerwaarde van genetische monitoring na herintroductie van rugstreeppad (*Epidalea calamita*).



De ideale strategie is om bij aanvang van uitzetting te bepalen wat er concreet uitgezet wordt van genetische diversiteit en rijkdom (T0), om daarna op vaste intervallen van circa 1 generatie (3-4 jaar) een representatieve staalname uit te voeren en aan hetzelfde genetische protocol te onderwerpen. Daarbij geeft de verandering in genetische parameters (genetische diversiteit H_e , allelenrijkdom AR, inteeltcoëfficiënten F en effectieve grootte N_e) een beeld van de toestand van de herintroductie. De aantallen die gemonitord moeten worden hangen af van de concrete ruimtelijke verspreiding van deelpopulaties binnen een gebied. We raden aan om, indien mogelijk, per populatie minstens 30 individuen te genotyperen. De concrete opzet hangt echter af van de grootte van de deelgebieden en eventuele ruimtelijke structuur die dispersie belemmert of vergemakkelijkt. Zulke monitoring wordt echter maar zinvol wanneer de populatie zich spontaan kan ontwikkelen en het signaal van lokale genetische veranderingen niet vermengd wordt met dat van bijkomende uitzettingen.

Momenteel is er een panel van circa 15 microsatellietmerkers (een type sterk variabele genetische merkers) in gebruik. Dit wordt voor compatibiliteit met nieuwere DNA sequencing technologieën vervangen door een panel van 200-400 SNPs (single nucleotide polymorphisms, variabele plaatsen van één base in het genoom die ook voor monitoring gebruikt worden).



5. HABITATGESCHIKTHEIDSCRITERIA

Cruciaal in de selectie van geschikte uitzetlocaties is het toetsen van de gebieden aan criteria die op basis van de beschikbare kennis de geschiktheid van leefgebieden voor knoflookpad bepalen. Hoewel een veelheid aan interacties tussen omgevingsvariabelen dit sterk contextafhankelijk maakt en deze criteria niet altijd kunnen steunen op onweerlegbaar experimenteel bewijs, bestaat een vrij brede ecologische kennis over de soort in binnen- en buitenland. Vooral bij het stichten van nieuwe populaties is het van belang deze criteria als minimale doelstellingen te beschouwen.

De nood aan habitatgeschiktheidscriteria wordt onderstreept door de veranderingen in de (voormalige) Vlaamse leefgebieden. Onder meer verzuring van waterpartijen, de intrede van invasieve vissoorten (blauwbandgrondel, zonnebaars, Amerikaanse hondsvij, gibel, ...), het verlies van open pioniersituaties in de landhabitat, het verdwijnen van door grondwater of overstromingen van beken gevoede vochtige depressies, het steeds vroeger in het jaar droogvallen etc. zorgen ervoor dat de huidige leefgebieden waar knoflookpad (niet meer) voorkomt niet richtinggevend zijn aangaande de criteria waaraan geschikt leefgebied dient te voldoen.

De criteria (Tabel 6) omvatten onder meer elementen met betrekking tot water- en landhabitat, connectiviteit, beheer(garanties) en herhaaldelijke toetsing. Visvrije waterpartijen met voldoende waterpermanentie (bv. na te gaan aan de hand van het gemiddelde van de laagste grondwaterstanden, te meten in september-oktober), alsook de beschikbaarheid van open, vergraafbaar landhabitat in de directe nabijheid verdienen bijzondere aandacht. De criteria zijn gebaseerd op een uitgebreide literatuurlijst (Creemers & van Delft, 2009; Duguet & Melki, 2003; ANB, 2015; Lommaert et al., 2020; Mergeay & Verbist, 2021; Nöllert et al., 2012; Paelinckx, 2009; Rannap & Rannap, 2016; van Doorn et al., 2021; Verhees et al., 2020; Verschraegen & Beckers, 2015).



Tabel 6: Habitatgeschiktheidscriteria voor translocatie van knoflookpad.

onderwerp	criterium	waarde	noodzaak
leefgebied	oppervlakte	min. 160 ha, al dan niet verdeeld over meerdere functioneel verbonden deelpopulaties	matig
water	aantal geschikte waterpartijen	min. 4 in een straal van 500 m	hoog
water	verbindingen	snoer van geschikte waterpartijen met 200 m onderlinge afstand	hoog
water	aanwezigheid vis	geen	hoog
water	oppervlakte per poel (lente)	500-2000 m ² (100-2000 m ²)	hoog
water	waterdiepte (lente)	60-150 cm (30-150 cm)	matig
water	droogvalfrequentie vóór eind augustus	niet	hoog
water	droogvalfrequentie na eind augustus	elke 3-5 jaar wenselijk	matig
water	trofiegraad	meso-eutroof	hoog
water	zuurtegraad	6,5-8	hoog
water	beschaduwing	max. 30%	matig
water	verticale oevervegetatie	aanwezig	matig
water	submerse vegetatie	minstens 50%	matig
water	emerse vegetatie	20-50%	matig
water	doorzicht	helder	hoog
water	bodemtextuur	stevig, geen dikke sliblaag	hoog
land	bodemtextuur	los, vergraafbaar, < 20% klei, successie behoudt aspect voor komende 6 jaar	hoog
land	begroeiing - kruiden	schraal, pionierstadium, zonbeschenen, met voldoende open zand	hoog
land	begroeiing - bomen	max. 25% bedekking	hoog
land	aandeel	min. 60% geschikt landhabitat in 300 m straal rond waterhabitat	hoog
land	afstand tot waterhabitat	0-50 m	hoog
land	migratie	knelpunten afwezig	matig
land	vochtvariatie	vochtig tot vrij droge zones aanwezig	matig
beheer	herhaling habitatgeschiktheidstoets	1 keer per 3 jaar	hoog
beheer	duurzame geschiktheid habitat o.b.v. beheersgaranties op korte termijn	aanwezig	hoog
beheer	uitvoerder herhaalde toetsing	vastgelegd	hoog

De aangewende literatuurbronnen zijn veelal eensluidend over welke variabelen (en welke waarden) relevant zijn. Algemeen kan gesteld worden dat het welslagen van een uitzet staat of valt met buitengewone zorg voor de habitatkenmerken. Zelfs mét deze zorg is succes niet gegarandeerd en is variabiliteit aanzienlijk (Rannap et al., 2015). Om te vermijden dat stochasticiteit en kennishiaten leiden tot het opnieuw verdwijnen van uitzetpopulaties, stellen we bepaalde criteria danig scherp. Zo stelt de LSVI-tabel dat de aanwezigheid van slechts één geschikte waterpartij van 400 m² mag gelden als ondergrens van het geschikte aantal waterpartijen. Bij een uitzet is het echter nooit raadzaam de precieze drempelwaarden tot doel te stellen - om de kansen op het blijven bestaan van een populatie op te drijven moet de lat hoger gelegd worden. Uitzet in één geïsoleerde waterpartij kan door de steeds moeilijk te voorspellen slaagkansen nooit gelden als veilige aanpak (Rannap et al., 2012). Onderzoek toonde aan dat poelen met vergelijkbare waarden voor tal van populatiekenmerken, waaronder seksratio, aantal eieren per vrouwtje, fertiele fractie van de vrouwtjes en adulte overleving, toch

////////////////////////////////////

significante verschillen in juveniele overleving kunnen vertonen (Hels, 2002). Als men alles inzet op één waterpartij (en logischerwijze ook één naburige landhabitatmatrix), kan één calamiteit het voortbestaan van een hele populatie hypothekeren.

Om vergelijkbare redenen pleiten we onder meer voor de totale afwezigheid van vis (o.a. Nyström et al., 2002; Rannap & Rannap, 2016). Hoewel een zekere graad van predatie deel uitmaakt van de natuurlijke biotische interacties in het aquatisch ecosysteem, gaat het in de praktijk veelal om uitheemse vissoorten met de eigenschappen van toppredatoren. Door gebrek aan co-evolutie zijn inheemse amfibieënlarven hier niet tegen opgewassen en vormt dit een bijzonder ernstige bedreiging voor het welslagen van de uitzet. De actuele situatie is dermate precair dat het belangrijk is om optimale kraamkamers te creëren voor deze soort. Invasieve vissoorten horen daar niet in thuis.

Verder dienen de voortplantingswateren niet te zeer geëutrofeerd noch verzuurd te zijn, met aanwezigheid van voldoende (submerse) macrofyten (o.a. Nyström et al., 2007; Rannap & Rannap, 2016). Het (matig) voedselrijke karakter van de waterpartijen houdt verband met de lange aquatische ontwikkelingsfase van de groot wordende larven. Hoewel variatie in waterdieptes gekend is, geniet een voorjaarswaterpeil van ca. 1 m de voorkeur, zoals ook spreekt uit de leefgebieden in de buurlanden (o.a. Aumaître, 2014; Gillette et al., 2014; Menke et al., 2016; Rannap & Rannap, 2016; Verhees et al., 2020). Hierin verschilt de soort duidelijk van zuiderse verwante soorten, die zich veel vaker en met meer succes voortplanten in ondiepe waterpartijen (Speybroeck et al., 2016). Ook de oppervlakte van de waterpartijen varieert, al wordt een minimumoppervlakte van 1000 m² doorgaans als wenselijk aangeduid (Rannap et al. 2012, Verhees et al., 2020). Harde waterbodems (zoals klei) genieten de voorkeur (Rannap & Rannap, 2016). Overige criteria ten aanzien van de waterhabitat zijn weergegeven in Tabel 6.

Bij amfibiegericht beheer wordt vaak veel aandacht geschonken aan de kwaliteit van voortplantingshabitats. Aangezien de post-metamorfe levensstadia het grootste deel van hun leven op het land doorbrengen, zijn landhabitatkenmerken zeker even belangrijk. Ook de ruim 15 jaar praktijkervaring bij kweek en met name uitzet van knoflookpadden in Nederland wijzen in die richting (Crombaghs, pers. med.) - geschikte waterpartijen geven matige populatieontwikkeling zonder adequate ontwikkeling en beheer van open, zandige of zand-lemige landhabitat. Hels & Nachman (2008) benadrukten de rol van juveniele overleving. Hun stochastische modelsimulaties tonen hoe juveniele overleving een groter effect heeft op de duurzame overleving van subpopulaties dan adulte overleving en fecunditeit. Samen met van nature relatief lage dichtheden (en dus meer kans op verlies van individuen door random dispersie) en beperkte jaarlijkse overleving, onderschrijven deze onderzoeksresultaten de nood aan het zo klein mogelijk houden van de afstand tussen land- en waterhabitat (Rannap et al. 2012). Aanwezigheid van bomen nabij de voortplantingswateren dient te worden vermeden (Rannap et al. 2012). Overige criteria inzake landhabitat zijn weergegeven in Tabel 6.

Beheergaranties en het met vaste regelmaat herhalen van de toets inzake habitatgeschiktheid maken integraal deel uit van de criteria.

Referenties

ANB 2015. Soortenbeschermingsprogramma voor de knoflookpad. Natuurpunt Studie in opdracht van het Agentschap Natuur en Bos.

Aumaître D. (red.). 2014. Plan national d'actions du pélobate brun (*Pelobates fuscus* Laurenti, 1768). Déclinaison régionale Lorraine 2014-2018. CEN Lorraine – Commission Reptiles et Amphibiens de Lorraine).

Bauwens D., Claus K. 1996. Verspreiding van amfibieën en reptielen in Vlaanderen. De Wielewaal Natuurvereniging v.z.w., Turnhout.

Brys R., Everts T., Deflem I., Neyrinck S. 2022. Een eDNA-screening naar de aanwezigheid van knoflookpad (*Pelobates fuscus*) in de Maten. INBO rapport, niet publiek beschikbaar.

Cogălniceanu D., Székely P., Székely D., Roşioru D., Băncilă R.I., Miaud C. 2013. When Males Are Larger than Females in Ectotherms: Reproductive Investment in the Eastern Spadefoot Toad *Pelobates syriacus*. 4:699-706. <https://doi.org/10.1643/CE-12-053>

Creemers R.C.M., van Delft J.J.C.W. 2009. De amfibieën en reptielen van Nederland. Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis. 476 pp.

de Witte G.F. 1948. Faune de Belgique. Amphibiens et reptiles. Deuxième édition. Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique, Bruxelles.

Dufresnes C., Strachinis I., Tzoras E., Litvinchuk S.N., Denoël M. 2019. Call a spade a spade: taxonomy and distribution of *Pelobates*, with description of a new Balkan endemic. *ZooKeys* 859: 131-158. <https://doi.org/10.3897/zookeys.859.33634>

Duguet R., Melki F. (eds.). 2003. Les amphibiens de France, Belgique et Luxembourg. Éditions Biotope. 480 pp.

Edmands S. 2007. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology* 16: 463-475. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03148.x

Frankham R., Ballou J.D., Eldridge M.D.B., Lacy R.C., Ralls K., Dudash M.R., Fenster C.B. 2011. Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation Biology* 25: 465-475.

Gillette M., Chrétien Souris, M. (eds.). 2014. Plan national d'actions en faveur du pélobate brun *Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768). 2014-2018. DREAL Lorraine & Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie.

Goovaerts J., Honnay O. & Ceulemans T. 2018. Phantom populations and extinction debt. *Biodiversity in fragmented habitats in the Hageland (Belgium)*, *Natuur.focus* 17(1): 18-28. [in Dutch]

Griffiths R.A., Pavajean L. 2008. Captive breeding, reintroduction, and the conservation of amphibians. *Conservation Biology* 22(4): 852-861.

////////////////////////////////////

Hels T. 2002. Population dynamics in a Danish metapopulation of spadefoot toads *Pelobates fuscus*. *Ecography* 25: 303-313.

Hels T., Nachman G. 2008. Simulating viability of a spadefoot toad *Pelobates fuscus* metapopulation in a landscape fragmented by a road. *Ecography* 25(6): 730-744.

Hoffmann A.A., Miller A.D., Weeks A.R. 2021. Genetic mixing for population management: From genetic rescue to provenancing. *Evolutionary Applications* 14: 634-652. 10.1111/eva.13154

IUCN/SSC. 2013. Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0. ISBN: 978-2-8317-1609-1. Gland, Switzerland: IUCN Species Survival Commission.

Jooris R., Engelen P., Speybroeck J., Lewylle I., Louette G., Bauwens D., Maes, D. 2012. De IUCN Rode Lijst van de amfibieën en reptielen in Vlaanderen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2012 (22).

Kowalewski L. 1974. Observations on the phenology and ecology of amphibia in the region of Czestochowa. *Acta Zoologica Cracoviensia* 19:3.

Lommaert L., Adriaens D., Pollet M. (red.). 2020. Criteria voor de beoordeling van de lokale staat van instandhouding van de Habitatrictlijnsoorten in Vlaanderen. Versie 2.0. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2020 (28). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. DOI: doi.org/10.21436/inbor.8193367

Liddell E., Sunnucks P., Cook C.N. 2021. To mix or not to mix gene pools for threatened species management? Few studies use genetic data to examine the risks of both actions, but failing to do so leads disproportionately to recommendations for separate management. *Biological Conservation* 256: 109072.

Maes D., Anselin A., De Knijf G., Denys L., Devos K., Gouwy J., Leyssen A., Packet J., Pauwels I., Pollet M., Speybroeck J., Stienen E., Thomaes A., T'jollyn F., Van Den Berge K., Van Landuyt W., Van Thuyne G., Vermeersch G., Verhaeghe F. 2017. Afbakenen van actueel relevant potentieel leefgebied voor een selectie van Europees prioritaire soorten. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2017 (30). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

Menke N., Göcking C., Geiger A. 2016. Die Knoblauchkröte (*Pelobates fuscus*). Verbreitung, Biologie, Ökologie, Schutzstrategien und Nachzucht. LANUV-Fachbericht 75. Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen.

Mergeay J. 2014. Advies in het kader van de opmaak van een soortenbeschermingsprogramma voor de knoflookpad in Vlaanderen. Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. INBO.A.3139. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

Mergeay J., Verbist V. 2021. Leidraad Translocaties voor Biodiversiteit in Vlaanderen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2021 (13). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. DOI: doi.org/10.21436/inbor.34130911

Nöllert A., Grossenbacher K., Laufer H. 2012. *Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768) – Knoblauchkröte. – pp. 465-562 in Grossenbacher, K. (Hrsg.): Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. – Band 5/I, Froschlurche (Anura) I (Alytidae, Bombinatoridae, Pelodytidae, Pelobatidae). – AULA-Verlag GmbH, Wiebelsheim.

Nyström P., Birkedal L., Dahlberg C., Brönmark C. 2002. The declining spadefoot toad *Pelobates fuscus*: calling site choice and conservation. *Ecography* 25: 488-498.



Nyström P., Hansson J., Månsson J., Sundstedt M., Reslow C., Broström A. 2007. A documented amphibian decline over 40 years: possible causes and implications for species recovery. *Biological Conservation* 138(3-4): 399-411.

Parent G.H. 1984. Atlas des batraciens et reptiles de Belgique. Cahiers d'Ethologie Appliquée 4: 1-198.

Phillips S., Geary M., Allmark M., Bennett S., Norman K., Ball R., Peters C., Muir A.P. 2020. The importance of long-term genetic monitoring of reintroduced populations: inbreeding in the natterjack toad (*Epidalea calamita*). *The Herpetological Journal*, 30(3), 159-167.

Ralls K., Ballou J.D., Dudash M.R., Eldridge M.D.B., Fenster C.B., Lacy R.C., Sunnucks P., Frankham R. 2018. Call for a paradigm shift in the genetic management of fragmented populations. *Conservation Letters* 11(2): 1-6.

Rannap R., de Vries W., Briggs L. 2012. Criteria for assessing the favourable conservation status of *Pelobates fuscus*. Project report "Securing *Leucorrhinia pectoralis* and *Pelobates fuscus* in the northern distribution area in Estonia and Denmark". LIFE08NAT/EE/000257

Rannap R., Kaart T., Iversen L.L., de Vries W., Briggs L. 2015. Geographically varying habitat characteristics of a wide-ranging amphibian, the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*), in Northern Europe. *Herpetological Conservation and Biology* 10(3): 904-916.

Rannap R., Rannap V. (eds.). 2016. Protection of the yellow-spotted whiteface and the common spadefoot toad. Best practice guidelines. Report LIFE08NAT/EE/000257 Dragonlife project.

Roosen R. 2008. Soortbeschermingsplan knoflookpad. Rapport van Limburgs Landschap VZW. In opdracht van het Agentschap voor Natuur en Bos, Brussel.

Sparreboom M. (red.). 1981. De amfibieën en reptielen van Nederland, België en Luxemburg. A.A. Balkema, Rotterdam.

Speybroeck J., Beukema W., Bok B., Van Der Voort J., Velikov I. 2016. Field guide to the amphibians and reptiles of Britain and Europe. British Wildlife Publishing, Bloomsbury. 432 pp.

Speybroeck J., De Bruyn L., Van de Poel S., Ledegen H., Westra T. 2020. Monitoringsprotocol amfibieën en reptielen. Versie 2.0. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2020 (22). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. doi.org/10.21436/inbor.17954118

van Doorn L., Auwerx J., Speybroeck J. 2021. Advies over het onderhoud van de poelen in Bomerhei (Peer) i.f.v. knoflookpad. INBO.A.4068.

Van Dingenen R. 2018. Inventarisatie knoflookpad Boomerhei Peer 2018. Powerpoint- presentatie Natuurpunt.

Verhees J., de Jong V., Lewylle I. 2020. Actieplan knoflookpad Vlaanderen. Evaluatie leefgebieden en haalbaarheidsstudie. Rapportnr. 17-233. Natuurbalans - Limes Divergens BV, Nijmegen.

Verschraegen T., Beckers G. 2015. Visvrij amfibieënbeheer in Vijvercomplex Midden-Limburg en de herontdekking van de knoflookpad. *Natuur.focus* 14(1): 17-25.

//