



Vlaanderen
is wetenschap

Monitoring en populatiegenetische analyse van heikikker in Vlaanderen: Toestand 2021 en 2023

Caroline Mouton, Io Deflem, Sabrina Neyrinck, Jeroen Speybroeck, An Van Breusegem, Loïc van Doorn, Daan Van Eenaeme, Bailey Van Gils, Joachim Mergeay

INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK

Auteurs:

Caroline Mouton , Io Deflem , Sabrina Neyrinck , Jeroen Speybroeck , An Van Breusegem ,
Loïc van Doorn , Daan Van Eenaeme, Bailey Van Gils, Joachim Mergeay 
Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Reviewers:

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:

caroline.mouton@inbo.be

Wijze van citeren:

Mouton C., Deflem I., Neyrinck S., Speybroeck J., Van Breusegem A., van Doorn L., Van Eenaeme D., Van Gils B., Mergeay J.(2023). Monitoring en populatiegenetische analyse van heikikker in Vlaanderen: Toestand 2021 en 2023. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2023 (56). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
DOI: doi.org/10.21436/inbor.100329493

D/2023/3241/469

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2023 (56)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Hilde Eggermont

Foto cover:

Heikikkers (J. Mentens/Vilda)

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/).

MONITORING EN POPULATIEGENETISCHE ANALYSE VAN HEIKIKKER IN VLAANDEREN: TOESTAND 2021 EN 2023

Caroline Mouton, Io Deflem, Sabrina Neyrinck, Jeroen Speybroeck, An Van Breusegem, Loïc van Doorn, Daan Van Eenaeme, Bailey Van Gils en Joachim Mergeay

doi.org/10.21436/inbor.100329493

Dankwoord

Dit onderzoek kwam tot stand met behulp van het Agentschap Natuur- en Bos van de Vlaamse overheid. We bedanken Katleen Vandenbergh graag in het bijzonder. Vervolgens danken wij ook alle leden van de stuurgroep, de verschillende regiobeheerders, betrokken boswachters, gebiedscoördinatoren en ieder die heeft bijgedragen aan het tot een goed einde brengen van dit project.

Samenvatting

De heikikker (*Rana arvalis*) komt in onze regio voor in halfopen heide- en veengebieden. Hij gedijt vooral in gebieden met weinig tot matig voedselrijke grond. Het verspreidingsgebied van de heikikker strekt zich uit over een groot deel van het Europese vasteland. In België vinden we de soort alleen nog in de provincies Antwerpen en Limburg. Daar is ze een prioritaire soort. Het leefgebied van de heikikker is sterk versnipperd en afhankelijk van beschermde gebieden. In 2013 werd de heikikker in Vlaanderen geclassificeerd als 'kwetsbaar'. Gedurende de laatste decennia heeft deze soort, vooral in het westelijke deel van zijn verspreidingsgebied, te lijden gehad onder het verlies van zijn typische leefgebieden en voortplantingspoelen. De heikikker kreeg ook te maken met een afname van de kwaliteit van geschikte habitats door vervuiling, eutrofiëring en verzuring. Dit kan hoofdzakelijk toegeschreven worden aan toenemende verstedelijking en intensivering van de landbouw. De heikikker staat vermeld in Bijlage IV van de Habitatrictlijn (92/43/EEG), wat betekent dat zowel de soort als zijn leefgebied van communautair belang zijn en daarom strikte bescherming vereisen. In 2019 kreeg de soort een Soortenbeschermingsprogramma toegewezen.

Dit onderzoek heeft de genetische toestand van Vlaamse heikikkerpopulaties onderzocht aan de hand van de actuele genetische diversiteit en de genetische structuur. In snel veranderende omgevingen is voldoende genetische diversiteit essentieel voor het voortbestaan van populaties. Het monitoren van de genetische toestand omvat het onderzoeken van: de genetische diversiteit, de bestaande genetische structuren en verschillen tussen de vindplaatsen van heikikker. We bemonsterden hiervoor DNA uit bevruchte eitjes, verzameld in het voorjaar van 2021 en 2023 uit alle gekende vindplaatsen van heikikker in Vlaanderen. Deze monitoring maakte hiervoor gebruik van genetische variatie op microsatelliet-merkers.

Door het evalueren van verschillende maten van genetische diversiteit en andere genetische kenmerken, vormt dit onderzoek een basis voor weloverwogen beslissingen en toekomstige stappen met betrekking tot het behoud van de heikikker. Over het algemeen tonen de analyses geen sterke verschillen tussen de waargenomen (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e). De heterozygositeit is ook op alle locaties relatief hoog en vertoont nergens opvallende afwijkingen. Eenzelfde patroon kan worden teruggevonden voor allelische rijkdom (AR). Op het eerste zicht lijkt geen enkele populatie dus genetische verarming te vertonen. We zien echter wel grote verschillen in de effectieve populatiegrootte (N_e). Slechts enkele locaties benaderen de vooropgestelde grenswaarden voor een gunstige staat van instandhouding. Deze resultaten sluiten aan bij eerder onderzoek uit 2013, waarbij een inschatting werd gemaakt van de duurzaamheid van populaties op basis van de hoeveelheid leefgebied. We vonden weinig genetische structuur tussen populaties, wat aangeeft dat er in het verleden heel wat uitwisseling plaats gevonden heeft.

We concluderen dat er lokaal een gunstige genetische basis is voor de heikikker. De kleine effectieve populatiegrootte van de meeste populaties vormt echter een risico voor duurzaam behoud in de toekomst. We adviseren om deze populatiekernen te vergroten via uitbreiding van het leefgebied, en waar mogelijk ook de connectiviteit ertussen te verbeteren.

English abstract

The moor frog (*Rana arvalis*) is found in our region specifically within semi-open heath and peatlands, where it is predominantly located in areas with low to moderately nutrient-rich soils. Moor frogs have an extensive distribution covering a significant portion of the European mainland. In Belgium, moor frogs are now only found in the provinces of Antwerp and Limburg, where they are considered a priority species. Their habitat is highly fragmented and often relies on protected areas. In Flanders, moor frog was classified as 'vulnerable' in 2013. Over recent decades, especially in the western part of its distribution area, this species has suffered from the loss of its typical habitats and breeding ponds, as well as a decline in the quality of suitable habitats due to pollution, eutrophication, and acidification. These issues are mainly attributed to an increase in urbanisation and agricultural intensification. The moor frog is listed in Annex IV of the Habitat Directive (92/43/EEC), indicating that both the species and its habitat are of great importance and require strict protection. In 2019, a Species Protection Program was established for this species.

This study investigated the genetic status of moor frog populations in Flanders based on current genetic diversity and structure. In rapidly changing environments, sufficient genetic diversity is essential for population survival. Monitoring the genetic status involves examining genetic diversity, existing genetic structures, and differences between studied locations. For this purpose, we sampled DNA from fertilized eggs collected in the spring of 2021 and 2023 from all known moor frog sites in Flanders. This monitoring used genetic variation using microsatellite markers.

By assessing various measures of genetic diversity and other genetic characteristics, this research establishes a foundation for informed decisions and future actions on the conservation of moor frogs. In general, the analyses reveal no substantial differences between observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e). The heterozygosity remains consistently and relatively high in all locations without noticeable deviations. The same trend is observed for allelic richness (AR). At first glance, no population seems to exhibit genetic depletion. However, significant disparities are evident in the effective population size (N_e). Only a few locations approach the designated threshold for a favourable conservation status. These findings are consistent with estimates from 2013, where the assessment of the population sustainability was roughly based on habitat quantity. Moreover, we observed minimal genetic structure between populations, indicating extensive historical gene flow among the studied locations.

We conclude that, at a local level, there's a favourable genetic foundation for moor frog in Flanders. However, the small effective population size of most populations poses a risk for future sustainable conservation. We therefor recommend enlarging these population cores through habitat expansion and, where possible, improving the connectivity between them.

Inhoudstafel

Dankwoord	2
Samenvatting	3
English abstract	4
Lijst van figuren	6
Lijst van tabellen	7
1 Inleiding en doelstellingen	8
1.1 Heikikker (<i>Rana arvalis</i>) in Vlaanderen en Europa.....	8
1.2 Conservatie- en populatiegenetica	9
1.3 Doelstellingen	11
2 Werkwijze.....	12
2.1 Staalname 2021-2023	12
2.2 Genetische analyses.....	13
2.2.1 DNA-extractie	13
2.2.2 ddPCR en soortensamenstelling.....	15
2.2.3 RFLP-analyse en soortenidentificatie	15
2.2.4 Microsatelliet-analyse en genotypering	16
2.3 Verwerking van de data: Populatiegenetische analyses.....	16
2.3.1 Analyse van de gecombineerde dataset (2021 en 2023)	16
2.3.2 Genetische diversiteit (uH_e , H_o en AR) en effectieve groottes (N_e)	16
2.3.3 Genetische structuur (F_{ST} , PCA en DAPC)	17
3 Resultaten	19
3.1 Genetische diversiteit (uH_e , H_o en AR) en effectieve groottes (N_e).....	19
3.2 Genetische structuur (F_{ST} , PCA en DAPC).....	23
4 Discussie en conclusies.....	26
4.1 Genetische diversiteit (uH_e , H_o en AR) en effectieve groottes (N_e).....	26
4.2 Genetische structuur	29
4.3 Stand van zaken en toekomst van de heikikker in Vlaanderen	29
5 Referenties	31
6 Bijlage	34

Lijst van figuren

Figuur 1:	Locaties waar genetisch materiaal van heikikker werd verzameld. De in het groen aangeduide locaties werden zowel in 2021 en 2023 bemonsterd, de roze enkel in 2021. M.b.v. van dit genetische materiaal worden later de populatiegenetische analyses uitgevoerd.12
Figuur 2:	Schematische voorstelling van de methode die werd gebruikt om in 2021 en 2023 heikikkereitjes te verzamelen. Op een bepaalde locatie worden verschillende waterlichamen onderzocht. Per waterlichaam worden de legsels (in dit voorbeeld rood, blauw en oranje) apart bemonsterd door per legsel een tiental eitjes te verzamelen in een recipiënt. Voor de ddPCR analyse wordt per locatie een mix van alle legsels genomen (bewaartube B; B). Afhankelijk van de ddPCR-resultaten zijn 2 scenario's mogelijk. Scenario 1 vereist een bijkomende RFLP-stap, scenario 2 niet. Onafhankelijk van het scenario wordt een DNA-extract vereist voor microsatelliet analyse en genotypering. Dit wordt bekomen uit het eitje dat per legsel werd bewaard in bewaartube A (A).....14
Figuur 3:	Restrictiepatroon na gelelectroforese als resultaat van een RFLP-analyse (analyses stalen 2021). Aan de hand van het bandenpatroon kan duidelijk een onderscheid gemaakt worden tussen heikikker (aangeduid in het roze) en bruine kikker. Elke kolom stelt een individueel staal voor. (Figuur naar voorbeeld uit Brys <i>et al.</i> 2020).15
Figuur 4:	De geobserveerde heterozygositeit (H_o) en allelenrijkdom (AR) teruggevonden voor de bestudeerde locaties.....20
Figuur 5:	Visualisatie van de paarsgewijze F_{ST} waarden voor de locaties. In het rood worden de hoogste waarden aangeduid, in het blauw de laagste.....23
Figuur 6:	PCA-plot waarop de ordinatie van de verschillende individuen wordt weergegeven. Elk punt duidt een individu aan. De provincies werden weergegeven d.m.v. een andere kleur. De verschillende symbolen geven de verschillende locaties weer. De bovenste figuur toont de ordinatie van alle individuele individuen, de onderste figuur toont de middelpunten voor elke bemonsterde locatie. Respectievelijk wordt 4.8% en 4.5% van de variatie verklaard door de eerste twee assen.24
Figuur 7:	DAPC-plot na clustering voor $K=10$ (d.i. het aantal a priori gedefinieerde groepen). Respectievelijk wordt 20.2% en 17.5% van de variatie verklaard door de eerste twee PC-assen.25
Figuur 8:	Kaart naar Mergeay & Van Hove (2013). De gebieden die in kleur zijn aangeduid tonen Natura2000-gebieden. De cirkels en hun verschillende kleuren komen overeen met de gunstigheid van de habitat om heikikker te herbergen.27
Figuur 9:	Effectieve populatiegroottes per bestudeerde locatie. Bovenaan worden de schattingen o.b.v. van verwantschappen te zien, onderaan zijn de schattingen o.b.v. de linkage disequilibrium (LD) benadering weergegeven.....28

Lijst van tabellen

Tabel 1:	Overzicht van het aantal geanalyseerde individuen per locatie ($N_{(locatie)}$) en per provincie.....	17
Tabel 2:	Overzicht van de <i>unbiased</i> verwachte heterozygositeit (uH_e), waargenomen heterozygositeit (H_o) in de Vlaamse locaties alsook de standaard fout voor heterozygositeit per index per locatie; en de allelenrijkdome (AR; gemiddelde over alle loci met rarefactie $N=20$).....	21
Tabel 3:	Overzicht van de schattingen van de effectieve populatiegrootte (N_e) o.b.v. de staalname uit 2021 en 2023, alsook het aantal geanalyseerde legsels ($N_{(Locatie)}$). Zowel schattingen volgens de LD-methode als volgens de verwantschappen tussen individuen worden in deze tabel weergegeven.....	22

1 INLEIDING EN DOELSTELLINGEN

1.1 HEIKIKKER (*RANA ARVALIS*) IN VLAANDEREN EN EUROPA

De heikikker (*Rana arvalis*) is een amfibieënsoort die in onze contreien in halfopen heide- en veenlandschappen voorkomt, hier is de soort overwegend te vinden in voedselarme tot mild voedselrijke gebieden (Jooris *et al.*, 2013). Heikikker is tevens een karakteristieke soort voor (1) mineraalarme oligotrofe wateren van de Atlantische zandvlakten (Littorelletalia uniflorae), (2) oligotrofe tot mesotrofe stilstaande wateren met vegetatie behorende tot het Littorelletalia uniflorae en/of Isoëto-Nano-juncetea en (3) dystrofe natuurlijke poelen en meren (ANB, 2019). Hier bestaat het voedsel van de heikikker uit een variëteit van insecten(larven), wormen, arthropoda en slakken (ANB, 2019).

Het voortplantingsseizoen van de heikikker start, afhankelijk van de weersomstandigheden en de populatie, eind februari en loopt tot april (ANB, 2019). Opvallend is dat de mannetjes tijdens deze periode enkele dagen helderblauw kunnen kleuren. De mannetjes komen als eerste aan in de voortplantingspoelen, gevolgd door de vrouwtjes die één eiklomp van ongeveer 600-3000 eitjes afleggen. Gewoonlijk vindt de afzet plaats in ondiepe waterpartijen, of aan de rand van diepere waterpartijen waar de diepte 10 tot 25 cm bedraagt (ANB, 2019). Vanaf oktober gaat de soort, ingegraven in het landhabitat, in winterrust tot het voortplantingsseizoen. De maximale leeftijd van de heikikker wordt geschat op 10 à 12 jaar (ANB, 2019).

Heikikker kent een ruim verspreidingsgebied dat zich uitstrekt over een groot deel van het Europese vasteland (IUCN, 2009). De grenzen van het areaal bevinden zich in het noorden rond 69°NB en in het oosten tussen de 45°-50° NB tot ver in Azië (de Jong & Vos, 2009). De zuidwestelijke grens van het areaal bevindt zich in de Vlaamse Kempen, op enkele relictpopulaties in Noordwest-Frankrijk na (ANB, 2019; de Jong & Vos, 2009). In België worden heikikkers enkel in de provincies Antwerpen en Limburg teruggevonden. De soort wordt in beide provincies geklasseerd als prioritaire soort (Berx *et al.*, 2010; Maes *et al.*, 2021). Het leefgebied is sterk versnipperd en is in grote mate afhankelijk van beschermde gebieden (ANB, 2019). In 2013 kreeg de heikikker de Rode Lijst status 'kwetsbaar' toegewezen (Jooris *et al.*, 2013).

In 2009 classificeerde IUCN de globale conservatiestatus van de heikikker over het gehele areaal als 'least concern'. Desondanks kreeg de soort de laatste decennia, voornamelijk langs de westelijke kant van het areaal, te kampen met het verlies en degradatie van het leefgebied. Voor Vlaanderen, zie o.a. Kuzmin *et al.*, 2009; Mergeay & Van Hove, 2013; Speybroeck & De Knijf, 2019. Dit wordt voornamelijk toegeschreven aan toenemende urbanisatie en intensivering van de landbouw (Kuzmin *et al.*, 2009; Mergeay *et al.*, 2020). Bovendien hebben aanhoudende perioden van droogte en de opkomst van invasieve soorten ook een negatieve invloed op het voortbestaan van de heikikker (Mergeay *et al.*, 2020). Tenslotte wordt het negatieve effect van de toenemende verzuring van de voortplantingspoelen ook geassocieerd met infecties veroorzaakt door Chytride schimmels. Infecties door deze schimmels zorgen voor een verlaagde

overlevingskans van de eitjes (Jooris *et al.* 2013; Speybroeck & De Knijf, 2019; Mergeay *et al.*, 2020).

Om de heikikker beter te beschermen en te ondersteunen, is de soort opgenomen in Bijlage IV van de Habitatrictlijn (92/43/EEG). Dit betekent dat de soort in België van communautair belang is en dat zowel de soort als zijn habitat strikt beschermd moeten worden. In 2019 is een specifiek soortenbeschermingsprogramma (SBP) opgesteld, waarbij de nadruk vooral ligt op het herstel van zowel het water- als het landbiotoop van de soort (ANB, 2019). Daarnaast is er een soortenmeetnet opgezet om de populatietrend van de soort en de structuur evenals de habitat en de kwaliteit ervan op bepaalde locaties te monitoren.

1.2 CONSERVATIE- EN POPULATIEGENETICA

Een belangrijk aspect binnen de monitoring van een soort is de opvolging van diens genetische toestand. In snel veranderende omgevingen is de aanwezigheid van voldoende genetische diversiteit belangrijk voor het voortbestaan van populaties. Veranderingen in de genetische diversiteit, of het verlies ervan, kunnen immers de algemene fitness en het adaptief potentieel van populaties beïnvloeden (Frankham, 2005; Laikre *et al.*, 2009).

Het monitoren van de genetische toestand houdt in dat zowel de genetische diversiteit als de aanwezige genetische structuur en de verschillen tussen populaties worden onderzocht. Hiervoor maakte dit monitoringsonderzoek gebruik van genetische markers, in dit geval microsatelliet loci. Een locus is een specifieke locatie op het chromosoom waar een bepaalde DNA-sequentie teruggevonden wordt. Microsatellietloci (ook wel simple sequence repeats (SSR), of kortweg microsatellieten) zijn korte maar heel variabele stukken DNA die verspreid in het genoom voorkomen. Deze grote variatie maakt ze geschikt voor onderzoek naar genetische diversiteit binnen en tussen populaties.

Het onderzoeken van de genetische toestand kan op zijn beurt op volgende manieren gebeuren:

- Voor elk DNA-staal bepalen we per locus een genotype, dat de combinatie van allelen weergeeft. Als je bijvoorbeeld drie allelen hebt (A, B en C, de **allelenrijkdom** $AR=3$), kan je in theorie zes verschillende genotypes vinden: (1) AA, AB, AC, BB, BC, CC. AA, BB en CC zijn homozygote genotypes, (2) AB, AC en BC zijn heterozygote genotypes. Door dat op een representatieve set individuen uit een populatie te doen kan je de frequentie van elk allel in de populatie bepalen. Daarmee bepalen we verder de **verwachte heterozygositeit** (H_e of gendiversiteit), wat we makkelijk kunnen vergelijken met de **waargenomen heterozygositeit** (H_o) (de frequentie van heterozygote genotypes). Verwachte heterozygositeit (H_e), ook wel gendiversiteit, is een maat voor genetische diversiteit en duidt het aandeel heterozygote genotypes aan dat je verwacht als je random de allelfrequenties combineert in een ideale populatie. Heterozygositeit kan waarden aannemen tussen 0 en 1, waarbij 0 betekent dat alle individuen homozygoot zijn en 1 dat alle individuen heterozygoot zijn.
- De **effectieve populatiegrootte** (N_e) reflecteert hoeveel **genetische drift** (d.i. de willekeurige verandering van de frequenties van allelen binnen een genenpoel over

generaties) een populatie per generatie ondervindt (o.a. Mergéay *et al.*, 2020). Deze populatiegrootte geeft aan hoe een populatie zich genetisch gedraagt. Hierbij is de effectieve populatiegrootte gemiddeld zo'n tien keer kleiner dan het werkelijke aantal individuen dat teruggevonden kan worden binnen een populatie (Frankham, 1995). De berekening van N_e is complex en onderhevig aan veel assumpties, en is daardoor niet altijd mogelijk met de beschikbare data.

- Het berekenen van genetische afstanden tussen individuen en populaties op basis van de **fixatie-index** (F_{ST}). De fixatie-index varieert van 0 (geen verschillen tussen populaties) tot 1 (de populaties zijn helemaal verschillend), en geeft de genetische afstand weer tussen individuen/populaties.
- **Ordinatie**-technieken zoals Principal Component Analysis (PCA) dewelke de genetische afstanden tussen individuen weergeeft en zo de aanwezige structuur kan visualiseren.
- **Toewijzingsanalyses** zoals uitgevoerd bij een Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) of software tools zoals STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) waarbij gezocht wordt naar aanwezige clusters in de dataset.

1.3 DOELSTELLINGEN

Opname in Bijlage IV van de Habitatrichtlijn impliceert dat zowel de soort als zijn habitat beschermd moeten worden. Daarnaast werd in 2019 een soortenbeschermingsprogramma (SBP) voor de heikikker bekrachtigd. In dit SBP werden de acties (1) kennisopvolging en vergroting (monitoring) en (2) instandhouding areaal en populaties/verbeteren toestand genetisch verarmde populaties opgenomen. Om deze acties op zo'n zinvol mogelijke manier in te vullen zijn monitoring van de heikikker samen met populatiegenetische analyses vereist. Aan de hand van een genetische studie en monitoring kunnen o.a. de genetische diversiteit en andere genetische indices verder als basis dienen om in de toekomst gegronde beslissingen en vervolgstappen (met betrekking tot translocatie, (her)introductie en kweek) te nemen inzake het voortbestaan van heikikker. Hierbij wordt geopteerd om uit geselecteerde Vlaamse poelen genetisch materiaal te bemonsteren. De stalen die worden verzameld kunnen gebruikt worden voor een breed spectrum aan genetische analyses.

Samenvattend wordt met dit project, door middel van populatiegenetische methodes, aan o.a. de acties die beschreven werden in het soortenbeschermingsprogramma (SBP) voor heikikker beantwoord. Hierbij worden volgende doelstellingen gesteld:

- Het onderzoeken van de instandhouding van de soort;
- De genetische achtergrond van de soort nagaan en deze opvolgen door het bepalen van o.a. genetische diversiteit en genetische structuur;
- Het opstellen van onderbouwde eventuele vervolgstappen inzake translocaties, (her)introductie en kweek

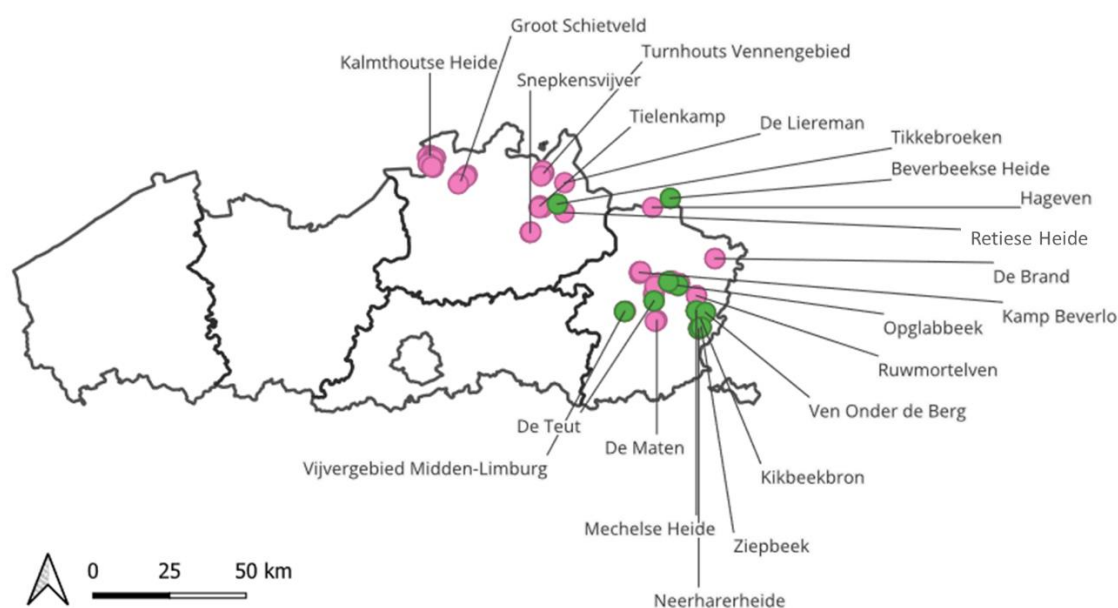
Deze studie wil de huidige toestand van heikikker in Vlaanderen nagaan en gaat hiervoor verder op bevindingen uit 2020 (Brys *et al.*, 2020). Onderzoekers van het genetische diversiteitsteam van het INBO zetten toen een pilootstudie op rond het eventuele gebruik van eDNA technieken bij de monitoring van de heikikker. Om populatiegenetische analyses toe te laten werd voor deze pilootstudie een merkerset, bestaande uit 19 microsatellieten, samengesteld.

In het voorjaar van 2021 en 2023 werden in het kader van de monitoring van heikikker stalen verzameld. De microsattelieten-merkerset uit 2020 (Brys *et al.*, 2020) werd hierbij opnieuw gebruikt om de genetische toestand op te volgen. De resultaten van deze staalname worden in dit eindrapport samengevat.

2 WERKWIJZE

2.1 STAALNAME 2021-2023

De genetische toestand van heikikker in Vlaanderen werd opgevolgd door analyses uit te voeren op DNA-extracten afkomstig uit individuele eitjes. De staalname van dit project vond plaats gedurende de voortplantingsperiode van heikikker (tussen eind februari en eind maart) in het voorjaar van 2021 en 2023. Om uitdroging te voorkomen, werden de eitjes in 2021 bewaard in 100% ethanol. In 2023 werden de eitjes verzameld en eerst een paar dagen bewaard in poelwater. Op deze manier konden de eerste celdelingen nog een paar dagen voortgaan en garanderen we in een volgende fase meer DNA te kunnen extraheren. Zowel in 2021 als in 2023 werden de bemonsterde eilegels na staalname in de koelkast (ca. 5°C) bewaard. Tijdens het bemonsteren van het kikkerdril moest er echter rekening gehouden worden met het feit dat de eitjes van de heikikker en de bruine kikker (*Rana temporaria*), die vaak samen voorkomen, morfologisch zeer sterk op elkaar gelijken.



Figuur 1: Locaties waar genetisch materiaal van heikikker werd verzameld. De in het groen aangeduide locaties werden zowel in 2021 en 2023 bemonsterd, de roze enkel in 2021. M.b.v. van het verzamelde genetische materiaal worden later de populatiegenetische analyses uitgevoerd.

In 2021 werden in totaal 328 waterlichamen bezocht. In 107 van de 328 bezochte waterlichamen werden legsels aangetroffen. Na analyse (zie 2.2.2 ddPCR-methode) werden in 71 van deze 107 waterlichamen legsels van heikikker vastgesteld; in de overige 36 waterlichamen werd enkel bruine kikker aangetroffen. De 71 waterlichamen die heikikkerlegsels bevatten werden ingedeeld in 24 overkoepelende locaties (**Figuur 1**). Deze overkoepelende locaties zijn gebieden waarbinnen zich meerdere sub-locaties kunnen bevinden binnen een landschappelijk homogene context en binnen de dispersie-afstand van heikikker. Deze dispersieafstand wordt tussen de 1

à 3 kilometer geschat (Vos & Chardon, 1998). In realiteit blijkt deze afstand vaak niet veel verder dan 1 kilometer te zijn (Kovar *et al.*, 2009).

In 2023 hebben we, op basis van de staalname uit 2021, 10 locaties opnieuw bemonsterd. De selectie van de bemonsteringscampagne in 2023 richtte zich op locaties waar in 2021 minder stalen waren verzameld. Het doel was om de dataset van 2021 aan te vullen, eerder dan een directe vergelijking tussen de jaren mogelijk te maken. Bij elke locatie zijn in 2023 kikkerdrilmonsters genomen door ongeveer tien eitjes per kikkerdril te verzamelen. Elk monster werd apart in een potje verzameld en bewaard in poelwater gedurende ongeveer drie dagen.

In 2021 werden van elke bemonsterde eiklomp twee eitjes verzameld. Eén eitje werd in een eerste bewaartube (A) bewaard en het andere in een tweede bewaartube (B). De stalen uit tube B werden in een volgende stap gebruikt om de verhouding heikikker/bruine kikker te achterhalen via een ddPCR-protocol (zie 2.2.2). In 2023 werden een tiental eitjes per legsel ingezameld en bewaard in het water waarin het legsel gevonden was. Dit voor ongeveer drie dagen op ca. 5°C. Na het bewaren in de koelkast werd per legsel één eitje gebruikt voor individuele extractie (bewaartube A) en werden twee eitjes gebruikt voor een soortensamenstelling-analyse (bewaartube B). Door de mogelijke verwarring die kan optreden tussen de eitjes van heikikker en bruine kikker, werd elke staalname dus als het ware dubbel uitgevoerd (**Figuur 2**).

Op basis van de verhoudingen die zijn verkregen uit de ddPCR-analyse, werd besloten of een aanvullend RFLP-protocol nodig was om verdere individuele identificatie van soorten uit te voeren (zie 2.2.3). Door het eerder vermelde vaak gelijktijdig voorkomen van heikikker en bruine kikker zijn deze stappen nodig om ervoor te zorgen dat de verdere analyses uitgevoerd werden met genetisch materiaal afkomstig van heikikkers. Wanneer het met zekerheid heikikker-eitjes betrof, werd de inhoud uit tube A gebruikt om individuele DNA-extracties uit te voeren.

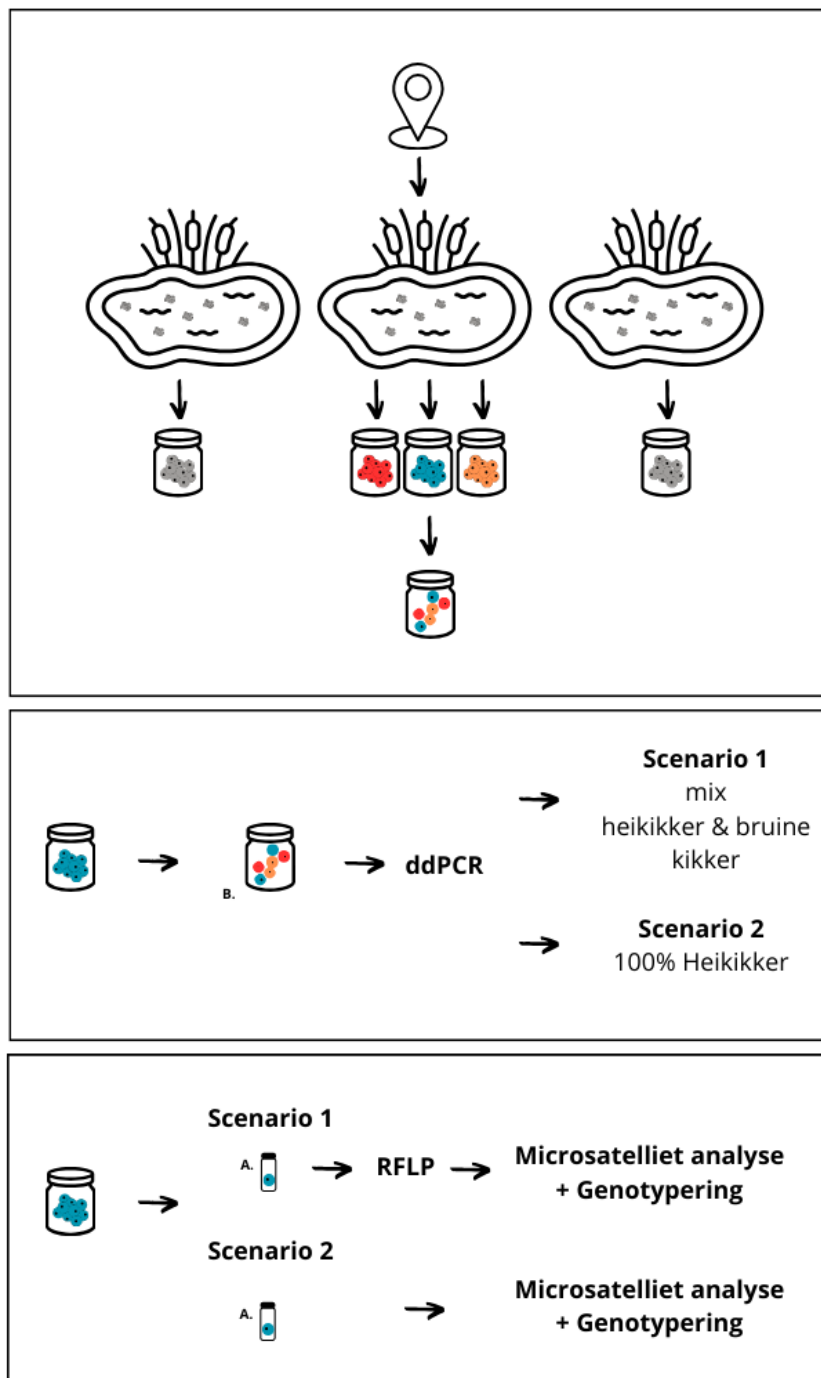
2.2 GENETISCHE ANALYSES

2.2.1 DNA-extractie

Per verzameld legsel werden, wanneer het een heikikkerlegsel betrof, drie eitjes¹ geëxtraheerd: twee eitjes voor de ddPCR-analyse en één eitje voor de individuele extractie te gebruiken voor microsatelliet-analyse (al dan niet met een RFLP-analyse voorafgaand). Omdat uit voorgaande testen bleek dat de extractie op enkel het embryo een betere DNA-opbrengst opleverde, werd van elk eitje eerst het uitwendige geleimembraan met een scalpel verwijderd.

De extractie gebeurde met de Blood & Tissue Kit (Qiagen) met een lysisstap van 1 uur, waarna het verkregen extract geëluëerd werd. Vervolgens werd de concentratie van het genetische materiaal bepaald door middel van fluorescent picogreen van de Quant iT™ Picogreen dsDNA assay kit (Life technologies).

¹ In 2021 werden twee eitjes per legsel geëxtraheerd. Eén eitje voor de ddPCR-analyse en één eitje voor de uiteindelijke individuele genotypering op basis van microsatellieten.



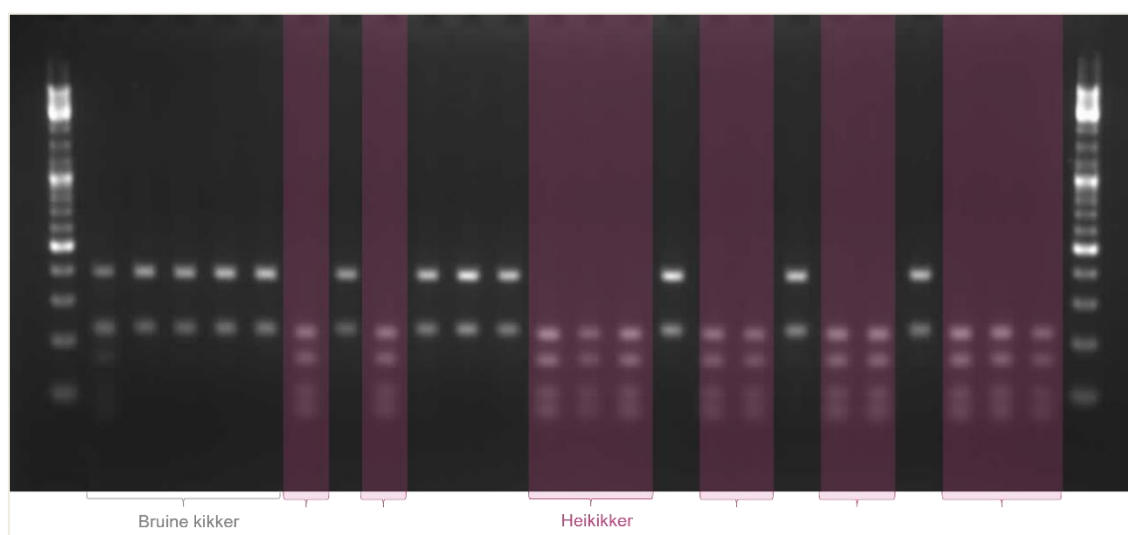
Figuur 2: Schematische voorstelling van de methode die werd gebruikt om in 2021 en 2023 heikikkereitjes te verzamelen. Op een bepaalde locatie worden verschillende waterlichamen onderzocht. Per waterlichaam worden de legsels (in dit voorbeeld rood, blauw en oranje) apart bemonsterd door per legsel een tiental eitjes te verzamelen in een recipiënt. Voor de ddPCR analyse wordt per locatie een mix van alle legsels genomen (bewaartube B; B). Afhankelijk van de ddPCR-resultaten zijn 2 scenario's mogelijk. Scenario 1 vereist een bijkomende RFLP-stap, scenario 2 niet. Onafhankelijk van het scenario wordt een DNA-extract vereist voor microsatelliet analyse en genotypering. Dit wordt bekomen uit het eitje dat per legsel werd bewaard in bewaartube A (A).

2.2.2 ddPCR en soortensamenstelling

Om na te gaan wat de soortensamenstelling was van de bemonsterde poelen, werd een digital-droplet-PCR (of kortweg ddPCR) uitgevoerd. De eitjes die per locatie werden verzameld in bewaartube B (**Figuur 2**), werden gemengd en verbrijzeld met een TissueLyzer (3 min bij 30 Hz). Deze stalen werden in wat volgt de 'mengstalen' genoemd daar ze de genetische informatie bevatten van alle poelen verzameld in eenzelfde locatie. De ddPCR methode maakt gebruik van een verstuviging van de PCR-reactie, waarbij een groot aantal druppels (of droplets) wordt aangemaakt. De druppels die worden aangemaakt bevatten zowel de (e)DNA-template van het DNA-extract als de reagentia. Op basis van het aantal druppels kan vervolgens de procentuele samenstelling van de mengstalen bepaald worden. Voor een meer uitgebreide synthese van het gebruikte ddPCR-protocol verwijzen we naar Brys *et al.* (2020).

2.2.3 RFLP-analyse en soortenidentificatie

Na de ddPCR-stap werd de procentuele samenstelling van de mengstalen (uit bewaartube B) bepaald. Als bleek dat een bepaalde locatie bruine kikker bevatte, werd één eitje per legsel van desbetreffende locatie via een bijkomende RFLP-analyse (Restriction Fragment Length Polymorphism) onderzocht op het cytochroom b locus (*cyt b*). Palo & Merilä (2003) volgend, kan op deze manier een onderscheid gemaakt worden tussen bruine kikker en heikikker. Het restrictie-enzyme *HaeIII* verknipt het DNA op specifieke plaatsen, die verschillen tussen beide soorten, wat resulteert in verschillende stukken DNA van ongelijke lengtes. Deze fragmenten kunnen we visualiseren via elektroforese (**Figuur 3**). Voor RFLP-condities en PCR-condities verwijzen we naar Brys *et al.* (2020). DNA-extracten gebruikt tijdens de RFLP-analyse zijn afkomstig uit de bewaartubes A per legsel. Op deze manier kunnen de individuele eitjes uit locaties die een gemengde soortensamenstelling vertonen aan een soort toegewezen worden.



Figuur 3: Restrictiepatroon na gelelectroforese als resultaat van een RFLP-analyse (analyses stalen 2021). Aan de hand van het bandenpatroon kan duidelijk een onderscheid gemaakt worden tussen heikikker (aangeduid in het roze) en bruine kikker. Elke kolom stelt een individueel staal voor. (Figuur naar voorbeeld uit Brys *et al.* 2020).

2.2.4 Microsatelliet-analyse en genotypering

Voor de genotypering van de bemonsterde heikikkerstalen werd gebruik gemaakt van een eerder geselecteerde set van microsatellieten (Brys *et al.*, 2020). Deze set bestaat uit 19 microsatelliet merkers. De merkers werden vervolgens in twee multiplexen (MP1 en MP2) en twee simplexen (samen MP3) gelopen (**Bijlage 1**). Voor specificaties van de gevolgde procedure voor microsatelliet-analyse verwijzen we naar Brys *et al.* (2020). Vervolgens gebeurde het identificeren van de allelen met het programma Geneious Prime 2019.3.2 (<https://www.geneious.com>).

2.3 VERWERKING VAN DE DATA: POPULATIEGENETISCHE ANALYSES

2.3.1 Analyse van de gecombineerde dataset (2021 en 2023)

In een eerste stap werden d.m.v. het R-pakket *adegenet* 2.1.0 (Jombart, 2008) individuen en merkers waarvoor te weinig gegevens beschikbaar zijn verwijderd (d.i. >45% missing data) alsook loci die niet polymorf bleken te zijn. Een locus is polymorf als voor dat locus verschillende allelen teruggevonden kunnen worden.

Merkers en locaties werden daarna gecontroleerd op nul-allelen, op afwijkingen van het Hardy-Weinberg evenwicht (HWD) en op linkage disequilibrium (LD) met genepop 4.6 (Rousset, 2008)

De analyses zijn op 978 individuele genotypes (verschillende eieren) uitgevoerd. Drie loci werden verwijderd wegens monomorf of het hebben van te veel ontbrekende data. Vervolgens werd na het onderzoeken van HWD, LD en de frequentie aan nul-allelen beslist dat er geen bijkomende loci verwijderd dienden te worden.

2.3.2 Genetische diversiteit (uH_e , H_o en AR) en effectieve groottes (N_e)

Om de genetische diversiteit binnen de Vlaamse heikikkerpopulaties na te gaan werden *unbiased* verwachte heterozygositeit (uH_e ; d.i. de verwachte heterozygositeit waaraan een correctie is toegevoegd voor kleine staalgroottes), waargenomen heterozygositeit (H_o) en allelenrijkdom (AR) geschat door middel van het R-pakket *hierfstat* v0.5-10 (Goudet, 2005), GenAEx (Peakall & Smouse, 2012) en het programma HP-Rare v1.1 (Kalinowski, 2005). De allelenrijkdom werd hierbij aan de hand van een rarefactie naar $N=20$ geschat.

Naast deze indices voor genetische diversiteit werden ook schattingen gemaakt van de effectieve populatiegroottes (N_e) van de bemonsterde locaties. Echter, door de manier waarop werd bemonsterd (d.i. het verzamelen van eitjes) moet in dit geval eerder gesproken worden over schattingen van het effectieve aantal ouders dat zich op het moment van de staalname heeft voortgeplant in plaats van de effectieve populatiegrootte in een bepaalde locatie. Schattingen gebeuren door middel van de programma's NeEstimator v2.1 (Do *et al.*, 2014) en COLONY v2.0.6.8 (Jones & Wang, 2010). Beide programma's verschillen van elkaar in de manier waarop de effectieve groottes worden geschat. NeEstimator maakt gebruik van de mate van

linkage disequilibrium (LDN_e ; Waples & Do, 2008), COLONY2 maakt gebruik van verwantschappen tussen individuen in eenzelfde locatie.

Tabel 1: Overzicht van het aantal geanalyseerde individuen per locatie (N_{locatie}) en per provincie.

Provincie	Locatie	Locatie afkorting	N _(Locatie)
Antwerpen	De Liereman	ANT_DL	30
	Groot Schietveld	ANT_GS	50
	Kalmthoutse Heide	ANT_KH	114
	Retiese Heide	ANT_RH	27
	Snepkensvijver	ANT_SV	28
	Tikkebroeken	ANT_TB	32
	Turnhouts Vennengebied	ANT_THV	42
	Tielenkamp	ANT_TK	36
Limburg	Beverbeekse Heide	LIM_BH	65
	De Brand	LIM_DB	16
	De Maten	LIM_DM	30
	De Teut	LIM_DT	18
	Huttebeekvijvers	LIM_HBV	29
	Hageven	LIM_HV	28
	Kamp Beverlo	LIM_KB	28
	Kikbeekbron	LIM_KBB	27
	Mechelse Heide	LIM_MH	52
	Neerharerheide	LIM_NHH	35
	Opglabbeek	LIM_O	22
	Ruwmortelven	LIM_RMV	26
	Schietveld Helchteren	LIM_SHH	103
	Vijvergebied Midden-Limburg	LIM_VML	40
	Ven Onder de Berg	LIM_VODB	49
	Ziepbeek	LIM_ZB	51

Voor de schattingen in NeEstimator werden enkel de allelen met een frequentie hoger dan 0.05 in beschouwing genomen. In COLONY2 werd gebruik gemaakt van een polygaam paringssysteem, 3 runs en medium precisie. Vervolgens werd voor de schattingen van *Ne* uitgegaan van non-random *mating*.

2.3.3 Genetische structuur (F_{ST} , PCA en DAPC)

Voor het analyseren van de genetische structuur wordt onder andere de **fixatie-index** (F_{ST} , (Weir & Cockerham, 1984)) paarsgewijs tussen de verschillende populaties berekend. De fixatie index geeft de genetische afstand weer tussen individuen en populaties of locaties. In dit geval wordt F_{ST} berekend met behulp van het R-pakket *diveRsity* v1.9.90 (Keenan *et al.*, 2013) op basis van 1000 bootstraps (d.i. een statistische methode waarbij herhaalde steekproeven worden genomen uit een bestaande set gegevens). Op deze manier kan de betrouwbaarheid van een

statistische schatting worden gestaafd) . Voor het berekenen van deze index worden alle locaties meegenomen.

Vervolgens wordt de genetische structuur geanalyseerd via een **PCA-analyse**. Deze ordinatiemethode maakt gebruik van de genetische afstanden tussen individuen die als punten worden aangeduid in de PCA-plot. Individen die dicht bij elkaar liggen, lijken genetisch sterker op elkaar. Naast een ordinatie volgens PCA-analyse wordt de structuur ook nagegaan via een **DAPC-clustering**. Hierbij worden de individuen in de dataset in een eerste ordinatie toegewezen aan een a priori aantal gekozen groepen om vervolgens te kunnen nagaan aan welke groepen/clusters de individuen elk worden toegewezen. Wanneer de beide datasets gecombineerd worden toont een clustering volgens kmeans een optimaal aantal clusters bij K=10 (K staat voor het aantal clusters; deze keuze werd op basis van de *Bayesian Information Criterion* (BIC) gemaakt; **Bijlage 2**). De ordinatie- en clusteroefening gebeurt via het R-pakket *adeigenet* v2.1.5 (Jombart, 2008).

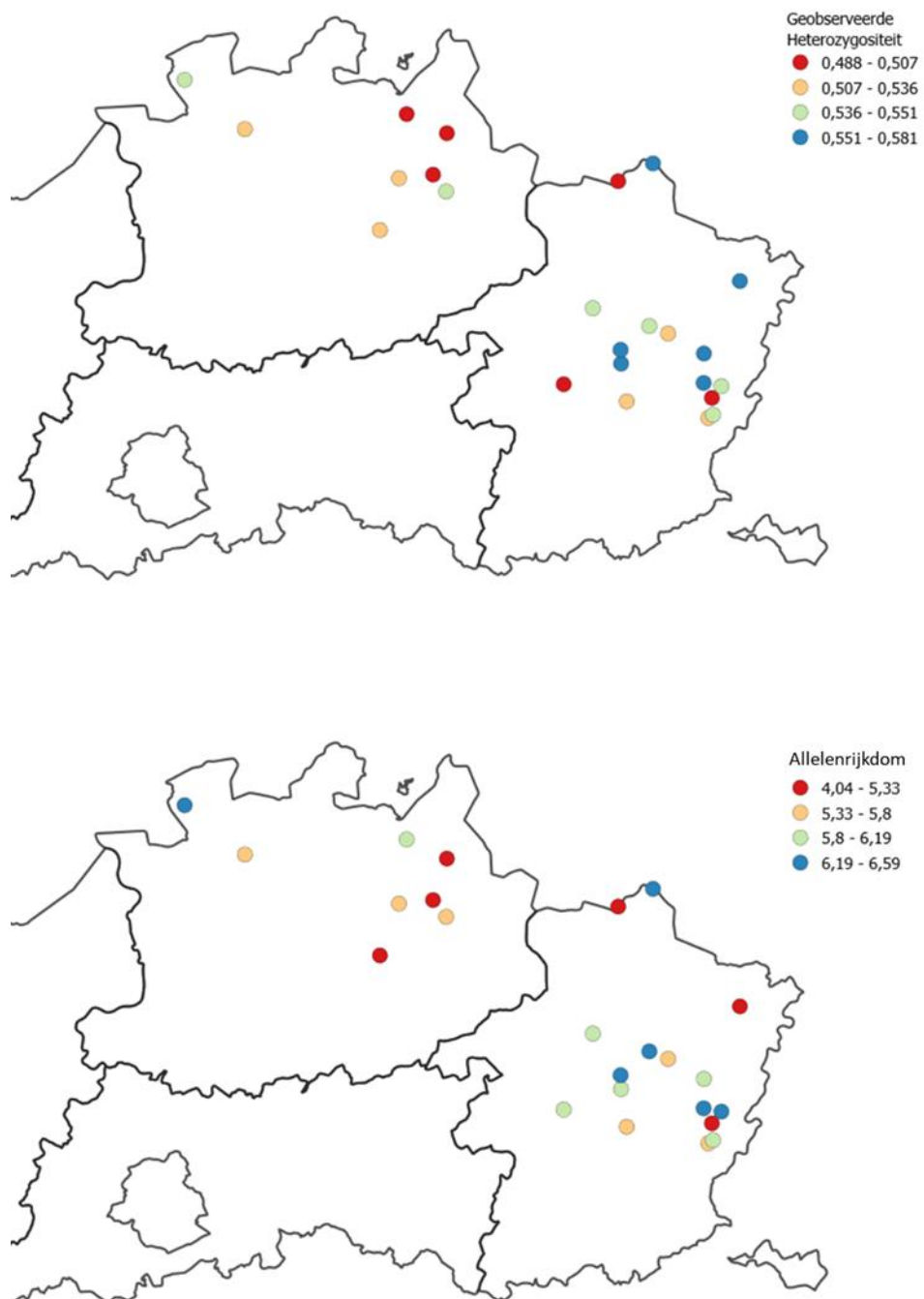
3 RESULTATEN

3.1 GENETISCHE DIVERSITEIT (uH_E , H_O EN AR) EN EFFECTIEVE GROOTTES (N_e)

De verwachte heterozygositeit (uH_e) varieerde van 0.491 ± 0.070 (Antwerpse De Liereman) tot 0.599 ± 0.069 (Limburgse Huttebeekvijvers). De geobserveerde heterozygositeit (H_o) varieerde op haar beurt van 0.488 ± 0.077 (Limburgse Hageven) tot 0.581 ± 0.071 (Limburgse De Teut). Het lijkt erop dat de verwachte en waargenomen heterozygositeit niet significant van elkaar verschillen. (**Figuur 4; Tabel 2**).

De berekening van allelenrijkdom (*AR*) per locatie werd bepaald aan de hand van een rarefactie methode, d.i. een methode om allelenrijkdom te kunnen vergelijken tussen stalen van verschillende grootte. De berekeningen laten waarden zien die variëren tussen 4.400 (Antwerpse Tikkebroeken) en 6.800 (Limburgse Vijvergebied Midden-Limburg) liggen (**Figuur 4; Tabel 2**).

Vervolgens werd de effectieve populatiegrootte (N_e ; **Tabel 3**) geschat. Voor veel van deze schattingen worden waarden tot oneindig gevonden. De schattingen via het LD-principe vertonen bij een paar locaties oneindige betrouwbaarheidsintervallen. De N_e -schattingen berekend aan de hand van verwantschappen binnen locaties vertonen dit probleem minder. We merken op dat deze schattingen van N_e vaak ook het aantal bemonsterde legsels (N) benadert. Schietveld Houthalen-Helchteren, Groot Schietveld in Antwerpen en de Kalmthoutse Heide tonen de hoogste resultaten maar vertonen alle drie oneindige confidentie-intervallen.



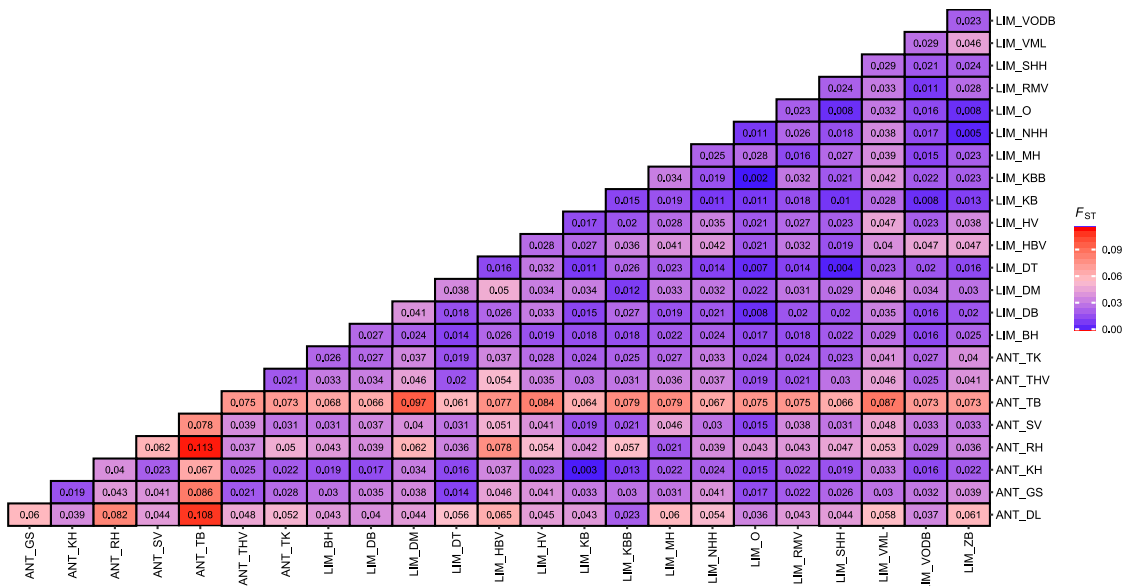
Figuur 4: De geobserveerde heterozygositeit (H_o) en allelenrijkdom (AR) teruggevonden voor de bestudeerde locaties.

Tabel 2: Overzicht van de *unbiased* verwachte heterozygositeit (uH_e), waargenomen heterozygositeit (H_o) in de Vlaamse locaties alsook de standaard fout voor heterozygositeit per index per locatie; en de allelenrijkdom (AR; gemiddelde over alle loci met rarefactie N=20).

Locatie	N _(Locatie)	Locatie (afkorting)	uH_e	SE(uH_e)	H_o	SE(H_o)	Allelenrijkdom (AR)
De Liereman	30	ANT_DL	0.491	0.070	0.491	0.070	4.620
Groot Schietveld	50	ANT_GS	0.539	0.077	0.530	0.076	5.540
Kalmthoutse Heide	114	ANT_KH	0.553	0.078	0.537	0.076	6.310
Retiese Heide	27	ANT_RH	0.533	0.086	0.537	0.085	5.340
Snepkensvijver	28	ANT_SV	0.532	0.074	0.513	0.069	5.190
Tikkebroeken	32	ANT_TB	0.520	0.064	0.504	0.070	4.040
Turnhouts Vennengebied	42	ANT_THV	0.547	0.079	0.501	0.076	6.170
Tielenkamp	36	ANT_TK	0.536	0.073	0.508	0.070	5.800
Beverbeekse Heide	65	LIM_BH	0.579	0.074	0.561	0.070	6.330
De Brand	16	LIM_DB	0.582	0.072	0.562	0.065	5.250
De Maten	30	LIM_DM	0.517	0.072	0.526	0.073	5.580
De Teut	18	LIM_DT	0.592	0.073	0.581	0.071	5.810
Huttebeekvijvers	29	LIM_HBV	0.599	0.069	0.559	0.063	6.360
Hageven	28	LIM_HV	0.513	0.080	0.488	0.077	5.300
Kamp Beverlo	28	LIM_KB	0.562	0.078	0.540	0.075	6.180
Kikbeekbron	27	LIM_KBB	0.515	0.077	0.491	0.072	5.210
Mechelse Heide	52	LIM_MH	0.571	0.077	0.560	0.073	6.230
Neerharerheide	35	LIM_NHH	0.550	0.079	0.534	0.079	5.690
Opglabbeek	22	LIM_O	0.572	0.074	0.514	0.074	5.730
Ruwmortelven	26	LIM_RMV	0.590	0.073	0.578	0.071	6.020
Schietveld Houthalen-Helchteren	103	LIM_SHH	0.575	0.077	0.548	0.073	6.540
Vijvergebied Midden-Limburg	40	LIM_VML	0.562	0.072	0.491	0.070	6.080
Ven onder de Berg	49	LIM_VODB	0.572	0.079	0.546	0.073	6.590
Ziepbeek	51	LIM_ZB	0.571	0.077	0.548	0.078	6.170

3.2 GENETISCHE STRUCTUUR (F_{ST} , PCA EN DAPC)

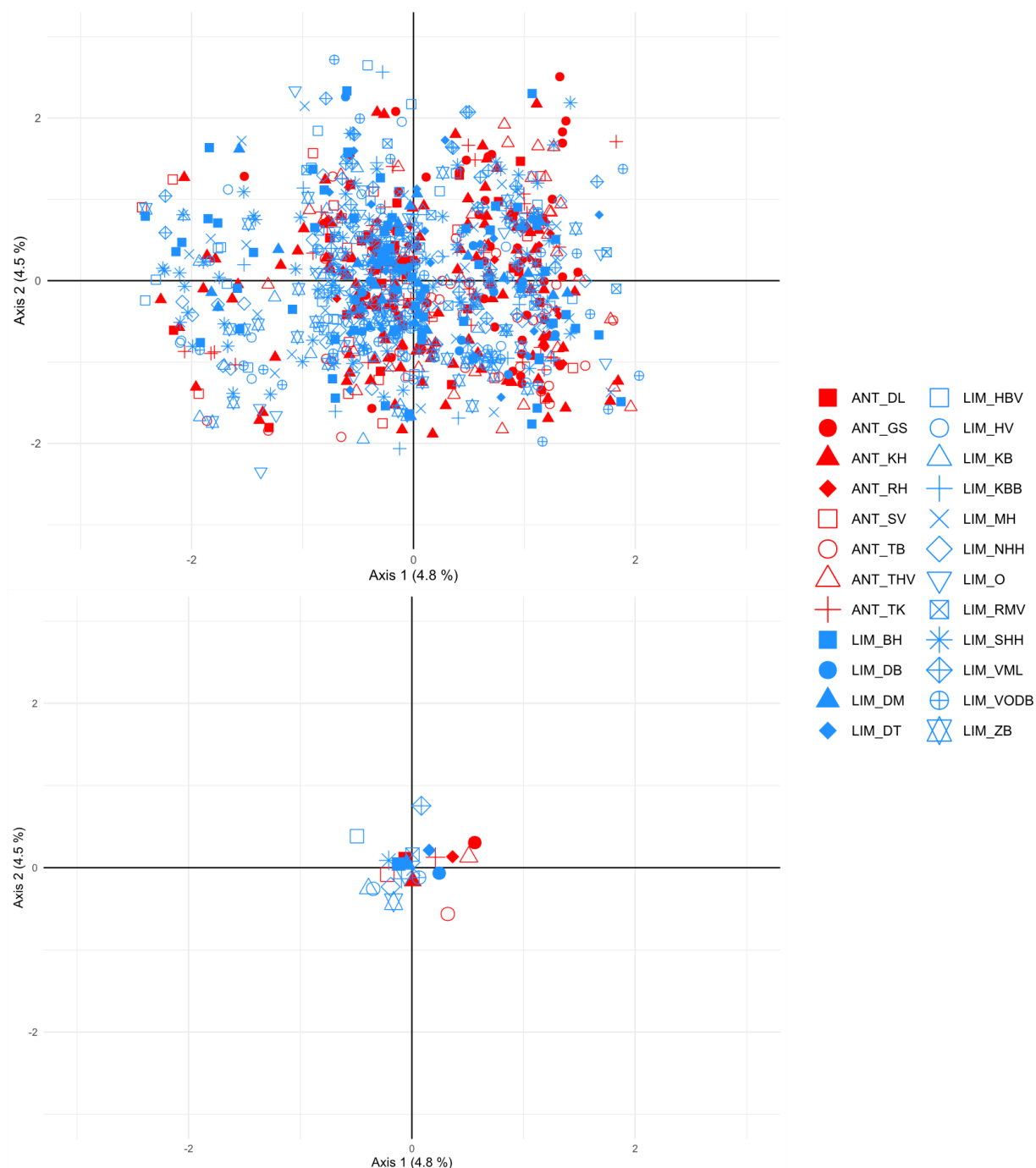
De berekende paarsgewijze fixatie-indices (F_{ST}) voor de heikikkerlocaties varieerde tussen 0.002 (BC95%CI: 0 – 0.028) en 0.113 (BC95%CI: 0.089 – 0.141). Deze resultaten worden respectievelijk gevonden voor Opglabbeek - Kikbeekbron en Retiese Heide - Tikkebroeken (**Figuur 5** **Figuur 5**). Waarden voor F_{ST} kunnen tussen de 0 en 1 liggen. Hoe lager deze waarde is, hoe kleiner de genetische afstand/ het genetische verschil tussen locaties.



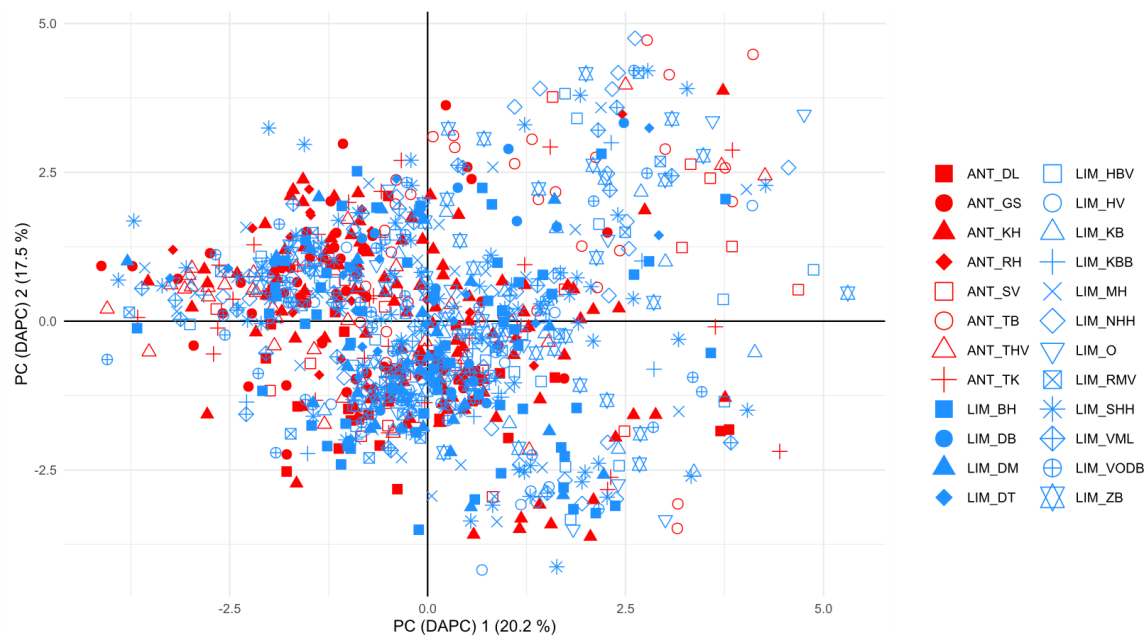
Figuur 5: Visualisatie van de paarsgewijze F_{ST} waarden voor de locaties. In het rood worden de hoogste waarden aangeduid, in het blauw de laagste.

De Principal Component Analysis (PCA) leidt tot een grote wolk van datapunten waarin opnieuw weinig duidelijke structuur waar te nemen is. Respectievelijk wordt 4.8% en 4.5% van de variatie verklaard door de eerste twee assen. Bovendien bevinden alle middelpunten van de individuele locaties zich schijnbaar dichtbij de oorsprong (**Figuur 6**). Deze clustering rond de oorsprong suggereert opnieuw weinig grote verschillen tussen de verschillende locaties.

Vervolgens werd een DAPC-clustering (**Figuur 7**) uitgevoerd waarbij de individuen aan een a priori aantal groepen (d.i. K=10) worden toegewezen. Respectievelijk wordt 20.2% en 17.5% van de variatie verklaard door de eerste twee PC-assen. Ook uit deze clustering blijkt opnieuw dat er weinig structuur teruggevonden wordt tussen de locaties.



Figuur 6: PCA-plot waarop de ordinatie van de verschillende individuen wordt weergegeven. Elk punt duidt een individu aan. De provincies werden weergegeven d.m.v. een andere kleur. De verschillende symbolen geven de verschillende locaties weer. De bovenste figuur toont de ordinatie van alle individuele individuen, de onderste figuur toont de middelpunten voor elke bemonsterde locatie. Respectievelijk wordt 4.8% en 4.5% van de variatie verklaard door de eerste twee assen.



Figuur 7: DAPC-plot na clustering voor K=10 (d.i. het aantal a priori gedefinieerde groepen). Respectievelijk wordt 20.2% en 17.5% van de variatie verklaard door de eerste twee PC-assen.

4 DISCUSSIE EN CONCLUSIES

Op basis van genetische indices beoogde dit onderzoek de genetische toestand van heikikker in Vlaanderen, anno 2021 en 2023, te evalueren. De genetische diversiteit en andere genetische indices kunnen op deze manier de basis leggen om in de toekomst gegronde beslissingen en vervolgstappen te nemen inzake het voortbestaan van heikikker (met betrekking tot translocatie, (her)introductie, kweek).

4.1 GENETISCHE DIVERSITEIT (U_H , H_O EN AR) EN EFFECTIEVE GROOTTES (N_E)

De analyses van heterozygositeit toonden in het algemeen geen sterk significante verschillen tussen de verwachte en geobserveerde heterozygositeit. Duidelijke verschillen tussen waargenomen en verwachte heterozygositeit kunnen het gevolg zijn van o.a. inteelt, recente bottlenecks of kleine populatiegroottes. Hier is dit dus niet meteen het geval. Ook is de gecorrigeerde allelenrijkdom naar een staalnamegrootte van $N=20$ over het algemeen relatief hoog. Enkel de AR teruggevonden in de Antwerpse Tikkebroeken lijkt relatief lager te zijn dan in de andere locaties. Een eventuele verklaring hiervoor kan zijn dat voor deze locatie niet voor alle loci informatie voorhanden was (het tekort aan informatie blijft wel binnen de grenzen van het aanvaardbare). Herinner hierbij dat “De allelenrijkdom aantoonst hoeveel allelen (d.i. een bepaalde variant van een locus, gemiddeld over loci) aanwezig zijn voor een gegeven staalgrootte.” Het aantal geanalyseerde loci heeft dus een directe invloed op het resultaat. Desondanks kunnen we over het algemeen besluiten dat er in elke geanalyseerde locatie nog voldoende genetische diversiteit teruggevonden kon worden. Er lijkt dus nergens een sterke genetische verarming voor te komen en alle locaties vertonen overal een vergelijkbare allelenrijkdom.

Deze positieve conclusie staat in contrast met wat de schattingen van effectieve populatiegroottes tonen. Slechts in vier populaties geven de puntschattingen op basis van linkage disequilibrium (LD) een grootte die voldoet aan de criteria voor een duurzame metapopulatie. Deze werd in 2020 voor heikikker in Vlaanderen op $N_e > 295$ gezet (Lommaert *et al.* 2020). De effectieve populatie van Klein Schietveld (Antwerpse Kempen) werd eerder in Mergeay *et al.* (2020) geschat op ca. 316, maar een latere analyse op de uitgebreide dataset van Brys *et al.* (2020) suggereert een effectieve grootte rond de 600. Het streefcijfer van $N_e > 295$ stelt de zogenaamde N_{e95} voor, de populatiegrootte die op een periode van 100 jaar minstens 95% van zijn genetische diversiteit kan behouden (Allendorf & Ryman, 2002; Lommaert *et al.*, 2020). Dit streefcijfer is overigens lager dan de internationaal beschouwde grenswaarde van 500 (Hoban *et al.*, 2020). Sommige locaties tonen confidentie-intervallen die onbepaald zijn. Dit is doorgaans te wijten aan te lage statistische kracht, wat een gevolg kan zijn van een te kleine staalgrootte en van het aantal beschouwde merkers. Toch geven de puntschattingen nuttige indicaties. Zeker in populaties die werkelijk groot zijn, is een groter monster nodig om de bovenlimiet van het confidentie-interval te begrenzen. Daartegenover staat dat de gevonden resultaten (**Figuur 9**; **Tabel 3**) wel overeen lijken te komen met de verwachte gunstigheid van habitat beschreven in Mergeay & van Hove (2013). Hierin werden regio's aangeduid waar potentieel grote effectieve populatiegroottes teruggevonden zouden kunnen worden (**Figuur 8**). Wanneer we de bekomen resultaten van zowel de linkage disequilibrium (LDN_e) manier en de benadering volgens verwantschappen nemen, overlappen in beide gevallen de regio's met hoge schattingen de plaatsen die aangeduid werden als gunstig. De zones die als onzeker

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

gunstig
ongunstig
potentieel gunstig
onzeker

GENETISCHE STRUCTUUR

Op basis van de huidige ordinatie- en clusteringanalyses clustert de Vlaamse heikikkerpopulaties schijnbaar als één grote geografische populatie samen. Binnen deze groep is er echter een subtiële substructuur waarneembaar. Bovendien is er geen duidelijk onderscheid tussen provincies zichtbaar. Deze bevindingen zijn in lijn met de verwachtingen en kunnen mogelijk worden verklaard door de relatief recente opsplitsing van een vroegere grote heikikkermetapopulatie die zich uitstreckte over Antwerpen en Limburg. Paarsgewijze F_{ST} -berekeningen op hun beurt tonen aan wat de genetische differentiatie is tussen verschillende populaties/locaties. Wanneer deze index wordt berekend tussen twee locaties, wordt de genetische variatie tussen elke locatie vergeleken met de genetische variatie tussen de twee locaties. Waarden voor F_{ST} kunnen tussen de 0 en 1 liggen. Hoe hoger deze waarde, hoe hoger de genetische afstand tussen de locaties in kwestie. De gevonden resultaten tussen locaties zijn over het algemeen laag, wat impliceert dat ook de differentiatie tussen locaties laag is. De bemonsterde individuen uit de verschillende locaties verschillen dus relatief weinig van elkaar. Merk op dat de Antwerpse Tikkebroeken opnieuw een uitzondering op de regel lijkt te zijn. De hoogste waarden voor de paarsgewijze schatter worden voornamelijk teruggevonden in combinatie met deze populatie. We vermoeden echter dat dit een effect is van de datakwaliteit eerder dan een echt structureel verschil tussen locaties. De hoogst teruggevonden waarde van slechts 0.113 (BC95%CI: 0.089 – 0.141) sluit hier bij aan. De paarsgewijze F_{ST} geeft inzicht in hoe de populaties zich ten opzichte van elkaar verhouden en toont de structuur aan tussen de bestudeerde stalen. Opnieuw komen we hier tot dezelfde conclusie dat er tussen de bestudeerde locaties weinig structuur valt waar te nemen.

STAND VAN ZAKEN EN TOEKOMST VAN DE HEIKIKKER IN VLAANDEREN

Dit onderzoek, gebaseerd op staalnames uit 2021 en 2023, toont aan dat elke onderzochte locatie over het algemeen goede resultaten laat zien in termen van heterozygositeit (uH_e & H_o) en allelenrijkdom (AR). Op basis van deze indicatoren kan voorlopig worden geconcludeerd dat de heikikkerpopulatie in Vlaanderen het over het algemeen nog goed lijkt te doen. Hiertegenover staat dat, wanneer we de schattingen van effectieve populatiegroottes per bemonsterde locatie bekijken en we rekening houden met de vooropgestelde Ne_{95} , slechts enkele populaties zich schijnbaar in een gunstige staat van instandhouding verkeren. Zoals eerder aangegeven moet de interpretatie van deze Ne -schattingen echter met enige voorzichtigheid gebeuren, al lijken deze eerste indicaties wel te kloppen met de verwachtingen uit Mergeay en Van Hove (2013). Locaties die in 2013 als gunstig werden aangeduid, komen volgens de resultaten uit deze studie opnieuw als schijnbaar gunstig terug. Eenzelfde stramien vinden we terug voor de locaties aangeduid als ongunstig. Ook kunnen we voorzichtige conclusies trekken betreffende de gebieden die in 2013 als onzeker werden bestempeld. De voorspellingen uit Mergeay en Van Hove (2013) werden onder andere gebaseerd op beschikbare habitat en overeenkomstige oppervlaktes.

We concluderen een voorlopig lokale gunstige genetische status van de heikikker maar mogen de reeds gekende gevaren waarmee de soort te kampen krijgt niet uit het oog verliezen. De te kleine effectieve groottes die we waarnemen voor de meeste populaties reflecteren de snelle achteruitgang van de soort op vele plaatsen, zoals ook in de Vlaamse Rode Lijst van de amfibieën weergegeven (Jooris *et al.*, 2012, 2013) en gerapporteerd in andere buurlanden (**Bijlage 3**; Eionet, s.d.). Om het voortbestaan van de soort te kunnen garanderen onderstrepen we dat er, naast het monitoren van de genetische status, ook ingezet moet blijven worden op de bescherming, uitbreiding en het behoud van de habitat van de soort. We adviseren om populatiekernen die lage effectieve cijfers vertonen te vergroten via uitbreiding van het leefgebied. Ook moet getracht worden om in te zetten, waar mogelijk, op het verbinden van kleine populaties. Dit is van cruciaal belang voor het behoud van een duurzame genetische diversiteit.

5 REFERENCES

- Allendorf F. & Ryman N. (2002). The role of genetics in population viability analysis. In: Beissinger S.R. M.D.R. (ed.). Population Viability Analysis. Chicago USA: University of Chicago Press, p. 50–85.
- ANB (2019). Soortenbeschermingsprogramma voor heikikker (*Rana arvalis*).
- Berx C., Helsen L., Röttger R., Helsen K., Wellens M., Verhaert I., de Nijn B. & Toelen D. (2010). Provinciale Prioritaire Soorten Provincie Antwerpen. Dienst Duurzaam Milieu- en Natuurbeleid, Provincie Antwerpen.
- Brys R., Cox K. & Neyrinck S. (2020). Ontwikkeling van een monitoringsprotocol voor heikikker - Bepaling van de aanwezigheid en verhouding bruine en heikikker via (e)DNA-barcoding en opstart genetische monitoring. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2020 (8). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. <https://doi.org/10.21436/inbor.17686189>.
- de Jong T.H. & Vos C.C. (2009). Heikikker. *Rana arvalis*. In: Creemers R.C.M., van Delft J.J.C.W. (red.). (2009). De amfibieën en reptielen van Nederland. Nederlandse Fauna 9. Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis, European Invertebrate Survey-Nederland, Leiden. p. 199–208.
- Do C., Waples R.S., Peel D., Macbeth G.M., Tillett B.J. & Ovenden J.R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size N_e from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14 (1): 209–214. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12157>.
- Eionet (s.d.). the Article 17 web tool on biogeographical assessments of conservation status of species and habitats under Article 17 of the Habitats Directive. <https://nature-art17.eionet.europa.eu/article17/species/summary/?period=5&subject=Pelobates%20fuscus>.
- Frankham R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: A review. *Genetical Research* 66 (2): 95–107. <https://doi.org/10.1017/S0016672300034455>.
- Frankham R. (2005). Stress and adaptation in conservation genetics. *Journal of Evolutionary Biology* 18 (4): 750–755. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00885.x>.
- Goudet J. (2005). hierfstat, a package for r to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* 5 (1): 184–186. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x>.
- Hoban S., Bruford M., D’Urban Jackson J., Lopes-Fernandes M., Heuertz M., Hohenlohe P.A., Paz-Vinas I., Sjögren-Gulve P., Segelbacher G., Vernesi C., Aitken S., Bertola L.D., Bloomer P., Breed M., Rodríguez-Correa H., Funk W.C., Grueber C.E., Hunter M.E., Jaffe R., Liggins L., Mergeay J., Moharrek F., O’Brien D., Ogden R., Palma-Silva C., Pierson J., Ramakrishnan U., Simo-Droissart M., Tani N., Waits L. & Laikre L. (2020). Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. *Biological Conservation* 248. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108654>.
- IUCN (2009). *Rana arvalis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-1.

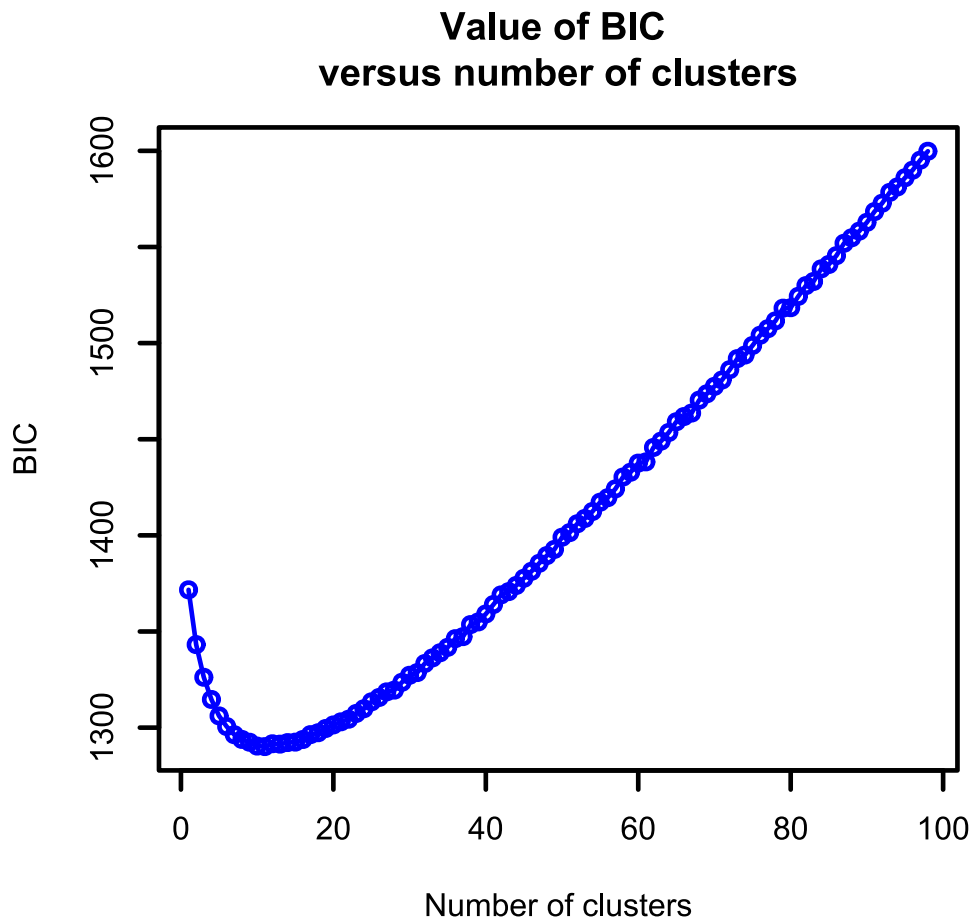
- Palo J.U. & Merilä J. (2003). A simple RFLP method for identification of two ranid frogs. *Conservation Genetics* 4 (6): 801–803. <https://doi.org/10.1023/B:COGE.00000006117.43571.6e>.
- Peakall R. & Smouse P.E. (2012). GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28 (19): 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155 (2): 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>.
- Rousset F. (2008). GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8 (1): 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>.
- Speybroeck J. & De Knijf G. (2019). Staat van instandhouding (status en trends) van de soorten van de Habitatrichtlijn - rapportageperiode 2013-2018. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2019 (12). In: Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2019 (12). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. <https://doi.org/10.21436/inbor.16089660>.
- Vos C.C., Antonisse-De Jong A.G., Goedhart P.W. & Smulders M.J.M. (2001). Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). *Heredity*.
- Vos C.C. & Chardon J.P. (1998). Effects of habitat fragmentation and road density on the distribution pattern of the moor frog *Rana arvalis*. *Journal of Applied Ecology* 35 (1): 44–56. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.1998.00284.x>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2007.02061.x>.
- Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984). Estimating F-statistics, for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38 (6): 1358–1370.

6 BIJLAGE

Bijlage 1: Overzicht van de gebruikte microsatellietmerker set per multiplex en per fluorescent label.
Tabel naar voorbeeld uit Bijlage 3, Brys *et al.* (2020).

Multiplexnr.	Merkernaam	Fluorescent Label	Bron / Gen bank n°
MP1	RC08604	FAM	(Vos <i>et al.</i> , 2001)
	RlatCa41	FAM	(Garner & Tomio, 2001)
	RtsB14	VIC	(Berlin <i>et al.</i> , 2000)
	RA14	NED	EU871714
	RCIDII	PET	(Vos <i>et al.</i> , 2001)
	RECALQ	PET	(Vos <i>et al.</i> , 2001)
	RNTYR2	PET	(Vos <i>et al.</i> , 2001)
MP2	Rt2Ca2-22	FAM	(T. Garner, niet gepubliceerd)
	Rtempμ9	FAM	(Rowe & Beebee, 2001)
	RA03	FAM	EU871710
	RlatCa18	VIC	(Garner & Tomio, 2001)
	RA04	VIC	EU871711
	Rtempμ4	NED	(Rowe & Beebee, 2001)
	RRD590	NED	(Vos <i>et al.</i> , 2001)
	Rtμp	NED	(Pidancier <i>et al.</i> , 2002)
	Rtempμ5	PET	(Rowe & Beebee, 2001)
	RA11	PET	EU871712
MP3	RtU4	FAM	(Berlin <i>et al.</i> , 2000)
	RA13	VIC	EU871713

Bijlage 2: Kmeans benadering voor het vinden van het meest optimale aantal clusters in de dataset voor DAPC. De figuur heeft weer wat de BIC (Bayesian Information Criterion)-waarden tegenover het aantal clusters. Idealiter komt het optimale aantal clusters overeen met de laagste BIC-waarde (Jombart & Collins, 2015).



Bijlage 3: Schermafbeelding van kaart voor periode 2013-2018 en alle bio-regio's (Eionet, s.d.). Status van de heikikker in de EU-lidstaten (EU28) volgens officiële beoordeling als deel van de Habitatrichtlijn (92/43/EEG) – Art. 17. Betekenis van de legende: groen=gunstig, licht grijs=onbekend, donker grijs=niet beschikbaar, oranje=ongunstig-onvoldoende en rood=ongunstig-slecht.

