



Vlaanderen
is wetenschap

Kweek, translocatie en genetica van de vroedmeesterpad in Vlaanderen (2021-2024)

Deels i.o.v. het Agentschap Natuur en Bos LIFE14
IPE BE 002 BNIP

Loïc van Doorn, Johan Auwerx, Joachim Mergeay, Jeroen Speybroeck, Daan Van Eenaeme,
Caroline Mouton, Io Deflem

**INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK**

Auteurs:

Loïc van Doorn , Johan Auwerx , Joachim Mergeay , Jeroen Speybroeck , Daan Van Eenaeme, Caroline Mouton , Io Deflem 

Reviewers:

Gerlinde Van Thuyne

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:

INBO Brussel, Herman Teirlinckgebouw, Havenlaan 88 bus 73, 1000 Brussel, België
vlaanderen.be/inbo

e-mail:

info@inbo.be

Wijze van citeren:

van Doorn, L. *et al.* (2025). Kweek, translocatie en genetica van de vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) in Vlaanderen (2021-2024). Deels i.o.v. het Agentschap Natuur en Bos LIFE14 IPE BE 002 BNIP. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2025 (36). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. DOI: doi.org/10.21436/inbor.128949348

D/2025/3241/213

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2025 (36)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Hilde Eggermont

Foto cover:

Vroedmeesterpad (Loïc van Doorn)

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:

deels i.o.v. het Agentschap Natuur en Bos LIFE14 IPE BE 002 BNIP uitgevoerd

AGENTSCHAP
NATUUR & BOS



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

KWEEK, TRANSLOCATIE EN GENETICA VAN DE VROEDMEESTERPAD (*ALYTES OBSTETRICANS*) IN VLAANDEREN (2021-2024)

Deels i.o.v. het Agentschap Natuur en Bos LIFE14 IPE
BE 002 BNIP

Loïc van Doorn, Johan Auwerx, Joachim Mergeay, Jeroen Speybroeck, Daan Van
Eenaeme, Caroline Mouton, Io Deflem

doi.org/10.21436/inbor.128949348

Dankwoord/Voorwoord

We danken Johan Toebat, leidend ambtenaar voor ANB in deze opdracht, en de leden van de stuurgroep voor de positieve en resultaatgerichte samenwerking.

Daarnaast zijn we ook dank verschuldigd aan de vele professionals en vrijwilligers die hun handen uit de mouwen steken om de gebieden op orde te krijgen, vergunningen aan te vragen, beheerwerken uit te voeren en proactief mee na te denken om de translocaties en populaties alle kansen te bieden.

Samenvatting

Het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) voert in opdracht van het Agentschap voor Natuur en Bos (ANB) een kweek- en translocatieprogramma uit voor de vroedmeesterpad. Dit project dient een deel van de doelstellingen van het Soortenbeschermingsprogramma (SBP) voor de vroedmeesterpad te realiseren. Het programma ging in 2019 van start met het verzamelen van vroedmeesterpadlarven uit populaties in Vlaanderen, Wallonië en Nederland. Hierbij brachten we de genetische diversiteit en verwantschap van deze en omliggende populaties in kaart. Op basis van de genetische resultaten verdeelden we de verzamelde dieren over verschillende kweekgroepen, waarvan de nakomelingen vanaf 2021 worden ingezet voor translocaties in Vlaanderen.

In de periode 2021-2023 zijn 15.618 vroedmeesterpadden vrijgelaten op elf locaties. De translocaties zullen de komende jaren worden voortgezet. Daarnaast ontwikkelden we een single nucleotide polymorphisms (SNP) genetisch panel. Dit panel is afgestemd op eerder onderzochte populaties en getest op beperkte schaal bij drie niet eerder genetisch geanalyseerde populaties, evenals bij twee populaties waarvoor translocaties hebben plaatsgevonden. De methodiek blijkt effectief en maakt het mogelijk om in de toekomst een grondige monitoring uit te voeren van zowel al onderzochte als nieuwe en nog niet eerder geanalyseerde populaties.

English abstract

The Research Institute for Nature and Forest (INBO) is implementing a breeding and translocation program for the midwife toad on behalf of the Agency for Nature and Forest (ANB). This project aims to achieve part of the objectives set out in the Species Protection Program for the midwife toad. The program began in 2019 with the collection of midwife toad larvae from populations in Flanders, Wallonia, and the Netherlands. During this process, the genetic diversity and relationships of these and surrounding populations were analyzed. Based on the genetic results, the collected animals were divided into breeding groups, and their offspring have been used for translocations in Flanders since 2021.

Between 2021 and 2023, 15.618 midwife toads were released at eleven locations, and these translocations will continue in the coming years. Additionally, a single nucleotide polymorphisms (SNP) genetic panel was developed. This panel is tailored to previously studied populations and was tested on a small scale with three populations that had not been genetically analyzed before, as well as with two populations where translocations have taken place. The methodology has proven to be effective, enabling thorough monitoring in the future for both previously studied populations and new or yet-to-be-analyzed populations.

Inhoudstafel

Dankwoord/Voorwoord	2
Samenvatting	3
English abstract	4
Lijst van figuren	6
Lijst van tabellen	6
1 Inleiding	7
2 Kweek	9
3 Translocatie	14
4 Genetica	16
4.1 werkwijze	16
4.1.1 Staalname	16
4.1.2 Voorbereiding SNP-panel	18
4.1.3 Ontwikkeling SNP-panel	19
4.1.4 Validatie SNP-panel	19
4.1.5 Analyses nieuwe populaties	19
4.2 Resultaten	20
4.2.1 Validatie SNP-panel	20
4.2.2 Resultaten nieuwe populaties	20
4.3 Relevantie voor het translocatieprogramma	29
5 Vervolgproject	31
Referenties	32
Bijlagen	34

Lijst van figuren

Figuur 1 Effect van de densiteit aan larven op de uiteindelijke massa van de juvenielen in die bakken. Zoals bij vele soorten amfibieën speelt ook voor deze soort een densiteitseffect, waardoor er wordt geopteerd om niet meer dan 500 larven per 250L bak (2 larven/L) te huisvesten. 10

Figuur 2 Aantal larven geboren per kweekgroep per jaar. De kader geeft het totaal aantal larven per jaar weer. 11

Figuur 3 Waargenomen heterozygositeit (H_o) van de verschillende kweekgroepen gelinkt aan het gemiddelde aantal larven per adult vrouwtje in de kweek per jaar voor de periode 2021-2024. 12

Figuur 4 Massa van de juvenielen per kweekgroep per jaar (niet-overwinterde larven). 13

Figuur 5 Ordinatieplot (PCA) voor de eerste twee principal components (PC1 en PC2) op basis van de gecombineerde dataset uit 2021 en 2024 en het SNP-panel (176 SNP's). Elk punt vertegenwoordigt een individu, waarbij de kleuren het land en de vormen de locatie aangeven. 24

Figuur 6 Ordinatieplot (PCA) voor de tweede en derde principal components (PC3 en PC4) op basis van de gecombineerde dataset uit 2021 en 2024 en het SNP-panel (252 SNP's). Elk punt vertegenwoordigt een individu, waarbij de kleuren het land en de vormen de locatie van het individu aangeven. 25

Figuur 7 Ordinatieplot (PCA) voor de eerste twee principal components (PC1 en PC2) op basis van de gecombineerde dataset uit 2021 en 2024 en het SNP-panel (176 SNP's). Enkel de individuen afkomstig uit bijplaatsingen en herintroducties (roze kleur) en de individuen afkomstig uit populaties die gebruikt werden voor de kweek zijn weergegeven. Elk punt vertegenwoordigt een individu, waarbij de kleuren de kweekgroep en de vormen de locatie van het individu aangeven. 26

Lijst van tabellen

Tabel 1 Kweekgroepen en bronpopulaties.	8
Tabel 2 Aantal adulte vroedmeesterpadden per kweekgroep per jaar.	9
Tabel 3 Het aantal uitgezette larven en juvenielen van vroedmeesterpad per jaar.	14
Tabel 4 Translocaties van vroedmeesterpad (zowel larven als juvenielen) in de periode 2021-2023.	15
Tabel 5 Overzicht van staalname (2019 en 2020-2024) voor het genetisch onderzoek. De populaties die bemonsterd werden in 2020-2024 en dus werden meegenomen in de nieuwe analyse, zijn vetgedrukt. Onder herkomst wordt “kweek” aangeduid voor de stalen verzameld uit de kweekgroepen in het Onderzoekscentrum.	17
Tabel 6 De inteeltcoëfficiënt (<i>FIS</i>), verwachte (<i>He</i>) en geobserveerde heterozygositeit (<i>Ho</i>), het gemiddeld aantal allelen (MNA) en het effectief aantal allelen (NEA) per populatie berekend voor het SNP-panel (176 SNP's) voor de gecombineerde dataset uit 2021 en 2024. Populaties bemonsterd in 2020-2024 zijn vetgedrukt.	21
Tabel 7 Aantal correct toegewezen individuen op basis van DAPC-analyses. Voor incorrect toegewezen individuen wordt de foutief toegewezen populatie vermeld. Een individu wordt als volledig toegewezen beschouwd wanneer meer dan 70% van de toewijzing aan één populatie wordt toegekend; bij een lagere toewijzing worden ook de deelpopulaties weergegeven. Populaties bemonsterd in 2020-2024 zijn vetgedrukt.	27

1 INLEIDING

Dit rapport bouwt voort op het vorige [rapport](#) waarin de opstart van het kweek- en translocatieproject voor de vroedmeesterpad in Vlaanderen werd gedocumenteerd (Auwerx et al., 2021). Het huidige rapport behandelt de translocaties die hebben plaatsgevonden in de periode van 2021 tot en met 2023. Daarnaast wordt de opmaak van een *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) genetisch panel besproken, evenals de genetische afkomst van enkele eerder niet onderzochte populaties in 2023 en een beperkte genetische monitoring van de translocaties in 2024.

Dit rapport maakt deel uit van een samenwerkingsovereenkomst (SWO) tussen het Agentschap voor Natuur en Bos (ANB) en het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) en wordt mede gefinancierd door de Europese Commissie via het LIFE BNIP-project (LIFE14 IPE BE 002 BNIP). De SWO omvat drie taken: (1) de jaarlijkse kweek van 400-800 larven van de vroedmeesterpad gedurende de periode 2021-2023, (2) de ontwikkeling van een uitzet- en monitoringsstrategie, en (3) de rapportage van de uitgevoerde activiteiten. Het project wordt opgevolgd door een stuurgroep die halfjaarlijks bijeenkomt onder voorzitterschap van ANB. De monitoring van de populaties wordt besproken in een afzonderlijk rapport. De SWO geeft uitvoering aan één van de speerpunten van het soortenbeschermingsprogramma (SBP) voor de vroedmeesterpad: het via translocaties bijdragen aan het behalen van de instandhoudingsdoelstelling (IHD), die stelt dat in Vlaanderen 20 populaties met elk 200 roepende mannetjes gerealiseerd moeten worden (Goemaere & Heylen, 2017). De genetische analyses en de uitvoering van de translocaties vallen buiten de scope van deze SWO maar worden eveneens gerapporteerd.

In het eerdere project (Auwerx et al., 2021) zijn in 2019 larven verzameld uit dertien verschillende herkomstgebieden, die vervolgens zijn opgekweekt tot volwassen dieren. Sinds 2021 worden deze volwassen dieren ingezet voor de jaarlijkse kweek. De individuen afkomstig van de ENCI groeve in Nederland zijn niet weerhouden wegens sterke genetische verschillen met de andere ingezamelde populaties. De populatie van de ENCI groeve is vermoedelijk het gevolg van een niet gedocumenteerde translocatie. De overige dieren zijn ingedeeld in zes kweekgroepen (**Tabel 1**). De keuze voor zes kweekgroepen was praktisch, om de verschillende herkomstgebieden op te kunnen volgen. Genetisch gezien is deze indeling slechts deels relevant, gezien de vroedmeesterpadden in België en Nederland uiteenvallen in een westelijke en oostelijke groep. Er zijn geen aanwijzingen om deze groepen gescheiden te houden bij translocaties.

Tabel 1 Kweekgroepen en bronpopulaties.

Kweekgroep	Naam	Bronpopulaties
VB	Vlaams-Brabant	Groeve Ganzemans, Heymansdries/Ezelsweg
BO	Borgloon	Groot-Loon
VO	Voeren	Veursvallei, Kattenroth
NL	Nederlands Limburg	Keverberg, Groeve Blom
WO	Wallonië-Oost	Marche-En-Famenne, Marchempré, Stockay
WW	Wallonië-West	St-Antoine, Grande Honnelle

Het genetisch onderzoek dat eveneens werd gerapporteerd in 2021 had als doel de genetische diversiteit en structuur van de Vlaamse en een deel van de Waalse en Nederlandse populaties in kaart te brengen (Auwerx et al., 2021). De bevindingen uit dit onderzoek dienden vervolgens als basis voor het huidige kweekprogramma, enerzijds om de toestand van potentiële bronpopulaties en uitzetlocaties te bestuderen en anderzijds om de identiteit van bronpopulaties te kennen. Om de genetische diversiteit en structuur te bepalen werden ongeveer 1600 genetische variaties, ook wel *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP's) genoemd, geïdentificeerd binnen deze populaties. SNP's zijn variaties in één enkele nucleotide (oftewel één 'letter' in de genetische code) tussen individuen en populaties, en komen vaak in grote aantallen voor in het genoom van organismen (de volledige set van genetisch materiaal of DNA). De analyse van deze variaties werd uitgevoerd met behulp van een *restriction site-associated DNA sequencing* (RAD-seq) techniek, die zich richt op een klein deel van het genoom om SNP's te detecteren en de genotypes, of genetische samenstelling, van deze SNP's voor alle individuen afzonderlijk te bepalen (Andrews et al., 2016). Hoewel RAD-seq gedetailleerde informatie biedt, is de techniek vanwege de hoge kosten en complexiteit minder geschikt voor routinematige monitoring van kweek- en uitzettingsprogramma's.

In een volgende fase is het daarom aangewezen om de meest informatieve SNP's te selecteren voor de ontwikkeling van een SNP-panel, dat specifiek gericht is op het monitoren en opvolgen van de uitgezette populaties van vroege meesterpad in West-Europa. De geselecteerde SNP's kunnen vervolgens op een efficiënte en doelgerichte manier worden gesequeneerd met behulp van de *Genotyping-in-Thousands by Sequencing* (GT-seq) techniek (Campbell et al., 2015). In tegenstelling tot RAD-seq, dat een willekeurig deel van het genoom onderzoekt, maakt GT-seq gebruik van specifiek ontwikkelde primers die gericht zijn op de DNA-sequenties waarin de geselecteerde SNP's zich bevinden. Dit betekent dat voor de detectie van 200 SNP's op 200 verschillende locaties in het genoom, 200 sets van primers nodig zijn. Primers worden ontwikkeld om te binden aan specifieke delen van het DNA, die vervolgens specifieke SNP's bevatten. Na de selectie van de meest informatieve SNP's en de ontwikkeling van een geschikt protocol stelt een SNP-panel ons in staat om op een kostenefficiënte en routinematige manier een groot aantal individuen te genotyperen, zodat we de genetische oorsprong van deze dieren nauwkeurig kunnen bepalen.

2 KWEEK

Vroedmeesterpaden worden in onze contreien geslachtsrijp na twee of drie winters. De jaarlijkse overleving van de adulte dieren in de kweek is gemiddeld 98%. Er wordt gestreefd naar 50 adulte individuen per kweekgroep (**Tabel 2**). Zolang een kweekgroep niet bestaat uit 50 adulte dieren, worden er nakomelingen van de desbetreffende kweekgroep bijgehouden om deze aan te vullen. Hierdoor treedt na enkele generaties genetische verarming op, dit was echter binnen de looptijd van het voorliggende project niet aan de orde.

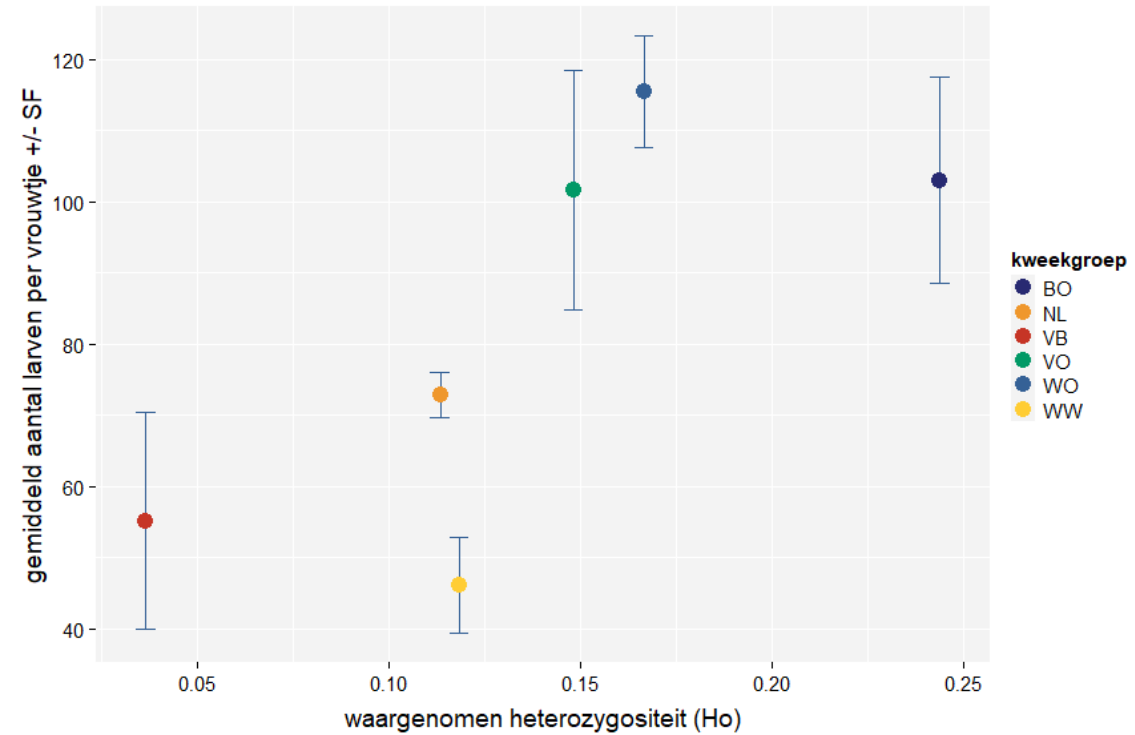
Tabel 2 Aantal adulte vroedmeesterpadden per kweekgroep per jaar.

	Kweekgroep					
Jaar	WW	WO	VB	BO	VO	NL
2021	20	19	18	16	20	20
2022	24	34	16	17	33	38
2023	30	41	20	17	36	44

De productie van vroe­de­meester­pad­den wordt in het Onder­zoeks­cen­trum voor Aquatische Fauna te Linke­beek uit­ge­voerd met behulp van bui­ten­ter­ra­ria voor de adul­ten en een inten­sieve opkweek van de larven in een Recirculating Aquaculture System (RAS), ge­plaatst in een tun­nel­serre. In het RAS wor­den het aantal larven, de voeding en de wa­ter­kwaliteit geoptimaliseerd in een ge­sloten systeem met ver­schil­len­de filters.

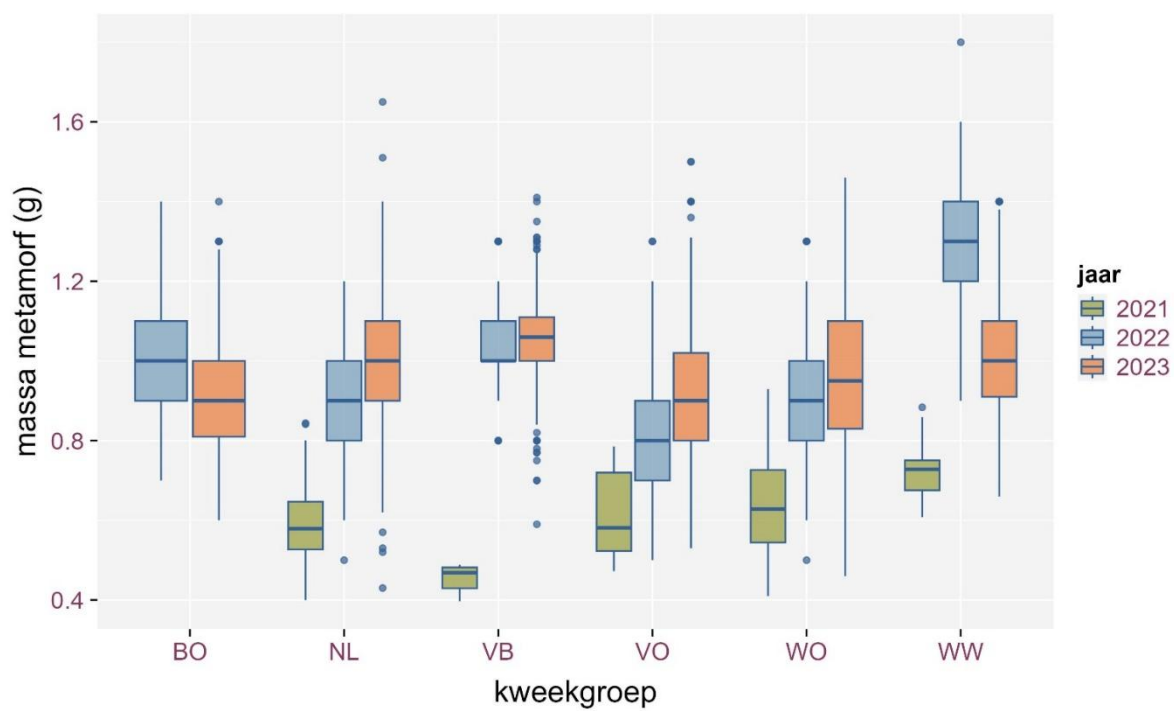
De adulten overwinteren 's winters onder gecontroleerde omstandigheden bij omgevingstemperatuur. De ruimte wordt boven het vriespunt gehouden. In het voorjaar worden de kweekgroepen in buitenterraria geplaatst. De buitenterraria (2.6m op 1.3m) zijn gevuld met zand, schuilplaatsen, vegetatie en een waterbakje. De adulte dieren worden wekelijks gevoerd met levende “gut-loaded” en “dusted” huiskrekels (*Acheta domesticus*). De waterbakjes worden iedere ochtend gecontroleerd op afgezette larven. Aanwezige larven worden geteld en overgeplaatst naar een individueel bakje gevuld met 8L bronwater. De eventueel aanwezige lege eisnoeren worden op ethanol bewaard, voor latere analyse. Als de larven na 1-2 weken voldoende gegroeid zijn worden deze overgeplaatst naar het RAS. Hier zijn 19 bakken (250L per bak) beschikbaar. Het RAS wordt gevuld met bronwater wat zowel naar waterkwaliteit als afwezigheid van pathogenen van belang is. De larven worden per kweekgroep apart gehuisvest, maar niet per afzonderlijk legsel, gezien het praktisch niet mogelijk is deze apart te houden. De bakken worden gestockeerd tot een maximum van ongeveer 500 larven (**Figuur 1**). Hierna wordt een nieuwe bak gestart. Zo worden de larven in cohortes van grotendeels dezelfde leeftijd opgekweekt. De larven blijven in het RAS tot aan de uitzet in het najaar of tot ze in metamorfose gaan. De larven die binnen hetzelfde jaar metamorfosen worden uit het RAS overgeplaatst naar metamorfose-bakken. Na metamorfose worden ze gewogen en 1-2 weken bijgehouden tot uitzet. In deze periode worden ze met huiskrekels gevoerd.

De verschillen in aantal nakomelingen tussen de kweekgroepen (**Figuur 2**) zijn, naast het aantal adulte dieren per kweekgroep, te verklaren door genetische verschillen tussen de kweekgroepen (**Figuur 3**). Het gemiddeld aantal larven per jaar per vrouwtje lijkt positief gecorreleerd met de waargenomen heterozygositeit (H_o , een maat voor de genetische diversiteit, zie **Tabel 6**). Indien dit patroon doorgetrokken wordt naar de (getransloceerde) populaties in Vlaanderen, heeft dit potentieel gevolgen voor de duurzaamheid ervan (zie ook genetica).



Figuur 3 Waargenomen heterozygositeit (H_o) van de verschillende kweekgroepen gelinkt aan het gemiddelde aantal larven per adult vrouwtje in de kweek per jaar voor de periode 2021-2024.

De overleving van de larven en juvenielen tot aan de uitzet in de periode 2021-2023 is 91%. De verhouding tussen de aantallen uitgezette larven en juvenielen (**Tabel 3**) verschuift doorheen de jaren richting juvenielen. Dit is een gevolg van het optimaliseren van de kweekprotocols, waardoor de dieren sneller groeien. Daarnaast stijgt ook de massa van de metamorfen (**Figuur 4**), wat eveneens duidt op gezondere dieren, hetgeen mogelijk zal resulteren in een betere overleving na uitzet.



Figuur 4 Massa van de juvenielen per kweekgroep per jaar (niet-overwinterde larven).

3 TRANSLOCATIE

De translocaties worden uitgevoerd onder vergunning ANB/BL-FF/V19-00066quinque. De leidraad translocaties voor biodiversiteit in Vlaanderen (Mergeay & Verbist, 2021) geeft een overzicht van de nomenclatuur en methodiek alsook het legaal kader van translocaties.

Jaarlijks worden zowel larven als juvenielen uitgezet (**Tabel 3**). In 2022 en 2023 zijn daarnaast ook overwinterende larven van het voorgaande jaar uitgezet. De stijgende trend is gelinkt aan de aantallen en leeftijd van de adulten in de kweekgroepen (**Tabel 2**). Translocaties worden uitgevoerd voor 3-4 jaar per doellocatie, om een natuurlijke populatie-opbouw te verkrijgen.

Tabel 3 Het aantal uitgezette larven en juvenielen van vroedmeesterpad per jaar.

Jaar	Larven	Juvenielen	Totaal
2021	791	189	980
2022	2896	2133	5029
2023	4348	5261	9609
2021-2023	8035	7583	15618

Op vraag van het ANB worden in de Voerstreek enkel dieren uit de oostelijke genetische lijn uitgezet (kweekgroepen NL, WO en VO). In Vlaams-Brabant was het de intentie om enkel de westelijke genetische lijn (kweekgroepen WW en VB) te gebruiken, maar door de te lage output van deze kweekgroepen (**Figuur 2**) is hier vanaf de start in 2021 van afgeweken en worden alle kweekgroepen gebruikt voor de translocaties in Vlaams-Brabant. De uitgevoerde translocaties zijn samengebracht in **Tabel 4**.

Uitzetgebieden dienen te voldoen aan de habitatgeschiktheidscriteria (Speybroeck & Auwerx, 2019). Deze criteria zijn opgesteld om de leefgebieden op kwalitatieve en kwantitatieve manier te beoordelen naar hun geschiktheid voor de vroedmeesterpad, specifiek in het kader van translocaties.

Tabel 4 Translocaties van voedmeesterpad (zowel larven als juvenielen) in de periode 2021-2023.

Provincie	Gemeente	Populatie	Locatie	Type translocatie	Jaar	Aantal	Totaal
Vlaams-Brabant	Sint-Genesius-Rode	Kwadebeekvallei	Hof-Ten-Hout	Geassisteerde herkolonisatie	2021	150	2286
Vlaams-Brabant	Sint-Genesius-Rode	Kwadebeekvallei	Hof-Ten-Hout	Geassisteerde herkolonisatie	2022	697	
Vlaams-Brabant	Sint-Genesius-Rode	Kwadebeekvallei	Hof-Ten-Hout	Geassisteerde herkolonisatie	2023	1439	
Vlaams-Brabant	Sint-Genesius-Rode	Kwadebeekvallei	Heymansdries/Ezelsweg	Bijplaatsing	2021	50	451
Vlaams-Brabant	Sint-Genesius-Rode	Kwadebeekvallei	Heymansdries/Ezelsweg	Bijplaatsing	2022	150	
Vlaams-Brabant	Sint-Genesius-Rode	Kwadebeekvallei	Heymansdries/Ezelsweg	Bijplaatsing	2023	251	
Vlaams-Brabant	Sint-Genesius-Rode	Kwadebeekvallei	Kwadeplasstraat loc. 1	Geassisteerde herkolonisatie	2021	0	207
Vlaams-Brabant	Sint-Genesius-Rode	Kwadebeekvallei	Kwadeplasstraat loc. 1	Geassisteerde herkolonisatie	2022	0	
Vlaams-Brabant	Sint-Genesius-Rode	Kwadebeekvallei	Kwadeplasstraat loc. 1	Geassisteerde herkolonisatie	2023	207	
Vlaams-Brabant	Overijse	Blaivie	Blaivie	Herintroductie	2021	200	1829
Vlaams-Brabant	Overijse	Blaivie	Blaivie	Herintroductie	2022	709	
Vlaams-Brabant	Overijse	Blaivie	Blaivie	Herintroductie	2023	920	
Vlaams-Brabant	Tervuren	Golfpark Tervuren	Golfpark Tervuren	Herintroductie	2021	0	2787
Vlaams-Brabant	Tervuren	Golfpark Tervuren	Golfpark Tervuren	Herintroductie	2022	1201	
Vlaams-Brabant	Tervuren	Golfpark Tervuren	Golfpark Tervuren	Herintroductie	2023	1586	
Vlaams-Brabant	Huldenberg	Ganspoel	Ganspoel	Bijplaatsing	2021	150	2252
Vlaams-Brabant	Huldenberg	Ganspoel	Ganspoel	Bijplaatsing	2022	757	
Vlaams-Brabant	Huldenberg	Ganspoel	Ganspoel	Bijplaatsing	2023	1345	
Vlaams-Brabant	Huldenberg	Ganzemansstraat	Groeve Ganzemans	Bijplaatsing	2021	0	722
Vlaams-Brabant	Huldenberg	Ganzemansstraat	Groeve Ganzemans	Bijplaatsing	2022	265	
Vlaams-Brabant	Huldenberg	Ganzemansstraat	Groeve Ganzemans	Bijplaatsing	2023	457	
Vlaams-Brabant	Huldenberg, Bertem	Ganzemansstraat	Tersaert	Bijplaatsing	2021	0	540
Vlaams-Brabant	Huldenberg, Bertem	Ganzemansstraat	Tersaert	Bijplaatsing	2022	200	
Vlaams-Brabant	Huldenberg, Bertem	Ganzemansstraat	Tersaert	Bijplaatsing	2023	340	
Vlaams-Brabant	Lennik	Gaasbeek	Gaasbeek	Herintroductie	2021	0	1262
Vlaams-Brabant	Lennik	Gaasbeek	Gaasbeek	Herintroductie	2022	0	
Vlaams-Brabant	Lennik	Gaasbeek	Gaasbeek	Herintroductie	2023	1262	
Limburg	Voeren	Veursvallei	Veursvallei noord	Bijplaatsing	2021	150	850
Limburg	Voeren	Veursvallei	Veursvallei noord	Bijplaatsing	2022	300	
Limburg	Voeren	Veursvallei	Veursvallei noord	Bijplaatsing	2023	400	
Limburg	Voeren	Veursvallei	Daal	Geassisteerde herkolonisatie	2021	280	2432
Limburg	Voeren	Veursvallei	Daal	Geassisteerde herkolonisatie	2022	750	
Limburg	Voeren	Veursvallei	Daal	Geassisteerde herkolonisatie	2023	1402	

4 GENETICA

4.1 WERKWIJZE

4.1.1 Staalname

Aangezien het DNA van de in 2019 verzamelde stalen niet langer beschikbaar is voor analyse, en om de genotypes van het SNP-panel te valideren door ze te vergelijken met eerder vastgestelde genotypes, hebben we nieuwe stalen verzameld van twee zuivere kweekgroepen: ENCI (deze wordt niet gebruikt voor translocatie) en Borgloon (herkomst van deze populatie is Groot-Loon). Deze zijn aangevuld met stalen van één wilde populatie waar geen bijplaatsingen zijn gebeurd (Kattenroth). Voor de ENCI- en Borgloon-populaties zijn mondswabs van volwassenen afgenomen, terwijl staartpunten van larven zijn verzameld van de Kattenroth-populatie. Daarnaast zijn tussen 2020 en 2024 staartpunten van larven verzameld van vijf populaties die nog niet eerder geanalyseerd werden: Groeve Ganzemans in Huldenberg (voor en na bijplaatsingen uit alle kweekgroepen), Groeve Blaivie in Overijse (herintroductie uit alle kweekgroepen), Tervuren Centrum, Veeweide (Tervuren) en een populatie uit Etterbeek (**Tabel 5**).

Tabel 5 Overzicht van staalname (2019 en 2020-2024) voor het genetisch onderzoek. De populaties die bemonsterd werden in 2020-2024 en dus werden meegenomen in de nieuwe analyse, zijn vetgedrukt. Onder herkomst wordt “kweek” aangeduid voor de stalen verzameld uit de kweekgroepen in het Onderzoekscentrum.

Site	Code	Jaar	Herkomst	Land	Provincie	Aantal
Groot-Loon (Borgloon)	LOON	2019	Wild	België	Limburg	29
	LOON24	2024	Kweek	België	Limburg	16
Voeren - Kattenroth	KATT	2019	Wild	België	Limburg	7
	KATT24	2024	Wild	België	Limburg	24
Voeren - Veursbos	VEVE	2019	Wild	België	Limburg	19
Sint-Genesius-Rode	GENE	2019	Wild	België	Vlaams-Brabant	1
Tervuren - Centrum	TERV	2023	Wild	België	Vlaams-Brabant	23
Huldenberg - Groeve Ganzemans	GANZ20	2020	Wild	België	Vlaams-Brabant	23
	GANZ24	2024	Wild	België	Vlaams-Brabant	22
Overijse - Groeve Blaivie	BLAI	2024	Wild	België	Vlaams-Brabant	21
Tervuren - Veeweide	VEEW	2024	Wild	België	Vlaams-Brabant	30
Etterbeek	ETTE	2023	Wild	België	Brussel	20
Terril St-Antoine	TERR	2019	Wild	België	Henegouwen	28
Grande Honnelle	HONN	2019	Wild	België	Henegouwen	2
Carrière de Stockay	STOC	2019	Wild	België	Luik	28
Marche-en-Famenne	FAME	2019	Wild	België	Luxemburg	28
C. de Marchempré	MARC	2019	Wild	België	Namen	28
Bemelenberg	BEME	2019	Wild	Nederland	Limburg	10
Groeve Blom	BLOM	2019	Wild	Nederland	Limburg	13
Curfsgroeve	CURF	2019	Wild	Nederland	Limburg	9
Eckelrade	ECKE	2019	Wild	Nederland	Limburg	25
Emmaberg	EMMA	2019	Wild	Nederland	Limburg	16
ENCI-groeve	ENCI	2019	Wild	Nederland	Limburg	27
	ENCI24	2024	Kweek	Nederland	Limburg	14
Gerendal	GERE	2019	Wild	Nederland	Limburg	24
Holset	HOLS	2019	Wild	Nederland	Limburg	24
Julianagroeve	JULI	2019	Wild	Nederland	Limburg	11
Keverberg	KEVE	2019	Wild	Nederland	Limburg	8
Kloosterbosch	KLOO	2019	Wild	Nederland	Limburg	22
Kruisbos	KRUI	2019	Wild	Nederland	Limburg	25
Kunderberg (Ubachsberg Noord)	KUND	2019	Wild	Nederland	Limburg	10
Meertsengroeve	MEER	2019	Wild	Nederland	Limburg	9
Mheer	MHEE	2019	Wild	Nederland	Limburg	10
Noorbeek	NOOR	2019	Wild	Nederland	Limburg	14
Putberg	PUTB	2019	Wild	Nederland	Limburg	5
Groeve 't Rooth	ROOT	2019	Wild	Nederland	Limburg	12
Schaelsberg	SCHA	2019	Wild	Nederland	Limburg	4
Ubachsberg-Zuid	UBAC	2019	Wild	Nederland	Limburg	5
Wolfsrath	WOLF	2019	Wild	Duitsland	-	5
Goslar	GOSL	2019	Wild	Duitsland	-	5
Brenne	FR	2019	Wild	Frankrijk	-	5

4.1.2 Voorbereiding SNP-panel

De verwerking van de stalen uit 2019 werd destijds volledig uitbesteed aan de Radboud Universiteit (NL). De genotypering werd uitgevoerd met behulp van de *Genotyping By Sequencing*-methode (Elshire et al., 2011), een specifieke RAD-seq techniek, zoals gedetailleerd beschreven in het protocol van Lemmers et al. (2020) en eerder gerapporteerd door Auwerx et al. (2021).

Omdat er voor de ontwikkeling van het SNP-panel enkele aanvullende stappen zijn toegevoegd aan de verwerking van de ruwe data, geven we in de volgende paragraaf een overzicht van de **oorspronkelijke verwerkingsmethode** gebruikt voor de volledige SNP-set (Auwerx et al., 2021), gevolgd door een toelichting van de nieuwe stappen.

De kwaliteit van de ruwe sequencing fragmenten uit 2019 werd eerst beoordeeld met FastQC software v0.11.5 (Andrew, 2010). Demultiplexing van de fragmenten (i.e., het toewijzen van elk DNA-fragment aan een individu op basis van unieke barcodes) werd uitgevoerd met de *process_radtags* module in Stacks v2.53 (Catchen et al., 2011; Catchen et al., 2013; Rochette et al., 2019), waarbij fragmenten met onduidelijke barcodes, foute knipplaatsen en/of lage kwaliteit werden verwijderd. Een totaal van 42 stalen met minder dan 0.5 miljoen fragmenten werden verwijderd. Vervolgens werden in de fragmenten SNP's geïdentificeerd met de *denovo_map pipeline* in Stacks, met een minimale dekking van drie fragmenten per stack ($m = 3$) en maximaal twee paarsgewijze verschillen per stack ($M = 2$) en tussen individuen ($n = 2$). Loci werden gefilterd met behulp van VCFtools v0.1.16 (Danecek et al., 2011) om SNP's te verwijderen met een overschot aan heterozygoten ($p < 0.05$), een minimale allelfrequentie over de hele populatie van minder dan 1%, een gemiddelde dekking van minder dan 10 fragmenten, of met meer dan 20% ontbrekende data.. Uiteindelijk werd één SNP per groep fragmenten gebruikt voor de analyse, wat resulteerde in een set van 1637 SNP's voor verdere studie. Naar deze data verwijzen we als volledige SNP-set, om het onderscheid te maken met het SNP-panel.

Voor de **ontwikkeling van het SNP-panel** werden eerst 105 individuen verwijderd wegens te veel ontbrekende data (meer dan 20%) of waarvan de gemiddelde dekking per fragment lager was dan 10, waardoor er nog 363 stalen overblijven voor verdere analyse. De set van 1637 eerder geïdentificeerde SNP's (de volledige SNP-set) werd vervolgens verder gescreend met het R-pakket Radiator (versie 1.2.2; Gosselin, 2020), om enkel de meest geschikte SNP's te behouden voor het panel. Verschillende criteria werden toegepast tijdens deze filtering:

- **Heterozygositeit:** Alleen SNP's met een heterozygositeit tussen 0.01 en 0.5 werden behouden.
- **Minor Allele Count (MAC):** Alleen SNP's waarvan het alternatieve allel minstens 3 keer voorkwam in de populatie werden behouden.
- **Gemiddelde dekking:** SNP's moesten een gemiddelde dekking hebben tussen de 10 en 100.
- **Positie van SNP's:** De SNP's moesten zich bevinden tussen 25 en 75 baseparen (bp) binnen de DNA-fragmenten.
- **Linkage disequilibrium:** SNP's die te dicht bij elkaar liggen en mogelijk genetisch gekoppeld zijn, werden vermeden.

uit 2021. Voor deze dataset werden dezelfde analyses uitgevoerd zoals hierboven beschreven voor de validatie van het SNP-panel.

4.2 RESULTATEN

4.2.1 Validatie SNP-panel

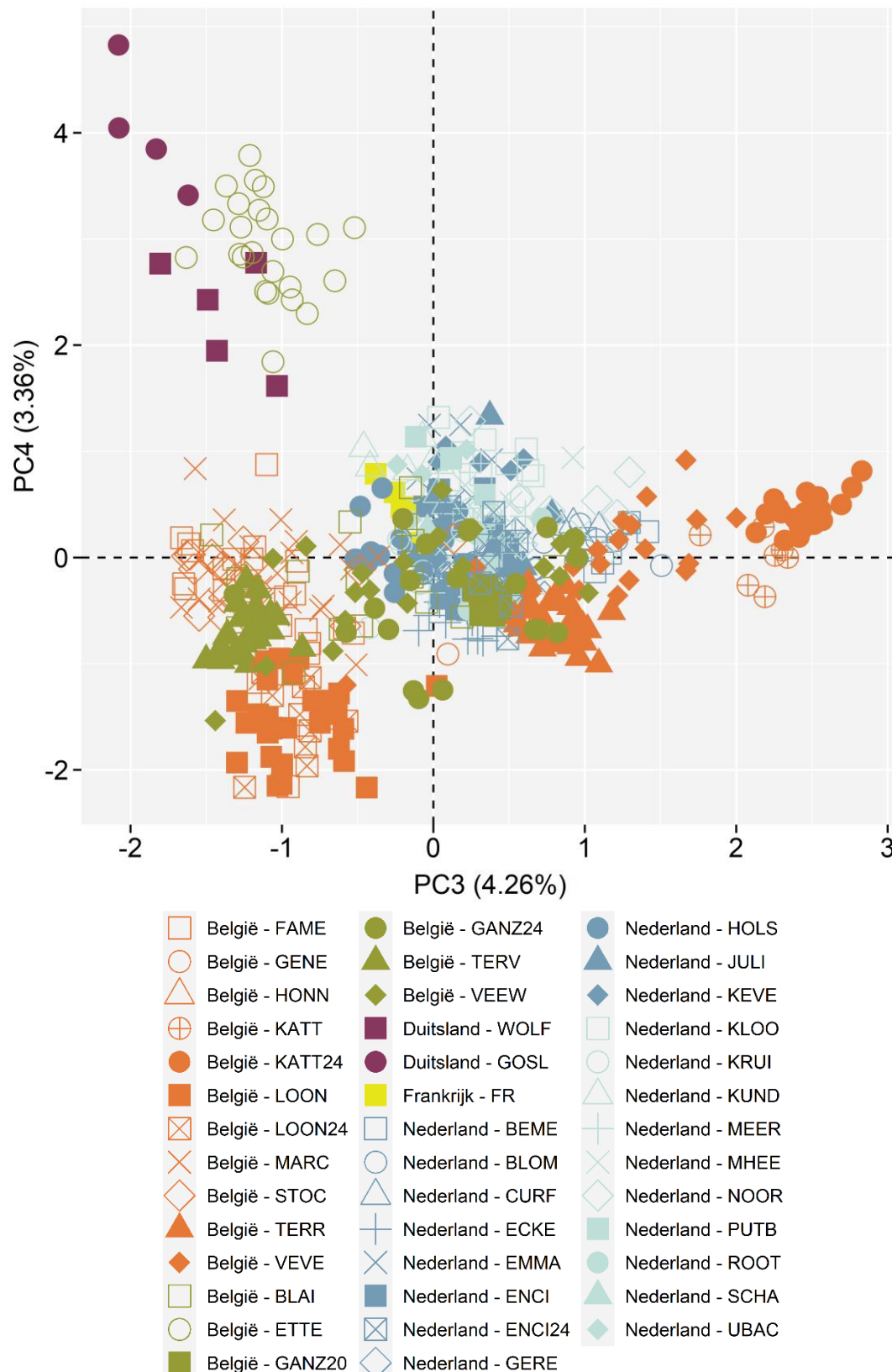
De resultaten van de vergelijking tussen het SNP-panel (176 SNP's) en de volledige SNP-set (1636 SNP's) voor de dataset van 2021 zijn opgenomen in de bijlage. Hoewel de waarden voor genetische diversiteit voor het panel consistent iets hoger liggen dan die van de volledige SNP-set, blijven de trends gelijkaardig, wat de vergelijkbaarheid waarborgt (**Tabel S1**). De genetische structuur en de toewijzing van de individuen zijn grotendeels overeenkomstig, hoewel twijfelachtige individuen soms een andere toewijzing kregen (**Figuur S1-S3; Tabel S2**). Deze bevindingen bevestigen dat het SNP-panel consistente en betrouwbare gegevens genereert in vergelijking met de volledige SNP-set. Voor een meer gedetailleerde bespreking van de resultaten en de afzonderlijke populaties verwijzen we naar sectie 4.2.2. Daarin worden alle stalen van de gecombineerde dataset besproken, inclusief de nieuwe stalen uit 2020-2024 die niet werden gebruikt voor de vergelijking van het SNP-panel en de volledige SNP-set.

4.2.2 Resultaten nieuwe populaties

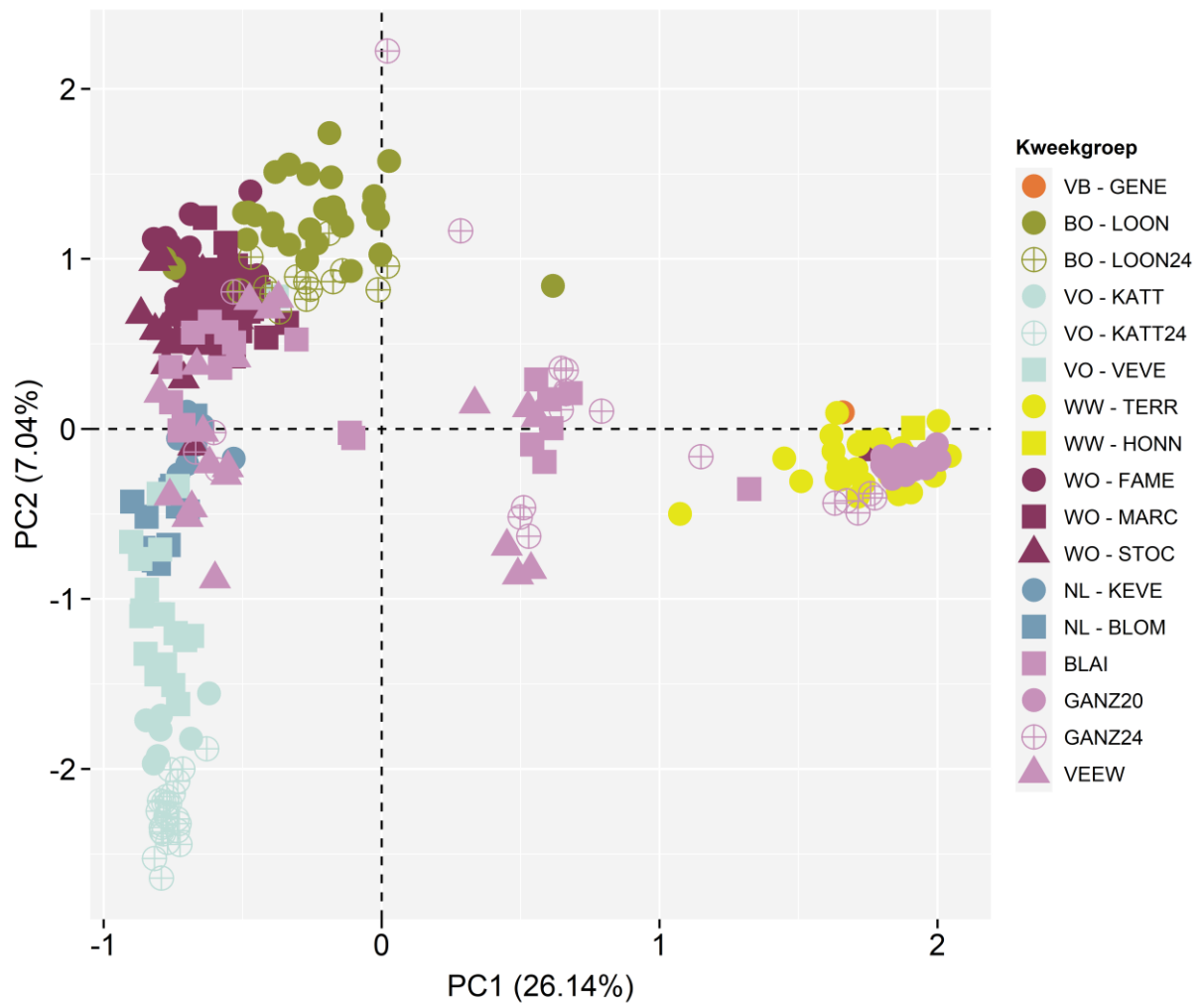
Diversiteit - De populatie uit groeve Ganzemans vertoonde, voor de bijplaatsingen, de laagste scores voor alle diversiteitsparameters (**Tabel 6**). Na de bijplaatsing behaalde deze populatie de hoogste scores, net als de geïntroduceerde populatie uit groeve Blaivie en de populatie uit Veeweide. Ook de populatie uit Etterbeek heeft voor alle parameters een relatief hoge diversiteit. De populatie Tervuren - Centrum daarentegen scoort relatief laag, maar niet uitzonderlijk laag in vergelijking met de overige populaties.

De kweekpopulatie Borgloon vertoont in de analyse van de kweekdieren een heterozygositeit die consistent is met eerdere analyses van de wilde populatie. De wilde populatie Kattenroth, waarvoor geen bijplaatsingen plaatsvonden, vertoont de op één na laagste diversiteit, wat vrijwel overeenkomt met de bemonstering van 2019. Voor gedetailleerde bespreking van de andere Vlaamse populaties, evenals de Nederlandse, Franse en Duitse populaties, wordt verwezen naar het rapport van Auwerx et al. (2021) en Lemmers et al. (2020).

Toewijzingen - Van de 549 unieke genotypes werd 89.4% correct toegewezen aan de populatie van oorsprong, wat vergelijkbaar is met de resultaten uit de analyse van 2021. De Franse, Duitse, Nederlandse en Belgische stalen uit 2021 werden over het algemeen correct toegewezen aan hun populaties van oorsprong (**Tabel 7**). Uitzonderingen zijn de individuen uit de Julianagroeven, waarvan slechts 33,3% correct werd toegewezen, de Meertsengroeven (57.1%), Mheer (50%) en Noorbeek (20%). De nieuwe stalen uit Kattenroth, Borgloon en de ENCI-groeven werden allemaal correct toegewezen aan dezelfde populaties als in 2021. De stalen uit Tervuren - Centrum en Etterbeek werden eveneens volledig correct toegewezen aan hun populaties van oorsprong. Voor Groeve Ganzemans werd vastgesteld dat vóór de bijplaatsing alle 24 individuen correct werden toegewezen aan de oorspronkelijke populatie. Na de bijplaatsing werden 17 van de 21 individuen correct toegewezen. Eén individu werd toegewezen aan de populatie van Mheer, terwijl drie individuen werden toegewezen aan de populatie van Veeweide. In Groeve Blaivie werden slechts 9 van de 19 individuen correct toegewezen aan de populatie van oorsprong. Van de resterende individuen werden er één volledig toegewezen aan Borgloon, één aan Carrière de Stockay en zeven aan Groeve Ganzemans. Voor Veeweide werden 13 van de 20 individuen correct toegewezen aan de populatie van oorsprong. Twee individuen werden volledig toegewezen aan Borgloon, twee aan Veursbos, één aan Groeve Blaivie en twee aan Groeve Ganzemans. De resultaten zijn gelijkaardig wanneer we de toewijzingsanalyses uitvoeren met enkel de vijf kweekgroepen en de locaties waar dieren werden uitgezet en bijgeplaatst (Groeve Ganzemans voor en na bijplaatsing, Groeve Blaivie en Veeweide).



Figuur 6 Ordinatieplot (PCA) voor de tweede en derde principal components (PC3 en PC4) op basis van de gecombineerde dataset uit 2021 en 2024 en het SNP-panel (252 SNP's). Elk punt vertegenwoordigt een individu, waarbij de kleuren het land en de vormen de locatie van het individu aangeven.



Figuur 7 Ordinatieplot (PCA) voor de eerste twee principal components (PC1 en PC2) op basis van de gecombineerde dataset uit 2021 en 2024 en het SNP-panel (176 SNP's). Enkel de individuen afkomstig uit bijplaatsingen en herintroducties (roze kleur) en de individuen afkomstig uit populaties die gebruikt werden voor de kweek zijn weergegeven. Elk punt vertegenwoordigt een individu, waarbij de kleuren de kweekgroep en de vormen de locatie van het individu aangeven.

4.3 RELEVANTIE VOOR HET TRANSLOCATIEPROGRAMMA

De validatie van het SNP-panel toont aan dat het geselecteerde panel van 176 SNP's betrouwbare en consistente resultaten oplevert, zowel wat betreft de diversiteitsparameters, de genetische structuur als de toewijzingen. Deze resultaten komen overeen met de oorspronkelijke set van 1636 SNP's die in de eerdere analyse van 2021 werd gebruikt. Het SNP-panel blijkt daarmee een effectieve en kostenefficiënte methode te zijn voor de toekomstige monitoring van het kweek- en uitzetprogramma van vroegmeesterpad.

De eerder beschreven structurele patronen blijven op basis van het SNP-panel behouden, met een duidelijke scheiding tussen de populaties uit het oosten en westen van België. Wat betreft de analyse van de niet eerder onderzochte populaties uit Etterbeek en Tervuren - Centrum, blijkt dat Etterbeek een duidelijke, afzonderlijke cluster vormt. Het verschil in clustering is echter minder uitgesproken dan bijvoorbeeld tussen de ENCI-groeve, Terril St-Antoine, Grande Honnelle en de overige populaties. Tervuren - Centrum daarentegen clustert voornamelijk met de grotere groep uit het oosten van Wallonië, Duitsland en Nederland, hoewel de toewijzingsanalyses individuen uit Tervuren - Centrum correct aan hun oorspronkelijke populatie toe wijzen. De populatie uit Etterbeek vertoont een hoge genetische diversiteit voor alle parameters, terwijl de genetische diversiteit voor de populatie uit Tervuren - Centrum eerder aan de lage kant is. De populatie uit Tervuren - Centrum is op basis van deze resultaten vermoedelijk het gevolg van een (historische) uitzetting, gezien de verwantschap met de oostelijke groep en niet met de westelijke groep, waartoe de omliggende autochtone populaties behoren. De oorsprong van de populatie in Etterbeek is op basis van de voorliggende dataset niet te bepalen, maar ook deze is potentieel getransloceerd omwille van de genetische afstand tot omliggende autochtone populaties, relatief hoge genetische diversiteit en de situering in centrum Brussel.

De analyse van de zes kweekgroepen toont een duidelijk onderscheid tussen de groepen, waarbij het grootste verschil zich bevindt tussen de populaties gebruikt voor de kweekgroepen Wallonië-West (Terril St-Antoine en Grande Honnelle), Vlaams-Brabant (Sint-Genesius-Rode en Groeve Ganzemans (2020)) enerzijds en populaties gebruikt voor de overige kweekgroepen anderzijds. Tijdens de nieuwe analyses op basis van het SNP-panel werd één populatie meegenomen waar individuen zijn bijgeplaatst (Groeve Ganzemans), één volledige herintroductie (Groeve Blaivie) en één populatie waarvan individuen waarschijnlijk afkomstig zijn vanuit een naburige bijplaatsing (Veeweide). De getransloceerde individuen uit de onderzochte bijplaatsingen/herintroducties zijn afkomstig uit alle kweekgroepen. Vóór de bijplaatsing vertoonde Groeve Ganzemans een zeer lage genetische diversiteit, waarbij de individuen voornamelijk clusterden met de individuen uit Terril St-Antoine. Na de bijplaatsing is de genetische diversiteit toegenomen en behoort de populatie tot de hoogst scorenden. Bovendien toont de ordinatie-analyse aan dat de genetische achtergrond van Groeve Ganzemans na de bijplaatsing een gemengde oorsprong vertoont, met individuen die zowel samen clusteren met de oorspronkelijke groep van voor de herintroductie als met individuen uit diverse kweekgroepen. Daarnaast lijkt een subgroep van individuen uit Groeve Ganzemans,

samen met individuen uit Groeve Blaivie en Veeweide, een nieuwe cluster te vormen, waarschijnlijk het gevolg van de genetische menging van de bronpopulaties. Zowel Groeve Blaivie als Veeweide hebben een gemengde herkomst en hoge genetische diversiteit. Voor Veeweide geeft dit aan dat de populatie zeer waarschijnlijk afkomstig is uit de nabijgelegen bijgeplaatste populatie (Ganspoel, op 700 meter in vogelvlucht). De toewijzing van individuen aan specifieke kweekpopulaties is, omwille van de gemengde herkomst, niet mogelijk.

5 VERVOLGPROJECT

Van 2024 tot en met 2028 maakt de kweek en translocatie van voedmeesterpad deel uit van een vervolgproject. In dit vervolgproject worden de geoptimaliseerde protocollen voortgezet, stoppen sommige translocaties in gebieden waar ze niet langer noodzakelijk zijn, en wordt actief gezocht naar nieuwe translocatiegebieden. Waar nieuwe gebieden in het vorige project elkaar in relatief snel tempo opvolgden door de eerdere focus op het optimaliseren van leefgebieden, zal het in dit vervolgproject belangrijk zijn om voldoende leefgebieden te identificeren en te optimaliseren, zodat de kweek maximaal kan renderen en aan het halen van de IHD wordt gewerkt.

Referenties

Andrew, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81-92.

Auwerx, J., De Corte, Z., Mergeay, J., Picavet, B., Speybroeck, J., van Doorn, L., Wagemaker, a N. (2021). Ex situ kweek van de vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) in Vlaanderen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2021 (32). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. DOI: doi.org/10.21436/inbor.39518999

Campbell, N. R., Harmon, S. A., & Narum, S. R. (2015). Genotyping-in-Thousands by sequencing (GT-seq): A cost effective SNP genotyping method based on custom amplicon sequencing. *Molecular ecology resources*, 15(4), 855-867.

Catchen, J., Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Amores, A., & Cresko, W. A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 3124–3140. <https://doi.org/10.1111/mec.12354>

Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., Postlethwait, J.H., & De Koning, D.-J. (2011). Stacks: Building and Genotyping Loci De Novo From Short-Read Sequences. *G3*, 1(3), 171–182. <https://doi.org/10.1534/g3.111.000240>

Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., & Durbin, R. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156–2158.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>

Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS one*, 6(5), e19379.

Goemaere, K., Heylen O. (2017). Ontwerp-soortenbeschermingsprogramma voor de vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*). Rapport Antea Group in opdracht van het Agentschap voor Natuur en Bos.

Gosselin, T. (2020). radiator: RADseq Data Exploration, Manipulation and Visualization using R. R package version 1.1.9 <https://thierrygosselin.github.io/radiator/>. doi:10.5281/zenodo.3687060

Goudet, J. (2005). Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular ecology notes*, 5(1), 184-186.

Jombart, T. (2008). Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>

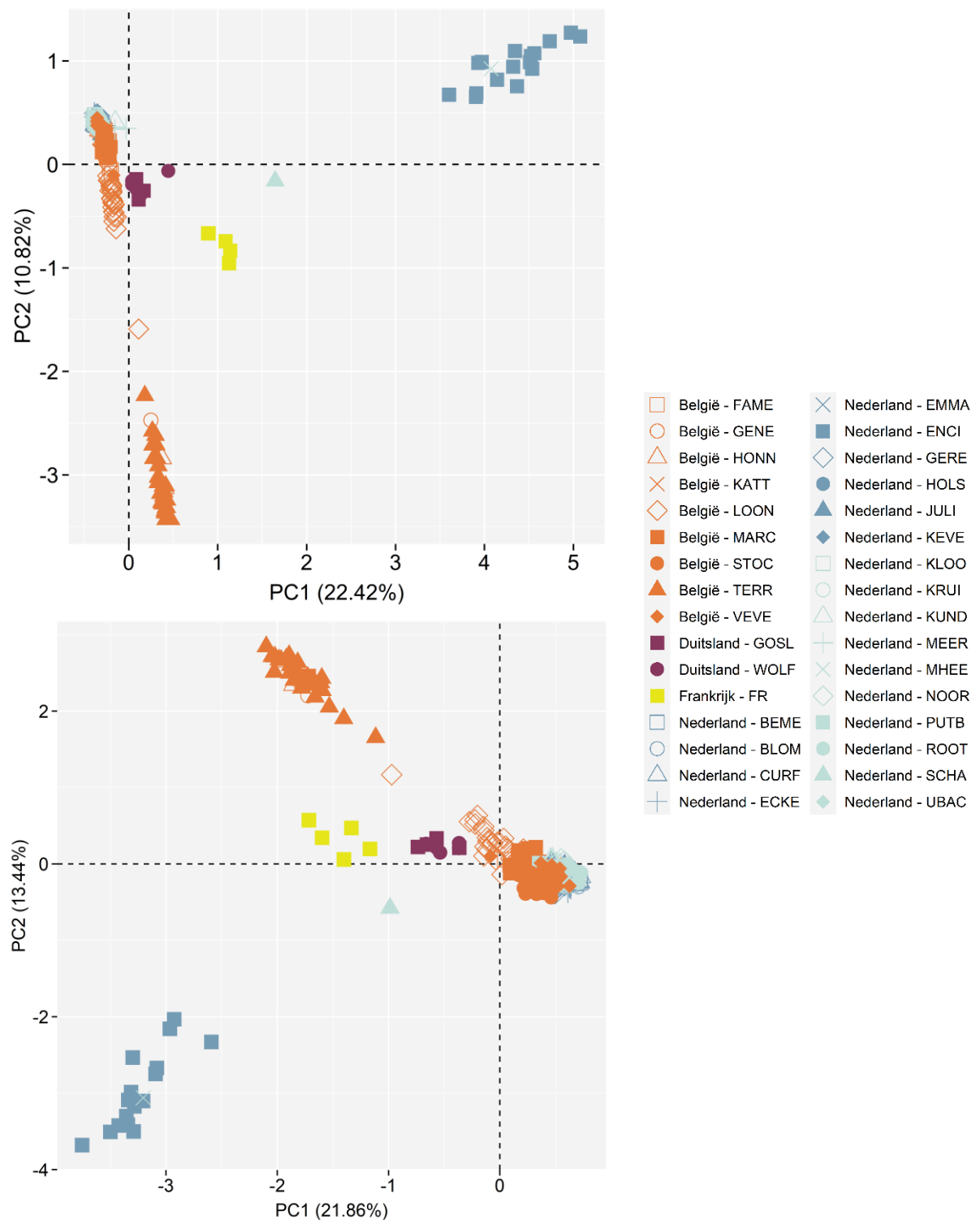
Lemmers, P., Gilbert, M.J., Wagemaker, C.A.M., Crombaghs, B.H.J.M. (2020). De genetische diversiteit, vitaliteit en authenticiteit van vroedmeesterpadpopulaties in Limburg. Natuurbalans - Limes Divergens BV, Stichting RAVON & Radboud Universiteit, Nijmegen.

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.org/10.21436/inbor.34130911.R

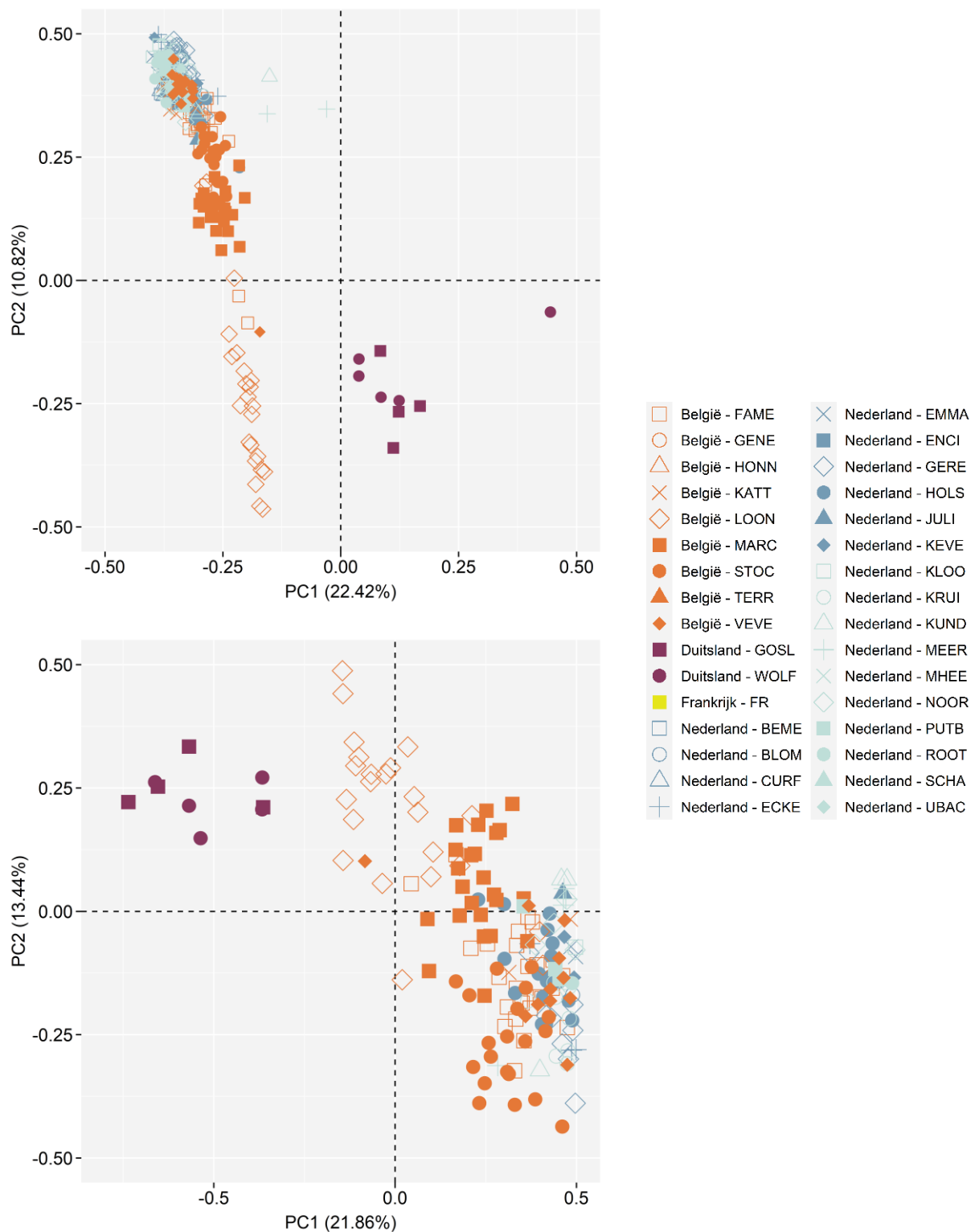
Rochette, N. C., Rivera-Colón, A. G., & Catchen, J. M. (2019). Stacks 2: Analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology*, 28(21), 4737–4754.

Speybroeck, J. & Auwerx, J. (2019). Advies betreffende de criteria voor habitatgeschiktheid voor de vroedmeesterpad in het kader van bijplaatsing en introductie. (Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek; Nr. INBO.A.3719). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek.

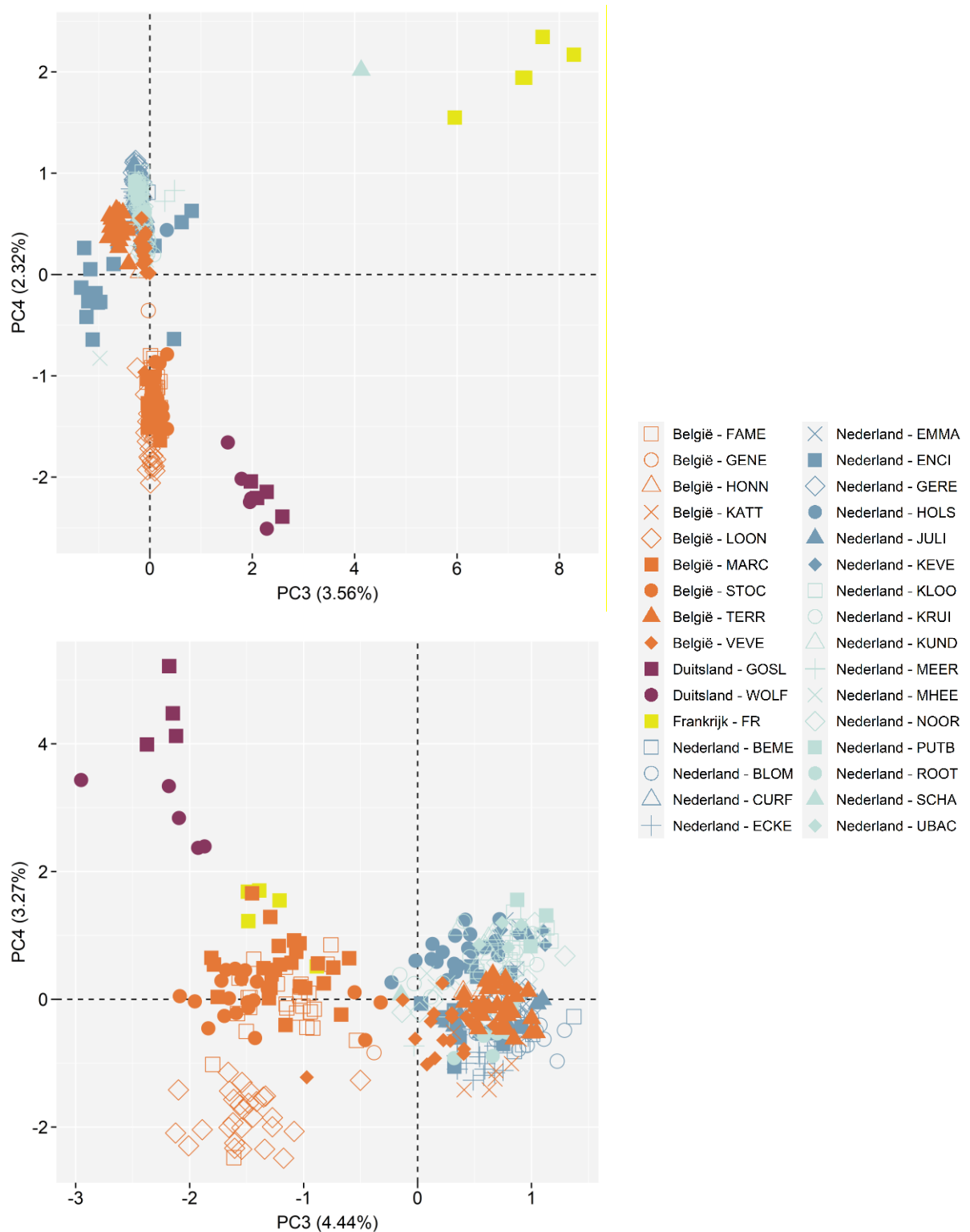
Bijlagen



Figuur S1 Ordinatieplot (PCA) voor de eerste twee principal components (PC1 en PC2) op basis van de dataset uit 2021, met de volledige SNP-set (1637 SNP's, boven) en het SNP-panel (176 SNP's, onder). Elk punt vertegenwoordigt een individu, waarbij de kleuren het land en de vormen de locatie aangeven



Figuur S2 Ingezoomde ordinatieplot (PCA) voor de eerste twee principal components (PC1 en PC2) op basis van de dataset uit 2021, met de volledige SNP-set (1637 SNP's, boven) en het SNP-panel (176 SNP's, onder). Elk punt vertegenwoordigt een individu, waarbij de kleuren het land en de vormen de locatie aangeven.



Figuur S3 Ordinatieplot (PCA) voor de derde en vierde principal components (PC3 en PC4) op basis van de dataset uit 2021, met de volledige SNP-set (1637 SNP's, boven) en het SNP-panel (176 SNP's, onder). Elk punt vertegenwoordigt een individu, waarbij de kleuren het land en de vormen de locatie aangeven.

Tabel S1 Inteeltcoëfficiënt (*FIS*), verwachte (*He*) en waargenomen heterozygositeit (*Ho*) per locatie, berekend voor zowel de volledige SNP-set als het SNP-panel op basis van de dataset uit 2021.

Site	Aantal	Code	Land	FIS	He	Ho	MNA	NEA	FIS	He	Ho	MNA	NEA
C. de Marchempré	25	MARC	België	0.265	0.105	0.085	1.104	1.117	0.234	0.205	0.175	1.204	1.258
Carrière de Stockay	20	STOC	België	0.101	0.088	0.079	1.088	1.097	0.128	0.176	0.154	1.176	1.214
Grande Honnelle	2	HONN	België	-0.100	0.067	0.076	1.077	1.072	0.111	0.098	0.086	1.102	1.109
Groot-loon (Borgloon)	28	LOON	België	-0.021	0.114	0.117	1.114	1.128	-0.027	0.229	0.235	1.229	1.297
Marche-en-Famenne	26	FAME	België	0.074	0.090	0.082	1.090	1.099	0.065	0.180	0.165	1.180	1.220
Sint-Genesius-Rode	1	GENE	België	-	-	0.089	1.089	-	-	-	0.122	1.122	-
Terril St-Antoine	28	TERR	België	-0.017	0.077	0.080	1.077	1.083	-0.007	0.123	0.123	1.123	1.140
Voeren - Kattenroth	7	KATT	België	-0.088	0.035	0.039	1.035	1.036	-0.121	0.075	0.089	1.077	1.081
Voeren - Veursbos	19	VEVE	België	0.046	0.078	0.075	1.078	1.085	0.065	0.164	0.158	1.164	1.197
Bemelenberg	6	BEME	Nederland	0.013	0.065	0.063	1.065	1.070	0.074	0.134	0.118	1.132	1.155
Curfsgroeve	7	CURF	Nederland	0.060	0.050	0.045	1.049	1.053	-0.009	0.090	0.092	1.090	1.099
Eckelrade	18	ECKE	Nederland	0.035	0.041	0.039	1.041	1.042	-0.030	0.083	0.086	1.083	1.090
Emmaberg	6	EMMA	Nederland	-0.091	0.062	0.069	1.063	1.067	-0.122	0.122	0.139	1.124	1.139
ENCI-groeve	16	ENCI	Nederland	0.078	0.210	0.192	1.209	1.266	0.069	0.208	0.193	1.208	1.263
Gerendal	18	GERE	Nederland	0.011	0.042	0.041	1.042	1.043	0.075	0.087	0.080	1.087	1.095
Groeve Blom	11	BLOM	Nederland	0.058	0.057	0.052	1.056	1.060	0.105	0.111	0.094	1.110	1.124
Groeve 't Rooth	8	ROOT	Nederland	-0.038	0.076	0.079	1.077	1.083	-0.052	0.143	0.149	1.143	1.166
Holset	19	HOLS	Nederland	0.014	0.077	0.076	1.077	1.083	0.012	0.148	0.147	1.147	1.173
Julianagroeve	9	JULI	Nederland	0.130	0.075	0.063	1.074	1.081	0.141	0.144	0.117	1.142	1.168
Keverberg	7	KEVE	Nederland	0.036	0.065	0.061	1.065	1.070	0.036	0.135	0.128	1.135	1.156
Kloosterbosch	13	KLOO	Nederland	0.017	0.054	0.053	1.054	1.057	0.008	0.116	0.117	1.116	1.131
Kruisbos	16	KRUI	Nederland	0.131	0.057	0.048	1.057	1.061	0.151	0.106	0.088	1.105	1.118
Kunderberg (Ubachsberg-Noord)	8	KUND	Nederland	0.027	0.055	0.053	1.055	1.058	0.026	0.095	0.090	1.094	1.105

