Vlaanderen
is wetenschap

Genetische opvolging van de beekforelteelt in functie van het herstelprogramma

Karen Cox, An Van Breusegem, Johan Auwerx

INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK

Auteurs:
Karen Cox, An Van Breusegem, Johan Auwerx

Reviewers:
Io Defelm

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:
karen.cox@inbo.be

Wijze van citeren:
Cox, K. et al. (2025). Genetische opvolging van de beekforelteelt in functie van het herstelprogramma. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2025 (51). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. DOI: doi.org/10.21436/inbor.132577218

D/2025/3241/308
Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2025 (51)
ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:
Hilde Eggermont

Foto cover:
Beekforellarven (Johan Auwerx)

Dit werk valt onder een Creative Commons Naamsvermelding 4.0 Internationaal-licentie.

INSTITUUT
NATUUR- EN
BOSONDERZOEK

GENETISCHE OPVOLGING VAN DE BEEKFORELTEELT IN FUNCTIE VAN HET HERSTELPROGRAMMA

Karen Cox, An Van Breusegem & Johan Auwerx

doi.org/10.21436/inbor.132577218

Dankwoord/Voorwoord

Een bijzonder woord van dank zijn we verschuldigd aan de leden van het Vlaamse Visserijfonds. Hun jarenlange ondersteuning, ook voor onderwerpen die niet rechtstreeks met hengelbelangen te maken hebben, is een echt geschenk. Ook willen we Kristof Vlietinck, Alain Dillen, Seger Van Mileghem en Rudi Yseboodt van het Agentschap Natuur en Bos uitdrukkelijk danken voor de vlotte en goede samenwerking.

Samenvatting

De beekforel (*Salmo trutta fario*), een kwetsbare soort, wordt in het INBO-onderzoekscentrum voor Aquatische Fauna in Linkebeek gekweekt voor translocatie naar diverse Vlaamse beken. Sinds 2004 wordt hiervoor een kweeklijn gebruikt met forellen van Belgische oorsprong uit Couvin. Deze groep werd om de twee à drie jaar verjongd tot 2023. Hoewel er geen aanwijzingen voor inteelt waren, bleek de kweekgroep domesticatieverschijnselen te vertonen. Daarom werd in 2024 overgeschakeld naar een nieuwe kweekgroep uit de Geul, een zijrivier van de Maas. Deze lijn werd geleverd door de kwekerij van Achouffe en bestaat uit drie leeftijdsgroepen.

Met behulp van genetische analyses willen we volgende vragen beantwoorden:

- Hoe is de genetische diversiteit van de Couvin-kweeklijn geëvolueerd sinds de start?
- Beschikt de Geul-kweekgroep over voldoende genetische diversiteit?
- Sluit deze genetisch aan bij de verwachte wilde Belgische populaties?

Analyse van mitochondriaal DNA (controleregio) toont een Atlantische herkomst, wat verwacht werd, maar sluit inmenging van commercieel gekweekte forel niet uit. De genetische diversiteit van de Couvin-lijn is tussen 2005 en 2023 gestegen, maar ook opvallend veranderd. Vermoedelijk zijn ongemerkt forellen van andere oorsprong ingebracht, met aanzienlijke impact op de genetische samenstelling.

Bij de Geul-lijn is de genetische diversiteit en het effectief aantal ouderdieren van de eerste groep nakomelingen (2023) laag. De latere groepen (2024 en 2025) tonen een duidelijk hogere diversiteit, mede dankzij extra ouderdieren. De eerste groep wijkt genetisch sterk af van de andere twee.

Om de genetische basis van de Geul-lijn te versterken, raden we aan om de eerste groep (2023) aan te vullen met individuen uit de latere groepen. Regelmatige nieuwe instroom in kweekgroep kan de diversiteit verder ondersteunen. Genetische opvolging van uitzettingen blijft cruciaal om het succes van herstelmaatregelen te evalueren en bij te sturen.

English abstract

The brown trout (*Salmo trutta fario*), a vulnerable species, is bred at the INBO research center in Linkebeek for translocation into the wild. Since 2004, a breeding line of Belgian origin from Couvin has been used for this purpose. This group was rejuvenated every two to three years until 2023. Although no signs of inbreeding were detected, indications of domestication were noticed. Therefore, a new breeding group was introduced in 2024, originating from the Geul, a tributary of the Meuse River. This group, consisting of three age classes, was supplied by the hatchery in Achouffe (Ardennes).

Genetic analyses aim to answer the following questions:

- How has the genetic diversity of the Couvin breeding line evolved since the start?
- Does the Geul breeding group possess sufficient genetic diversity?
- Does this group genetically match the wild populations expected in Belgium?

Mitochondrial DNA (control region) analysis indicates an Atlantic origin, as expected, but this does not exclude the influence of commercially bred trout. Between 2005 and 2023, the Couvin line showed increased genetic diversity, along with a notable shift in genetic composition. This suggests that individuals from other, unrecorded origins may have been introduced, significantly impacting the breeding stock.

In the Geul group, the first offspring generation (2023) exhibited low genetic diversity and a low effective number of parents. The later groups (2024 and 2025) show considerably higher diversity, partly due to the inclusion of additional broodstock. The first group also differs genetically from the other two.

To strengthen the genetic base of the Geul line, it is advisable to supplement the 2023 group with individuals from the later groups. Regularly adding new individuals to the breeding population could further support genetic diversity. Continued genetic monitoring of released fish is essential to assess and adjust restoration efforts over time.

Inhoudstafel

1 Kweekprogramma beekforel 7

2 Materiaal en Methode 10

2.1 Stalen en DNA-extractie 10

2.2 Mitochondriaal DNA 10

2.3 Microsatellietanalyse 11

2.3.1 Genotypering 11

2.3.2 Dubbele genotypes 13

2.3.3 Verwantschap 13

2.3.4 Controle van de merkers 13

2.3.5 Genetische diversiteit en effectief aantal ouders 13

2.3.6 Genetische differentiatie en structuur 14

3 Resultaten 15

3.1 Mitochondriaal DNA 15

3.2 Microsatellietanalyse 15

3.2.1 Dubbele stalen en verwantschap 15

3.2.2 Kwaliteit van de merkers 16

3.2.3 Genetische diversiteit en N_b 17

3.2.4 Genetische differentiatie en structuur 18

4 Discussie 20

4.1 Herkomst 20

4.2 Kweekgroep Couvin 20

4.3 Kweekgroep de Geul 21

4.4 Conclusie 22

Lijst van figuren

Figuur 1 Principale componentenanalyse van microsatellietgenotypes van beekforel, weergegeven met gebruik van de eerste twee assen. Elke kweekgroep heeft een andere kleur. De ellipsen geven het betrouwbaarheidsinterval weer (68%). 19
Figuur 2 Barplot van de DAPC resultaten voor 3 tot 6 clusters (K). Elke balk is een individu en de verschillende kleuren geven de verschillende clusters weer. 19

Lijst van foto's

Foto 1 Een van de kweekvijvers met beekforel in Linkebeek (INBO). 7
Foto 2 Afname van kuit van beekforel. 9

Lijst van tabellen

Tabel 1 Lijst van de verschillende kweekgroepen, hun codes, jaar van staalname en het aantal genotypes na het verwijderen van dubbele stalen en, tussen haakjes, het aantal na het verwijderen van broers/zussen tot twee per familie. 10
Tabel 2 Informatie over de microsatellietmerkers gebruikt voor de genetische karakterisering van de beekforelkweekgroepen. MP: multiplex, Label: fluorescent label, Primers F en R: forward en reverse primer. 12
Tabel 3 Aantal families met het aantal broers/zussen per familie onder de stalen van beekforel uit de kweekgroepen van Couvin 2005 (COU_2005) en 2023 (COU_2023), en van de Geul 2023, 2024 en 2025 (resp. GEU_2023, GEU_2024 en GEU_2025). 16
Tabel 4 De geobserveerde en verwachte heterozygositeit (H_o en H_e), gemiddeld aantal allelen (Na), allelische rijkdom (A_r), inteeltcoëfficiënt (F_{IS}), elk met de standaarddeviatie tussen haakjes, en het effectief aantal ouders (N_b) van de verschillende kweekgroepen van beekforel met het betrouwbaarheidsinterval tussen haakjes. 17
Tabel 5 Aantal private allelen per kweekgroep bij vergelijking van de kweekgroepen samen (*Pa* totaal) en bij vergelijking per herkomst (*Pa* per herkomst), namelijk de herkomst Couvin (blauw) en herkomst de Geul (groen). Tussen haakjes is het aantal private allelen wanneer broers/zussen verwijderd werden tot maximaal twee per familie. 17
Tabel 6 Genetische differentiatie tussen de verschillende generaties van de kweekgroepen Couvin en de Geul. Onder de diagonaal zijn de F_{ST} waarden, boven de diagonaal D_{est} waarden. 18

1 KWEEKPROGRAMMA BEEKFOREL

Als kwetsbare soort wordt de beekforel (*Salmo trutta fario*) gekweekt in het onderzoekscentrum van het INBO in Linkebeek voor translocatiedoeleinden (Auwerx *et al.*, 2023). Dit is de in beken en rivieren levende ondersoort van de Atlantische forel (*Salmo trutta*) die opgenomen werd met status 'kwetsbaar' in de IUCN Rode Lijst voor Vlaanderen (Verreycken *et al.*, 2014). Hoewel er inspanningen zijn geleverd, is de waterkwaliteit en/of fysische kwaliteit van kleine rivieren en stromen vaak nog onvoldoende (Boets *et al.*, 2018). Dit bemoeilijkt populatieherstel en -groei, ook na herintroductie (Pauwels *et al.*, 2016; Van den Neucker *et al.*, 2009, 2010a, 2010b, 2012, 2013; Van Wichelen *et al.*, 2018; Vandamme *et al.*, 2017, 2020, 2024b, 2024a; Vught *et al.*, 2015). Herintroducties en bijplaatsingen blijven bijgevolg belangrijke hulpmiddelen, steeds voorafgegaan door de teelt van de beekforel.

Foto 1 Een van de kweekvijvers met beekforel in Linkebeek (INBO).

Het doel is om zo goed als mogelijk de kweek te starten met ouderdieren afkomstig van natuurlijke, Belgische populaties. Beekforel in de Belgische rivieren wordt al decennia intensief uitgezet, vaak met materiaal van onbekende oorsprong (Van Houdt *et al.*, 2005). Recente fylogeografische studies, voornamelijk met behulp van mitochondriaal DNA (mtDNA), ondersteunen de classificatie van alle forellen als *Salmo trutta*, een wijdverspreide en polymorfe

soort (Apostolidis *et al.*, 2011; Bardakci *et al.*, 2006; Bernatchez, 2001; Berrebi, 2015; Hashemzadeh Segherloo *et al.*, 2012; Lo Brutto *et al.*, 2010; Osinov & Bernatchez, 1996; Sanz, 2017; Suárez *et al.*, 2001; Tougard *et al.*, 2018). Met behulp van de resultaten werd de diversiteit van de Atlantische forel in tien verschillende fylogenetische lijnen en sublijnen verdeeld, gekenmerkt door hun primaire geografische distributies (Bardakci *et al.*, 2006; Bernatchez, 2001; Bernatchez *et al.*, 1992; Sanz, 2017; Snoj *et al.*, 2009, 2011; Suárez *et al.*, 2001; Tougard *et al.*, 2018):

- Danubischel lijn: Ponto-Kaspische bekkens
- Middellandse Zee: Middellandse Zee en Adriatische Zee
- Adriatische Zee : Middellandse Zee- en Adriatische bekkens
- Marmoratus: Adriatisch bekken
- Atlantisch: Noord-Atlantisch bekken
- Balkan: Balkanschiereiland
- Tigris: Bekken van de Perzische Golf
- Noord-Afrika: Marokko, Algerije (uitgestorven), en Sicilië
- Dadès: Dadès-rivier, Marokko
- Duero: Westelijk Iberisch Schiereiland.

Deze lijnen vertonen vaak een aanzienlijke geografische overlap, waarbij meerdere mtDNA-lijnen soms samen voorkomen binnen enkele populaties, gedeelde geografische gebieden of gemeenschappelijke drainages (Apostolidis *et al.*, 2008, 2011; Bernatchez, 2001; Berrebi *et al.*, 2000, 2017; Duftner *et al.*, 2003; Lerceteau-Köhler *et al.*, 2013; Meraner *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2001). Bovendien komen waargenomen mtDNA-lijnen vaak niet overeen met morfologische of geografische groeperingen van populaties (Hashemzadeh Segherloo *et al.*, 2021). De complexiteit neemt nog toe door translocaties van Atlantische forel naar inheemse mediterrane en Ponto-Kaspische habitats (Kottelat & Freyhof, 2007). In onze contreien komt de Atlantische lijn van nature voor.

In december 2004 startte het INBO met een kweekgroep afkomstig uit de rivier Ry de Rome in Couvin (Namen), bestaande uit 25 ouderdieren. Deze groep zou een Belgische herkomst hebben volgens de studie van Van Houdt *et al.* (2005). In het daaropvolgende jaar startte het kweekprogramma en werden de eerste vinknips genomen voor genetische analyse. Om de twee à drie jaar werd de kweekgroep verjongd, tot generatie F7 of F8 in 2023. Dit wil zeggen dat uit de groep nakomelingen van de oorspronkelijk ouderdieren een selectie van nieuwe ouderdieren (80 tot 120 dieren) werd gemaakt. Na enkele jaren werd deze stap herhaald en dit tot generatie zeven of acht in 2023. Hoewel er nog geen uiterlijke tekenen van inteelt waren, leek het omwille van domesticatieverschijnselen toch aangewezen om over te schakelen op een nieuwe kweekgroep afkomstig van de Geul, een zijrivier van de Maas.

De nieuwe kweekdieren werden geleverd door de kwekerij van Achouffe (Waalse overheid). Dit zijn nakomelingen van ouderdieren die rechtstreeks in de Geul gevangen werden. Een eerste groep, ontvangen op de kwekerij in 2023, bestond uit 131 tweejarige dieren die in december 2024 ingezet werden voor het kweekprogramma. Deze zullen verder GEU_2023 genoemd

worden. De tweede groep kweekdieren van de Geul, GEU_2024, bestaande uit 400 eenjarige forellen in 2023, worden in 2025 ingezet. Een derde groep GEU_2025 bestaat uit 461 zes maanden oude vissen en zullen in 2026 ingezet worden. Alle groepen van de Geul bevatten dieren die opgekweekt werden in Achouffe.

De kweekprocedure voor Couvin werd steeds uitgevoerd door hom en kuit per individu te verzamelen en een vrouwtje met een mannetje (soms twee) te bevruchten. De kweekgroep, bestaande uit een poule van 80 tot 120 dieren, werd nooit aangevuld met nieuwe individuen. Uit deze poule worden jaarlijks 25 tot 40 vrouwtjes en 30 tot 50 mannetjes gebruikt om in te zetten in de reproductie. De selectie van ouderdieren gebeurt random; de focus ligt vooral op de kwaliteit van de gameten.

In de kwekerij van Achouffe werd van tien vrouwtjes kuit verzameld, wat per vrouwtje werd onderverdeeld in tien stalen. Substalen van tien vrouwtjes werden samengevoegd tot een mengstaal en bevrucht door zaad van een mannetje. Dit benaderd dus een polygame paring. De drie groepen beekforellen met herkomst de Geul zijn nakomelingen van een groep ouderdieren die regelmatig aangevuld werden met jonge dieren uit eigen kweek van de kwekerij van Achouffe en eventueel met mannetjes uit de wilde bronpopulatie.

De volgende vragen willen we met behulp van genetische analyses beantwoorden:

- Hoe is het met de genetische diversiteit van de kweekgroep van Couvin gesteld anno 2023 ten opzichte van de diversiteit bij de start van het kweekprogramma in 2005?
- Heeft de nieuwe kweekgroep afkomstig uit de Geul voldoende genetische diversiteit?
- Sluit de nieuwe kweekgroep van de Geul op genetisch vlak aan bij de wilde populaties die je in België mag verwachten?

Foto 2 Afname van kuit van beekforel.

2 MATERIAAL EN METHODE

2.1 STALEN EN DNA-EXTRACTIE

Stalen van de kweekdieren van Couvin genomen in 2005 werden teruggevonden. Hoewel er 25 ouderdieren waren in 2005, werden er in totaal 37 stalen teruggevonden zonder een eenduidige identificatiecode. Bijgevolg werd uit al deze stalen van Couvin DNA geëxtraheerd (COU_2005). Daarnaast waren er 30 stalen van Couvin genomen van de kweekgroep in 2023 (F7 à F8, COU_2023), 29 stalen van de tweejarigen uit de Geul (GEU_2023) en 29 stalen van de eenjarige beekforellen uit de Geul in 2024 (GEU_2024). Van de derde groep uit de Geul werden 30 eenjarige forellen in 2025 bemonsterd (GEU_2025). In Tabel 1 worden de codes per groep gegeven die we consequent in dit verslag zullen gebruiken. Alle vinknips werden op ethanol en gekoeld bewaard.

Tabel 1 Lijst van de verschillende kweekgroepen, hun codes, jaar van staalname en het aantal genotypes na het verwijderen van dubbele stalen en, tussen haakjes, het aantal na het verwijderen van broers/zussen tot twee per familie.

Groepscode	Herkomst	Staalnamejaar	Aantal
COU_2005	Couvin	2005	25 (18)
COU_2023	Couvin	2023	30 (23)
GEU_2023	Geul	2023	29 (29)
GEU_2024	Geul	2024	29 (21)
GEU_2025	Geul	2025	30 (29)

Een deel van de vinknip werd genomen waaruit DNA werd geëxtraheerd met behulp van de DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) met elutie in 100 µl AE buffer. De integriteit van het DNA werd geëvalueerd op een subset van 24 stalen op een 1% agarose gel. De DNA concentratie van alle stalen werd gemeten met de Quant-iT Picogreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) met behulp van de Synergy HT plate reader (BioTek).

2.2 MITOCHONDRIAAL DNA

Om uit te sluiten dat de kweekgroepen afstammen van andere lijnen dan de Atlantische lijn, werd de controleregio (CR) van het mitochondriaal DNA gebruikt zoals beschreven door (Hashemzadeh Segherloo *et al.*, 2012). De volledige CR werd geamplificeerd met de primers BrtD-F20 (5'-GAGATTTTAACTCCCACCCT-3') en BrtD-R20 (5'-TAGGGTCCATCTTAACAGCT-3') in 15 stalen: drie stalen elk van Couvin anno 2005, Couvin anno 2023, de eerste groep van de Geul (GEU_2023) en zes stalen van de tweede groep van de Geul (GEU_2024). De polymerase-ketting-reacties (PCR) werden uitgevoerd in een volume van 10 µl bestaande uit 5 µl 2x Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), 0,1 µl van elke primer (10 µM), 1 µl verdund DNA (10 ng/µl) en 3,80 µl DEPC water. De condities bestonden uit de initiële denaturatie gedurende 10 min op 94 °C,

gevolgd door 30 cycli met telkens een denaturatiestap gedurende 1 min op 94 °C, een annealingstap van 1 min op 52 °C en een extensiestap van 90 s op 72 °C. De finale extensie duurde 15 min op een temperatuur van 72 °C. PCR-producten werden gecontroleerd op 1% agarosegels en opgezuiverd met PureIT ExoZAP PCR CleanUp (Ampliqon) en vervolgens gemeten met de Quantus fluorometer en QuantiFluor ONE dsDNA kit (Promega).

Sequencing in twee richtingen werd uitgevoerd met de BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) in een volume van telkens 8 µl met 2 µl opgezuiverd PCR-product (11 ng/µl), 0,40 µl primer (10 µM), 2 µl 2,5x Ready Reaction Mix, 1 µl 5x Sequencing Buffer. Na opzuivering met de BigDye XTerminator Purification kit (Thermo Fisher Scientific) werden producten geanalyseerd op een ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Na een visuele controle van de kwaliteit van de sequenties, werd een consensus sequentie op basis van beide sequentierichtingen gevormd voor elk staal met de software Geneious Prime v2019.2.3 (Biomatters Ltd.; https://www.geneious.com). De sequenties werden vergeleken met deze voorhanden in openbare databanken van NCBI (geraadpleegd op 31 mei 2024) via de BLAST tool in Geneious Prime. Samen met enkele gepubliceerde sequenties, respectievelijk uit de publicatie van Cortey *et al.* (2009) en van Van Houdt *et al.* (2005), werd een Neighbour-Joining boom gemaakt op basis van Jukes-Cantor genetische afstanden na sequentie-alignment met behulp van de Geneious Aligner (global alignment met free end gaps en default cost matrix 65% similarity (5.0/-4.0)).

2.3 MICROSATELLIETANALYSE

2.3.1 Genotypering

Na het verzamelen van de beschikbare microsatellietmerkers uit de literatuur en databanken, werden 23 merkers geselecteerd voor verdere testen. Na deze testfase op 12 stalen afkomstig van de verschillende kweekgroepen, werden 17 microsatellieten gekozen die we maximaal konden groeperen in slechts twee multiplexen (Tabel 2). Onder de gebruikte merkers is Salmo-sdY, een geslachtspecifieke merker (Quéméré *et al.*, 2014); er is enkel amplificatie bij mannetjes. Op die manier kunnen we een indicatie van de verhouding in geslachten geven op basis van de steekproef. De merkers ontwikkeld door Vasemägi *et al.* (2005) zijn EST-gelinkte microsatellieten en deze ontwikkeld door Grimholt *et al.* (2002) zijn gelinkt aan het major-histocompatabiliteitscomplex (MHC, genen die coderen voor een groep eiwitten die een rol spelen in het immuunsysteem). De primers voor mOne102 amplificeren twee onafhankelijke loci; de tweede multiplex bevat daarom eigenlijk negen microsatellieten, met mOne102 verdeeld in merkers mOne102a en mOne102b.

De PCR-reacties werden uitgevoerd in een oplossing van 5 µl Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), 1 µl DNA aan een concentratie van 10 ng/µl, 0,10, 0,20 of 0,40 µl van elke primerset (10 µM;) en aangevuld met DEPC water tot een totaal volume van 10 µl bereikt was. De PCR-condities waren als volgt: 15 min op 95 °C voor de initiële denaturatie, 35 cycli van telkens 30 s op 95 °C, 30 s op de annealing temperatuur en 30 s op 72 °C, gevolgd door finale elongatie gedurende 10 min op 72 °C en 15 min op 4 °C. De annealing temperatuur voor de eerste multiplex was 49 °C en voor

de tweede was dit 51 °C. De PCR-producten werden onverdund geanalyseerd met een ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) samen met de GeneScan-600 LIZ standaard en de fragmentanalyse gebeurde met het programma Geneious Prime. De vier eerste groepen stalen vermeld in Tabel 1 werden in 2024 geanalyseerd, de vijfde en laatste groep in 2025. Ter controle werden in 2024 twee tot vijf herhalingen van acht stalen toegevoegd en in 2025 twee tot drie herhalingen van vijf stalen en een staal uit de analyses van 2024. Stalen met een ontbrekend genotype voor meer dan 50% van de merkers werden verwijderd voor verdere analyse.

Tabel 2 Informatie over de microsatellietmerkers gebruikt voor de genetische karakterisering van de beekforelkweekgroepen. MP: multiplex, Label: fluorescent label, Primers F en R: forward en reverse primer.

Locus	MP	Label	Primers (5´-3´)	Referentie
MHC-I	1	Fam	F - AGGAAGGTGCTGAAGAGGAAC R - CAATTACCACAAGCCCGCTC	(Grimholt *et al.*, 2002)
Salmo-sdY	1	Vic	F - GGGCCTATGAATTTCTGATG R - ACAGATTTGCGACATGAACA	(Quéméré *et al.*, 2014)
Str2QUB	1	Vic	F - CTGGGGTCCACAGCCTATAA R - GAGCTACAACCTGATCCACCA	(Keenan *et al.*, 2013a)
Ssa85	1	Ned	F - AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC R - ACCCGCTCCTCACTTAATC	(O'Reilly *et al.*, 1996)
CA053293	1	Ned	F - TCTCATGGTGAGCAACAAACA R - ACTCTGGGGCATTCATTCAG	(Vasemägi *et al.*, 2005)
Ssa410UoS	1	Ned	F - GGAAAATAATCAATGCTGCTGGTT R - CTACAATCTGGACTATCTTCTTCA	(Cairney *et al.*, 2000)
mOne108[B]	1	Ned	F - GTCATACTACTCATTCCACATTA R - ACACAGTCACCTCAGTCTATTC	(Keenan *et al.*, 2013a; Olsen & Vøllestad, 2001)
Ssa197	1	Pet	F - GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG R - TGGCAGGGATTTGACATAAC	(O'Reilly *et al.*, 1996)
SsaD71	1	Pet	F - AACGTGAAACATAAATCGATGG R - TTAAGAATGGGTTGCCTATGAG	(King *et al.*, 2005)
BG935488	2	Fam	F - TGACCCCACCAAGTTTTTCT R - AAACACAGTAAGCCCATCTATTG	(Vasemägi *et al.*, 2005)
Oneμ9	2	Fam	F - CTCTCTTTGGCTCGGGGAATGTT R - GCATGTTCTGACAGCCTACAGCT	(Scribner *et al.*, 1996)
Sasa-TAP2A	2	Fam	F - GTCCTGATGTTGGCTCCCAGG R - GCGGGACACCGTCAGGGCAGT	(Grimholt *et al.*, 2002)
mOne102	2	Vic	F -GGGATTATTCTTACTTTGGCTGTT R - CCTGGTTGGGAATCACTGC	(Keenan *et al.*, 2013a; Olsen & Vøllestad, 2001)
Cocl-lav-4	2	Ned	F - TGGTGTAATGGCTTTTCCTG R - GGGAGCAACATTGGACTCTC	(Rogers *et al.*, 2004)
CA048828	2	Ned	F - GAGGGCTTCCCATACAACAA R - GTTTAAGCGGTGAGTTGACGAGAG	(Vasemägi *et al.*, 2005)
Str3QUB	2	Pet	F - CTGACCGCTGCACACTAA R -GGCTCTAATCGACTGGCAGA	(Keenan *et al.*, 2013a)
CA060177	2	Pet	F -CGCTTCCTGGACAAAAATTA R -GAGCACACCCATTCTCA	(Vasemägi *et al.*, 2005)

[A] een volume van 0,10 µl van de primerset werd gebruikt in de PCR-reactie
[B] een volume van 0,40 µl van de primerset werd gebruikt in de PCR-reactie
Voor de overige primers werd steeds een volume van 0,20 µl gebruikt.

2.3.2 Dubbele genotypes

Omdat bepaalde stalen genomen in 2005 van de kweekgroep Couvin geen individueel label hadden, is het mogelijk dat er stalen van eenzelfde individu afkomstig zijn. De dubbele stalen identificeerden we met behulp van R package poppr v2.9.6 in R v4.3.2 (Kamvar *et al.*, 2014, 2015; R Core Team, 2023) waarmee we identieke of sterk gelijkende genetische profielen kunnen herkennen.

2.3.3 Verwantschap

Een overtal aan nauwe verwanten binnen een staalname van juvenielen is mogelijk (Hansen *et al.*, 1997; King *et al.*, 2021). Om eventuele nauwe verwanten, hier broers en zussen, binnen kweekgroepen te identificeren, gebruikten we de software Colony v2.0.6.5 in 2024 en v2.0.7.1 in 2025 volgens een maximale waarschijnlijkheidsbenadering (Jones & Wang, 2010; Wang, 2004). De methode houdt ook rekening met de foutmarge per locus, bepaald aan de hand van de herhalingen, en de uitval van allelen. De laatste parameter werd laag gehouden (0,001 voor elk locus). De volgende instellingen werden gebruikt: full likelihood methode, random paring en drie runs van gemiddelde lengte. Voor de cohorten van Couvin 2005 en de Geul werd de vrouwtjes en mannetjes als polygaam beschouwd. Voor Couvin 2023 beschouwden we ze als monogaam vanwege de gevolgde kweekprocedure. Enkel families met een waarschijnlijkheid van 0,90 of hoger werden in beschouwing genomen. De drie groepen van de Geul werden ook samen onderzocht omdat ze grotendeels van eenzelfde batch ouderdieren afkomstig zijn. Omdat families met broers/zussen binnen een steekproef verdere resultaten kunnen beïnvloeden, werden maximaal twee broers/zussen per familie behouden voor verdere analyse.

2.3.4 Controle van de merkers

Na het verwijderen van dubbele genoytpes en van enkele broers en zussen per familie (zie eerder), controleerden we of de merkers in Hardy-Weinberg-evenwicht verkeerden met behulp van het R package genepop 1.2.2 in R v4.4.2 (R Core Team, 2024; Rousset, 2008). Omdat merker Salmo-sdY een enkel allel produceert bij mannelijke beekforel, werd deze niet gecontroleerd op het naleven van assumpties. Deze merker werd ook niet meegenomen in verdere analyses. De aanwezigheid van nul-allelen werd onderzocht met hetzelfde package met de maximum likelihood methode, met behulp van het Expectation-Maximisation (EM) algoritme van Dempster *et al.* (1977), alsook met de software ML-Null Freq (Kalinowski & Taper, 2006). Verder werd het package genepop gebruikt voor het testen van linkage disequilibrium tussen loci. We voerden correcties uit voor meervoudig testen met behulp van Bonferroni.

2.3.5 Genetische diversiteit en effectief aantal ouders

De volgende schatters van genetische diversiteit werden berekend per populatie met R package hierfstat 5.0-11 (Goudet & Jombart, 2022): het gemiddeld aantal allelen (*Na)*, allelische rijkdom gecorrigeerd voor het minimaal aantal stalen (A_r), geobserveerde heterozygositeit (H_o), verwachte heterozygositeit (H_e) en de inteeltcoëfficiënt (F_{IS}). Met package poppr werd het aantal private allelen (*Pa*) per kweekgroep berekend, enerzijds voor alle kweekgroepen samen en per herkomst (Couvin en Geul).

De maten van genetische diversiteit van de verschillende generaties van kweekgroepen binnen dezelfde herkomst werden met elkaar vergeleken. Verschillen werden getest, met FDR-correctie (Benjamini & Hochberg, 1995), met behulp van gepaarde t-testen. Normaliteit werd eerst getest met de Shapiro-Wilk test met behulp van het package rstatix 0.7.2 (Kassambara, 2023).

Om de effectieve populatiegrootte (N_e) te schatten gebruikten we de momentschatter op basis van linkage disequilibrium met een correctie voor bias geïmplementeerd in het programma NeEstimator 2.01 (Do *et al.*, 2014; Waples & Do, 2008). Allelen met een frequentie lager dan 0,02 werden weggelaten en 95% betrouwbaarheidsintervallen werden met de jackknife methode berekend. In plaats van discrete generaties, heeft de beekforel overlappende generaties, wat niet beantwoordt aan de assumpties van deze methode. De schatting benadert eerder het effectief aantal ouders (N_b) die de cohorte in kwestie heeft voortgebracht.

2.3.6 Genetische differentiatie en structuur

Genetische differentiatie tussen de kweekgroepen en tussen de verschillende jaren werd paarsgewijs berekend met behulp van F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) en D_{est} (Jost, 2008) samen met gecorrigeerde 95% betrouwbaarheidsintervallen op basis van 10.000 bootstrapiteraties. Hiervoor werd het package diveRsity 1.9.90 benut (Keenan *et al.*, 2013b).

Om een eventuele structuur te achterhalen, gebruikten we methodes die niet onderhevig zijn aan assumpties als Hardy-Weinberg-evenwicht, linkage equilibrium, enz. Enerzijds voerden we een principale componentenanalyse (PCA) uit en anderzijds een discriminantanalyse van principale componenten (DAPC) (Jombart *et al.*, 2010) met package adegenet 2.1.10 (Jombart, 2008). Voor de laatste benadering zochten we eerst naar nieuwe clusters met behulp van de K-means procedure waarbij we informatie van 9 principale componenten gebruikten, met een K-aantal clusters van 1 tot en met 10 en met tien herhalingen per K. Het beste clustermodel werd geselecteerd op basis van het Bayesiaanse Informatiecriterium (BIC). We gebruikten K-1 leidende PC-assen als voorspellers van verschillen tussen populaties, zoals voorgesteld door Thia (2023).

3 RESULTATEN

3.1 MITOCHONDRIAAL DNA

Twee stalen leverden geen bruikbare sequenties op: één staal van Couvin 2005 en één van de Geul 2024. Voor de overige dertien stalen kon een consensussequentie opgebouwd worden met een lengte tussen 1019 en 1031 bp. Er zijn drie groepen te onderscheiden:

- Acht sequenties (één van Couvin 2005 en Couvin 2023 en drie van de Geul 2023 en 2024), gelijken 100% op elkaar en op sequenties van gelijkaardige lengte waaronder de accessienummers AF253541 (Suárez *et al.*, 2001), LT617599 (Tougard *et al.*, 2018) en AF73087 (haplotype Atcs2) (Cortey *et al.*, 2009), allen aangegeven als Atlantische haplotypen. Het is een wijd verspreid haplotype dat ook in viskwekerijen aangetroffen wordt (Cortey *et al.*, 2009; haplogroep AT3-2). In vergelijking met de sequenties van de fenylalanineëindes van de controleregio (d.i. een gedeelte van de CR) uit de studie Van Houdt *et al.* (2005), bleek dit haplotype ATL2 te zijn.
- Drie sequenties (één van Couvin 2005 en twee van de Geul 2024, 100% gelijkend op elkaar) verschilden een nucleotide van voorgaande sequenties en behoren tot haplogroep AT3-2 beschreven in de studie van Cortey *et al.* (2009). Wanneer we vergelijken met de sequenties van Van Houdt *et al.* (2005), gaat het om haplotype ATL4 wat in de betreffende studie enkel in een wilde populatie in de Ry de Rome van de Viroin werd gevonden. Kweekdieren van de startpopulatie “Couvin” waren daarvan afkomstig.
- Tenslotte waren er twee sequenties van Couvin 2023 die respectievelijk twee en drie nucleotiden verschilden van de eerste en tweede groep sequenties, en een nucleotide van AF253543 (Suárez *et al.*, 2001) en van MK948037 (Splendiani *et al.*, 2020), opnieuw Atlantische haplotypen. Het verschil met deze laatste sequentie MK948037 betreft een T-nucleotide binnen een poly-T regio in het midden van de sequentie en is mogelijk geen echt verschil. De haplotypen lijken te behoren tot de wijd verspreide haplogroep AT3-1 beschreven in de studie van Cortey *et al.* (2009). In vergelijking met de sequenties van Van Houdt *et al.* (2005) verschillen de sequenties een nucleotide van haplotype ATL1, een haplotype dat ook vaak in viskwekerijen voorkomt.

Volgens de Neighbour-Joining boom met inclusie van sequenties van Cortey *et al.* (2009), en zoals hierboven beschreven, behoren de drie haplotypen tot haplogroepen AT3-1 en AT3-2 (meer specifiek de geografische groep 2-4 van AT3-2).

3.2 MICROSATELLIETANALYSE

3.2.1 Dubbele stalen en verwantschap

Aan de hand van de herhalingen bleek de gemiddelde fout per merker kleiner dan 1%. Voor één staal afkomstig van de kweekgroep met eenjarige dieren van de Geul (GEU_2024) was de extractie mislukt. Een ander staal uit dezelfde groep (een mannetje) vertoonde een triploïd karakter; voor zes merkers werden met andere woorden drie allelen gevonden in plaats van één

of twee. Dit staal werd buiten beschouwing gelaten voor de verdere analyses, maar zal nog besproken worden. Verder hadden vier stalen ontbrekende genotypes voor een enkele merker.

We vonden voor 12 stalen een dubbel genotype. De dubbele genotypes waren doorgaans 100% identiek, behalve voor twee koppels waar telkens één staal een ontbrekend genotype had voor een enkele merker. Het betreft dubbele stalen uit de Couvin kweekgroep van 2005. Per koppel dubbele genotypes werd één behouden in de dataset. Het finaal aantal genotypes per kweekgroep wordt weergegeven in Tabel 1. Het percentage vrouwtjes per kweekgroep varieerde van 37 tot 62.

Onder de stalen van Couvin 2005 vonden we vijf families bestaande uit twee tot vijf broers/zussen (Tabel 3). Ook onder de individuen van Couvin anno 2023 vonden we zeven families met twee tot zes broers/zussen. Er waren vier families met telkens een paar broers/zussen in de groep GEU_2023, zes families met twee tot zes broers/zussen in GEU_2024, en twee families met elk twee of drie broers/zussen in GEU_2025. Er waren geen nauwe verwanten tussen de verschillende groepen van de Geul.

Tabel 3 Aantal families met het aantal broers/zussen per familie onder de stalen van beekforel uit de kweekgroepen van Couvin 2005 (COU_2005) en 2023 (COU_2023), en van de Geul 2023, 2024 en 2025 (resp. GEU_2023, GEU_2024 en GEU_2025).

Kweekgroep	Aantal families	Aantal broers/zussen
COU_2005	2	2
	1	3
	2	5
COU_2023	3	2
	2	3
	1	4
	1	6
GEU_2023	4	2
GEU_2024	3	2
	1	3
	1	5
	1	6
GEU_2025	1	3
	1	2

3.2.2 Kwaliteit van de merkers

Geen enkel locus week significant af van het Hardy-Weinberg-evenwicht na Bonferroni correctie. Toch leken er vooral in de groep van Couvin in 2023 signalen van afwijking van dit evenwicht te zijn voor de correctie werd toegepast. Merker mOne102a lijkt volgens de genepop resultaten 20% of meer nul-allelen te bevatten in vier van de vijf groepen; dit locus vertoont wel maar twee allelen. Volgens dezelfde methode zijn er meerdere loci die een signaal van nul-allelen geven in de groep van Couvin in 2023. De resultaten verkregen met ML-Null Freq identificeerden echter geen loci met een problematisch aantal nul-allelen. Significant linkage disequilibrium werd gedetecteerd in zes paren van loci, waarvan twee in de eerste kweekgroep

van de Geul (GEU_2023). Elke combinatie was echter uniek in een enkele groep. Bijgevolg werden alle loci voor verdere analyse behouden.

3.2.3 Genetische diversiteit en N_b

Voor de kweekgroepen van Couvin was de verwachte heterozygositeit (H_e) en allelische rijkdom (A_r) significant gestegen (Tabel 4; P < 0,02). Zowel beide maten van heterozygositeit als A_r zijn significant hoger in GEU_2024 en in GEU_2025 ten opzichte van deze in GEU_2023, en in GEU_2025 ten opzichte van GEU_2024.

Het effectief aantal ouders (N_b) lijkt ook gestegen in de kweekgroep Couvin, van 12 in 2005 naar 43 in 2023. Het effectief aantal ouders voor de eerste twee kweekgroepen van de Geul is ongeveer drie tot zes en bijzonder laag, terwijl deze van de derde kweekgroep, GEU_2025, 25 is.

Het aantal private allelen voor de kweekgroepen Couvin anno 2023 is substantieel hoger dan in de andere kweekgroepen (Tabel 5). Wanneer per herkomst het aantal private allelen vergeleken wordt, valt op dat binnen de herkomst Couvin er een groot aantal verschillende allelen aanwezig zijn in beide onderzochte jaren. Voor de Geul is dat vooral van toepassing in de groep GEU_2025.

Tabel 4 De geobserveerde en verwachte heterozygositeit (H_o en H_e), gemiddeld aantal allelen (*Na*), allelische rijkdom (A_r), inteeltcoëfficiënt (F_{IS}), elk met de standaarddeviatie tussen haakjes, en het effectief aantal ouders (N_b) van de verschillende kweekgroepen van beekforel met het betrouwbaarheidsinterval tussen haakjes.

Groep	H_o	H_e	*Na*	A_r	F_{IS}	N_b
COU_2005	0,62 (0,20)	0,56 (0,15)	4,24 (1,25)	4,24 (1,25)	-0,110 (0,160)	12,3 (3,0 – 151,5)
COU_2023	0,72 (0,18)	0,67 (0,12)	5,76 (2,31)	5,49 (2,13)	-0,060 (0,166)	43,5 (23,4 – 145,7)
GEU_2023	0,45 (0,20)	0,43 (0,18)	2,53 (0,80)	2,51 (0,76)	-0,046 (0,192)	2,7 (1,8 – 5,8)
GEU_2024	0,64 (0,19)	0,61 (0,17)	4,65 (1,97)	4,58 (1,90)	-0,045 (0,144)	6,1 (3,0 – 10,3)
GEU_2025	0,73 (0,17)	0,69 (0,17)	6,47 (2,96)	5,96 (2,52)	-0,058 (0,051)	24,7 (15,9 – 44,1)

Tabel 5 Aantal private allelen per kweekgroep bij vergelijking van de kweekgroepen samen (*Pa* totaal) en bij vergelijking per herkomst (*Pa* per herkomst), namelijk de herkomst Couvin (blauw) en herkomst de Geul (groen). Tussen haakjes is het aantal private allelen wanneer broers/zussen verwijderd werden tot maximaal twee per familie.

kweekgroep	*Pa* totaal	*Pa* per herkomst
COU_2005	9 (10)	29 (22)
COU_2023	28 (28)	55 (46)
GEU_2023	1 (1)	1 (1)
GEU_2024	0 (0)	4 (4)
GEU_2025	14 (14)	29 (29)

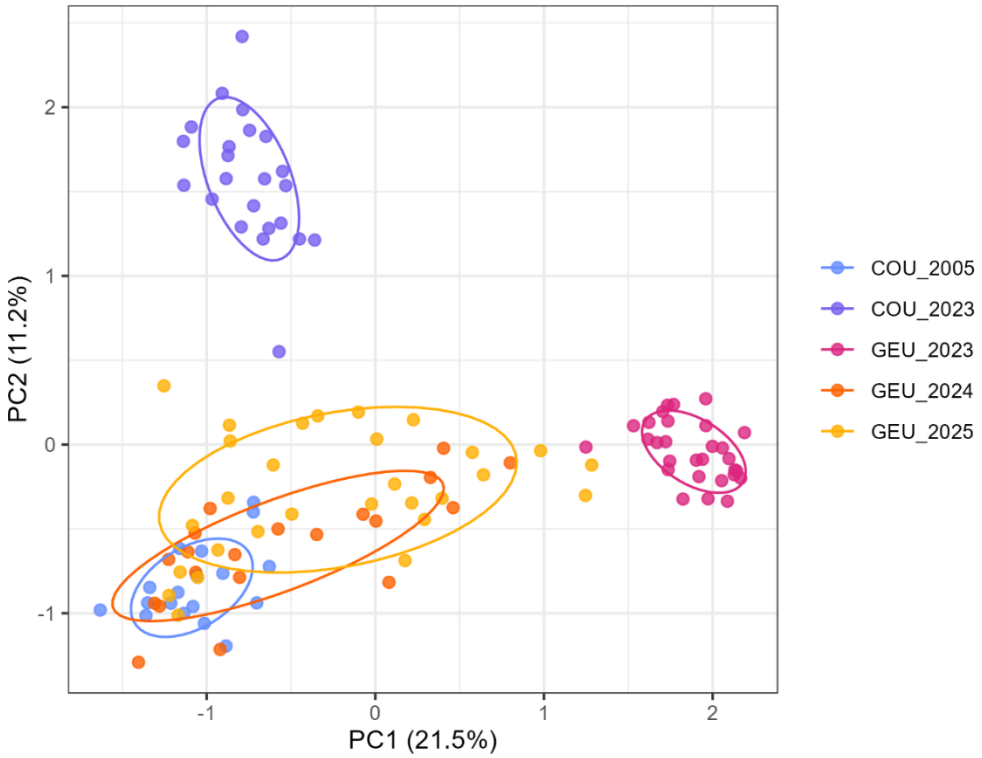
3.2.4 Genetische differentiatie en structuur

De paarsgewijze genetische differentiatie is doorgaans hoog tussen elk paar kweekgroepen (Tabel 6). Dit geldt ook voor de differentiatie tussen verschillende generaties van dezelfde herkomst, behalve voor de Geul bemonsterd in 2025 (GEU_2025), die een zeer lage differentiatie vertoont met GEU_2024; D_{est} tussen GEU_2025 en GEU_2024 is niet significant verschillend van nul. Voor de vergelijking tussen Couvin anno 2005 en de Geul anno 2024 is deze ook relatief laag (F_{ST} = 0,085).

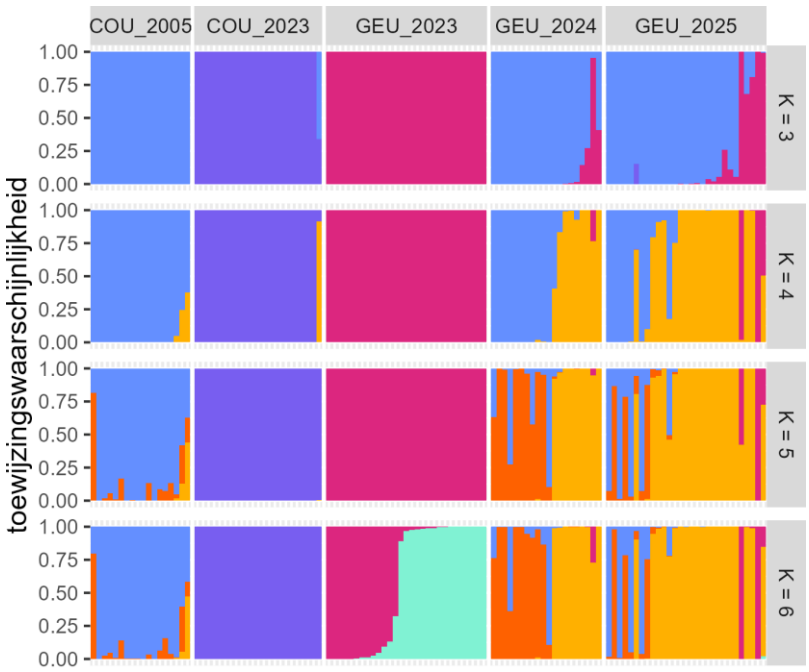
Tabel 6 Genetische differentiatie tussen de verschillende generaties van de kweekgroepen Couvin en de Geul. Onder de diagonaal zijn de F_{ST} waarden, boven de diagonaal D_{est} waarden.

	COU_2005	**COU_2023**	**GEU_2023**	**GEU_2024**	**GEU_2025**
COU_2005		0,395	0,395	0,069	0,105
COU_2023	0,220		0,525	0,334	0,292
GEU_2023	0,368	0,335		0,308	0,261
GEU_2024	0,085	0,183	0,276		0,016
GEU_2025	0,089	0,142	0,204	0,026	

De resultaten van de PCA geven ook aan dat de kweekgroep Couvin anno 2005 genetisch gelijkt op deze van de Geul in 2024 (Figuur 1). Van deze cluster met COU_2005 en GEU_2024 zijn Couvin anno 2023 en de Geul in 2023 duidelijk gescheiden. Om het aantal clusters te bepalen voor de DAPC-analyse, was een “elleboog” in BIC-curve waar te nemen rond drie tot zes clusters (K). Voor de volledigheid werden de DAPC resultaten voor deze drie waarden gegeven (Figuur 2). Voor K = 3 krijgen we zeer gelijkaardige resultaten als deze volgens de PCA. Bij een hogere K-waarde vormt het merendeel van de derde kweekgroep van de Geul (GEU_2025) samen met een deel van de tweede kweekgroep (GEU_2024) een aparte cluster. Maar vanaf K = 5 is er een verdere onderverdeling van de Geul genotypes van 2024 en 2025 en bij K = 6 ook van de individuen van de Geul van 2023.



Figuur 1 Principale componentenanalyse van microsatellietgenotypes van beekforel, weergegeven met gebruik van de eerste twee assen. Elke kweekgroep heeft een andere kleur. De ellipsen geven het betrouwbaarheidsinterval weer (68%).



Figuur 2 Barplot van de DAPC resultaten voor 3 tot 6 clusters (K). Elke balk is een individu en de verschillende kleuren geven de verschillende clusters weer.

4 DISCUSSIE

4.1 HERKOMST

Hoewel er voor een beperkt aantal stalen een sequentie van de controleregio (CR) werd bepaald, wijzen ze allemaal op een Atlantische herkomst wat binnen de verwachtingen ligt. De haplotypen behoren tot de evolutionaire lijnen AT3-1 en AT3-2 (meer specifiek de geografische groep 2-4) zoals beschreven door Cortey *et al.* (2009). Beide lijnen kennen een verspreiding door heel het Noord-Atlantisch bekken. Deze lijnen met daarbinnen enkele in onze studie geïdentificeerde haplotypen worden daarentegen ook vaak in commerciële forelkwekerijen benut. Zo vertoont het triploïde individu van de Geul 2024 een haplotype behorend tot AT3-2, terwijl triploïdie wijst op invloed van commerciële kweek (zie verder). Op basis van enkel CR kunnen wilde, lokale populaties niet onderscheiden worden van kweekvis. Daarvoor zijn bijkomende genetische merkers en verschillende referentiestalen nodig, zowel uit verschillende omliggende viskwekerijen als van wilde populaties, om eventuele menging en hybridisatie tussen beide te identificeren.

4.2 KWEEKGROEP COUVIN

In vergelijking met gepubliceerde waarden voor genetische diversiteit van beekforel gemeten met behulp van microsatellieten in noordelijk Europa, waren de waarden voor heterozygositeit voor alle kweekgroepen vergelijkbaar (bijv. Faulks & Östman, 2016; Klütsch *et al.*, 2019; Lemopoulos *et al.*, 2019; Wollebaek *et al.*, 2018), hoewel ook hogere waarden worden waargenomen (bijv. H_e = 0,60-0,80 in Cornwall (UK) (King *et al.*, 2020)). Wanneer we de waarden voor verwachte heterozygositeit en het gemiddeld aantal allelen vergelijken met deze van de andere populaties in het Maasbekken (DeBoeck *et al.*, 2006), dan valt vooral de lagere waarde van de initiële ouderpopulatie anno 2005 op. Toch leek de allelische rijkdom van de kweekgroep Couvin significant gestegen in de periode 2005-2023. De gevolgde kweekprocedure waarbij kuit van 25 à 40 vrouwtjes individueel werd bevrucht met hom van één tot twee mannetjes uit een poule van 80 tot 120 dieren, had dus een positief effect op de totale genetische diversiteit.

Daartegenover staat wel dat de kweekgroep genetisch sterk veranderde in de loop der jaren. Bovendien bevatten de groepen een groot aantal private allelen. Vele van de oorspronkelijke allelen zijn verloren gegaan, maar er zijn ook nieuwe allelen opgedoken. Het eerste zal deels door genetische drift gebeurd zijn. In hoeverre hier ook sprake is van een verandering onder invloed van selectie is moeilijk te achterhalen. Alleszins zouden geen nieuwe ouders bewust aan de 25 ouderdieren of aan latere generaties toegevoegd zijn. Voor de creatie van elke generatie werd een specifieke set van ouders geselecteerd onder de nakomelingen en kon op die manier telkens een bepaald deel van de oorspronkelijke genenpoel benut en doorgegeven zijn geweest. Hierdoor zouden bepaalde allelen kunnen wegvallen of net meer vertegenwoordigd kunnen zijn.

Een bijkomende en meer aannemelijke verklaring voor het verschil tussen de groepen, en dan vooral voor het verschijnen van nieuwe allelen, is dat er beekforellen van een andere herkomst gaandeweg werden toegevoegd, afkomstig uit de beek stroomafwaarts van de kwekerij in Linkebeek. Dit werd niet geregistreerd en de impact werd toen als verwaarloosbaar beschouwd. In het verleden (voor 1997) werd namelijk ook beekforel gekweekt afkomstig van de kwekerij van Achouffe, maar niet voor behoudsdoelstellingen; enkelen kwamen terecht in de betreffende beek. Door de hoge mate van verandering in genetische samenstelling, kunnen we afleiden dat de toegevoegde dieren een enorme invloed gehad hebben op het verdere kweekproces. Enkel voor een kleine selectie van stalen werden sequenties gegenereerd van de maternaal overerfbare CR. Indien er compleet nieuwe haplotypen zouden opduiken in COU_2023 ten opzichte van deze in COU_2005, dan zou dit verder wijzen op toevoeging van nieuwe dieren. In 2005 werden immers alle ouderdieren bemonsterd.

Door de gebruikte kweekstrategie werd niet alleen de genetische diversiteit verhoogd, maar ook het effectief aantal ouders. Vermoedelijk heeft de strategie ervoor gezorgd dat het reproductiesucces tussen ouderparen weinig varieerde, wat het effectief aantal ouders maximaliseerde. De vermoedelijke mix van ouderdieren van Couvin en een andere onbekende herkomst heeft waarschijnlijk ook bijgedragen aan het verhogen van diversiteit. Dit wordt vaak gezien bij stocks van commerciële viskwekerijen (DeBoeck *et al.*, 2006).

4.3 KWEEKGROEP DE GEUL

De nakomelingen van 2023 van de kweekgroep van de Geul bevat een lage genetische diversiteit. Er zijn wel niet veel nauwe verwanten, vermoedelijk door de hogere leeftijd van deze groep op het moment van staalname. Toch is ook het effectief aantal ouders bijzonder laag. Daartegenover staat de tweede groep van de Geul van 2024 die een hogere genetische diversiteit bevat, maar met een zeer laag effectief aantal ouders. Hoewel beide groepen nakomelingen zijn van eenzelfde groep ouderdieren, eventueel aangevuld met nieuwe dieren, zijn beide groepen genetisch sterk verschillend. De kweekstrategie van Achouffe zorgde bijgevolg voor een gedeeltelijk andere genenpoel. De derde groep van 2025 lijkt genetisch wel op deze van 2024, maar is tegelijk genetisch het meest divers. Het effectief aantal ouders is ook wat hoger (25 individuen). Mogelijk heeft de toevoeging van extra ouderdieren gezorgd voor een stijgende trend in genetische diversiteit. Omdat er gedeeltelijk andere allelen worden gevonden in de kweekgroepen zal dit een positief effect hebben op de totale genetische variatie van de translocatie.

Verontrustend is de vondst van een triploïd individu in de groep van 2024. Triploïde beekforel wordt door een hittebehandeling of met behulp van hydrostatische druk gecreëerd om steriele individuen te produceren (Preston *et al.*, 2013). De vondst lijkt dus de invloed van gekweekte forel in de wilde populatie te suggereren. Bovendien zijn triploïde beekforellen niet noodzakelijk 100% steriel en kunnen ze met diploïden kruisen (Lahnsteiner & Dünser, 2024).

Dat er potentieel inmenging is van beekforel uit commerciële kweekprogramma's, werd al meegedeeld door de leverancier (de kwekerij van Achouffe). Uitzetforel zit voornamelijk meer

bovenstrooms, gescheiden door een dam. Bij hevige regen kan zo'n dam eventueel overwonnen worden. Over een absoluut wilde populatie kunnen we bijgevolg niet meer spreken.

4.4 CONCLUSIE

Beide kweekstrategieën, zowel deze in Linkebeek als in Achouffe, lijken de genetische diversiteit op een hoger niveau te brengen. Uit de resultaten blijkt dat de kweekpopulatie Couvin (ongepland) werd aangevuld met nieuwe kweekdieren. Het zorgde voor een kweekgroep in 2023 die sterk afweek van de startpopulatie in 2005. Over de genetische samenstelling van de kweekgroepen tussen beide jaren is helaas niets gekend. Het is dan ook moeilijk in te schatten wanneer de inbreng van nieuwe individuen en vervolgens de genetische shift gebeurde.

Ook uit de analyse van de kweekgroepen van de Geul kunnen we afleiden dat toevoeging van nieuwe individuen een positief effect hebben op de genetische variatie. Uit communicatie met de kwekerij van Achouffe leiden we af dat er recente hybridisatie is met uitzetforel. Gezien de veelvuldige herbepoting met kweekvis voor visvangst, is het echter moeilijk om nog zuiver wilde populaties te vinden.

Het doel is om de drie groepen van de Geul te mengen. Dit zal de genetische diversiteit van de nakomelingen ten goede komen. Best wordt wel meer gewicht gegeven aan de groepen GEU_2024 en GEU_2025 die een hogere heterozygositeit en allelenrijkdom vertonen. Algemeen lijkt het een goede strategie om na verloop van tijd enkele nieuwe dieren aan de kweekgroepen toe te voegen, bij voorkeur uit dezelfde waterloop bij kweek voor uitzetting in de Geul. Het is ook nuttig om de uitzettingen in de tijd genetisch op te volgen om de slaagkansen van het herstelprogramma te kunnen inschatten en eventueel bijsturen. Genetische screening kan bijvoorbeeld gebeuren bij elke selectie van een nieuwe groep ouderdieren. Door genetische vangst-hervangst kan niet alleen de genetische diversiteit van de translocatie opgevolgd worden, maar ook de overleving en reproductie van de uitgezette beekforel, mits de gebruikte ouderparen voor de teelt ook genetisch gekarakteriseerd worden.

Referenties

Apostolidis A.P., Loukovitis D. & Tsigenopoulos C.S. (2008). Genetic characterization of brown trout (*Salmo trutta*) populations from the Southern Balkans using mtDNA sequencing and RFLP analysis. Hydrobiologia 600 (1): 169-176. https://doi.org/10.1007/s10750-007-9229-4.

Apostolidis A.P., Stoumboudi M.Th., Kalogianni E., Cote G. & Bernatchez L. (2011). Genetic divergence among native trout *Salmo trutta* populations from southern Balkans based on mitochondrial DNA and microsatellite variation. Journal of Fish Biology 79 (7): 1950-1960. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03136.x.

Auwerx J., van Doorn L., Speybroeck J. & Van Wichelen J. (2023). Kweekprogramma's voor bedreigde aquatische diersoorten. Dertig jaar praktijkervaring in het Onderzoekcentrum voor Aquatische Fauna (INBO). Natuurfocus 22 (1): 9-18.

Bardakci F., Degerli N., Ozdemir O. & Basibuyuk H.H. (2006). Phylogeography of the Turkish brown trout *Salmo trutta* L.: mitochondrial DNA PCR-RFLP variation. Journal of Fish Biology 68 (A): 36-55. https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.00948.x.

Benjamini Y. & Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology) 57 (1): 289-300. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.

Bernatchez L. (2001). The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. Evolution 55 (2): 351-379. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb01300.x.

Bernatchez L., Guyomard R. & Bonhomme F. (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Saltno trutta* populations. Molecular Ecology 1 (3): 161-173. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00172.x.

Berrebi P. (2015). Three brown trout *Salmo trutta* lineages in Corsica described through allozyme variation. Journal of Fish Biology 86 (1): 60-73. https://doi.org/10.1111/jfb.12534.

Berrebi P., Jesenšek D. & Crivelli A.J. (2017). Natural and domestic introgressions in the marble trout population of Soča River (Slovenia). Hydrobiologia 785 (1): 277-291. https://doi.org/10.1007/s10750-016-2932-2.

Berrebi, Povz, Jesensek, Cattaneo-Berrebi, & Crivelli (2000). The genetic diversity of native, stocked and hybrid populations of marble trout in the Soca river, Slovenia. Heredity 85 (3): 277-287. https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.00753.x.

Boets P., Gobeyn S., Dillen A., Poelman E. & Goethals P.L.M. (2018). Assessing the suitable habitat for reintroduction of brown trout (*Salmo trutta forma fario*) in a lowland river: A modeling approach. Ecology and Evolution 8 (10): 5191-5205. https://doi.org/10.1002/ece3.4022.

Cairney M., Taggart J.B. & HØyheim B. (2000). Characterization of microsatellite and minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids. Molecular Ecology 9 (12): 2175-2178. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.105312.x.

Cortey M., Vera M., Pla C. & García-Marín J.-L. (2009). Northern and Southern expansions of Atlantic brown trout (*Salmo trutta*) populations during the Pleistocene. Biological Journal of the Linnean Society 97 (4): 904-917. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01220.x.

DeBoeck G., Blust R., Todorache C., Baret P., Cornille I., Buysse D., Coeck J., Belpaire C., Geeraerts C., Verbiest H., Mostaert F., Viaene P., Vereecken H., Ovidio M., Philippart J.-C., Raeymakers J., Van Houdt J. & Volckaert P. (2006). Impact assessment and remediation of anthropogenic interventions on fish populations (FISHGUARD). Scientific support plan for a sustainable development policy (SPSDII). Belgian Science Policy, Brussels, Belgium. https://orbi.uliege.be/handle/2268/62167.

Dempster A.P., Laird N.M. & Rubin D.B. (1977). Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological) 39: 1-22. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1977.tb01600.x.

Do C., Waples R.S., Peel D., Macbeth G.M., Tillett B.J. & Ovenden J.R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. Molecular Ecology Resources 14 (1): 209-214. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12157.

Duftner N., Weiss S., Medgyesy N. & Sturmbauer C. (2003). Enhanced phylogeographic information about Austrian brown trout populations derived from complete mitochondrial control region sequences. Journal of Fish Biology 62 (2): 427-435. https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00038.x.

Faulks L. & Östman Ö. (2016). Genetic diversity and hybridisation between native and introduced Salmonidae fishes in a Swedish alpine lake. PLOS ONE 11 (3): e0152732. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152732.

Goudet J. & Jombart T. (2022). hierfstat: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics. R package version 0.5-11.

Grimholt U., Drabløs F., Jørgensen S., Høyheim B. & Stet R.J. (2002). The major histocompatibility class I locus in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*): polymorphism, linkage analysis and protein modelling. Immunogenetics 54 (8): 570-581. https://doi.org/10.1007/s00251-002-0499-8.

Hansen M.M., Nielsen E.E. & Mensberg K.-L.D. (1997). The problem of sampling families rather than populations: relatedness among individuals in samples of juvenile brown trout *Salmo trutta* L. Molecular Ecology 6 (5): 469-474. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.t01-1-00202.x.

Hashemzadeh Segherloo I., Farahmand H., Abdoli A., Bernatchez L., Primmer C.R., Swatdipong A., Karami M. & Khalili B. (2012). Phylogenetic status of brown trout *Salmo trutta* populations in five rivers from the southern Caspian Sea and two inland lake basins, Iran: a morphogenetic approach. Journal of Fish Biology 81 (5): 1479-1500. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03428.x.

Hashemzadeh Segherloo I., Freyhof J., Berrebi P., Ferchaud A.-L., Geiger M., Laroche J., Levin B.A., Normandeau E. & Bernatchez L. (2021). A genomic perspective on an old question: *Salmo* trouts or *Salmo trutta* (Teleostei: Salmonidae)? Molecular Phylogenetics and Evolution 162: 107204. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107204.

Jombart T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24 (11): 1403-1405. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129.

Jombart T., Devillard S. & Balloux F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genetics 11: 94. https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94.

Jones O.R. & Wang J. (2010). COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. Molecular Ecology Resources 10 (3): 551-555. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x.

Jost L. (2008). G(ST) and its relatives do not measure differentiation. Molecular Ecology 17 (18): 4015-4026. https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2008.03887.x.

Kalinowski S. & Taper M. (2006). Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. Conservation Genetics 7 (6): 991-995. https://doi.org/10.1007/s10592-006-9134-9.

Kamvar Z.N., Brooks J.C. & Grünwald N.J. (2015). Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. Frontiers in Genetics 6: 208-208. https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00208.

Kamvar Z.N., Tabima J.F. & Grünwald N.J. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. PeerJ 2: e281. https://doi.org/10.7717/peerj.281.

Kassambara A. (2023). rstatix: Pipe-friendly framework for basic statistical tests. R package version 0.7.2. https://CRAN.R-project.org/package=rstatix.

Keenan K., Bradley C.R., Magee J.J., Hynes R.A., Kennedy R.J., Crozier W.W., Poole R., Cross T.F., McGinnity P. & Prodöhl P.A. (2013a). Beaufort trout MicroPlex: a high-throughput multiplex platform comprising 38 informative microsatellite loci for use in resident and anadromous (sea trout) brown trout *Salmo trutta* genetic studies. Journal of Fish Biology 82 (6): 1789-1804. https://doi.org/10.1111/jfb.12095.

Keenan K., McGinnity P., Cross T.F., Crozier W.W. & Prodöhl P.A. (2013b). diveRsity: an R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. Methods in Ecology and Evolution 4 (8): 782-788. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067.

King A.R., Miller A.L. & Stevens J.R. (2021). Has stocking contributed to an increase in the rod catch of anadromous trout (*Salmo trutta* L.) in the Shetland Islands, UK? Journal of Fish Biology 99 (3): 980-989. https://doi.org/10.1111/jfb.14784.

King R.A., Stockley B. & Stevens J.R. (2020). Small coastal streams—Critical reservoirs of genetic diversity for trout (*Salmo trutta* L.) in the face of increasing anthropogenic stressors. Ecology and Evolution 10 (12): 5651-5669. https://doi.org/10.1002/ece3.6306.

King T.L., Eackles M.S. & Letcher B.H. (2005). Microsatellite DNA markers for the study of Atlantic salmon (*Salmo salar*) kinship, population structure, and mixed-fishery analyses. Molecular Ecology Notes 5 (1): 130-132. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00860.x.

Klütsch C.F.C., Maduna S.N., Polikarpova N., Forfang K., Aspholm P.E., Nyman T., Eiken H.G., Amundsen P.-A. & Hagen S.B. (2019). Genetic changes caused by restocking and hydroelectric dams in demographically bottlenecked brown trout in a transnational

subarctic riverine system. Ecology and Evolution 9 (10): 6068-6081. https://doi.org/10.1002/ece3.5191.

Kottelat M. & Freyhof J. (2007). Handbook of European freshwater fishes. Vol. 13. Publications Kottelat Cornol, Switzerland.

Lahnsteiner F. & Dünser A. (2024). Triploid brown trout, *Salmo trutta*, develop functional gonads with age and are able to interbreed with diploid counterparts. Journal of Fish Biology n/a (n/a): 1-12. https://doi.org/10.1111/jfb.15739.

Lemopoulos A., Prokkola J.M., Uusi-Heikkilä S., Vasemägi A., Huusko A., Hyvärinen P., Koljonen M.-L., Koskiniemi J. & Vainikka A. (2019). Comparing RADseq and microsatellites for estimating genetic diversity and relatedness — Implications for brown trout conservation. Ecology and Evolution 9 (4): 2106-2120. https://doi.org/10.1002/ece3.4905.

Lerceteau-Köhler E., Schliewen U., Kopun T. & Weiss S. (2013). Genetic variation in brown trout *Salmo trutta* across the Danube, Rhine, and Elbe headwaters: a failure of the phylogeographic paradigm? BMC Evolutionary Biology 13 (1): 176. https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-176.

Lo Brutto S., Hristovski N. & Arculeo M. (2010). Genetic divergence between morphological forms of brown trout *Salmo trutta* L. in the Balkan region of Macedonia. Journal of Fish Biology 76 (5): 1220-1227. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02595.x.

Meraner A., Baric S., Pelster B. & Dalla Via J. (2007). Trout (*Salmo trutta*) mitochondrial DNA polymorphism in the centre of the marble trout distribution area. Hydrobiologia 579 (1): 337-349. https://doi.org/10.1007/s10750-006-0479-3.

Olsen E.M. & Vøllestad L.A. (2001). Within-stream variation in early life-history traits in brown trout. Journal of Fish Biology 59 (6): 1579-1588. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00222.x.

O'Reilly P.T., Hamilton L.C., McConnell S.K. & Wright J.M. (1996). Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53 (10): 2292-2298. https://doi.org/10.1139/f96-192.

Osinov A. & Bernatchez L. (1996). Atlantic and Danubian phylogenetic groupings of brown trout *Salmo trutta* complex: genetic divergence, evolution, and conservation. Journal of Ichthyology 36 (9): 723-746.

Pauwels I., Van Wichelen J., Vandamme L., Vught I., Van Thuyne G., Auwerx J., Baeyens R., De Maerteleire N., Gelaude E., Picavet B., Pieters S., Robberechts K., Belpaire C. & Coeck J. (2016). Wetenschappelijke onderbouwing en ondersteuning van het visserijbeleid en het visstandbeheer - onderzoeksprogramma visserij 2015: eindrapport. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2016, Nr. INBO.R.2016.12075827. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

Preston A.C., Taylor J.F., Craig B., Bozzolla P., Penman D.J. & Migaud H. (2013). Optimisation of triploidy induction in brown trout (*Salmo trutta* L.). Aquaculture 414-415: 160-166. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.034.

Quéméré E., Perrier C., Besnard A.-L., Evanno G., Baglinière J.-L., Guiguen Y. & Launey S. (2014). An improved PCR-based method for faster sex determination in brown trout (*Salmo*

trutta) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). Conservation Genetics Resources 6 (4): 825-827. https://doi.org/10.1007/s12686-014-0259-8.

R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

R Core Team (2024). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rogers S.M., Marchand M.-H. & Bernatchez L. (2004). Isolation, characterization and cross-salmonid amplification of 31 microsatellite loci in the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*, Mitchill). Molecular Ecology Notes 4 (1): 89-92. https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00578.x.

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.

Sanz N. (2017). Phylogeographic history of brown trout. In: Brown trout. John Wiley & Sons, Ltd, p. 15-63. https://doi.org/10.1002/9781119268352.ch2.

Scribner K.T., Gust J.R. & Fields R.L. (1996). Isolation and characterization of novel salmon microsatellite loci: cross-species amplification and population genetic applications. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53 (4): 833-841. https://doi.org/10.1139/f95-254.

Snoj A., Marić S., Bajec S.S., Berrebi P., Janjani S. & Schöffmann J. (2011). Phylogeographic structure and demographic patterns of brown trout in North-West Africa. Molecular Phylogenetics and Evolution 61 (1): 203-211. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.05.011.

Snoj A., Marić S., Berrebi P., Crivelli A.J., Shumka S. & Sušnik S. (2009). Genetic architecture of trout from Albania as revealed by mtDNA control region variation. Genetics Selection Evolution 41 (1): 22. https://doi.org/10.1186/1297-9686-41-22.

Splendiani A., Berrebi P., Tougard C., Righi T., Reynaud N., Fioravanti T., Lo Conte P., Delmastro G.B., Baltieri M., Ciuffardi L., Candiotto A., Sabatini A. & Caputo Barucchi V. (2020). The role of the south-western Alps as a unidirectional corridor for Mediterranean brown trout (*Salmo trutta* complex) lineages. Biological Journal of the Linnean Society 131 (4): 909-926. https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa125.

Suárez J., Bautista J.M., Almodóvar A. & Machordom A. (2001). Evolution of the mitochondrial control region in Palaearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. Heredity 87 (2): 198-206. https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00905.x.

Thia J.A. (2023). Guidelines for standardizing the application of discriminant analysis of principal components to genotype data. Molecular Ecology Resources 23 (3): 523-538. https://doi.org/10.1111/1755-0998.13706.

Tougard C., Justy F., Guinand B., Douzery E.J.P. & Berrebi P. (2018). *Salmo macrostigma* (Teleostei, Salmonidae): Nothing more than a brown trout (*S. trutta*) lineage? Journal of Fish Biology 93 (2): 302-310. https://doi.org/10.1111/jfb.13751.

Van den Neucker T., Gelaude E., Baeyens R., Jacobs Y., De Maerteleire N., Robberechts K., Stevens M., Mouton A., Buysse D., Auwerx J., Vught I., De Charleroy D. & Coeck J. (2013).

Wetenschappelijke ondersteuning herstelprogramma's kopvoorn, serpeling, kwabaal en beekforel in 2012. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2013, Nr. 21. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

Van den Neucker T., Gelaude E., Baeyens R., Jacobs Y., De Maerteleire N., Stevens M., Mouton A., Buysse D., Auwerx J., Vught I., De Charleroy D. & Coeck J. (2012). Wetenschappelijke ondersteuning herstelprogramma's kopvoorn, serpeling, kwabaal en beekforel in 2011. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2012, Nr. 19. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

Van den Neucker T., Gelaude E., Martens S., Baeyens R., Jacobs Y., Stevens M., Mouton A., Buysse D., Auwerx J., De Charleroy D., Coeck J. & van Vessem J. (2009). Wetenschappelijke ondersteuning herstelprogramma's kopvoorn, serpeling, kwabaal en beekforel in 2008. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2009, Nr. 39. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

Van den Neucker T., Gelaude E., Martens S., Baeyens R., Jacobs Y., Stevens M., Mouton A., Buysse D., Auwerx J., Vught I., De Charleroy D., Coeck J. & van Vessem J. (2010a). Wetenschappelijke ondersteuning herstelprogramma's kopvoorn, serpeling, kwabaal en beekforel in 2009. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2010, Nr. 64. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

Van den Neucker T., Gelaude E., Martens S., Baeyens R., Jacobs Y., Stevens M., Mouton A., Buysse D., Auwerx J., Vught I., De Charleroy D., Coeck J. & van Vessem J. (2010b). Wetenschappelijke ondersteuning herstelprogramma's kopvoorn, serpeling, kwabaal en beekforel in 2010. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2010, Nr. 68. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

Van Houdt J.K.J., Pinceel J., Flamand M.-C., Briquet M., Dupont E., Volckaert F.A.M. & Baret P.V. (2005). Migration barriers protect indigenous brown trout (*Salmo trutta*) populations from introgression with stocked hatchery fish. Conservation Genetics 6 (2): 175-191. https://doi.org/10.1007/s10592-004-7822-x.

Van Wichelen J., Vandamme L., Pauwels I., Auwerx J., Buysse D., Baeyens R., De Maerteleire N., Gelaude E., Picavet B., Pieters S., Robberechts K. & Coeck J. (2018). Wetenschappelijke onderbouwing en ondersteuning van het visserijbeleid en het visstandbeheer. Onderzoeksprogramma visserij 2017 - eindverslag. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2018, Nr. 76. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. https://doi.org/10.21436/inbor.15335912.

Vandamme L., Van Wichelen J., Pauwels I., Auwerx J., Vught I., Buysse D., Baeyens R., De Maerteleire N., Gelaude E., Picavet B., Pieters S., Robberechts K. & Coeck J. (2017). Wetenschappelijke onderbouwing en ondersteuning van het visserijbeleid en het visstandbeheer. Onderzoeksprogramma visserij 2016. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2017, Nr. 1. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

Vandamme L., Van Wichelen J., Steendam C., Brys, Rein, Pauwels I., Auwerx J., Buysse D., Baeyens R., De Maerteleire N., Gelaude E., Pieters S., Robberechts K. & Coeck J. (2020). Wetenschappelijke onderbouwing en ondersteuning van het visserijbeleid en het visstandbeheer - onderzoeksprogramma visserij 2019: eindrapport. Rapporten van het

Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2020, Nr. 49. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. https://doi.org/10.21436/inbor.28808440.

Vandamme L., Verhelst P., Labrière A., Buysse D., Bruneel S., Broos S., Pauwels I., Auwerx J., Plaetinck S., Rosseel D., De Maerteleire N., Pieters S. & Coeck J. (2024a). Wetenschappelijke onderbouwing en ondersteuning van het visserijbeleid en het visstandbeheer, Onderzoeksprogramma visserij 2023. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2024, Nr. 70. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. https://doi.org/10.21436/inbor.119555245.

Vandamme L., Verhelst P., Pauwels I., Buysse D., Broos S., Auwerx J., Brys R., Neyrinck S., Plaetinck S., Pieters S., Rosseel D., De Maerteleire N. & Coeck J. (2024b). Wetenschappelijke onderbouwing en ondersteuning van het visserijbeleid en het visstandbeheer, Onderzoeksprogramma visserij 2021 – 2022. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2024, Nr. 3. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. https://doi.org/10.21436/inbor.101502149.

Vasemägi A., Nilsson J. & Primmer C.R. (2005). Seventy-five EST-linked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellite markers and their cross-amplification in five salmonid species. Molecular Ecology Notes 5 (2): 282-288. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00902.x.

Verreycken H., Belpaire C., Van Thuyne G., Breine J., Buysse D., Coeck J., Mouton A., Stevens M., Van den Neucker T., De Bruyn L. & Maes D. (2014). IUCN Red List of freshwater fishes and lampreys in Flanders (north Belgium). Fisheries Management and Ecology 21 (2): 122-132. https://doi.org/10.1111/fme.12052.

Vught I., Buysse D., De Charleroy D., Jansen I., Mouton A., Papadopoulos I., Auwerx J., Baeyens, Raf, De Maerteleire N., Gelaude E., Picavet B., Pieters S., Robberechts K. & Coeck J. (2015). Wetenschappelijke onderbouwing en ondersteuning van het visserijbeleid en het visstandbeheer - Onderzoeksprogramma visserij 2014: Eindrapport. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2015, Nr. INBO.R.2015.11373725. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

Wang J. (2004). Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. Genetics 166 (4): 1963-1979. https://doi.org/10.1534/genetics.166.4.1963.

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. https://doi.org/10.2307/2408641.

Weiss S., Schlötterer C., Waidbacher H. & Jungwirth M. (2001). Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantic basin fish — by man or nature? Molecular Ecology 10 (5): 1241-1246. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01261.x.

Wollebaek J., Heggenes J. & Roed K.H. (2018). Life histories and ecotype conservation in an adaptive vertebrate: Genetic constitution of piscivorous brown trout covaries with habitat stability. Ecology and Evolution 8 (5): 2729-2745. https://doi.org/10.1002/ece3.3828.