



Vlaanderen
is wetenschap

Metapopulatiestudie in het kader van het soortbeschermingsprogramma poelkikker

Jeroen Speybroeck, Caroline Mouton, Karen Cox, Loïc van Doorn, Arent Raepsaet,
An Van Breusegem, Leen Verschaeve

INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK

Auteurs:

Jeroen Speybroeck^{id}, Caroline Mouton^{id}, Karen Cox^{id}, Loïc van Doorn^{id}, Arent Raepsaet, An Van Breusegem, Leen Verschaeve

Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Reviewers:

Joachim Mergeay

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

Vestiging:

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

e-mail:

jeroen.speybroeck@inbo.be

Wijze van citeren:

Speybroeck J., Mouton C., Cox K., van Doorn L., Raepsaet A., Van Breusegem A., Verschaeve L. (2025). Metapopulatiestudie in het kader van het soortbeschermingsprogramma poelkikker. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2025 (76). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
DOI: doi.org/10.21436/inbor.136187742

D/2025/3241/481

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2025 (76)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Hilde Eggermont

Foto cover:

Mannetje poelkikker, Lo-Reninge, 22 juni 2024 - © Jeroen Speybroeck

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:

Het Agentschap Natuur en Bos

AGENTSCHAP
NATUUR & BOS



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

METAPOPULATIESTUDIE IN HET KADER VAN HET SOORTBESCHERMINGSPROGRAMMA POELKIKKER

Jeroen Speybroeck, Caroline Mouton, Karen Cox, Loïc van Doorn, Arent Raepsaet, An Van Breusegem, Leen Verschaeve

doi.org/10.21436/inbor.136187742

Dankwoord/Voorwoord

We danken Natuurpunt Studie voor het ter beschikking stellen van de verspreidingsgegevens. We zijn Sam Van de Poel (Natuurpunt Studie), Daan Van Eenaeme, Max van Elsen, Henri Rommel en Sten Gijbels erkentelijk voor hun bijdrage aan het veldwerk en collega Joachim Mergeay voor het ter beschikken stellen van de historische gegevens van Holsbeek et al. (2008, 2010). We danken de privé-eigenaars en terreinbeheerders voor het verschaffen van toegang tot de onderzochte terreinen. Joachim Mergeay en Arent Raepsaet worden bedankt voor het reviewen van het conceptrapport.

Samenvatting

De poelkikker (*Pelophylax lessonae*) is een Europees beschermde en op de Vlaamse Rode Lijst als 'kwetsbaar' aangeduide soort. Deze studie biedt voor het eerst een geïntegreerd beeld van de genetische structuur, verspreiding en leefgebiedsvereisten van de Vlaamse populaties, als wetenschappelijke onderbouw voor het Soortbeschermingsprogramma (SBP). Hiermee kan het SBP verbeterd worden met concrete maatregelen om de poelkikker te beschermen en in een gunstige staat van instandhouding te brengen.

Verspreiding en trends

Poelkikker komt nog voor in een beperkt aantal kerngebieden in de Kempen en in enkele geïsoleerde clusters in West-Vlaanderen. Poelkikkerpopulaties komen in Vlaanderen altijd samen voor met bastaardkikker (*P. kl. esculentus*); populaties met enkel poelkikker zijn nagenoeg verdwenen. De soort is de voorbije decennia zeldzamer geworden ten opzichte van bastaardkikker, vooral door habitatverlies, versnippering en concurrentie met de invasieve meerkikker (*P. ridibundus* s.l.).

Genetische diversiteit en structuur

Het genetisch onderzoek op meer dan 900 individuen toont een duidelijke scheiding tussen de West-Vlaamse en de oostelijke (Antwerpse en Limburgse) populaties. Binnen regio's is de genetische differentiatie laag, wat wijst op beperkte dispersie maar nog enige uitwisseling binnen lokale netwerken. De genetische diversiteit van meerdere populaties, o.a. Brechtse Heide, is echter laag. West-Vlaamse populaties wijken genetisch én morfologisch af en verdienen bijzondere aandacht als mogelijke relictten of unieke lijn.

Habitat en ecologie

Poelkikker is een pioniersoort van open, kleinschalige en structuurrijke landschappen met kleine, vaak tijdelijke, visvrije wateren. De soort verkiest oligotrofe tot mesotrofe poelen met dichte oevervegetatie, in een mozaïek van waterpartijen van 10–1000 m². Op het land gebruikt ze vochtige, goed doorgraafbare bodems in open terrein (natte heiden, vochtige graslanden). Grote permanente vijvers zijn doorgaans ongeschikt en bevorderen eerder bastaard- en meerkikker.

Belangrijkste bedreigingen

De kernproblemen zijn verdroging, habitatfragmentatie, verlies van tijdelijke wateren en de opmars van meerkikker. Hybridisatie met bastaardkikker vormt geen rechtstreekse bedreiging.

— — —

Onze resultaten bevestigen dat behoud van de poelkikker enkel mogelijk is via gebiedsgerichte maatregelen die hydrologie, poelkwaliteit en ruimtelijke samenhang combineren, met structurele inbedding in het Vlaams natuur- en waterbeleid.

Aanbevelingen voor beheer en/of beleid

Het behoud en herstel van kleinschalige poelencomplexen vormt een belangrijke prioriteit. Deze complexen moeten een variatie in hydroperiode vertonen, visvrij blijven en een natuurlijke vegetatiestructuur behouden of ontwikkelen. Daarnaast is het herstel van de hydrologische dynamiek in heide- en graslandcomplexen cruciaal om geschikte voortplantings- en leefomstandigheden voor de poelkikker te waarborgen.

Het versterken van de landschappelijke connectiviteit tussen poelen, bij voorkeur binnen een afstand van 500 tot 1000 meter, is essentieel om uitwisseling tussen deelpopulaties mogelijk te maken en genetische vitaliteit te behouden. Om de toestand van de soort nauwkeurig op te volgen, is een gerichte monitoring via een professioneel meetnetwerk – uitgevoerd door INBO en Natuurpunt – noodzakelijk.

Het beheer moet afgestemd worden op de aanwezigheid van de invasieve meerkikker. Daarbij moeten permanente vijvers zoveel mogelijk worden vermeden en waar mogelijk jaarlijks worden drooggelegd om de poelkikker te bevoordelen. Tot slot verdienen de geïsoleerde West-Vlaamse populaties bijzondere aandacht, aangezien zij mogelijk unieke genetische eenheden vertegenwoordigen binnen het Vlaamse verspreidingsgebied.

English abstract

The pool frog (*Pelophylax lessonae*) is protected under the European Habitats Directive and listed as Vulnerable on the Flemish Red List. This study provides the first comprehensive assessment of the species' genetic structure, distribution, and habitat requirements in Flanders, offering a solid scientific foundation for the Species Protection Programme (SBP).

Distribution and Trends

In Flanders, the pool frog now survives in only a few core areas within the Campine region and several isolated clusters in West Flanders. Populations almost always occur alongside the edible frog (*P. kl. esculentus*), while pure pool frog populations have nearly disappeared. Over recent decades, the species has declined relative to the edible frog, mainly due to habitat loss, landscape fragmentation, and competition with the invasive marsh frog (*P. ridibundus* s.l.).

Genetic Diversity and Structure

Genetic analyses of more than 900 individuals reveal a clear genetic distinction between West Flanders and the eastern populations in Antwerp and Limburg. Within regions, genetic differentiation is low, suggesting limited dispersal but some ongoing gene flow among nearby sites. Several populations, such as those in Brechtse Heide, show reduced genetic diversity. The West Flemish populations differ genetically and morphologically and may represent distinct or relict lineages that warrant particular conservation attention.

Habitat and Ecology

The pool frog is a pioneer species of open, small-scale, structurally diverse landscapes containing small, often temporary, fish-free ponds. It favours oligotrophic to mesotrophic water bodies with dense shoreline vegetation, embedded in a mosaic of ponds ranging from 10 to 1000 m². On land, the species uses moist, well-drained soils in open habitats such as wet heathlands and humid grasslands. Large, permanent ponds are generally unsuitable and instead favour edible and marsh frogs.

Key Threats

Major threats include hydrological drying, habitat fragmentation, loss of temporary ponds, and the spread of the invasive marsh frog. Hybridisation with the edible frog does not pose a direct risk to the pool frog's persistence.

Conservation Implications

Effective conservation of the pool frog in Flanders requires integrated, area-based action that combines hydrological restoration, improvement of pond quality, and reinforcement of spatial connectivity. These measures should be embedded within broader Flemish nature and water management policies to ensure long-term population viability.

Inhoudstafel

Dankwoord/Voorwoord	2
Samenvatting	3
Aanbevelingen voor beheer en/of beleid	4
English abstract	5
1 Inleiding	11
2 Onderzoek	13
2.1 Genetisch onderzoek	13
2.1.1 Hybridogenese en genoomexclusie bij groene kikkers	13
2.1.1.1 Verschillende systemen, polyploidie en genetische merkers	14
2.1.1.2 LE-systeem	15
2.1.1.2.1 Aangepast LE-systeem	16
2.1.1.3 RE-systeem	17
2.1.1.4 E-systeem	18
2.1.2 Doelstellingen: genetische soortenidentificatie en populatiegenetica	20
2.1.3 Werkwijze	20
2.1.3.1 Staalname	20
2.1.3.1.1 Fase 1 (2023) – Soortensamenstelling en soortenidentificatie	20
2.1.3.1.2 Fase 2 (2024) – Populatiegenetica	21
2.1.3.2 DNA-extractie en microsatellietgenotypering	24
2.1.3.3 Verwerken van de genetische data	25
2.1.3.3.1 Genetische identificatie van de soort en vangsten	25
2.1.3.3.2 Onderzoek naar polyploidie	25
2.1.3.4 Populatiegenetica: studie van het L-genoom	26
2.1.3.4.1 Genetische structuur van het L-genoom	26
2.1.3.4.2 Genetische diversiteit van het L-genoom	27
2.1.3.5 Populatiegenetica: studie van het R-genoom	28
2.1.4 Resultaten genetisch onderzoek	28
2.1.4.1 Genetische identificatie van de soort en eventuele vangsten	28
2.1.4.2 Onderzoek naar polyploidie	29
2.1.4.3 Populatiegenetica: studie van het L-genoom	30
2.1.4.3.1 Genetische structuur van het L-genoom	30
2.1.4.3.2 Genetische diversiteit van het L-genoom	35
2.1.4.4 Populatiegenetica: studie van het R-genoom	40
2.1.4.4.1 Genetische structuur en diversiteit van het R-genoom	40
2.1.5 Discussie en conclusies inzake genetica	41

Verklarende woordenlijst

Allel	Zie ook locus ; op een specifieke plaats op een chromosoom of locus kunnen verschillende varianten optreden. Deze verschillende varianten worden allelen genoemd.
Allelenrijkdom (AR)	Het gemiddeld aantal allelen per locus dat voorkomt binnen een bepaalde groep of populatie. Hoe hoger de rijkdom, hoe meer genetische variatie.
Diploïd	Zie ook heterozygoot en homozygoot ; een diploïd organisme heeft twee kopieën per chromosoom (ofwel twee allelen per locus). Dit is de regel bij gewervelde dieren.
Gametogenese	De gametogenese is het volledige proces waarbij de geslachtscellen of gameten worden geproduceerd.
Genetische differentiatie	Genetische differentiatie verwijst naar het verschil in genetische samenstelling tussen verschillende populaties van een soort. Het ontstaat doordat genetische variatie, zoals verschillende allelen op specifieke genetische locaties, zich in verschillende mate voordoet binnen elke populatie. Factoren zoals genetische drift, natuurlijke selectie en migratie kunnen bijdragen aan genetische differentiatie tussen populaties. Een voorbeeld van een maat van differentiatie is de fixatie-index F_{ST} .
Genetische drift	Genetische drift is een willekeurig proces waarbij toevallige veranderingen in allelenfrequenties optreden in een populatie over generaties.
Genetische merker	Zie ook microsatelliet(en) ; een gekend stukje DNA dat gebruikt kan worden om verschillen tussen individuen en/of populaties op te sporen.
Genomotype	Variant van een soort/taxon met verschillende combinaties van ouderlijke genomen binnen een hybridecomplex.
Genoom	Het genoom is de volledige genetische samenstelling van een organisme.
Genotype	Het genotype is de specifieke genetische code (de combinatie van allelen) van een organisme. De DNA-analyse die leidt tot het bepalen van individuele genotypes noemen we genotypering.
Heterozygoot	Zie ook diploïd , locus en allel ; door het bezitten van twee kopieën per chromosoom, is een diploïd individu heterozygoot voor een bepaald locus als deze twee verschillende allelen bezit.

1 INLEIDING

Op Europees niveau valt de poelkikker onder de Habitatrichtlijn. In Vlaanderen staat de soort op de Rode Lijst als ‘kwetsbaar’ aangeduid op basis van recente bezorgdheden over verspreiding en populatietrends in Vlaanderen (Speybroeck *et al.* 2024). Voor de poelkikker is specifiek een soortenbeschermingsprogramma (SBP) uitgewerkt (Antea, 2019). Dat programma bevat concrete beheer-, monitoring- en herstelmaatregelen (looptijd & evaluatieprocedures) om metapopulaties te vrijwaren en te versterken. Het SBP stuurt de praktische uitvoering in Vlaanderen aan. Op provinciaal vlak is de poelkikker opgenomen als provinciaal prioritaire soort (PPS) in elke provincie waar de soort momenteel voorkomt (Maes *et al.* 2021a, b, c, d). Antwerpen, Limburg, Vlaams-Brabant en West-Vlaanderen noemen de soort expliciet als prioriteit, wat extra aandacht en lokale maatregelen (herstelprojecten, monitoring, ruimtelijke aandacht) stimuleert. Voor het natuurbeleid in Vlaanderen vormt de poelkikker een bijzondere uitdaging. Als Habitatrichtlijnsoort (Bijlage IV) geniet hij strikte bescherming, ondanks dat de soort hier uitsluitend in hybridesystemen voorkomt.

In 1882 beschreef Camerano een kortpotige variant van de bastaardkikker (*Pelophylax esculentus* var. *lessonae*) uit Piemonte (Noord-Italië) die later door Karaman (1921) als zelfstandige soort werd beschouwd. Kruisingsexperimenten van de Poolse zoöloog Leszek Berger (1964) toonden aan dat paring tussen poelkikker en bastaardkikker dieren met bastaardkikkerfenotype opleverden, terwijl paringen tussen bastaardkikkers onderling in de meeste gevallen leidden tot dieren die reeds tijdens de larvale ontwikkeling stierven. In de jaren 1970 kon de in eerste instantie op argwaan onthaalde hybridehypothese van Berger bekrachtigd worden. Toen werd aangetoond dat bij Oostenrijkse bastaardkikkers het genetisch materiaal niet de Mendeliaanse overerving volgde, maar enkel het meerkikkergeenoom klonaal werd overgeërfd terwijl het poelkikkergeenoom verwijderd werd (Tunner *et al.* 1974).

Deze inzichten in het hybridesysteem van groene kikkers roepen vragen op over de praktische invulling van de bescherming van poelkikker. Moet men inzetten op het behoud van zoveel mogelijk genetische diversiteit binnen de mengpopulaties? Of eerder op het veiligstellen van leefgebieden waarin de poelkikker functioneel kan blijven voortbestaan? Of sporen deze twee doelstellingen in de praktijk gewoon samen, omdat zorgen voor het ene ook zorgen voor het andere impliceert? Daarnaast zijn versnippering van het landschap, verdroging, intensieve landbouw en de aanwezigheid van (uitheemse) vis maar ook de uitheemse en invasieve meerkikker (*P. ridibundus* s.l.) belangrijke bedreigingen die zowel het voortbestaan van de poelkikker als van andere amfibieënsoorten onder druk zetten.

Hoewel het genetisch onderzoek naar het groenekikkercomplex exponentieel toenam, bestaan tot op heden nog belangrijke kennislacunes. Populatiegenetisch onderzoek naar de genetische diversiteit en ruimtelijke samenhang van poelkikkerpopulaties en de van nature ermee samen voorkomende bastaardkikker in Vlaanderen ontbreekt.

Met deze onderzoeksopdracht willen we kennislacunes verhelpen rond de Vlaamse poelkikkerpopulaties.

- Populatiegenetisch onderzoek: waar treffen we de genetisch gezien meest robuuste poelkikkerpopulaties aan? Hierbij schatten we de genetische variatie binnen en tussen populaties in, met de focus op poelkikkerrijke populaties.
- Ecologisch onderzoek:
 - Verspreiding, populatie en trends:

- Wat is het actueel voorkomen van de soort?
- Hoe evolueren de Vlaamse poelkikkerpopulaties in verhouding tot die van andere groenekikkersoorten?
- ...
- Habitat:
 - Wat zijn de kenmerken van het actuele Vlaamse habitat van de poelkikker?
 - Kan er beheerd worden ten voordele van poelkikker (en eventueel ten nadele van bastaardkikker en zeker meerkikker)?
 - ...

De bekomen onderzoeksresultaten moeten toelaten beheer en behoud van de soort te informeren.

In wat volgt wordt poelkikker of afkomstig van poelkikker aangeduid met een “L”, verwijzend naar de soortnaam *lessonae*; meerkikker of afkomstig van meerkikker wordt aangeduid met een “R”, naar soortnaam *ridibundus*. Hieruit volgt dat individuele bastaardkikkers aangeduid kunnen worden met “LR”. Een groep bastaardkikkers wordt vaak ook aangeduid met “E”, naar soortnaam *esculentus*.

Het geslacht van groene kikkers wordt, net zoals bij de mens, bepaald door XY-chromosomen (Schempp & Schmid, 1981). Het hebben van twee X-chromosomen resulteert in het vrouwelijke geslacht, het hebben van zowel een X- als een Y-chromosoom resulteert in het mannelijke geslacht. Omdat wordt aangenomen dat, op basis van gedrag, de meeste primaire kruisingen tussen poel- en meerkikker gebeuren door kruising van een grotere vrouwelijke meerkikker (R_xR_x) en kleinere mannelijke poelkikker (L_yL_y), wordt geslachtsbepaling een L-gerelateerde aangelegenheid (Berger *et al.*, 1988). De uitkomst van zo’n primaire kruising wordt weergegeven in Figuur 1.

		♀ R_xR_x 	
	Gameten	R_x	R_x
♂ L_yL_x 	L_y	♂ L_yR_x 	♂ L_yR_x 
	L_x	♀ L_xR_x 	♀ L_xR_x 

Figuur 1 Schematisch overzicht van een primaire kruising tussen een vrouwelijke meerkikker (R_xR_x) en een mannelijke poelkikker (L_yL_x), mogelijke gameten en de uitkomst van een paring (dit zijn de combinaties van LR).

2.1.1.1 Verschillende systemen, polyploidie en genetische merkers

De voortplanting van de bastaardkikker, *Pelophylax kl. esculentus*, is een complex proces dat zeer gevarieerd is en aangepast aan de syntopisch voorkomende oudersoorten, *P. lessonae* en/of *P. ridibundus*. Hun gametogenetische processen (geslachtscelvorming) zijn populatieafhankelijk (Biriuk *et al.*, 2016; Dedukh *et al.*, 2019). In de meeste gevallen worden nieuwe hybriden niet langer gecreëerd door primaire hybridisatie, maar door terugkruisingen met de ouderlijke soort of met andere hybride vormen. Er zijn drie hoofdtypen voortplantingssystemen die hun instandhouding mogelijk maken (Uzzell & Berger, 1975): (1) coëxistentie met *P. lessonae* (het LE-systeem), (2) coëxistentie met *P. ridibundus* (het RE-systeem) en (3) zelfvoorziening met uitsluitend hybride bastaardkikkers (het E-systeem).

In sommige gevallen komen ook individuen met een afwijkend aantal sets van chromosomen voor. In de meeste gevallen bezit een individu 2 kopieën van een chromosoom, d. i. een **diploïd** individu. Bij groene kikkers kan in bepaalde systemen **polyploidie** voorkomen, hierbij bezitten individuen meer dan 2 kopieën per chromosoom. Het voorvoegsel dat ploïdie vooraf gaat, staat voor het aantal sets; een individu met bv. drie sets chromosomen wordt een **triploïd** genoemd. Het aantal chromosomensets

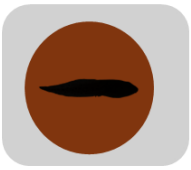
dat een individu bezit heeft op zijn beurt invloed op hoeveel verschillende **allelen** mogelijk te vinden zijn per genetische merker. Een **genetische merker** is een gekend stukje DNA dat gebruikt kan worden om verschillen tussen individuen en/of populaties op te sporen. Het is als het ware een herkenningspunt in een stukje erfelijke materiaal. In het geval van deze studie werd gebruik gemaakt van **microsatellieten**³. Op een specifieke plaats op een chromosoom of **locus** kunnen verschillende varianten optreden; dit zijn de allelen. Voor een diploïd individu zijn op deze manier voor een bepaald locus twee verschillende allelen mogelijk. Wanneer een individu voor een locus twee verschillende allelen bezit, spreken we over een **heterozygoot**. Zijn de beide allelen hetzelfde spreken we over een **homozygoot**. De termen heterozygoot en homozygoot worden enkel gebruikt bij diploïde individuen.

In onderstaande onderdelen worden de verschillende voortplantingssystemen kort toegelicht. Hierop bestaan nog variaties waarvan verwacht wordt dat ze niet in Vlaanderen voorkomen (zie o.a. Dufresnes & Mazepa, 2020). Elk systeem heeft een andere invloed op de genetische variatie van poelkikker en bij uitbreiding van het L-genoom.

2.1.1.2 LE-systeem

Een eerste soort systeem dat kan worden gedefinieerd is het LE-systeem (Figuur 2). Het LE-systeem kenmerkt zich door het naast elkaar voorkomen van poelkikkers (*P. lessonae*) en bastaardkikkers (*P. kl. esculentus*). Tot nog toe wordt aangenomen dat dit natuurlijk systeem dominant is in onze contreien (o.a. Holsbeek & Jooris, 2010), natuurlijk is (Uzzell & Berger, 1975) en bovendien het meest wijdverspreid (o.a. Pruvost *et al.*, 2013a, 2015; Hoffmann *et al.*, 2015; Hermaniuk *et al.*, 2020). Zowel mannelijke als vrouwelijke bastaardkikkers komen erin voor, maar toch vind reproductie in het LE-systeem voornamelijk plaats via de vrouwelijke bastaardkikkers (Christiansen *et al.*, 2005). Dit volgt ook uit het feit dat binnen mannelijke hybriden (LR) het Y-chromosoom, dat net zoals bij de mens voor de geslachtsbepaling zorgt, geïsoleerd zit binnen het L-genoom (Christiansen, 2009). Dit L-genoom wordt bij kruising geëlimineerd waardoor meer vrouwelijke hybride nakomelingen geproduceerd worden (**Figuur 2**). Bastaardkikkers (LR) elimineren het L-genoom tijdens de gametogenese en produceren in LE-systemen enkel klonale R-gameten. Nieuwe hybriden kunnen in dit type systeem daarom enkel worden geproduceerd met behulp van poelkikkers (beoordeeld door o.a. Graf & Polls Pelaz, 1989). De poelkikker gedraagt zich in LE-systemen dus als een afvloeisysteem voor het L-genoom (o. a. Lehtonen *et al.*, 2013). Kruisingen tussen twee **diploïde** bastaardkikkers die resulteren in een genetische meerkikker (RR) zijn niet levensvatbaar en dragen bijgevolg niet bij aan de volgende generatie (o.a. Guex *et al.*, 2002). Door het gebrek aan seksuele recombinatie in de hybride voortplanting van de bastaardkikker stapelen schadelijke mutaties (mutatielading) zich op in het R-genoom, wat leidt tot fatale ontwikkelingsfouten wanneer twee van deze ongezonde R-genomen combineren (o.a. Guex *et al.*, 2002). Door invasie van meerkikkers kan dit echter veranderen (zie verder). De stabiliteit van het LE-systeem wordt onder meer in stand gehouden door de seksuele voorkeur van vrouwelijke poelkikkers en bastaardkikkers dewelke mannelijke poelkikkers lijken te verkiezen boven mannelijke bastaarden (Roesli & Reyer, 2000; Skierska *et al.*, 2023).

³ Een microsatelliet is een stuk repetitief DNA waarin bepaalde DNA-motieven worden herhaald. Het motief kan bestaan uit twee tot tien nucleotiden. Het aantal herhalingen bepaalt over welk allel (variant van een gen) het gaat.

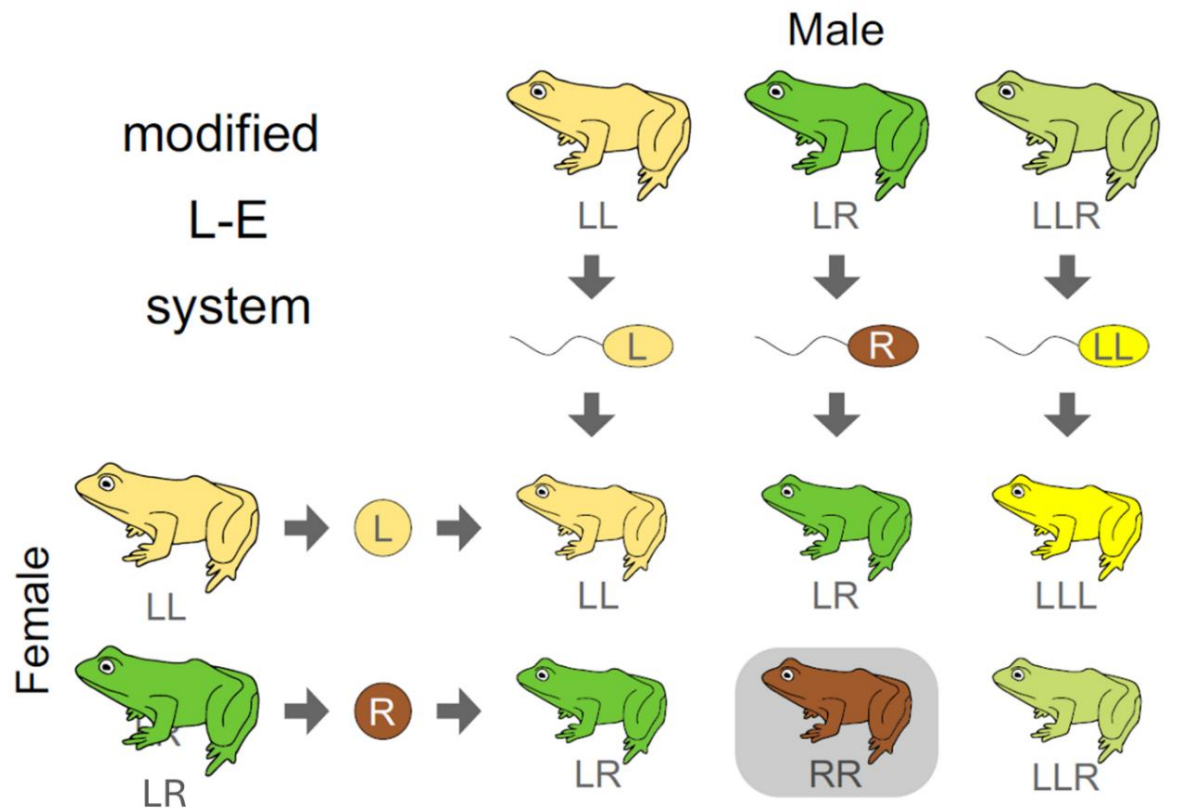
		♀LL 	♀LR 
	Gameten	L	R
♂L _Y L 	L _Y of L	L _Y L of LL 	L _Y R of LR 
♂L _Y R 	R	LR 	RR 

Figuur 2 Schematische voorstelling van de voortplanting in het diploïde LE-systeem. Groen staat voor poelkikker, bruin staat voor meerkikker. Een combinatie van de beide kleuren staat voor de hybride. Wanneer een individu een Y-chromosoom heeft, hebben we te maken met een mannelijk individu. Het grijze kadertje wijst op het niet levensvatbaar zijn. Figuur naar voorbeeld uit Christiansen (2009).

2.1.1.2.1 Aangepast LE-systeem

Het aangepaste LE-systeem lijkt, zoals de naam al doet vermoeden, op het LE-systeem maar met dat verschil dat dit binnen dit systeem ook **polyploidie** optreedt. Het gaat in dit geval over het voorkomen van **triploidie**, dit is een vorm van polyploidie waarbij het individu 3 chromosoomsets bezit. In aangepaste LE-systemen komen LLR mannetjes voor die altijd diploïde, klonale LL-gameten produceren (Pruvost *et al.*, 2013a). In tegenstelling tot het E-systeem (zie verder), is het aangepaste LE-systeem niet afhankelijk van triploïden om te blijven voortbestaan.

In dit type systemen is de genetische differentiatie tussen het L-genoom van de triploïde LLR en de diploïde LL groot. De genetische diversiteit van het L-genoom in LLR is daarbij lager dan dat van de diploïde bastaardkikkers, omdat het LL-aandeel klonaal wordt doorgegeven aan de nakomelingen (**Figuur 3**). Het niveau aan genetische diversiteit van het L-genoom bij LL en LR is daarnaast vergelijkbaar (Pruvost *et al.*, 2013a). De triploïde LLR kikkers fungeren, doordat ze hun R-genoom niet doorgeven tijdens de vorming van gameten, als een soort afvoelsysteem voor het R-genoom. De verspreiding van het R-genoom gebeurt in aangepaste systemen daarom voornamelijk door de LR-kikkers die zorgen voor een R-gameet. Triploïde LLR mannetjes zijn bijgevolg niet noodzakelijk voor het voortbestaan van diploïde LR in dit systeem. Het lijkt er op dat de polyploïde bastaardkikker hier een manier gevonden heeft om te overleven binnen het aangepaste LE-systeem door te parasiteren op het R-genoom van de LR-individueen waarmee ze samenleven (Pruvost *et al.*, 2013a). In het aangepaste LE-systeem kunnen door de kruising van een mannelijke, triploïde bastaardkikker (LLR) met een vrouwelijke diploïde poelkikker (LL) triploïde poelkikkers (LLL) ontstaan (**Figuur 3**). Over de invloed en overleving van deze triploïde poelkikkers binnen dit systeem is echter weinig gekend (zie ook 2.1.1.4 E-systeem). Doorgaans komen ze in lage aantallen voor. We nemen dan ook aan dat hun rol op populatieniveau eerder beperkt is.



Figuur 3 Schematische voorstelling van het aangepast LE-systeem voorgesteld volgens Weigand *et al.* (2022) naar voorbeeld uit Pruvost *et al.* (2013a). Aan de linkerkant worden de aanwezige vrouwtjes en hun gameten voorgesteld, bovenaan de aanwezige mannetjes met hun gameten. Het grijze kadertje wijst op het niet levensvatbaar zijn of het niet bereiken van volwassenheid.

2.1.1.3 RE-systeem

Het RE-systeem, waar meerkikker samen voorkomt met bastaardkikker, komt minder vaak voor (Graf & Polls Pelaz, 1989), en wordt voornamelijk waargenomen in Centraal- en Oost-Europa (o.a. Doležalková-Kaštánková *et al.*, 2018; Falaschi *et al.*, 2020; Fedorova *et al.*, 2025; Hoffmann *et al.*, 2015; Krizmanić & Ivanović, 2010; Lada, 2021). Bastaardkikkers zijn in diploïde RE-systemen allemaal mannelijk (Christiansen, 2009), produceren L-gameten (in mindere mate ook R-gameten) en zijn voor de voorplanting dus afhankelijk van de meerkikkers, dit in tegenstelling tot de situatie in LE-systemen (Figuur 4; Christiansen, 2009; Christiansen *et al.*, 2005; Graf & Polls Pelaz, 1989; Plötner, 2005).

		♀RR 
	Gameten	R
♂R _Y R 	R _Y en R	R _Y R en RR 
♂L _Y R 	L _Y	L _Y R 

Figuur 4 Schematische voorstelling van de voortplanting in het diploïde RE-systeem. Groen staat voor poelkikker, bruin staat voor meerkikker. Een combinatie van de kleuren staat voor de hybride. Wanneer een individu een Y-chromosoom heeft, hebben we te maken met een mannelijk individu. Figuur naar voorbeeld uit Christiansen (2009).

2.1.1.4 E-systeem

Het E-systeem bestaat uitsluitend uit bastaardkikkers. Dit type systeem kan blijven bestaan door het voorkomen van **polyploïdie**. In E-systemen komen **triploïden** en heel uitzonderlijk tetraploïden voor (Arioli, 2007; Arioli *et al.*, 2010; Borkin *et al.*, 2004; Christiansen, 2009; Christiansen & Reyer, 2009; Jakob *et al.*, 2010; Pruvost *et al.*, 2015). In een laboratoriumsetting werd pentaploïdie ook al eens vastgesteld (Fedorova *et al.*, 2025; Hermaniuk *et al.*, 2020).

Door het voorkomen van drie verschillende hybridetypes, **diploïde LR** en **triploïde LLR** en **LRR**, zorgt triploïdie voor stabiliteit binnen het E-systeem. De bastaardkikkers in het E-systeem zijn namelijk in staat om op zichzelf alle gameten te produceren die nodig zijn voor een succesvol voortbestaan van de bastaardkikker, zonder dat één van de twee ‘pure’ oudersoorten nodig is (Christiansen, 2009; Pruvost *et al.*, 2013a). Het systeem kan zich dus succesvol voortplanten, zonder oudersoorten, en is hierdoor als het ware zelfvoorzienend.

Diploïde hybriden (LR) ontstaan door de versmelting van L-gameten die exclusief geproduceerd worden door triploïde LLR en R-gameten geproduceerd door triploïde LRR en diploïde LR (Christiansen, 2009; Pruvost *et al.*, 2013a). Triploïde LLR kunnen op twee manieren ontstaan: (1) door kruising van LR-vrouwtjes die LR-gameten voortbrengen en mannelijke LLR-bastaardkikkers die voor een L-gameet zorgen (verschillend van gameetvorming in aangepast LE-systeem (**Figuur 3**)); (2) in mindere mate door de kruising van een LRR of LR mannetje dat een R-gameet produceert met een LLR vrouwtje die voor een LL gameet zorgt (Christiansen, 2009; Pruvost *et al.*, 2013a) (**Figuur 5**). LRR kan enkel ontstaan bij versmelting van LR-eitjes afkomstig van LR-vrouwtjes met R-gameten van LR- of LRR- mannetjes (Christiansen, 2009; Pruvost *et al.*, 2013a). Door de versmelting van LL-gameten afkomstig van een vrouwelijke LLR en L-gameten van een mannelijke LLR, kunnen in dit systeem ook triploïde poelkikkers (LLL) ontstaan. De vorming van LL-gameten komt echter voor in zeer lage frequenties (Pruvost *et al.*,

2013a) en over de potentiële reproductieve impact van deze triploïde poelkikkers is ook weinig geweten. De overleving en vruchtbaarheid van deze niet-hybride nakomelingen in een E-systeem wordt verder doorgaans als laag beoordeeld (Christiansen *et al.*, 2009; Christiansen, 2009). Een samenvatting van de mogelijke combinaties wordt weergegeven in **Figuur 5**. Polyploïde bastaardkikkers vertonen verschillende patronen qua overerving in vergelijking met hun diploïde hybride tegenhangers. Op deze manier heeft polyploïdie een impact op de genetische variatie en stabiliteit. De gameten van triploïde bastaardkikkers kunnen bijvoorbeeld gerecombineerd zijn (Christiansen & Reyer, 2009). Recombinatie is het proces dat gewoonlijk plaatsvindt wanneer het genetisch materiaal van de beide ouders wordt gemixt. Dit proces leidt tot nakomelingen die een unieke combinatie bevatten van eigenschappen afkomstig van beide ouders.

In E-systemen kan een triploïd individu dus als het ware de poelkikker vervangen als L-donor bij paring met een diploïde hybride (Holsbeek *et al.*, 2008). Omdat het geslacht gekoppeld is aan het L-genoom, worden in dit type systeem minder mannelijke LRR-individuen geproduceerd. De laatste rij weergegeven in **Figuur 5** is dus eerder illustratief, al zijn er uitzonderingen op deze regel (Christiansen *et al.*, 2009). Hoewel terugkruising naar de diploïde oudersoorten theoretisch mogelijk zou zijn, metamorfoserende larven met deze genotypes (LL of RR) niet (Berger, 1988 in Holsbeek & Jooris, 2010). Omdat hybriden soms twee klonaal gekopieerde genomen van dezelfde soort erven, ontbreekt gezonde genetische menging en stapelen fouten zich op (Doležalková-Kaštánková *et al.*, 2018). Daardoor ontwikkelen veel larven zich niet goed en sterven ze meestal voordat ze volwassen worden. Toch wordt verwacht dat in triploïde bastaardkikkers zowel het L- als het R-genoom geregeld opnieuw gecombineerd worden (L in LLR, R in LRR). Hierdoor zouden schadelijke mutaties telkens worden verwijderd en stapelen ze zich niet op (Reyer *et al.*, 2015). Er is alleszins een post-zygotische selectie gaande die ervoor zorgt dat LL-poelkikkers en RR-meerkikkers niet overleven..

		♀LLR	♀LR	♀LRR
	Gameten	L en LL*	R* en LR	R
♂L _Y LR	L _Y en L	L _Y L en LL L _Y LL* en LLL*	L _Y R* en LR* L _Y LR en LLR	L _Y R en LR
♂L _Y R	R	LR en LLR*	RR* en LRR	RR
♂L _Y RR	R	LR en LLR*	RR* en LRR	RR

Figuur 5 Schematische voorstelling van de voortplanting in het E-systeem. Groen staat voor poelkikker, bruin staat voor meerkikker. Een combinatie van de kleuren staat voor de hybride. Wanneer een individu een Y-chromosoom heeft, hebben we te maken met een mannelijk individu. * wijst op schaars voorkomen. Het grijze kadertje wijst op het niet levensvatbaar zijn of het niet bereiken van volwassenheid. Door het zelden tot niet voorkomen van mannelijke LRR-individuen, is de laatste rij eerder illustratief. Figuur naar voorbeeld uit Christiansen (2009).

2.1.2 Doelstellingen: genetische soortenidentificatie en populatiegenetica

Om een antwoord te bieden op de vraag hoe het met de poelkikkers in Vlaanderen is gesteld, is het enerzijds belangrijk om na te gaan waar de soort aanwezig is en anderzijds wat de genetische toestand van deze populaties is. Dit project werd daarom opgedeeld in twee fasen:

Fase 1 (2023) – Soortensamenstelling en soortenidentificatie: Deze fase omvatte het opsporen van poelkikkers in Vlaanderen. Waar komen ze voor en samen met welke andere groene kikkersoorten? Groene kikkers worden verzameld op verschillende plaatsen in Vlaanderen. Omdat er initieel onzekerheid heerste over de accuraatheid van de soorttoewijzing op basis van morfologie in het veld, werd deze toewijzing tijdens **fase 1** getoetst door middel van **soortspecifieke microsatellietmarkers en allelen** voor poel- en meerkikker. Hiervoor werd de genetische identificatiemethode ontwikkeld voor het meetnet poelkikker gebruikt (het meetnet werd nadien op basis van de resultaten methodologisch omgevormd naar het gebruiken van de morfologie). Samengevat: tijdens fase 1 werd de accuraatheid van een morfologische soorttoewijzing in het veld door experts nagegaan.

Fase 2 (2024) – Populatiegenetica: Tijdens deze vervolgfase werd, na evaluatie van de morfologische identificatie, genetisch onderzoek ingezet om genetische variatie en diversiteit van poelkikker te onderzoeken. Hiervoor werd een andere set microsatellieten samengesteld, bruikbaar voor populatiegenetisch onderzoek van poelkikker. De genetische structuur en variatie binnen en tussen populaties werd onderzocht.

2.1.3 Werkwijze

2.1.3.1 Staalname

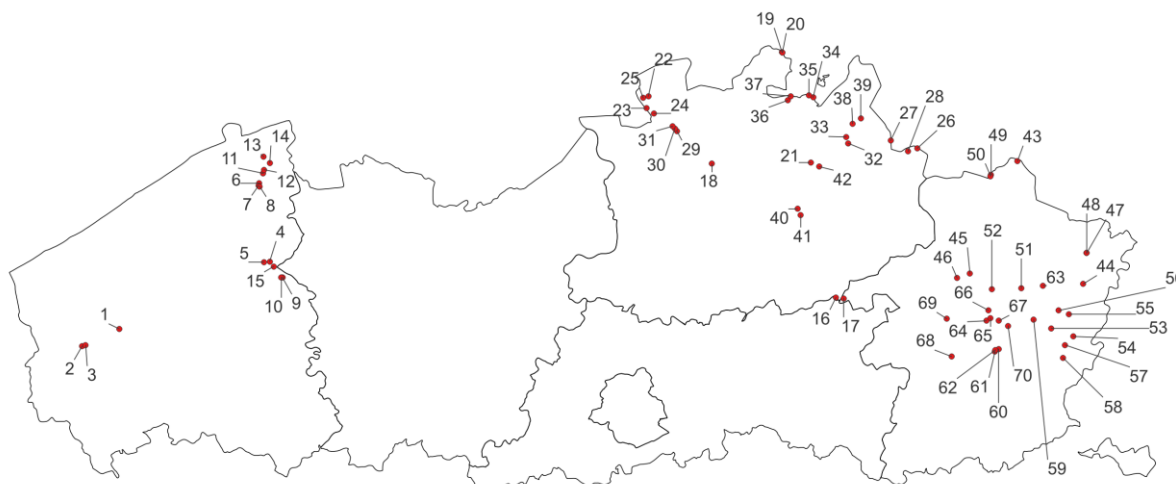
2.1.3.1.1 Fase 1 (2023) – Soortensamenstelling en soortenidentificatie

Tussen 2023 en 2024 werden na deskundig oordeel verschillende Vlaamse locaties geselecteerd die interessant werden geacht voor verder onderzoek (**Tabel 1, Figuur 6**). De staalname uit 2023 en de resultaten die hieruit volgden behoren tot **fase 1**. Waar mogelijk werden 30 stalen willekeurig verzameld per site, uitgezonderd in de Maten waar meer individuen werden bemonsterd. Per individu werd een teenclip genomen en bewaard in absolute ethanol op -20°C.

Tabel 1 Overzicht van de onderzochte locaties en hoeveelheid stalen per locatie waarvan morfologische soorttoewijzing werd gecontroleerd door middel van de genetische soorttoewijzing (fase 1). NP staat voor Nationaal Park.

Provincie	Nr op	Site	Subsite	Aantal stalen
West-Vlaanderen	1	IJzervallei	De Blankaart meetnet	30
West-Vlaanderen	2	Bulskampveld	Aanwispoutten	28
West-Vlaanderen	3	Bulskampveld	Bornebeek	21
West-Vlaanderen	4	Damme-West	Damme W - noord	27
West-Vlaanderen	5	Damme-West	Damme W - zuid	23
West-Vlaanderen	6	Vloethemveld	Vloethemveld	30
Antwerpen	7	Blakheide	Blakheide meetnet	23
Antwerpen	8	Blakheide	Blakheide s.s.	27
Antwerpen	9	Buitengoor	Buitengoor meerkikker	6
Antwerpen	10	Eksterheide	Eksterheide s.s.	7
Antwerpen	11	Eksterheide	bij Duivelskuil 2b	23

Provincie	Nr op kaart	Site	Cod e	Subsite	N _E	N _L	N _{tot}
Limburg	68	Tommelen	TO	Tommelen**	6	19	25
Limburg	69	Vijvergebied Midden-Limburg	VIJ	Terlamen poel 2	4	19	23
Limburg	70	Winterslag	WIN	Winterslag ^a		1	1



Figuur 7 Overzicht van de verzamelde swabs voor genotypering en populatiegenetisch onderzoek en enkele stalen ter soortenidentificatie (fase 2) van groene kikker in Vlaanderen. Voor een overzicht van de plaatsnamen horende bij de nummers, zie **Tabel 2**.

Locaties die in beide fases werden bestudeerd zijn: De Blankaart-meetnet, Aanwijspuiten en Bornebeek van Bulskampveld, West-Zuid en West-Noord in Damme, Wortel 1 en Wortel 2 van site Merkske & Wortel, Tommelen, Nationaal Park (NP) Hoge Kempen Zuid, Grote en Kleine Dilikensweier in de Maten. Voor een deel van deze locaties gebeurde de populatiegenetische analyse in fase 2 op basis van stalen die al in fase 1 waren verzameld (**Tabel 2**).

2.1.3.2 DNA-extractie en microsatellietgenotypering

Het DNA wordt uit de teenclips geëxtraheerd door gebruik te maken van de Blood & Tissue kit (Qiagen); DNA wordt uit de wissers geëxtraheerd met behulp van de QIAamp extractie kit (Qiagen). De concentratie van het DNA-extract werd vervolgens bepaald door middel van de Quant iT™ Picogreen dsDNA assay kit (Life technologies) op een Synergy plate reader (BioTek). Voor de genotypering van de stalen werd gebruik gemaakt van microsatellieten. Gedurende dit project werden twee verschillende merkersets benut.

Fase 1 – De eerste merkerset werd samengesteld om op basis van genetische kenmerken de soort (poelkikker versus meerkikker *sensu lato*) te identificeren. Het is belangrijk om te vermelden dat in dit rapport wordt uitgegaan van de meerkikker *sensu lato*. Door de gebruikte methodiek kunnen de verschillende (onder)soorten binnen dit complex niet van elkaar worden onderscheiden. Het is dezelfde set die eerder werd gebruikt voor het meetnet (Speybroeck *et al.*, 2020) en wordt in

Fase 2 – De tweede fase bestaat uit de populatiegenetica van populaties met een substantiële proportie aan aanwezige poelkikkers. Hiervoor wordt een selectie gemaakt van verschillende loci die geschikt bleken te zijn voor populatiegenetisch onderzoek van poelkikker en tevens weergeven of we met hybriden te maken hebben. De 16 microsatellieten werden gelopen in 3 multiplexreacties (**Tabel S2** in Bijlagen). Voor de microsatellietanalyse bestaat het PCR-recept uit 3,6 µl DEPC water, 5 µl Multiplex Mastermix van Qiagen, 0,1 µl (0,1 µM) van beide primers en 1 µl template DNA (10 ng/µl) en de PCR-condities zijn 15 minuten aan 95 °C; 35 cycli 30 seconden op 95 °C, 30 seconden op 54 °C, 30 seconden 72 °C; 10 minuten 72 °C; 15 minuten 4 °C en afsluitend continu op 15 °C. De PCR-producten worden finaal gelopen op de ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) met de LIZ-600 standaard. Het identificeren van de allelen gebeurde in Geneious Prime 2019.3.2 (<https://www.geneious.com>) en Genemapper 6 (Applied Biosystems).

Christiansen *et al.*, 2005). De verhouding kan variëren naargelang de combinatie van allelen binnen en tussen loci. Allelendosering wordt bij een selectie van 9 merkers (**Tabel S2** in Bijlagen) onderzocht. De keuze voor deze 9 merkers werd gebaseerd op voorgaand geciteerde literatuur (o.a. Christiansen, 2005; Christiansen *et al.*, 2005).

Finaal gebeurde de toewijzing van triploidie per individu door gedetecteerde triploidie over de 16 loci samen te brengen. Een individu werd onder meer als triploïd beschouwd wanneer 25% van de loci (≥ 4 van de 16) een signaal van triploidie vertoonde (d.i. drie gescoorde allelen binnen een locus of toegewezen triploidie via allelendosering). Dit was in alle gevallen een combinatie van signalen. Wanneer minder dan 4 loci een indicatie gaven voor polyploidie, werd een bijkomende afweging gemaakt. Scoringen met drie verschillende allelen (echte triploïde scoringen) kregen meer gewicht dan aanwijzingen op basis van dosering. Zo werd een individu met bijvoorbeeld slechts 3 positieve loci, waarvan 2 via triploïde scoringen, alsnog als triploïd toegewezen. Een individu werd nooit als polyploïd aangeduid wanneer slechts één locus triploidie vertoonde.

Het is belangrijk om te achterhalen welke bastaardkikkers triploidie vertonen, aangezien we geïnteresseerd zijn in de diversiteit van het poelkikker-genoom. Omdat de kruising en de overerving voor diploïde en triploïde bastaardkikkers anders gebeurt en afhankelijk is van het type systeem waarin ze voorkomen, heeft de ploïdie tegelijk een invloed op de poelkikkers.

Triploidie werd voor de stalen van **fase 1** enkel op basis van triploïde scoringen toegekend. Wegens het beperkt aantal merkers in deze fase werd hier geen grenswaarde van een minimaal aantal merkers met een positief signaal gehanteerd.

2.1.3.4 Populatiegenetica: studie van het L-genoom

Populatiegenetisch onderzoek wordt enkel uitgevoerd in **Fase 2** van dit onderzoek. Dit project focust zich op het bepalen van de genetische gezondheid van de poelkikkers in Vlaanderen. Daarom wordt er voor de populatiegenetische studie geopteerd om enkel het poelkikkeraandeel verder te onderzoeken, en dus het L-genoom. We onderscheiden verschillende genomotypes (d.i. de specifieke combinatie van ouderlijke genomen binnen een hybride organisme of complex) met verschillende ploïdieën die we binnen deze studie kunnen verwachten:

- 3 L-allelen voor triploïde poelkikkers (LLL).
- 2 L-allelen voor diploïde poelkikkers (LL) en triploïde bastaardkikkers (LLR).
- 1 L-allel voor diploïde bastaardkikkers (LR) en triploïde bastaardkikkers (LRR), deze individuen zijn haploïd voor het L-genoom.

Het L-genoom kon worden onderzocht voor alle 16 loci.

2.1.3.4.1 Genetische structuur van het L-genoom

De genetische structuur van de **diploïde poelkikkers (LL)** werd getest door de **paarsgewijze fixatie index** (F_{ST} ; (Weir & Cockerham, 1984)) te berekenen met behulp van het R-pakket *diveRsity* v1.9.90 (Keenan *et al.*, 2013) gebaseerd op 1000 bootstraps. Dit is een statistische methode waarbij herhaaldelijk steekproeven worden genomen uit een bestaande dataset, om zo de betrouwbaarheid van een statistische schatting te evalueren. Enkel voor subsites met minimaal vijf stalen werden F_{ST} -waarden berekend. De F_{ST} geeft de genetische afstand (differentiatie) weer tussen (sub)sites. Om de graad van differentiatie aan te duiden werd (Wright, 1978) gevolgd: $0 \leq F_{ST} < 0,05$ weinig differentiatie, $0,05 \leq F_{ST} < 0,15$ matige differentiatie, $0,15 \leq F_{ST} < 0,25$ hoge differentiatie; en $0,25 \leq F_{ST}$ zeer hoge differentiatie. Op basis van de paarsgewijze F_{ST} -waarden van poelkikkers (en diploïde bastaardkikkers)

tussen subsites met minstens 5 stalen, gelegen in eenzelfde site, zal worden beslist of deze subsites al dan niet beschouwd mogen worden als één geheel of populatie voor verdere analyse.

Vervolgens werd de genetische structuur van **diploïde poelkikkers (LL)** ook nagegaan via **PCA (Principale Componenten Analyse)**. Dit is een ordinatiemethode waarmee de genetische informatie vereenvoudigd wordt, terwijl de belangrijkste structuren behouden worden. Het resultaat van een PCA analyse visualiseert in dit geval genetische structuren of clusters zonder voorafgaande aannames over groepen. Individuen die dicht bij elkaar liggen op de grafiek, lijken genetisch sterker op elkaar. Daarnaast werd ook een **DAPC (Discriminantanalyse van Principale Componenten)** uitgevoerd. Clusteringsanalyses zoals de DAPC-analyse worden uitgevoerd om verschillen tussen groepen te kwantificeren en visualiseren. Hierbij worden de individuen in de dataset toegewezen aan een aantal gekozen groepen om vervolgens te kunnen nagaan hoe deze groepen (clusters) zich tegenover elkaar verhouden. Het aantal groepen of clusters (K) werd bepaald door gebruik te maken van de *k*-means-methode⁵, met K gaande van 1 cluster tot X clusters (X is het uiteindelijke aantal sites na samenvoegen van subsites o.b.v. F_{ST} -analyse), en het Bayesiaans informatiecriterium (BIC) om uiteindelijk de K-waarde te selecteren. BIC is een maat om modellen te vergelijken, waarbij een lagere BIC wijst op een beter model. De verschillende modellen die worden getest komen in dit geval overeen met het “K” aantal clusters waaraan de individuen in de dataset kunnen worden toegewezen (bv. model 1 waar K = 2, model 2 waar K = 3, ...). In model 1 worden alle individuen aan één van de twee groepen toegewezen, in model 2 aan één van de drie groepen enzovoort). Hiervoor werden X - 1 (maximaal aantal clusters min één) principale componenten geselecteerd. Elke K werd X keer herhaald. PCA- en DAPC-analyse werden uitgevoerd met behulp van R-pakket *adeigenet* v2.1.5 (Jombart, 2008) op alle diploïde poelkikkers. Door het definiëren van clusters kunnen we bepalen welke (deel)populaties genetisch van elkaar verschillen of op elkaar gelijken. Sites die aan eenzelfde genetische cluster worden toegewezen, lijken dus meer op elkaar dan deze in verschillende clusters. In tegenstelling tot PCA, die de totale variantie samenvat, laat DAPC zien hoe de verschillende groepen zich tegenover elkaar verhouden.

Tenslotte werden ook F_{ST} -waarden binnen en tussen **alle genotypes (LL, LR, LLR en LLL)** per (sub)site met minimaal vijf stalen berekend met behulp van het programma SPAGeDi 1.5d (Hardy & Vekemans, 2002).

2.1.3.4.2 Genetische diversiteit van het L-genoom

Indien minstens vijf stalen ($N \geq 5$) beschikbaar, werd de genetische diversiteit van het poelkikkerspecifieke genoom van alle genotypes onderzocht door **verwachte heterozygositeit** (gendifersiteit; H_e) te berekenen met het programma SPAGeDi 1.5d (Hardy & Vekemans, 2002). De **allelenrijkdom** (AR) en **waargenomen heterozygositeit** (H_o), alsook berekend met SPAGeDi 1.5d, werd enkel voor het L-genoom van diploïde poelkikkers bepaald. Met gepaste statistische toetsen (parametrisch of niet-parametrisch) werden verschillen in genetische diversiteit onderzocht tussen (1) provincies en op globaal niveau, en tussen (2) LL- en LR-individuen. Daarnaast werd een lineaire regressieanalyse uitgevoerd om (1) de relatie te toetsen tussen de genetische diversiteit van LL en LR en het percentage vastgestelde triploïden, en (2) het verband te onderzoeken tussen het aantal bastaardkikkers en de genetische diversiteit. De statistische tests werden uitgevoerd in R v. 4.5.1 (R Core Team, 2021). Tenslotte werden voor de diploïde poelkikkers, met behulp van het R-pakket *adeigenet* v2.1.5 (Jombart, 2008), de **private allelen** over alle onderzochte loci bepaald.

⁵ Het k-means algoritme groepeerd automatisch gegevenspunten in clusters door ze toe te wijzen aan het dichtstbijzijnde clustercentrum, met als doel de totale afstand tussen de punten en hun centra zo klein mogelijk te maken.

2.1.3.5 Populatiegenetica: studie van het R-genoom

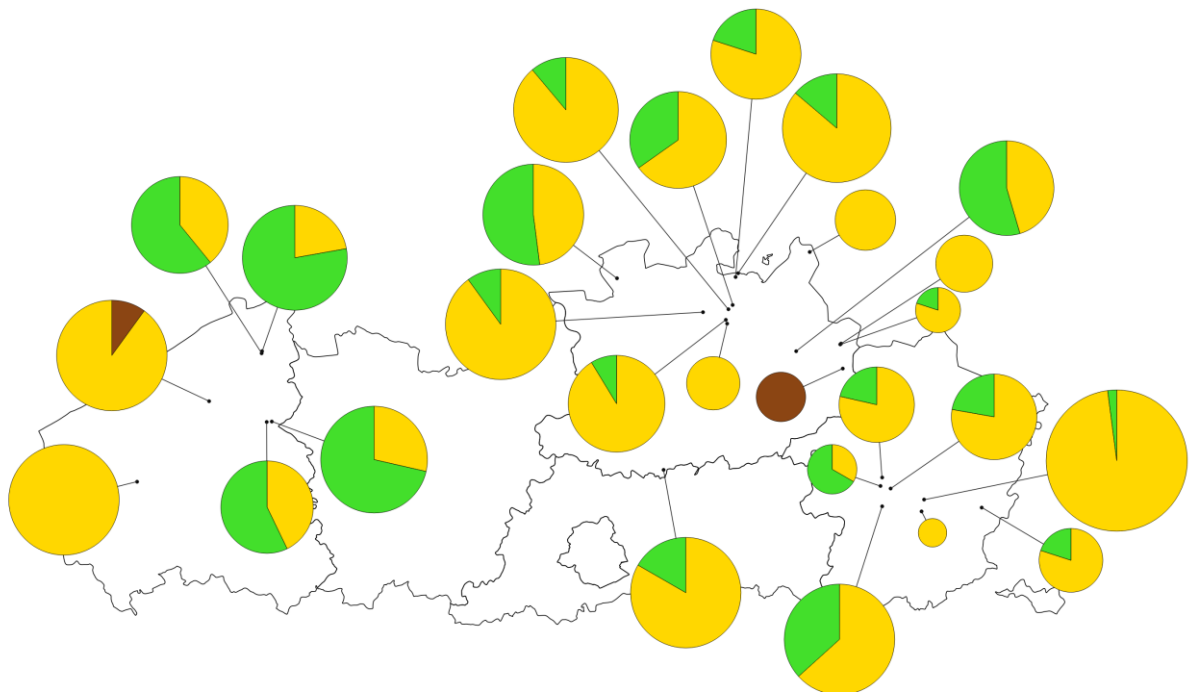
Naast de analyse van het L-genoom werd ook het R-genoom van bastaardkikkers (LLR of LR) verder onderzocht. Zo kon worden nagegaan of de diversiteit van het ene genoom samenhangt met de variatie binnen eenzelfde locatie tussen de verschillende aanwezige vormen. Omdat het project zich vooral richtte op de diversiteit en structuur van poelkikkers, werd bij het ontwikkelen van de genetische merkerset voor populatiegenetica voornamelijk gekozen voor poelkikkerspecifieke merkers. Daardoor waren er minder R-specifieke allelen beschikbaar om het R-genoom in detail te bestuderen. Van de 16 loci gebruikt tijdens fase 2, bezitten 7 loci R-specifieke allelen. Twee van deze loci bleken in deze studie monomorf voor het R-genoom. Op deze manier kon de diversiteit van het R-genoom geanalyseerd worden op basis van 5 loci (Ga1a19, Rrid013A, Rlca1b5, Rlca1b6 en Re1CAGA10). Om toch een eventuele vergelijking mogelijk te maken tussen de diversiteit van het L-genoom en het R-genoom, werd de diversiteit van het L-genoom voor dezelfde 5 loci herhaald.

Het R-genoom werd met het programma SPAGeDi 1.5d (Hardy & Vekemans, 2002) onderzocht. Enkel (paarsgewijze) F_{ST} , de verwachte heterozygositeit (H_e) en de vergelijking met de diversiteit binnen het L-genoom voor dezelfde loci werden besproken.

2.1.4 Resultaten genetisch onderzoek

2.1.4.1 Genetische identificatie van de soort en eventuele hervangsten

Fase 1 - De soortidentificatie door middel van de morfologie resulteerde in een hoog percentage juiste toekenningen. Slechts 9 individuen van 538 (1,7%) waarbij soorttoewijzing op basis van zowel morfologie als de genetische merkers mogelijk was gaven een verschil tussen morfologische en genetische identificatie. In totaal werden 141 poelkikkers, 388 bastaardkikkers en 9 meerkikkers geïdentificeerd (**Figuur 8**).



Figuur 8 Overzicht van de gevonden soorten, na genetische soorttoewijzing, uit fase 1. De grootte van de taartdiagrammen toont het totale aantal stalen per subsite weer (N = 2 tot 49). Groen = poelkikker, geel = bastaardkikker en bruin = meerkikker.

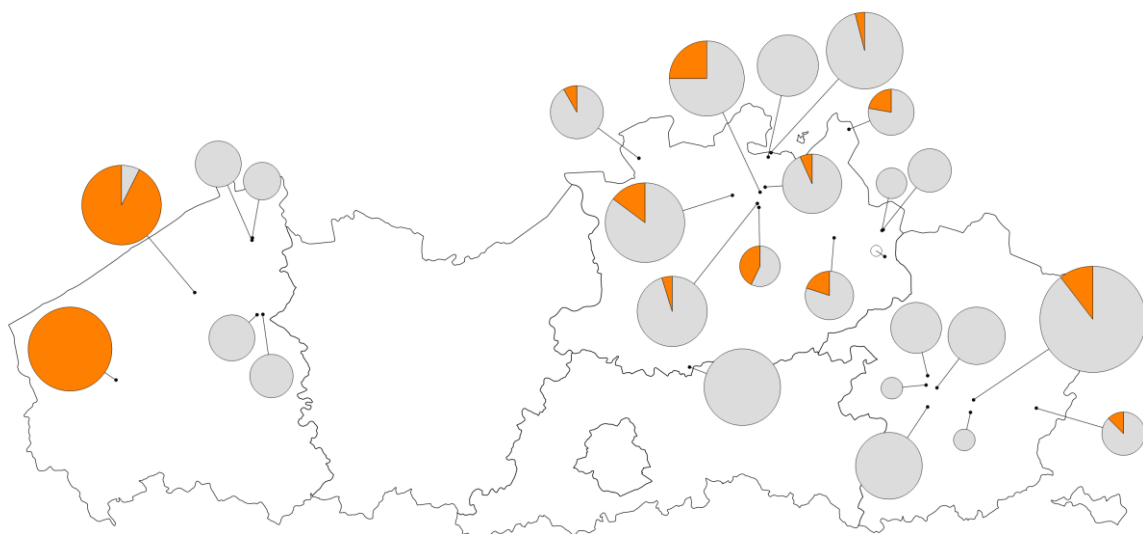
Fase 2 - Elf poelkikkers werden in het veld als bastaardkikkers geïdentificeerd. Twee individuen werden respectievelijk als meerkikker en poelkikker aangeduid, terwijl beide uiteindelijk bastaardkikkers bleken te zijn. Slechts één individu kreeg 'species onzeker' toegekend in het veld, dit exemplaar bleek uiteindelijk een bastaardkikker te zijn. Voor de 929 genetische stalen (waarvan 81 verzameld in 2023 en 848 verzameld in 2024, werd op basis van morfologie amper 1,5% van de geanalyseerde kikkers als een andere soort geïdentificeerd in het veld.

Voor locus Res16 bleek allel 121 dewelke aanzien werd als een poelkikkerspecifiek allel, ook te amplificeren in meerkikker. Allel 121 werd enkel meegenomen in de analyse van het L-genoom.

Vijf dubbele genotypes werden geïdentificeerd en uit de dataset verwijderd voor verdere analyse. Deze individuen waren geen hervangsten.

2.1.4.2 Onderzoek naar polyploidie

Fase 1 – Polyploidie werd in fase 1 enkel vastgesteld door middel van gescoorde triploidie (dit is het vertonen van meer dan twee verschillende allelen per locus in een individu). Op basis van de scoringen werden 82 triploïde bastaardkikkers (LLR) geïdentificeerd in 13 subsites (Blakheide meetnet, Blakheide s.s., De Blankaart meetnet, Eksterheide s.s., bij Duivelskuil 2b, Zijpbeek Gaarvijver, Pluisven, Bonte Klepper, Grote & Kleine Dilikensweier, Poppel meetnet, Retiesebaan meetnet, Vloethemveld en Wortel2) (**Figuur 9**). Zoals eerder aangehaald, werd er in fase 1 niet verder ingegaan op eventuele polyploidie op basis van allelendosering. De kans bestaat dat hierdoor polyploïden onder de radar bleven na analyse van fase 1. Het percentage triploïde bastaardkikkers van het totaal aantal bemonsterde bastaardkikkers varieerde van 0 tot 100% (gemiddelde = 14 %; mediaan = 0%)(**Figuur 9**, **Tabel S3**).

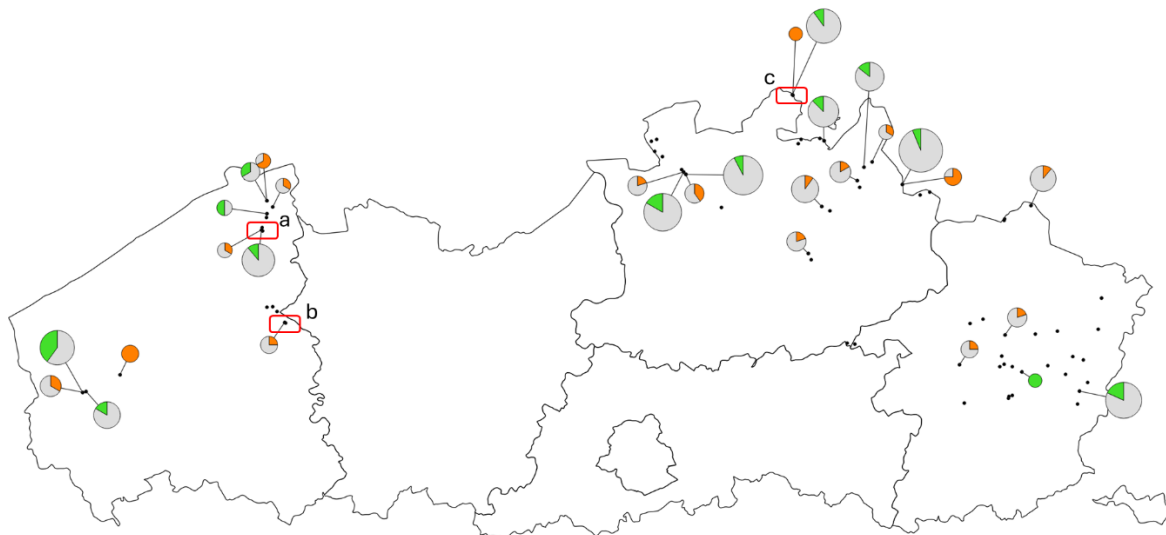


Figuur 9 Overzicht van het voorkomen van triploïde bastaardkikkers in de onderzochte subsites van fase 1. Oranje = percentage triploïde bastaardkikker LLR van het totale aantal bastaardkikkers op die locatie. De grootte van de taartdiagrammen toont het totale aantal bastaardkikker stalen per subsite weer (N = 2 tot 49). In één subsite (Buitengoor in Antwerpen) werden geen bastaardkikkers bemonsterd op een totaal van 6 stalen; hier is de taartdiagram blanco.

Fase 2 – 26 bastaardkikkers en 18 poelkikkers worden uiteindelijk als triploïd geïdentificeerd, met de respectievelijke LLR- en LLL-genomotypes (**Figuur 10**). In 24 poelen/subsites, verspreid over alle geanalyseerde provincies worden triploïden gedetecteerd op basis van zowel gescoorde triploidie en allelendosering. Het percentage triploïden op het totaal aantal bestudeerde stalen per subsite (N)

varieerde van 0 tot 100% voor West-Vlaanderen (gemiddelde = 19%; mediaan = 6%; N = 2 tot 25), van 0 tot 20% in Antwerpen (gemiddelde = 5%; mediaan = 0%; N = 1 tot 29) en van 0 tot 18% in Limburg (gemiddelde = 5%; mediaan = 0%; N = 1 tot 40).

Fase 1 én fase 2 – In 2023 werd polyploidie vastgesteld in Pluisven, een subsite die onder de overkoepelende Kalmthoutse heide site werd onderverdeeld. De analyse van stalen uit 2024, die geen stalen afkomstig uit Pluisven bevatten, vertoonden geen polyploidie. Tommelen werd in zowel 2023 als 2024 bemonsterd, maar vertoonde voor beide jaren geen polyploidie. Twee stalen uit Damme die in 2023 niet als triploïd werden aangeduid en in 2024 werden hergebruikt, bleken na de analyse in 2024 wél triploïd te zijn (1 x LLR en 1 x LLL).



Figuur 10 Overzicht van het voorkomen van triploïden in de onderzochte locaties. Punten geven locaties weer waar stalen werden geanalyseerd voor populatiegenetisch onderzoek. Groen= percentage triploïde poelkikker van het totaal aantal poelkikkers in die locatie, oranje = percentage triploïde bastaardkikker van het totale aantal bastaardkikkers op die locatie. De grootte van de taartdiagrammen duidt de totale hoeveelheid van de soort aan die voor de locaties die genetisch werden geanalyseerd (N per type = 1 tot 16; zie ook N_E of N_L in **Tabel 3**). Het gebied aangeduid met a duidt op locatie Damme W Zuid waar triploidie bij beide soorten werd teruggevonden; b bestaat uit de 2 subsites Gulke Putten Oost en Gulke Putten West. Enkel in Gulke putten West werden triploïden waargenomen; het gebied aangeduid met c bestaat uit de 2 subsites Elsakker 1 en Elsakker 2, hierin werden respectievelijk 1 triploïde poelkikker en 2 triploïde bastaardkikkers teruggevonden.

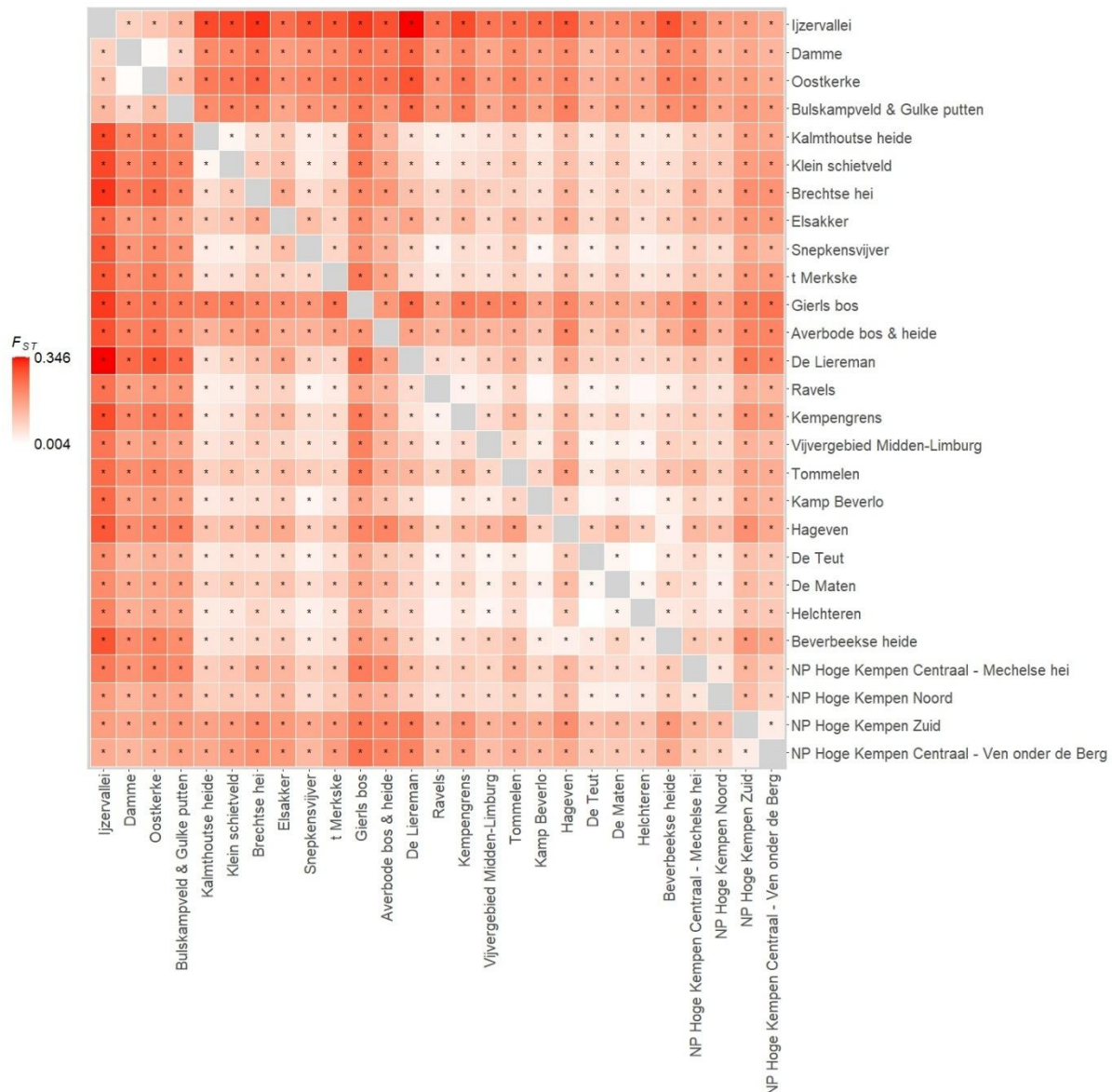
2.1.4.3 Populatiegenetica: studie van het L-genoom

Fase 2 – Het populatiegenetisch onderzoek naar de genetische samenstelling en toestand van groene kikkers op geselecteerde locaties, samen met het onderzoek naar het L-genoom in Vlaanderen, werd uiteindelijk gebaseerd op 913 individuele genotypes waarvan 673 LL, 197 LR, 26 LLR en 17 LLL. Zoals eerder aangegeven werden de individuen ter soortenidentificatie niet meegenomen voor de populatiegenetische analyse.

2.1.4.3.1 Genetische structuur van het L-genoom

Wanneer de **diploïde poelkikkers (LL)** met elkaar vergeleken werden binnen eenzelfde site ($N \geq 5$) werden er **significante F_{ST} -waarden** (als maat voor **genetische differentiatie**) teruggevonden tussen subsites van Nationaal Park (NP) Hoge Kempen Centraal (matige differentiatie), Putse Moer en Biezenkuilen van De Kalmthoutse Heide (weinig differentiatie), en Damse Vaart Noord en Sabtsweg

van Oostkerke (matige differentiatie). Tussen de overige combinaties van subsites binnen sites werden geen significante F_{ST} -waarden teruggevonden.



Figuur 11 Paarsgewijze F_{ST} -resultaten tussen diploïde poelkikkers over de verschillende locaties. Sites na samennemen van subsites (excl. NP Hoge Kempen Centraal). De kleuren duiden de mate van differentiatie aan, hoe donkerder hoe groter de differentiatie; * duidt aan dat het paarsgewijze resultaat significant verschillend is van nul. De sites werden gerangschikt van west (boven en rechts) naar oost (onder en links).

Zoals in de werkwijze aangegeven, werd na de berekening van paarsgewijze F_{ST} tussen **LL-poelkikkers** beslist welke subsites al dan niet samengenomen konden worden. Voor subsites waar geen LL-poelkikkers werden bemonsterd (of te weinig $N < 5$), werd waar mogelijk paarsgewijze F_{ST} geëvalueerd voor LR-LR of LL-LR. Met uitzondering van NP Hoge Kempen Centraal (subsites Mechelse Hei en Ven onder de Berg) werden alle subsites samengevoegd onder de overkoepelende sitenaam van de staalnamelocatie. De hoogste paarsgewijze F_{ST} na het samenvoegen van sites werd teruggevonden voor de IJzervallei – De Liereman (0,346; 95% BI = 0,381 – 0,379). Algemeen was het genetisch verschil

tussen West-Vlaamse populaties en de overige onderzochte populaties matig ($F_{ST} = 0,130$; tussen Damme en De Teut) tot zeer hoog ($F_{ST} = 0,346$; tussen IJzervallei en De Liereman).

Voor Kalmthoutse Heide en Oostkerke werd geen verdere onderverdeling gemaakt. Hoewel de F_{ST} -waarden tussen de subsites aan de randen van het gebied iets hoger waren, wordt verwacht dat deze kikkers genetisch slechts in beperkte mate van elkaar verschillen. De overige paren van subsites vertoonden daarnaast lage F_{ST} -waarden. Dit subtiele verschil werd daarom als te gering beschouwd om de subsites verder apart te behandelen.

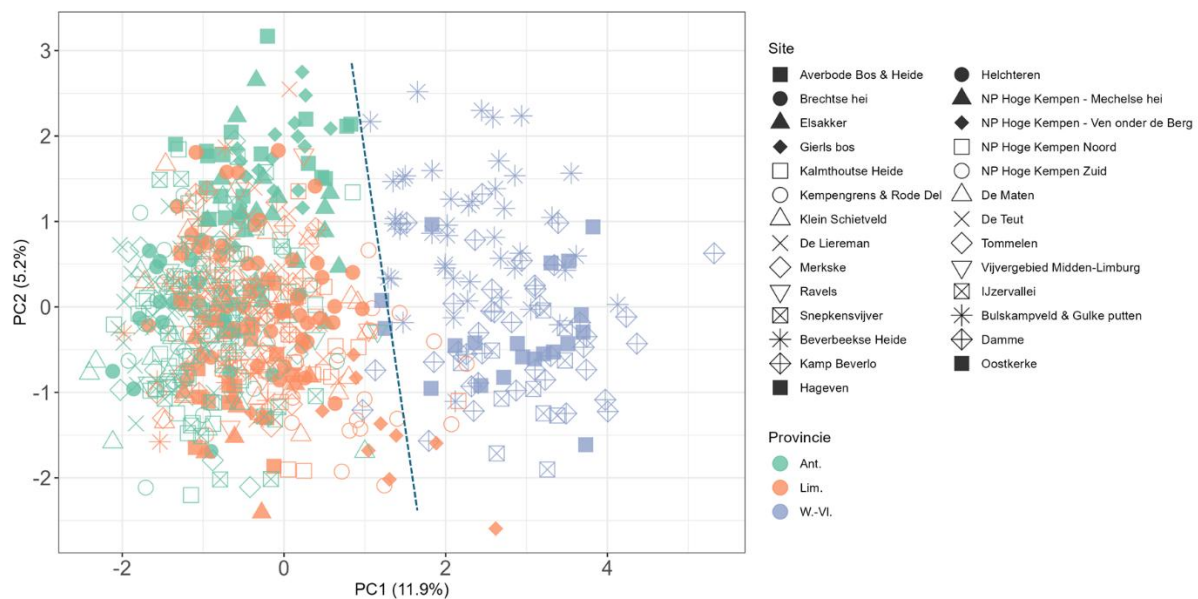
Tenslotte werden de stalen van de dicht bij elkaar gelegen sites van het Bulskampveld, Vagevuurbossen en Gulke putten samengenomen (F_{ST} was ook hier niet significant verschillend van nul). Dit gebeurde ook voor de stalen van Damme en Damme-Oost. Het samenvoegen van subsites leidde uiteindelijk tot **27 overkoepelende sites** die, in wat volgt, verder populatiegenetisch geanalyseerd werden. Damme en Oostkerke werden apart gehouden door de net significante, matige differentiatie tussen LL uit Damme-Oost en Oostkerke Damse vaart ($F_{ST} = 0,05$; 95% BI = 0,0007 – 0,1206).

Wanneer de paarsgewijze **F_{ST} -resultaten** tussen **alle genomotypes** werden beschouwd voor de 27 gedefinieerde sites, vertoonden de vergelijkingen tussen het L-genoom van LL-LR binnen eenzelfde site lage differentiaties. De hoogste differentiatie die werd teruggevonden bedroeg daarbij 0,03. In de IJzervallei kon LL niet worden vergeleken met LR, maar was de vergelijking tussen triploïden en diploïde poelkikker wel mogelijk. De paarsgewijze resultaten waren: LL-LLL = 0,11; LL-LLR = 0,34 en LLL-LLR = 0,11. De triploïden blijken in de IJzervallei matige differentiatie te vertonen tegenover elkaar en in vergelijking met de diploïde oudersoort.

Verder vertoonden nabij gelegen sites voor zowel LL (**Figuur 11**) als LR (**Figuur S1** in Bijlagen) lage differentiatie. Er zijn enkele Kempische populaties die algemeen een relatief hoge differentiatie t.o.v. andere populaties vertonen, zoals Gierls bos, Averbode Bos & Heide, Hageven (behalve t.o.v. Beverbeekse Heide), NP Hoge Kempen Zuid en in mindere mate NP Hoge Kempen Centraal – Ven onder de Berg (behalve t.o.v. elkaar).

Tenslotte resulteerde de analyse van het L-genoom over alle types in een globale F_{ST} -waarde van 0,157 over alle loci, duidend op een matige tot grote differentiatie (Weir & Cockerham, 1984).

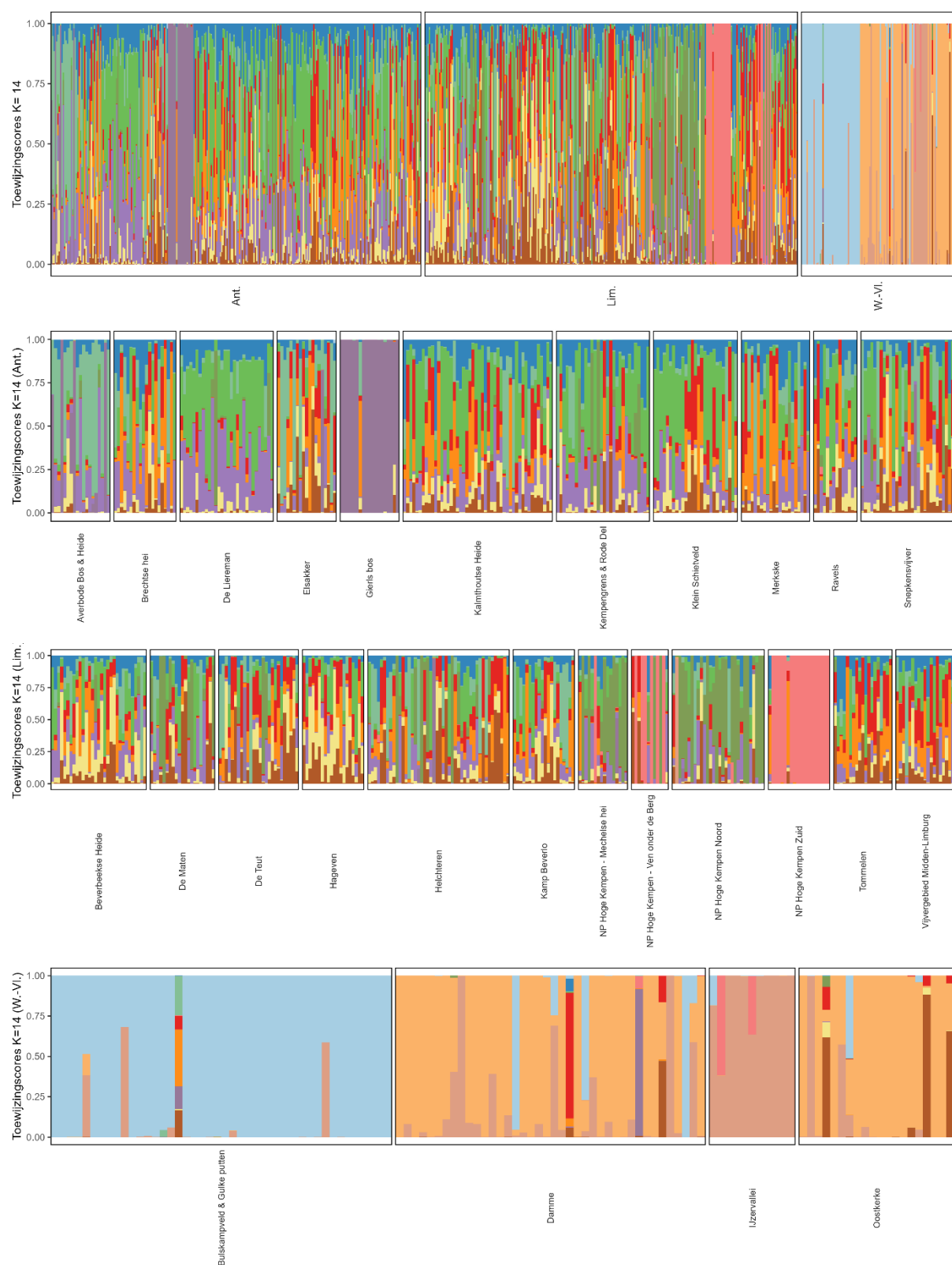
Analoog aan de differentiatiewaarden laat de **PCA-ordinatie** van de **LL-poelkikkers** zien dat de West-Vlaamse kikkers duidelijk verschillen van de andere stalen (**Figuur 12**). De kikkers uit Limburg en Antwerpen lijken, ten opzichte van de West-Vlaamse meer op elkaar, maar sommige populaties (bijvoorbeeld NP Hoge Kempen Zuid en Averbode bos) wijken wat af. De eerste twee assen van de PCA verklaren slechts een deel (resp. 11,9% en 5,2%) van de totale verschillen, maar geven toch een goed overzicht van de belangrijkste patronen.



Figuur 12 Visualisatie van de PCA-analyse van de LL-poelkickers. Elk symbooltje duidt een individu aan. Stippellijn geeft schijnbare scheiding van de stalen weer; aan de linkerkant Limburg (oranje) en Antwerpen (groen), aan de rechterkant West-Vlaanderen (blauw).

Hoewel de laagste gemiddelde BIC-waarde bij de **DAPC-analyse** van de **LL-poelkickers** teruggevonden werd bij $K = 20$ clusters, is er nauwelijks verschil met de BIC-waarden voor $K = 16$ tot 19 en worden de verschillen klein vanaf $K = 14$ (**Figuur S2** in Bijlagen). Daarom werd een reeks van verschillende K 's getest ($K = 1$ tot 20). Voor $K = 14$ werd 40,9 % en 11,7 % van de variatie respectievelijk verklaard door de eerste twee PC-assen. Deze ordinatie zorgde opnieuw voor een verdere bevestiging van een opsplitsing tussen de West-Vlaamse en de overige stalen (**Figuur 13**; bovenaan). Deze opsplitsing is zichtbaar bij alle geanalyseerde K 's. Opmerkelijk is ook dat bij $K = 14$, schijnbaar drie West-Vlaamse clusters gevormd werden: (1) stalen afkomstig uit de IJzervallei, (2) Bulskampveld & Gulke Putten en (3) Damme + Oostkerke (**Figuur 13**); dit is niet het geval is voor bepaalde andere K -waarden, zoals $K < 14$.

Verder vormen Gierls Bos en in mindere mate Averbode Bos aparte genetische clusters. Dit geldt ook voor de populatie in NP Hoge Kempen Zuid samen met een deel van het nabijgelegen NP Hoge Kempen – Ven onder de Berg. Voor de overige populaties in Antwerpen en Limburg worden de meeste individuen toegewezen aan meerdere verschillende clusters. Er is wel een schijnbaar onderscheid te maken voor de groep De Maten – NP Hoge Kempen - Mechelse Hei – NP Hoge Kempen Noord en groep Hageven – Beverbeekse Heide.



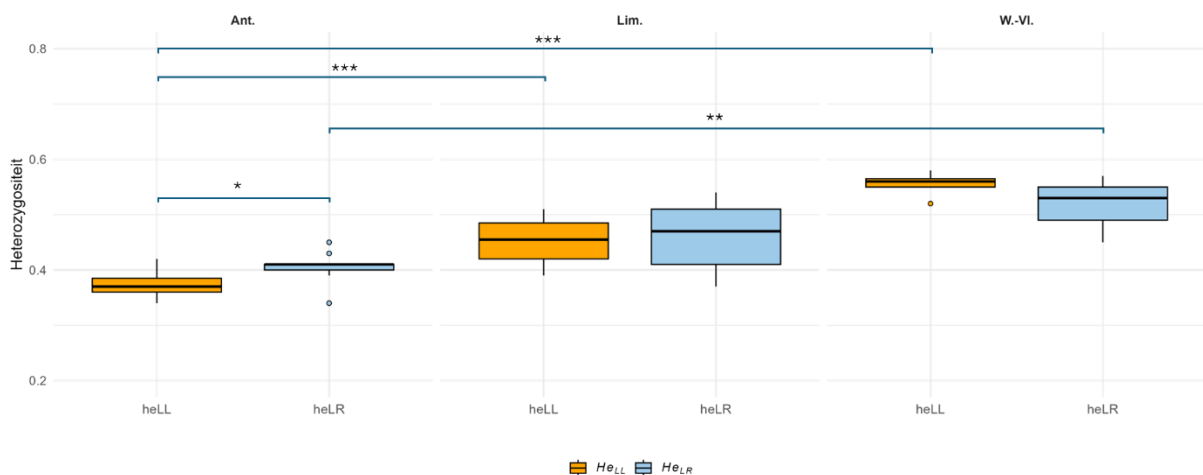
Figuur 13 Individuele toewijzingen na DAPC-analyse voor K = 14. Elk balkje geeft een individu mee, elk kleur staat voor een van de 14 clusters die gedefinieerd werd.

2.1.4.3.2 Genetische diversiteit van het L-genoom

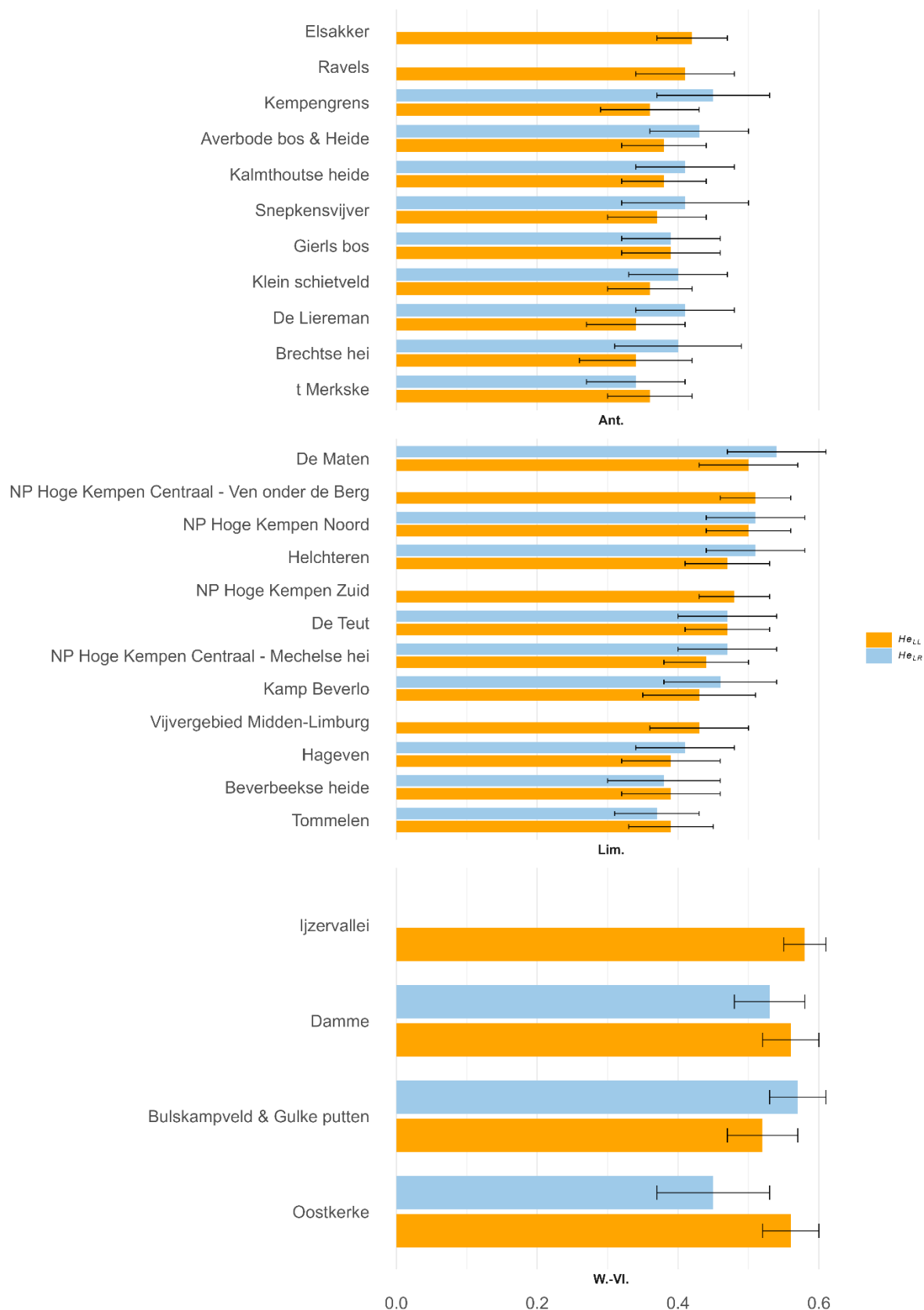
Voor **diploïde poelkikkers (LL)** ligt de **verwachte heterozygositeit (H_e)** tussen de 0,34 (De Liereman) en 0,58 (IJzervallei) (**Tabel 3; Figuur 15**). Daarnaast was H_e significant gerelateerd aan provincie (Kruskal-Wallis $\chi^2(2) = 19,44$; $p < 0.001$). Antwerpse stalen vertoonden op deze manier een significant lagere verwachte heterozygositeit in vergelijking met de andere provincies. Een post-hoc Dunn test toonde vervolgens aan dat $H_{e, LL}$ enkel tussen West-Vlaanderen en Limburg niet significant van elkaar verschilden ($p = 0,089$). De andere combinaties verschillen wel significant van elkaar ($p < 0.001$) (**Figuur 14**). Op deze manier werd bevestigd dat binnen Limburg ook poelkikkerpopulaties bestaan met vergelijkbare gendiversiteit als in West-Vlaanderen, bijvoorbeeld NP Hoge Kempen - Ven onder de Berg ($H_e = 0,51$).

De **geobserveerde heterozygositeit (H_o)** werd enkel voor LL gerapporteerd en varieerde tussen de 0,33 in Brechtse Hei en 0,66 in De IJzervallei; de diversiteitsindex was ook hier opnieuw afhankelijk van de provincie (ANOVA: $F(2, 24) = 32,99$; $p < 0.001$) en significant verschillend tussen provincies (Tukey HSD: voor alle combinaties $p < 0,001$).

Alle genotypes (LL, LR, LLR en LLL) – Verwachte heterozygositeit (H_e) gecorrigeerd voor staalnamegrootte voor elk genotype varieerde bij diploïde hybriden (LR) tussen de 0,36 en 0,48 (**Tabel 3**). Voor triploïde hybriden (LLR) en poelkikkers (LLL) kon enkel voor de IJzervallei een nuttige H_e worden berekend. Deze bedroegen voor LLR 0,34 en voor LLL 0,63. De **verwachte heterozygositeit** van het L-genoom verschilde globaal (d.i. over alle sites) **niet significant tussen diploïde poel- en bastaardkikkers** (Wilcoxon rank-sum test = 248,5; $p = 0,473$). Wanneer de verwachte heterozygositeit werd opgesplitst op basis van provincie, verschilde enkel binnen Antwerpen $H_{e, LL}$ significant van $H_{e, LR}$ (t-test: $p = 0,03$) (**Figuur 14**). De gendiversiteit was in Antwerpse sites dus significant hoger bij diploïde bastaardkikkers dan bij diploïde poelkikkers. Tussen provincies verschilt $H_{e, LR}$ enkel significant tussen West-Vlaanderen en Antwerpen (Tukey HSD: $p = 0,008$; **Figuur 14**).



Figuur 14 Boxplots die de verschillen tussen verwachte heterozygositeit binnen provincies en tussen provincies weergeeft. Binnen Limburg en West-Vlaanderen zijn geen significante verschillen tussen de H_e van het L-genoom van diploïde poel- en bastaardkikkers. Tussen provincies werd er enkel een significant verschil waargenomen tussen de H_e van LR uit Antwerpen en West-Vlaanderen. De sterren geven toenemende mate van statistische significantie weer: * : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$, *** : $p \leq 0,001$.



Figuur 15 Verwachte heterozygositeit (H_e) of gendiversiteit per provincie van het L-genoom bij diploïde poelkikker (oranje) en diploïde bastaardkikker (blauw). Foutenvlaggen zijn weergegeven.

Wanneer $H_{e,LL}$ en $H_{e,LR}$ per site worden vergeleken, bleek de $H_{e,LR}$ in de meeste gevallen iets hoger dan de diversiteit binnen diploïde poelkikkers, maar niet significant (**Figuur 15**). Uitzonderingen zijn 't Merkske, Beverbeekse heide, Tommelen, Damme en Oostkerke waar de diversiteit van de poelkikkers hoger ligt (opnieuw niet significant). Over het algemeen werd daarom gesteld dat poelkikkers en bastaardkikkers in eenzelfde site genetisch gelijkaardig zijn.

De heterozygositeit (H_e) van LL en LR is niet significant gerelateerd aan het percentage triploïden (LLR en LLL) dat per site werd bepaald door de populatiegenetische analyse: voor LL gaf een lineaire regressie $p = 0,054$; $R^2 = 0,140$ en voor LR $p = 0,667$ met $R^2 = 0,01$. Hierbij is de invloed van triploïden op de heterozygositeit van LL net niet significant. R^2 geeft hierbij aan welk deel van de totale variantie in H_e van LL of LR werd verklaard door het percentage triploïden. Daarnaast was er enkel tussen West-Vlaanderen en Limburg een significant verschillend percentage triploïden (post-hoc Dunn; $p = 0,03$).

Het aantal bastaardkikkers dat in totaal werd geteld (dit aantal is verschillend van het aantal dat populatiegenetisch werd onderzocht) in de geanalyseerde sites voor populatiegenetica leek daarnaast geen effect te hebben op de $H_{e,LL}$ (lineaire regressie: $p = 0,173$; $R^2 = 0,07$) en een net significant effect (lineaire regressie: $p = 0,04$; $R^2 = 0,198$) te hebben op de gendiversiteit van LR.

De **allelenrijkdom** (AR) werd enkel voor LL gerapporteerd (**Tabel 3**) en had waarden van $1,34 \pm 0,07$ in de Brechtse hei tot $1,57 \pm 0,03$ in de IJzervallei. Vervolgens werden in 10 van de 28 overkoepelende sites **private allelen** teruggevonden.

Tabel 3 Overzicht van de samenstellingen per locatie. N staat voor aantal individuen, H_e staat voor de verwachte heterozygositeit of gendiversiteit over alle onderzochte loci (16 loci; gecorrigeerd naar staalnamegrootte (Nei, 1978); H_o staat voor geobserveerde heterozygositeit, AR staat voor allelenrijkdom en PA_{LL} geeft de private allelen voor LL weer. LL staat voor diploïde poelkikker, LR staat voor diploïde bastaardkikker, LLR staat voor triploïde bastaardkikker en LLL staat voor triploïde poelkikkers. Aantallen na samenvoegen van subsites en filteren. - = $N < 5$, waarde wordt niet weergegeven of resultaat niet beschikbaar.

Provincie	Site	N _{LL}	N _{LR}	N _{LLR}	N _{LLL}	H _{eLL} ± SE	H _{eLR} ± SE	H _{oLL} ± SE	AR _{LL} ± SE	PA _{LL}
Antwerpen	Averbode bos & Heide	19	6	0	0	0,38 ± 0,06	0,43 ± 0,07	0,39 ± 0,06	1,38 ± 0,06	0
	Brechtse hei	20	6	0	0	0,34 ± 0,08	0,40 ± 0,09	0,33 ± 0,08	1,34 ± 0,08	0
	Elsakker	19	3	2	1	0,42 ± 0,05	-	0,42 ± 0,06	1,42 ± 0,05	2
	Gierls bos	19	9	1	0	0,39 ± 0,07	0,39 ± 0,07	0,41 ± 0,08	1,39 ± 0,07	4
	Kalmthoutse heide	48	20	0	0	0,38 ± 0,06	0,41 ± 0,07	0,38 ± 0,07	1,39 ± 0,06	1
	Kempengrens	30	6	3	1	0,36 ± 0,07	0,45 ± 0,08	0,35 ± 0,07	1,36 ± 0,07	0
	Klein schietveld	27	7	3	3	0,36 ± 0,06	0,40 ± 0,07	0,37 ± 0,07	1,36 ± 0,06	0
	De Liereman	30	8	1	0	0,34 ± 0,07	0,41 ± 0,07	0,36 ± 0,08	1,34 ± 0,07	0
	t Merkske	22	12	0	1	0,36 ± 0,06	0,34 ± 0,07	0,35 ± 0,06	1,36 ± 0,06	0
	Snepkensvijver	30	9	1	0	0,37 ± 0,07	0,41 ± 0,09	0,35 ± 0,07	1,38 ± 0,07	0
	Ravels	14	4	1	1	0,41 ± 0,07	-	0,42 ± 0,07	1,41 ± 0,07	0
Limburg	Beverbeekse heide	31	8	1	0	0,39 ± 0,07	0,38 ± 0,08	0,42 ± 0,08	1,39 ± 0,08	7
	Kamp Beverlo	20	7	0	0	0,43 ± 0,08	0,46 ± 0,08	0,46 ± 0,09	1,43 ± 0,08	0
	Hageven	20	10	0	0	0,39 ± 0,07	0,41 ± 0,07	0,40 ± 0,07	1,39 ± 0,07	0
	Helchteren	46	8	1	0	0,47 ± 0,06	0,51 ± 0,07	0,46 ± 0,07	1,47 ± 0,06	0
	NP Hoge Kempen Centraal - Mechelse hei	16	5	0	0	0,44 ± 0,06	0,47 ± 0,07	0,47 ± 0,07	1,44 ± 0,06	0
	NP Hoge Kempen Centraal - Ven onder de Berg	12	4	0	0	0,51 ± 0,05	-	0,55 ± 0,06	1,51 ± 0,05	0
	NP Hoge Kempen Noord	30	10	0	0	0,50 ± 0,06	0,51 ± 0,07	0,50 ± 0,06	1,50 ± 0,06	1
	NP Hoge Kempen Zuid	20	0	0	2	0,48 ± 0,05	-	0,48 ± 0,05	1,48 ± 0,05	0
	De Maten	21	7	0	0	0,50 ± 0,07	0,54 ± 0,07	0,52 ± 0,08	1,50 ± 0,07	0
	De Teut	26	9	0	0	0,47 ± 0,06	0,46 ± 0,07	0,53 ± 0,07	1,48 ± 0,06	3
	Tommelen	19	6	0	0	0,39 ± 0,06	0,37 ± 0,06	0,40 ± 0,07	1,39 ± 0,06	0
	Vijvergebied Midden-Limburg	19	3	1	0	0,43 ± 0,07	-	0,44 ± 0,07	1,43 ± 0,07	0
West-Vlaanderen	IJzervallei	11	4	6	5	0,58 ± 0,03	-	0,66 ± 0,05	1,57 ± 0,03	0
	Bulskampveld & Gulke putten	44	12	1	0	0,52 ± 0,05	0,57 ± 0,04	0,54 ± 0,05	1,52 ± 0,05	0

2.1.4.4 Populatiegenetica: studie van het R-genoom

De studie van het R-genoom kon worden uitgevoerd voor 226 individuele, haploïde R-genotypes (200 LR en 26 LLR) en was gebaseerd op 5 loci met 2 of meer allelen per locus.

2.1.4.4.1 Genetische structuur en diversiteit van het R-genoom

Over de 5 onderzochte loci had de globale F_{ST} een waarde van 0,431; wat duidt op zeer grote differentiatie (Wright, 1978). De paarsgewijze F_{ST} 's hebben waarden tussen de 0 en 1. Tenslotte vertoonden de loci over het algemeen zeer weinig allelenvariatie. Verwachte heterozygositeit varieerde tussen 0 en $0,51 \pm 0,143$ (De Teut), met hogere waarden in enkele Limburgse en Antwerpse populaties (**Tabel 4**). Waar deze hoge waarden voorkomen, werd een veel lagere diversiteit binnen het L-genoom voor dezelfde loci teruggevonden. Het omgekeerde komt ook voor, met bijvoorbeeld in West-Vlaamse populaties veel hogere gendiversiteit voor het L-genoom dan voor het R-genoom.

Een nuttige $H_{e, LLR}$ van het R-genoom (en het L-genoom) kon enkel voor IJzervallei worden berekend en werd daarom niet in **Tabel 4** weergegeven. Hier is de diversiteit van het L-genoom lager dan de diversiteit in het R-genoom voor dezelfde 5 loci, nl. $0,199 \pm 0,123$ versus $0,400 \pm 0,167$.

Tabel 4 Overzicht van de H_e bij diploïde bastaardkikkers (LR) binnen het R-genoom en het L-genoom voor dezelfde 5 loci.

Provincie	Site	N _{LR}	H _{e, LR} ± SE (R-genoom)	H _{e, LR} ± SE (L-genoom)
Antwerpen	Averbode bos & Heide	6	0 ± 0	0,280 ± 0,136
	Brechtse hei	6	0,440 ± 0,185	0,067 ± 0,067
	Gierlsbos	9	0,111 ± 0,111	0,167 ± 0,075
	Kalmthoutse heide	20	0,491 ± 0,132	0,216 ± 0,094
	Kempengrens	6	0,227 ± 0,139	0,200 ± 0,082
	Klein Schietveld	7	0,295 ± 0,121	0,171 ± 0,070
	De Liereman	8	0,336 ± 0,138	0,086 ± 0,086
	t Merkske	12	0,324 ± 0,114	0,061 ± 0,061
	Snepkensvijver	9	0,139 ± 0,139	0,156 ± 0,109
Limburg	Beverbeekse heide	8	0,371 ± 0,112	0,136 ± 0,088
	Kamp Beverlo	7	0,305 ± 0,135	0,057 ± 0,057
	Hageven	10	0,258 ± 0,123	0,289 ± 0,089
	Helchteren	8	0,457 ± 0,086	0,221 ± 0,111
	NP Hoge Kempen Centraal – Mechelse hei	5	0 ± 0	0,380 ± 0,174
	NP Hoge Kempen Noord	10	0,124 ± 0,051	0,244 ± 0,116
	De Maten	7	0,381 ± 0,162	0,305 ± 0,139
	De Teut	9	0,510 ± 0,143	0,152 ± 0,106
	Tommelen	6	0,107 ± 0,107	0,240 ± 0,105
West-Vlaanderen	Bulskampveld & Gulke putten	12	0,206 ± 0,087	0,470 ± 0,046
	Damme	9	0 ± 0	0,411 ± 0,057
	Oostkerke	5	0,160 ± 0,098	0,360 ± 0,098

2.1.5 Discussie en conclusies inzake genetica

Dit project beoogde in een eerste fase de morfologische soortentoeuwijzing van de verschillende voorkomende groene kikkers (poelkikker, bastaardkikker en meerkikker *s.l.*) in Vlaanderen op genetische manier af te toetsen. Op deze manier kon het voorkomen van poelkikkers op verschillende locaties worden nagegaan (**fase 1**). De soortenidentificatie door experts in het veld op basis van morfologische kenmerken bleek een hoge accuraatheid te hebben. In een tweede luik werden bijgevolg populaties met een hogere proportie aan poelkikker geselecteerd voor een populatiegenetische studie. De discussie zal zich verder focussen op de resultaten bekomen uit dit tweede luik van het project (**fase 2**). Finaal werd getracht om conclusies te formuleren inzake de stand van zaken en de toekomst van poelkikkers, en met uitbreiding de bastaardkikkers, in het Vlaamse landschap.

2.1.5.1 Genetische structuur

Na analyse werd duidelijk dat op basis van de verzamelde data binnen een overkoepelende site vaak weinig differentiatie terug te vinden was tussen bemonsterde poelen wanneer het L-genoom tussen poelkikkers vergeleken werd, en dan vooral van genomotypes LL en LR. Behalve in de site Nationaal Park Hoge Kempen Centraal, waaronder subsites Mechelse hei en Ven onder de Berg werden verzameld, bleken poelkikkers verschillend genoeg te zijn om ze bij verdere analyse gescheiden te houden. Het bundelen van poelen binnen een locatie tot eenzelfde populatie of systeem impliceert dat connectiviteit tussen verschillende poelen mogelijk zou moeten zijn. Hoewel bronnen aanduiden dat groene kikkers maximaal 800 m disperseren (Holenweg, 2001), liggen veel poelen binnen eenzelfde site verder uit elkaar (bv. ± 3 km voor Averbode Bos & Heide, ± 7 km tussen De Blankaart Meetnet en De Blankaart Reninge Rijsdreef, ± 6 km in Helchteren) en worden sommige poelen binnen sites van elkaar gescheiden door gewestwegen al dan niet voorzien van ecoducten of ecotunnels. Dit kan verklaard worden door het voorkomen van tussenliggende (door ons niet bemonsterde) plekken binnen sites waar groene kikkers voorkomen, maar kan ook het verdere dispersievermogen (max. 1,5 - 1 km) van individuen gemodelleerd door (Hammarström *et al.*, 2016 in Wikström, 2018) bevestigen.

Structureel werd een opsplitsing tussen West-Vlaamse poelkikkerpopulaties tegenover de rest van de Vlaamse stalen (Limburg en Antwerpen) duidelijk. Deze opdeling werd bevestigd door de resultaten van zowel paarsgewijze F_{ST} als de resultaten van de clusteringsanalyses (PCA en DAPC). De West-Vlaamse populaties hebben immers een geïsoleerde ligging binnen het Vlaamse verspreidingsgebied.

Verder is er een spatiale gradiënt in de mate van toewijzing aan de verschillende genetische clusters binnen de Limburgse en Antwerpse locaties. Er is een overgang die grotendeels samenvalt met de provinciegrenzen tussen Antwerpen en Limburg. Enkele sites binnen de Limburgse en Antwerpse cluster clusteren wel (merendeels) apart, waaronder Gierls bos, NP Hoge Kempen Zuid met Ven onder de Berg, Hageven met Beverbeekse heide. Deze sites lijken zich dus van de overige sites in de Kempen te onderscheiden. Sommige sites of groepen van sites hebben verder eerder een genetische samenstelling die wat afwijkt van de grote meerderheid binnen Antwerpen of Limburg (Averbode Bos & Heide en de groep De Maten – Mechelse hei – NP Hoge Kempen Noord). Dit gaat vaak over dicht bij elkaar gelegen sites die bovendien enige mate afgezonderd zijn van de overige onderzochte populaties.

Bijkomend kan genetisch onderscheid nog toenemen onder **genetische drift**, waarbij willekeurige veranderingen optreden in allelfrequenties doorheen generaties. Allelen kunnen gemakkelijker verdwijnen door drift wanneer de populatie klein en geïsoleerd is. Het kan duiden op een verminderde connectiviteit dewelke cruciaal is voor het behoud van genetische

Tenslotte is er de hoge genetische diversiteit die waargenomen werd in de West-Vlaamse poelkikker. Ook hier werden vaak polyploïden aangetroffen (LLR en LLL). De populaties vormen niet enkel een aparte genetische cluster, maar wijken volgens gendiversiteit danig af van de overige Vlaamse populaties. Mogelijk behoren deze populaties tot een andere evolutionaire lijn dan deze van de Antwerpse en Limburgse populaties.

2.1.5.3 Gevolgen voor behoud en verder onderzoek

Wanneer daarnaast de diversiteit van het L-genoom van poelkikkers, waarop geparasiteerd wordt, werd vergeleken tussen de beide soorten, werd geconcludeerd dat deze nauw samenhangen en (behalve in Antwerpen) weinig verschillend zijn. Dat ligt binnen de verwachtingen aangezien het L-genoom van de bastaardkikker in een LE-systeem afkomstig is van een poelkikker. Daarnaast lijkt de diversiteit van diploïde poelkikkers niet afhankelijk te zijn van het aantal bastaardkikkers dat in een site voorkomt ($p = 0,17$) en maar net significant ($p = 0,04$) voor de diversiteit van LR.

oorzaak als gevolg zijn van de achteruitgang van poelkikker, wat misschien de lagere genetische diversiteit in de Antwerpse populaties kan verklaren.

Bastaardkikkers vormen een unieke uitdaging voor natuurbehoud. Ze zijn niet reproductief geïsoleerd van hun oorspronkelijke soorten en worden daarom biologisch gezien niet als een 'echte' soort aanzien. Maar toch vormen ze aparte evolutionaire en ecologische eenheden met een karakteristiek uiterlijk, geluid en habitatadaptatie (Hoffmann *et al.*, 2015; Pruvost *et al.*, 2013a). Deze hybride afstammingslijnen, in stand gehouden door hemiklonale voortplanting, kunnen blijven bestaan en zelfs evolueren naar seksuele onafhankelijkheid, zoals te zien is bij polyploïde noordelijke populaties die minder gevoelig zijn aan lage temperaturen en unieke morfologische eigenschappen vertonen (Kierzkowski *et al.*, 2011; Pruvost *et al.*, 2013b). Dergelijke systemen zijn echter kwetsbaar: klimaatverandering, veranderingen in de habitat of hernieuwde hybridisatie met ouderlijke soorten kunnen hun evenwicht snel verstoren. Voor natuurbehoud gelden deze kikkers niet als statische taxa, maar als dynamische evolutionaire experimenten. Hybridogenese is dus geen evolutionaire doodlopende weg, maar een route naar meer biodiversiteit. Door hun habitats te beschermen, worden dus niet alleen de huidige populaties veiliggesteld, maar ook de evolutionaire processen die in de toekomst tot nieuwe soorten kunnen leiden.

Vermoedelijk oefent de invasie van meerkikker een grotere impact uit op het voortbestaan van poelkikkers én bastaardkikkers in Vlaanderen en met uitbreiding de rest van Europa (Leuenberger *et al.*, 2014). Waar meerkikker voorkomt gaan de andere groene kikkers achteruit en management van deze invasie is een hele opgave (Falaschi *et al.*, 2020; Holsbeek & Jooris, 2010; Quilodrán *et al.*, 2018). Zo werden inheemse poelkikkers op sommige locaties zelfs al volledig vervangen (Holsbeek & Jooris, 2010; Schmeller *et al.*, 2005 in Leuenberger *et al.*, 2014). Meerkikker kan op zowel ecologische als genetische manier de poelkikker gaan vervangen (Leuenberger *et al.*, 2014). Wanneer meerkikkers worden geïntroduceerd in een LE-systeem, kunnen ze met zowel de poel- als bastaardkikkers levensvatbare nakomelingen produceren. Deze kruisingen resulteren respectievelijk in diploïde bastaardkikkers en meerkikkers, dewelke op hun beurt beiden enkel R-gameten produceren (Falaschi *et al.*, 2020; Holsbeek & Jooris, 2010; Vorburger & Reyer, 2003). Door terugkruising ontstaan vervolgens meer meerkikkers die na verloop van tijd het LE-systeem overnemen en zowel poel- als bastaardkikker elimineren, tenzij lokale adaptatie aan en voorkeuren voor bepaalde habitats een rem zetten op de invasie.

De diversiteit van het R-genoom werd getest op basis van slechts 5 loci en gaf in meerdere gevallen een hoger resultaat voor het R-genoom dan voor het L-genoom. Dit verschil kan te wijten zijn aan de beperkte set merkers die gebruikt werd om de vergelijking mogelijk te maken. Het omgekeerde patroon komt echter ook voor, in bepaalde West-Vlaamse populaties vertoont het L-genoom een duidelijk hogere genetische diversiteit dan het R-genoom. Dit valt binnen de verwachtingen, aangezien het R-genoom klonaal wordt doorgegeven. Bovendien kunnen de triploïde LLR-individueen in dergelijke populaties een bijkomende, verarmende invloed hebben op datzelfde R-genoom. Populaties waarin een hogere diversiteit voor het R-genoom werd waargenomen (zij het op basis van een beperkt aantal merkers en stalen) stonden mogelijk onder invloed van meerdere genetische lijnen van meerkikker s.l. Daarnaast is het ook mogelijk dat hybriden op deze plaatsen ontstonden door de instroom van nieuwe, migrerende meerkikkers.

Subsite De Blankaart van de IJzervallei, waar zeer weinig poelkikkers overblijven, kan een voorbeeld zijn van waar de invasie van meerkikker nog volop aan de gang is. Deze locatie bevindt zich in een gebied dat wordt omringd door meerkikkers, maar waar tot 2006–2008 nog geen exemplaren waren vastgesteld. In minder dan tien jaar hebben meerkikkers hier de overhand

De conclusies uit dit rapport zijn gebaseerd op slechts een deel van de groene-kikker-systemen die vandaag in Vlaanderen terug te vinden zijn. Enkel locaties waar zowel poel- als bastaardkikker samen voorkomen zijn bemonsterd en verder geanalyseerd. Het blijft een open vraag hoe systemen waarbinnen enkel bastaardkikkers leven er genetisch aan toe zijn en hoe zij de eventueel nabij gelegen LE-systemen beïnvloeden. Alsook moet er rekening gehouden worden met het feit dat door de gekozen staalnamemethode, waarbij de focus lag bij het bemonsteren van poelkikkers, de genetische identiteit van bastaardkikkers in de bemonsterde locaties onder- of overschat kan worden.

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

www.vlaanderen.be/inbo doi.org/10.21436/inbor.136187742 Pagina 45 van 118

2.2 MORFOLOGIE

2.2.1 Inleiding

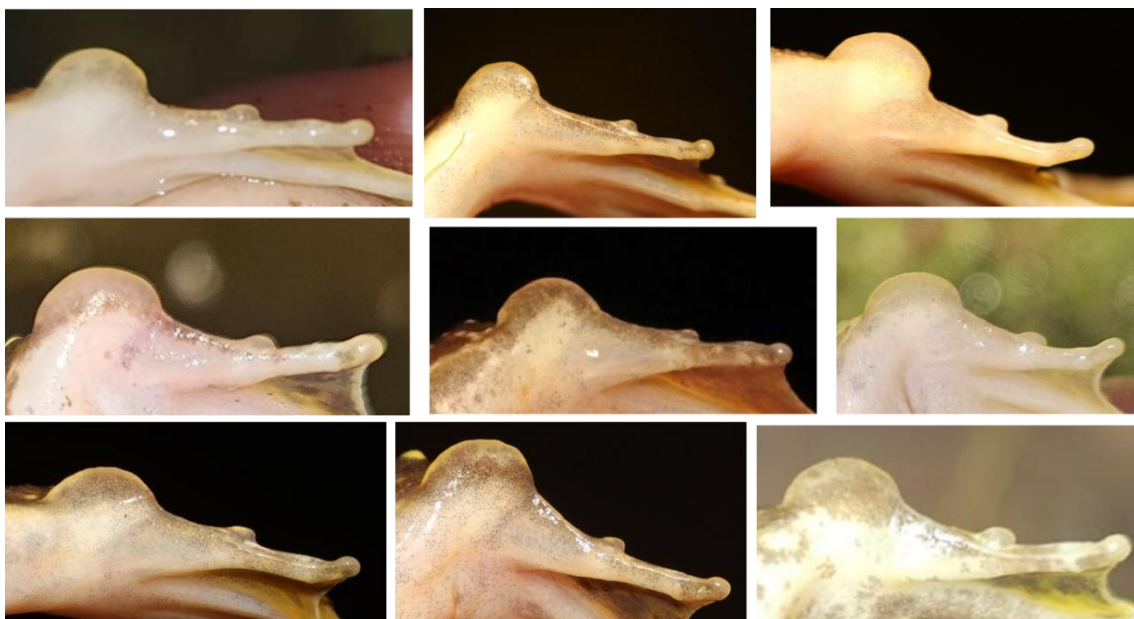
Op basis van uitwendig kenmerken het onderscheid maken tussen de drie voornaamste groenekikkertaxa (poelkikker, bastaardkikker, meerkikker s.l.) is niet eenvoudig. Het in Vlaanderen veelvuldig voorkomen van triploïde bastaardkikkers (van het LLR-type, waarbij twee chromosomensets van poelkikker en één van meerkikker aanwezig zijn) bemoeilijkt de opdracht, aangezien deze intermediaire kenmerken kunnen vertonen (tussen poelkikker en klassieke, diploïde bastaardkikkers in). De determinatie wordt doorgaans onderbouwd aan de hand van verhoudingen in de lengtematen van bepaalde lichaamsonderdelen.

De relatieve scheenbeenlengte is de verhouding tussen de lengte van het scheenbeen (tibiofibula, één gefuseerd bot bij kikkers en padden, anders dan bij bv. de mens, waar scheenbeen en kuitbeen twee afzonderlijke botten in het onderbeen zijn)(SBL) en de kop-romplengte (KRL). De relatieve graafknobbellengte is de verhouding van de lengte van de graafknobbel (of (binnenste) metatarsusknobbel of callus internus)(GKL) ten opzichte van de lengte van de ernaast gelegen eerste teen (TeL).



Figuur 16 Aanduiding van de verschillende lengtematen op een mannelijke bastaardkikker (habitus in grote foto) en de poot van een poelkikker (detail in inzet). KRL: kop-romplengte, SBL: scheenbeenlengte, GKL: graafknobbellengte, TeL: lengte van de eerste teen.

Meer dan van de vermelde lengtematen en hun onderlinge verhoudingen geldt de vorm (kromming en lengte/hoogte-verhouding) van de graafknobbel als diagnostisch kenmerk. De poelkikker wordt gekenmerkt door een hoge, symmetrisch gevormd knobbel ('halve maan'). Dit geldt als de meest richtinggevende indicatie bij de soorttoekenning.



Figuur 17 Voorbeelden van graafknobbel en eerste teen van Vlaamse poelkikkers.

Bastaardkikker en meerkikker hebben beide minder hoge knobbels met een naar de teentip wijzende top, waarbij de knobbel van meerkikker veelal erg kort is en die van bastaardkikker intermediair tussen beide zuivere biologische soorten.



Figuur 18 Voorbeelden van graafknobbel en eerste teen van Vlaamse bastaardkikkers.



Figuur 19 Voorbeelden van graafknobbel en eerste teen van in Vlaanderen gevangen uitheemse meerkikkers s.l..

We bespreken hieronder overige uiterlijke kenmerken van de poelkikker. Voor omstandige toelichting bij het morfologisch en auditief onderscheid tussen de verschillende groenekikkertaxa verwijzen we naar Speybroeck *et al.* (2016).

De poelkikker is de kleinste groenekikkersoort van Europa. In vergelijking met andere groenekikkersoorten vertoont de poelkikker een enigszins juveniel aandoend uiterlijk: de kop is verhoudingsgewijs vrij groot ten opzichte van het lichaam en de ogen zijn relatief groot ten opzichte van de kop. De snuit is relatief kort. De achterpoten zijn kort ten opzichte van het lichaam. Deze kenmerken zijn indicatief, maar niet feilloos diagnostisch, vooral (maar niet uitsluitend) omdat bastaardkikker intermediaire kenmerken tussen de originele oudersoorten (poelkikker en meerkikker) kan vertonen inclusief ruime overlap met hen. We vermelden huidtextuur (gaande van glad bij poelkikker tot ruw bij meerkikker), kleur van de vlekken op rug en poten (doorgaans zwart en veelal scherp begrensd bij poelkikker tot allerlei kleuren en slordig afgelijnd bij meerkikker), kopvorm (stompe snuit en relatief grote ogen bij poelkikker tot lang en spits(er) bij meerkikker met relatief kleine ogen).

Mannelijke poelkikkers kunnen tijdens de voortplantingsperiode vrijwel helemaal citroengeel worden (ook vrij vaak bij bastaardkikker tot zelden of nooit bij meerkikker). **Figuur 20** illustreert de variatie in uiterlijk van mannelijke poelkikkers.



Figuur 20 Mannelijke poelkikkers uit Vlaanderen.

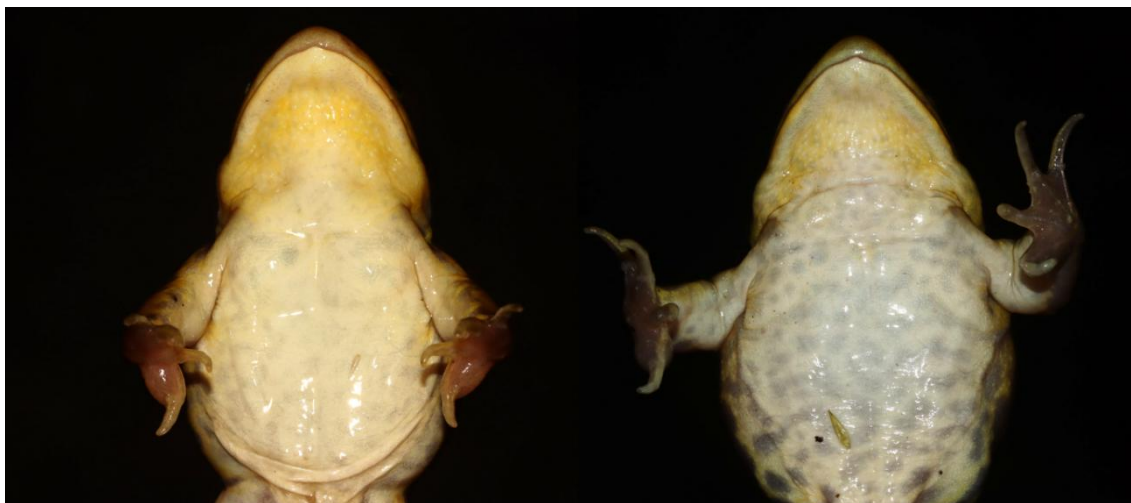
Vrouwtjes vertonen een iets bredere waaier aan patroonvariatie, gaande van vrijwel egaal grasgroene dieren tot dieren met kastanjebruine rugkleur. **Figuur 21** illustreert de variatie in uiterlijk van vrouwelijke poelkikkers.



Figuur 21 Vrouwelijke poelkikkers uit Vlaanderen.

Dorsaal vlekkenpatroon en kleurtinten variëren bij beide geslachten doorheen het jaar en in relatie met temperatuursveranderingen, met de helderste kleuren veelal waarneembaar tijdens het voortplantingseizoen (april-juli).

De onderzijde is doorgaans weinig gevlekt (**Figuur 22**). De onderzijde van meerkikkers is vaak nog zwaarder getekend dan die van bastaardkikker. De onderzijde van vrouwelijke groene kikkers is doorgaans zwaarder getekend dan die van mannetjes. Buikpatroon is slechts beperkt bruikbaar voor soortidentificatie.



Figuur 22 Onderzijde mannelijke poelkikker (links) en mannelijke bastaardkikker (rechts).

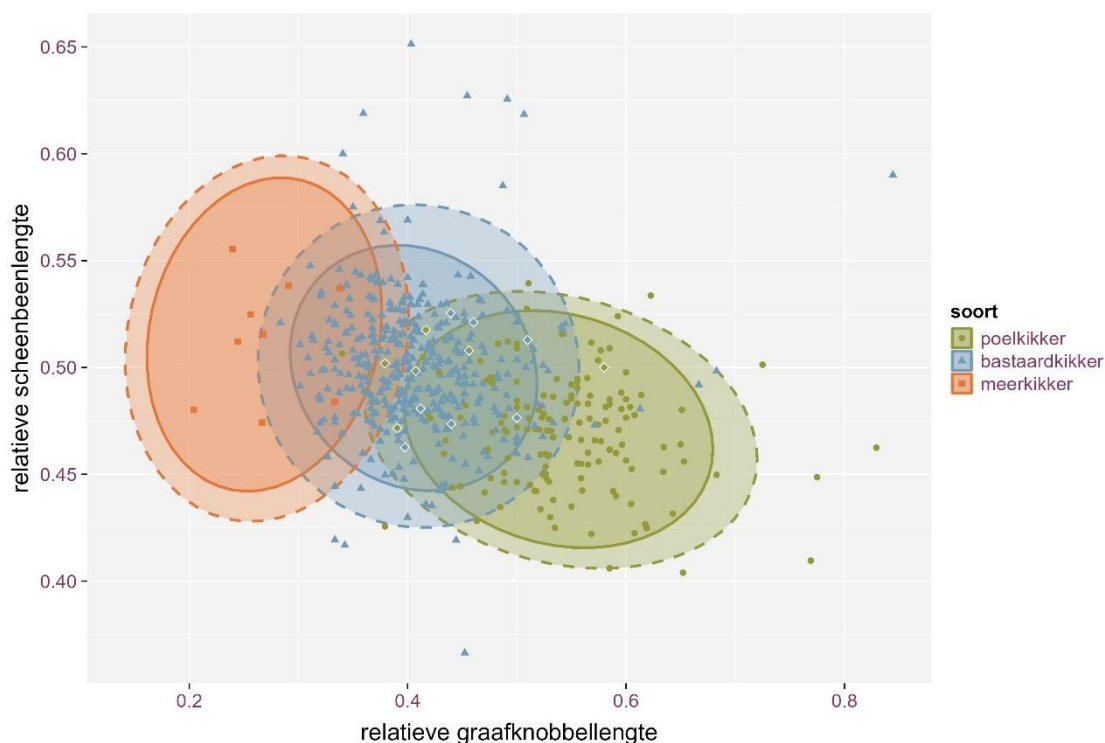
2.2.2 Materiaal en methode

In de lente en zomer van 2023 werden op 27 locaties groene kikkers gevangen. Van de gevangen kikkers werden vier lichaamsdelen opgemeten (lengte metatarsusknobbel, lengte eerste teen, lichaamslengte, scheenbeenlengte) met een schuifmaat tot een nauwkeurigheid van een tiende van een millimeter.

Soortbepaling op basis van de morfologie van de metatarsusknobbel werd genetisch gevalideerd. Morfologische en genetische identificatie beperkten zich tot het onderscheiden van drie taxa: poelkikker, bastaardkikker en meerkikker in ruime zin. Die laatste omvat meerdere taxa waarvan op heden consensus over soortrang ontbreekt. Allen gelden ze als invasief in Vlaanderen. Het onderscheid maken tussen verschillende meerkikker(onder)soorten vereist aanvullend genetisch onderzoek dat binnen dit onderzoek niet voorzien was. Daarom worden ze als één soort s.l. behandeld.

2.2.3 Resultaten

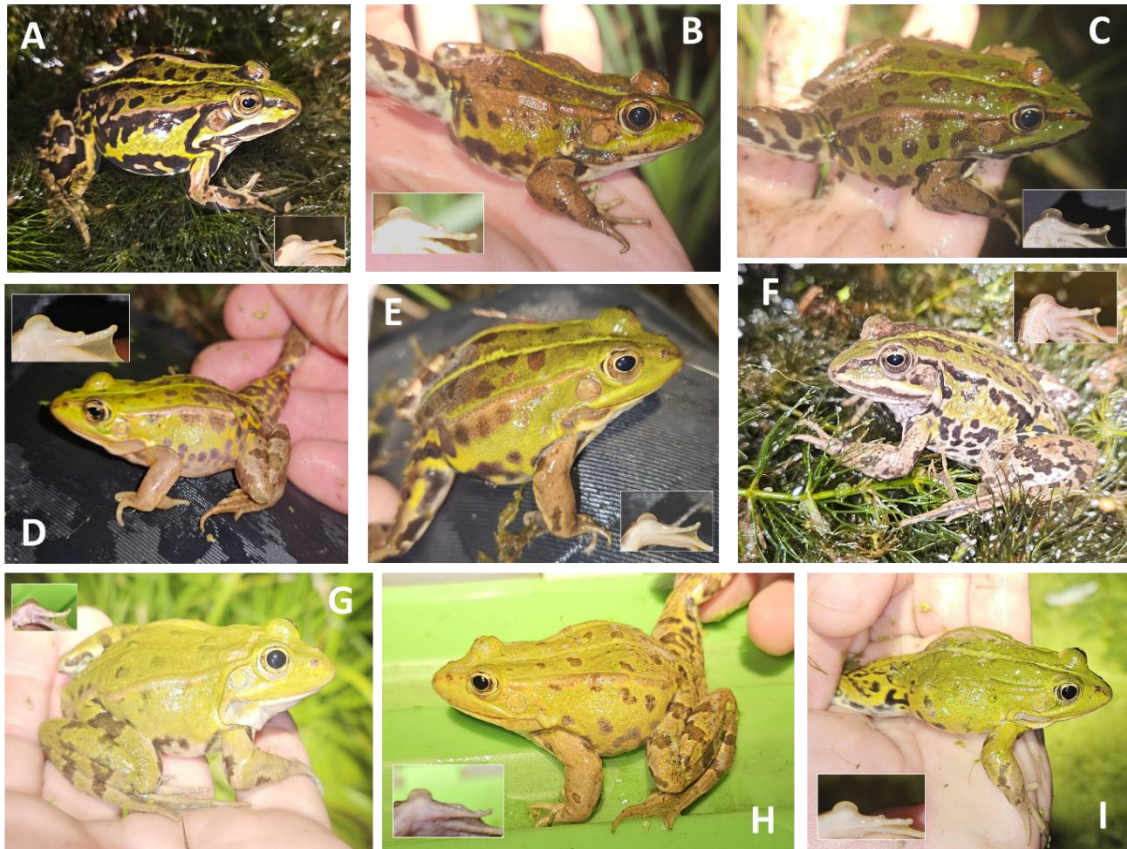
In **Figuur 23** staat het onderlinge verband tussen beide relatieve lengtematen weergegeven voor de 553 kikkers die werden gevangen en gemeten in 2023 (poelkikker: 148, bastaardkikker: 388, meerkikker: 9). De resultaten zijn beperkt interpreteerbaar door de kleine steekproefgrootte van meerkikker (die vooral in 2025 frequent gevangen werden). Hoewel er duidelijk grote overlap is tussen de verschillende taxa, lijkt uit de beschikbare data zichtbaar dat de relatieve knobbellengte een beter onderscheidend vermogen biedt dan de relatieve scheenbeenlengte. De beperkte steekproefgrootte voor met name meerkikker maar ook bepaalde delen van elk taxon op basis van leeftijd en geslacht leiden tot beperkte bruikbaarheid van deze gegevens.



Figuur 23 Relatieve scheenbeenlengte (lengte van tibiofibula (SBL) gedeeld door kop-romplengte (KRL)) in functie van de relatieve graafknobbellengte (graafknobbellengte (GKL) gedeeld door lengte van de eerste teen (Tel)). Witte cirkeltjes geven stalen weer waar genetica en morfologie verschillende soortidentificatie opleverden.

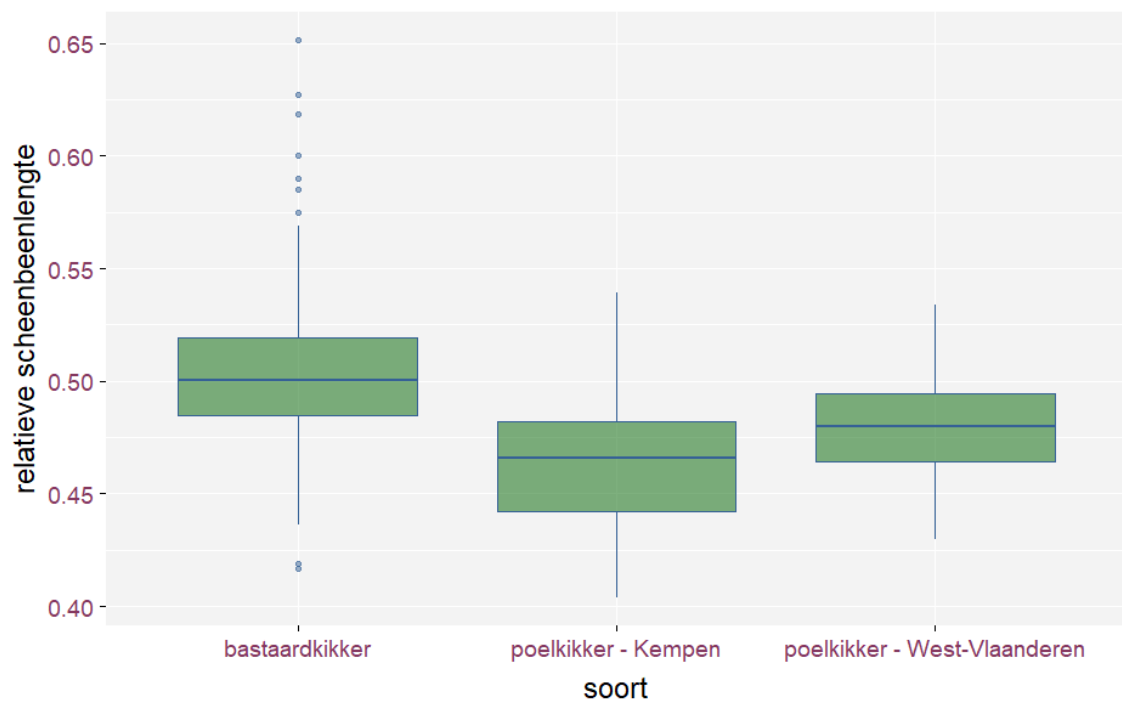
Genetische validatie van de soorttoekenningen leverde een correcte morfologische identificatie op voor 98.3 % van 538 kikkers bemonsterd in 2023 en 98.5 % van 848 kikkers van 2024. Hieruit besluiten we dat de betrokken veldmedewerkers de herkenning van groene kikkers ‘in de hand’ goed tot zeer goed beheersen en dat het dus mogelijk is Vlaamse groene kikkers verregaand correct te onderscheiden op basis van morfologische kenmerken.

In 2025 werden echter in een aantal nieuw ontdekte locaties in West-Vlaanderen dieren aangetroffen met onduidelijke of schijnbaar tegenstrijdige kenmerken (schijnbare poelkikkers met ruwe huid, ongewoon grote poelkikkers, symmetrische graafknobbel maar lange(re) eerste teen, ...)(**Figuur 24**). Dit suggereert dat de in de Kempen geldende determinatiekenmerken in West-Vlaanderen mogelijk minder waterdicht te gebruiken zijn.



Figuur 24 Morfologisch moeilijk te determineren West-Vlaamse poelkikkers en bastaardkikkers (A en F: Fort van Beieren (Koolkerke), B: De Fonteintjes (Blankenberge), C: Uitkerkse Polders (Blankenberge), D: Meetkerkse Moeren (Zuienkerke), E: Kampveld (Oostkamp), G en H: Stavelestraat (Alveringem), I: Elzendamme (Vleteren)).

Ook de relatieve scheenbeenlengte van West-Vlaamse poelkikkers neigt enigszins naar iets hogere waarden dan deze uit de Kempen (**Figuur 25**).



Figuur 25 Relatieve scheenbeenlengte (lengte van tibiofibula (SBL) gedeeld door kop-romplengte (KRL)) van bastaardkikker en poelkikker uit twee regio's.

Verder (genetisch) onderzoek is noodzakelijk om onder meer na te gaan of hier sprake is van afwijkende morfologie van LLR-hybriden of eventueel triploïde poelkikkers.

2.3 VERSPREIDING EN RELATIEVE ABUNDANTIE

2.3.1 Inleiding

Verspreiding

Voor leken zijn groene kikkers lastig te herkennen op basis van uitwendige kenmerken of geluid. Het actueel voorkomen van de poelkikker op basis van beschikbare waarnemingen (waarnemingen.be – Natuurpunt) vereist validatie. Hierbij wordt nagegaan of de soort (nog steeds) aanwezig is in de in het SBP opgesomde leefgebieden (Antea, 2019). Daarnaast wordt in deze studie ook aanvang gemaakt met inventarisatie in functie van het beter documenteren van de reikwijdte van de gekende metapopulaties en het vaststellen van de aanwezigheid van de soort in voorheen onbekende leefgebieden.

Relatieve abundantie

Populatiegroottes of -dichtheden bepalen vereist doorgedreven onderzoek aan de hand van vangst-merk-hervangsttechnieken. Dit type onderzoek valt buiten de scope van deze onderzoeksopdracht. Wel werd de relatieve abundantie van poelkikker en de syntoop voorkomende andere groenekkikertaxa nagegaan. Dergelijke verhoudingen kunnen dienen als referentie voor toekomstige bepaling van trends en wijzigingen in de relatieve abundantie van deze taxa.

Om trends te bepalen zijn robuuste tijdsreeksen nodig. De reeds vermelde moeilijkheden met het correct onderscheiden van de soorten bemoeilijken dit. Bovendien zijn gegevens van voorkomen in bepaalde (schijnbaar of effectief geïsoleerde) delen van het Vlaamse poelkikkerareaal soms erg beperkt (bv. waarneming van één individu). De gegevens van Holsbeek *et al.* (2008) vormen hierop een unieke uitzondering. We herbezochten een reeks van ruwweg 18 jaar geleden onderzochte locaties waarbij soortbepaling zowel genetisch als morfologisch werd uitgevoerd om na te gaan hoe de relatieve verhouding tussen de verschillende groenekkertaxa is veranderd.

2.3.2 Materiaal en methode

In de lente en de zomer van 2023, 2024 en 2025 werden 190 locaties bezocht over het volledige gekende historische Vlaamse areaal van de soort alsook in een aantal potentiële leefgebieden. Omdat het SBP verschillende populaties/gebieden vermeldt zonder beschikbare gegevens (en dus dubieuze aanwezigheid) van de soort, hebben we ons gebaseerd op de beschikbare gevalideerde waarnemingsgegevens van Natuurpunt (www.waarnemingen.be). Waar nodig en mogelijk voerden we aanvullende validatie uit om de beschikbare referentiedata aan te vullen. Het veldwerk diende tegelijkertijd het genetisch onderzoeksluik. Om variatie binnen populaties minimaal mee te nemen werd binnen gebieden getracht meer dan één locatie/waterpartij te bemonsteren. De resulterende bemonstering is zeer uitgebreid en representatief voor het Vlaams areaal van de soort (zie **Figuur 28** vs. **Figuur 30**), al laat ze gedetailleerde uitspraken op gebiedsniveau niet toe. In twee gebieden werden meer waterpartijen gekozen om enig zicht op de variatie binnen gebieden te kunnen bekomen (Kalmthoutse Heide en Nationaal Park Hoge Kempen). In 2023 en 2024 werd een nagenoeg dekkende bemonstering uitgevoerd van de gekende populaties. In 2025 werd inventariserend onderzoek verricht naar het voorkomen van poelkikker in gebieden met weinig of geen beschikbare gegevens. Daarnaast werden voorheen onderzochte locaties (Holsbeek *et al.* 2008) heronderzocht om de evolutie in de verhouding tussen de verschillende groenekikkertaxa te bepalen, voor zover deze nog niet onderzocht waren in 2023 of 2024.

Tabel 5 Poelkikkerleefgebieden in Vlaanderen. Provincie: ANT = Antwerpen, LIM = Limburg, VBR = Vlaams-Brabant, WVl = West-Vlaanderen. SBP populatie geeft het nummer weer waarmee naar deze populatie wordt verwezen in het soortbeschermingsprogramma (Antea, 2019).

provincie	sitecode	gebied	SBP populatie
ANT	BON	Bonte Klepper	12
ANT	BRE	Brechtse Heide	72
ANT	BUI	Buitengoor / Meergoor	23
ANT	BRA	Caterskapeldreef	72
ANT	LIE	De Liereman	18
ANT	RON	Den Diel	22
ANT	EKS	Eksterheide	13
ANT	ELS	Elsakker	10
ANT	GIE	Gierls Bos	geen
ANT	GSV	Groot Schietveld	8
ANT	MER	Halsche Beemden / Wortel-Kolonie / Merkske	11
ANT	ASB	Het Goor - Asbroek	25
ANT	TIE	Hoge Rielen	60
ANT	KAL	Kalmthoutse Heide	5
ANT	KEM	Kempengrens / Reuselseweg	geen
ANT	KSV	Klein Schietveld	7
ANT	MAX	Maxburg	geen
ANT	RON	Postel	21
ANT	RET	Prinsenveld	geen
ANT	RAV	Ravels / Arendonk (Rode Del / Het Goorken) / Poppel	19
ANT	RET	Reties Heike	geen
ANT	ROM	Rommensbos	9
ANT	RON	Ronde Put	20
ANT	SNE	Sneepkensvijver	24
ANT	TIE	Tielenkamp	60
ANT	RET	Tikkebroeken	59
ANT	TOR	Torven	25
ANT	TVG	Turnhouts Vennengebied	14-17
ANT	VIS	Visbeekvallei	74
ANT	WOL	Wolfsheuvel	geen
ANT	ZOE	Zoersel	geen
ANT / VBR	RIJM	Rijmenam	geen
ANT / VBR / LIM	AVE	Averbode Bos en Heide	27
LIM	BER	Bergerven	61
LIM	BEV	Beverbeekse Heide	73
LIM	BOS	Bosbeekvallei	geen
LIM	DAU	Dauteweyers	62
LIM	BRA	De Brand	67
LIM	MAT	De Maten	37
LIM	TEN	De Teut / Terhaagdoorneheide	40
LIM	WEL	Grote Beemd (Wellen)	geen
LIM	HAG	Hageven	30
LIM	HER	Herkenrode	geen
LIM	WIK	Het Wik	38
LIM	BEV	Kamp van Beverlo	geen
LIM	WIK	Kiewit	36
LIM	HOZ	Kikbeekbron	geen
LIM	LAA	Laambeek / Groene Del	geen
LIM	MAA	Maaswinkel	64
LIM	HON	Mechelse Hei	geen
LIM	HEL	Mil. Domein Houthalen-Helchteren	41
LIM	HOZ	Neerharerheide	geen
LIM	OPH	Ophovenheide / Gruitroderbos / Oudsberg	42
LIM	RES	Resterheide	68
LIM	RIE	Riebos	geen
LIM	HON	Ruwmoertelven / Kruisven / Dilserbos	65
LIM	SCH	Schoonbeek	geen
LIM	STM	Sint-Maartensheide / Mariahof / Stramprooierbroek	31
LIM	TOM	Tommelen	43
LIM	TOS	Tösch-Langeren	67
LIM	VIJ	Vijvergebied Midden-Limburg	33-34
LIM	KLA	Waterschei / Klaverberg	geen
LIM	WIK	Welleke / Ballewijers / Slangebeekbron	39
LIM	WIN	Winterslag	geen
LIM	WIT	Witteberg	geen
LIM	HOZ	Ziepbeek	geen
WVL	BEI	Beisbroek	geen
WVL	BUL	Bulskampveld s.l.	4
WVL	DAM	Damme en Oostkerke	3
WVL	BLK	Ijzervallei - De Blankaart	1
WVL	BLK	Ijzervallei - Lo-Reninge	51
WVL	BLK	Ijzervallei - Pervijze	geen
WVL	BLK	Ijzervallei - Viconia	47
WVL	STD	Sint-Donaas	geen
WVL	VLO	Vloethemveld	2

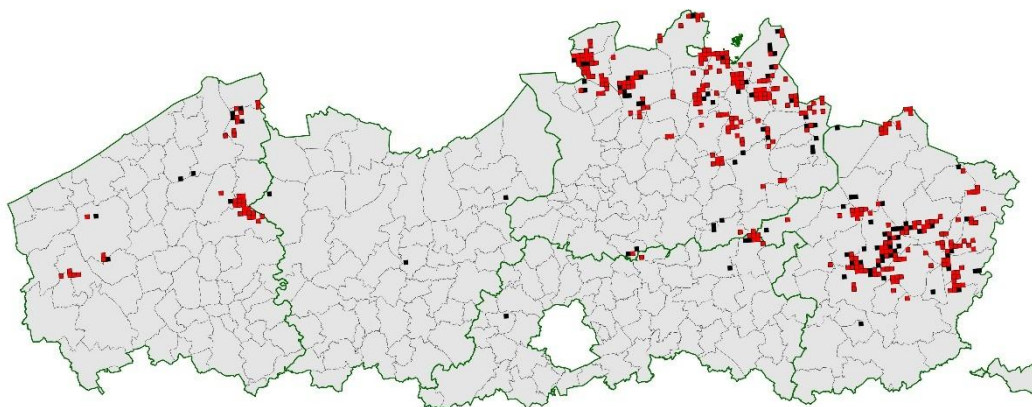
////////////////////////////////////

2.3.3 Resultaten

2.3.3.1 Verspreiding

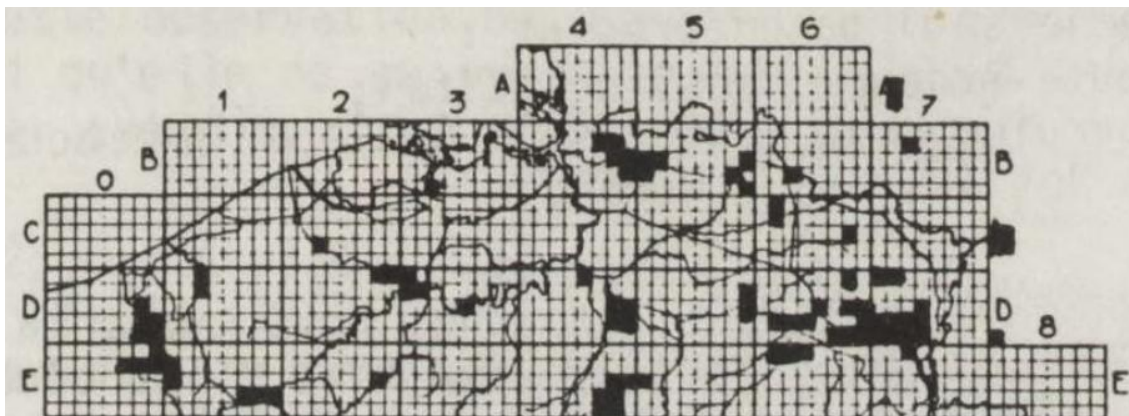
2.3.3.1.1 Poelkikker

Figuur 26 geeft de verspreidingsgegevens van poelkikker in Vlaanderen sinds 2000 weer. Dit omvat door de administratoren van waarnemingen.be gevalideerde, maar niet steeds aan de hand van foto of geluidsopname verifieerbare gegevens.



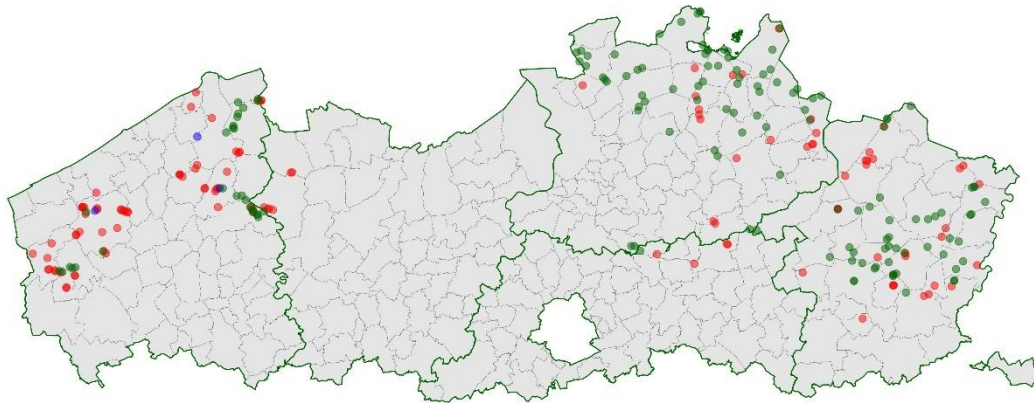
Figuur 26 Verspreiding poelkikker (1 km x 1 km hokken raster Habitatrictlijn) – zwart: 2000-2015, rood 2016-2025. Gegevens: Natuurpunt en INBO.

Historische gegevens zijn onvolledig, maar suggereren het voorkomen van populaties die op heden lijken te zijn verdwenen (**Figuur 27** - Parent, 1984).



Figuur 27 Verspreiding van poelkikker in Vlaanderen volgens Parent (1984).

Naast het verzamelen van genetisch materiaal, beoogde het uitgevoerde veldwerk het bevestigen van de aanwezigheid van poelkikker in gekende en/of vermeende leefgebieden. Daarnaast werd aanvullend een inventarisatie verricht om de aanwezigheid in nieuwe, potentieerlijke locaties na te gaan. In totaal onderzochten we 256 waterpartijen op de aanwezigheid van de soort.



Figuur 28 In 2023-2025 onderzochte waterpartijen met (groen) of zonder (rood) aanwezigheid van poelkikker (n = 256). Blauw: twijfel over aanwezigheid; aanvullend genetisch en morfologisch onderzoek vereist.

In wat volgt bieden we een niet-exhaustieve bespreking van een aantal gebieden waar de aan- of afwezigheid van de soort afwijkt van de voorheen beschikbare kennis.

De afwezigheid van een soort aantonen is lastig. Gericht onderzoek kan indicatie geven hoeveel inspanning dient te worden geleverd om met een bepaalde (hoge) waarschijnlijkheid de afwezigheid van een soort aan te tonen (zie bv. Kéry, 2002). Voor poelkikker ontbreken dergelijke cijfers echter en de bepaling ervan in Vlaanderen valt buiten de scope van dit onderzoek. Zo blijft het tot nader order theoretisch moeilijk, zometeen onmogelijk, de afwezigheid van de soort in een bepaalde gebied aan te tonen. Als best beschikbare proxy proberen we aan te geven na hoeveel bezoeken en hoeveel gevangen kikkers we in de vermelde gebieden geen poelkikker hebben aangetroffen. Als referentiekader beperken we ons tot historische waarnemingen vanaf het jaar 2000.

Oost-Vlaanderen

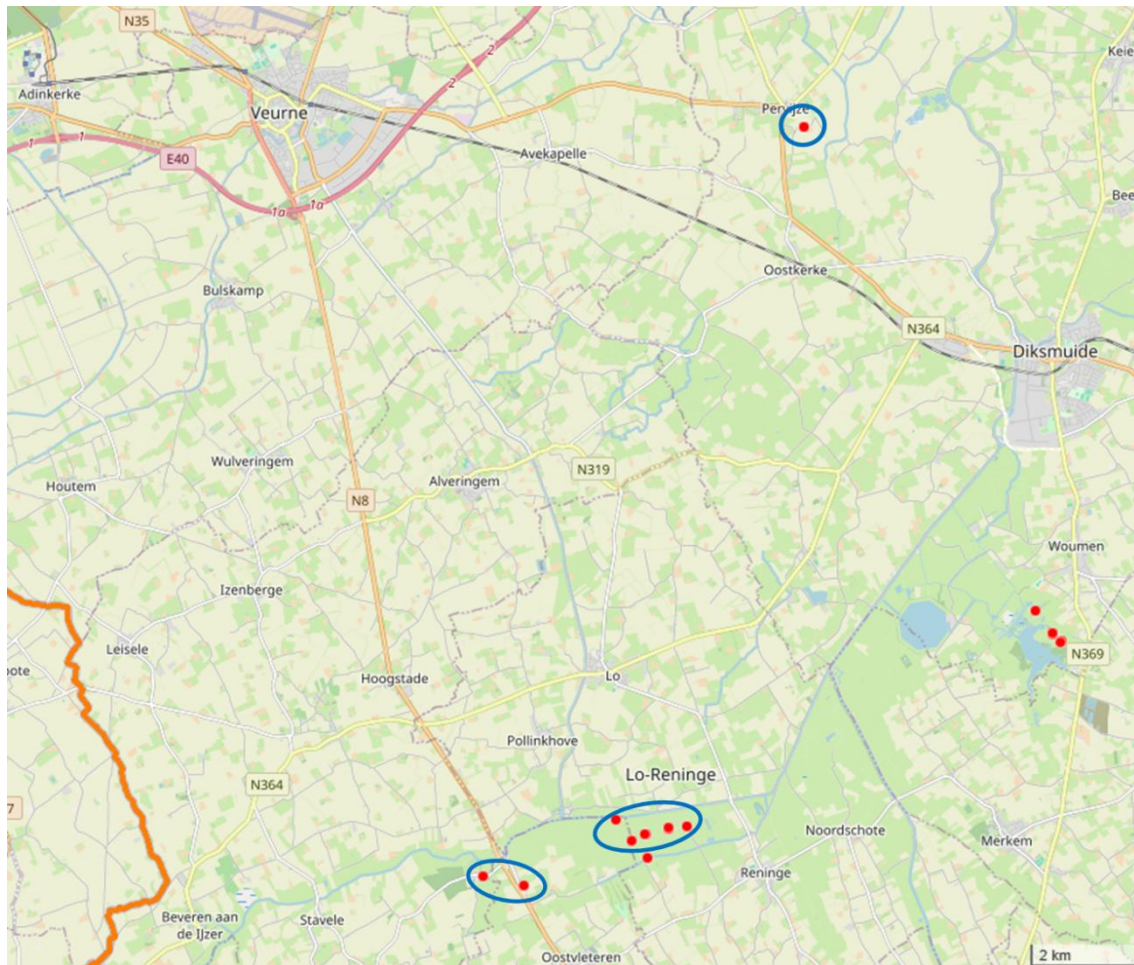
De beschikbare historische waarnemingen van poelkikker uit Oost-Vlaanderen zijn schaars en hebben naar alle waarschijnlijkheid reeds sinds het einde van vorige eeuw geen betrekking meer tot natuurlijke, zichzelf instandhoudende populaties. Ook onze nieuwe inventarisatieresultaten brengen hier voorlopig geen verandering in. Zoektochten in Maldegemveld (26/6/2024: 15 meerkikkers) en Hooggoed (10/7/2025: drie bastaardkikkers) leverden geen waarnemingen van poelkikker op. Wel hebben we de soort in 2025 aangetroffen op een nieuwe West-Vlaamse locatie op amper 100 m van de provinciegrens (Schaatsvijver, Parochieveldbos – 10/7/2025: 10 bastaardkikkers en 6 poelkikkers). Hoewel geschikte waterhabitats schaars lijken, is het mogelijk dat in deze grensomgeving poelkikker op Oost-Vlaams grondgebied aanwezig is. Ook in de regio Knesselare-Ursel-Maldegem kunnen we de aanwezigheid van de soort, hoewel onwaarschijnlijk, niet volledig uitsluiten.

West-Vlaanderen

Gezien de versnipperde aard van het beperkte voorkomen in de provincie West-Vlaanderen en het relatief hoge belang van dit deelgebied binnen het Vlaamse areaal van de soort geniet deze provincie onze bijzondere aandacht.

Uit de Viconia Kleiputten beschikken we slechts over de waarneming van twee mannetjes op 29 mei 2009. We konden er de soort niet vaststellen (8/7/2023: acht bastaardkikkers en één meerkikker, 2/7/2025: 15 bastaardkikkers en één meerkikker – vangsten werden verricht in kleinere waterpartijen; vangen doorheen het hele gebied zou naar alle waarschijnlijkheid een duidelijk groter aandeel meerkikker opleveren).

Het kennisniveau over de aanwezigheid van de poelkikker in de IJzervallei blijft echter laag. De verspreiding van de soort lijkt tot nader order sterk verspreid en de lokale dichtheden zijn laag tot zeer laag. Gedetailleerde inventarisatie van dit groot waterrijk gebied is nodig om de aanwezigheid en abundantie van de soort te bepalen en om te onderzoeken of er nog sprake is van een functionele metapopulatie. De geïsoleerde ligging ten opzichte van de overige Vlaamse populaties versterkt het belang van deze populatie(s) op Vlaams niveau.



Figuur 29 Puntwaarnemingen 2011-2025 - IJzervallei. Nieuwe vindplaatsen INBO aangeduid met blauwe ellipsen. De meeste waarnemingen van De Blankaart kunnen niet geverifieerd worden, al kon INBO auditief de actuele (schijnbaar zeer schaarse) aanwezigheid van de soort bevestigen in 2024. Kaart: OpenStreetMap. Gegevens: Natuurpunt en INBO.

Brugse Bossen

Hoewel de soort nog steeds vermeld wordt voor deze regio, zijn er geen verifieerbare recente waarnemingen uit de bos- en groengebieden ten zuidwesten van Brugge.

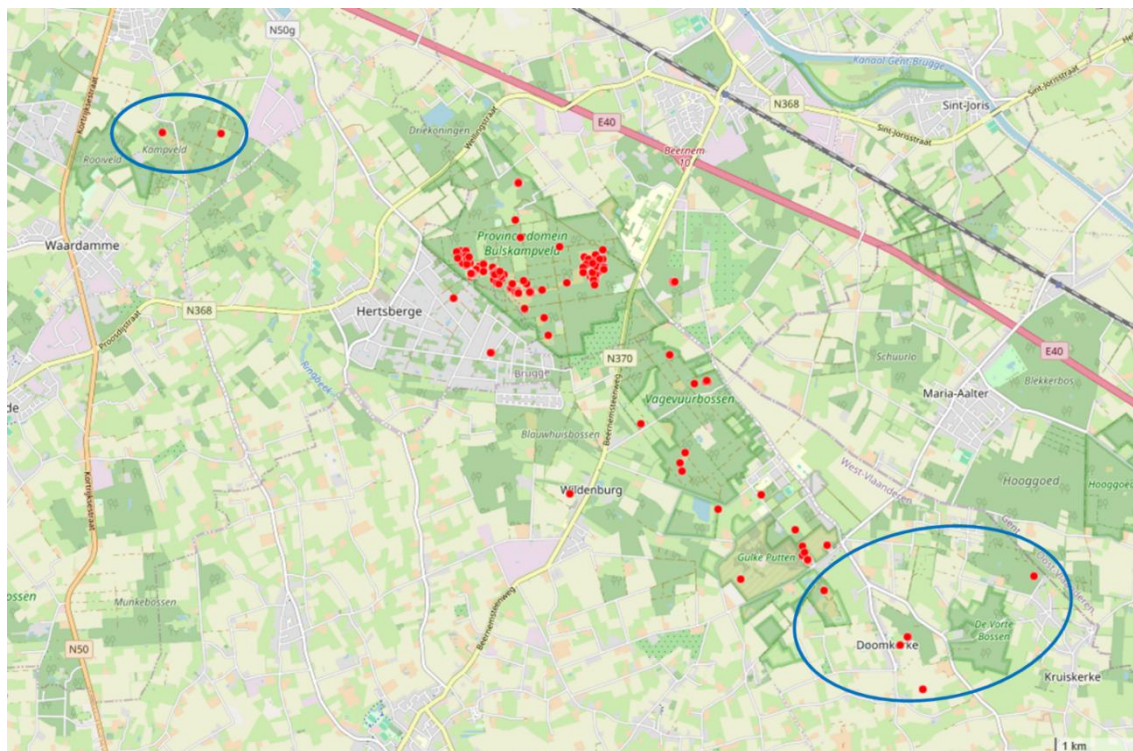
Op het voormalig militair domein Vloethemveld (op de grens van Zedelgem en Jabbeke) werden op 26 augustus 2000 drie mannetjes en één vrouwtje waargenomen door Robert Jooris. Door het ontbreken van foto's of geluidsopnames kunnen waarnemingen van latere datum niet gecontroleerd worden. Het gebied werd door ons drie keer onderzocht. Dit leverde telkens bastaardkikkers en meerkikkers op, maar geen poelkikkers - 3/7/2023: 27 bastaardkikkers en 3 meerkikkers; 6/6/2024: 50 bastaardkikkers en 2 meerkikkers; 17/7/2025: 58 bastaardkikkers en 62 meerkikkers. Ondanks de aanwezigheid van schijnbaar geschikt habitat (vochtige heide, vergraafbare grond, tal van kleine waterpartijen, ...) lijkt poelkikker hier zeer schaars of afwezig. De aanwezigheid van de invasieve meerkikker in Vloethemveld was tot vóór ons onderzoek niet gedocumenteerd.

Uit dezelfde regio beschikken we over één andere historische waarneming in Zevenkerken (Sint-Andries) van één volwassen mannetje op 26 mei 2003. Voorlopig leverde een zoektocht in dit

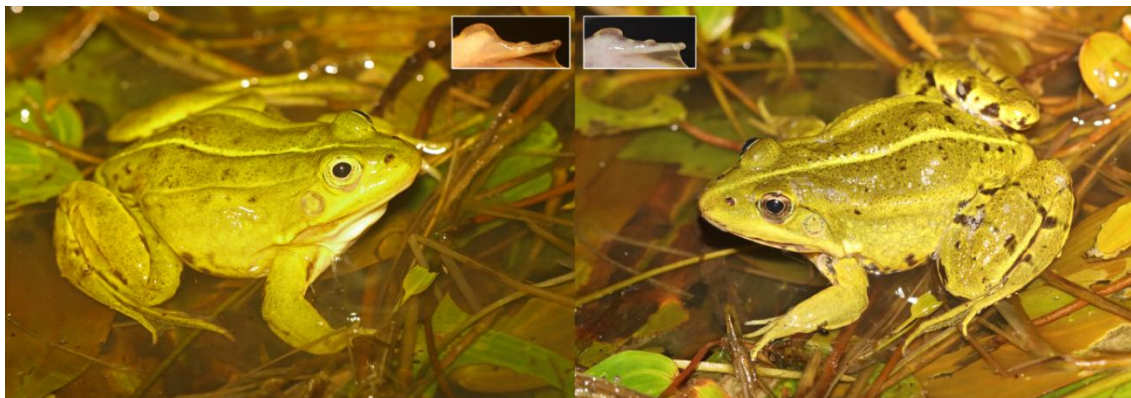
gebied alsook het nabije Beisbroekbos (6/7/2025) geen waarnemingen van groene kikkers op. Verder onderzoek is noodzakelijk.

Bulskampveld en ruime omgeving

De aanwezigheid van poelkikker in voedselarme habitats in Beernem (Aanwijspuiten en Heideveld Bornebeek) is reeds lang gekend. Ons onderzoek bevestigde de aanwezigheid van de soort in de ruime omgeving van het Bulskampveld. Met verifieerbare waarnemingen uit Hertsberge, de Vagevuurbossen en de Gulke Putten vergrootte het areaal van deze populatie reeds met ongeveer een drievoud (**Figuur 30**). In 2025 konden we hierin nieuwe vindplaatsen toevoegen in Kampveld, Predikherenbossen/Disveld, Gallatasbossen en Parochieveldbos, waardoor het areaal (indien we ons baseren op de contouren van de beschikbare waarnemingen) nogmaals met ruim een factor twee vergroot werd. In het totnogtoe meest westelijke actuele voorkomen (want zie Brugse Bossen) is de aanwezigheid van meerkikker het vermelden waard. In een grote plas in Kampveld vingen we op 30/6/2025 17 poelkikkers, 3 bastaardkikkers en 2 meerkikkers. Opvolging van de mogelijke opmars van meerkikker is aangewezen.



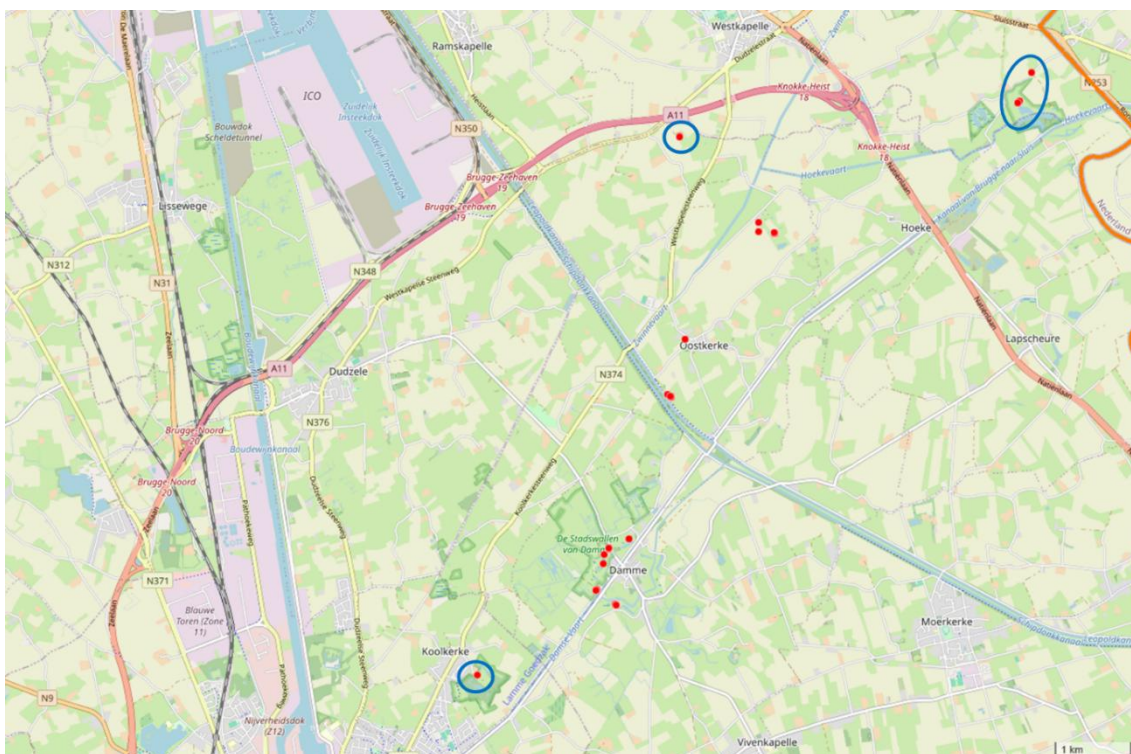
Figuur 30 Puntwaarnemingen 2011-2025 - Bulskampveld en ruime omgeving. Nieuwe vindplaatsen INBO aangeduid met blauwe ellipsen. Kaart: OpenStreetMap. Gegevens: Natuurpunt en INBO.



Figuur 31 Adult mannetje poelkikker (links) en jong mannetje bastaardkikker (rechts) van de nieuw ontdekte locatie in het Parochieveldbos (West-Vlaanderen op ca. 100 m van de grens met Oost-Vlaanderen). Inzet: graafknobbel en eerste teen.

Damme en ruime omgeving

We weten reeds sinds het eerste decennium van deze eeuw dat de rond Damme aanwezige poelkikkerpopulatie zich uitstrekt tot ten noorden van het Schipdonkkanaal en het Leopoldkanaal. In 2025 ontdekten we in en rond de Sint-Donaaspolder een populatie die op ongeveer nog eens 3,5 km verder noordoostwaarts ligt (**Figuur 32**). Ook zuid(west)waarts konden we een uitbreiding van ongeveer 2 km ontdekken, met voorkomen van poelkikker (met weliswaar eigenaardige morfologie) nabij het Fort van Beieren (Koolkerke).

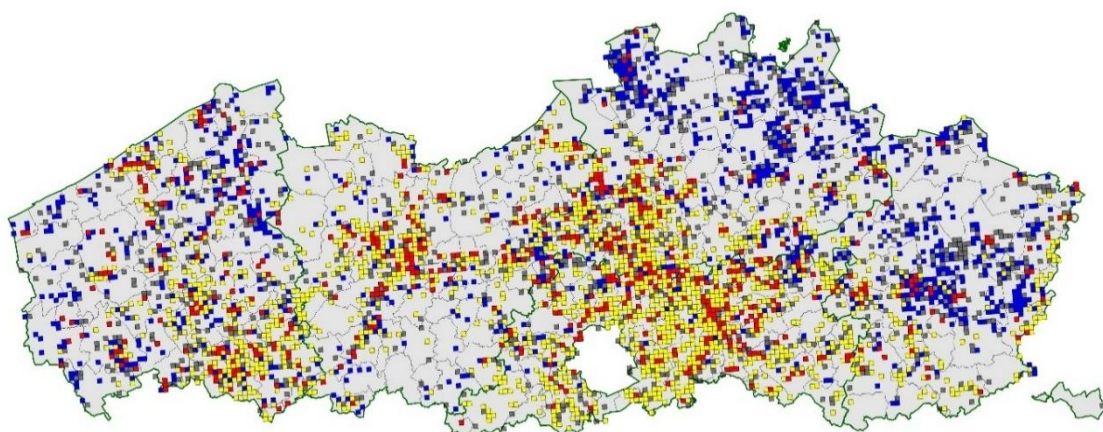


Figuur 32 Puntwaarnemingen 2011-2025 - Damme en ruime omgeving. Nieuwe vindplaatsen INBO aangeduid met blauwe ellipsen. Kaart: OpenStreetMap. Gegevens: Natuurpunt en INBO.

2.3.3.1.2 Meerkikker en bastaardkikker

Gezien de reële dreiging die invasieve meerkikkers vormen voor de inheemse poel- en bastaardkikker, moeten we over een accuraat en actueel beeld beschikken van de verspreiding van meerkikker in Vlaanderen. Zo kunnen contactzones tussen meerkikker en poelkikker (maar ook bastaardkikker) in beeld gebracht worden en gerichte beheersacties informeren.

De beschikbare gegevens waren hiervoor op verschillende manieren ontoereikend. Hoewel het volume aan groenekikkerwaarnemingen sterk groeide, is er geen uitsluitend over de juistheid van de waarnemingen. Zonder foto is dit onmogelijk te verifiëren. Zelfs met foto kan vaak geen soortdeterminatie met zekerheid worden uitgevoerd. Daarnaast wordt door waarnemers met toenemende mate gekozen om groene kikkers als niet nader te determineren groene kikker in te voeren (en niet als één van de soorten). Voor wat betreft de waarnemingen met bewijsmateriaal (foto of geluid) zorgde dit vervolgens voor een grote bron aan potentieel verfijnbare determinaties. Daarom voerde INBO validatie uit van 10.821 waarnemingen met foto's.



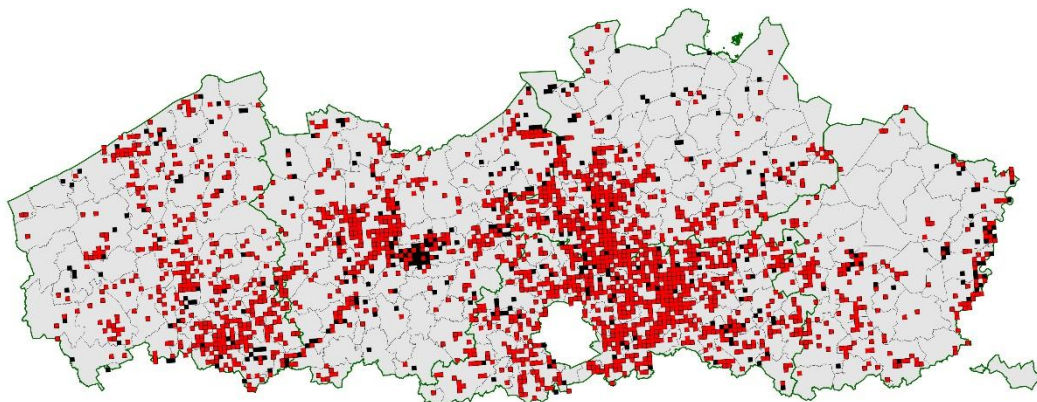
Figuur 33 Verspreiding van bastaard- en meerkikker in Vlaanderen op basis van waarnemingen (2004-2025) met verifieerbaar bewijsmateriaal (foto of geluid). Blauw: minstens één verifieerbare bastaardkikkerwaarneming, geen verifieerbare meerkikkerwaarnemingen, geel: minstens één verifieerbare meerkikkerwaarneming, geen verifieerbare bastaardkikkerwaarnemingen, rood: minstens één verifieerbare bastaardkikkerwaarneming en minstens één verifieerbare meerkikkerwaarneming, grijs: enkel waarnemingen van niet nader gedetermineerde groene kikkers (excl. poelkikker). Gegevens: Natuurpunt en INBO.

Hoewel voor heel wat hokken nog steeds enkel verifieerbare waarnemingen van “onbekende” groene kikkers beschikbaar zijn, stelt de door ons geleverde validatiesprong de verspreidingspatronen op scherp. Zo zien we dat de gebieden waar meerkikker tot op heden schaars of quasi afwezig is sterk overlappen met het Vlaamse areaal van poelkikker. Of dit een ecologische verklaring heeft (zoals nichesegregatie), is moeilijk te zeggen, aangezien de huidige verspreiding van de invasieve meerkikkers een weerspiegeling is van meerdere anthropogene introducties. Wel duiken verspreid doorheen de poelkikkerleefgebieden reeds her en der waarnemingen van meerkikker op (zie **Figuur 33**).

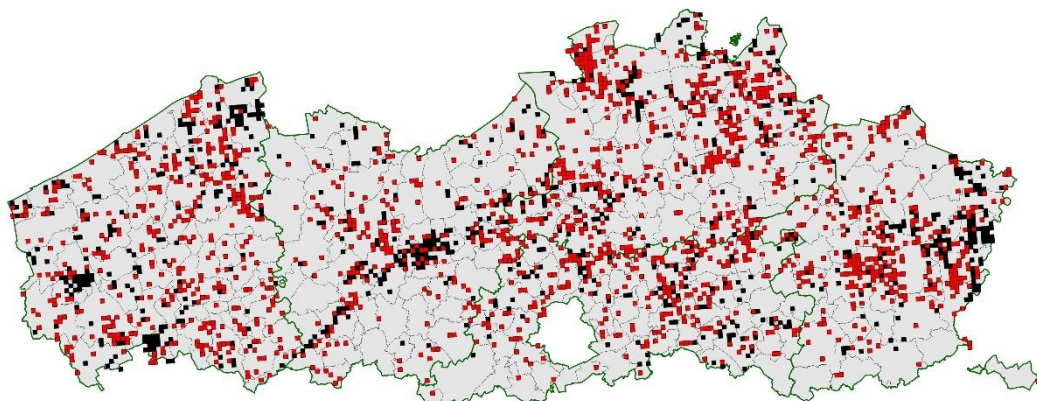
Ondanks waarnemerseffecten, lijkt het duidelijk dat meerkikker domineert in onder meer nagenoeg de hele provincie Vlaams-Brabant, de niet-Kempische delen van de provincies

Antwerpen en Limburg en de valleien van Schelde en Leie. Ook langs de Grensmaas treffen we in heel wat kilometerhokken enkel (nog) meerkikker aan, waarbij gevreesd wordt dat de soort zich verder westwaarts doorheen Limburg zou verspreiden en zo ook leefgebieden van poelkikker zou binnendringen. Hetzelfde scenario zou zich kunnen ontrollen naar met name de meso- en eutrofe poelkikkerhabitats in West-Vlaanderen (metapopulaties Damme en IJzervallei).

De afwezigheid van waarnemingen is deels te verklaren door waarnemerseffecten. Een lagere dichtheid aan waarnemers resulteert in een lagere dichtheid aan waarnemingen. Anderzijds is gekend dat bepaalde regio's historisch nagenoeg door geen enkele groenekikkersoort bezet waren (bv. Vlaamse Ardennen, zuiden van Vlaams-Brabant)(Jooris & Holsbeek, 2010).



Figuur 34 Verspreiding meerkikker s.l. met en zonder foto vanaf 2000. Rood: minstens één gevalideerde waarneming met foto, zwart: minstens één gevalideerde waarneming zonder foto en geen gevalideerde waarnemingen met foto beschikbaar.

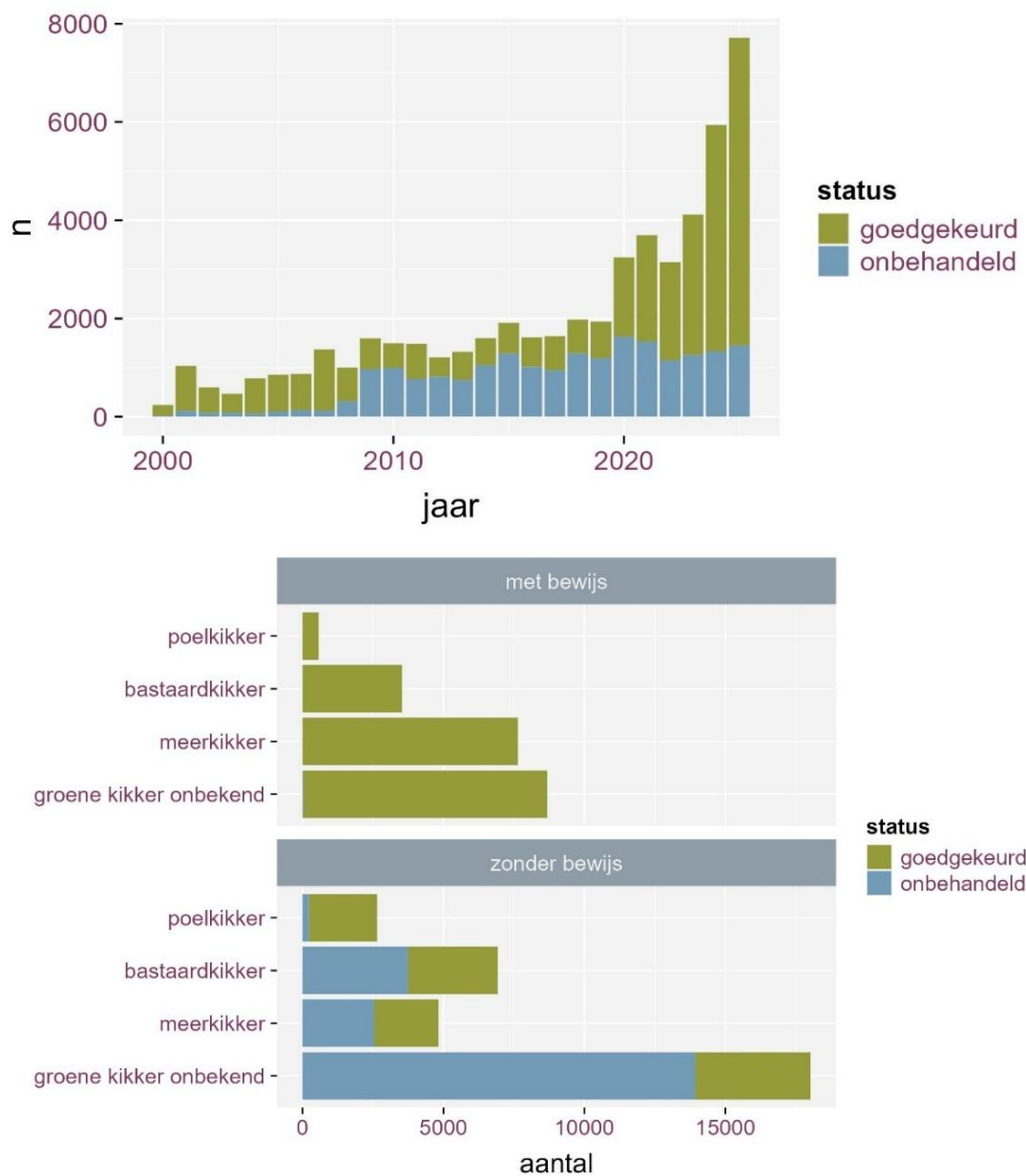


Figuur 35 Verspreiding bastaardkikker met en zonder foto vanaf 2000. Rood: minstens één gevalideerde waarneming met foto, zwart: minstens één gevalideerde waarneming zonder foto en geen gevalideerde waarnemingen met foto beschikbaar.

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

De hoeveelheid nieuwe waarnemingen neemt jaarlijks toe en de achterstand in het valideren van waarnemingen van groene kikkers blijft aanzienlijk. Wel hebben we voor de periode sinds 2000 en tot en met 20 oktober 2025 het aantal waarnemingen met foto's van "onbekende groene kikkers" sterk doen afnemen (**Figuur 36**). Onbehandelde waarnemingen zonder foto blijven talrijk en moeilijk te valideren.

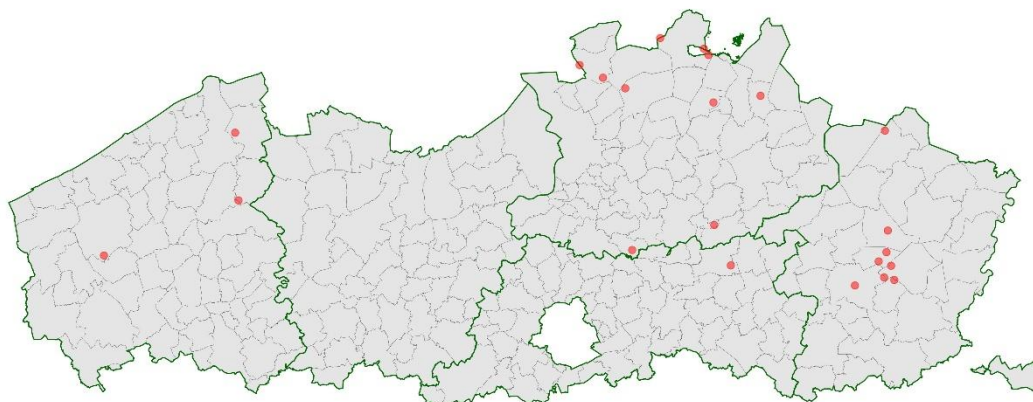
De hoeveelheid nieuwe waarnemingen neemt jaarlijks toe en de achterstand in het valideren van waarnemingen van groene kikkers blijft aanzienlijk. Wel hebben we voor de periode sinds 2000 en tot en met 20 oktober 2025 het aantal waarnemingen met foto's van "onbekende groene kikkers" sterk doen afnemen (**Figuur 36**). Onbehandelde waarnemingen zonder foto blijven talrijk en moeilijk te valideren.



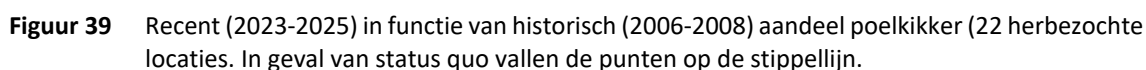
Figuur 36 Validatiestatus van waarnemingen van groene kikkers (boven: totaal per jaar, onder: type per taxon) van 2000 tot en met 20/10/2025. Bron: Natuurpunt.

2.3.3.2.2 Evolutie (2006-2008 vs. 2023-2025)

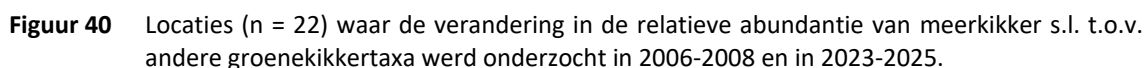
De toen geselecteerde locaties liggen niet random over Vlaanderen verspreid, maar vertonen ruimtelijke vertekening. Bovendien werd in grote mate gekozen voor tuinvijvers in particuliere eigendom. Toch bieden de toen zowel morfologisch als genetisch gefundeerde determinaties van een aantal groene kikkers op verschillende locaties een zeldzame kans om veranderingen in de relatieve abundantie van de taxa na te gaan.

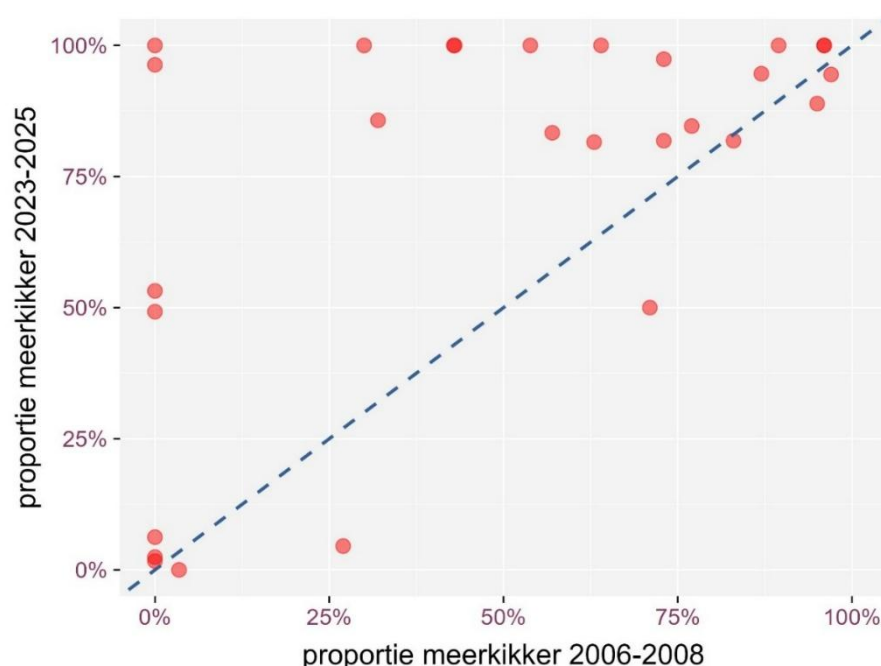


Figuur 38 Locaties (n = 22) waar de verandering in de relatieve abundantie van poelkikker t.o.v. andere groenekkertaxa werd onderzocht in 2006-2008 en in 2023-2025.



De data van Holsbeek *et al.* (2008) bevatte ook een reeks locaties zonder poelkikker, maar met bastaardkikker en soms ook toen al meerkikker. De impact van meerkikker op bastaardkikker is tot op heden in binnen- maar ook buitenland zo goed als niet onderzocht. Omdat meerkikker als invasieve soort voor zowel poelkikker als bastaardkikker een bedreiging kan vormen, is het zinvol ook de evolutie van meerkikker te bestuderen waar poelkikker niet aanwezig is.





Figuur 41 Recent (2023-2025) in functie van historisch (2006-2008) aandeel meerkikker (29 herbezochte locaties). In geval van status quo vallen de punten op de stippellijn.

Het aandeel meerkikker (op basis van 29 herbezochte locaties) is significant gestegen (GLMM met logit link en periode als fixed effect en locatie als random effect: $p < 0.001$) van 24.9 % (95% confidentie-interval: 17.8-33.7 %) naar 33.5 % (95% confidentie-interval: 24.7-43.6 %). De relatieve toename van meerkikker ten opzichte van bastaardkikker is duidelijk en groter dan de relatieve afname van poelkikker ten opzichte van andere groene kikkersoorten (zie hoger). In sommige locaties waar meerkikker anno 2006-2008 nog volledig ontbrak (en enkel bastaardkikker werd vastgesteld), is de soort (s.l.) nu talrijk aanwezig, met soms zelfs quasi of totale afwezigheid van bastaardkikker als resultaat.

2.4 HABITAT EN RELATIEVE ABUNDANTIE

2.4.1 Inleiding

Habitatfragmentatie kan steeds kleiner wordende leefgebieden van poelkikker herleiden tot functionele eilanden in een landschapsmatrix die een zee van bastaardkikkers bevat. Zo kan toenemende fragmentatie een relatief grotere instroom van bastaardkikkers uit gebieden die buiten de poelkikkerleefgebieden liggen veroorzaken en zorgt habitatfragmentatie enkel indirect tot een mogelijk negatieve invloed van bastaardkikker op poelkikker. Poelkikker komt in Vlaanderen echter van nature al altijd samen voor met bastaardkikker. Zonder de invloed van habitatfragmentatie is het samen voorkomen van beide taxa dus normaal. Bastaardkikker beheersmatig elimineren is dan ook (naast onhaalbaar) onzinnig. Om het natuurlijk evenwicht tussen bastaardkikker en poelkikker niet te verstoren en in de richting van een dominantie van bastaardkikker en/of meerkikker te leiden, is het echter wel aangewezen kwaliteit en kwantiteit van poelkikkerleefgebieden te beschermen.

De opmars van uitheemse meerkikkers vormt echter wel een groeiende bedreiging. Daar waar deze vooralsnog in hoofdzaak impact lijken te hebben op de Vlaamse bastaardkikkers en nog maar beperkt aanwezig zijn in poelkikkerleefgebied, laten habitatkenmerken van met name de meer voedselrijke leefgebieden vermoeden dat de negatieve effecten van meerkikker nog moeten naar voren treden in de toekomst.

In dit onderdeel:

1. bespreken we de algemene kenmerken van Vlaamse poelkikkerhabitats
2. onderzoeken we de relatie tussen de relatieve abundantie van poelkikker en habitatkenmerken

We trachten habitatkenmerken te ontwaren die voor poelkikker relatief gunstig(er) zijn dan voor bastaardkikker door relatieve abundantie (poelkikker versus bastaardkikker) in verband te brengen met habitatkenmerken. Absolute abundanties of populatiegroottes zijn niet beschikbaar. Het bepalen ervan is arbeidsintensief en viel buiten de scope van deze opdracht. De doelstelling van dit onderzoeksluik is na te gaan of bepaalde habitatkenmerken in verband staan met het relatief aandeel poelkikker in de mengpopulaties van poelkikker en bastaardkikker. Beheer richten op deze kenmerken kan mogelijk de poelkikker relatief gezien bevoordelen ten opzichte van de in syntopie voorkomende bastaardkikker. In eerste instantie is het echter van groter belang beide soorten relatief in het voordeel te stellen ten opzichte van de invasieve meerkikkers. Hiervoor beschikken we echter niet over de gepaste gegevens. De aanwezigheid van meerkikker is te recent en nog in evolutie, waardoor we geen dynamisch evenwicht met poelkikker kunnen veronderstellen. Bovendien is het aantal gebieden met samen voorkomen van meerkikker en poelkikker vooralsnog beperkt. We gebruiken hier bastaardkikker als model voor een minder habitatkritische en grotere syntoop voorkomend groenekikker soort, waarbij we aannemen dat eventueel waargenomen habitatvoorkeursverschillen scherper zouden zijn indien we poelkikker tegenover meerkikker zouden kunnen plaatsen.

We werken enkel met beschikbare kaartlagen. Analyse van habitatkenmerken in het veld (zowel eenvoudig waarneembare variabelen als bemonstering die verdere analyse in een laboratorium vereisen) viel buiten de scope en begroting van deze (vooral op het genetisch onderzoek gerichte) opdracht.

2.4.2 Materiaal en methode

Relatieve abundantie

De responsvariabele in dit luik is de proportie poelkikker in de som van poelkikker en bastaardkikker zoals deze werd bepaald tijdens de vangsten in 2023-2025 (zie 2.3.3.2). Voor analyse gebruikten we enkel locaties waar minimaal 20 kikkers (van beide taxa samen) werden gevangen. Locaties met meer dan 5 % meerkikker beschouwden we als te verstoord om de natuurlijke link tussen de verhouding van inheemse taxa (poelkikker en bastaardkikker) en habitat te onderzoeken en werden verwijderd.

Buffers

We berekenden buffers rondom de locaties waar de kikkers gevangen werden. Hoewel dispersieafstanden slecht gekend zijn en sterk contextafhankelijk zijn (en in Vlaanderen ten gevolge van habitatfragmentatie vermoedelijk gelimiteerd), werden relevante bufferstralen gekozen in overeenstemming met de beschikbare literatuur inzake dispersie van poelkikker (bv. Holenweg, 2001): 100 m, 500 m en 1000 m.

Habitatkennerken

We voerden intersecties uit van de bekomen buffers met een aantal beschikbare kaartlagen.

Watervlakkenlaag –

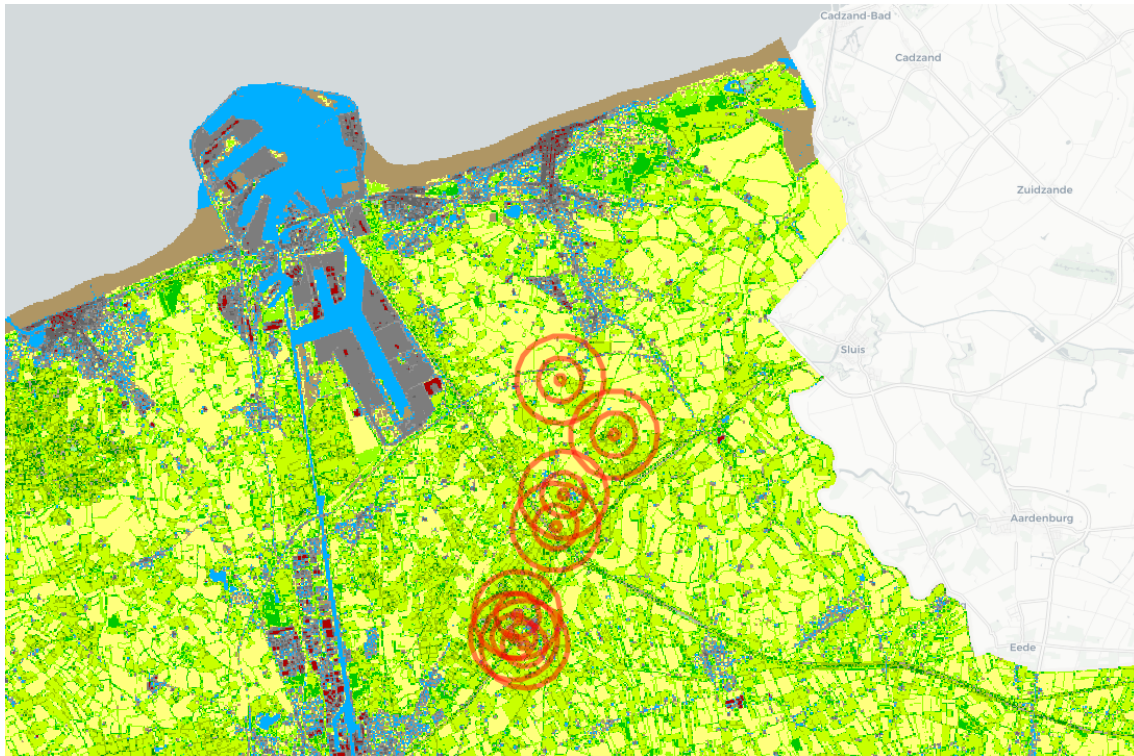
<https://www.vlaanderen.be/datavindplaats/catalogus/watervlakken-versie-2024>

We berekenden het aantal stilstaande wateren en de totale wateroppervlakte binnen elke buffer alsook de oppervlakte van de waterpartij waarin de kikkers werden gevangen.

Bodembedekkingskaart (BBK) –

<https://www.vlaanderen.be/datavindplaats/catalogus/bodembedekkingskaart-bbk-1m-resolutie-opname-2021>

We kwantificeerden landgebruik rondom de staalnamelocaties door per buffer de oppervlakte per categorie te bepalen. Hiervoor reduceerden we de categorieën van de bodembedekkingskaart tot een beknopte set: akker, bomen, grasland, onbegroeid, urbanisatie, water en weiland (i.e. graslanden aangeduid in agrarisch gebruik).



Figuur 42 Voorbeeld van buffers (100 m, 500 m en 1000 m) rond een aantal bemonsteringslocaties in de metapopulatie rondom Damme (West-Vlaanderen) op de Bodembedekkingskaart 2021. Bron kaart: Geopunt.

Biologische waarderingskaart (BWK) –

<https://www.vlaanderen.be/datavindplaats/catalogus/biologische-waarderingskaart-en-natura-2000-habitatkaart-toestand-2023>

We kwantificeerden de door de BWK onderscheiden habitattypes rondom de staalnamelocaties door per buffer de oppervlakte per hoofdtype en per subtype te bepalen.

Om bij analyse niet ten prooi te vallen aan combinatorische explosie door een te hoog aantal variabelen is ook hier (zie BBK) een reductie van het aantal types nodig. Van de hoofdtypes weerhielden we enkel deze die in minstens 10% van de buffers voorkomen ($n = 13$). Van de subtypes weerhielden we enkel deze die in minstens 50% van de buffers voorkomen (eveneens $n = 13$).

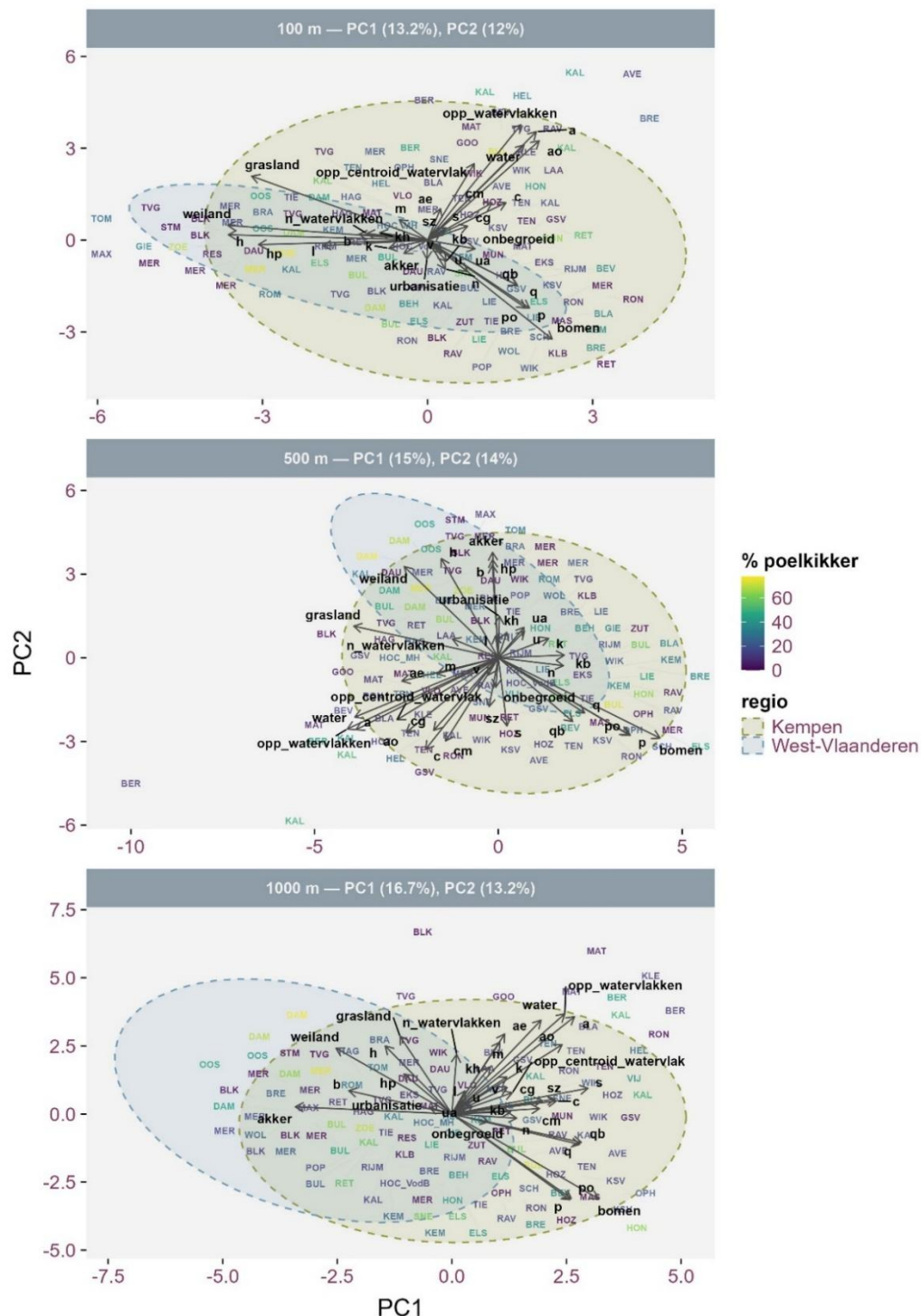
Analyse

Om de variatie in de maximale set aan geselecteerde habitatvariabelen te verkennen, voerden we een Principale componentenanalyse (PCA) uit. Dit is een statistische methode die wordt gebruikt om de variatie in een dataset te beschrijven met zo weinig mogelijk dimensies (componenten), door nieuwe, onderling onafhankelijke variabelen te creëren — de zogenaamde principale componenten — die elk een zo groot mogelijk deel van de totale variantie in de oorspronkelijke data verklaren.

Tenslotte modelleerden we (beta-binomiale GLMM – Generalized Linear Mixed Model) de relatieve abundantie van poelkikker in functie van een nog beperktere selectie van voorspellende variabelen die we selecteren op basis van hun ecologische relevantie en door

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

2.4.3 Resultaten



Figuur 43 Voornaamste principale componenten (PC1 en PC2) per buffergrootte (100, 500 of 1000 m) van habitatkenmerken. De puntwaarnemingen worden weergegeven met hun sitecode (zie Tabel 6), waarvan de kleur de relatieve abundantie van poelkikker illustreert. De in het zwart vet gedrukte namen geven de habitatvariabelen weer, met de pijlen als indicatie van het belang van elke variabele (lengte van de pijl) en hun onderling verband (richting van de pijl – pijlen die in dezelfde richting wijzen staan in onderling positief verband, pijlen met tegengestelde richting staan in negatief verband, pijlen die loodrecht op mekaar staan houden geen verband). BWK-codes - zie www.vlaanderen.be/inbo/de-biologische-waarderingskaart/bwk-karteringseenheden.

Vervolgens voerden we GLMM-modellering uit (beta-binomiaal) waarbij de proportie poelkikker als respons geldt en de oppervlakte van een aantal habitattypes als predictoren. De predictor 'regio' wordt toegevoegd voor West-Vlaanderen versus de Kempen, alsook een random effect voor populatie (aangezien de staalnamelocaties ruimtelijk gegroepeerd liggen in gebieden/populaties). Ook hier vinden we weinig sterke relaties tussen de relatieve abundantie aan poelkikkers en de gebruikte variabelen. De manier waarop de tekens van de schattingen (rood voor positief en blauw voor negatief in de figuur) zich onderling verhouden strookt met de PCA. Er zijn nagenoeg geen statistisch significante effecten, met uitzondering van een negatief verband tussen poelkikkertaandeel en de totale wateroppervlakte in de buffer met diameter 500 m en een bijna significant positief verband met de oppervlakte van het onderzochte watervlak.

Figuur 44 Resultaten modellering GLMM voor drie buffergroottes rondom locaties waar kikkers werden gevangen. Schatting: parameterschatting, met rood voor positief verband en blauw voor negatief verband. Cijfers in de tegels zijn p-waarden. Significantienniveau - •: $p = 0,05$; 0,10; *: $p < 0,05$; zonder symbool: niet significant.

Waterhabitat

Landhabitat

De poelkikkerproportie lijkt in positief verband te staan met open landschappen. Landschappen rijk aan bos, loofhoutaanplanten, struweel en houtkanten lijken meer gelinkt aan hogere proporties van bastaardkikker.

Zowel voor water- als landhabitat ontbreken cruciale gegevens om een groter deel van de variatie in de proportie aan poelkikker te kunnen verklaren. Voor de waterhabitat vermelden we de aanwezigheid van (inheemse en uitheemse) vis en vegetatie (oever, submers, drijvend) alsook diverse fysicochemische watervariabelen, permanentie en fluctuatie van waterbeschikbaarheid. Voor landhabitat is onder meer de (werkelijke) connectiviteit van belang, waarbij in de context van invasieve soorten (waaronder meerkikker) een hoge graad van connectiviteit potentieel nefast kan zijn.

Algemeen is voorzichtigheid geboden, aangezien de resultaten een vertekend beeld kunnen geven aangezien de onderzochte locaties zich allemaal in huidig of (vermeend) historisch leefgebied van de poelkikker bevinden. Daar staat tegenover dat de soort in verschillende locaties niet gevangen werd (17 van de 124 locaties met bastaardkikker, maar geen poelkikker, versus aanwezigheid van bastaardkikker vastgesteld op alle locaties), waardoor de variatie binnen de data gunstig beïnvloed wordt.

Het is van groot belang in gedachten te houden dat dit model in het beste geval inzichten verleent over de verhouding tussen poelkikker en bastaardkikker. Het zegt dus niets over welke variabelen bijdragen tot grote populaties van poelkikker. Die kunnen namelijk voorkomen in syntopie met (grote) populaties van bastaardkikker. Verschillende leefgebiedenkenmerken en -onderdelen zijn gunstig voor beide taxa en dus ook voor de poelkikker.

3.1 TOESTAND VAN DE VLAAMSE POELKIKKERPOPULATIES EN BEDREIGINGEN

De huidige staalname was in hoofdzaak gericht op het bemonsteren van poelkikkers. Door het lage aantal bemonsterde bastaardkikkers per locatie en populatie kunnen we niet uitsluiten dat een hogere aanwezigheid aan triploïde bastaardkikkers voor lagere genetische diversiteit binnen de poelkikkers zou zorgen. De trefkans van triploïde bastaardkikkers lag gemiddeld iets hoger in de Antwerpse populaties ten opzichte van de Limburgse, waar doorgaans de poelkikkers een hogere genetische diversiteit vertoonden. Daartegenover waren de West-Vlaamse populaties het meest genetisch divers, terwijl polyploïden er relatief frequent voorkwamen. Wel werd duidelijk dat lage diversiteit in het L-genoom verbonden was aan de isolatiegraad van de populaties in de Kempen (Gierls Bos, Tommelen, 't Merkske, Beverbeekse Heide). In combinatie met habitatdegradatie zorgt een gebrek aan influx van nieuwe poelkikkerallelen ervoor dat kleine populaties genetisch verarmen. Mogelijk zijn sommige van de West-Vlaamse populaties

In een poging om oorzaken van de (toegenomen) relatieve abundantie van bastaardkikker te preciseren voerden we een analyse uit waarbij we de relatieve abundantie van poelkikker (in verhouding tot bastaardkikker) trachtten in verband te brengen met kenmerken van de leefgebieden inzake landschap en habitat. De resultaten zijn in lijn met wat in de literatuur gesteld wordt over habitatvereisten van poelkikker in contrast met deze van andere groene kikkersoorten (Holenweg *et al.* 2002; Plötner *et al.* 2025). Poelkikker is bij uitstek een soort van open, halfnatuurlijke landschappen zoals weerspiegelt in haar actueel Vlaams voorkomen in complexen van grasland en (vochtige) heideterreinen. Waar poelkikker in bosrijke gebieden voorkomt, zijn deze gebieden ook relatief talrijker bevolkt door bastaardkikker. De relatieve abundantie van de soort t.o.v. bastaardkikker is verder groter in gebieden waar de totale oppervlakte aan water eerder beperkt is. Waar grote watervlakken aanwezig zijn, is de proportie poelkikker ten opzichte van bastaardkikker lager.

Poelkikker is in verhouding tot bastaardkikker duidelijk talrijker aanwezig in het gros van de West-Vlaamse populaties dan in de Antwerpse en Limburgse leefgebieden. De genetisch duidelijk gescheiden aard van deze populaties kan laten vermoeden dat andere variabelen hier ook een rol spelen. Dat deze West-Vlaamse populaties bovendien nog meer beperkt zijn inzake leefgebiedoppervlakte en dat de versnipperingsgraad hier nog hoger is, zorgt ervoor dat ze bijzondere aandacht verdienen.

Vergelijking tussen onze observaties en deze van een kleine twintig jaar geleden tonen een significante toename van meerkikker in Vlaanderen. Hoewel we niet beschikken over duidelijke documentatie van de evolutie van het verspreidingsbeeld van deze taxa, kunnen we door uitgebreide validatie van foto's die door middel van citizen science (Natuurpunt -

www.waarnemingen.be) beschikbaar zijn vaststellen dat meerkikkers actueel wijd verspreid voorkomen in Vlaanderen.

Hoewel reeds eerder gemeld (Jooris & Holsbeek, 2010) is de invasie van meerkikkers in Vlaanderen grotendeels onderbelicht gebleven. Deze (onder)soorten toevoegen aan onze natuurlijke aquatische systemen reikt echter verder dan de ene groenekikkersoort vervangen door de andere. Meerkikkers worden veel groter en produceren veel meer nakomelingen, waardoor ze bestaande evenwichten in ecosystemen onvermijdelijk doen verschuiven. Ze vormen niet alleen een predator en competitor voor inheemse groene kikkers, maar ook voor andere soorten. Ze nemen gebieden in waar groene kikkers historisch afwezig waren (zoals het zuiden van de provincies Oost-Vlaanderen, Vlaams-Brabant en Limburg) en waar bedreigde soorten waaronder vroedmeesterpad *Alytes obstetricans* aan hen ten prooi vallen.

De impact op bastaardkikker konden we illustreren. De verwachting is dat de expansie van meerkikker in Vlaanderen nog aan de gang is. Op heden zien we reeds belangrijke aanwezigheid van meerkikkers in een aantal leefgebieden van poelkikker, waaronder de IJzervallei, de geïsoleerde poelkikkerpopulatie van Rijmenam en omgeving en populaties in het oosten van Limburg die wellicht worden gekoloniseerd vanuit de Maasvallei (De Brand, Tösch-Langeren, Bergerven). Meerkikker is ook aanwezig in een aantal gebieden waar poelkikker voorheen aanwezig was maar waar we de soort nu niet meer aantreffen (Vloethemveld, Maaswinkel, Buitengoor). In sommige (potentieel voormalige) poelkikkerleefgebieden komt naast meerkikkers bovendien Amerikaanse stierkikker voor (Torfven, waar we poelkikker nog heel schaars aantreffen, Asbroek / Het Goor), waarvan de ecologische impact voldoende bekend is. Naar alle waarschijnlijk zullen in de toekomst ruimere delen van het Vlaamse areaal van de poelkikker nog verder ingenomen worden. Omdat het niet haalbaar lijkt de influx van meerkikker te verhinderen, kunnen we enkel trachten het beheer op poelkikker af te stemmen. Nog verregaander dan voor bastaardkikker, leveren grotere, diepere en minder vegetatierijke waterpartijen een competitief voordeel voor de diverse mix aan meerkikkers in Vlaanderen.

Tabel 6 Poelkikkerleefgebieden in Vlaanderen geordend volgens door INBO aangetroffen proportie poelkikker. * : In het Vijvergebied Midden-Limburg komt meerkikker voor, maar hebben we deze niet aangetroffen in de onderzochte poelkikkerhabitats.

provincie	sitecode	gebied	proportie poelkikker	invasieve kikkers
WVL	VLO	Vloethemveld	niet waargenomen	meerkikker
WVL	BEI	Beisbroek	niet waargenomen	
ANT	VIS	Visbeekvallei	niet waargenomen	
ANT	RON	Den Diel	niet waargenomen	
ANT	BUI	Buitengoor / Meergoor	niet waargenomen	meerkikker
ANT	TOR	Torfven	niet waargenomen	meerkikker / stierkikker
ANT	ASB	Het Goor - Asbroek	niet waargenomen	meerkikker / stierkikker
LIM	RIE	Riebos	niet waargenomen	
LIM	WIT	Witteberg	niet waargenomen	
LIM	STM	Sint-Maartensheide / Mariahof / Stramprooierbroek	niet waargenomen	meerkikker
LIM	BOS	Bosbeekvallei	niet waargenomen	
LIM	HOZ	Neerharerheide	niet waargenomen	
LIM	MAA	Maaswinkel	niet waargenomen	meerkikker
LIM	DAU	Dauteweyers	niet waargenomen	meerkikker
LIM	HER	Herkenrode	niet waargenomen	meerkikker
LIM	WIK	Welleke / Ballewijers / Slangebeekbron	niet waargenomen	
LIM	WEL	Grote Beemd (Wellen)	niet waargenomen	meerkikker
WVL	BLK	Ijzervallei - De Blankaart	< 10 %	meerkikker
WVL	BLK	Ijzervallei - Viconia	< 10 %	meerkikker
ANT	EKS	Eksterheide	< 10 %	
ANT	TVG	Turnhouts Vennengebied	< 10 %	
ANT	TIE	Tielenkamp	< 10 %	
ANT	RON	Ronde Put	< 10 %	
LIM	RES	Resterheide	< 10 %	
LIM	BRA	De Brand	< 10 %	meerkikker
LIM	TOS	Tösch-Langeren	< 10 %	meerkikker
LIM	HOZ	Ziepbeek	< 10 %	
LIM	LAA	Laambeek / Groene Del	< 10 %	meerkikker
LIM	WIK	Het Wik	< 10 %	
LIM	WIN	Winterslag	< 10 %	
LIM	KLA	Waterschei / Klaverberg	< 10 %	meerkikker
WVL	BLK	Ijzervallei - Lo-Reninge	10-30 %	meerkikker
WVL	BLK	Ijzervallei - Pervijze	10-30 %	
WVL	STD	Sint-Donaas	10-30 %	
ANT	BRA	Caterskapeldreef	10-30 %	
ANT	WOL	Wolfsheuvel	10-30 %	
ANT	KSV	Klein Schietveld	10-30 %	
ANT	GSV	Groot Schietveld	10-30 %	
ANT	BRE	Brechtse Heide	10-30 %	
ANT	BON	Bonte Klepper	10-30 %	
ANT	MAX	Maxburg	10-30 %	
ANT	ROM	Rommensbos	10-30 %	
ANT	MER	Halsche Beemden / Wortel-Kolonie / Merkske	10-30 %	
ANT	LIE	De Liereman	10-30 %	
ANT	RAV	Ravels / Arendonk (Rode Del / Het Goorken) / Poppel	10-30 %	meerkikker
ANT	TIE	Hoge Rielen	10-30 %	
ANT	RET	Tikkebroeken	10-30 %	
ANT	RET	Reties Heike	10-30 %	
ANT	RET	Prinsenvak	10-30 %	
ANT	RON	Postel	10-30 %	
ANT / VBR	RIJM	Rijmenam	10-30 %	meerkikker
ANT / VBR / LIM	AVE	Averbode Bos en Heide	10-30 %	
LIM	HAG	Hageven	10-30 %	meerkikker
LIM	BEV	Kamp van Beverlo	10-30 %	
LIM	HEL	Mil. Domein Houthalen-Helchteren	10-30 %	
LIM	OPH	Ophovennerheide / Gruitroderbos / Oudsberg	10-30 %	
LIM	BER	Bergerven	10-30 %	meerkikker
LIM	HON	Mechelse Hei	10-30 %	meerkikker
LIM	HOZ	Kikbeekbron	10-30 %	
LIM	SCH	Schoonbeek	10-30 %	
LIM	MAT	De Maten	10-30 %	meerkikker
LIM	WIK	Kiewit	10-30 %	
LIM	TEN	De Teut / Terhaagdoornheide	10-30 %	
WVL	DAM	Damme en Oostkerke	> 30 %	
WVL	BUL	Bulskampveld s.l.	> 30 %	
ANT	ZOE	Zoersel	> 30 %	
ANT	ELS	Elsakker	> 30 %	
LIM	HON	Ruwmortelven / Kruisven / Dilserbos	> 30 %	
ANT	KAL	Kalmthoutse Heide	> 30 %	
ANT	GIE	Gierls Bos	> 30 %	
ANT	SNE	Sneepkensvijver	> 30 %	
ANT	KEM	Kempengrens / Reuselweg	> 30 %	
LIM	BEV	Beverbeekse Heide	> 30 %	
LIM	TOM	Tommelen	> 30 %	
LIM	VIJ	Vijvergebied Midden-Limburg	> 30 %	meerkikker *

Onze onderzoeksresultaten bestrijken onvoldoende de kritische elementen die een rol spelen in toestand en trend van de Vlaamse poelkikkerpopulaties. De aanwezigheid van vis in allerlei stilstaande wateren vormt een belangrijke predatiedruk op met name larvale kikkers. Invasieve vissoorten veroorzaken hogere mortaliteit bij kikkerlarven (INBO, in voorbereiding – **Figuur 46**).



Figuur 46 Experimentele vispredatie op eieren en larven van bastaardkikker (INBO, in voorbereiding): overleving van twintig eieren en larven van bastaardkikker na acht dagen in syntopie met drie vissen in telkens vijf containers per vissoort en controle. Inheemse vissoorten: bittervoorn, tiendoornige stekelbaars en kroeskarper. Uitheemse vissoorten: Amerikaanse hondsvij, blauwbandgrondel en zonnebaars.

De impact van verschillende uitheemse kreeftsoorten is evenzeer van belang. Met name in de Damse metapopulatie en ruime omgeving zijn de dichtheden aan rode Amerikaanse rivierkreeft *Procambarus clarkii* zeer hoog. De negatieve impact van deze soort op Europese aquatische ecosystemen is bekend (o.a. Souty-Grosset *et al.* 2016). Eutrofiëring en daaraan gekoppeld verlies van vegetatie en vegetatiestructuur kunnen de predatiedruk verhogen alsook directe effecten van verlies aan waterkwaliteit veroorzaken. Voedselarme milieus waar poelkikker zich handhaaft kunnen zo verhoudingsgewijs geschikter worden voor bastaardkikker en/of meerkikker in combinatie met de predatiedruk die wordt uitgeoefend door uitheemse vissoorten zoals blauwband *Pseudorasbora parva*, zonnebaars *Lepomis gibbosus* en Amerikaanse hondsvij *Umbra pygmaea*. In de meer voedselrijke poelkikkerhabitats nemen de diversiteit en structurele complexiteit aan macrofyten af. Ondergedoken waterplanten zoals kranzwieren, fonteinkruiden en hoornbladsoorten worden vervangen door vegetatieloos en dus ook dekkingsloos water. Ook bodemwoelende deels herbivore vissoorten zoals karper en gibel kunnen de vegetatiestructuur en trofie van de waterpartijen in ongunstige zin wijzigen.

Voor een uitgebreid overzicht van bedreigingen, zie SBP (Antea, 2019).

3.1.1 Bespreking populaties in SBZ-H

Paelinckx *et al.* (2009) stelden de gewestelijke instandhoudingsdoelstellingen op. Voor 18 speciale beschermingszones van de Habitatrichtlijn (SBZ-H) werden doelen voor populatie en leefgebied opgemaakt voor poelkikker. Twee andere SBZ-gebieden werden vermeld als leefgebied van de soort, maar zonder doelen (reëvaluatie nodig - conform de G-IHD moeten ook voor deze populaties maatregelen genomen worden zodat ze duurzaam kunnen behouden worden)(**Figuur 47; Tabel 8**).

Lommaert *et al.* (2020) stelden criteria op voor het bepalen van de lokale staat van instandhouding van de Habitatrichtlijnsoorten (**Tabel 9**).

Referenties	Indicator	Gunstig	Ongunstig
Criterium: Toestand populatie			
Schmidt <i>et al.</i> 2006	Relatieve populatiegrootte ⁽¹⁾	≥ 200 roepende mannetjes per deelpopulatie	< 200 roepende mannetjes per deelpopulatie
Mergeay 2012	Metapopulatie-grootte	N _c >3250 adulten (N _c >325)	N _c <3250 adulten (N _c <325)
Mergeay 2012	Grootte leefgebied	≥ 160 ha gunstig leefgebied	<160 ha gunstig leefgebied
Schmidt <i>et al.</i> 2006	Voortplanting	Succesvolle voortplanting aantoonbaar (larven en/of juvenielen aanwezig)	Succesvolle voortplanting niet aantoonbaar (geen larven noch juvenielen aanwezig)
Holenweg-Peter 2001; Trochet <i>et al.</i> 2014	Afstand nabije populatie	≤ 1.2 km	> 1.2 km
Criterium: Kwaliteit leefgebied			
<i>Aquatisch leefgebied</i>			
Schmidt <i>et al.</i> 2006	Aantal en grootte van de waterpartijen	Complex van meerdere permanente kleine plassen (< 250 m²) of één grote plas (> 250 m²)	Max. één permanente kleine plas (< 250 m²) aanwezig
Expertoordeel	Voedselrijkdom	Oligotroof of mesotroof	Eutroof
Schmidt <i>et al.</i> 2006	Beschaduwing	Geen tot weinig (<33% van de opp.)	Veel (>33% van de opp.)
Schmidt <i>et al.</i> 2006	Permanentie	Bevat ganse jaar water	Valt droog vóór begin augustus
Schmidt <i>et al.</i> 2006	Oeverzone	> 25% van de oeverlengte met abundante vegetatie	< 25% van de oeverlengte met abundante vegetatie

Deze zijn echter vrij generiek en bieden weinig houvast, wat het gebrek aan soortgerichte inzichten illustreert. De doelen inzake metapopulatiegrootte en grootte leefgebied worden wellicht door (zeer) veel populaties niet gehaald, maar zijn bij gebrek aan gegevens moeilijk te toetsen.

Eerst dienen echter twee belangrijke algemene opmerkingen te worden gemaakt die inzichten opgevoerd in het SBP weerleggen:

- Hybridisatie met bastaardkikker wordt vaak zonder nuance vermeld als bedreiging van poelkikker. Dit is niet correct. Het toenemen van bastaardkikker lijkt eerder een symptoom en niet de oorzaak van poelkikkerafname. Verder onderzocht deze studie de mogelijke hybridisaties met meerkikker niet. Over de mogelijke invloed van dergelijke kruisingen op systemen kunnen dus geen uitspraken worden gedaan. Wel lijkt meerkikker, via predatie en concurrentie alleen al, een reële bedreiging te vormen. .
- In tegenstelling tot meerkikker, is poelkikker niet eenduidig gebaat bij permanente waterpartijen. Ondiep en tijdelijk water biedt snelle larvale ontwikkeling en lage predatiedruk.

BE2100016 - Klein en Groot Schietveld

Doel SBP 2019 - populatie: minimaal behoud van de huidige populatie

Doel SBP 2019 - leefgebied: behoud van bestaand leefgebied

Op basis van de beschikbare gegevens schatten we in dat beide deelgebieden belangrijke populaties huisvesten. De genetische diversiteit binnen het poelkikkergenoom is voor het Klein Schietveld vergelijkbaar met deze van de omringende Antwerpse populaties, maar is in vergelijking met de onderzochte Limburgse populaties eerder laag.

Tentatieve LSVI: gunstig

BE2200031 - Valleien van de Laambeek, Zonderikbeek, Slangbeek en Roosterbeek met vijvergebieden en heiden

Doel SBP 2019 - populatie: behoud van de soort op de actuele locaties

Doel SBP 2019 - leefgebied: geen bijkomende kwaliteitsvereisten

Op basis van de beschikbare gegevens schatten we in dat het gebied belangrijke populaties huisvest, met name in de Teut en het Vijvergebied Midden-Limburg, beide met een relatief hoge genetische diversiteit. In dit laatste deelgebied vormt de aanwezigheid van meerkikker een ernstige bedreiging. Amfibiegericht beheer (in functie van boomkikker, knoflookpad en heikikker) met jaarlijks droogleggen van vijvers geldt ook voor poelkikker als een gunstige maatregel die relatief gezien wellicht minder gunstig is voor meerkikker. In deelgebied het Welleke konden we echter geen poelkikkers vaststellen.

Tentatieve LSVI: gunstig

BE2100015 - Kalmthoutse heide

Doel SBP 2019 - populatie: minimaal behoud van de huidige populaties

Doel SBP 2019 - leefgebied: De verbetering van de hydrologie wordt als doel gesteld. Deze doelstelling spoort samen met de kwaliteitsdoelstelling voor de vochtige heidehabitats en de venhabitats.

Op basis van de beschikbare gegevens schatten we in dat het gebied belangrijke populaties huisvest. De genetische diversiteit is middelmatig te noemen in vergelijking met andere Vlaamse

Tentatieve LSVI: ongunstig

BE2500004 - Bossen, heiden en valleigebieden van zandig Vlaanderen: westelijk deel

Doel SBP 2019 - populatie: 3 populaties aanwezig binnen de SBZ. Doelstelling: Verdere uitbreiding van de actuele populaties in Bulskampveld (Aanwijspuiten) en Vloethemveld tot populaties van minstens 200 roepende mannetjes en uitbreiding van de populatie in Heideveld-Bornebeek tot minstens 50 roepende mannetjes zijn noodzakelijk om de duurzame instandhouding van de soort in de SBZ te verzekeren.

Doel SBP 2019 - leefgebied: De specifieke doelstellingen hebben betrekking op: 1) Behoud van de kwaliteit van water- en landbiotoop: oligotrofe tot mesotrofe plassen, zonbeschenen, voldoende waterhoudend (minstens eind augustus). 2) Behoud van landbiotoop: vochtige heide of heischraal graslanden en voedselarme moerassen.

Onze inventarisaties van 2023-2025 resulteerden in aanzienlijke vergroting van het areaal van de metapopulatie van het Bultskampveld die een hoge genetische diversiteit draagt. De populatie van Vloethemveld lijkt echter (zo goed als) uitgestorven. Ook het actueel voortbestaan van de populatie van Beisbroek/Zevenkerken konden we voorsnog niet bevestigen.

Tentatieve LSVI: ongunstig voor bepaalde deelgebieden

BE2200028 - De Maten

Doel SBP 2019 - populatie: behoud van de soort op de actuele locaties

Doel SBP 2019 - leefgebied: geen bijkomende kwaliteitsvereisten

De populatie van De Maten lijkt relatief klein maar heeft een relatief hoge genetische diversiteit. Amfibiegericht vijverbeheer moet toelaten dat poelkikker net zoals andere soorten (knoflookpad, heikikker, rugstreeppad, boomkikker) kan profiteren van geschikte voortplantingswateren met lage predatiedruk (en dus zonder vis).

Tentatieve LSVI: ongunstig

BE2200030 - Mangelbeek en heide- en vengebieden tussen Houthalen en Gruitrode

Doel SBP 2019 - populatie: 5 populaties van minimaal 200 roepende mannetjes in complex van 3-5 permanente kleine plassen of één of meer grote plassen

Doel SBP 2019 - leefgebied: De kwaliteitseisen worden grotendeels gedekt door deze van heikikker. Voortplantingswateren dienen jaarrond water te houden.

De populaties van het militair domein van Houthalen-Helchteren en Ophoverenheide behoren wellicht tot de grotere populaties van Vlaanderen en vertonen een middelmatig tot hogere genetische diversiteit.

Tentatieve LSVI: gunstig

BE2100020 - Heesbossen, Vallei van Marke en Merkske en Ringven met valleigronden langs de Heerlese Loop

Doel SBP 2019 - populatie: *Nastreven van een duurzame kernpopulatie (200 roepende mannetjes) in deelgebied 4 (Elsakker – Duprez) en deelgebied 6 (Wortel-Kolonie)*

Hoewel de dichtheden aan poelkikker in de meeste deelgebieden eerder laag lijken, werpt amfibiegericht poelbeheer hier zijn vruchten af voor verschillende amfibiesoorten (kamsalamander, boomkikker, knoflookpad, poelkikker). De populatie van Elsakker wordt gekenmerkt door een hoge relatieve abundantie aan poelkikker. Bovendien heeft deze populatie een hogere genetische diversiteit dan het gros van de genetisch onderzochte Antwerpse populaties. Ze verdient dan ook bijzonder aandacht.

BE2400014 - Demervallei

Doel SBP 2019 - leefgebied: "De specifieke doelstellingen hebben betrekking op het verhogen van de kwaliteit van het leefgebied: goede waterkwaliteit, samenhang van de voortplantingsplaatsen, geen hybridisatie van poelkikker met meer- en bastaardkikker."

Tentatieve LSVI: gunstig

Doel SBP 2019 - leefgebied: Er worden doelstelling gesteld voor het opheffen van de migratiebarrière tussen het Goor-Asbroek en de vallei van de Grote Nete; een natuurlijke visstand en bestrijding van invasieve exoten, onder meer stierkikker.

Tentatieve LSVI: ongunstig

***Doel SBP 2019 - populatie:** Creëren van duurzame populaties in goede staat van instandhouding. Hierbij wordt gestreefd naar minstens 200 roepende mannetjes per populatie. Bij de populatie in het Hageven moet men streven naar een mogelijkheid tot uitwisseling met de populatie in Nederland. Er is geen extra oppervlakte nodig.*

De vanuit Vlaamse oogpunt geïsoleerde populaties van het Hageven en Beverbeekse Heide zijn van gewestelijk belang. Het actueel bestaan van een zuidwaartse verbinding met de andere Limburgse kernpopulaties blijft ongedocumenteerd. Binnen Limburg vonden we hier echter (samen met die van Tommelen) de laagste genetische diversiteit in het poelkikker-genoom binnen de genetisch onderzochte sites.

BE2200034 - Itterbeek met Brand, Jagersborg en Schootsheide en Bergerven

Doel SBP 2019 - leefgebied: "Volgende doelstellingen werden opgenomen: 1) Natuurlijke hydrologie optimaliseren. Deze doelstelling gaat samen met de kwaliteitsdoelstelling voor de oligotrofe tot mesotrofe stilstaande wateren (3130) en vochtige heidehabitats (4010). 2) Aandacht besteden aan de problemen van eutrofiëring en verzuring. 3) Het verhinderen van hybridisatie van poelkikker met meerkikker."

Tentatieve LSVI: ongunstig

Doel SBP 2019 - populatie: voorkomend in deelgebied 9 (Maaswinkel). Onduidelijke toekomst voor deze soort aangezien ze zich momenteel in een kritische toestand bevindt. Elke externe negatieve invloed kan momenteel leiden tot het uitsterven van deze soort. Bovendien is hybridisatie ook een probleem. Einddoel: Verbetering leefgebied.

We konden de aanwezigheid van de soort in dit SBZ-H-gebied niet bevestigen. De kans dat de soort er is uitgestorven is reëel. Mogelijke oorzaken zijn de invasie van meerkikkers, eutrofiëring en vis. De stelling (zie eerder opgemaakt populatiedoel) dat hybridisatie een probleem is klopt niet (zie hoger).

Populatie 1 De Blankaart

De populatie van De Blankaart is op heden wellicht zeer klein en ernstig bedreigd. Het is onduidelijk of er verbinding is met andere relictpopulaties in de IJzervallei. Grootschalig beheer in functie van watervogels bevorderde naar alle waarschijnlijkheid de opmars van meerkikker (die hier anno 2006-2008 nog niet voorkwam) alsook de instroom van vis. Aanleg van kleinere ondiepe poelen kan ten gunste zijn van de poelkikker in dit gebied. Beheersing van de grote meerkikkerpopulatie lijkt hier moeilijk, zoniet uitgesloten. De populatie ligt niet in SBZ-H.

Populatie 2 Vloethemveld

Zie ook bespreking SBZ-H-gebieden. Deze populatie is wellicht uitgestorven. Voormalig voorkomen in Beisbroek/Zevenkerken kon evenmin door ons worden bevestigd.

Populatie 3 Damme

Vanuit natuurbehoudsoogpunt is dit een van de belangrijkste populaties in Vlaanderen. Deze metapopulatie herbergt een zeer hoge genetische diversiteit en strekt zich op basis van onze nieuwe inventarisatieresultaten uit van Koolkerke tot de Sint-Donaaspolder en is volledig buiten SBZ-H-gebied gelegen. Een deel van dit leefgebied bestaat uit zwaar geëutrofeerd agrarisch gebied. Connectiviteit is hier mogelijk een knelpunt, hoewel er voor de onderzochte deelpopulaties geen barrière voor gene flow werd aangetoond. Aanwezigheid van visvrij/arme, eerder kleine, vegetatierijke waterpartijen is van groot belang. De aard van de in dit gebied beschikbare watervlakken alsook de eerder hoge voedselrijkdom voeden de bezorgdheid dat dit gebied in de toekomst zou ingenomen worden door meerkikker. Een andere actuele druk is de aanwezigheid van grote dichtheden aan uitheemse kreeften (*Procambarus clarkii*).

Populatie 4 Bulskampveld

Zie ook bespreking SBZ-H-gebieden. Onze inventarisatie vergrootte het areaal van deze metapopulatie van Kampveld tot net tegen de Oost-Vlaamse provinciegrens. Meerkikker is aanwezig in de periferie.

Populatie 5 Kalmthoutse heide

Zie ook bespreking SBZ-H-gebieden. Van oudsher een belangrijk en vrij groot leefgebied dat ook op heden nog een omvangrijke populatie bevat. Beschikbaarheid van geschikt water is onder meer onder toenemende verdroging een aandachtspunt voor beheer.

Populatie 6 Mastenbos

Niet bezocht - geen aanvulling op wat in het SBP vermeld staat.

Populatie 7 Klein schietveld

Zie ook bespreking SBZ-H-gebieden. Van oudsher een belangrijk en vrij groot leefgebied dat ook op heden nog een omvangrijke populatie bevat.

Populatie 48 Nieuwenhovebos

Hoewel poelkikker pas recent door ons in dit gebied voor het eerst kon worden vastgesteld (en dit dan in feite niet in Nieuwenhovebos zelf maar in het zuidelijker gelegen Kampveld), stelt het SBP ten onrechte dat hier de belangrijkste West-Vlaamse populatie voorkomt.

Populatie 49 Hooyput

Het gebied Hooyput werd niet door ons bezocht maar maakt wel deel uit van SBZ-H BE2100024.
Zie SBP.

Populatie 50 Middelkerke

Vermeend voorkomen van poelkikker in de kustregio is tot op heden niet onweerlegbaar aangetoond. Deze populatie (waarvan in het SBP wordt vermeld dat ze in urbaan gebied gelegen is en zou kunnen uitgezet zijn) is ons volledig onbekend.

Populatie 51 Reninge

Naast de populaties van De Blankaart en Stuivekenskerke is dit de derde populatie in de IJzervallei. Ons onderzoek heeft het areaal van deze populatie gevoelig vergroot. Deze populatie ligt sterk geïsoleerd van de rest van het Vlaamse poelkikkerareaal en worden gekenmerkt door een zeer hoge genetische diversiteit. Dit zorgt ervoor dat we de instandhouding van deze populatie prioritair achten. Aanvullend inventariserend onderzoek is nodig om het actuele areaal van de populatie in kaart te brengen, twijfels bij morfologische identificatie op te helderen en de syntopie met meerkikker en bastaardkikker te documenteren. Deze populatie heeft de hoogste genetische diversiteit van alle binnen ons onderzoek genetisch onderzochte populaties.

Populatie 52 Weelde – Ravels

Zie bespreking SBZ-H-gebieden. We vonden hier in zeer lage aantallen meerkikker. Deze populatie heeft een relatief hoge genetische diversiteit (in vergelijking met andere genetisch onderzochte Antwerpse populaties).

Populatie 53 Kijkverdriet

Zie bespreking SBZ-H-gebieden. We hebben hier de aanwezigheid van de soort kunnen bevestigen.

Populatie 54 Bellenhof

Er zijn geen waarnemingen van dit gebied.

Populatie 55 Tielrode

Hoewel aanvullend inventariserend onderzoek zinvol kan zijn, zijn hier geen recente waarnemingen beschikbaar.

Populatie 69 Kamp van Beverlo

Zie bespreking SBZ-H-gebieden.

Populatie 70 Mosselgoren

Zie bespreking SBZ-H-gebieden. We hebben hier geen poelkikker aangetroffen.

Populatie 71 Beeltjens – Kwarekken

Uit dit gebied ligt slechts één niet verifieerbare waarneming voor. Meerkikker en stierkikker zijn hier abundant aanwezig.

Populatie 72 Sint-Job in 't Goor

Als hiermee de populatie bedoeld wordt die wij als Brechtse Heide aanduiden, is dit een populatie met enkele vitale kernen (waaronder Marbelenven), maar met wellicht limiterende connectiviteit in het landschap. We hebben in deze omgeving ook een nieuwe vindplaats (Bosven nabij de Caterskapeldreef op grondgebied Schilde) toegevoegd. De genetische diversiteit van de poelkikkerpopulatie Brechtse Heide is op basis van ons onderzoek bijzonder laag.

Populatie 73 Achelse Kluis

Zie bespreking SBZ-H-gebieden (= Beverbeekse Heide).

BEHEERADVIES

De habitatvereisten van poelkikker overlappen in grote mate met deze van andere groenekikkersoorten en in het bijzonder met die van bastaardkikker. Bovendien zijn veel van de eerder aangehaalde bedreigingen moeilijk beheersmatig uit te sluiten. Toch trachten we hier in de mate van het mogelijke specifiek in functie van poelkikker een beheeradvies te formuleren.

Waterhabitat

Zoals bij veel amfibieën wordt ook bij de poelkikker de populatiedichtheid in sterke mate bepaald door de beschikbaarheid aan geschikte waterhabitats. Daarbij is het echter belangrijk dat kwantiteit van waterhabitat niet verward wordt met grote watervlakken. Grotere wateroppervlakken zijn immers vaker permanent van aard, bevatten doorgaans vis, kennen een lagere structurele diversiteit en vormen daarbovenop een geschikter leefgebied voor de bastaardkikker en de meerkikker. Een uitzondering hierop wordt gevormd door ondiepe, vaak tijdelijke wateren die zich over grotere oppervlakten kunnen uitstrekken. De aanwezige vegetatiestructuur biedt in dergelijke omstandigheden voldoende beschutting. Over het algemeen vormt een mozaïek van kleine (10-1000 m²), vegetatierijke — zowel submers als emers —, niet-permanente wateren een geschikt waterhabitat voor de poelkikker.

We verwijzen naar de adviezen geformuleerd in onderdeel 5.2 van het SBP voor meer doorgedreven beheeradvies met betrekking tot waterhabitat.

Landhabitat

Het belang van het landhabitat mag niet onderschat worden. Poelkikker brengt er ook meer tijd in door dan andere groenekikkersoorten. De terrestrische leefgebieden zijn gevarieerd, maar vertonen doorgaans enkele gemeenschappelijke kenmerken: het gaat meestal om open landschappen met zandige, goed doorgraafbare bodems die niet volledig uitdrogen. Een typisch voorbeeld voor de Kempische populaties zijn natte heiden. Voor de West-Vlaamse populaties in voedselrijkere omstandigheden zijn de landhabitats minder gekend, maar vermoedelijk worden vooral vochtige weilanden gebruikt.

We verwijzen naar de adviezen geformuleerd in onderdelen 5.3 van het SBP voor meer doorgedreven beheeradvies met betrekking tot landhabitat.

We herhalen tot slot enkele recht te zetten misvattingen uit het SBP:

- Hybridisatie met bastaardkikker wordt vaak zonder nuance vermeld als bedreiging van poelkikker. Zoals we in dit onderzoek hebben toegelicht, is dit niet correct. Het toenemen van bastaardkikker lijkt eerder een symptoom en niet de oorzaak van poelkikerafname. Verder onderzocht deze studie de mogelijke hybridisaties met meerkikker niet. Over de mogelijke invloed van dergelijke kruisingen op systemen kunnen dus geen uitspraken worden gedaan. Wel lijkt meerkikker, via predatie en concurrentie alleen al, een reële bedreiging te vormen.
- In tegenstelling tot meerkikker, is poelkikker niet eenduidig gebaat bij permanente waterpartijen. Ondiep en tijdelijk water biedt snelle larvale ontwikkeling en lage predatiedruk

AANVULLEND ONDERZOEK

Monitoring en inventarisatie poelkikker en andere groene kikkers

Na initieel te zijn aangeduid als (te) moeilijke soort voor monitoring, werd in 2021 alsnog een meetnet voor poelkikker opgestart. Na enkele pilootjaren werd anno 2025 gekozen om dit meetnet volledig door professionele medewerkers van INBO en Natuurpunt Studie te laten uitvoeren. De voorheen gevolgde aanpak van roepkoortellingen in combinatie met genetische determinatie van larven (voor opvolging van de verhouding tussen bastaard- en poelkikker) wordt vervangen door visuele en/of op handvangst gebaseerde soortidentificatie. Per steekproefelement/waterpartij wordt vastgelegd of de hele poel dan wel een deelzone van de oever wordt geteld. Alle aanwezige groene kikkers worden op soort gebracht, indien nodig na vangen. In totaal worden ca. 100 poelen gemonitord over een cyclus van vier jaar, waarbij dus jaarlijks 25 poelen worden onderzocht. Hiervan worden er 15 onderzocht door het INBO en 10 door Natuurpunt Studie.

Gezien de onvolledige kennis van de actuele verspreiding van de soort is het van belang naast het monitoren van gekende vindplaatsen ook in te zetten op inventarisatie. Daartoe wordt ook jaarlijks gewerkt aan een zogeheten inhaalslag, waarbij minstens tien kansrijke waterpartijen worden onderzocht op de aanwezigheid van de soort. Met name rond alle gekende West-Vlaamse populaties ligt hier nog werk op de plank. Ook in de Kempen zijn er echter grote ruimtelijke lacunes, zoals in het noorden van Limburg alsook in Antwerpen tussen het Groot Schietveld en Eksterheide. Ook alle perifere populaties zijn slecht gekend, waaronder de (meta)populatie van Rijmenam en die in het oosten van de provincie Antwerpen. Aanvullend onderzoek is hier nodig.

De focus van het genetisch luik lag in deze studie op poelkikker, waardoor slechts beperkt genetisch materiaal van bastaardkikkers werd geanalyseerd. Aangezien de bastaardkikker een essentieel onderdeel vormt van het groene-kikkersysteem (LE of varianten daarvan), is het cruciaal dat toekomstige staalname evenwichtig gebeurt over alle betrokken taxa (*P. lessonae*, *P. kl. esculentus*, eventuele triploïde vormen, alsook van geïntroduceerde *P. ridibundus* s.l.). Een dergelijke geïntegreerde aanpak laat toe om de mate van ploïdie binnen populaties nauwkeurig te bepalen, de aard van het lokale systeem (klassiek LE, gemodificeerd LE, E-systeem, of een systeem in transitie) te identificeren, en de wijze van overerving en reproductieve afhankelijkheden beter te begrijpen. Toekomstig onderzoek zou daarom idealiter genetische en cytologische analyses combineren (waarbij ploïdie op meer eenduidige manier kan vastgesteld worden) en onderzoek van populatiestructuur en genoomdynamiek op landschapsniveau omvatten om meer inzicht in mate en manier van genenuitwisseling te krijgen.

Ook de toestand en trend van de meerkikkers vereist opvolging, om te voorkomen dat de invasie van deze (onder)soorten zich ongedocumenteerd verderzet ten koste van de inheemse soorten waaronder poelkikker. Ons onderzoek toont aan dat meerkikker nog nagenoeg ontbreekt in veel van de kerngebieden van poelkikker, maar toeneemt met name vanuit de randen. Deze zullen de stabiele LE-systemen verstoren. In situaties waar habitatkenmerken niet limiterend zijn voor meerkikker zullen de gevolgen zichtbaar zijn, met een toename aan meerkikkers en een afname van poelkikker en bastaardkikker.

Referenties

- Dedukh D., Litvinchuk J., Svinin A., Litvinchuk S., Rosanov J. & Krasikova A. (2019). Variation in hybridogenetic hybrid emergence between populations of water frogs from the *Pelophylax esculentus* complex. PLoS ONE 14 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224759>.
- Denoël, M.; Dufresnes, C. (2025). The alien marsh frog cocktail: Distribution, causes and pathways of a global amphibian invasion. Biological Conservation 306: 111120.
- Doležalková-Kaštánková M., Mazepa G., Jeffries D.L., Perrin N., Plötner M., Plötner J., Guex G.D., Mikulíček P., Poustka A.J., Grau J. & Choleva L. (2021). Capture and return of sexual genomes by hybridogenetic frogs provide clonal genome enrichment in a sexual species. Scientific Reports 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81240-5>.
- Doležalková-Kaštánková M., Pruvost N.B.M., Plötner J., Reyer H.U., Janko K. & Choleva L. (2018). All-male hybrids of a tetrapod *Pelophylax esculentus* share its origin and genetics of maintenance. Biology of Sex Differences 9 (1). <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0172-z>.
- Dufresnes C. & Mazepa G. (2020). Hybridogenesis in Water Frogs. In: Encyclopedia of Life Sciences. Wiley, p. 718–726. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0029090>.
- Falaschi M., Melotto A., Manenti R. & Ficetola G.F. (2020). Invasive species and amphibian conservation. Herpetologica 76 (2): 216–227. <https://doi.org/10.1655/0018-0831-76.2.216>.
- Fedorova A., Pustovalova E., Drohvalenko M., Biriuk O., Doležalková-Kaštánková M., Kravchenko M., Korshunov O., Mikulíček P., Choleva L., Holovnia D., Dedukh D. & Shabanov D. (2025). Hybridogenetic reproduction of *Pelophylax* water frogs from different hemiclinal population systems from Eastern Ukraine: selective mortality, and clonal and ploidy diversity. Zoological Journal of the Linnean Society 204 (3). <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlaf066>.
- Garner T.W.J., Gautschi B., Röthlisberger S. & Reyer H.-U. (2000). A set of CA repeat microsatellite markers derived from the pool frog, *Rana lessonae*. Molecular Ecology 9: 2155–2234.
- Graf J. & Polls Pelaz M. (1989). Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex. In: Dawley R. & Bogart J. (eds.). Evolution and ecology of unisexual vertebrates. New York State Museum Bulletin 466, New York State Museum, Albany, NY, p. 289–302.
- Guex G.D., Hotz H. & Semlitsch R.D. (2002). Deleterious alleles and differential viability in progeny of natural hemiclinal frogs. Evolution 56 (5): 1036–1044.
- Hammarström A, Sandberg L, Widenfalk L, Widenfalk O. (2016). Planeringsverktyg för gölgroda: kunskapsframställning, konnektivitetsanalys och hänsynanpassningar. 1–25
- Hanski I. (1999). Metapopulation ecology: Oxford University Press.
- Hardy O. & Vekemans X. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Molecular Ecology Notes 2: 618–620.
- Hauswaldt J.S., Höer M., Ogielska M., Christiansen D.G., Dziewulska-Szwajkowska D., Czernicka E. & Vences M. (2012). A simplified molecular method for distinguishing among species and ploidy levels in European water frogs (*Pelophylax*). Molecular Ecology Resources 12 (5): 797–805. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03160.x>.
- Hermaniuk A., Czajkowska M., Borkowska A. & Taylor J.R.E. (2020). Body size variation in hybrids among populations of European water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) with different

breeding systems. *Amphibia Reptilia* 41 (3): 361–371. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10005>.

- Hoffmann A., Plötner J., Pruvost N.B.M., Christiansen D.G., Röthlisberger S., Choleva L., Mikulíček P., Cogălniceanu D., Sas-Kovács I., Shabanov D., Morozov-Leonov S. & Reyer H.U. (2015). Genetic diversity and distribution patterns of diploid and polyploid hybrid water frog populations (*Pelophylax esculentus* complex) across Europe. *Molecular Ecology* 24 (17): 4371–4391.
- Holenweg Peter, A.K. (2001). Dispersal rates and distances in adult water frogs, *Rana lessonae*, *R. ridibunda* and their hybridogenetic associate *R. esculenta*. *Herpetologica* 4 (57): 449–460.
- Holenweg Peter, A.K.; Reyer, H.-U.; Abt Tietje, G. (2002). Species and sex ratio differences in mixed populations of hybridogenetic water frogs: The influence of pond features. *Écoscience*, 9(1): 1–11. doi.org/10.1080/11956860.2002.11682684
- Holsbeek G. & Jooris R. (2010). Potential impact of genome exclusion by alien species in the hybridogenetic water frogs (*Pelophylax esculentus* complex). *Biological Invasions* 12 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9427-2>.
- Holsbeek G., Maes G.E., De Meester L. & Volckaert F.A.M. (2009). Conservation of the introgressed European water frog complex using molecular tools. *Molecular Ecology* 18 (6): 1071–1087. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04087.x>.
- Holsbeek G., Mergeay J., Hotz H., Plötner J., Volckaert F.A.M. & De Meester L. (2008). A cryptic invasion within an invasion and widespread introgression in the European water frog complex: Consequences of uncontrolled commercial trade and weak international legislation. *Molecular Ecology* 17 (23): 5023–5035.
- Holsbeek, G.; Mergeay, J.; Volckaert, F.A.M.; De Meester, L. (2010). Genetic detection of multiple exotic water frog species in Belgium illustrates the need for monitoring and immediate action. *Biological Invasions* 12: 1459–1463.
- Hotz H, Uzzell T, Guex G-D, Alpers D, Semlitsch RD, Beerli P (2001) Microsatellites: a tool for evolutionary genetic studies of western Palearctic water frogs. *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin, Zoologische Reihe*, 77,43–50.
- Jakob C., Arioli M. & Reyer H.-U. (2010). Ploidy composition in all-hybrid frog populations in relation to ecological conditions. *Evolutionary Ecology Research* (12): 633–652. <https://doi.org/10.5167/uzh-38402>.
- 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>.
- Jooris, R.; Holsbeek, G. (2010). Groene kikkers in Vlaanderen en het Brussels Hoofdstedelijk Gewest. Rapport Natuur.Studie 2010 2.
- Karaman, S. (1921). Beiträge zur Herpetologie von Jugoslawien (Kroatien, Slavonien und die benachbarten adriatischen Inseln). *Glasnik der Kroatischen Naturwissenschaftlichen Gesellschaft in Zagreb* 33: 194–208.
- Keenan K., McGinnity P., Cross T.F., Crozier W.W. & Prodöhl P.A. (2013). diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution* 4 (8): 782–788. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>.

- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* (89): 583–590. <https://academic.oup.com/genetics/article/89/3/583/5992737>.
- Paelinckx D., Sannen K., Goethals V., Louette G., Rutten J. & M. Hoffmann (2009). Gewestelijke doelstellingen voor de habitats en soorten van de Europese Habitat- en Vogelrichtlijn voor Vlaanderen. Mededelingen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek INBONDER MEER2009.6, Brussel, 669 pp.
- Parent G.H. (1984). Atlas des batraciens et reptiles de Belgique. *Cahiers d'Éthologie Appliquée* 4(3): 1-198.
- Plötner J. (2005). Die westpaläarktischen Wasserfrösche - Von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation. Bielefeld: Laurenti-Verlag. <https://www.researchgate.net/publication/256542836>.
- Plötner J., Litvinchuk S.N., Borkin L. (2025). *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) – Kleiner Wasserfrosch. In: Plötner (ed.) *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas*. Band 5/III B Froschlurche (Anura) III B (Ranidae II). AULA-Verlag, Wiebelsheim.
- Prüvost N.B.M., Hoffmann A. & Reyer H.U. (2013a). Gamete production patterns, ploidy, and population genetics reveal evolutionary significant units in hybrid water frogs (*Pelophylax esculentus*). *Ecology and Evolution* 3 (9): 2933–2946. <https://doi.org/10.1002/ece3.687>.
- Prüvost N.B.M., Hollinger D. & Reyer H.U. (2013b). Genotype-temperature interactions on larval performance shape population structure in hybridogenetic water frogs (*Pelophylax esculentus* complex). *Functional Ecology* 27 (2): 459–471. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12049>.
- Prüvost N.B.M., Mikulíček P., Choleva L. & Reyer H.U. (2015). Contrasting reproductive strategies of triploid hybrid males in vertebrate mating systems. *Journal of Evolutionary Biology* 28 (1): 189–204. <https://doi.org/10.1111/jeb.12556>.
- Quilodrán C.S., Currat M. & Montoya-Burgos J.I. (2018). Effect of hybridization with genome exclusion on extinction risk. *Conservation Biology* 32 (5): 1139–1149. <https://doi.org/10.1111/cobi.13120>.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>.
- Ragghianti M., Bucci S., Marracci S., Casola C., Mancino G., Hotz H., Guex G.D., Plötner J. & Uzzell T. (2007). Gametogenesis of intergroup hybrids of hemiclinal frogs. *Genetical Research* 89 (1): 39–45.
- Reyer H.U., Arioli-Jakob C. & Arioli M. (2015). Post-zygotic selection against parental genotypes during larval development maintains all-hybrid populations of the frog *Pelophylax esculentus*. *BMC Evolutionary Biology* 15 (131). <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0404-3>
- Rösli M. & Reyer H.U. (2000). Male vocalization and female choice in the hybridogenetic *Rana lessonae*/*Rana esculenta* complex. *Animal Behaviour* 60 (6): 745–755. <https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1519>.
- Schempp W. & Schmid M. (1981). Chromosome Banding in Amphibia VI. BrdU-Replication Patterns in Anura and Demonstration of XX/XY Sex Chromosomes in *Rana esculenta*. In: *Chromosoma (Berl.)*, Vol. 83. 697–710 p.

- Schmeller D.S., Seitz A., Crivelli A. & Veith M. (2005). Crossing species' range borders: Interspecies gene exchange mediated by hybridogenesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272 (1572): 1625–1631. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3129>.
- Skierska K., Lagner A., Rozenblut-Kościsty B., Kosiba P., Kolenda K. & Ogielska M. (2023). Population structure, mate choice, and genome transmission in naturally formed pairs in a *Pelophylax lessonae*–*Pelophylax esculentus* hybridogenetic system. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 77 (8). <https://doi.org/10.1007/s00265-023-03366-y>.
- Smith M.A., Green D.M. (2005). Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography* 28(1): 110-128.
- Souty-Grosset C., Anastácio, P.M., Aquiloni L., Banha F., Choquer J., Chuchol C., Tricarico E. (2016). The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in Europe: Impacts on aquatic ecosystems and human well-being. *Limnologia* 58: 78-93.
- Speybroeck J., De Bruyn L., Van de Poel S., Ledegen H. & Westra T. (2020). Monitoringsprotocol amfibieën en reptielen. Versie 2.0. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2020 (22). <https://doi.org/10.21436/inbor.17954118>.
- Speybroeck, J.; De Knijf, G. (2019). Staat van instandhouding (status en trends) van de soorten van de Habitatrichtlijn. Deelrapport amfibieën en reptielen - rapportageperiode 2013-2018. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2019 (12). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. DOI: doi.org/10.21436/inbor.16089660
- Speybroeck, J.; van Doorn, L.; Van de Poel, S.; Maes, D. (2024). Rode Lijst van de amfibieën en reptielen in Vlaanderen 2024. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2024 (66). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. DOI: doi.org/10.21436/inbor.116242193
- Theodoropoulos, A.; Barten, R.N.; Bijlsma, L.; Couweleers, T.; van Eden, A.J.; Gosselink, M.; Martinaldi, M.; Plomp, S.; Twilt, S.; Hop, S.; van der Maat, Z.; Dufresnes, C.; France, J.; van de Graaf, R.; Struijk, R.P.J.H.; Stark, T.; Wielstra, B. (2025). The invasive marsh frogs advancing into The Netherlands carry a diverse mix of mtDNA. *Amphibia-Reptilia* (2025) DOI:10.1163/15685381-bja10239.
- Tunner, H.G. (1974). Die klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation. *Zeitschrift für zoologische Systematik und Evolutionsforschung* 12: 309-314.
- Uzzell T. & Berger L. (1975). Electrophoretic Phenotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, and Their Hybridogenetic Associate, *Rana esculenta*. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 127: 13–24.
- Vorburger C. & Reyer H.-U. (2003). A genetic mechanism of species replacement in European waterfrogs? In: *Conservation Genetics*, Vol. 4. 141–155 p.
- Weigand H., Cross Lopez de Llergo J. & Frantz A.C. (2022). Genomic basis for an informed conservation management of *Pelophylax* water frogs in Luxembourg. *Ecology and Evolution* 12 (4). <https://doi.org/10.1002/ece3.8810>.
- Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984). Estimating F-statistics, for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38 (6): 1358–1370.
- Wikström G. (2018). Degree project in biological forest management for a red-listed anuran: movement and habitat use of pool frogs (*Pelophylax lessonae*) in Sweden. 2018 p.

- Wright S. (1978). Evolution and the genetics of populations. A treatise in four volumes. Volume 4. Variability within and among natural populations. The University of Chicago Press, Chicago, 580 p.
- Zeisset I. & Hoogesteger T. (2018). A reassessment of the biogeographic range of northern clade pool frogs (*Pelophylax lessonae*) Herpetological Journal. British Herpetological Society.
- Zeisset I., Rowe G. & Beebee T.J.C. (2000). Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the north European water frogs *Rana ridibunda* and *R. lessonae*. In: Molecular Ecology, Vol. 9. p. 1173–1174. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.00954-2.x>.

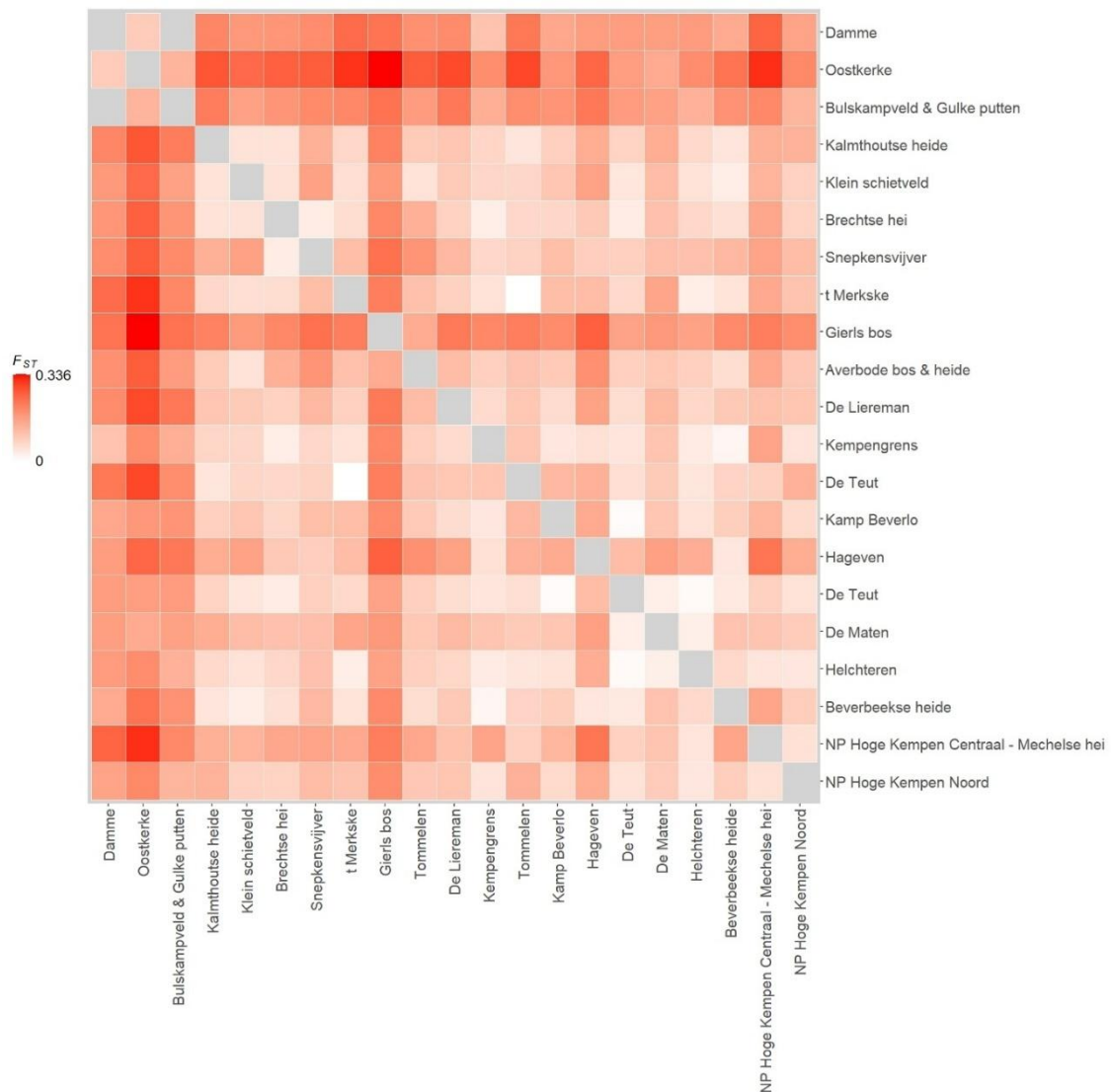
Bijlagen

Tabel S1 Microsatellietenset voor soortbepaling (fase 1) waarbij wordt aangegeven voor welke soorten groene kikker ze een positief signaal geven.

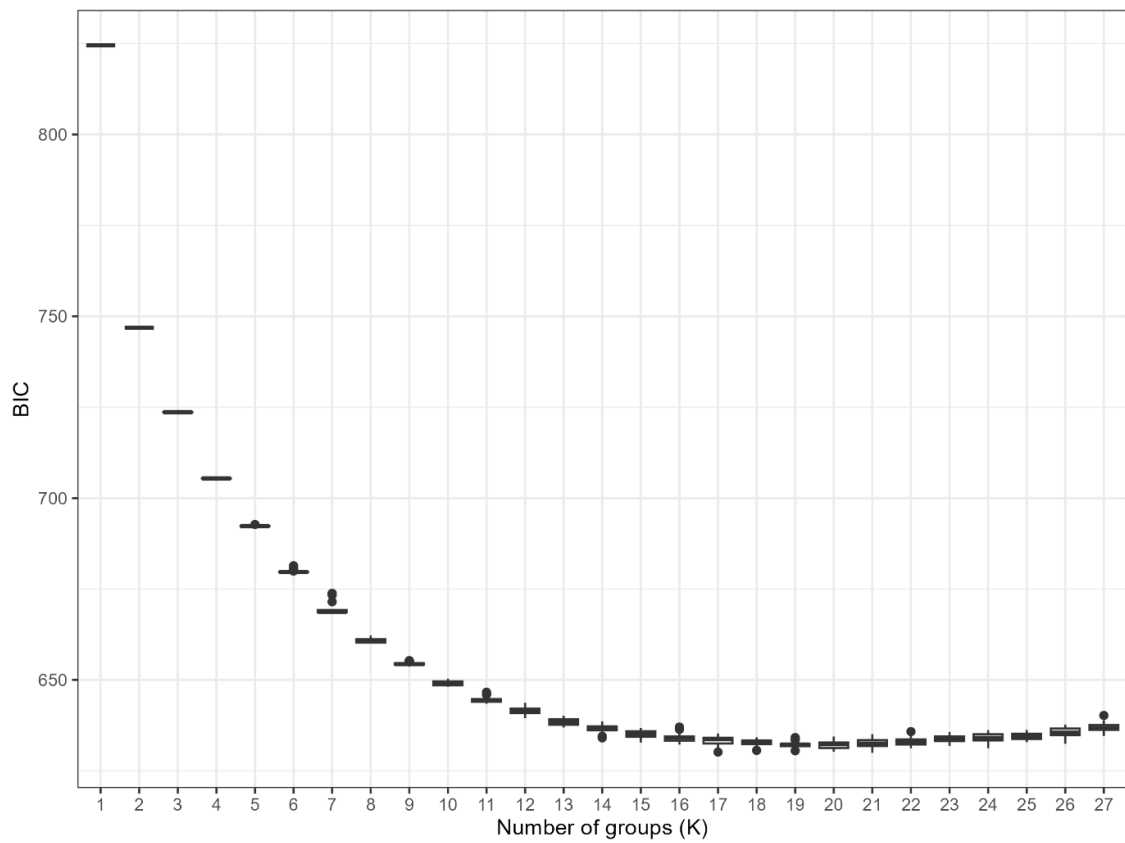
Fluorescent label	Locus	Poelkikker	Meerkikker	Referenties
6-FAM	RICA1a27	positief	negatief	(Christiansen & Reyer, 2009)
	Rrid169A	negatief	positief	(Christiansen & Reyer, 2009)
VIC	RICA1b5	positief	positief	(Arioli <i>et al.</i> , 2010)
	Rrid064A	negatief	positief	(Christiansen & Reyer, 2009)
NED	Res22	negatief	positief	(Zeisset <i>et al.</i> , 2000)
	RICA5	positief	positief	(Garner <i>et al.</i> , 2000)
PET	Res20	positief	negatief	(Zeisset <i>et al.</i> , 2000)

Tabel S2 Multiplexsamenstelling van de microsatellieten voor populatiegenetisch onderzoek van het poelkikkergerenoom (L) in poelkikkers en bastaardkikkers. De merkerset wordt opgedeeld in 3.

	Fluorescent label	Locus	Referentie	Dosering getest
Multiplex 1	6-FAM	RICA1	(Garner <i>et al.</i> , 2000)	X
		Ga1a19	(Arioli <i>et al.</i> , 2010)	X
	VIC	RICA1b27	(Garner <i>et al.</i> , 2000)	
	NED	Rrid013A	(Hotz <i>et al.</i> , 2001)	
	PET	ReGA1a23	(Christiansen & Reyer, 2009)	
Multiplex 2	6-FAM	RICA2a34	(Christiansen & Reyer, 2009)	X
		RICA1b5	(Garner <i>et al.</i> , 2000)	X
	VIC	RICA2a49	(Garner <i>et al.</i> , 2000)	
		RICA1b6	(Arioli <i>et al.</i> , 2010)	X
	NED	RICA5	(Garner <i>et al.</i> , 2000)	
		RICA31	(Garner <i>et al.</i> , 2000)	
Multiplex 3	PET	RICA18	(Garner <i>et al.</i> , 2000)	
	6-FAM	RICA1a27	(Christiansen & Reyer, 2009)	X
	VIC	Re1CAGA10	(Arioli <i>et al.</i> , 2010)	X
	NED	Res16	(Zeisset <i>et al.</i> , 2000)	X
	PET	Res5	(Zeisset <i>et al.</i> , 2000)	X



Figuur S1 Paarsgewijze F_{ST} -resultaten tussen diploïde bastaardkikkers over de verschillende locaties (zonder significantie). Sites na samennemen van subsites (excl. NP Hoge Kempen Centraal). De kleuren duiden de mate van differentiatie aan, hoe donkerder hoe groter de differentiatie. Grijs = geen vergelijking mogelijk/geen resultaat De sites werden gerangschikt van west (boven en rechts) naar oost (onder en links).



Figuur S2 Resultaten van BIC- analyse voor kmeans, elke cluster werd 27 keer herhaald.

Lijst van figuren

Figuur 1	Schematisch overzicht van een primaire kruising tussen een vrouwelijke meerkikker (R_xR_x) en een mannelijke poelkikker (L_yL_x), mogelijke gameten en de uitkomst van een paring (dit zijn de combinaties van LR).	14
Figuur 2	Schematische voorstelling van de voortplanting in het diploïde LE-systeem. Groen staat voor poelkikker, bruin staat voor meerkikker. Een combinatie van de beide kleuren staat voor de hybride. Wanneer een individu een Y-chromosoom heeft, hebben we te maken met een mannelijk individu. Het grijze kadertje wijst op het niet levensvatbaar zijn. Figuur naar voorbeeld uit Christiansen (2009).	16
Figuur 3	Schematische voorstelling van het aangepast LE-systeem voorgesteld volgens Weigand <i>et al.</i> (2022) naar voorbeeld uit Pruvost <i>et al.</i> (2013a). Aan de linkerkant worden de aanwezige vrouwtjes en hun gameten voorgesteld, bovenaan de aanwezige mannetjes met hun gameten. Het grijze kadertje wijst op het niet levensvatbaar zijn of het niet bereiken van volwassenheid.	17
Figuur 4	Schematische voorstelling van de voortplanting in het diploïde RE-systeem. Groen staat voor poelkikker, bruin staat voor meerkikker. Een combinatie van de kleuren staat voor de hybride. Wanneer een individu een Y-chromosoom heeft, hebben we te maken met een mannelijk individu. Figuur naar voorbeeld uit Christiansen (2009).	18
Figuur 5	Schematische voorstelling van de voortplanting in het E-systeem. Groen staat voor poelkikker, bruin staat voor meerkikker. Een combinatie van de kleuren staat voor de hybride. Wanneer een individu een Y-chromosoom heeft, hebben we te maken met een mannelijk individu. * wijst op schaars voorkomen. Het grijze kadertje wijst op het niet levensvatbaar zijn of het niet bereiken van volwassenheid. Door het zelden tot niet voorkomen van mannelijke LRR-individueen, is de laatste rij eerder illustratief. Figuur naar voorbeeld uit Christiansen (2009).	19
Figuur 6	Overzicht van de bemonsterde locaties waar morfologische soortenidentificatie werd getoetst door middel van een genetisch gebaseerde soorttoewijzing (fase1). De cijfers geven de locaties weer, een legende kan worden teruggevonden in Tabel 1 .	21
Figuur 7	Overzicht van de verzamelde swabs voor genotypering en populatiegenetisch onderzoek en enkele stalen ter soortenidentificatie (fase 2) van groene kikker in Vlaanderen. Voor een overzicht van de plaatsnamen horende bij de nummers, zie Tabel 2 .	24
Figuur 8	Overzicht van de gevonden soorten, na genetische soorttoewijzing, uit fase 1. De grootte van de taartdiagrammen toont het totale aantal stalen per subsite weer (N = 2 tot 49). Groen = poelkikker, geel = bastaardkikker en bruin = meerkikker.	28
Figuur 9	Overzicht van het voorkomen van triploïde bastaardkikkers in de onderzochte subsites van fase 1. Oranje = percentage triploïde bastaardkikker LLR van het totale aantal bastaardkikkers op die locatie. De grootte van de taartdiagrammen toont het totale aantal bastaardkikker stalen per subsite weer (N = 2 tot 49). In één subsite (Buitengoor in Antwerpen) werden geen bastaardkikkers bemonsterd op een totaal van 6 stalen; hier is de taartdiagram blanco.	29

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

Figuur 23	Relatieve scheenbeenlengte (lengte van tibiofibula (SBL) gedeeld door kopromplengte (KRL)) in functie van de relatieve graafknobbellengte (graafknobbellengte (GKL) gedeeld door lengte van de eerste teen (TeL)). Witte cirkeltjes geven stalen weer waar genetica en morfologie verschillende soortidentificatie opleverden.	51
Figuur 24	Morfologisch moeilijk te determineren West-Vlaamse poelkikkers en bastaardkikkers (A en F: Fort van Beieren (Koolkerke), B: De Fonteintjes (Blankenberge), C: Uitkerkse Polders (Blankenberge), D: Meetkerkse Moeren (Zuierenkerke), E: Kampveld (Oostkamp), G en H: Stavelestraat (Alveringem), I: Elzendamme (Vleteren)).	52
Figuur 25	Relatieve scheenbeenlengte (lengte van tibiofibula (SBL) gedeeld door kopromplengte (KRL)) van bastaardkikker en poelkikker uit twee regio's.	53
Figuur 26	Verspreiding poelkikker (1 km x 1 km hokken raster Habitatrictlijn) – zwart: 2000-2015, rood 2016-2025. Gegevens: Natuurpunt en INBO.	56
Figuur 27	Verspreiding van poelkikker in Vlaanderen volgens Parent (1984).	56
Figuur 28	In 2023-2025 onderzochte waterpartijen met (groen) of zonder (rood) aanwezigheid van poelkikker (n = 256). Blauw: twijfel over aanwezigheid; aanvullend genetisch en morfologisch onderzoek vereist.	57
Figuur 29	Puntwaarnemingen 2011-2025 - IJzervallei. Nieuwe vindplaatsen INBO aangeduid met blauwe ellipsen. De meeste waarnemingen van De Blankaart kunnen niet geverifieerd worden, al kon INBO auditief de actuele (schijnbaar zeer schaarse) aanwezigheid van de soort bevestigen in 2024. Kaart: OpenStreetMap. Gegevens: Natuurpunt en INBO.	59
Figuur 30	Puntwaarnemingen 2011-2025 - Bulskampveld en ruime omgeving. Nieuwe vindplaatsen INBO aangeduid met blauwe ellipsen. Kaart: OpenStreetMap. Gegevens: Natuurpunt en INBO.	60
Figuur 31	Adult mannetje poelkikker (links) en jong mannetje bastaardkikker (rechts) van de nieuw ontdekte locatie in het Parochieveldbos (West-Vlaanderen op ca. 100 m van de grens met Oost-Vlaanderen). Inzet: graafknobbel en eerste teen.	61
Figuur 32	Puntwaarnemingen 2011-2025 - Damme en ruime omgeving. Nieuwe vindplaatsen INBO aangeduid met blauwe ellipsen. Kaart: OpenStreetMap. Gegevens: Natuurpunt en INBO.	61
Figuur 33	Verspreiding van bastaard- en meerkikker in Vlaanderen op basis van waarnemingen (2004-2025) met verifieerbaar bewijsmateriaal (foto of geluid). Blauw: minstens één verifieerbare bastaardkikkerwaarneming, geen verifieerbare meerkikkerwaarnemingen, geel: minstens één verifieerbare meerkikkerwaarneming, geen verifieerbare bastaardkikkerwaarnemingen, rood: minstens één verifieerbare bastaardkikkerwaarneming en minstens één verifieerbare meerkikkerwaarneming, grijs: enkel waarnemingen van niet nader gedetermineerde groene kikkers (excl. poelkikker). Gegevens: Natuurpunt en INBO.	64
Figuur 34	Verspreiding meerkikker s.l. met en zonder foto vanaf 2000. Rood: minstens één gevalideerde waarneming met foto, zwart: minstens één gevalideerde waarneming zonder foto en geen gevalideerde waarnemingen met foto beschikbaar.	65
Figuur 35	Verspreiding bastaardkikker met en zonder foto vanaf 2000. Rood: minstens één gevalideerde waarneming met foto, zwart: minstens één gevalideerde waarneming zonder foto en geen gevalideerde waarnemingen met foto beschikbaar.	65

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

85

Lijst van tabellen

Tabel 1	Overzicht van de onderzochte locaties en hoeveelheid stalen per locatie waarvan morfologische soorttoewijzing werd gecontroleerd door middel van de genetische soorttoewijzing (fase 1). NP staat voor Nationaal Park.	20
Tabel 2	Overzicht van de verzamelde stalen voor fase 2 dat populatiegenetisch geanalyseerd werd; Aantallen bemonsterde kikkers die per locatie, subsite en per soort (N_E = aantal bastaardkikkers, N_L = aantal poelkikkers en N_{tot} = totaal aantal voor filtering) voor de verdere populatiegenetische analyses worden gebruikt (fase 2). De soort weergegeven in de tabel gebeurde op basis van de genetische methodiek gebaseerd op soortspecifieke merkers en allelen. ^a = Stalen die in fase genomen werden ter soortidentificatie, maar die niet in de verdere dataverwerking werden behandeld. ^b = subsite strikt gelegen in Vlaams-Brabant of Limburg, maar aangeduid als deel van Antwerpse site. * = stalen verzameld tijdens fase 1 (2023) en hergebruikt voor populatiegenetische analyse fase 2 (2024), ** = stalen deels verzameld tijdens fase 1 (2023). NP staat voor Nationaal Park.	22
Tabel 3	Overzicht van de samenstellingen per locatie. N staat voor aantal individuen, H_e staat voor de verwachte heterozygositeit of gendiversiteit over alle onderzochte loci (16 loci; gecorrigeerd naar staalnamegrootte (Nei, 1978); H_o staat voor geobserveerde heterozygositeit, AR staat voor allelenrijkdom en PA_{LL} geeft de private allelen voor LL weer. LL staat voor diploïde poelkikker, LR staat voor diploïde bastaardkikker, LLR staat voor triploïde bastaardkikker en LLL staat voor triploïde poelkikkers. Aantallen na samenvoegen van subsites en filteren. - = N < 5, waarde wordt niet weergegeven of resultaat niet beschikbaar.	38
Tabel 4	Overzicht van de H_e bij diploïde bastaardkikkers (LR) binnen het R-genoom en het L-genoom voor dezelfde 5 loci.	40
Tabel 5	Poelkikkerleefgebieden in Vlaanderen. Provincie: ANT = Antwerpen, LIM = Limburg, VBR = Vlaams-Brabant, WV = West-Vlaanderen. SBP populatie geeft het nummer weer waarmee naar deze populatie wordt verwezen in het soortbeschermingsprogramma (Antea, 2019).	55
Tabel 6	Poelkikkerleefgebieden in Vlaanderen geordend volgens door INBO aangetroffen proportie poelkikker. * : In het Vijvergebied Midden-Limburg komt meerkikker voor, maar hebben we deze niet aangetroffen in de onderzochte poelkikkerhabitats.	82
Tabel 7	Samenvatting vastgestelde proportie poelkikker in actuele en voormalige leefgebieden in Vlaanderen. * : In het Vijvergebied Midden-Limburg komt meerkikker voor, maar hebben we deze niet aangetroffen in de onderzochte poelkikkerhabitats.	83
Tabel 8	SBZ-H-gebieden poelkikker. Gebieden waar het belang als “overige vindplaatsen” staat aangeduid hebben geen doelen voor populatie of leefgebied.	85
Tabel 9	Criteria voor het bepalen van de lokale staat van instandhouding van poelkikker (Lommaert <i>et al.</i> 2020).	86