

Genetisch onderzoek vitaliteit en authenticiteit vroedmeesterpad in Limburg

Maarten Gilbert & Pim Lemmers

In Nederland komt de vroedmeesterpad van oorsprong alleen voor in het Zuid-Limburgse heuvelland. Veel populaties zijn hier echter sterk gefragmenteerd en geïsoleerd, met veelal lage aantallen geslachtsrijpe dieren. Dit kan mogelijk leiden tot genetische verarming en uiteindelijk invloed hebben op de duurzame staat van instandhouding van de soort in Limburg. Daarnaast hebben sommige populaties mogelijk een uitheemse herkomst. Om hier meer inzicht in te krijgen, is in 2019 een genetisch onderzoek uitgevoerd in opdracht van de provincie Limburg.

De vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) bereikt in Zuid-Limburg de noordwestelijke grens van het natuurlijke verspreidingsgebied. In Nederland en de rest van Noordwest-Europa komt de ondersoort *Alytes obstetricans obstetricans* voor. Richting het zuiden neemt de genetische diversiteit toe, met name op het Iberisch Schiereiland, waar verschillende andere ondersoorten en soorten voorkomen. Door menselijk handelen is de vroedmeesterpad ook op veel andere locaties in Nederland buiten het natuurlijke verspreidingsgebied geïntroduceerd (figuur 1). In Zuid-Limburg kwam de vroedmeesterpad vanouds verspreid voor in het kleinschalige cultuurlandschap, maar door intensivering van het landgebruik en schaalvergroting van de landbouw is veel leefgebied verloren gegaan en steeds meer versnipperd geraakt. De soort staat dan ook als 'kwetsbaar' op de Rode Lijst. Isolatie en te kleine populatiegroottes kunnen leiden tot genetische verarming en een verminderde levensvatbaarheid van populaties. In 2019 is onderzocht in welke mate genetische verarming een rol speelt in de verschillende populaties. Door dit onderzoek werd tevens inzicht verkregen in de authenticiteit

en herkomst van de onderzochte Zuid-Limburgse populaties. Een uitgebreide beschrijving hiervan is eerder verschenen in het Natuurhistorisch Maandblad (Lemmers *et al.*, 2021).

Methodiek

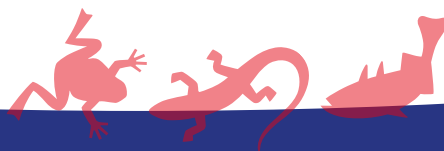
Alle naar verwachting authentieke populaties in Zuid-Limburg ten oosten van de Maas waren opgenomen in het onderzoek. Daarnaast was ook de uitgezette populatie in de ENCI-groeve ten westen van de Maas opgenomen in het onderzoek. Per leefgebied werd gestreefd om

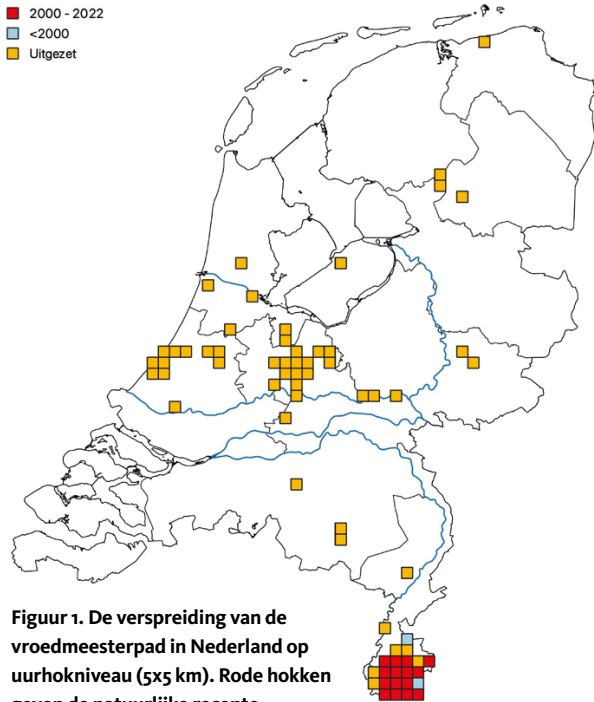


Vroedmeesterpad. (Foto: Maarten Gilbert)



Leefgebied vroedmeesterpad: kleinschalig cultuurlandschap te Limburg. (Foto: Maarten Gilbert)



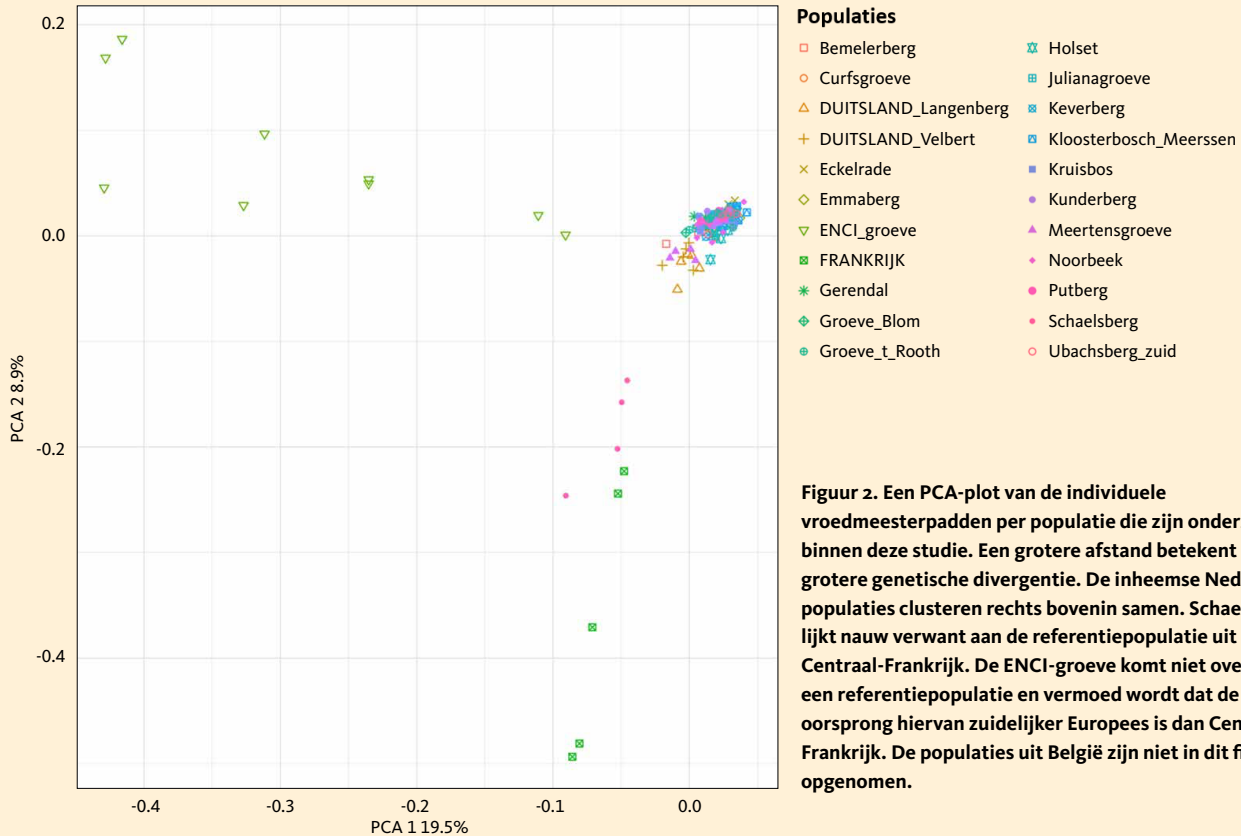


Figuur 1. De verspreiding van de vroedmeesterpad in Nederland op uurhokniveau (5x5 km). Rode hokken geven de natuurlijke recente verspreiding weer voor de periode 2000-2022, blauwe hokken de verspreiding vóór 2000 en gele hokken de uitzettingen. Binnen uurhokken met oorspronkelijke populaties kunnen ook uitgezette populaties aanwezig zijn, zoals bijvoorbeeld de populatie bij de Schaelsberg.

20-30 dieren te bemonsteren. Dit aantal geeft veelal een goed inzicht in de genetische diversiteit die aanwezig is in de totale populatie. Vanwege de verborgen levenswijze van (sub)adulte dieren werden larven bemonsterd. Hierbij werd een klein deel van de staartpunt afgenomen voor DNA-extractie, een handeling die geen negatieve effecten heeft op de groei en overleving van amfibielarven (Wilbur & Semlitsch 1990; Arntzen *et al.* 1999). In totaal zijn er 316 larven bemonsterd, verspreid over twaalf gebieden. Ter referentie zijn ook enkele monsters van vroedmeesterpadpopulaties uit België, Duitsland en Centraal-Frankrijk opgenomen in de analyses. Op basis van GBS (genotyping by sequencing) werd vervolgens circa 1% van het totale genoom in kaart gebracht, waarbij ongeveer 1200 onderscheidende SNP's (single nucleotide polymorphisms; een variatie in het DNA van één nucleotide) werden geselecteerd voor de verdere analyses. Door de hoge resolutie van het grote aantal SNP's konden populaties en zelfs individuen onderling goed vergeleken worden.

Genetische diversiteit en authenticiteit

Opvallend was dat de populaties Schaelsberg (nabij Valkenburg) en de ENCI-groeve (nabij Maastricht) zeer divergent (genetisch afwijkend) waren ten opzichte van de overige populaties in Zuid-Limburg, België en Duitsland (figuur 2). Populatie Schaelsberg clusterde samen met de populatie uit Centraal-Frankrijk, waardoor het aannemelijk is dat deze populatie uit deze regio afkomstig is. De herkomst van de populatie ENCI-groeve is niet bekend, maar gezien de hoge mate van divergentie, zowel binnen de populatie als ten opzichte van andere populaties, is een Zuid-Europese oorsprong aannemelijk. Nadere analyse van de



Figuur 2. Een PCA-plot van de individuele vroedmeesterpadden per populatie die zijn onderzocht binnen deze studie. Een grotere afstand betekent een grotere genetische divergentie. De inheemse Nederlandse populaties clusteren rechts bovenin samen. Schaelsberg lijkt nauw verwant aan de referentiepopulatie uit Centraal-Frankrijk. De ENCI-groeve komt niet overeen met een referentiepopulatie en vermoed wordt dat de oorsprong hiervan zuidelijker Europees is dan Centraal-Frankrijk. De populaties uit België zijn niet in dit figuur opgenomen.



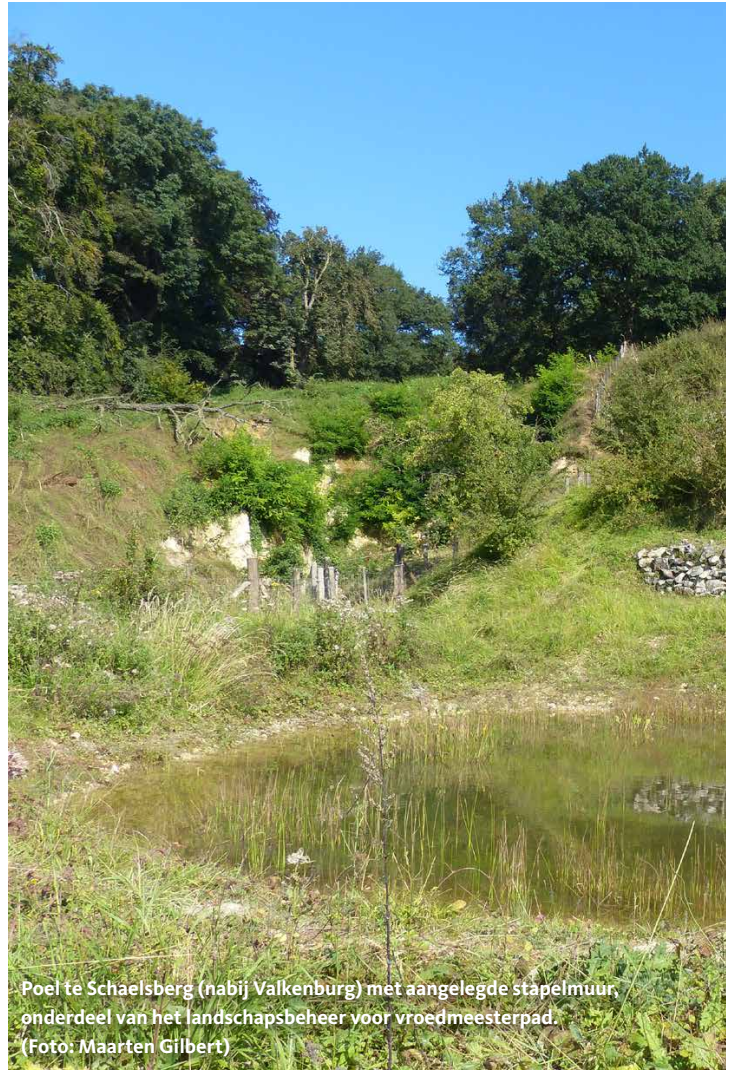
mitochondriale haplotypes (varianten van een klein deel van het mitochondriaal DNA) toont echter wel aan dat het *A. o. obstetricans* betreft en geen andere Zuid-Europese (onder)soort van vroedmeesterpad (Vliegenthart *et al.*, 2022). De genetische afstand tussen individuen onderling was in deze populaties ook groter dan in de oorspronkelijke inheemse populaties en de populaties in België en Duitsland langs de noordelijke grens van het areaal. Dit is inherent aan de toenemende genetische diversiteit richting het zuiden waar zich de glaciële refugia (toevluchtsoorten) bevonden tijdens de laatste ijstijden.

Voor de oorspronkelijke, inheemse vroedmeesterpadpopulaties was de genetische variatie veelal vergelijkbaar tussen grote en kleine populaties. Ook de F_{IS} -waarde (de inteeltcoëfficiënt), die een indicatie geeft van de heterozygositeit van populaties (hoe lager de heterozygositeit, des te hoger de mate van inteelt), was vergelijkbaar tussen grote en kleine populaties. Deze waarden waren ook vergelijkbaar met de grote referentiepopulaties in België en Duitsland. Dit is een indicatie dat genetische verarming waarschijnlijk niet de belangrijkste factor is in de afname van sommige populaties. Een vergelijkbare studie in Zwitserland toonde dit ook aan (Tobler *et al.*, 2013). Met name een verslechterde habitatkwaliteit en -connectiviteit zijn waarschijnlijk de belangrijkste factoren voor de afname van populaties, en mogelijk ook amfibieziektes.

Toekomstperspectief

Het effect van genetische verarming lijkt vooralsnog beperkt, maar de afname van genetische variatie in kleine geïsoleerde populaties is een voortdurend proces, waardoor de negatieve effecten in de loop der tijd groter kunnen worden. Natuurlijke uitwisseling tussen oorspronkelijke populaties is dus van groot belang voor het duurzaam voortbestaan van de soort. Hierbij kan de uitwisseling van een beperkt aantal individuen per generatie al een groot effect hebben (Madsen *et al.*, 1999). Uiteraard is het daarbij cruciaal dat de habitat geschikt is voor vroedmeesterpad en dat dit door gericht beheer in stand wordt gehouden. De focus dient hierbij op de oorspronkelijke populaties te liggen. Natuurlijke verbindingen verdienen altijd zeer sterk de voorkeur, maar bij populaties waar dit niet gerealiseerd kan worden kan bijplaatsing overwogen worden. Hiervoor dienen alleen oorspronkelijke en bij voorkeur nabij liggende populaties als bron gebruikt te worden. Dit dient maximaal 20% van de bestaande populatie te betreffen, om zo het behoud van de bestaande allelen (varianten van een bepaald gen) te waarborgen (Weeks *et al.*, 2011; Hedrick, 1995). Deze allelen kunnen belangrijk zijn voor lokale adaptatie van een (sub)populatie. Verder dienen de criteria vanuit de IUCN omtrent herintroducties en translocaties gevolgd te worden (IUCN/SSC, 2013). Van goed ingerichte, robuuste verbindingen profiteren echter – tot in lengte van jaren – honderden, zo niet duizenden soorten; van het overzetten van individuen profiteert er maar één.

De geïntroduceerde uitheemse (zeer divergente) populaties Schaelsberg en ENCI-groeve dienen zoveel mogelijk geïsoleerd te worden van oorspronkelijke populaties of wellicht zelfs verwijderd te worden om verdere verspreiding, zowel op natuurlijke wijze als via menselijk handelen, tegen te gaan. Bij contact en vermenging met oorspronkelijke populaties is verlies van lokale genetische diversiteit een realistisch scenario, waarbij de lokale Nederlandse genetische

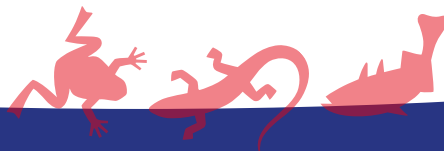


Poel te Schaelsberg (nabij Valkenburg) met aangelegde stapelmuur, onderdeel van het landschapsbeheer voor vroedmeesterpad. (Foto: Maarten Gilbert)



Jonge larve vroedmeesterpad. (Foto: Edo Goverse)

diversiteit verloren kan gaan. Daarnaast kunnen ongecontroleerde en illegale uitzettingen en bijplaatsingen ook andere negatieve gevolgen hebben, zoals verstoring van het lokale ecosysteem en introductie van pathogenen. De vroedmeesterpad is bijvoorbeeld zeer gevoelig voor





de ziekte chytridiomycose, veroorzaakt door *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Ongecontroleerde uitzettingen, zowel in Limburg als in andere delen van Nederland, dienen dus te allen tijde voorkomen te worden.

Samenvattend kan gesteld worden dat voor de vroedmeesterpad factoren als habitatkwaliteit en mogelijk ook amfibieziektes waarschijnlijk zwaarder wegen dan genetische verarming bij kleine en afnemende populaties. Het is essentieel dat ingezet wordt op het vergroten van de habitatkwaliteit en het verbinden van populaties voor een robuuste populatiestructuur en het duurzaam voortbestaan van de vroedmeesterpad in Limburg.

Summary

Genetic research common midwife toad Limburg

The common midwife toad (*Alytes obstetricans*) occurs only naturally in the outermost southeastern parts of the Netherlands (Zuid-Limburg), which demarcates the northwestern limit of its distribution range in Europe. Here, the once connected populations are nowadays highly fragmented and isolated, with low levels of adult animals in some populations. This may have led to genetic erosion and a reduced fitness of the remaining populations. In 2019, a genetic study was undertaken to provide insight in these factors. Of the 12 included populations, two



Oude larven vroedmeesterpad. (Foto: Maarten Gilbert)

(Schaelsberg and ENCI-groeve) were clearly non-native, likely originating from Central-France and even more southern regions, respectively. The genetic diversity was relatively low in the native populations. However, it was comparable to other populations along the northern distribution limit in Belgium and Germany. Furthermore, the expected heterozygosity (expressed as F_{IS}) was comparable in relatively large and small populations. This indicates that other factors, such as habitat suitability and potentially also amphibian diseases, may have a larger effect on the population size and viability than genetic erosion has. Nevertheless, natural connections and exchange of animals between native populations are crucial for the long-term survival of the common midwife toad in the Netherlands. In contrast, illegally introduced (non-native) populations need to be isolated or even removed and new introductions need to be prevented, to minimize the potentially detrimental effects on native populations, such as loss of local genetic diversity, disruption of the ecosystem, and introduction of amphibian pathogens.

Literatuur

- Arntzen, J.W., A. Smithson & R. S. Oldham, 1999. Marking and tissue sampling effects on body condition and survival in the newt *Triturus cristatus*. *Journal of Herpetology* 33(4): 567-57.
- Hedrick, P.W., 1995. Gene flow and genetic restoration: the Florida panther as a case study. *Conservation Biology*: 996-1007.
- IUCN/SSC, 2013. Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0. Gland, Switzerland: IUCN Species Survival Commission.
- Lemmers, P., M.J. Gilbert, C.A.M. Wagemaker & B.H.J.M. Crombaghs, 2021. Genetisch onderzoek aan de Vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) in Limburg. Genetische diversiteit, vitaliteit en authenticiteit van populaties. *Natuurhistorisch Maandblad* 8(110): 182-189.
- Madsen, T., R. Shine, M. Olsson & H. Wittzell, 1999. Restoration of an inbred adder population. *Nature* 402(6757): 34-35.
- Tobler, U., T.W. Garner & B.R. Schmidt, 2013. Genetic attributes of midwife toad (*Alytes obstetricans*) populations do not correlate with degree of species decline. *Ecology and evolution* 3(9): 2806-2819.
- Vliegenthart, C., M. van de Vrede, I. den Boer, M. Gilbert, P. Lemmers, J. France, M. de Visser, R. Struijk & B. Wielstra, 2022. The limits of mtDNA barcoding for determining the provenance of invasive species: a midwife toad example. *Amphibia-Reptilia*, submitted.
- Weeks, A.R., C.M. Sgro, A.G. Young, R. Frankham, N.J. Mitchell, K.A. Miller, ... & A.A. Hoffmann, 2011. Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments: a genetic perspective. *Evolutionary Applications* 4(6): 709-725.
- Wilbur H.M. & H.D. Semlitsch, 1990. Ecological Consequences of Tail Injury in Rana Tadpoles. *Copeia* 1: 18-24.

Maarten Gilbert

RAVON, m.gilbert@ravon.nl

Pim Lemmers

Natuurbalans - Limes Divergens BV, lemmers@natuurbalans.nl

