

Genetisch onderzoek aan de Vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) in Limburg

GENETISCHE DIVERSITEIT, VITALITEIT EN AUTHENTICITEIT VAN POPULATIES



FIGUUR 1

Bij de Vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) draagt het mannetje zorg voor de eieren (foto: Paul van Hoof).

P. Lemmers, Bureau Natuurbalans – Limes Divergens BV, Toernooiveld 1, 6525 ED Nijmegen, e-mail: lemmers@natuurbalans.nl
M.J. Gilbert, RAVON, Toernooiveld 1, 6525 ED Nijmegen, e-mail: m.gilbert@ravon.nl
C.A.M. Wagemaker, Radboud Universiteit, Instituut voor Water en Wetland Research, Afdeling Plantecologie en Fysiologie, e-mail: n.wagemaker@science.ru.nl
B.H.J.M. Crombaghs, Bureau Natuurbalans – Limes Divergens BV, Toernooiveld 1, 6525 ED Nijmegen, e-mail: crombaghs@natuurbalans.nl

In het Zuid-Limburgse heuvelland komt de Vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) verspreid voor. Door de lage aantallen en de slechte habitatverbindingen tussen de leefgebieden zijn deze populaties vaak erg kwetsbaar. Het totale aantal geslachtsrijpe dieren wordt bij een aanzienlijk deel van de populaties als laag ingeschat. Door de veelal geringe omvang en de hoge mate van ruimtelijke isolatie rees de vraag of er bij de populaties sprake is van een dermate genetische verarming dat dit hun duurzaam voortbestaan in gevaar brengt. Ook bestonden er van enkele populaties twijfels over de authenticiteit. Om dit te onderzoeken is in opdracht van de Provincie Limburg in 2019 bij het merendeel van de Limburg-

se populaties van de Vroedmeesterpad genetisch onderzoek uitgevoerd. De resultaten van dat onderzoek zijn in dit artikel beschreven.

AANLEIDING EN DOELEN

De Vroedmeesterpad [figuur 1] komt in Nederland van nature alleen voor in Zuid-Limburg. Dit is tevens de noordwestelijke grens van het verspreidingsareaal in Europa (FRISSEN & VAN DEN BROEK, 2009). De soort staat als 'Kwetsbaar' vermeld op de Rode Lijst Amfibieën en Reptielen (VAN DELFT *et al.*, 2007) en is opgenomen in Bijlage IV van de Europese Habitatrichtlijn. De Vroedmeesterpad is een warmteminnende soort die wordt geassocieerd met kleinschalige overwegend zuidelijk geëxponeerde landschapselementen zoals graften, holle wegen en rommelige overhoekjes. Ze wordt onder meer aangetroffen op (oude) boerenerven, in tuinen, extensief beheerde terreinen en voormalige grind- en mergelgroeves (FRISSEN & VAN DEN BROEK, 2009).

De Vroedmeesterpad kwam vroeger meer verspreid over Zuid-Limburg voor, maar veel vindplaatsen zijn inmiddels door allerlei oorzaken verdwenen. Die oorzaken zijn vooral terug te voeren op schaalvergroting van de landbouw en intensivering van het landgebruik (FRISSEN & VAN DEN BROEK, 2009). Het is mogelijk dat door toenemende isolatie van leefgebieden de risico's op inteelt toenemen waardoor het duurzaam voortbestaan van de soort in gevaar komt. In de Natuurvisie van de Provincie Limburg is aangegeven dat indien soorten niet meer vanzelf kunnen terugkeren in geschikt leefgebied, translocatie en repopulatie een geschikte maatregel kan zijn voor het behoud van die soorten (PROVINCIE LIMBURG, 2017). Als populaties dermate genetisch verarmd zijn dat niet uitgesloten kan worden dat er inteelteffecten optreden met als gevolg een verminderde vitaliteit, dan kan deze maatregel ook worden toegepast. Om inzicht te krijgen in de noodzaak van translocatie en repopulatie dient eerst de huidige genetische variatie binnen de afzonderlijke populaties van de soort in beeld te worden gebracht. Dit was de aanleiding om het hier gepresenteerde genetisch onderzoek in opdracht van de Provincie Limburg uit te voeren. Samengevat waren de doelen als volgt:

- 1) Het krijgen van een representatief beeld van eventuele inteelt en verlies van genetische variatie, zuiverheid en vitaliteit van de aanwezige (deel)populaties.
- 2) Het op basis van dit beeld komen tot een afweging of het raadzaam is om met translocatie en repopulatie een grotere genetische variatie te bewerkstelligen met als gevolg daarvan een

grotere kans op duurzame instandhouding van de bestaande populaties.

METHODIEK

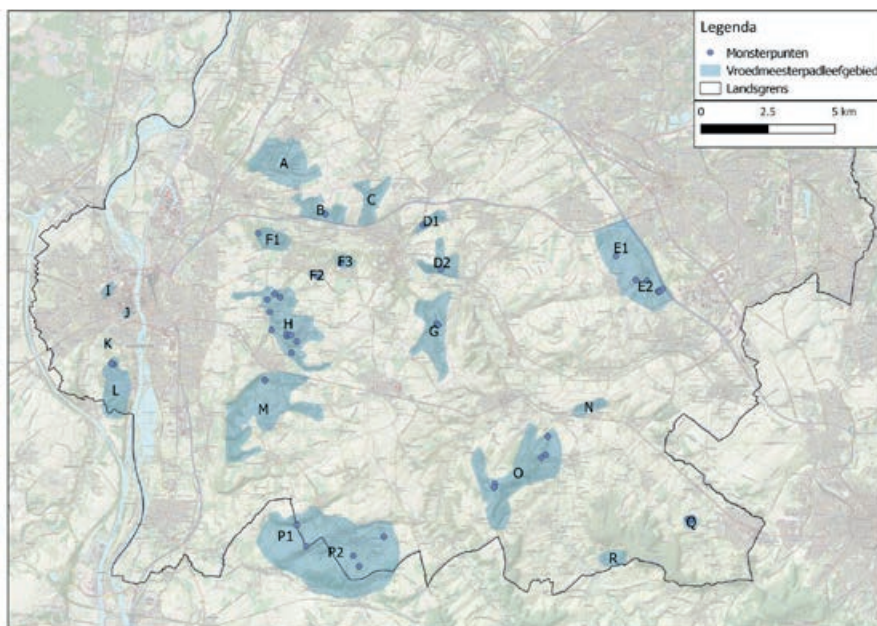
Aangezien er in Zuid-Limburg veel versnipperde deelpopulaties van de Vroedmeesterpad voorkomen, was het niet mogelijk om alle populaties binnen een redelijk tijdsbestek en binnen het beschikbare onderzoeksbudget te onderzoeken. Daarom is er een prioritering gemaakt in de te bemonsteren deelleefgebieden op basis van de verwachte authenticiteit.

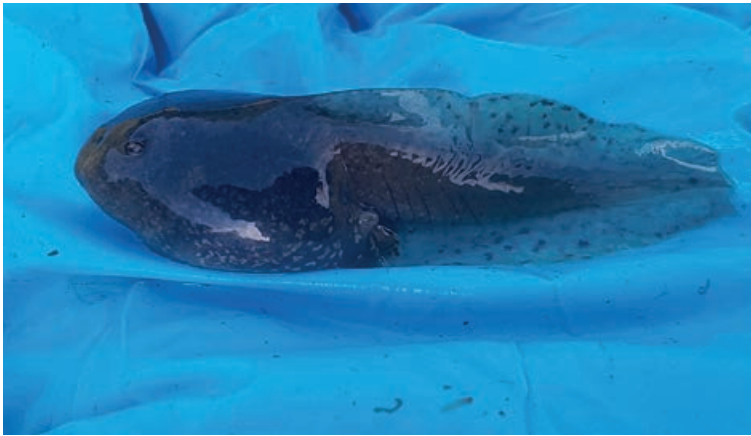
Leefgebied en aantal bemonsterde larven per deelleefgebied	Onderbouwing voor niet bemonsteren	Totaal aantal larven bemonsterd
A. Waterval	Waarschijnlijk verdwenen	
B. Kloosterbosch		25
C. Ravensbosch	Mogelijk verdwenen	
D1. Emmaberg (20), D2. Schaelsberg (5)		25
E1. Kunderberg (10), E2. Ubachsberg-Zuid (5), Putberg (5), Keверberg (10)		30
F1. Curfsgroeve (10), Groeve 't Rooth (12), Julianagroeve (12) (Zuidelijke Geuldalhelling), F2. Groeve Blom (13), F3. Meertensgroeve (10)		57
G. Gerendal		25
H. Bemelerberg (12) (Bemelen-Cadier en Keer)		12
I. Hoge fronten	Verdacht, waarschijnlijk uitgezet	
J. Natuurtuin Natuurmuseum Maastricht	Verdacht, waarschijnlijk uitgezet	
K. Natuurtuinen Jekerdal	Uitgezette populatie	
L. ENCI-groeve		32
M. Eckelrade		26
N. Wahlwiller	Uitgezette populatie	
O. Kruisbos		30
P1. Mheer		15
P2. Noorbeek		14
Q. Holset		25
R. Cottessen	Recent dieren bijgeplaatst van Keверberg, onduidelijk of authentieke populatie nog aanwezig is	
Totaal		316

TABEL 1
Bemonsterde leefgebieden en aantal bemonsterde larven van de Vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) per deelleefgebied. De cursief aangegeven leefgebieden zijn niet bemonsterd. Het bemonsterd aantal larven per deelleefgebied is tussen haakjes weergegeven. De letters corresponderen met figuur 2.

FIGUUR 2

Begrenzing van de leefgebieden van Vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*) op basis van het voorkomen van de soort in de periode 2001-2013. Tevens zijn de monsterpunten binnen de leefgebieden weergegeven: A. Waterval; B. Kloosterbosch; C. Ravensbosch; D1. Emmaberg; D2. Schaelsberg; E1. Ubachsberg-Noord (Kunderberg); E2. Ubachsberg-Zuid (Putberg); F1. Zuidelijke Geuldalhelling, (Curfsgroeve, Groeve 't Rooth & Julianagroeve); F2. Groeve Blom; F3. Meertensgroeve; G. Gerendal; H. Bemelen-Cadier en Keer; I. Hoge fronten; J. Natuurtuin Maastricht; K. Natuurtuinen Jekerdal; L. ENCI-groeve; M. Eckelrade; N. Wahlwiller; O. Kruisbos; P1. Mheer; P2. Noorbeek; Q. Holset en R. Cottessen. De letters corresponderen met tabel 1.





FIGUUR 3

Van de larven is een klein staartpuntje afgenomen voor DNA-extractie. Deze handeling heeft geen negatieve effecten op de groei en/of overleving van een amfibielarve (foto: Pim Lemmers).

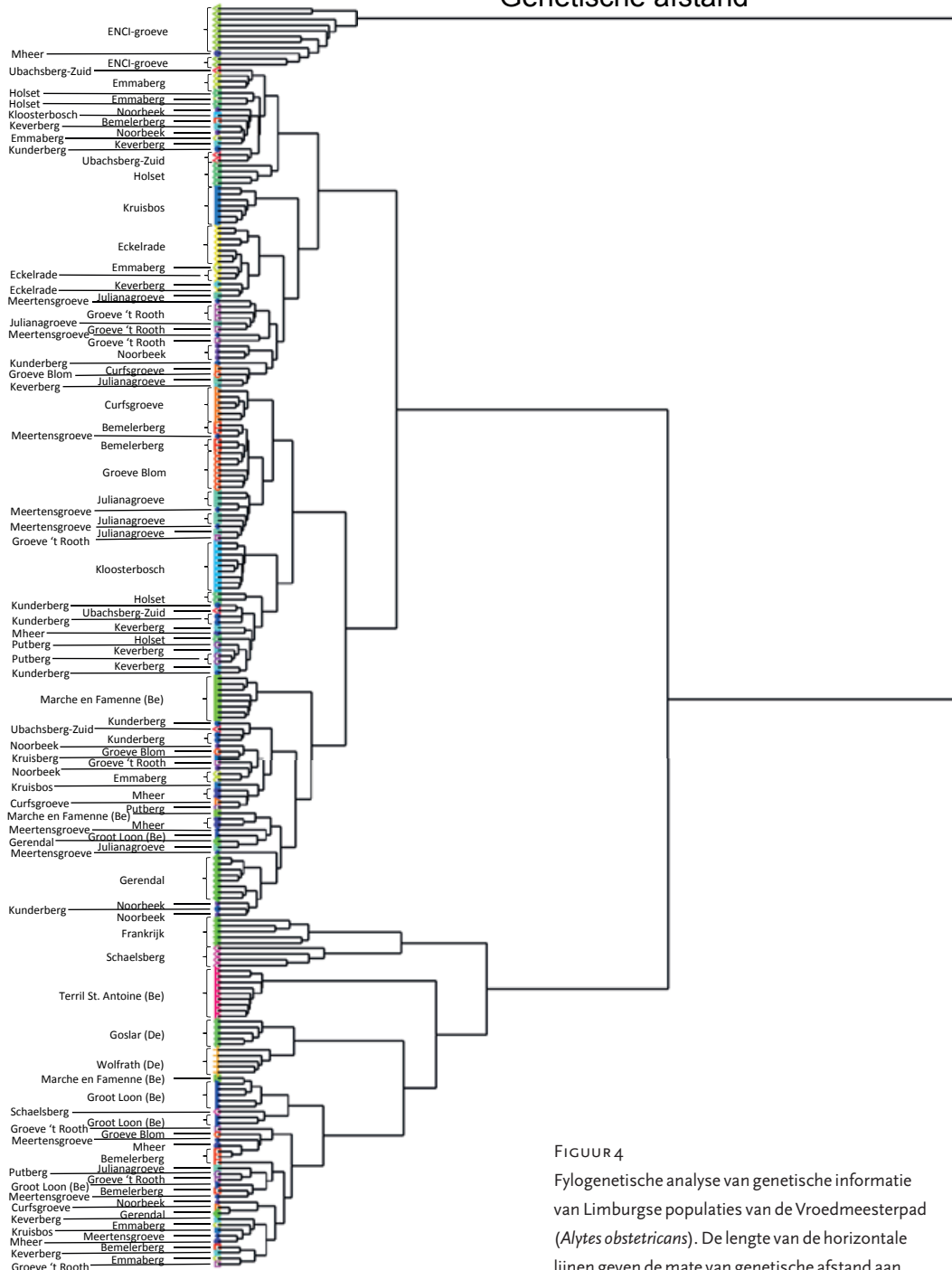
Door de vrij verborgen levenswijze en de soms zeer geringe populatieomvang is de kans om voldoende adulte dieren te vangen voor een representatieve steekproef klein. Daarom is er gefocust op het vangen en bemonsteren van larven. In totaal zijn twaalf van de meest belangrijke leefgebieden bemonsterd [tabel 1; figuur 2]. Naast de Nederlandse leefge-

bieden zijn ook referentiepopulaties uit België, Duitsland en Frankrijk in het onderzoek meegenomen.

Van de larven is een klein staartpuntje afgenomen voor DNA-extractie [figuur 3], een handeling die geen negatieve effecten heeft op de groei en/of overleving van amfibielarven (WILBUR & SEMLITSCH, 1990; ARNTZEN *et al.*, 1999). Gestreefd is om 20 tot 30 larven per leefgebied te onderzoeken.

In totaal zijn 316 larven bemonsterd. Per leefgebied zijn zo veel mogelijk verschillende wateren en larven van verschillende lengteklassen in het onderzoek opgenomen om een zo representatief mogelijk beeld van de genetische samenstelling van de populaties te krijgen. De methode die hierbij is toegepast wordt 'genotyping by sequencing' (GBS) genoemd (ELSHIRE *et al.*, 2011). GBS is een techniek

Genetische afstand



FIGUUR 4

Fylogenetische analyse van genetische informatie van Limburgse populaties van de Vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*). De lengte van de horizontale lijnen geven de mate van genetische afstand aan.

waarbij een fractie (ongeveer 1%) van de totale DNA-sequentie in kaart wordt gebracht. Voor elk individu worden hierdoor verspreid over het hele genoom enkele duizenden genetische DNA-merkers, zogenaamde SNP's (Single Nucleotide Polymorphisms) geselecteerd. De analyse van deze SNP's verschaft inzicht in de genetische kenmerken van de (deel-)populaties en individuen. Voor een gedetailleerde beschrijving van het laboratoriumprotocol en uitvoering van de bio-informatica wordt verwezen naar LEMMERS *et al.* (2020).

RESULTATEN

Algemeen

Op basis van de fylogenetische analyse kunnen al meteen twee grote clusters onderscheiden worden die genetisch gezien sterk van elkaar verschillen [figuur 4]. Dit zijn namelijk de monsters uit de ENCI-groeve inclusief één sample uit Mheer en de rest van de Nederlandse, Belgische en Franse monsters. Binnen de tweede groep kunnen vervolgens nog twee grote subgroepen worden onderscheiden.

Binnen de eerste subgroep vallen de meeste Nederlandse monsters en één Belgische populatie en binnen de tweede de Franse, Duitse, twee Belgische en enkele monsters van Nederlandse populaties. De genetische afstand tussen individuen is het grootst voor individuen uit de ENCI-groeve, de Schaelsberg en Frankrijk.

Op basis van de analyses is evident dat de populaties van de ENCI-groeve en de Schaelsberg sterk afwijken van de overige Limburgse populaties. Deze worden derhalve niet als inheems beschouwd. De inheemse populaties zijn nauw verwant aan de referenties uit België en Duitsland. Uit de fylogenetische analyse is niet af te leiden of dieren van een bepaald leefgebied zijn verplaatst naar een ander, maar dit lijkt wel waarschijnlijk. Er zijn bijvoorbeeld sterke overeenkomsten tussen enkele dieren van Noorbeek en Kunderberg/Emmaberg/Gerendal die op basis van de geografische ligging niet op natuurlijke wijze kunnen uitwisselen. De fylogenetische analyse laat ook zien dat de er binnen de Nederlandse inheemse populaties enkele dieren zijn met een uitheemse oorsprong. Dit geldt bijvoorbeeld voor een dier uit Mheer, dat sterke genetische overeenkomst vertoont met de ENCI-groeve [figuur 4]. Daarnaast laat een ander dier uit Mheer overeenkomst zien met de Belgische referentie Terril St. Antoine. Ook één dier uit de Meertensgroeve vertoont overeenkomst met deze referentie. Eén dier afkomstig van de Curfsgroeve heeft kenmerken

Populatie	Private allelen	Inteeltcoëfficiënt F_{IS}	Populatiegrootte
Bemelerberg	0	-0,6240	groot
Groeve Blom	0	-0,6525	klein
Curfsgroeve	0	-0,5973	klein
Eckelrade	1	-0,6021	klein
Emmaberg	0	-0,5969	klein
ENCI-groeve	65	-0,9032	groot
Gerendal	0	-0,6263	klein
Holset	1	-0,6317	klein
Julianagroeve	0	-0,6085	groot
Keerbergen	0	-0,6017	groot
Kloosterbosch	0	-0,5854	klein
Kruisbos	0	-0,6152	groot
Kunderberg	0	-0,6146	klein
Meertensgroeve	0	-0,6598	klein
Mheer	0	-0,6293	klein
Noorbeek	0	-0,6167	klein
Putberg	0	-0,5847	groot
Groeve 't Rooth	3	-0,6551	groot
Schaelsberg	7	-0,8537	klein
Ubachsberg-Zuid	0	-0,5815	klein
Groot Loon (Be)	2	-0,5963	groot
Marche en Famenne (Be)	2	-0,5399	groot
Terril St. Antoine (Be)	0	-0,5143	groot
Frankrijk	5	-0,7371	groot
Wulfrath (Du)	0	-0,7064	groot
Goslar (Du)	0	-0,6650	groot
Gemiddeld zonder ENCI-groeve, de Schaelsberg en referentiepopulaties	0,3	-0,6157	

van de beide Duitse referenties Goslar en Wulfrath. Ook zijn er genetische overeenkomsten tussen Belgische referenties en de Nederlandse. Genetische uitwisseling (translocatie) tussen Duitse en Nederlandse populaties lijkt minder aan de orde. De Nederlandse populaties die geografisch gezien dicht bij elkaar liggen, worden over het algemeen ook bij elkaar geclusterd. Dit geldt bijvoorbeeld voor de Bemelerberg, Curfsgroeve, Julianagroeve, Groeve Blom, Groeve 't Rooth en de Meertensgroeve. Echter ook hier suggereert de analyse dat in het verleden dieren zijn bijgeplaatst uit andere gebieden. De referentie uit Centraal-Frankrijk vertoont een hogere genetische differentiatie ten opzichte van de Nederlandse, Belgische en Duitse populaties.

Genetische variatie binnen populaties

De genetische variatie binnen een populatie wordt uitgedrukt in F_{ST} . De waarden kunnen variëren tussen 0 en 1. Hoge F_{ST} -waarden impliceren een hoge mate van genetische differentiatie tussen populaties. De inteeltcoëfficiënt F_{IS} is het deel van de variantie in de deelpopulatie dat aanwezig is in een individu. Hoe negatiever de waarde, des te hoger de heterozygositeit en dus des te lager de mate van inteelt. Daarnaast zegt het aantal private allelen in een populatie iets over in hoeverre allelen enkel in de deelpopulaties worden aangetroffen en of er dus sprake is van genetische uitwisseling tussen deelpo-

TABEL 2

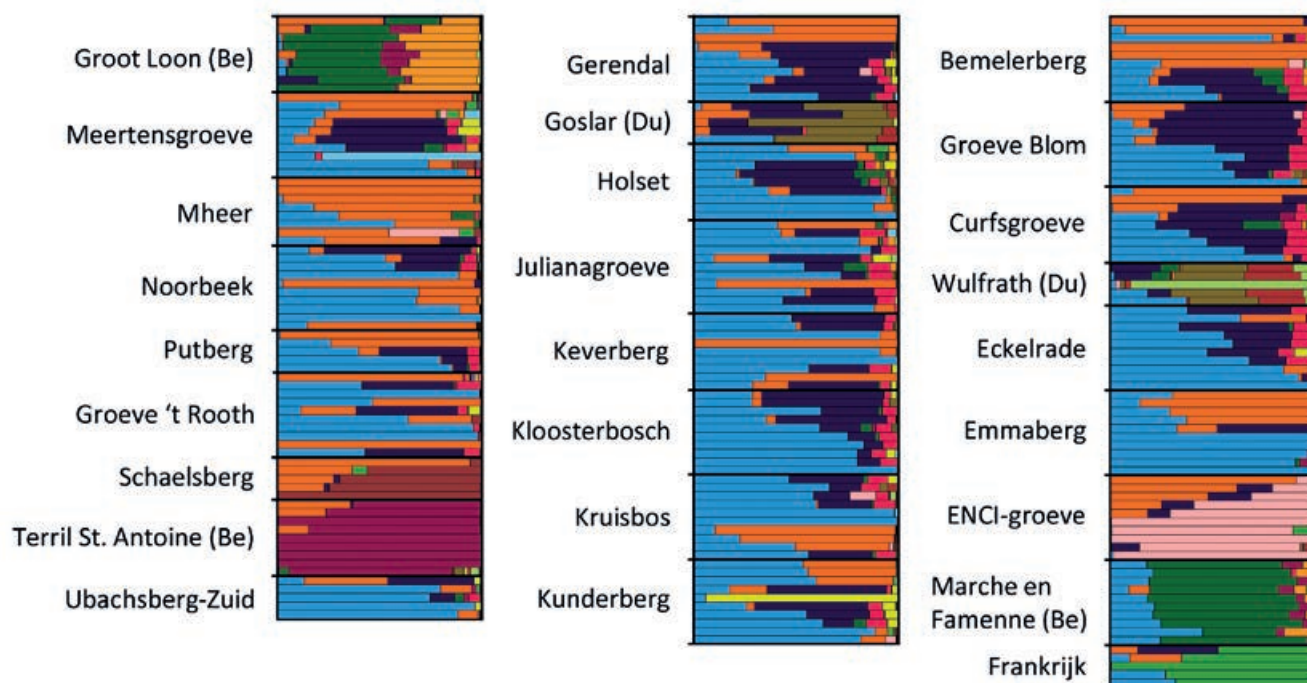
Private allelen en inteeltcoëfficiënten (F_{IS}) per populatie op basis van 2479 Single Nucleotide Polymorphisms. Groen duidt op een relatief lage en rood op een relatief hoge inteeltcoëfficiënt. Hoe negatiever de F_{IS} -waarde, des te hoger de heterozygositeit en dus des te lager de mate van inteelt.

Populatie	Bemelerberg	GroeveBlom	Curfsgroeve	Eckelrade	Emmaberg	Gerendal	Holset	Julianagroeve	Keverberg	Kloosterbosch	Kruisbos	Kunderberg	Meertensgroeve	Mheer	Noorbeek	Putberg	Groeve 't Rooth	Ubachsberg Zuid	Schaelsberg	ENCI-groeve	Groot Loon (Be)	Marche en Famenne (Be)	Terril St. Antoine (Be)	Frankrijk	Goslar (Du)	Wulfrath (Du)
Bemelerberg	0.000	0.031	0.073	0.160	0.136	0.135	0.117	0.033	0.074	0.143	0.144	0.108	0.024	0.075	0.053	0.105	0.059	0.114	0.327	0.345	0.133	0.124	0.348	0.338	0.305	0.283
GroeveBlom	0.031	0.000	0.116	0.170	0.158	0.177	0.159	0.065	0.089	0.153	0.163	0.151	0.074	0.133	0.078	0.148	0.093	0.148	0.358	0.379	0.171	0.195	0.376	0.365	0.343	0.314
Curfsgroeve	0.073	0.116	0.000	0.169	0.163	0.135	0.128	0.086	0.121	0.181	0.187	0.140	0.075	0.124	0.096	0.150	0.067	0.154	0.322	0.359	0.169	0.174	0.341	0.348	0.332	0.310
Eckelrade	0.160	0.170	0.169	0.000	0.205	0.260	0.189	0.134	0.151	0.243	0.204	0.182	0.130	0.180	0.138	0.228	0.133	0.227	0.405	0.428	0.229	0.240	0.403	0.421	0.412	0.409
Emmaberg	0.136	0.158	0.163	0.205	0.000	0.190	0.125	0.092	0.068	0.135	0.181	0.115	0.104	0.117	0.079	0.104	0.095	0.099	0.349	0.367	0.170	0.177	0.366	0.344	0.297	0.314
Gerendal	0.135	0.177	0.135	0.260	0.190	0.000	0.143	0.125	0.169	0.236	0.203	0.160	0.095	0.166	0.134	0.153	0.121	0.173	0.352	0.358	0.197	0.178	0.364	0.375	0.351	0.311
Holset	0.117	0.159	0.128	0.189	0.125	0.143	0.000	0.120	0.105	0.150	0.149	0.129	0.090	0.103	0.084	0.106	0.083	0.088	0.309	0.347	0.152	0.133	0.316	0.304	0.265	0.273
Julianagroeve	0.033	0.065	0.086	0.134	0.092	0.125	0.120	0.000	0.046	0.105	0.140	0.090	0.033	0.085	0.033	0.075	0.028	0.081	0.333	0.380	0.135	0.154	0.342	0.354	0.299	0.299
Keverberg	0.074	0.089	0.121	0.151	0.068	0.169	0.105	0.046	0.000	0.077	0.123	0.085	0.063	0.070	0.020	0.045	0.070	0.078	0.355	0.381	0.147	0.158	0.374	0.364	0.304	0.315
Kloosterbosch	0.143	0.153	0.181	0.243	0.135	0.236	0.150	0.105	0.077	0.000	0.171	0.166	0.136	0.144	0.087	0.129	0.129	0.123	0.400	0.414	0.194	0.202	0.425	0.410	0.362	0.352
Kruisbos	0.144	0.163	0.187	0.204	0.181	0.203	0.149	0.140	0.123	0.171	0.000	0.171	0.123	0.132	0.107	0.160	0.123	0.150	0.369	0.381	0.193	0.195	0.394	0.385	0.337	0.331
Kunderberg	0.108	0.151	0.140	0.182	0.115	0.160	0.129	0.090	0.085	0.166	0.171	0.000	0.082	0.131	0.082	0.104	0.104	0.045	0.352	0.377	0.176	0.157	0.363	0.369	0.303	0.306
Meertensgroeve	0.024	0.074	0.075	0.130	0.104	0.095	0.090	0.033	0.063	0.136	0.123	0.082	0.000	0.074	0.048	0.073	0.041	0.085	0.267	0.331	0.120	0.125	0.299	0.306	0.231	0.244
Mheer	0.075	0.133	0.124	0.180	0.117	0.166	0.103	0.085	0.070	0.144	0.132	0.131	0.074	0.000	0.059	0.090	0.069	0.112	0.224	0.259	0.104	0.093	0.310	0.220	0.207	0.214
Noorbeek	0.053	0.078	0.096	0.138	0.079	0.134	0.084	0.033	0.020	0.087	0.107	0.082	0.048	0.059	0.000	0.034	0.053	0.056	0.296	0.360	0.119	0.122	0.319	0.325	0.264	0.275
Putberg	0.105	0.146	0.150	0.228	0.104	0.153	0.106	0.075	0.045	0.129	0.160	0.104	0.073	0.090	0.034	0.000	0.090	0.080	0.295	0.336	0.161	0.155	0.366	0.351	0.326	0.331
Groeve 't Rooth	0.059	0.093	0.067	0.133	0.095	0.121	0.083	0.026	0.070	0.129	0.123	0.104	0.041	0.069	0.053	0.090	0.000	0.063	0.278	0.334	0.136	0.136	0.307	0.295	0.248	0.249
Ubachsberg Zuid	0.114	0.148	0.154	0.227	0.099	0.173	0.088	0.081	0.078	0.123	0.150	0.045	0.085	0.112	0.056	0.080	0.063	0.000	0.314	0.330	0.154	0.127	0.358	0.324	0.293	0.289
Schaelsberg	0.327	0.358	0.322	0.405	0.349	0.352	0.309	0.333	0.355	0.400	0.369	0.352	0.267	0.224	0.296	0.295	0.278	0.314	0.000	0.203	0.291	0.305	0.339	0.218	0.331	0.310
ENCI-groeve	0.345	0.379	0.359	0.428	0.367	0.356	0.347	0.380	0.381	0.414	0.381	0.377	0.331	0.259	0.360	0.336	0.334	0.330	0.203	0.000	0.343	0.364	0.373	0.258	0.317	0.314
Groot Loon (Be)	0.133	0.171	0.169	0.229	0.170	0.197	0.152	0.135	0.147	0.194	0.193	0.176	0.120	0.104	0.119	0.161	0.136	0.154	0.291	0.343	0.000	0.138	0.236	0.291	0.274	0.264
Marche en Famenne (Be)	0.124	0.195	0.174	0.240	0.177	0.178	0.133	0.154	0.158	0.202	0.195	0.157	0.125	0.093	0.122	0.155	0.136	0.127	0.305	0.364	0.138	0.000	0.317	0.322	0.236	0.247
Terril St. Antoine (Be)	0.348	0.376	0.341	0.403	0.366	0.364	0.316	0.342	0.374	0.425	0.394	0.363	0.299	0.310	0.319	0.366	0.307	0.358	0.339	0.373	0.236	0.317	0.000	0.345	0.401	0.378
Frankrijk	0.338	0.365	0.348	0.421	0.344	0.375	0.304	0.354	0.364	0.410	0.385	0.369	0.306	0.220	0.325	0.351	0.295	0.324	0.218	0.258	0.291	0.322	0.345	0.000	0.312	0.288
Goslar (Du)	0.305	0.343	0.332	0.412	0.297	0.351	0.265	0.299	0.304	0.362	0.337	0.303	0.231	0.207	0.264	0.326	0.248	0.293	0.331	0.317	0.274	0.236	0.401	0.312	0.000	0.183
Wulfrath (Du)	0.283	0.314	0.310	0.409	0.314	0.311	0.273	0.299	0.315	0.352	0.331	0.306	0.244	0.214	0.275	0.331	0.249	0.289	0.310	0.314	0.264	0.247	0.378	0.288	0.183	0.000

TABEL 3
Paarsgewijze F_{ST} -waarden voor genetische differentiatie tussen populaties. Een hogere waarde duidt op een sterkere differentiatie (= mindere mate van uitwisseling). Het kleurenschema rood-geel-groen staan voor geen-weinig-veel genetische differentiatie tussen populaties.

populaties. Private allelen zijn uniek voor een bepaalde populatie en vormen een indicatie voor genetische differentiatie. Hoe meer private allelen, des te hoger de genetische differentiatie (zie bijvoorbeeld de ENCI-groeve; tabel 2). En hoe hoger het aantal private allelen, des te groter de kans dat er weinig genetische uitwisseling plaatsvindt tussen populaties. De ENCI-groeve en de Schaelsberg laten een hoge mate van heterozygositeit zien met een groot aantal unieke allelen [tabel 2]. Dit is in lijn met de hoge mate van genetische differentiatie [tabel 3] en betekent dat de mate van genetische uitwisseling tussen deze en andere (inheemse) populaties voornamelijk zeer laag is, waarschijnlijk zelfs in het geheel nog niet plaatsvindt. Een hoge mate van heterozygositeit is tevens vastgesteld bij de referentiepopulaties uit Duitsland en Frankrijk. Voor de meeste inheemse populaties geldt dat de geobserveerde heterozygositeit in de buurt ligt van de verwachte heterozygositeit [tabel 2]. Het aantal unieke allelen is over het algemeen laag, hetgeen suggereert dat deze populaties genetisch

materiaal hebben uitgewisseld met andere populaties. Gezien de geografische ligging is het bij sommige populaties onwaarschijnlijk dat de genetische overeenkomst op een natuurlijke dispersie berust, aangezien het populaties betreft die relatief ver van de andere populaties verwijderd liggen (bijvoorbeeld Kloosterbosch en Noorbeek). Het ligt meer voor de hand dat dieren in het verleden (afgelopen decennia) tussen deze populaties zijn verplaatst door menselijk handelen. Op basis van onze genetische gegevens kan geen indicatie worden gegeven wanneer dit heeft plaatsgevonden. Het grootste aantal private allelen van de inheemse leefgebieden is vastgesteld in Groeve 't Rooth [tabel 2]. Dit suggereert dat er relatief weinig genetische uitwisseling is geweest tussen deze en andere populaties. De hoogste inteeltcoëfficiënten (F_{IS} -waarden) zijn bepaald in de leefgebieden Ubachsberg-Zuid, Putberg en Kloosterbosch. Dit betreft allemaal kleine populaties met een F_{IS} -waarde die groter is dan $-0,5854$ [tabel 2]. Dit betekent niet dat er ook daad-



FIGUUR 5
Resultaten van de clusteranalyse in STRUCTURE. Door de software worden 18 genetische clusters op basis van de data onderscheiden. Iedere staaf is een individu en ieder onderscheiden cluster heeft een eigen kleur. De dikke zwarte lijnen bakenen een populatie af. De kleuren oranje en blauw representeren DNA-merkers die weinig onderscheidend zijn tussen populaties; ze komen zodoende in vrijwel elke populatie voor.

werkelijk sprake is van inteelt binnen deze populaties die zich uit in fenotypische afwijkingen of een lagere reproductie.

Genetische uitwisseling tussen populaties

De paarsgewijze genetische differentiatie (F_{ST}) laat zien dat de ENCI-groeve en de Schaelsberg genetisch sterk verschillen van zowel de Franse en Duitse referentiepopulaties als van de andere Nederlandse populaties [tabel 3]. Van de inheemse populaties vertonen de Bemelerberg, Groeve Blom, de Curfsgroeve, de Julianagroeve, de Meertensgroeve, Noorbeek en Groeve 't Rooth onderling lage F_{ST} -waarden en hebben dus weinig onderlinge differentiatie. Dit kan verklaard worden doordat deze populaties relatief kortgeleden van elkaar gescheiden zijn en/of door uitwisseling van dieren, op natuurlijke wijze, dan wel door menselijk handelen. Met uitzondering van Noorbeek liggen deze leefgebieden geografisch dicht bij elkaar [figuur 2]. Ooit was er een heel robuuste ecologische structuur tussen de leefgebieden van deze populaties in de vorm van grubben en holle wegen in combinatie met goed ontwikkelde bosranden. Dit kan de lage differentiatie tussen genoemde populaties verklaren.

Met behulp van de analysesoftware STRUCTURE is een clusteranalyse uitgevoerd.

Deze analyse laat zien dat er 18 verschillende clusters kunnen worden onderscheiden die zijn aangegeven met verschillende kleuren [figuur 5]. Overeenkomstige kleuren worden genetisch gezien als behorend tot dezelfde populatie. De populaties uit België, Duitsland, Frankrijk, de ENCI-groeve en Schaelsberg worden grotendeels als unieke clusters aangemerkt. Vrijwel alle inheemse Nederlandse populaties vertonen in meerdere of mindere mate vermenging met andere. Geen enkele inheemse

populatie kan als een uniek zuiver cluster worden bestempeld. Op basis van deze analyse worden alle inheemse Vroedmeesterpadden gerekend tot één grote, maar voor Nederland unieke, populatie. Deze hoge mate van verwantschap moet toegeschreven worden aan een relatief recente isolatie, een tot voor kort (circa 100 jaar geleden) hoge mate van natuurlijke uitwisseling en aan mogelijke verplaatsingen door de mens. Dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld de Belgische populaties, die ten opzichte van de Nederlandse populaties wel grotendeels als aparte clusters worden gezien. Door de grotere geografische afstand tot de Nederlandse populaties is dat daar ook te verwachten. Een duidelijke indicatie van recente verplaatsingen is dat een dier uit Mheer overeenkomsten vertoont met de populatie uit de ENCI-groeve. Dit blijkt ook uit andere analyses [figuur 4]. In de Meertensgroeve en de Kunderberg zijn eveneens dieren aanwezig die sterk afwijken van de rest van de populatie. Mogelijk zijn hier dieren aanwezig die afkomstig zijn van een populatie die niet in dit onderzoek is meegenomen (zie de gele balkjes in figuur 5).

ACHTERGRONDEN

Het is bekend dat bijplaatsing en uitwisseling van Vroedmeesterpadden door menselijk toedoen in Limburg heeft plaatsgevonden (LEMMERS *et al.*, 2020). Dit is al deels gebeurd in de jaren zeventig van de vorige eeuw, vóór de inwerkingtreding van de Natuurbeschermingswet van 1973. Deze handelingen waren toen nog niet verboden. Dit was ook van natuurbeschermers die constateerden dat vindplaatsen van Vroedmeesterpad of Geelbuikvuurpad (*Bombina variegata*) actief werden verstoord of zelfs totaal werden vernietigd. Zij vingden dieren weg en zetten ze



FIGUUR 6
Voormalige dagbouw-groeves, zoals de Julianagroeven, vormen uitstekend leefgebied voor de Vroedmeesterpad (*Alytes obstetricans*). Uitbreiding van leefgebieden en verbinding via 'stapstenen' vergroot de kans op natuurlijke uitwisseling omdat gebiedendoorsteeds dicht bij elkaar komen te liggen (foto: Pim Lemmers).

uit in geschikt leefgebied elders in Zuid-Limburg. Dit heeft ervoor gezorgd dat veel historische populaties en genetisch materiaal behouden zijn gebleven. Deze reddingsacties verklaren waarschijnlijk mede waarom veel van de inheemse populaties weinig unieke allelen bezitten en genetisch sterk overeenkomen. De genetische gelijkenis van de inheemse populaties moet waarschijnlijk ook toegeschreven worden aan een kleinschaliger landschap waardoor veel meer natuurlijke uitwisseling tussen populaties mogelijk was. Desalniettemin toont dit onderzoek aan dat de inheemse Nederlandse vroedmeesterpadpopulaties genetisch gezien uniek zijn en specifiek voor dit deel van het verspreidingsareal binnen Europa. De afzonderlijke in Nederland inheemse deelpopulaties van de Vroedmeesterpad worden gekenmerkt door een redelijke tot goede genetische diversiteit. Er zijn geen aanwijzingen gevonden dat er sprake is van inteeltdepressies binnen de populaties. Inheemse populaties vertonen een vergelijkbare mate van genetische variatie als de dieren die afkomstig zijn uit de onderzochte Belgische en Duitse leefgebieden. De referentie uit Centraal-Frankrijk vertoont daarentegen wel een veel hogere verscheidenheid in erfelijk materiaal. Dat geldt ook voor de niet autochtone populaties van de ENCI-groeven en de Schaelsberg. Waarschijnlijk is de lagere genetische diversiteit in Nederland en het aangrenzende noordwestelijke deel van het natuurlijke verspreidingsareal een natuurlijk fenomeen, veroorzaakt door relatief recente uitbreiding van de soort vanuit de zuidelijker gelegen glaciële overlevingsgebieden na de laatste ijstijd (HEWITT, 1996).

TRANSLOCATIE OF BIJPLAATSING NOODZAKELIJK?

Sinds 2001 vindt door het samenwerkingsverband Platform Geelbuikvuurpad & Vroedmeesterpad een structurele monitoring van de Vroedmeesterpad plaats. De gegevens laten slechts een matige toename

van de soort zien en in sommige deelpopulaties gaan de aantallen zelfs achteruit (GOVERSE *et al.*, 2016). Desondanks tonen de resultaten van deze studie aan dat de inheemse Nederlandse vroedmeesterpadpopulaties genetisch vitaal zijn. De F_{IS} -waarden tussen kleine en grote inheemse populaties zijn vergelijkbaar. Uit eerder onderzoek was al gebleken dat de afname van de populaties niet samengaat met de genetische vitaliteit (TOBLER *et al.*, 2013); grote gezonde vroedmeesterpadpopulaties kunnen een vergelijkbare genetische variatie vertonen als kleine afnemende populaties. Ook in de huidige studie is dit patroon zichtbaar. Op basis hiervan wordt translocatie om genetisch te 'versterken' vooralsnog niet als een noodzakelijke beschermingsmaatregel gezien. Andere fac-

toren dan de genetische samenstelling lijken zwaarder mee te wegen bij een toenemende afname van dieren in kleine populaties. Vooral het ongeschikt raken van habitat en mogelijk ook amfibieziektes kunnen hierbij belangrijke factoren zijn. Als voorbeeld kan de geografisch geïsoleerde populatie van Holset worden aangedragen. Deze populatie is genetisch gezien robuust en vergelijkbaar met andere grote populaties zoals die van de Bemelerberg. Tussen het jaar 2005 en 2011 werden hier nog maar enkele larven aangetroffen en nam de populatieomvang zeer sterk af. Na het opschonen, opknappen en aanleggen van voortplantingswateren worden in Holset jaarlijks gemiddeld nu weer meer dan 60 larven aangetroffen (GOVERSE *et al.*, 2016). Ondanks deze toename dient te worden vermeld dat het larvenaantal nog steeds relatief laag is voor een vitale amfibiepopulatie.

Voor de ENCI-groeven en de Schaelsberg wordt dringend aanbevolen om deze gebieden niet te verbinden met andere leefgebieden om uitwisseling en inmenging van uitheemse genen in de Nederlandse autochtone populaties te voorkomen. Bij de ENCI-groeven is dit gezien de barrièrewerking van de Grensmaas en het Julianakanaal geen probleem. Echter voor de Schaelsberg bestaat er een groter risico dat uitwisseling optreedt, gezien de nabijgelegen leefgebieden Emmaberg en Gerendal.

CONCLUSIES

Dit onderzoek laat zien dat de inheemse Nederlandse populaties van de vroedmeesterpad genetisch uniek zijn, specifiek voor dit deel van het verspreidingsareal binnen Europa. De genetische diversiteit is redelijk tot goed en vergelijkbaar met die van andere populaties in België en Duitsland aan de noordwestelijke rand van het verspreidingsareal. De genetische diversiteit bij kleine en grotere populaties is veelal vergelijkbaar, waardoor dit niet de belangrijkste factor lijkt te zijn voor actuele vitaliteit van

de populaties. Habitatkwaliteit en omvang van de leefgebieden lijken hierin een veel belangrijkere en bepalendere factor te zijn. LENDERS (2000) benadrukte in het “Bescherminingsplan vroedmeesterpad en geelbuikvuurpad 2000–2004” al dat veel leefgebieden geografisch versnipperd zijn geraakt en noemt dat een van de belangrijkste speerpunten voor toekomstige bescherming en beheer. Deze studie toont aan dat dit vanuit een genetisch perspectief nog steeds het geval is. Desalniettemin worden er de laatste jaren als gevolg van natuurlijke dispersie en het realiseren van stapstenen zoals waterbuffers soms ook weer (historische) leefgebieden opnieuw gekoloniseerd (HERMENS *et al.*, 2019; LAMBRIKX, 2019). Structureel onderhoud, verbetering en uitbreiding van kernleefgebied [figuur 6] heeft snel een positief effect op de populatieomvang en daarmee op duurzame instandhouding. De kans op natuurlijke uitwisseling wordt dan groter omdat gebieden steeds dicht bij elkaar komen te liggen. De uitwisselingskans bij geboortepieken wordt zo structureel groter dan bij kleine kwijnende populaties. Translocatie om populaties genetisch te “versterken” wordt momenteel niet gezien als een noodzakelijke beschermingsmaatregel voor de Vroedmeesterpad.

DANKWOORD

Wij danken Stichting het Limburgs Landschap, Natuurmonumenten en Staatsbosbeheer voor het verlenen van betredingstoestemming. Ook zijn wij alle particuliere grondeigenaren erkentelijk voor de constructieve medewerking en het verlenen van toestemming om poelen

op hun grondgebied te bemonsteren. Jöran Janse wordt bedankt voor het mede uitvoeren van het veldwerk. Joachim Mergeay en Jeroen Speybroeck van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek danken we voor het aanleveren van referentiemonsters van drie Belgische populaties. Christian Höppner en Falk Eckhardt van NABU Niedersachsen leverden referentiemonsters van twee Duitse populaties. Dankzij de jarenlange inzet van alle leden van het Platform Geelbuikvuurpad & Vroedmeesterpad was dit onderzoek mogelijk want zonder de aanhoudende inspanningen van de Platformleden zou de Vroedmeesterpad in Zuid-Limburg er een stuk slechter voor staan! Tot slot danken we de Provincie Limburg voor het financieel mogelijk maken van dit onderzoek.

Summary

GENETIC STUDY OF COMMON MIDWIFE TOAD (*ALYTES OBSTETRICANS*) IN LIMBURG

Genetic diversity, vitality and authenticity of populations

The Common midwife toad (*Alytes obstetricans*) occurs naturally in the Netherlands only in the province of Limburg. Here, populations are scattered and often vulnerable due to the low numbers, fragile connections and high degree of spatial isolation. To determine the genetic diversity, vitality and authenticity of populations, a total of 316 larvae, divided over 12 habitats, were sampled in 2019 and analysed using the genotyping by sequencing (GBS) method. The genetic diversity in small and larger populations was often comparable, and this does not seem to be the most important factor for population development or size. F_{IS} -values were comparable between small and large indigenous populations, indicating that the populations are predominantly genetically viable. Furthermore, the populations at the “ENCI-groeve” and “Schaelsberg” sites showed strong genetic correlations with French populations, and cannot be considered native. Systematic maintenance, improvement and expansion of habitats will likely have a more rapid and favourable effect on population conservation than translocation or repopulation. Natural connections between populations should be envisaged in the long run.

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.
- DELFT, J.J.C.W. VAN, R.C.M. CREEMERS & A.M. SPITZENVAN DER SLUIJS, 2007. Basisrapport Rode Lijst amfibieën en reptielen volgens Nederlandse en IUCN-criteria. Stichting RAVON, Nijmegen.
- ELSHIRE, R.J., J.C. GLAUBITZ, Q. SUN, J.A. POLAND, K. KAWAMOTO, E.S. BUCKLER & S.E. MITCHELL, 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6(5): e19379.
- FRISSEN, D.P.E.M. & T.G.Y. VAN DEN BROEK, 2009. Vroedmeesterpad – *Alytes obstetricans*. In: H.J.M. Van Buggenum, R.P.G. Geraeds & A.J.W. Lenders (red), *Herpetofauna van Limburg. Verspreiding en ecologie van amfibieën en reptielen in de periode 1980-2008*. Stichting Natuurpublicaties Limburg, Maastricht: 114-125.
- GOVERSE, E., B.H.J.M. CROMBAGHS & J. JANSE, 2016. Vroedmeesterpad in Limburg. Per populatie bekeken. *Schubben & Slijm. RAVON nieuwsbrief voor en door vrijwilligers* 27: 16-19.
- HERMENS, J., J. JANSE & K. JOOSTEN, 2019. Vroedmeesterpad Horstergrub laat weer van zich horen. *Schubben & Slijm. RAVON nieuwsbrief voor en door vrijwilligers* 41: 4.
- HEWITT, G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58(3): 247-276.
- LAMBRIKX, N., 2019. Vroedmeesterpad terug in Groot Welsden. *Schubben & Slijm. RAVON nieuwsbrief voor en door vrijwilligers* 42: 6.
- LEMMERS, P., M.J. GILBERT, C.A.M. WAGEMAKER & B.H.J.M. CROMBAGHS, 2020. De genetische diversiteit, vitaliteit en authenticiteit van vroedmeesterpadpopulaties in Limburg. *Natuurbalans Limes Divergens BV, Stichting RAVON & Radboud Universiteit, Nijmegen*.
- LENDERS, A.J.W., 2000. *Bescherminingsplan vroedmeesterpad en geelbuikvuurpad 2000-2004*. Natuurhistorisch Genootschap in Limburg/Stichting RAVON, Maastricht/Nijmegen.
- PROVINCIE LIMBURG, 2017. *Natuurvisie Limburg 2016*. Vastgesteld door Provinciale Staten op 10 februari 2017. Provincie Limburg, Maastricht.
- TOBLER, U., T.W.J. 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.
- WILBUR H.M. & H.D. SEMLITSCH, 1990. Ecological consequences of tail injury in *Rana* tadpoles. *Copeia* 1990(1): 18-24.



NATUURHISTORISCH
GENOOTSCHAP in LIMBURG

Colofon

DAGELIJKS BESTUUR

Frank Oelmeijer (voorzitter), Alfred Paarlberg (penningmeester), Ben Matheij & Math de Ponti.

ALGEMEEN BESTUUR

Wilfred Alblas, Toon van Baal, Marian Baars, Jan-Joost Bakhuizen, Susanne Hanssen, Wouter Jansen, Stef Keulen, Pieter Puts, Aidan Williams & Linda Wortel.

KANTOOR

Olaf Op den Kamp, Jeanne Cuypers & Martine Lemmens.

ADRES

Kapellerpoort 1, 6041 HZ Roermond,
tel. 0475-386470 (kantoor@nhgl.nl).
www.nhgl.nl.

LIDMAATSCHAP

€ 38,00 per jaar. Leden t/m 23 jaar € 17,50; bedrijven, verenigingen, instellingen e.d. € 120,00.
Okjen Weinreich (leden@nhgl.nl).
IBAN: NL73RABO0159023742, BIC: RABONL2U.

BESTELLINGEN/PUBLICATIEBUREAU

Publicaties zijn te bestellen bij het publicatiebureau, Marja Lenders (publicaties@nhgl.nl).
Losse nummers € 4,-; leden € 3,50 (incl. porto), themanummers € 7,-.
IBAN: NL31INGB0000429851, BIC: INGBNL2A.

NATUURHISTORISCH M A A N D B L A D

REDACTIE Olaf Op den Kamp (hoofdredacteur), Philip Bossenbroek, Henk Heijligers, Jan Hermans, Ton Lenders, Gerard Majoor (eindredactie), Guido Verschoor, Raymond Pahlplatz & Marc Poeth (redactie-assistent) (redactie@nhgl.nl).

RICHTLIJNEN VOOR KOPIJ-INZENDING

Diegenen die kopij willen inzenden, dienen zich te houden aan de richtlijnen voor kopij-inzending. Deze kunnen worden aangevraagd bij de redactie of zijn te bekijken op www.nhgl.nl.

LAY-OUT & OPMAAK Van de Manakker, Grafische communicatie, Maastricht (mvandemanakker@xs4all.nl).

EDITING SUMMARIES Jan Klerkx, Maastricht.

DRUK Grafagroep Zuid, Swalmen.



Copyright. Auteursrecht voorbehouden. Overname slechts toegestaan na voorafgaande schriftelijke toestemming van de redactie.

ISSN 0028-1107

provincie limburg



KRINGEN

KRING HEERLEN

Olaf Op den Kamp (kringheerlen@nhgl.nl).

KRING MAASTRICHT

Bert Op den Camp (kringmaastricht@nhgl.nl).

KRING ROERMOND

Math de Ponti (kringroermond@nhgl.nl).

KRING VENLO

Peter Eenshuistra (kringvenlo@nhgl.nl).

KRING VENRAY

Patrick Palmen (kringvenray@nhgl.nl).

STUDIEGROEPEN

FOTOSTUDIEGROEP

Bert Morelissen (fotostudiegroep@nhgl.nl).

HERPETOLOGISCHE STUDIEGROEP

Pieter Puts (herpetostudiegroep@nhgl.nl).

LIBELLENSTUDIEGROEP

Jan Hermans (libellenstudiegroep@nhgl.nl).

MOLLUSKEN STUDIEGROEP LIMBURG

Stef Keulen (molluskenstudiegroep@nhgl.nl).

MOSSENSTUDIEGROEP

Paul Spreuwenberg (mossenstudiegroep@nhgl.nl).

PADDENSTOELENSTUDIEGROEP

Henk Henczyk (paddenstoelenstudiegroep@nhgl.nl).

PLANTENSTUDIEGROEP

Olaf Op den Kamp (plantenstudiegroep@nhgl.nl).

PLANTENWERKGROEP WEERT

Jacques Verspagen (plantenwerkgroepweert@nhgl.nl).

SPRINKHANENSTUDIEGROEP

Harry van Buggenum (sprinkhanenstudiegroep@nhgl.nl).

STUDIEGROEP EPHEMEROPTERA, PLECOPTERA EN TRICHOPTERA

Harry Tolcamp (ept@nhgl.nl).

STUDIEGROEP ONDERAARDSE KALKSTEENGROEVEN

Rob Visser (secretariaat@sok.nl).

VISSENWERKGROEP

Victor van Schaik (vissenstudiegroep@nhgl.nl).

VLINDERSTUDIEGROEP

Mark de Mooij (vlinderstudiegroep@nhgl.nl).

VOGELSTUDIEGROEP

Nicky Hulbosch (vogelstudiegroep@nhgl.nl).

WANTSENSTUDIEGROEP LIMBURG

Martine Lemmens (wantsen@nhgl.nl).

WERKGROEP DRIESTRUIK

Wouter Jansen (werkgroepdriestruik@nhgl.nl).

ZOOGDIERENSTUDIEGROEP

Aegidia van Grinsven (zoogdierenstudiegroep@nhgl.nl).

STICHTINGEN

STICHTING NATUURPUBLICATIES LIMBURG

Uitgever van publicaties, boeken en rapporten (snl@nhgl.nl).

STICHTING DE LIERELEI

Projectbureau voor onderzoek van natuur en landschap in Limburg (lierelei@nhgl.nl).

STICHTING IR. D.C. VAN SCHAÏK

Stichting voor het beheer van onderaardse kalksteengroeven in Limburg. Postbus 2235, 6201 HA Maastricht (vanschaikestichting@nhgl.nl).

STICHTING NATUURBANK LIMBURG

Stichting voor het beheer van waarnemingen van het NHGL (natuurbank@nhgl.nl).

