

Ruimtelijke samenhang en genetische variatie van boomkikkerpopulaties in Nederland



# Ruimtelijke samenhang en genetische variatie van boomkikkerpopulaties in Nederland

C.C. Vos\*

P. Arens\*\*

H. Baveco\*

R. Bugter\*

H. Kuipers\*

M.J.M. Smulders\*\*

\* Alterra

\*\* Plant Research International

Alterra-rapport 1065

Alterra, Wageningen, 2005

## REFERAAT

Vos, C.C. \*, P. Arens\*\*, H. Baveco\*, R. Bugter\*, H. Kuipers\*, M.J.M. Smulders\*\*, 2005. *Ruimtelijke samenhang en genetische variatie van boomkikkerpopulaties in Nederland*. Wageningen, Alterra, Alterra-rapport 1065. 61 blz.; 7 fig.; 14 tab.; 23 ref.

Een modelanalyse van de ruimtelijke samenhang heeft plaatsgevonden van een netwerkpopulatie van de boomkikker (*Hyla arborea*) in Midden-Limburg. De bezettingskans van poelen is bepaald met een regressiemodel en de ruimtelijke samenhang van de leefgebieden is geanalyseerd met het dispersiemodel *Smallsteps*. Het herstel-scenario 2010 biedt goede potenties voor de uitbreiding van de netwerkpopulatie. Er zijn echter nog enkele zwakke schakels in de ruimtelijke samenhang geconstateerd. Bovendien dient door het nemen van maatregelen nog meer in het huidige verspreidingsgebied van de boomkikker geïnvesteerd te worden.

Een genetische analyse in de Achterhoek maakt aannemelijk dat herkolonisatie heeft plaatsgevonden vanuit vier bronpopulaties. Hierbij zijn vier populatieclusters ontstaan die genetisch sterk verschillend zijn.

De genetische diversiteit in de Doort (Midden-Limburg) is vergelijkbaar met populaties in de Achterhoek maar kleiner dan in twee Zwitserse populaties.

Trefwoorden: Boomkikker, *Hyla arborea*, ruimtelijke samenhang, versnippering, genetische diversiteit, dispersie, microsatelieten, simulatiemodel.

Auteurs: \* Alterra  
\*\* Plant Research International

ISSN 1566-7197

Dit rapport kunt u bestellen door € 25,- over te maken op banknummer 36 70 54 612 ten name van Alterra, Wageningen, onder vermelding van Alterra-rapport 1065. Dit bedrag is inclusief BTW en verzendkosten.

© 2005 Alterra  
Postbus 47; 6700 AA Wageningen; Nederland  
Tel.: (0317) 474700; fax: (0317) 419000; e-mail: [info.alterra@wur.nl](mailto:info.alterra@wur.nl)

Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Alterra.

Alterra aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

# Inhoud

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Woord vooraf                                                                       | 7  |
| Samenvatting                                                                       | 9  |
| 1 Inleiding                                                                        | 13 |
| 1.1 Achtergrond                                                                    | 13 |
| 1.2 Doelstellingen                                                                 | 14 |
| 2 Analyse ruimtelijke samenhang netwerkpopulatie Midden-Limburg                    | 17 |
| 2.1 Inleiding                                                                      | 17 |
| 2.2 Methoden                                                                       | 19 |
| 2.2.1 Bepalen van de bezettingskans                                                | 19 |
| 2.2.2 Genereren van de habitatkaart huidige situatie                               | 19 |
| 2.2.3 Genereren van de habitat kaart Scenario 2010                                 | 20 |
| 2.2.4 Bepalen van de ruimtelijke samenhang van het netwerk                         | 21 |
| 2.3 Resultaten                                                                     | 23 |
| 2.3.1 Resultaten bezettingskans huidige situatie                                   | 23 |
| 2.3.2 Resultaten ruimtelijke samenhang huidige situatie                            | 24 |
| 2.3.3 Resultaten bezettingskans scenario 2010                                      | 25 |
| 2.3.4 Resultaten ruimtelijke samenhang scenario 2010                               | 25 |
| 3 Genetische variatie van de boomkikker.                                           | 27 |
| 3.1 Analyse van boomkikkerpopulaties in een gefragmenteerd gebied in de Achterhoek | 27 |
| 3.2 Bemonstering                                                                   | 27 |
| 3.3 Resultaten van de genetische analyse                                           | 31 |
| 3.4 Resultaten van de ruimtelijke analyse van genetische verwantschap              | 35 |
| 4 Analyse van de genetische diversiteit van de populatie in de Doort               | 39 |
| 4.1 Resultaten van de genetische analyse                                           | 39 |
| 4.2 Verschillen in allelische diversiteit tussen gebieden?                         | 40 |
| 5 Conclusies en aanbevelingen                                                      | 43 |
| 5.1 Inleiding                                                                      | 43 |
| 5.2 Bezettingskans en ruimtelijke samenhang populatie Midden-Limburg               | 44 |
| 5.2.1 Aanbevelingen voor het herstelplan van de boomkikker in Midden-Limburg       | 44 |
| 5.3 Genetische analyse van de boomkikker in de Achterhoek                          | 46 |
| 5.4 Genetische analyse populatie de Doort                                          | 48 |
| Literatuur                                                                         | 51 |
| Bijlagen                                                                           | 53 |



## Woord vooraf

Dit onderzoek heeft plaatsgevonden in het kader van het Onderzoeksprogramma LNV-383 'Biodiversiteit' van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. Het project draagt bij aan het beantwoorden van een aantal kennisvragen die in het Beschermingsplan van de boomkikker zijn genoemd. De heer R. Zollinger, coördinator van het beschermingsplan Boomkikker en werkzaam bij RAVON, is als kennisvrager bij dit project opgetreden. Daarnaast hebben de volgende mensen met hun kennis van de regionale boomkikkerpopulaties en met het beschikbaar stellen van verspreidingsdata bijgedragen aan het project: de heer H. Van Buggenum en de heer W. Vergoossen (RAVON, Herpetologische studiegroep Limburg), de heer W. Jansen (Stichting IKL) en de heer J. Stronks (Staring Advies, in opdracht van de provincie Gelderland).





## Samenvatting

### *Analyse ruimtelijke samenhang boomkikkerpopulatie Midden-Limburg*

In Midden-Limburg, in het gebied tussen Echt en Susteren, bevindt zich een belangrijke netwerkpopulatie van de boomkikker. Volgens het beschermingsplan van de boomkikker (Crombaghs & Lenders 2001) dient voor duurzame instandhouding het verspreidingsgebied van de boomkikker te worden uitgebreid. Hiervoor zijn verschillende ruimtelijke mogelijkheden. Om de keuze van een optimale strategie te ondersteunen heeft een analyse plaatsgevonden van de ruimtelijke samenhang van het leefgebied, waarbij de huidige situatie en een herstel-scenario voor 2010 met elkaar zijn vergeleken. De bezettingskans van poelen is bepaald met een regressiemodel op basis van de hoeveelheid voortplantingswateren en landhabitat in de omgeving van een poel. Poelen met een lage bezettingskans vormen een zwakke schakel in het netwerk en dit dient zoveel mogelijk voorkomen te worden. De ruimtelijke samenhang van de leefgebieden is geanalyseerd met het simulatiemodel Smallsteps, een model waarmee de dispersiebewegingen van boomkikkers worden gesimuleerd. Ook hier geldt dat onderdelen van het netwerk met een slechte ruimtelijke samenhang vermeden dienen te worden, zeker als deze zwakke schakel zich op een sleutelpositie binnen het netwerk bevindt.

Op basis van de resultaten worden de volgende aanbevelingen gedaan:

#### *1. Versterk de bronpopulaties*

Het zuidelijke gebied, waar de boomkikker nu reeds in een aantal populaties voorkomt, functioneert als bron van waaruit de uitbreiding naar nieuw leefgebied moet plaatsvinden. Er bevinden zich tussen de populaties in het zuidelijke gebied echter nog een aantal zwakke schakels, juist op locaties die voor de uitbreiding naar het noorden cruciaal zijn. Daarom wordt aanbevolen om allereerst de ruimtelijke samenhang en bezettingskansen van de zuidelijke populaties te verbeteren.

#### *2. Het Noordwestelijke uitbreidingsgebied heeft de beste potenties*

Kijkend naar de potentiële uitbreidingsgebieden, blijkt de noordwestelijke hoek van het uitbreidingsgebied de beste potenties te hebben. Hier bevinden zich nu al een aantal gebieden die zeer geschikt zijn voor de boomkikker. Om deze gebieden vanuit de huidige boomkikkerpopulaties ook te kunnen bereiken zal echter het leefgebied in het tussenliggende landschap verbeterd dienen te worden.

#### *3. Zorg voor een goede aansluiting tussen de verbindingzones en het uitbreidingsgebied*

Er blijken twee routes te zijn voor de uitbreiding naar het noorden. Hierbij vertoont de westelijke route een aantal zwakke punten met geringe ruimtelijke samenhang. De oostelijke route langs de Pepinusbeek heeft in de huidige situatie al goede potenties als verbindingzone. Echter deze zone sluit momenteel niet aan op potentieel leefgebied.

#### *4. Het scenario 2010 is positief*

Het model geeft aan dat de aanleg van nieuw leefgebied, verbindingzones en het verminderen van de barrièrewerking van de N572 een zeer positief effect heeft op de bezettingskans van de bestaande en potentiële leefgebieden van de boomkikker in Midden-Limburg. In het scenario ontstaan twee verbindingzones met een sterk verbeterde ruimtelijke samenhang naar de gebieden in het noordoosten. Het verdient dan ook aanbeveling het scenario 2010 uit te voeren.

#### *5. Los bottlenecks op in scenario 2010*

Er zijn twee bottlenecks waar de bezettingskans voor de boomkikker nog niet optimaal is. Deze locaties vormen een essentiële schakel in de kolonisatie van zuid naar noord. Ook de ruimtelijke samenhang in het zuidelijke gebied waar de boomkikker nu al voorkomt dient nog verder verbeterd te worden, om de dispersie van de boomkikker naar nieuwe leefgebieden te optimaliseren. Omdat het hier om de bronpopulaties gaat van waaruit het noordelijke gebied gekoloniseerd dient te worden is het belangrijk om met prioriteit in deze extra ruimtelijke samenhang te investeren.

#### ***Genetische analyse van de boomkikker in de Achterhoek***

In de Achterhoek laten de schattingen van populatiedifferentiatie zien dat de meeste populaties, die binnen een straal van 5 km van elkaar liggen, door dispersie dusdanig goed met elkaar verbonden dat ze erg op elkaar lijken (dwz niet van elkaar te onderscheiden). Hierbij zijn vier populatieclusters ontstaan die nu nog steeds genetisch van elkaar te onderscheiden zijn. Het lijkt aannemelijk dat de herkolonisatie van deze nieuwe gebieden heeft plaatsgevonden vanuit de vier bronpopulaties die in de 70-er jaren nog aanwezig waren. Tussen de clusters is sprake van een zeer aanzienlijke differentiatie, wat erop duidt dat de clusters sterk geïsoleerd van elkaar zijn geraakt en er momenteel weinig dispersie tussen clusters plaatsvindt. Tussen de clusters Vildersveen en Laarbraakweg lijkt op grond van de assignment test enige uitwisseling plaats te vinden. De Laarbraakweg dient daarom niet als een afzonderlijke bronpopulatie te worden opgevat, maar maakt deel uit van de Vildersveen cluster.

De correlatie tussen genetische differentiatie ( $F_{ST}$ ) en geografische afstand tussen alle paren van populaties is significant over de hele schaal van het studiegebied, alhoewel de correlatie boven de 15 km lijkt af te nemen. Op basis van deze correlatie kan niet zonder meer worden geconcludeerd dat er momenteel uitwisseling tussen populaties tot over 15 km plaatsvindt. De differentiatie tussen de vijf boomkikker clusters vóór de fragmentatie van het gebied was waarschijnlijk laag en het huidige patroon is waarschijnlijk in de loop van het fragmentatie proces ontstaan. De twee clusters Teeselinkven en Vildersveen vormden ook na de versnippering van het leefgebied nog grote sub-populaties, waarop drift minder invloed heeft gehad zodat er ook minder differentiatie is opgetreden. De huidige sterke isolatie met de andere clusters is dus zeer waarschijnlijk het gevolg van recente habitatfragmentatie.

Doordat de boomkikker in dit gebied aan het toenemen is en (nieuwe) tussenliggende poelen mogelijkwerwijs gekoloniseerd zijn of worden, is het aannemelijk dat de

onderlinge isolatie van de vier kernclusters (Roeterinksbroek, Teeselinkven, Vildersveen en Waterster) in de komende tijd zal verminderen en de genetische diversiteit in elke poel toeneemt. Dit proces is zeer belangrijk om verder verlies aan diversiteit tegen te gaan en kan mogelijk de populatiegroei van de boomkikker in dit gebied een belangrijke impuls geven doordat hierdoor mogelijke negatieve fitness effecten worden verminderd. Vooral voor de Waterster en omgeving, die zeer geïsoleerd lijken te liggen en een centrale plaats in het gebied innemen, is het van belang dat de uitbreiding van de boomkikker ook in de directe omgeving van deze poel plaatsvindt. Hierbij is een analyse van de doorlaatbaarheid van het landschap gewenst voor het bepalen van de optimale locaties voor verbindingzones en de benodigde hoeveelheid nieuw leefgebied.

### ***Genetische analyse van de boomkikker in de Doort***

De genetische diversiteit in de Doort is vergelijkbaar met de gemiddelde genetische diversiteit van de populaties in de Achterhoek maar kleiner dan die van Zwitserse en Deense populaties. Zowel in de Achterhoek als in Zwitserland en Denemarken zijn de populaties met elkaar verbonden in een netwerk waardoor de totale beschikbare diversiteit in beide gebieden ten opzichte van de Doort een stuk groter is. Om in de toekomst een vergelijkbaar niveau van diversiteit te verkrijgen in het potentiële uitbreidingsgebied, zijn andere boomkikkerpopulaties in de directe omgeving van de nu bemonsterde poel in de Doort van groot belang (vooral als dit ook oude kernpopulaties betreft). Indien ze samen met de Doort in een netwerk verbonden kunnen gaan worden, zal dat waarschijnlijk een hogere genetische diversiteit opleveren.

Op grond van de nu gemeten absolute hoeveelheid diversiteit in de Doort is niet te zeggen of de lagere diversiteit in de Doort negatieve effecten heeft op de fitness en de benodigde populatiegroei. Negatieve effecten kunnen zijn: een verhoogd aantal afwijkingen, sterfte onder larven en juvenielen, en een verlaagde populatiegroei. De relatief lage genetische diversiteit van de Nederlandse boomkikkerpopulaties, en de verminderde fitness die is gevonden in kleine geïsoleerde Deense populaties, maakt echter het doen van fitness onderzoek in Nederland wel gewenst. Om vast te stellen of de genetische diversiteit in Nederlandse populaties is afgenomen en of dat effect heeft op de fitness, zou in een vervolgstudie de relatie tussen genetische diversiteit en fitness-parameters dienen te worden bepaald.



# 1 Inleiding

In het beschermingsplan van de Boomkikker (Crombaghs & Lenders 2001) zijn een aantal onderzoeksvragen geformuleerd, die voor een effectieve bescherming van de boomkikker beantwoord dienen te worden. Een belangrijke vraag is ondermeer bij welke omvang en ruimtelijke samenhang van het netwerk van leefgebieden sprake is van een duurzame situatie. In het kader van het LNV Onderzoeksprogramma Biodiversiteit is een studie uitgevoerd naar de kennisbehoeften bij de uitvoering van soortbeschermingsplannen (Groot Bruinderink et al. 2002 ). Hieruit kwam naar voren dat er behoefte bestaat aan de beoordeling van regionale inrichtingsscenario's ten behoeve van de boomkikker, als ondersteuning bij de keuze van de beste beschermingsstrategie.

## 1.1 Achtergrond

Uit eerder onderzoek is gebleken dat een van de belangrijke oorzaken voor de achteruitgang van de boomkikker in Nederland het verdwijnen is van geschikt leefgebied. Het leefgebied van de boomkikker bestaat uit voortplantingswater (poelen, leemputten, kleine moerasjes e.d.) met in de omgeving struweel en kruidenrijke ruigte, het landhabitat. Door intensivering van het landgebruik zijn veel natuurlijke elementen in het agrarisch cultuurlandschap verdwenen. Hierdoor is het leefgebied van de boomkikker sterk versnipperd geraakt. De leefgebieden zijn te klein geworden en te geïsoleerd geraakt. Uit een analyse van het verspreidingspatroon van de boomkikker in Zeeuws-Vlaanderen blijkt dat de soort vooral aanwezig is in poelen met een grote ruimtelijke samenhang (Vos & Stumpel 1996). Naarmate de dichtheid aan geschikte poelen en landhabitat toeneemt, neemt ook de bezettingskans van een poel toe. Op basis van extinctie en kolonisatiegegevens van lokale populaties in Zeeuws-Vlaanderen is een metapopulatiemodel van de boomkikker ontwikkeld, waarmee gegeven de kwaliteit, omvang en ruimtelijke samenhang van leefgebieden de duurzaamheid van het populatienetwerk wordt geschat (Vos et al. 2000; Etienne et al. 2004). De ruimtelijke samenhang van een habitatnetwerk, met andere woorden de uitwisseling van boomkikkers tussen poelen, wordt niet alleen bevorderd door de afstand maar ook door de aard van het tussenliggende landschap. Met behulp van gezenderde boomkikkers is de interactie tussen de inrichting van het landschap en de bewegingen van boomkikkers onderzocht. Het blijkt dat boomkikkers een sterke voorkeur hebben voor houtwallen en andere opgaande begroeiing, akkers vermijden terwijl grasland een min of meer neutrale positie inneemt (Vos 1999). Daarnaast vormen wegen een barrière voor amfibieën, waarbij sterfte van overstekende amfibieën door verkeer voor veel slachtoffers zorgt (Gelder 1973, Vos & Chardon 1994, Hels & Buchwald 2001, Glandt 2004). Op basis van deze bewegingspatronen is het dispersiemodel *Smallsteps* ontwikkeld, waarmee de ruimtelijke samenhang van landschappen voor de boomkikker kan worden bepaald.

In een sterk versnipperde netwerk van populaties kan genetische variatie verarming optreden (Saccheri et al. 1998). De genetische variatie neemt af in kleine populaties en wanneer weinig uitwisseling van genen tussen populaties mogelijk is als gevolg van isolatie. Voor de boomkikkerpopulatie in de Achterhoek zijn genetische merkers ontwikkeld (Arens et al. 2000). Op basis van de genetische samenstelling van populaties binnen een netwerk kan een schatting worden gemaakt van de mate van uitwisseling tussen de populaties. Het vergelijken van de genetische variatie van de Nederlandse populaties met populaties elders in Europa, geeft een indicatie of er sprake is van genetische verarming. Of een mogelijke genetische verarming een gevolg is van versnippering van het leefgebied of een natuurlijke oorzaak heeft, omdat Nederland aan de noordwest grens van het verspreidingsgebied ligt, is onbekend. Wanneer er echter verschillen zouden zijn tussen de regio's in Nederland, zou dat een aanwijzing zijn dat versnippering de oorzaak is voor verarming.

## 1.2 Doelstellingen

### ***Analyse ruimtelijke samenhang netwerkpopulatie boomkikker Midden-Limburg.***

In Midden-Limburg bevindt zich een belangrijke netwerkpopulatie van de boomkikker, waarvan het leefgebied dient te worden uitgebreid (Crombaghs & Lenders 2001). In het actieprogramma Boomkikker (IKL 2003) worden hiervoor maatregelen voorgesteld, waarbij een gebied van 7 km overbrugd moet worden van de huidige verspreidingsgebieden naar nieuw te koloniseren gebieden. Er zal een analyse van de ruimtelijke samenhang worden uitgevoerd, waarbij de huidige situatie en een scenario voor 2010 met elkaar worden vergeleken. Hierbij wordt de bezettingskans van de poelen bepaald op basis van de hoeveelheid leefgebied in de omgeving. Daarnaast wordt de kans op uitwisseling tussen de poelen bepaald op basis van het tussenliggende landschap.

Op basis van de resultaten worden aanbevelingen gedaan voor de beste strategie om te komen tot een uitbreiding van het habitatnetwerk in Midden-Limburg.

### ***Analyse genetische variatie van de netwerkpopulatie van de boomkikker in de Achterhoek en in Midden-Limburg.***

Succesvolle dispersie is een randvoorwaarde voor de overleving van de boomkikker in een netwerk van leefgebieden. Op basis van de genetische verwantschap van afzonderlijke populaties in de Achterhoek wordt een schatting gemaakt van de mate van uitwisseling tussen deze populaties. De resultaten geven een indicatie over de genetische variatie van de populaties die als bron van de nieuw gekoloniseerde populaties hebben gediend. Deze analyse kan dienen als voorbeeld voor de toekomstige ontwikkeling in de Doort, wanneer het 2010 scenario wordt uitgevoerd.

Daarnaast wordt de mate van genetische variatie van de netwerkpopulatie in de Achterhoek vergeleken met de variatie in Midden-Limburg en enkele populaties elders in Europa. Hierdoor wordt een indruk verkregen of er verschillen zijn in de genetische variatie binnen de verspreidingsgebieden in Nederland. Door vergelijking van de genetische variatie met populaties elders in Europa wordt bepaald of er sprake

zou kunnen zijn van genetische verarming van de boomkikkerpopulaties in Nederland.





## 2 Analyse ruimtelijke samenhang netwerkpopulatie Midden-Limburg

### 2.1 Inleiding

In het Beschermingsplan boomkikker 2001-2005 (Crombaghs & Lenders 2001) is een herstelprogramma voor de boomkikkerpopulatie in Midden-Limburg opgenomen. Het IKL heeft, op verzoek van de provincie Limburg, de herstelmaatregelen concreet uitgewerkt in het Actieprogramma Boomkikker Limburg (IKL 2003). In dit actieprogramma worden een groot aantal mogelijkheden genoemd die gericht zijn op het herstel en uitbreiding van het leefgebied van de boomkikker in Midden-Limburg. Het actieprogramma is zowel gericht op het versterken van de huidige populaties in en rond de Doort (tussen Echt en Susteren) als op een uitbreiding van het leefgebied naar het noorden (zie figuur 1). Voor de kolonisatie van de nieuwe noordelijke leefgebieden dient een gebied van ca. 7 km overbrugd worden. Het Waterschap Roer en Overmaas heeft een uitgebreid herstelplan voor beek en waterlopen ontwikkeld (Waterschap Roer en Overmaas

2004 ). De natuurlijke zones langs beken zullen zodanig worden ingericht dat ze als verbindingszones kunnen functioneren voor de boomkikker en een rol kunnen spelen bij de kolonisatie van de nieuwe gebieden.

Het is de bedoeling dat na de uitvoering van het herstelplan het leefgebied van de boomkikker zodanig is uitgebreid, dat zich een duurzame populatie kan ontwikkelen. Om te bepalen of de maatregelen voldoende zullen zijn voor het herstel en uitbreiding van de boomkikker worden twee analyses uitgevoerd op de huidige situatie en op een scenario voor 2010.

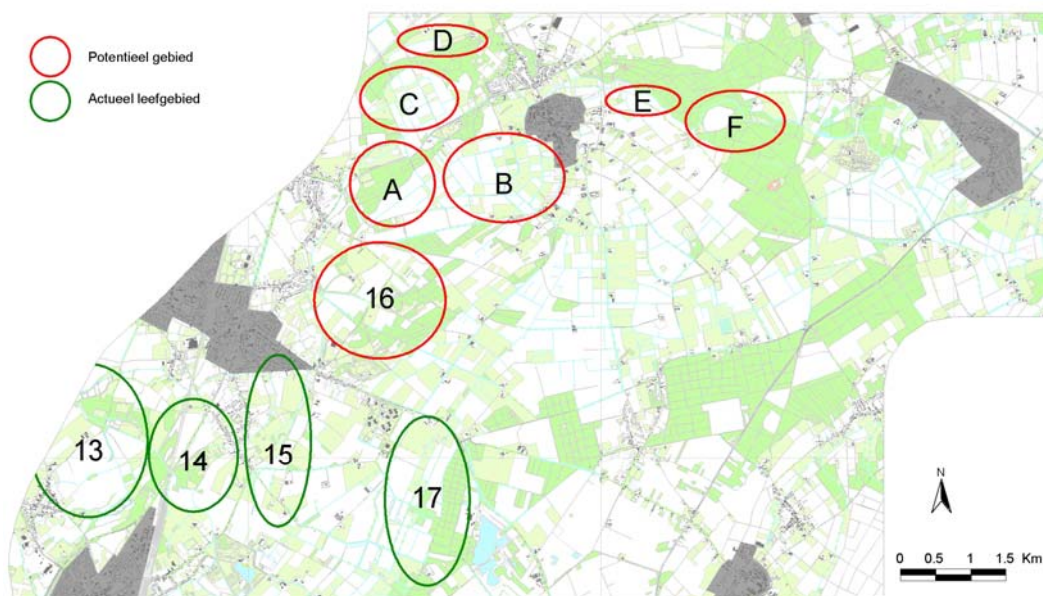
#### *Analyse 1: Is de bezettingskans van de voortplantingswateren voldoende?*

De bezettingskans van een poel is afhankelijk van de kwaliteit van de poel zelf en van de ruimtelijke samenhang van het habitatnetwerk in de omgeving van deze poel. Uit een analyse van de verspreidingsgegevens in Zeeuws-Vlaanderen (Vos & Stumpel 1996) blijkt dat een poel een hoge bezettingskans heeft wanneer er voldoende poelen in een straal van 750m rond de poel aanwezig zijn en wanneer er voldoende struweel en ruigte aanwezig is in een straal van 1000m rond de poel.

#### *Analyse 2: Is de kans op uitwisseling voldoende?*

Voor de kolonisatie van de nieuwe leefgebieden ten noorden van het huidige verspreidingsgebied, dient een gebied van 7 km overbrugd te worden. Om dit mogelijk te maken worden verbindingszones en nieuw leefgebied aangelegd. Met behulp van *Smallsteps* wordt de kans op uitwisseling van boomkikkers binnen het netwerk bepaald, op basis van het tussenliggende landschap. Hierbij wordt rekening gehouden met landschapselementen die een verbindende functie hebben en landschapselementen die een (relatieve) barrière vormen.

Het scenario voor 2010 is in een workshop met betrokkenen opgesteld. In het scenario zijn een aantal verbindingzones ten behoeve van de boomkikker langs beken gerealiseerd. Daarnaast zijn een aantal natuurgebieden optimaal ingericht als leefgebied voor de boomkikker: de zogenaamde 'A-basisbiotopen'. A-basisbiotopen zijn beschreven in het Beschermingsplan Boomkikker (Crombaghs & Lenders 2001) en bestaan uit grotere leefgebieden waar zich een stabiele populatie kan vestigen. Grotere stabiele populaties zijn een belangrijke randvoorwaarde voor de overleving van soorten in versnipperd leefgebied. Uit veldonderzoek en modelsimulaties blijkt dat een netwerk van leefgebieden met een groot leefgebied (sleutelgebied) een grotere overlevingskans heeft dan een netwerk dat uit alleen kleine gebieden bestaat (Verboom et al. 2001). Dit komt omdat deze grotere populaties een veel kleinere uitsterfkans hebben en zo een belangrijke kolonisatiebron zijn van waaruit gebieden waar de boomkikker is uitgestorven opnieuw gekoloniseerd worden.



*Figuur 1 Actieprogramma boomkikker Limburg. De gebieden 13 Doort en Horsterplas, 14 Slekkerhout, 15 Vulensbeekdal, 17 Haeselaarsbroek, en 18 IJzerenbosch zijn gebieden waar de boomkikker reeds voorkomt. Het IJzerenbosch (gebied 18) ligt verder naar het zuiden en valt buiten het studiegebied. De gebieden 16 Marissen/Het Leen, A 't Broekje, B Eerselen, C Reigersbroek, E 't Sweeltje en F Munningsbosch zijn potentiële uitbreidingsgebieden (bron IKL 2003)*

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Bepalen van de bezettingskans**

De bezettingskans is berekend voor alle poelen die gekwalificeerd zijn als ‘geschikt’ of ‘potentieel geschikt’ (criteria plus en nul, zie tabel 1.) De bezettingskans van een poel wordt berekend met het regressiemodel dat is ontwikkeld op basis van de verspreidingsgegevens van de boomkikker in Zeeuws-Vlaanderen (Vos & Stumpel 1996). Volgens dit model hangt de bezettingskans van een poel af van de volgende factoren:

1. De kwaliteit van de poel, uitgedrukt door het elektrisch geleidingsvermogen van het water (een maat voor de voedselrijkdom) en de bedekking van het water met watervegetatie. Deze gegevens zijn voor de voortplantingswateren in Limburg niet beschikbaar. Daarom is voor deze factoren een gemiddelde waarde aangehouden.

2. De ruimtelijke samenhang van het habitatnetwerk in de omgeving van de poel uitgedrukt in:

De hoeveelheid poelen in een straal van 750 m. hiervoor zijn alle geschikte en mogelijk geschikte poelen in beschouwing genomen.

De hoeveelheid struweel en ruigte in een straal van 1000 m rond de poel. Tabel 1 geeft een overzicht welke elementen als struweel en welke als ruigte zijn beschouwd.

### **2.2.2 Genereren van de habitatkaart huidige situatie**

Voor het bepalen van de bezettingskans van de poelen is een GIS-kaart gemaakt met al het geschikte leefgebied. Voor deze kaart zijn de volgende bronnen gebruikt:

- Topografische kaart 1:10.000
- Kaart met kleine landschapselementen van het IKL
- Een interpretatie van de geschiktheid van de poelen als leefgebied voor de boomkikker (H. Van Buggenum).
- Een workshop met deskundigen waarin de habitatkaart is verbeterd.

In tabel 1 is een overzicht gegeven van de elementen die als leefgebied voor de boomkikker zijn aangemerkt. Het is niet mogelijk om al het geschikte habitat van kaarten te destilleren. Voor een volledig overzicht zou een gebiedsdekkende veldinventarisatie nodig zijn. Tijdens een workshop is de habitatkaart gecontroleerd en zijn enkele gebieden geschrapt en andere toegevoegd. Vervolgens was men van mening dat de kaart een goed beeld geeft van het beschikbare leefgebied.

*Tabel 1 Overzicht van de landschapselementen die als geschikt boomkikkerhabitat zijn aangemerkt ten behoeve van de berekening van de bezettingskans.*

| Geschikt Habitat boomkikker                | Omschrijving habitatype voor de regressieanalyse | Toelichting                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Poelen en andere voortplantingswateren     | 'Poel'                                           | Geschiktheid aangegeven door H. Van Buggenum voor huidige situatie en voor 2010. (Plus: geschikt; Nul: potentieel geschikt; Min : ongeschikt; ? : onbekend).                                                                                                                                     |
| Heg                                        | 'Struweel'                                       | Indien in GIS het element als lijn is aangegeven dan is een standaard breedte van 5m aangehouden.                                                                                                                                                                                                |
| Houtsingel                                 | 'Struweel'                                       | Indien in GIS het element als lijn is aangegeven dan is een standaard breedte van 5m aangehouden.                                                                                                                                                                                                |
| Houtwal                                    | 'Struweel'                                       | Indien in GIS het element als lijn is aangegeven dan is een standaard breedte van 5m aangehouden.                                                                                                                                                                                                |
| Gemengd bos                                | 'Struweel'                                       | < 1 ha gehele bosje,<br>> 1 ha zoom van 50m                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Loofbos                                    | 'Struweel'                                       | < 1 ha gehele bosje,<br>> 1 ha zoom van 50m                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Populierenopstand                          | 'Struweel'                                       | < 1 ha gehele bosje,<br>> 1 ha zoom van 50m                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Naaldbos                                   | 'Struweel'                                       | < 1 ha gehele bosje,<br>> 1 ha zoom van 50m                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Griend                                     | 'Struweel'                                       | < 1 ha gehele bosje,<br>> 1 ha zoom van 50m                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Bouwland en grasland binnen natuurgebieden | 'Ruigte'                                         | In een workshop is hier een correctie op uitgevoerd, omdat niet alles wat op de kaart als natuurgebied is aangemerkt reeds bestaande natuurgebied is. Omdat in de praktijk een natuurgebied niet uit 100% geschikt leefgebied zal bestaan wordt 33% van deze oppervlakte als geschikt beschouwd. |

### 2.2.3 Genereren van de habitat kaart Scenario 2010

#### *Verbindingszones*

Het Waterschap Roer en Overmaas heeft een Waterbeheersplan voor de beken ontwikkeld. Een groot aantal beken in het studiegebied zullen worden ingericht als verbindingszone voor de boomkikker. Dit betekent dat een strook van 20 of 30m langs de beek een natuurlijke bestemming krijgt. Hier kan zich struweel en ruigte ontwikkelen. Daarnaast wordt er om de 300m een voortplantingswater aangelegd. De voortplantingswateren hebben een oppervlakte van 500m<sup>2</sup>. Aangenomen is dat de strook voor 50% uit ruigte en voor 50% uit struweel bestaat.

#### *Inrichting enkele grotere leefgebieden*

In een workshop zijn voor het scenario 2010 7 locaties voor grotere leefgebieden bepaald. De gebieden zijn ingericht volgens de inrichtingscriteria van de zogenaamde 'A-basisbiotopen' uit het Beschermingsplan Boomkikker. In het beschermingsplan staat dat een A-basisbiotoop voortplantingswateren bevat van 1000 tot 2000 m<sup>2</sup>. Daarnaast dient er per 100ha leefgebied circa 10% maar minimaal 6 ha optimaal

landhabitat aanwezig te zijn. Dit is vertaald naar: een gebied van 100 ha met hierin 5 voortplantingswateren van 2000 m<sup>2</sup>, 10 ha struweel en 10 ha ruigte. De 7 A-basisbiotopen zijn schematisch in de kaart van 2010 aangegeven (zie figuur 4 en 5).

#### *Poelen*

Voor het scenario 2010 is aangenomen dat alle poelen die potentieel geschikt zijn in de huidige situatie optimaal geschikt zijn in 2010. Ook alle poelen die in de verbindingzones en in de nieuwe leefgebieden worden aangelegd zijn optimaal geschikt voor boomkijkers.

#### *Wegen*

De provinciale weg bij Echt richting Duitsland (N572) vormt een belangrijke barrière voor de uitbreiding naar het noorden. In het scenario is ervan uitgegaan dat de barrièrewerking van deze weg grotendeels is opgeheven, door de aanleg van voorzieningen. De meest effectieve wijze om de barrièrewerking te verminderen is de aanleg van een ruime beekonderdoorgang met droge oevers, als integraal onderdeel van de verbindingzones (Broekmeyer & Steingröver 2001).

### **2.2.4 Bepalen van de ruimtelijke samenhang van het netwerk**

Het simulatiemodel *Smallsteps* simuleert de bewegingen van boomkijkers door het landschap. Het model is ontwikkeld op basis van de bewegingen van gezenderde boomkijkers (Vos 1999). Uit het zenderonderzoek is gebleken dat boomkijkers zich niet willekeurig door het landschap bewegen. Bij overgangen tussen landschapstypen blijkt dat er voor sommige elementen, zoals houtwallen, een duidelijke voorkeur bestaat terwijl andere landschapstypen, met name akkers, worden vermeden. Deze voor en afkeur voor habitattypen hebben tot gevolg dat de ruimtelijke samenhang tussen poelen in een netwerk niet alleen afhangt van de afstand tussen poelen maar ook van de aard van het tussenliggende landschap. Voor het bepalen van de ruimtelijke samenhang is een kaart gemaakt van de 'doorlaatbaarheid' van het landschap voor de huidige situatie en voor het scenario 2010. In tabel 2 is een overzicht gemaakt van de landschapselementen die als corridor of als barrière functioneren en de landschapselementen die neutraal zijn voor de uitwisseling van boomkijkers.

Naast de kans om een bepaald landschapstype in te gaan is de snelheid en gerichtheid van de beweging bepalend voor de bewegingen van de boomkijkers. Deze maten zijn afgeleid van de snelheden die zijn waargenomen bij de gezenderde dieren. Het blijkt dat de dieren zich in struweel langzamer bewegen dan over akkers, terwijl grasland hier tussenin zit.

De mate van uitwisseling tussen leefgebieden wordt bepaald door de voorkeur van de bewegende dieren. Daarnaast is echter ook sterfte tijdens dispersie een belangrijke factor. Van verkeerswegen is bijvoorbeeld bekend dat overstekende amfibieën zeer vaak worden overreden. De kans op sterfte hangt hierbij sterk samen met de verkeersintensiteit (Hels & Buchwald 2001). In het studiegebied zijn de wegen

onderverdeeld in 2 categorieën: drukke doorgaande wegen met een kans op sterfte van 25% en lokale wegen met een kans op sterfte van 10%. Gezien de resultaten uit het onderzoek van Glandt (2004) zijn deze sterfte kansen nog aan de lage kant, hetgeen het belang van voorzieningen bij wegen benadrukt. Er zijn geen gekwantificeerde gegevens bekend over de kans op sterfte op akkers. Algemeen wordt aangenomen dat amfibieën open droge gebieden vermijden omdat zij in deze gebieden een relatief groot risico lopen, wegens het gevaar van uitdrogen, predatie risico en het ontbreken van voedsel (Ray et al. 2002). Wel mag worden aangenomen dat ze bij het horen van kooractiviteit ook een open akker zullen oversteken, waarbij de kans om de akker in te gaan tijdelijk verhoogd zou zijn t.o.v. de kans die in het model wordt aangehouden (tabel 3). Dit effect van sociale attractie kon in deze analyse niet worden meegenomen. Het sterfte risico zal toenemen naarmate een dier langer op de akker blijft. De kans op sterfte per tijdstap in deze ongunstige gebieden is zodanig gezet dat een dier gemiddeld na 24 uur verblijf op de akker dood is.

*Tabel 2 Overzicht van landschapselementen met een positieve, neutrale of negatieve waarde in het bewegingsmodel Smallsteps*

| Landschapselement                                                                                                  | Doorlaatbaarheid in Smallsteps | Toelichting                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Het habitat van de boomkikker: alle landschapselementen die in tabel 1 als 'struweel' en 'ruigte' zijn aangemerkt. | 'Corridor'                     | Deze landschapselementen bevorderen de uitwisseling van boomkikkers.          |
| Doorgaande wegen tussen de dorpskernen                                                                             | 'Barrière'                     | Deze elementen hebben een negatief effect op de uitwisseling van boomkikkers. |
| Kernen van Naaldbossen.                                                                                            | 'Barrière'                     | Idem                                                                          |
| Bebouwde kom                                                                                                       | 'Barrière'                     | Idem                                                                          |
| Bouwland                                                                                                           | 'Barrière'                     | Idem                                                                          |
| Kernen van loofbos, en gemengd bos.                                                                                | 'Neutraal'                     | Deze elementen zijn neutraal.                                                 |
| Grasland                                                                                                           | 'Neutraal'                     | Idem                                                                          |

In tabel 3 zijn de bewegingsparameters per landschapstype en per simulatiestap opgenomen: stapgrootte, draaihoek, de kans op sterfte en de overgangskansen tussen landschapstypen. Deze waarden zijn afgeleid van de waargenomen bewegingen van de gezenderde boomkikkers.

*Tabel 3 Overzicht van bewegingsparameters per landschapstype van het bewegingsmodel Smallsteps.*

| Parameter                      | Corridor | Neutraal | Barrière vlak | Wegen type 1* | Wegen type 2** |
|--------------------------------|----------|----------|---------------|---------------|----------------|
| Gemiddelde hoek                | 0.0      | 0.0      | 0.0           | 0.0           | 0.0            |
| Hoek parameter                 | 1.04     | 1.04     | 1.34          | 1.34          | 1.34           |
| Hoek verdeling                 | Normaal  | Normaal  | Normaal       | Normaal       | Normaal        |
| Sterfte                        | 0        | 0        | 0.175         | 0.25          | 0.1            |
| Gemiddelde stapgrootte         | 13.5     | 19.7     | 39.5          | 39.5          | 39.5           |
| Stapgrootte standaard deviatie | 13.5     | 19.7     | 39.5          | 39.5          | 39.5           |
| Overgangskansen                |          |          |               |               |                |
| Van/ Naar                      |          |          |               |               |                |
| Corridor                       | 1        | 0.11     | 0.02          | 0.25          | 0.5            |
| Neutraal                       | 0.89     | 1        | 0.17          | 0.25          | 0.5            |
| Barrière, vlak                 | 0.98     | 0.83     | 1             | 0.25          | 0.5            |
| Wegen                          | 1        | 1        | 1             | 1             | 1              |

\* Betreft wegen die dorpskernen verbinden (zie figuur 2).

\*\* Betreft rustige rondweg bij Echt (zie figuur 2).

## ***De simulaties***

Een simulatie begint met 5000 dieren in iedere geschikte poel. Ieder dier zet maximaal 1500 stappen volgens de bewegingsparameters uit tabel 3. Wanneer een boomkikker tijdens deze bewegingen door het landschap een geschikte poel tegenkomt dan blijft hij daar. De poelen hebben hierbij een detectieafstand van 25m, zodat een poel op 25m afstand wordt waargenomen. Het landschap is opgedeeld in rasters van 10 x 10m en het aantal passerende boomkikkers is bijgehouden. Op basis van het aantal gepasseerde boomkikkers wordt de doorlaatbaarheid van het landschap bepaald. Het aantal gepasseerde kikkers is een maat voor de ruimtelijke samenhang van het netwerk.

## **2.3 Resultaten**

### **2.3.1 Resultaten bezettingskans huidige situatie**

Figuur 2 (zie achterin rapport) geeft een overzicht van de bezettingskans van de poelen in de huidige situatie. In de vier deelgebieden waar nu reeds boomkikkers voorkomen zijn de omstandigheden in gebied 13 'Doort en Horsterplas' en gebied 14 'Slekkenhout' gunstig. Hier zijn voldoende poelen, struweel en ruigte aanwezig en hebben de meeste poelen een bezettingskans van meer dan 75%. Gebied 15 'Vulensbeekdal' is veel minder gunstig. Gebied 15 vormt een belangrijke schakel zowel naar het oostelijk gelegen Haeselaarsbroek als naar de potentiële uitbreidingsgebieden naar het noorden. Hier dient daarom met prioriteit geïnvesteerd te worden in de aanleg van extra boomkikkerhabitat. Gebied 17 'Haeselaarsbroek' laat een gemengd beeld zien. Ook hier kan de situatie nog verbeterd worden. Gezien de ambitie om de verspreiding van de boomkikker naar het noorden uit te breiden,

zou met name in het noordelijke deel van dit gebied de situatie verbeterd moeten worden.

Kijkend naar de potentiële uitbreidingsgebieden, dan blijkt dat op dit moment de uitgangssituatie in gebied C 'Reigersbroek' en gebied D 'Rozendaal' gunstig te zijn. De tussenliggende schakels gebied 16 'Marissen/Het Leen' en gebied A 't Broekje' bevatten op het ogenblik te weinig leefgebied voor de boomkikker. De situatie in de meer oostelijk gelegen potentiële uitbreidingsgebieden gebied B 'Eerselen', gebied E 't Sweeltje' en gebied F 'Munningsbosch' is niet gunstig. In deze gebieden komt de bezettingskans niet hoger dan 25% omdat er momenteel te weinig landhabitat aanwezig is en ook de poelendichtheid is hier te gering.

### **2.3.2 Resultaten ruimtelijke samenhang huidige situatie**

Figuur 3 (zie achterin rapport) geeft een overzicht van de ruimtelijke samenhang van het huidige landschap voor de boomkikker. De doorlaatbaarheid van het landschap varieert van donkergroen met een hoge doorlaatbaarheid tot oranje, met een zeer lage doorlaatbaarheid. Gebieden die door een ononderbroken groene zone met elkaar verbonden zijn hebben een goede ruimtelijke samenhang. De witte gebieden zijn door de boomkikkers in het geheel niet bereikt. Er bestaan grote verschillen in de doorlaatbaarheid van het landschap. Kijkend naar de vier deelgebieden waar de boomkikker nu reeds voorkomt, zijn gebied 13 'Doort en Horsterplas' en gebied 14 'Slekkerhout' goed met elkaar verbonden. De ruimtelijke samenhang met gebied 15 'Vulensbeekdal' is minder goed. De ruimtelijke samenhang binnen gebied 17 'Haeselaarsbroek' is ook goed. Echter gebied 17 is momenteel slecht verbonden met de overige bezette gebieden. Mogelijk is de ruimtelijke samenhang via gebied 18 'IJzerenbosch' beter, echter dit valt buiten het studiegebied. Het verbeteren van de ruimtelijke samenhang met gebied 15 'Vulensbeekdal' en 17 'Haeselaarsbroek' heeft hoge prioriteit, omdat vanuit deze bestaande populaties de uitbreiding naar het noorden gemaakt dient te worden. Kijkend naar de uitbreidingsmogelijkheden naar het noorden, dan tekenen zich 2 routes af die beide nog verbetering behoeven. Met name de westelijke route vanaf gebied 15 'Vulensbeek' heeft al een behoorlijk sterke ruimtelijke samenhang richting de potentiële uitbreidingsgebieden gebied A 't Broekje', gebied C 'Reigersbroek' en gebied D 'Rosendaal'. Hier vormt de autoweg van Echt naar Duitsland echter een barrière en ook vormt het gebrek aan ruimtelijke samenhang van het gebied 16 'Marissen/Het Leen' een zwakke schakel. Bij de oostelijke uitbreidingsroute vanaf gebied 17 'Haeselaarsbroek' bevindt zich een goede verbindingszone langs de Pepinusbeek. Deze zone loopt in de huidige situatie echter dood. De overige uitbreidingsgebieden zijn in de huidige situatie slecht verbonden. Tenslotte is opvallend dat zich ook in het oosten gebieden met een goede ruimtelijke samenhang bevinden, met name ten westen van Posterholt.



### 2.3.3 Resultaten bezettingskans scenario 2010

In figuur 4 (zie achterin rapport) is de bezettingskans van de voortplantingswateren van het scenario 2010 weergegeven. De aanleg van de basisbiotopen en de verbindingzones hebben tot een aanzienlijke uitbreiding van voortplantingswateren met een hoge bezettingskans geleid. In het gebied waar nu reeds boomkijkers voorkomen is de situatie duidelijk verbeterd, zoals in gebied 17 'Haeselaarsbroek', waar zich nu een hoge concentratie van poelen met een hoge bezettingskans bevindt. Ook de aanleg van een nieuw basisbiotoop tussen gebied 17 'Haeselaarsbroek' en gebied 15 'Vulensbeekdal' heeft de potenties verbeterd. Echter de bezettingskansen van de voortplantingswateren binnen gebied 15 'Vulensbeekdal' is nog onvoldoende verbeterd. Juist omdat dit een belangrijke schakel naar het noorden vormt zou hier nog extra in geïnvesteerd dienen te worden. Kijkend naar het noordelijke uitbreidingsgebied dan is het effect van de aanleg van verbindingzones en basisbiotopen duidelijk zichtbaar. Er zijn nu twee zones van leefgebieden met een hoge bezettingskans waarlangs het uitbreidingsgebied A 't Broekje', gebied C 'Reigersbroek' en gebied D 'Rozendaal' gekoloniseerd kan worden. Echter gebied 16 Marissen/Het Leen vormt nog steeds een zwakke schakel, waarin nog meer geïnvesteerd dient te worden. Meer naar het oosten zijn de verbindingzones duidelijk zichtbaar. De voortplantingswateren hebben hier echter een geringe bezettingskans omdat de hoeveelheid leefgebied hier toch te veel verdunt. Op termijn zou ook op deze noodoostelijke uitbreidingsroute geïnvesteerd kunnen worden. Gezien de veel betere potenties van het noordwestelijke uitbreidingsgebied heeft dit echter een lagere prioriteit.

### 2.3.4 Resultaten ruimtelijke samenhang scenario 2010

Figuur 5 (zie achterin rapport) geeft een overzicht van de ruimtelijke samenhang van het landschap voor de boomkikker bij uitvoering van scenario 2010. Het aanleggen van verbindingzones, basisbiotopen en het verminderen van de barrièrewerking van de autoweg bij Echt (N572) heeft een sterke verbetering van de ruimtelijke samenhang tot gevolg.

Kijkend naar de vier deelgebieden waar de boomkikker nu reeds voorkomt, is de ruimtelijke samenhang tussen gebied 13 'Doort en Horsterplas' en gebied 14 'Slekkerhout' met gebied 15 'Vulensbeekdal' wel verbeterd maar nog niet optimaal. Ook de ruimtelijke samenhang richting gebied 17 'Haeselaarsbroek' is door de aanleg van een basisbiotoop verbeterd, maar hier ontbreekt nog een verbindingzone. Kijkend naar de uitbreidingsgebieden naar het noorden dan zijn er nu twee uitbreidingszones met een sterk verbeterde ruimtelijke samenhang gecreëerd. In principe is de ruimtelijke samenhang voldoende om via twee routes het uitbreidingsgebied in het noordoosten uitbreidingsgebied A 't Broekje', gebied C 'Reigersbroek' en gebied D 'Rozendaal' te bereiken. Wel is het aan te raden om de plekken waar de zone met een goede doorlaatbaarheid erg smal is, deze op termijn nog te versterken. Een verdere versterking van het netwerk kan worden bereikt door gebruikt te maken van de goede connectiviteit in oost-west richting ter hoogte van

gebied 16 'Marissen/Het Leen', door langs deze route ook te investeren in nieuwe leefgebieden.

### **3 Genetische variatie van de boomkikker.**

Binnen dit deel van het project worden metingen uitgevoerd aan de genetische variatie binnen en tussen populaties en clusters van populaties. Uit de genetische structuur zullen schattingen van de mate van uitwisseling tussen de populaties binnen de clusters en tussen clusters worden gemaakt. Hiermee kan worden nagegaan of de periode van habitatfragmentatie en isolement heeft geleid tot populatiedifferentiatie en verlies van genetische diversiteit. De schatting van de mate van dispersie tussen populaties binnen en tussen clusters geeft inzicht over welke afstanden succesvolle dispersie heeft plaatsgevonden.

De genetische studie bestaat uit twee onderdelen: een analyse van genetische diversiteit in boomkikker populaties in de Achterhoek, waar sinds de jaren '70 vier populaties fungeren als bronpopulatie bij de uitbreiding van de boomkikker; en een analyse van de boomkikkers in de populatie in Doort, die straks moeten fungeren als bronpopulatie in het daar te realiseren uitbreidingsgebied. De genetische diversiteit in beide gebieden wordt vergeleken met die in vergelijkbare landschappen in Zwitserland en Denemarken.

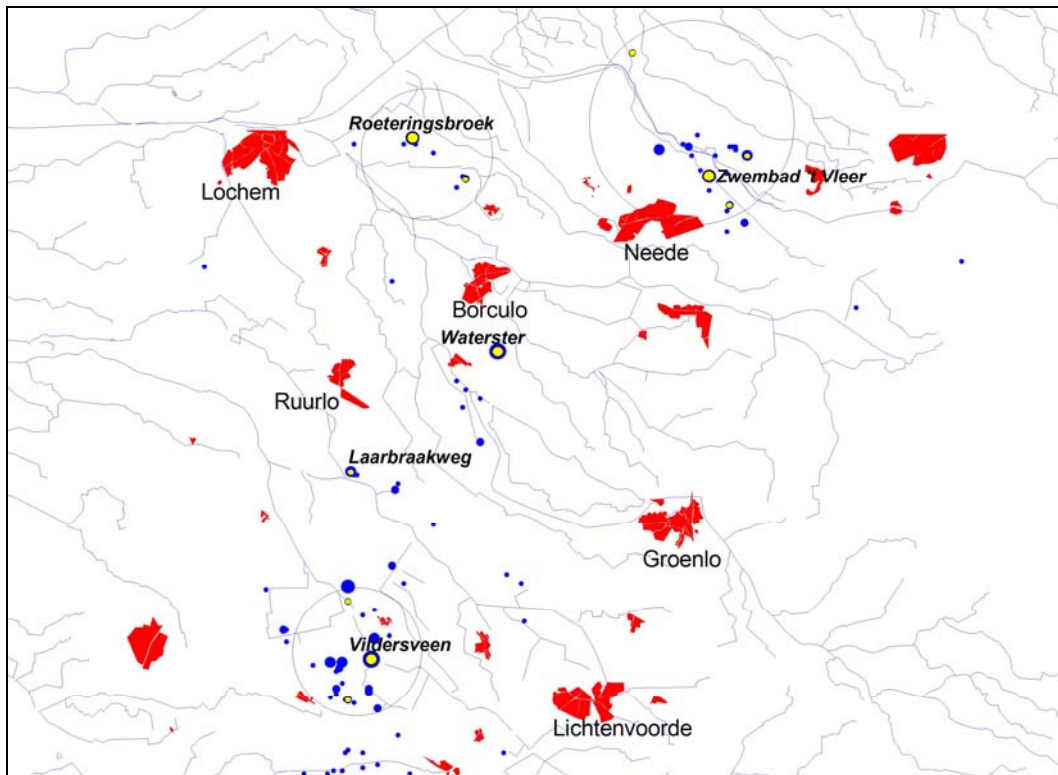
#### **3.1 Analyse van boomkikkerpopulaties in een gefragmenteerd gebied in de Achterhoek**

Het gebied in de Achterhoek, tegen Twente, dat globaal wordt begrensd door de plaatsen Zelhem, Lichtenvoorde, Haaksbergen en Lochem, is het studiegebied voor een kleinschalig populatie-genetisch onderzoek aan de boomkikker (zie Figuur 6). Op grond van historische data wordt aangenomen dat in de 70er jaren, toen de situatie voor de boomkikker het slechtst was, in dit gebied nog slechts vier populaties in het gebied aanwezig waren: Vildersveen, Teeselinkven/Neede, Roeterinksbroek en Waterster. Figuur 7 geeft een overzicht van de verspreiding van de boomkikker in de periode 1985-1988, 1989-1996 en 1997-2001. De vier populaties zijn in de periode 1985-1988 de enige grotere populaties. De hypothese die wordt getest is dat vanuit deze historische bronpopulaties de andere populaties opnieuw zijn gekoloniseerd, en dat op deze manier de huidige clusters van boomkikker populaties zijn gevormd. Hierbij is het nog onduidelijk of de Laarbraakweg als een afzonderlijke cluster moet worden opgevat. Wel valt op dat de populatie Laarbraakweg uit de periode 1985-1988 niet bekend is, maar wel uit de periode 1989-1996 (Figuur 7).

#### **3.2 Bemonstering**

In 1998 zijn in de Achterhoek eieren verzameld van Boomkikkers in vijf clusters: Cluster V Vildersveen, Cluster T Teeselinkven (inclusief de populatie uit Twente (Tw-1), Cluster R Roeterinksbroek, Cluster W1 Waterster en Cluster L1 Laarbraakweg (zie Figuur 6 en Tabel 4). Eieren zijn verzameld in een zo kort mogelijk tijdsbestek en op verschillende plekken langs de rand van een poel. Omdat vrouwtjes meerdere

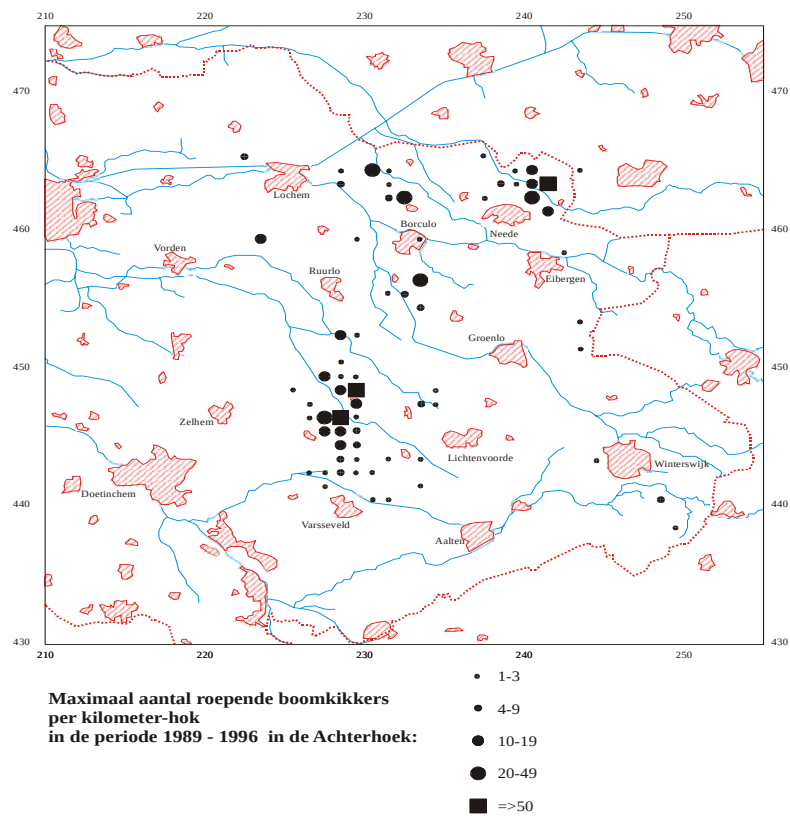
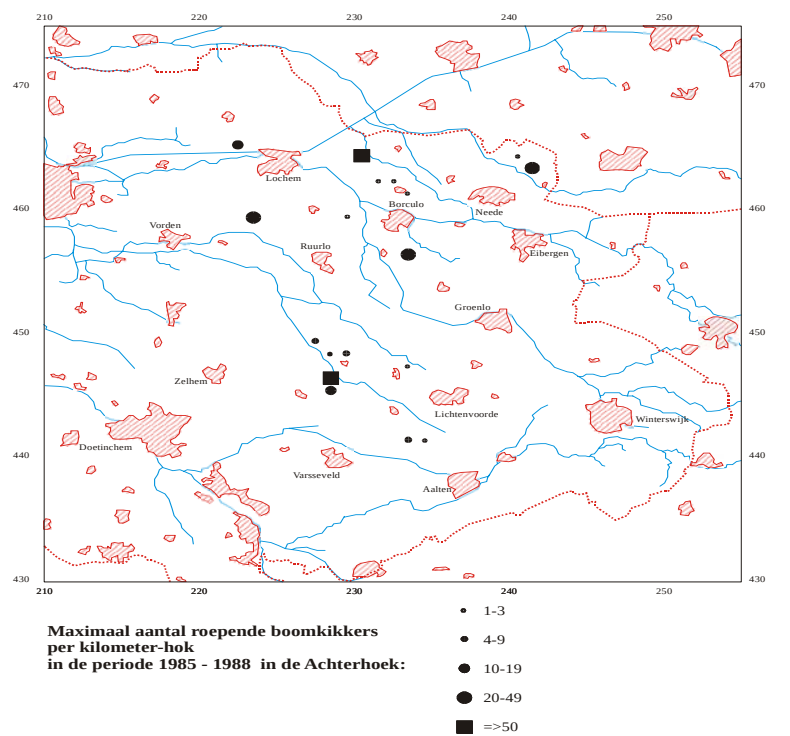
eiklonpen per nacht kunnen afzetten kan het voorkomen dat soms meerdere eiklonpen van dezelfde vrouwelijke boomkikker zijn verzameld. Binnen de clusters zijn verschillende poelen bezocht waarbij getracht is tot 20-30 eieren per poel te verzamelen. Voor de analyse nemen we aan dat elke poel een aparte populatie vormt. Tabel 4 geeft de schattingen van de omvang van de populaties aan de hand van het aantal roepende mannetjes, en het aantal genomen monsters. In poelen R2 en T2 lukte het niet om meer dan respectievelijk slechts 1 en 2 individuen te bemonsteren en deze zijn daarom verder buiten beschouwing gelaten in de populatie genetische analyses.



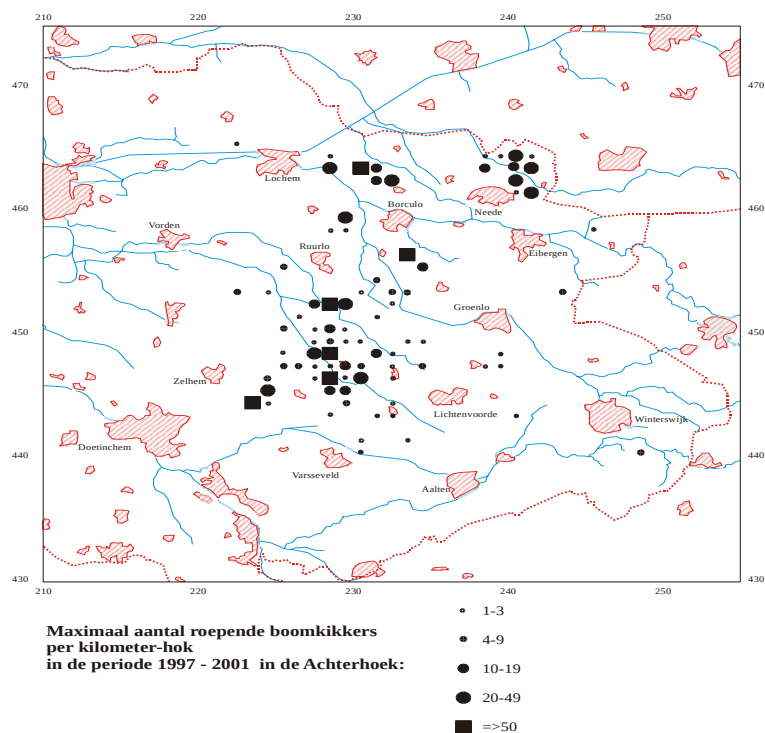
*Figuur 6. Studiegebied Achterhoek met daarin de bemonsterde clusters en poelen (de gele punten zijn bemonsterd)*

*Tabel 4 De in 1998 bemonsterde poelen in de Achterhoek. Per cluster zijn de bemonsterde poelen en het aantal bemonsterde individuen aangegeven*

| Poelnummer                     | x-coördinaat | y-coördinaat | Gebiedsnaam                                       | Indicatie populatiegrootte in 1998 (roepende mannetjes) | Aantal bemonsterde eiklonpen |
|--------------------------------|--------------|--------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------|
| <b>Cluster Vildersveen</b>     |              |              |                                                   |                                                         |                              |
| V-1                            | 228.9        | 446.4        | Vildersveen                                       | 150                                                     | 34                           |
| V-2                            | 228.1        | 448.4        | Boerderij Maandag                                 | 60                                                      | 12                           |
| V-3                            | 228.8        | 445.3        | Halse Heide                                       | 15                                                      | -                            |
| V-4                            | 228.1        | 445          | Stuive zand                                       | 10                                                      | 10                           |
| V-5                            | 227.5        | 446.3        | schietbaan Kolenbrander + poelen langs Tulnersweg | vorig jaar uitgestorven?                                | -                            |
| V-7                            | 226          | 447.4        | Wolfersveen                                       | ?                                                       | -                            |
| <b>Cluster Teeselinkven</b>    |              |              |                                                   |                                                         |                              |
| T-1                            | 240.4        | 462.9        | 't Vleer                                          | 50                                                      | 8                            |
| T-2                            | 240.1        | 464.4        | Needse Achterveld                                 | 20                                                      | 2                            |
| T-3                            | 241.7        | 463.6        | oostelijk v. Teeselinkven                         | 30                                                      | 13                           |
| T-4                            | 241.1        | 461.9        | Kieftendijk                                       | 12                                                      | 17                           |
| T-5                            | 238.7        | 463.8        | Polhaarweg                                        | ?                                                       | -                            |
| T-6                            | 240.6        | 463.6        | Lonneken                                          | 4                                                       | -                            |
| T-7                            | 241.2        | 463.9        | Teeselinkven                                      | 2                                                       | -                            |
| T-8                            | 241.6        | 461.3        | Achterste Russchemorsdijk                         | 10                                                      | -                            |
| <b>Twente</b>                  |              |              |                                                   |                                                         |                              |
| Tw-1                           | 237800       | 467100       | Brummelman                                        | 20                                                      | 9                            |
| Tw-2                           | 240700       | 466300       | Markvelderveld                                    | 20                                                      | -                            |
| Tw-3                           | 258050       | 464800       | Bennekampshaar/Witteveen                          | 30                                                      | -                            |
| <b>Cluster Roeterinksbroek</b> |              |              |                                                   |                                                         |                              |
| R-1                            | 230.3        | 464.2        | Roeterinksbroek                                   | 40                                                      | 23                           |
| R-2                            | 232.1        | 462.8        | Wanninkhof-noord                                  | 30                                                      | 1                            |
| R-3                            |              |              |                                                   |                                                         | 10                           |
| <b>Cluster Waterster</b>       |              |              |                                                   |                                                         |                              |
| W-1                            | 233.2        | 456.9        | Waterster                                         | 100                                                     | 22                           |
| W-3                            | 232.6        | 453.8        | Ruurlose Broek                                    | 10                                                      | -                            |
| W-4                            | 229.7        | 452.2        | Tichelman, Ruurlose Broek                         | 6                                                       | -                            |
| <b>Cluster Laarbraakweg</b>    |              |              |                                                   |                                                         |                              |
| L-1                            | 228.2        | 452.8        | Laarbraakweg                                      | 30                                                      | 14                           |



*Figuur 7 Verspreiding boomkikker in de periodes 1985-1988, 1989-1996 en 1997-2001 (bron J. Stronks)*



*Figuur 7 Vervolg*

### 3.3 Resultaten van de genetische analyse

Ten behoeve van genetisch onderzoek aan de boomkikker zijn microsatelliet merkers ontwikkeld (Arens et al. 2000, zie 'Kader Verklaring enige begrippen uit de populatiegenetica' voor een korte toelichting). De in totaal 175 bemonsterde boomkikker individuen zijn met een sub-set van acht microsatelliet loci geanalyseerd (loci: HA5-22A, HA5-201, HA1-60, HA1-104, HA1-09, HA1-20, HA1-25 en HA1-140). De loci hebben in de totale dataset 2 tot 10 verschillende allelen (gemiddeld 6.25). Tabel 5 geeft het aantal allelen per locus en per populatie als indicatie voor de genetische diversiteit. Voor de interpretatie van de genetische variatie is het van belang te testen of de populaties zich in Hardy-Weinberg evenwicht bevinden. Hierbij wordt getest of merkers zich Mendeliaans gedragen en of de boomkikker populaties geen afwijkende genetische patronen laten zien. (Tabel 6). Het begrip Hardy-Weinberg (HW) evenwicht wordt uitgelegd in het kader 'Verklaring enige begrippen uit de populatiegenetica'.

Tabel 5. Gebruikte microsatelliet loci met het aantal gevonden allelen per locus.

| aantal allelen per locus en per populatie en cluster |           |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |         |   |   |    |    |        |  |
|------------------------------------------------------|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------|---|---|----|----|--------|--|
|                                                      | Populatie |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | Cluster |   |   |    |    |        |  |
| Locus                                                | R1        | R3 | T1 | T3 | T4 | Tw | V1 | V2 | V4 | W1 | L1 | R       | T | V | W1 | L1 | Totaal |  |
| HA5-22                                               | 2         | 1  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2       | 2 | 2 | 2  | 2  | 2      |  |
| HA5-20                                               | 3         | 2  | 3  | 3  | 3  | 3  | 4  | 3  | 4  | 2  | 2  | 3       | 3 | 4 | 2  | 2  | 4      |  |
| HA1-60                                               | 5         | 2  | 5  | 4  | 4  | 5  | 4  | 3  | 3  | 3  | 4  | 5       | 6 | 4 | 3  | 4  | 8      |  |
| HA1-10                                               | 3         | 2  | 2  | 4  | 4  | 3  | 4  | 4  | 3  | 2  | 3  | 3       | 5 | 4 | 2  | 3  | 5      |  |
| HA1-09                                               | 7         | 5  | 4  | 5  | 6  | 4  | 5  | 5  | 3  | 5  | 6  | 8       | 6 | 7 | 5  | 6  | 9      |  |
| HA1-20                                               | 2         | 2  | 2  | 3  | 3  | 2  | 3  | 4  | 3  | 2  | 3  | 2       | 3 | 4 | 2  | 3  | 4      |  |
| HA1-25                                               | 6         | 4  | 4  | 4  | 5  | 3  | 5  | 4  | 5  | 4  | 4  | 6       | 5 | 7 | 4  | 4  | 8      |  |
| HA1-14                                               | 5         | 2  | 4  | 3  | 4  | 2  | 7  | 4  | 4  | 6  | 5  | 5       | 4 | 8 | 6  | 5  | 10     |  |

De meeste populaties zijn in HW evenwicht op alle acht loci. Slechts 4 populatie/locus combinaties zijn niet in HW evenwicht. Dit aantal afwijkingen (4 van de 88) ligt binnen het aantal dat door toeval kan worden gevonden (Bonferroni correctie van de 5% onzekerheidsgrens bij meerdere testen). In een aantal gevallen is het cluster niet in HW evenwicht terwijl de populaties binnen deze clusters wel in HW evenwicht zijn. Hier komt de afwijking van het HW evenwicht in het cluster waarschijnlijk door het samenvoegen van de populaties. Gezien de resultaten van de Hardy Weinberg test is er geen reden om aan te nemen dat bij een van de loci nul-allelen voorkomen. Dit betekent dat de dataset geschikt is voor verdere analyse.

Tabel 6. Test voor Hardy-Weinberg evenwicht binnen clusters en populaties binnen cluster

| Cluster of populatie | Merker      |         |         |         |        |        |          |         |
|----------------------|-------------|---------|---------|---------|--------|--------|----------|---------|
|                      | HA5-22A     | HA5-201 | HA1-60  | HA1-104 | HA1-09 | HA1-20 | HA1-25   | HA1-140 |
|                      | 1           | 2       | 3       | 4       | 5      | 6      | 7        | 8       |
| Cluster 1 (R)        | +           | +       | +       | +       | +      | +      | +        | +       |
| R1                   | +           | +       | +       | +       | +      | +      | +        | +       |
| R3                   | n.a.(fixed) | +       | +       | +       | +      | +      | +        | +       |
| Cluster 2 (T)        | * 0.009     | * 0.01  | * 0.003 | +       | +      | +      | +        | +       |
| T1                   | +           | +       | +       | +       | +      | +      | +        | +       |
| T3                   | +           | +       | +       | +       | +      | +      | +        | +       |
| T4                   | +           | +       | +       | +       | +      | +      | +        | +       |
| Tw                   | +           | +       | +       | +       | +      | +      | +        | +       |
| Cluster 3 (V)        | +           | * 0.009 | +       | +       | +      | +      | +        | * 0.026 |
| V1                   | +           | +       | +       | * 0.02  | +      | +      | +        | * 0.028 |
| V2                   | +           | +       | +       | +       | +      | +      | +        | * 0.018 |
| V4                   | +           | +       | +       | +       | +      | +      | +        | +       |
| 4 W1                 | +           | +       | +       | +       | +      | +      | * 0.0003 | +       |
| 5 L1                 | +           | +       | +       | +       | +      | +      | +        | +       |

\*Significante afwijkingen van HW evenwicht en de bijbehorende P-waarde (P=0.05 is grenswaarde).



### ***Kader verklaring enige begrippen uit de populatiegenetica***

#### ***Wat zijn Microsatellieten?***

Microsatellieten zijn stukken DNA waarin combinaties van baseparen (motieven tussen 2 en 8 basen) repeterend voorkomen. Bijvoorbeeld de basencombinatie GA tien keer herhaald: GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA (kort weergegeven als GA10). Het aantal herhalingen van deze GA “repeat” kan verschillen tussen chromosomen en zo kunnen verschillende combinaties van microsatelliet lengtes tussen individuen bestaan (bijv individu 1 heeft: GA10 en GA10, individu 2 heeft: GA10 en GA12). Door middel van unieke stukjes DNA (primers) aan weerszijde van een microsatelliet kan een stuk DNA met de microsatelliet erin worden vermeerderd (PCR) en vervolgens zichtbaar worden gemaakt. De lengteverschillen in de repeat zullen leiden tot lengteverschillen tussen de vermeerderde stukjes DNA, en deze kunnen worden gedetecteerd. De stukken DNA met verschillende lengte worden allelen genoemd. Het aantal overeenkomsten in aanwezige allelen tussen individuen is een maat voor de onderlinge verwantschap. Grote aantallen identieke allelen wijzen op een hoge verwantschap.

#### ***Hardy-Weinberg evenwicht***

In een populatie waarin individuen willekeurig met elkaar kunnen paren (“random mating”) voldoet de verhouding tussen het aantal individuen die homozygoot zijn voor een allel of heterozygoot zijn voor dat allel en een ander allel aan de formule van Hardy – Weinberg. De populatie is dan in evenwicht dwz de momentopname die een genetische analyse in feite is, geeft een min of meer stabiele situatie weer. Afwijkingen van het HW evenwicht kunnen een biologische achtergrond hebben. Bijvoorbeeld omdat paringen niet random zijn. Ook kan een afwijking van HW evenwicht een aanwijzing zijn dat de populatie die bemonsterd is in feite uit sub-populaties bestaan, die elk wel in evenwicht kunnen zijn. Afwijkingen kunnen echter ook een technische reden hebben. Bij het gebruik van microsatellieten kunnen nul allelen optreden. Dit treedt op als door een mutatie een allel van één van de twee chromosomen niet vermeerderd kan worden en alleen het andere allel wordt gedetecteerd. Het individu wordt dan ten onrechte beschouwd als homozygoot. Dit kan leiden tot een tekort aan heterozygoten t.o.v. de verwachting op grond van het HW evenwicht. Afwijkingen van HW evenwicht door de aanwezigheid van nul allelen zijn vaak wel te onderscheiden van biologische redenen, als voldoende merkers aanwezig zijn, doordat er dan merkers met zowel afwijkingen als merkers die in HW evenwicht zijn voor dezelfde populaties te vinden zijn.

Vervolgens is gekeken naar de genetische differentiatie (F-statistiek) tussen de clusters, binnen de clusters tussen populaties en tussen alle populaties afzonderlijk. In F-statistiek is  $F_{ST}$  de maat voor genetische differentiatie tussen populaties. Het is het

deel van de variatie die wordt gevonden tussen populaties ten opzichte van de totale variatie. De maat loopt van 0 (geen variatie tussen populaties) tot 1 (populaties zijn compleet verschillend en hebben geen allel gemeenschappelijk). De hoogte van de  $F_{ST}$  – waarde geeft dus aan of er veel (lage  $F_{ST}$ ) of weinig (hoge  $F_{ST}$ ) uitwisseling van individuen is tussen populaties. Hierbij worden  $F_{ST}$  –waarden vaak ingedeeld in drie klassen; van 0 tot 0.05 niet of nauwelijks gedifferentieerd, van 0.05 tot 0.15 matig gedifferentieerd en hoger dan 0.15 sterk gedifferentieerde populaties. Tabel 7 laat zien dat er een sterke differentiatie is, zowel tussen populaties als tussen clusters.

$F_{IS}$  is een parameter voor het inteelniveau binnen populaties. Een positieve waarde geeft aan dat er een tekort is aan heterozygoten, een negatieve waarde een overschot aan heterozygoten. De  $F_{IS}$  – waarde als maat voor inteelt op het populatie-niveau is significant negatief en dit wijst erop dat er iets meer loci heterozygoot aanwezig zijn dan verwacht. Dit is wel een relevant gegeven, het kan erop wijzen dat de paring van volwassen dieren niet helemaal willekeurig verloopt en dat dieren die genetisch verschillen elkaar opzoeken (assortative mating). Een alternatieve verklaring kan zijn dat nakomelingen van zulke paringen juist beter overleven (heterozygoten-voordeel), bijvoorbeeld omdat ze beter bestand zijn tegen ziektes.

De analyse van populatiedifferentiatie geeft een algemeen beeld van het niveau van differentiatie in het onderzoeksgebied. Om een indruk te krijgen van de onderlinge verschillen tussen bepaalde populaties of clusters zijn paarsgewijze  $F_{ST}$  – waarden tussen populaties uitgerekend (Tabel 8).

*Tabel 7. F-statistiek voor het gehele gebied*

|                                                             | $F_{ST}$ | $F_{IS}$  |
|-------------------------------------------------------------|----------|-----------|
| 5 clusters (R, T, V, W1, L1)                                | 0.2054** | -0.0713** |
| 11 populations (R1, R3, T1, T3, T4, Tw, V1, V2, V4, W1, L1) | 0.1974** | -0,0912** |

\* significant bij  $P < 0.05$ , \*\* significant bij  $p < 0.01$ , op grond van betrouwbaarheidstoetsen.

*Tabel 8. Paarsgewijze  $F_{ST}$ – waarden tussen populatieclusters (8a) en tussen losse populaties (8b)*

*Tabel 8a*

| $F_{ST}$ -values  | R      | T      | V      | W      |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|
| T cluster         | 0.2038 |        |        |        |
| V cluster         | 0.2575 | 0.1421 |        |        |
| Waterster (W1)    | 0.2167 | 0.2707 | 0.2327 |        |
| Laarbraakweg (L1) | 0.2853 | 0.1488 | 0.0723 | 0.2762 |

Tabel 8b.

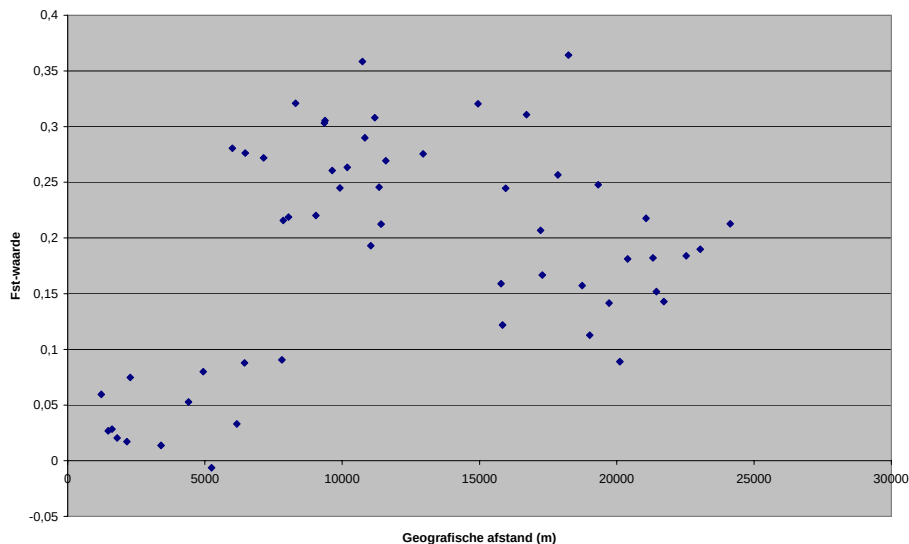
|    | R1     | R3     | T1                   | T3                   | T4     | Tw     | V1                   | V2                   | V4     | W1     |
|----|--------|--------|----------------------|----------------------|--------|--------|----------------------|----------------------|--------|--------|
| R3 | 0.0748 |        |                      |                      |        |        |                      |                      |        |        |
| T1 | 0.2634 | 0.321  |                      |                      |        |        |                      |                      |        |        |
| T3 | 0.2124 | 0.2607 | 0.0269 <sup>NS</sup> |                      |        |        |                      |                      |        |        |
| T4 | 0.1931 | 0.2202 | 0.0596 <sup>NS</sup> | 0.0205 <sup>NS</sup> |        |        |                      |                      |        |        |
| Tw | 0.2188 | 0.2719 | 0.0800 <sup>NS</sup> | -0.0063              |        |        |                      |                      |        |        |
| V1 | 0.2566 | 0.3108 | 0.089                | 0.1519               | 0.1416 | 0.1839 |                      |                      |        |        |
| V2 | 0.2447 | 0.3205 | 0.1127               | 0.1812               | 0.1572 | 0.2177 | 0.0172 <sup>NS</sup> |                      |        |        |
| V4 | 0.2478 | 0.3642 | 0.1429               | 0.1899               | 0.1821 | 0.2127 | 0.0284 <sup>NS</sup> | 0.0137 <sup>NS</sup> |        |        |
| W1 | 0.2158 | 0.2806 | 0.3054               | 0.29                 | 0.3034 | 0.308  | 0.2457               | 0.245                | 0.2755 |        |
| L1 | 0.2693 | 0.3584 | 0.1218               | 0.1667               | 0.159  | 0.2068 | 0.0878               | 0.0527 <sup>NS</sup> | 0.0906 | 0.2762 |

\* NS niet significant verschillend, alle andere populaties zijn wel significant verschillend.

Tussen clusters variëren de  $F_{ST}$  – waarden van 0.07 tot 0.29 en tussen de populaties van -0.006 tot 0.36. Hieruit kan worden geconcludeerd dat op het niveau van de clusters de differentiatie in het algemeen hoog is, behalve tussen het Vildersveen cluster en Laarbraakweg die aanzienlijk minder gedifferentieerd zijn (0.0723). De differentiatie tussen populaties varieert sterk, wat aangeeft dat er waarschijnlijk zowel onderling goed verbonden als onderling sterk geïsoleerde populaties voorkomen. Om te kijken welke populaties significant van elkaar verschillen, is er een statistische test (exact test) voor populatiedifferentiatie uitgevoerd (Tabel 8b). De meeste populaties verschillen significant van elkaar. Er zit echter een duidelijk patroon in. De populaties binnen cluster T Teeselinkven (T1, T2, T3 en TW) zijn allen niet significant van elkaar te onderscheiden. Datzelfde geldt voor de populaties binnen cluster V Vildersveen (V1, V2 en V4). Verder zijn R1 en R3 significant verschillend, evenals alle vergelijkingen tussen populaties uit verschillende clusters. De enige uitzondering hierop is populatie V2 (Vildersveen) die niet significant onderscheidbaar is van L1 (Laarbraakweg). Het niet significant onderscheidbaar zijn wordt in deze analyse echter voor een deel bepaald door het aantal bemonsterde individuen in beide populaties wat voor beide populaties vrij laag is. Niettemin wijst dit op een grotere verwantschap.

### 3.4 Resultaten van de ruimtelijke analyse van genetische verwantschap

Om te onderzoeken wat het effect van geografische afstand tussen populaties is op de genetische verschillen, zijn alle paarsgewijze fysieke afstanden en de paarsgewijze genetische afstanden met elkaar vergeleken. De paarsgewijze punten zijn in figuur 8 weergegeven. Om te onderzoeken of er een significante correlatie bestaat tussen fysieke afstand en genetische afstand is een Mantel test uitgevoerd (hierbij wordt



*Figuur 8 Relatie tussen genetische verwantschap ( $F_{ST}$ ) en geografische afstand tussen populaties.*

gekeken naar de correlatie tussen de twee afstand matrices. Dit is vergelijkbaar met een normale regressie analyse die vanwege de paarsgewijze en dus niet onafhankelijke datapunten word vervangen door een Mantel test (die gebruik maakt van randomisatie van de gegevens). De correlatie tussen genetische differentiatie ( $F_{ST}$ ) en geografische afstand tussen alle paren van populaties is 0.35. Deze correlatie is significant (percentage permutaties door toeval met een gelijke of grotere associatie is 1.95, minder dan 5%). Voor de alternatieve maat  $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ , die een correctie geeft bij hoge  $F_{ST}$  waarden, is de correlatie met afstand 0.28 (percentage permutaties met een gelijke of grotere associatie: is 2.80). Voor beide genetische afstandsmaten geldt dat de correlatie met de fysieke afstand groter is dan op grond van toeval kan worden verwacht, met andere woorden er bestaat een significante relatie tussen genetische afstand en geografische afstand. Populaties die gezien hun geografische afstand relatief weinig differentiatie vertonen, betreffen allemaal paren van populaties in de clusters Teeselinkven enerzijds en Vildersveen anderzijds. Uit figuur 8 blijkt dat de correlatie boven afstanden van 15 km weer afneemt.

### ***Zijn er indicaties voor recente kolonisaties of bottlenecks?***

Populaties die qua omvang langere tijd stabiel zijn gebleven (zich in mutatie-drift evenwicht bevinden) hebben relatief veel allelen die in lage frequenties voorkomen en slechts een klein aantal dat in hogere frequenties voorkomt. Deze zo geheten L-vormige allelfrequentie distributies worden verstoord door bottlenecks. Een bottleneck is een periode van zeer kleine aantallen reproducerende individuen. Afhankelijk van de duur en de zwaarte van zo'n bottleneck gaat er genetische variatie in de desbetreffende populatie verloren door toeval (drift). Bijvoorbeeld het enige individu met een bepaald allel weet zich niet te reproduceren en gaat dood waardoor dit zeldzame allel uit de populatie verdwijnt. Doordat tijdens zo'n bottleneck zeldzame allelen een grotere kans hebben om verloren te gaan, verschuift de allelfrequentie distributie naar links. Dit effect blijft, afhankelijk van de zwaarte van de bottleneck, gedurende een aantal generaties zichtbaar. Daarnaast kan een scheve distributie wijzen op een recente kolonisatie (founder effect). Voor alle populaties is onderzocht of een mogelijke verschuiving van de distributie aantoonbaar was, wat kan duiden op een recente bottleneck dan wel een recente kolonisatie. De populaties met een normale allelfrequentie verdeling zijn waarschijnlijk de bronpopulaties

(Tabel 9). De allelfrequentie blijkt goed overeen te komen met de verwachtingen. De oude bron-populaties, Roeteringsbroek (R1), 't Vleer (T1), Vildersveen (V1), Waterster (W1) hebben een normale L-vormige distributie, terwijl de recent gekoloniseerde populaties een verschoven distributie hebben. Ook populatie Laarbraakweg blijkt een normale L-vormige distributie te hebben, hetgeen erop zou wijzen dat dit ook een reeds lang bestaande bron-populatie is.

*Tabel 9. Overzicht distributie-verdeling allelen in de verschillende populaties*

|                                  |                                               |
|----------------------------------|-----------------------------------------------|
| R1 normaal L-vormige distributie | Roeteringsbroek, oud, verwachte bronpopulatie |
| R3 verschoven distributie        |                                               |
| T1 normaal L-vormige distributie | 't Vleer, oud, verwachte bronpopulatie        |
| T3 verschoven distributie        |                                               |
| T4 verschoven distributie        |                                               |
| Tw verschoven distributie        |                                               |
| V1 normaal L-vormige distributie | Vildersveen, oud, verwachte bronpopulatie     |
| V2 verschoven distributie        |                                               |
| V4 verschoven distributie        |                                               |
| W1 normaal L-vormige distributie | Waterster, oud, verwachte bronpopulatie       |
| L1 normaal L-vormige distributie | Laarbraakweg, historie onbekend               |

### ***Zijn er indicaties voor uitwisseling tussen populaties?***

Om te onderzoeken of er directe aanwijzingen zijn voor uitwisseling tussen populaties is er een 'assignment' toets uitgevoerd. Hierbij worden individuen op grond van hun multi-locus genotype toegewezen aan de populaties, waarmee ze het meeste overeen komen. Individen die toegewezen worden aan populaties die niet de populatie zijn waaruit ze zijn bemonsterd, worden daarmee geïdentificeerd als mogelijke migranten. Aangezien er in deze studie is uitgegaan van eieren betreft het hier mogelijke eerste- of evt. tweede generatie nakomelingen van migranten, de statistische kracht van deze analyse is hierdoor beduidend lager dan wanneer volwassen dieren, waaronder mogelijk directe migranten, waren bemonsterd. De resultaten van deze analyse (Tabel 10) moeten dus behoedzaam worden geïnterpreteerd ook omdat de aantallen individuen per populatie laag zijn. Ook kunnen niet-bemonsterde populaties in of rond de directe omgeving van het studiegebied van belang zijn. Uit de assignment test blijkt dat mogelijke uitwisseling vooral plaats vindt tussen populaties binnen hetzelfde cluster (Tabel 10, cursief). In een aantal gevallen is er ook sprake van toewijzingen naar populaties van andere clusters (Tabel 10, vet). Gezien de frequente uitwisseling tussen de clusters Vildersveen en Laarbraakweg, lijken deze tot één cluster te behoren. De overige uitwisseling tussen clusters zou wijzen op een uitwisseling over afstanden van 11 (R1/T4) tot bijna 22 (V4/T1) km. De toewijzingskansen naar andere populaties buiten de eigen cluster (toewijzingen tussen Vildersveen en Laarbraakweg niet meegerekend) zijn echter meer dan een factor 100 lager dan die bij binnen cluster toewijzingen horen. Daarnaast is in die gevallen de toewijzingskans naar de eigen populatie nagenoeg even hoog waardoor de betrouwbaarheid van deze vijf toewijzingen laag is. Opvallend is verder wel dat de assignment test geen enkele

uitwisseling met de Waterster W1 aangeeft. Dit wijst op een sterke isolatie van deze populatie.

*Tabel 10. Toewijzing van dieren naar de best passende populatie op grond van het multi-locus genotype. Getallen zijn aantallen dieren. Cursief uitwisseling binnen Cluster, vet uitwisseling tussen clusters*

| <i><b>Van</b></i> | <i><b>Naar</b></i> |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|-------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                   | <i><b>R1</b></i>   | <i><b>R3</b></i> | <i><b>T1</b></i> | <i><b>T3</b></i> | <i><b>T4</b></i> | <i><b>Tw</b></i> | <i><b>V1</b></i> | <i><b>V2</b></i> | <i><b>V4</b></i> | <i><b>W1</b></i> | <i><b>L1</b></i> |
| R1                | 19                 | 2                | 0                | 0                | <b>1</b>         | 0                | 0                | 0*               | 0                | 0                | 0                |
| R3                | 0                  | 10               | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                |
| T1                | 0                  | 0                | 5                | 2                | 0                | 0                | 0                | <b>1</b>         | 0                | 0                | 0                |
| T3                | 0                  | 0                | <i>1</i>         | 4                | 4                | 4                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                |
| T4                | 0                  | 0                | 2                | 3                | 9                | 2                | 0                | <b>1</b>         | 0                | 0                | 0                |
| Tw                | 0                  | 0                | 0                | 3                | 0                | 6                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                |
| V1                | <b>1</b>           | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 23               | 5                | <i>1</i>         | 0                | <b>4</b>         |
| V2                | 0                  | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 3                | 7                | <i>1</i>         | 0                | <b>2</b>         |
| V4                | 0                  | 0                | <b>1</b>         | 0                | 0                | 0                | 2                | <i>1</i>         | 6                | 0                | 0                |
| W1                | 0                  | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 22               | 0                |
| L1                | 0                  | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | <b>3</b>         | <b>1</b>         | <b>1</b>         | 0                | 9                |

\* Identieke toewijzingskans met de toewijzingskans naar de eigen populatie.

## 4 Analyse van de genetische diversiteit van de populatie in de Doort

In Midden Limburg tussen Susteren en Echt bevindt zich een belangrijke netwerkpopulatie van de boomkikker. Van deze zogeheten Doort populatie is de genetische diversiteit bepaald. Daartoe zijn in het voortplantingsseizoen 40 eiklonpen bemonsterd van de "moederpoel" (coördinaten 188.185 X 344.270). Daarbij is van elke eiklomp één enkel eitje gebruikt voor de genetische analyses. In de andere direct naastgelegen poelen zijn geen eiklonpen aangetroffen. De genetische diversiteit in de Doort is vergeleken met die in de Achterhoek en twee populaties in Zwitserland om te kijken hoe deze zich tot elkaar verhouden.

### 4.1 Resultaten van de genetische analyse

De 40 bemonsterde individuen zijn geanalyseerd met dezelfde acht microsatelliet merkers die ook voor de Achterhoek zijn gebruikt. Vier van de acht merkers in de Doort zijn niet in HW evenwicht (Tabel 11).

De inteelt index  $F_{IS}$  (0.035, Tabel 12) voor deze populatie is licht positief (tekort aan heterozygoten) maar laat een grote spreiding tussen de merkers zien. De onderlinge verhoudingen tussen allelen in de Doort zijn duidelijk niet in evenwicht, maar zonder verdere demografische gegevens, genetische data van omringende populaties of fitness gegevens, valt het moeilijk daar iets met zekerheid uit te concluderen.

Beide parameters (HW en  $F_{IS}$ ) duiden er in ieder geval op dat paring niet willekeurig is of dit veroorzaakt wordt door demografische effecten (zeer ongelijke bijdragen van dieren aan nakomelingschap, uitzetten van dieren of weer uitwisselen tussen voorheen gescheiden populaties) en/of dat er sprake is van genetische effecten (combinatie van selectie en inteelt) is op grond van deze gegevens niet te bepalen.

Voor de populatie in de Doort is ook gekeken of de populatie zich in mutatie-drift evenwicht bevindt. De allelfrequentie distributie test laat geen aanwijzingen voor een mogelijke recente bottleneck zien.

Tabel 11. Test voor Hardy-Weinberg (HW) evenwicht per locus

| Pop/markers | HA5-22A | HA5-201 | HA1-60  | HA1-104 | HA1-09  | HA1-20  | HA1-25 | HA1-140 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|
|             | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7      | 8       |
| Doort       | +       | +       | * 0.001 | +       | * 0.044 | * 0.013 | +      | * 0.001 |

\*Significante afwijkingen van HW evenwicht en de bijbehorende P-waarde (P=0.05 is grenswaarde).

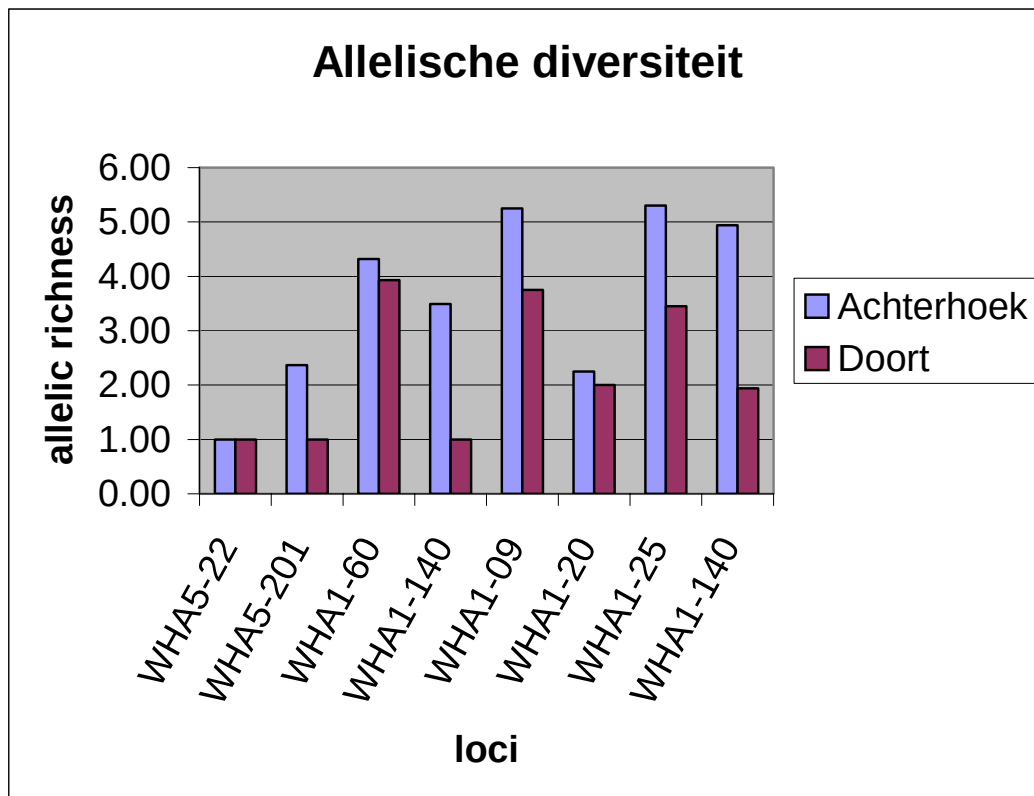
Tabel 12. -  $F_{IS}$  waarden in de Doort

| Merker  | $F_{IS}$ |
|---------|----------|
| HA5-22A | -0.333   |
| HA5-201 | -0.354   |
| HA1-60  | -0.008   |
| HA1-104 | -0.015   |
| HA1-09  | -0.007   |
| HA1-20  | 0.305    |
| HA1-25  | 0.034    |
| HA1-140 | 0.495    |
| Gem.    | 0.035    |

## 4.2 Verschillen in allelische diversiteit tussen gebieden?

In Zwitserland zijn twee boomkikkergebieden, elk bestaande uit één grote populatie (Lavigny en Trouville) omringd door een aantal kleine populaties, bemonsterd. Van de grote populaties zijn monsters genomen en ook geanalyseerd met behulp van de acht microsatelliet merkers (deels hier, deels door Sylvain Dubey, Universiteit Lausanne, Zwitserland). Voor het vergelijken van de genetische diversiteit tussen de verschillende populaties is gekozen voor allelic richness of allelische diversiteit. Allelische diversiteit is een maat voor de hoeveelheid verschillende allelen (of allelische diversiteit) die rekening houdt met verschillen in steekproefgrootte. De hoeveelheid allelen per populatie is met behulp van de rarefactie methode berekend. Hierbij wordt de hoeveelheid allelen in alle populaties gestandaardiseerd naar de kleinste steekproef (omdat populaties met 1 allel als monomorf (geen allelische variatie) worden beschouwd wordt de gecorrigeerde allelische diversiteit verkregen door van het getal 1 af te trekken). In figuur 9 is de allelische diversiteit van de Doort vergeleken met de gecombineerde populaties uit de Achterhoek. De allelische diversiteit in de Doort is vergeleken met die in de Achterhoek, op één locus na, altijd (duidelijk) lager. Wanneer we ook in de Achterhoek kijken naar losse populaties (zie Tabel 13) blijkt echter dat de allelische diversiteit van de populatie in de Doort tussen de waarden van die in de Achterhoek in ligt: sommige kleine populaties in de Achterhoek hebben minder diversiteit, maar alle grote populaties hebben meer.





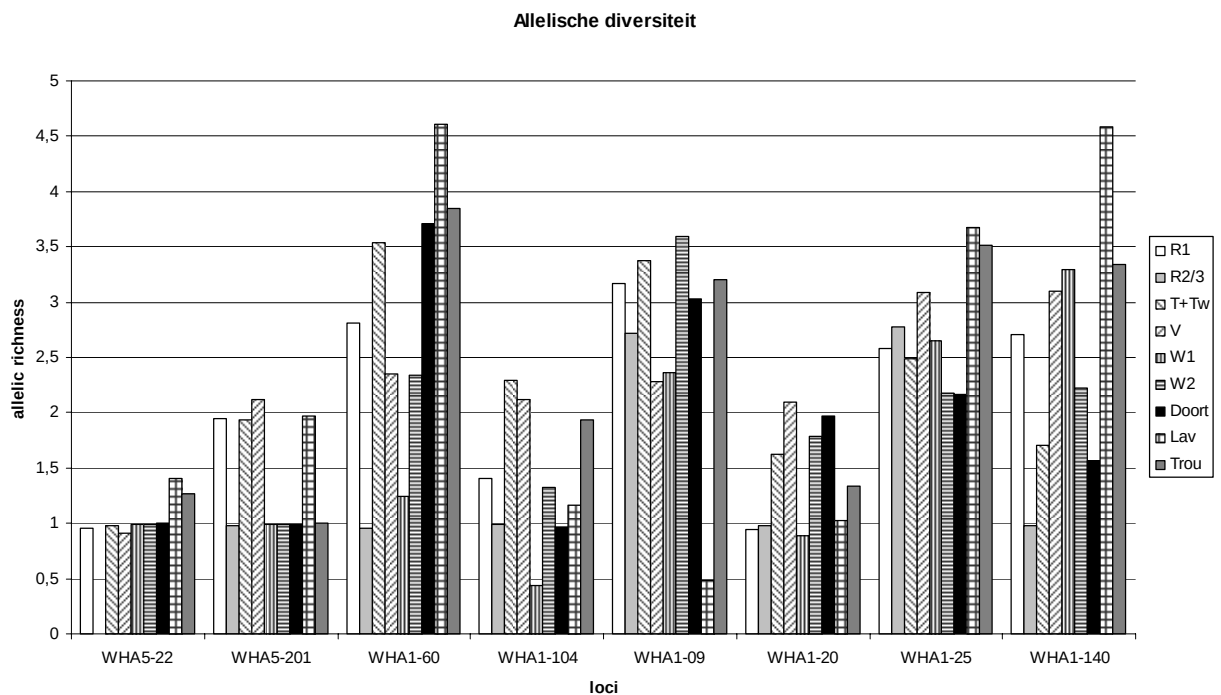
Figuur 9. Verschil in allelische diversiteit tussen Achterhoek en de Doort

Vervolgens zijn de gegevens van de allelische diversiteit vergeleken tussen alle Nederlandse en Zwitserse populaties. In Tabel 13 zijn de losse groepen in de Achterhoek en Zwitserland (Lavigny en Trouville) meegenomen naast de Doort. Deze gegevens zijn ook uitgezet in Figuur 10. Verdere analyse van de allelische diversiteit van de verschillende populaties laat zien dat, hoewel de allelische diversiteit in de Doort voor alle acht merkers lager is dan de hoogste waarde in een populatie uit de Achterhoek of Zwitserland, in vier merkers de bijdrage op de totale aanwezige diversiteit vanuit de Doort de hoogste is. Dit komt voornamelijk door de differentiatie van de Doort ten opzichte van de rest en slechts bij één merker door de bijdrage aan de totale diversiteit van de diversiteit in de Doort zelf. De populatie in Doort bevat dus allelen die niet of in andere frequenties voorkomen in de andere populaties en is als zodanig genetisch gezien een aparte en waardevolle populatie. De twee Zwitserse populaties bevatten overigens voor vier loci (5-22, 1-60, 1-25 en 1-40) meer tot veel meer diversiteit dan enige Nederlandse populatie.

Tabel 13. Allelische diversiteit in alle clusters van populaties die niet significant verschillen.

|       | WHA5-22 | WHA5-201 | WHA1-60 | WHA1-104 | WHA1-09 | WHA1-20 | WHA1-25 | WHA1-140 |
|-------|---------|----------|---------|----------|---------|---------|---------|----------|
| R1    | 0.96    | 1.95     | 2.81    | 1.41     | 3.17    | 0.95    | 2.58    | 2.71     |
| R2/3  | 0       | 0.98     | 0.96    | 0.99     | 2.72    | 0.98    | 2.78    | 0.98     |
| T+Tw  | 0.98    | 1.93     | 3.54    | 2.29     | 3.37    | 1.63    | 2.49    | 1.7      |
| V     | 0.91    | 2.12     | 2.35    | 2.12     | 2.28    | 2.1     | 3.09    | 3.1      |
| W1    | 0.99    | 0.99     | 1.24    | 0.44     | 2.36    | 0.89    | 2.65    | 3.29     |
| L1    | 0.99    | 0.99     | 2.34    | 1.33     | 3.6     | 1.79    | 2.18    | 2.22     |
| Doort | 1       | 0.99     | 3.71    | 0.97     | 3.03    | 1.97    | 2.17    | 1.57     |
| Lav   | 1.41    | 1.97     | 4.61    | 1.16     | 0.48    | 1.03    | 3.67    | 4.58     |
| Trou  | 1.27    | 1        | 3.85    | 1.94     | 3.2     | 1.34    | 3.51    | 3.34     |

NB: Voor de berekening van de allelische diversiteit is uit gegaan van RT=11; de steekproefgrootte van populatie R2/R3.



Figuur 10. Allelische diversiteit van alle Nederlandse en Zwitserse populaties

## 5 Conclusies en aanbevelingen

### 5.1 Inleiding

In Midden-Limburg bevindt zich een belangrijke netwerkpopulatie van de boomkikker, waarvan het leefgebied voor een duurzame bescherming dient te worden uitgebreid (Crombaghs & Lenders 2001). In het actieprogramma Boomkikker (IKL 2003) worden hiervoor maatregelen voorgesteld, waarbij een gebied van 7 km overbrugd moet worden van de huidige verspreidingsgebieden naar nieuw te koloniseren gebieden. Hierbij is het de vraag wat de beste strategie is bij deze uitbreiding. Om dit proces te ondersteunen is een analyse gedaan naar de ruimtelijke samenhang van het leefgebied, waarbij de huidige situatie en een scenario voor 2010 met elkaar zijn vergeleken. In een optimale situatie bestaat het leefgebied van de boomkikker uit voortplantingswateren met een hoge bezettingskans in een ruimtelijk samenhangend netwerk van leefgebieden, waar de uitwisseling van boomkikkers tussen de leefgebieden optimaal is. De bezettingskans van poelen is voorspeld met een regressiemodel op basis van de hoeveelheid voortplantingswateren en landhabitat in de omgeving van een poel. Poelen met een lage bezettingskans vormen een zwakke schakel in het netwerk en dit dient zoveel mogelijk voorkomen te worden. In hoofdstuk 5.2 worden de resultaten en aanbevelingen m.b.t. de bezettingskans van de voortplantingswateren gepresenteerd. De ruimtelijke samenhang van de leefgebieden is geanalyseerd met het simulatiemodel *Smallsteps*, een model waarmee de dispersiebewegingen van boomkikkers wordt gesimuleerd. Ook hier geldt dat onderdelen van het netwerk met een slechte ruimtelijke samenhang vermeden dienen te worden, zeker als deze zwakke schakel zich op een sleutelpositie binnen het netwerk bevindt. In hoofdstuk 5.2 worden de resultaten en aanbevelingen m.b.t. de ruimtelijke samenhang gepresenteerd.

In het tweede deel van dit rapport is op basis van genetische verwantschap een reconstructie gemaakt van de uitbreiding van de netwerkpopulatie in de Achterhoek, sinds de 70er jaren. Daarnaast is de mate van genetische variatie van de netwerkpopulatie in de Achterhoek vergeleken met de variatie in een populatie in Midden-Limburg en enkele populaties elders in Europa. Hiermee ontstaat een indruk of er verschillen zijn in de genetische variatie binnen de verspreidingsgebieden in Nederland. Door vergelijking van de genetische variatie met populaties elders in Europa wordt bepaald of er sprake zou kunnen zijn van genetische verarming van de boomkikkerpopulaties in Nederland. Deze resultaten worden in hoofdstuk 5.3 en 5.4 besproken.

## **5.2    Bezettingskans en ruimtelijke samenhang populatie Midden-Limburg**

### ***Interpretatie van de resultaten***

Bij de interpretatie van de resultaten van het regressiemodel dienen de volgende kanttekeningen te worden geplaatst. Het regressiemodel is gebaseerd op correlaties tussen het voorkomen van boomkijkers en het landschap in Zeeuws-Vlaanderen (Vos & Stumpel 1996). Dit betekent dat in het studiegebied in Zeeuws-Vlaanderen een significante correlatie is aangetoond tussen de kans dat een poel bezet is door boomkijkers en een aantal factoren die samenhangen met de kwaliteit van de poel en het landschap in de omgeving van de poel. Bij de toepassing van een regressiemodel buiten het gebied waar het voor is ontwikkeld dient altijd enige voorzichtigheid te worden betracht. Ook bleek in het studiegebied Limburg niet alle informatie voorhanden, die voor het regressiemodel nodig is. Er was geen informatie beschikbaar over de habitatskwaliteitsfactoren van de poel en over de hoeveelheid ruigte in het landschap. Dit betekent dat de uitkomsten van het model niet als absolute voorspellingen van de bezettingskans moeten worden opgevat. De verschillen in bezettingskans tussen de poelen en tussen de scenario's kunnen echter wel onderling vergeleken worden. Hierdoor ontstaat inzicht waar de goede plekken zitten in het netwerk en waar de zwakke.

Ook voor de resultaten van het simulatiemodel Smallsteps geldt dat de voorspellingen van de ruimtelijke samenhang van het landschap niet als absolute voorspellingen van de bewegingen van boomkijkers door het landschap moeten worden opgevat. De voorkeur en afkeur voor bepaalde landschapstypen berusten op veldwaarnemingen aan bewegende boomkijkers (Vos 1999). Dus in grote lijnen is de conclusie gerechtvaardigd dat leefgebied verbonden door landschapstypen die de voorkeur hebben van boomkijkers een goede ruimtelijke samenhang zullen hebben. Boomkijkers zullen relatief vaker langs deze routes door het landschap bewegen. Echter de absolute verdeling van aantallen in het landschap is fictief omdat natuurlijk niet bekend is hoeveel dieren er werkelijk uit de diverse poelen zullen vertrekken. Grote populaties zullen in werkelijkheid meer bijdragen aan de ruimtelijke samenhang dan kleine omdat er meer dieren vertrekken uit grote populaties. Wel is het zo dat de resultaten onderling vergeleken kunnen worden, zodat conclusies getrokken kunnen worden over gebieden met een lage en gebieden met een hoge ruimtelijke samenhang.

### **5.2.1    Aanbevelingen voor het herstelplan van de boomkikker in Midden-Limburg**

#### ***Bezettingskans huidige situatie***

Op basis van de bezettingskansen van de voortplantingswateren in de huidige situatie wordt aanbevolen om prioriteit te geven aan het versterken van het zuidelijke gebied waar de boomkikker nu reeds voorkomt. Het zuidelijke gebied functioneert als bronpopulatie, van waaruit de uitbreiding naar nieuw leefgebied moet plaatsvinden.

Er bevinden zich echter nog een aantal zwakke schakels juist op de locaties die voor de uitbreiding naar het noorden cruciaal zijn.

*Aanbeveling: Investeren in de aanleg van extra leefgebied in gebied 15 'Vulensbeek' en het noorden van gebied 17 'Haeselaarsbroek'.*

Kijkend naar de potentiële uitbreidingsgebieden, blijkt de noordwestelijke hoek van het uitbreidingsgebied de beste potenties te hebben. Hier bevinden zich nu reeds een aantal gebieden die zeer geschikt zijn voor de boomkikker. Echter om deze gebieden vanuit de huidige boomkikkerpopulaties ook te kunnen bereiken zal het leefgebied in het tussenliggende landschap verbeterd dienen te worden.

*Aanbeveling: Uitbreiding van de boomkikker richten op de noordwestelijke potentiële leefgebieden C 'Reigersbroek' en gebied D 'Rozendaal'.*

*Aanbeveling: Extra leefgebied creëren in het tussenliggende gebied: gebied 16 'Marissen/Het Leen' en gebied A 't Broekje'.*

### ***Ruimtelijke samenhang huidige situatie***

Op basis van de ruimtelijke samenhang van het landschap in de huidige situatie wordt aanbevolen om allereerst de samenhang te verbeteren binnen het huidige boomkikkergebied. Er is een optimale ruimtelijke samenhang nodig om de kans op kolonisatie vanuit de brongebieden zo groot mogelijk te maken.

*Aanbeveling: Gebied 15 'Vulensbeek' en gebied 17 'Haeselaarsbroek' dienen verbonden te worden met de nu reeds goed verbonden gebieden 13 'Doort en Horsterplas' en gebied 14 'Slekkerhout'.*

Kijkend naar de ruimtelijke samenhang naar het noorden, blijkt dat er twee routes zijn voor de uitbreiding naar het noorden. Hierbij vertoont de westelijke route een aantal zwakke punten met geringe samenhang. De oostelijke route langs de Pepinusbeek heeft in de huidige situatie al goede potenties als verbindingzone. Echter deze zone sluit momenteel niet aan op potentieel leefgebied.

*Aanbeveling: Investeren in de zwakke punten in de uitbreidingszone richting gebied A 't Broekje', gebied C 'Reigersbroek' en gebied D 'Rozendaal'.*

*Aanbeveling: Nieuw leefgebied aanleggen langs de Pepinusbeek.*

### ***Bezettingskans scenario 2010***

De aanleg van nieuw leefgebied en verbindingzones heeft een zeer positief effect op de bezettingskans van de bestaande en potentiële leefgebieden van de boomkikker in Midden-Limburg. Er zijn echter nog twee bottlenecks waar de situatie voor de boomkikker nog niet optimaal is. Deze locaties vormen een essentiële schakel in de kolonisatie van zuid naar noord.

*Aanbeveling: Gebied 15 'Vulensbeekdal' en gebied 16 'Marissen/Het Leen' vragen nog om een extra inspanning door het creëren van extra leefgebied.*

### ***Ruimtelijke samenhang scenario 2010***

De aanleg van nieuw leefgebied, verbindingzones en het verminderen van de barrièrewerking van de N572 heeft een zeer positief effect op de ruimtelijke samenhang van het leefgebied van de boomkikker. Kijkend naar de uitbreidingsgebieden naar het noorden dan ontstaan er twee zones met een sterk verbeterde ruimtelijke samenhang naar de gebieden in het noordoosten: A 't Broekje', gebied C 'Reigersbroek' en gebied D 'Rozendaal'. Alleen de ruimtelijke samenhang in het zuidelijke gebied waar de boomkikker nu al voorkomt dient nog verder verbeterd te worden, om de dispersie van de boomkikker naar nieuwe leefgebieden te optimaliseren. Omdat het hier om de brongebieden gaat van waaruit het noordelijke gebied gekoloniseerd dient te worden is het belangrijk om met prioriteit in deze extra ruimtelijke samenhang te investeren.

Een verdere versterking van het netwerk kan worden bereikt door gebruikt te maken van de goede connectiviteit in oost-west richting ter hoogte van gebied 16 'Marissen/het Leen', door langs deze route ook te investeren in nieuwe leefgebieden.

*Aanbeveling: De verbinding verder verbeteren van gebied 15 'Vulensbeekdal' aan gebied 13 'Doort en Horsterplas' en aan gebied 14 'Slekkerhout'. Daarnaast is verbetering van de samenhang van gebied 15 'Vulensbeekdal' via het nieuwe basisbiotoop naar gebied 17 'Haeselaarsbroek' gewenst. Aanleg nieuwe leefgebieden langst de oos-west verbinding ter hoogte van gebied 16 'Marissen/Het Leen'.*

## **5.3 Genetische analyse van de boomkikker in de Achterhoek**

### ***Differentiatie tussen populaties en tussen populatie-clusters***

In de Achterhoek laten de schattingen van populatiedifferentiatie zien dat de meeste populaties binnen een cluster juist erg op elkaar lijken. Dit geeft aan dat alle populaties binnen een straal van 5 km van elkaar door dispersie goed met elkaar verbonden zijn. De enige uitzondering hierop is in het cluster Roeterinksbroek, waar de twee populaties R1 en R2/3 verschillend zijn hoewel ze slechts op 2.3 km van elkaar liggen. Dit is waarschijnlijk het effect van (her)kolonisatie van R2/3 (Wanninkhof) vanuit R1 (Roeterinksbroek) waarbij de gevonden verschillen zijn ontstaan doordat het aantal stichters vanuit Roeterinksbroek beperkt was.

Het lijkt aannemelijk dat de herkolonisatie van nieuwe gebieden heeft plaatsgevonden vanuit de vier bronpopulaties die in de 70er jaren nog aanwezig waren. Hierbij zijn vier populatieclusters ontstaan die nu nog steeds genetisch van elkaar te onderscheiden zijn. Tussen de clusters is sprake van een zeer aanzienlijke differentiatie, wat erop duidt dat de clusters sterk geïsoleerd van elkaar zijn geraakt en er momenteel weinig dispersie tussen clusters plaatsvindt. Populaties V2 (Boerderij Maandag) en L1 (Laarbraakweg) zijn de enige uitzondering hierop. Deze twee populaties liggen op slechts 4400 meter van elkaar en zijn niet van elkaar te onderscheiden. Tussen de clusters Vildersveen en Laarbraakweg lijken er op grond van de assignment test uitwisseling plaats te vinden waarbij V2 waarschijnlijk fungeert als stapsteen. De Laarbraakweg dient daarom niet als een afzonderlijke bronpopulatie te worden opgevat, maar maakt deel uit van de Vildersveen cluster.

### ***Correlatie met afstand***

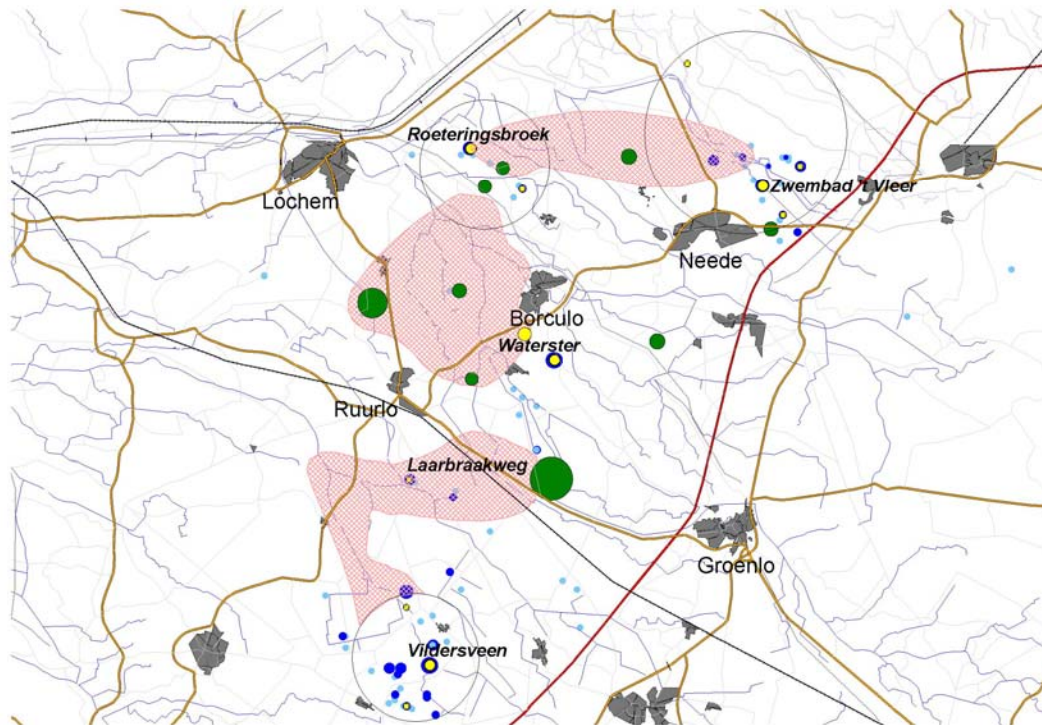
De correlatie tussen genetische differentiatie ( $F_{ST}$ ) en geografische afstand tussen alle paren van populaties is significant over de hele schaal van het studiegebied alhoewel de correlatie boven de 15 km lijkt af te nemen. Voor een correlatie tussen genetische en geografische afstand is een zekere mate van uitwisseling tussen populaties nodig want als alleen genetische drift een rol speelt dan in de genetische afstand tussen populaties gaat de relatie met afstand verloren. Drift is ongericht en twee willekeurige populaties kunnen door toeval zowel meer als minder op elkaar gaan lijken. Op basis van de gevonden correlatie tussen genetische en geografische afstand kan niet zondermeer worden geconcludeerd dat momenteel uitwisseling tussen populaties tot over 15 km plaatsvindt. Het patroon kan namelijk ook dateren van voor de landschapsfragmentatie of tijdens het proces van habitat fragmentatie tot stand zijn gekomen. De differentiatie tussen de vijf boomkikker clusters van vóór de fragmentatie van het gebied was waarschijnlijk lager. De twee clusters Teeselinkven en Vildersveen vormden ook na de versnippering van het leefgebied nog grote subpopulaties, waarop drift weinig invloed heeft gehad zodat er ook niet veel differentiatie is opgetreden. Van het cluster Vildersveen is bekend dat hier tot vrij recent ook een andere oude en zeer goede kernpopulatie aanwezig was, voor Teeselinkven is dat mogelijk ook het geval geweest. Het is dus mogelijk dat het huidige patroon van genetische variatie de historische dispersie reflecteert, terwijl uitwisseling op dit moment, als gevolg van habitatfragmentatie, nauwelijks meer voor komt.

Doordat de boomkikker in dit gebied aan het toenemen is en (nieuwe) tussenliggende poelen mogelijkwerwijs gekoloniseerd zijn of worden, is het aannemelijk dat de onderlinge isolatie van de vier kernclusters (Roeterinksbroek, Teeselinkven, Vildersveen en Waterster) minder zal worden en de genetische diversiteit in elke poel zal toenemen. Met name rond Vildersveen en Teeselinkven zijn de populatieaantallen aan het toenemen en worden nieuwe poelen gekoloniseerd. Verbindingen tussen deze twee gebieden via Roeterinksbroek en de Waterster kunnen dit proces nog verder versterken. Vooral voor de Waterster en omgeving, die zeer geïsoleerd lijkt te liggen, is het van belang dat de uitbreiding van de boomkikker ook in de directe omgeving van deze poel plaatsvindt. In figuur 11 zijn indicatieve zones aangegeven, waar de aanleg van nieuw leefgebied zich met voorrang op zou dienen te richten. De optimale locaties zouden bepaald dienen te worden op basis van een analyse van de doorlaatbaarheid van het landschap, vergelijkbaar met de analyse van Midden-Limburg.

*Aanbeveling: Een analyse van de doorlaatbaarheid van het landschap in de Achterhoek geeft inzicht in de benodigde maatregelen en de beste locaties voor het verbeteren van de ruimtelijke samenhang.*

Het verschil in genetische samenstelling tussen populaties in de Achterhoek is hoogstwaarschijnlijk het gevolg van genetische drift in kleine populaties, en niet van lokale aanpassing. Voor de structuur en het functioneren van de netwerkpopulatie in de Achterhoek is het gebied rond de populatie op de Waterster van groot belang: het is centraal gelegen, en een belangrijke stapsteen.

*Aanbeveling: Om verder verlies van genetische diversiteit te voorkomen zijn maatregelen ter verbetering van de ruimtelijke samenhang met name rond de Waterster van groot belang.*



*Figuur 11 Indicatieve zones waar bij voorrang nieuw leefgebied aangelegd zou dienen te worden om verder verlies van genetische diversiteit te voorkomen.*

### ***Vermijden van inteelt?***

De  $F_{IS}$  – waarde als maat voor inteelt op het populatie-niveau is significant negatief in de Achterhoek en dit wijst erop dat er meer loci heterozygoot aanwezig zijn dan verwacht. Mogelijke oorzaken hiervoor zijn dat dieren niet willekeurig paren maar hun partner uitzoeken op genetische verschillen of dat paringen tussen genetisch meer afwijkende dieren een grotere kans op fertiele eieren geven (inteelt ontwijking en heterozygoten voordeel zoals bijvoorbeeld in Zweden voor zandhagedissen is aangetoond, Olsson et al. 1996). Daarnaast zou migratie van individuen van de ene poel naar de andere poel na het opheffen van het isolement van de poelen kortstondig ook tot een heterozygotie overschot kunnen leiden maar dit is gezien het gehele patroon van genetische variatie niet waarschijnlijk en voor enkele poelen zelfs erg onwaarschijnlijk.

## **5.4 Genetische analyse populatie de Doort**

De  $F_{IS}$  – waarde in de Doort, als maat voor inteelt op populatieniveau, is licht positief maar ook hier zijn een aantal loci met een groot overschot aan heterozygoten wat kan wijzen op vergelijkbare effecten in deze populatie als in de Achterhoek (zie



5.3.3). Twee andere loci laten hier een groot tekort aan heterozygoten zien. Ook zijn de helft van de merkers niet in HW evenwicht. Mochten hier genetische effecten aan ten grondslag liggen dan lijkt het erop dat balancerende selectie op fitness kenmerken via koppeling met microsatelliet merkers kan leiden tot een overschot aan heterozygoten op bepaalde loci terwijl voor andere loci door drift een tekort aan heterozygoten gevonden kan worden.

### ***Genetische diversiteit***

Boomkikkers zijn relatief mobiele amfibieën waarvan verwacht kan worden dat ze snel op landschapsveranderingen reageren. Desondanks zijn er weinig genetische studies gepubliceerd. In Zweedse boomkikkerpopulaties is een zeer lage genetische diversiteit gevonden (Edenhamn et al. 2000), wat mogelijk samenhangt met postglaciale processen van kolonisatie, founder effecten en habitat fragmentatie. Ook vonden ze een correlatie tussen isolatie en levensvatbaarheid van larven, wat kan wijzen op inteeltdepressie in geïsoleerde boomkikkerpopulaties. In een studie van twee geïsoleerde boomkikkerlocaties in Denemarken zijn extreem lage overlevingspercentages gevonden die zijn geïnterpreteerd als zijnde het gevolg van zware inteeltdepressie (zie Edenhamn et al. 2000).

De studie van Edenhamn et al. (2000) is uitgevoerd met allozymen die over het algemeen een lagere allelische variatie laten zien en minder geschikt zijn om populatie genetische structuren te detecteren. Daardoor kunnen de verkregen resultaten niet rechtstreeks met onze resultaten aan Nederlandse populaties worden vergeleken.

Uit schaarse data van microsatelliet merkers in een aantal monsters uit Kroatië (Arens et al 2000) is wel duidelijk dat de genetische diversiteit (in de vorm van aantal allelen) daar veel hoger ligt dan in Nederland. Dit betekent niet ondermeer dat in Nederland veel diversiteit verloren is gegaan. Voor veel soorten worden geografische verschillen in genetische diversiteit door Europa gedetecteerd, waarbij veelal de diversiteit in zuidelijke gebieden zoals in de Balkan (en dus ook Kroatië) hoger is dan in de meer noordelijke gebieden (bijvoorbeeld Garner et al. 2004). Genetische diversiteit in een populatie kan daarom het best vergeleken worden met populaties die uit min of meer dezelfde regio afkomstig zijn en waarvan bij voorkeur bekend is dat de populatie niet te lijden heeft gehad van serieuze bottlenecks en isolatie.

Om een indruk te krijgen van de genetische diversiteit in de Doort kan deze worden vergeleken met die in de Achterhoek. Omdat de waarden voor populatiedifferentiatie in de Achterhoek echter ook duiden op een aanzienlijke isolatie tussen de verschillende clusters die mogelijk ook gepaard is gegaan met verlies aan genetische diversiteit, is ook een vergelijking gemaakt met twee Zwitserse populaties. In deze vergelijking blijkt dat de genetische diversiteit in Doort vergelijkbaar is met de gemiddelde genetische diversiteit van de afzonderlijke populaties in de Achterhoek maar kleiner dan die van de Zwitserse populaties. Zowel in de Achterhoek als in Zwitserland zijn de populaties met elkaar verbonden in een netwerk waardoor de totale beschikbare diversiteit in beide gebieden ten opzichte van de Doort een stuk groter is. Om in Limburg vergelijkbare niveau's te krijgen zijn andere boomkikkerpopulaties in de directe omgeving van de nu bemonsterde poel in de Doort van groot belang (vooral als dit ook oude kernpopulaties betreft). Indien

deze samen met de Doort in een netwerk verbonden kunnen worden, zal dat een hogere genetische diversiteit kunnen opleveren.

*Aanbeveling: Voor het verhogen van de genetische diversiteit is een optimale ruimtelijke samenhang van de Doort met andere populaties in het netwerk van groot belang.*

Op grond van de nu gemeten absolute hoeveelheid diversiteit in de Doort is niet te zeggen of de lagere diversiteit in de Doort nu negatieve effecten heeft op de fitness en daarmee populatie groei. Zulke negatieve effecten kunnen zijn: een verhoogd aantal afwijkingen en sterfte onder larven en juvenielen, en een verlaagde populatie groei. Zulke effecten zijn in de literatuur wel bekend, met name in gevallen van sterke afname van genetische diversiteit (Madsen et al. 1999, Olsson et al. 1996, Vila et al. 2002). Mocht er al genetische diversiteit in de Doort verloren zijn gegaan, dan heeft dit in ieder geval niet zodanige vormen aangenomen dat acute problemen te verwachten zijn.

De sterke reductie van aantallen boomkijkers in Nederland in de afgelopen decennia kan echter wel degelijk hebben geleid tot verlies aan diversiteit. De zeer recente studie naar de genetische diversiteit van boomkikkerpopulaties in Denemarken (Andersen et al. 2004) wijst in deze richting. De genetische diversiteit in de Deense populaties, waarvan geen recente bottleneck bekend is, is vergelijkbaar met de genoemde Zwitserse populaties en dus hoger dan die van de Nederlandse populaties. Bovendien is er bij andere Deense populaties die wel een lagere diversiteit vertonen, ook een lagere fitness aangetoond. De nakomelingen van deze verarmde populaties vertoonden een verhoogde sterfte in de eerste levensfase. Afname in fitness kan zich ook uiten in een verminderd vermogen tot populatiegroei, zelfs onder gunstige omstandigheden. Voorbeelden hiervan zijn bekend, onder meer in wolven (Vila et al. 2002). De genetische diversiteit in deze genetisch verarmde Deense populaties is vergelijkbaar of zelfs hoger dan de genetische diversiteit in Doort of die van de populaties in de Achterhoek. Als we de mogelijke consequenties van verlaagde niveau's van genetische diversiteit zouden doortrekken naar de Nederlandse populaties, dan is herstel van de genetische diversiteit een zeer belangrijke randvoorwaarde voor de duurzame instandhouding van de soort in Nederland. Om vast te stellen of de genetische diversiteit in Nederlandse populaties is afgenomen en hoeveel effect dat heeft op de fitness, moet de relatie tussen genetische diversiteit en fitness-parameters worden bepaald in populaties in Nederland met een verschillende hoeveelheid variatie (inclusief Zeeuws-Vlaanderen en Brabant).

*Aanbeveling: De relatief lage genetische diversiteit van de Nederlandse boomkikkerpopulaties, en de verminderde fitness die is gevonden in Deense populaties, maakt het doen van fitness onderzoek in Nederland gewenst.*

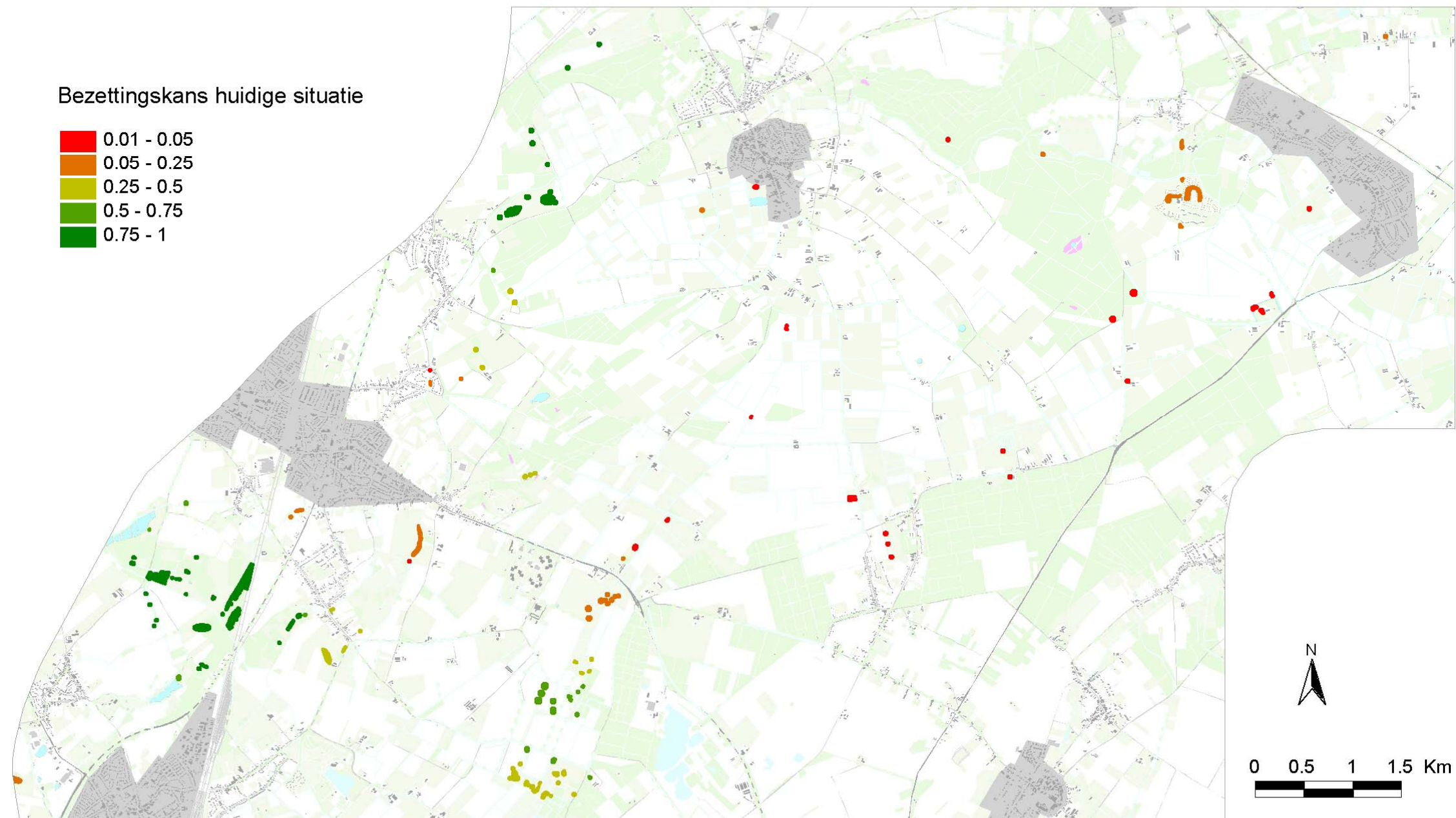
## Literatuur

- Andersen, L. W., Fog, K. & Damgaard, C. 2004. Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proc. R. Soc. Lond.* **271**:1293-1302.
- Arens, P., Van 't Westende, W., Bugter, R., Smulders, M. J. M. & Vosman, B. 2000. Microsatellite markers for the European tree frog *Hyla arborea*. *Molecular Ecology* 10: 1917-1927 **9**:1944-1946.
- Broekmeyer, M. & Steingröver, E. 2001. Handboek robuuste verbindingen, ecologische randvoorwaarden. in (editors), editor. Alterra, Wageningen.
- Crombaghs, B. H. J. M. & Lenders, H. J. R. 2001. Beschermingsplan boomkikker 2001-2005. Expertisecentrum LNV, Rapport Directie Natuurbeheer nr. 42, Wageningen.
- Edenhamn, P., Hoggren, M. & Carlson, A. 2000. Genetic diversity and fitness in peripheral and central populations of the European tree frog *Hyla arborea*. *Hereditas* **133**:115-122.
- Etienne, R. S., Ter Braak, C. J. F. & Vos, C. C. 2004. Application of stochastic patch occupancy models to real metapopulations. Pages 105-132 in I. Hanski, and O. E. Gaggiotti, editors. *Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulations*. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Glandt, D. 2004. Der laubfrosch, ein König sucht sein Reich. Beiheft der Zeitschrift für Feldherpetologie 8, Laurenti verlag, Bielefeld.
- Groot Bruinderink, G.W.T.A., Kuiters, A.T. & Lammertsma, D.R., 2002. Programmeringsstudie onderzoek soortbeschermingsplannen. Alterra-rapport 524, Wageningen.
- Garner, T. W. J., Pearman, P. B. & Angelone, S. 2004. Genetic diversity across a vertebrate species' range: a test of the central-peripheral hypothesis. *Molecular Ecology* **13**:1047-1053.
- Gelder, J. J. van 1973. A quantitative approach to the mortality resulting from traffic in a population of *Bufo bufo* L. *Oecologia (Berl.)* **13**:93-95.
- Hels, T. & Buchwald, E. 2001. The effect of road kills on amphibian populations. *Biological Conservation* **99**:331-340.
- IKL 2003. Concept Actieprogramma boomkikker Limburg. Stichting Instandhouding Kleine Landschapselementen in Limburg, Roermond.
- Madsen, T., Shine, R., Olsson, M. & Wittzell, H. 1999. Restoration of an inbred adder population. *Nature* **402**:34-35.
- Olsson, M., Gullberg, A. & Tegelstrom, H. 1996. Malformed offspring, sibling matings, and selection against inbreeding in the sand lizard (*Lacerta agilis*). *Journal of Evolutionary Biology* **9**:229-242.
- Ray, N., Lehmann, A. & Joly, P. 2002. Modelling spatial distribution of amphibian populations: a GIS approach based on habitat matrix permeability. *Biodiversity and Conservation* **11**:2143-2165.
- Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankare, M., Vikman, P., Fortelius, W. & Hanski, I. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* **392**:491-494.

- Verboom, J., Foppen, R., Chardon, P., Opdam, P. & Luttikhuisen, P. 2001. Introducing the key patch approach for habitat networks with persistent populations: an example for marshland birds. *Biological Conservation* **100**:89-101.
- Vila, C., Sundqvist, A. K., Flagstad, Ø., Seddon, J., Björnerfeldt, S., Kojola, I., Casulli, A., Sand, H., Wabakken, P. & Ellegren, H. 2002. Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proc. R. Soc. Lond.* **270**:91-97.
- Vos, C. C. 1999. A frog's-eye view of the landscape; quantifying connectivity for fragmented amphibian populations. Ph.D. Thesis Wageningen University. Also published as IBN Scientific Contributions 18. DLO Institute for Forestry and Nature Research, Wageningen. 144 pp.
- Vos, C. C. & Chardon, J. P. 1994. Herpetofauna en verkeerswegen; een literatuurstudie. Rijkswaterstaat, Dienst Weg- en Waterbouwkunde, Project versnippering deel 24 pp 104.
- Vos, C. C., & Stumpel, A. H. P. 1996. Comparison of habitat-isolation parameters in relation to fragmented distribution patterns in the tree frog (*Hyla arborea*). *Landscape Ecology* **11**:203-214.
- Vos, C. C., Ter Braak, C. J. F. & Nieuwenhuizen, W. 2000. Incidence function modelling and conservation of the tree frog *Hyla arborea* in the Netherlands. *Ecological Bulletins* **48**:165-180.
- Waterschap Roer en Overmaas 2004. Waterbeheersplan Roer en Overmaas 2004-2007.

## Bijlagen

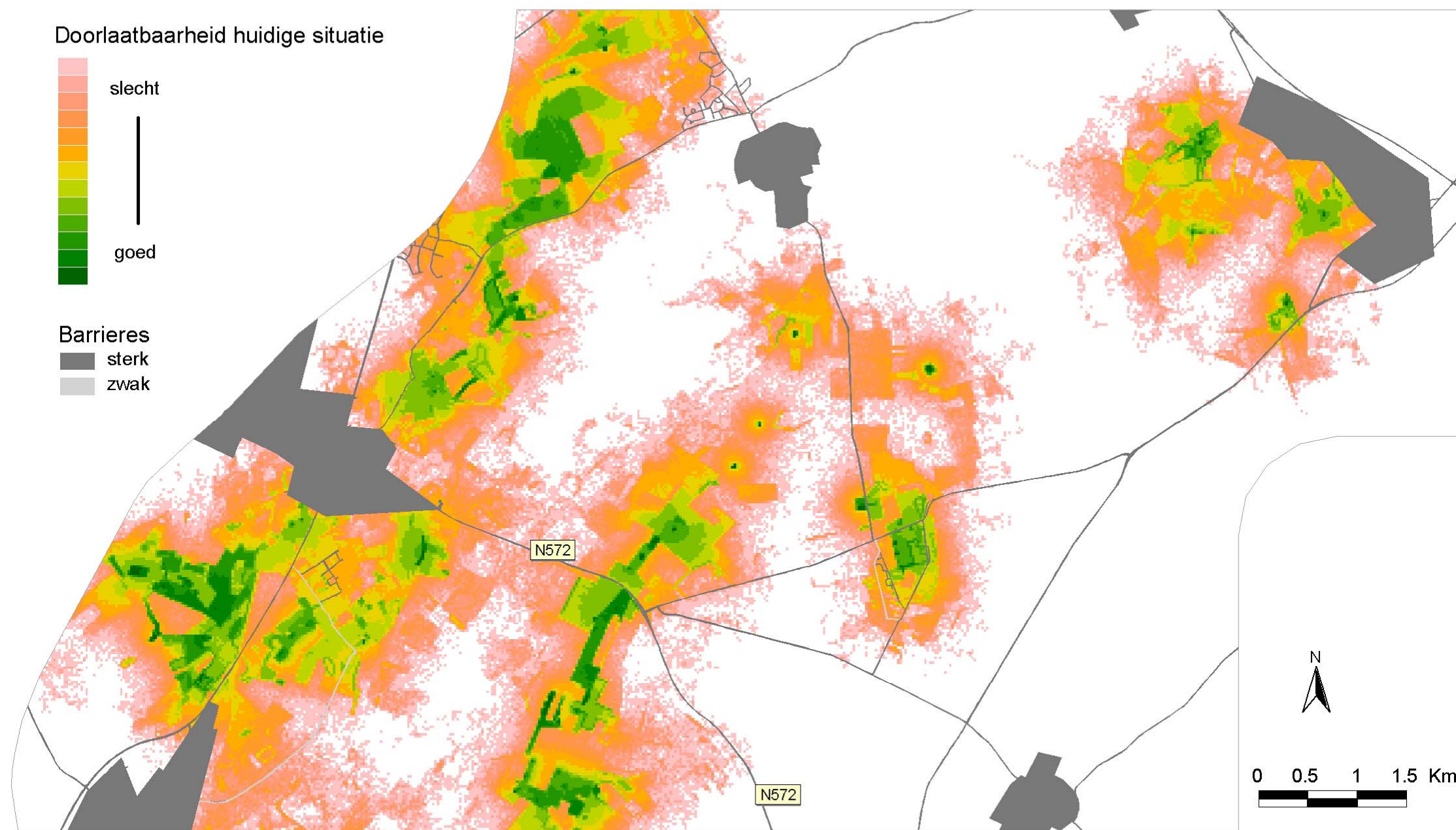




*Figuur 2 Voorspelde bezettingskans van de voortplantingswateren van de boomkikker in Midden-Limburg in de huidige situatie.*



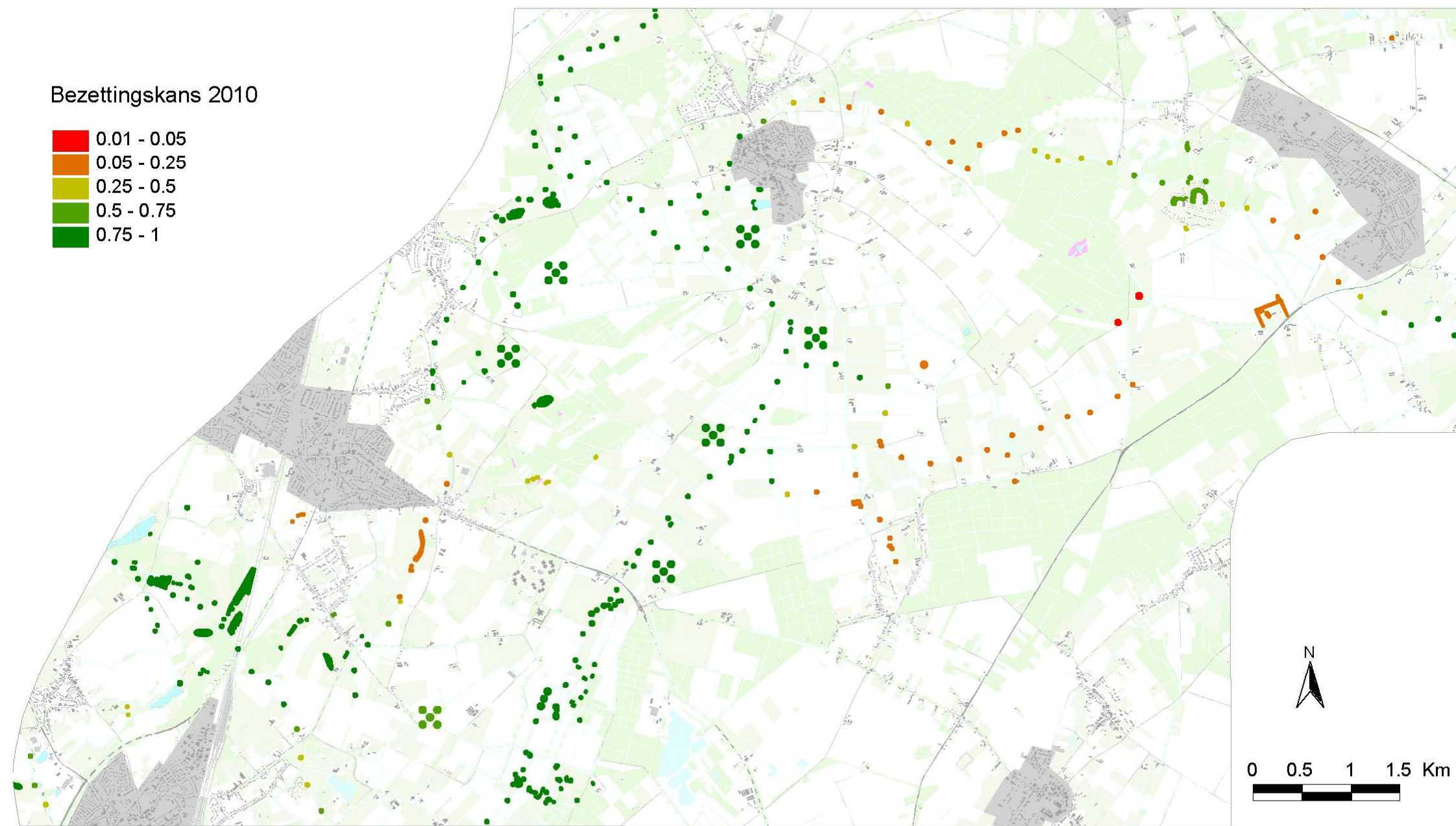




*Figuur 3 Voorspelde doorlaatbaarheid van het landschap in Midden-Limburg in de huidige situatie. De ruimtelijke samenhang varieert van hoog (groen) tot laag (oranje). In de witte gebieden is geen samenhang.*



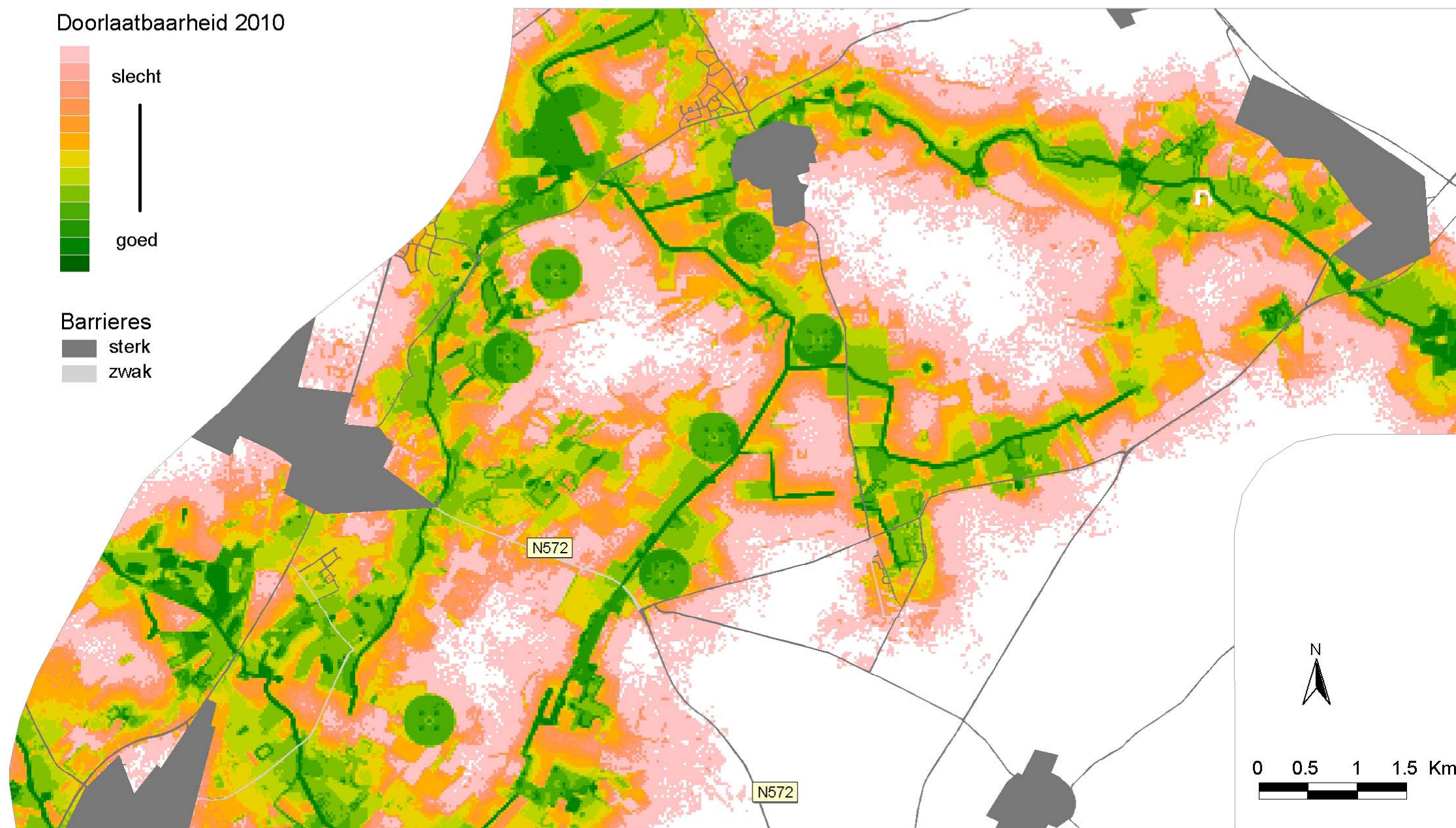




*Figuur 4 Voorspelde bezettingskans van de voortplantingswateren van de boomkikker in Midden-Limburg in het scenario voor 2010.*







*Figuur 5 Voorspelde doorlaatbaarheid van het landschap in Midden-Limburg in het scenario voor 2010. De ruimtelijke samenhang varieert van hoog (groen) tot laag (oranje). In de witte gebieden is geen samenhang.*