Vlaanderen
is wetenschap

Innovatieve methodes voor natuurbeheer: moleculair genetische technieken voor soortenbescherming en -beheer

An Vanden Broeck, Karen Cox

INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK

Auteurs:
An Vanden Broeck, Karen Cox
Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) is het Vlaams onderzoeks- en kenniscentrum voor natuur en het duurzame beheer en gebruik ervan. Het INBO verricht onderzoek en levert kennis aan al wie het beleid voorbereidt, uitvoert of erin geïnteresseerd is.

Vestiging:
INBO Geraardsbergen
Gaverstraat 4, 9500 Geraardsbergen
www.inbo.be

e-mail:
an.vandenbroeck@inbo.be

Wijze van citeren:
Vanden Broeck A., Cox K. (2017). Innovatieve methodes voor natuurbeheer: moleculair genetische technieken voor soortenbescherming en -beheer. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2017 (46). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
DOI: doi.org/10.21436/inbor.13847334.

D/2017/3241/369
Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2017 (46)
ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:
Maurice Hoffmann

Foto cover:
Het nemen van een bladstaal van boskers voor genetisch onderzoek.

© 2017, Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Innovatieve methodes voor natuurbeheer: moleculair genetische technieken voor soortenbescherming en -beheer

An Vanden Broeck en Karen Cox

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2017 (46)

Voorwoord

Het vakgebied van de moleculaire genetica ontwikkelt heel erg snel en vele toepassingen oorspronkelijk ontworpen voor de menselijke geneeskunde en erfelijkheidsleer, kennen eveneens hun toepassingen in de ecologie. Het DNA-molecule is immers universeel en van eenzelfde opbouw voor alle levende organismen. Dit rapport bundelt enkele bevindingen uit de literatuur en uit eigen onderzoek over de toepassingen van de moleculaire genetica in het natuurbehoud en –beheer, meer bepaald in soortenbescherming en populatie-ecologisch onderzoek. Via dit rapport willen we de toepassingen van genetische technieken toelichten en het gebruik ervan binnen het Vlaams natuurbeleid stimuleren. We bedanken hierbij Joachim Mergeay voor waardevolle suggesties en aanvullingen op een eerdere versie van dit rapport.

Samenvatting

Soortenbescherming vormt één van de belangrijkste pijlers van het Vlaams natuurbeleid. Zo werkt Vlaanderen mee aan het behoud en de bescherming van de Europees beschermde soorten. Daarnaast is er ook aandacht voor soorten die in Vlaanderen prioritaire bescherming genieten maar die niet in het Europees kader gevat zijn. Om soorten te behouden en te beschermen worden, onder andere, soortbeschermingsplannen opgesteld, ecoducten aangelegd en kweekprogramma's opgestart voor herintroducties. Al deze maatregelen hebben als doel ervoor te zorgen dat populaties worden beschermd en soorten binnen Vlaanderen in een gunstige staat verkeren. Het bepalen van de toestand van een populatie is niet altijd eenvoudig en wordt momenteel meestal uitgevoerd via tellingen van individuen in het veld. Ook is het niet steeds duidelijk welke bezette leefgebieden samen een populatie vormen; hoe een populatie ruimtelijk kan worden afgebakend en over welke afstanden individuen van te beschermen soorten zich spontaan kunnen verplaatsen. De efficiëntie van beheersmaatregelen, zoals bijvoorbeeld de effectiviteit van ecoducten, is niet steeds eenvoudig te bepalen met conventionele methoden als cameravallen en sporenonderzoek.

In dit rapport tonen we aan hoe innovatieve genetische technieken hun toepassing kennen binnen de populatie-ecologie. We kaderen deze toepassingen binnen de Europese biodiversiteitsstrategie en het Vlaamse soortenbeleid. We tonen hierbij aan dat de moleculaire genetica nuttige informatie kan opleveren over het beoordelen van de toestand van een populatie, het opsporen van moeilijk te detecteren soorten en de evaluatie van beheersmaatregelen. Verder tonen we aan hoe genetische monitoringprogramma's o.a. kunnen fungeren als knipperlicht om populaties in problemen vroegtijdig op te sporen. Tenslotte worden enkele methodologische aandachtspunten belicht bij het gebruik van genetische technieken in de beoordeling van de toestand van een populatie, meer specifiek bij het bepalen van de genetische, effectieve populatiegrootte.

English abstract

Species protection is one of the most important pillars of the nature protection policy of the Flemish region (Belgium). This means reaching a favorable conservation status of the species of European importance (species listed in the Birds and Habitats Directives) and other typically Flemish species of conservation importance which are not included in the European framework. Flanders has decided to draw up regional conservation objectives first and to translate them into local-scale objectives subsequently. A series of criteria and indicators like the census population size are used as indicators to define the status of populations. However, defining population boundaries and corresponding census population sizes are not always easy. Genetic techniques can have an added value in this aspect and can help to support the evaluation of the effectiveness of conservation measures.

This report provides examples of the application of innovative genetic techniques in population ecology and species conservation. We show here that molecular genetics can provide useful information to define population boundaries and to assess the conservation status of a population by using genetic parameters like the genetic effective population size, functional connectivity and effective migration. Furthermore, we show how genetic monitoring programs can act as an early warning signal to detect threatened populations at an early stage. Finally, because of its increased use, some methodological points of interest are highlighted concerning the genetic effective population size in the assessment of the conservation status of a population.

Inhoud

1 Doel van dit rapport ... 10

2 Biodiversiteitsstrategie 2020 ... 11

3 Het Vlaamse soortenbeleid ... 11

4 Genetische variatie ... 12

5 Epigenetische variatie ... 15

6 Genetische variatie, lokale adaptatie en klimaatverandering ... 15

7 Genetische technieken voor soortenbescherming ... 16

8 Beoordelen van de toestand van een populatie ... 16

8.1 Genetische monitoringsprogramma's ... 19
8.2 Opsporen van moeilijk te detecteren soorten ... 20
8.3 Evaluatie van beheersmaatregelen ... 21

9 Conclusie ... 23

10 BIJLAGE: Methodologische aandachtspunten bij het schatten van de effectieve populatiegrootte ... 24

10.1 Methodes voor het bepalen van genetische effectieve populatiegrootte ... 24
10.1.1 Single sample methodes en software ... 24
10.1.2 Temporele methodes en software ... 25
10.1.3 Beperkingen en mogelijkheden van huidige methodes ... 26
10.2 Het type en aantal genetische merkers ... 27
10.3 Het aantal en de ruimtelijke spreiding van de stalen ... 28

11 Referenties ... 30

Lijst van figuren

Figuur 1 Potentiële impact van verlies aan genetische variatie bij kleine populaties. 13

Figuur 2 Epigenetische variatie: methylgroepen (Me) binden op het DNA en bepalen zo het aan- en uitschakelen van genen. 15

Figuur 3 Enkele toepassingen van genetische technieken in het ecologisch onderzoek (aangegeven in blauw) en het nut ervan voor het natuurbeheer (aangegeven in groen). 16

Figuur 4 Voorstelling van de invloed van een catastrofale gebeurtenis op de census grootte en de effectieve grootte van een populatie. 17

Figuur 5 Schattingen van N_e (methode: LDN_e (Waples & Do, 2008)) met 95% betrouwbaarheidsinterval (B.I.) (Jacknife over loci) op basis van genetische merkers voor Vlaamse populaties van rugstreeppad, gentiaanblauwtje, blauwe knoop en adder. Populaties waarvoor geen begrensde B.I. bekomen werden, zijn niet opgenomen in de figuur. 19

Figuur 6 Verbreiding tussen deelpopulaties van de metapopulatie in de vallei van de Zwarte Beek voor het gentiaanblauwtje. De blauwe pijlen geven de verbreiding van de individuen weer, met het aantal verbreiders aangegeven op de pijlen. PA: Panoramaduinen, FO: Fonteintje, MA: Matthiashoeve, AWB: Achter De Witte Bergen. 19

Figuur 7 Voorbeelden van menselijke invloed op de verandering van genetische variatie in natuurlijke populaties 20

Figuur 8 Gemiddelde schattingen van N_e berekend met LDNe voor subsets van de SNP-set van gaffelwaterjuffer (A en C) met de bijhorende aantal oneindige schattingen per subset en het aantal onbegrensde betrouwbaarheidsintervallen (B en D). 28

Lijst van foto's

Foto 1 Het nemen van stalen voor genetisch onderzoek kan meestal op een niet-destructieve wijze, zoals hier bij een alpenwatersalamander (Foto INBO). 12

Foto 2 Museumstalen van het gentiaanblauwtje uit de collectie van het KBIN (foto INBO) 14

Foto 3 Een camera kan de aanwezigheid van de otter aantonen. Een otterkeutel bevat DNA dat bruikbaar is voor genetische monitoring (foto INBO) 21

Verklarende woordenlijst

Allel: een variant van een gen of locus.
Allelische rijkdom: het aantal geobserveerde allelen per locus in een populatie.
DNA: desoxyribonucleïnezuur, belangrijkste drager van erfelijke informatie.
Diploid: Een genoom of een cel is diploïd indien de celkern van elk chromosoom twee exemplaren bevat.
Effectieve populatiegrootte: de snelheid waarmee genetische drift inwerkt op de genetische diversiteit van een populatie, maat voor de grootte van de genenpoel.
DNA-barcoding: een methode om organismen toe te wijzen aan een soort aan de hand van de DNA-sequentie op welbepaalde genetische merkers.
Fenotype: het geheel van uiterlijke kenmerken van een individu.
Genetische drift: verlies van genetische diversiteit door toeval.
Genotype: het erfelijk materiaal van een individu.
Genetische merker: DNA-fragment (locus) waarop variatie wordt getypeerd binnen en tussen populaties.
Genmigratie: genenuitwisseling, het proces waarbij populaties genetisch materiaal met elkaar uitwisselen. Dit kan gebeuren via rechtstreekse uitwisseling van individuen (migratie), maar ook via zaden, sporen, stuifmeel of andere niet-autonome dragers van genetische informatie.
Hardy-Weinberg veronderstellingen: theorema van Hardy-Weinberg veronderstelt dat; de voortplanting in de populatie louter willekeurig gebeurt, er enkel seksuele voortplanting is, er geen natuurlijke selectie is, er geen genetische drift is, er geen genenuitwisseling is en de effectieve populatiegrootte oneindig is. In de populatiegenetica vormt dit het nul-model. Afwijkingen van de verwachte distributie van allelen op loci binnen individuen, binnen populaties en tussen populaties laten toe om inferenties te maken over voortplantingswijze, selectie, drift, genmigratie en populatiegrootte.
Homozygoot: een locus komt voor in de vorm van twee identieke allelen bij diploïde organismen.
Heterozygoot: een locus komt voor in de vorm van twee verschillende allelen bij diploïde organismen.
Inteelt: het kruisen van verwante individuen binnen een populatie.
Inteeltdepressie: een afname van vruchtbaarheid en / of vitaliteit van nakomelingen als gevolg van inteelt. Inteeltdepressie ontstaat door het tot uiting komen van ongunstige allelen in homozygote toestand.
Metapopulatie: een verzameling van deelpopulaties die verbonden zijn via genenuitwisseling en/of genmigratie.
Mutatie: verandering in het erfelijke materiaal van een organisme.
Neutrale merker: DNA-fragment dat niet onderhevig is aan natuurlijke selectie, waardoor veranderingen in de frequentie van dat allel enkel toe te schrijven zijn aan genetische drift, genmigratie en mutatie.
Functionele merker: DNA-fragment onderhevig aan natuurlijke selectie.
Populatie: een groep organismen van dezelfde soort die (in min of meerdere mate) in tijd of ruimte gescheiden zijn van andere individuen van die soort.
Vegetatieve voortplanting: ongeslachtelijke voortplanting, bij planten bijv. via het afscheuren van een deel van de plant en (wortel)uitlopers.
Verbreiden: verspreiden. Individuen verbreiden tussen leefgebieden en worden dan migranten genoemd.

1 Doel van dit rapport

Moleculaire genetische technieken zijn een onderschat werkinstrument in het natuurbeheer. Het erfelijk materiaal van een organisme, het DNA, is een rijke bron van informatie. Deze informatie biedt heel veel nuttige toepassingen voor het natuurbeheer die tot nu toe onderbenut worden in het Vlaamse natuurbeleid. In dit rapport situeren we het belang van genetische variatie als essentieel onderdeel van de biodiversiteit en lichten we enkele van de vele toepassingen toe die de genetica het soortenbeheer te bieden heeft.

Het vakgebied van de moleculaire ecologie kent sinds eind jaren 1980 een enorme expansie en nieuwe genetische technieken worden met de regelmaat van de klok ontwikkeld. Wereldwijd verrichten wetenschappers onderzoek naar de toepassingen van moleculaire technieken binnen de ecologie. Dit rapport heeft niet tot doel een overzicht te geven van al de verschillende mogelijke toepassingen. Wel willen we aan de hand van een aantal praktische voorbeelden de relevantie ervan toelichten voor een wetenschappelijk gefundeerd Vlaams natuurbeleid. Meer specifiek willen we hier toelichten hoe de recente ontwikkelingen in de moleculaire genetica kunnen bijdragen aan een efficiënte monitoring van populaties en soorten in Vlaanderen. Genetische monitoring kan immers nuttige informatie aanleveren als ondersteuning voor de rapportering van het Europese Natura 2000-netwerk (Lokale Staat Van Instandhouding) en ook voor de opvolging van niet-Natura 2000 soorten zoals Rode Lijst-soorten en invasieve exoten zoals vermeld in het Soortenbesluit. Dergelijke informatie kan eveneens helpen bij de opmaak van een passende beoordeling waarbij de invloed van een bepaalde milieudruk op de staat van instandhouding van populaties wordt geëvalueerd. Verder kunnen genetische technieken ingezet worden om bepaalde problemen op te sporen in populaties die het schijnbaar goed doen op het terrein maar toch onder druk staan. In dit rapport geven we aan hoe genetische technieken beter kunnen benut worden voor een efficiënt natuurbehoud. De toepassingen van eDNA of omgevings-DNA in het natuurbehoud worden hier niet behandeld, hiervoor verwijzen we naar Brys et al. (2016).

2 Biodiversiteitsstrategie 2020

In 2011 keurde de Europese commissie de biodiversiteitstrategie 2020. Deze strategie omvat een gemeenschappelijk uitvoeringskader waarbinnen de Europese Commissie en de lidstaten zich engageren om zes specifieke streefdoelen te realiseren. Het eerste streefdoel is de uitvoering van de Habitat- en Vogelrichtlijn. Daartoe dient de achteruitgang van alle onder de Europese natuurwetgeving vallende soorten en habitats, de zogenaamde Natura 2000-soorten- en habitats, te stoppen. Bovendien dient een aanzienlijke en meetbare verbetering van de toestand van deze soorten en habitats, in vergelijking met de huidige toestand, te worden gerealiseerd tegen 2020. De evaluatie van de toestand van deze Europees beschermde soorten en habitats wordt bepaald door instandhoudingsdoelen (IHD).

De EU verplicht de lidstaten om de staat van instandhouding binnen hun grondgebied op te volgen en zes-jaarlijks te rapporteren. De uitvoering van de Habitat- en Vogelrichtlijn gebeurt in Vlaanderen via het 'Decreet betreffende het natuurbehoud en het natuurlijk milieu' (21/10/1997), de wijzigingen aan en de uitvoeringsbesluiten op dit decreet. Binnen België zijn het immers de gewesten die elk op hun grondgebied verantwoordelijk zijn voor het bereiken van de gunstige staat van instandhouding die vanuit de Europese Commissie geëist wordt.

3 Het Vlaamse soortenbeleid

Een aantal lidstaten, waaronder België, hebben een instrumentarium ontwikkeld waarmee de staat van instandhouding van alle onder de Europese natuurwetgeving vallende soorten lokaal bepaald kan worden, de zogenaamde ***Lokale Staat Van Instandhouding*** of LSVI. Het doel van dit instrumentarium is het beoordelen van de toestand van een populatie. Dit gebeurt aan de hand van twee criteria die concreet geëvalueerd worden via een aantal meetbare indicatoren: de toestand van de populatie en de toestand van het leefgebied. Dit instrumentarium kan eveneens dienst doen bij: i) de passende beoordeling: betekent de ingreep een inbreuk op het behalen van de gunstige staat van instandhouding?, ii) de beoordeling van de staat van instandhouding op een hoger niveau, zoals de regionale SVI of de beschermingsstatus (Lommaert, in druk.

De Europese Habitatrichtlijn stelt dat de gunstige staat van instandhouding niet enkel op basis van ecologische, maar ook op basis van genetische kenmerken moet bepaald worden (Evans & Arvela, 2011). Niettegenstaande de vele onderzoeksinspanningen voor vele prioritair te beschermen soorten, blijven de criteria die de toestand van een populatie definiëren voor een heel aantal soorten empirisch weinig onderbouwd (Lommaert, in druk). De toestand van een populatie of soort wordt geschat op basis van veldobservaties, tellingen en theoretische modellen (Westra et al., 2016). Zo wordt populatiegrootte doorgaans gekwantificeerd door de geschatte oppervlakte van een populatie, het aantal locaties waar de soort binnen een bepaalde perimeter te vinden is en/of door het aantal getelde individuen. Bij planten wordt de toestand van een populatie beoordeeld op basis van de bedekkingsgraad en of er reproductie waarneembaar is. Mate van connectiviteit wordt bepaald aan de hand van de afstand tussen naburige populaties (met behulp van een vooraf bepaalde grenswaarde). Deze worden vergeleken met waarden van migratie en verbreiding uit de literatuur om de connectiviteit tussen deelpopulaties in te schatten. Ook voor habitatkwaliteit zijn er naast de biotische en abiotische kenmerken landschapskenmerken die in beschouwing genomen worden. Zo moeten er voor bepaalde soorten bepaalde landschapselementen aan- of afwezig zijn, mogen bepaalde afstanden tot voortplantingswateren of zomer- en winterverblijfplaatsen niet overschreden worden, en wordt een minimale grenswaarde gehandhaafd voor de grootte van het aaneengesloten leefgebied.

De beoordeling van de toestand van de populatie alsook van de connectiviteit en habitatkwaliteit is dus grotendeels afhankelijk van wat we rechtstreeks zien op het terrein en van theoretische modellen. Deze inschatting is zeker van waarde, maar is onderhevig aan vele onzekerheden en veronderstellingen. Genetisch onderzoek naar de mate van verbondenheid tussen populaties en de genetische variatie binnen populaties kan bijdragen aan een wetenschappelijk onderbouwde inschatting van de toestand van de prioritair te beschermen soorten in Vlaanderen.

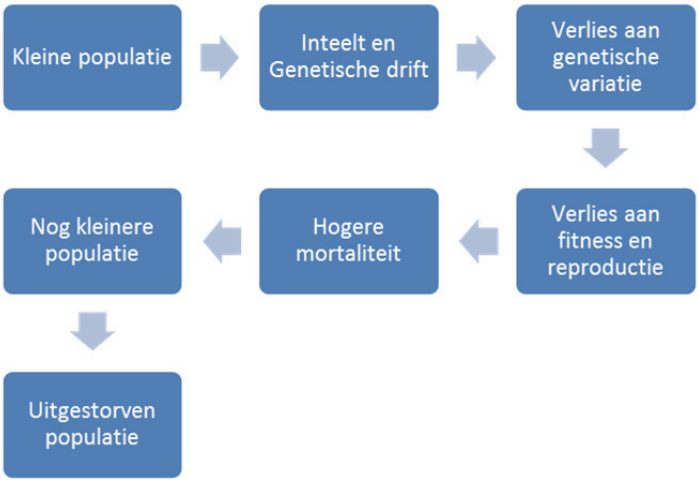
Foto 1 Het nemen van stalen voor genetisch onderzoek kan meestal op een niet-destructieve wijze, zoals hier bij een alpenwatersalamander (Foto INBO).

4 Genetische variatie

Genetische variatie is, naast de verscheidenheid van soorten en ecosystemen, een essentieel onderdeel van de biodiversiteit. Het zit vervat in het DNA van een organisme en is een bron van informatie over het heden en, via het genetisch materiaal van de voorouders, het verleden. De genetische variatie is bepalend voor het aanpassingsvermogen van een soort aan veranderende omstandigheden. Kennis van genetische variatie is daarom van belang om het aanpassingsvermogen van populaties en soorten in te schatten. Verlies aan genetische variatie kan leiden tot inteeltdepressie en uiteindelijk in sommige gevallen zelfs tot uitsterven van populaties en soorten (Figuur 1).

Genetische variatie kan bestudeerd worden op meerdere hiërarchische niveau's; zoals op niveau van een individu, een populatie of een soort. De studie van genetische variatie op niveau van het DNA gebeurt door het bepalen van parameters die de variatie omschrijven, zoals de mate van heterozygositeit of gendiversiteit (H_e), de allelische rijkdom (A_r), de inteeltcoëfficient (F_{IS}) en de effectieve populatiegrootte (N_e). Dit zijn allen maten voor de genetische variatie aanwezig in een (deel)populatie of de grootte van de genenpoel. De meest gebruikte maat is deze van verwachte heterozygositeit (H_e) gedefinieerd door Nei (1973) als de kans dat twee willekeurig gekozen allelen binnen een populatie verschillend zijn. Het is de heterozygositeit die men verwacht indien de populatie zich in Hardy-Weinberg evenwicht (HWE) bevindt. Door afwijkingen op te sporen van de patronen van genetische diversiteit die men verwacht onder HWE op meerdere hiërarchische niveaus en op meerdere loci, is het mogelijk te ontdekken welk proces fundamenteel aan de oorsprong ligt van deze afwijking, zoals migratie, selectie of genetische drift. Zo geeft de inteeltcoëfficiënt (F_{IS}) weer hoe sterk de gemiddelde waarde van de waargenomen heterozygositeit van individuen (H_o), afwijkt van de onder HWE verwachte heterozygositeit (H_e). De waarde van de inteeltcoëfficient geeft zodoende informatie over de mate van inteelt in de beschouwde populatie in de vorige generatie.

Doorgaans wordt het maximaliseren van H_e en / of A_r en dus het minimaliseren van de gemiddelde verwantschap (F_{IS}) als criterium voorgesteld om de genetische diversiteit te bewaren in conservatieprogramma's of in kweekprogramma's van dieren (Caballero & Toro, 2000; Caballero & Toro, 2002). De effectieve populatiegrootte geeft aan hoe sterk de populatie onderhevig is aan genetische drift. Een hoge effectieve populatiegrootte ($N_e \geq 1000$) wijst op een populatiegrootte die voldoende is om toevaleffecten op lange termijn als verwaarloosbaar te beschouwen en die doorgaans een voldoende hoog evolutiepotentieel bezit (Frankham et al., 2014).



Figuur 1 Potentiële impact van verlies aan genetische variatie bij kleine populaties.

Vele studies tonen het verband aan tussen de mate van genetische variatie en de overlevingskansen van individuen of populaties (Frankham, 2005). Voor onder meer klokjesgentiaan (*Gentiana pneumonanthe*) (Oostermeijer et al., 1998), witte rapunzel (*Phyteuma spicatum*) (Kolb, 2005) en purperorchis (*Orchis purpurea*) (Jacquemyn et al., 2007) is genetische verarming vastgesteld in de vorm van een lagere diversiteit van allelen en een hogere graad van homozygositeit in kleine ten opzichte van grote populaties. Verder is aangetoond dat kleine populaties van deze soorten minder vitale zaden en zaailingen voortbrengen, wat wijst op een verminderde fitness. Bij beuk (*Fagus sylvatica*) werd een sterke genetische verarming waargenomen in gefragmenteerde bossen in vergelijking met grote, minder gefragmenteerde bossen. Dit geeft aan dat zelfs windbestuivers, waarbij pollen doorgaans over grote afstanden door de wind gedragen worden, onder habitatfragmentatie kunnen lijden (Jump & Penuelas, 2007).

Sommige soorten bevatten echter van nature uit heel weinig genetische variatie. Dit is bijvoorbeeld het geval voor vele plantensoorten die zich hoofdzakelijk vegetatief vermeerderen via stek of worteldelen en weinig tot geen geslachtelijke voortplanting via zaden kennen. De genetische variatie binnen deze populaties wordt dan weergegeven als het aantal genetisch verschillende individuen of genotypen. Een studie naar de genetische variatie bij drijvende weegbree (*Luronium natans*) in Vlaamse waterpartijen toonde een lage genetische variatie en een hoofdzakelijk vegetatieve vermeerdering aan (Cox et al., 2014a). Uit een studie naar de genetische diversiteit van ruwe olm (*Ulmus glabra*) en veldolm (*U. minor*) in Vlaanderen werd duidelijk dat vegetatieve voortplanting vooral voorkomt bij de veldolm en ook bij de hybride van beide olmensoorten (*Ulmus* x *hollandica*). Klonen (planten met hetzelfde genotype) van olm werden door menselijke invloed over grote afstanden verspreid en aangeplant (Cox et al., 2014b).

Naast de hoeveelheid genetische variatie, is ook de mutatielading, nl. de hoeveelheid recessieve lethale of sublethale mutaties, binnen een populatie van belang. Elk diploïd organisme heeft zijn genetische informatie dubbel: van ieder ouder één volledig kopie van het genoom. Wanneer een organisme twee (doorgaans zeer licht) verschillende kopijen (allelen) draagt van een bepaald locus (gen), is de toestand heterozygoot. Als er twee dezelfde allelen zijn, is de toestand homozygoot. Wanneer een mutatie optreedt in de loop van de evolutie, en deze ervoor zorgt dat het gen niet meer functioneert naar behoren (een recessief allel), heeft een drager van dat recessieve allel vaak geen nadelig effect hiervan, indien er nog een normaal functioneel allel is dat de taken naar behoren kan uitoefenen. Wanneer twee verwanten die datzelfde allel dragen nakomelingen hebben, is een kwart van de nakomelingen homozygoot op het recessieve allel. Er is nu geen functioneel allel meer aanwezig in deze nakomelingen, en de recessieve allelen komen tot uiting in het fenotype. Indien het een zeer belangrijke functie betreft kan een homozygote recessieve toestand dodelijk (lethaal) zijn. Dit fenomeen, het dragen van een aantal recessieve lethale of sublethale mutaties, noemt men de mutatielading (Kimura & Crow, 1964). Bij een sterke daling in census populatiegrootte, kan de mutatielading resulteren in inteeltdepressie.

Of een soort van nature uit al dan niet een lage genetische diversiteit bevat, kan onder meer onderzocht worden via genetische analyse van historische populaties. Collecties in natuurhistorische musea zoals het Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen (KBIN), bevatten een schat aan informatie over de biodiversiteit, waaronder ook de genetische diversiteit van historische populaties die nog maar weinig negatieve menselijke invloed

ondervonden. De studie van museumstalen laat toe om de genetische diversiteit van historische populaties in kaart te brengen en deze te vergelijken met huidige populaties. Op deze manier kan inzicht worden bekomen in de ecologie van soorten en kunnen schadelijke effecten op populaties en soorten, zoals habitatfragmentatie, beter worden beoordeeld. Zo zijn bijvoorbeeld voor de otter (*Lutra lutra*), de Europese hamster (*Cricetus cricetus*) en de korhoen (*Lyrurus tetrix*) op Europese schaal sterke reducties aangetoond in genetische diversiteit ten opzichte van historische populaties. Dit heeft als gevolg dat de huidige populaties genetisch verarmd zijn en weinig aanpassingsvermogen bezitten (Koelewijn, 2011; La Haye et al., 2017; Larsson et al., 2008).

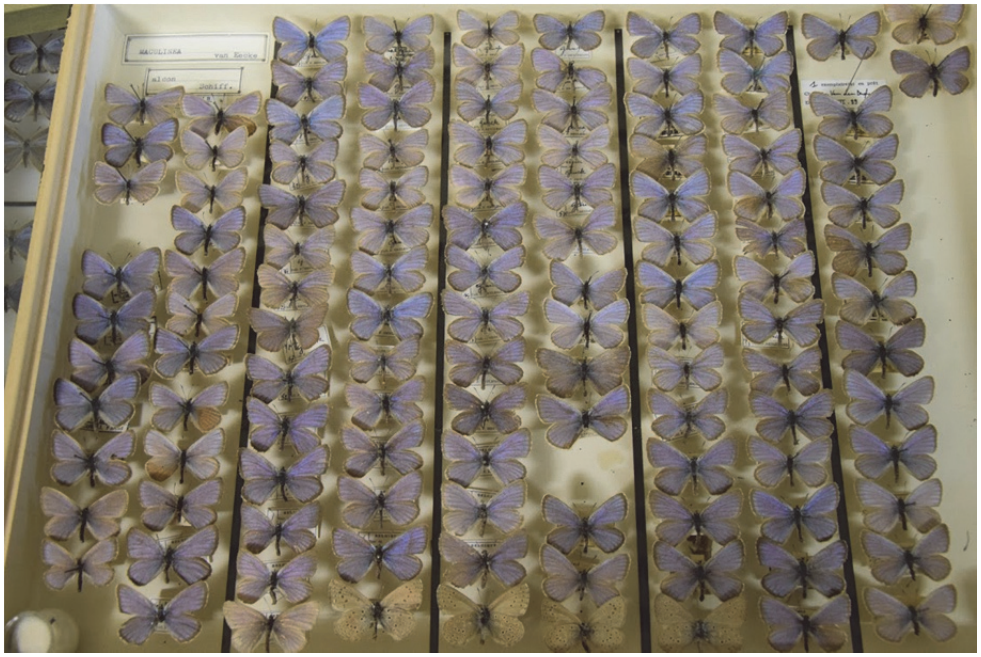
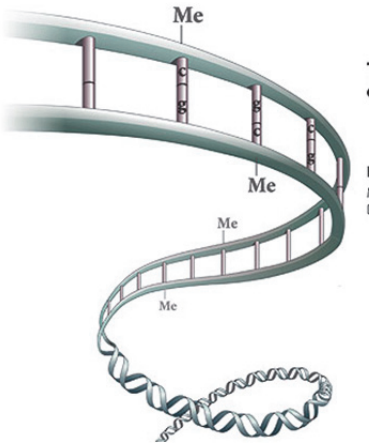


Foto 2 Museumstalen van het gentiaanblauwtje uit de collectie van het KBIN (foto INBO)

5 Epigenetische variatie

Soorten die zich voornamelijk of uitsluitend ongeslachtelijk voortplanten zijn gekenmerkt door een lage genotypische variatie binnen populaties en kunnen toch heel succesvol zijn. De theorie van de klassieke populatiegenetica voorspelt nochtans dat deze soorten of op een evolutionair dood spoor zitten wegens het gebrek aan aanpassingsvermogen en evolutiepotentieel (Verhoeven & Preite, 2014). Nochtans zijn er veel voorbeelden van soorten met uiterst weinig genetische diversiteit die het heel erg goed doen onder verschillende klimaat- of omgevingsomstandigheden, zoals de invasieve plantensoort Japanse duizendknoop (*Fallopia japonica*). Recente bevindingen tonen hier een rol aan van epigenetische variatie in adapatatie en evolutie (Richards et al., 2012).

Epigenetische variatie is overerfbare variatie in de expressie van genen die onafhankelijk is van de genetische code in het DNA (Felsenfeld, 2014). Epigenetische variatie beïnvloedt het aan- of uitschakelen van genen. Dit gebeurt via chemische verbindingen, voornamelijk methylgroepen, die binden op het DNA (Figuur 2). Via het aan-of uitschakelen van genen heeft epigenetische variatie een invloed op het fenotype van een individu. Steeds meer studies tonen aan dat epigenetische variatie kan doorgegeven worden aan opeenvolgende generaties en op die manier ook een rol speelt in het aanpassingsvermogen en evolutiepotentieel van populaties (voor een overzicht zie Richards et al., 2017). Dit is vermoedelijk vooral het geval bij soorten die zich ongeslachtelijk voortplanten en bij lang levende organismen (Gonzalez et al., 2017; Latzel et al., 2016; Verhoeven & Preite, 2014). De studie naar de rol van epigenetische variatie in de ecologie staat nog in de kinderschoenen maar is in volle ontwikkeling.



Figuur 2 Epigenetische variatie: methylgroepen (Me) binden op het DNA en bepalen zo het aan- en uitschakelen van genen.

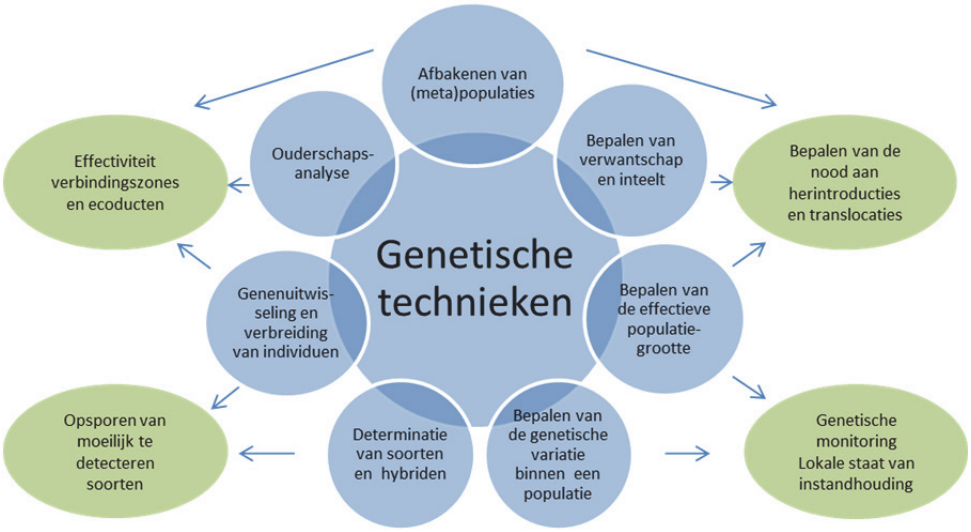
6 Genetische variatie, lokale adaptatie en klimaatverandering

Populaties en individuen zijn in de loop van de geschiedenis aangepast aan de lokale omstandigheden. Deze lokale adaptatie is het gevolg van het feit dat natuurlijke selectie niet overal identiek verloopt en dat lokale populaties kenmerken ontwikkelen die hen voordeel bieden onder de heersende lokale milieu-omstandigheden. Deze kenmerken weerspiegelen zich in de variatie binnen functionele genen die tot uitdrukking komen in het fenotype. Snelle veranderingen in de lokale omstandigheden, zoals bijvoorbeeld een snel veranderend klimaat, kan tot gevolg hebben dat lokale populaties niet meer aangepast zijn aan de nieuwe plaatselijke omstandigheden en zich niet meer in stand kunnen houden. Het aanpassen aan nieuwe omstandigheden vraagt immers tijd om nieuwe genetische variatie te creëren via bijvoorbeeld migratie van genen uit andere populaties. Bij een snel veranderend klimaat met bijvoorbeeld extreme neerslag of droogte, krijgen de soorten de tijd niet om voldoende nieuwe genetische variatie te ontwikkelen. Dat betekent dat soorten minder snel aan nieuwe bedreigingen kunnen weerstaan.

De lokale aanpassing is bijvoorbeeld van belang bij de keuze van bosplantsoen bij bebossingsprojecten. Via moleculaire technieken kan men zoeken naar specifieke genetische eigenschappen (functionele genen) die een belangrijke rol spelen bij lokale adaptatie . De mate van lokale aanpassing op Vlaamse en Europese schaal bij zwarte els en sporkehout werd onderzocht door De Kort et al. (2014). Op basis van deze studie werden de herkomstgebieden van bosbouwkundig teeltmateriaal aangepast.

7 Genetische technieken voor soortenbescherming

De studie naar genetische variatie kent vele toepassingen in het natuurbeheer (Figuur 3) (zie ook: de Groot, 2013; Koelewijn, 2011). Het weergeven van een volledig overzicht van alle mogelijke toepassingen, valt buiten de doelstelling van dit rapport. We focussen hier specifiek op enkele toepassingen die vooral van belang zijn voor soortenbescherming en soortenbeheer.



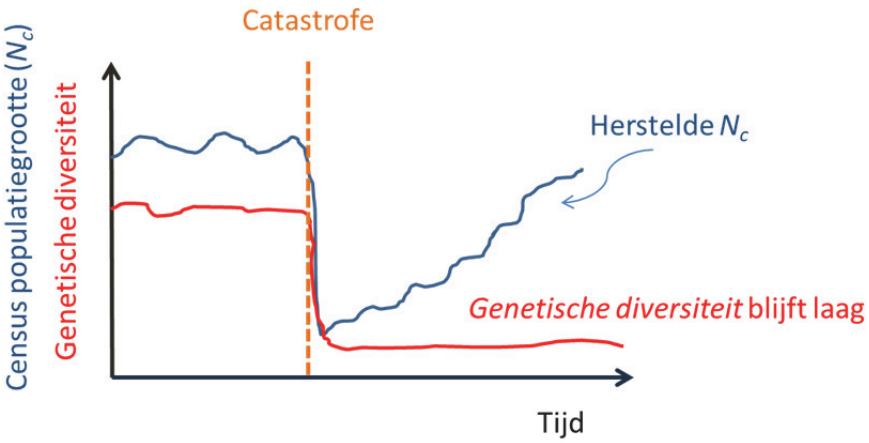
Figuur 3 Enkele toepassingen van genetische technieken in het ecologisch onderzoek (aangegeven in blauw) en het nut ervan voor het natuurbeheer (aangegeven in groen).

8 Beoordelen van de toestand van een populatie

Soortenbescherming is gericht op de evaluatie van de lokale staat van instandhouding (LSVI) en het nemen van maatregelen om populaties te beschermen. De te beschermen populaties dienen in eerste instantie ruimtelijk te worden afgebakend. Het afbakenen van de ruimtelijke grenzen van een populatie of het bepalen van behoudseenheden is echter niet eenvoudig; de mate van isolatie van leefgebieden is op het terrein moeilijk waar te nemen. Genetisch onderzoek kan hiertoe bijdragen via de studie van verwantschap en genenuitwisseling. Naast het beschrijven van de genetische variatie binnen een populatie, kan ook inzicht worden verkregen in belangrijke ecologische processen zoals de verbreiding van individuen en de effectieve verbreiding - i.e. verbreiding in combinatie met succesvolle voortplanting- tussen (deel)populaties. Via een éénmalige steekproef kan men via genetische technieken ook inzicht krijgen in de historiek van de populaties zoals historische verspreidingsroutes (Cottrell et al., 2004), verwantschappen en schommelingen in effectieve populatiegrootte (Cox et al., 2017; Vanden-Broeck et al., 2011; Vanden Broeck, 2014). De methodologische aspecten van het schatten van de effectieve populatiegrootte worden besproken in de bijlage van dit rapport.

In sommige gevallen is ook in relatief grote populaties de genetische diversiteit laag. In langdurig stabiele populaties hebben grote populaties een hogere genetische diversiteit. Echter, wanneer een populatie (historisch) sterke schommelingen heeft ondergaan, is ook daar de genetische diversiteit lager dan verwacht. Een plotse daling van de census populatiegrootte kan optreden door een catastrofale gebeurtenis zoals habitatfragmentatie, extreme klimaatomstandigheden, ziekten en plagen. Een dergelijke gebeurtenis kan dan tot gevolg hebben dat het grootste deel van de genetische variatie verdwijnt. Als de populatie zich later weer uitbreidt, blijft de genetische variatie relatief laag, ook na het herstel van de census populatiegrootte. Men spreekt dan van een genetisch flessenhalseffect (*bottleneck*). Het herstel van de census populatiegrootte is in het geval van een flessenhalseffect afhankelijk van de succesvolle voortplanting van enkele individuen. Een populatie die het schijnbaar goed doet, kan toch onderhevig zijn aan inteelt, bijvoorbeeld wanneer een groot aantal leden van de populatie zeer nauw verwant zijn met elkaar als gevolg van een vorige flessenhals. Dit effect kan vroegtijdig via genetisch onderzoek aan het licht komen. Uit een grote meta-analyse blijkt dat het uitsterven / verdwijnen van populaties doorgaans voorafgegaan

wordt door een verlies van genetische diversiteit (Spielman et al., 2004). Genetische technieken kunnen bijgevolg dienst doen als knipperlichtsignaal voor het opsporen van problemen voordat het te laat is (Laikre et al., 2008).



Figuur 4 Voorstelling van de invloed van een catastrofale gebeurtenis op de census grootte en de effectieve grootte van een populatie.

De ***effectieve populatiegrootte (N_e)*** is een parameter die de verandering in genetische variatie binnen een populatie beschrijft en is een goede maatstaf voor het omschrijven van de totale genenpoel van een populatie. In de wetenschappelijke literatuur wordt de term '*effectieve populatiegrootte'* op verschillende manieren gedefinieerd, afhankelijk van de termijn waarop men de populatie beschouwt en afhankelijk van de relaties tussen deelpopulaties onderling (zie bijlage).

Mergeay et al. (2017) beschrijven ***genetische criteria voor de instandhouding van populaties*** op basis van de effectieve populatiegrootte**.** N_e definieert de grootte van een ideale theoretische populatie volgens het model van Wright-Fisher (dit is conform de Hardy-Weinberg assumpties, maar zonder de veronderstellingen van een oneindig grote populatie en dus de afwezigheid van genetische drift), die evenveel genetische drift ondergaat als de bestudeerde populatie in kwestie. Elke afwijking van het Wright-Fisher-model leidt tot een lagere effectieve populatiegrootte dan de werkelijke (census) populatiegrootte. De effectieve populatiegrootte is dus een maat voor hoe snel een populatie aan genetische diversiteit verliest door toeval. Onder bepaalde simpele scenario's komt de effectieve populatiegrootte overeen met het aantal genetisch verschillende individuen die via geslachtelijke voortplanting de bestudeerde genenpoel tot stand hebben gebracht (in dat geval is N_e = aantal *ouders*). In de meeste gevallen is de effectieve populatiegrootte veel kleiner dan de census populatiegrootte. Belangrijke factoren die hiertoe bijdragen zijn het voorkomen van ongelijke seksratio's, variatie in reproductief succes en een fluctuerende census populatiegrootte.

Bij het bepalen van genetische criteria voor de instandhouding van populaties worden streefwaarden berekend voor de effectieve populatiegrootte waarbij het verwachte verlies aan genetische diversiteit voor de komende honderd jaar wordt beperkt tot 5%. Deze streefwaarde is in functie van de generatieduur van de soort; hoe korter in de tijd de generaties elkaar opvolgen, hoe hoger de effectieve populatiegrootte dient te zijn voor het behoud van 95% genetische variatie over de komende 100 jaar. De berekende streefwaarde wordt dan vermenigvuldigd met tien om de na te streven census populatiegrootte *(N_c)* te bepalen die het behoud van de genetische variatie voor de komende 100 jaar kan garanderen, er van uitgaande dat de census populatiegrootte doorgaans gemiddeld tienmaal hoger ligt dan de effectieve populatiegrootte (maar met aanzienlijke verschillen tussen soorten) (Frankham, 1995). Waar mogelijk, wordt Deze census populatiegrootte vervolgens per soort vertaald naar de grootte van het leefgebied dat hieraan voldoet en bijgevolg dient nagestreefd te worden voor een gunstige staat van instandhouding en een behoud van genetische diversiteit in de toekomst (Mergeay, 2013a). Via deze werkwijze kunnen genetische criteria in rekening worden gebracht bij de LSVI indien de census populatiegrootte kan bepaald worden en indien men populaties en metapopulaties duidelijk kan afbakenen (Mergeay & Vanden Broeck, in druk). Deze theoretische benadering is zeker waardevol voor het bepalen van algemene genetische criteria wanneer, zoals

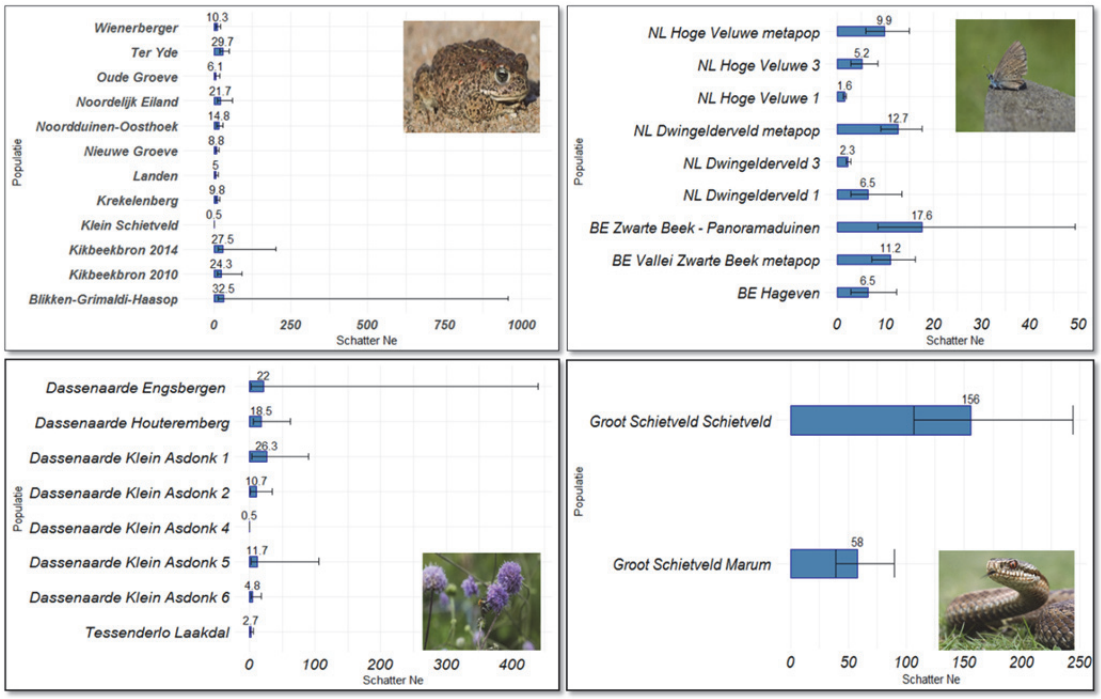
in de meeste gevallen, geen specifieke genetische data van de te beschermen populaties voorhanden zijn. Bij de theoretische benadering zijn wel twee kanttekeningen te maken over de veronderstellingen. Ten eerste kan de verhouding tussen N_c en N_e sterk afwijken van de veronderstelde verhouding (N_c= 10 N_e) tussen soorten en zelfs tussen populaties van eenzelfde soort. De werkelijke waarde is voor de meeste soorten onbekend (Frankham et al., 2014). Een hoog aantal volwassen individuen is niet noodzakelijk recht evenredig met een hoge genetische diversiteit. Wanneer maar enkele individuen participeren aan de voortplanting is de effectieve populatie zeer klein (zie ook figuur 4). Ten tweede, wordt bij het afbakenen van het noodzakelijke leefgebied voor de lokale staat van instandhouding, uitgegaan van algemene, geschatte waarden van verbreidingsafstanden die individuen kunnen afleggen, meestal gebaseerd op data van vangst-hervangst studies. Ook hier stelt zich het probleem dat deze verbreidingsafstanden sterk afhangen van de specifieke landschapsconfiguratie en er voor vele soorten een gebrek is aan wetenschappelijke data en empirische studies die de verbreidingsafstanden bepalen.

Er is nood aan ***empirische genetische studies*** voor het bepalen van de ***effectieve populatiegroottes*** van (meta)populaties. Dergelijke studies werden in een aantal Vlaamse populaties uitgevoerd, o.a. voor rugstreeppad (*Epidalea calamita*)(Cox et al., 2017) , adder (*Vipera berus*) (Geeraerts, 2012), blauwe knoop (*Succisa pratensis*) en in een aantal Vlaamse en Nederlandse populaties van gentiaanblauwtje (*Maculinea alcon*) (Vanden Broeck et al., 2017). Deze genetische studies zijn gebaseerd op één steekproef en kunnen als oorspronkelijk referentiekader dienen voor eventuele toekomstige genetische monitoringsprogramma's. We geven hier kort enkele bevindingen weer, voor meer details over deze studies verwijzen we naar de gepubliceerde rapporten en wetenschappelijke publicaties.

De empirische schatters voor de effectieve populatiegroottes van de onderzochte Vlaamse populaties liggen voor de meeste soorten extreem laag. We bespreken hieronder enkele resultaten waarbij begrensde betrouwbaarheidsintervallen voor de schatters werden bekomen (figuur 5). We merken hierbij wel op dat voor grote populaties en voor hoge geschatte waarden van de effectieve populatiegroottes, doorgaans geen begrensde bovenwaarde voor het betrouwbaarheidsinterval wordt bekomen (zie ook: bijlage). Dit is ook het geval voor sommige Vlaamse populaties van bestudeerde soorten en deze zijn niet opgenomen in figuur 5. Voor een gedetailleerde analyse van de toestand van Vlaamse populaties van een aantal prioritair te beschermen soorten, verwijzen we naar de hogervermelde publicaties.

Voor het gentiaanblauwtje liggen de geschatte waarden voor N_e tussen 1.6 en 17.6. Ook voor populaties blauwe knoop in het Hageland, waar de soort toch nog vrij algemeen voorkomt, liggen de geschatte waarden voor de effectieve populatiegroottes vaak laag (vb. variërende van 0.5 tot 26.3 voor de metapopulatie Dassenaarde (Diest)). Dit is ook het geval voor enkele bestudeerde populaties van rugstreeppad waarvoor heel erg lage waarden worden geschat voor het effectief aantal ouders (gerelateerd aan N_e) (bijv. 5 à 7 in Landen en 6 à 9 in Krekelenberg; (Cox et al., 2015). De effectieve populatiegrootte van adder werd voor het Groot Schietveld geschat op ongeveer 200 individuen. Dit is ongeveer tienmaal minder dan het geschatte aantal adders (census populatiegrootte) op het Groot Schietveld (Geeraerts, 2012). De vaak lage waarden voor geschatte effectieve populatiegroottes wijzen op een hoog risico op verdwijnen van deze populaties. In vele gevallen is de effectieve grootte van de populaties, en het beschikbare leefgebied dat vereist is om voldoende grote metapopulaties te bekomen, te klein om duurzaam voortbestaan mogelijk te maken (bv. Mergeay & Van Hove, 2013). Genetisch onderzoek, en genetische criteria gebaseerd op de noodzakelijke effectieve grootte van populaties, geven duidelijk aan dat vergroten van populaties, via een verbetering van de kwaliteit en grootte van het leefgebied, in vele gevallen noodzakelijk is om populaties op lange termijn te behouden.

De hoger vermelde studies verschaffen ook inzicht in de ***populatiestructuur*** en de mate van ***effectieve verbindingen tussen deelpopulaties***. Voor het gentiaanblauwtje werden verbreidingsafstanden van 3 km waargenomen tussen deelpopulaties van de Vallei van de Zwarte Beek waarbij een bos geen onoverbrugbare landschapselement bleek te zijn (Vanden Broeck et al., 2017) (figuur 5). Met uitzondering van de deelpopulaties van de Vallei van de Zwarte beek die onderling een metapopulatie vormen, zijn alle andere Vlaamse populaties van gentiaanblauwtje (Groot Schietveld, Hageven, Zwart Water) extreem geïsoleerd. Voor rugstreeppad werden verbreidingsafstanden van minimaal 8,5 km (over een gehele generatie) waargenomen tussen Vlaamse kustpopulaties (Cox et al., 2017). Hierdoor is er genenuitwisseling mogelijk van Westhoek naar Ter Yde, maar toch in mindere mate vanuit deze beide subpopulaties naar de intermediair gelegen deelpopulatie in Noordduinen en Oosthoek vanwege het moeilijk te overbruggen, tussenliggend landschap (Cox et al., 2017). De deelpopulaties rugstreeppad die voorkomen in de haven van Linkeroever van Antwerpen zijn daarentegen goed met elkaar verbonden (Cox et al. 2015).



Figuur 5 Schattingen van N_e (methode: LDN_e (Waples & Do, 2008)) met 95% betrouwbaarheidsinterval (B.I.) (Jacknife over loci) op basis van genetische merkers voor Vlaamse populaties van rugstreeppad, gentiaanblauwtje, blauwe knoop en adder. Populaties waarvoor geen begrensde B.I. bekomen werden, zijn niet opgenomen in de figuur.

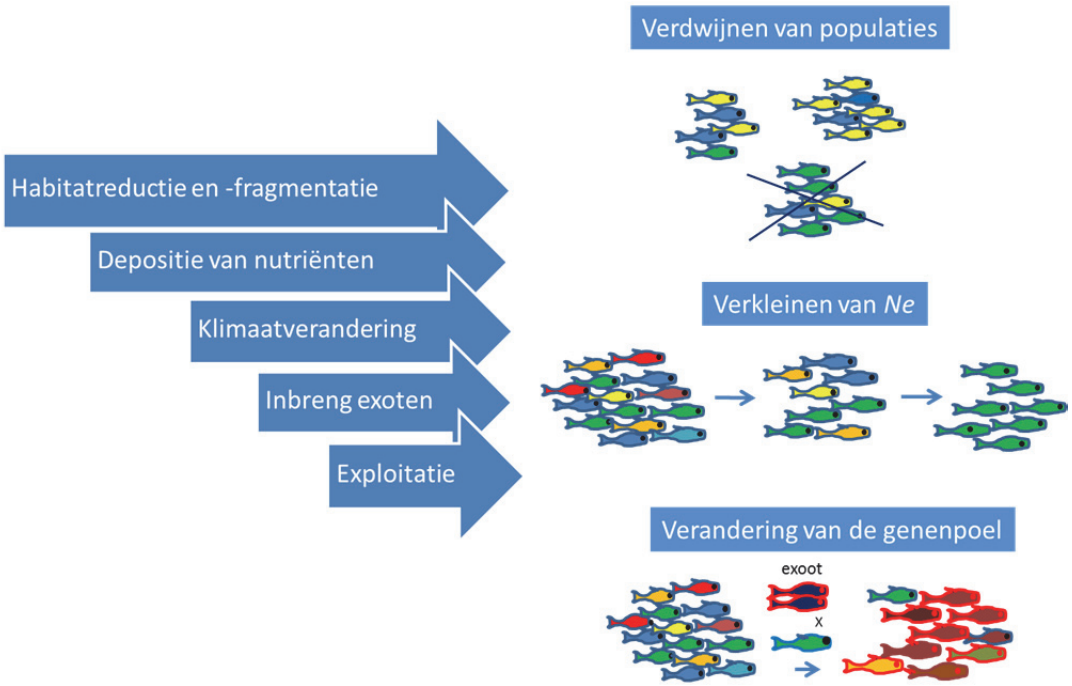
Figuur 6 Verbreiding tussen deelpopulaties van de metapopulatie in de vallei van de Zwarte Beek voor het gentiaanblauwtje. De blauwe pijlen geven de verbreiding van de individuen weer, met het aantal verbreiders aangegeven op de pijlen. PA: Panoramaduinen, FO: Fonteintje, MA: Matthiashoeve, AWB: Achter De Witte Bergen.

8.1 Genetische monitoringsprogramma's

De genetische toestand van een populatie kan geschat worden op basis van één steekproef. Om de leefbaarheid en kwetsbaarheid van populaties in kaart te kunnen brengen, zijn vooral trends op lange termijn van belang. Voor een efficiënte en effectieve soortenbescherming is genetische monitoring, nl. de bemonstering van populaties voor genetisch onderzoek op regelmatige tijdstippen, daarom sterk aan te raden. Dit wordt ook voorgeschreven door de Europese Habitatrichtlijn die stelt dat de staat van instandhouding van een aantal Europees beschermde soorten (nl. de Natura 2000-soorten) dient te worden gemonitord. Genetische monitoring levert informatie over ***spatiale en temporele aspecten van genetische variatie*** en de processen die deze variatie beïnvloeden.

Genetische monitoring is een methode om natuurlijke schommelingen in genetische variatie binnen soorten en populaties te kunnen onderscheiden van veranderingen als gevolg van menselijke impact. Verlies of versnippering van het leefgebied, stikstofdepositie, klimaatverandering en inbreng van exotische, uitheemse soorten die kruisen

met verwante inheemse soorten, zijn enkele voorbeelden van de menselijke impact met veelal nefaste gevolgen voor het behoud van genetische variatie. Deze invloeden veranderen ook de samenstelling van de genenpoel, meestal in negatieve zin, en bijgevolg ook het evolutiepotentieel en het aanpassingsvermogen van de soort (figuur 7). Genetische monitoring brengt inzicht in de leefbaarheid van populaties en helpt eveneens de impact van de processen die deze leefbaarheid beïnvloeden, in kaart te brengen.



Figuur 7 Voorbeelden van menselijke invloed op de verandering van genetische variatie in natuurlijke populaties

Genetische monitoring naar de toestand van prioritair te beschermen soorten wordt in Vlaanderen nog niet standaard toegepast. Opstarten van genetische monitoring gebeurt het best via een doordachte keuze van soorten en populaties. Niet alle soorten zijn even eenvoudig te bemonsteren voor genetisch onderzoek. De soorten waarbij DNA-stalen kunnen worden verzameld op een niet-destructieve wijze verdienen de voorkeur voor genetische monitoring. Bij de meeste amfibieën en reptielen levert het wegnemen van een stukje van de slijmlaag op de huid, een speeksel- of cloaca staal met een daartoe bestemd wattenstokje (*swab*-staal) in de meeste gevallen voldoende DNA voor genetisch onderzoek. Bij vlinders volstaat doorgaans een klein vleugelstukje ter grootte van enkele millimeters als DNA-staal waarbij de vlinder geen blijvende nadelige gevolgen ondervindt. Planten worden bemonsterd via een stukje bladweefsel en ondervinden hier uiteraard eveneens geen nadelige effecten van. Bij zoogdieren voldoet een klein weefselstukje zoals bijvoorbeeld een haarwortel of een bloedstaal. Ook verkeersslachtoffers van bijvoorbeeld zoogdieren of insecten kunnen aan genetisch onderzoek worden onderworpen. De tijdsperiode tussen verschillende steekproeven is afhankelijk van de generatietijd van de soort. Om trends te bestuderen in bijvoorbeeld de effectieve populatiegrootte wordt aangeraden om 5 generaties tijd te laten tussen twee opeenvolgende steekproeven (Tallmon et al., 2010). Het is daarbij uiteraard sterk aan te bevelen om de tijdsperiodes tussen verschillende steekproeven niet te groot te maken om zo tijdig geschikte beheersmaatregelen te kunnen voorstellen (zie ook: bijlage).

8.2 Opsporen van moeilijk te detecteren soorten

Sommige prioritair te beschermen Vlaamse soorten leven een verborgen bestaan en zijn heel moeilijk waar te nemen. Dit is onder meer het geval voor de otter (*Lutra Lutra*), gladde slang (*Coronella austriaca*), adder (*Vipera berus*), 13 bedreigde soorten vleermuizen en recent ook de wolf (*Canis lupus*). Ook voor deze soorten is een efficiënte monitoring van groot belang in het kader van de Europese Habitatrichtlijn die strikte regels oplegt voor de bescherming en het behoud van deze soorten. De waarneming en monitoring volgens traditionele methoden als fotovallen, sporenonderzoek, zenders, vangsten of zichtwaarnemingen is niet steeds eenvoudig en arbeidsintensief. Vooral dieren met een groot leefgebied of nachtdieren zijn heel moeilijk met deze traditionele methoden te

monitoren. Genetisch onderzoek kan ook hier een zinvolle bijdrage leveren. Genetische technieken vereisten aanvankelijk doorgaans veel en zuiver DNA, maar zijn inmiddels zo verfijnd dat voldoende zuiver DNA kan worden verkregen uit bijvoorbeeld haren van dieren, eischalen en uitwerpselen. Dit materiaal kan in het veld worden verzameld zonder dieren te storen of te vangen. Naast het detecteren van de aanwezigheid van bepaalde soorten via de DNA-barcoding-techniek waarbij kleine, soort-specifieke DNA fragmenten worden gebruikt om soorten te benoemen (zie Brys et al., 2016), kan DNA in vele gevallen ook gebruikt worden voor individuele herkenning. Via deze indirecte manier van waarnemen kan een beeld van de genetische status van een populatie worden verkregen en ook een schatting van het minimum aantal aanwezige dieren of eventuele verwantschap tussen individuen (Koelewijn, 2011). In Nederland wordt de otterpopulatie jaarlijks genetisch gemonitord, na een herintroductie met otters uit Oost-Europa in 2002. Deze monitoring is gebaseerd op DNA-profielen op basis van DNA geïsoleerd uit verse uitwerpselen van otters. Dit maakt het mogelijk veranderingen in de ruimtelijke verspreiding en de populatieomvang van jaar tot jaar te volgen (Kuiters, 2016).

Foto 3 Een camera kan de aanwezigheid van de otter aantonen. Een otterkeutel bevat DNA dat bruikbaar is voor genetische monitoring (foto INBO)

8.3 Evaluatie van beheersmaatregelen

Door versnippering en verlies van natuurlijke leefgebieden, gebeurt de kolonisatie van nieuw of hersteld leefgebied in vele gevallen niet meer spontaan. De leefgebieden zijn meestal verder van elkaar gelegen dan de afstand die kan worden overbrugd door verbreiding. Bovendien zijn de resterende populaties van de meeste te beschermen soorten te klein om voldoende verbreiders te leveren die de verbinding tussen de (potentiële) leefgebieden verzekeren. Natuurlijke leefgebieden zijn hierdoor in vele gevallen niet met elkaar verbonden en spontane kolonisatie van potentiële leefgebieden blijft meestal uit (Mergeay, 2017).

Herintroducties, translocaties of bij plaatsingen kunnen een belangrijke beheersmaatregel zijn in soortenbeschermingsprogramma's. Ze kunnen helpen om de genetische diversiteit en dus ook de leefbaarheid van (meta)populaties te verhogen in afwachting van de realisatie van grotere leefgebieden of van nieuwe leefgebieden als stapstenen tussen bestaande (Mergeay, 2017). In Vlaanderen worden (al dan niet regionale) herintroducties overwogen of reeds uitgevoerd voor onder andere: rugstreeppad, knoflookpad, grote modderkruiper, rivierdonderpad, kwabaal, beekforel, Europese hamster, bever, grote tijm, en groenknolorchis. Meestal gaat het om het opnieuw inbrengen van een soort op plaatsen waar het leefgebied is hersteld en waar de soort vroeger spontaan voorkwam.

Kweek- en uitzetprogramma's worden steeds meer overwogen om via herintroducties of bij plaatsingen soorten naar een gunstige staat van instandhouding te brengen. Dit dient wetenschappelijk gefundeerd en weloverwogen te zijn (IUCN/SSC, 2013). Belangrijke vragen die zich hierbij stellen zijn onder meer :i) welke populaties zijn geschikt als bronpopulatie? ii) hoeveel dieren dienen te worden bijgeplaatst of te worden geïntroduceerd? Genetisch onderzoek kan hier een sleutelrol spelen enerzijds bij het bepalen van de meest geschikte bronpopulaties via de studie naar (historische) verwantschap tussen populaties en anderzijds bij de optimalisatie van de genetische variatie bij de ouderdieren in kweekprogramma's (Mergeay & De Meester, 2010). Bij bij plaatsingen en herintroducties is het aan

te raden de dieren vooraf genetisch te screenen wat achteraf toelaat de slaagkans van deze beheersmaatregel te evalueren en de gevolgen ervan voor de leefbaarheid van de populaties in te schatten.

Verbindingszones zoals ***ecoducten*** worden aangelegd om de leefgebieden van soorten terug met elkaar te verbinden, nadat ze door bijvoorbeeld een weg werden gescheiden, en om genenuitwisseling te bevorderen. De aanleg van een ecoduct is duur (bijna 5 miljoen euro voor het Kikbeekecoduct over de E314 in Opgrimbie, voltooid in 2006). Het is dan ook belangrijk dat er zekerheid bestaat dat ecoducten en andere verbindingsmaatregelen de functie vervullen waarvoor ze zijn aangelegd, namelijk de leefbaarheid van de populaties verhogen die door de aanleg van een weg werden gefragmenteerd (Honnay, 2010). Via een empirische genetische studie kan men nagaan of en in welke mate een ecoduct of verbindingszone een effectieve maatregel is om leefgebieden functioneel met elkaar te verbinden. Een genetische studie op enkele doelsoorten in het gebied in de periode voor de aanleg van het ecoduct (als referentietoestand) en een genetische monitoring na de constructie van het ecoduct kunnen de effectiviteit van dure infrastructurele projecten als ecoducten kwantificeren (Mergeay, 2013b)

9 Conclusie

De moleculaire genetica kent vele praktische toepassingen voor het soortenbeleid en –beheer. Vele van deze toepassingen hebben hun nut reeds bewezen en worden sporadisch toegepast bij de evaluatie van soorten en populaties in Vlaanderen. De meeste van deze studies betreft echter een éénmalige steekproef en genetisch onderzoek uitgevoerd op één bepaald tijdstip. Genetische technieken kunnen echter nog meer optimaal worden benut in het Vlaams natuurbeleid voor zowel het bepalen van de toestand van populaties als voor de evaluatie van beheersmaatregelen. Zo kan genetische monitoring van prioritair te beschermen soorten bijdragen tot een nog meer wetenschappelijk onderbouwd soortenbeleid. Bij de opstart van genetische monitoringprogramma's is het belangrijk voldoende aandacht te besteden aan een goed doordachte methodologie zoals de keuze van genetische merkers, frequentie van monitoring en steekproefgrootte.

10 BIJLAGE: Methodologische aandachtspunten bij het schatten van de effectieve populatiegrootte

Bij elke methode zijn er randvoorwaarden of assumpties waaraan moet voldaan worden om tot een betrouwbare schatting te komen. Dit is niet anders bij genetisch onderzoek. In plaats van de aandachtspunten voor elk aspect binnen het populatie-genetisch onderzoek toe te lichten, beperken we ons tot de schattingen van de recente/huidige genetische effectieve populatiegrootte. De jongste jaren is daar veel aandacht binnen het onderzoeksveld aan besteed en nieuwe inzichten en analysemethodes zijn zeker nog in de toekomst te verwachten. Hier bespreken we de belangrijkste aspecten van de huidig belangrijkste methodes.

Er zijn eigenlijk meerdere manieren om N_e te definiëren. De twee meest bekende vormen zijn de inteelt-N_e (N_{eI}) en de variantie-N_e (N_{eV}) (Crow & Denniston, 1988). De eerste vorm wordt gebruikt om de snelheid van het verlies aan heterozygositeit te voorspellen, terwijl de tweede vorm eerder de variantie van de verandering in allelfrequentie over generaties heen weergeeft. N_{eI} is meer afhankelijk van het aantal adulten of het aantal potentiële ouders en N_{eV} van het aantal nakomelingen (Kimura & Crow, 1964). Daarnaast is N_{eV} meer gevoelig voor afnames in populatiegrootte, hoewel N_{eI} en N_{eV} gelijk zijn aan elkaar in een enkele, geïsoleerde populatie met constante grootte (Kimura & Crow, 1964; Schwartz et al., 2007). Zulke populaties komen echter zeer zelden voor in de natuur.

Naast de verschillende theoretische modellen van N_e zijn er ook meerdere methodes om N_e te schatten. Zo heb je methodes die demografische, ecologische data gebruiken, maar het is zeer moeilijk om voldoende data van natuurlijke populaties te verzamelen voor een directe schatting van N_e (Waples, 2005). Daarom zijn methodes op basis van genetische merkers tot stand gekomen. Ze worden ondertussen veelvuldig gebruikt, mede dankzij de snelle vooruitgang in de ontwikkeling van moleculaire technieken. Binnen de set van schatters gebaseerd op genetische data heb je '*single sample'* schatters en temporele schatters. Voor de eerste methode wordt enkel op één bepaald moment in de tijd een bemonstering uitgevoerd en krijg je een benadering van N_{eI}, terwijl voor de temporele methode op meerdere momenten met minimum één generatie ertussen een steekproef gebeurt wat een schatting van N_{eV} oplevert (Laurie-Ahlberg & Weir, 1979; Nei & Tajima, 1981). Later volgt meer informatie over de toepassing en randvoorwaarden van deze methoden.

Effectieve populatiegrootte wordt niet enkel beïnvloed door totale populatiegrootte, waardoor de ratio ook spatiaal kan variëren tussen populaties van dezelfde soort (Engen et al., 2007). Myhre et al. (2016) gaven aan dat wanneer overleving en vruchtbaarheid afhankelijk zijn van populatiegrootte, en dus van densiteit, je niet mag uitgaan van een proportionele relatie tussen effectieve en census grootte. Bovendien kunnen ook fluctuaties in de omgeving een effect hebben op de snelheid van genetische drift in densiteitsafhankelijke populaties, niet alleen door hun invloed op de populatiegrootte, maar ook door hun directe invloed op de vitaliteit.

10.1 Methodes voor het bepalen van genetische effectieve populatiegrootte

10.1.1 Single sample methodes en software

Momenteel heeft genetisch onderzoek niet altijd een vaste plek in het monitoren van populaties en zijn bijgevolg niet altijd temporeel gescheiden stalen beschikbaar. Van de zogenaamde *single sample* methodes wordt dan ook dankbaar gebruik gemaakt. We geven hier een korte opsomming van de beschikbare methodes:

- OneSamp (Tallmon et al., 2008): dit programma maakt gebruik van *approximate Bayesian computation*. Het was een online tool met een enorme wachtlijst en is sinds kort niet meer beschikbaar (misschien op vraag aan de auteur).

- Estim (Vitalis & Couvet, 2001): deze methode schat zowel effectieve populatiegrootte als mate aan migranten. In kleine deelpopulaties kan drift resulteren in associaties tussen gen-kopieën. Estim definieert dit als 'identiteitsdisequilibrium binnen een deelpopulatie'.

- Colony (Jones et al., 2016; Jones & Wang, 2010): het programma bevat twee methodes voor de schatting van effectieve populatiegrootte, maar met gebruik van een maximum-likelihood analyse. De ene is gebaseerd op de verwantschap tussen individuen, de andere op de *heterozygote excess* methode (zie verder). Het a priori invoeren van een waarde voor N_e, alsook een foutmarge voor de genetische merkers is mogelijk (Wang, 2016). Ook kan de verwantschapsmethode om met niet-random paring, met

eenhuizige planten die zowel zelfbestuivend als uitkruisend zijn, en met haplodiploide organismen. Het zou ook toepasbaar zijn op polyploiden.

- EPA of AgeStructure (Wang et al., 2010): deze methode houdt rekening met overlappende generaties en bepaalt de schatting van effectieve populatiegrootte aan de hand van een toewijzing van ouders. Geslacht en leeftijd van de individuen moeten gekend zijn.

- LDNe (Waples & Do, 2008): hier wordt informatie geleverd door linkage disequilibrium[1] gebruikt om effectieve populatiegrootte te schatten.

- Heterozygote excess (Pudovkin et al., 1996; Zhdanova & Pudovkin, 2008): op basis van een overschot aan heterozigositeit verwacht onder Hardy-Weinberg evenwicht kan voor een enkele cohorte het aantal effectieve ouders (zie verder) geschat worden. Het gaat wel uit van een kleine populatie waarbij de cohorte geproduceerd werd door een gelijk aantal mannelijke en vrouwelijke individuen. Door een binomiale fout in de bemonstering verschillen allelfrequenties tussen vrouwelijke en mannelijke ouders, wat meer heterozygoten oplevert dan wordt verwacht.

- Parent based coancestry (Nomura, 2008): uitgaande van een enkele cohorte waarbij de gemeenschappelijke allelen (moleculair co-verwantschap) benut worden om de effectieve populatiegrootte te schatten.

- PwoP (Waples & Waples, 2011): ofwel ouderschapsanalyse zonder ouders. Deze methode is gerelateerd aan de verwantschapsmethode geïmplementeerd in Colony. In de paper van Waples & Waples (2011) gebruiken ze ML-Relate van Kalinowski et al. (2006) om de verwantschappen te bepalen en daarmee het aantal effectieve ouders (zie verder) te berekenen.

10.1.2 Temporele methodes en software

N_{eV} kan je enkel schatten met behulp van temporele methodes. Dit vereist een steekproef op minstens twee verschillende tijdstippen. Er zijn verschillende methodes waarvan we er hier enkele noemen. Je hebt de standaard temporele methode op basis van de verandering in allelfrequenties van Waples (1989) waarvoor er meerdere manieren mogelijk zijn om de gestandaardiseerde variantie van allelfrequenties te berekenen (de zogenaamde F-statistieken). Je hebt de methode van Nei & Tajima (1981), van Pollak (1983) en van Jorde & Ryman (2007). Ze werden allemaal geïntegreerd in het programma NeEstimator v2 (Do et al., 2014). Daarnaast heb je een pseudo-maximum-likelihood methode die migratie toestaat (MLNe; Wang, 2002; Wang & Whitlock, 2003), een maximum-likelihood (ML) en markov chain monte carlo (MCMC) methode (MCLEEPS; Anderson et al., 2000), Bayesiaanse methodes zoals TM3 geïmplementeerd in NeEstimator v2 en CoNe (Anderson, 2005; Berthier et al., 2002). Methodes die meer dan 2 staalnamepunten in de tijd aankunnen zijn R package NB (Hui & Burt, 2015) en TMVP (Beaumont, 2003) die respectievelijk gelijken op MLNe en TM3. Gompert (2016) heeft onlangs een programma ontwikkeld, SPATG, waarmee zowel Nev als omgevingsafhankelijke selectie kan geschat worden. Het programma heeft daarvoor genetische tijdsreeksen (allelfrequenties) nodig en maakt gebruik van Bayesiaanse statistiek.

In principe moet er slechts één generatie tussen die tijdstippen liggen. Bij populaties met overlappende generaties kan dit echter een afwijkende schatting van N_{eV} opleveren, zeker wanneer de staalname gericht is op een bepaalde leeftijdsklasse. Er is een verschil in bijdrage aan de voortplanting tussen verschillende leeftijdsklassen die een invloed heeft op de schatting van de effectieve populatiegrootte. Zelfs bij een willekeurige staalname over alle leeftijdsklassen heen, zou je de individuen, of beter hun allelenfrequenties, moeten wegen volgens die bijdrage (Waples & Yokota, 2007). Als er een lange periode zit tussen staalnames, 5 à 10 generaties lang, dan wordt het signaal van genetische drift sterker, die de ruis geleverd door die overlappende generaties kan overstemmen. Voor de Jordy & Ryman methode is het best om opeenvolgende cohortes te bemonsteren, in de veronderstelling dat er weinig verandering is in de demografie. Wanneer dergelijke staalname niet mogelijk is of de bemonsterde individuen niet op leeftijd kunnen gebracht worden, wordt bij voorkeur de staalname sterk gespreid doorheen de tijd. In de genetische studie van adder (*Vipera berus*) werden geen stalen in verschillende jaren genomen, maar probeerden Geeraerts & Mergeay (2012) de bemonsterde individuen te verdelen in leeftijdsklassen en deze

[1] *Linkage disequilibrium verwijst naar de non-random associatie tussen allelen op verschillende loci binnen een populatie.*

verdeling als temporele variatie te gebruiken in een methode die rekening houdt met de cohorte-structuur van de populatie.

10.1.3 Beperkingen en mogelijkheden van huidige methodes

Het nadeel van vele genetische methodes voor het bepalen van de effectieve populatiegrootte is dat ze een gesloten populatie veronderstellen, willekeurige paring binnen de populatie en discrete generaties. Een populatie is in vele gevallen niet geïsoleerd. Er is met andere woorden genenuitwisseling met andere populaties of migratie. We spreken dan van een metapopulatie. Migratie heeft net als drift en andere evolutionaire krachten het gevolg dat allelfrequenties kunnen wijzigen. Als die wijzigingen verkeerdelijk worden toegewezen aan genetische drift, kunnen ze een foute schatting van effectieve populatiegrootte opleveren (Wang & Whitlock, 2003). Migratie kan zowel een over- als een onderschatting van N_e veroorzaken. Wanneer immigratie hoog is en er dus vele vreemde allelen in een populatie binnenkomen, geeft dit een vals signaal van genetische drift en krijg je een lagere lokale N_e dan de werkelijke. Wanneer er uitwisseling is tussen genetisch zeer gelijkaardige populaties, dan lijkt het alsof er meer ouders voorhanden zijn dan oorspronkelijk in de ontvangende populatie en verkrijg je een overschatting van N_e (bijv. Baalsrud et al., 2014) ofwel N_e met genmigratie (Spieth, 1974). Zo lijkt het alsof de situatie gunstiger is in de populatie in kwestie. Als de migratie zou verdwijnen, bijvoorbeeld door een barrière, dan slaat genetische drift in de populatie toe in proportie met zijn lagere, geïsoleerde populatiegrootte.

Ryman et al. (2014) geven aan dat bij zeer hoge genenuitwisseling de grenzen van de deelpopulaties moeilijk te bepalen zijn. Hierdoor krijg je onderschattingen van N_e bij het gebruik van de temporele methode, zowel van de globale N_e als deze van de deelpopulaties. Ze vermoeden dat dit een reden kan zijn voor de zeer lage schattingen bij mariene populaties van vissen. Ze onderstrepen de noodzaak om degelijke informatie te verzamelen over de populatiestructuur. Daarvoor heb je een extensieve bemonstering nodig. Wil je een inschatting van de lokale N_e (dus van een bepaalde deelpopulatie) dan lijkt de beste optie de bemonstering uit te voeren in connectie met de lokale voortplanting, wanneer menging van populaties eerder minimaal is. Voor een schatting van de globale N_e moeten zo veel mogelijk deelpopulaties bemonsterd worden en in representatieve proporties over verschillende jaren/generaties. Dit is niet eenvoudig voor vele soorten. Bovendien kan de precisie van de schatting laag blijven, tenzij de globale populatie effectief klein is (Ryman et al., 2014).

Ook Gilbert & Whitlock (2015) hadden in hun simulaties rekening gehouden met verschillende scenario's van migratie. Ze testten verschillende methodes uit waaruit bleek dat LDNe, MLNe en TMVP het beste presteerden, maar niet allemaal onder hetzelfde scenario. Het is dus wenselijk te weten met welk demografisch scenario je te maken hebt bij een studie. Daarnaast kunnen temporele data je schatting van N_e verbeteren.

Omdat de huidige methodes voor het schatten van N_{eV} en N_{el} uitgaan van discrete generaties, moeten de resultaten bij soorten met overlappende generaties anders geïnterpreteerd worden. Bij een eenmalige staalname en bijgevolg bij het gebruik van een *single sample* schatter voor N_{el}, wordt in vele gevallen maar een enkele of een beperkt aantal cohortes bemonsterd (Waples, 2005). De schatting van N_e is dan in wezen niet N_e maar eerder het effectief aantal ouders (N_b) of een aantal ergens tussen beiden. Ook bij temporele methodes zal de steekproef vooral nakomelingen bevatten van ouders die maar een fractie van een hele generatie representeren wat leidt tot een onderschatting van N_{eV}. Vandaar dat geopperd wordt om voldoende tijd tussen beide staalnamepunten te laten zodat het signaal van cumulatieve drift sterk genoeg is om andere elementen van ruis te overstemmen.

De ratio N_b/N_e kan benaderd worden voor vele soorten met overlappende generaties met behulp van enkele kenmerken van hun levenscyclus, zoals de volwassen leeftijd en levensduur (Waples et al., 2013). Deze kennis kan gebruikt worden om de schatting van N_b te corrigeren. Dit werd getest door Waples et al. (2014) waarbij de linkage disequlibrium methode werd gebruikt. Schattingen van N_b zaten binnen een marge van 5% van de echte waarde van N_b verwijderd. Als je een betrouwbare schatting van N_e met dezelfde methode wil verkrijgen uit een enkele staalname van volwassen dieren of planten, moet je steekproef een gelijk aantal cohortes bevatten als er in een generatie geproduceerd kunnen worden (bijv. Menéndez et al., 2016; Robinson & Moyer, 2013). Hoewel de schatting altijd kleiner is dan de echte N_e, wordt op die manier de afwijking zo klein mogelijk gehouden. Gelukkig is het doorgaans eenvoudiger om N_b te berekenen. Via de gecorrigeerde waarde van N_b kan met behulp van de ratio N_b/N_e ook N_e van de generatie benaderd worden. Het begrijpen van de relaties tussen N_e, N_b en N_c en hoe deze op

hun beurt in relatie staan met de populatiedynamiek en de fluctuaties in populatiegrootte zijn belangrijk voor het ontwerpen van robuuste strategieën in het belang van de conservatie van soorten (Ruzzante et al., 2016).

Hoewel er afwijkingen mogelijk zijn op de schattingen van N_e en N_b die een correcte inschatting van de te ondernemen beheersmaatregelen in de weg kunnen staan, wordt binnen het onderzoeksveld van de populatiegenetica steeds verder gezocht naar manieren om de afwijkingen te voorkomen. Daarbij komt nog dat deze schattingen nooit als enige informatie wordt verzameld, maar samen wordt beoordeeld met andere genetische factoren van de populatie in kwestie en die van de omliggende populaties (Ryman et al., 2014).

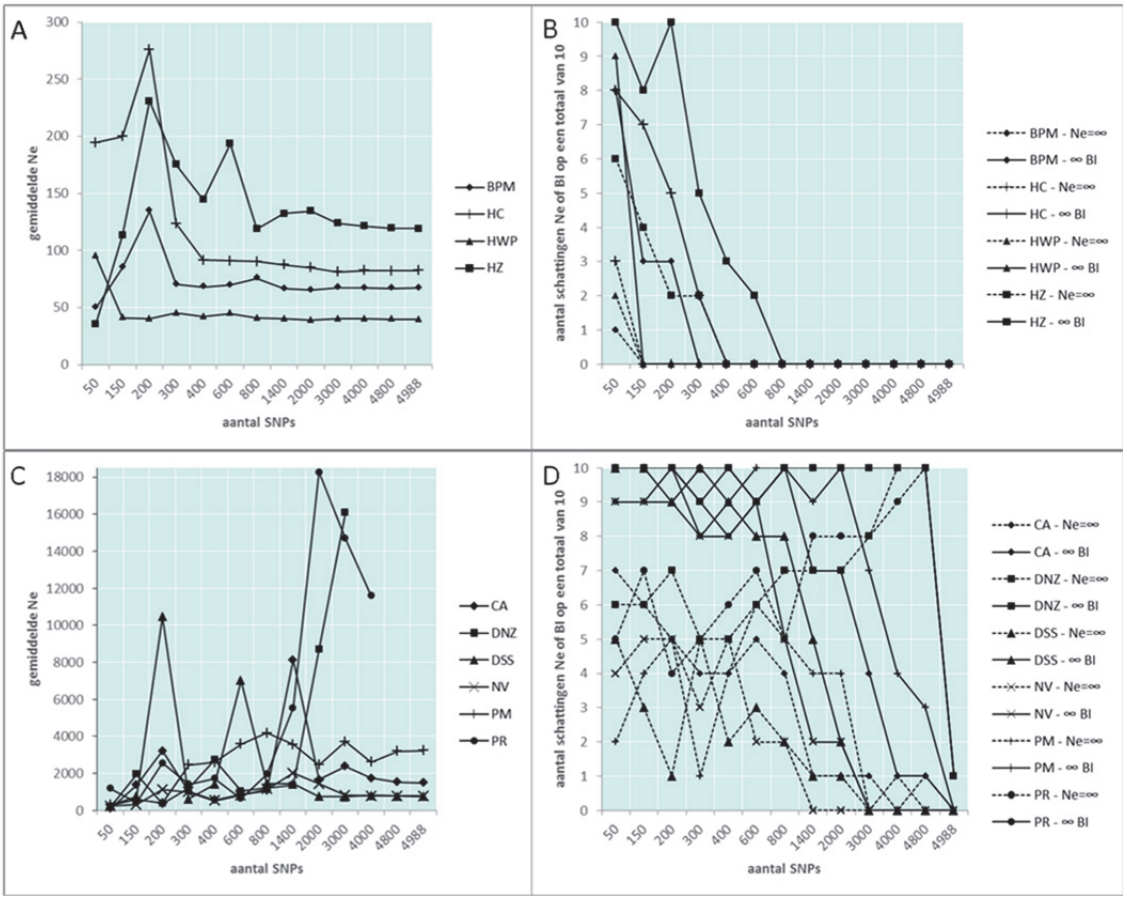
10.2 Het type en aantal genetische merkers

Voor een betrouwbare schatting van N_b en N_e moet je niet alleen de randvoorwaarden van de gebruikte methodiek kennen. Je hebt naast een degelijke staalname ook een set van genetische merkers nodig die voldoende resolutie heeft. Bepaalde auteurs hadden 10 tot 20 sterk polymorfe merkers voorgesteld (Waples & Yokota, 2007). Maar volgens Nunziata et al. (2015) leverde dit niet het gewenste resultaat in hun studie.

Om de merkerkeuze te bepalen, microsatellieten of *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), voor een bepaald project rond een insectensoort, werd in een voorstudie beroep gedaan op een bestaande dataset van gaffelwaterjuffer (Coenagrion scitulum; Swaegers et al., 2015a; Swaegers et al., 2015b). Gelijkaardige selectiecriteria als deze gebruikt door Swaegers et al. (2015b) werden toegepast om de SNP-set te filteren. Uiteindelijk hielden we 4988 SNPs over voor 190 stalen verdeeld over 10 populaties. Het doel was om met een veelgebruikte methode, namelijk LDNe, te evalueren hoeveel SNPs nodig zouden zijn voor een betrouwbare genetische schatting van N_e. Er werden 10 willekeurige subsets van telkens 50, 150, 200, 300, 300, 400, 600, 800, 1400, 2000, 3000, 4000 of 4800 SNPs genomen. Voor elke subset en de totale set SNPs werd N_e geschat met LDNe. Het aantal polymorfe SNPs varieert natuurlijk per subset, maar is gemiddeld c. 70% van het totaal. Daarnaast moeten we in gedachten houden dat de gelijkenis tussen subsets toeneemt naarmate het aantal SNPs dichter bij het totaal aantal beschikbare SNPs ligt. Gemiddelde schattingen van N_e voor de tien subsets werden berekend (figuur 8; A en C). Oneindig grote schattingen werden niet meegenomen in het gemiddelde, maar namen we mee in de evaluatie, alsook het aantal schattingen waarvan de bovenlimiet van het 95% betrouwbaarheidsinterval niet begrensd is (figuur 8; B en D). Hieruit blijkt dat we voor bepaalde populaties een stabiele schatting krijgen met een aantal SNPs dat tussen 150 en 800 gelegen is of in de duizendtallen, afhankelijk van de populatie. Voor een andere set populaties lijken de berekeningen geen eenduidige schatting op te leveren, ongeacht het aantal SNPs. Het kan dat dit om zeer grote populaties gaat waarvoor de LDNe methode minder geschikt is ofwel is de staalname ontoereikend.

Een gedeelte van de gaffelwaterjufferpopulaties waren ook met 12 microsatellieten geanalyseerd door Swaegers et al. (2014): BPM, DNZ, HWP, NV en PR. Ze gebruikten de verwantschapsmethode in Colony om N_e te schatten. Deze schattingen zitten in dezelfde grootteorde als deze berekend met SNPs voor de populaties BPM en HWP (resultaten worden niet getoond). Voor de populaties DNZ en PR kunnen we de schattingen niet vergelijken vanwege de onbegrensde waarden met behulp van SNPs (Figuur 7; B). Terwijl Ne van populatie NV volgens LDNe op de totale SNP-set 753 (621.3-954) bedraagt, is dit volgens Colony op de microsatellietenset 48 (30-83). Wel werden geen betrouwbare schatters verkregen met LDNe bij gebruik van de informatie op basis van de microsatellieten.

Hieruit blijkt dat er geen eenduidig antwoord is voor de merkerkeuze en het aantal merkers. Dit hangt af van de resolutie van de merkerset binnen de populatie die onderzocht wordt, alsook van de gebruikte methode om N_e te schatten. De ene methode kan al beter overweg met vele merkers, zoals dikwijls het geval is bij SNPs en andere genomische data, dan de andere. Maar de ontwikkelingen in dit veld staan niet stil (Barbato et al., 2015; Browning & Browning, 2015; Hollenbeck et al., 2016; Sheehan et al., 2013; Waples, 2016). We verwachten dat met het toenemende aantal merkers het de precisie van de schattingen in principe ten goede zal komen.



Figuur 8 Gemiddelde schattingen van N_e berekend met LDNe voor subsets van de SNP-set van gaffelwaterjuffer (A en C) met de bijhorende aantal oneindige schattingen per subset en het aantal onbegrensde betrouwbaarheidsintervallen (B en D).

10.3 Het aantal en de ruimtelijke spreiding van de stalen

Waples & Yokota (2007) zeggen in verband met het gebruik van temporele methode voor de schatting van N_e dat een grote hoeveelheid bemonsterde individuen belangrijk zijn, niet alleen vanwege de precisie van de schatting, maar ook om de afwijkingen door het niet beantwoorden aan assumpties in verband met de staalname te minimaliseren. Een standaard aantal stalen kan niet vooropgesteld worden. Enkel met een grondige kennis van de levenscyclus van de soort in kwestie kan een strategie voor bemonstering opgesteld worden. Wel vonden Kamath et al. (2015) dat bij de schatting van N_e van een geïsoleerde populatie van grizzlyberen met behulp van een temporele methode (EPA) de berekende waarden kleiner werden naarmate de ratio tussen het aantal bemonsterde individuen en N_e kleiner werd, hoewel er nog steeds een stijgende trend doorheen de tijd waarneembaar was. Dit was ook het geval voor de schattingen van N_b met de verwantschapsmethode (Colony), terwijl deze met de linkage disequilibriummethode (LDNe) niet gevoelig bleken te zijn voor de steekproefgrootte. Een minimum van 60 bemonsterde individuen bij relatief kleine populaties werd daarnaast gesuggereerd door Tallmon et al. (2010).

Zoals hogerop aangegeven, kan genenuitwisseling de schatting van N_e sterk beïnvloeden. We moeten dus weten of we met een populatie te maken hebben die onderdeel vormt van een metapopulatie of, wanneer meerdere, discrete populaties (ruimtelijk gegroepeerde individuen) onderzocht worden, ze samen een metapopulatie vormen. De noodzaak om de genetische, spatiale structuur en de mate en richting van genenuitwisseling te achterhalen, geldt niet alleen in het geval van discrete populaties. Ook binnen continue populaties heerst dikwijls een spatiale structuur die een invloed kan hebben op de schatting van N_e, wanneer er geen rekening mee wordt gehouden (Neel et al., 2013; Shirk & Cushman, 2014). Afhankelijk van de voortplantingsstructuur (vorming van sociale groepen) en dispersieafstanden kan deze structuur een andere vorm aannemen. Het is dus van belang die spatiale structuur eerst te onderzoeken, vooraleer betrouwbare schattingen van lokale en totale N_b en N_e kunnen berekend worden.

Neel et al. (2013) stelt daarbij een staalname voor over meerdere ruimtelijke schalen, zodat de detectie van structuur op fijne schaal mogelijk wordt.

Daarenboven moeten we ervoor waken dat we een random steekproef nemen. In sommige situaties stijgt de kans dat je verwanten bemonstert, bijvoorbeeld bij het bemonsteren van amfibielarven in poelen. Een sterkere vertegenwoordiging van bepaalde families in de steekproef ten opzichte van deze in de populatie zal de berekening van genetische parameters beïnvloeden, zeker deze van N_e. In dergelijke gevallen worden dikwijls verwante individuen genetisch geïdentificeerd en uit de dataset verwijderd (Whiteley et al., 2014). Waples & Anderson (2017) stellen echter dat het rigoureus verwijderen van verwante individuen uit de data niet noodzakelijk een beter resultaat oplevert. Ze toonden aan dat er geen ultieme oplossing is voor elke situatie, maar dat we zo goed als mogelijk moeten streven naar een random staalname. Indien de bemonstering waarschijnlijk niet ad random kan gebeuren en een correctie nodig is, dan is het noodzakelijk om goed te overwegen welke correctie we best toepassen en bijgevolg te begrijpen wat de gevolgen voor de schattingen kunnen zijn.

11 Referenties

Anderson E.C. (2005). An efficient Monte Carlo method for estimating N_e from temporally spaced samples using a Coalescent-Based Likelihood. Genetics 170(2):955-967.

Anderson E.C., Williamson E.G., Thompson E.A. (2000). Monte Carlo evaluation of the likelihood for N_e. from temporally spaced samples. Genetics 156(4):2109-2118.

Baalsrud H.T., Sæther B.-E., Hagen I.J., Myhre A.M., Ringsby T.H., Pärn H., Jensen H. (2014). Effects of population characteristics and structure on estimates of effective population size in a house sparrow metapopulation. Mol Ecol 23(11):2653-2668.

Barbato M., Orozco-terWengel P., Tapio M., Bruford M.W. (2015). SNeP: a tool to estimate trends in recent effective population size trajectories using genome-wide SNP data. Frontiers in Genetics 6:109.

Beaumont M.A. (2003). Estimation of population growth or decline in genetically monitored populations. Genetics 164(3):1139-1160.

Berthier P., Beaumont M.A., Cornuet J.M., Luikart G. (2002). Likelihood-based estimation of the effective population size using temporal changes in allele frequencies: A genealogical approach. Genetics 160(2):741-751.

Browning S.R., Browning B.L. (2015). Accurate non-parametric estimation of recent effective population size from segments of identity by descent. Am J Hum Genet 97(3):404-418.

Brys R., Halfmaerten D., Jacquemyn H., Mergeay J. (2016). eDNA barcoding. Natuurfocus 15(3):114-120.

Caballero A., Toro M.A. (2000). Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. Genetical Research 75(3):331-343.

Caballero A., Toro M.A. (2002). Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. Conservation Genetics 3(3):289-299.

Cottrell J.E., Tabbener H.E., Milner A., Connolly T., Sing L., LefŠvre F., Achard P., Bord cs S., Gebhardt K., Vornam B. et al. (2004). Chloroplast DNA haplotypes of 637 trees of *Populus nigra* L. held in ex situ conservation genebanks in seven European countries and their possible postglacial migration routes. Forest Ecology and Management:In press.

Cox K., Leyssen A., Mergeay J., Ronse A., Packet J., Denys L. (2014a). Genetic assessment of *Luronium natans* in lower Belgium: Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2014 (5021339). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

Cox K., Maes J., Van Calster H., Mergeay J. (2017). Effect of the landscape matrix on gene flow in a coastal amphibian metapopulation. Conservation Genetics 18(6):1359-1375.

Cox K., Vanden Broeck A., Mergeay J. (2015). Toestand van Vlaamse rugstreeppadpopulaties op basis van genetische data: Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2015 (10767598). Instituut voor Natuuren Bosonderzoek, Brussel.

Cox K., Vanden Broeck A., Vander Mijnsbrugge K., Buiteveld J., Collin E., Heybroek H.M., Mergeay J. (2014b). Interspecific hybridisation and interaction with cultivars affect the genetic variation of *Ulmus minor* and *Ulmus glabra* in Flanders. Tree Genetics & Genomes 10(4):813-826.

Crow J.F., Denniston C. (1988). Inbreeding and variance effective population numbers. Evolution:482-495.

de Groot G.A.L., I. (2013). Genetische tools voor natuurbeheer: van het lab naar de praktijk. vakblad voor natuur, bos en landschap:4-7.

De Kort H., Vander Mijnsbrugge K., Vandepitte K., Honnay O., Mergeay J. (2014). Onderzoek naar de indeling van herkomstgebieden voor Frangula alnus en *Alnus glutinosa* op basis van genomische en fenotypische data. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2014 (INBO.R.2014.3200085). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

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

Engen S., Ringsby T.H., Sæther B.-E., Lande R., Jensen H., Lillegård M., Ellegren H. (2007). Effective size of fluctuating populations with two sexes and overlapping generations. Evolution 61(8):1873-1885.

Evans D.A., Arvela M. (2011). Assessment and reporting under Article 17 of the Habitats Directive. European Topic Centre on Biological Diversity

Felsenfeld G. (2014). A Brief History of Epigenetics. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6(1):a018200.

Frankham R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. Genetics Research 66:95 - 107.

Frankham R. (2005). Genetics and extinction. Biological Conservation 126(2):131-140.

Frankham R., Bradshaw C.J.A., Brook B.W. (2014). Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. Biological Conservation 170(0):56-63.

Geeraerts C., Mergeay J. (2012). Genetisch onderzoek van de adder in functie van duurzame bescherming op lange termijn. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2012 (rapportnr. 57). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
Gilbert K.J., Whitlock M.C. (2015). Evaluating methods for estimating local effective population size with and without migration. Evolution 69(8):2154-2166.
Gompert Z. (2016). Bayesian inference of selection in a heterogeneous environment from genetic time-series data. Mol Ecol 25(1):121-134.
Gonzalez A.P.R., Dumalasova V., Rosenthal J., Skuhrovec J., Latzel V. (2017). The role of transgenerational effects in adaptation of clonal offspring of white clover (*Trifolium repens*) to drought and herbivory. Evolutionary Ecology 31(3):345-361.
Hollenbeck C.M., Portnoy D.S., Gold J.R. (2016). A method for detecting recent changes in contemporary effective population size from linkage disequilibrium at linked and unlinked loci. Heredity 117(4):207-216.
Honnay O. (2010). Ecoducten: wondermiddel of pleister op een houten been. Natuurfocus 9:71 - 75.
Hui T.-Y.J., Burt A. (2015). Estimating effective population size from temporally spaced samples with a novel, efficient maximum-likelihood algorithm. Genetics 200(1):285-293.
IUCN/SSC. (2013). Guidelines for reintroductions and other conservation translocations. Version 1.0. Gland, Switzerland: IUCN Species Survival Commission,. 57 p.
Jacquemyn H., Brys R., Vandepitte K., Honnay O., Roldan-Ruiz I., Wiegand T. (2007). A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. New Phytologist 176(2):448-459.
Jones A.T., Ovenden J.R., Wang Y.G. (2016). Improved confidence intervals for the linkage disequilibrium method for estimating effective population size. Heredity 117(4):217-223.
Jones O.R., Wang J. (2010). COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. Molecular Ecology Resources 10(3):551-555.
Jorde P.E., Ryman N. (2007). Unbiased estimator for genetic drift and effective population size. Genetics 177(2):927-935.
Jump A.S., Penuelas J. (2007). Extensive spatial genetic structure revealed by AFLP but not SSR molecular markers in the wind-pollinated tree, *Fagus sylvatica*. Molecular Ecology 16(5):925-936.
Kalinowski S.T., Wagner A.P., Taper M.L. (2006). ml-relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. Molecular Ecology Notes 6(2):576-579.
Kamath P.L., Haroldson M.A., Luikart G., Paetkau D., Whitman C., van Manen F.T. (2015). Multiple estimates of effective population size for monitoring a long-lived vertebrate: an application to Yellowstone grizzly bears. Molecular Ecology 24(22):5507-5521.
Kimura M., Crow J.F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics 49:725-738.
Koelewijn H.P.K., L. (2011). Genetica in het natuurbeheer: een onderschat werkinstrument. De Levende Natuur maart 2011:49 -54.
Kolb A. (2005). Reduced reproductive success and offspring survival in fragmented populations of the forest herb *Phyteuma spicatum*. Journal of Ecology 93(6):1226-1237.
Kuiters A.T.d.G., G.A..; Lammertsma, D.R; Jansman, H.A.H.; Bovenschen, J. (2016). Genetische monitoring van de Nederlandse otterpopulatie; Ontwikkeling van populatieomvang en genetische status 2015/2016. Wettelijke Onderzoekstaken Natuur & Milieu. WOt-technical report 81:47.
La Haye M.J.J., Reiners T.E., Raedts R., Verbist V., Koelewijn H.P. (2017). Genetic monitoring to evaluate reintroduction attempts of a highly endangered rodent. Conservation Genetics 18(4):877-892.
Laikre L., Larsson L.C., Palme A., Charlier J., Josefsson M., Ryman N. (2008). Potentials for monitoring gene level biodiversity: using Sweden as an example. Biodiversity and Conservation 17(4):893-910.
Larsson J.K., Jansman H.A.H., Segelbacher G., Hoglund J., Koelewijn H.P. (2008). Genetic impoverishment of the last black grouse (*Tetrao tetrix*) population in the Netherlands: detectable only with a reference from the past. Molecular Ecology 17(8):1897-1904.
Latzel V., Gonzalez A.P.R., Rosenthal J. (2016). Epigenetic memory as a basis for intelligent behavior in clonal plants. Frontiers in Plant Science 7.
Laurie-Ahlberg C., Weir B.S. (1979). Allozymic variation and linkage disequilibrium in some laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. Genetics 92(4):1295-1314.
Lommaert L.A., D.; Pollet, M. (red.). (in press). Criteria voor de beoordeling van de lokale staat van instandhouding van de Habitatrichtlijnsoorten in Vlaanderen. Versie 2.0. INBO.R.2015.8193367. 273 p.
Menéndez J., Álvarez I., Fernandez I., Menéndez-Arias N.A., Goyache F. (2016). Assessing performance of single-sample molecular genetic methods to estimate effective population size: empirical evidence from the endangered *Gochu Asturcelta* pig breed. Ecology and Evolution 6(14):4971-4980.
Mergeay J. (2013a). Analyse van de mogelijke verbindingen voor amfibieën en reptielen in S-IHD rapporten. Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. INBO.A.2013.66.

Mergeay J. (2013b). Voorstel tot genetische monitoring van de effectiviteit van het ecoduct kempengrens: Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2013 (INBO.R.2013.9). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
Mergeay J. (2017). Translocaties in natuurbeheer. Natuurfocus 16(3):121-128.
Mergeay J., De Meester L. (2010). (Her)introducties en rationaliteit in het natuurbeheer. Natuurfocus 9(3):124-127.
Mergeay J., Vanden Broeck A. (in druk). Algemene genetische criteria voor de instandhouding van populaties. In: Lommaert L.A., D.; Pollet, M. (red.). Criteria voor de beoordeling van de lokale staat van instandhouding van de Habitatrichtlijnsoorten in Vlaanderen. Brussel, België: Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. p 29 - 35.
Myhre A.M., Engen S., Sæther B.-E. (2016). Effective size of density-dependent populations in fluctuating environments. Evolution 70(11):2431-2446.
Neel M.C., McKelvey K., Ryman N., Lloyd M.W., Short Bull R., Allendorf F.W., Schwartz M.K., Waples R.S. (2013). Estimation of effective population size in continuously distributed populations: there goes the neighborhood. Heredity 111(3):189-199.
Nei M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70:3321-3323.
Nei M., Tajima F. (1981). Genetic drift and estimation of effective population size. Genetics 98(3):625-640.
Nomura T. (2008). Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample. Evolutionary Applications 1(3):462-474.
Nunziata S.O., Scott D.E., Lance S.L. (2015). Temporal genetic and demographic monitoring of pond-breeding amphibians in three contrasting population systems. Conservation Genetics 16(6):1335-1344.
Oostermeijer J.G.B., Luijten S.H., Krenova Z.V., Den Nijs H.C.M. (1998). Relationships between population and habitat characteristics and reproduction of the rare Gentiana pneumonanthe L. Conservation Biology 12(5):1042-1053.
Pollak E. (1983). A new method for estimating the effective population size from allele frequency changes. Genetics 104(3):531-548.
Pudovkin A.I., Zaykin D.V., Hedgecock D. (1996). On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny. Genetics 144(1):383-387.
Richards C.L., Alonso C., Becker C., Bossdorf O., Bucher E., Colomé-Tatché M., Durka W., Engelhardt J., Gaspar B., Gogol-Döring A. et al. (2017). Ecological plant epigenetics: Evidence from model and non-model species, and the way forward. Ecology Letters 20(12):1576-1590.
Richards C.L., Schrey A.W., Pigliucci M. (2012). Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with epigenetic differentiation. Ecology Letters 15(9):1016-1025.
Robinson J.D., Moyer G.R. (2013). Linkage disequilibrium and effective population size when generations overlap. Evolutionary Applications 6(2):290-302.
Ruzzante D.E., McCracken G.R., Parmelee S., Hill K., Corrigan A., MacMillan J., Walde S.J. (2016). Effective number of breeders, effective population size and their relationship with census size in an iteroparous species, *Salvelinus fontinalis*. Proceedings of the Royal Society Biological Sciences 283(1823).
Ryman N., Allendorf F.W., Jorde P.E., Laikre L., Hössjer O. (2014). Samples from subdivided populations yield biased estimates of effective size that overestimate the rate of loss of genetic variation. Molecular Ecology Resources 14(1):87-99.
Schwartz M.K., Luikart G., Waples R.S. (2007). Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. Trends Ecology Evolution 22(1):25-33.
Sheehan S., Harris K., Song Y.S. (2013). Estimating variable effective population sizes from multiple genomes: a sequentially markov conditional sampling distribution approach. Genetics 194(3):647-662.
Shirk A.J., Cushman S.A. (2014). Spatially-explicit estimation of Wright's neighborhood size in continuous populations. Frontiers in Ecology and Evolution 2(62).
Spielman D., Brook B.W., Frankham R. (2004). Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(42):15261-15264.
Swaegers J., Mergeay J., Therry L., Bonte D., Larmuseau M.H., Stoks R. (2014). Unravelling the effects of contemporary and historical range expansion on the distribution of genetic diversity in the damselfly *Coenagrion scitulum*. J Evol Biol 27(4):748-759.
Swaegers J., Mergeay J., Van Geystelen A., Therry L., Larmuseau M.H.D., Stoks R. (2015a). Data from: Neutral and adaptive genomic signatures of rapid poleward range expansion. Dryad Digital Repository: Dryad Digital Repository.
Swaegers J., Mergeay J., Van Geystelen A., Therry L., Larmuseau M.H.D., Stoks R. (2015b). Neutral and adaptive genomic signatures of rapid poleward range expansion. Mol Ecol 24(24):6163-6176.
Tallmon D.A., Gregovich D., Waples R.S., Baker C.S., Jackson J., Taylor B.L., Archer E., Martien K.K., Allendorf F.W., Schwartz M.K. (2010). When are genetic methods useful for estimating contemporary abundance and detecting population trends? Molecular Ecology Resources 10(4):684-692.

Tallmon D.A., Koyuk A., Luikart G., Beaumont M.A. (2008). ONeSAMP: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. Molecular Ecology Resources 8(2):299-301.
Vanden-Broeck A., Gruwez R., Cox K., Adriaenssens S., Michalczyk I.M., Verheyen K. (2011). Genetic structure and seed-mediated dispersal rates of an endangered shrub in a fragmented landscape: a case study for Juniperus communis in northwestern Europe. Bmc Genetics 12.
Vanden Broeck A., Maes D., Kelager A., Wynhoff I., WallisDeVries M.F., Nash D.R., Oostermeijer J.G.B., Van Dyck H., Mergeay J. (2017). Gene flow and effective population sizes of the butterfly *Maculinea alcon* in a highly fragmented, anthropogenic landscape. Biological Conservation 209:89-97.
Vanden Broeck A.V.L., W.; Cox, K., Gyselings, R.; De Bruyn, L.; Mergeay, J. (2014). De groenknolorchis (Liparis loeselii L.). Zaadverbreiding en lokale adaptatie. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2014 (INBO.R.2014.1561208). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. 34 p.
Verhoeven K.J.F., Preite V. (2014). Epigenetic variation in asexually reproducing organisms. Evolution 68(3):644-655.
Vitalis R., Couvet D. (2001). estim 1.0: a computer program to infer population parameters from one- and two-locus gene identity probabilities. Molecular Ecololgy Notes 1(4):354-356.
Wang J. (2002). An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. Genetics 160(3):1203-1215.
Wang J. (2016). A comparison of single-sample estimators of effective population sizes from genetic marker data. Molecular Ecology 25(19):4692-4711.
Wang J., Brekke P., Huchard E., Knapp L.A., Cowlishaw G. (2010). Estimation of parameters of inbreeding and genetic drift in populations with overlapping generation. Evolution 64(6):1704-1718.
Wang J., Whitlock M.C. (2003). Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. Genetics 163(1):429-446.
Waples R.S. (1989). A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. Genetics 121(2):379-391.
Waples R.S. (2005). Genetic estimates of contemporary effective population size: to what time periods do the estimates apply? Mol Ecol 14(11):3335-3352.
Waples R.S. (2016). Making sense of genetic estimates of effective population size. Molecular Ecology 25(19):4689-4691.
Waples R.S., Anderson E.C. (2017). Purging putative siblings from population genetic data sets: a cautionary view. Molecular Ecology 26(5):1211-1224.
Waples R.S., Do C. (2008). LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. Molecular Ecology Resources 8(4):753-756.
Waples R.S., Luikart G., Faulkner J.R., Tallmon D.A. (2013). Simple life-history traits explain key effective population size ratios across diverse taxa. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 280(1768).
Waples R.S., Waples R.K. (2011). Inbreeding effective population size and parentage analysis without parents. Molecular Ecology Resources 11:162-171.
Waples R.S., Yokota M. (2007). Temporal estimates of effective population size in species with overlapping generations. Genetics 175(1):219-233.
Westra T., De Knijf G., Ledegen H., De Bruyn L., Maes D., Onkelinx T., Piesschaert F., Vanreusel W., Van Elegem B., Pollet M. et al. (2016). Monitoring van prioritaire dier- en plantensoorten in Vlaanderen. Natuurfocus 15(4):156-165.
Whiteley A.R., McGarigal K., Schwartz M.K. (2014). Pronounced differences in genetic structure despite overall ecological similarity for two *Ambystoma* salamanders in the same landscape. Conserv Genet 15(3):573-591.
Zhdanova O.L., Pudovkin A.I. (2008). Nb_HetEx: a program to estimate the effective number of breeders. J Hered 99(6):694-695.