

Advies over de opzet van een ex situ kweek van vuursalamander in Vlaanderen

Adviesnummer:	<u>INBO.A.3309</u>
Datum advisering:	23 juni 2015
Auteur(s):	Joachim Mergeay, Karen Cox, Jeroen Speybroeck
Contact:	Lieve Vriens (lieve.vriens@inbo.be)
Kenmerk aanvraag:	ANB-INBO-BEL-2015-32
Geadresseerden:	Agentschap voor Natuur en Bos Centrale Diensten T.a.v. Muriel Vervaeke Koning Albert II-laan 20 bus 8 1000 Brussel muriel.vervaeke@lne.vlaanderen.be
Cc:	Agentschap voor Natuur en Bos Carl De Schepper (carl.deschepper@lne.vlaanderen.be)

Aanleiding

Amfibieënpopulaties kennen wereldwijd een dramatische terugval en zijn in hun voortbestaan bedreigd. De infectieziekte chytridiomycose speelt hierbij een sleutelrol. De ziekteverwekkers van chytridiomycose zijn de schimmels *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Batrachochytrium salamandrivorans*. Hoewel hij naar alle waarschijnlijkheid vrij wijd verspreid aanwezig is in Europa werden weinig of geen gevallen van op populatieniveau ingrijpende sterfte van de eerste schimmel vastgesteld. De tweede schimmel heeft echter de voornaamste Nederlandse populatie van de vuursalamander nagenoeg doen uitsterven. Sinds december 2013 werden tot op heden in België drie infectiehaarden van *Batrachochytrium salamandrivorans* vastgesteld. Gezien de mogelijke negatieve impact - massale sterfte van vuursalamanders - kan een ex situ kweek overwogen worden. Nederland en Wallonië hebben reeds een ex situ kweek opgezet met vuursalamanders uit hun regio. De vuursalamanders van België, Nederland en West-Duitsland behoren vermoedelijk tot dezelfde fylogeografische lijn.

Vraag

1. Waarmee moet rekening gehouden worden bij het kiezen of samenstellen van een ouderpopulatie? Het gaat hier over zaken als: wat is de beste periode voor het verzamelen van een bronpopulatie, aan welke criteria moeten de in te zamelen dieren voldoen, hoeveel dieren moet de ouderpopulatie bevatten, van welke oorsprong?
2. Wat zijn de meest aangewezen condities voor ex situ kweek en verzorging, over welke tijdsduur?
3. Is het aangewezen om de Vlaamse bronpopulatie bij een ex situ kweek in de toekomst bij te voegen aan die van Nederland, Wallonië en W-Duitsland om een goede genetische diversiteit te realiseren in de bronpopulatie?

Toelichting

1 Samenstelling ouderpopulatie

1.1 Keuze van bronpopulaties

De startpopulatie bevat best minimaal 95% van de heterozygositeit van de donorpopulaties (Weeks et al., 2011). Dit kan reeds bekomen worden met een initiële startpopulatie van 10 effectieve stichters. In de praktijk wordt best begonnen met startpopulatie die even groot is als de effectieve grootte die nodig is om de genetische diversiteit op de beschouwde termijn te behouden (zie tabel 1). Om te beoordelen welke deelpopulaties als bronpopulaties kunnen fungeren en in welke mate elke bronpopulatie bemonsterd moet worden, moet een genetische studie uitgevoerd worden. In 2011 werden door het INBO reeds in 16 bossen larvenstalen genomen voor genetische analyses. Dit resulteerde in een masterscriptie aan de Universiteit van Antwerpen (Franken, 2012). Na uitbreiding van de genetische merkerset om een hogere resolutie te bekomen, werden de analyses herhaald. Voor 14 bossen was de staalname voldoende groot om een analyse van de genetische conditie uit te voeren. Het betreft het Nerenbos, Bruinbos, Heilig Geestgoed en Harentbeekbos in Merelbeke, Buggenhoutbos, Maarkebeekvallei (Longkruidbosje Ladeuze- en Eeckhoutbos), Raspaillebos en de volgende locaties in de Vlaamse Ardennen: Brakelbos, Bos Terrijst, Hayesbos, Steenbergbos, Parikebos, Trimpont en Kapellenbos (Terkleppebeek). Deze ongepubliceerde data kunnen dus gedeeltelijk dienen als basis voor de keuze van bronpopulaties. Vele andere populaties werden alsnog niet gescreend of konden niet opgenomen worden in de analyse vanwege onvoldoende stalen voor een betrouwbaar resultaat, zoals deze aan het Kasteel van

Horst of in het Meerdaalwoud. Afhankelijk van de verdeling van de genetische variatie over alle populaties heen, zullen bepaalde populaties proportioneel minder of meer aanvullend bemonsterd moeten worden. Een genetisch referentiepunt van de kweekpopulatie dient bepaald te worden om de startsituatie in te kunnen schatten en verdere opvolging mogelijk te maken.

1.2 Aantal dieren

Om het aantal dieren of de populatiegrootte in te schatten, dient men te weten hoe lang deze kweekpopulatie in stand gehouden moet worden en met welke doeleinden voor ogen. Is dit enkel voor het behoud van de soort en zijn genetische variatie, of ook voor uitzettingen (genetic rescue¹ of herintroductie)? Hoe groter de populatie, hoe minder snel er verlies aan genetische variatie optreedt door drift (d.i. door toevalseffecten). Dit vereist ook meer infrastructuur en middelen om de kweekpopulatie te onderhouden. De vuursalamander heeft een minimale generatietijd van 4 tot 6 jaar. Door in gevangenschap de generatietijd te rekken, kan met minder dieren de genetische variatie maximaal in stand gehouden worden (Frankham et al., 2010). Bij vuursalamander kan de levensduur in het wild 20 jaar overschrijden (Nöllert & Nöllert, 2001). Het is in theorie mogelijk om de generatieduur dus te rekken tot 20 jaar, eerder dan een normalere 8-10 jaar.

Om te bepalen hoe groot de effectieve populatie moet zijn voor behoud van een bepaald niveau van de heterozygositeit gebruikt men de vergelijking 1

$$N_e = t / \left(-2 \ln \left(\frac{H_t}{H_0} \right) \right) \text{ (vergelijking 1)}$$

met t het aantal generaties, H_t de heterozygositeit in generatie t en H_0 de heterozygositeit bij aanvang. Door de vergelijking op te lossen voor het aantal generaties t in gevangenschap en (H_t/H_0) =het gewenste behoud van heterozygositeit (doorgaans 0.95) bekom je de gewenste waarde van N_e . Tabel 1 geeft een overzicht van mogelijke grenswaardes.

t	# j bij t=10 j	N_e @0.90	N_e @0.95	N_e @0.975	# j bij t=20 j	N_e @0.90	N_e @0.95	N_e @0.975
1	10	4.7	9.7	19.7	20	4.7	9.7	19.7
2	20	9.5	19.5	39.5	40	9.5	19.5	39.5
3	30	14.2	29.2	59.2	60	14.2	29.2	59.2
4	40	19.0	39.0	79.0	80	19.0	39.0	79.0
5	50	23.7	48.7	98.7	100	23.7	48.7	98.7
6	60	28.5	58.5	118.5	120	28.5	58.5	118.5
7	70	33.2	68.2	138.2	140	33.2	68.2	138.2
8	80	38.0	78.0	158.0	160	38.0	78.0	158.0
9	90	42.7	87.7	177.7	180	42.7	87.7	177.7
10	100	47.5	97.5	197.5	200	47.5	97.5	197.5

Tabel 1. Minimale effectieve groottes N_e waarbij 0.90, 0.95 of 0.975 van de oorspronkelijke heterozygositeit wordt behouden na t generaties, waarbij aangegeven wordt of de generatietijd 10 j bedraagt (natuurlijke condities) dan wel 20 j (artificieel gerekte generatieduur door beperken van voortplanting).

Dit behelst de effectieve populatiegrootte. In de praktijk verschilt die van het werkelijke aantal dieren, de census populatiegrootte (N_c). Onder natuurlijke condities is de effectieve

¹ Populaties met lage genetische variatie en lage fitness kunnen in aanmerking komen voor genetic rescue. Door individuen van een andere populatie toe te voegen, voeg je ook andere genen toe. Dit kan de genetische variatie verhogen in de populatie in nood.

grootte gemiddeld genomen tienmaal kleiner dan N_c . In gevangenschap is het echter mogelijk om beide quasi gelijk te krijgen. Dit vereist een zeer stringente opvolging van de kweekcondities en de kweekpopulatie, door het aantal nakomelingen per individu zo gelijkmatig mogelijk te houden over de gehele populatie.

In een stabiele populatie (gemiddeld aantal nakomelingen per individu=2) geldt vergelijking 2:

$$N_e = \frac{4N_c - 2}{V_k + 2} \text{ (vergelijking 2)}$$

Waarbij V_k de variantie in familie grootte weergeeft. In gevangenschap is het mogelijk de variantie in familie grootte strikt te controleren, te minimaliseren en zelfs te reduceren tot nul (elk individu heeft exact even veel nakomelingen die zelf de daaropvolgende generatie mogen voortplanten). Wanneer de variantie effectief nihil is, is de effectieve grootte van de populatie bijna tweemaal zo groot als de census populatie. Dit, gecombineerd met een artificieel gerekte generatietijd laat toe om met een relatief kleine populatie in gevangenschap, gedurende lange tijd een grote hoeveelheid heterozygositeit te behouden.

De evolutie van de populatie wordt best genetisch opgevolgd, zodat het kweekprogramma - wanneer nodig- kan bijgestuurd worden.

1.3 Selectie in gevangenschap aan resistentie tegen *Batrachochytrium salamandrivorans*

Een ex situ kweek van vuursalamander heeft uiteindelijk tot doel om op termijn dieren terug te kunnen uitzetten in hun natuurlijke omgeving. Het risico bestaat echter dat de pathogeen in kwestie zich permanent kan vestigen in West-Europa, en daardoor een blijvend gevaar vormt voor amfibiepopulaties. Het is in principe mogelijk om via gecontroleerde natuurlijke selectie resistentie op te bouwen in de kweekpopulatie, om uiteindelijk te eindigen met een nagenoeg resistente populatie vuursalamander die zonder gevaar voor extinctie bij contact met *B. salamandrivorans*, kan uitgezet worden.

Dit kan gerealiseerd worden door binnen de kweekpopulatie het reproductie-overschot onder gecontroleerde condities bloot te stellen aan de pathogeen. Aangezien een vrouwtje afhankelijk van haar grootte 8 tot 60 larven afzet per keer (Nöllert & Nöllert, 2001) kan dat overschot hiervoor gebruikt worden (na metamorfose). Individuen die deze infectie overleven zijn mogelijk van nature ten dele resistent. Deze kunnen worden toegevoegd aan een aparte "besmette" kweekpopulatie, die parallel maar duidelijk gescheiden van de niet-besmette kweekpopulatie wordt gehouden. Op deze manier zet men in op twee paarden. Dit selectie-experiment laat vuursalamanders toe om op een relatief risico-arme wijze te co-evolueren met de pathogeen, én om na te gaan of er genetische variatie is voor resistentie aan deze pathogeen. Zulke co-evolutie gebeurt mogelijk ook al in wilde populaties, maar gezien het sterftecijfer zodanig hoog lijkt (>95%) heeft dit in situ te grote risico's voor het voortbestaan van de wilde populaties om louter hierop te vertrouwen. Anderzijds bestaat het risico dat men bij stopzetten van de kweek compleet onaangepaste dieren uitzet die snel ten onder dreigen te gaan aan infectie door *B. salamandrivorans*.

1.4 Periode staalname

Bij de opstart van een ex situ kweek kan het een voordeel zijn om in eerste instantie larven te bekomen die het resultaat zijn van reeds voorbije paringen. Hiertoe zouden dan hoogzwangere dieren moeten verzameld worden voorafgaand aan de grootste larvenafzetactiviteit. In Vlaanderen blijken vuursalamanderwijfjes larven af te zetten vanaf november tot mei, waarbij het aandeel hoogzwangere wijfjes vooral vanaf januari lijkt af te nemen (Speybroeck, ongepubliceerde gegevens). Een goed onderscheid kunnen maken tussen mannetjes en wijfjes moet sowieso een essentiële vaardigheid zijn van de

verzamelaar(s). Een andere mogelijkheid is het verzamelen en opkweken van larven, al is het hierbij mogelijk dat de bemonstering op een welbepaalde plek genetisch erg nauw verwante dieren oplevert.

2 Kweekcondities

Het INBO beschikt niet over expertise inzake kweken van amfibieën. Voor gespecialiseerde informatie betreffende de kweekcondities verwijzen we naar de website van "Amphibian Ark" (<http://www.amphibianark.org/about-us/aark-organization/>). Dit is een samenwerkingsverband tussen de "World Association of Zoos and Aquariums", de IUCN² SSC Conservation Breeding Specialist Group, en de "Amphibian Specialist Group" en tal van andere partners. Deze samenwerking werd in 2007 opgestart om invulling te geven aan een wereldwijd actieplan ter behoud van met uitsterven bedreigde amfibieën (<http://www.amphibianark.org/pdf/ACAP.pdf>). De organisatie coördineert de soortbeschermingsprogramma's die wereldwijd uitgevoerd worden door zoo's, aquariums, museums, universiteiten en private kwekers. Op de website wordt alle mogelijke informatie betreffende de kweek van amfibieën ontsloten, inclusief zaken betreffende bioveiligheid, normen, het gebruik van containers als behuizing enz. (<http://www.amphibianark.org/resources/> en http://www.amphibianark.org/resources/aark-documents/#Husbandry_and_ex_situ_management_-_general). De site bundelt ook studies, resultaten en onderzoeksnoten wat betreft de kweek van amfibieën in gevangenschap (<http://www.amphibianark.org/resources/science-and-research/>). Een voorbeeld van praktische richtlijnen voor de kweek van vuursalamander is terug te vinden in volgende link http://www.theamphibian.co.uk/fire_salamander_care_sheet.htm).

Verder lijkt het logisch de eventueel toe te passen werkwijze af te toetsen met de in Nederland gevolgde praktijk (www.ravon.nl), en verder beroep te doen op de extensieve ervaring van de Koninklijke Maatschappij voor Dierkunde van Antwerpen (KMDA) en de daar ingebedde onderzoekscel Centre for Research and Conservation, die uitgebreide ervaring heeft met ex situ behoud van populaties in gevangenschap.

3 Samenvoegen verschillende genenpoelen

De gemiddelde heterozygositeit op microsatellietmerkers van de reeds onderzochte populaties (met behulp van 20 microsatellietmerkers) lag tussen 0.50 en 0.60 en was dus relatief hoog. De effectieve populatiegrootte was daarentegen in vele populaties behoorlijk klein. Ook waren er indicaties dat bepaalde populaties recent een reductie in populatiegrootte en/of gene flow hadden ondergaan. Als de kweekpopulatie echter voldoende groot is en minimaal 95 % bevat van de in Vlaanderen voorhanden genetische variatie, dan is menging met de Nederlandse, Waalse en West-Duitse populaties niet noodzakelijk. Bovendien blijkt dat er lokale verschillen bestaan tussen populaties in West-Duitsland volgens voortplantingshabitat (Caspers et al., 2009; Steinfartz et al., 2007; Weitere et al., 2004). Er zijn ook genetische verschillen tussen de Vlaamse populaties. Zo zijn bijvoorbeeld de populaties uit Merelbeke genetisch duidelijk verschillend van deze uit de Vlaamse Ardennen. Er is met andere woorden een populatiestructuur. In welke mate deze gerespecteerd wordt binnen de kweekpopulatie(s), is opnieuw afhankelijk van het doel van het kweekprogramma. Indien men een kweekprogramma per bestaande metapopulatie wil uitbouwen, moet men de regels wat betreft aantal dieren en proportie aanwezige genetische variatie toepassen per metapopulatie (zie 1.1 en 1.2). In geval van totale uitbraak en massale sterfte doorheen Vlaanderen, zou het samenvoegen van dieren van verschillende Vlaamse populaties (als uitgangspopulatie voor de kweek) onvermijdelijk leiden tot een afvlakking van de genetische structuur en variatie tussen de Vlaamse populaties. Naderhand

² International Union for Conservation of Nature

zou op basis van dit soort kweek overal een genetische mix worden uitgezet die sterk verschilt van de oorspronkelijke Vlaamse populatiestructuur.

4 Discussie

Een eventuele ex situ kweek moet voorafgegaan worden door specifiek onderzoek. Enerzijds verder genetisch onderzoek, anderzijds onderzoek over voeding, ziektes, kweekcondities... Dat vergt tijd en middelen. De middelen even buiten beschouwing gelaten, lijkt tijd alvast een probleemfactor, gezien de dreiging van massale sterfte. Daarom is het in eerste instantie belangrijk dat de dispersiekansen van de schimmel geminimaliseerd worden. Verder dient nagedacht te worden over het volgende:

- Is het zinvol en haalbaar de kweek te onderhouden voor langere tijd? Zijn de middelen aanwezig om dit engagement voor een ongekende tijdsduur aan te gaan?
- Op welk moment zal beslist worden de dieren terug uit te zetten en waar? In geval van herintroductie na massale sterfte, is er nood aan een methode om na te gaan of de schimmel niet meer in het leefgebied aanwezig is, tenzij via selectie op resistentie tegen de pathogeen een adequaat niveau van resistentie is ontwikkeld in de kweekpopulatie. De omvang van de sterfte zal wellicht ook bepalend zijn voor het aantal dieren dat nodig is om elke voormalige populatie terdege terug op te starten.

Conclusie

1. De startpopulatie bevat best minimaal 95% van de genetische variatie van de bronpopulaties. Om te beoordelen welke deelpopulaties als bronpopulaties kunnen fungeren en in welke mate elke bronpopulatie bemonsterd moet worden, moet in feite de genetische variatie binnen en tussen deze populaties gekend zijn. Dit vergt aanvullend onderzoek.
2. Voor gespecialiseerde informatie betreffende de kweekcondities verwijzen we naar de website van "Amphibian Ark" (<http://www.amphibianark.org/about-us/aark-organization/>). Op de site wordt alle mogelijke informatie (normen, kweekcondities en onderzoek) betreffende de kweek van amfibieën ontsloten. Overleg met de Nederlandse medewerkers van RAVON en de Koninklijke Maatschappij voor Dierkunde van Antwerpen is eveneens aan te raden.
3. De gemiddelde heterozygositeit van de reeds onderzochte populaties lag tussen 0.50 en 0.60 en was dus relatief hoog. De effectieve populatiegrootte was daarentegen in vele populaties behoorlijk klein. Als de kweekpopulatie echter voldoende groot is en minimaal 95 % bevat van de in Vlaanderen voorhanden genetische variatie, dan is menging met de Nederlandse, Waalse en West-Duitse populaties niet noodzakelijk.
4. Afhankelijk van de doelstelling van het kweekprogramma (conservatie, genetic rescue, herintroducties, ...) dienen de criteria waaraan de kweekpopulatie moet voldoen, aangepast worden.
5. Het is in eerste instantie belangrijk dat de dispersiekansen van de schimmel geminimaliseerd worden, vermits een doelgerichte ex situ kweek nog investeringen in middelen, tijd en onderzoek vergt.

Referenties

- Caspers B.A., Junge C., Weitere M., Steinfartz S. (2009). Habitat adaptation rather than genetic distance correlates with female preference in fire salamanders (*Salamandra salamandra*). *Frontiers in Zoology* 6:13.
- Franken T. (2012). Conservation genetics of the Fire salamander (*Salamandra salamandra*) in Flanders [Master thesis]. Universiteit Antwerpen: 55 p.
- Frankham, R., Balloux, J.D., Briscoe, D.A.. (2010). *Introduction to Conservation Genetics*. 2 edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Nöllert A. & Nöllert C. (2001). *Amfibieëngids van Europa*. Tirion Uitgevers BV, Baarn, Nederland.
- Steinfartz S., Weitere M., Tautz D. (2007). Tracing the first step to speciation: ecological and genetic differentiation of a salamander population in a small forest. *Molecular Ecology* 16:4550-4561.
- Weeks A.R., Sgro C.M., Young A.G., Frankham R., Mitchell N.J., Miller K.A., Byrne M., Coates D.J., Eldridge M.D.B., Sunnucks P. et al. (2011). Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments: a genetic perspective. *Evolutionary Applications* 4:709-725.
- Weitere M., Tautz D., Neumann D., Steinfartz S. (2004). Adaptive divergence vs. environmental plasticity: tracing local genetic adaptation of metamorphosis traits in salamanders. *Molecular Ecology* 13:1665-1677.