

De Rugstreepad als strandtoerist

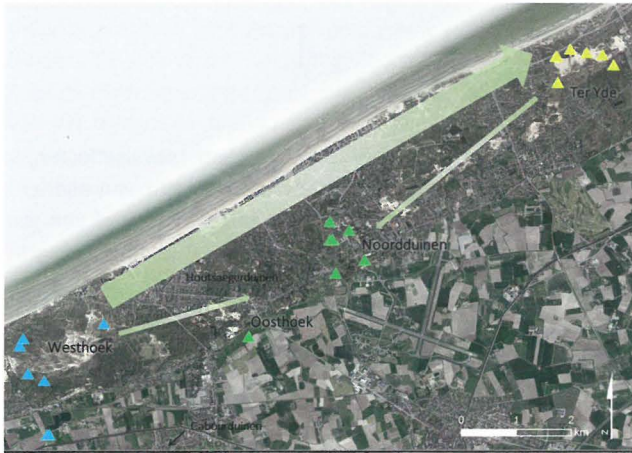
Landschapsgenetica vertelt hoe het de Rugstreepad vergaat
aan de kust

Karen Cox, Joke Maes, Hans Van Calster & Joachim Mergeay

Veel amfibieënsoorten gaan wereldwijd achteruit. Het is dus van belang om de staat van de huidige populaties te beoordelen, al is dit gewoonlijk niet eenvoudig met behulp van traditionele methodes. Ze zijn vaak moeilijk te observeren door hun nachtelijke levenswijze en het grote deel van hun leven dat ze ondergronds, onder water of in andere cryptische habitats, zoals in holen of onder boomstronken, doorbrengen. Genetisch onderzoek kan hier een oplossing bieden. Met een eenmalige bemonstering kunnen we bepalen of er sprake is van een lokale populatiestructuur of eerder van verschillende deelpopulaties die met elkaar verbonden zijn door dispersie (metapopulatiestructuur). De laatste jaren wordt genetisch onderzoek ook ingezet om de invloed van het landschap op dispersie na te gaan en meer gerichte behoudsmaatregelen voor te stellen. Hier laten we zien hoe zo'n aanpak werkt, met Vlaamse kustpopulaties van de Rugstreepad *Epidalea* (voormalig *Bufo*) *calamita* als voorbeeld.



Rugstreepad *Epidalea calamita* (© Leo Vaes)



Figuur 1. Locaties van de poelen waar rugstreeppadlarven werden bemonsterd (driehoeken). Deze werden ingedeeld in drie deelpopulaties volgens hun genetische informatie en aangeduid met verschillende kleuren. De groene pijlen geven de richting en mate van recente genenuitwisseling weer (dikkere pijlen tonen grotere mate van uitwisseling).

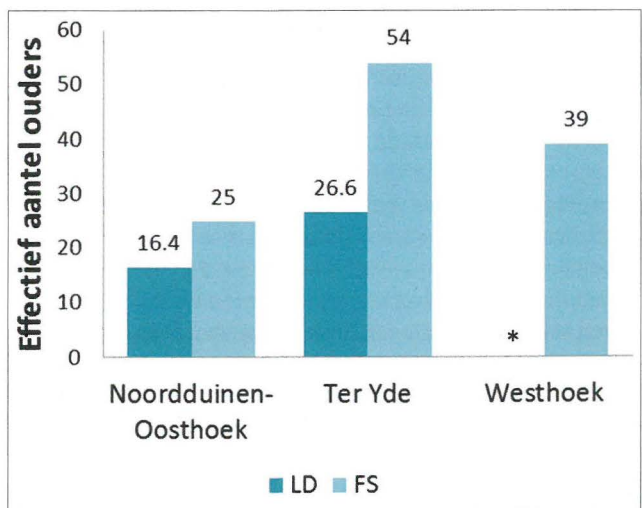
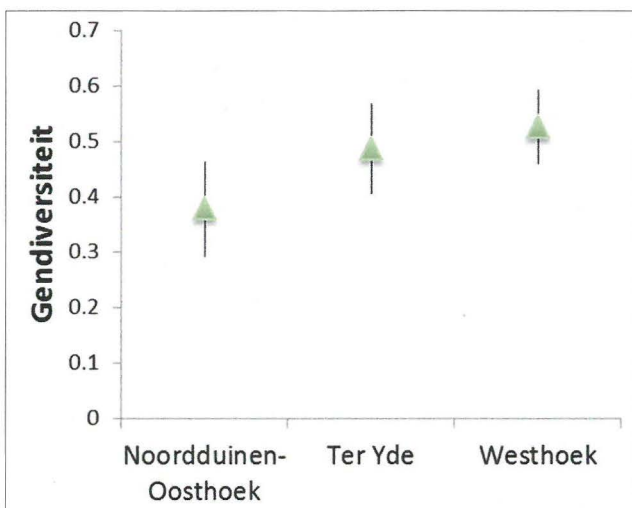
Enkele decennia geleden kwamen meerdere populaties van de Rugstreeppad verspreid voor langs de kust (Bauwens & Claus 1996). Het is niet ondenkbaar dat in de toenmalige ecoregio van de kustduinen grotere populaties voorkwamen die met elkaar in contact stonden door de uitwisseling van individuen. Wanneer deze individuen zich succesvol kunnen vestigen en zich kunnen voortplanten, is er genenuitwisseling tussen populaties, wat het niveau van genetische diversiteit (zie **Box 1**) van de ontvangende populatie op peil kan houden of zelfs verhogen. Aan de Belgische kust komt de Rugstreeppad tegenwoordig enkel nog in de duinen ten westen van de IJzer voor (Jooris et al. 2013): in de Westhoek, Cabourduinen, Oosthoek, Houtsaegerduinen, Noorduinen en Ter Yde (Figuur 1). Op de topografische kaarten van Vandermaelen (1846-1854) lijken de vastgelegde of grijze duinen nog een aaneengesloten geheel te vormen. Sindsdien geraakte het gebied steeds meer versnipperd, voornamelijk door urbanisatie, verruiging en verstruweling. Vanaf de jaren 1950 zakte de oppervlakte duinen van 730 naar 350 ha (Provoost et al.

2002). Momenteel heb je verschillende steden ingeplant in de duinengordel en wordt het naburige landschap gedomineerd door akkers, weilanden en wegen. Het is dus nog maar de vraag of de Rugstreeppaden zich kunnen handhaven in deze almaar kleinere habitatvlekken en of deze vlekken met elkaar verbonden zijn door genenuitwisseling.

Deze vragen lijken alleszins moeilijk te beantwoorden enkel op basis van veldobservaties. Hoewel de Rugstreeppad doorgaans nabij zijn geboorteplek lijkt te blijven, is het toch onduidelijk welke afstanden deze soort effectief kan overbruggen (bv. 4,4 km volgens Miaud et al. 2000). Bovendien bestaat er nog minder kennis over hoe het landgebruik de dispersie van de soort beïnvloedt. Verscheidene studies probeerden het effect van landschap op connectiviteit tussen populaties van de Rugstreeppad uit te klaren (Frei et al. 2016, Stevens et al. 2004, 2006a en 2006b). Hieruit blijkt dat het ene landschap het andere niet is. De ruimtelijke samenstelling, de graad van heterogeniteit en de aanwezige landgebruikstypes kunnen sterk verschillen. Om meer te kunnen zeggen over de connectiviteit van rugstreeppadpopulaties aan de Belgische Westkust moeten we daarom het gebied in kwestie zelf onder de loep nemen. In ons studiegebied zou je kunnen verwachten dat de geografische afstand tussen vindplaatsen de voornaamste oorzaak is van de aanwezige, ruimtelijke populatiestructuur. Dit noemt men isolatie-door-afstand (isolation-by-distance), wat neerkomt op een afnemende verwantschap tussen individuen naarmate ze verder van elkaar voorkomen. Toch is het landschap zo heterogeen dat ook hiervan een effect op connectiviteit kan verwacht worden. Met inzicht in de populaties, hun genetische structuur en in de invloed van het landschap op de connectiviteit willen we aanbevelingen doen voor beheer.

Van staartpuntjes tot genetische variatie

In 2014 werden voornamelijk staartpuntjes van larven verzameld in 23 poelen verdeeld over de Westhoek, Oosthoek, Noorduinen en Ter Yde. Ook werden enkele eitjes van eenzelfde



Figuur 2. De gendiversiteit, d.i. een maat van genetische variatie, met standaardfout (links) en het effectief aantal ouders (rechts) per deelpopulatie bepaald met twee methodes, de linkage disequilibriummethode (LD) en de verwantschapmethode (FS) (meer informatie over de gebruikte methodes is te vinden in Cox et al. 2015, 2017). Zowel de genetische variatie als het effectief aantal ouders (zie **Box 1**) zijn het laagste in Noorduinen-Oosthoek. *Deze schatting is onbetrouwbaar en is daarom weggelaten.

Box 1: Begrippen

Genetische diversiteit

Dit is het bestaan van verschillen in het genetisch materiaal, in dit geval van een populatie. Dit wordt geschat aan de hand van het aantal en de frequentie van de aanwezige allelen. Voor diploïde organismen, zoals de Rugstreeppad, zijn er steeds twee allelen of varianten per gen (één op elk chromosoom). Dit kunnen twee dezelfde allelen zijn (homozygoot) of twee verschillende (heterozygoot). Een voldoende hoge genetische variatie is nodig voor de leefbaarheid van een populatie op lange termijn. Het risico op de achteruitgang van een populatie wordt steeds groter naarmate de populatie kleiner wordt, bijvoorbeeld door habitatfragmentatie, en de genenuitwisseling met andere populaties belemmerd wordt.

Microsatelliet

Kleine stukjes repetitief DNA die willekeurig voorkomen binnen het genoom. Het is doorgaans een zeer variabele genetische merker. Elk individu heeft dus ook twee allelen per microsatelliet. De combinatie van allelen voor een set van microsatellieten (of een ander type merkers) levert een **genetisch profiel** van een individu. Dit wordt ook wel het **genotype** van het individu genoemd.

Effectief aantal ouders

De effectieve populatiegrootte kan een belangrijk inzicht geven over de levensvatbaarheid van een populatie. Genetische drift leidt altijd tot verlies aan genetische variatie

(d.i. verlies aan genetische diversiteit door toevalseffecten). De grootte en aard van het verlies is afhankelijk van allerlei factoren, zoals uiteraard populatiegrootte. Instinctief zou je zeggen dat een grote populatie minder sterk onderhevig is aan genetische drift. Maar niet elke grote populatie, in de zin van het totaal aantal volwassen individuen, gedraagt zich zo. Drift staat met andere woorden niet in verhouding tot de totale grootte of censusgrootte, maar tot de effectieve grootte. Dit is de grootte van een theoretisch ideale populatie, die in gelijke mate onderhevig is aan genetische drift als de populatie in kwestie. Deze maat laat ons toe om te beoordelen of een populatie voldoende weerbaar is tegen drift en inteelt. De effectieve grootte is gewoonlijk veel kleiner dan de censusgrootte. Omdat we in deze studie met larven werken uit één jaar, kunnen enkel de zogenaamde 'single-sample estimators' als schatters van de effectieve populatiegrootte gebruikt worden. Daarnaast is de Rugstreeppad een soort met overlappende generaties, waardoor de schatting eerder het effectief aantal ouders benadert dan wel de effectieve populatiegrootte. Het effectief aantal ouders heeft de bemonsterde geboortecohorte geproduceerd en bevat een deel van de informatie vevat in de effectieve populatiegrootte.

Genetische afstand

De genetische afstand wordt bepaald aan de hand van het verschil tussen de genetische profielen van twee individuen.

eisnoer verzameld in dezelfde gebieden (twee eisnoeren in Noordduinen, één eisnoer in de overige). De larven afkomstig van eenzelfde eisnoer zijn broers en zussen. Deze kennis kan als referentie dienen om andere nauwe verwanten op te sporen. Om de genetische toestand van een populatie correct te kunnen bepalen, mogen er namelijk niet te veel nauwe verwanten voorkomen in de steekproef (Goldberg & Waits 2010). Dit zou je wel kunnen verwachten bij larven uit poelen. Daarom werd finaal telkens maar van één larve per familie het genotype overgehouden voor de verdere verwerking. We gebruikten elf gepubliceerde microsatellieten als genetische merkers om een genetisch profiel (of genotype) voor elk individu te bekomen (zie **Box 1**).

Initieel hadden we genotypen van 256 individuen uit 23 poelen, maar na de verwijdering van potentiële broers en zussen bleven er nog profielen van 152 larven over. Als we dan zochten naar de populatiestructuur of naar groepen van individuen waarbinnen er een zekere genetische uniformiteit heerst of waarbinnen een hogere verwantschap bestaat dan tussen de groepen, bleken de Rugstreeppadden van de Westhoek en Ter Yde eerder tot aparte deelpopulaties te behoren, terwijl deze van de Noordduinen en de Oosthoek meer een geheel vormden (**Figuur 1**) (Cox et al. 2017, Cox & Mergeay 2015). We noemen hen vanaf nu deelpopulatie Noordduinen-Oosthoek. Hoewel Noordduinen-Oosthoek geografisch tussen Westhoek en Ter Yde gelegen is, is het genetische verschil tussen de eerste en elk van de twee

overige deelpopulaties hoger dan tussen Westhoek en Ter Yde. We onderzochten ook de mate van recente genenuitwisseling (tijdens de laatste generatie) tussen de drie deelpopulaties. Uit de resultaten bleek dat er onverwacht veel dispersie was vanuit de Westhoek naar Ter Yde, maar niet in omgekeerde richting. Hiervoor moet de Rugstreeppad een minimale afstand van circa 8,5 km overbruggen. Ook was er beperkte effectieve dispersie naar Noordduinen-Oosthoek vanuit de twee andere deelpopulaties.

Nu de structuur van de metapopulatie bekend is, kunnen we de genetische variatie voor elke deelpopulatie beoordelen. Deze blijkt vergelijkbaar te zijn met andere Noordwest Europese populaties (Cox et al. 2017), behalve voor deelpopulatie Noordduinen-Oosthoek, want die is eerder aan de lage kant (**Figuur 2**). Ook wat het effectief aantal ouders betreft (zie **Box 1**), scoort dezelfde deelpopulatie het slechtst. Maar 16 à 25 adulte rugstreeppadden hebben effectief bijgedragen aan de bemonsterde generatie. Deze genetische maten geven dus aan dat het minder goed gesteld is met deze deelpopulatie.

Landschap als elektrisch netwerk

Door een hoge plaatselijke dichtheid van een soort kan er competitie ontstaan om paringspartners of om voedsel, wat het zoeken naar betere oorden kan stimuleren (Travis et al. 1999). Elk

individueel heeft ook zijn eigen persoonlijkheid. Je hebt bijvoorbeeld durvers die zich verder van hun geboorteplek verplaatsen en je hebt de meer honkvaste types. Naast de kwaliteit en de grootte van het leefgebied die de populatiedensiteit kunnen beïnvloeden, is er nog het landschap tussen habitatvlekken dat dispersie bevordert dan wel belemmert. Welk landgebruik bevorderlijk is voor dispersie is sterk soortafhankelijk. Doorgaans wordt uitgegaan van de kennis van experts om de ecologische kost of de hoeveelheid weerstand die een individu zal ondervinden bij het doorkruisen van een landgebruikstype te bepalen. Ook in deze studie werd deze kennis gebruikt, voornamelijk uit voorgaande studies, om een initiële hypothese op te stellen. Als basis gebruikten we de Landgebruikskarta NARA-T 2014 (Poelmans & Van Daele 2014), waarvan we het aantal landgebruiksklassen reduceerden tot twaalf. Ook de verschillende categorieën waterwegen, trein- en tramlijnen werden toegevoegd. In totaal resulteerde dit in een kaart met zestien landgebruiksklassen: open duinlandschap, gesloten duinlandschap, strand en slikken, grasland, laag groen, struweel, hoog groen, bos, akker, infrastructuur (d.i. onbebouwde, harde oppervlakken, inclusief wegen), waterelement, bevaarbare waterweg, overige waterwegen, tramlijn, treinlijn en bebouwing. Er werden meerdere scenario's vooropgesteld voor de weerstand die het betreffende landschap tegen dispersie biedt. Zo werden bijvoorbeeld verschillende weerstandswaarden voor eenzelfde landgebruikstype getest. De in totaal zestig scenario's werden vertaald in rasterkaarten met een resolutie van 10 op 10 meter (**Figuur 3**), die als basis dienden voor de berekening van afstanden tussen de bemonsterde poelen. Dit gebeurde met behulp van algoritmen geleend uit de elektriciteitsleer (McRae et al. 2008). Elke cel van een rasterkaart is een knooppunt in het netwerk. De verbindingen tussen knooppunten bieden 'elektrische weerstand' tegen mobiliteit, waarbij het type landgebruik de hoeveelheid weerstand bepaalt. Uitgaande van het principe dat een kleinere genetische afstand (zie **Box 1**) tussen individuen een zekere uitwisseling impliceert, kan je stellen dat genetische afstanden een maat zijn voor effectieve dispersie. Wij evalueerden welk van de zestig scenario's dan wel het isolatie-door-afstand scenario deze genetische afstanden het best verklaart.



Rugstreeppad verdronken tijdens vloed en aangespoeld in het vloedmerk. (© Koen Verschoore)



Figuur 3. Een weerstandskarta van het gedeelte met de Noordduinen, waarbij landgebruiksklassen een weerstandswaarde tegen dispersie van 1 tot 10 kregen toegewezen volgens een bepaald scenario. Hoe hoger de waarde, hoe moeilijker het gebied te doorkruisen is.

Urbanisatie als rem voor effectieve dispersie

Na evaluatie van de resultaten blijken bepaalde scenario's de genetische afstanden het beste te verklaren. Deze scenario's suggereren dat Rugstreeppadden zich in het studiegebied het gemakkelijkst kunnen verplaatsen in open gebied en steeds meer moeite ondervinden naarmate de begroeiing hoger wordt en de urbanisatiegraad toeneemt. Tegelijk blijkt het strand de belangrijkste verbinding te zijn tussen de deelpopulaties in de Westhoek en in Ter Yde. Dat dispersie vooral vanuit de Westhoek gebeurt naar Ter Yde heeft mogelijk te maken met de betere habitatkwaliteit van de Westhoek. Het gebied is groter, meer aaneengesloten en heeft meer voortplantingswateren (Provoost et al. 2011). Die zijn bovendien meer variabel wat oppervlakte en diepte betreft, terwijl ze in de Noordduinen en Ter Yde vaak artificieel en bijgevolg dieper zijn. Diepere poelen zijn misschien minder vatbaar voor uitdroging, maar zijn daardoor geschikt voor de predatoren van rugstreeppadlarven zoals libellenlarven en voor concurrerende soorten zoals Gewone pad (*Bufo bufo*) (Banks & Beebee 1988, Bardsley & Beebee 2001). In de Westhoek zou bijgevolg het voortplantingssucces stabielere kunnen zijn en hogere lokale densiteiten kunnen opleveren. Zoals eerder vermeld kan een hogere dichtheid onderlinge competitie verhogen en emigratie stimuleren.

Dat urbane elementen een rem kunnen betekenen voor dispersie werd al vaak in voorgaande studies op amfibieën gevonden (bv. Emaresi et al. 2011, Richardson 2012). Ook in onze studie kwam bebouwing in combinatie met andere elementen zoals bevaarbare waterwegen of trein- en tramsporen dikwijls als de sterkst limiterende factor voor connectiviteit naar voor. De weerstandswaarde voor deze elementen in onze beste modellen bleek wel de laagste onder de geteste waarden, maar dan met een hoger contrast tussen de verschillende landgebruiksklassen. De Rugstreeppad waagt zich wel eens in de stad. Men vindt hem dan in tuinen of afvoerputjes (Floris Verhaeghe pers. med., Provoost et al. 2011). Er is nog onzekerheid over de invloed van bijvoorbeeld akkers en infrastructuur. Akkers komen nauwelijks voor tussen de poelen, eerder ten zuiden van de duinen, wat



Duinpan in Noorduinen. (© Floris Verhaeghe)

het variabel resultaat voor dit landgebruikstype kan verklaren. Infrastructuur en dan vooral wegen zijn echter abundant in het studiegebied. Hoewel de wegen vaak vergezeld zijn van bebouwing is het onduidelijk of ze minder of even moeilijk te doorkruisen zijn. In ieder geval zijn wegen minder gemakkelijk over te steken dan bijvoorbeeld graslanden, in tegenstelling tot wat Stevens et al. (2006b) in hun studie vonden. Zij vonden dat dispersie bij Rugstreeppad eerder door de voorkeur voor een bepaald landgebruik werd bepaald en minder door de weerstand die dat landgebruik geeft voor verplaatsingen. Samengevat waren de geprefereerde landschapselementen niet noodzakelijk deze met een lage weerstand. In hun model van habitatvoorkeuren kreeg bos een lagere weerstandswaarde dan open gebied. Gelijkaardige scenario's in onze studie vertoonden echter een veel minder sterk verband met de genetische afstanden. Een mogelijke verklaring voor de verschillende resultaten tussen beide studies is het verschil in landschap. Het studiegebied van Stevens et al. (2006b), gelegen tussen Samber en Maas, bestaat uit klei- en grindgroeves, geen duinen, en bevat een hoger aandeel bos van andere bostypes dan deze aan de kust. Ook komen er minder bebouwing en wegen voor. Mogelijk speelt ook de hogere verkeersdrukte van de wegen aan de Vlaamse kust een

rol, want hier zullen waarschijnlijk meer verkeersslachtoffers vallen (Beebee 2013). In toekomstige modellen zou de graad van verkeersdrukte opgenomen kunnen worden om het effect van de verschillende types aan wegen op dispersie te verduidelijken.

Deelpopulatie Noorduinen-Oosthoek in de verdrinking

Hoewel de Rugstreeppad een grote afstand lijkt te kunnen overbruggen (hier 8,5 km over een periode van een generatie), geeft dat niet de garantie op een goede connectiviteit die de achteruitgang van genetische variatie moet tegengaan. Aan de Belgische kust lijkt vooral de deelpopulatie van Noorduinen-Oosthoek het moeilijk te hebben. Onze resultaten geven aan dat in het heterogene, sterk geürbaniseerde landschap genenuitwisseling het beste verloopt via de duinen en het strand. De kleine deelpopulatie van Noorduinen-Oosthoek kan niet profiteren van het strand als corridor omdat er geen open ruimtes of duinen zijn, zoals in de Westhoek en Ter Yde, die de populatie met het strand verbinden. De deelpopulatie is helemaal ingesloten door de stad Koksijde, die volgens onze resultaten de connectiviteit met de andere deelpopulaties limiteert. Het is uiteraard moeilijk om een urbaan landschap om te vormen, maar misschien kunnen enkele maatregelen toch een verschil maken. De private tuinen kunnen bijvoorbeeld padvriendelijk ingericht worden. Ook het plaatsen van paddentunnels onder de wegen kan een hulpmiddel zijn om de urbane kern te doorkruisen. Omdat de Rugstreeppad een pionierssoort is die de natuurlijke dynamiek van de duinen verkiest, kan de verdere verruiging en verstruweling van het leefgebied een achteruitgang van de populaties in de hand werken. Het huidige graas- en maaibeheer moet dus gehandhaafd worden om tenminste het aanwezige leefgebied te behouden. Verder onderzoek naar de lokale demografie en de kwaliteit van het leefgebied kan meer inzicht opleveren in de mogelijke aanleidingen tot dispersie in het studiegebied. Regelmatige observaties of metingen van populatiedichtheden en parameters die het leefgebied typeren zouden hiervoor de nodige informatie kunnen opleveren. Samen met de monitoring van de genetische diversiteit en effectieve populatiegrootte kan zowel de achteruitgang van populaties helpen anticiperen als de resultaten op basis van de ruimtelijke analyse verder uitklaren.



Dikkopjes klaar voor staalname (© Floris Verhaeghe)

SUMMARY

Cox K., Maes J., Van Calster H. & Mergeay J. 2017. Natterjack Toad as a beach tourist. Landscape genetics reveals conservation issues of Natterjack Toad populations at the Belgian coast. *Natuur.focus* 16(4): 152-157. [in Dutch]

Numerous amphibian species are facing population declines and even extinction. Habitat fragmentation due to natural and anthropogenic influences can negatively affect connectivity and can cause gene pools to become small and isolated with an accelerated loss in genetic variation and, in turn, reduced fitness and increased extinction risks as consequences, to which especially amphibian populations are vulnerable. Molecular genetic analyses are useful to help unravel (meta)population structure and connectivity, particularly when direct observations are problematic and time consuming, as observations of amphibians often are. The last few years genetics are increasingly applied to evaluate the influence of the landscape on effective dispersion. In this study we investigated the last few coastal populations of Natterjack Toad *Epidalea* (formally *Bufo*) *calamita* in Belgium, applying such genetic approaches. We identified three subpopulations with unidirectional levels of gene flow among the two most geographically separated subpopulations (Westhoek and Ter Yde), while the geographically intermediate subpopulation (Noordduinen-Oosthoek) only received a limited number of migrants. In order to analyze which landscape features affect functional connectivity and to what extent, sixty different landscape resistance scenarios as well as the isolation-by-distance model were compared using two landscape genetics approaches. Urbanization and vegetation height negatively affected connectivity, while the beach seemed to act as a corridor between Westhoek and Ter Yde. As the subpopulation at Noordduinen-Oosthoek was the smallest, least genetically diverse and most isolated, conservation measures are needed to maintain habitat quality and to improve connectivity with the other two subpopulations.

DANK

De studie was onderdeel van een samenwerking tussen INBO en het Agentschap voor Natuur en Bos (ANB). We willen graag het lokale ANB-personeel en vrijwilligers bedanken voor het uitvoeren van de staalname en Floris Verhaeghe voor de algemene coördinatie en opvolging. Tenslotte nog dank aan ons labopersoneel, waaronder Sabrina Neyrinck, An Van Breusegem en Nancy Van Liefveringe. Zij zorgden voor de laboanalyses en voerden een eindeloze reeks testen uit om dit project tot een goed einde te brengen.

AUTEURS

Karen Cox en Joachim Mergeay zijn onderzoekers in het team Genetische Diversiteit aan het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. Hans Van Calster werkt als onderzoeker aan hetzelfde instituut in het team Biometrie, Methodologie en Kwaliteitszorg. Joke Maes is project-medewerker agrarisch natuur- en landschapsbeheer aan het Regionaal Landschap Kleine en Grote Nete en is ook onderzoeker bij de groep Evolutionaire Ecologie aan het departement Biologie van de Universiteit Antwerpen.

CONTACT

Karen Cox, Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO), Genetische Diversiteit, Gaverstraat 4, 9500 Geraardsbergen

E-mail: karen.cox@inbo.be

REFERENTIES

- Banks B. & Beebee T.J.C. 1988. Reproductive success of Natterjack Toads *Bufo calamita* in two contrasting habitats. *Journal of Animal Ecology* 57(2): 475-492.
- Bardsley L. & Beebee T.J. 2001. Strength and mechanisms of competition between common and endangered anurans. *Ecological Applications* 11(2):453-463.
- Beebee T.J.C. 2013. Effects of road mortality and mitigation measures on amphibian populations. *Conservation Biology* 27(4):657-668.
- 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*, Advance online publication. doi: 10.1007/s10592-017-0985-z.
- Cox K. & Mergeay J. 2015. Genetische beoordeling van potentiële bronpopulaties Rugstreeppad voor herintroductie in Zwinstreek. Brussel. INBO.R.2015.9091964.
- Emaresi G., Pellet J., Dubey S., Hirzel A.H. & Fumagalli L. 2011. Landscape genetics of the Alpine newt *Mesotriton alpestris* inferred from a strip-based approach. *Conserv Genet* 12(1):41-50.
- Frei M., Csencsics D., Brodbeck S., Schweizer E., Bühler C., Gugerli F. et al. 2016. Combining landscape genetics, radio-tracking and long-term monitoring to derive management implications for Natterjack toads *Epidalea calamita* in agricultural landscapes. *J Nat Conserv* 32:22-34.
- Goldberg C.S. & Waits L.P. 2010. Quantification and reduction of bias from sampling larvae to infer population and landscape genetic structure. *Molecular Ecology Resources* 10(2):304-313.
- Jooris R., Engelen P., Speybroeck J., Lewylye I., Louette G., Bauwens D. et al. 2013. De amfibieën en reptielen van Vlaanderen. Recente verspreiding en toelichting bij de nieuwe Rode Lijst. Mechelen. 9789057183201.
- McRae B.H., Dickson B.G., Keitt T.H. & Shah V.B. 2008. Using circuit theory to model connectivity in ecology, evolution, and conservation. *Ecology* 89(10):2712-2724.
- Miaud C., Sanuy D. & Avriillier J.-N. 2000. Terrestrial movements of the Natterjack Toad *Bufo calamita* (Amphibia, Anura) in a semi-arid, agricultural landscape. *Amphibia-Reptilia* 21(3):357-369.
- Poelmans L. & Van Daele T. 2014. Landgebruikskaart NARA-T 2014. Studie uitgevoerd in opdracht van het INBO. Referentietraak Natuurrapportering Vlaanderen. VITO, Mol.
- Provoost S., Ampe C., Bonte D., Cosyns E. & Hoffmann M. 2002. Ecology, management and monitoring of dune grasslands in Flanders, Belgium. *Littoral 2002 The Changing Coast*:11-22.
- Provoost S., Feys S., Van Gompel W. & Vercurysse W. 2011. Evaluatie van het gevoerde beheer en opmaak van een beheerplan voor het VNR De Duinen en Bossen van De Panne. Deel I: Evaluatie van het gevoerde beheer in de deelgebieden Houtsaegerduinen en de Westhoek. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. INBO.R.2011.53.
- Richardson J.L. 2012. Divergent landscape effects on population connectivity in two co occurring amphibian species. *Molecular Ecology* 21(18):4437-4451.
- Stevens V.M., Leboulengé É., Wesselingh R.A. & Baguette M. 2006a. Quantifying functional connectivity. Experimental assessment of boundary permeability for the Natterjack Toad *Bufo calamita*. *Oecologia* 150(1):161-171.
- Stevens V.M., Polus E., Wesselingh R.A., Schtickzelle N. & Baguette M. 2004. Quantifying functional connectivity. Experimental evidence for patch-specific resistance in the Natterjack toad *Bufo calamita*. *Landscape Ecology* 19(8):829-842.
- Stevens V.M., Verkenne C., Vandewoestijne S., Wesselingh R.A. & Baguette M. 2006b. Gene flow and functional connectivity in the Natterjack Toad. *Molecular Ecology* 15(9):2333-2344.
- Travis J.M.J., Murrell D.J. & Dytham C. 1999. The evolution of density-dependent dispersal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266(1431):1837-1837.