



Vlaanderen
is wetenschap

Een genetische studie van Chinese muntjak in Vlaanderen

Io Deflem, Bram D'hondt, Zoë De Corte, Caroline Mouton, An Van Breusegem, Sabrina Neyrinck,
Tim Adriaens, Joachim Mergeay

INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK

Auteurs:

Io Deflem , Bram D'hondt , Zoë De Corte , Caroline Mouton , An Van Breusegem , Sabrina Neyrinck , Tim Adriaens , Joachim Mergeay 

Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Reviewer:

Karen Cox

Het INBO is het onafhankelijk onderzoeksinstituut van de Vlaamse overheid dat via toegepast wetenschappelijk onderzoek, data- en kennisontsluiting het biodiversiteitsbeleid en -beheer onderbouwt en evalueert.

Vestiging:

Herman Teirlinckgebouw

INBO Brussel

Havenlaan 88 bus 73, 1000 Brussel

vlaanderen.be/inbo

e-mail:

bram.dhondt@inbo.be

Wijze van citeren:

Deflem I, D'hondt B, De Corte Z, Mouton C, Van Breusegem A, Neyrinck S, Adriaens T, Mergeay J. Een genetische studie van Chinese muntjak in Vlaanderen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2022 (23). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

DOI: doi.org/10.21436/inbor.84191641

D/2022/3241/246

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2022 (23)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Maurice Hoffmann

Foto cover:

Yves Adams / Vilda



Dit werk valt onder een [Creative Commons Naamsvermelding-GelijkDelen 4.0 Internationaal-licentie](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

EEN GENETISCHE STUDIE VAN CHINESE MUNTJAK IN VLAANDEREN

Io Deflem, Bram D'hondt, Zoë De Corte, Caroline Mouton, An Van Breusegem,
Sabrina Neyrinck, Tim Adriaens, Joachim Mergeay

doi.org/10.21436/inbor.84191641

Dankwoord

De auteurs willen hun uitdrukkelijke dank betuigen aan het Agentschap voor Natuur en Bos (ANB, afdelingen Algemeen Beleid en Natuurinspectie), als opdrachtgever maar ook voor het verlenen van de meerderheid aan stalen. Stalen werden ook aangeleverd door jagers uit Vlaanderen; Alastair Ward, David Hooton, Karl Ivens, John Hargreaves (Engeland); Ellen Van Norren (Nederland); en Jean-François Maillard (Frankrijk). Daarnaast bedanken we Ariane Staelens en Tom Ruttink van het Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek (ILVO) voor de ondersteuning bij de laboanalyses. Axel Neukermans, Jan Vercammen en Sander Devisscher worden bedankt voor assistentie bij het ophalen en verwerken van stalen.

Samenvatting

De Chinese muntjak is een kleine hertensoort die door de mens is geïntroduceerd in Europa. In Groot-Brittannië is de soort één van de meest algemene hoefdieren geworden. Vanwege schade aan akkers, tuinen en plantsoenen, en voornamelijk aan bossen, wordt muntjak nu beschouwd als een probleemsoort. Om een herhaling van het Britse scenario op het Europese vasteland te vermijden, geldt er sinds 2016 een strikt verbod op de import, kweek en uitwisseling van muntjak (Verordening EU nr. 1143/2014).

Vlaanderen lijkt momenteel het zwaartepunt te vormen van het voorkomen van muntjak binnen de Europese Unie. De dynamiek in verspreiding is complex, omdat deze gestuurd wordt door menselijk handelen enerzijds (bv. uitwisselingen, lethaal beheer) en door natuurlijke processen anderzijds (bv. dispersie, natuurlijke mortaliteit). Om deze processen te kunnen ontrafelen, moet de genetische signatuur van individuen, families en populaties bekend zijn.

Het doel van dit rapport is tweedelig. In een eerste fase worden patronen van genetische diversiteit, structuur en onderlinge verwantschappen van muntjak in Vlaanderen bestudeerd. In een tweede fase wordt een protocol ontwikkeld waarmee verwantschappen van nieuwe, in de toekomst aangeleverde stalen kunnen worden onderzocht.

In totaal gebruikten we voor deze studie 175 stalen uit Vlaanderen, van vrijlevende en gehouden dieren. Deze werden aangevuld met stalen uit het Verenigd Koninkrijk, Nederland en Frankrijk. Uit de stalen werd DNA geëxtraheerd en gegenotypeerd, met de bedoeling kleine genoomvariaties of *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP's) te identificeren. Finaal werden 18.762 SNP's geïdentificeerd in 126 individuen. Hieruit werden ook 151 SNP's geselecteerd die de structuur op basis van de totale set SNP's zo goed als mogelijk benaderen, en toekomstige analyses op een routinematige wijze mogelijk maken.

Samenvattend kunnen we stellen dat er zich in Vlaanderen een duidelijke structuur aftekent. Hierbij zijn genetische clusters te onderscheiden, waarbinnen gehouden en/of wilde dieren onderling verwant zijn. Sommige locaties met (voormalig) gehouden dieren geven blijk van inteelt. De totale genetische diversiteit van de Vlaamse populatie ligt in lijn met die in het Verenigd Koninkrijk.

De herkomst van de vooralsnog belangrijkste populatie in het wild, ten oosten van de stad Antwerpen, is gekend. Zij staat los van alle andere (voormalig) gehouden populaties uit dit onderzoek. Er zijn bovendien genetische indicaties dat deze populatie relatief groot is en zich ruimtelijk uitbreidt.

De analyses van de overige locaties wijzen op een belangrijke mate van menselijk handelen, waarbij gehouden dieren van eigenaar zijn gewisseld (al dan niet recent, al dan niet rechtstreeks, al dan niet legaal). Besluiten daaromtrent kunnen evenwel niet louter op verwantschapscoëfficiënten worden gebaseerd, zonder verdere details van individuen, locaties en, desgevallend, handhavingdossiers.

Aanbevelingen voor beheer en/of beleid

Vlaanderen is momenteel de regio binnen de Europese Unie met de belangrijkste aanwezigheid van Chinese muntjak (in termen van areaal en de regelmaat van waarnemingen). In overeenstemming met de internationale afspraken (Verordening EU nr. 1143/2014), en ter preventie van ecologische schade binnen het Vlaamse Gewest (met name aan bossen), moet de populatie zo goed als mogelijk beheerd worden. Dit omvat een strikte handhaving van het verbod op bezit, kweek, uitwisseling en vrijlating van gehouden muntjakken enerzijds, en het verwijderen van alle dieren uit het wild anderzijds.

De genetische referentiedatabank die voor dit rapport is opgesteld (SNP-panel en geanalyseerde specimens) kan (1) handhavers bijstaan in het blootleggen van illegale activiteiten met muntjak, (2) beheerders informeren over de herkomst van dieren in het wild, en (3) wetenschappers helpen om ecologische processen en patronen te ontrafelen.

English abstract

The Chinese muntjac is a small deer species introduced to Europe by humans. The species has now become one of the most common ungulates in Great Britain. Due to severe damage to crops, gardens, and parks, and primarily to forests, muntjac is now considered a problematic invasive species. To avoid a repetition of the British scenario on the European mainland, a strict ban on the import, breeding, and exchange of muntjac has been in place since 2016 (Regulation EU No 1143/2014).

Currently, Flanders seems to comprise the largest muntjac population within the European Union. The species' spread dynamics are complex, as they are driven by both human actions (e.g., exchange, lethal control) and natural processes (e.g., dispersal, mortality). To understand the underlying processes, we investigated genetic patterns of individuals, families, and populations.

The aims of this report were twofold. First, patterns of genetic diversity, structure, and kinship of muntjac in Flanders were studied. Second, a protocol was developed that allows to investigate relationships of new samples supplied in the future.

A total of 175 samples from Flanders were obtained, both from free-living and captive animals. These were supplemented with samples from the United Kingdom, the Netherlands and France. DNA was extracted from the samples and genotyped, with the aim of identifying small variations in the genome (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). A total 18.762 SNPs were identified in 126 individuals. Next, 151 SNPs, representing the structure of the full dataset, were selected for future routine analyses.

In summary, we observed a clear population genetic structure of muntjac in Flanders. We observed multiple genetic clusters that comprise both free-living and captive individuals. Some (former) locations with captive animals showed evidence of inbreeding. Overall, genetic diversity of the Flemish population is in line with the diversity among individuals in the United Kingdom.

The origin of the most important population in the wild, east of the city of Antwerp, is elucidated. Individuals here were genetically distinct from all other (former) captive populations. Moreover, there are genetic indications that this population is relatively large and expanding spatially.

The analyses of the other locations indicate an important degree of human involvement, in which captive animals have been exchanged (recently or not, directly or indirectly, legal or illegal). However, the kinship coefficients do not allow to infer on the underlying motivations without taking additional detail from individuals, locations, and law enforcement files into account.

Inhoudstafel

Dankwoord	2
Samenvatting	3
Aanbevelingen voor beheer en/of beleid	4
English abstract	5
1 Inleiding.....	7
1.1 Herkomst en ecologie van muntjak.....	7
1.2 Muntjak in Europa	8
1.2.1 Muntjak in Groot-Brittannië.....	8
1.2.2 Beleid en wetgeving	9
1.2.3 Muntjak in continentaal Europa.....	10
1.2.4 Muntjak in Vlaanderen.....	11
1.3 Genetische monitoring van muntjak.....	13
1.4 Doelstellingen.....	14
2 Werkwijze.....	15
2.1 Staalname.....	15
2.2 Genetische analyses	17
2.2.1 Genotypering.....	17
2.2.2 Bio-informatica.....	17
2.2.3 Dataverwerking	18
2.3 Routinematige monitoring	20
2.3.1 Selectie SNP's	20
2.3.2 Primer design en validatie panel.....	20
3 Resultaten	22
3.1 Genetische diversiteit	22
3.2 Effectieve populatiegroottes.....	23
3.3 Genetische structuur.....	23
3.4 Verwantschappen	26
3.5 Ontwikkeling SNP-panel	32
4 Discussie	34
4.1 Genetische diversiteit en effectieve populatiegroottes	37
4.2 Genetische structuur.....	37
4.3 Verwantschappen	38
4.4 Genetica van muntjak in vlaanderen	39
4.5 Routinematige monitoring	40
Referenties	41

1 INLEIDING

1.1 HERKOMST EN ECOLOGIE VAN MUNTJAK

De Chinese muntjak (*Muntiacus reevesi*), ook kortweg muntjak genoemd, is een kleine hertensoort die inheems is in Centraal- en Zuid-China (ondersoort *M. reevesi reevesi*) en in Taiwan (*M. reevesi micrurus*). De soort komt hier in gematigde en subtropische struwelen en bossen voor, waar het dieet voornamelijk bestaat uit bladeren, vruchten en twijgen (Timmins & Chan 2016). Met een schouderhoogte van gemiddeld 45 tot 50 cm is de muntjak zeer klein van gestalte (Chapman 2008 in Cooke 2019). Bokken worden gekenmerkt door een donkere, V-vormige koptekening, een kort, naar achteren gericht gewei bestaande uit één stang, en opvallende slagstanden (Putman 2009; **Figuur 1**). De geiten hebben een ruitvormige koptekening en hebben geen gewei, de slagstanden komen niet onder de bovenlip uit (Cooke 2019, Smith-Jones 2004).



Figuur 1. Chinese muntjak (bok) met typische slagstanden, gewei en V-vormige tekening op de kop (Vilda: Yves Adams).

De voortplanting is bij muntjak niet aan seizoenen gebonden. Geiten zijn seksueel rijp vanaf een gewicht van ongeveer 10 kilogram, wat doorgaans op een leeftijd van zeven maanden wordt bereikt (Chapman & Harris 1996 in Cooke 2019). De dracht duurt zeven maanden en geiten kunnen na een geboorte snel opnieuw bevrucht worden (gemiddeld 233 dagen tussen opeenvolgende geboortes; Chapman et al. 1997). Op elk gegeven tijdstip is de meerderheid

van de vrouwelijke dieren in een florerende populatie dan ook drachtig. Een worp bestaat doorgaans uit één kalf (Cooke 2019). In het wild zouden dieren zelden ouder dan vijf (Chapman 2008 in Cooke 2019) à tien jaar oud worden (Smith-Jones 2004).

Muntjak staat op de Rode Lijst van China vermeld als 'kwetsbaar', doordat de populatie sterk gefragmenteerd is, het areaal krimpt en de kwaliteit van het habitat achteruitgaat (Chapman et al. 2021, Jiang et al. 2016). De huidige internationale Rode Lijst-status ('niet bedreigd', Timmins & Chan 2016) wordt daarom herzien.

1.2 MUNTJAK IN EUROPA

De Chinese muntjak is door de mens in Europa geïntroduceerd. De referentie wordt gesteld door Groot-Brittannië (Verenigd Koninkrijk), waar de soort één van de meest algemene hoefdieren is geworden (zie Bottiau 2018, Casaer et al. 2015, Cooke 2019 en Smith-Jones 2004 voor monografieën over muntjak). De ecologische impact van muntjak vormde de aanleiding voor een toegewijde, internationale aanpak voor de preventie van nieuwe introducties. Hieronder bespreken we achtereenvolgens de situatie in Groot-Brittannië, het wetgevende kader, de situatie op het Europese vasteland, en de situatie in Vlaanderen.

1.2.1 Muntjak in Groot-Brittannië

In het zuiden van Engeland werd muntjak tijdens het einde van de 19^{de} en de 20^{ste} eeuw gehouden als sier- of jachtwild op privé-landgoederen. De exacte oorsprong van deze individuen is niet gekend (Cooke 2019). Meermaals werden vanuit deze private collecties dieren opzettelijk of onopzettelijk vrijgelaten. Het primaire doel van de opzettelijke vrijlatingen was het verhogen van de abundantie van jachtwild (Chapman 2021). Bovendien werden er tijdens de jaren 1960 en '70 ook verwilderde dieren gevangen en vervolgens op andere geschikte locaties uitgezet, om zo het verspreidingsgebied te vergroten. Tijdens de laatste decennia van de 20^{ste} eeuw werd het areaal op deze manier uitgebreid tot de rest van Engeland, alsook delen van Wales (Ward 2005). De muntjakpopulatie in Groot-Brittannië werd tegen het einde van de 20^{ste} eeuw op 40.000 individuen geschat (Harris et al. 1995). Sindsdien is de populatie enkel gegroeid, en een meer recente schatting legt het aantal dan ook op 128.000 dieren (Mathews et al. 2018, zie ook Croft et al. 2017). De snelle toename van muntjak in Engeland kan worden verklaard door het enorme aanpassingsvermogen, de brede trofische niche, en de hoge fertiliteit, waardoor de soort succesvol gedijt in verschillende habitattypes waaronder het (sub)urbane milieu. Deze eigenschappen zorgen ervoor dat muntjakken makkelijk nieuwe regio's kunnen koloniseren en op korte tijd hun verspreidingsgebied kunnen vergroten (Jackson et al. 1977, Keller et al. 2011).

Ondertussen wordt de sterke aanwezigheid van muntjak in Groot-Brittannië aanzien als een probleem (Baiwy et al. 2013, Bottiau 2018, Cooke 2019). De soort veroorzaakt schade aan akkers, tuinen, plantsoenen en bossen (**Figuur 2**). De schade-intensiteit wordt sterk gestuurd door de populatiedichtheid. Op gebiedsniveau kan die dichtheid aanzienlijk oplopen, in de orde van gemiddeld één dier per hectare (Cooke 2006). Competitie tussen muntjak en ree is

////////////////////////////////////

(Verordening EU nr. 1143/2014¹, hierna de verordening genoemd). Voor soorten op deze lijst moeten lidstaten acties ondernemen om vestiging te vermijden (als de soort nog niet gevestigd is) of zo goed als mogelijk te beheeren (als de soort wel al gevestigd is). De verordening stelt daarbij een strikt verbod in om deze soorten opzettelijk (i) te importeren, (ii) te houden, (iii) te kweken, (iv) te vervoeren, (v) te verhandelen, (vi) te gebruiken of uit te wisselen, (vii) te laten voortplanten, of (viii) vrij te laten in het milieu. Hiermee beoogt de verordening een uitdoving van het menselijk gebruik van alle Unielijstsoorten. Voor muntjak zijn de bepalingen van de verordening van kracht sinds 3 augustus 2016. Zij zijn, voor wat de Vlaamse bevoegdheden betreft, verankerd in het Soortenbesluit². Het toezicht op de verbodsbepalingen wordt geregeld in het Milieuhandhavingsbesluit³ (natuurinspectie). In Vlaanderen mogen daarenboven enkel zoogdiersoorten worden gehouden die worden vermeld op de zogenaamde positieflijst⁴. Het houden van muntjak is op deze gronden dus in principe al sinds 2009 verboden.

1.2.3 Muntjak in continentaal Europa

Ook in de lidstaten van het Europese vasteland bestaat er nog steeds een risico op introductie van muntjak in het wild, via dieren die worden gehouden in gevangenschap (private collecties of dierentuinen, legaal of illegaal gehouden, wel of niet opzettelijk vrijgesteld; Ward et al. 2021). Dit was zeker het geval vóór de inwerkingtreding van wettelijke beperkingen.

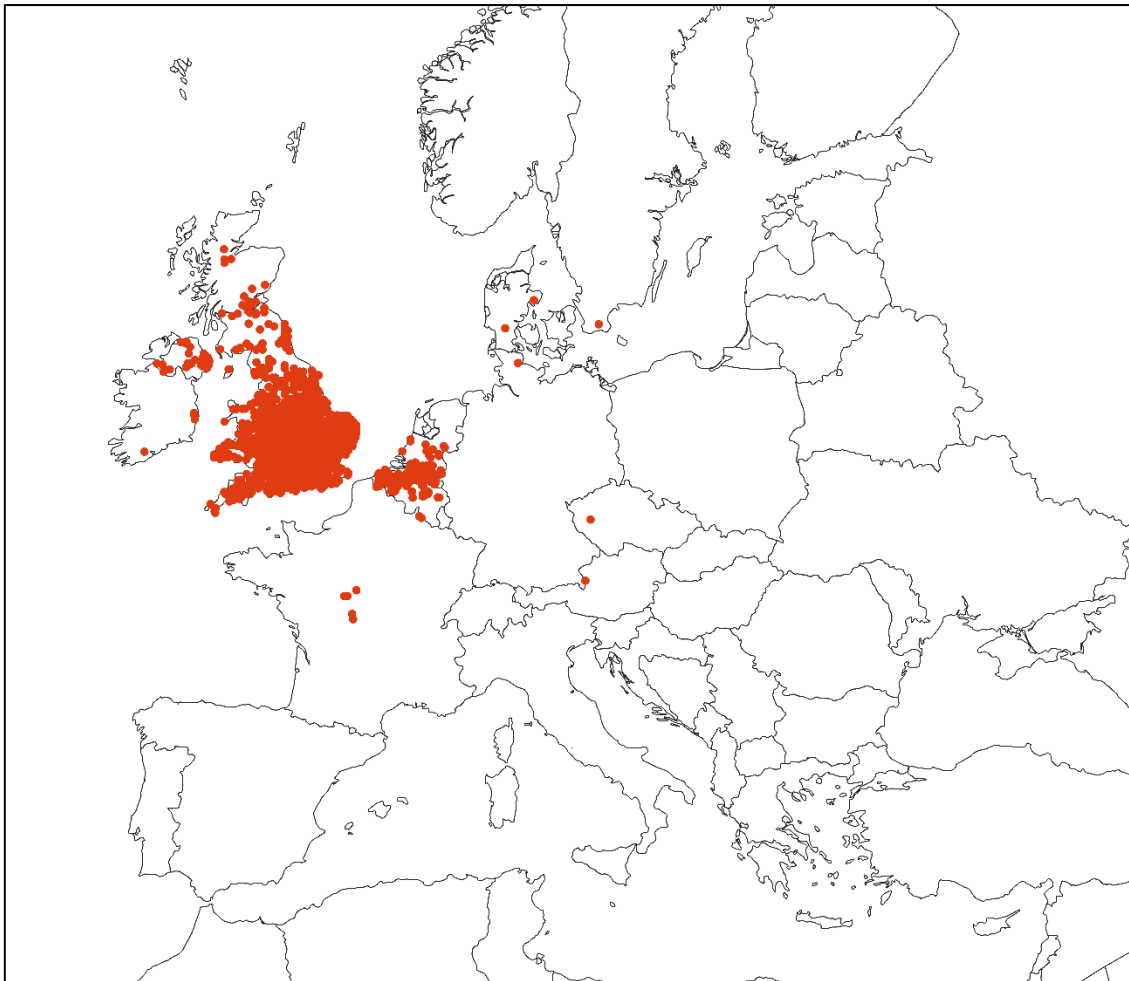
Muntjak werd inderdaad reeds in verschillende Europese landen in het wild waargenomen (Baiwey et al. 2013, Carden et al. 2011, Dick et al. 2010, European Union 2017, Freeman et al. 2016, Tsiamis et al. 2017, **Figuur 3**). Het is hierbij niet steeds duidelijk of er sprake is van vestiging, en wat de omvang is. Muntjak is namelijk ook moeilijk waar te nemen in het wild. In **Frankrijk** zijn er naast sporadische meldingen (bv. Bottiau 2018, Richard 1982) steeds frequenter waarnemingen in de regio Centre-Val de Loire (Hurel et al. 2018). Ook in **Nederland** wordt muntjak af en toe opgemerkt. De meeste van de recente waarnemingen bevinden zich in de provincie Noord-Brabant, nabij de grens met Vlaanderen (Hollander 2013). In **Duitsland** werden de eerste muntjakken in het wild waargenomen in 2004. Sindsdien wordt de aanwezigheid van individuele muntjakken sporadisch gerapporteerd (Hofmann 2018, Nehring & Skowronek 2017). Overigens zijn er geïsoleerde meldingen uit **Zweden**, **Denemarken**, **Ierland**, **Tsjechië** en **Oostenrijk** (**Figuur 3**, Ward et al. 2021).

¹ Europese verordening nr. 1143/2014 betreffende de preventie en beheersing van de introductie en verspreiding van invasieve uitheemse soorten (22 oktober 2014).

² Besluit van de Vlaamse Regering met betrekking tot soortenbescherming en soortenbeheer (15 mei 2009).

³ Besluit van de Vlaamse Regering tot uitvoering van titel XVI van het decreet van 5 april 1995 houdende algemene bepalingen inzake milieubeleid (12 december 2008).

⁴ Koninklijk besluit tot vaststelling van de lijst van niet voor productiedoeleinden gehouden zoogdieren die gehouden mogen worden (16 juli 2009).



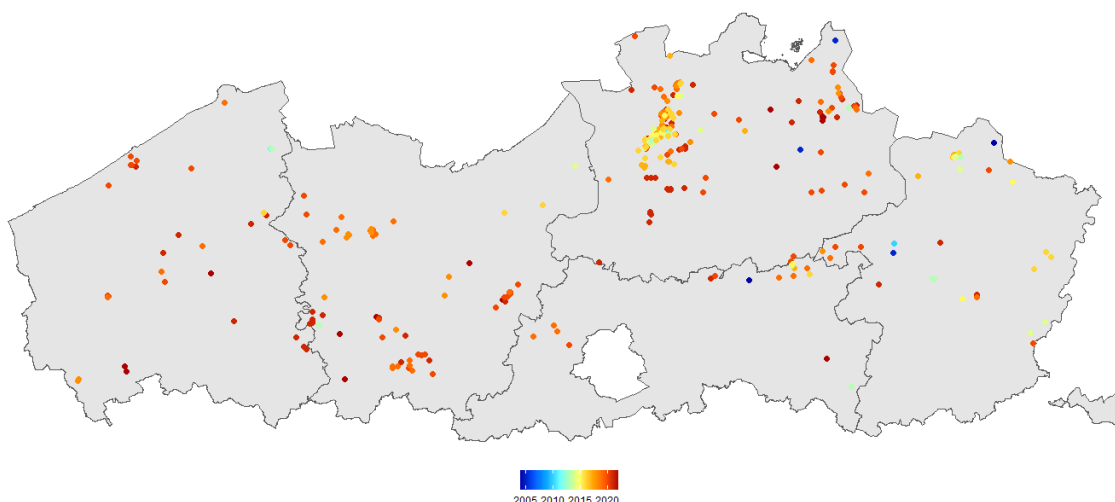
Figuur 3. Waarnemingen van muntjak in Europa (2008-2022). Bron: GBIF (2022).

1.2.4 Muntjak in Vlaanderen

In België werd muntjak tot nu toe sporadisch gemeld uit het **Waals Gewest** en het **Brussels Hoofdstedelijk Gewest** (Adriaens et al. 2019, Baiwy et al. 2013, Casaer et al. 2015, GBIF 2023). In Wallonië werden sinds 2017 in het wild individuen gemeld uit Waals-Brabant, Henegouwen en Luik.

De meeste Belgische meldingen komen evenwel uit **Vlaanderen**. De eerste waarnemingen dateren van 2004 en 2005⁵. Het aantal jaarlijkse waarnemingen bleef aanvankelijk zeer laag, maar kende een vlucht vanaf 2013. Ondertussen is de soort in elke Vlaamse provincie waargenomen (**Figuur 4, 5**). Gelet op de grootte van dit areaal en de frequentie van waarnemingen, lijkt Vlaanderen momenteel het zwaartepunt van de verspreiding van muntjak op het Europese vasteland te vormen. Voor het natuurbehoud en -beleid is dit een zorgwekkende situatie. De habitatomstandigheden worden namelijk als geschikt beoordeeld (Baiwy et al. 2013), en dus is het scenario van een Europees-continentale invasie vanuit Vlaanderen een reële mogelijkheid.

⁵ Het Belang van Limburg, 9 juni 2005, "Doodgereden muntjak verontrust onderzoekers in Bree"



Figuur 4. De cumulatieve verspreiding van muntjak in het wild in Vlaanderen (2004-2022). De kleuren geven het jaar van de waarneming weer. Bron: GBIF (2023), data voornamelijk van Casaer et al. (2021) en Vanreusel et al. (2023).

De kaart in **Figuur 4** kent een belangrijke nuance. Uit opvolging weten we dat veel waargenomen dieren (vaak duidelijk tamme dieren) niet in het wild hebben standgehouden. De soort wordt ondertussen namelijk gericht beheerd. De aanpak omvat enerzijds de handhaving van de eerder genoemde verbodsbepalingen ten aanzien van dieren in gevangenschap, en anderzijds de verwijdering van dieren in het wild (middels afvangst of afschot). De kaart is dan ook een slechte weergave van de huidige verspreiding van muntjak, en het actuele patroon is feitelijk slecht bekend. Tenminste is met zekerheid een gevestigde populatie aanwezig in de oostelijke rand van de stad Antwerpen (Voorkempen, **Figuur 2**). Op diverse andere locaties wordt de aanwezigheid van muntjak vermoed, maar blijft het onduidelijk of er sprake is van vestiging en voortplanting.

Het is niet uitgesloten dat de handhavingsacties sinds 2016 mede verantwoordelijk zijn geweest voor de sterke toename van het aantal waarnemingen, gezien (de ruchtbaarheid rond) interventies houders ertoe kon aanzetten zich pro- of reactief van hun dieren te ontdoen. Het aantal waarnemingen lag in 2022 drastisch lager dan in de jaren daarvoor (**Figuur 5**). Dit patroon kan in overeenstemming zijn met een uitdoving van de gehouden populatie, en met een adequater beheer van dieren in het wild. De toekomst zal moeten uitwijzen in hoeverre dit patroon een reële terugval weergeeft, en zo dit het geval is, of deze ook aanhoudt.

Duidelijk is dat de dynamiek in verspreiding van muntjak in Vlaanderen complex is, omdat zij enerzijds gestuurd wordt door menselijk handelen (bv. ontsnappingsen, uitwisselingen, lethaal beheer) en anderzijds door natuurlijke processen (bv. voortplanting, dispersie, natuurlijke mortaliteit). Een aantal van deze processen kunnen blootgelegd worden door middel van genetisch onderzoek. Hiervoor moet eerst de genetische signatuur bekend zijn op het niveau van individuen, families en populaties.

ook 5'-CACTATGCCGAG-3'. De variabele positie is hier A of G. In sommige populaties komt de ene variant meer voor dan de andere. Wanneer dergelijke informatie van honderden tot tienduizenden plaatsen in het genoom wordt gecombineerd, krijg je een beeld van de genomwijde genetische structuur binnen en tussen populaties. SNP's kunnen opgespoord worden in het genoom met behulp van verschillende methodes (bv. *Restriction-site Associated DNA Sequencing (RADseq)*, Baird et al. 2008; *Whole Genome Sequencing*). Deze methodes zijn echter niet geschikt voor routinematige monitoring en vereisen vaak hoogkwalitatief DNA (Carroll et al. 2018). Daarom bestaat de mogelijkheid om op basis van duizenden SNP's, eerder geïdentificeerd met bijvoorbeeld RADseq-technieken, de meest informatieve SNP's te selecteren (bv. Bootsma et al. 2020, Harmoinen et al. 2021) en vervolgens te genotypen (bv. Campbell et al. 2015). Zulke methodes laten ons toe om op routinematige wijze een groot aantal individuen genetisch te screenen.

1.4 DOELSTELLINGEN

Het doel van dit project is tweedelig. In een **eerste fase** willen we patronen van genetische diversiteit, structuur en onderlinge verwantschappen van Chinese muntjak in Vlaanderen bestuderen om zo een beeld te krijgen van de verschillende introductiehaarden. Daarbij worden ook stalen uit het buitenland betrokken.

In een **tweede fase** ontwikkelen we een monitoringsprotocol dat ons toelaat om op routinematige wijze genetische verwantschappen van nieuwe, in de toekomst aangeleverde stalen te onderzoeken.

2 WERKWIJZE

2.1 STAALNAME

In dit onderzoek werden in totaal (d.w.z. voor beide fasen samen) 175 stalen van Chinese muntjak uit Vlaanderen betrokken (**Tabel 1, Figuur 6**). Deze dieren bevonden zich ofwel in gevangenschap (en werden in de regel via handhavingsacties bekomen, bv. via inbeslagnames), ofwel in het wild. Vanwege de confidentialiteit die uitgaat van de handavingsdossiers worden de stalen benoemd op het niveau van de betreffende gemeente (deel- of hoofdgemeente, naarmate de beschikbare informatie), zonder verdere details.

Voor de analyse van genetische diversiteit en structuur (2.2) betrokken we 152 dieren uit Vlaanderen, verzameld tussen 2006 en 2020. Deze werden aangevuld met 11 stalen uit het Verenigd Koninkrijk en twee uit Nederland (**Tabel 1, Figuur 6**).

Voor de ontwikkeling van het monitoringprotocol (2.3) betrokken we een deel van dezelfde stalen als hierboven, aangevuld met 23 nieuwe stalen uit Vlaanderen (verzameld in 2021 en 2022), zeven uit het Verenigd Koninkrijk en drie uit Frankrijk (**Tabel 1, Figuur 6**).

Tabel 1. Overzicht van de locaties. De Vlaamse locaties zijn alfabetisch gerangschikt per provincie (LIM, Limburg; ANT, Antwerpen; VBR, Vlaams-Brabant; OVL, Oost-Vlaanderen; WVL, West-Vlaanderen). Gevang. = dieren uit gevangenschap; wild = dieren uit het wild.

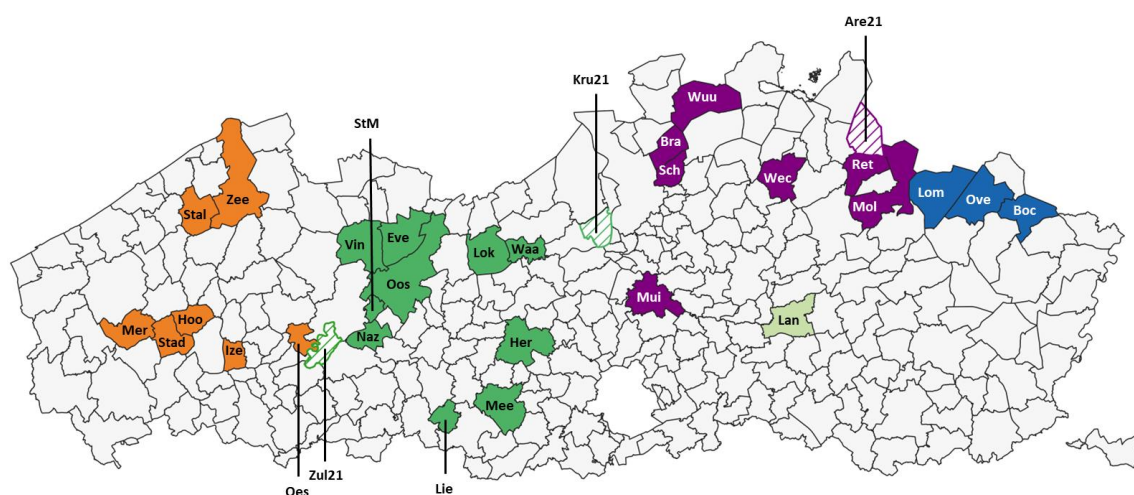
N_{ini}: initieel beschikbare stalen voor de analyse van genetische diversiteit en structuur (fase 1).

N_{gen}: het aantal stalen van N_{ini} dat succesvol is gegetotypeerd.

N_{mon}: stalen voor de ontwikkeling van het monitoringprotocol (fase 2), zoals betrokken uit N_{ini}, of aanvullend verzameld in 2021-'22 (tussen haakjes).

Land	Prov.	Locatie	Code	Herkomst	N _{ini}	N _{gen}	N _{mon}
België	LIM	Bocholt	Boc	Wild	1	1	1
België	LIM	Lommel	Lom	Gevang.	1	0	0
België	LIM	Overpelt	Ove	Gevang.	3	3	10 (7)
België	ANT	Arendonk	Are21	Gevang.	0	0	3 (3)
België	ANT	Brasschaat	Bra(21)	Wild	1	1	2 (1)
België	ANT	Mol	Mol	Gevang.	4	4	1
België	ANT	Muizen	Mui	Gevang.	3	3	2
België	ANT	Retie	Ret	Wild	1	1	1
België	ANT	Schoten	Sch(21)	Gevang./wild	27	22	14 (5)
België	ANT	Wechelderzande	Wec	Gevang.	5	5	5
België	ANT	Wuustwezel	Wuu	Wild	1	1	1
België	VBR	Langdorp	Lan	Gevang.	52	39	6
België	OVL	Evergem	Eve	Wild	1	1	1
België	OVL	Herdersem	Her	Wild	4	4	3
België	OVL	Lierde	Lie	Gevang.	5	0	0
België	OVL	Kruibeke	Kru21	Gevang.	0	0	5 (5)

België	OVL	Lokeren	Lok	Wild	2	1	1
België	OVL	Meerbeke	Mee	Wild	1	1	1
België	OVL	Nazareth	Naz	Wild	1	1	1
België	OVL	Oostakker	Oos	Gevang.	2	2	1
België	OVL	Sint-Martens-Latem	StM	Gevang.	4	3	4
België	OVL	Vinderhout	Vin	Gevang./wild	13	9	4
België	OVL	Waasmunster	Waa	Gevang.	2	1	1
België	OVL	Zulte	Zul21	Wild	0	0	2 (2)
België	WVL	Hooglede	Hoo	Gevang.	4	2	1
België	WVL	Izegem	Ize	Gevang.	3	3	3
België	WVL	Merkem	Mer	Gevang.	1	1	0
België	WVL	Oeselgem	Oes	Gevang.	4	2	2
België	WVL	Staden	Stad	Wild	1	1	0
België	WVL	Stalhille	Stal	Gevang.	3	2	2
België	WVL	Zeebrugge	Zee	Gevang.	2	0	0
Nederland	-	Breda	-	Wild	1	0	0
Nederland	-	Stein	Ste_NL	Wild	1	1	1
Frankrijk	-	Céré-la-Ronde	Fra21	Wild	0	0	3 (3)
Verenigd Koninkrijk	-	Gloucestershire	VK21	Wild	0	0	7 (7)
Verenigd Koninkrijk	-	Lincolnshire	VK	Wild	2	2	2
Verenigd Koninkrijk	-	Norfolk	VK	Wild	2	2	2
Verenigd Koninkrijk	-	Northamptonshire	VK	Wild	1	1	1
Verenigd Koninkrijk	-	Suffolk	VK	Wild	6	6	4
Totaal					165	126	96



Figuur 6. Aanduiding van de (hoofd)gemeenten van waaruit Vlaamse stalen zijn bekomen (gearceerd = enkel aanvullende stalen voor de ontwikkeling van het SNP-panel voor het monitoringprotocol). Kleuren komen overeen met de provincies.

2.2 GENETISCHE ANALYSES

2.2.1 Genotyping

DNA van de weefselstalen werd geëxtraheerd met de DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). De kwaliteit van het geëxtraheerde DNA werd vervolgens bepaald met behulp van agarose gelelektroforese (2%). De concentratie werd bepaald met de Quant-iT PicoGreen dsDNA kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). De genetische technieken gebruikt in deze studie vereisen hoogkwalitatief DNA. De kwaliteit van de stalen van de locatie te Lierde bleek onvoldoende en deze stalen werden dan ook niet meegenomen in de genetische analyses. De overige 160 stalen werden willekeurig verdeeld over twee pools van telkens 94 en 78 individuen. Elke pool bevatte 12 herhalingen en twee *No Template Controls* (NTC's).

Voor het identificeren van variaties onder de vorm van SNP's gebruikten we een *restriction site-associated DNA sequencing* (of kortweg RADseq) techniek. Hierbij wordt in een subset van het volledige genoom op zoek gegaan naar de aanwezigheid van SNP's (Andrews et al. 2016). Meer specifiek volgden we een *Double-Digest Genotyping by Sequencing* (ddGBS) protocol, gebaseerd op methodes beschreven in Elshire et al. (2011). De concentratie van elk individueel staal werd eerst verdund naar 20 ng/μL. Digestie van het DNA gebeurde met twee enzymen, *EcoRI* en *ApeKI*, in twee afzonderlijke stappen (*EcoRI*: incubatie op 37 °C gedurende 2 uur; *ApeKI*: incubatie op 75 °C gedurende 2 uur). Tijdens de tweede stap werd NaCl 5 M toegevoegd voor een betere werking van *ApeKI*. Vervolgens werden aan elk staal een unieke barcode (*EcoRI*) en gemeenschappelijke (*ApeKI*) adapter toegevoegd met behulp van T4 DNA ligase op een temperatuur van 22 °C gedurende 60 minuten, gevolgd door 30 minuten op 65 °C. Alle stalen werden na ligatie opgezuiverd met behulp van Ampure XP beads (1:1 verhouding). Hierna werden de stalen geamplificeerd (16 cycli van 30 s op 96 °C, 20 s op 65 °C en 30 s op 68 °C), waarna de stalen opnieuw werden opgezuiverd met Ampure XP beads (1:0,8 verhouding). De finale concentratie van elk staal werd bepaald met het QuantiFluor One ds DNA system (Promega). Van elk staal werd 10 ng genomen en gepoold (94 stalen in pool 1, 78 stalen in pool 2), alvorens een finale opzuivering werd uitgevoerd. Deze opzuivering, net als de vorige twee opzuiveringen, zorgen ervoor dat zowel de hele korte als de hele lange fragmenten, en restanten van enzymen, worden verwijderd. Beide pools werden vervolgens op één laan 2 x 150 bp gesequeneerd op een Illumina HiSeq 2500 door Admera Health nv.

2.2.2 Bio-informatica

De kwaliteit van de ruwe sequenties werd gecontroleerd met behulp van FastQC software v0.11.9 (Andrews 2015). De gepoolde sequenties werden vervolgens gescheiden op basis van de unieke barcodes, toegevoegd aan elk individueel staal, via de *process_radtags* module van Stacks v2.54 (Catchen et al. 2011, 2013, Rochette et al. 2019). Sequenties met een niet afgelezen base en lage kwaliteit (Phred-score > 10) werden verwijderd. Eén individu (afkomstig uit Oeselgem) met 13.252 individuele sequenties werd verwijderd. Voor de overige individuen was het gemiddeld aantal sequenties per individu 14.274.369 (bereik = 5.037.554 - 82.450.946) voor filtering en 13.628.567 (bereik = 4.025.669 – 81.667.556) na filtering.

de censusgrootte ten gevolge van verschillen in voortplantingssucces tussen individuen, ongelijke verhouding van geslachten, of variatie in volwassen N_c (Vanden Broek & Cox 2017). Effectieve populatiegroottes werden berekend voor locaties met minstens negen individuen (Schoten, Langdorp, Vinderhout en het Verenigd Koninkrijk) met het programma NeEstimator (versie 2.1, Do et al. 2014). Voor de schattingen werd de *linkage disequilibrium* methode (LDNe) gebruikt (Waples & Do 2008), onder een random mating model en werden enkel allelen met een frequentie hoger dan 0,05 meegenomen.

Genetische structuur – Ten eerste werd de fixatie-index (F_{ST} , Weir & Cockerham 1984), een maat voor genetische afstand tussen locaties, berekend met het R-pakket ‘Hierfstat’ (versie 0.5-7, Goudet 2005). Voor de berekening van de genetische differentiatie tussen locaties werden enkel deze met minstens vijf individuen meegenomen (Schoten, Langdorp, Vinderhoute, Wechelderzande en het Verenigd Koninkrijk).

Vervolgens werd de genetische structuur over alle stalen weergegeven met behulp van een PCA-plot (*Principal Component Analysis*) met het R-pakket 'ade4' (versie 1.7-18). Op een PCA-plot clusteren individuen met een gelijkaardige genetische samenstelling samen.

Om vervolgens individuen toe te wijzen aan groepen, werd er eerst een *Discriminant Analysis of Principal Components* (DAPC) uitgevoerd. DAPC transformeert de data met behulp van een PCA, waarna het aantal clusters en de toewijzingen van individuen aan deze clusters worden bepaald met behulp van *Discriminant Analysis* (DA). Deze analyse werd uitgevoerd zonder prior informatie over het aantal clusters, op basis van het K-means algoritme. Hierbij wordt het optimaal aantal clusters (K) geschat op basis van het *Bayesian Information Criterion* (BIC). Vervolgens werd elk individu toegewezen aan één van de clusters (Jombart & Collins 2015).

Aansluitend werd een STRUCTURE-analyse uitgevoerd (Falush et al. 2003, Pritchard et al. 2000). Net als bij een DAPC gaat het STRUCTURE-algoritme op zoek naar genetische clusters (K) in de dataset. Dat gebeurt in dit geval zonder prior informatie over het aantal locaties. Vervolgens wordt voor elk individu de afkomst van elk van deze clusters bepaald. De STRUCTURE-analyse werd drie keer uitgevoerd. Hierbij gebruikten we een admixture-model zonder prior informatie over het aantal clusters (burn-in = 10.000, iteraties = 100.000). Het optimaal aantal clusters K werd daarna bepaald op basis van Delta K en log likelihood met behulp van Structure Harvester (versie 0.6.94, Earl & vonHoldt 2012).

Verwantschapsanalyses – Verwantschappen tussen individuen werden berekend als de verwantschapscoëfficiënt (r) volgens de methode van Wang (2002) met het R-pakket ‘related’ (versie 0.7, Pew et al. 2015). De verwachte relaties op basis van deze coëfficiënt zijn weergegeven in **Tabel 2**. Bij een waarde rond 0,500 spreken we van een verwantschap in de eerste graad (bv. tussen ouders en hun nakomelingen, of tussen broers of zussen onderling). Bij een waarde rond 0,250 spreken we van een verwantschap in de tweede graad (bv. tussen grootouders en hun kleinkinderen, of tussen tantes/ooms en hun nichtjes/neefjes), en een waarde rond 0,125 toont een verwantschap in de derde graad aan. In geval van inteelt wordt de waarde van r naar boven getrokken; en de coëfficiënt is dus een continue variabele (niet

beperkt tot discrete waarden). Waardes lager dan 0,100 werden niet in rekening gebracht wegens te grote onzekerheid (Pew et al. 2015).

Tabel 2. Verwachte relatie tussen individuen op basis van verwantschapscoëfficiënt r (in afwezigheid van inteelt). We geven hier tevens de gevestigde, Engelstalige termen mee.

Relatie (Engels)	Relatie (Nederlands)	<i>r</i>
<i>Twins</i>	Tweeling	1,000
<i>Parent/offspring</i>	Ouder/nakomeling	0,500
<i>Full siblings</i>	Broer/zus	0,500
<i>Half siblings</i>	Halfbroer/halfzus	0,250
<i>Grandparents/grandchildren</i>	Grootouder/kleinkind	0,250
<i>Aunt/uncle/niece/nephew</i>	Tante/oom/neef/nicht	0,250
<i>Double-first cousin</i>	Volle neef/nicht, langs beide kanten	0,250
<i>Half-aunt/half-uncle/half-niece/half-nephew</i>	Halftante/halfoom/halfneef/halfnicht	0,125
<i>First cousin</i>	Volle neef/nicht	0,125
<i>Great grandparents/ great grandchildren</i>	Overgrootouder/achterkleinkind	0,125
<i>Grandaunt/granduncle/grandniece/grandnephew</i>	Groottante/grootoom/achternicht/achterneef	0,125

2.3 ROUTINEMATIGE MONITORING

2.3.1 Selectie SNP's

De methode gebruikt om SNP's op te sporen (RADseq) is niet geschikt voor routinematige monitoring. Uit de 18.762 gedetecteerde SNP's kunnen we tijdens een volgende stap wel de meest informatieve SNP's selecteren. Dit panel moet zo accuraat mogelijk de structuur van de volledige dataset benaderen, zodat we in de toekomst de herkomst van nieuw geanalyseerde stalen kunnen bepalen. De eerste stap in het ontwikkelen van dit panel is het filteren van de volledige SNP-set volgens enkele criteria waaraan elke geselecteerde SNP moet voldoen (heterozygositeit = 0,01-0,5, *minor allele count* (MAC) = 3, gemiddelde coverage = 10-100, SNP positie binnen reads = 25-75 bp, vermijden van *linkage disequilibrium* tussen dicht bij elkaar gelegen SNP's, en Hardy-Weinberg evenwicht). Deze filtering werd uitgevoerd met het R-pakket 'Radiator' (versie 1.2.2, Gosselin 2020). Na de initiële filtering werden 4.679 van de 18.762 SNP's behouden. Vervolgens werden 401 outlier SNP's, gedetecteerd met behulp van het R-pakket 'pcadapt' (versie 4.3.3, Privé et al. 2020), en 849 SNP's waarvan de verwachte heterozygositeit hoger was dan 0,4, verwijderd. Uiteindelijk bleven er 3.429 SNP's over die geschikt werden bevonden voor het panel. Van deze gefilterde SNP's selecteerden we er 500 die op ongeveer gelijke afstand verdeeld waren over de chromosomen.

2.3.2 Primer design en validatie panel

De 500 geselecteerde SNP's kunnen in een volgende fase specifiek gesequeneerd worden met een specifieke techniek, *Genotyping-in-Thousands by sequencing* (of GTseq, Campbell et al. 2015). GTseq verschilt van RADseq-methodes doordat er specifieke primers worden

Van de 500 geselecteerde SNP's bleken er 238 geschikt voor primer design. In een volgende stap werden de 96 individuen gegenotypeerd voor deze 238 loci volgens de GTseq-methode. Slechts 163 loci werden succesvol gegenotypeerd in meer dan 80% van de individuen. Voor de 61 stalen die door beide methodes (RADseq en GTseq) werden geanalyseerd, varieerde het aantal genotypes dat verschilt tussen 0 en 95,12% per SNP (gemiddelde = 3,91%). Er werden 12 SNP's, met een aandeel verschillende genotypes hoger dan 10%, verwijderd. Het finale panel bevat **151 SNP's** met een gemiddelde aantal afwijkende genotypes per SNP van 0,89%.

3 RESULTATEN

3.1 GENETISCHE DIVERSITÄT

De waargenomen genetische diversiteit (**Tabel 3**) is het hoogst voor de stalen afkomstig uit het Verenigd Koninkrijk ($H_o = 0,254$), gevolgd door (het ene individu uit) Nederland ($H_o = 0,231$) en de dieren uit Vlaanderen ($H_o = 0,225$). Binnen Vlaanderen worden de hoogste waarden gevonden voor Nazareth, Stalhille en Oeselgem ($\geq 0,260$). De laagste waarden worden gevonden voor respectievelijk Hooglede, Waasmunster, Oostakker, Wuustwezel, Langdorp en Merkem ($< 0,190$).

Tabel 3. Gemiddelde waargenomen (H_O) en verwachte (H_E) heterozygositeit en standaarddeviatie per locatie.

Locatie	N	H_O	H_E
België	114	0,225 ± 0,354	0,197 ± 0,168
Bocholt	1	0,217 ± 0,412	-
Overpelt	3	0,254 ± 0,354	0,232 ± 0,265
Brasschaat	1	0,225 ± 0,431	-
Mol	4	0,193 ± 0,301	0,147 ± 0,214
Muizen	3	0,259 ± 0,378	0,185 ± 0,240
Retie	1	0,248 ± 0,432	-
Schoten	22	0,229 ± 0,222	0,225 ± 0,199
Wechelderzande	5	0,253 ± 0,309	0,192 ± 0,214
Wuustwezel	1	0,181 ± 0,385	0,181 ± 0,385
Langdorp	39	0,189 ± 0,229	0,179 ± 0,202
Evergem	1	0,208 ± 0,406	-
Herdersem	4	0,247 ± 0,293	0,216 ± 0,233
Lokeren	1	0,257 ± 0,437	-
Meerbeke	1	0,252 ± 0,434	-
Nazareth	1	0,295 ± 0,456	-
Oostakker	2	0,179 ± 0,338	0,129 ± 0,223
Sint-Martens-Latem	3	0,204 ± 0,240	0,254 ± 0,324
Vinderhoute	9	0,247 ± 0,256	0,222 ± 0,206
Waasmunster	1	0,172 ± 0,377	-
Hooglede	2	0,150 ± 0,301	0,114 ± 0,210
Izegem	3	0,248 ± 0,318	0,220 ± 0,244
Merkem	1	0,189 ± 0,391	-
Oeselgem	2	0,260 ± 0,403	0,195 ± 0,244
Staden	1	0,229 ± 0,420	-
Stalhille	2	0,265 ± 0,347	0,255 ± 0,289
Nederland	1	0,231 ± 0,421	-
Verenigd Koninkrijk	11	0,254 ± 0,222	0,261 ± 0,192

3.2 EFFECTIEVE POPULATIEGROOTTES

Effectieve populatiegroottes (N_e) werden enkel berekend voor locaties met minstens negen individuen. N_e voor Verenigd Koninkrijk gaf geen betrouwbare schatting (oneindig; 95%-betrouwbaarheidsinterval [C.I.] = [2,3; oneindig]). Schoten gaf een N_e van 47,6 (95% C.I. = [11,5; oneindig]), Langdorp een N_e van 8,3 (95% C.I. = [6; 11,3]) en Vinderhoute een N_e van 4,0 (95% C.I. = [2; 14,8]).

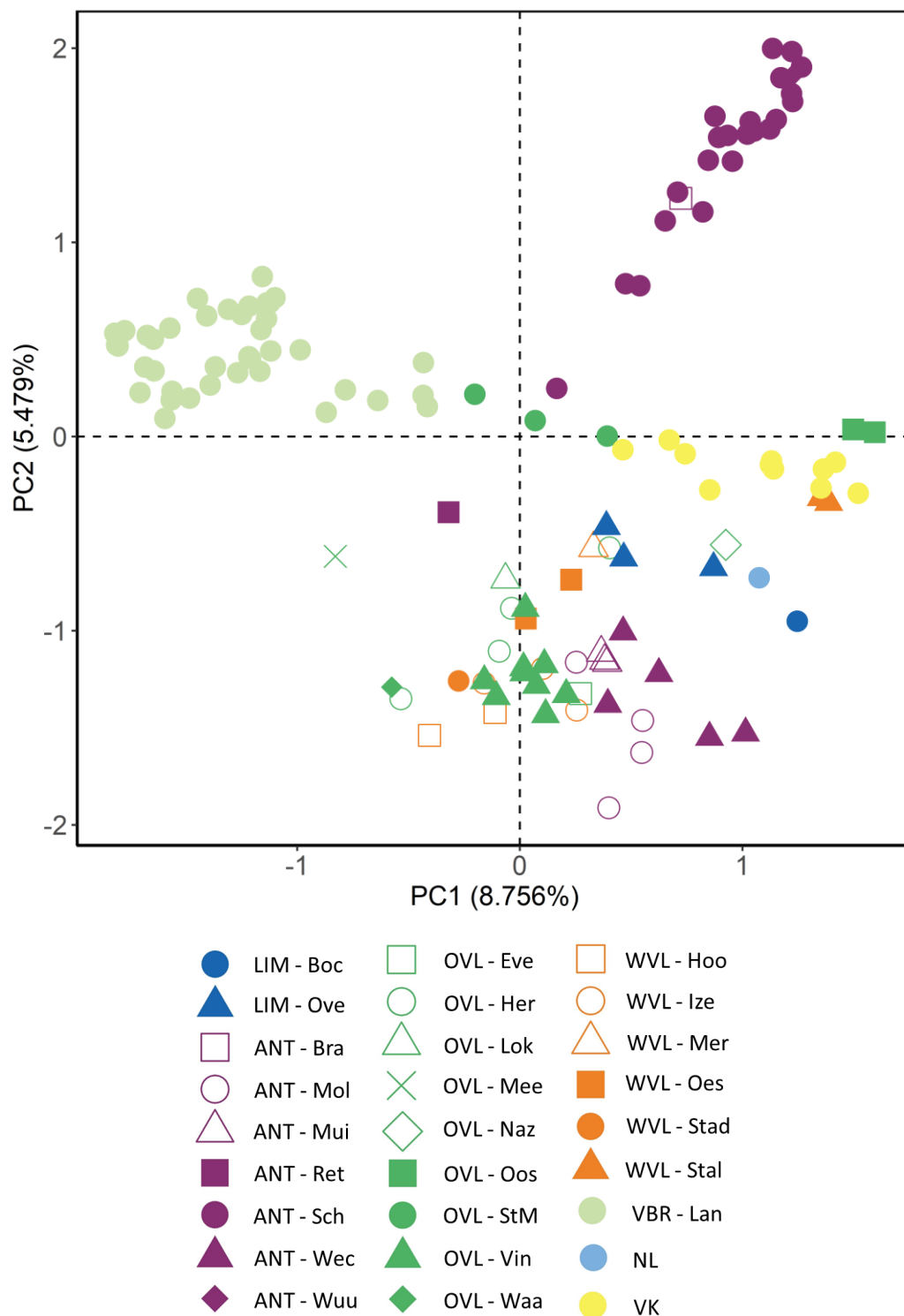
3.3 GENETISCHE STRUCTUUR

De gemiddelde genetische differentiatie over alle locaties, gemeten als F_{ST} , is 0,235 (Tabel 4). Genetische differentiatie is het hoogst tussen de locaties Langdorp en Wechelderzande (F_{ST} = 0,298) en het laagst tussen het Verenigd Koninkrijk en Schoten (F_{ST} = 0,117). Enkel de binnenlandse locaties beschouwd, is differentiatie het laagst tussen Vinderhoute en Schoten (F_{ST} = 0,193; 95% C.I. = [0,189; 0,198]) en tussen Vinderhoute en Langdorp (F_{ST} = 0,194; 95% C.I. = [0,186; 0,202]).

Tabel 4. Paarsgewijze genetische afstand (op basis van F_{ST}) en 95%-betrouwbaarheidsintervallen tussen locaties ($N_{\text{genotypering}} \geq 5$).

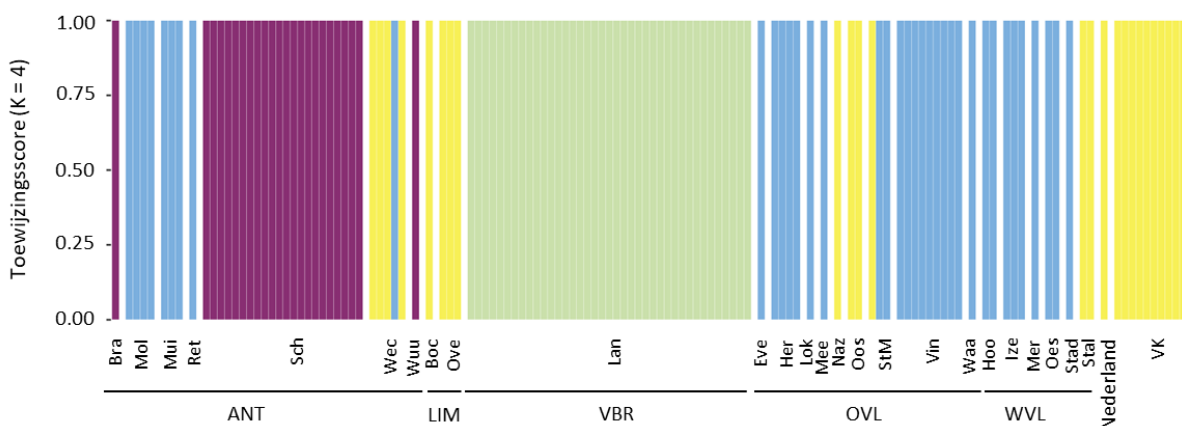
	Langdorp	Schoten	Vinderhoute	Wechelderzande	VK
Langdorp	-	[0,239; 0,250]	[0,186; 0,202]	[0,296; 0,309]	[0,222; 0,250]
Schoten	0,241	-	[0,189; 0,198]	[0,229; 0,238]	[0,116; 0,123]
Vinderhoute	0,194	0,193	-	[0,208; 0,218]	[0,138; 0,146]
Wechelderzande	0,298	0,244	0,218	-	[0,166; 0,180]
VK	0,241	0,117	0,142	0,175	-

De *Principal Component Analysis* (PCA) suggereert op basis van de eerste en tweede as (PC1 en PC2) alvast duidelijk dat de individuen uit Langdorp enerzijds, en deze uit Schoten-Brasschaat-Wuustwezel anderzijds, aparte clusters vormen (Figuur 7). De andere individuen uit de provincie Antwerpen sluiten genetisch meer aan bij individuen uit andere provincies. Dieren uit Stalhille, Oostakker en Sint-Martens-Latem lijken samen te clusteren met de stalen uit het Verenigd Koninkrijk.



Figuur 7. Ordinatieplot (PCA). Elk symbool geeft een individu weer. De kleuren en vormen geven respectievelijk de provincie en locatie weer. Hoe dichter de afstand tussen individuen op de plot, hoe meer genetisch gelijkend.

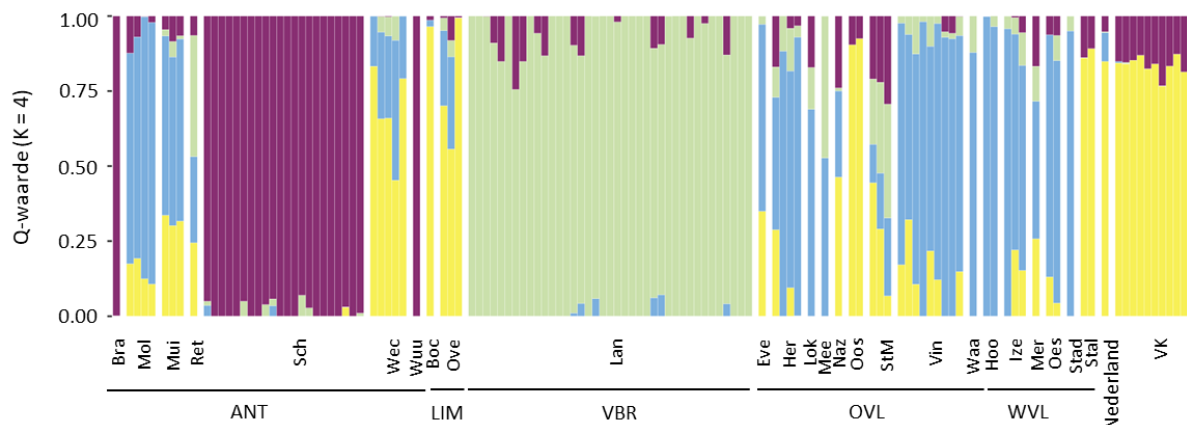
De DAPC-analyse toont aan dat het optimale aantal clusters vier is en wijst vervolgens elk individu toe aan één van deze vier clusters (**Figuur 8**). Aparte clusters worden gevormd door de individuen uit: **(1)** Brasschaat, Schoten en Wuustwezel; **(2)** Langdorp; **(3)** Wechelderzande (deels), Bocholt, Overpelt, Nazareth, Oostakker, Sint-Martens-Latem (deels), Stalhille (dus: vier provincies), Nederland en het Verenigd Koninkrijk; **(4)** Mol, Muizen, Retie, Wechelderzande (deels), Evergem, Herdersem, Lokeren, Meerbeke, Sint-Martens-Latem (deels), Vinderhoute, Waasmunster, Hooglede, Izegem, Merkem, Oeselgem en Staden (dus: drie provincies).



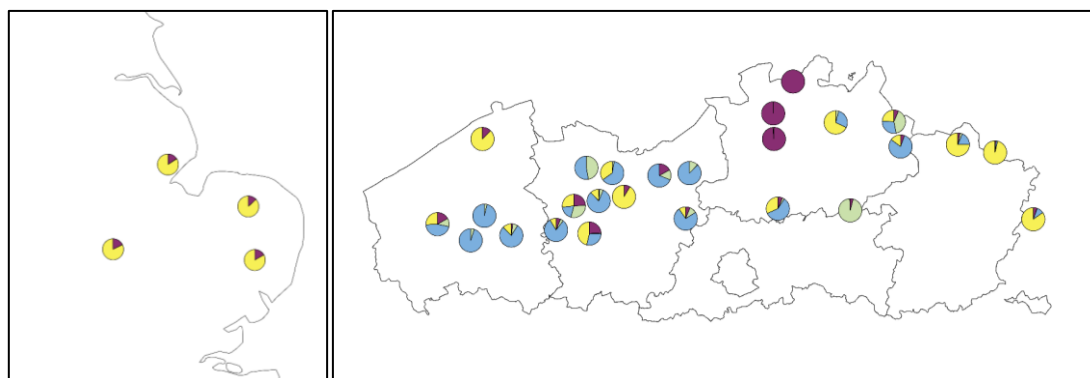
Figuur 8. Toewijzing berekend via *Discriminant Analysis of Principal Components* (DAPC). Elke staaf is een individu. De kleur geeft weer aan welke van de vier clusters een individu werd toegewezen.

De STRUCTURE-analyse geeft een gelijkaardig, maar meer genuanceerd resultaat. Zij identificeert ook vier genetische clusters (**Figuur 9, 10**). De Q-waarde, berekend door STRUCTURE, geeft aan wat de oorsprong van elk individu is op basis van de waargenomen clusters. Deze resultaten tonen opnieuw aan dat de individuen uit **(1)** Brasschaat, Schoten en Wuustwezel, en **(2)** uit Langdorp, aparte clusters vormen. **(3)** Aan de derde cluster kunnen grotendeels individuen uit Wechelderzande, Bocholt, Overpelt, Oostakker, Stalhille, Nederland en het Verenigd Koninkrijk worden toegewezen. Hetzelfde geldt voor **(4)** individuen uit Mol, Muizen, Herdersem, Lokeren, Evergem, Vinderhoute, Waasmunster, Hooglede, Izegem, Merkem, Oeselgem en Staden. Individen van de twee laatste clusters vertonen wel vaak vermenging (admixture).

Alle overige individuen (Retie, Meerbeke, Nazareth, Sint-Martens-Latem en Merkem) laten zich niet eenduidig aan één van deze vier clusters toewijzen. Dit kan wijzen op een gemengde oorsprong.



Figuur 9. Q-waarde berekend voor elk individu (weergegeven door één staaf) met behulp van STRUCTURE software. Deze waarde geeft de admixture-proportie van elk individu weer ($K = 4$).



Figuur 10. Gemiddelde Q-waarde berekend door STRUCTURE voor elk van de locaties (links: Engeland, rechts: Vlaanderen).

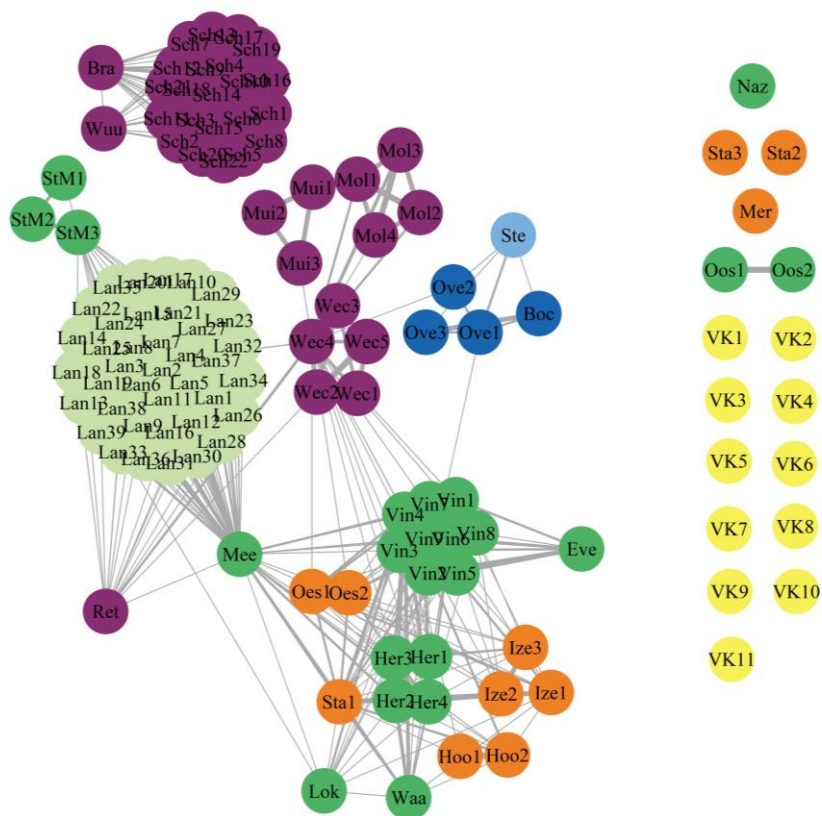
3.4 VERWANTSCHAPPEN

Verwantschappen tussen individuele dieren worden gegeven door een coëfficiënt ($r = 0,500$ voor 1^{ste} graad; $0,250$ voor 2^{de} graad; en $0,125$ voor 3^{de} graad; Tabel 2). **Figuur 11** toont de verwantschappen tussen individuen. **Figuur 12** toont een samenvatting op het niveau van de 27 locaties. Hieronder bespreken we de verwantschap per locatie. Een locatie kan op meerdere plaatsen genoemd worden.

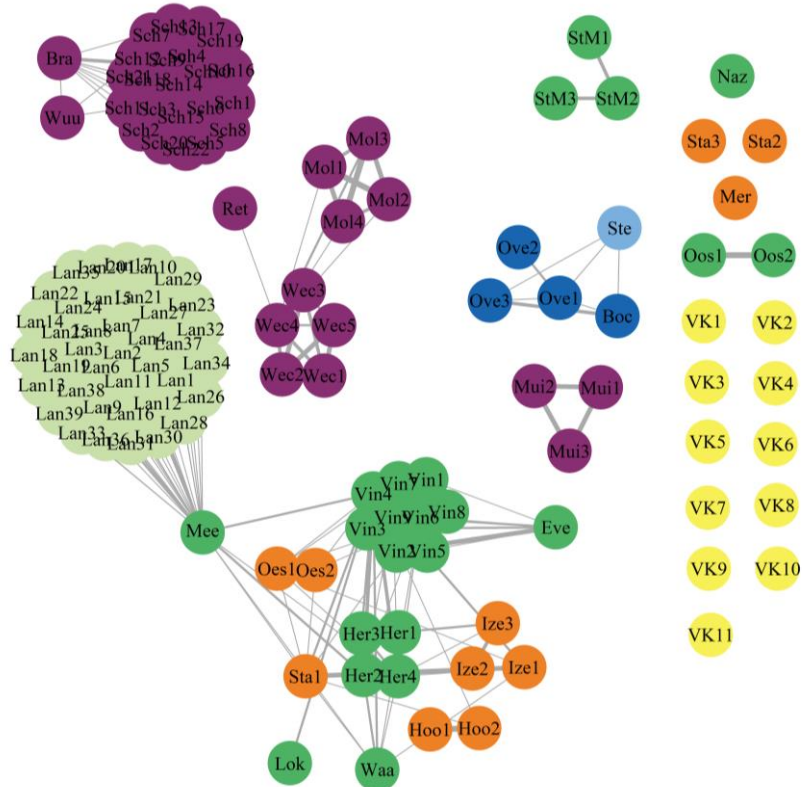
De onderlinge verwantschapsscores tussen stalen van het **Verenigd Koninkrijk** bereiken de drempel van $0,10$ niet (bereik = $-0,1086 - 0,077$, gem. = $-0,020$). Er is ook geen verwantschap met een andere locatie vastgesteld. Enkel voor de individuen uit **Stalhille** zou een verre verwantschap nog vermoed kunnen worden (met Suffolk, bereik = $0,006 - 0,050$, gem. = $0,025$). Overigens linkt Stalhille aan geen andere locatie.

////////////////////////////////////

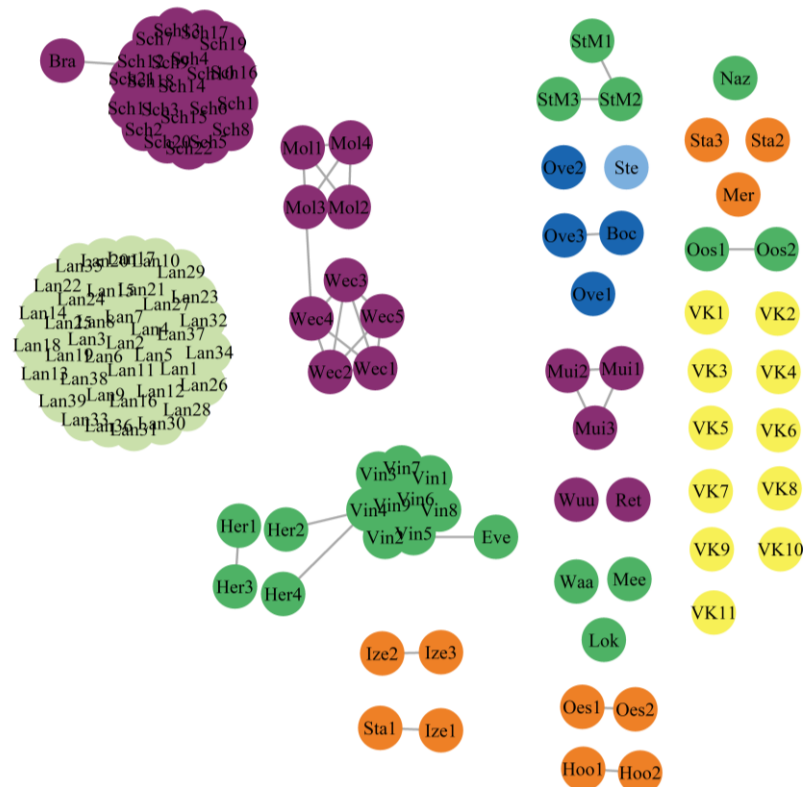
(a) $r \geq 0,1$



(b) $r \geq 0,2$



(c) $r \geq 0,4$



Figuur 11. Verwantschapsanalyse, op het niveau van individuen. Individuen zijn met elkaar verbonden indien hun verwantschapscoëfficiënt (r) minstens 0,1 (a), 0,2 (b) of 0,4 bedraagt (c). De individuen zijn ingekleurd volgens de provincies.

De vier individuen uit **Herdersem** zijn onderling nauw verwant (bereik = 0,279 - 0,487, gem. = 0,356). Bovendien zijn er verwantschappen met Hooglede (1 Hoo, 2 Her; bereik = 0,129 - 0,157), Meerbeke (1 Mee, 3 Her; bereik = 0,188 - 0,335), Lokeren (1 Lok, 3 Her; bereik = 0,147 - 0,193), Staden (1 Sta, 3 Her; bereik = 0,153 - 0,275), Waasmunster (1 Waa, 2 Her; bereik = 0,296 - 0,394), Wechelderzande (1 Wec, 3 Her; r = 0,100 - 0,144), Oeselgem (2 Oes, 3 Her; bereik = 0,114 - 0,220, gem. = 0,150), Izegem (3 Ize, 4 Her; bereik = 0,107 - 0,340, gem. = 0,214) en Vinderhoute (7 Vin, 3 Her; bereik = 0,103 - 0,475, gem. = 0,231).

Naast de reeds vermelde verwantschappen, is het individu uit **Lokeren** ook verwant met dat uit Izegem (r = 0,121), Meerbeke (r = 0,120), Staden (r = 0,137) en Waasmunster (r = 0,172), en met individuen uit Vinderhoute (4 Vin, 1 Lok; bereik = 0,147 - 0,332).

Naast eerder genoemde verwantschappen is het ene individu uit **Waasmunster** ook verwant aan individuen uit Hooglede (1 Hoo; r = 0,170), Izegem (r = 0,213), Meerbeke (r = 0,238), Staden (r = 0,313) en Vinderhoute (4 Vin; bereik = 0,150 - 0,381).

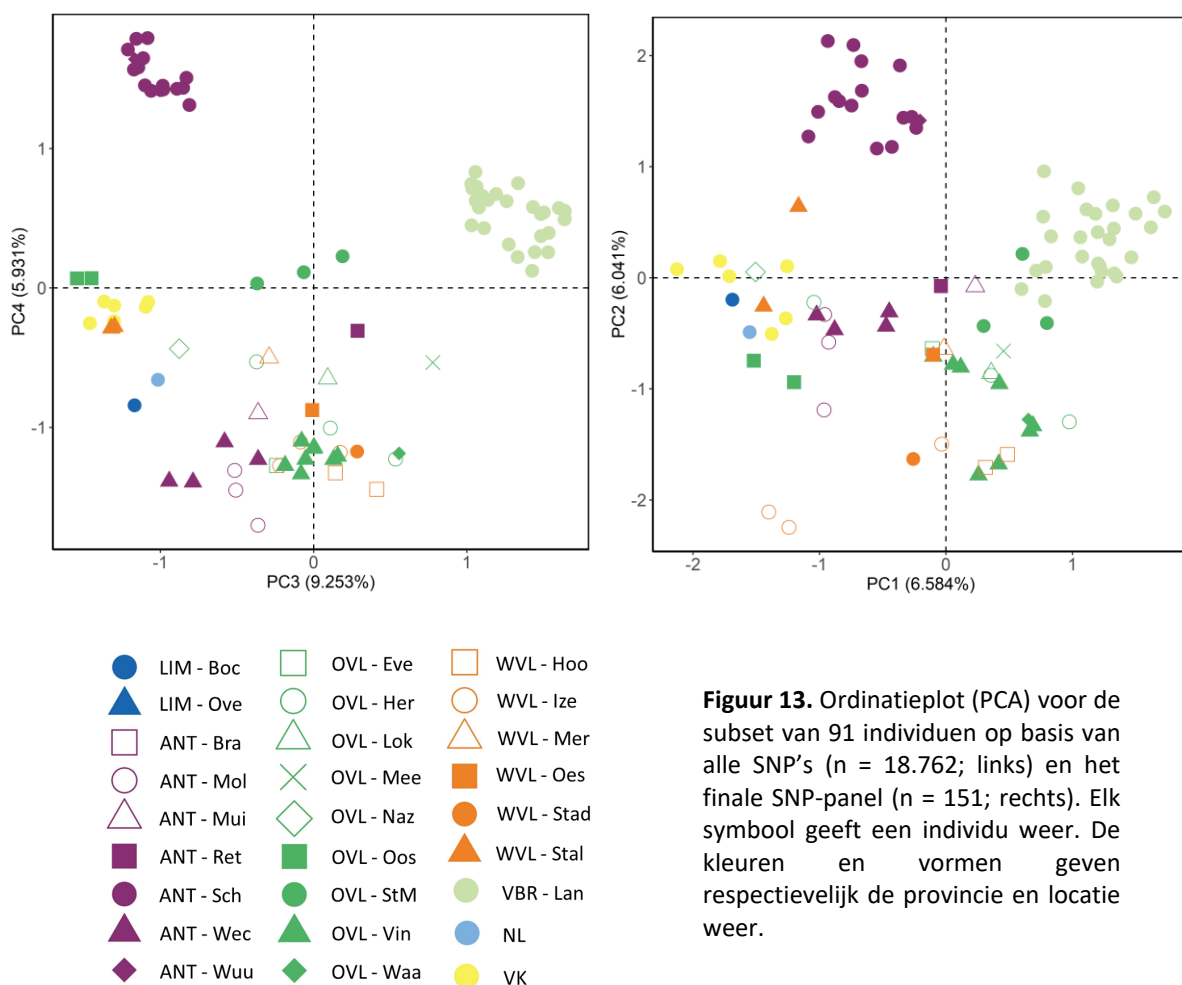
De twee individuen uit **Hooglede** zijn onderling nauw verwant (r = 0,687). Naast eerder genoemde verwantschappen is er verwantschap met Meerbeke (1 Hoo, 1 Mee; r = 0,150), Izegem (1 Hoo, 1 Ize; r = 0,115), Staden (1 Sta, 2 Hoo; bereik = 0,133 - 0,285) en Vinderhoute (1 Vin, 2 Hoo; bereik = 0,119 - 0,242).

De individuen uit **Wechelderzande** zijn onderling nauw verwant (bereik = 0,395 - 0,642, gem. = 0,507). Alle verwantschappen met overige locaties zijn ondertussen genoemd (negen locaties).

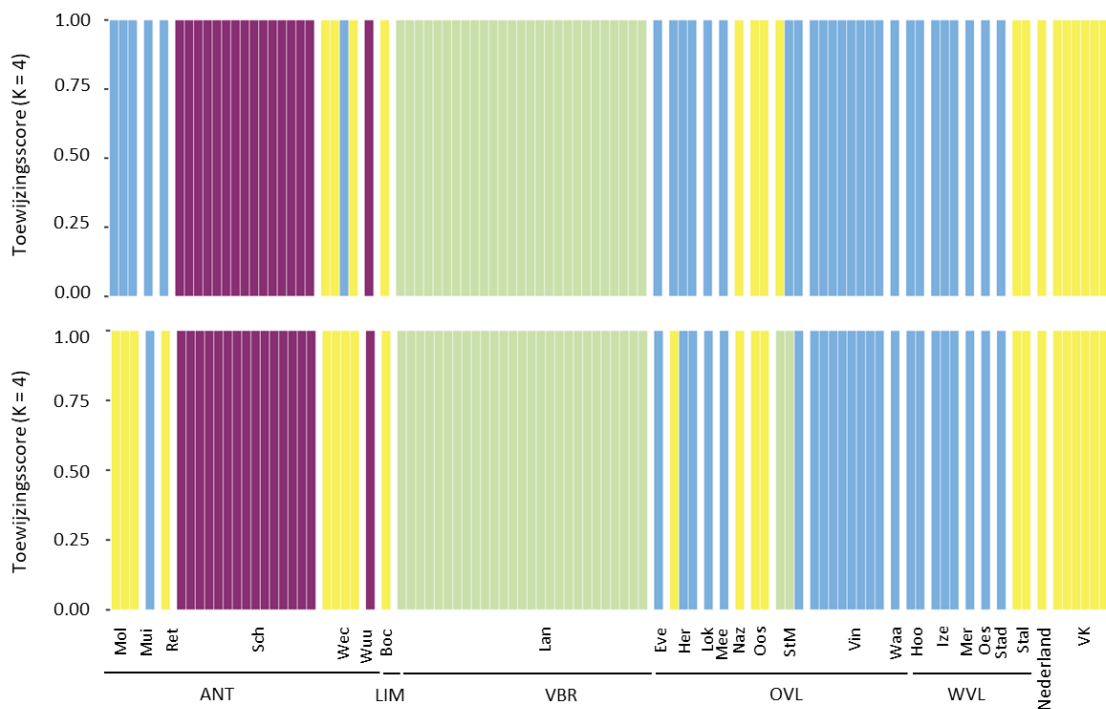
3.5 ONTWIKKELING SNP-PANEL

Wanneer we, op basis van de RADseq-analyses, de resultaten van de volledige SNP-set met deze van het finale SNP-panel vergelijken, zien we dat de genetische structuur op basis van beide sets gelijkaardig is (**Figuur 13**). De individuen uit Langdorp en Schoten vormen ook op basis van het finale panel aparte genetische clusters. Voor de andere individuen zijn er subtiele verschillen, maar over het algemeen blijft het patroon hetzelfde. De toewijzingsanalyses op basis van DAPC voor het finale panel geven opnieuw aan dat er vier genetische clusters zijn binnen de dataset (**Figuur 14**). Acht individuen krijgen op basis van het panel een andere toewijzing. Deze individuen zijn afkomstig uit Mol, Retie, Wechelderzande, Herdersem en Sint-Martens-Latem. Dit zijn individuen waarbij de STRUCTURE-analyse een herkomst aanduidt uit meerdere groepen (**Figuur 15**).

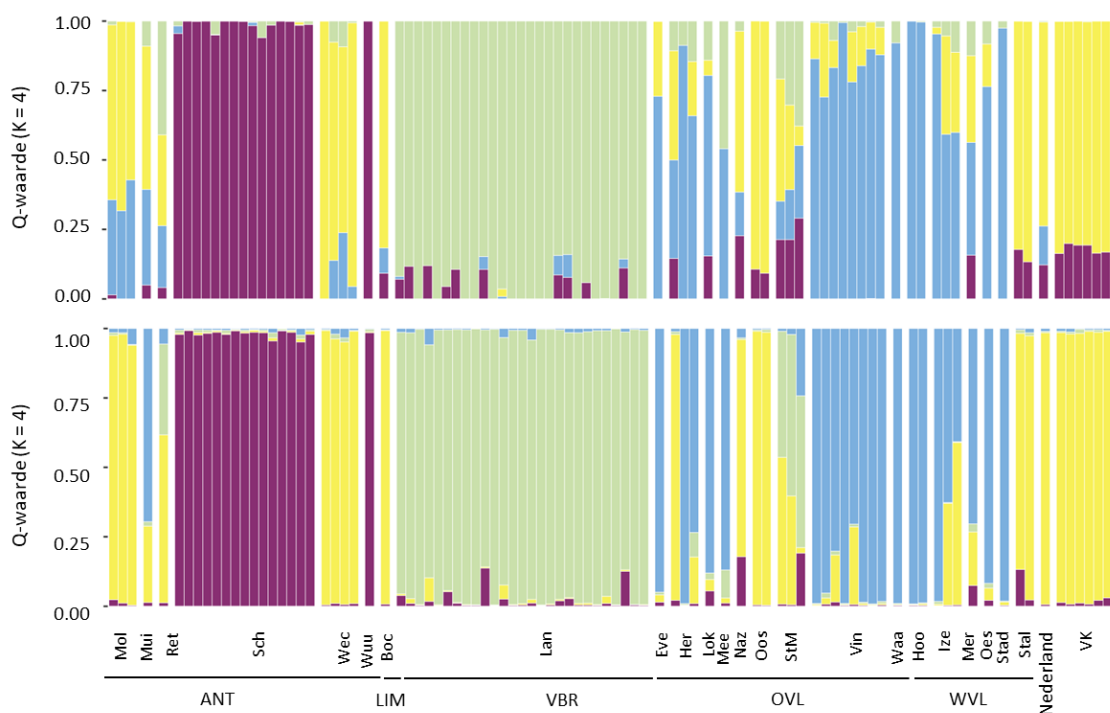
Over het algemeen geeft de STRUCTURE-analyse dezelfde resultaten voor de volledige SNP-set en het finale SNP-panel, waarbij de meeste individuen een duidelijke oorsprong in een bepaalde cluster hebben (**Figuur 15**). De resultaten met het SNP-panel geven wel minder admixture. Sommige individuen hebben opnieuw een onduidelijke oorsprong (bv. Sint-Martens-Latem, Retie), anderen kennen een toewijzing aan een andere cluster (bv. Mol, Nazareth).



Figuur 13. Ordinatatieplot (PCA) voor de subset van 91 individuen op basis van alle SNP's ($n = 18.762$; links) en het finale SNP-panel ($n = 151$; rechts). Elk symbool geeft een individu weer. De kleuren en vormen geven respectievelijk de provincie en locatie weer.

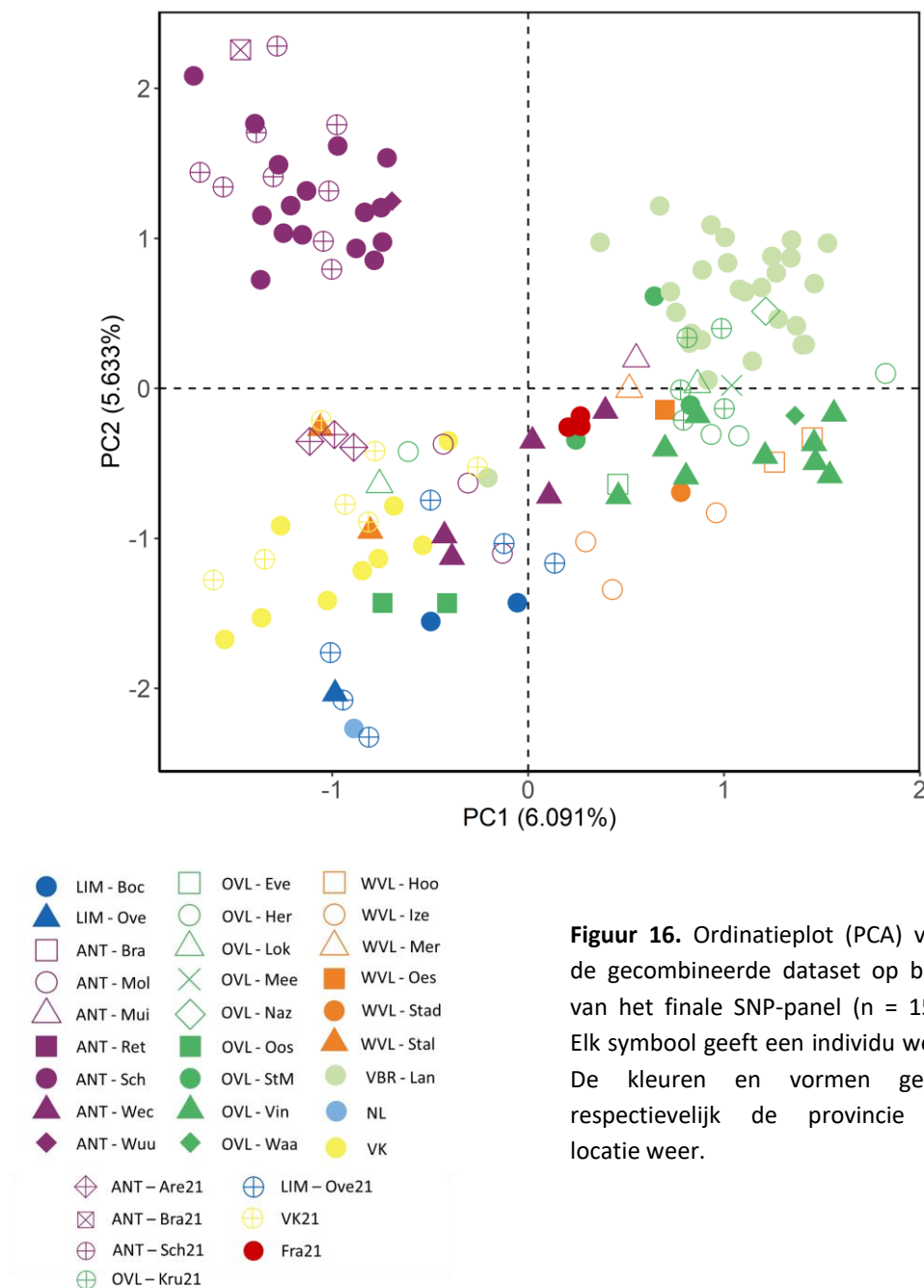


Figuur 14. Toewijzing berekend via *Discriminant Analysis of Principal Components* (DAPC) op basis van alle SNP's ($n = 18.762$; boven) en het finale SNP-panel ($n = 151$; onder). Elke staaf is een individu. De kleur geeft weer aan welke van de vier clusters een individu werd toegewezen.

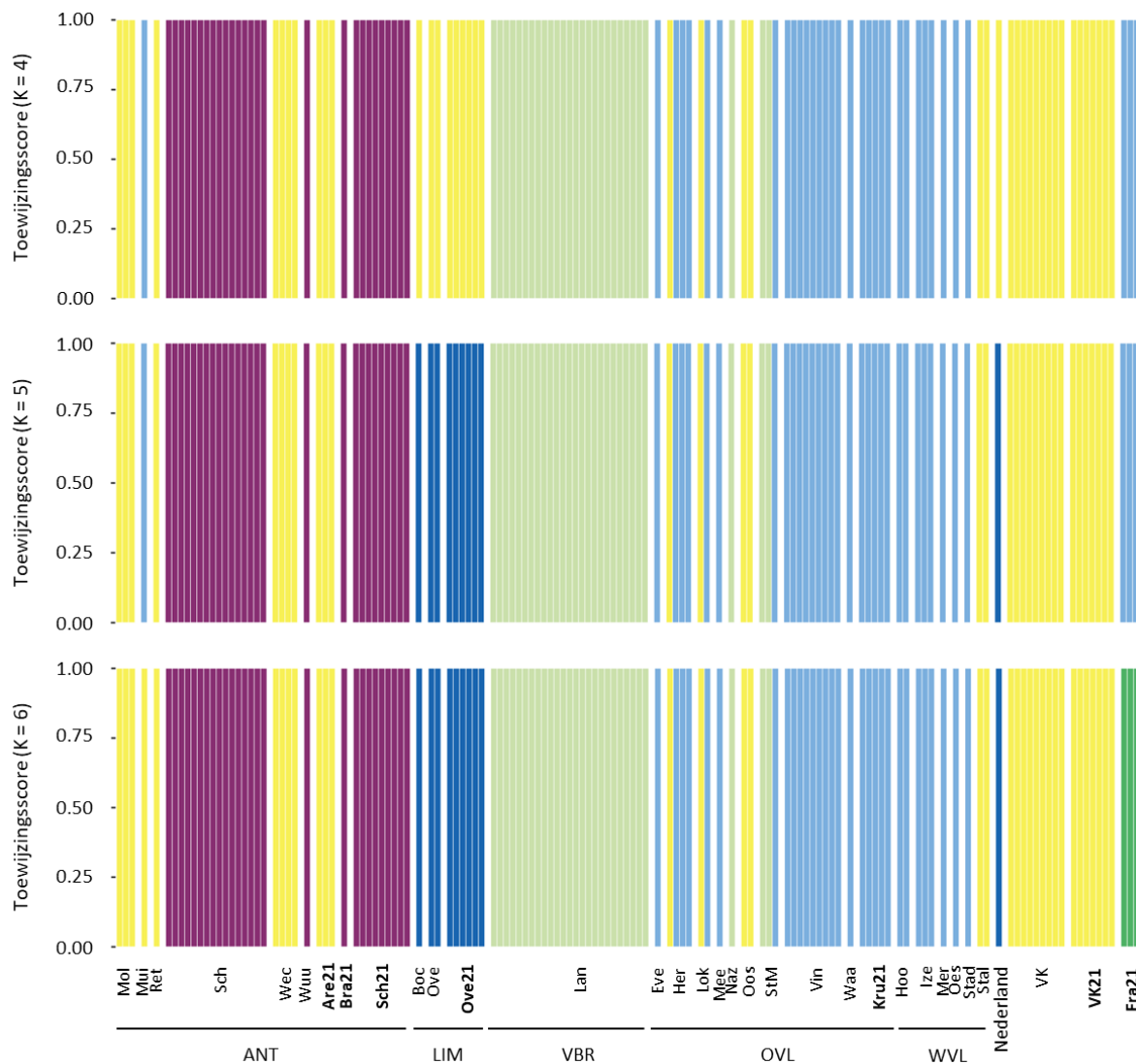


Figuur 15. Q-waarde berekend voor elk individu met behulp van STRUCTURE software op basis van alle SNP's ($n = 18.762$; boven) en het finale SNP-panel ($n = 500$; onder). Deze waarde geeft de admixture-proportie van elk individu weer ($K = 4$). Elke staaf is een individu.

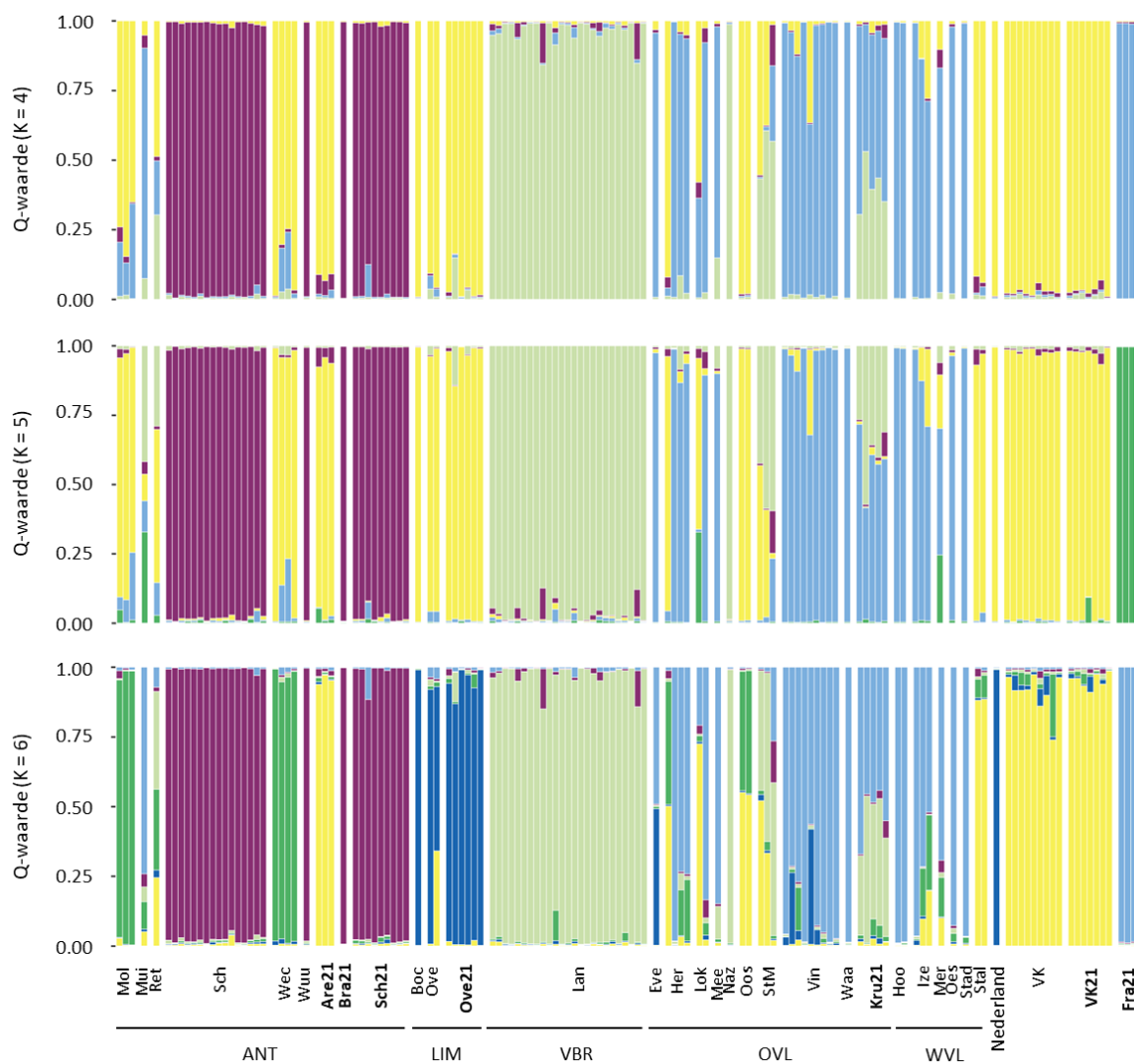
Voor de volgende analyses werden de 91 individuen, geanalyseerd via RADseq, gecombineerd met 42 individuen geanalyseerd via GTseq. Van deze 42 individuen zijn er 33 die niet eerder geanalyseerd werden. Op basis van PC1 en PC2 vormt de cluster Schoten-Brasschaat-Wuustwezel nog steeds een aparte groep (**Figuur 16**). De nieuwe stalen uit Schoten en Brasschaat behoren tot dezelfde groep. Langdorp vormt ook nog steeds een aparte cluster, al is het onderscheid minder duidelijk en lijken diverse Oost-Vlaamse locaties, nu uitgebreid met de nieuwe stalen uit Kruibeke, tot dezelfde groep te behoren. De nieuwe stalen uit Overpelt vinden aansluiting bij de eerder geanalyseerde stalen uit Limburg (en bij het Nederlandse staal). De nieuwe stalen uit Arendonk clusteren bij locaties uit andere provincies. Het staal uit Zulte is niet succesvol gegenotypeerd. De individuen uit Frankrijk clusteren niet apart op basis van PC1 en PC2, wel op basis van PC3 (niet getoond).



De DAPC- en STRUCTURE-analyses voor deze stalen geven gelijkaardige resultaten (**Figuur 17**, **Figuur 18**). De nieuwe individuen uit Arendonk worden toegewezen aan de derde cluster, waartoe ook de nieuwe stalen van het Verenigd Koninkrijk behoren. Met inclusie van de nieuwe stalen uit Limburg wordt een nieuwe cluster herkend (waartoe ook het Nederlandse staal behoort). Daarnaast vormen ook de Franse stalen een aparte cluster. Op basis van de STRUCTURE-analyse lijkt het dat de individuen uit Kruibeke hun oorsprong deels hebben in de cluster van Langdorp, en deels in de vierde cluster (zie 3.3, **Figuur 18**).



Figuur 17. Toewijzing berekend via *Discriminant Analysis of Principal Components* (DAPC) voor de gecombineerde dataset op basis van het finale SNP-panel (n = 151). Elke staaf is een individu. De kleur geeft weer aan welke van de vier (boven), vijf (midden) of zes (onder) clusters een individu werd toegewezen.



Figuur 18. Q-waarde berekend voor elk individu (weergegeven door één staaf) met behulp van STRUCTURE software voor de gecombineerde dataset op basis van het finale SNP-panel ($n = 151$). Deze waarde geeft de admixture-proportie van elk individu weer.

4 DISCUSSIE

4.1 GENETISCHE DIVERSITEIT EN EFFECTIEVE POPULATIEGROOTTES

De waargenomen genetische diversiteit bedraagt voor de meeste locaties tussen 0,20 en 0,25 (**Tabel 3**). Over het algemeen wordt aangenomen dat genetische diversiteit bij uitheemse soorten laag is, door het beperkt aantal individuen dat wordt geïntroduceerd en de genetische bottlenecks die hiermee geassocieerd zijn (Frankham et al. 2002, Lee 2002). Deze hypothese lijkt voor muntjak in Groot-Brittannië te worden bevestigd door Freeman et al. (2016). Belangrijk hierbij te vermelden is dat ondanks die lage genetische diversiteit, muntjak zich er snel en succesvol heeft kunnen verspreiden. De lagere genetische diversiteit op sommige locaties in Vlaanderen is waarschijnlijk het resultaat van inteelt. Dit idee lijkt te worden bevestigd door de effectieve populatiegroottes (hoge H_O en N_e voor Schoten, versus lage H_O en N_e voor Langdorp), doch niet heel consistent (hoge H_O maar lage N_e voor Vinderhout). Het is niet mogelijk om genetische diversiteit in Vlaanderen rechtstreeks te vergelijken met deze berekend in andere studies doordat er een ander type merkers werd gebruikt (bv. Freeman et al. 2016).

De groep uit Schoten vertoonde een gemiddelde genetische diversiteit ten opzichte van de andere Vlaamse locaties en gaf ook de grootste effectieve populatiegrootte van de drie geteste locaties uit Vlaanderen. Een schatting van de actuele populatiegrootte van de in het wild levende dieren kunnen we op basis van deze cijfers niet maken, gezien er onvoldoende recente stalen uit het wild zijn. Deze schatting kan wel worden gemaakt naarmate stalen worden aangeleverd. Naar inschatting is de populatie wel onvoldoende groot om een zekere mate van inteeltdepressie te vermijden (Frankham et al. 2014). Dit hoeft een succesvolle en snelle uitbreiding niet in de weg te staan (zie hoger).

4.2 GENETISCHE STRUCTUUR

Met een gemiddelde F_{ST} -waarde van 0,235 is er een duidelijke genetische differentiatie tussen de verschillende locaties waar muntjak in Vlaanderen werd of wordt gevonden (Frankham et al. 2002). Er is dus geen sprake van één genetisch homogeen groep. Dit is in tegenstelling tot de populatie in Engeland, waar uit eerder onderzoek blijkt dat er weinig populatiestructuur is (Freeman et al. 2016). Ondanks het lage aantal Engelse stalen in deze studie, lijken onze resultaten in overeenstemming met die bevindingen (**Figuur 7**). Dat er tussen de Vlaamse stalen wel genetische structuur wordt vastgesteld, maar tussen de Engelse stalen niet, kan worden verklaard doordat de Engelse populatie een wilde, aaneengesloten en veel grotere populatie betreft. De Vlaamse populatie daarentegen is klein en voortkomend uit meerdere introducties, die soms ingeteeld zijn.

Zowel de DAPC-analyse als de STRUCTURE-analyse onderscheiden vier clusters binnen de in dit onderzoek betrokken stalen van muntjak uit Vlaanderen. In beide analyses scheiden de locaties Schoten-Brasschaat-Wuustwezel enerzijds, en de locatie Langdorp anderzijds, duidelijk

De andere twee clusters omvatten individuen uit meerdere provincies en vertonen admixture (genetische vermenging). Ten eerste weerspiegelen deze clusters dus geen geografisch afgebakende gebieden. Ten tweede blijken een redelijk aantal individuen door de admixture niet ondubbelzinnig aan één van de clusters te worden toegewezen (STRUCTURE). Deze beide patronen signaleren dat de herkomst (de familie- of eigen historiek) van dieren uit deze clusters vaak buiten de eigen locatie is gelegen.

De achtergrond van individuele dieren wordt duidelijker herkend in de verwantschapsanalyses. Belangrijk om te vermelden is evenwel dat er geen conclusies kunnen worden gemaakt over de exacte relatie tussen individuen, aangezien een bepaalde coëfficiënt kan wijzen op meerdere types relaties (**Tabel 2**). Bovendien waren de leeftijd en het geslacht van dieren niet meegeleverd met de stalen. Bovendien is er geen informatie over de richting van relaties en kunnen de waardes hoger zijn dan verwacht op basis van bepaalde verwantschappen, door (de vaak hoge graad van) inteelt (Hedrick & Lacy 2015).

Onder de dieren van locatie Schoten die uit het wild zijn betrokken, zijn enkele r -waarden vastgesteld die op een eerstegraadsverwantschap duiden (max. $r = 0,633$). Dit duidt waarschijnlijk op voortplanting, en dus op vestiging van de populatie. Deze vestiging wordt ook bevestigd door zicht- en cameravalwaarnemingen (INBO, niet gepubliceerd).

In andere gevallen wijst de verwantschapsanalyse erop dat familiebanden het lokale niveau overstijgen. Zo wijst ook de verwantschapsanalyse uit dat de individuen uit Schoten, Brasschaat en Wuustwezel één genetische groep vormen. Een bij de handhavingdiensten

Tussen alle overige locaties werd er een zekere verwantschap vastgesteld, al kon die beperkt zijn tot één individu, en aan de lage kant zijn ($r \approx 0,10$). Sommige dieren uit het wild kunnen via deze weg aan een groep van dieren in gevangenschap worden toegewezen (bv. Evergem aan Vinderhoute, **Figuur 12**). Waar gehouden dieren verwant blijken met gehouden dieren op een andere locatie, betekent dit dat er dieren van eigenaar zijn gewisseld, al of niet recent, en al of niet rechtstreeks.

Samenvattend kunnen we stellen dat de genetische diversiteit van Chinese muntjak in Vlaanderen in de lijn ligt met deze van het Verenigd Koninkrijk, waar de populatie tot een zeer abundante probleemsoort is uitgegroeid. Evenwel tekent er zich in Vlaanderen een duidelijke, intern gedifferentieerde structuur af, waarbij enkele groepen zijn te onderscheiden. Sommige (voormalig) gehouden locaties geven blijk van inteelt.

Voor wat dieren uit gevangenschap betreft (of dieren uit het wild met een vermoedelijk, recent verleden in gevangenschap), geven zowel de DAPC-, STRUCTURE- als verwantschapsanalyses wetenschappelijke ondersteuning voor menselijk handelen. Die handelingen kunnen kweek, uitwisseling of vrijlating omvatten. De mate waarin dit voor specifieke relaties het geval is, kan niet worden beoordeeld zonder verdere details van de individuen, de locaties en, desgevallend, de handhavingss dossiers. De exacte relatie (bv. moeder/kind, of broer/zus) en de richting (van bijvoorbeeld uitwisseling) kan niet uit de verwantschapscoëfficiënt afgeleid worden. Bovendien hoeft een verwantschap tussen twee locaties niet noodzakelijk te betekenen dat er een rechtstreekse uitwisseling gebeurde, gezien dieren ook een gemeenschappelijke herkomst op een derde locatie kunnen kennen. Hoewel enkele (verre) verwantschappen kunnen teruggaan op wettelijk toegelaten handelingen van vóór de beperkingen op het houden van muntjak (positieflijst, 2009; verordening, 2016), is dit voor andere verwantschappen zeker niet het geval, de maximumleeftijd van dieren en dossierspecifieke details in acht genomen.

4.5 ROUTINEMATIGE MONITORING

Uit de resultaten van het SNP-panel blijkt dat we succesvol stalen kunnen toewijzen aan de oorspronkelijke cluster. Hieruit kunnen we concluderen dat we met een zeer hoge waarschijnlijkheid de herkomst van nieuwe stalen kunnen bepalen en dat het panel succesvol kan gebruikt worden voor toekomstige routinematige monitoring.

De monitoring kan in principe worden toegepast op elk DNA-houdend weefsel, naargelang de kwaliteit, bv. (consumptie)vlees, botmateriaal, of uitwerpselen. Dit moet handhavers verder bijstaan in het blootleggen van verboden handelingen, beheerders informeren over de herkomst van dieren in het wild en de genetische parameters van beheerde populaties, en wetenschappers helpen om demografische patronen en genetische processen verder te ontrafelen.

REFERENCES

- Adriaens T, Branquart E, Gosse D, Reniers J, Vanderhoeven S (2019). Feasibility of eradication and spread limitation for species of Union concern sensu the EU IAS Regulation (EU 1143/2014) in Belgium. Report prepared in support of implementing the IAS Regulation in Belgium. Institute for Nature and Forest Research, Service Public de Wallonie, National Scientific Secretariat on Invasive Alien Species, Belgian Biodiversity Platform.
- Andrews S (2015). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA, Johnson EA (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PloS one*, 3(10), e3376.
- Baiwy E, Schockert V, Branquart E (2013). Risk analysis of the Reeves' muntjac *Muntiacus reevesi*, Risk analysis report of non-native organisms in Belgium. Cellule interdépartementale sur les Espèces invasives (CiEi), DGO3, SPW/Editions.
- Bootsma ML, Gruenthal KM, McKinney GJ, Simmons L, Miller L, Sass GG, Larson WA (2020). A GT-seq panel for walleye (*Sander vitreus*) provides important insights for efficient development and implementation of amplicon panels in non-model organisms. *Molecular Ecology Resources*, 20(6), 1706-1722.
- Bottiau A (2018). Le cerf muntjac (*Muntiacus reevesi*): écologie, biologie, dynamique des populations et étude du potentiel invasif. PhD Thesis. École Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- Campbell NR, Harmon SA, Narum SR (2015). Genotyping-in-Thousands by sequencing (GT-seq): A cost effective SNP genotyping method based on custom amplicon sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 15(4), 855-867.
- Casaer J, Boone N, Devisscher S, Vercammen J, Adriaens T (2015). Best practice voor beheer van Chinese muntjak *Muntiacus reevesi* in Vlaanderen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2015 (INBO.R.2015.7092003). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Casaer J, Devisscher S, Adriaens T, Brosens D, Desmet P, Reyserhove L (2021). Invasive species - Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*) in Flanders, Belgium. Version 1.2. Research Institute for Nature and Forest (INBO). Sampling event dataset <https://doi.org/10.15468/sr8bn2>.
- Carden RF, Carlin CM, Marnell F, Mcelholm D, Hetherington J, Gammell MP (2011). Distribution and range expansion of deer in Ireland. *Mammal Review*, 41(4), 313-325.
- Carroll EL, Bruford MW, DeWoody JA, Leroy G, Strand A, Waits L, Wang J (2018). Genetic and genomic monitoring with minimally invasive sampling methods. *Evolutionary Applications*, 11(7), 1094-1119.
- Catchen JM, Amores A, Hohenlohe P, Cresko W, Postlethwait JH (2011). Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes | genomes | genetics*, 1(3), 171-182.

- Hollander H (2016). Exotische hoefdieren in Nederland slaan niet aan. Kijk op Exoten nov 2016: 16-17.
- Hurel P, Terlin M, Derré F, Barboiron A (2018). Le muntjac de Reeves, un nouveau cervidé exotique envahissant nécessitant une réaction rapide. Faune Sauvage 321.
- Jackson JE, Chapman DI, Dansie O (1977). A note on the food of Muntjac deer (*Muntiacus reevesi*). Journal of Zoology, Lond., 183, 546-548.
- Jiang Z, Jiang J, Wang Y, Zhang E, Zhang Y, Li L, ... Ping X (2016). Red list of China's vertebrates. Biodiversity Science, 24(5), 500.
- Jombart T & Collins C (2015). A tutorial for discriminant analysis of principal components (DAPC) using adegenet 2.0.0. London: Imperial College London, MRC Centre for Outbreak Analysis and Modelling.
- Keller RP, Kocев D, Džeroski S (2011). Trait-based risk assessment for invasive species: high performance across diverse taxonomic groups, geographic ranges and machine learning/statistical tools. Diversity and Distributions, 17(3), 451-461.
- Lee CE (2002). Evolutionary genetics of invasive species. Trends in Ecology & Evolution, 17(8), 386-391.
- Li H & Durbin R (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. Bioinformatics, 25(14), 1754-1760.
- Mathews F, Kubasiewicz LM, Gurnell J, Harrower CA, McDonald RA, Shore RF (2018). A review of the population and conservation status of British mammals. Joint Publication JP025, Natural England, Peterborough.
- Mudd AB, Bredeson JV, Baum R, Hockemeyer D, Rokhsar DS (2020). Analysis of muntjac deer genome and chromatin architecture reveals rapid karyotype evolution. Communications Biology, 3(1), 1-10.
- Nehring S & Skowronek S (2017). Die invasiven gebietsfremden Arten der unionsliste der Verordnung (EU) Nr.1143/2014, Erste Fortschreibung.
- Nentwig W, Bacher S, Kumschick S, Pyšek P, Vilà M (2018). More than “100 worst” alien species in Europe. Biological Invasions, 20(6), 1611-1621.
- Palmer G, Stephens PA, Ward AI, Willis SG (2015). Nationwide trophic cascades: changes in avian community structure driven by ungulates. Scientific reports 5 (1): 1-6.
- Palstra FP & Ruzzante DE (2008). Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? Molecular ecology, 17(15), 3428-3447.
- Paris JR, Stevens JR, Catchen JM (2017). Lost in parameter space: a road map for stacks. Methods in Ecology and Evolution 8 (10): 1360-1373.
- Pew J, Muir PH, Wang J, Frasier TR (2015). Related: an R package for analysing pairwise relatedness from codominant molecular markers. Molecular Ecology Resources, 15(3), 557-561.

////////////////////////////////////

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Privé F, Luu K, Vilhjálmsson BJ, Blum MG (2020). Performing highly efficient genome scans for local adaptation with R package pcadapt version 4. *Molecular Biology and Evolution*, 37(7), 2153-2154.
- Putman RJ (2009). *Muntiacus reevesi* (Reeves' muntjac). CABI Invasive Species Compendium datasheet. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/74281>.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Richard L (1982). Note sur un crane de petit cervide Asiatique tué dans l'Eure. *Actes du Muséum de Rouen*:46-57.
- Rochette NC & Catchen JM (2017). Deriving genotypes from RAD-seq short-read data using Stacks. *Nature Protocols* 12: 2640-2659.
- Rochette NC, Rivera-Colón AG, Catchen JM (2019). Stacks 2: Analytical methods for paired-endsequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology* 28 (21): 4737-4754.
- Segar J, Pereira HM, Baeten L, Bernhardt-Römermann M, De Frenne P, Fernández N, ... & Staude IR (2022). Divergent roles of herbivory in eutrophying forests. *Nature Communications*, 13(1), 7837.
- Smith-Jones C (2004). Muntjac: managing an alien species. Coch y Bonddu Books.
- Timmins J & Chan B (2016). *Muntiacus reevesi*. The IUCN red list of threatened species 2016: e.T42191A22166608.
- Tsiamis K, Gervasini E, Deriu I, D'amico F, Nunes A, Addamo A, De Jesus Cardoso A (2017). Baseline Distribution of Invasive Alien Species of Union concern. Ispra (Italy): Publications Office of the European Union.
- 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.
- Vanreusel W, Swinnen K, Gielen K, Vercayie D, Driessens G, Veraghtert W, Desmet P, Herremans M (2023). Waarnemingen.be - Non-native animal occurrences in Flanders and the Brussels Capital Region, Belgium. Version 1.58. Natuurpunt. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/k2aiak>.
- Wang J (2002). An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, 160(3), 1203-1215.
- Waples RS (2002). Evaluating the effect of stage-specific survivorship on the Ne/N ratio. *Molecular Ecology*, 11(6), 1029-1037.
- Waples RS & Do CHI (2008). LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources*, 8(4), 753-756.

Ward AI (2005). Expanding ranges of wild and feral deer in Great Britain. *Mammal Review*, 35(2), 165-173.

Ward AI, Richardson S, Mergeay J (2021). Reeves' muntjac populations continue to grow and spread across Great Britain and are invading continental Europe. *European Journal of Wildlife Research*, 67(3), 1-10.

Weir BS & Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1358-1370.

Williams TR, Harris S, Chapman N, Wayne RK, Beaumont MA, Bruford MW (1995). A molecular analysis of the introduced Reeves' muntjac in Southern England-genetic variation in the mitochondrial genome. In: Muntjac Deer - Their Biology, Impact and Management in Britain, Forestry Authority Press, pp. 6-22.