



Vlaanderen
is wetenschap

Een genetische studie van Chinese muntjak in Vlaanderen – een update (2025)

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

INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK

Auteurs:

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

Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Reviewers:

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, Mouton C, Van Breusegem A, Neyrinck S, Adriaens T, Mergeay J. Een genetische studie van Chinese muntjak in Vlaanderen - een update (2025). Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2025 (35). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

DOI: doi.org/10.21436/inbor.128499361

D/2025/3241/209

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2025 (35)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Hilde Eggermont



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 - EEN UPDATE (2025)

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

doi.org/10.21436/inbor.128499361

Dankwoord

De auteurs willen uitdrukkelijk het Agentschap voor Natuur en Bos bedanken (ANB; boswachters, faunabeheerders, natuurinspecteurs en andere medewerkers), voor het verlenen van de meerderheid van de nieuwe stalen die voor dit rapport zijn geanalyseerd. Stalen werden ook aangeleverd door Vlaamse jagers, Alain Licoppe (DEMNA, Wallonië) en Jean-François Maillard (OFB, Frankrijk). Uiteraard danken wij ook nog steeds degenen die stalen hebben aangeleverd voor het eerdere rapport (die ook hier zijn opgenomen). Dit rapport is verder gerealiseerd met de hulp van INBO-collega's die hielpen met de ophaling en verwerking van stalen, en collega Karen Cox voor het suggereren van waardevolle verbeteringen.

Samenvatting

Dit rapport is een vervolg van de genetische studie van Deflem et al. (2022). In die studie werden voor het eerst stalen van Chinese muntjak (*Muntiacus reevesi*) uit Vlaanderen onderzocht op de mate van genetische diversiteit, structuur en onderlinge verwantschap. Daarbij werd een protocol ontwikkeld voor eenvoudige (routinematige) monitoring. Dit rapport behandelt de verwerking van nieuwe stalen volgens dit protocol.

De muntjak is een klein hert dat werd geïntroduceerd in Europa vanuit China. In het Verenigd Koninkrijk is de soort lokaal ondertussen één van de meest algemene hertensoorten geworden. Muntjakpopulaties kunnen lokaal hoge dichtheden bereiken, met schade tot gevolg, vooral in bossen. Om een toename op het Europese vasteland te vermijden, is muntjak opgenomen op de lijst van voor de Europese Unie zorgwekkende invasieve soorten (Verordening EU nr. 1143/2014).

Sinds 2012 is muntjak veelvuldig vastgesteld in Vlaanderen, dat nu het zwaartepunt blijkt te zijn van de soort in de Europese Unie. De verspreiding is complex, als een gevolg van natuurlijke processen enerzijds (bv. dispersie, natuurlijke mortaliteit) en menselijk handelen anderzijds (bv. illegaal bezit, beheer). Het exacte areaal en de huidige trend (toename of afname) zijn onduidelijk. Daarom is het relevant om de populatie genetisch nauw te monitoren.

Zowel nieuwe stalen (2021 tot 2024), als eerder verzamelde maar nog niet succesvol geanalyseerde stalen werden onderzocht. Het betreft 45 en 29 stalen, respectievelijk, uit Vlaanderen, Wallonië, Nederland, Frankrijk en het Verenigd Koninkrijk. De resultaten werden toegevoegd aan de genetische databank, die nu gegevens van 212 dieren bevat.

De genetische diversiteit binnen locaties in Vlaanderen varieert sterk, maar binnen genetische clusters niet. De diversiteit van de gevestigde populatie in de Antwerpse rand ligt in lijn met de diversiteit van populaties uit het Verenigd Koninkrijk. Er is binnen deze relatief grote populatie geen genetische differentiatie tussen de eerdere en nieuwe stalen.

Het algemene beeld van de genetische structuur blijft een combinatie van geografische en niet-geografische patronen. In diverse gevallen blijken locaties uit aangrenzende gemeenten (in West-Vlaanderen, Oost-Vlaanderen en op de grens Antwerpen-Limburg) duidelijk met elkaar geclusterd, wat kan wijzen op natuurlijke dispersie of op uitwisseling van individuen op een lokaal niveau. Maar algemeen wordt clustering ook gestuurd door niet-nabijgelegen locaties, wat duidt op uitwisseling op een bovenlokaal niveau, of op een gemeenschappelijke herkomst. Daarnaast zijn er ook een aantal stalen met onduidelijke toewijzing aan één van de clusters.

De locaties Schoten-Brasschaat-Wuustwezel tekenen opnieuw het sterkst af van de rest. Nieuw is dat ook een staal uit Breda (Nederland) hieraan gelinkt kan worden, wat sterk bewijs vormt van verspreiding van deze populatie op Nederlandse bodem. De link met een staal uit de provincie Luik blijft onverklaard, maar pleit voor een uitgebreidere analyse van stalen uit Wallonië, waar muntjak ondertussen ook gevestigd blijkt. Ook voor een aantal andere (lokale) situaties bieden de analyses nieuwe inzichten. Handhavers en terreinbeheerders kunnen contact opnemen met de auteurs voor de interpretatie van casus-specifieke resultaten.

Aanbevelingen voor beheer en beleid

Vlaanderen kent nog steeds een belangrijke aanwezigheid van Chinese muntjak. In overeenstemming met Verordening EU nr. 1143/2014 moet de populatie zo goed als mogelijk worden beheerst. Dit omvat een strikte handhaving van het verbod op bezit, kweek, uitwisseling en vrijlating van gehouden muntjakken enerzijds, en het verwijderen van dieren uit het wild anderzijds.

De nieuwe analyses bevestigen dat het beleid rond muntjak zich op beide sporen moet blijven richten. De vondst van een Nederlands staal met een duidelijke herkomst in Vlaanderen, en de aanwezigheid van muntjak in de provincie Luik, onderstrepen het toenemend belang van een grensoverschrijdende aanpak.

De genetische databank die in het vorig rapport is opgestart, en met dit rapport is uitgebreid, 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 de populatiedynamiek van de soort te bestuderen.

English abstract

This report is a follow-up to the genetic study by Deflem et al. (2022). In that study, samples of Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*) from Flanders were examined for the first time to determine their genetic diversity, structure and relatedness. A protocol was developed for simple (routine) monitoring. This report deals with the processing of new samples according to this protocol.

Muntjac is a small deer that has been introduced to Europe from China. In the United Kingdom, the species has become one of the most common deer species. Muntjac populations can reach high densities locally, causing damage, especially in forests. To prevent an expansion on the European mainland, muntjac has been included in the list of invasive species of Union concern (Regulation (EU) No 1143/2014).

Since 2012, muntjac has been frequently observed in Flanders, which has now become the stronghold of the species in the European Union. Its spread is complex, due to natural processes on the one hand (e.g. dispersion, natural mortality) and human activity on the other (e.g. illegal possession, management). The exact distribution and current trends are unclear (increase or decrease). It is therefore important to monitor the population genetically.

Both new samples (recently collected, 2021 to 2024) and previously collected but unsuccessfully analysed samples were examined. This concerns 45 and 29 samples, respectively, from Flanders, Wallonia, the Netherlands, France and the United Kingdom. The results were added to a genetic database, which now contains data from 212 animals.

Genetic diversity within locations in Flanders varies greatly, but not within genetic clusters. The diversity of the established population in the Antwerp area is in line with that of populations from the United Kingdom. Within this relatively large population, there is no genetic differentiation between the earlier and new samples.

The overall picture of the genetic structure remains a combination of geographical and non-geographical patterns. In several cases, locations in neighbouring municipalities (in West Flanders, East Flanders and on the Antwerp-Limburg border) appear to be clearly clustered together, which may indicate natural dispersal or exchange of individuals at a local level. However, clustering is also generally driven by non-neighbouring locations, which may indicate exchange above the local level, or a shared origin. In addition, there are also a number of samples that cannot be clearly assigned to one of the clusters.

The Schoten–Brasschaat–Wuustwezel area once again stands out as genetically distinct. A sample from Breda (the Netherlands) clusters with this group, providing strong evidence for the spread of this population across the national border. A genetic link with a sample from the province of Liège remains unexplained and underscores the need for a more comprehensive analysis of samples from Wallonia, where muntjac now also appears to be established. The analyses further yield new insights into several other local contexts. Enforcement officers and site managers may contact the authors for interpretation of case-specific results.

Inhoudstafel

Dankwoord	2
Samenvatting	3
Aanbevelingen voor beheer en/of beleid	4
English abstract	5
Lijst van figuren	7
Lijst van tabellen	8
1 Inleiding	9
1.1 Achtergrond	9
1.2 Situatie in Europa	9
1.3 Situatie in Vlaanderen	11
1.4 Genetische monitoring	12
1.5 Doelstellingen	13
2 Werkwijze	14
2.1 Stalen	14
2.2 Genetische analyses	17
2.2.1 Genotypering	17
2.2.2 Bio-informatica	18
2.2.3 Dataverwerking	18
3 Resultaten	20
3.1 Genetische structuur	20
3.2 Genetische diversiteit	26
3.3 Verwantschappen	28
4 Discussie	30
4.1 Methodologie	30
4.2 Diversiteit	30
4.3 Structuur en verwantschap	30
5 Referenties	33
Bijlage	36

Lijst van figuren

Figuur 1	Het aantal kilometerhokken met waarnemingen van muntjak in het Vlaamse Gewest (paars: alle waarnemingen; grijs: gevalideerde waarnemingen). Bron: GBIF (2025), data voornamelijk van Casaer et al. (2025), D’hondt et al. (2025) en Vanreusel et al. (2025); aangevuld met data uit het e-loket Afschotmeldingen.	11
Figuur 2	Waarnemingen van muntjak in het wild in Vlaanderen (2004-2024). De kleuren geven het jaar van de waarneming weer. Ook de niet-gevalideerde waarnemingen zijn opgenomen. Bron: zoals in Figuur 1.	12
Figuur 3	Overzicht van de (hoofd)gemeenten waaruit Vlaamse stalen zijn verzameld. Gearceerde gemeenten verwijzen naar nieuwe stalen; dubbel gearceerde gemeenten naar nieuw-geanalyseerde stalen en stalen uit het vorige rapport. De kleuren verwijzen naar de provincies.....	16
Figuur 4	Ordinatieplot (PCA) voor PC1 en PC2. 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.	22
Figuur 5	Ordinatieplot (PCA) voor PC3 en PC4. Zie vorige figuur voor toelichting en legende.	23
Figuur 6	Toewijzing berekend via DAPC. Elke staaf is een individu. De kleur geeft weer aan welk van de vier clusters een individu werd toegewezen (cluster 1 = paars, cluster 2 = groen, cluster 3 = geel, cluster 4 = blauw).....	24
Figuur 7	Q-waarde berekend met behulp van STRUCTURE. Elke staaf is een individu. De waarde geeft de <i>admixture</i> -proportie van elk individu weer. De kleur geeft weer aan welk van de vier clusters een individu werd toegewezen (cluster 1 = paars, cluster 2 = groen, cluster 3 = geel, cluster 4 = blauw).	25
Figuur 8	Gemiddelde Q-waarde berekend door STRUCTURE voor elk van de Belgische en Nederlandse locaties. De kleur geeft weer aan welk van de vier clusters een individu werd toegewezen (cluster 1 = paars, cluster 2 = groen, cluster 3 = geel, cluster 4 = blauw).	25
Figuur 9	Gemiddelde gestandaardiseerde multilocusheterozygositeit per locatie. De kleur geeft de relatieve waarde weer (blauw = hoogste, rood = laagste); de grootte van de symbolen is proportioneel aan het aantal stalen per locatie.	27

Lijst van tabellen

Tabel 1 Overzicht van de locaties. De Belgische locaties zijn alfabetisch gerangschikt per provincie (LIM, Limburg; ANT, Antwerpen; VBR, Vlaams-Brabant; OVL, Oost-Vlaanderen; WVL, West-Vlaanderen; LUX, Luxemburg). Gevang. = dieren uit gevangenschap; wild = vrijlevende dieren. N₂₀₂₄ verwijst naar de nieuw-geanalyseerde stalen (nieuw ingezameld (*)) of al eerder ingezameld, zie tekst). N_{2024,analyse} is het aantal hiervan dat met succes werd geanalyseerd. N₂₀₂₂ is het aantal stalen dat in de vorige analyse met succes werd geanalyseerd. N_{totaal} is het totaal aantal succesvol geanalyseerde stalen. 15

Tabel 2 De paarsgewijze genetische afstand (F_{ST}) tussen locaties ($N \geq 5$). De cijfers onder de diagonaal geven het 95%-betrouwbaarheidsinterval. Sch* verwijst naar de nieuwe stalen uit Schoten. 21

Tabel 3 Inteelcoëfficiënt (F_{IS}), allelische rijkdom (AR), gemiddelde waargenomen (H_O) en verwachte (H_E) heterozygositeit en standaarddeviatie per locatie met meer dan vijf stalen. Locaties waarvoor eerder nog geen heterozygositeit bekend was (Deflem et al. 2022: Tabel 3), zijn vetgedrukt. 27

1 INLEIDING

Voor een meer uitgebreid verslag van de situatie van muntjak verwijzen we naar het eerste rapport (Deflem et al. 2022; zie ook Casaer et al. 2015 en D'hondt et al. 2023). We harnemen hier de meest essentiële zaken, en vullen aan met recente informatie.

1.1 ACHTERGROND

De Chinese muntjak (*Muntiacus reevesi* Ogilby, 1839), kortweg muntjak, is een kleine hertensoort die inheems is in Centraal- en Zuid-China (*M. reevesi reevesi*) en Taiwan (*M. reevesi micrurus*). Door menselijk handelen heeft deze soort zich de afgelopen decennia ook in Europa, dus buiten het inheemse verspreidingsgebied, weten te vestigen. Aangenomen wordt dat de aanwezigheid van muntjak in Europa het resultaat is van onopzettelijke ontsnappingen enerzijds (bv. uit private collecties en dierentuinen) en opzettelijke vrijlatingen anderzijds (bv. voor jachtbelangen; Tsiamis et al. 2017, Ward et al. 2021).

1.2 SITUATIE IN EUROPA

In het **Verenigd Koninkrijk** heeft de introductie inmiddels geleid tot een aanzienlijke populatie. De muntjak werd aan het einde van de 19^{de} en het begin van de 20^{ste} eeuw geïntroduceerd in Zuid-Engeland, als sier- en jachtwild op private landgoederen (Chapman 2021, Cooke 2019). Als gevolg van opzettelijke en onopzettelijke introducties breidde het verspreidingsgebied zich uit naar andere delen van het Verenigd Koninkrijk (Ward 2005). Tegen het einde van de 20^{ste} eeuw was de populatie sterk toegenomen. Hoewel de geschatte aantallen uiteenlopen, is duidelijk dat muntjak in verschillende regio's één van de meest algemene hertensoorten is geworden (Croft et al. 2017, Harris et al. 1995, Mathews et al. 2018). Modellen suggereren dat er nog een ruime marge is voor verdere kolonisatie in zowat alle delen van het Verenigd Koninkrijk (Freeman et al. 2022).

Om een soortgelijke ontwikkeling in de **Europese Unie** te voorkomen, werd de muntjak opgenomen op de lijst van voor de Unie zorgwekkende invasieve uitheemse soorten (Verordening EU nr. 1143/2014¹). De Verordening verbiedt het opzettelijk importeren, houden, kweken, vervoeren, verhandelen, gebruiken en vrijlaten van deze soorten. Daarnaast moeten lidstaten maatregelen nemen om vestiging te voorkomen en bestaande populaties in de mate van het mogelijke te verwijderen. Voor muntjak zijn de bepalingen sinds 2016 van kracht. De implementatie van de Verordening in het Vlaamse Gewest is geregeld via het Soortenbesluit²,

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).

Muntjak is in **verschillende lidstaten** gemeld, waaronder Ierland, Denemarken, Oostenrijk en Polen (Chapman 2022, Schertler et al. 2024, Ward et al. 2021). In de meeste van deze landen lijkt het vooralsnog om heel sporadische meldingen te gaan, waarbij onduidelijk is of de aanwezigheid geïsoleerd en kortstondig was, dan wel of er sprake is van vestiging met eventuele voortplanting.

Een overzicht van de historische en huidige situatie in **Frankrijk** wordt gegeven door Maillard et al. (2024). Er zijn recente waarnemingen uit verschillende regio's, maar deze lijken opnieuw heel sporadisch van karakter. Anders is het gesteld in de regio Centre-Val de Loire (departementen Indre-et-Loire, Loir-et-Cher en Indre). Hier wordt een gevestigde populatie vermoed. Het aantal waarnemingen is namelijk toegenomen gedurende de afgelopen 15 jaar, met name rond de gemeente Céré-la-Ronde, maar veldonderzoek doet een (heel) lage dichtheid vermoeden. De populatie in deze regio is vermoedelijk ontstaan door ontsnapte individuen uit particuliere collecties (Bottiau 2018, Hurel et al. 2018). In de regio Normandië (Clères) zou zich tussen 1950 en de jaren '80 een kleine, ontsnapte populatie in het wild hebben gehandhaafd (Chapman 2022, Maillard et al. 2024).

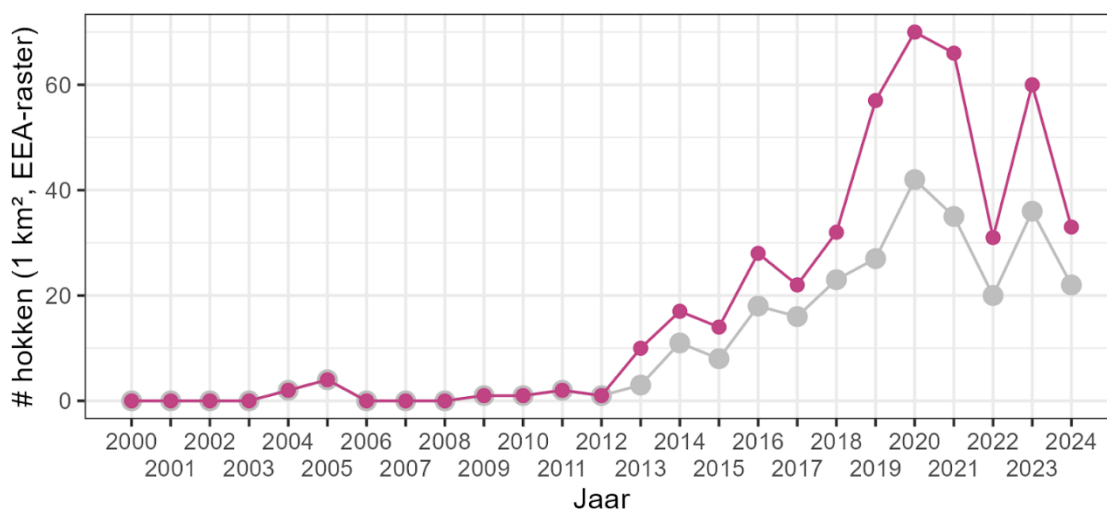
Muntjak lijkt ondertussen wel gevestigd te zijn in **Wallonië**. Buiten sporadische meldingen, verspreid over het gewest, en een vermoedelijk kwijnende populatie in de omgeving van Frasnes-lez-Anvaing (net ten zuiden van de Vlaamse Ardennen), blijken er namelijk verschillende (deel)populaties te bestaan in de Maasvallei tussen Andenne en Flémalle. Daarbij zijn er duidelijke tekenen van voortplanting (Tinel & Legat 2023).

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

SITUATIE IN VLAANDEREN

Ondanks de waarnemingen binnen andere lidstaten, lijkt **Vlaanderen** nog steeds het zwaartepunt voor muntjak te vormen in de Europese Unie, gelet op het aantal locaties waar de soort is vastgesteld, en de regelmaat van meldingen. Een overzicht van de waarnemingen werd gegeven door Deflem et al. (2022). Bijgevolg beperken we ons hier tot een update met toevoeging van de meest recente jaren.

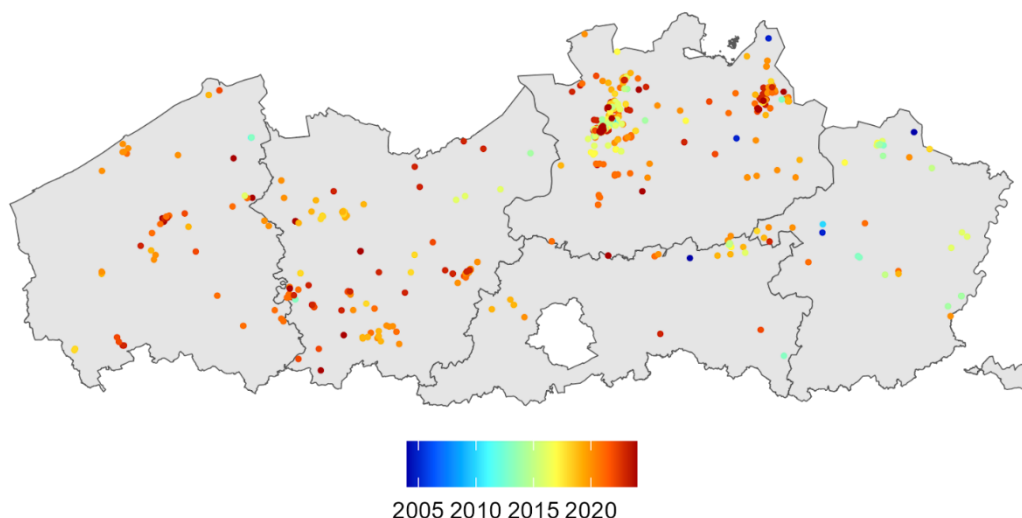
Figuur 1 toont, na de terugval in 2022, een jaar met veel (2023) en een jaar met weinig (2024) waarnemingen. Het is uit deze cijfers dus nog steeds niet duidelijk of er sprake is van een reële terugval na de piek uit de periode 2019-2021.



Figuur 1 Het aantal kilometerhokken met waarnemingen van muntjak in het Vlaamse Gewest (paars: alle waarnemingen; grijs: gevalideerde waarnemingen). Bron: GBIF (2025), data voornamelijk van Casaer et al. (2025), D’hondt et al. (2025) en Vanreusel et al. (2025); aangevuld met data uit het e-loket Afschotmeldingen.

Een **afname** zou conform zijn met een verdere uitdoving van gehouden populaties, ten gevolge van het toezicht op het verbod op bezit. Daarnaast worden meer dieren met succes uit het wild verwijderd: in totaal zijn er 87 meldingen van afvangst of afschot in het e-loket van de Vlaamse overheid voor de periode tot en met 2024, waarvan de helft uit de laatste twee jaren. Doordat afschotmeldingen niet wettelijk verplicht zijn voor muntjak, is voornoemd cijfer mogelijk een onderschatting.

Figuur 2 toont de verspreiding van alle waarnemingen tot op heden. Op vele plaatsen is de aanwezigheid sporadisch (kortstondig) gebleken. De huidige verspreiding is ten opzichte van het vorige rapport feitelijk ongewijzigd. De oostelijke rand van Antwerpen (Voorkempen) vormt nog steeds het belangrijkste bolwerk. Op andere locaties is muntjak (vermoedelijk) aanwezig, maar zijn weinig details gekend (bv. Noordoost-Antwerpen, Zuid-Oost-Vlaanderen). In de gemeente Schoten (Antwerpen) is de populatie van muntjak ondertussen in detail bestudeerd (D’hondt et al. 2023, 2025).



Figuur 2 Waarnemingen van muntjak in het wild in Vlaanderen (2004-2024). De kleuren geven het jaar van de waarneming weer. Ook de niet-gevalideerde waarnemingen zijn opgenomen. Bron: zoals in Figuur 1.

De situatie in Vlaanderen is dus nog steeds in belangrijke mate **onzeker**, zowel wat de actuele verspreiding als de te verwachten trends betreft. In de nabije toekomst kan een toename worden verwacht indien het beheer de vestiging, voortplanting en dispersie onvoldoende zou drukken, of indien illegale activiteiten met de soort zouden worden voortgezet. Daarom blijft het uiterst relevant om de populatie van heel nabij te monitoren, ook op genetisch vlak.

1.4 GENETISCHE MONITORING

De eerste genetische analyses hebben aangetoond dat er in Vlaanderen een duidelijke **genetische structuur** bestaat, gekenmerkt door clusters waarin zowel dieren uit gevangenschap als vrijlevende exemplaren genetisch verwant blijken (Deflem et al. 2022). Deze structuur volgt echter maar gedeeltelijk een geografisch patroon, wat duidt op een aanzienlijke mate van menselijk handelen. De oorsprong van de wilde populatie in de oostelijke rand van Antwerpen is met zekerheid vastgesteld. Deze populatie vertoont geen genetische verwantschap met de overige (voormalig) gehouden populaties die waren geanalyseerd. Bovendien wezen de genetische gegevens erop dat deze populatie relatief groot is en het verspreidingsgebied gestaag uitbreidt. Op basis van de resultaten is het duidelijk dat de verspreidingsdynamiek van muntjak in Vlaanderen complex is en verschilt per situatie, waarbij er zowel sprake is van menselijke factoren (bv. ontsnappingen, uitwisselingen, lethaal beheer) als van natuurlijke processen (zoals voortplanting, dispersie en natuurlijke mortaliteit).

In het rapport uit 2022 werd vervolgens een methodiek ontwikkeld voor een genetische screening op een relatief snelle en eenvoudige wijze. Hierbij wordt gebruikgemaakt van variaties van één nucleotide binnen het genoom, de zogenoemde **Single Nucleotide Polymorphisms** (SNP's). Deze SNP's kunnen worden ingezet om genetische verschillen of, omgekeerd, verwantschappen tussen individuen of populaties te kwantificeren. Bijvoorbeeld: in een populatie kan op een specifieke positie in het genoom de DNA-sequentie 5'-CACTATACCGAG-3'

voorkomen, terwijl bij andere individuen op dezelfde locatie 5'-CACTATGCGAG-3' wordt aangetroffen. De variabele positie, in dit geval A of G, vormt de SNP.

Op basis van een grootschalig onderzoek naar ongeveer 20.000 SNP's in het genoom van muntjak zijn de meest informatieve variaties geselecteerd om een specifiek panel van 151 SNP's te ontwikkelen. Uit resultaten van het eerdere rapport blijkt dat dit SNP-panel robuust en geschikt is voor toekomstige monitoring. Hiermee kunnen nieuwe stalen dus voortaan snel en efficiënt worden geanalyseerd. Dit laat een **routinematige monitoring** toe, en het is de intentie om nieuw-beschikbare stalen van muntjak op regelmatige basis in bulk te analyseren. De resultaten worden dan toegevoegd aan een dataset die alle genetische informatie van de geanalyseerde individuen bundelt.

1.5 DOELSTELLINGEN

Het eerder ontwikkelde SNP-panel werd gebruikt om stalen van muntjak te screenen. Het betreft **(1)** nieuwe stalen, die ons sinds het vorige rapport hebben bereikt, en **(2)** stalen die eerder waren verzameld, maar waarvan de eerdere analyse niet was gelukt. Op basis van deze stalen worden patronen van genetische diversiteit, genetische structuur en onderlinge verwantschappen bestudeerd.

2 WERKWIJZE

2.1 STALEN

In het onderzoek uit 2022 werden in totaal 175 stalen uit **Vlaanderen** verzameld (**Tabel 1, Figuur 3**), aangevuld met stalen uit het **Verenigd Koninkrijk** (18), **Frankrijk** (3) en **Nederland** (2). Van deze stalen werden er uiteindelijk **143** succesvol geanalyseerd met het **SNP-panel**⁵. In dat onderzoek werden stalen opgenomen die tot en met december 2021 werden ingezameld.

Sinds die datum zijn er **45 nieuwe** stalen ingezameld, waaronder 23 in de provincie Antwerpen (2021-2023), 12 in Oost-Vlaanderen (2022-2024), vijf in West-Vlaanderen (2021-2022), drie uit Wallonië (2023-2024) en twee uit Frankrijk (2023). Hiernaast werden **29 eerder ingezamelde** (2010-2021), maar nog niet succesvol geanalyseerde stalen betrokken (**Tabel 1, Figuur 3**).

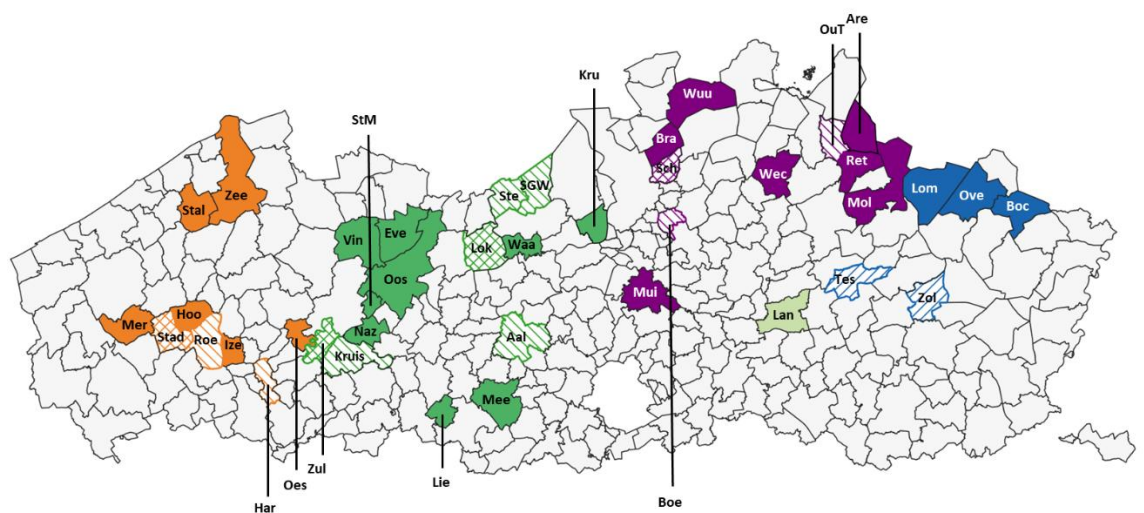
Alle verzamelde stalen betreffen weefselstalen (tong, overig spierweefsel, oor), met uitzondering van enkele orale swabs (Lierde). De dieren zijn ofwel afkomstig uit gevangenschap (meestal verkregen via handhavingsacties) of uit het wild (o.a. verkeersslachtoffers, bestrijding). Omwille van de vertrouwelijkheid van de handhavingsdossiers wordt de informatie beperkt tot het niveau van de betrokken gemeente (deelgemeente of hoofdgemeente, afhankelijk van de beschikbare informatie).

⁵ Sommige stalen konden dus niet succesvol in het SNP-panel worden betrokken. Van locaties met een groot aantal stalen (zoals Langdorp en Schoten) waren ook niet alle stalen opgenomen.

Tabel 1 Overzicht van de locaties. De Belgische locaties zijn alfabetisch gerangschikt per provincie (LIM, Limburg; ANT, Antwerpen; VBR, Vlaams-Brabant; OVL, Oost-Vlaanderen; WVL, West-Vlaanderen; LUX, Luxemburg). Gevang. = dieren uit gevangenschap; wild = vrijlevende dieren. N₂₀₂₄ verwijst naar de nieuw-geanalyseerde stalen (nieuw ingezameld (*)) of al eerder ingezameld, zie tekst). N_{2024,analyse} is het aantal hiervan dat met succes werd geanalyseerd. N₂₀₂₂ is het aantal stalen dat in de vorige analyse met succes werd geanalyseerd. N_{totaal} is het totaal aantal succesvol geanalyseerde stalen.

Land	Prov.	Locatie	Code	Herkomst	N ₂₀₂₄	N _{2024, analyse}	N _{2022, analyse}	N _{total}
België	LIM	Bocholt	Boc	Wild	0	0	1	1
België	LIM	Lommel	Lom	Gevang.	1	1	0	1
België	LIM	Overpelt	Ove	Gevang.	0	0	10	10
België	LIM	Tessenderlo	Tes	Wild	1	1	0	1
België	LIM	Zolder	Zol	Wild	1	1	0	1
België	ANT	Arendonk	Are	Gevang.	0	0	3	3
België	ANT	Boechout	Boe	Wild	1*	1	0	1
België	ANT	Brasschaat	Bra	Wild	1	1	1	2
België	ANT	Mol	Mol	Gevang.	1	1	3	4
België	ANT	Muizen	Mui	Gevang.	1	0	3	3
België	ANT	Oud-Turnhout	OuT	NA	2*	2	0	2
België	ANT	Retie	Ret	Wild	0	0	1	1
België	ANT	Schoten	Sch	Gevang./wild	20*	20	23	43
België	ANT	Wechelderzande	Wec	Gevang.	0	0	5	5
België	ANT	Wuustwezel	Wuu	Wild	0	0	1	1
België	VBR	Langdorp	Lan	Gevang.	0	0	31	31
België	OVL	Aalst	Aal	Wild	5*	5	0	5
België	OVL	Eksaarde	Eks	Gevang.	5	5	0	5
België	OVL	Evergem	Eve	Wild	0	0	1	1
België	OVL	Herdersem	Her	Wild	0	0	4	4
België	OVL	Kruibeke	Kru	Gevang.	0	0	5	5
België	OVL	Kruisem	Kruis	Wild	4*	3	0	3
België	OVL	Lierde	Lie	Gevang.	5*	4	0	4
België	OVL	Lokeren	Lok	Wild	1	1	1	2
België	OVL	Meerbeke	Mee	Wild	0	0	1	1
België	OVL	Nazareth	Naz	Wild	0	0	1	1
België	OVL	Oostakker	Oos	Gevang.	0	0	2	2
België	OVL	Sint-Gillis-Waas	SGW	NA	1*	1	0	1
België	OVL	Stekene	Ste	Wild	1*	1	0	1
België	OVL	Sint-Martens-Latem	StM	Gevang.	0	0	4	4
België	OVL	Vinderhout	Vin	Gevang./wild	0	0	9	9
België	OVL	Waasmunster	Waa	Gevang.	1	1	1	2
België	OVL	Zulte	Zul	Wild	1*	1	0	1
België	WVL	Harelbeke	Har	Wild	1*	1	0	1
België	WVL	Hooglede	Hoo	Gevang.	2	2	2	4

Land	Prov.	Locatie	Code	Herkomst	N ₂₀₂₄	N _{2024, analyse}	N _{2022, analyse}	N _{totaal}
België	WVL	Izegem	Ize	Gevang.	0	0	3	3
België	WVL	Merkem	Mer	Gevang.	0	0	0	1
België	WVL	Oeselgem	Oes	Gevang.	2	2	2	4
België	WVL	Roeselare	Roe	Gevang.	4*	4	0	4
België	WVL	Staden	Stad	Gevang.	2	2	1	3
België	WVL	Stalhille	Stal	Wild	2	2	1	3
België	WVL	Zeebrugge	Zee	Wild	1	1	0	1
België	LUX	Bouillon	Bou	Wild	1	0	0	0
België	LUIK	Wanze	Wan	Wild	2	1	0	1
Nederland	-	Breda	Bre	Wild	1	1	0	1
Nederland	-	Stein	Ste	Wild	0	0	1	1
Frankrijk	-	Céré-la-Ronde	CLR	Wild	0	0	3	3
Frankrijk	-	Manthelan	Man	Wild	1	1	1	1
Frankrijk	-	-	Nan	Wild	2	2	0	2
VK	-	Gloucestershire	Glo	Wild	0	0	7	7
VK	-	Lincolnshire	Lin	Wild	0	0	2	2
VK	-	Norfolk	Norf	Wild	0	0	2	2
VK	-	Northamptonshire	Nort	Wild	0	0	1	1
VK	-	Suffolk	Suf	Wild	0	0	6	6
Totaal					74	69	143	212



Figuur 3 Overzicht van de (hoofd)gemeenten waaruit Vlaamse stalen zijn verzameld. Gearceerde gemeenten verwijzen naar nieuwe stalen; dubbel gearceerde gemeenten naar nieuw-geanalyseerde stalen en stalen uit het vorige rapport. De kleuren verwijzen naar de provincies.

GENETISCHE ANALYSES

Genotyping

Genomisch DNA van de weefselstalen werd geëxtraheerd met de *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen). De kwaliteit van het geëxtraheerde DNA werd geëvalueerd via agarose-gelelektroforese (2%), en de DNA-concentratie werd bepaald met de *Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

De genotypering van de 74 nieuwe stalen gebeurde voor 151 SNP's uit het eerder gepubliceerde SNP-panel (Deflem et al. 2022), via het *GTseq*-protocol (Campbell et al. 2015) ontwikkeld door GTseek (Idaho, VS). GTseek ontwierp voor elk SNP-locus in het SNP-panel locus-specifieke primers op basis van de flankerende sequenties.

In de eerste stap werd per staal een multiplex-PCR uitgevoerd waarin alle 151 primerparen simultaan werden gebruikt. De PCR-reactie werd uitgevoerd met de *Qiagen Plus Multiplex Master Mix*. Hierbij werden de primers voor alle SNP-loci gecombineerd met het staal en de PCR-mastermix, waarna elk SNP-locus specifiek werd geamplificeerd. Het PCR-verloop omvatte een initiële hot-start bij 95 °C gedurende 15 minuten, gevolgd door vijf cycli van denaturatie (95 °C, 30 s), *annealing* (57 °C, 30 s) en extensie (72 °C, 2 min), gevolgd door tien cycli met verhoogde *annealing*temperatuur (65 °C, 30 s) en verkorte extensietijd (72 °C, 30 s).

In een tweede (simplex) PCR-reactie werden staal-specifieke i5-barcodes (bestaande uit zes nucleotiden) en een plaat-specifieke i7-barcode toegevoegd, opnieuw uitgevoerd met de *Qiagen Plus Multiplex Master Mix*. De i5-barcode maakt het mogelijk om de sequenceringsdata correct te koppelen aan de individuele stalen. Omdat slechts één plaat met 85 stalen (inclusief twee plaatduplicaten en negen duplicaten van vorige sequencing runs, dus 74 nieuwe en unieke individuen) werd geanalyseerd, werd één plaat-specifieke i7-barcode gebruikt. Het PCR-verloop omvatte een hot-start bij 95 °C gedurende 15 minuten, gevolgd door tien cycli van denaturatie (95 °C, 10 s), annealing (65 °C, 30 s) en extensie (72 °C, 30 s), afgesloten met een finale extensiestap van 5 minuten bij 72 °C.

Na de barcoding (simplex) PCR werden de PCR-producten genormaliseerd met de *SequalPrep Normalization Kit* (Thermo Fisher Scientific) en vervolgens samengevoegd. De pool van stalen werd vervolgens opgezuiverd met *AMPure XP beads* (Beckman Coulter). De kwaliteit en de concentratie van de opgezuiverde pool werden beoordeeld met behulp van ddPCR. De uiteindelijke DNA-bibliotheek werd vervolgens gesequeneerd op een *Illumina MiSeq* toestel (2 x 150 bp, *V2 flow cell*).

2.2.2 Bio-informatica

De resultaten van de MiSeq-sequencing bestaan uit twee *FASTQ*-bestanden (voor de *forward* en *reverse reads*), waarin alle sequenties voor de 85 stalen zijn opgenomen (74 nieuwe stalen, 11 duplicaten). De kwaliteit van de ruwe sequenties werd beoordeeld met FastQC software (versie 0.11.9, Andrews 2015), en vervolgens samengevat met multiQC software (Ewels 2016). De *forward* en *reverse reads*, met een minimale overlap van 10 bp, werden samengevoegd met PEAR software (versie 0.9.11, Zhang 2014). De genotypes van de individuen voor de 151 SNP's werden vervolgens bepaald met een aangepast Perl script, gebaseerd op Campbell et al. (2015).

Vijf stalen werden uitgesloten van verdere analyses, aangezien hun genotypes voor meer dan 25% van de SNP's ontbraken (telkens één individu uit Muizen, Kruisem, Lierde, Wanze en Bouillon). Voor de overige stalen bedroeg de gemiddelde hoeveelheid ontbrekende genotypes 3%. Voor slechts één staal (het tweede staal uit Wanze) bedroeg dit percentage meer dan 20%. De genotypes van de elf duplicaten per run werden vergeleken voor kwaliteitscontrole (vergelijking van de twee plaatduplicaten met hun analogen binnen de run; vergelijking van de negen duplicaten met hun analogen uit vorige runs; Deflem et al. 2022). Van de 151 SNP's uit het panel werden er 11 verwijderd omdat het aantal missende genotypes over alle individuen meer dan 20% bedroeg.

De nieuwe data werd geïntegreerd met de gegevens uit het vorige rapport. De finale dataset in dit rapport omvat de genotypes voor de 140 SNP's uit het SNP-panel, bepaald voor 212 individuen, inclusief 69 nieuw geanalyseerde stalen (**Tabel 1**).

2.2.3 Dataverwerking

Op basis van het SNP-panel werden voor de 212 stalen drie parameters onderzocht: (1) genetische structuur (het onderscheid tussen, en de toewijzing van individuen aan, verschillende groepen), (2) genetische diversiteit en (3) verwantschap tussen dieren. Voor een nadere toelichting over de interpretatie van deze parameters wordt verwezen naar Vanden Broeck & Cox (2017) en Deflem et al. (2022). Alle analyses werden uitgevoerd met behulp van R (versie 4.4.2, R Core Team 2024).

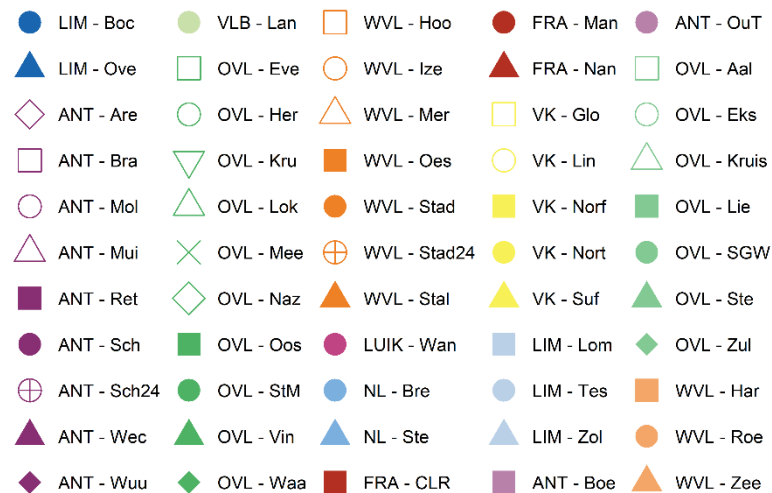
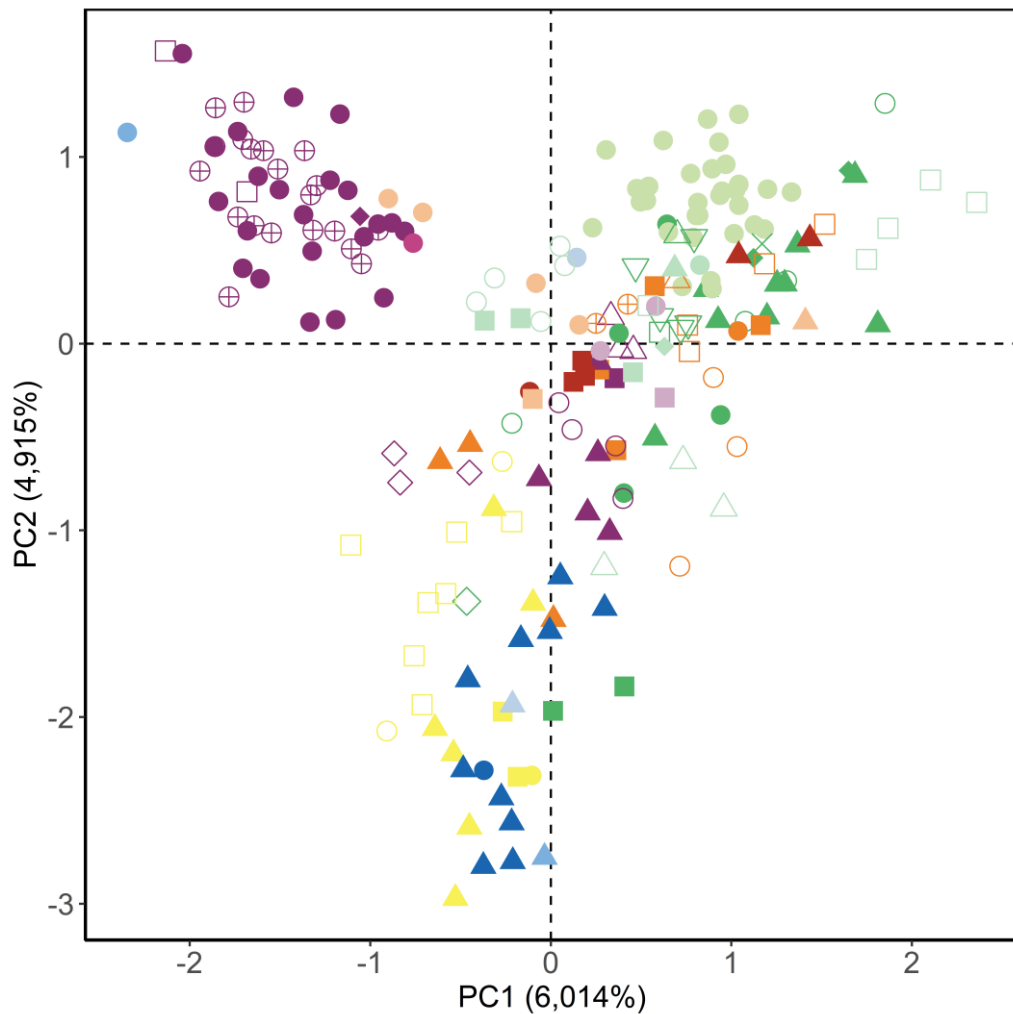
Genetische structuur – Ten eerste werd de fixatie-index (F_{ST} , Weir & Cockerham 1984), een maat voor de genetische afstand tussen locaties, berekend met het R-pakket hierfstat. Voor de berekening van de genetische differentiatie werden enkel locaties met minstens vijf individuen meegenomen (Overpelt; Schoten, Wechelderzande; Langdorp; Aalst, Eksaarde, Kruiabeke, Vinderhoute; Gloucestershire en Suffolk). Voor de individuen uit Schoten maken we bovendien een onderscheid tussen de eerdere stalen en de nieuwe stalen. Daarnaast werd de fixatie-index berekend tussen genetische clusters (zie verder).

Vervolgens werd de genetische structuur over alle stalen weergegeven met behulp van een Principale Componenten Analyse (PCA) met het R-pakket ade4 versie 1.7-18 (Dray & Dufour 2007). In een PCA-plot clusteren individuen met een gelijkaardige genetische samenstelling samen. Om individuen toe te wijzen aan specifieke groepen, werd een Discriminante Analyse van Principale Componenten (DAPC) uitgevoerd met het R-pakket adegenet versie 2.1.11.

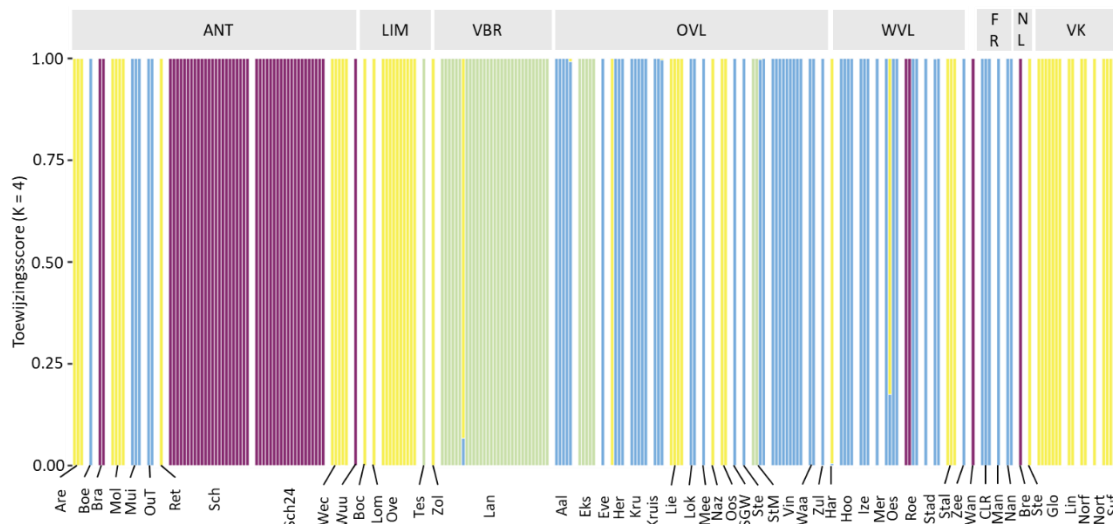
3.1 GENETISCHE STRUCTUUR

Tussen Vlaamse locaties is de differentiatie het laagst tussen Schoten en Langdorp ($F_{ST} = 0,145$) en tussen Vinderhoutse en Langdorp ($F_{ST} = 0,134$). Een opmerkelijke bevinding is dat voor veel locaties de differentiatie met Britse locaties lager is dan met andere locaties uit Vlaanderen. Wat betreft de locaties die nieuw zijn betrokken, vertoont Eksaarde* een sterke differentiatie ten opzichte van alle overige locaties, met een gemiddelde F_{ST} van 0,311.

⁶ Locaties die (deels) nieuw zijn ten opzichte van het vorige rapport, zijn in hoofdstuk 3.1 en 3.2 met een * aangeduid.



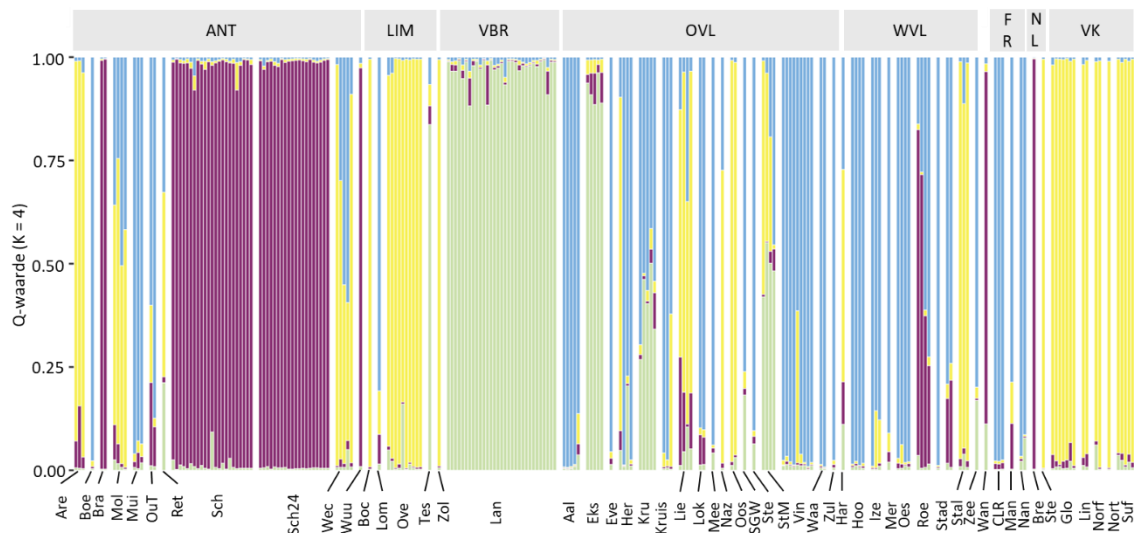
Figuur 4 Ordinatatieplot (PCA) voor PC1 en PC2. Elk symbool geeft een individu weer. De kleuren en vormen geven respectievelijk de provincie en locatie weer. Hoe dichter de afstand tussen individuen op de plot, hoe meer genetisch gelijkend.



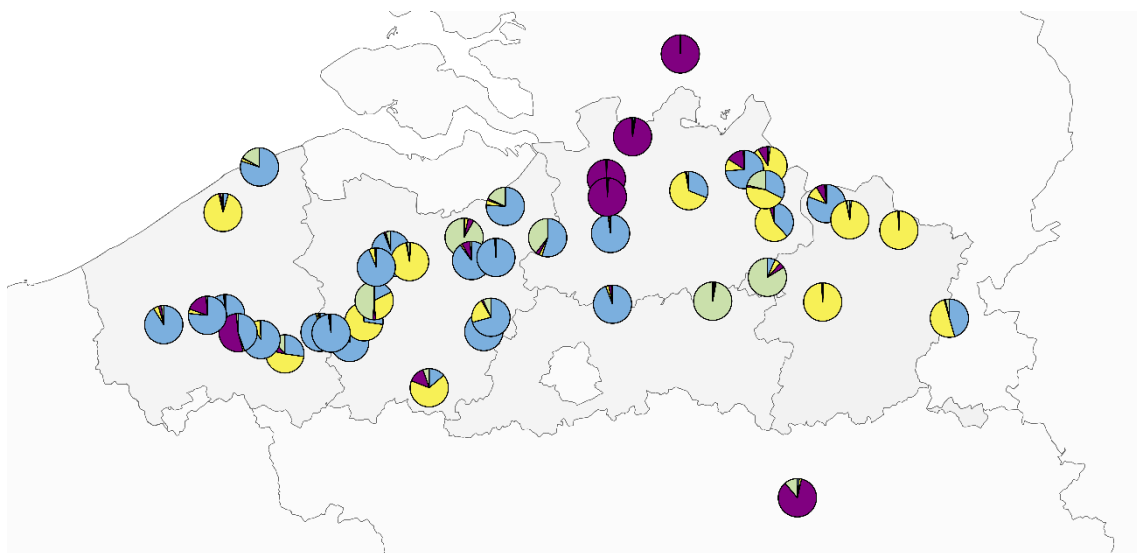
Figuur 6 Toewijzing berekend via DAPC. Elke staaf is een individu. De kleur geeft weer aan welk van de vier clusters een individu werd toegewezen (cluster 1 = paars, cluster 2 = groen, cluster 3 = geel, cluster 4 = blauw).

Bij een opsplitsing in vijf clusters zijn er enkele wijzigingen, waaronder de afsplitsing van C  r  la-Ronde en Manthelan* (Centraal-Frankrijk), maar niet de overige* Franse stalen, met enkele Vlaamse populaties. Bij zes clusters splitst uit cluster (3) een aantal Kempische locaties af (zie bijlage, **Figuur S1**).

De **STRUCTURE**-analyse levert een gelijkaardig, maar genuanceerder beeld (**Figuur 7**, **Figuur 8**). De Q-waarde geeft voor elk individu de mate van toekenning aan elk van de waargenomen clusters. Ook hier komen vier tot zeven clusters naar voren als geschikt. Uitgaande van vier clusters, zijn de resultaten als volgt. **(1)** Individuen uit Brasschaat*, Schoten*, Wuustwezel, Breda*, Roeselare* en Wanze* worden aan deze eerste cluster toegewezen. Er is amper sprake van vermenging (*admixture*; $Q > 0,95$), behalve bij de dieren uit Roeselare* en Wanze* die gedeeltelijk aan respectievelijk cluster 2 en cluster 4 toegewezen worden. **(2)** De cluster Langdorp - Tessenderlo* - Eksaarde* - Sint-Martens-Latem is ook sterk afgetekend, maar niet voor wat laatstgenoemde locatie betreft. De analyse suggereert voor de vier dieren uit Sint-Martens-Latem eigenlijk een gemengde of andere herkomst (merk op dat die gemengde toekenning ook in **Figuur 6** weerspiegeld wordt). **(3)** De STRUCTURE-analyse laat ook beter zien welke locaties sterk lijken op deze uit het Verenigd Koninkrijk, en welke minder sterk (d.i. vermenging vertonen met andere herkomsten). De sterk gebonden locaties zijn nog steeds overal de betreffende provincies verdeeld (bv. Overpelt, Arendonk, Oostakker, Stalhille*). Bij bv. Wechelderzande en Lierde* is sprake van *admixture*. Ook een individu uit Herdersem wordt vooral aan deze derde cluster toegewezen. **(4)** Eenzelfde gevarieerd beeld komt naar voren in de vierde cluster, waar sommige locaties een sterke toewijzing tonen (bv. Aalst*, Hooglede*), terwijl dat voor anderen minder het geval is (bv. Kruibeke, Oud-Turnhout*). Bij deze laatsten kan een gemengde, of andere, herkomst dus niet uitgesloten worden. Samenvattend kan gesteld worden dat (individen uit) clusters 3 en 4 een sterkere vermenging (*admixture*) tonen dan clusters 1 en 2. De F_{ST} -waardes berekend tussen de vier clusters varieert tussen 0,090 (tussen cluster 3 en 4) en 0,141 (tussen cluster 1 en 2) (**Tabel S1**).



Figuur 7 Q-waarde berekend met behulp van STRUCTURE. Elke staaf is een individu. De waarde geeft de *admixture*-proportie van elk individu weer. De kleur geeft weer aan welk van de vier clusters een individu werd toegewezen (cluster 1 = paars, cluster 2 = groen, cluster 3 = geel, cluster 4 = blauw).



Figuur 8 Gemiddelde Q-waarde berekend door STRUCTURE voor elk van de Belgische en Nederlandse locaties. De kleur geeft weer aan welk van de vier clusters een individu werd toegewezen (cluster 1 = paars, cluster 2 = groen, cluster 3 = geel, cluster 4 = blauw).

Bij de erkenning van een vijfde cluster worden de stalen uit Eksaarde* apart gezet, samen met enkele, voorheen eerder onduidelijk geplaatste locaties (Roeselare*, Lierde*, Sint-Martens-Latem). Bij $K = 6$ zijn moeilijker patronen te ontwaren op locatieniveau, maar komen bv. C  r  la-Ronde en Manthelan* in de nieuwe groep terecht. In het algemeen houden de toewijzingen aan clusters 1 en 2 bij $K = 4$ beter stand bij uitbreiding naar $K = 5$ of 6 dan clusters 3 en 4 (zie bijlage, **Figuur S2**).

GENETISCHE DIVERSITÄT

De indices voor genetische diversiteit (inteeitcoëfficiënt, allelische rijkdom, verwachte en waargenomen heterozygositeit) per locatie (voor locaties met minstens vijf individuen) worden weergegeven in **Tabel 3**. De waarden liggen over het algemeen lager dan in de analyse uit het eerdere rapport. Een rechtstreekse vergelijking tussen de waarden is echter niet zinvol, gezien het SNP-panel (dit rapport) slechts een subset betreft van de volledige SNP-set (vorig rapport).

De inteeltcoëfficiënt (F_{IS}) varieert van -0,340 (Eksaarde*) tot 0,037 (Gloucestershire). Met uitzondering van de stalen uit Schoten uit de vorige analyse, zijn alle waarden voor de Belgische populaties negatief, terwijl voor de Engelse populaties positieve waarden worden vastgesteld. De allelische rijkdom (AR) ligt tussen 1,108 (Wechelderzande) en 1,195 (Suffolk). In de Belgische populaties variëren de AR -waarden van 1,108 tot 1,174, terwijl de Engelse populaties hogere waarden vertonen. De waargenomen heterozygositeit (H_O) varieert van 0,128 (Wechelderzande) tot 0,184 (Suffolk). De verwachte heterozygositeit (H_E) varieert van 0,105 (Wechelderzande) tot 0,196 (Suffolk). In Kruibeke worden de hoogste waarden voor Vlaanderen waargenomen ($H_O = 0,179$ en $H_E = 0,140$).

Over het algemeen is er weinig variatie in resultaten tussen de clusters zoals bekomen uit de STRUCTURE-analyse (**Tabel S2**). De inteeltcoëfficiënt varieert van 0,016 (cluster 2) tot 0,099 (cluster 3). De allelische rijkdom ligt tussen 1,158 (cluster 2) en 1,182 (cluster 3). De waargenomen en verwachte heterozygositeit varieert tussen 0,158 (cluster 2) en 0,183 (cluster 3), en 0,153 (cluster 3) en 0,165 (cluster 1) respectievelijk.

De gestandaardiseerde multilocusheterozygositeit, berekend voor alle individuen, varieert weinig, gaande van 0,927 (Evergem) tot 1,124 (Zeebrugge*) (**Figuur 9**). Er werd geen geografisch patroon vastgesteld, noch een patroon gelinkt aan de verschillende clusters.

VERWANTSCHAPPEN

We beperken ons in dit overzicht tot de verwantschappen van nog niet eerder geanalyseerde stalen, waarbij we een ondergrens van $r \geq 0,400$ hanteren (dus net lager dan een eerstegraadsverwantschap). We merken hierbij op dat de verwantschappen in dit rapport berekend zijn aan de hand van het SNP-panel, terwijl dat in het vorige rapport op basis van de volledige SNP-set was. Dit kleiner aantal SNP's brengt een hogere onzekerheid mee. Het volledige verwantschapsprofiel van (een) individu(en) kan worden opgevraagd bij de auteurs.

Hieronder presenteren we de verwantschappen door elke locatie te noemen waarmee een verwantschap is vastgesteld, in de regel met vermelding van het aantal verwante dieren van die locatie (N), de gemiddelde verwantschap met die dieren (r), en het bereik van die verwantschappen (minimum tot maximum, b). Indien voor een locatie slechts één waarde is vermeld, dan verwijst dat naar de r -waarde ten opzichte van één enkel individu ($N = 1$).

Limburg:

- Lommel (één individu, 2019): verwant aan meerdere individuen uit Wechelderzande ($N = 5$, $r = 0,576$; $b = 0,508\text{--}0,685$).
- Tessenderlo (één individu, 2020): geen verwantschappen.
- VOC Zolder (één individu, 2010): verwant aan individuen uit Bocholt ($r = 0,521$), Overpelt ($n = 6$; $r = 0,553$; $b = 0,437\text{--}0,721$) en Stein ($r = 0,507$).

Antwerpen:

- Arendonk (drie individuen): geen verwantschappen.
- Boecheut (één individu, 2021): verwant aan telkens één individu uit Evergem ($r = 0,446$), Herdersem ($r = 0,415$), Kruisem ($r = 0,509$), Oeselgem ($r = 0,402$), Vinderhoute ($r = 0,427$).
- Brasschaat (één individu, 2017): geen verwantschappen.
- Oud-Turnhout (twee individuen, 2023): enkel verwant aan elkaar ($r = 0,522$).
- Mol (één individu, 2020): verwant met andere individuen uit Mol ($N = 3$; $r = 0,702$, $b = 0,582-0,838$) en uit Wechelderzande ($N = 2$; $r = 0,401$ en $r = 0,454$)
- Schoten (20 individuen, 2021-2023): deze nieuwe stalen tonen verschillende verwantschappen aan oude stalen en onderling.

Oost-Vlaanderen:

- Aalst (vijf individuen, 2022-2023): onderling nauw verwant ($r = 0,557$; $b = 0,735-0,309$). Ook verwant aan individuen uit Herdersem ($N = 5$, $r = 0,558$, $b = 0,442-0,648$), Langdorp ($r = 0,482$), Vinderhoutse ($N = 4$, $r = 0,466$, $b = 0,439-0,519$), Waasmunster ($N = 2$; $r = 0,456$ en $r = 0,582$)
- Eksaarde (vijf individuen, 2020): onderling nauw verwant ($r = 0,636$; $b = 0,374-0,772$).
- Lierde (vijf individuen, 2020): onderling verwant ($r = 0,419$; $b = 0,417-0,426$).
- Lokeren (één individu): geen verwantschappen.
- Stekene (één individu, 2023): verwant aan een individu uit Waasmunster ($r = 0,406$) en Sint-Gillis-Waas ($r = 0,466$).

- ## West-Vlaanderen:

- ## Wallonië:

- ## Frankrijk:

- ## Nederland:

- www.vlaanderen.be/inbo doi.org/10.21436/inbor.128499361 Pagina 29 van 38

4 DISCUSSIE

In navolging van het eerdere rapport (Deflem et al. 2022) ontleedden we de beschikbare stalen van muntjak op vlak van genetische **diversiteit, structuur en verwantschap**. We maakten daarbij gebruik van verschillende indices, die ofwel de locaties van herkomst als uitgangspunt namen (bv. diversiteitsindices, F_{ST}), of zich richtten op de individuen los van hun herkomst (bv. PCA, DAPC, STRUCTURE, r). Daarbij werden 69 nieuw(e) (geanalyseerde) stalen betrokken.

4.1 METHODOLOGIE

We maakten hierbij uitsluitend gebruik van het eerder opgestelde **SNP-panel**, dat bedoeld is voor routinematige monitoring. In vergelijking met de analyses op basis van de volledige SNP-set (Deflem et al. 2022) blijven de conclusies feitelijk dezelfde, hoewel er in de absolute waarden wel kleine verschillen worden vastgesteld (bv. lagere waarden voor H_O , verschillen in F_{ST} , hogere waarden voor r). De genetische posities van locaties ten opzichte van elkaar blijven dus onveranderd, maar een absolute interpretatie van de cijfers moet worden genuanceerd, ook voor wat verwantschappen op individueel niveau betreft (r).

4.2 DIVERSITEIT

Uit de analyse van de heterozygositeit lijkt naar voren te komen dat de genetische diversiteit verschilt tussen locaties. Verondersteld dat de Britse populaties een referentie vormen voor de diversiteit binnen gevestigde, wilde populaties, lijken sommige Vlaamse populaties een eerder lage tot gelijkaardige diversiteit te herbergen. Onder andere bij dieren uit de Antwerpse Voorkempen (Schoten) lijkt de diversiteit in lijn met die uit Groot-Brittannië. Daaruit zou (voorzichtig) geconcludeerd kunnen worden dat er vooralsnog **geen genetische barrières** (inteelt) blijken voor een verdere populatieontwikkeling. We wijzen wel op de aanzienlijke foutenvlaggen voor de schattingen, mede veroorzaakt door het beperkt aantal stalen per locatie (**Tabel 3**). Bovendien lijkt er weinig variatie in genetische diversiteit tussen de clusters; de tweede en kleinste cluster (met o.a. individuen van Langdorp) bevat de minste genetische diversiteit.

4.3 STRUCTUUR EN VERWANTSCHAP

Een belangrijke motivatie voor de keuze van de analyses is om na te gaan in hoeverre de genetische structuur een **geografisch signaal** vertoont (nl. de mate waarin nabijgelegen locaties genetisch geclusterd zijn, of niet). Het ontbreken van zo'n signaal kan een belangrijke indicatie zijn voor opzettelijke handelingen met muntjak, zoals uitwisseling of kweek.

Ten opzichte van het vorige rapport leverden de huidige analyses van de genetische structuur geen fundamenteel nieuwe inzichten op. Het algemene beeld blijft een **combinatie** van geografische en niet-geografische patronen. Deze weerspiegelen eerder natuurlijke, en eerder menselijke processen, respectievelijk.

Niettemin dragen de resultaten bij aan een betere kennis van de **lokale situatie** op het terrein. Zo kon bij de recente vaststelling van wilde dieren nabij Landschap De Liereman in Oud-Turnhout (2023) worden vermoed dat deze via dispersie uit het nabijgelegen Arendonk kwamen. De genetische analyses geven daar echter geen aanwijzing voor. De vaststelling dat het dier dat in 2010 in het VOC van Zolder werd binnengebracht uit de Noord-Limburgse cluster voortkomt, toont aan dat muntjak daar al langere tijd aanwezig was (vergelijk **Figuur 1**).

We geven verder geen gedetailleerde beschouwing per locatie, cluster of verwantschap, maar handhavers en lokale terreinbeheerders worden uitgenodigd om contact op te nemen met de auteurs voor de interpretatie van **casus-specifieke resultaten**.

5 REFERENCES

- Andrews S (2015). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- 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 (2025). Invasive species – Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*) in Flanders, Belgium. Version 1.17. Research Institute for Nature and Forest (INBO). Sampling event dataset. <https://doi.org/10.15468/sr8bn2>
- Chapman NG (2021). History of introduction of Reeves' muntjac in Great Britain and ecological characteristics facilitating expansion of feral populations. *European Journal of Wildlife Research*, 67(3), 1–7.
- Chapman NG (2022). Reeves' muntjac *Muntiacus reevesi* (Ogilby, 1839). In: Corlatti L, Zachos FE (red.), *Terrestrial Cetartiodactyla*, pp. 29–50. Springer Nature, Cham, Zwitserland.
- Cooke A (2019). Muntjac and water deer: natural history, environmental impact and management. Pelagic Publishing Ltd.
- Croft S, Chauvenet AL, Smith GC (2017). A systematic approach to estimate the distribution and total abundance of British mammals. *PLoS ONE*, 12(6), e0176339.
- Deflem I, D'hondt B, De Corte Z, Mouton C, Van Breusegem A, Neyrinck S, Adriaens T, Mergeay J (2022). Een genetische studie van Chinese muntjak in Vlaanderen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 23, Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. <https://doi.org/10.21436/inbor.84191641>
- D'hondt B, Engels P, Verbist B, Vercammen J, Huygens W, Adriaens T, Casaer J (2023). Monitoring van een Vlaamse populatie van Chinese muntjak (*Muntiacus reevesi*) in het kader van bestrijding. *Lutra*, 66(2), 105–121.
- D'hondt B, Casaer J, Vercammen J, Pallemmaerts L, Adriaens T, Desmet P, Govaert S (2025). MUNTJAC_ANTWERP – Camera trap observations of Chinese muntjac in forested areas near Antwerp (Belgium). Research Institute for Nature and Forest (INBO). Occurrence dataset. <https://doi.org/10.15468/gn87d6>
- Dray S, Dufour AB (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22, 1–20.

- Schulz B, Borkenhagen P (2021). Muntjaks (*Muntiacus reevesi*) in Schleswig-Holstein – Beginn einer Invasion, erfolgreiche Bekämpfung oder beides ein bisschen? Faunistisch-Ökologische Mitteilungen, 10, 83–92.
- Stoffel MA, Esser M, Kardos M, Humble E, Nichols H, David P, Hoffman JI (2016). inbreedR: an R package for the analysis of inbreeding based on genetic markers. Methods in Ecology and Evolution, 7(11), 1331–1339.
- Tinel C, Legat A (2023). Amélioration des connaissances sur la présence et les effectifs du muntjac de Chine en Wallonie. Rapport in opdracht van Service Public de Wallonie (SPW) – Direction de la nature et des espaces verts. 35 pp.
- Tsiamis K, Gervasini E, Deriu I, D’Amico F, Nunes A, Addamo A, Cardoso AC (2017). Baseline distribution of invasive alien species of Union concern. Ispra, 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.
- Van Norren E, Casaer J, Adriaens T (2019). Muntjaks ontsnappen beperkt, maar opmerkzaamheid is geboden. Nature Today, 1 mei 2019.
- Vanreusel W, Swinnen K, Gielen K, Vercayie D, Driessens G, Veraghtert W, Desmet P, Herremans M (2025). Waarnemingen.be – Non-native animal occurrences in Flanders and the Brussels Capital Region, Belgium. Version 1.147. Natuurpunt. Occurrence dataset. <https://doi.org/10.15468/k2aiak>
- Van Veen K, D’hondt B (2023). De muntjak, geen voet aan de grond of meer dan wij nu weten? Kijk op Exoten, 43, 14–15.
- Waarneming.nl (2025). Chinese muntjak. <https://waarneming.nl/species/7700/>. Geraadpleegd: 12 februari 2025.
- Wang J (2002). An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. Genetics, 160(3), 1203–1215.
- 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, 38(6), 1358–1370.
- Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. Bioinformatics, 30(5), 614–620.

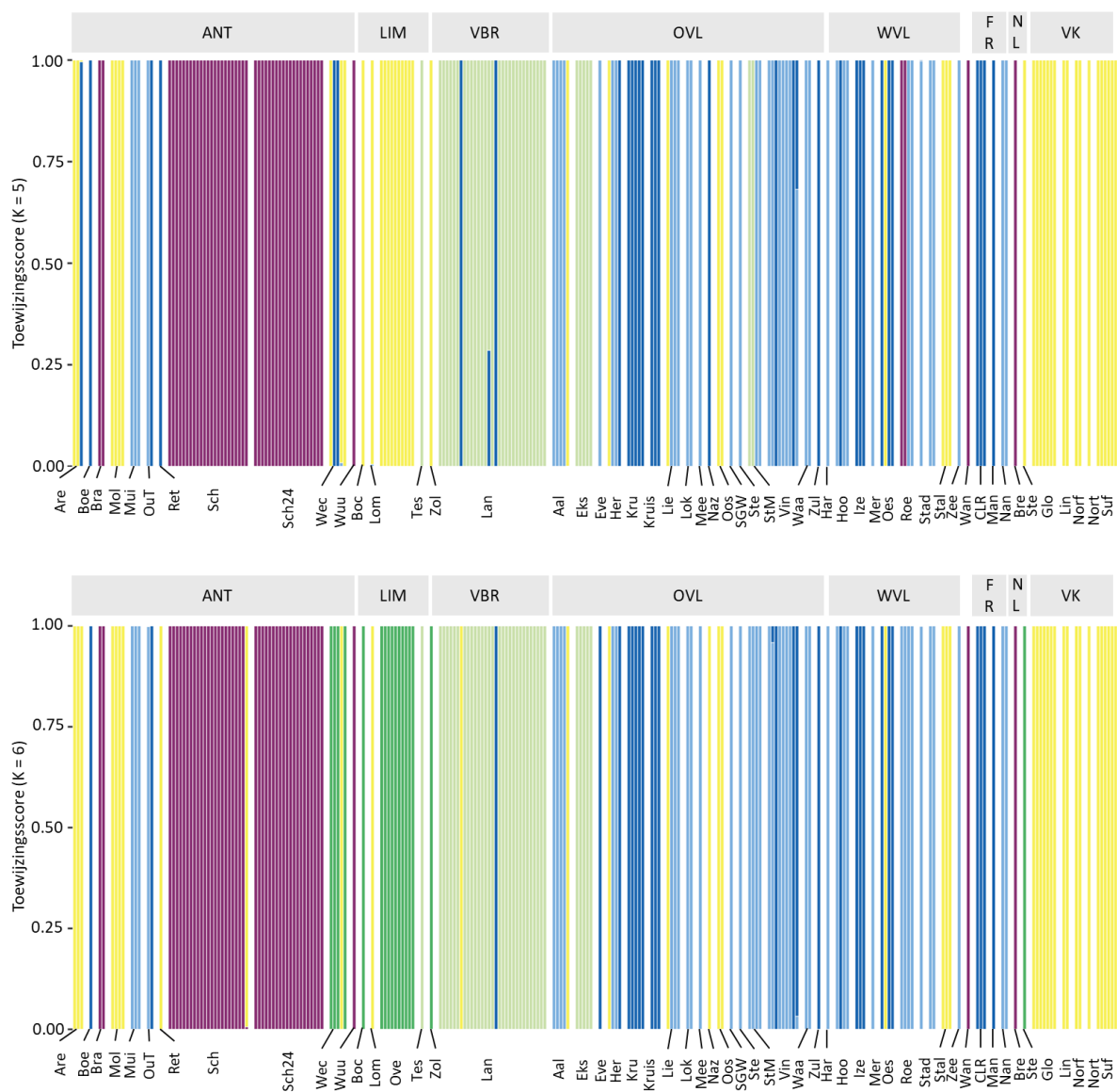
BIJLAGE

Tabel S1 De paarsgewijze genetische afstand (F_{ST}) tussen de vier clusters. De cijfers onder de diagonaal geven het 95%-betrouwbaarheidsinterval. Individuen werden aan één van de vier clusters toegewezen op basis van de toewijzingsscore van STRUCTURE.

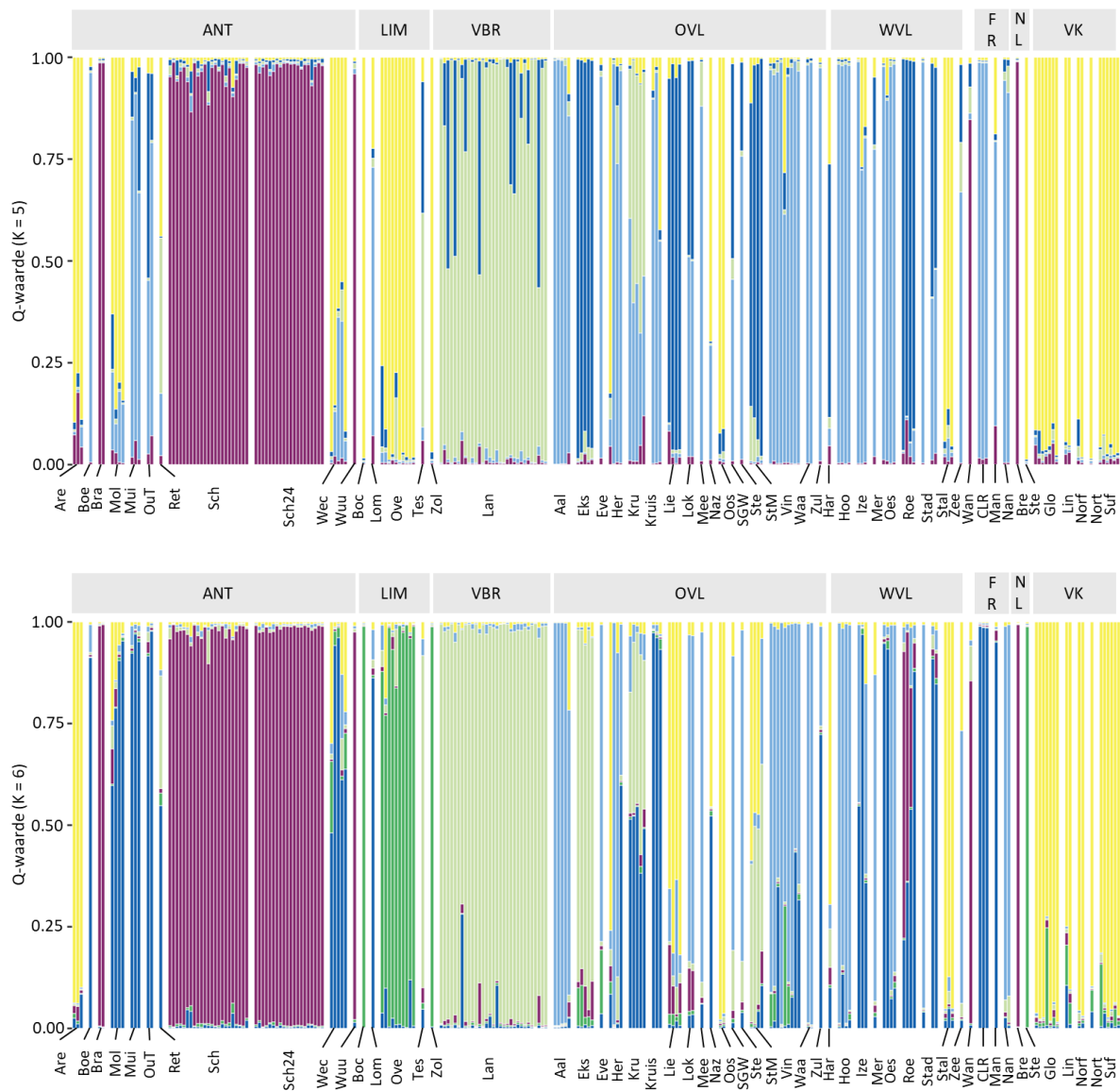
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
Cluster 1	-	0,141	0,094	0,131
Cluster 2	[0,107; 0,173]	-	0,116	0,107
Cluster 3	[0,076; 0,118]	[0,090; 0,141]	-	0,090
Cluster 4	[0,100; 0,170]	[0,080; 0,139]	[0,073; 0,116]	-

Tabel S2 Inteelcoëfficiënt (F_{IS}), allelische rijkdom (AR), gemiddelde waargenomen (H_o) en verwachte (H_e) heterozygositeit en standaarddeviatie berekend per cluster. Individuen werden aan één van de vier clusters toegewezen op basis van de toewijzingsscore van STRUCTURE.

Cluster	F_{IS}	AR	H_E	H_O
Cluster 1	0,041	1,174	$0,174 \pm 0,188$	$0,165 \pm 0,180$
Cluster 2	0,016	1,158	$0,158 \pm 0,187$	$0,157 \pm 0,197$
Cluster 3	0,099	1,182	$0,183 \pm 0,157$	$0,153 \pm 0,122$
Cluster 4	0,075	1,174	$0,174 \pm 0,176$	$0,153 \pm 0,153$



Figuur S1 Toewijzing berekend via DAPC voor vijf (boven) en zes (onder) clusters. Elke staaf is een individu. De kleur geeft aan welk van de clusters een individu werd toegewezen.



Figuur S2 Q-waarde berekend voor elk individu (weergegeven door één staaf) met behulp van STRUCTURE software voor K = 5 (boven) en K = 6 (onder). Deze waarde geeft de *admixture*-proportie van elk individu weer. Elke genetische cluster heeft een andere kleur.