

Genetische variatie binnen en tussen damhertpopulaties in de Waterleidingduinen en NP Zuid Kennemerland

Beknopte rapportage op basis van een nulmeting in 2019/2020

Arjen de Groot

Wageningen Environmental Research
(WENR)



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

December 2021



Achtergrond

Populatiegroei en -beheer

Sinds het midden van de vorige eeuw komen zowel in de Amsterdamse Waterleidingduinen (AWD) als het aangrenzende Nationale Park Zuid-Kennemerland (NPZK) damherten voor. In de jaren '50 werden enkele dieren uitgezet in de Kennemerduinen. Op dat moment kwamen in de AWD nog geen damherten voor, maar vanaf de jaren '70 werden ook hier damherten gezien, vermoedelijk afkomstig vanuit de dan nog kleine populatie in NPZK. Vele jaren later zijn daar in beide gebieden nog ontsnapte dieren uit particuliere hertenkampen bijgekomen (Van Breukelen 2013).

Lange tijd was zowel in AWD als NPZK slechts een klein groepje damherten aanwezig. Vanaf omstreeks 2000 zijn de aantallen sterk gaan toenemen, met een jaarlijkse groei van ruim 30%.

In het NPZK zijn de aantallen in principe altijd gereguleerd en geldt een streefstand van 200 individuen. Vanwege het tijdelijk ontbreken van een ontheffing werd de populatie vanaf 2010 tijdelijk niet beheerd, en liepen de aantallen op tot een geschat minimum aantal van ca. 800 damherten in 2016. Sinds 2016 vindt weer afschot plaats en wordt het aantal geleidelijk teruggebracht tot de streefstand.

In de AWD werd de populatie tot 5 jaar geleden niet beheerd. Daardoor liepen de aantallen de afgelopen jaren sterk op tot een geschat minimaal aantal van ca. 3900 damherten (voorjaar 2016). Sinds 2016 vormt afschot onderdeel van het beheer met als doel de aantallen te reduceren tot een streefaantal van 800 damherten. Naast een reductie van de aantallen wordt door Waternet een reactief beheer gevoerd, waarbij dieren waarvan mag worden verwacht dat ze de winter niet overleven in een vroegtijdig stadium uit hun lijden worden verlost.

Buiten het formeel vastgestelde leefgebied geldt een nulstandbeleid. Er zijn geen aanwijzingen dat er damherten van buiten het gebied binnenkomen. Tot ongeveer 10 jaar geleden kon echter in principe wel incidenteel uitwisseling plaatsvinden tussen AWD en NPZK via het duingebied ten oostzijde van Zandvoort. Daarvoor moesten wel meerdere wegen en een spoorbaan worden gepasseerd, en of dit in de praktijk ook gebeurde, en in welke mate, is onduidelijk.

Omdat de sterke groei van de populatie in de AWD in toenemende mate leidde tot overlast in de omgeving en aanrijdingen met het verkeer, werd in 2011 besloten de AWD geheel te omheinen met een 17 km lang damhert-kerend hek van 2,40 m hoog. In 2012 werd dit hek voltooid en daarmee is de populatie in de AWD vrijwel geheel geïsoleerd geraakt van de omgeving. Bij NPZK is geen sprake van een volledige omheining.

Genetische vitaliteit

Hoewel de aantallen damherten in beide gebieden hoog zijn, zijn deze dus ontstaan uit een kleine groep individuen. Daardoor was per definitie sprake van een smalle genetische basis, en gedurende de tweede helft van de vorige eeuw kan de destijds beperkte populatieomvang in theorie voor nog verdere genetische verarming hebben gezorgd (Buiteveld en Koelewijn 2006). Anderzijds kan het incidenteel binnenkomen van ontsnapte dieren uit verschillende bronnen wellicht de variatie hebben vergroot. Hoeveel van deze variatie behouden is gebleven gedurende de sterke populatiegroei sinds 2000, en het daaropvolgende beheer, is onzeker. Duidelijk is in elk geval dat de beperkte uitwisselingsmogelijkheden tussen AWD en NPZK, of met andere damhertpopulaties, er voor heeft gezorgd dat een natuurlijk herstel van eventuele genetische verarming sterk werd belemmerd.

Bekend is dat een te sterke genetische verarming op termijn voor vitaliteitsproblemen kan zorgen in wilde dierpopulaties, zowel als gevolg van een gebrek aan vermogen tot aanpassingen aan veranderende omstandigheden (in bijvoorbeeld vegetatie en klimaat) als ook door het optreden van inteelt (paring tussen verwante dieren). In veel diersoorten kan inteelt resulteren in bijvoorbeeld een verminderde levensduur of reproductie, een mechanisme dat 'inteeltdepressie' wordt genoemd (De Groot et al. 2014). Dit maakt het relevant om enig zicht te krijgen op de variatie in de populatie, en hoe deze zich ontwikkelt.

Herstel van uitwisseling?

Er is de intentie om ecologische barrières tussen AWD en NPZK zoveel mogelijk op te heffen en zo de verbondenheid tussen beide gebieden weer te vergroten. Eind 2013 is natuurbrug Zandpoort over de Zandvoortselaan gereed gekomen (Figuur 1). In 2017 en 2018 volgden de natuurbuggen Zeepoort en Duinpoort over respectievelijk de Bloemendaalse Zeeweg en de spoorlijn Haarlem-Zandvoort. Deze laatste twee bruggen zijn inmiddels geopend. In overleg hebben de beheerders van AWD en NPZK echter besloten natuurbrug Zandpoort pas te openen voor damherten nadat de aantallen aan de AWD-kant in voldoende mate zijn teruggebracht. Op moment dat in beide gebieden de streefstand wordt genaderd en er sprake zal zijn van een gezamenlijk afgestemd damhertenbeheer in beide gebieden zal het tijdelijk raster op de natuurbrug worden verwijderd. De verwachting is dat dit nog enkele jaren zal duren.

Wanneer op termijn ook natuurbrug Zandpoort wordt geopend, ontstaat er weer een vrije mogelijkheid tot migratie van damherten tussen AWD en NPZK. Dit betekent echter niet per definitie dat migranten in hun nieuwe populatie ook voor nageslacht weten te zorgen en genetische menging tussen de beide populaties daarmee ook effectief optreedt. Recent onderzoek aan edelherten op de Veluwe lijkt er bijvoorbeeld op te wijzen dat daar weliswaar migratie tussen deelgebieden optreedt, maar dat per deelgebied sprake is van meerdere bloedgroepen, doordat dieren met een gelijke genetische afkomst bovengemiddeld vaak met elkaar paren (De Groot et al. 2016).



Figuur 1. Overzicht van de ligging van een drietal natuurbruggen die de afgelopen jaren zijn gerealiseerd binnen het leefgebied van de damherten in de AWD en het NPZK. (Op basis van bronkaart van Provincie Noord-Holland).

Doelstelling

Populatie-genetisch onderzoek kan inzicht geven in het daadwerkelijk optreden van effectieve genetische uitwisseling als gevolg van de gerealiseerde natuurbruggen. Van belang bij dit type onderzoek is de uitvoering van een meting voorafgaand aan het openstellen van de verbinding ($t=0$; nulmeting) om de genetische verschillen bij de uitgangssituatie vast te leggen, en een vergelijkende meting in een later stadium ($t=1$, na enkele jaren) om te kijken of de genetische verschillen zijn verminderd na openstelling. Of een dergelijke vergelijking praktisch haalbaar is hangt echter af van een aantal factoren.

Ten eerste moet een set van genetische merkers beschikbaar zijn die in staat is om per individueel damhert een uniek genetisch profiel vast te stellen. Een vergelijking van een dergelijke set van unieke profielen per populatie vormt de statistische basis voor het berekenen van de populatiedifferentiatie. Voor damherten is een set zogenaamde microsatteliet-merkers beschikbaar, die nuttige informatie kan geven over de genetische variatie per populatie. Echter, eerdere (buitenlandse) genetische studies met deze merkers suggereerden dat de genetische variatie bij damherten per definitie veel minder groot is dan bij bijvoorbeeld het edelhert (Baker et al. 2017). Dat maakte het onzeker of de resolutie die nodig is voor het betrouwbaar meten van uitwisseling kon worden gehaald.

Ten tweede geldt dat, zelfs als dit wel het geval is, het meten van een verschil tussen $t=0$ en $t=1$ alleen mogelijk is als überhaupt aanvankelijk sprake was van een meetbaar verschil in genetische samenstelling tussen beide populaties. Zo niet, dan kan ook geen vermindering van dat verschil worden aangetoond.

Belangrijk is dus om eerst via een nulmeting de uitgangsbasis te verkennen. In 2019 gaf gebiedsbeheerder Waternet aan WENR de opdracht voor een dergelijke nulmeting, op basis van daartoe door hen aangeleverde weefselmonsters van afgeschoten damherten. Dit betrof fase 1 en 2 van het destijds opgestelde onderzoeksplan (Kuiters et al. 2019). Afgesproken werd om op basis van de resultaten van deze nulmeting een beslissing te nemen over de meerwaarde van uitvoering van een effectmeting enkele jaren na opening van de natuurbrug (fase 3 t/m 5 van het onderzoeksplan).

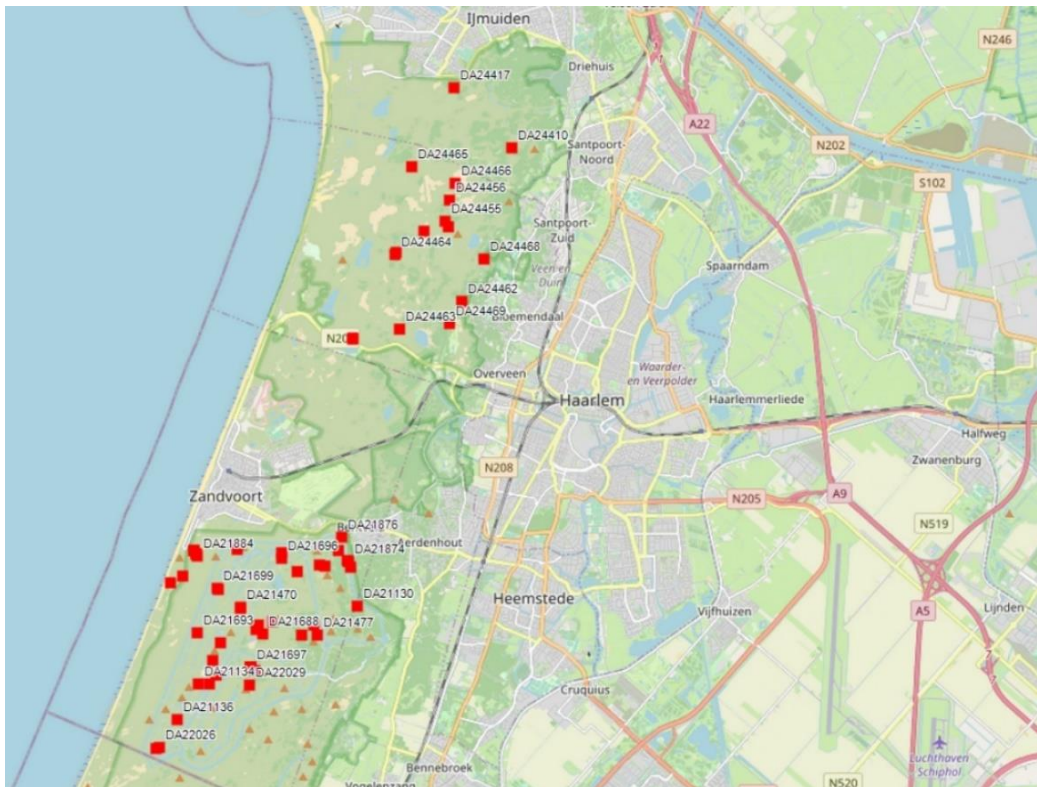
De voorliggende rapportage presenteert de resultaten van deze nulmeting, en beantwoordt op basis daarvan de volgende drie hoofdvragen:

- 1) Hoe is het momenteel gesteld met de genetische variatie in de damhertpopulaties in AWD en in NPZK, en in hoeverre is de aangetroffen variatie reden tot zorg?
- 2) In hoeverre is momenteel sprake van een aantoonbaar verschil in genetische samenstelling tussen de twee populaties?
- 3) In hoeverre biedt de aangetoonde variatie binnen en tussen de twee populaties voldoende houvast voor het uitvoeren van een betrouwbare analyse van het effect van de natuurbruggen op genetische uitwisseling?

Methode

Beschikbare monsters

In totaal werden door Waternet monsters van 93 verschillende individuen aangeleverd, waarvan 48 uit het afschotseizoen eind 2019 (25 uit AWD en 23 uit NPZK) en 45 uit het afschotseizoen eind 2020 (25 uit AWD en 20 uit NPZK). Per seizoen betrof het een vrijwel gelijke verdeling tussen individuen in de leeftijdsklassen 0 t/m 2 jaar en 3 jaar en ouder, en een vrijwel gelijke verdeling tussen mannelijke en vrouwelijke individuen. De ruimtelijke spreiding van de afschotlocaties van de bemonsterde individuen is weergegeven in figuur 2.



Figuur 2: Ruimtelijke verdeling van de afschotlocaties van bemonsterde damherten (elk rood vierkantje is een monsterlocatie; soms meerdere individuen bemonsterd op dezelfde locatie).

Vaststellen van genetische profielen

Genetische analyses werden uitgevoerd op het Laboratorium voor Ecologische Genetica van WENR. Per weefselmonster is daartoe allereerst DNA geëxtraheerd middels een reeds beschikbaar protocol op basis van de DNEasy Blood&Tissue DNA extraction kit van Qiagen.

Voor het bepalen van uniek genetisch profiel per individu, werd in voorjaar 2020 op basis van een literatuurscan een merkerset geselecteerd die reeds beschikbaar was uit eerder onderzoek van Baker et al. (2017). Het betreft hier een set van 10 zogenaamde 'microsatelliet-merkers'. Dit zijn fragmenten in het DNA die in lengte kunnen variëren. Bij microsatelliet-analyse wordt per merker deze lengtevariatie in beeld gebracht. Voor elk monster (=individu) worden de waargenomen lengte-varianten (allelen) per merker vervolgens samengevoegd tot een totaalprofiel. In het huidige onderzoek werden alle 10 merkers uit Baker et al. (2017) betrokken. Het labprotocol ervan werd echter door WENR geoptimaliseerd. Er werden twee sets van elk 5 merkers gemaakt, waarbij elke set in een enkele reactie kan worden geanalyseerd en uitgelezen. Deze zogenaamde multiplex-strategie betekent dat dus slechts 2 in plaats van 10 afzonderlijke labanalyses nodig zijn, wat een aanzienlijke kostenbesparing oplevert

(conform de geplande werkwijze in de projectofferte). De verdeling van merkers over de twee reacties was als volgt: Multiplex 1 = OarFCB48, MAF70, B<4505, ILST30, ETH2, Multiplex 2 = TGLA127, CSSM014, NVHRT21, HAUTR27 en RT30. Voor meer detailinformatie over de exacte afzonderlijke merkers verwijzen we naar Baker et al. (2017). Vervolgens werd getest of deze methode een betrouwbaar profiel opleverde, door een testset van enkele tientallen monsters in drievoud te analyseren. Dit leverde een consistent resultaat op. Op basis daarvan werd vervolgens doorgedaan met het vaststellen van een profiel voor alle beschikbare monsters. In voorjaar 2020 betrof dit de 48 monsters van individuen die eind 2019 waren geschoten. In voorjaar 2021 werden de overige 45 monsters geanalyseerd, van individuen geschoten eind 2020. Voor de in deze notitie gepresenteerde resultaten zijn al deze profielen samengevoegd en als een dataset bekeken.

Data-analyse

De verkregen DNA profielen zijn allereerst gebruikt voor het bepalen van de variatie binnen elk van de twee populaties. Hiertoe werd gekeken naar een aantal verschillende populatie-genetische parameters:

- 1) De allelenrijkdom, oftewel het gemiddelde aantal allelen per merker. Deze wordt aangeduid met de letter A.

- 2) De verwachte heterozygositeit (H_e), oftewel het gemiddelde aantal heterozygote individuen per merker dat je zou verwachten als er sprake is van willekeurige paring tussen alle individuen binnen de populatie. H_e is hoger wanneer de totale variatie in de populatie groter is, en wordt daarom vooral gebruikt als een tweede maat voor de variatie in de populatie, die minder wordt beïnvloed door de (toevallige) aanwezigheid van eventuele hele zeldzame allelen in de steekproef.

- 3) De waargenomen heterozygositeit (H_o), oftewel het percentage heterozygote individuen per merker dat daadwerkelijk is waargenomen. H_o vormt een indicatie voor het risico op schadelijke effecten door inteelt (paring tussen verwante dieren).

- 4) de fixatie-index (F_{is}): deze index wordt berekend op basis van de verhouding tussen H_e en H_o , en geeft een inzicht in de mate waarin sprake is van een sociale substructuur binnen de populatie, die de genetische patronen kan beïnvloeden. Een waarde van $F_{is} > 0$ vormt een aanwijzing dat sprake is van groepjes relatief verwante individuen die vaker met elkaar paren dan met andere individuen. Een waarde $F_{is} < 0$ suggereert dat sprake is van uitkruising, oftewel een voorkeur voor genetisch afwijkende partners.

Vervolgens werden analyses uitgevoerd om te bepalen in welke mate de twee populaties onderling verschillen. Hiervoor werd gebruik gemaakt van:

- 1) De paarsgewijze genetische differentiatie (F_{st}). Een F_{st} van 0 geeft aan dat de genetische samenstelling van twee populaties identiek is, waarbij de allelfrequenties voor de verschillende allelen hetzelfde zijn. Bij een F_{st} van 1 zijn de populaties maximaal verschillend, dat wil zeggen dat er geen overlap voorkomt tussen de aanwezige allelen.

- 2) Een indeling van alle individuen in de dataset in genetische clusters (groep van individuen die relatief sterk overeenkomt in genetische samenstelling) op basis van Bayesiaanse clusteringstechnieken (De Groot et al. 2016). Wanneer de twee populaties genetisch sterk verschillen, zullen individuen uit deze populaties aan verschillende genetische clusters worden toegewezen. Zie Van der Grift & De Groot (2018) voor een recent voorbeeld van deze toepassing voor hazelwormen rond ecocorridor Zwaluwenberg, nabij Hilversum, waarbij bleek dat dieren aan weerszijden van de corridor in afzonderlijke groepen werd ingedeeld, en dus duidelijk genetisch gescheiden groepen vormen.

Resultaten en discussie

Voor 90 van de 93 individuen (97%) kon met succes een volledig genetisch profiel worden vastgesteld (bestaande uit data voor alle 10 merkers). Het betrof in totaal 50 individuen uit AWD en 43 individuen uit NPZK, en daarmee een robuuste steekproef voor elk van de populaties.

Genetische variatie binnen populaties

De belangrijkste populatie-genetische waarden per populatie zijn samengevat in Tabel 1. Daarbij valt op dat de aangetroffen variatiewaarden redelijk overeenkomen tussen beide populaties.

De allelenrijkdom A is identiek voor beide populaties, en bedraagt 2.0. Dit is een zeer lage waarde in vergelijking met andere hoefdiersoorten. Ter illustratie: De Groot et al. (2016) troffen voor edelherten op de Veluwe een waarde aan van $A = 7.2$, en voor zwijnen een waarde van $A = 4.0$. Het is echter gevaarlijk om deze allelenrijkdom rechtstreeks te vergelijken tussen diersoorten, aangezien sommige diersoorten van nature een veel hogere variatie kennen dan andere. Beter is daarom om de waarden te vergelijken met andere populaties van verschillende omvang en historie, binnen dezelfde soort. De keuze voor het 10p1 overnemen van de merker-set van Baker et al. (2017) maakt het mogelijk om onze resultaten rechtstreeks te vergelijken met de resultaten uit die studie, waarin variatiewaarden werden bepaald voor 18 damhertpopulaties uit 10 landen op het noordelijk halfrond. Voor deze populaties werd een vergelijkbaar lage allelenrijkdom gevonden, met een gemiddelde van eveneens $A = 2.0$, met een smalle bandbreedte van 1.7 in een populatie in Portugal tot 2.7 in een populatie in Turkije. Voor de andere variatiemaat, H_e , verschillen de waarden voor AWD en NPZK ook niet veel, en zijn eveneens erg laag. Ook hier is dit tot op zekere hoogte overeenkomstig de resultaten voor buitenlandse populaties uit Baker et al. (2017). Het gemiddelde ligt daar iets hoger ($H_e = 0.29$), maar loopt uiteen van 0.14 in Canada tot 0.48 in Italië.

Tabel 1: populatiegenetische parameters per populatie

	A	He	Ho	Fis
AWD	2.0	0.22	0.17	0.13
NPZK	2.0	0.17	0.14	0.08
Totaal	2.1	0.19	0.15	0.11

Hoewel een lage diversiteit dus meer regel dan uitzondering lijkt in damhertpopulaties verspreid over het noordelijk halfrond, betekent dit niet dat er in de soort überhaupt weinig variatie bestaat. Baker et al. (2017) laten zien dat per populatie de diversiteit weliswaar laag is, maar wel aanzienlijke verschillen bestaan in genetische samenstelling tussen populaties uit verschillende landen. Zij vermoedden dan ook dat de lage variatie per populatie het gevolg is van sterke menselijke invloeden: populaties zijn ofwel relicten van veel grotere populaties, waarbij door sterke krimp in omvang veel variatie verloren is gegaan ('genetic bottlenecks'), ofwel zijn ontstaan door translocaties naar nieuwe gebieden, waarbij inherent sprake is van een startpopulatie met kleine omvang en dito variatie ('founder effects'). Wanneer genetische verarming en inteelt het gevolg is van onnatuurlijke processen, is dit vaak reden tot zorg, omdat de soort daar niet op is aangepast. Toch zijn er ook soorten die van nature een sterke inteelt laten zien en daar mee om kunnen gaan zonder schadelijke gevolgen. Smith (1979) noemt damhert als een van de voorbeelden daarvan, aangezien individuele herten meestal dicht bij hun eigen groep blijven en zelden in hun eentje wegtrekken, en omdat hun sociale structuur, waarbij jonge vrouwtjes bij hun moeder blijven en veel kans lopen om door hun eigen vader te worden gedekt, inteelt van nature in de hand werkt. Inderdaad zijn er internationaal, ondanks de over het algemene opvallend lage variatie, maar weinig voorbeeld beschikbaar van damhertpopulaties die een lage overleving of reproductie lijken te kennen. Een uitzondering is een kleine gehouden populatie van de Perzische ondersoort *Dama Dama mesopotamica*, waarbij een verminderde vruchtbaarheid werd aangetroffen die werd gerelateerd aan inteelt (Ekrami et al. 2016). Een direct verband kon echter niet worden

aangetoond. Al met al lijkt het er dus op dat een lage variatie bij damherten niet direct aanleiding is tot grote zorg. Ook de populaties in de AWD en NPZK lijken tot nu toe goed te functioneren en kennen een hoge reproductie.

Opvallend is wel dat de waargenomen heterozygositeit in AWD en NPZK met respectievelijk $H_o = 0.14$ en 0.17 aan de lage kant is vergeleken met andere populaties. Baker et al. (2017) noemen een gemiddelde H_o van 0.28 , kortom twee keer zo hoog als in de AWD. Een belangrijke kanttekening daarbij is echter dat in dit opzicht de verschillen tussen populaties groot zijn, en dat waarden van rond de 0.15 niet ongebruikelijk zijn. Het hogere gemiddelde werd voor een flink deel veroorzaakt door hoge waarden in Italië, waar de variatie überhaupt opvallend hoog is, en in Engeland, waar dit waarschijnlijk vooral werd veroorzaakt door het kunstmatig samenbrengen van herten uit verschillende bronpopulaties. Baker et al. (2017) lieten zien dat de Engelse damhertpopulaties nog altijd uit verschillende genetische subgroepen bestaan, onder meer zichtbaar via een hoge F_{is} waarde. In de AWD en NKZK was deze F_{is} waarde welliswaar groter dan 0 , maar niet erg hoog, wat er op duidt dat hier geen sprake is van een sterke substructuur. Dit is opvallend gezien het feit dat af en toe ontsnapte dieren uit verschillende hertenkampen in de populatie zijn binnengekomen. Mogelijk hebben deze dieren zich niet weten voort te planten, of waren de betreffende hertenkampen bevolkt met dieren van een redelijk vergelijkbare herkomst.

Populatie-differentiatie en kansen voor het aantonen van uitwisseling

Hoewel geen directe reden tot zorg over de vitaliteit van de populaties, is de aangetroffen variatie in de dataset helaas wel zodanig laag dat dit een probleem kan vormen voor vervolganalyses met als doel om genetische uitwisseling vast te stellen. De variatie bleek namelijk zo beperkt dat meerdere monsters, met zekerheid afkomstig van verschillende afgeschoten individuen, exact hetzelfde profiel vertoonden. In totaal werden 18 profielen elk in meerdere individuen aangetroffen (zie Tabel 2 voor een totaalijst), waarvan 8 profielen zelfs in beide populaties voorkwamen. In totaal betrof het 46 individuen met een niet-uniek profiel, kortom een meerderheid van de totale hoeveelheid individuen in de dataset. De huidige analysemethode is dus niet in staat om elk individueel hert in deze populaties te herkennen op basis van een uniek profiel. Dat maakt het onmogelijk om via deze methode op betrouwbare wijze een individu door de tijd heen te volgen op basis van keutelmonsters, en op die wijze na te gaan of een individu zich heeft verplaatst van ene populatie naar de andere. Deze wijze van migrant-detectie was beoogd als een van de manieren om de effectiviteit van de natuurbrug in beeld te brengen.

Ook voor de andere beoogde statistische analyses voor het berekenen van genetische differentiatie tussen populaties en het bestaan van ruimtelijke genetische patronen (differentiatiewaarde F_{st} en clusteranalyses) is een dataset bestaande uit unieke profielen een vereiste. De huidige resultaten suggereren dat dergelijke analyses dus momenteel maar beperkt mogelijk zijn. Om toch een voorzichtige poging te doen om de genetische verschillen te bepalen, is gebruik gemaakt van een subset van de beschikbare data, waaruit dubbelingen werden verwijderd door per profiel slechts 1 individu te behouden. Dit resulteerde in een dataset met 54 unieke profielen.

Wanneer voor deze dataset de genetische differentiatie werd berekend tussen de twee populaties, resulteerde dit in een F_{st} waarde van 0.098 . Deze waarde duidt op een licht verschil in genetische samenstelling tussen beide populaties. Dit resultaat moet echter met veel voorzichtigheid worden bekeken, want de zeer lage variatie per merker maakt de F_{st} waarde relatief gevoelig voor kleine verschillen (1 afwijkend allel bij 1 individu resulteert meteen in een flinke verandering in F_{st}). Om deze gevoeligheid te verkennen werd de waarde ook berekend op basis van aparte datasets voor de beide monsterperiodes (eind 2019 en eind 2020), wat resulteerde in waarden van respectievelijk 0.047 en 0.113 . Dit is een onrealistische verandering binnen 1 jaar en geeft aan hoe sterk de uitkomst fluctueert afhankelijk van de exacte samenstelling van de steekproef. Het betekent ook dat het zeer gevaarlijk zou zijn om in een toekomstige studie de F_{st} -waarde voor deze nulmeting en een meting enkele jaren na openen van de natuurbrug te vergelijken en op basis daarvan conclusies te trekken over vermindering van de differentiatie.

Wanneer wordt gekeken naar de daadwerkelijk aangetroffen allelen, valt op dat vrijwel alle allelen in beide populaties voorkomen. Dit blijkt ook uit de allelenrijkdom zoals weergegeven in Tabel 1, die voor elk van beide populaties vrijwel even hoog is als voor de totale dataset ($A=2.0$ versus $A=2.1$). Ook de relatieve verhoudingen tussen allelen zijn over het algemeen zeer vergelijkbaar voor beide populaties. Dit suggereert dat de F_{st} -waarde inderdaad een artefact is, en de werkelijke differentiatie maar heel beperkt is.

Tot slot werd op basis van de database van 53 unieke profielen ook een clusteranalyse uitgevoerd via het programma STRUCTURE. Deze analyse probeert de profielen in verschillende clusters in te delen en berekent op basis van Bayesiaanse statistiek welke aantal clusters en welke verdeling van profielen over die clusters het meest waarschijnlijk is. Voor de huidige dataset bleek echter het bestaan van slechts 1 cluster het meest waarschijnlijk. Kortom: alle unieke profielen lijken afkomstig uit dezelfde genetische pool, zonder duidelijke ruimtelijke substructuur. Ook op basis van deze analyse is een genetisch onderscheid tussen de damhertpopulaties in AWD en NPZK dus niet mogelijk.

Tabel 2: Lijst van 18 profielen die bij meerdere individuen voorkwamen, en monsterinformatie per individu. Profielen 11 t/m 18 (in geel) werden bij individuen uit beide populaties aangetroffen.

Profiel	Populatie	Periode	Monstercode
1	AWD	eind 2019	190933
1	AWD	eind 2020	WENR190954
2	AWD	eind 2019	190970
2	AWD	eind 2020	WENR190935
3	AWD	eind 2020	WENR190960
3	AWD	eind 2020	WENR190949
4	AWD	eind 2019	190953
4	AWD	eind 2019	190927
4	AWD	eind 2020	WENR190951
5	NPZK	eind 2019	190923
5	NPZK	eind 2020	WENR190957
6	NPZK	eind 2019	191010
6	NPZK	eind 2019	100963
6	NPZK	eind 2019	190964
6	NPZK	eind 2019	190990
6	NPZK	eind 2019	190081
6	NPZK	eind 2020	WENR190968
7	NPZK	eind 2020	WENR190940
7	NPZK	eind 2020	WENR190956
8	NPZK	eind 2020	WENR191016
8	NPZK	eind 2020	WENR190955
9	NPZK	eind 2019	190959
9	NPZK	eind 2019	190999
10	NPZK	eind 2019	190975
10	NPZK	eind 2019	190997
10	NPZK	eind 2020	WENR191009
11	AWD	eind 2020	WENR190936
11	AWD	eind 2019	190998
11	NPZK	eind 2020	WENR190937
12	AWD	eind 2020	WENR190926
12	NPZK	eind 2019	190993
12	NPZK	eind 2019	191002
12	NPZK	eind 2020	WENR190995
13	AWD	eind 2020	WENR190943
13	NPZK	eind 2019	190969
14	AWD	eind 2019	190966
14	NPZK	eind 2019	190938
14	NPZK	eind 2019	190980
15	AWD	eind 2020	WENR190932
15	NPZK	eind 2019	190984
16	AWD	eind 2020	WENR190944
16	NPZK	eind 2019	190976
17	AWD	eind 2020	WENR190929
17	NPZK	eind 2020	WENR190920
18	AWD	eind 2020	WENR190939
18	NPZK	eind 2020	WENR191001

Conclusies

- In beide populaties lijkt sprake van een erg lage variatie, zowel in termen van allelenrijkdom als in termen van heterozygositeit
- De aangetroffen waarden komen echter sterk overeen met eerdere resultaten voor andere damhertpopulaties in Europa en Noord Amerika. Op basis daarvan geven de resultaten op dit moment weinig reden tot zorg over de vitaliteit van de populaties in AWD en NPZK.
- Ondanks het waarschijnlijk samenkomen van dieren uit verschillende bronnen in de AWD en NPZK, lijkt in beide populaties weinig tot geen sprake van genetische substructuur. Kortom, we zien weinig aanwijzingen voor sociale groepen binnen een populatie die vooral met elkaar paren, zoals eerder bij Nederlandse populaties van edelherten wel werd aangetroffen.
- Ook tussen de twee populaties lijkt weinig genetisch verschil aanwezig. Dit blijkt zowel uit de allelenrijkdom (vrijwel alle allelen komen in beide populaties voor), als uit een clusteranalyse (die alle individuen toekende aan dezelfde genetische groep).
- De zeer lage variatie binnen en tussen populaties heeft echter wel nadelige gevolgen voor het potentieel om op basis van deze methode een effect aan te tonen van de natuurbrug(gen) op de genetische uitwisseling. De huidige set van 10 merkers resulteert niet voor elk individu in een uniek profiel, wat het volgen van individuen in tijd en ruimte op basis van non-invasieve monsters onmogelijk maakt, en statistische differentiatie-analyses minder betrouwbaar maakt. Daarnaast geldt dat aangezien een genetisch verschil nu al niet aanwezig lijkt, het niet mogelijk zal zijn om een vermindering in dit verschil aan te tonen.

Aanbevelingen

Op basis van de resultaten voor de huidige nulmeting lijkt het onwaarschijnlijk dat het mogelijk is om een eventueel effect van de natuurbrug aan te tonen middels de hier toegepaste genetische analysemethode. Zowel een vergelijking tussen $t=0$ en $t=1$ als migrant-detectie via keutelmonsters verzameld rond en op de natuurbrug is waarschijnlijk weinig betrouwbaar.

Op dit moment bevelen we dan ook aan om af te zien van de activiteiten uit fase 3 t/m 5 van het in 2019 opgestelde onderzoeksplan, tenminste in de vorm zoals destijds omschreven.

Een mogelijkheid zou kunnen zijn om over te stappen op een andere analysemethode, die gebruik maakt van merkers met een hogere resolutie, om zo alsnog in staat te zijn om individuele herten te herkennen. Een methode op basis van een groter aantal zogenaamde SNP-merkers (single nucleotide polymorphisms) zou hiervoor uitsluitel kunnen bieden. SNP-gebaseerde analyses zijn sterk in opkomst voor dit type onderzoek, en worden door WENR momenteel onder andere toegepast voor onderzoek naar migratiepatronen bij muskusratten. Een SNP-merkerset voor damherten zou echter nog nieuw ontwikkeld moeten worden, wat relatief kostbaar is.

Een reële vraag is dan ook of dit voor het hier beoogde doel de moeite waard is. Uit buitenlands onderzoek weten we dat als sprake was geweest van een duidelijk verschil in samenstelling tussen beide populaties, ook de huidige microsatelliet-set dit al wel had moeten aantonen. De genetische verschillen tussen de beide populaties lijken dan ook daadwerkelijk slechts zeer klein te zijn. Dat maakt het niet alleen per definitie lastig om een verdere vermindering in verschil aan te tonen, maar betekent ook dat een dergelijke analyse van beperkte relevantie is.

De SNP methode zou waarschijnlijk wel in staat zijn om te bepalen of überhaupt migratie over de natuurbrug plaatsvindt (ongeacht of deze zich in de nieuwe populatie voortplanten). Echter hiertoe zou men ook kunnen volstaan met een onderzoek op basis van zandbedden of camera's.

Referenties

Baker KH, Gray HWI, Metzaniidou D, et al. (2017) Strong population structure in a species manipulated by humans since the Neolithic: the European fallow deer (*Dama dama dama*). *Heredity* 119: 16-26.

Buiteveld J., Koelewijn HP (2006) Klein en dan? Wat kan een beheerder doen met kleine en kwijnende populaties? Alterra-rapport 1250. Alterra, Wageningen UR.

De Groot GA., Jansman HAH, Bovenschen J, Laros I, Meyer-Lucht Y, Hoglund J. (2014) Inteelt onder Sallandse korhoenders: De genetische gevolgen van een kleine populatieomvang. Alterra-rapport 2599. Alterra, Wageningen UR.

De Groot GA, Spek GJ, Bovenschen J, Laros I, Van Meel T, De Jong JF, Jansman HAH (2016) Herkomst en migratie van Nederlandse edelherten en wilde zwijnen: een basiskaart van de genetische patronen in Nederland en omgeving. Alterra-rapport 2724. Alterra, Wageningen UR.

Ekrami B., Tamadon A, Razeghian Jahromi I, et al. (2016) Fertility reduction in male Persian fallow deer (*Dama dama mesopotamica*): inbreeding detection and morphometric parameters evaluation of semen. *Journal of Biosciences and Medicine* 4, DOI: 10.4236/jbm.2016.46005.

Smith R (1979) On selection for inbreeding in polygynous animals. *Heredity* 43: 205-211.

Van Breukelen L. (2013) Historisch overzicht reeën-damherten AWD. Waternet.

Van der Grift E., De Groot G.A. (2018) Genetisch onderzoek hazelworm in Ecocorridor Zwaluwenberg. *Nature Today* 2018 (12-10).