

Auteurs:

Io Def em , Caroline Mouton , Nico De Regge , An Van Breusegem , Sabrina Neyrinck ,
Joachim Mergeay 

Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Reviewers:

Thomas Scheppers

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:

io.defem@inbo.be

Wijze van citeren:

Def em I, Mouton C, De Regge N, Van Breusegem A, Neyrinck S, Mergeay J (2023). Herkomstbepaling van patrijs in Vlaanderen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2023 (27). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

DOI: doi.org/10.21436/inbor.94976248

D/2023/3241/228

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2023 (27)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Maurice Hofmann

Foto cover:

R. Verlinde / Vilda



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

HERKOMSTBEPALING VAN PATRIJS IN VLAANDEREN

Io Deflem, Caroline Mouton, Nico De Regge, An Van Breusegem,
Sabrina Neyrinck, Joachim Mergeay

doi.org/10.21436/inbor.94976248

Dankwoord/Voorwoord

We bedanken Hubertus Vereniging Vlaanderen en de lokale jachtrechthouders voor hulp bij het verzamelen van de stalen. Verder bedanken we de collega's van het analytisch labo, prof. Steven Bouillon en Yannick Stroobandt (KU Leuven, Departement Aard- en Omgevingswetenschappen) voor de hulp bij de voorbereiding van de stalen en de uitvoering van de stabiele isotopenanalyses en Fauve Maertens voor hulp bij het voorbereiden van het SNP-panel.



Samenvatting

Ondanks het verbod op het uitzetten van jachtwild worden er nog steeds patrijzen afkomstig uit kwekerijen waargenomen in Vlaanderen. Om zulke illegale uitzettingen op te sporen werd in 2021 een **genetische studie** opgestart, waarbij ongeveer 30.000 genetische variaties (of Single Nucleotide Polymorphisms, SNP's) werden gedetecteerd in de Vlaamse patrijzenpopulatie. Verdere analyses toonden aan dat, met uitzondering van de provincie Antwerpen, overal in Vlaanderen in meer of mindere mate patrijzen afkomstig uit kwekerijen aanwezig waren. De methode die in voorgaand onderzoek werd gebruikt, is echter niet geschikt voor een snelle en eenvoudige routinematige monitoring. *Genotyping-in-Thousands by sequencing*, of kortweg GT-seq, daarentegen is een methode die individuen relatief eenvoudig kan genotyperen voor enkele honderden genetische variaties. Hierdoor is GT-seq wel geschikt voor toekomstige monitoring. Op basis van de 30.000 SNP's die eerder werden gedetecteerd, werd een finale selectie of panel van 200 SNP's opgesteld. Dit panel maakt over het algemeen nog steeds een duidelijk onderscheid tussen gekweekte en wilde individuen en kan dus in de toekomst gebruikt worden om illegale uitzettingen op te sporen.

Op basis van genetisch onderzoek kunnen we echter geen uitspraken doen over het tijdstip waarop een individu werd uitgezet. We kunnen namelijk niet vaststellen of een patrijs recent werd uitgezet of een nakomeling is van patrijzen die in het verleden werden uitgezet. Daarom werd, naast de ontwikkeling van een genetisch panel, ook onderzocht of er een onderscheid gemaakt kan worden tussen wilde individuen en individuen met een kweekherkomst op basis van **isotopensamenstelling** van veren. We opteren ervoor om o.a. het isotopensignaal voor stikstof (i.e. de verhouding tussen de zwaardere en lichtere vorm van stikstof) te onderzoeken. Dit signaal geeft een beeld over de plaats in de voedselketen (of het trofisch niveau) van individuen en populaties. Hoe hoger de verhouding, en dus hoe groter het aandeel van de zwaardere stikstofisotopen, hoe hoger de plaats in de voedselketen. De isotopensignatuur in weefsels wordt vastgelegd op het moment dat dat specifieke weefsel, in dit geval de veren, wordt gevormd. Patrijzenkuikens die opgroeien onder kweekomstandigheden consumeren voornamelijk voedsel van plantaardige oorsprong, terwijl wilde patrijzenkuikens tijdens de eerste weken bijna uitsluitend insecten eten. Patrijzen die uitgezet worden voor het jachtseizoen zijn bijna uitsluitend dieren die in datzelfde jaar geboren zijn. De analyses worden uitgevoerd op de twee buitenste handpennen (P9 en P10), omdat dit de enige twee veren zijn die niet worden gewisseld tijdens de postjuvenile rui. Aangezien deze veren gevormd werden tijdens de eerste weken van de levensloop van de patrijs, weerspiegelen ze ook het dieet gedurende deze periode. De resultaten tonen aan dat het isotopensignaal voor stikstof bij de wilde individuen tot driemaal hoger is dan bij gekweekte individuen. Met andere woorden, het verschil in trofisch niveau (herbivoor versus insectivoor/omnivoor) is duidelijk zichtbaar in het isotopensignaal, waardoor we kunnen concluderen dat isotopenanalyses succesvol kunnen worden gebruikt om het onderscheid te maken tussen wilde en gekweekte individuen die zeer recent werden uitgezet.

Aanbevelingen voor beheer en/of beleid

Zowel de genetische methode op basis van het SNP-panel, als de analyses op basis van stabiele isotopen kunnen gebruikt worden om patrijzen met een kweekherkomst in de vrije wildbaan te detecteren. Afhankelijk van de gewenste informatie kan er gekozen worden om beide of slechts één van de methodes te gebruiken. Genetische monitoring kan, in tegenstelling tot isotopenanalyses, op elk moment en met elk type weefsel individuen met een kweekherkomst opsporen. Bovendien kan er een beter beeld geschetst worden over het (genetisch) aandeel van gekweekte patrijzen in de totale Vlaamse patrijzenpopulatie, en de invloed van historische uitzettingen. Dit is het meest efficiënt wanneer er gekozen wordt om op routinematige wijze een groot aantal individuen te screenen. Wanneer blijkt dat individuen een genetische kweekherkomst hebben, kan vervolgens op basis van isotopenanalyses bepaald worden of deze al dan niet recent (i.e. datzelfde jaar) werden uitgezet.

Als je enkel geïnteresseerd bent in recente uitzettingen (i.e. vlak voor het jachtseizoen), kan ervoor worden gekozen om enkel analyses te doen op basis van stabiele stikstofisotopen. Isotopenanalyses kunnen eenvoudig en snel worden uitgevoerd en geven onmiddellijk een duidelijk resultaat. Het nadeel is dan wel dat uitzettingen die meer dan een jaar voor de herfst (of het desbetreffende jachtseizoen) gebeurd zijn, op deze manier niet meer opgespoord kunnen worden. Gekweekte individuen die een jaar na uitzetting geschoten worden, gebruiken in tussentijd dezelfde voedselbronnen als wilde patrijzen en hebben hun verenkleed ondertussen ook volledig gewisseld.

English abstract

Despite the ban on the release of game in Flanders, captive-bred individuals of the grey partridge (*Perdix perdix*) are still observed in Flanders. To detect these illegal releases, a **genetic study** was started in 2021, in which approximately 30,000 genetic variations (or Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) were detected in the Flemish partridge population. Further analyses showed that, with the exception of the province of Antwerp, captive-bred individuals were observed in every Flemish province. However, the method used is not suitable for routine monitoring. Genotyping-in-Thousands by sequencing, or GT-seq, on the other hand, is a method that can easily genotype individuals for several hundred genetic variations, which makes this method suitable for future monitoring. Based on the 30,000 SNPs previously detected, a final selection or panel of 200 SNPs was prepared. In general, this panel still makes a clear distinction between farmed and wild individuals and can therefore be used in the future to detect illegal releases of partridge in Flanders.

Based on genetic research, we cannot make any statements about the exact timing of the release. We cannot determine whether a partridge was released recently or is a descendant of partridges that were released in the past. Therefore, in addition to the development of a genetic panel, we investigated whether a distinction can be made between wild and captive-bred individuals based on the **isotopic composition** of the feathers. We opted to investigate the isotope signal for nitrogen (i.e. the ratio between the heavier and lighter form of nitrogen). This signal reflects individuals' or populations' trophic level. More specifically, the higher the ratio, and thus the greater the proportion of the heavier nitrogen isotopes, the higher the position of an individual or species in the food chain. The isotope signature in tissues is captured at the moment that that specific tissue, in this case the feathers, is formed. Partridge chicks raised under rearing conditions mainly receive a uniform diet of plant origin, while wild partridge chicks consume almost exclusively insects during the first few weeks. Partridges released for the hunting season are generally animals born in spring of the same year. Isotopic analyses were performed on the two outer primaries (P9 and P10), as these are the only two feathers that are not exchanged during the post-juvenile moult. Since these feathers were formed during the first weeks of the partridge's life, they reflect the diet during this period. The isotope signal for nitrogen is up to three times higher in the wild individuals than in the cultured individuals. In other words, the difference in trophic level (herbivore versus insectivore/omnivore) is clearly visible in the isotope signal, leading us to conclude that isotope analyses can be successfully used to distinguish between wild and farmed individuals that were released very recently.



Inhoudstafel

Dankwoord/Voorwoord	2
Samenvatting	3
Aanbevelingen voor beheer en/of beleid	4
English abstract	5
1 Inleiding	7
2 Genetische monitoring.....	8
3 Stabiele isotopen.....	9
4 Doelstellingen	11
5 Werkwijze.....	12
5.1 Genetische monitoring	12
5.1.1 SNP-panel ontwikkeling.....	12
5.1.2 Panel validatie.....	12
5.2 Stabiele isotopen	14
5.2.1 Staalname	14
5.2.2 Analyses	14
5.2.3 Dataverwerking	15
6 Resultaten	16
6.1 Genetische monitoring.....	16
6.2 Stabiele isotopen	20
7 Discussie.....	22
7.1 Genetische monitoring	22
7.2 Stabiele isotopen	23
7.3 Voor- en nadelen van beide methodes	24
Referenties	26



1 INLEIDING

De patrijs (*Perdix perdix*, Phasianidae) gaat sinds enkele decennia sterk achteruit in Vlaanderen (Onkelinx et al. 2021, Vermeersch et al. 2021), net als in de rest van Europa (BirdLife International 2017). De verandering van het agrarische landschap (o.a. het verdwijnen van kleine landschapselementen en het intensief gebruik van pesticiden) wordt vaak aangeduid als de voornaamste oorzaak van deze achteruitgang (Kuijper et al. 2009). De patrijs is bovendien een populaire kleinwildsoort en mag, binnen erkende wildbeheereenheden, tussen 15 september en 14 november onder bepaalde voorwaarden worden bejaagd. Ten eerste moet er op niveau van de volledige wildbeheereenheid (WBE) een gemiddelde dichtheid van drie broedparen per 100 ha open ruimte worden waargenomen gedurende de drie voorgaande jaren. Sinds 2021 wordt deze dichtheid ook geverifieerd door gestandaardiseerde tellingen. Ten tweede moet er een patrijsvriendelijk beheer worden gevoerd.

Ondanks het verbod op het uitzetten van jachtwild, dat sinds 1991 van kracht is, worden er nog steeds patrijzen afkomstig uit kwekerijen waargenomen in Vlaanderen (Schauvliege & De Bruyn 2020). Door de aanwezigheid van gekweekte individuen in het wild, wordt verwacht dat uitspraken omtrent densiteiten van diezelfde wilde populaties mogelijk niet accuraat of correct zijn. In dergelijke omstandigheden kunnen jaarlijkse tellingen en het (al dan niet) toepassen van een patrijsvriendelijk beheer in vraag worden gesteld. Daarnaast heeft het uitzetten van gekweekte patrijzen ook verschillende nadelige effecten op de wilde populaties. Voor een uitgebreide uiteenzetting hiervan verwijzen we graag naar Deflem et al. (2021). Om deze illegale uitzettingen op te sporen werd er in 2021 een genetische studie gestart (Deflem et al. 2021). Dit onderzoek toont aan dat wilde en gekweekte patrijzen genetisch verschillend zijn in Vlaanderen en dat er in zowat elke Vlaamse provincie, met uitzondering van Antwerpen, in meer of mindere mate patrijzen met een kweekherkomst werden aangetroffen.



2 GENETISCHE MONITORING

Het genetisch onderzoek uit 2021 had als doel om een beter beeld te krijgen van de genetische structuur (i.e. populatiestructuur, genetische diversiteit en connectiviteit) van patrijs in Vlaanderen enerzijds, en van de genetische verschillen tussen wilde en gekweekte patrijzen anderzijds. De toen gebruikte methodiek heeft duizenden genetische variaties (*Single Nucleotide Polymorphisms* of kortweg SNP's) geïdentificeerd in de Vlaamse patrijzenpopulaties. Zulke SNP's zijn variaties in één enkele nucleotide tussen individuen en populaties, en komen vaak in grote aantallen voor in het genoom. Om deze variaties op te sporen, werd een *restriction site-associated DNA sequencing* (RAD-seq) techniek gebruikt, waarbij er in slechts een klein deel van het volledige genoom werd gezocht naar de aanwezigheid van SNP's (Andrews et al. 2016). Deze methode is, door de kosten en de moeilijk reproduceerbare methodiek, echter niet geschikt voor efficiënte routinematige monitoring, maar het is wel een essentiële stap in de ontwikkeling ervan. Uit deze genetische variaties kunnen we in een volgende stap de meest informatieve SNP's, dewelke duidelijk verschillend zijn tussen wilde en gekweekte patrijzen, selecteren. We kunnen dus op basis van de eerder verzamelde data een panel, bestaande uit een 200 tal SNP's, ontwikkelen specifiek voor de detectie van gekweekte patrijzen. Deze 200 SNP's kunnen dan zeer gericht gesequeneerd worden met behulp van een andere techniek, *Genotyping-in-Thousands by sequencing* (of GT-seq, Campbell et al. 2015). GT-seq verschilt van RAD-seq methodes doordat er specifieke primers worden ontwikkeld die enkel het stukje DNA gaan herkennen waar die bepaalde SNP zich bevindt. Met andere woorden, voor de detectie van 200 SNP's op 200 verschillende plaatsen in het genoom, worden 200 primersets ontwikkeld. Zo'n SNP-panel laat ons toe om op een meer (kosten-)efficiënte en routinematige wijze een groot aantal patrijzen te genotyperen (i.e. bepalen welke variaties van de SNP elk individu bezit) om vervolgens de (genetische) oorsprong te bepalen.



3 STABIELE ISOTOPEN

Op basis van genetisch onderzoek kunnen we echter niet vaststellen of een patrijs recent werd uitgezet of een nakomeling is van patrijzen die in het verleden werden uitgezet. Belangrijk hierbij te vermelden is dat verschillende studies (vb. Angelov et al. 2019, Buner 2009, Buner et al. 2011, Homberger et al. 2021, Rymešová et al. 2013) aantonen dat zowel de overlevingskansen als het broedsucces van gekweekte patrijzen in het wild zeer laag zijn (zie Mergeay et al. 2022 voor een samenvatting). Daarnaast kunnen uitgezette patrijzen die afkomstig zijn van wildvang op basis van genetische analyses niet gedetecteerd worden als uitgezette exemplaren. Om uitspraken te doen over het tijdstip (recent of historisch) van uitzettingen kunnen analyses op basis van stabiele isotopen worden uitgevoerd.

Chemische elementen, zoals waterstof (H), stikstof (N), zuurstof (O) en koolstof (C), komen in de natuur in verschillende vormen voor. Elke vorm of isotoop verschilt daarbij in het aantal neutronen dat in de atoomkern aanwezig is. We spreken over stabiele isotopen wanneer er geen verval is doorheen de tijd, zoals wel het geval is bij radioactieve elementen. Het verschil in relatieve abundantie van de stabiele lichte (minder neutronen) en zware (meer neutronen) vorm van één van deze elementen wordt vaak gebruikt in ecologisch onderzoek om de herkomst, maar ook het trofische niveau (i.e. plaats in de voedselketen) en het dieet van individuen, populaties en soorten te bestuderen (Inger & Bearshop 2008).

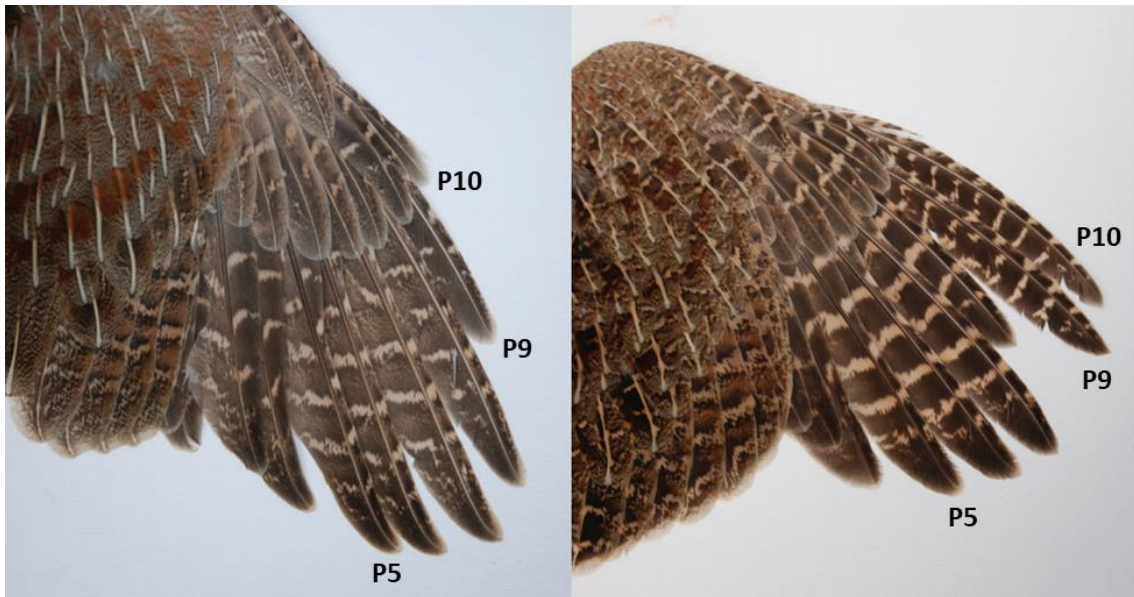
De meest gebruikte isotopen bij onderzoek naar trofische ecologie zijn de lichte en zware vorm van stikstof (^{14}N en ^{15}N) en koolstof (^{13}C en ^{12}C). Hierbij wordt de verhouding tussen beide vormen (genoteerd als bijvoorbeeld $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ of $\delta^{15}\text{N}$) gemeten. Stabiele stikstofisotopen worden gebruikt om de positie in de voedselketen te bepalen. De verhouding tussen de zware en de lichte vorm stijgt namelijk met een geschatte 2,5 tot 5 ‰ bij elke stap in de voedselketen, doordat lichtere isotopen makkelijker worden uitgescheiden (Inger & Bearshop 2008, Post 2002). Met andere woorden, hoe hoger de plaats in de voedselketen, hoe groter de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio. De verhouding tussen koolstofisotopen daarentegen blijft stabiel doorheen de voedselketen en reflecteert de gebruikte koolstofbron tijdens de fotosynthese (verschillend tussen C3, C4 en CAM planten) aan het begin van de voedselketen (Kelly 2000). Doordat de isotopensamenstelling van een bepaald weefsel het dieet van een individu tijdens de synthese van dat type weefsel reflecteert, kunnen we bovendien een idee krijgen van het dieet gedurende verschillende periodes. De isotopensamenstelling van bloed geeft bijvoorbeeld een beeld over het recente dieet, terwijl de samenstelling in veren een beeld geeft over het dieet gedurende de vorming ervan, vaak enkele weken of maanden eerder (Hobson & Wassenaar 2008, Inger & Bearshop 2008).

Met behulp van stabiele isotopen kunnen we het dieet en dus ook de herkomst van patrijzen, gevangen in de vrije wildbaan, bepalen. Individuen die opgroeien onder kweekomstandigheden consumeren grotendeels plantaardig materiaal, terwijl kuikens in het wild tijdens de eerste twee weken bijna uitsluitend insecten consumeren (Bro 2016, Southwood & Cross 1969). Het aandeel plantaardig materiaal stijgt geleidelijk na deze eerste weken (Bro 2016) en het dieet van volwassen patrijzen bestaat in het wild uit zowel plantaardig als dierlijk materiaal (McGowan &



Kirwan 2013). Aangezien het trofisch niveau tussen wilde en gekweekte patrijzen verschilt (insectivoor/omnivoor versus herbivoor), verwachten we ook een verschil in $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in bepaalde veren, zoals eerder aangetoond bij fazanten (Jensen et al. 2012).

Patrijzen die in de zomer worden uitgezet voor de jacht zijn vaak individuen geboren in de (late) lente van datzelfde jaar. Patrijzen hebben in hun eerste levensjaar slechts een gedeeltelijke postjuvenile rui van de slagpennen, waarbij enkel de buitenste twee handpennen (P9 en P10) van het juveniele verenkleed (gevormd in juni) worden behouden tot de zomer/herfst van het volgend kalenderjaar (**Figuur 1**). Deze postjuvenile rui begint bij de binnenste handpen (P1) op een leeftijd van 23 tot 26 dagen. Meerjarige patrijzen, daarentegen, wisselen hun volledige verenkleed, inclusief de buitenste twee handpennen, tussen het broedseizoen en oktober (Bro 2016). Dit specifieke rui patroon zorgt ervoor dat de isotopensamenstelling van de twee buitenste handpennen van patrijzen geboren in datzelfde kalenderjaar in het najaar/tijdens het jachtseizoen het dieet van kuikens tijdens de eerste week weerspiegelt, aangezien P9 en P10 al na enkele dagen gevormd worden. We verwachten hierdoor een duidelijk verschil tussen dieren opgegroeid onder kweekomstandigheden en patrijzen in het wild tijdens hun eerste kalenderjaar (Jensen et al. 2012).



Figuur 1. Vleugel van een meerjarige patrijz (links) en een patrijz in zijn eerste kalenderjaar (rechts). De buitenste twee handpennen (P9 en P10) worden niet vervangen tijdens de postjuvenile rui, zoals zichtbaar op de rechtse foto (aangepast van Game & Wildlife Conservation Trust 2016).

4 DOELSTELLINGEN

Het doel van dit project is om een protocol uit te werken dat ons, op routinematige wijze, toelaat om een onderscheid te maken tussen wilde en gekweekte patrijzen en na te gaan of de gekweekte patrijzen in het afgelopen jaar in de vrije wildbaan gebracht werden.

In het eerste deel van dit rapport wordt een SNP-panel ontwikkeld om een efficiënte genetische monitoring toe te laten, dit op basis van de resultaten uit eerdere genetisch onderzoek (Deflem et al. 2021). In het tweede deel wordt onderzocht of de verhouding van stabiele isotopen van stikstof verschilt tussen patrijzen opgegroeid onder kweekomstandigheden en in het wild. De verhouding tussen koolstofisotopen wordt altijd tegelijk met stikstof gemeten en wordt dus bijkomstig geanalyseerd, ook al wordt er niet onmiddellijk een verschil verwacht. Voor deze analyse zal gebruik worden gemaakt van de buitenste twee handpennen (P9 en P10), aangezien deze het dieet van enkele maanden voor de start van het jachtseizoen (15 september tot 14 november) weerspiegelen. Op deze manier kunnen we nagaan of een gestrekte patrijs al dan niet opgegroeid is onder kweekomstandigheden en dus recent (hetzelfde jaar) werd uitgezet. Daarnaast wordt het isotopensignaal van een handpen (P5) die wel tijdens de postjuvenile rui vervangen wordt, geanalyseerd. Wanneer deze bij uitgezette patrijzen verschilt in isotopensignaal van de buitenste twee handpennen, kunnen we concluderen dat dit individu uitgezet is voor de postjuvenile rui.



5 WERKWIJZE

5.1 GENETISCHE MONITORING

5.1.1 SNP-panel ontwikkeling

Tijdens voorgaand onderzoek werden 30.194 SNP's geïdentificeerd in de Vlaamse patrijzenpopulaties (Deflem et al. 2021). De eerder geïdentificeerde SNP's werden verder gefilterd met behulp van het R pakket Radiator (versie 1.2.2, Gosselin 2020) zodat enkel de geschikte SNP's werden behouden voor de ontwikkeling van het panel. De volgende filtering criteria werden toegepast: heterozygositeit = 0,01 - 0,5, *minor allele count* (MAC) = 3, gemiddelde coverage = 10 - 100, SNP positie binnen reads = 25 - 75 baseparen (bp), vermijden van *linkage disequilibrium* tussen dicht bij elkaar gelegen SNP's en Hardy-Weinberg evenwicht (HWE). Een totaal van 4.591 SNP's voldeed aan deze criteria. Vervolgens werden uit deze subset 500 SNP's geselecteerd die enerzijds het sterkst verschillend zijn tussen wilde individuen en individuen afkomstig uit kweek (i.e., de SNP's met de hoogste F_{ST} -waardes) en anderzijds gelijkmatig verdeeld zijn over het genoom, zodat er een goede representatie is van de genetische structuur.

5.1.2 Panel validatie

Voor het ontwikkelen en testen van de primerparen voor de 500 geselecteerde SNP's werden tien nieuwe stalen en 86 eerder geanalyseerde stalen, waarvan er 13 niet succesvol gegenotypeerd werden, opgestuurd naar GTseek LLC (Idaho, VS) (**Tabel 1**). Hiervoor werd het protocol gevolgd zoals beschreven in Campbell et al. (2015). Van de eerder geanalyseerde stalen werd DNA geëxtraheerd uit zowel bloed als uit weefselstalen, en werden zuiver wilde, zuiver kweek en hybride individuen opgestuurd. De stalen werden vervolgens opnieuw gegenotypeerd voor de geselecteerde SNP's volgens de *Genotyping-in-Thousands by sequencing* of kortweg GT-seq methode (Campbell et al. 2015). Via deze methode zijn we in staat om op voorhand geselecteerde SNP's gericht te sequencen. Dit in tegenstelling tot de eerder gebruikte RAD-seq methode, waarbij we enkel op zoek gaan naar alle aanwezige SNP's in een deel van het genoom.

Op basis van de resultaten van de validatie werd er, net als tijdens het eerder onderzoek, eerst een PCA, DAPC (Jombart & Collins 2015) en STRUCTURE analyse (Falush et al. 2003, Pritchard et al. 2000) uitgevoerd op de 96 individuen en de genotypes die het resultaat zijn van de GT-seq methode. Dit zijn ordinatie- en clusteringmethodes die verwantschappen tussen individuen weergeven. Vervolgens werd gekeken of deze genotypes en toewijzingen overeenkomen met de eerdere resultaten op basis van de RAD-seq methode voor de individuen die door beide methodes geanalyseerd werden (Deflem et al. 2021). In een laatste stap vergeleken we de toewijzing van alle 482 eerder geanalyseerde individuen op basis van het finale panel en de volledige dataset.



Tabel 1. Overzicht van de stalen gebruikt voor de validatie van het SNP-panel (N_{totaal}) en het aantal stalen dat succesvol gegenotypeerd kon worden ($N_{\text{gegenotypeerd}}$). Tussen haakjes staat het aantal stalen dat bij het vorige onderzoek werd geanalyseerd, maar niet succesvol gegenotypeerd kon worden.

* Stalen verzameld na Deflem et al. (2021).

WBE	Regio	N_{totaal}	$N_{\text{gegenotypeerd}}$
Antwerpse polders	Noorderkempen	1	1
Essen	Noorderkempen	2 (1)	2
Groot Brecht	Noorderkempen	1	1
Maxburg	Noorderkempen	2	1
Noorderkempen	Noorderkempen	1	1
Kinrooi	Noord-Limburg	1	1
Jekervallei	Zuid-Limburg	1	1
Patrijzenkuilen	Zuid-Limburg	2	2
Meerdaal-Honseem	Oost-Brabant	1	1
ROW	Oost-Brabant	6	6
Tussen Voer & Yse	Oost-Brabant	3	3
Velpedal	Oost-Brabant	6 (2)	6
Walenbos	Oost-Brabant	1	1
Dendervallei West-Pajottenland	Pajottenland	2 (1)	2
Land van Aalst	Pajottenland	3	2
Oost-Pajottenland	Pajottenland	3	3
Hoge Kale	Noorden-OostVI	1	1
Langs de Hoge Kale	Noorden-OostVI	2	2
Meetjesland-Noord	Noorden-OostVI	1	1
Rond Kale, Lieve & Burggrave	Noorden-OostVI	1	1
Etbos	Oosten-OostVI	2	2
Klaverbeek	Oosten-OostVI	2	2
Scheldevallei	Oosten-OostVI	1	1
Dendervallei	Zuiden-OostVI	2	2
Scheldeoord	Zuiden-OostVI	1	0
Drie Koningen	Centraal-WVI	1	1
Mandelvallei	Centraal-WVI	2 (1)	1
De Kimmelbeek	Ieper	1 (1)	1
In Flanders Fields	Ieper	1 (1)	1
Damme-Oostkust	Kust-Oost	1	1
De Middenkustvallei	Kust-West	2	2
Tussen Ijzer en Houtland	Kust-West	1	1
De Harelbeek -en Heulebeekvallei	Zuiden-WestVI	2 (2)	2
Leie en Schelde kouters	Zuiden-WestVI	1 (1)	1
Kweek 1A (Frankrijk)		5 (1)	5
Kweek 1B (Frankrijk)		3	3
Kweek 2 (Frankrijk)		4	3
Kweek 3 (België)		4	3
Kweek 4 (Nederland/Duitsland)		4 (1)	3
Kweek 5 (onbekend)		4	4
Kweek 6* (onbekend)		10	10
Totaal		96	88



5.2 STABIELE ISOTOPEN

5.2.1 Staalname

Tijdens het jachtseizoen van 2022 werden de twee buitenste handpennen (P9 en P10) van 34 wilde individuen verzameld, aangevuld met volledige vleugels van 41 individuen. De stalen zijn afkomstig uit drie wildbeheereenheden (**Tabel 2**). Deze wilde patrijzen zijn afkomstig uit regio's waar tijdens het eerder onderzoek geen onregelmatigheden werden vastgesteld (Deflem et al. 2021). Handpennen werden ook verzameld van 34 patrijzen afkomstig uit één kwekerij (Frankrijk). Volledige vleugels werden verzameld van twee commerciële leveranciers (aangekocht in het Verenigd Koninkrijk en Polen), waarvan we veronderstellen dat ze afkomstig zijn uit kweek (**Tabel 2**). Alle stalen werden bij kamertemperatuur in een droge ruimte bewaard.

Tabel 2. Overzicht van het totaal aantal stalen verzameld voor de stabiele isotopenanalyse (N_{totaal}) en het aantal handpennen (N_{P10} , N_{P9} , N_{P5}) gebruikt voor de isotopenanalyses.

Groep	N_{totaal}	N_{P10}	N_{P9}	N_{P5}
WBE De Middenkustvallei	8	8	-	-
WBE De Harelbeek- en Heulebeekvallei	56	19	9	9
WBE Maxburg	11	11	-	-
Kwekerij 2 (Frankrijk)	18	18	-	-
Kwekerij 7 (Verenigd Koninkrijk)	8	8	5	5
Kwekerij 8 (Polen)	8	8	5	5
Totaal	98	72	19	19

Eerdere studies tonen aan dat isotopensamenstelling verschilt tussen veren van hetzelfde individu en zelfs binnen verschillende secties van dezelfde veer (Bearhop et al. 2002, Jensen et al. 2012, Wiley et al. 2010). Om zulke verschillen op te sporen, werden er voor negen wilde en tien gekweekte individuen verschillende handpennen geanalyseerd (P10, P9, P5, **Figuur 1, Tabel 2**). In totaal werden er zo 110 handpennen, afkomstig van 72 individuen, geanalyseerd.

5.2.2 Analyses

De verzamelde veren werden voor analyse schoongemaakt met aceton en vervolgens grondig gespoeld met gedestilleerd water. De gewassen veren werden gedroogd in een oven op een temperatuur van 40°C gedurende 24 uur. Van elke gedroogde veer werd vervolgens telkens een stuk met een gewicht tussen 0,200 en 0,800 mg van de bovenste tip gebruikt en afgewogen in een aluminium kroesje.

De isotoopratio's van zowel stikstof als koolstof ($\delta^{15}\text{N}$ en $\delta^{13}\text{C}$) werden vervolgens bepaald door verbranding met een *elemental analyser* (Thermo Flash HT/EA or EA 1110) gekoppeld aan een *IRMS systeem* (Thermo Delta V Advantage) via een *Conflo IV interface* (Thermo) aan het departement aard- en omgevingswetenschappen van de Katholieke Universiteit Leuven. Beide ratio's worden tijdens dit proces standaard gemeten, ook al ligt de focus in dit onderzoek op $\delta^{15}\text{N}$. De isotoopratio's werden op volgende wijze berekend en weergegeven:

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

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \frac{\left(\frac{R_{\text{STAAL}}}{R_{\text{STANDAARD}}}\right)}{R_{\text{STANDAARD}}} \times 1000,$$

waarbij R_{STAAL} de verhouding $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ of $^{14}\text{C}/^{13}\text{C}$ van het gemeten staal volgens de delta-schrijfwijze in promille weergeeft. $R_{\text{STANDAARD}}$ geeft deze verhouding weer voor de gebruikte internationale standaard (Vienna PeeDee Belemniet voor $\delta^{13}\text{C}$ en lucht voor $\delta^{15}\text{N}$).

5.2.3 Dataverwerking

De variatie in $\delta^{15}\text{N}$ en $\delta^{13}\text{C}$ tussen de verschillende groepen (WBE De Middenkustvallei, WBE De Harelbeek- en Heulebeekvallei, WBE Maxburg, kwekerij 2, kwekerij 6 en kwekerij 7) werd getest via een *linear mixed effects* model met behulp van het R pakket nlme versie 3.1-161 (Pinheiro et al. 2022), waarbij de zes groepen en het type veer (P5, P9 en P10) als *fixed effect* werden beschouwd en het individu als *random effect*. Alle analyses werden uitgevoerd in R versie 4.2.1 (R Core Team 2022).



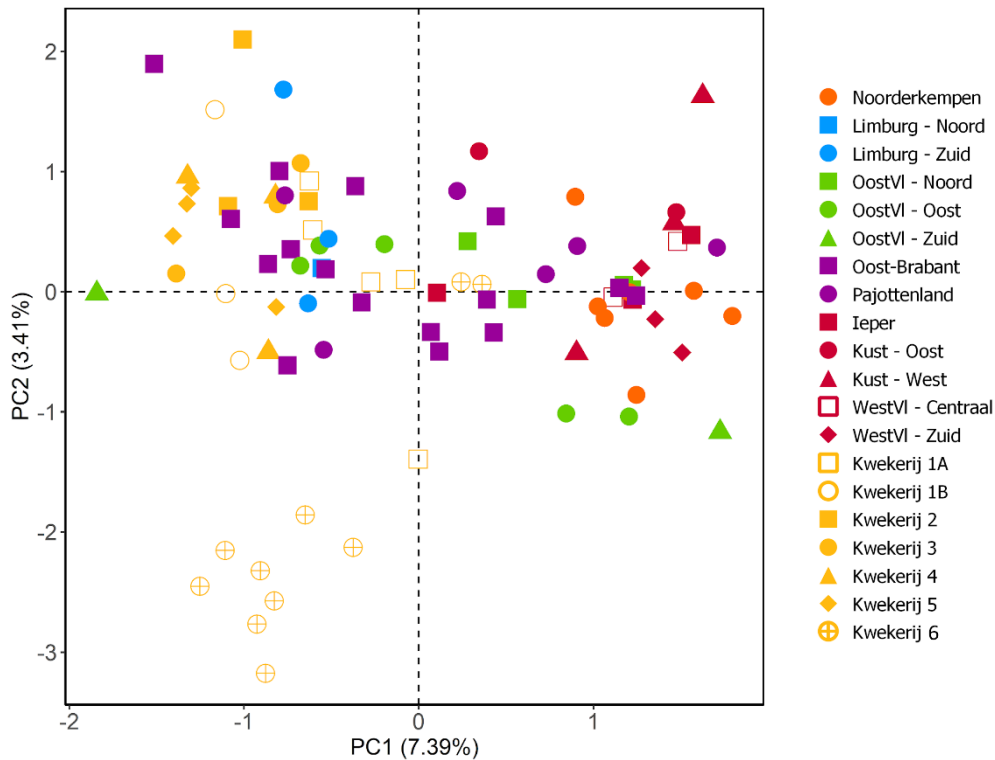
6 RESULTATEN

6.1 GENETISCHE MONITORING

Van de 500 geselecteerde SNP's bleken er 341 geschikt voor *primer design*. Van deze 341 geschikte SNP's werden er vervolgens 214 succesvol gegenotypeerd in meer dan 80% van de individuen op basis van de GT-seq methode. Een totaal van 66 individuen werden zowel gegenotypeerd tijdens de vorige analyses (via RAD-seq) als tijdens de validatie van het SNP-panel (via GT-seq). Het aandeel genotypes van de 214 SNP's dat verschilt tussen beide methodes varieert tussen 0,00 en 70,59% per SNP (gemiddelde = 3,67%, mediaan = 2,86%). Tien SNP's met een aandeel verschillende genotypes hoger dan 10% werden vervolgens verwijderd. Het finale panel bevat 204 SNP's met een gemiddelde aantal afwijkende genotypes per SNP van 2,78% (mediaan = 2,86%, bereik = 0,00 - 8,96%).

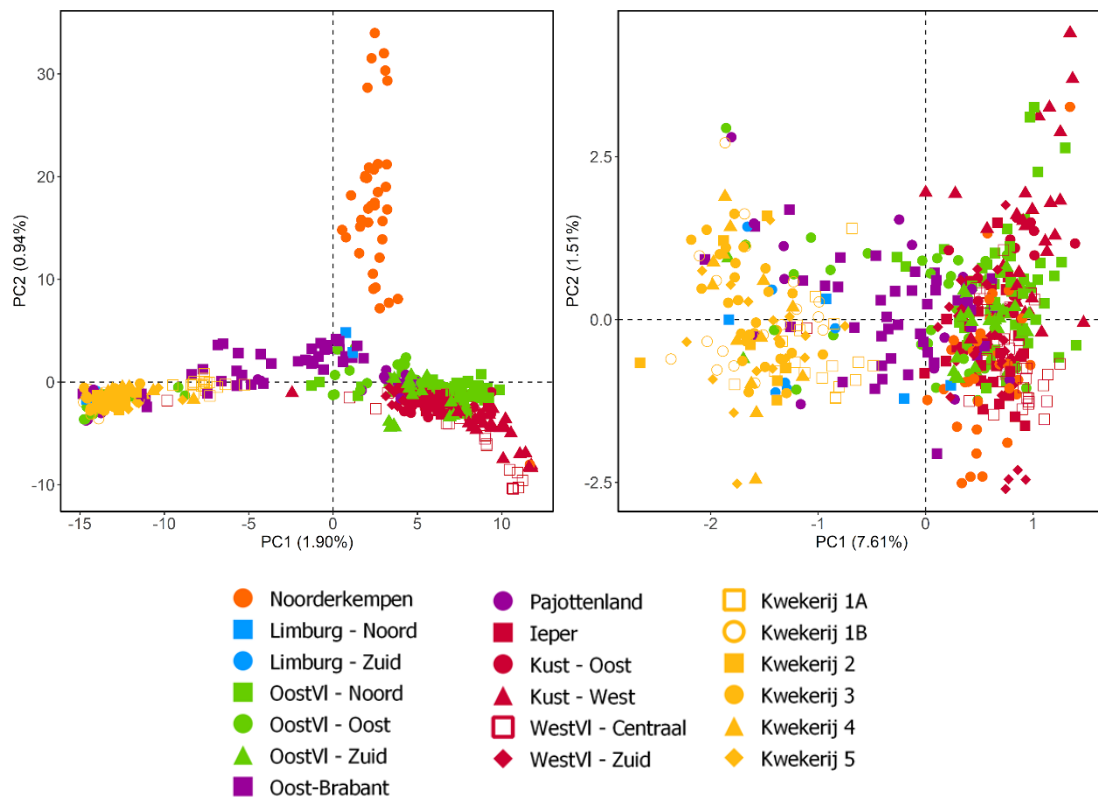
Voor beide datasets komt de toewijzing door DAPC analyse volledig overeen. Deze toewijzing verschilt voor enkele individuen wel met de toewijzing van deze stalen als deel van de volledige dataset op basis van de 30.000 SNP's. Zes individuen (vijf individuen uit Oost-Brabant, één uit Pajottenland) die op basis van volledige dataset als kweek werden beschouwd, worden op basis van het finale SNP-panel toegewezen aan de wilde groep. De toewijzing op basis van de STRUCTURE analyse komt ook overeen bij beide datasets, maar verschilt opnieuw met de toewijzing op basis van de volledige dataset voor negen individuen. Eén wild individu wordt op basis van de 204 SNP's toegewezen aan de kweekgroep (Pajottenland); twee kweekindividuen (Oost-Vlaanderen Oost en Oost-Brabant) en drie hybriden (Oost-Brabant) worden toegewezen aan de wilde groep, twee zuivere kweekindividuen (Oost-Vlaanderen Zuid en Oost-Brabant) en één wild individu (Ieper) aan de groep met hybriden.

Voor de verdere analyses werden acht van de 96 individuen die werden gebruikt voor de panelvalidatie verwijderd omdat meer dan 10% van de genotypes van de SNP's verschilden met de resultaten uit de eerdere analyse. De eerste PC-as maakt een duidelijk onderscheid tussen kweekindividuen, wildvang individuen afkomstig uit kweek en zuiver wilde individuen (**Figuur 2**). De tweede PC-as scheidt de individuen uit kwekerij 6 en de andere kwekerijen. Deze individuen worden op basis van DAPC ook toegewezen aan de kweekcluster, met uitzondering van twee individuen. Voor de 13 individuen die eerder niet gegenotypeerd konden worden, zijn de genotypes met de GT-seq methodes wel succesvol bepaald kunnen worden. Eén van deze individu (afkomstig uit Oost-Brabant) wordt toegewezen aan de kweekgroep, de andere aan de wilde groep.



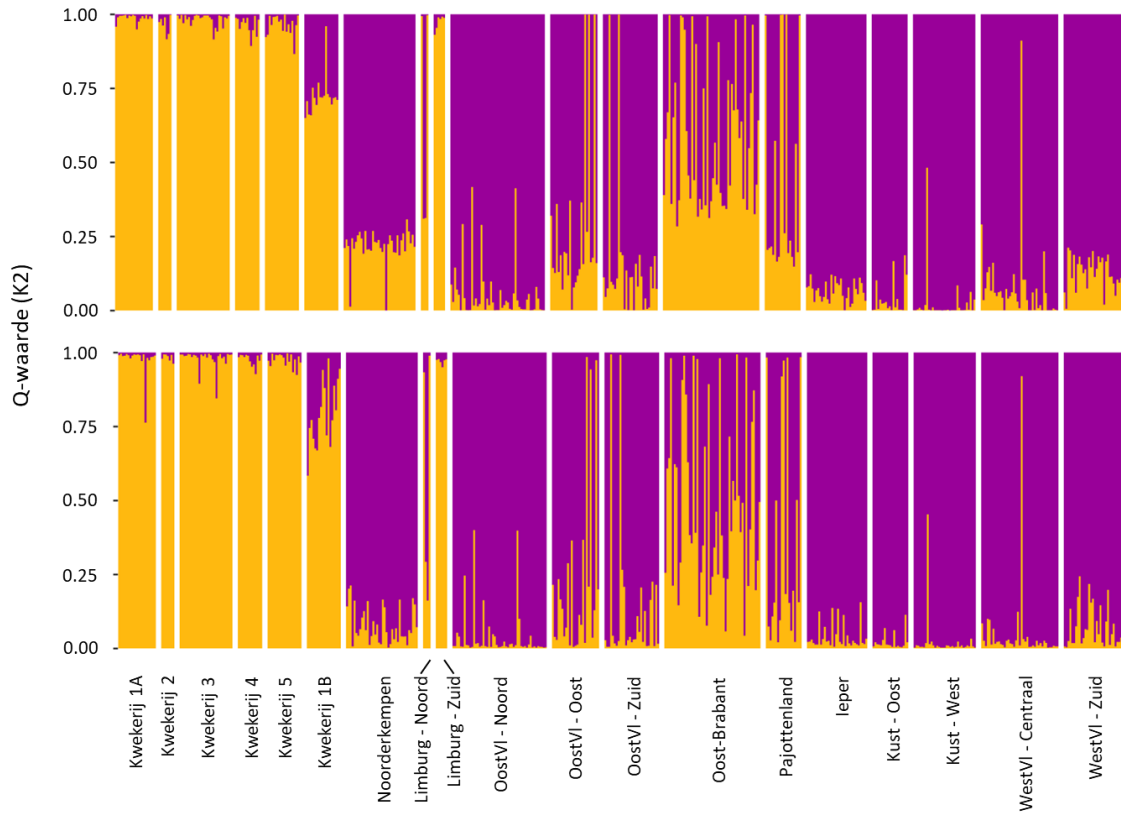
Figuur 2. Ordinatie plot (PCA) voor het finale SNP-panel (204 SNP's). De symbolen geven de 88 patrijzenindividuen weer, waarvan er 78 opnieuw werden gegenotypeerd voor de validatie van dit panel. De overige 10 individuen werden tijdens deze validatie voor de eerste keer gegenotypeerd. De kleuren en symbolen geven aan tot welke groepen deze individuen behoren.

Wanneer we kijken naar de genotypes van de 482 individuen die eerder geanalyseerd werden voor de 204 SNP's van het finale panel, zien we dat de PCA nog steeds een duidelijk onderscheid toont tussen wilde individuen en individuen afkomstig uit kweek. De structuur binnen de wilde groepen is op basis van de geselecteerde SNP's minder goed zichtbaar, maar nog steeds subtiel aanwezig (**Figuur 3**). Op basis van de DAPC-analyses worden acht individuen, die eerder als afkomstig uit kweek werden beschouwd, nu geïdentificeerd als wild (één individu uit kwekerij 1A, vijf individuen uit Oost-Brabant en twee uit Pajottenland). Het finale panel geeft dus een andere toewijzing voor 1,66% van de individuen.



Figuur 3. Ordinatie plot (PCA) voor de volledige dataset (links) en het finale panel van 204 SNP's (rechts). De symbolen geven de verschillende patrijzenindividuen weer. De kleuren en symbolen geven aan tot welke groepen deze individuen behoren.

De STRUCTURE analyse geeft een iets meer genuanceerd beeld (**Figuur 4**). Bij een STRUCTURE analyse geeft de Q-waarde weer het toewijzingspercentage is van elk individu aan de waargenomen clusters, in dit geval zijn dat twee clusters (kweek en wild). Een Q-waarde groter dan 0,700 geeft, voor toewijzingen aan de kweekcluster, aan dat een individu waarschijnlijk zuiver afkomstig is uit een kwekerij. Dertien individuen (11 uit Oost-Brabant en twee uit Pajottenland) werden op basis van de volledige dataset geïdentificeerd als een nakomeling van een kweek en een wild individu (hybride afkomst; Q-waarde kweekcluster tussen 0,500 en 0,700). Deze grenzen werden op basis van de eerdere analyses gekozen (Deflem et al. 2021). Van deze 13 individuen worden er op basis van de geselecteerde SNP's zes individuen, uit Oost-Brabant en het Pajottenland, geïdentificeerd als wild (Q-waarde lager dan 0,500). De Q-waarde van deze individuen varieert op basis van de geselecteerde SNP's tussen 0,395 en 0,493 (gemiddelde = 0,449), terwijl deze waarde op basis van de volledige dataset tussen 0,582 en 0,642 lag (gemiddelde = 0,595). Bovendien worden vijf individuen uit Oost-Brabant, die eerder als zuiver afkomstig uit kweek geïdentificeerd werden ($Q = 0,718 - 0,765$, $Q_{\text{gemiddelde}} = 0,751$), nu als hybride geïdentificeerd ($Q = 0,581 - 0,669$, $Q_{\text{gemiddelde}} = 0,564$). Drie hybriden uit Oost-Brabant worden op basis van het panel geïdentificeerd als kweekindiviu. Belangrijk hierbij te vermelden is dat er ook enkele individuen uit kweek 1A als hybride worden gezien en niet als zuiver afkomstig uit kweek, zowel op basis van de volledige dataset als op basis van de geselecteerde SNP's.

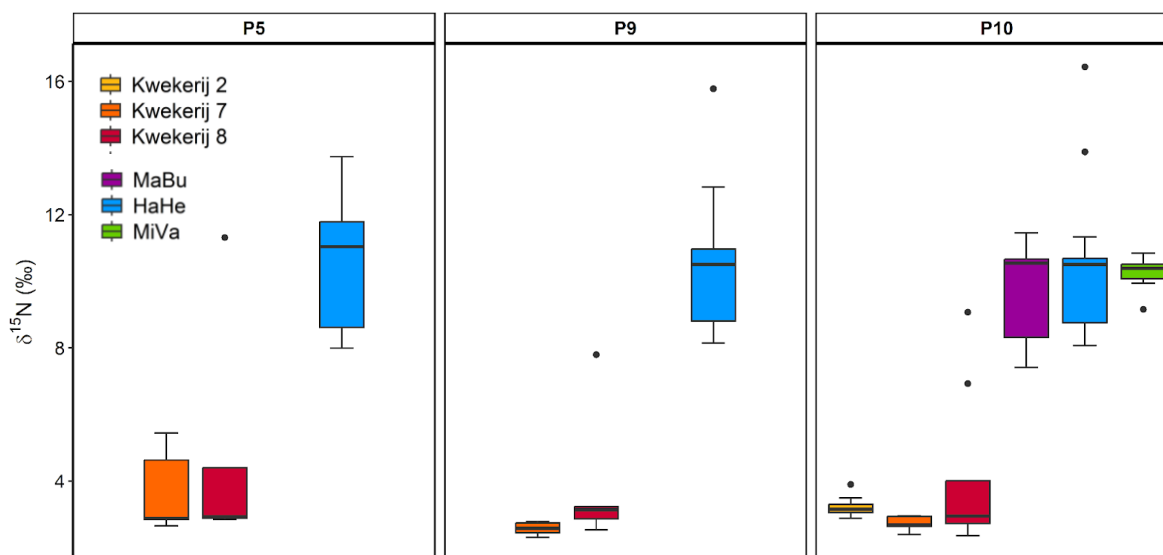


Figuur 4. Q-waarde berekend voor elk individu (weergegeven door één staaf) op basis van de volledige dataset (boven) en het finale SNP-panel van 204 SNP's (onder) met behulp van STRUCTURE software. Deze waarde geeft de *admixture* proportie van elk individu weer. STRUCTURE identificeerde voor elke dataset twee genetische clusters (geel = kweek, paars = wild). Een Q-waarde van meer dan 70% wordt geïnterpreteerd als een zuivere afstameling van de cluster.



6.2 STABIELE ISOTOPEN

Het isotopensignaal voor stikstof is sterk verschillend tussen de wilde groepen enerzijds en de kweekgroepen anderzijds ($F_{1,15} = 48,121$, $P < 0,001$; **Figuur 5, Tabel 4, Tabel 5**). De gemiddelde $\delta^{15}\text{N}$ -waarde voor alle kweekindividuen is 3,46‰ en voor alle wildvang individuen 10,28‰. Het type veer heeft geen invloed op het isotopensignaal ($F_{2,30} = 0,242$; $P = 0,786$).



Figuur 5. Boxplots voor het $\delta^{15}\text{N}$ (‰) per groep en per type handpen. MaBu = WBE Maxburg, HaHe = WBE De Harelbeek- en Heulebeekvallei, MiVa = WBE De Middenkustvallei.

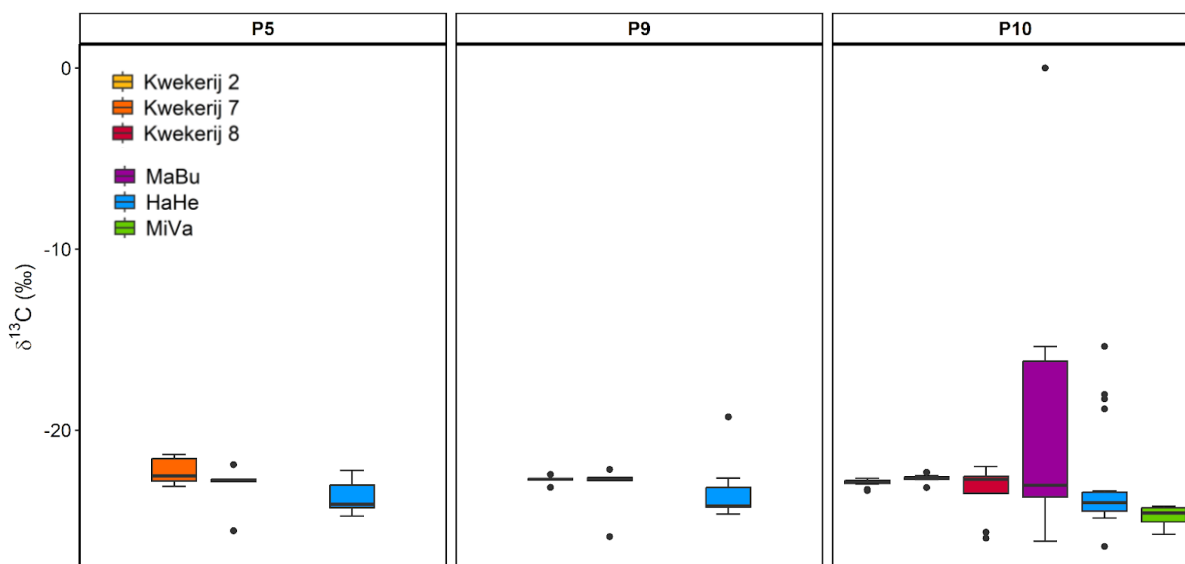
Tabel 4. Gemiddelde waarden en standaarddeviatie voor $\delta^{15}\text{N}$ (‰) per groep en per type veer.

Groep	P10	P9	P5
WBE De Middenkustvallei	10,26 ± 0,54	-	-
WBE De Harelbeek- en Heulebeekvallei	10,30 ± 2,07	10,74 ± 2,38	10,44 ± 2,10
WBE Maxburg	9,76 ± 1,44	-	-
Kwekerij 2	3,19 ± 0,25	-	-
Kwekerij 6	2,72 ± 0,21	2,57 ± 0,20	3,69 ± 1,27
Kwekerij 7	4,07 ± 2,51	3,91 ± 2,19	4,88 ± 3,66

Tabel 5. Resultaten (P-waarden) van de *posthoc* test voor het verschil in $\delta^{15}\text{N}$ (boven de diagonaal) en $\delta^{13}\text{C}$ (onder de diagonaal) tussen de verschillende groepen. Significante waarden zijn vetgedrukt.

	MiKu	HaHe	MaBu	Kweek 2	Kweek 7	Kweek 8
MiKu	-	1,000	0,987	< 0,001	< 0,001	< 0,001
HaHe	0,349	-	0,973	< 0,001	< 0,001	< 0,001
MaBu	0,001	0,046	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Kweek 2	0,316	1,000	0,073	-	0,994	0,715
Kweek 7	0,288	0,996	0,314	0,999	-	0,460
Kweek 8	0,710	0,999	0,066	0,997	0,975	-

Het isotopensignaal voor koolstof (**Figuur 6, Tabel 6**) verschilt tussen de verschillende groepen ($F_{5,66} = 3,837$; $P = 0,004$), maar niet tussen de verschillende handpennen ($F_{2,36} = 0,006$; $P = 0,994$). Dit verschil is voornamelijk gedreven door een significant verschil tussen de wilde individuen uit WBE Maxburg en de andere groepen (**Tabel 5**). Enkele wilde individuen uit WBE Maxburg en WBE De Harelbeek- en Heulebeekvallei hebben een hogere $\delta^{13}\text{C}$ (tussen $-19,27$ en $-15,02\%$) dan alle andere individuen en individuen uit dezelfde WBE's (tussen $-26,43$ en $-21,35\%$). Er is geen verschil tussen de wilde en de kweekgroepen.



Figuur 6. Boxplots voor $\delta^{13}\text{C}$ (‰) per groep en per type handen. MaBu = WBE Maxburg, HaHe = WBE De Harelbeek- en Heulebeekvallei, MiVa = WBE De Middenkustvallei.

Tabel 6. Gemiddelde waarden en standaarddeviatie voor $\delta^{13}\text{C}$ (‰) per groep en per type veer.

Groep	P10	P9	P5
WBE De Middenkustvallei	$-24,78 \pm 0,60$	-	-
WBE De Harelbeek- en Heulebeekvallei	$-22,91 \pm 2,94$	$-23,38 \pm 1,68$	$-23,72 \pm 0,89$
WBE Maxburg	$-20,60 \pm 4,27$	-	-
Kweek 2	$-22,89 \pm 0,18$	-	-
Kweek 6	$-22,67 \pm 0,24$	$-22,75 \pm 0,26$	$-22,27 \pm 0,78$
Kweek 7	$-23,35 \pm 1,54$	$-23,23 \pm 1,50$	$-23,16 \pm 1,39$

7 DISCUSSIE

Dit rapport had als doel om de mogelijkheden van zowel genetische monitoring als monitoring op basis van stabiele isotopen voor de identificatie van patrijzen afkomstig uit kweek te identificeren. Beide methodes lijken geschikt om het onderscheid te maken en kunnen complementair gebruikt worden. We bespreken hieronder in detail de mogelijkheden en resultaten (Deflem et al. 2021, Mergeay et al. 2022).

7.1 GENETISCHE MONITORING

Voor het bestuderen van de genetische structuur van patrijzen in Vlaanderen werd in een eerder onderzoek gebruikgemaakt van een *restriction site-associated DNA sequencing* (RAD-seq) protocol (Deflem et al. 2021). Deze methode laat toe om duizenden genetische varianten, SNP's, in het genoom te detecteren. Zulke methodes zijn echter niet geschikt om op een efficiënte, reproduceerbare en routinematige manier uitspraken te doen over de genetische samenstelling van individuen en populaties. GT-seq of *Genotyping-in-thousands by sequencing* daarentegen is een populaire tool die deze genetische variaties gericht kan opsporen en genotyperen, zoals aangetoond bij een groot aantal studies (vb. LaVerriere et al. 2022, Liu et al. 2016, Schmidt et al. 2020). De resultaten zijn betrouwbaar en robuust, zoals ook aangetoond door de kleine foutenmarge van de genotypes van de SNP's (gemiddelde = 3,67%) en door de toewijzingen die overeenkomen met deze op basis van genotypes bepaald bij de eerdere RAD-seq analyse. Bemerk dat een variatie in het genotype voor één of enkele SNP's voor een individu geen invloed heeft op de finale toewijzing. Bovendien is GT-seq zeer geschikt voor stalen waar de hoeveelheden DNA laag zijn en stalen waar de kwaliteit van het DNA minder is (vb. Setzke et al. 2021), zoals bijvoorbeeld het geval is bij haren en uitwerpselen (Campbell et al. 2015, Hayward et al. 2022). Dit wordt bevestigd door de 13 stalen, waarvan de genotypes niet succesvol bepaald kon worden door de RAD-seq methode, die wel op basis van de GT-seq methode geanalyseerd konden worden.

Van de 30.000 SNP's die eerder geïdentificeerd werden, selecteerden we 500 SNP's voor panel ontwikkeling. Ondanks een uitval van meer dan de helft van de geselecteerde SNP's, kon er op basis van het finale panel van 204 SNP's nog steeds een duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen wilde patrijzen en patrijzen afkomstig uit kweek. Slechts 1,7% van de individuen kreeg op basis van dit finale panel een andere toewijzing. De individuen die een andere toewijzing kregen, waren telkens afkomstig uit Oost-Brabant en waren individuen met Q-waarden die net wel of net niet tot één van de drie groepen (zuiver kweek, zuiver wild of hybride) behoorden. Bovendien zijn de verschillen tussen de wilde populaties, die eerder wel aangetoond konden worden, niet meer zichtbaar. Dit kan op twee manieren verklaard worden. Om te beginnen hebben we geselecteerd op genetische varianten die duidelijk het onderscheid maken tussen wild en kweek. Hiernaast bleef er minder informatie behouden, aangezien er van de 30.000 SNP's slechts 204 overbleven in het finale panel. Dit verklaart dan ook waarom er subtiele verschillen zijn in Q-waarde, die door harde grenzen soms zorgen voor een andere toewijzing.

7.2 STABIELE ISOTOPEN

Op basis van het verschil in de verhouding tussen de zwaardere en lichtere vorm van stikstof ($\delta^{15}\text{N}$) kan een duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen de individuen afkomstig uit de drie kwekerijen en de wilde individuen. Hoe groter deze verhouding, hoe hoger het trofische niveau en dus de plaats in de voedselketen van dat specifieke individu. Patrijzenkuikens die opgroeien onder kweekomstandigheden krijgen voornamelijk plantaardig materiaal als voedsel. Wilde kuikens daarentegen zijn tijdens de eerste weken (bijna) volledig toegewezen op wilde insecten als voedselbron. Het aandeel plantaardig materiaal dat tijdens de eerste weken geconsumeerd wordt, is zeer beperkt (Bro 2016). Wilde volwassen dieren eten zowel plantaardig als dierlijk materiaal. We verwachtten dat dit verschil in dieet weerspiegeld wordt in een duidelijk verschil tussen de isotopensignaturen van kweekindividuen, die recent zijn uitgezet, en wilde patrijzen. Eventueel kan in kwekerijen speciale voeding gegeven worden die verrijkt is met eiwitten, maar we verwachten dat het verschil met een bijna volledig dierlijk dieet van wilde kuikens nog steeds zichtbaar zal zijn. Het isotopensignaal voor stikstof is bij de wilde individuen tot driemaal hoger dan bij gekweekte individuen (gemiddelden van respectievelijk 10,28 en 3,46‰), wat dus wijst op een hogere plaats in de voedselketen (omnivoor/insectivoor versus herbivoor).

Dit isotopensignaal verschilde niet tussen de verschillende veren (handpennen P5, P9 en P10). De gekweekte patrijzen in deze studie hebben tot het moment van de staalname nagenoeg plantaardig materiaal gekregen, dus werd er weinig tot geen verschil verwacht tussen de verschillende handpennen. Bij wilde patrijzen verwachtten we een groter verschil, aangezien het dieet doorgaans verschuift van volledig insectivoor naar omnivoor tijdens de eerste levensmaanden. Handpennen P9 en P10 worden niet gewisseld tijdens de postjuvenile rui en reflecteren dus het meer insectivore dieet tijdens de eerste week. Handpen P5 wordt al tijdens de zomer (na een tweetal maanden) gewisseld, wanneer we een groter aandeel aan plantaardig materiaal verwachten, en dus ook een lager verhouding in $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Door de beperkte staalname, met name in de beide leeftijdsklassen, zijn deze resultaten echter te onzeker om conclusies rond een dieetshift te maken. Het belangrijkste besluit is dat het verschil in isotopensignaal tussen wilde en gekweekte individuen groter is dan eventuele verschillen tussen handpennen van hetzelfde individu. Hierbij merken we op dat voor deze studie de individuen ofwel in het wild voorkwamen ofwel opgekweekt werden. Hierdoor werd er geen groot verschil verwacht in P5 en de buitenste handpennen P9 en P10. Wanneer gekweekte dieren, geboren in datzelfde kalenderjaar, uitgezet worden in de zomer en geschoten worden in het najaar, wordt wel een verschil verwacht tussen de twee buitenste handpennen (die niet gewisseld werden in deze periode) en de overige handpennen, die mogelijks wel in het wild gewisseld werden. Vandaar dat enkel de twee buitenste handpennen geschikt zijn voor het identificeren van uitgezette dieren in de vrije wildbaan.

De variatie in $\delta^{15}\text{N}$ is tussen en binnen de kweekgroepen minimaal, doordat alle individuen nagenoeg hetzelfde plantaardige materiaal consumeren. Met uitzondering van één individu dat een gelijkaardige waarde heeft als dat van de wilde individuen. Dit staal was afkomstig van een commerciële leverancier van patrijzenvleugels die grotendeels gebruikmaakt van gekweekte patrijzen, maar occasioneel ook vleugels van wild geschoten dieren levert. Dit staal betreft dan

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

ook mogelijks een individu dat in het wild gevangen werd. Een grotere variatie in het isotopensignaal wordt geobserveerd tussen en binnen de wilde groepen. Dit is waarschijnlijk het gevolg van een verschil aan gebruikte voedselbronnen bij wilde individuen, door de grotere variatie aanwezig in het wild (Jensen et al. 2012).

In tegenstelling tot het stikstofsignaal, verschilt de verhouding $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ niet tussen wilde en gekweekte individuen en niet tussen de verschillende handpennen. Deze verhouding weerspiegelt de gebruikte koolstofbron aan het begin van de voedselketen. We zien wel een verschil tussen de wilde groepen, waarbij voornamelijk volwassen individuen van WBE Maxburg, maar ook uit WBE De Harelbeek- en Heulebeekvallei een hogere verhouding $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ vertonen. Door het ontbreken van een verschil tussen wilde en gekweekte individuen is het koolstofsignaal zoals verwacht niet bruikbaar voor de toekomstige monitoring voor de detectie van uitgezette gekweekte individuen.

7.3 VOOR- EN NADELEN VAN BEIDE METHODES

Beide methodes kunnen complementair gebruikt worden en hebben elk specifieke voor- en nadelen. Genetische monitoring kan, onafhankelijk van het tijdstip, individuen met een kweekherkomst detecteren, maar kan geen uitsluitel geven over het exacte tijdstip en kan niet uitsluiten dat een patrijs een nakomeling is van twee eerder uitgezette individuen. Een uitgebreide genetische monitoring kan wel een beter algemeen beeld schetsen over historische uitzettingen en het aandeel hybriden in de totale patrijzenpopulatie. Op basis van eerdere genetische monitoring detecteerden we de aanwezigheid van individuen afkomstig uit kweek in elke provincie, met uitzondering van de provincie Antwerpen. Dit onderzoek was gebaseerd op vrijwillige medewerking en geeft dus geen beeld over het effectief aandeel patrijzen afkomstig uit kweek dat in het wild aanwezig is.

Ondanks de hoge accuraatheid is er op basis van het SNP-panel toch een kleine onzekerheid rond de toewijzing, vnl. bij individuen uit Oost-Brabant. Isotopenanalyses zouden uitsluitel kunnen geven over de herkomst van deze twijfelgevallen (recent uitgezet of niet). Verder kunnen genetische analyses wild gevangen individuen (of eieren) die elders gekweekt werden of verplaatste individuen niet opsporen. Tenslotte vereist het uitvoeren van de genetische monitoring, zowel in het labo als tijdens de verdere verwerking, meer tijd en specifieke kennis. Hiernaast kunnen de analyses pas uitgevoerd worden bij een bepaald minimum aan stalen.

Isotopenanalyses zijn over het algemeen eenvoudiger, sneller en goedkoper en vereisen geen moleculair getrainde laborant of verdere verwerking door een expert. Voor een klein aantal stalen kunnen de analyses binnen een dag uitgevoerd en verwerkt worden. Bovendien lijkt het onderscheid tussen wilde en gekweekte individuen zeer duidelijk, waardoor er geen ruimte is voor misinterpretatie of discussie. Met behulp van isotopenanalyses kunnen we enkel de individuen detecteren die zeer recent werden uitgezet, aangezien gekweekte individuen die een jaar na uitzetting geschoten worden in tussentijd dezelfde voedselbronnen gebruikten als wilde patrijzen en hun verenkleed volledig gewisseld hebben. Dit hoeft in het algemeen geen



probleem te zijn aangezien aangekochte patrijzen geboren zijn in datzelfde kalenderjaar en worden uitgezet voor de start van het jachtseizoen. Bovendien is dat de kans op overleving van patrijzen met een kweekherkomst zeer laag is (zie Mergeay et al. 2022 voor verdere informatie).



Referenties

- Andrews K.R., Good J.M., Miller M.R., Luikart G. & Hohenlohe P.A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2): 81–92.
- Angelov E., Gruychev G. & Stoyanov S. (2019). Do hand reared grey partridges (*Perdix perdix* L., 1758) survive after releasing in upland habitats of Western Bulgaria? *Forestry Ideas*, 25: 385–393.
- Bearhop S., Waldron S., Votier S.C. & Furness R.W. (2002). Factors that influence assimilation rates and fractionation of nitrogen and carbon stable isotopes in avian blood and feathers. *Physiological and Biochemical Zoology*, 75(5):451–458.
- BirdLife International (2017). *European birds of conservation concern: populations, trends and national responsibilities*. Cambridge, UK.
- Bro E. (2016). *La Perdrix grise. Biologie, écologie, gestion et conservation*. Mèze, France: Biotope.
- Buner F. (2009). How to re-introduce gray partridges - conclusions from a releasing project in Switzerland. Pages 391 - 395 in Cederbaum SB, Faircloth BC, Terhune TM, Thompson JJ, Carroll JP, eds. *Gamebird 2006: Quail VI and Perdix XII*. 31 May - 4 June 2006. Warnell School of Forestry and Natural Resources, Athens, GA, USA.
- Buner F., Browne S. & Aebischer N.J. (2011). Experimental assessment of release methods for the reestablishment of a red-listed galliform, the grey partridge (*Perdix perdix*). *Biological Conservation*, 144 (1): 593–601.
- Campbell N.R., Harmon S.A. & Narum S.R. (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.
- Deflem I., Mouton C., De Regge N., Van Breusegem A., Neyrinck S. & Mergeay J. (2021). Genetische structuur en herkomst van patrijs (*Perdix perdix*) in Vlaanderen. *Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2021 (57)*. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. doi.org/10.21436/inbor.62125143.
- Falush D., Stephens M. & Pritchard J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular ecology notes*, 7(4), 574–578.
- Gosselin T. (2020). radiator: RADseq Data Exploration, Manipulation and Visualization using R. R package version 1.2.2.
- Hobson K.A. & Wassenaar L.I. (2018). *Tracking animal migration with stable isotopes*. Academic Press.
- Homberger B., Jenni L., Duplain J., Lanz M. & Schaub M. (2021). Strong effects of radio-tags, social group and release date on survival of reintroduced grey partridges. *Animal Conservation*.
- Inger R. & Bearhop S. (2008). Applications of stable isotope analyses to avian ecology. *Ibis*, 150(3): 447–461.
- Jensen P.M., Madsen P., Jensen L.S. & Pipper C. B. (2012). *European Journal of Wildlife Research*, 58(4): 755–760.

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.

Kuijper D.P.J., Oosterveld E. & Wymenga E. (2009). Decline and potential recovery of the European grey partridge (*Perdix perdix*) population—a review. *European Journal of Wildlife Research*, 55 (5): 455–463.

LaVerriere E., Schwabl P., Carrasquilla M., Taylor A.R., Johnson Z.M., Shieh M., ... & Neafsey D.E. (2022). Design and implementation of multiplexed amplicon sequencing panels to serve genomic epidemiology of infectious disease: a malaria case study. *Molecular Ecology Resources*.

Liu S., Palt, Y., Gao G. & Rexroad III C.E. (2016). Development and validation of a SNP panel for parentage assignment in rainbow trout. *Aquaculture*, 452: 178–182.

McGowan P.J. & Kirwan G.M. (2013). Grey partridge (*Perdix perdix*). In: del Hoyo J., Elliott A., Sargatal J., Christie D.A. & de Juana E. (eds.). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona.

Mergeay J., Scheppers T., Deflem I. & Mouton C. (2022). Advies over de detectie vanuitsetting van patrijs op basis van genetische analyse (Adviezen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek; nr. INBO.A.4407). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

Onkelinx T., Vermeersch G. & Devos K. (2021). Patrijs. In: Trends op basis van de Algemene Broedvogelmonitoring Vlaanderen (ABV). Technisch achtergrondrapport voor de periode 2007-2020. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2021 (14). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. <https://doi.org/10.21436/inbor.34162521>.

Pinheiro J., Bates D. & R Core Team (2022). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-161.

Post D.M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83(3): 703–718.

Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Rymešová D., Tomášek O. & Šálek M. (2013). Differences in mortality rates, dispersal distances and breeding success of commercially reared and wild grey partridges in the Czech agricultural landscape. *European Journal of Wildlife Research*, 59: 147–158.

Schauvliege M. & De Bruyn P. (2020). Verslag van de hoorzitting namens de Commissie voor Leefmilieu, Natuur, Ruimtelijke Ordening en Energie: over het voorstel van decreet tot wijziging van het Jachtdecreet van 24 juli 1991, wat de schrapping van de patrijs als bejaagbare soort betreft. Vlaams Parlement.

Schmidt D.A., Campbell N.R., Govindarajulu P., Larsen K.W. & Russello M.A. (2020). Genotyping-in-Thousands by sequencing (GT-seq) panel development and application to minimally invasive DNA samples to support studies in molecular ecology. *Molecular Ecology Resources*, 20(1): 114–124.



Setzke C., Wong C. & Russello M.A. (2021). Genotyping-in-Thousands by sequencing of archival fish scales reveals maintenance of genetic variation following a severe demographic contraction in kokanee salmon. *Scientific reports*, 11(1): 1–10.

Southwood T.R.E. & Cross D.J. (1969). The Ecology of the Partridge: III. Breeding success and the abundance of insects in natural habitats. *Journal of Animal Ecology*, 38 (3): 497–509.

Vermeersch G., Onkelinx T. & Driessens G. (2021). Resultaten van het project Algemene Broedvogels Vlaanderen (ABV) tot en met 2020. In: *INBO Vogelnieuws*, 34: 25–29.

Wiley A.E., Ostrom P.H., Stricker C.A., James H.F. & Gandhi H. (2010). Isotopic characterization of flight feathers in two pelagic seabirds: sampling strategies for ecological studies. *Condor*, 112(2):337–346.

