

## Vaderschapsanalyse bij eik: eikenstuifmeel komt van ver

**Eiken in de stad geven de voorkeur aan stuifmeel van vaders die ver van ze verwijderd staan. Eiken in een naaldbos zien ook meer in de vaders van ver weg. Toeval of ingenieus systeem om de variatie in het nageslacht zo hoog mogelijk te houden?**

Dat vroegen wij ons af toen wij de eerste resultaten van ons onderzoek zagen. Het onderzoek was eigenlijk niet bedoeld om het vaderschap van eiken te analyseren. We gingen er namelijk van uit dat de eiken in het geïsoleerd staande groepje zomereiken, dat wij hadden geselecteerd in Amsterdam, elkaar onderling zouden bevruchten. Diezelfde hoop hadden wij voor twee bomen die zich bevinden op een fort (zandheuvel) in een stuifzandgebied waarin hoofdzakelijk naaldbomen staan. De bomen werden geselecteerd

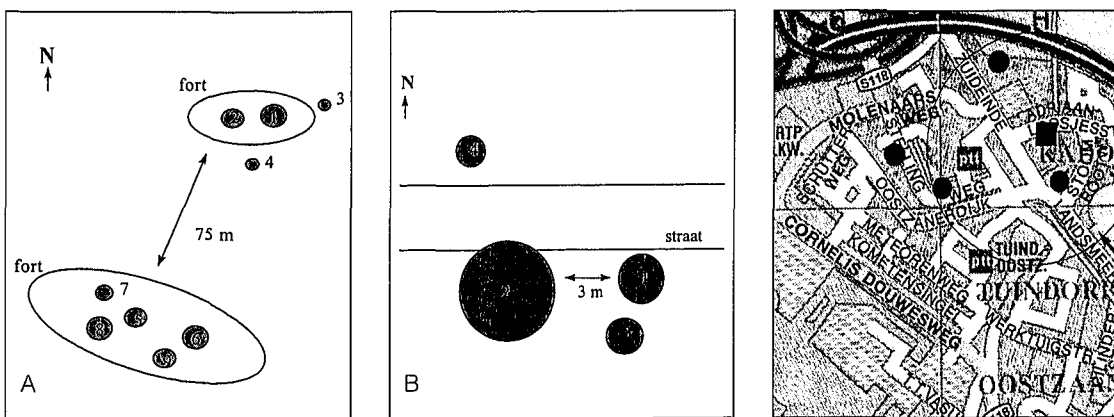
om voor een nakomelingschap te zorgen waarvan wij zowel de moederboom als de vaderboom zouden kennen. Zo'n nakomelingschap hebben wij nodig om de chromosomen van eik in kaart te kunnen brengen. Op deze kaart willen wij bepaalde eigenschappen markeren, zodat we in de toekomst ecologische processen kunnen bestuderen. Eiken zijn éénhuizig, dat wil zeggen aan een boom worden zowel mannelijke als vrouwelijke bloeiwijzen gevormd. Zelfbevruchting komt echter niet voor, eiken zijn strikte kruisbestuivers (Ducousso et al., 1993). 1998 was een mastjaar voor eiken en de bomen hingen dan ook vol eikels. Honderden eikels konden wij oogsten van de beoogde moederbomen! Voor het uitzaaien wilden wij controleren of er voldoende nakomelingen van de twee bomen waren. Wij hadden natuurlijk wel rekening gehouden met de bemoeienis van de andere bomen.

### Beschrijving locaties

In Amsterdam staan de bomen aan een straat in een woonwijk. Vlak naast de ouderbomen staan twee andere eiken. De eiken zijn volledig omringd door huizen met verderop een enkele eik. Met de term "ouderbomen" bedoelen wij de twee eiken die wij hebben uitgekozen om te dienen als ouders van het nakomelingschap dat wij willen gaan bestuderen.

Het Leuvenumse bos is een voormalige zandverstuiving die begroeid is met naaldbomen, op de forten kunnen eiken zich vestigen door de humeuze bosgrond die zich vlak onder het zand bevindt. De locatie in het Leuvenumse bos is een fort met daarop twee eiken, vlak in de buurt (tot 10 meter) staan nog twee jonge vruchtdragende eiken (buurbomen 1 en 2) en een eindje verderop (ongeveer 75 meter) staat een groepje grotere eiken (buurbomen 3 tot en met 7).

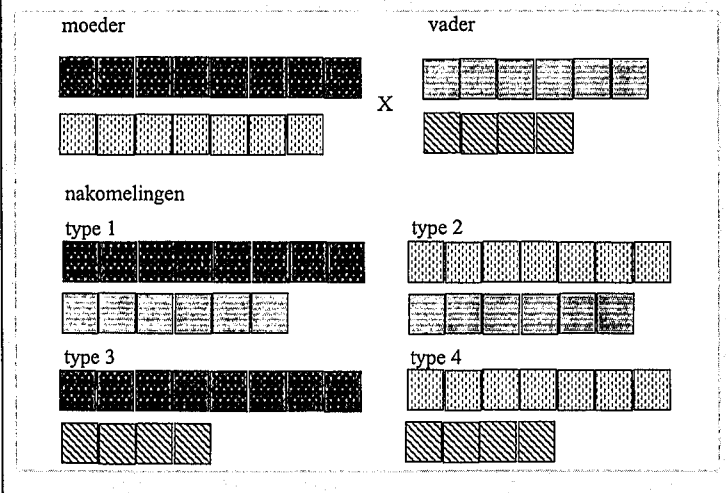
In figuur 1 is een situatieschets



*Figuur 1. Situatieschets van de locatie van de ouderbomen (nr. 1 is de moederboom, nr. 2 de vaderboom) en buurbomen in A. Leuvenumse bos en B. Amsterdam. De grootte van de eiken is gerelateerd aan een variërende cirkeldiameter. C. Amsterdam. Op de plattegrond van het gebied rondom de moederboom (aangeduid met een zwart blokje) staan met zwarte stippen de eiken die gevonden zijn binnen een straal van 100 meter. De positie van het noorden is in alle drie de figuren hetzelfde.*

### Kader 1. Mendeliaanse overerving van DNA-merkers

De wetten van Mendel voorspellen bij een bekende vader en moeder hoe de genetische eigenschappen van de nakomelingen eruit komen te zien. Dit is mogelijk omdat nakomelingen altijd voor de ene helft hun genetische informatie van de moeder krijgen en voor de andere helft van de vader. Bij de productie van eicel en stuifmeelcel wordt de totale hoeveelheid genetische informatie tot de helft gereduceerd. Dit is mogelijk omdat elke genetische code in duplo aanwezig is in een organisme. Bij bevruchting van de eicel door de stuifmeelcel, voegen beide helften van genetische informatie zich samen. Iedere combinatie heeft evenveel kans. Dit gebeurt dus ook voor de stukjes DNA van de DNA-merkers. In de onderstaande figuur staat afgebeeld hoe de verschillende stukjes DNA (van een DNA-merker) van de vader en de moeder kunnen overerven naar de nakomelingen. Elke nakomeling heeft een even grote kans op één van beide moederlijke en één van beide vaderlijke stukjes DNA. Voor de moeder en de vader is dezelfde DNA-merker afgebeeld, maar je ziet dat de stukjes DNA van een verschillende grootte zijn. De moeder heeft stukjes DNA met lengte: 8 eenheden en 7 eenheden; de vader heeft stukjes DNA met lengte: 6 eenheden en 4 eenheden. Het nakomelingschap bestaat uit vier verschillende combinaties van van deze stukjes DNA, elk met een gelijke kans van 25%.



weergegeven van de locaties van de ouderbomen en de buurbomen in Amsterdam en in het Leuvenumse bos.

### Materiaal en methode

DNA werd geïsoleerd uit de worteltopjes die zich in de eikels bevinden. Van de moederboom uit Amsterdam werden 67 eikels onderzocht, van de moederboom uit het Leuvenumse bos waren dat er 60. Voor het DNA onderzoek van de ouder- en buurbomen werden stukjes blad gebruikt.

De ouderbomen, de buurbomen en de nakomelingen werden gekarakteriseerd met behulp van zogenaamde DNA-merkers. DNA-merkers laten stukjes van het DNA van de betreffende eik zien. Elke eik heeft per merker twee stukjes DNA: een stukje van de moeder en een stukje van de vader. Omdat de stukjes in grootte verschillen, kan je heel simpel vaststellen welke eiken de vader en de moeder van een bepaalde eik zijn (kader 1).

De naam van deze DNA-merker

is microsatelliet-merker. Wij beschikken over 6 van deze microsatelliet-merkers, die ieder op een ander chromosoom liggen. Drie van deze merkers hebben wij gebruikt voor onze controle van het nakomelingschap.

Deze merkers zijn beschreven door Dow et al. (1995) en Steinkellner et al. (1997; zie voor verdere uitleg over DNA-merkers: Van Dam en De Vries, 1998).

### Resultaten

#### Ouderschapsanalyse

De ouderbomen en de twee buurbomen uit Amsterdam bleken erg op elkaar te lijken. Dit konden we afleiden uit het feit dat voor bijna iedere DNA-merker de stukjes DNA van de ouderbomen en de buurbomen even groot waren. Het geringe verschil tussen de bomen in Amsterdam zou kunnen berusten op een hoge mate van verwantschap. Aangezien we maar drie DNA merkers hebben bestudeerd, kan dit niet met zekerheid worden gezegd. De DNA-merkers van de ouderbomen en de buurbomen uit het Leuvenumse bos vertonen minder stukjes DNA van dezelfde grootte; deze eiken lijken minder op elkaar.

Met behulp van de DNA-merker gegevens van de ouders en de buurbomen werd van de nakomelingschap van de moederbomen bepaald van welke bomen de vaderlijke stukjes DNA afkomstig waren. Als een individu stukjes DNA bezat die niet van de vaderboom of de buurbomen afkomstig waren, dan werd hij aangemerkt als kruisingsproduct van de moederboom met pollen van een boom die ver verwijderd staat (buiten de straal van 100 meter). Voor beide situaties werd dit uitgezocht en de resultaten staan weergegeven in figuur 2. Voor beide situaties geldt dat de meeste nakomelingen afkomstig zijn van "verre" vaderbomen. In

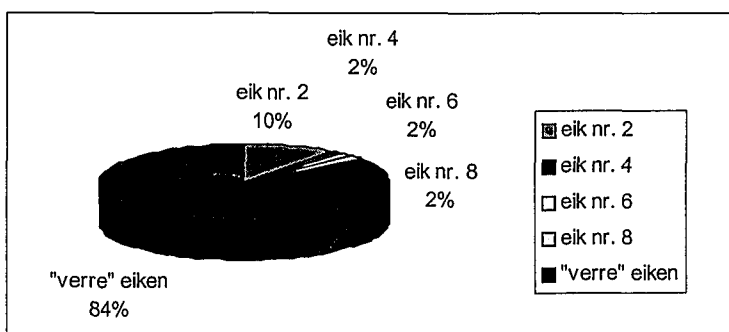
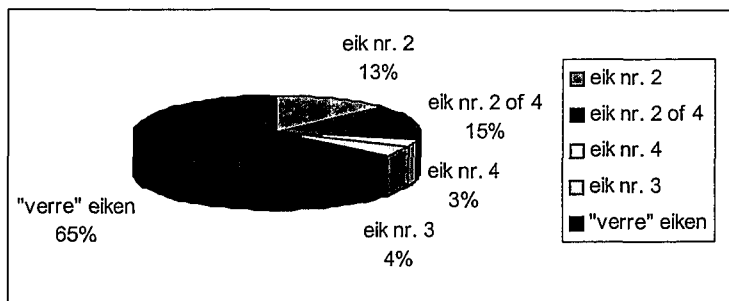


Fig. 2. Het aandeel van verschillende vaderbomen in het nakomelingschap. A. Nakomelingen van de moederboom uit Amsterdam. B. Nakomelingen van de moederboom uit het Leuvenumse bos.

## Discussie en conclusies

Uit dit onderzoek blijkt dat het grootste deel van de nakomelingen van een eik een "verre" vader heeft. Slechts een laag percentage van het nakomelingschap heeft als vader een eik die naast de moederboom staat. Blijkbaar hebben eiken die naast elkaar staan geen hogere kans om elkaar te bevruchten. Er moet dus gekeken worden naar andere factoren die mogelijk een rol spelen. Hieronder volgen een aantal van deze factoren; aangezien er weinig bekend is over dit onderwerp zal de lijst hoogst waarschijnlijk onvolledig zijn.

**Verschil in bloeitijdstip.** Het is bekend dat niet alle eiken op hetzelfde moment in bloei staan, daarbij moet nog worden opgemerkt dat eerst de mannelijke bloeiwijzen bloeien gevolgd door de vrouwelijke bloemen. Het is dus mogelijk dat als de vrouwelijke bloemen van de moederboom bloeien, de bomen die dichtbij staan al uitgebloeid zijn of nog moeten bloeien. In dat geval zal het pollen met de wind worden meegevoerd van bomen waarvan de mannelijke bloemen wel bloeien (Ducouso et al., 1993). Een ander punt is dat binnen eenzelfde boom de onderste takken het eerste bloeien, gevolgd door de hogere takken in de boom. In dat geval moet er rekening gehouden worden met het oogsten van de eikels, aangezien de onderste takken door andere vaders kunnen zijn bestoven dan de bovenste takken.

**Inteelt.** In de natuur bestaan verschillende mechanismen om inteelt te voorkomen. Het op verschillende tijden bloeien van

Amsterdam is het percentage nakomelingen uit kruisingen met "verre" vaders lager dan in het Leuvenumse bos. Daar staat dan ook tegenover dat in Amsterdam het percentage kruisingen met de buurbomen hoger ligt.

## Inteelt analyse

Het grootste deel van de nakomelingen is bevrucht met pollen van verwijderd staande eiken. Dit resulteert in een bijdrage van veel vaders aan het nakomelingschap. Het is dus niet het geval dat de eik die naast de moederboom staat, de vader is van alle nakomelingen. We zouden nu graag willen weten of dit iets te maken heeft met een mechanisme dat de variatie in het nageslacht zo hoog mogelijk houdt. Door de genetische variatie van de nakomelingschappen te bepalen kunnen wij hierover meer inzicht krijgen. Genetische variatie kan berekend worden met behulp van DNA-merkers.

De genetische variatie van een nakomelingschap afkomstig van

één moeder en veel vaders wordt vergeleken met de genetische variatie van een nakomelingschap met één moeder en één vader. De genetische variatie van het eerste nakomelingschap is naar verwachting hoger: de verschillende vaders dragen veel variatie bij aan het nakomelingschap omdat al die vaders verschillend zijn. De uitkomst van de berekening kwam overeen met de verwachtingen. De genetische variatie van een nakomelingschap met veel vaders is hoger dan de genetische variatie van een nakomelingschap met maar één vader. Dit werd vastgesteld voor zowel het nakomelingschap uit het Leuvenumse bos als het nakomelingschap uit Amsterdam.

Het mechanisme van de eik dat stuifmeel van "verre" eiken selecteert, zorgt ervoor dat er veel vaders zullen deelnemen aan de bevruchting van de moederboom. Hierdoor blijft de genetische variatie van het nakomelingschap op peil en wordt inteelt voorkomen.

mannelijke en vrouwelijke bloemen is daar één van. Een ander mechanisme is incompatibiliteit. Incompatibiliteit is een interactie tussen stamper en pollen: het moederlijke weefsel vertoont een acceptatie of afstoting van pollen. De moederplant zal alleen dat stuifmeel accepteren dat voldoet aan bepaalde eisen die in de genetische code van de moederplant staan. Vooral onverwant pollen zal worden opgenomen door het stempelweefsel, omdat tijdens de evolutie van de eik geselecteerd is tegen inteelt (dit is uitgezocht voor steeneik (*Quercus ilex*): (Yacine en Bouras, 1997). Deze hypothese houdt in dat verwante bomen slechter kruisen dan onverwante bomen. Bomen die bij elkaar staan in de stad kunnen allemaal afkomstig zijn uit dezelfde bulk eikels geoogst van één boom. Dus bomen die dicht bij elkaar staan in de stad hebben een hogere kans om verwant aan elkaar te zijn dan bomen die ver van elkaar verwijderd staan. In het bos geldt hetzelfde: de meeste eikels worden verspreid door Vlaamse gaaien. Een Vlaamse gaai kan meerdere eikels in zijn bek nemen en het is zeer waarschijnlijk dat hij ze verzamelt van dezelfde boom. Als de Vlaamse gaai de eikels vervolgens ergens gaat begraven, zullen er dus groepjes verwante eiken uit groeien.

**Windrichting.** In Nederland is de heersende windrichting noordwest, dat houdt in dat het eikenpollen in zuid-oost richting wordt meegevoerd. Voor eiken die dichtbij elkaar staan zal de windrichting niet uitmaken, door de takken zullen er luchtverwelingen ontstaan die zorgen voor een pollenwolk rondom de boom. Maar voor bomen die een eindje verderop staan geldt dit wel.

**Weersomstandigheden.** Bij koel en droog weer is de levensduur van de mannelijke en vrouwelijke

bloemen het langst, dit betekent dat ze ook de meeste gelegenheid hebben om elkaar te bestuiven. Bij nat weer kan het pollen niet vrijkomen en kan er geen bestuiving optreden. Bij warm weer hebben de bloemen een korte levensduur en is de bestuivingsperiode erg kort. De weersomstandigheden bepalen dus wanneer en hoe lang de vrouwelijke bloemen van de moederboom receptief zijn (Cecich, 1997). Bij koel weer hebben meer bomen de kans om de vrouwelijke bloemen aan de moederboom te bestuiven. Bij warm weer echter kan het zijn dat de vrouwelijke bloemen precies één dag receptief zijn en dat op die dag misschien alleen maar één andere boom rijp pollen loslaat. Dit laatste geldt ook voor nat weer: de vrouwelijke bloemen kunnen onbevruucht uitbloeien als al het pollen vastgeplakt zit in de vochtige mannelijke bloemen. Als de vochtigheid afneemt na een regenrijke periode, zullen alleen de laatbloeiende eiken en misschien nog de bovenste takken van de vroeg bloeiende eiken bevrucht worden.

**Omvang boom.** Grote bomen zullen meer pollen produceren dan kleine bomen. Dus als de bomen die dichtbij staan veel kleiner zijn ten opzichte van de bomen die ver weg staan, hebben de bomen ver weg meer kans tot bestuiving. Wat het mechanisme ook moge zijn, het staat vast dat de meeste vaders van ver komen en dat dit een positief effect heeft op de genetische variatie in het nakomelingschap. Hetzelfde is gevonden binnen eikenbossen door Dow en Ashley (1998; *Quercus macrocarpa*, een eik die in Amerika voorkomt) en Streiff et al. (*in press*; *Quercus robur* en *Q. petraea*, zomereik en wintereik in Frankrijk). De hier gepresenteerde resultaten zijn gebaseerd op de eikel-oogst van één jaar. Een aantal

van bovengenoemde factoren kan tussen verschillende jaren variëren, wat betekent dat ook de bijdrage van de verschillende vaders kan variëren tussen jaren. Op het moment zijn we bezig met ouderschapsanalyse van een aantal bomen in een eikenpopulatie in "De Meinweg". Dit zal resulteren tot meer inzicht in de ouderschap binnen eikenpopulaties.

## Literatuur

- Cecich, R.A., 1997: The continuum between flowers and acorns. Proceedings of the meeting "Diversity and adaptation in oak species". Pennsylvania 12-17 October 1997.
- Dam, B. van, Vries, S. de, 1998: In de voetsporen van de eik, post-glaciale herkolonisatie-routes. De Levende Natuur 99(1): 38-41.
- Dow, B.D., Ashley, M.V., Howe, H.F., 1995: Characterization of highly variable (GA/CT)<sub>n</sub> microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. Theor Appl Genet 91: 137-141.
- Dow, B.D., Ashley, M.V., 1998: High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. Journal of Heredity 89: 62-70.
- Ducousso, A., Michaud, H., Lumaret, R., 1993: Reproduction and gene flow in the genus *Quercus* L. Ann Sci For 50, Suppl 1: 91s-106s.
- Steinkellner, H., Fluch, S., Turetschek, E., Lexer, C., Streiff, R., Kremer, A., Burg, K., Glössl, J., 1997: Identification and characterization of (GA/CT)<sub>n</sub> - microsatellite loci from *Quercus petraea*. Plant Molecular Biology 33: 1093-1096.
- Streiff, R., Ducousso, A., Lexer, C., Steinkellner, H., Glössl, J., Kremer, A., *in press*: Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.
- Yacine, A., Bouras, F., 1997: Self- and cross-pollination effects on pollen tube growth and seed set in hom oak *Quercus ilex* L. (Fagaceae). Ann Sci For 54: 447-462.

Voor meer informatie over dit onderwerp kunt u zich richten tot: Erica Bakker, IBN-DLO, Postbus 23, 6700 AA Wageningen Tel.: 0317-477839, E-mail: e.g.bakker@ibn.dlo.nl