

Invloed van de bosbouwpraktijk op de genetische samenstelling van eikenbossen

Eiken, maar ook veel andere boomsoorten, overleefden de laatste ijstijd in Zuid-Europa en de Balkan. Tijdens het verblijf in deze refugia traden veranderingen op in het DNA. Deze veranderingen in het DNA worden mutaties genoemd. Op basis van mutaties in het DNA dat in de bladgroenkorrels (= chloroplasten) zit kunnen zgn. haplotypen worden onderscheiden. Aangezien het chloroplast DNA van eiken uitsluitend via de moederlijke lijn overerft, hebben alle nakomelingen van een boom hetzelfde chloroplast DNA en behoren daardoor tot hetzelfde haplotype.

Na de laatste ijstijd migreerden de eiken weer naar het noorden van Europa en tijdens dit proces werden eikels incidenteel over grote afstand verplaatst. De boom die uit deze eikel groeide was de stichter (Eng. founder) van een lokale populatie die allemaal dezelfde chloroplast DNA en dus een zelfde haplotype hadden. Dit zgn. founder effect verklaart waarom in een natuurlijk bosgebied alle eikenbomen tot hetzelfde haplotype behoren. Hierdoor kan uit de huidige verspreiding van de haplotypen over Europa een beeld worden verkregen van de migratie-routes na de laatste ijstijd. Onder volledig natuurlijke omstandigheden komen in een eikenbos slechts bomen van één haplotype voor (Dumolin-Lapègue et al., 1997; Petit et al., 1996). Dit betekent dat alle eiken

in een natuurlijk bos één gemeenschappelijke vrouwelijke voorouder hebben.

Alhoewel natuurlijke populaties van eiken zeldzaam zijn, wordt ook in Nederland in de laatste restanten oorspronkelijk eikenbos toch vaak nog één haplotype aangetroffen (Van Dam en De Vries, 1998). In het noordwesten van Nederland worden vooral haplotypen van de Spaanse lijn gevonden en in het zuidoosten wordt de Italiaanse lijn gevonden. Het gaat dan dus om nakomelingen van bomen die tijdens de ijstijd aanwezig waren in de bekende refugia in Zuid Spanje en Italië. Dit duidt erop dat in Nederland de Italiaanse en Spaanse migratieroutes samen komen. Echter, vrijwel al het Nederlandse eikenbos is aangeplant. Soms is hierbij gebruik gemaakt van lokaal uitgangsmateriaal maar vaak is materiaal uit West-Duitsland en Oost-Europa gebruikt. Eiken uit deze herkomstgebieden hebben een betere vorm en groeien sneller dan de Nederlandse eiken. Daarnaast neemt vooral door de natuurlijke ontwikkelingen in de grove dennenbossen het aandeel spontaan gevestigde eiken in het Nederlandse bos toe. De herkomst van deze eiken is meestal onbekend. Hebben deze verschillen in aanleg en ontwikkeling van de eikenbossen een grote invloed op de genetische samenstelling van de eikenbossen? Deze vraag stond centraal in een voorstudie waarvan we hier de resultaten presenteren.

De onderzochte bossen

Het onderzoek is uitgevoerd in de volgende drie bosgebieden:

1. Bosreservaat De Meinweg (ten oosten van Roermond in de gemeente Roerdalen). Hoewel de geschiedenis van dit eikencomplex niet exact gereconstrueerd kan worden, blijkt uit oude beschrijvingen van het gebied dat tijdens de vorige eeuw het gebied geen bos maar heide was. Aangezien na het verbannen van de schapen snel eiken terug kwamen wordt verondersteld dat de wintereiken als strubben de begrazing hebben overleefd (Den Ouden, 1995).
2. Militair terrein De Stompert (bij Soesterberg). Op de kaart van Lt. van der Meer uit 1800-1810 staat het huidige gebied aangegeven als een open gebied met daarin kleine groepjes bomen. Aangenomen wordt dat dit eiken waren waaruit het huidige gemengde bos van zomer- en wintereik is voortgekomen.
3. Boswachterij Amerongen. In dit gebied zijn op drie plaatsen monsters verzameld:
 - in het gemengd zomer- en wintereikenbos in het bosreservaat Galgenberg (afd 9d, e, f, g). De exacte geschiedenis van dit gebied is onbekend. Op de kaart van Lt Van der Meer (1800-1810) staat het gebied al als bos aangegeven.
 - in de spontane eikenverjonging onder scherm van groveden (afd 6a, foto 1). Dit grovedennenbos is een eerste generatie heidebebossing aangelegd rond 1930. De eikenverjonging bestaat alleen uit zomereik. Van oude eiken in singels ten oosten en ten westen van het grovedennenbos zijn ook monsters verzameld. Deze eiken zijn mogelijk de moederbomen.
 - in de vierjarige eikenaanplant

Spontane eikenverjonging onder een scherm van grove den in Boswachterij Amerongen, vak 6a.

van afd. 6b. Deze eiken hebben als herkomst 'Duiven'.

In een eerder onderzoek aan vijf bomen per gebied zijn de eiken in De Meinweg en De Stompert, op basis van het voorkomen van slechts één haplotype, als autochtoon aangemerkt (Van Dam & De Vries, 1998).

Onderzoeksmethode

In De Meinweg zijn in het oude eikencomplex van 25 zomer- en 25 wintereiken bladeren verzameld. In de Stompert is dit bij 40 zomer- en 25 wintereiken gebeurd. In de Boswachterij Amerongen zijn van de spontane eikenverjonging onder grove den en van de aangeplante eiken ieder 100 bomen bemonsterd. Aanvullend zijn 15 zomereiken bemonsterd in de eikensingels grenzend aan de spontane eikenverjonging. In het gemengd zomer- en wintereikenbos in het bosreservaat is de bemonstering beperkt tot vier zomereiken en twee wintereiken.

Van iedere boom werd DNA geïsoleerd uit een blad met behulp van een DNA isolatiekit (Puregene). Met drie universele primers (DT/TD, CD/DC en TF/FT) werd een specifiek deel van het chloroplast DNA vermeerderd. Met restrictie-enzymen TaqI en AluI, die het DNA op een vaste plaats knippen, werd het PCR product in een aantal kleinere fragmenten geknipt. De fragmenten werden met behulp van polyacrylamide gel electroforese gescheiden op basis van hun lengte. Na kleuring werden de fragmenten zichtbaar als een streepjescode, het RFLP-patroon (zie foto 2). Op basis van het RFLP-patroon werd het haplotype bepaald door deze te vergelij-



ken met franse referentiemonsters (Dumolin-Lapèque et al., 1997; Bovenschen et al., 1999) Tabel 1 geeft een overzicht van de gevonden haplotypen en hun brongebieden. Hieruit kunnen drie conclusies worden getrokken:

- In De Meinweg zijn alle bemonsterde eiken (zowel wintereiken als zomereiken) van één haplotype en van Italiaanse origine.
- In De Stompert behoren ook alle zomer en wintereiken tot één haplotype maar zij zijn van Spaanse origine.
- De bomen in het bosreservaat Galgenberg hebben ook één haplotype en zijn van Italiaanse afkomst.

Dit is een duidelijke aanwijzing dat deze populaties autochtoon zijn.

In de aangeplante opstand en de spontane verjonging is het beeld anders.

Deze bestaan beide uit een mengsel van haplotypen. Het merendeel van de verjonging (92%) heeft haplotype 12 (Spaanse lijn), 7% heeft haplotype 1 (Italiaanse

lijn) en slechts 1% heeft haplotype 7 (Balkan lijn). De aangeplante verjonging bestaat voornamelijk (82%) uit bomen van de Spaanse lijn. Deze Spaanse lijn is met drie haplotypen vertegenwoordigd; haplotype 10 (71%), haplotype 11 (3%) en haplotype 12 (8%). Naast de Spaanse lijn komen ook bomen uit de Balkan lijn met haplotype 7 voor (18%). Een verklaring van de menging van haplotypen in een bosgebied moet worden gezocht bij de aanplant van zomereiken in het bosgebied. Herkomst *Q. robur* 'Duiven' bestaat, net als veel andere Nederlandse herkomsten, uit een mengsel van haplotypen (Bovenschen et al., 1999). De eikels waaruit deze herkomsten worden verzameld in wegbeplantingen en de bomen van de wegbeplantingen werden indertijd waarschijnlijk geselecteerd op hun kwaliteiten voor laanbomen uit divers uitgangsmateriaal. De oorzaak van de vermenging van haplotypen in de spontane verjonging moet worden gezocht in de aangrenzende eikensingels. Bij deze bomen werden zowel Spaanse als Italiaanse haplo-

Tabel 1. Procentueel aandeel van de verschillende haplotypen in de bemonsterde eikenbossen in procenten

Brongebied	Haplotype	Meinweg (n=50)	Stompert (n=65)	Amerongen			
				Bos- reservaat (n=6)	Spontane verjonging (n=100)	Singel (n=15)	Aanplant, herkomst Duiven (n=100)
Italiaans	1	100		100	7	47	
	10						71
Spaans	11						3
	12		100		92	53	8
Balkan	7				1		18

typen aangetoond. Deze bomen hebben zeer waarschijnlijk de eikels geleverd voor de verjonging en zijn daarmee verantwoordelijk voor de gemengde haplotypen in de verjonging. Niet alle bomen uit de singels werden geanalyseerd zodat we nu de herkomst van de nakomeling met het

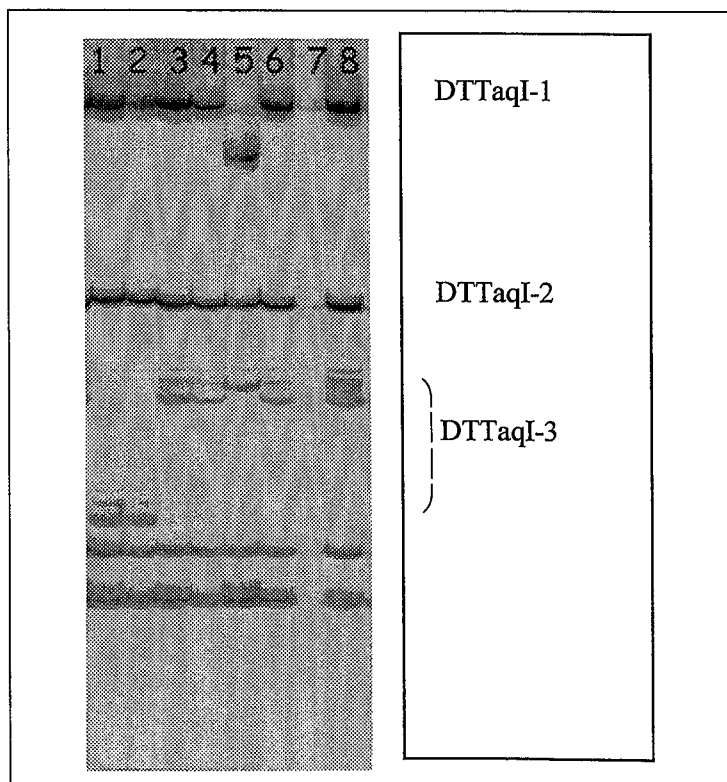
Balkan haplotype niet kunnen herleiden tot de singels.

Opvallend is dat de verhouding tussen beide haplotypen in de singels anders is dan in de verjonging. Van de 15 bemonsterde bomen heeft 47% haplotype 1 en 53% haplotype 12. Als de eiken uit de singels echt de moederbo-

men zijn, dan is in de verjonging het aantal nakomelingen met haplotype 1 duidelijk oververtegenwoordigd.

Haplotype als indicator voor autochtone bossen

Van de onderzochte eikenbossen hebben De Meinweg, De Stompert en het bosreservaat De Galgenberg één gefixeerd haplotype, zowel voor de zomereiken als de wintereiken. Dit is een sterke aanwijzing voor het autochtoon zijn van de eikenbomen. In eerder onderzoek (Van Dam & De Vries, 1998) is voor De Meinweg en De Stompert al aangegeven dat de eiken in deze bossen zeer waarschijnlijk autochtoon zijn. Deze conclusie was gebaseerd op de bemonstering van slechts 5 bomen per gebied. In de meeste, onbeheerde Europese bossen is één haplotype gefixeerd (Dumolin-Lapègue et al., 1997), daarom is in deze bossen een kleine steekproef voldoende (Pons & Petit, 1995). Het



Digestiepatronen van DTTaqI fragmenten.

De Lanen 1 en 2 geven het digestiepatroon van het Balkan haplotype. De lanen 3, 4, 6, 7 en 8 geven het digestiepatroon van het Spaanse haplotype. In laan 5 is het digestiepatroon van het Italiaanse haplotype zichtbaar.

Nederlandse bos is sterk door de mens beïnvloed, daarom kan er hier en daar toch een ander haplo-type (later) binnen zijn gekomen. Dus voor Nederland is het relevant om de steekproef te vergroten. De conclusie voor De Meinweg en De Stompert bleef echter gelijk, namelijk dat deze bossen autochtoon zijn. Bij het gebruik van chloroplast DNA als indicator moeten we ons echter wel realiseren dat we kijken naar kenmerken die via de vrouwelijke lijn overerven. Nakomelingen van een kruising tussen een autochtone eik (moeder boom) en een niet-autochtone eik (vader boom) worden op grond van deze analyse toch als een autochtone eik aangemerkt.



Haplotype en beheer

Het onderzoek in de Boswachterij Amerongen laat duidelijk de effecten van beheer op de genetische samenstelling van het eikenbos zien. De analyse van de eiken in het bosreservaat toont aan dat in dit bosgebied van nature eiken met haplo-type 1 uit het Italiaanse brongebied voorkomen. Door aanplant zijn eiken uit andere brongebieden (Spanje en Balkan) geïntroduceerd. In de onderzochte oudere eikensingels gaat het nog om materiaal dat wel in Nederland inheems is maar in de jonge aanplant gaat het ook om materiaal van de Balkan lijn. Van de Balkan lijn mag worden aangenomen dat deze door mensen naar Nederland is gebracht.

Opvallend is het hoge aandeel nakomelingen van de Spaanse lijn in de verjonging. De oorzaak hiervan is niet bekend maar aangezien er duidelijk bomen van verschillende vestigingsjaren aanwezig zijn lijkt het niet aanne-melijk dat gedurende de hele verjongingsperiode de bomen met haplo-type 1 nauwelijks za-den hebben geproduceerd. Mo-

gelijk is er een andere reden waarom haplo-type 12 oververtegenwoordigd is in de natuurlijke verjonging.

Betekenis genetische variatie op het chloroplast DNA

Met de mogelijkheid om haplotypen in eikenbossen vast te stellen werd het mogelijk om met een grotere zekerheid een uitspraak te doen over het autochtoon zijn van bossen. Met deze techniek is het mogelijk om de geschiedenis van de bomen te reconstrueren. Zelfs een kleine steekproef van vijf bomen is al voldoende.

De onderzochte bossen in Amerongen laten zien dat de genetische diversiteit van het eikenbos toeneemt met de intensiteit van het beheer. De diversiteit in de aangeplante opstand en de natuurlijke verjonging is groter dan in de natuurlijke, autochtone populaties.

Enerzijds wordt aangenomen dat autochtone soorten beter zijn aangepast aan de Nederlandse omstandigheden. Anderzijds wordt verondersteld dat een ho-

gere diversiteit een gunstige eigenschap is in verband met het overleven op termijn. Denk daarbij aan een mogelijke klimaatsverandering onder invloed van het broeikas-effect.

Of de hogere diversiteit in het chloroplast DNA die nu gevonden wordt in een aangeplante opstand en in een natuurlijke verjonging inderdaad de kans op aanpassen vergroot kan nu nog niet worden gesteld. De variatie op het chloroplast DNA is vooral geschikt voor historische studies. Er zijn andere technieken beschikbaar om de diversiteit binnen een populatie in meer detail te bestuderen.

Momenteel wordt de diversiteit binnen de hier beschreven populaties in meer detail onderzocht met een andere techniek. Deze techniek (microsatellieten) is bovendien geschikt om vaderschapsanalyse uit te voeren (Bakker & Van Dam, 1999).

De resultaten van dit onderzoek zullen aanvullende informatie verschaffen over de effecten van het beheer op de diversiteit van eikenbossen en de effecten van

de diversiteit op de overlevingskansen van eikenpopulaties.

Literatuur

Bakker, E.G. & B.C. Van Dam, 1999. Vaderschapsanalyse bij eik: eikenstufmeel komt van ver. *Nederlands Bosbouw Tijdschrift* 71(1): 35-38.

Bovenschen, J., C.C.G. van Doorn & B.C. van Dam, 1999. Variatie in het chloroplast DNA van inlandse eiken in Nederland. Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek. Wageningen. IBN-rapport 427.

Dam, B.C. van & S.M.G. de Vries.

1998. In de voetsporen van de eik, postglaciale herkolonisatie-routes *De Levende Natuur* 99(1): 38-41

Den Ouden, 1995. A-locatie bossen in Limburg. Kenschets, beoordeling en adviezen met betrekking tot behoud en ontwikkeling van bosrelicten in de provincie Limburg. Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek. Wageningen. IBN-rapport 136.

Dumolin-Lapègue, S., B. Demesure, S. Fineschi, V. le Corre & R.J. Petit, 1997. Phylogeographic structure of White Oaks throughout the European Continent. *Genetics*

146: 1475-1487

Petit, R.J., B. Demesure & E. Pineau 1996. Genetic differentiation at a local and continental scale in European oaks species: the importance of historical factors. In: Kremer A., & H. Muhs (eds). *Inter- and Intraspecific Variation in European Oaks: Evolutionary Implications and Practical Consequences*. Brussels: European Union. Pp. 145-163.

Pons, O. & R.J. Petit. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity I. Haploid locus. *Theor. Appl. Genet.* 90: 462-470.