De Levende Natuur 102 (1):26-29 (2001)

Genetische diversiteit in gemengde populaties van Zomer- en Wintereiken

Barbara van Dam & Erica Bakker

Sinds de ministersconferenties voor de bescherming van de Europese Bossen in Straatsburg (1990) en Helsinki (1993) heeft het behoud van de genetische diversiteit van bosbomen meer aandacht gekregen van politici en onderzoekers. Om rekening te kunnen houden met de genetische component van soorten in het beheer zal deze eerst moeten worden geanalyseerd. Adequate beheermaatregelen kunnen alleen dan worden genomen als inzicht is verkregen in de populatiestructuur én de demografische parameters van populaties.

Het belang van genetische diversiteit binnen de soort

Natuurbeheer is er op gericht om de verscheidenheid aan planten- en dierensoorten te handhaven en te beschermen. De verscheidenheid aan erfelijke eigenschappen is een onderdeel van de totale biodiversiteit en dient dan ook beschermd te worden. Natuurbeheer omvat daarmee ook het beheer van het genetisch materiaal (Hendriks et al., 1998).

De genetische diversiteit is van belang, omdat het een fundamentele voorwaarde is voor de overleving van soorten. Het vermogen tot aanpassing aan veranderingen in de tijd en overleven in een heterogene omgeving wordt bepaald door de omvang en de structuur van de genetische variatie tussen en binnen populaties. Vooral kleine populaties lopen een groot risico om als gevolg van genetische verarming uit te sterven, maar ook veranderingen door toeval spelen een rol. Populaties met voldoende genetische diversiteit kunnen toch uitsterven ten gevolge van toevallige omgevingsfluctuaties (van Groenendael, 1995).

De diversiteit binnen soorten is het resultaat van evolutionaire krachten. Kennis van de structuur van de genetische diversiteit levert informatie op over demografische parameters van soorten en populaties. Moleculair onderzoek levert tevens inzicht in de geschiedenis van de populatie.

Het werd pas praktisch mogelijk om de omvang en verdeling van de genetische diversiteit binnen en tussen natuurlijke populaties te beschrijven na de introductie van moleculaire technieken. Daarvóór konden alleen verschillen tussen individuen worden waargenomen als ze morfologisch tot uiting kwamen. Zelfs verwante soorten kunnen vaak moeilijk worden onderscheiden. Met moleculaire technieken werd het zelfs mogelijk om de taxonomische status van soorten te verifiëren (Bijlsma, 1995).

Autochtone eiken

Moleculaire technieken zijn uiterst geschikt voor het ecologische onderzoek en leveren nieuwe inzichten op aangaande de processen die zich afspelen op populatie niveau. Modelsoorten voor dit onderzoek zijn onder andere de Zomereik (*Quercus robur* L.) en de Wintereik (*Q. petraea* (Matt) Liebl.).

De Zomer- en Wintereik zijn verwante soorten die op basis van morfologische kenmerken van elkaar te onderscheiden zijn. Alhoewel de twee soorten gemengd voorkomen, hebben ze duidelijk verschillende ecologische voorkeur. In zijn algemeenheid kan worden gezegd dat de Zomereik op vochtiger en rijkere gronden groeit dan de Wintereik.

Beide soorten zijn autochtoon voor Nederland. Dit betekent dat zij na de laatste ijstijd spontaan naar Nederland zijn geïmmigreerd. De autochtone populaties van een soort vormen de genenbronnen van de soort voor Nederland.

Uit een landelijke inventarisatie naar het voorkomen van autochtone genenbronnen blijkt dat oude populaties van Zomer- en Wintereik zo zeldzaam zijn geworden (Maes, 1993), dat we ons moeten afvragen of ze nog wel over voldoende genetische diversiteit beschikken.

Maar de Zomereik is toch niet zeldzaam in Nederland? Nee, Zomereiken komen veelvuldig voor in 60.000 hectare bosgebied. Alleen de autochtone Zomereiken zijn zeldzaam. De meeste aangeplante eikenbossen in Nederland zijn niet autochtoon. Soms wordt voor de aanplant materiaal gebruikt dat gekweekt is uit eikels die in de directe omgeving zijn verzameld, maar meestal worden zogenaamde 'herkomsten' gebruikt. Deze 'herkomsten' zijn geselecteerd op hun bosbouwkundige kwaliteiten, zoals snelle groei en rechte stam en zijn vaak afkomstig uit Oost Europa (van Dam & de Vries, 1998).

Onderzoeksmethoden

Met behulp van DNA onderzoek wordt bevestigd dat de meeste eikenbossen in Nederland, die ouder zijn dan circa 150 jaar, autochtoon zijn. De bomen in deze bossen stammen af van bomen die de laatste ijstijd overleefden in het zuiden van Spanje of in Italië. Sommige oude bossen zijn echter niet autochtoon, maar oorspronkelijk afkomstig uit de Balkan (van Dam & de Vries, 1998).

Het stuifmeel van eiken wordt met de wind verspreid en zo kan genetisch materiaal worden verplaatst. Om de populatiestructuur te beschrijven is een DNA techniek nodig die zowel het DNA van de moeder als van de vader zichtbaar maakt. Eén van deze technieken is de zogenaamde microsatelliet analyse (kader 1).

De Levende Natuur 102 (1):26-29 (2001)

Foto 1. Wintereiken in vak 138 van De Meinweg: de stammen zijn sinds ca zeventig jaar niet meer afgezet.

De locaties

Het onderzoek werd uitgevoerd in de gemengde eikenbossen van het Bosreservaat De Meinweg bij Roermond en in het militair terrein De Stompert bij Soesterberg.

Uit eerder onderzoek naar het chloroplast DNA is gebleken dat alle bomen uit het proefvak van De Meinweg afstammen van bomen die tijdens de laatste ijstijd in Italië stonden. De bomen in De Stompert zijn nakomelingen van bomen die tijdens de laatste ijstijd in Spanje stonden (van Dam & de Vries, 1998). Beide bossen zijn in het verleden veelvuldig gebruikt als hakhoutcultuur.

In De Meinweg werden 327 bomen bemonsterd. De bomen staan op een helling die deel uitmaakt van een overgang tussen twee Maasterrassen. De bomen zijn gedurende lange tijd regelmatig afgezet, waardoor meerstammige stoven ontstonden. Sinds circa zeventig jaar zijn de stammen niet meer afgezet (foto 1). Om te voorkomen dat een boom meerdere keren werd bemonsterd is slechts één stam per stoof bemonsterd.

Voordat er met de bemonstering werd gestart, is uitgezocht welke omvang de hakhoutstoven hadden. Daartoe zijn 80 bomen onderzocht die met een DNA techniek werden gekarakteriseerd. Uit dit onderzoek blijkt dat deze 80 bomen tot 14 reusachtige stoven (diameter tot 6 meter) behoren, die op het oog niet altijd als zodanig te onderscheiden waren. Vervolgens werden 66 bomen in het proefperceel bemonsterd, rekening houdend met de grootte van de hakhoutstoven.

Soortsbepaling

Het is niet zo eenvoudig om de twee eikensoorten op uiterlijke kenmerken te onderscheiden. Een aantal morfologische kenmerken van het blad is echter goed bruikbaar (foto 2).

Van iedere boom werden uit de kroon vijf volgroeide bladeren verzameld. Deze bladeren werden onmiddellijk na het verzamelen ingedeeld in zes klassen op grond van de mate van beharing aan de onderzijde van het blad. Daarna werden de bladeren gedroogd en later werden nog andere bladkenmerken gemeten, zoals lengte en breedte van het blad, de lengte van de bladsteel en de vorm van

Kader 1 Vaktermen

Een **merker** is een stukje erfelijk materiaal (DNA) dat met behulp van moleculaire technieken kan wordt bestudeerd.

Microsatellieten zijn merkers die bestaan uit kleine stukjes zich herhalend DNA (Bakker & van Dam, 1999). Zij werden 20 jaar geleden ontdekt en behoren tot de meest krachtige Mendeliaanse merkers tot nu toe. De microsatellieten die bij dit onderzoek werden gebruikt liggen op het DNA in de kern van iedere cel. De locatie van de merker op het DNA wordt een **locus** genoemd. Bij diploïde organismen (zoals eiken) komen op ieder locus twee **allelen** voor; één is afkomstig van de moeder, de andere van de vader van het individu. Als een boom verschillende allelen heeft gekregen van zijn twee ouders dan noemen we deze boom **heterozygoot** voor het locus. Zijn beide allelen gelijk, dan noemen we dat **homozygoot**. Een populatie is meer divers naarmate er meer allelen en meer heterozygoten voorkomen in de populatie.

Een **populatie** van een soort kan bestaan uit sub-populaties die niet vrijelijk met elkaar kunnen kruisen. De sub-populaties zullen dan in de loop van de tijd steeds meer van elkaar gaan verschillen. Dit wordt veroorzaakt door random processen en door lokale selectie.

De Levende Natuur 102 (1):26-29 (2001)

de bladbasis (Ietswaart & Feij, 1989).

Met behulp van Principale Component Analyse werden de bomen in twee groepen verdeeld die overeenkomen met de twee soorten. De 327 bomen uit De Meinweg zijn zo onderverdeeld in 146 Zomereiken en 181 Wintereiken. In De Stompert werden 54 Zomereiken en 12 Wintereiken onderscheiden.

Variatie in het DNA

DNA werd geïsoleerd uit een vers blad van iedere boom. Met behulp van zes microsatelliet merkers (kader 1) werd iedere boom gekarakteriseerd. Aangezien in De Stompert voornamelijk Zomereiken werden aangetroffen is een vergelijking tussen de Wintereiken van de twee populaties niet mogelijk. 50 Zomereiken uit De Stompert zijn vergeleken met 50 Zomereiken uit De Meinweg.

Voor beide soorten en beide populaties Zomereiken werden voor iedere merker het aantal allelen, de allelfrequenties en het percentage heterozygoten berekend. Hieruit werden de gemiddelden per soort of per populatie berekend. In figuur 1 zijn voor de Zomer- en Wintereiken van de Meinweg, de allelfrequenties voor één van de loci weergegeven. Uit deze figuur en uit de statistische analyse blijkt dat de genetische diversiteit binnen de twee soorten en binnen de twee populaties Zomereiken heel groot is: bij beide soorten komen veel allelen voor. De mate waarin de twee soorten in De Meinweg van elkaar verschillen (genetische differentiatie) is echter heel klein, maar net significant.

Naast het aantal allelen is de heterozygotie een maat voor de diversiteit. Ook dat was voor beide soorten gelijk. Tussen de populaties van Zomereik waren de verschillen nog kleiner dan tussen de twee soorten.

Discussie en conclusies

De morfologische verschillen tussen de bomen zijn groot genoeg om ze met behulp van Principale Component Analyse in te delen in twee groepen die overeenkomen met de twee soorten. Een klein aantal bomen (3-7%) vertoonde intermediaire bladkenmerken, zodat niet met zekerheid bepaald kon worden tot welke soort deze bomen behoorden. Dit aantal intermediaire bomen komt overeen met het gemiddeld aantal hybriden dat eerder gemeld was voor natuurlijke populaties van eiken in Nederland (Ietswaart & Feij, 1989).

De genetische diversiteit, vastgesteld met microsatellieten, binnen de twee soorten in De Meinweg en De Stompert blijkt groot te zijn. Alhoewel autochtone eiken in Nederland zeldzaam zijn en de populaties navenant klein, is de diversiteit die wordt gevonden in deze kleine populaties vergelijkbaar met de diversiteit die wordt aangetroffen in een grote, natuurlijke populatie in Frankrijk (Streiff et al., 1998).

In het algemeen kan worden gezegd dat binnen de twee soorten en de twee populaties niet of nauwelijks verschillen worden gevonden in de samenstelling van de microsatelliet loci. Weliswaar is maar naar een klein stukje van het totale DNA gekeken, maar microsatellieten geven in het algemeen een goede indruk van de totale genetische diversiteit (Streiff et al., 1998).

Alle resultaten wijzen er dus op dat er genetisch materiaal wordt uitgewisseld, zowel binnen de soorten als tussen de twee soorten. De twee populaties Zomereiken die in dit onderzoek werden geanalyseerd liggen op een afstand van120 km van elkaar. Eikels worden onder andere door Vlaamse gaaien en muizen verspreid. Maar ze zijn niet in staat om de genetische structuur die ontstaan is tijdens de kolonisatie van Nederland na de laatste ijstijd te verstoren (Petit et al., 1998). De huidige genetische structuur wordt vooral bepaald door de verspreiding van genen met het stuifmeel.

Op basis van de resultaten van moleculair onderzoek wordt verondersteld dat, na de laatste ijstijd, eerst de Zomereiken Europa koloniseerden. Verspreiding via water en Vlaamse gaaien, die een voorkeur hebben voor de grotere eikels van de Zomereik, maakte dit mogelijk. De Wintereiken kwamen pas later naar het noorden, voornamelijk via hun stuifmeel. Dit stuifmeel bestoof de eerste pioniers-Zomereiken en zorgde zo voor een nageslacht van hybriden (Petit et al., 1998). Uit deze hybriden zouden, via een systeem van herhaalde preferentiële kruising tussen Wintereik-typen en door selectie op de ecologische voorkeuren van de soort, de "zuivere" Wintereiken zijn verkregen. Hybridisatie is voor de twee eikensoorten dus een natuurlijk proces. Hybridisatie tussen bomen uit West-Europa en de Balkan is in het verleden ook vaak voorgekomen in gebieden waar de beide afstammingslijnen elkaar tegenkwamen. Maar sinds de laatste honderd jaar hybridiseren in Nederland autochtone eiken met eiken die wij hebben

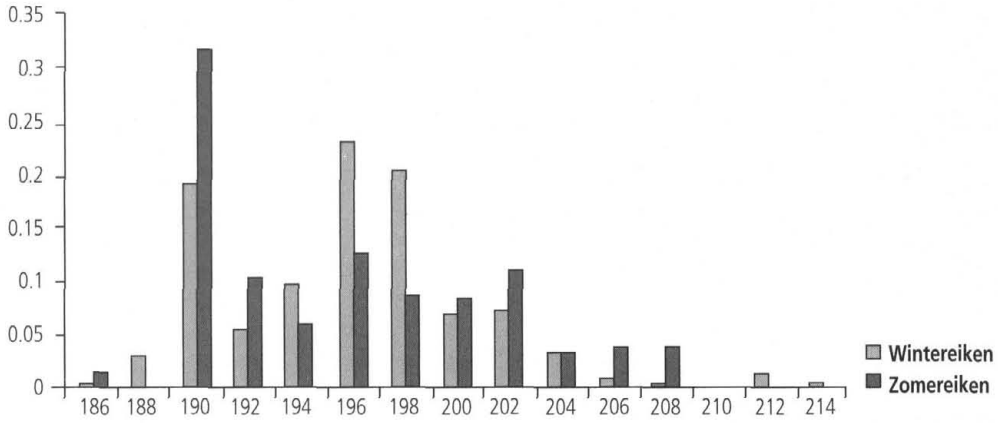

Fig. 1. Allelfrequenties van microsatelliet merker (AG9) in de Zomer- en Wintereiken van De Meinweg: op de x-as staat de lengte van het allel in basen; op de y-as staat de proportie van ieder allel. De genetische diversiteit is hoog, omdat er bij beide soorten veel allelen voorkomen (in Zomereik 12 en in Wintereik 13). De verschillen zijn echter klein en maar net significant: deze wordt veroorzaakt door het verschil in allelfrequentie van allel 190; de rest is niet significant.

De Levende Natuur 102 (1):26-29 (2001)

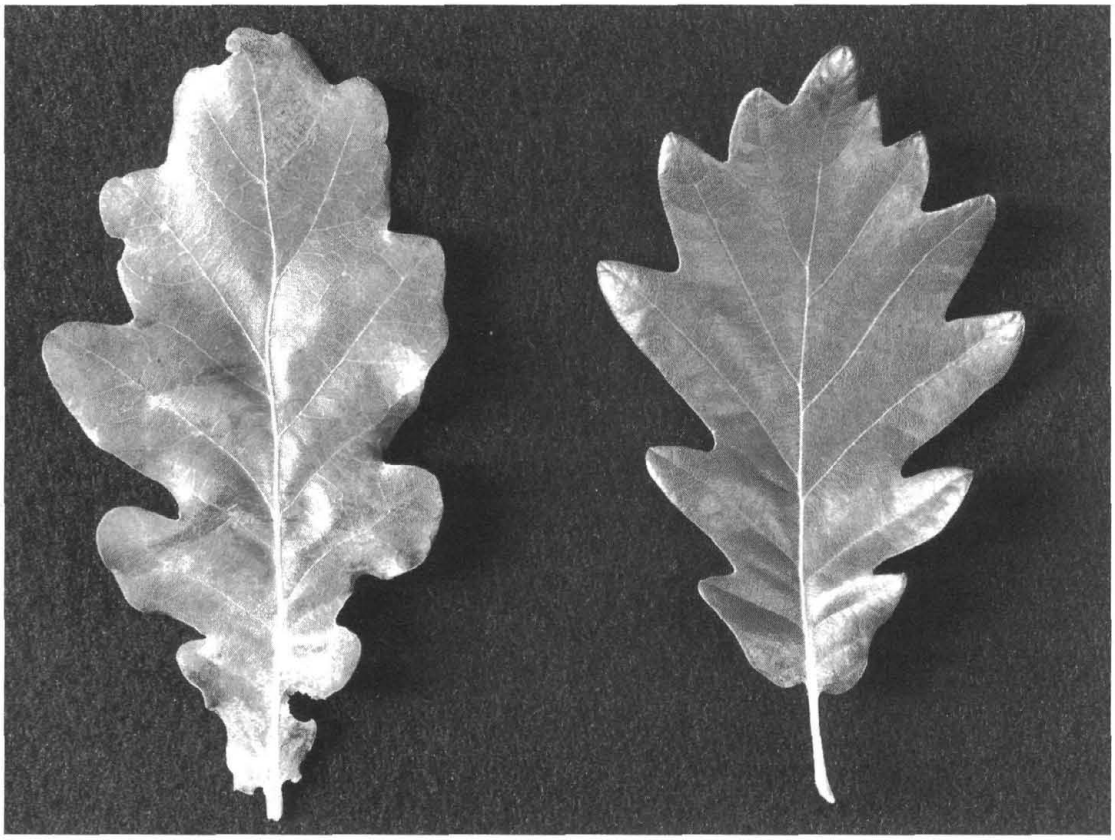

Foto 2. Bladkenmerken van een Zomereik (*Quercus robur*, links) en een Wintereik (*Quercus petraea*, rechts). Onder meer werden lengte en breedte van het blad, de lengte van de bladsteel en de vorm van de bladbasis gemeten.

geïmporteerd uit de Balkan. Welke gevolgen dit heeft voor de vitaliteit van de eiken moet nog nader worden onderzocht. Mogelijk kan de slechte vitaliteit van de eiken in de afgelopen tien jaar hiermee in verband worden gebracht.

De laatste oude bossen van autochtone Zomer- en Wintereiken worden niet bedreigd in hun voortbestaan door een tekort aan genetische diversiteit. Maar ook de samenstelling van de genetische diversiteit dient nader onderzocht te worden.

Met de beschrijving van de genetische diversiteit binnen populaties van Zomereiken en binnen de Zomer- en Wintereik is de eerste stap gezet om te komen tot een goede beschrijving van de populatiestructuur van de twee soorten. Het verdere onderzoek naar de uitwisseling van genetisch materiaal tussen eiken zal leiden tot meer inzicht in de gevolgen van hybridisatie voor de eiken in Nederland, zodat richtlijnen voor adequate maatregelen binnen handbereik komen.

Literatuur

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

Bijlsma, R., 1995. Moleculair genetische technieken en natuurbeheer. De Levende Natuur 96 (2): 40-45.

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.

Groenendael, J. van, 1995. Hoe klein mogen kleine populaties worden? De Levende Natuur 96 (2): 34-39.

Hendriks, R.J.J., N.J. Ouborg & J.M. van Groenendael, 1998. Is Natuurbeheer ook beheer van genen? Het thema genetische erosie in onderzoek, beleid en beheer. Katholieke Universiteit Nijmegen, Nijmegen.

Ietswaart, J.H. & A.E. Feij, 1989. A multivariate analysis of introgression between *Quercus robur* and *Q. petraea* in the Netherlands. Acta Bot. Neerlandica 38(3): 313-325.

Maes, N.C.M., 1993. Genetische kwaliteit van inheemse bomen en struiken. Deelproject: Randvoorwaarden en knelpunten bij behoud en toepassing van inheems genenmateriaal. IKC-NBLF en IBN-DLO, Wageningen. Rapport nr. 020.

Petit, R.J., E. Pinneau, B. Démesure, R. Bacilieri, A. Ducousso & A. Kremer, 1998. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 94: 9996-10001.

Streiff, R., T. Labbé, R. Bacilieri, H. Steinkellner, J. Glössl & A. Kremer, 1998. Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. Molecular Ecology 7: 317-328.

Summary

Genetic diversity in mixed populations of *Quercus robur* and *Quercus petraea*

For conservation purposes it is essential to know the structure of the genetic diversity between and within populations of a species.

As an example in this article the genetic diversity between and within mixed populations of *Quercus robur* and *Q. petraea* is described. The two species are autochtonous for The Netherlands but presently they are very rare (Maes, 1993). The results of microsatellite analysis indicate that the diversity in both species is still high. No significant molecular differences are found between two populations of *Q. robur* situated more than 120 km apart. The genetic diversity between the two species is similar as well. This indicates gene flow between the two species and between distant populations within a species.

The study of the effects of hybridisation between autochtonous oaks and oaks imported from the Balkans on the viability of the trees has to be studied before adequate guidelines for the conservation and management of the two species can be formulated.

Dankwoord

De beheerders van het Nationaal Park De Meinweg zijn we dank verschuldigd voor hun toestemming om op hun terrein onderzoek te mogen doen.

Wij danken de volgende collega's voor hun bijdragen aan dit onderzoek:

Cor Das en Gert Kranenborg voor hun hulp bij het veldwerk, Jan Bovenschen voor de moleculaire analyses en Bert van der Werf voor zijn statistische adviezen.

Drs. B.C. van Dam & Ir. E.G. Bakker
Alterra, afd. Ecologie & Milieu
Postbus 47
6700 AA Wageningen
email: b.c.vandam@alterra.wag-ur.nl