



FLORON

SCIENCE 4 NATURE



Knolsteenbreek

**Naar herstel in vochtige graslanden in Noord-
Brabant**

Sascha van der Meer, Maik Janssen, Lilian Seip en Sheila Luijten

FL2019.037

Titel: Knolsteenbreek, naar herstel in vochtige graslanden in Noord-Brabant

Rapport nr.: FL2019.037

Datum uitgave: 11 augustus 2022

Foto omslag: Knolsteenbreek in Het Broek - Sascha van der Meer

Auteurs: Sascha van der Meer, Maik Janssen, Lilian Seip en Sheila Luijten

Productie: **FLORON**
Bezoekadres: Toernooiveld 1
6525 ED Nijmegen

info@floron.nl

www.floron.nl

Subsidieverstrekker: Provincie Noord-Brabant

In samenwerking met: Science4Nature, Staatsbosbeheer, Natuurmonumenten en Brabants Landschap

Dit rapport kan geciteerd worden als:

van der Meer, S., M. Janssen, L.A. Seip & S.H. Luijten (2022) Knolsteenbreek, naar herstel in vochtige graslanden in Noord-Brabant. FLORON-rapport FL2019.037. FLORON, Nijmegen.



© 2022 FLORON, Nijmegen. FLORON onderzoekt en beschermt wilde planten
FLORON is onderdeel van Stichting RAVON

Inhoudsopgave

1	INLEIDING	4
1.1	ACHTERGROND	4
1.2	DOEL VAN HET PROJECT	4
2	KNOLSTEENBREEK	5
2.1	SOORTBESCHRIJVING	5
2.2	POLYPLÖIDIE	7
3	HOOILANDEN MET KNOLSTEENBREEK IN NOORD-BRABANT	8
3.1	ALGEMENE RESULTATEN	8
3.1.1	<i>Plantengemeenschappen</i>	9
3.2	NOORDPOLDER VAN OSSENDRECHT	9
3.2.1	<i>Beschrijving standplaats en begeleidende soorten</i>	9
3.2.2	<i>Populatieverjonging</i>	10
3.2.3	<i>Beheeradvies op maat</i>	11
3.3	HET MERKSKE	11
3.3.1	<i>Beschrijving standplaats en begeleidende soorten</i>	11
3.3.2	<i>Populatieverjonging</i>	13
3.3.3	<i>Beheeradvies op maat</i>	16
3.4	HET BROEK (CHAAMSE BEKENGEBIED)	17
3.4.1	<i>Beschrijving standplaats en begeleidende soorten</i>	17
3.4.2	<i>Populatieverjonging</i>	18
3.4.3	<i>Beheeradvies op maat</i>	19
3.5	DE MATEN	19
3.5.1	<i>Beschrijving standplaats en begeleidende soorten</i>	19
3.5.2	<i>Populatieverjonging</i>	20
3.5.3	<i>Beheeradvies op maat</i>	21
3.6	DE MORTELEN	21
3.6.1	<i>Beschrijving standplaats en begeleidende soorten</i>	21
3.6.2	<i>Populatieverjonging</i>	23
3.6.3	<i>Beheeradvies op maat</i>	24
3.7	DE OETERT (SANG EN GOORKENS)	24
3.7.1	<i>Beschrijving standplaats en begeleidende soorten</i>	24
3.7.2	<i>Populatieverjonging</i>	25
3.7.3	<i>Beheeradvies op maat</i>	25
4	OVERZICHT KIEMING EN VESTIGING NA ÉÉN JAAR	27
5	RESULTATEN FLOW CYTOMETRIE	29
6	CONCLUSIE	32
7	LITERATUUR	33
	BIJLAGE 1. FLOW CYTOMETRIE: MATERIAAL, METHODE EN ANALYSE	35

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

Knolsteenbreek is een kenmerkende soort van vochtige hooilanden. Vooral in het zuiden van Nederland kwam Knolsteenbreek algemeen voor, maar vanwege ingrijpende veranderingen in het landschap is het aantal populaties van de Knolsteenbreek drastisch gedaald. Een belangrijk deel van het Nederlandse verspreidingsgebied van de Knolsteenbreek ligt in Noord-Brabant. De provincie heeft de soort dan ook aangeduid als een prioritaire soort waarvoor maatregelen op soortniveau gelden. Maar ook in Brabant bleek de soort er slecht voor te staan, in het rapport 'Brabantse planten in de knel: actiepunten urgent bedreigde planten in Noord-Brabant' werden vragen opgeworpen over de toekomstige levensvatbaarheid van de meta-populatie (Luijten et al. 2016). Vóór 1950 was de soort bekend van 248 kilometerhokken terwijl het aantal kilometerhokken in de periode 2002-2013 was geschat op 65, een achteruitgang van 74% (Luijten et al. 2016). Waarschijnlijk is de soort vanwege de grootschalige ontwatering van vochtige graslanden, om ze geschikt te maken voor de intensieve landbouw en veeteelt, hier gedurende de laatste decennia sterk teruggelopen. Daarnaast is de Knolsteenbreek erg gevoelig voor bemesting en heeft het toenemend gebruik van (kunst)mest in agrarische gebieden ervoor gezorgd dat de soort in heel West-Europa sterk achteruit is gegaan (Weeda et al. 1985; Walisch et al. 2012).

Knolsteenbreek is gedurende de afgelopen decennia veelal verdwenen uit vochtige graslanden in Noord-Brabant, maar heeft zich op verschillende locaties weten te handhaven in slootkanten en in wegbermen. Deze locaties zijn een toevluchtsoord geworden waar kleine relictpopulaties hebben weten te overleven. Momenteel is het merendeel van de Brabantse groeiplaatsen zelfs te vinden in dit secundaire habitat (Cools 2009; Luijten et al. 2016). Knolsteenbreek bleek nog maar op enkele plekken in z'n natuurlijk habitat (vochtige graslanden) voor te komen.

1.2 Doel van het project

Het doel van het project is om vast te stellen in welke gebieden Knolsteenbreek nog te vinden is in vochtige hooilanden in Noord-Brabant, hoe de soort er in deze gebieden voorstaat en waar de knelpunten zitten voor het behoud en herstel van de soort in dit habitat. Hiervoor is gekeken naar de standplaats, het beheer, de factoren die van belang zijn voor populatieverjonging en het ploëdieniveau.

Op basis van de resultaten in dit project zijn locatie-specifieke beheeradviezen opgesteld voor de tien grootste hooilandpopulaties van Knolsteenbreek in Noord-Brabant.

2 Knolsteenbreek

2.1 Soortbeschrijving

Knolsteenbreek (*Saxifraga granulata*) is een graslandplant uit de steenbreekfamilie (Saxifragaceae). De soort is zeldzaam en staat op de Rode Lijst in de categorie 'bedreigd' (Sparrus et al. 2014). Knolsteenbreek ontleent haar naam aan de knolletjes die zich aan de basis van de plant, vlak onder de grond, bevinden. Deze graslandsoort is een echte voorjaarsbloeiër die vroeg in het jaar bladrozetten vormt. Dankzij de vroege ontwikkeling van de rozetbladeren ontloopt de Knolsteenbreek concurrentie met later startende, snelle groeiers in de kruidlaag. De soort bloeit vanaf eind april tot half juni. De bloeiwijzen met witte bloemen kunnen tot ongeveer 60 cm hoog worden (figuur 1). Wanneer de zaden zijn verspreid sterven de planten bovengronds af. Voor succesvolle kieming en vestiging zijn de zaden afhankelijk van onbegroeide plekjes of verstoringen in de kruidlaag. Naast voortplanting via zaden kan de Knolsteenbreek zich ook vegetatief vermeerderen via de knolletjes die zich aan de basis van de rozet of de stengel bevinden.



Figuur 1 Knolsteenbreek in bloei (foto: Sascha van der Meer)

Knolsteenbreek is zelf-compatibel, dat betekent dat de bloemen zaden kunnen vormen nadat ze zijn bestoven met stuifmeel van dezelfde plant (zelfbestuiving) (Walisch et al. 2012). Echter, wanneer een bloem wordt bestoven met stuifmeel van een andere plant (kruisbestuiving) worden er meer zaden geproduceerd (Walisch et al. 2012). Zelfbestuiving heeft bovendien een negatief effect op de kiemkracht van zaden en de overleving van kiemplanten (inteelt) (Walisch et al. 2012). De positie van een bloem binnen de bloeiwijze blijkt ook een belangrijke rol te spelen in zaadproductie. De centrale bloem uit de bloeiwijze, tevens de bloem die als eerste opent (figuur 2), produceert veel zware zaden. Zaadproductie en zaadgewicht nemen af naarmate bloemen later tijdens de bloei opengaan (van der Meer & Jacquemyn 2015a). Hoogstwaarschijnlijk heeft dit verschil in zaadkwaliteit binnen een plant te maken met de kans op zelfbestuiving en de beschikbaarheid van nutriënten om zaden te ontwikkelen. Tijdens het begin van de vrouwelijke fase van de centrale bloem zijn er nog geen andere bloemen in dezelfde bloeiwijze open en is de kans op zelfbestuiving klein, daarnaast zijn er aan het begin van de bloei nog veel nutriënten beschikbaar voor zaadproductie. Knolsteenbreek wordt voornamelijk bezocht door kleine vliegen en solitaire bijen (Lindgaard Hansen & Molau 1994), en produceert zaden die lang kiemkrachtig blijven (Weeda et al. 1985).



Figuur 2 Drie bloeiwijzen van de Knolsteenbreek. In elk van deze bloeiwijzen is de centrale bloem open en zijn de eerste laterale bloemen te zien in knop (foto: Sascha van der Meer).

2.2 Polyploidie

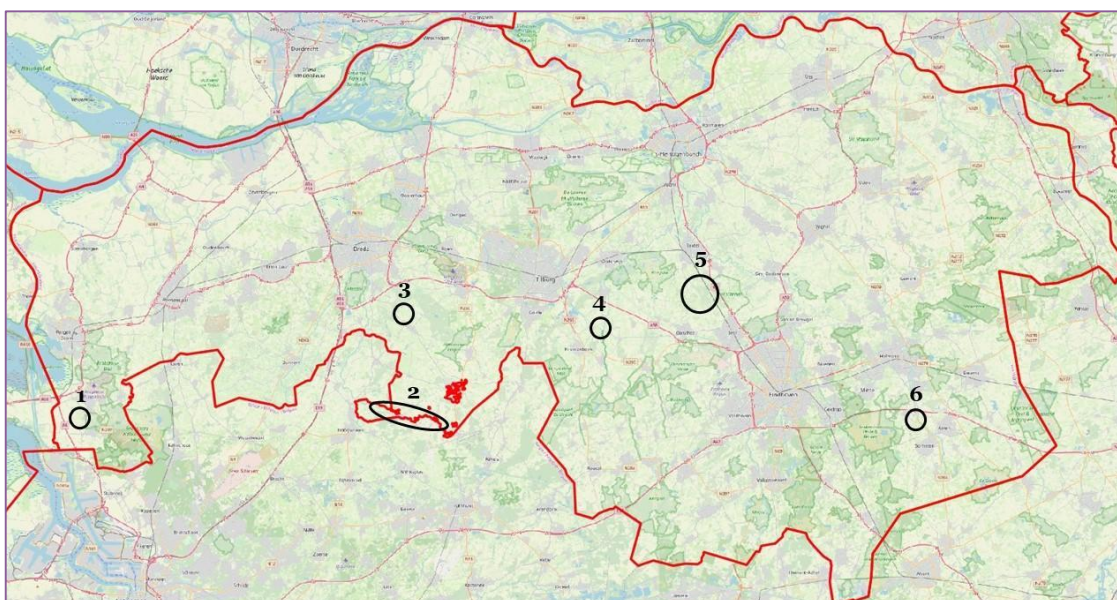
Veel populaties van Knolsteenbreek in Europa zijn polyploïd (Redondo et al. 1996). Polyploidie komt veel voor bij planten en betekent dat er meer dan twee kopieën van elk chromosoom aanwezig zijn per celkern. Onderzoek aan Knolsteenbreek populaties in Vlaams-Brabant heeft uitgewezen dat deze hoogstwaarschijnlijk octoploïd zijn, dat betekent dat deze planten acht kopieën van elk chromosoom hebben (van der Meer et al. 2014). Het hoge aantal kopieën per chromosoom zorgt ervoor dat deze populaties, ondanks jaren van achteruitgang, genetisch nog zeer divers zijn gebleven. Het hoge ploïdieniveau werkt als het ware als een buffer tegen genetische verarming, die kan optreden wanneer populaties kleiner worden en meer geïsoleerd van elkaar raken (van der Meer & Jacquemyn 2015b).

3 Hooilanden met Knolsteenbreek in Noord-Brabant

3.1 Algemene resultaten

In de periode 2014 tot 2022 is Knolsteenbreek in 91 km-hokken in Noord-Brabant waargenomen. Veel van deze waarnemingen betreffen groeiplaatsen in wegbermen en slootkanten. Een klein deel van de waarnemingen betreft groeiplaatsen in hooilanden met hooilandbeheer.

Met hulp van districtscoördinatoren van FLORON (Petra van der Wiel en Jacques Rovers), gegevens van lokale terreinbeheerders en data uit de Landelijke Vegetatie Databank, hebben we kunnen vaststellen dat Knolsteenbreek in grofweg zes gebieden nog in hooilanden te vinden is (figuur 3).



Figuur 3 Gebieden in Noord-Brabant waar Knolsteenbreek in hooilanden te vinden is; 1= de Noordpolder van Ossendrecht, 2= het Merkske, 3= het Broek (Chaamse bekengebied), 4= de Maten, 5= de Mortelen en 6= de Oetert (Sang en Goorkens).

Knolsteenbreek is in de bovenstaande zes gebieden nog in hooilanden te vinden. In een deel van deze gebieden liggen meerdere groeiplaatsen/populaties welke soms enkele honderden meters tot tientallen kilometers uit elkaar liggen. Vooral in het Merkske en de Mortelen vinden we op verschillende locaties groeiplaatsen van Knolsteenbreek in hooilanden, in bermen en slootkanten. De grotere groeiplaatsen in hooilanden zijn (potentieel) met elkaar verbonden door kleinere groeiplaatsen in bermen.

In totaal hebben we vier populaties in het Merkske, twee populaties in de Mortelen, één populatie in de Noordpolder van Ossendrecht, één populatie in het Broek, één populatie in de Maten en één populatie in de Oetert opgenomen in ons standplaatsonderzoek. In deze populaties is een kiemingsexperiment uitgevoerd waarbij er proefvlakken zijn aangelegd om te kunnen bepalen of er nog voldoende verjonging plaatsvindt. In elke populatie zijn drie proefvlakken aangelegd:

- Het eerste proefvlak is vrijgemaakt van vegetatie en ingezaaid met ongeveer 0.09 gram lokaal verzamelde zaden (grofweg 4000-4500 zaden).
- Het tweede proefvlak is alleen vrijgemaakt van vegetatie, dit proefvlak diende ter controle (natuurlijke kieming op open grond).
In het laatste proefvlak is niets gedaan, dit proefvlak diende ook ter controle (natuurlijke kieming in de vegetatie).

Alle proefvlakken zijn op maximaal 50 cm van bestaande groeiplaatsen van Knolsteenbreek aangelegd, om ervoor te zorgen dat zaden van de bestaande planten in de niet ingezaaide proefvlakken terecht kunnen komen zodat we een beeld kunnen vormen van de spontane kieming op open grond en in de vegetatie.

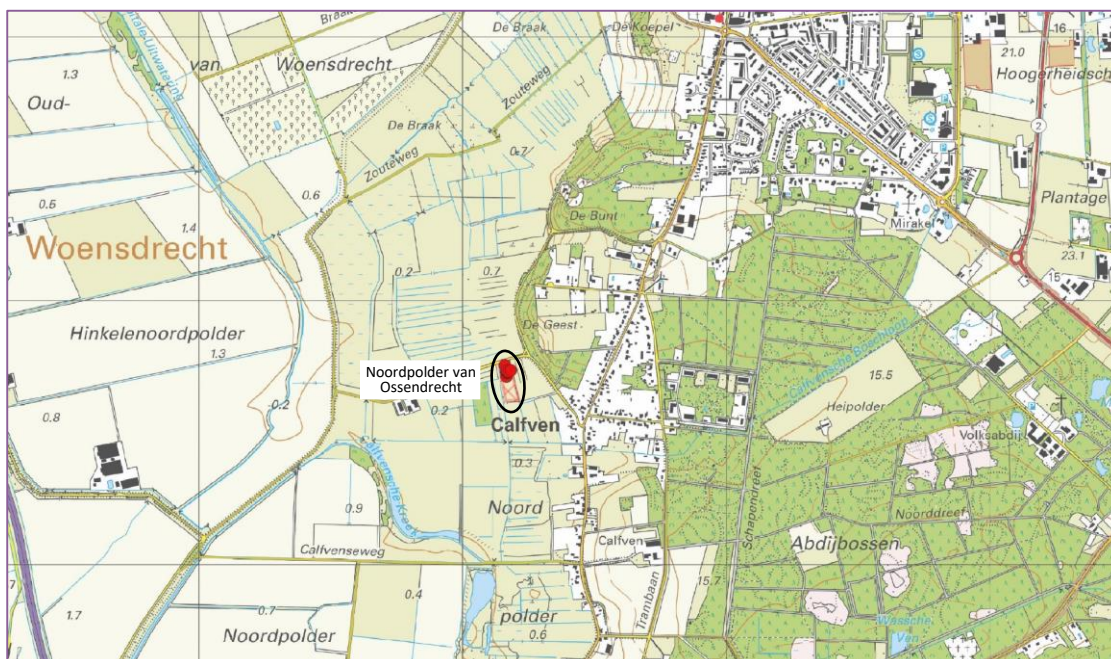
3.1.1 Plantengemeenschappen

Tijdens het standplaatsonderzoek hebben we in elke populatie de begeleidende soorten genoteerd. Op basis van de resultaten kunnen we vaststellen dat Knolsteenbreek voorkomt in graslanden die vallen in de klasse van de ‘matig voedselrijke graslanden’ (klasse r16 in Schaminée et al. 2019) en dan voornamelijk in plantengemeenschappen van de Veldrus-associatie (r16Aa2) of verschillende associaties binnen het Dotterbloem-verbond (r16Ab). De Veldrus-associatie omvat weinig productieve en weinig soortenrijke hooilanden die eenmaal per jaar worden gemaaid en zijn gebonden aan weinig of niet bemeste, natte humeuze tot venige zandgrond. Deze associatie wordt gekenmerkt door soorten als Bleke zegge (*Carex pallescens*) en Bosanemoon (*Anemone nemorosa*), waarbij Moerasrolklaver (*Lotus pedunculatus*), Gestreepte witbol (*Holcus lanatus*), Kale jonker (*Cirsium palustre*), Gewoon reukgras (*Anthoxanthum odoratum*), Veldzuring (*Rumex acetosa*), Scherpe boterbloem (*Ranunculus acris*), Pinksterbloem (*Cardamine pratensis*) en Lidrus (*Equisetum palustre*) vrijwel altijd aanwezig zijn (Schaminée et al. 2019). Het Dotterbloem-verbond bestaat uit bloemrijke, een- of tweemaal per jaar gemaaide, ’s winters periodiek overstroomde hooilanden op mineraalrijke en stikstofhoudende, vaak kleiige of venige, drassige gronden. Dit verbond wordt gekenmerkt door soorten als Echte koekoeksbloem (*Silene flos-cuculi*), Grote ratelaar (*Rhinanthus angustifolius*), Brede orchis (*Dactylorhiza majalis*), Gewone dotterbloem (*Caltha palustris* subsp. *palustris*), Moerasrolklaver (*Lotus pedunculatus*) en Tweerijige zegge (*Carex disticha*) (Schaminée et al. 2019).

3.2 Noordpolder van Ossendrecht

3.2.1 Beschrijving standplaats en begeleidende soorten

Aan de voet van de Brabantse Wal is Knolsteenbreek te vinden in de Noordpolder van Ossendrecht, dit gebied wordt beheerd door Natuurmonumenten (figuur 4). Tijdens de start van het project werd de omvang van deze populatie geschat op 20 bloeiende planten, terwijl er tegen het einde van het project 70 planten werden geteld waarvan ruim 30 bloeiende planten. Hierbij moet wel worden vermeld dat het niet duidelijk is om hoeveel genetisch identieke individuen het gaat, gezien een deel van de groeiplaats een relatief hoge dichtheid heeft en Knolsteenbreek zich klonaal kan voortplanten. In ieder geval lijkt de omvang van de groeiplaats de afgelopen jaren te zijn toegenomen.



Figuur 4 Hooiland met Knolsteenbreek aan de voet van de Brabantse Wal in de Noordpolder van Ossendrecht. Waarnemingen van Knolsteenbreek tussen 2014 en 2022 zijn aangegeven met rode stippen (bron: NDFF).

Het perceel kan worden omschreven als een vochtig hooiland met hoogte en laagteverschillen en een influx van ijzerrijk kwel, waardoor de fosfaatbeschikbaarheid relatief laag is. Knolsteenbreek is hier te vinden met soorten als Blauwe zegge (*Carex panicea*), Bosbies (*Scirpus sylvaticus*), Echte koekoeksbloem (*Silene flos-cuculi*), Gestreepte witbol (*Holcus lanatus*), Gevleugeld hertshooi (*Hypericum tetrapterum*), Gewone smeewortel (*Symphytum officinale*), Gewoon reukgras (*Anthoxanthum odoratum*), Holpijp (*Equisetum fluviatile*), Kale jonker (*Cirsium palustre*), Kruidend zenegroen (*Ajuga reptans*), Lidrus (*Equisetum palustre*), Moerasrolklaver (*Lotus pedunculatus*), Pinksterbloem (*Cardamine pratensis*), Scherpe boterbloem (*Ranunculus acris*), Tweerijige zegge (*Carex disticha*), Veldrus (*Juncus acutiflorus*), Veldzuring (*Rumex acetosa*) en Zwarte zegge (*Carex nigra*).

3.2.2 Populatieverjonging

De groeiplaats van Knolsteenbreek op het perceel is vrij compact. Het gaat om een oppervlakte van ongeveer $2 \times 4,5$ meter met een zeer hoge dichtheid van Knolsteenbreek in het midden en een lage dichtheid aan de randen van de groeiplaats. Op deze locatie zijn buiten de kiemplots ook juveniele planten (i.e. jonge planten) aangetroffen, al is niet helemaal duidelijk of dit klonale of seksuele voortplanting betrof. De resultaten van het kiemingsexperiment zijn weergegeven in tabel 1. In het zaaiplot met open grond zijn zo'n 60 kiemplanten gevestigd na uitzaaien. Omdat de proefvlakken op dit perceel meer dan 50 cm van de bestaande groeiplaats waren uitgezet, kunnen we geen uitspraak doen over het aantal kiemplanten in de proefvlakken 'geen inzaai, open grond' en 'geen inzaai, kruidlaag'.

Tabel 1 Resultaten kiemingsexperiment Noordpolder van Ossendrecht.

	Inzaai Open grond	Geen inzaai Open grond	Geen inzaai Kruidlaag
Aantal kiemplanten	60	x	x

3.2.3 Beheeradvies op maat

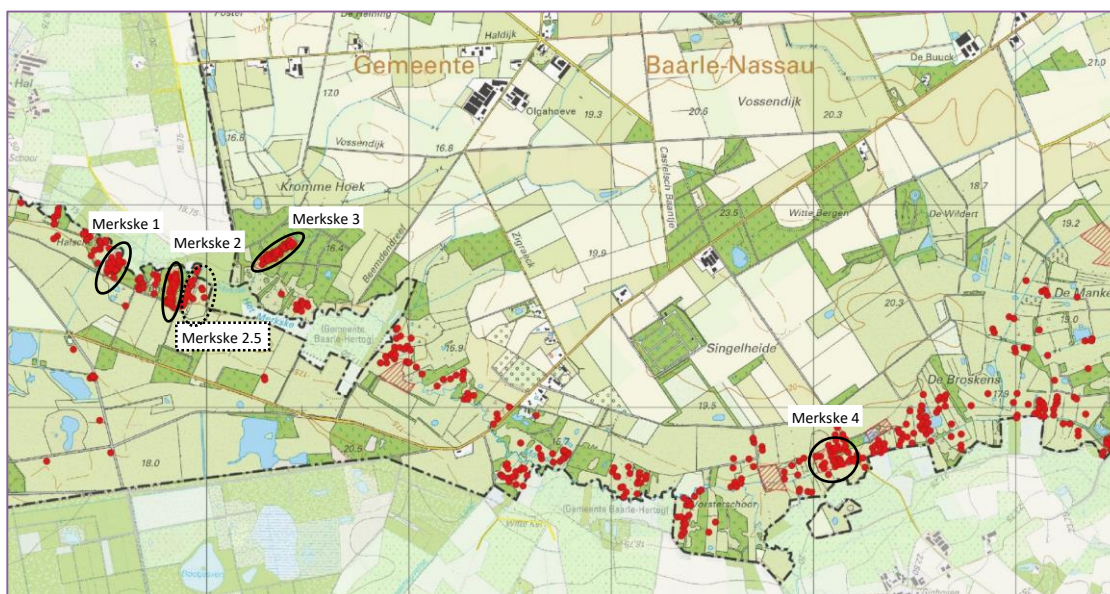
Momenteel wordt het perceel 1 keer per jaar gemaaid en het maaisel afgevoerd in het najaar. Vanwege de kwetsbare vegetatie worden er géén faunastroken op het perceel geplaatst. Op een nabijgelegen perceel met een minder kwetsbare vegetatie worden bredere faunastroken geplaatst om dit te compenseren. Wij zijn zeer enthousiast over het maatwerk dat wordt geleverd met betrekking tot de faunastroken, waarbij op gebiedsniveau wordt gekeken naar de beschikbaarheid van voedsel en schuilgelegenheid voor dieren, maar waarbij ook rekening wordt gehouden met de noden van kwetsbare plantensoorten zoals het tegengaan van verruiging.

Aanbeveling: De zode is plaatselijk zeer dicht en dat zorgt ervoor dat kieming (en dus populatieverjonging) een beperkende factor zou kunnen zijn voor de uitbreiding van graslandsoorten als Knolsteenbreek. Onze aanbeveling zou zijn om tijdens het maaien enkele open plekken in de bodem te creëren om meer kansen voor kieming te bewerkstelligen. Deze open plekken kunnen worden gecreëerd door grof te maaien, waarbij de bodem af en toe wordt geraakt met de maaimachine.

3.3 Het Merkske

3.3.1 Beschrijving standplaats en begeleidende soorten

In het Merkske is Knolsteenbreek te vinden in een groot aantal hooilandpercelen welke worden beheerd door Staatsbosbeheer (figuur 5). Op verschillende percelen in het gebied zijn groeiplaatsen van Knolsteenbreek te vinden met honderden bloeiende exemplaren bij elkaar. Daarnaast komt de soort in dit gebied niet alleen in hooilanden, maar ook in bermen en slootkanten voor. Het Merkske herbergt dan ook een belangrijk bolwerk van Knolsteenbreek in Noord-Brabant, zeker gezien deze populaties tevens in verbinding staan met populaties in de beekdalen net over de grens in het Vlaamse deel van de Kempen.



Figuur 5 Waarnemingen van Knolsteenbreek tussen 2014 en 2022 in het Merkske zijn aangegeven met rode stippen (bron: NDFF). Hooilanden die zijn geselecteerd voor het project zijn aangegeven met Merkske 1 t/m 4. Op hooiland Merkske 2.5 is een extra kiemingsexperiment uitgevoerd.

Merkske 1 ligt in de Halsche Beemden en is een hooilandperceel met hoogte en laagte verschillen en een sterke vocht gradiënt. Over het perceel verspreid staan ruim 200 bloeiende planten (het gaat hierbij om een schatting van het aantal genetisch unieke, bloeiende individuen waarbij één plant meerdere bloeistelen kan hebben). De bloeiende planten zijn verdeeld over enkele locaties waar tientallen individuen bij elkaar te vinden zijn. De drogere delen van het perceel, waar ook Knolsteenbreek staat, worden gekenmerkt door soorten als Bosanemoon (*Anemone nemorosa*), Echte koekoeksbloem (*Silene flos-cuculi*), Gestreepte witbol (*Holcus lanatus*), Gewoon reukgras (*Anthoxanthum odoratum*), Grote pimpernel (*Sanguisorba officinalis*), Kale jonker (*Cirsium palustre*), Kruidend zenegroen (*Ajuga reptans*), Moerasrolklaver (*Lotus pedunculatus*), Moerasstrepzaad (*Crepis paludosa*), Pinksterbloem (*Cardamine pratensis*), Scherpe boterbloem (*Ranunculus acris*), Slanke sleutelbloem (*Primula elatior*), Veldrus (*Juncus acutiflorus*) en Veldzuring (*Rumex acetosa*). Op de nattere delen van het perceel zijn soorten te vinden als Gewone dotterbloem (*Caltha palustris* subsp. *palustris*), Holpijp (*Equisetum fluviatile*), Moeraskartelblad (*Pedicularis palustris*) en Waterdrieblad (*Menyanthes trifoliata*).

Merkske 2 ligt ook in de Halsche Beemden en omvat een populatie van ongeveer 300 bloeiende planten. Het zwaartepunt van de populatie bevindt zich aan de kant van het pad (de zuidkant van het perceel), meer naar het noorden staan verspreid nog enkele tientallen individuen. Qua soortensamenstelling is het perceel vergelijkbaar met Merkske 1, hoewel de hoogte en laagte verschillen minder sterk zijn. Knolsteenbreek staat hier samen met soorten als Bosanemoon (*Anemone nemorosa*), Echte koekoeksbloem (*Silene flos-cuculi*), Gestreepte witbol (*Holcus lanatus*), Gewone dotterbloem (*Caltha palustris* subsp. *palustris*), Gewoon reukgras (*Anthoxanthum odoratum*), Holpijp (*Equisetum fluviatile*), Kale jonker (*Cirsium palustre*), Kruidend zenegroen (*Ajuga reptans*), Moerasrolklaver (*Lotus pedunculatus*), Pinksterbloem (*Cardamine pratensis*), Scherpe boterbloem (*Ranunculus acris*), Slanke sleutelbloem (*Primula elatior*), Veldrus (*Juncus acutiflorus*), Veldzuring (*Rumex acetosa*) en Zwarte zegge (*Carex*

nigra).

Merkske 3 ligt in Kromme Hoek en wordt ook wel 'Waterbeemd' genoemd. De Knolsteenbreek populatie bestaat hier uit ruim 150 bloeiende planten. Verder heeft dit perceel een zeer unieke soortensamenstelling en herbergt een van de weinige groeiplaatsen van Karwijselie (*Selinum carvifolia*) in Noord-Brabant, een zeer zeldzame en ernstig bedreigde soort. Daarnaast staan er soorten als Bosanemoon (*Anemone nemorosa*), Brede orchis (*Dactylorhiza majalis*), Echte koekoeksbloem (*Silene flos-cuculi*), Gestreepte witbol (*Holcus lanatus*), Gewone dotterbloem (*Caltha palustris* subsp. *palustris*), Gewone engelwortel (*Angelica sylvestris*), Gewoon reukgras (*Anthoxanthum odoratum*), Grote pimpernel (*Sanguisorba officinalis*), Holpijp (*Equisetum fluviatile*), Kale jonker (*Cirsium palustre*), Kleine valeriaan (*Valeriana dioica*), Kruipeend zenegroen (*Ajuga reptans*), Lidrus (*Equisetum palustre*), Moeraskartelblad (*Pedicularis palustris*), Moerasstreepzaad (*Crepis paludosa*), Moeraszegge (*Carex acutiformis*), Moesdistel (*Cirsium oleraceum*), Pijptorkruid (*Oenanthe fistulosa*), Pinksterbloem (*Cardamine pratensis*), Rietgras (*Phalaris arundinacea*), Slanke sleutelbloem (*Primula elatior*), Stijve zegge (*Carex elata*) en Waterdrieblad (*Menyanthes trifoliata*).

Merkske 4 is een groot perceel in de Broskens met een Knolsteenbreek populatie van ruim 1000 bloeiende planten verspreid over het perceel, waarbij op meerdere locaties tientallen tot honderden bloeiende planten bij elkaar staan. Het perceel heeft niet alleen hoogteverschillen maar ook duidelijke verschillen in voedselrijkdom. Zo zijn er stukken die worden gedomineerd door Gestreepte witbol (*Holcus lanatus*) en Grote brandnetel (*Urtica dioica*), maar verder zijn er soorten te vinden als Bosanemoon (*Anemone nemorosa*), Echte koekoeksbloem (*Silene flos-cuculi*), Gewone dotterbloem (*Caltha palustris* subsp. *palustris*), Gewoon reukgras (*Anthoxanthum odoratum*), Grote pimpernel (*Sanguisorba officinalis*), Grote ratelaar (*Rhinanthus angustifolius*), Holpijp (*Equisetum fluviatile*), Kale jonker (*Cirsium palustre*), Kruipeend zenegroen (*Ajuga reptans*), Moerasrolklaver (*Lotus pedunculatus*), Moeraspirea (*Filipendula ulmaria*), Moesdistel (*Cirsium oleraceum*), Pinksterbloem (*Cardamine pratensis*), Scherpe boterbloem (*Ranunculus acris*), Veldrus (*Juncus acutiflorus*), Veldzuring (*Rumex acetosa*) en Zwarte zegge (*Carex nigra*).

3.3.2 Populatieverjonging

Op alle vier de onderzochte percelen met Knolsteenbreek in het Merkske is populatieverjonging waargenomen, zowel in de proefvlakken van het kiemingsexperiment als daarbuiten. In het kiemingsexperiment werden duidelijk de meeste kiemplanten gevonden op het proefvlak dat was vrijgemaakt van vegetatie en waar lokaal verzamelde zaden waren ingezaaid. De resultaten zijn weergegeven in tabellen 2 t/m 5.

Tabel 2 Resultaten kiemingsexperiment Merkske 1

	Inzaai Open grond	Geen inzaai Open grond	Geen inzaai Kruidlaag
Aantal kiemplanten	375	1	4

Tabel 3 Resultaten kiemingsexperiment Merkske 2

	Inzaai Open grond	Geen inzaai Open grond	Geen inzaai Kruidlaag
Aantal kiemplanten	325	1	3

Tabel 4 Resultaten kiemingsexperiment Merkske 3

	Inzaai Open grond	Geen inzaai Open grond	Geen inzaai Kruidlaag
Aantal kiemplanten	7	0	0

Tabel 5 Resultaten kiemingsexperiment Merkske 4

	Inzaai Open grond	Geen inzaai Open grond	Geen inzaai Kruidlaag
Aantal kiemplanten	~1200	5	3

Op de verschillende onderzoekslocaties in het Merkske zijn grote verschillen gevonden in aantal kiemplanten na inzaai op kaal gemaakte grond. Op sommige locaties zijn zeer veel zaden gekiemd, zoals bij Merkske 4 (tabel 5, figuur 6). Terwijl op locatie Merkske 3 zeer weinig kiemplanten zijn aangetroffen (tabel 4).

**Figuur 6** Overzicht van de drie plots op onderzoekslocatie Merkske 4 (links) en de vele kiemplanten na uitzaaien in het plot met open grond (rechts) (foto's: Sheila Luijten).

Het lage aantal kiemplanten in 2021 op locatie Merkske 3 (Waterbeemd) komt waarschijnlijk doordat de plotjes zeer nat zijn geweest en/of dat er water in stagneerde (figuur 7, rechts). Dit is ook de enige plek waar in beide controle plots (kaal en begroeid) geen jonge knolsteenbreekplantjes zijn waargenomen. Alhoewel het aantal kiemplanten lager was dan in Merkske 4 is ook in Merkske 2 een aanzienlijk aantal zaden gekiemd (figuur 7, links)



Figuur 7 Zaaïexperiment op onderzoekslocatie Merkske 2 (links), de weinige kiemplanten in Merkske 3 (rechts) (foto's: Sheila Luijten).

Op een vijfde locatie in het Merkske, tussen locatie 2 en 3 in (Merkske 2.5), is een extra zaaïexperiment uitgevoerd. In het plot met open grond zijn na inzaai 960 kiemplanten geteld, in het plot met opengemaakte grond zonder inzaai zijn 4 kiemplanten waargenomen en in het plot waarbij de grond niet is kaal gemaakt, is één zeer jonge plant gezien (figuur 8).



Figuur 8 Visualisatie van de drie plots van het zaaïexperiment op onderzoekslocatie Merkske 2.5. Links: inzaai met open grond, midden: open grond en geen inzaai en rechts geen open grond en geen inzaai (foto's Sheila Luijten).

Op de overige onderzoekslocaties is het aantal juveniele planten in beide controle plots ongeveer even laag. Buiten het kiemingsexperiment werden kiemplanten en juveniele planten waargenomen op open plekjes op de bodem in de nabijheid van volwassen planten. Vooral op plekken met veel activiteit van mollen lijkt de dichtheid van Knolsteenbreek planten hoger te

zijn. Molshopen zijn perfecte kiembedden voor graslandsoorten als Knolsteenbreek (figuur 9). Vooral op drogere delen van percelen met Knolsteenbreek in het Merkske zien we veel molshopen en gangen. Op relatief vochtige percelen is weinig tot geen activiteit van mollen, omdat deze locaties simpelweg te nat zijn. Op deze vochtige percelen is het dus van belang dat de zode niet te dicht is, zodat er voldoende kansen voor zaadkieming en dus populatieverjonging zijn.



Figuur 9 Molshoop met Knolsteenbreek in een hooilandperceel in het Merkske (foto: Sascha van der Meer).

3.3.3 Beheeradvies op maat

De percelen in het Merkske werden altijd 1 keer per jaar gemaaid in het najaar. Vanwege toenemende verruiging en vergrassing worden de percelen de komende 5 jaar 2 keer per jaar gemaaid, waarbij een extra maaibeurt wordt uitgevoerd in juni. Op alle percelen wordt altijd een faunastrook geplaatst om te voorzien in voedsel en schuilgelegenheid voor dieren. Daarnaast loopt er een proef met lokaal, kleinschalig plaggen om verruiging tegen te gaan en verjonging van graslandsoorten te stimuleren.

Aanbeveling: De extra maaibeurt die de komende vijf jaar in juni zal worden uitgevoerd zorgt ervoor dat verschillende soorten als Moesdistel en Moerasstreepzaad géén zaden kunnen produceren. Voor Knolsteenbreek kan het mogelijk nadelig uitpakken; wanneer er in de eerste helft van juni wordt gemaaid zullen veel zaden nog niet volledig gerijpt zijn en dus verloren gaan, als er in de tweede helft van juni wordt gemaaid, is een groot deel van de zaden wel rijp en kan het maaien zelfs zaadverspreiding bevorderen. In ieder geval moet goed in ogenschouw worden genomen dat enkele kwetsbare soorten onder druk kunnen komen te staan door deze extra maaibeurt in juni.

Verruiging van verschillende percelen in het gebied is mogelijk in de hand gewerkt door het plaatsen van faunastroken. Toen de percelen nog 1 keer per jaar werden gemaaid werden de faunastroken dus maar eens per 2 jaar gemaaid (omdat deze bleven staan na de maaibeurt in

het najaar) en dit zorgt voor verruiging en vergrassing onder de relatief voedselrijke omstandigheden in het Merkske, waardoor kwetsbare graslandsoorten onder druk komen te staan. Gezien de toename van Gestreepte witbol, Riet en Rietgras op verschillende kwetsbare percelen valt het te overwegen om niet op elk perceel een faunastrook te plaatsen, maar te voorzien in voldoende voedsel en schuilgelegenheid voor dieren op gebiedsniveau. Waarbij percelen met veel kwetsbare soorten als Karwijselie, Knolsteenbreek, Moerasstrepzaad en Slanke sleutelbloem worden ontzien en op percelen met minder kwetsbare soorten grotere faunastroken worden geplaatst.

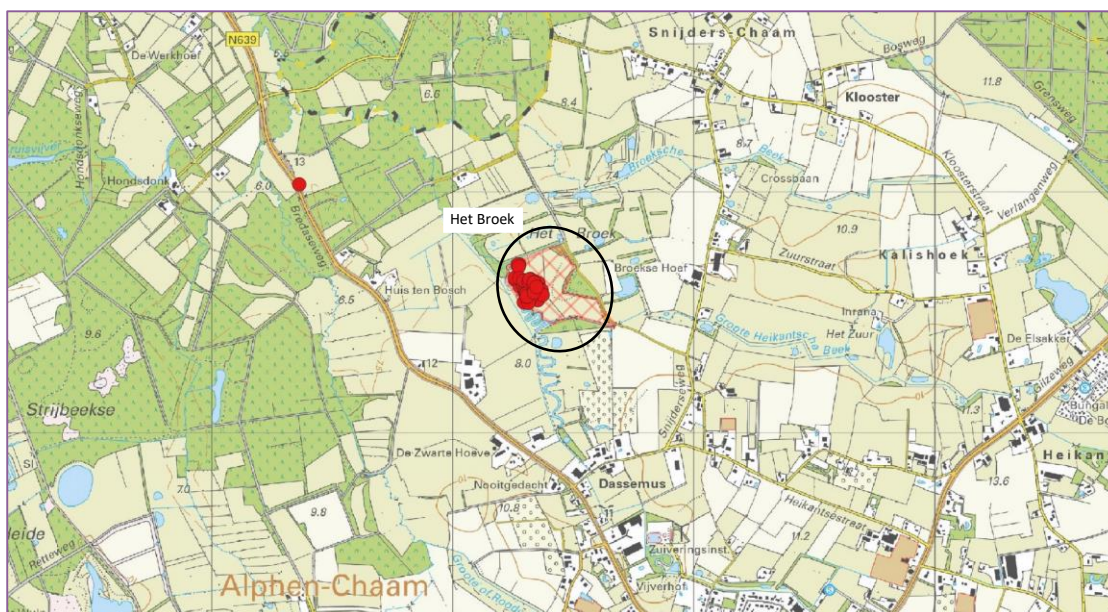
Om kieming en populatieverjonging te stimuleren zouden er, op locaties waar geen mollen actief zijn, open plekken kunnen worden gecreëerd. Dit is van groot belang gezien de zode op sommige plekken zeer dicht is met een dichte moslaag onder de vegetatie en er daarmee weinig ruimte is voor zaadkieming van graslandsoorten als Knolsteenbreek, Moerasstrepzaad en Grote pimpernel. Deze open plekken kunnen worden gecreëerd door bijvoorbeeld grof te maaien, waarbij de bodem af en toe wordt geraakt door de maaimachine.

Kleinschalig plaggen om graslandverjonging te bewerkstelligen is niet gangbaar in vochtige graslanden, omdat de plagplekken lager liggen dan de omringende vegetatie. Deze lagere plekken zijn vaak veel vochtiger en in de winter kan hier water stagneren. Deze plagplekken worden daarom vooral gekoloniseerd door natte (pionier)soorten in plaats van ruimte te creëren voor kieming van graslandsoorten. Het creëren van open plekken door bijvoorbeeld grof te maaien, zal waarschijnlijk meer verjonging van graslandsoorten opleveren omdat de zode wordt geopend, maar niet volledig wordt verwijderd.

3.4 Het Broek (Chaamse bekengebied)

3.4.1 Beschrijving standplaats en begeleidende soorten

In het Chaamse bekengebied is Knolsteenbreek te vinden in het Broek, een gebied dat wordt beheerd door Natuurmonumenten (figuur 10). Op het perceel in het Broek zijn verschillende groeiplaatsen van Knolsteenbreek waargenomen die zich tientallen meters uit elkaar bevinden maar via bestuiving met elkaar verbonden zijn. Verspreid over het perceel staan ruim 100 bloeiende planten, vaak in groepjes van enkele tot tientallen planten bij elkaar. Het perceel laat hoog-laag gradiënten zien waar Knolsteenbreek zich op overgangen van nat naar droog bevindt.



Figuur 10 Hooiland met Knolsteenbreek in het Broek, in het Chaamse bekengebied. Waarnemingen van Knolsteenbreek tussen 2014 en 2022 zijn aangegeven met rode stippen (bron: NDFD).

Naast Knolsteenbreek staan op dit perceel de prioritaire plantensoorten Kale vrouwenmantel (*Alchemilla glabra*) en Moesdistel (*Cirsium oleraceum*). Verder omvat het perceel soorten als Blauwe zegge (*Carex panicea*), Brede orchis (*Dactylorhiza majalis*), Echte koekoeksbloem (*Silene flos-cuculi*), Gestreepte witbol (*Holcus lanatus*), Gevleugeld hertshooi (*Hypericum tetrapterum*), Gewone engelwortel (*Angelica sylvestris*), Gewone waternavel (*Hydrocotyle vulgaris*), Gewoon reukgras (*Anthoxanthum odoratum*), Grote ratelaar (*Rhinanthus angustifolius*), Heelblaadjes (*Pulicaria dysenterica*), Holpijp (*Equisetum fluviatile*), Kale jonker (*Cirsium palustre*), Kruipend zenegroen (*Ajuga reptans*), Lidrus (*Equisetum palustre*), Moeraskartelblad (*Pedicularis palustris*), Moerasrolklaver (*Lotus pedunculatus*), Pinksterbloem (*Cardamine pratensis*), Poelruit (*Thalictrum flavum*), Scherpe boterbloem (*Ranunculus acris*), Tweerijige zegge (*Carex disticha*), Veldrus (*Juncus acutiflorus*) en Veldzuring (*Rumex acetosa*).

3.4.2 Populatieverjonging

Er is op verschillende locaties op het perceel verjonging waargenomen. Ook was er op verschillende plekken activiteit van mollen en wilde zwijnen te zien. De open grond die wordt gecreëerd door mollen en wilde zwijnen kan fungeren als kiembed voor de zaden van graslandsoorten als Knolsteenbreek. Aan de andere kant bleek de zode op andere locaties juist vrij dicht te zijn, met een dikke moslaag. Op deze locaties zou kieming een beperkende factor kunnen zijn voor het uitbreiden van Knolsteenbreek. Op twee van de drie proefvlakken van het kiemingsexperiment is ook kieming waargenomen, hoewel de kieming hoger leek te zijn op het proefvlak dat niet was ingezaaid dan op het proefvlak dat wel was ingezaaid (zie tabel 6). Mogelijk zijn de zaden in het ingezaaide proefvlak (inzaai, open grond) na een regenbui naar het naastgelegen proefvlak (geen inzaai, open grond) uitgespoeld. Het ontbreken van kiemplanten in het derde proefvlak (geen inzaai, kruidlaag), laat zien dat de dichte zode mogelijk een belemmering kan vormen voor zaadkieming van Knolsteenbreek en andere graslandsoorten.

Tabel 6 Resultaten kiemingsexperiment Het Broek

	Inzaai Open grond	Geen inzaai Open grond	Geen inzaai Kruidlaag
Aantal kiemplanten	19	224	0

3.4.3 Beheeradvies op maat

Het perceel wordt momenteel 1 keer per jaar gemaaid in het najaar, waarbij het maaisel wordt afgevoerd. Tijdens het maaien blijven er faunastroken staan om te voorzien in voedsel en schuilgelegenheid voor dieren. Deze faunastroken worden jaarlijks op een andere locatie op het perceel geplaatst.

Aanbeveling: De locaties waar faunastroken zijn geplaatst kunnen snel verruigen en soorten als Knolsteenbreek en Kale vrouwenmantel kunnen zich hierin slecht handhaven. Deze soorten profiteren van lage vegetatie in het vroege voorjaar om voldoende licht op te vangen om tot bloei te kunnen komen. In de faunastroken staat de vegetatie in het voorjaar hoog, wat ervoor zorgt dat er weinig tot geen licht op de bodem valt. Het is van groot belang eventuele verruiging door de faunastroken goed in de gaten te houden en kwetsbare soorten eventueel te ontzien door de faunastroken te plaatsen op delen van het perceel waar deze soorten niet voorkomen.

Over het algemeen zijn er verspreid over het perceel voldoende open plekken te vinden voor kieming en dus populatieverjonging van graslandsoorten als Knolsteenbreek. Op locaties waar de zode vrij dicht is, en er weinig activiteit is van mollen en wilde zwijnen, kan worden overwogen om tijdens het maaien open plekken te creëren door de maaimachine af en toe de grond te laten raken (i.e. grof maaien).

3.5 De Maten

3.5.1 Beschrijving standplaats en begeleidende soorten

In de Maten is Knolsteenbreek te vinden nabij het Spruitenstroompje, deze locatie wordt beheerd door Staatsbosbeheer (figuur 11). In 2019 is deze groeiplaats van Knolsteenbreek herontdekt door Maarten Mandos, nadat de soort enkele jaren niet was waargenomen. De omvang van de populatie wordt geschat op ruim 300 bloeiende planten.



Figuur 11 Hooiland met Knolsteenbreek in de Maten, nabij het Spruitenstroompje. Waarnemingen van Knolsteenbreek tussen 2014 en 2022 zijn aangegeven met rode stippen (bron: NDFP).

Het perceel is relatief voedselrijk en herbergt soorten als Gewone berenklaauw (*Heracleum sphondylium* subsp. *sphondylium*), Gewone smeerwortel (*Symphytum officinale*) met plaatselijk dominantie van Gestreepte witbol (*Holcus lanatus*). Daarnaast zijn er soorten als Echte koekoeksbloem (*Silene flos-cuculi*), Gewoon reukgras (*Anthoxanthum odoratum*), Glanshaver (*Arrhenatherum elatius*), Grote ratelaar (*Rhinanthus angustifolius*), Grote vossenstaart (*Alopecurus pratensis*), Kale jonker (*Cirsium palustre*), Kantig hertshooi (*Hypericum maculatum* subsp. *obtusiusculum*), Kleine veldkers (*Cardamine hirsuta*), Pinksterbloem (*Cardamine pratensis*), Scherpe boterbloem (*Ranunculus acris*), Rietorchis (*Dactylorhiza praetermissa*), Rode klaver (*Trifolium pratense*) en Veldzuring (*Rumex acetosa*) te vinden.

3.5.2 Populatieverjonging

Op verschillende plekken op het perceel is populatieverjonging waargenomen. Ook in de proefvlakken van het kiemingsexperiment zijn grote aantallen kiemplanten aangetroffen, zowel in het proefvlak dat was ingezaaid (inzaai, open grond) als het proefvlak waar alleen de vegetatie was verwijderd (geen inzaai, open grond) (tabel 7). Daarnaast werd er ook kieming waargenomen in het controle proefvlak (geen inzaai, kruidlaag).

Tabel 7 Resultaten kiemingsexperiment de Maten

	Inzaai Open grond	Geen inzaai Open grond	Geen inzaai Kruidlaag
Aantal kiemplanten	779	102	7

3.5.3 Beheeradvies op maat

Momenteel wordt het perceel 1 keer per jaar gemaaid en het maaisel afgevoerd in het najaar. Daarnaast worden er faunastroken geplaatst om te voorzien in voedsel en schuilgelegenheden voor dieren.

Aanbeveling: Plaatselijk is de vegetatie zeer dicht en dit heeft mogelijk een negatief effect op de kieming (en dus populatieverjonging) van Knolsteenbreek. Onze aanbeveling zou zijn om tijdens het maaien wat open plekken in de bodem te creëren om meer kansen voor kieming te bewerkstelligen. Deze open plekken kunnen worden gecreëerd door grof te maaien, waarbij de bodem af en toe wordt geraakt met de maaimachine.

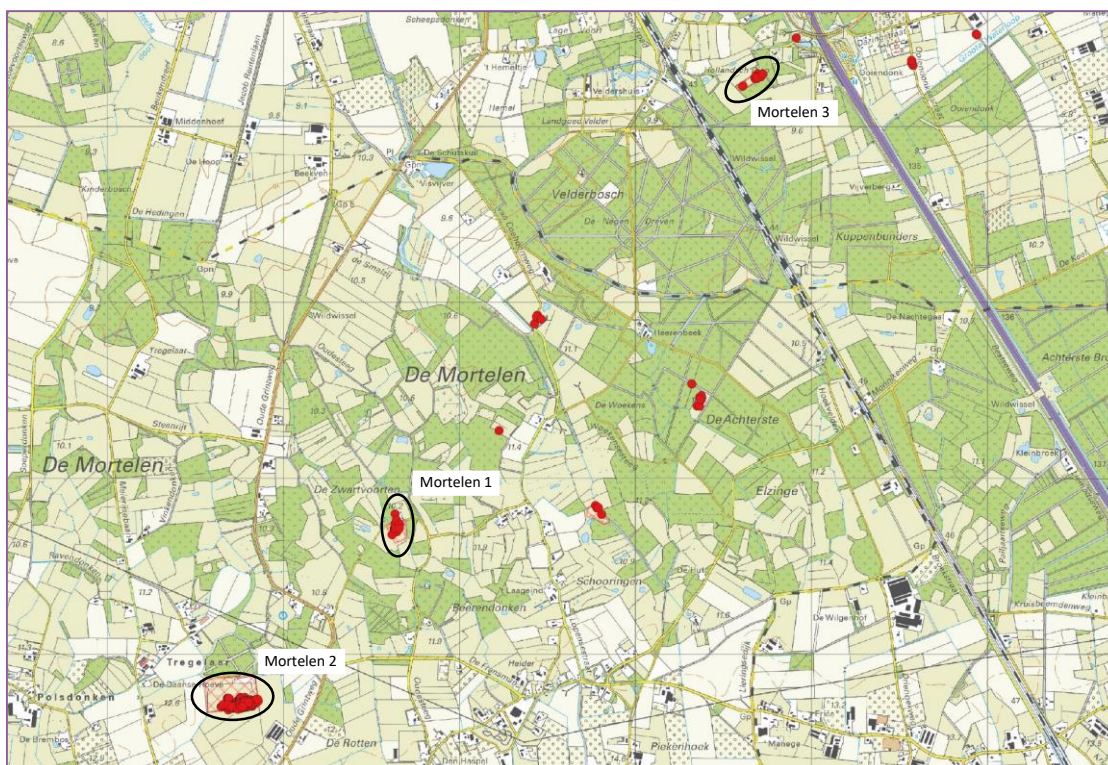
Tijdens de looptijd van het project waren de faunastroken altijd op andere locaties geplaatst dan het zwaartepunt van de Knolsteenbreek populatie. Dit is positief voor een kwetsbare soort als Knolsteenbreek. Wij hopen dan ook dat bij het plaatsen van deze faunastroken Knolsteenbreek en andere kwetsbare soorten ook in de toekomst zullen worden ontzien.

De rietkraag lijkt steeds verder uit te breiden op het perceel en zal op den duur de groeiplaats van Knolsteenbreek kunnen bereiken. Om de uitbreiding van de rietkraag te stoppen zou deze een extra keer moeten worden gemaaid, bijvoorbeeld in de zomer (juni).

3.6 De Mortelen

3.6.1 Beschrijving standplaats en begeleidende soorten

In de Mortelen, een gebied dat wordt beheerd door Brabants Landschap, liggen verschillende groeiplaatsen van Knolsteenbreek, de groeiplaatsen verschillen sterk in omvang van enkele tientallen tot duizenden planten. De populatie die is aangewezen op de maatregelenkaart van provincie Noord-Brabant (in het Groene Woud) ligt in dit gebied en wordt ook wel 'Hollands Diep' genoemd naar de nabijgelegen weg (Mortelen 3, figuur 12). In de Mortelen zijn recent verschillende nieuwe populaties van Knolsteenbreek ontstaan nadat percelen door Brabants Landschap zijn afgeplagd en maaisel uit de regio, met zaden van Knolsteenbreek, is opgebracht. In dit gebied hebben we uiteindelijk drie populaties geselecteerd (figuur 12), in twee relatief nieuwe populaties hebben we kiemingsexperimenten uitgevoerd en in alle drie de populaties hebben we gekeken naar de begeleidende soorten.



Figuur 12 Waarnemingen van Knolsteenbreek tussen 2014 en 2022 in de Mortelen zijn aangegeven met rode stippen (bron: NDFP). Hooilanden die zijn geselecteerd voor het project zijn aangegeven met Mortelen 1 t/m 3.

Mortelen 1 is een perceel dat jaren geleden is afgeplagd en is ingezaaid met maaisel van perceel Hollands Diep (Mortelen 3). Knolsteenbreek is opgekomen uit het maaisel en heeft zich sindsdien gevestigd. Op deze locatie worden verspreid over het perceel honderden planten aangetroffen, waarvan er ruim 150 in bloei staan met daarnaast nog honderden juveniele planten. Het zwaartepunt van de populatie ligt aan het iets schralere gedeelte aan de westzijde van het perceel. Knolsteenbreek staat hier samen met soorten als Akkerdistel (*Cirsium arvense*), Blauwe zegge (*Carex panicea*), Dichte veldbies (*Luzula congesta*), Echte koekoeksbloem (*Silene flos-cuculi*), Gestreepte witbol (*Holcus lanatus*), Gewone brunel (*Prunella vulgaris*), Grote ratelaar (*Rhinanthus angustifolius*), Kale jonker (*Cirsium palustre*), Knoopkruid (*Centaurea jacea*), Kruidend zegge (*Ajuga reptans*), Moerasrolklaver (*Lotus pedunculatus*), Pinksterbloem (*Cardamine pratensis*), Pitrus (*Juncus effusus*), Rietorchis (*Dactylorhiza praetermissa*), Rode klaver (*Trifolium pratense*), Scherpe boterbloem (*Ranunculus acris*), Speerdistel (*Cirsium vulgare*) en Veldzuring (*Rumex acetosa*).

Mortelen 2 is een groot perceel dat in 2018 geleden is ingezaaid met maaisel van omliggende percelen. In 2020 zijn hier voor het eerst bloeistelen gezien, in totaal ruim 200 bloeiende planten. Ook is er op dit perceel verjonging waargenomen, maar aanzienlijk minder dan in de andere percelen. Over de jaren 2020 – 2022 lijken de groeiplekken in omvang af te nemen, met in 2022 nog maar 50 bloeiende planten. De planten groeien voornamelijk in het zuidoostelijke deel van het perceel, waar vegetatie lager is en er meer open plekken zijn. De bodem is hier ook droger dan in de rest van het terrein. Ook in de oever van een sloot aan de oostzijde van het terrein worden vanaf 2020 planten gevonden, deze groeiplek lijkt over de jaren heen stabiel te blijven. Vooral westelijk is veel Pitrus (*Juncus effusus*) en Gewone waterbies (*Eleocharis*

palustris) aanwezig. In de nattere delen van het terrein staan tevens soorten als Gele lis (*Iris Pseudacorus*), Grote kattenstaart (*Lythrum salicaria*), Grote waterweegbree (*Alisma plantago-aquatica*) en Egelboterbloem (*Ranunculus flammula*). Nabij de groeiplaatsen van Knolsteenbreek is de vegetatie water graziger met soorten als Echte koekoeksbloem (*Silene flos-cuculi*), Gewoon reukgras (*Anthoxanthum odoratum*), Kruipend zenegroen (*Ajuga reptans*), Kruipende boterbloem (*Ranunculus repens*), Pinksterbloem (*Cardamine pratensis*), Rietorchis (*Dactylorhiza praetermissa*), Rode - en Witte klaver (*Trifolium pratense* en *T. repens*), Smalle weegbree (*Plantago lanceolata*) en Veldzuring (*Rumex acetosa*).

Mortelen 3 is het perceel dat ook wel ‘Hollands Diep’ wordt genoemd en herbergt een oorspronkelijke populatie van Knolsteenbreek met duizenden planten. Op deze locatie zijn ruim 2000 bloeiende planten geteld, daarnaast waren er nog veel meer vegetatieve individuen van Knolsteenbreek aanwezig. Plaatselijk is de soort hier zelfs bodem bedekkend. Het gaat dus om een zeer grote, vitale populatie. Op deze locatie staat Knolsteenbreek samen met soorten als Adelaarsvaren (*Pteridium aquilinum*), Echte koekoeksbloem (*Silene flos-cuculi*), Fluitenkruid (*Anthriscus sylvestris*), Gestreepte witbol (*Holcus lanatus*), Gewone berenklaauw (*Heracleum sphondylium* subsp. *sphondylium*), Gewone smeerwortel (*Symphytum officinale*), Gewoon reukgras (*Anthoxanthum odoratum*), Grasmuur (*Stellaria graminea*), Grote ratelaar (*Rhinanthus angustifolius*), Kale jonker (*Cirsium palustre*), Knoopkruid (*Centaurea jacea*), Kruipend zenegroen (*Ajuga reptans*), Moerasrolklaver (*Lotus pedunculatus*), Moerasspirea (*Filipendula ulmaria*), Pinksterbloem (*Cardamine pratensis*), Rode klaver (*Trifolium pratense*), Scherpe boterbloem (*Ranunculus acris*) en Veldzuring (*Rumex acetosa*).

3.6.2 Populatieverjonging

In populatie Mortelen 3 (Hollands Diep) wordt jaarlijks veel verjonging waargenomen. Er is op dit perceel tevens veel activiteit van mollen te zien, juveniele planten van Knolsteenbreek worden veelvuldig op oude molshopen aangetroffen.

Op de afgeplagde en heringerichte percelen Mortelen 1 en 2 zijn de resultaten omtrent populatieverjonging wisselend. Op perceel Mortelen 1 is relatief veel verjonging waargenomen op verschillende plekken op het perceel, maar het kiemingsexperiment schetst een ander beeld met relatief lage aantallen kiemplanten (tabel 8). Op perceel Mortelen 2 was het aantal kiemplanten zowel in het kiemingsexperiment als daarbuiten relatief laag (tabel 9). Beide percelen zijn de afgelopen jaren heringericht en het is de vraag hoe de vegetatie zich de komende jaren verder zal gaan ontwikkelen. Gezien de groeiplaats van Knolsteenbreek op perceel Mortelen 2 sinds 2020 kleiner is geworden en er weinig kieming is waargenomen, is het mogelijk dat de soort hier op den duur zal verdwijnen.

Tabel 8 Resultaten kiemingsexperiment Mortelen 1

	Inzaai Open grond	Geen inzaai Open grond	Geen inzaai Kruidlaag
Aantal kiemplanten	5	6	2

Tabel 9 Resultaten kiemingsexperiment Mortelen 2

	Inzaai Open grond	Geen inzaai Open grond	Geen inzaai Kruidlaag
Aantal kiemplanten	6	3	7

3.6.3 Beheeradvies op maat

Alle percelen met Knolsteenbreek in de Mortelen worden 1 keer per jaar gemaaid in het najaar, waarbij het maaisel wordt afgevoerd. Perceel Mortelen 3 (Hollands Diep) wordt tevens gebruikt als bron van maaisel voor percelen in de omgeving. Een deel van de groeiplaats van Knolsteenbreek op dit perceel wordt dus effectief 2 keer per jaar gemaaid.

Aanbeveling: Op perceel Mortelen 3 (Hollands Diep) zien we Adelaarsvaren steeds verder het perceel inkomen wat duidt op verzuring van de bodem. Knolsteenbreek lijkt zich hier prima te handhaven met een vitale populatie, maar de situatie omtrent verzuring moet wel goed in de gaten gehouden worden. Daarnaast zien we op delen van dit perceel ook soorten die duiden op hoge voedselrijkdom. Het valt dus te overwegen om naast het afhalen van maaisel met zaden van Knolsteenbreek (circa 15% van het perceel) ook de rest van het perceel in de tweede helft van juni te maaien en daarmee extra voedingsstoffen af te voeren.

De andere twee percelen zijn nog in ontwikkeling, dat is duidelijk te zien aan de aanwezige storingsplanten, zoals Akkerdistel en Speerdistel. Hier moet het huidige beheer enkele jaren worden voortgezet om te zien hoe de vegetatie zich verder zal ontwikkelen.

3.7 De Oetert (Sang en Goorkens)

3.7.1 Beschrijving standplaats en begeleidende soorten

In het gebied Sang en Goorkens is Knolsteenbreek te vinden in de Oetert (figuur 13). Het gaat hier om vochtige beekdalgraslanden die onder invloed van de Kleine Aa behoorlijk vochtig kunnen zijn in het voorjaar. Het gebied wordt beheerd door Staatsbosbeheer en Knolsteenbreek is hier op verschillende percelen aangetroffen. In totaal gaat het om een populatie van ongeveer 1000 bloeiende planten, de grootste groeiplaats ligt in de noordoost hoek van het gebied met honderden bloeiende planten bij elkaar. Verder zijn er in het gebied kleinere groeiplaatsen te vinden met telkens tientallen bloeiende planten bij elkaar. Knolsteenbreek staat hier samen met soorten als Blauwe zegge (*Carex panicea*), Bosanemoon (*Anemone nemorosa*), Bosbies (*Scirpus sylvaticus*), Brede orchis (*Dactylorhiza majalis*), Echte koekoeksbloem (*Silene flos-cuculi*), Gestreepte witbol (*Holcus lanatus*), Gewone dotterbloem (*Caltha palustris* subsp. *palustris*), Gewone engelwortel (*Angelica sylvestris*), Gewone smeewortel (*Symphytum officinale*), Gewoon reukgras (*Anthoxanthum odoratum*), Grote ratelaar (*Rhinanthus angustifolius*), Holpijp (*Equisetum fluviatile*), Kale jonker (*Cirsium palustre*), Kleine valeriaan (*Valeriana dioica*), Kruipend zenegroen (*Ajuga reptans*), Lidrus (*Equisetum palustre*), Moerasrolklaver (*Lotus pedunculatus*), Moeraszegge (*Carex acutiformis*), Moesdistel (*Cirsium oleraceum*), Paardenhaarzegge (*Carex appropinquata*), Pinksterbloem (*Cardamine pratensis*), Rietorchis (*Dactylorhiza praetermissa*), Scherpe boterbloem (*Ranunculus acris*), Slanke sleutelbloem (*Primula elatior*), Tweerijige zegge (*Carex disticha*), Veldrus (*Juncus acutiflorus*)

en Veldzuring (*Rumex acetosa*).



Figuur 13 Hooiland met Knolsteenbreek in de Oetert, in het gebied Sang en Goorkens. Waarnemingen van Knolsteenbreek tussen 2014 en 2022 zijn aangegeven met rode stippen (bron: NDFF).

3.7.2 Populatieverjonging

In het gebied is op verschillende plekken verjonging waargenomen. Vooral in de buurt van grotere groeiplaatsen waren veel juveniele planten te zien. Ook het kiemingsexperiment liet zien dat Knolsteenbreek prima kan kiemen op deze locatie (tabel 10).

Tabel 10 Resultaten kiemingsexperiment de Oetert

	Inzaai Open grond	Geen inzaai Open grond	Geen inzaai Kruidlaag
Aantal kiemplanten	426	33	9

3.7.3 Beheeradvies op maat

De percelen in de Oetert worden 1 keer per jaar gemaaid in het najaar, waarbij het maaisel wordt afgevoerd.

Aanbeveling: Gezien de percelen in de Oetert relatief vochtig zijn is er weinig activiteit van mollen. De zode is op sommige plekken relatief dicht wat een negatief effect kan hebben op de kieming van zaden van graslandsoorten als Knolsteenbreek. Er kan worden overwogen om

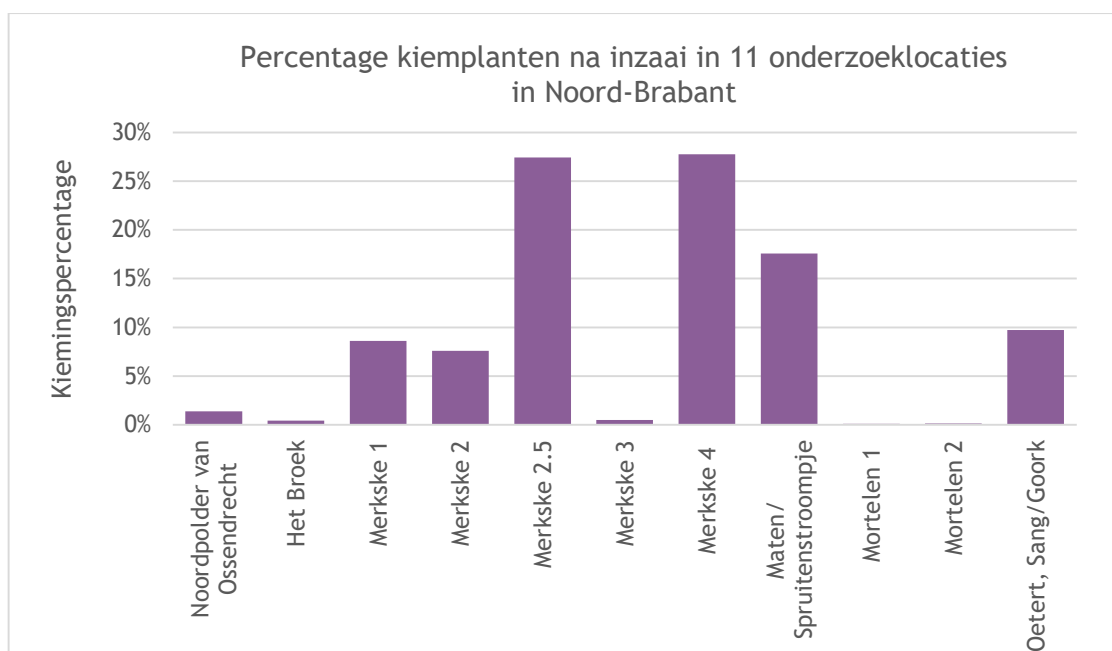
tijdens het maaien wat open plekken in de bodem te creëren om meer kansen voor kieming te bewerkstelligen. Deze open plekken kunnen worden gecreëerd door grof te maaien, waarbij de bodem af en toe wordt geraakt met de maaimachine.

4 Overzicht kieming en vestiging na één jaar

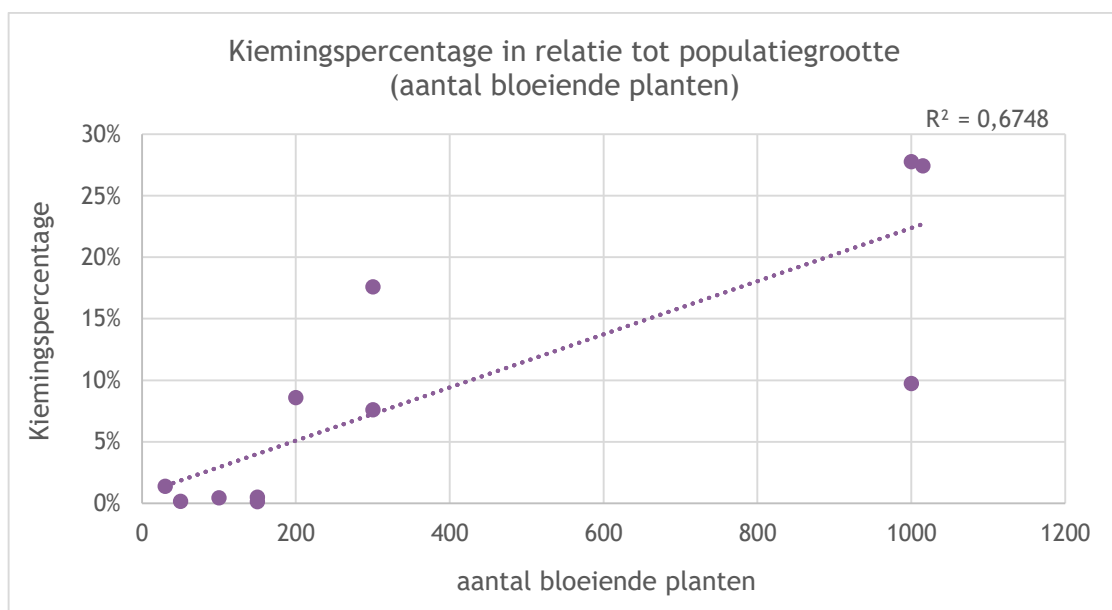
Wanneer er een vergelijking wordt gemaakt tussen de verschillende populaties van Knolsteenbreek op basis van het percentage kiemplanten (aantal planten/aantal ingebrachte zaden), dan zijn er grote verschillen te zien (0,1% tot 28%), zie figuur 14. Deze resultaten lijken verband te houden met het aantal bloeiende planten in de populatie waar het zaad vandaan komt (figuur 15). Het percentage gekiemde zaden vertoont een sterk verband met het aantal bloeiende planten in een populatie ($R^2 = 0.67$).

Opvallend is het lage kiemingspercentage op de locaties in de Mortelen, beiden 0,1%. Deze locaties wijken af omdat deze groeiplaatsen recent zijn ontstaan met zaden uit een zeer grote bronpopulatie Mortelen 3. Op locatie Mortelen 1 is relatief veel verjonging waargenomen buiten de proefvlakken van het kiemingsexperiment, maar op locatie Mortelen 2 was het aantal kiemplanten zowel in het kiemingsexperiment als daarbuiten relatief laag. Het is de vraag hoe de vegetatie en de groeiplaatsen van Knolsteenbreek zich op deze locaties de komende jaren verder zullen gaan ontwikkelen. Het lage kiemingspercentage (0,5%) op locatie Merkske 3 kan mogelijk verklaard worden doordat de zaaiplotjes zeer nat waren tijdens de eerste monitoringsronde. Wellicht is een te natte standplaats ongeschikt voor zaadkieming en vestiging. Dit verklaard mogelijk ook het lage kiemingspercentage in de Noordpolder van Ossendrecht (1,4%). De resultaten van het kiemingsexperiment in Het Broek/Chaamse bekengebied is dan weer opvallend omdat er meer kieming is waargenomen in het proefvlak waar géén zaden zijn ingezaaid dan in het proefvlak dat wel was ingezaaid (tabel 6). Mogelijk zijn deze resultaten te verklaren door uitspoeling van de gezaaide zaden na een regenbui, waarbij de zaden van het proefvlak 'inzaai, open grond' naar het proefvlak 'geen inzaai, open grond' zijn gespoeld. Het is dus goed mogelijk dat het geschatte kiemingspercentage voor deze populatie te laag is.

Het creëren van open plekken is gunstig voor de kieming van zaden, maar het resultaat is wisselend per onderzoekslocatie. Een verklaring hiervoor is mogelijk een combinatie van populatiegrootte met de daaraan gekoppelde genetische diversiteit én verschillen tussen de milieuomstandigheden tussen de bronpopulaties.



Figuur 14 Percentage kiemplanten (jonge plantjes) na uitzaai van zaden in opengemaakte proefvlakjes in 11 populaties van Knolsteenbreek in Noord-Brabant.



Figuur 15 Percentage kiemplanten (of jonge plantjes) in relatie tot het aantal bloeiende planten in de bronpopulatie voor Knolsteenbreek in Noord-Brabant.

5 Resultaten flow cytometrie

Binnen dit project is gekeken naar het ploëdieniveau van verschillende Knolsteenbreek populaties om mogelijke knelpunten voor het behoud van de soort in termen van genetische diversiteit en inteelt te kunnen onderzoeken. Wanneer de populaties in Noord-Brabant net als de Belgische populaties polyploid blijken te zijn (zie paragraaf 2.2), hebben deze een relatief hoge genetische diversiteit kunnen behouden en vallen problemen die samengaan met een verlies van genetische diversiteit niet te verwachten. Daarnaast is van sommige kleinere populaties in wegbermen of perceelranden onbekend of deze gekiemd zijn uit een historische zaadbank of zijn ingezaaid. Ingezaaide planten hebben mogelijk een ander ploëdieniveau dan de autochtone populaties. Kruisbestuiving tussen planten met een verschillend ploëdieniveau kan leiden tot bijvoorbeeld lagere zaadproductie of steriliteit van nakomelingen (Burton & Husband 2000; Husband & Sabara 2004). Informatie over het ploëdieniveau is tevens van belang als relictpopulaties in nabijgelegen bermen gebruikt worden voor het genetisch versterken van hooilandpopulaties.

Vanwege een onvoldoende beschikbaarheid aan vers bladmateriaal per plant was het niet mogelijk om voor alle onderzoekslocaties het DNA-gewicht te bepalen. Dit gold ook voor de planten uit België, die als extra referentiemateriaal zijn opgekweekt buiten het project om. De analyse beperkte zich daarom tot zes populaties op verschillende percelen in het Merkske en populatie Het Broek in het Chaamse bekengebied. Alle onderzochte locaties betroffen wilde populaties, waardoor het tevens niet mogelijk was om het ploëdieniveau van (ingezaaide) bermopulaties te bepalen.

Op iedere locatie is begin mei 2022 van 10-20 planten het jongste en meest groene blad verzameld. Van elke locatie zijn vier tot vijf monsters geanalyseerd op DNA-gewicht aan de hand van flow cytometrie. Ter referentie en optimalisatie van de flow cytometer is bladmateriaal gebruikt afkomstig van een bermopulatie in Amsterdam (Gooiseweg). Een uitgebreidere werkwijze van de analyse staat beschreven in bijlage 1.

De resultaten uit de flow cytometrie analyse laten duidelijk variatie zien in het relatieve DNA-gewicht binnen en tussen de verschillende locaties. De verschillen in het relatieve DNA-gewicht lijken bovendien overeen te komen met een verdubbeling en halve verdubbeling van de hoeveelheid DNA. Deze verdubbelingen kunnen mogelijk worden toegeschreven aan verschillen in ploëdieniveau. Zonder het absolute DNA-gewicht (in picogrammen) van de monsters te bepalen of het DNA-gewicht te vergelijken met referentiemateriaal van een plant met een bekend aantal chromosomenparen, kan echter geen uitspraak worden gedaan over het daadwerkelijke ploëdieniveau in de onderzochte populaties. Omdat de gehanteerde methode hiervoor niet geschikt was, zou naast het relatieve DNA-gewicht ook nog het aantal chromosomen per monster moeten worden vastgesteld.

Dat er variatie in ploëdieniveau binnen populaties is gevonden is zeer opmerkelijk, maar niet ongewoon. Het aantal chromosomen per celkern dat voor Knolsteenbreek uit de literatuur bekend is, vertoont grote variatie binnen de verspreiding van de soort (Rice et al. 2015, zie figuur 16), en zelfs binnen populaties (Redondo et al. 1996). Deze variatie, waarbij het ploëdieniveau van planten binnen een populatie (groeiplek) verschilt, heeft mogelijk wel consequenties voor

het functioneren van de populaties, omdat normaalgesproken een verschil in aantal chromosomen problemen geeft tijdens de reproductie (bevruchting).



Figuur 16 Verspreiding van chromosoomaantallen van Knolsteenbreek in Europa (bron: Redondo e.a. (1996))

Verschillen in ploëdieniveau geven geen problemen wanneer een soort zich voornamelijk vegetatief uitbreidt, waardoor planten zich op lokaal niveau kunnen blijven handhaven. Knolsteenbreek kan zich vegetatief vermeerderen via wortelknolletjes en aangenomen wordt dat deze manier van reproductie meer voorkomt dan seksuele vermeerdering via zaad (Lindgaard Hansen en Molau 1994). In een genetische studie naar Knolsteenbreek populaties in Vlaams-Brabant werden echter geen grote patches met genetisch identieke individuen aangetroffen, wat suggereert dat naast vegetatieve vermeerdering ook voortplanting via zaden een grote rol speelt in het voortbestaan van de populaties (van der Meer & Jacquemyn 2015b). Een andere mogelijkheid waarbij verschillende ploëdieniveaus naast elkaar in een populatie kunnen voorkomen is wanneer Knolsteenbreek zich voornamelijk via zelfbestuiving voortplant. Een laatste optie is apomixis (zelfbevruchting), maar dat is zeer onwaarschijnlijk gezien Knolsteenbreek zeer weinig zaden produceert wanneer bloemen niet bestoven worden (Walisch et al. 2012).

Wat de voornaamste manier van voortplanten is binnen de Brabantse Knolsteenbreek populaties is niet onderzocht binnen dit project. Het feit dat de Brabantse populaties zaden produceren, geeft in ieder geval wel voorzichtig aan dat de soort mogelijk geen negatieve gevolgen ondervindt voor seksuele uitbreiding. Dit geldt in ieder geval voor de populaties met veel bloeiende planten, want daar blijkt de vestiging uit zaad het hoogst (zie figuur 15). Problemen tijdens kieming en vestiging kunnen een gevolg zijn van de aanwezigheid van verschillende cytotypen waartussen seksuele voortplanting verhinderd is, omdat paring tussen twee ploëdieniveaus (bijv. diploïden met tetraploïden) kan leiden tot hybriden die minder vitaal

of steriel zijn (Certner et al. 2017). Het kan zijn dat er in grote populaties met veel bloeiende planten minder snel een mismatch is tussen verschillende cytotypes. Een belangrijke vraag is dus of populaties met verschillende cytotypen (planten met een verschillend ploëidieniveau) nu voornamelijk binnen hun ploëidyniveau nakomelingen produceren, mengen met andere niveaus of zelfbestuiven. Mogelijk heeft dit gevolgen voor de vitaliteit van de nakomelingen en dus het behoud van populaties Knolsteenbreek in Noord-Brabant.

6 Conclusie

Door zowel Cools (2009) als Luijten et al. (2016) werd een scherpe achteruitgang van Knolsteenbreek waargenomen in Noord-Brabant. Een nieuwe analyse van de verspreidingsdata van Knolsteenbreek in Noord-Brabant laat zien dat de soort tussen 2014 en 2022 in 91 km-hokken is aangetroffen (t.o.v. 65 km-hokken tussen 2002-2013). Deze toename is deels te verklaren door toegenomen waarnemersinspanning, onder andere ten behoeve van SNL-karteringen in natuurgebieden. Maar in verschillende gebieden is ook vastgesteld dat Knolsteenbreek simpelweg weer is toegenomen, bijvoorbeeld door uitgevoerde natuurherstelmaatregelen zoals in de Mortelen. Het lijkt er dus op dat de scherpe achteruitgang in Noord-Brabant is gestabiliseerd en de soort in verschillende gebieden met een vitale populatie aanwezig is in hooilanden.

Open plekken in de zode zijn essentieel voor kieming van de zaden van graslandsoorten als Knolsteenbreek. Wanneer de zode vrij dicht is en er onvoldoende activiteit van mollen wordt waargenomen, is het noodzakelijk om open plekken te creëren door bijvoorbeeld tijdens het maaien af en toe de grond te raken met de maaimachine. Een ander mogelijkheid is om handmatig, verspreid over het perceel kleine open plekjes te creëren, bij voorkeur voordat de planten hun zaden verspreiden. Door deze open plekken te creëren zorg je ervoor dat er altijd ruimte is voor zaadkieming en dus voor populatieverjonging.

In verschillende gebieden is ons opgevallen dat faunastroken flinke verruiging kunnen veroorzaken. Wij zijn ons bewust van het belang van faunastroken, maar willen dat de noden van planten hierbij niet over het hoofd worden gezien. Wij pleiten ervoor om stukken met een kwetsbare vegetatie zo mogelijk te ontzien bij het kiezen van locaties voor de faunastroken en dat voedsel en schuilgelegenheden voor dieren vooral op gebiedsniveau voldoende aanwezig moeten zijn, in plaats van op elk individueel perceel. Verruiging kan er namelijk voor zorgen dat kwetsbare plantensoorten achteruitgaan en deze effecten zijn niet zomaar terug te draaien. Daarom hopen wij dat er kritisch gekeken wordt naar het plaatsen van faunastroken op percelen met veel kwetsbare plantensoorten.

De resultaten uit de flow cytometrie leiden niet direct tot een advies voor beheer, voornamelijk omdat er nog veel onduidelijk is. Het is niet bekend wat de gevolgen van de gedetecteerde variatie in DNA-gewicht zijn voor de vitaliteit van de verschillende populaties met betrekking tot hun aanpassingsvermogen aan de leefomgeving, het klimaat en het gevoerde beheer. De flow cytometrie resultaten impliceren wel dat er zeer voorzichtig omgesprongen moet worden met het (eventueel) genetisch versterken van (kleine) populaties van Knolsteenbreek in Noord-Brabant. Genetische versterkingen kunnen alleen worden uitgevoerd wanneer men voldoende kennis heeft over de ploïdieniveaus van de populaties in kwestie. De resultaten geven dus aanleiding tot vervolgonderzoek waarin het daadwerkelijk ploïdieniveau kan worden achterhaald waardoor de kans op mogelijke barrières voor de overleving en vestiging in bestaande en/of op nieuwe locaties beter kan worden ingeschat. Binnen een dergelijk onderzoek kunnen tevens meer individuen per populatie en meer locaties worden meegenomen, zodat de totale variatie binnen populaties beter kan worden onderzocht en duidelijk wordt in hoeverre de populaties in Chaam en het Merkske zich verhouden tot de andere Brabantse populaties.

7 Literatuur

Burton, T.L. & Husband (2000) Fitness differences among diploids, tetraploids, and their triploid progeny in *Chamerion angustifolium*: mechanisms of inviability and implications for polyploid evolution. *Evolution*, 54: 1182-1191.

Certner M., E. Fenclová, P. Kúr, F. Kolar, P. Koutecky, A. Krahulcova & J. Suda (2017) Evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations in an annual herb: dispersal, local persistence and recurrent origins of polyploids. *Annals of Botany* 120: 303-315.

Cools (2009) Beschermingsplan voor de knolsteenbreek in de provincie Noord-Brabant. Rapport Ecologisch Adviesbureau Cools.

Galbraith DW, Lambert GM, Macas J & Dolezel J (1997) Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *Current Protocols in Cytometry*, 2: 5-7.

Husband, B.C. & H.A. Sabara (2004) Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist*, 161: 703-713.

Luijten, S.H., J.G.B. Oostermeijer, J.E. Dijkhuis en L. Sparrius (2016) Brabantse planten in de knel: Actiepunten urgent bedreigde planten in Noord-Brabant. Stichting Science4Nature, Amsterdam.

van der Meer, S., J.K.J. Van Houdt, G.E. Maes, B. Hellemans & H. Jacquemyn (2014) Microsatellite primers for the gynodioecious grassland perennial *Saxifraga granulata* (Saxifragaceae). *Applications in Plant Sciences*, 2 (9): 1400040.

van der Meer, S. & H. Jacquemyn (2015a) The effect of phenological variation in sex expression on female reproductive success in *Saxifraga granulata*. *American Journal of Botany*, 102 (12): 2116-2123.

van der Meer, S. & H. Jacquemyn (2015b) Genetic diversity and spatial genetic structure of the grassland perennial *Saxifraga granulata* along two river systems. *PLoS ONE*, 10 (6): e0130463.

Lindgaard Hansen, J.E. & U. Molau (1994) Pollination biology, mating system, and seed set in a Danish population of *Saxifraga granulata*. *Nordic Journal of Botany*, 14: 257-268.

Marie D. & S.C. Brown (1993) A Cytometric Exercise in Plant DNA Histograms with 2C Values for 70 Species. *Biology of the Cell*, 78: 41-51.

Redondo, N., M. Horjales, S. Brown & C. Villaverde (1996) Biometric and cytometric study of nuclear DNA within *Saxifraga granulata* L. *Boletim da Sociedade Broteriana*, 67: 287-301.

Rice, A. Glick, L., Abadi, S. Einhorn, M., Kopelman, N.M. e.a. (2015) The Chromosome Counts

Database (CCDB) – a Community Resource of Plant Chromosome Numbers. *The New Phytologist*, 206 (1): 19-26.

Schaminée, J.H.J., R. Haveman, S.M. Hennekens, M. Horsthuis, J.A.M. Janssen, I. de Ronde, N.A.C. Smits, K.V. Sykora (2019). *Veldgids Plantengemeenschappen van Nederland*. KNNV uitgeverij.

Sparrius L., B. Odé & R. Beringen (2014) Basisrapport Rode Lijst vaatplanten 2012 volgens Nederlandse en IUCN criteria. FLORON, Nijmegen.

Walisch T.J., G. Colling, M. Poncelet & D. Matthies (2012) Effects of inbreeding and interpopulation crosses on performance and plasticity of two generations of offspring of a declining grassland plant. *American journal of Botany*, 99 (8): 1300-1313.

Weeda E.J., R. Westra, C. Westra, T. Westra (1985) *Nederlandse Oecologische Flora: wilde planten en hun relaties*. IVN/VARA.

Zonneveld B.J.M. (2019) The DNA Weight per Nucleus (Genome Size) of More than 2350 Species of the Flora of the Netherlands, of which 1370 are New to Science, Including the Pattern of their DNA peaks. *Forum Geobotanicum* 8: 24-78.

Bijlage 1. Flow cytometrie: materiaal, methode en analyse

Materiaal - Binnen de projectduur bleven de opgekweekte plantjes uit de verschillende onderzoekslocaties te klein voor analyse. Na aankomst in Amsterdam is gewacht met de analyse in de hoop dat de plantjes zouden groeien in de kas. De planten zijn uiteindelijk buiten geplaatst, omdat deze geïnfecteerd werden of al waren door trips. Het samenvoegen van meerdere kleine blaadjes per monster leek onverstandig, omdat al bekend was dat populaties van Knolsteenbreek binnen Europa mogelijk uit meerdere ploëdieniveaus bestaan. De aantasting van het blad gold ook voor de Belgische planten waarvan aanvankelijk werd aangenomen dat het octoploïde planten waren. De planten gaan in mei in rust, vers bladmateriaal is dus maar kort beschikbaar. De potjes met de opkweek van de verschillende locaties staan buiten in de proeftuin bij Science4Nature.

Methode en analyse - Het protocol dat is gebruikt om het relatieve DNA-gewicht te bepalen is deels gebaseerd op de methode van Galbraith et al. (1997). Van elk monster is 1 cm² blad gedurende 30 seconden met een scherp mesje fijngehakt in een plastic petrischaal na toevoeging van 500 µL op ijs gekoelde extractiebuffer (Cystain® UV Precise T, Sysmex). De hoeveelheid bladmateriaal, tijd en intensiteit van het hakken zijn empirisch bepaald. Na elke vier tot vijf monsters is een nieuw mesje gebruikt zodat de scherpheid ervan behouden bleef. Om de celkernen voldoende te kunnen isoleren, is het fijngehakte bladmateriaal voor nog eens 30 seconden in de extractievloeistof geïncubeerd door de petrischaal schuin te houden. De kernoplossing is vervolgens gefilterd door een 30 of 50 µM CellTrics® filter. De celkernen zijn gekleurd in 1 mL ijskoude kleuringsbuffer (Cystain® UV Precise T, Sysmex) met de fluorochroom DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindool). De oplossing is gehomogeniseerd door een aantal keer op en neer te pipeteren. De optimale kleurtijd is voor iedere soort anders en is daarom van tevoren experimenteel bepaald. Alle monsters zijn na zeven minuten gerund op een Partec (PA I systeem) flow cytometer van de Universiteit van Amsterdam. Als kwaliteitscontrole en om de consistentie en lineariteit tussen runs vast te kunnen stellen, is aan elk monster 160 µL standaard (DNA Control UV, Sysmex) toegevoegd. Deze standaard bevatte fluorescent gelabelde rode bloedcellen (erythrocyten) van regenboogforel. De optimalisatie van de flow cytometer en interpretatie van resultaten is gedaan met hulp van Rob Bregman (oud analist, Universiteit van Amsterdam).

Analyse - Het bladmateriaal van locatie Merkske 2 bleek van mindere kwaliteit te zijn, waardoor slechts een enkel monster bruikbare spectra opleverde. De kwaliteit van de spectra in termen van spreiding (CV) viel over het algemeen redelijk te noemen. De CV-waardes varieerden van 0,87 tot 8,54 (zie tabel 11). In de regel zijn CV-waardes kleiner dan 5% nog aanvaardbaar. Grote CV-waardes kunnen mogelijk wijzen op aanwezigheid van secundaire plantenstoffen of inconsistente kleuring van celkernen. Het aantal celkernen dat door de flow cel werd gedetecteerd varieerde van 150 tot 2.000.

De histogrammen van alle samples lieten een enkele piek zien waaruit blijkt dat er geen variatie in DNA-gewicht is gevonden binnen individuen. Hierdoor zijn er geen aanwijzingen voor de aanwezigheid van een verschillend aantal chromosoom paren (optreden van endopolyploidie) of samengekleefde celkernen. Dit komt overeen met wat eerder is gevonden voor knolsteenbreek in Nederland (Zonneveld, 2019).

De positie van de waargenomen pieken komt overeen met het DNA-gewicht (in termen van fluorescentie) per kern van een somatische cel die niet in celdeling is. Deze piek wordt ook wel de 2C piek genoemd. Van elk sample is de relatieve positie van de (2C) piek ten opzichte van de eerste piek van de interne standaard bepaald, door de gemiddelde fluorescenties (kanaal nummers) van beide pieken op elkaar te delen (sample/standaard). Het gebruik van een ratio is over het algemeen robuuster tegen variatie in piekpositie tussen runs als gevolg van instabiliteit van het systeem, een verschil in instellingen of inconsistenties tijdens het kleuringsproces (Marie & Brown, 1993).

Tabel 11 Gemiddelde fluorescentie (kanaal nummer), coëfficiënt van variatie (CV) en relatieve 2C positie voor alle onderzochte monsters. De coëfficiënt van variatie (CV) geeft de spreiding van de (2C) piek als percentage van de gemiddelde fluorescentie.

Sample	Locatie	Gemiddelde	CV %	Relatieve 2C positie
A-1	Amsterdam	247,48	1,52	0.89
Ch-1	Het Broek	-	-	-
Ch-2	Het Broek	210,80	1,30	0.90
Ch-3	Het Broek	149,28	8,54	0.70
Ch-4	Het Broek	241,92	1,34	0.97
M1-1	Merkske 1	258,09	0,87	1.00
M1-2	Merkske 1	175,80	3,84	0.78
M1-3	Merkske 1	183,40	5,32	0.71
M1-4	Merkske 1	252,60	1,68	1.00
M1-5	Merkske 1	251,77	1,89	1.00
M2-1	Merkske 2	172,97	6,21	0.76
M2.5-1	Merkske 2.5	211,25	1,54	0.90
M2.5-2	Merkske 2.5	253,60	2,27	1.00
M2.5-3	Merkske 2.5	154,14	5,35	0.70
M2.5-4	Merkske 2.5	174,88	5,00	0.77
M3-1	Merkske 3	259,53	1,06	0.92
M3-2	Merkske 3	-	-	-
M3-3	Merkske 3	158,57	5,52	0.74
M3-4	Merkske 3	177,03	3,25	0.78
M4-1	Merkske 4	164,36	3,80	0.74
M4-2	Merkske 4	157,00	4,62	0.72
M4-3	Merkske 4	226,76	1,43	0.95
M4-4	Merkske 4	152,46	5,74	0.69
M5-1	Merkske 5	181,78	3,16	0.80
M5-2	Merkske 5	152,90	4,74	0.68
M5-3	Merkske 5	158,53	4,89	0.72
M5-4	Merkske 5	180,85	3,18	0.79

FLORON

Toernooiveld 1, 6525 ED Nijmegen
Postbus 9010, 6500 GL Nijmegen

T: 024 - 7 410 660 (alg.)
www.floron.nl

