

In de voetsporen van de eik, post

Barbara van Dam & Sven de Vries

De laatste ijstijd en de daarop volgende herkolonisatie van planten en dieren hebben een belangrijke rol gespeeld bij de huidige geografische verspreiding van de genetische variatie in natuurlijke populaties in Europa.

Veel soorten, waaronder de eiken, overleefden de laatste ijstijd in refugia in Zuid-Europa. Ongeveer 13.000 jaar geleden begon de herkolonisatie. Tijdens het verblijf in de refugia ontstonden door mutaties in het chloroplast DNA haplotypen. Uit de huidige geografische verspreiding van deze haplotypen in Europa zijn de migratieroutes te herleiden. Eiken die zich na de laatste ijstijd spontaan hebben gevestigd in Nederland zijn autochtoon.

Met behulp van een werkmethode, ontwikkeld door Maes (1993, dit nummer), kan worden vastgesteld welke populaties mogelijk autochtoon zijn. Daarna kan met behulp van DNA onderzoek een gedetailleerder beeld worden verkregen en met meer zekerheid een uitspraak worden gedaan over het autochtone karakter van de populaties.

Autochtone populaties van Zomer- en Wintereik in Nederland

De Zomereik (*Quercus robur*) en de Wintereik (*Q. petraea*) zijn nauwverwante soorten en hun verspreidingsgebieden in Europa zijn nagenoeg overlappend. Alhoewel zij ecologische verschillen vertonen, komen zij vaak gemengd voor. In deze gemengde bossen komt hybridisatie voor tussen beide soorten. Ook in Nederland komen hybriden (*Q. x rosacea*) voor (Ietswaart & Feij, 1989).

De soorten zijn voor Nederland autochtoon, dat wil zeggen dat zij zich hier na de laatste ijstijd spontaan hebben gevestigd en zich daarna slechts natuurlijk hebben verjongd, of kunstmatig verjongd zijn met strikt lokaal oorspronkelijk materiaal (OECD, 1974).

Toch zijn de meeste eiken in Nederland niet autochtoon. Sinds eeuwen worden eiken in Nederland aangeplant. Vooral de Zomereik was belangrijk voor de Nederlandse bos- en landschapsbouw. Soms werd gebruik gemaakt van lokaal plantmateriaal, maar meestal werd gebruik gemaakt van uitgangsmateriaal uit West-Duitsland en Oost-Europa

(Oosterbaan, 1988). De reden hiervoor was dat de eiken van deze herkomsten een betere vorm hadden en sneller groeiden. De Oost-Europese herkomsten hadden bovendien een frequentere zaaddracht en een lagere zaadprijs. De autochtone populaties van de Zomer- en Wintereik (foto 1 & 2) zijn nagenoeg verdwenen.

De noodzaak om autochtone genenbronnen te beschermen en te behouden is op internationaal niveau erkend en vastgelegd tijdens de Ministersconferenties voor de bescherming van de Europese bossen in Straatsburg en Helsinki (De Vries, in druk).

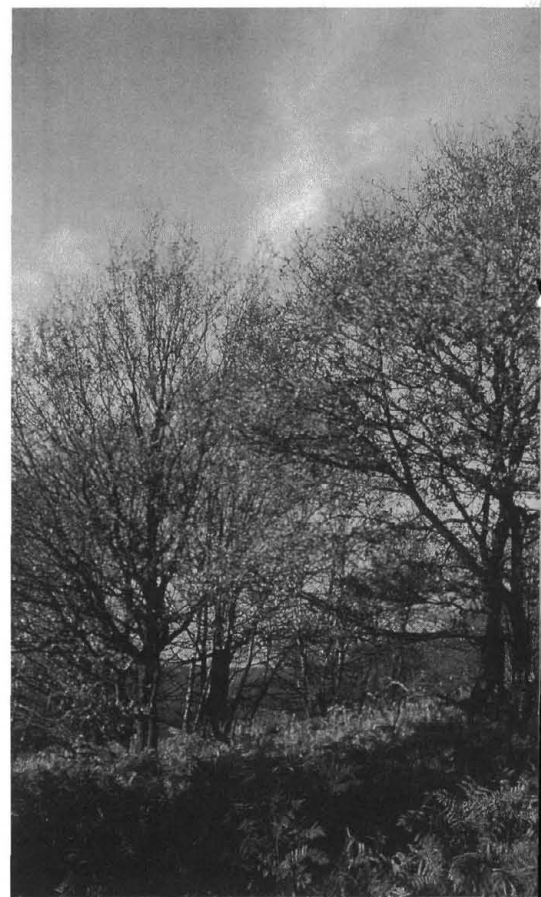
Niet alleen bij natuurbeschermers, maar ook bij bosbeheerders groeit de interesse in autochtoon materiaal. Het gebruik van dit uitgangsmateriaal zal de natuurwaarde en de duurzaamheid van hun bossen verhogen.

Uitgangspunt daarbij is dat autochtone eiken beter zijn aangepast aan de Nederlandse omstandigheden en het vermogen hebben om zich aan te passen aan de veranderingen die in de toekomst kunnen optreden.

Spontane vestiging na de laatste ijstijd

De Europese eiken overleefden de laatste ijstijd in refugia in Zuid-Spanje, Zuid-Italië en de Balkan. Ongeveer 13.000 jaar geleden begon de herkolonisatie van Europa.

Het tijdstip en de snelheid waarmee de eiken Europa koloniseerden na de laatste ijstijd kan worden beschreven met behulp van pollen data (Huntley & Birks, 1983). Maar aan deze methode kleven





glaciale herkolonisatie-routes



ar het een belangrijke rol heeft
bij de verspreiding van de eiken
troducuctie in de 18e eeuw.

nadelen. Zo kan de eerste kolonisatie slechts enkele individuen hebben omvat en kan de relatief kleine hoeveelheid pollen van deze individuen niet teruggevonden zijn tussen de overige fossiele pollen. Pollen werden uitsluitend bewaard in de veenrijke, lager gelegen gebieden en de pollen van de verschillende eikensoorten zijn heel moeilijk van elkaar te onderscheiden.

Zowel uit simulatiemodellen (Le Corre et al., 1997) als uit het pollenonderzoek blijkt dat de eiken zich heel snel, tot 500 meter per jaar, hebben verspreid over Europa. Evolutionisten gaan ervan uit dat de eerste kolonisten Zomereiken waren en dat de Wintereiken later volgden. Ook nu nog is de Wintereik in staat om de Zomereik te beconcurreren. De ecofysiologische verschillen tussen de soorten zijn verantwoordelijk voor deze successie (Rameau, 1990).

Om de huidige genetische structuur te kunnen verklaren moet worden aangenomen dat er, naast de voor de hand liggende diffuse verspreiding over korte afstand, uitzonderlijke gevallen van verspreiding over relatief grote afstand (tenminste 50 km) plaats moeten hebben gevonden. Deze gebeurtenissen hebben bijgedragen aan de hoge snelheid van invasie.

Bekend is dat de Vlaamse gaai een belangrijke rol speelt bij het transport van eikels over grotere afstand (Bossema, 1979), maar deze kan een eikel niet verder dan maximaal 20 km verplaatsen. Het transport van eikels via het water is heel goed mogelijk, zeker voor de vochtminnende Zomereik. Dit proces is beschreven in Zuid-Afrika (Knight, 1985) waar het een belangrijke rol heeft gespeeld bij de verspreiding van de eiken na hun introductie in de 18e eeuw.

van ieder gridpunt wordt een mogelijk autochtone populatie van eiken onderzocht op de aanwezigheid van de haplotypen.

ten, waaronder de eik, erft het chloroplast DNA uitsluitend over via de moeder. Daarom is het meer onderhevig aan genetische drift dan het DNA in de celkern en meer geschikt voor de studie naar de verspreiding van zaden.

Een inventarisatie van de variatie die voorkomt in het chloroplast DNA van eiken toonde aan dat deze variatie een duidelijke geografische structuur heeft en de patronen overeenkomen met de herkolonisatie routes van de soorten (Petit et al., 1993). De variatie in het chloroplast DNA is ontstaan door mutaties tijdens het verblijf in de refugia. Met behulp van deze mutaties kunnen varianten (haplotypen) worden gedefinieerd. Een aantal haplotypen heeft zich uitgebreid naar het noorden van Europa, andere zijn achtergebleven in het zuiden (Dumolin-Lapègue et al., 1997).

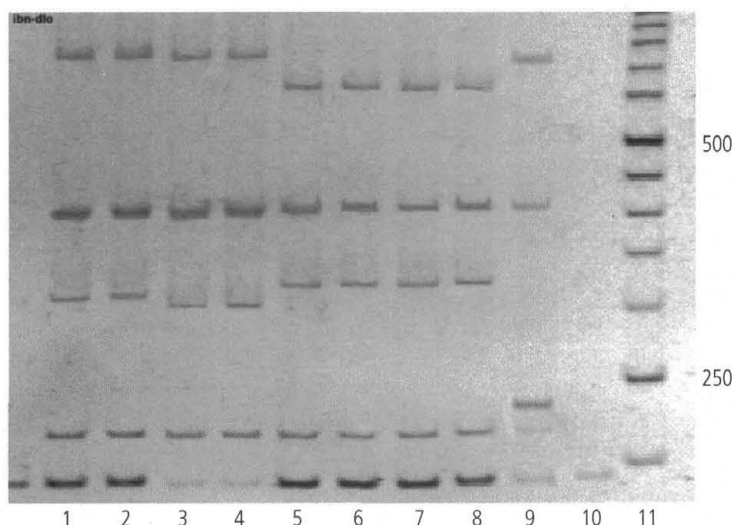
Bovendien komt in grote gebieden maar één haplotype voor, ook in gemengde populaties van Zomer- en Wintereik. Dit is het gevolg van de verspreiding over grote afstand. De nakomelingen van de eerste boom hebben allemaal haar chloroplast DNA. Omdat uit gecontroleerde kruisingen tussen beide soorten blijkt dat alleen de Zomereik als moederboom kan fungeren (Steinhoff, 1993), kan worden verondersteld dat de Wintereik zich via stuifmeel heeft gevestigd in de populatie.

In het kader van een Europees project, mede gefinancierd door de Europese Unie, wordt deze globale inventarisatie momenteel uitgebreid met honderden datapunten. Over de negen deelnemende landen is een gridpuntenstelsel van 50 x 50 km uitgezet en in de nabije omgeving van ieder gridpunt wordt een mogelijk autochtone populatie van eiken onderzocht op de aanwezigheid van de haplotypen.



1985)
gespeel
na hun

Fig. 1. RFLP-patronen: Polyacrylamide gel met haplo-typen oorspronkelijk afkomstig uit Zuid-Spanje (laan 3,4), Italië (laan 5 t/m 8) en de Balkan (laan 9).



- △ Quercus robur, Spaanse lijn
- ▲ Quercus robur, Balkan lijn
- ▲ Quercus robur, Italiaanse lijn
- Quercus petraea, Spaanse lijn
- ⊙ Quercus petraea, Balkan lijn
- Quercus petraea, Italiaanse lijn

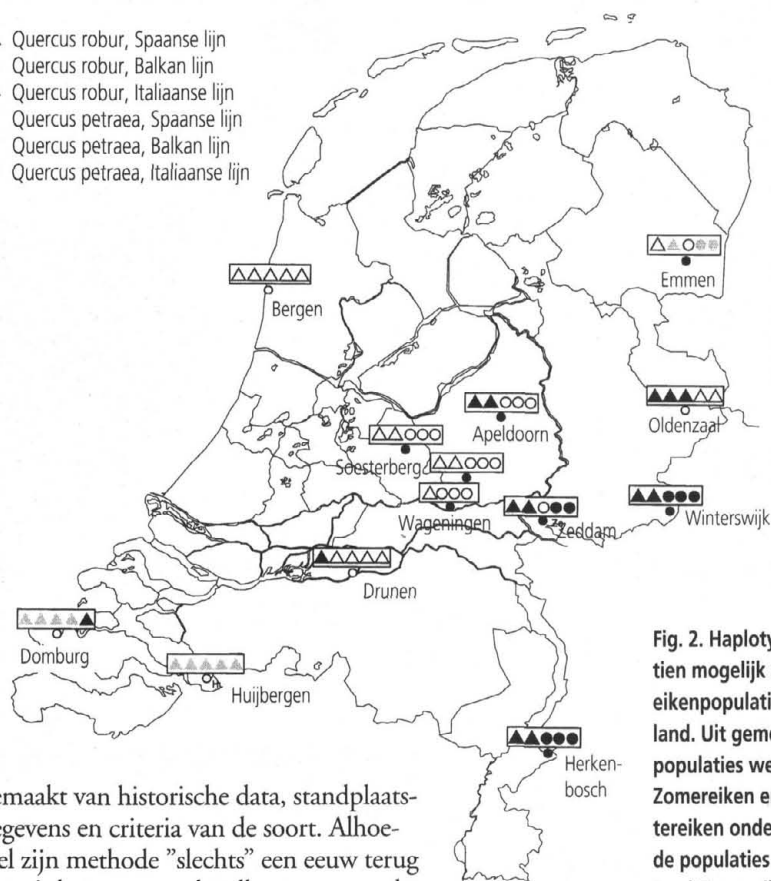


Fig. 2. Haplotypen in dertien mogelijk autochtone eikenpopulaties in Nederland. Uit gemengde populaties werden twee Zomereiken en drie Wintereiken onderzocht; uit de populaties met uitsluitend Zomereiken werden vijf eiken onderzocht.

gemaakt van historische data, standplaatsgegevens en criteria van de soort. Alhoewel zijn methode "slechts" een eeuw terug gaat, is het een waardevolle eerste aanpak. De volgende stap is een chloroplast DNA onderzoek, waarbij wordt nagegaan of de eiken uit deze populaties nakomelingen zijn van eiken die zich na de laatste ijstijd spontaan hebben gevestigd in Nederland. De variatie binnen een populatie is heel klein, meestal is er maar één haplo-type aanwezig in zowel de Zomer- als de Wintereik. Dit betekent dat beide soorten in de populatie afstammen van dezelfde moeder.

Het haplo-type wordt bepaald met behulp van een DNA techniek die wordt aangeduid als PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism).

Om het haplo-type van een boom vast te stellen is slechts een klein monster nodig, bijvoorbeeld vijf knoppen of een halve vierkante centimeter blad is al vol-

doende. Het weefsel wordt fijngemalen en het DNA wordt uit de chloroplasten gehaald en gezuiverd.

Met de universele chloroplast primersets: tRNA-Asp (GUC) - tRNA-Thr (GGU) en tRNA-Thr (UGU)-tRNA-Phe (GAA) wordt specifiek een gedeelte van het chloroplast DNA vermeerderd. Met enzymen, resp. TaqI en HinfI, die het DNA op een vaste plaats knippen (restrictie-enzymen) wordt het PCR product in kleinere fragmenten geknipt. Het mengsel van fragmenten wordt met behulp van polyacrylamide gel elektroforese gescheiden op basis van hun lengte. Na kleuring zijn de fragmenten zichtbaar als een streepjescode (RFLP-patroon). Mutaties die de lengte van de fragmenten veranderen uiten zich in een gewijzigd patroon dat karakteristiek is voor een bepaald haplo-type (fig. 1).

Haplotypen in autochtone populaties in Nederland

Voor ons onderzoek (Van Dam et al., 1996) zijn we uitgegaan van populaties die door Maes als mogelijk autochtoon zijn gekarakteriseerd. Dit bestand werd aangevuld met autochtone populaties uit andere bronnen. In totaal werden dertien populaties uitgezocht die verspreid liggen over Nederland (fig. 2). Acht van deze populaties bestaan uit Zomer- en Wintereik, vijf populaties bestaan uitsluitend uit Zomereik. Uit iedere gemengde populatie werden twee Zomereiken en drie Wintereiken onderzocht met de hiervoor beschreven PCR-RFLP methode. Uit de populaties van uitsluitend Zomereik werden ad random vijf eiken op dezelfde wijze onderzocht.

De resultaten van dit onderzoek tonen aan dat in Nederland drie haplotypen voorkomen (fig. 1). Deze haplotypen zijn dus nakomelingen van bomen uit de refugia in Spanje, Italië en de Balkan. De 'Spaanse lijn' overheerst in het westen en de 'Italiaanse lijn' in het oosten van Nederland. Beide lijnen ontmoeten elkaar in Nederland.

In vijf gemengde populaties hadden de Zomer- en Wintereik hetzelfde haplo-type. Dit bewijst dat ze tot één oorspronkelijke populatie behoren. De populaties in Soesterberg, Ede en Wageningen behoren tot de Spaanse lijn en de populaties in Herkenbosch en Winterswijk zijn oorspronkelijk afkomstig uit Italië. De populatie Zomereiken in Bergen bestaat uit de Spaanse lijn.



De Spaanse en Italiaanse lijn hebben zich, zonder enige twijfel, spontaan gevestigd in Nederland. De zes hiervoor genoemde populaties zijn dus autochtoon.

In Apeldoorn hebben de Zomer- en de Wintereik verschillende haplotypen. In Zeddam heeft één van de Wintereiken een afwijkend haplotype en in Oldenzaal en Drunen werden in het verleden autochtone Zomereiken van tenminste twee populaties vermengd. Beide haplotypen in deze populaties zijn weliswaar autochtoon, maar ze zijn in het verleden kunstmatig vermengd en op grond daarvan niet autochtoon. Aangezien Drunen en Apeldoorn min of meer op de grens liggen waar de lijnen elkaar ontmoeten in Nederland is het mogelijk dat het geïntroduceerde materiaal van lokale oorsprong was, maar uit de resultaten blijkt nu dat deze richtlijn voor het grensgebied niet altijd opgevolgd kan worden.

In Domburg en Huijbergen komt de 'Balkanlijn' voor. Op basis van de huidige kennis is deze lijn niet autochtoon. Emmen is een gemengde populatie en op grond daarvan niet autochtoon.

Kanttekeningen bij de resultaten en conclusies

De resultaten van dit onderzoek geven aan dat de werkmethode van Maes een waardevolle methode is. Acht van de dertien populaties zijn inderdaad autochtoon. Aanvullend DNA onderzoek geeft een gedetailleerder beeld en kan vermenigvuldiging van populaties aantonen. Beide methoden zijn noodzakelijk om snel en betrouwbaar autochtone populaties op te sporen. Met deze aanpak is het mogelijk om binnen enkele jaren tot richtlijnen en strategieën voor het behoud en de herintroductie van autochtoon genenmateriaal van eik te komen.

Begin 1998 komen alle deelnemers van het internationale project bij elkaar en tijdens dit congres zal duidelijk worden hoe we moeten omgaan met het materiaal dat oorspronkelijk afkomstig is uit de Balkan. Ook in Frankrijk wordt deze lijn tot aan de westkust gevonden. België wordt momenteel geïnventariseerd en de mogelijk autochtone eikenpopulaties worden tevens onderworpen aan DNA onderzoek. Uit de resultaten van dit onderzoek zal blijken of het Balkan-type ook voorkomt in België.

Theoretisch is het dan mogelijk dat de Balkanlijn via de noordgrens van de

Alpen naar West-Europa is gemigreerd en daarna verder is getrokken in noordelijke richting en mogelijk in Zuid-West Nederland zijn meest noordelijke verspreiding heeft. Als dit het geval is dan zijn de populaties in Domburg en Huijbergen toch autochtoon. De populatie in Emmen zou dan uit de 'Spaanse lijn' bestaan, maar is in het verleden vermengd met het Balkan-type.

Verder onderzoek

De volgende stap om tot goede richtlijnen te komen voor het behoud van autochtone genenbronnen is het vaststellen van de genetische diversiteit binnen populaties. De resultaten van dit onderzoek moeten aantonen of de diversiteit in Nederland nog voldoende is om het uitgangspunt van duurzaamheid waar te maken.

Maar wat is voldoende? Om hier een uitspraak over te doen moet onderzocht worden welke strategie eiken hebben aangewend om de veranderingen tijdens de laatste millennia het hoofd te bieden.

In de uitgestrekte autochtone eikenpopulaties van bijvoorbeeld Frankrijk wordt een grote genetische diversiteit gevonden. Zowel op basis van morfologische en fenologische kenmerken, maar ook op basis van isozym-analyse en DNA onderzoek. Voor een lang levend organisme als eik is dit een begrijpelijke strategie. De kans op wisselende omstandigheden is groot en de eiken die het best kunnen inspelen op deze veranderingen hebben de grootste kans om te overleven en nakomelingen voort te brengen.

Literatuur

- Bossema, I., 1979.** Jays and oaks; An eco-ethological study of a symbiosis. *Behaviour* 70: 11-17.
- Corre, V. le, N. Machon, R. Petit & A. Kremer, 1997.** Colonization with long-distance seed dispersal and genetic structure of maternally inherited genes in forest trees: a simulation study. *Genetic Research* 69: 117-125.
- Dam, B.C. van, S.M.G. de Vries & A. Oosterbaan, 1996.** Nieuw onderzoek Nederlandse eiken: behoud van inheemse bomen. *Nederlands Bosbouw Tijdschrift* 68: 190-193.
- 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.
- Huntley, G.M. & H.J.B. Birks, 1983.** An Atlas of past and present pollen maps for Europe, 0-13,000 years ago. Cambridge University Press, U.K.
- Ietswaart, J.H. & A.E. Feij, 1989.** A multivariate analysis of introgression between *Quercus robur* and *Q. petraea* in the Netherlands. *Acta Botanica Neerlandica* 38: 313-325.
- Knight, R.S., 1985.** A model of episodic, abiotic dispersal for oaks (*Quercus robur*). *South Africa Journal of Botany* 51: 265-269.
- 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.
- OECD, 1974.** Scheme for the control of forest reproductive material moving in international trade. Paris.
- Oosterbaan, A., 1988.** Teelt van Zomer- en Wintereik in Nederland. *Nederlands Bosbouw Tijdschrift* 60: 287-298.
- Petit, R.J., A. Kremer & D.B. Wagner, 1993.** Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theoretical Applied Genetics* 87: 122-128.
- Rameau, J.C., 1990.** Comportement dynamique du chene pedoncule et du chene sessile dans les successions forestieres. *Revue Forestieres Francaises* 42: 155-164.
- Steinhoff, S., 1993.** Results of species hybridization with *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt) Liebl. *Annales des Sciences Forestieres* 50: 137s-142s.
- Vries, S.M.G. de, in druk.** Activities concerning Genetic Resources of social hardwoods in The Netherlands. In: EUFORGEN report of first network meeting Social Hardwoods. Bordeaux, 23-25 Oct. 1997.

Summary

Footprints of postglacial recolonization by oaks

The restriction patterns of two chloroplast fragments, amplified by PCR with universal primers were studied to determine the haplotypes present in thirteen autochthonous populations in The Netherlands.

Three haplotypes are present in these populations originating from refugia in Southern Spain, Italy and the Balkans. The Spanish and Italian lineages are autochthonous for The Netherlands, the lineage from the Balkans is probably not autochthonous. The lineage, originating from Spain is dominant in the west part of the country and the Italian lineage in the eastern parts. Six populations were autochthonous, four populations consist of a mixture of at least two populations. Three populations are probably not autochthonous.

Future research concerning the genetic diversity within populations will elucidate the consequences for conservation and re-introduction strategies.

Drs. B.C. van Dam & Ir. S.M.G. de Vries
IBN-DLO
Postbus 23
6700 AA Wageningen