

Chloroplast DNA haplotype samenstelling van eikenopstanden (categorie 'van bekende origine') van de Rassenlijst van Bomen

Chloroplast DNA haplotype samenstelling van eikenopstanden (categorie 'van bekende origine') van de Rassenlijst van Bomen

Een aanvullende methode voor identificatie van autochtoniteit

**J. Buiteveld
M.C. Boerwinkel
J. Bovenschen
K.G. Kranenborg
S.M.G. de Vries**

Alterra-rapport 1169

Alterra, Wageningen, 2005

REFERAAT

Buiteveld J., Boerwinkel M.C., Bovenschen J., Kranenborg K.G. & S.M.G. de Vries, 2005. *Chloroplast DNA haplotype samenstelling van eikenopstanden (categorie 'van bekende origine') van de Rassenlijst van Bomen, Een aanvullende methode voor identificatie van autochtoniteit*. Wageningen, Alterra, Alterra-rapport 1169. 40 blz.; 14 fig.; 4 tab.; 15 ref.

Tegenwoordig kan autochtoon materiaal op de Rassenlijst van Bomen geplaatst worden in de categorie 'van bekende origine' en heeft daardoor een 'officiële' status. Identificatie van autochtone opstanden blijft echter nog een lastige zaak. Momenteel worden autochtone opstanden geïdentificeerd met de veldmethode van Maes (1993), waarbij zowel historische als veldcriteria worden gehanteerd. Voor zomer- en wintereik kan ook chloroplastDNA onderzoek naar postglaciale migratieroutes gebruikt worden om vast te stellen of een herkomst als autochtoon aangemerkt kan worden. In dit rapport is de chloroplast-haplotype samenstelling van eikenopstanden in de categorie 'van bekende origine' van de Rassenlijst van Bomen beschreven, met als doel een uitspraak te doen over de fylogenetische oorsprong en het autochtone karakter van deze eikenopstanden.

De studie heeft laten zien dat onderzoek naar de cpDNA-variantie een waardevolle aanvulling is op de criteria die gebruikt worden voor de evaluatie van autochtoniteit van eikenopstanden. Daarnaast laat het cpDNA-onderzoek zien dat er duidelijke geografische verschillen en soortverschillen zijn voor de mate van autochtoniteit. Zo bevestigt cpDNA-onderzoek zowel het vermoeden dat in het westen van Nederland minder autochtone opstanden bewaard zijn gebleven dan in het oostelijk deel van het land als dat zomereik meer verplaatst en aangeplant is dan wintereik.

Trefwoorden: Eiken, *Quercus robur*, *Quercus petraea*, chloroplastDNA, fylogeografie, autochtoon, Rassenlijst van Bomen.

ISSN 1566-7197

Foto's: Gert Kranenborg

Dit rapport kunt u bestellen door €25,- over te maken op banknummer 36 70 54 612 ten name van Alterra, Wageningen, onder vermelding van Alterra-rapport 1169. Dit bedrag is inclusief BTW en verzendkosten.

© 2005 Alterra

Postbus 47; 6700 AA Wageningen; Nederland

Tel.: (0317) 474700; fax: (0317) 419000; e-mail: info.alterra@wur.nl

Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Alterra.

Alterra aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Inhoud

Woord vooraf	7
Samenvatting	9
Summary	11
1 Inleiding	13
1.1 Bepaling van het autochtone karakter van opstanden	13
1.2 ChloroplastDNAonderzoek aan eiken	15
1.3 Doelstelling van het onderzoek	19
2 Materiaal en methode	21
2.1 Bemonsterde eikenopstanden	21
2.2 Verkorte beschrijving van DNA-analyse	21
2.3 Data analyse	21
3 Resultaten	23
3.1 Haplotype samenstelling	23
3.2 Geografische verspreiding van haplotypen in Nederland	26
3.3 Diversiteit binnen de opstanden en differentiatie tussen de opstanden	28
3.4 Mate van waarschijnlijkheid van autochtoniteit	30
4 Conclusies	37
Literatuur	39

Woord vooraf

Dit onderzoek is onderdeel van het Cultuur- en Gebruikswaarde Onderzoek (CGO) ten behoeve van de wettelijk verplichte Rassenlijst van Bomen en wordt uitgevoerd in opdracht van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit door de WOT-unit Centrum voor Genetische Bronnen Nederland (CGN).

We bedanken de betreffende terreinbeheerders voor de mogelijkheid die ze geboden hebben voor het verzamelen van materiaal om dit onderzoek te kunnen uitvoeren. Verder willen we Els Coart en Kristien van der Mijsbrugge bedanken voor commentaar op een eerdere versie van het rapport.

Samenvatting

Gedurende de afgelopen tien jaar is er een toenemende interesse in autochtone bomen en struiken waarneembaar. Sinds de inwerkingtreding van de nieuwe Europese Richtlijn 1999/105/EG betreffende de toelating van bosbouwkundig teeltmateriaal kan autochtoon materiaal op de Nationale lijsten van de diverse lidstaten geplaatst worden in de nieuwe categorie 'van bekende origine' (Anonymus, 2000). De autochtone opstanden hebben daardoor een 'officiële status' en kunnen verhandeld worden. In de 7^e Rassenlijst van Bomen worden van een beperkt aantal boom- en struiksoorten autochtone herkomsten in deze categorie opgenomen (Anonymus, 2002).

Hoewel het belang van autochtone genenbronnen breed onderkend wordt, blijft identificatie van autochtoon materiaal een lastige zaak. Momenteel worden autochtone opstanden geïdentificeerd met de veldmethode van Maes (1993), waarbij zowel historische als veldcriteria worden gehanteerd. Voor zomer- en wintereik kan ook chloroplastDNA onderzoek naar postglaciale migratieroutes gebruikt worden om vast te stellen of een herkomst als autochtoon aangemerkt kan worden. Op deze wijze kan met meer zekerheid een uitspraak worden gedaan over het autochtone karakter van eikenopstanden die al op basis van veldcriteria zijn geïdentificeerd. In dit rapport wordt een studie naar de chloroplast-haplotype samenstelling van eikenopstanden in de categorie 'van bekende origine' van de Rassenlijst van Bomen beschreven. Doel van de studie is een uitspraak te doen over de fylogenetische oorsprong en het autochtone karakter van deze eikenopstanden door vergelijking van de cpDNA-variantie in de opstanden met een referentiekaart van de genetische structuur (cpDNA) die opgebouwd is tijdens de postglaciale kolonisatie. Volgens de migratiepatronen wordt er vanuit gegaan dat uitsluitend haplotype 10, 11 en 12 van de Spaanse migratielijn en haplotype 1 van de Italiaanse migratielijn op een natuurlijke wijze naar Nederland zijn gemigreerd. Haplotype 1 van de Italiaanse migratielijn wordt uitsluitend in het zuidoosten van Nederland als autochtoon beschouwd. Haplotype 7 lijkt geïntroduceerd te zijn (König *et al*, 2002).

In totaal werden 32 zomereikopstanden en 16 wintereikopstanden geanalyseerd op haplotypensamenstelling. In de opstanden werden vijf haplotypen afkomstig van de Spaanse migratielijn (10, 11 en 12), de Italiaanse lijn (1) en de Balkanlijn (7) gevonden. Haplotype 7 werd uitsluitend in zomereik aangetroffen. Vergeleken met een eerder onderzoek naar chloroplast haplotype variatie in eiken in Nederland werden geen extra haplotypen gedetecteerd.

De bemonsterde eikenopstanden werden op grond van hun cpDNAhaplotypesamenstelling geëvalueerd op hun autochtoon karakter. Hierbij werd er vanuit gegaan dat de geldende veldcriteria van toepassing zijn. Het cpDNA-onderzoek ondersteunt het autochtone karakter van een opstand, wanneer:

- het een gemengde opstand van zomer- en wintereik betreft die gefixeerd is voor haplotype 1, 10, 11 of 12.

- het een winter- of zomereikopstand betreft die gefixeerd is voor haplotype 1, 10, 11 of 12.
- het een opstand (wintereik, zomereik of gemengd) betreft met een mengsel van twee haplotypen (1, 10, 11, of 12). Gebieden waar verschillende herkolonisatieroutes of clusters van verschillende haplotypen elkaar ontmoeten blijken meestal gefixeerd te zijn voor één haplotype, maar hier kan menging van twee haplotypen op een natuurlijke wijze niet uitgesloten worden.

Het cpDNAonderzoek bevestigt het autochtone karakter van een opstand niet wanneer:

- het een opstand betreft die uit een mengsel van 3 of meer haplotypen bestaat. De aanwezigheid van drie of meer haplotypen in een opstand duidt hoogstwaarschijnlijk op menselijke inbreng.
- het een opstand betreft waarin haplotype 7 voorkomt. De Balkanlijn, waartoe haplotype 7 behoort, komt niet in België en aangrenzende Duitse gebieden van Nederland voor, wat een onderbreking van de migratielijn betekent wanneer dit haplotype op natuurlijke wijze naar Nederland zou zijn gekomen. De geografische afstand is dusdanig groot tussen opstanden met haplotype 7 en de regio waar dit haplotype in hoge frequentie voorkomt dat het aannemelijk is te veronderstellen dat dit haplotype geïntroduceerd is.

Voor 19 opstanden kon het autochtone karakter van de opstand bevestigd worden of althans konden geen aanwijzingen gevonden worden dat de opstand niet-autochtoon is. In de overige 24 opstanden wees cpDNAonderzoek uit dat mogelijk op één of andere wijze menselijke inbreng heeft plaatsgevonden in de opstand.

Deze studie heeft laten zien dat onderzoek naar de cpDNAvariatie een waardevolle aanvulling is op de criteria die gebruikt worden voor de evaluatie van autochtoniteit van eikenopstanden. Daarnaast laat het cpDNAonderzoek zien dat er duidelijke geografische verschillen en soortverschillen zijn voor de mate van autochtoniteit. Zo bevestigt cpDNAonderzoek zowel het vermoeden dat in het westen van Nederland minder autochtone opstanden bewaard zijn gebleven dan in het oostelijk deel van het land als dat zomereik meer is verplaatst en aangeplant dan wintereik.

Summary

During the last decade a growing interest in autochthonous trees and shrubs can be noticed. Since the implementation of the new Directive (1999/105/EC) on the marketing of forest reproductive material a new category 'source identified' has been installed, which allows autochthonous material to be traded (Anonymus, 2000). In the 7th list of recommended varieties and provenances of trees of The Netherlands autochthonous forest reproductive material of a limited number of tree and shrub species has been placed in this new category (Anonymus, 2002).

The importance of autochthonous genetic resources is generally recognized, however identification of autochthonous material is still difficult. Currently, autochthonous trees and shrubs are identified in the field by a method developed by Maes (1993), which uses both historical and field criteria. For oak species also chloroplast DNA information based on European research can be used for identifying the autochthonous origin of stands. This allows us to verify with more certainty the autochthonous character of the oak stands. This study aims to examine the chloroplast haplotype composition of oak stands in the category 'source identified' of the 7th list of recommended varieties and provenances of trees in order to determine the phylogenetic origin of the stands. Subsequently, the chloroplast-DNA variation in the stands can be compared with a reference map of the genetic structure that has been build up during natural post-glacial colonization to evaluate the autochthony of the stands. According to migration patterns only haplotypes of the Spanish lineage (10, 11 and 12) and haplotype 1 of the Italian lineage are expected to have migrated naturally to The Netherlands. Haplotype 1 of the Italian lineage is considered to be autochthonous only in the southeast of The Netherlands. Haplotype 7 of the Balkan lineage seems to have been introduced (König *et al*, 2002).

Totally, 32 *Q. robur* and 16 *Q. petraea* stands were analyzed for their chloroplast haplotype composition. Five haplotypes derived from the Spanish lineage (10, 11 and 12), the Italian lineage (1) and the Balkan lineage (7) were identified in the stands. Haplotype 7 only occurred in the *Q. robur* stands. No extra haplotypes were found compared to previous research in The Netherlands.

The examined oak stands were evaluated for their autochthonous character based on their cpDNA haplotype composition under the assumption that the criteria of Maes (1993) were applicable. Chloroplast DNA research supports the autochthonous character of the stands if:

- the investigated stand concerns a mixed monotypic stand (fixed for haplotype 1, 10, 11 or 12)
- the investigated stand concerns a *Q. robur* or *Q. petraea* stand fixed for haplotype 1, 10, 11 or 12
- the investigated stand (*Q. robur*, *Q. petraea* or mixed) concerns a stand which comprises two haplotypes (1, 10, 11 or 12).

CpDNA research does not support the autochthonous character of the stand if:

- the investigated stand comprises a mixture of three or more haplotypes. The existence of more than two haplotypes in a stand provides strong evidence for human influence
- the investigated stand comprises haplotype 7. This haplotype, which belongs to the Balkan lineage, is very rare in The Netherlands and Belgium and scarce in the western part of Germany, which suggests that this haplotype did not migrate to The Netherlands in a natural way. Because of the large geographic distance between the stands comprising this haplotype and the region where haplotype 7 occurs at high frequency it is likely that this haplotype is introduced.

For 19 stands the autochthonous character could be confirmed or at least could not be proven to be non-autochthonous. In the remaining 24 stands cpDNA research showed that the stands had experienced some human interference.

This study showed that chloroplast DNA analysis is a useful method in addition to the field criteria already used for the evaluation of autochthony of oak stands. Furthermore, cpDNA research revealed clear geographic differences and differences between the species concerning autochthony. CpDNA research confirms the assumption that in the western part of The Netherlands less autochthonous stands have been preserved than in the east. Moreover, it supports the idea that the degree of human influence in *Q. robur* stands has been higher than in *Q. petraea* stands.

1 Inleiding

Sinds de laatste tien jaar is er een toenemende interesse in autochtone bomen en struiken. Vanuit het Ministerie van LNV zijn er door middel van diverse inventarisatie rondes meer en minder complete lijsten van autochtone populaties opgesteld. Het gebruik van teeltmateriaal van deze opstanden is de afgelopen tien jaar ook aanzienlijk toegenomen. Het gebruik van autochtone populaties als zaadbron voor nieuwe aanplant is een belangrijk aspect van het behoud van ons genenmateriaal. Plantmateriaal voor bosbouwkundige doeleinden mag echter alleen gebruikt worden als het aan bepaalde voorwaarden voldoet. Deze voorwaarden zijn vastgelegd in Nederlandse en EU regelgeving.

Sinds de inwerkingtreding van de nieuwe Europese Richtlijn 1999/105/EG betreffende de toelating van bosbouwkundig teeltmateriaal kan autochtoon materiaal op de Nationale lijsten van de diverse lidstaten geplaatst worden in de nieuwe categorie ‘van bekende origine’ (Anonymus, 2000). Dit houdt in dat er geen uitspraken worden gedaan betreffende de bosbouwkundige kwaliteit zoals die vereist is bij opname in één der andere categorieën van de Rassenlijst van Bomen. De kwaliteit van deze opstanden is van ecologische aard. Wel hebben ze hiermee een ‘officiële status’ en kunnen daarmee verhandeld worden. In de 7^e Rassenlijst van Bomen worden van een beperkt aantal boom- en struiksoorten autochtone herkomsten in deze categorie opgenomen (Anonymus, 2002).

1.1 Bepaling van het autochtone karakter van opstanden

Hoewel het belang van autochtone genenbronnen breed onderkend wordt, leidt identificatie van autochtoon materiaal nog tot enige discussie. De afgelopen eeuwen is de cultuurdruk op het landelijk gebied zeer groot geweest in Nederland. Hierdoor is het moeilijk autochtoon van niet-autochtoon te onderscheiden. Tegenwoordig zijn autochtone bomen en struiken voornamelijk nog te vinden op oude bosplaatsen, in houtwallen, langs holle wegen en aan de oevers van niet-vergraven beken.

Het begrip autochtoon wordt in de EU-richtlijn (1999/105/EG) betreffende het in de handel brengen van bosbouwkundig teeltmateriaal gedefinieerd (zie kader). Volgens deze definitie zijn bomen en struiken autochtoon wanneer deze zich sinds de spontane vestiging na de laatste IJstijd (ongeveer 12.000 jaar geleden) ter plekke altijd natuurlijk hebben verjongd (Heybroek, 1992).

Autochtoon

Volgens de EU-richtlijn (1999/105/EU) betreffende het in de handel brengen van bosbouwkundig teeltmateriaal is een autochtone opstand:

“een opstand waarvan de vernieuwing normaliter door continue natuurlijke regeneratie is geschied. De opstand mag kunstmatig zijn vernieuwd met behulp van teeltmateriaal dat uit dezelfde opstand of uit autochtone opstanden in de nabije omgeving is verkregen” (Anonymus 2000).

Het onomstotelijke bewijs dat een opstand of populatie autochtoon is, is volgens de definitie van de EU-richtlijn eigenlijk niet te leveren. Aan de hand van het bestuderen van pollendiagrammen van de laatste 10.000 jaar kan een beeld gevormd worden van welke soorten hier wanneer voorkwamen. Hiermee is echter niet aangetoond dat de huidige bomen en struiken ook afstammen van de eerste exemplaren na de ijstijd. Wel zijn er criteria die gebruikt kunnen worden om een uitspraak te doen over de mate van waarschijnlijkheid dat een bepaalde populatie of opstand autochtoon is. Enkele criteria die gebruikt worden om autochtone bomen en struiken op bepaalde groeiplaatsen te onderscheiden van niet-autochtoon materiaal worden hieronder genoemd (Maes, 1993). De eerste drie criteria hebben betrekking op de planten en de overige op de groeiplaats:

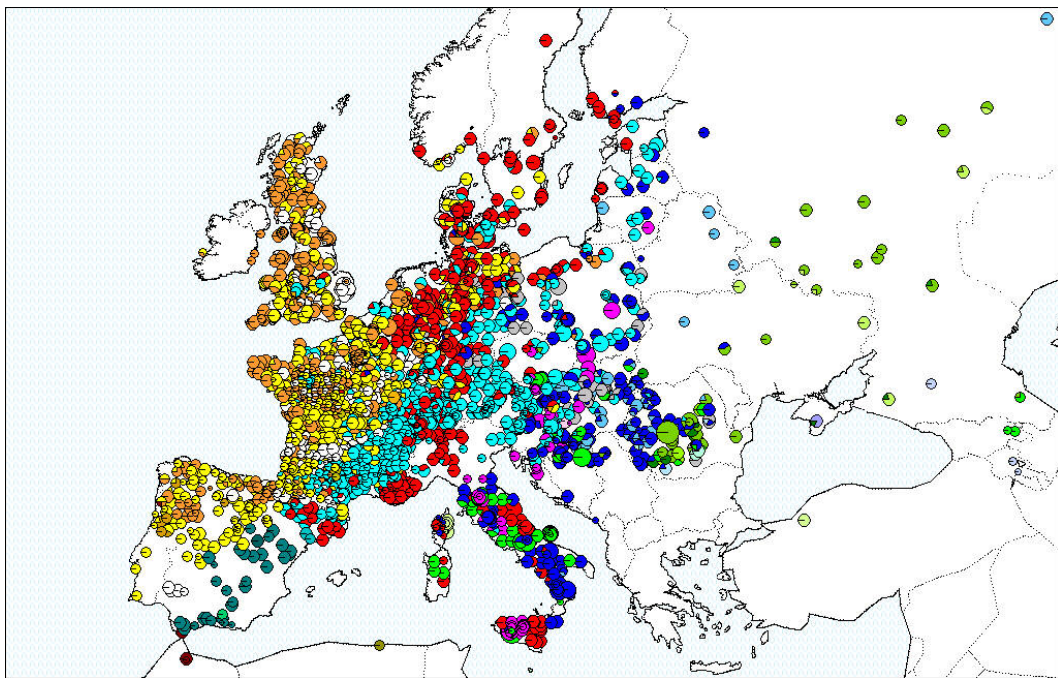
- het gaat om wilde soorten of variëteiten en niet om cultivars
- het betreft oude bomen of oud hakhout
- de bomen maken een spontane en niet-aangeplante indruk
- de groeiplaats ligt binnen het natuurlijke verspreidingsgebied van de soort
- het betreffende landschapselement (bos, houtwal en dergelijke) staat reeds aangegeven op de topografische kaarten uit 1830 – 1850
- de groeiplaats stamt ecologisch overeen met de natuurlijke standplaats van de soorten en maakt een natuurlijke en ongestoorde indruk
- er komen soorten voor die indicatief zijn voor oude bosplaatsen of houtwallen
- in de omgeving komt de soort op meerdere vergelijkbare groeiplaatsen voor en/of uit paleobotanisch onderzoek komen indicaties over het voorkomen ter plaatse in het verleden

In de praktijk gaan de criteria niet altijd allemaal tegelijk op en kan identificatie van autochtoon materiaal problematisch zijn. Het grootste probleem ligt bij soorten, zoals eik en beuk die al sinds eeuwen worden aangeplant om economische redenen. DNA-onderzoek kan het vaststellen van het autochtone karakter van materiaal ondersteunen.

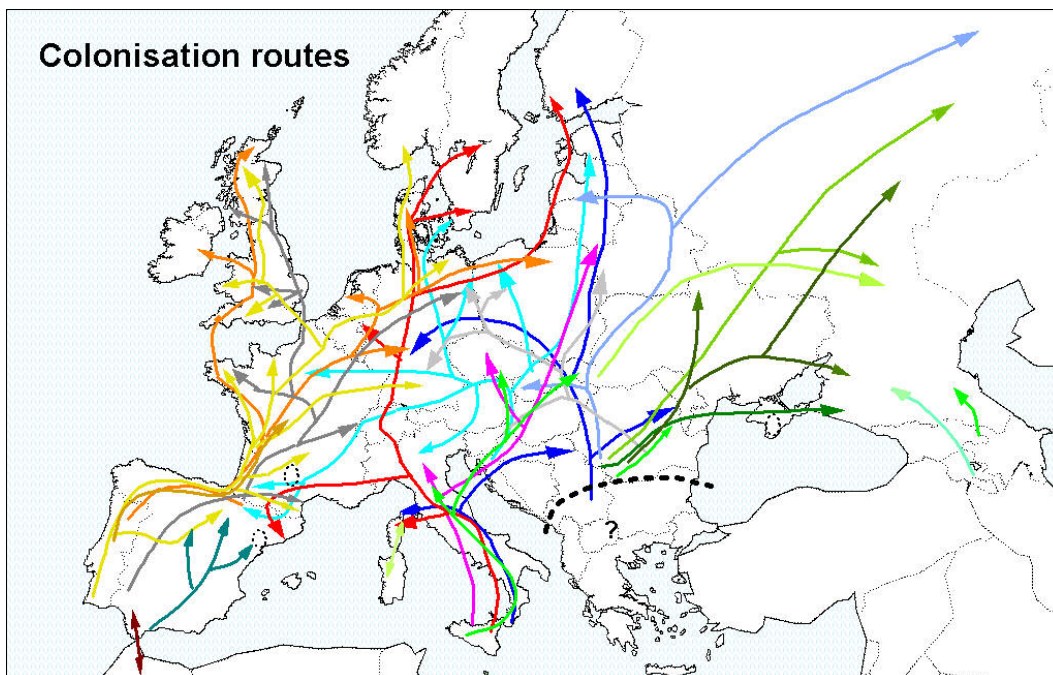
1.2 ChloroplastDNAonderzoek aan eiken

Bij zomer- en wintereik is, aan de hand van internationaal onderzoek naar migratieroutes, vast te stellen of een herkomst als autochtoon aangemerkt kan worden. Op deze wijze kan met meer zekerheid een uitspraak worden gedaan over het autochtone karakter van eikenopstanden die al op basis van veldcriteria zijn geïdentificeerd (van Dam & de Vries, 1998; König *et al*, 2002). Alterra neemt vanaf 1994 deel aan dit Europese onderzoek.

Met behulp van DNA-onderzoek kunnen de postglaciale herkolonisatieroutes van eik in Europa herleid worden (Petit *et al*, 2002ab). Tijdens het verblijf in de refugia gedurende de laatste ijstijd is door mutaties variatie ontstaan in het chloroplast-DNA. Deze chloroplast-DNA varianten worden haplotypen genoemd. Uit inventarisaties van eiken verspreid over Europa blijkt dat deze haplotypen een duidelijke geografische structuur hebben (Figuur 1). Totaal worden in Europa 32 haplotypen gevonden, die een sterke fylogenetische structuur hebben. Uit deze verspreiding van haplotypen kunnen zes migratielijnen worden gereconstrueerd. De migratielijnen hebben een duidelijk verschillende geografische verspreiding, die meestal van zuid naar noord loopt (Figuur 2). In Zuid-Europa zijn drie refugia geïdentificeerd: Zuid-Spanje, Zuid-Italië en het zuidelijk deel van de Balkan.

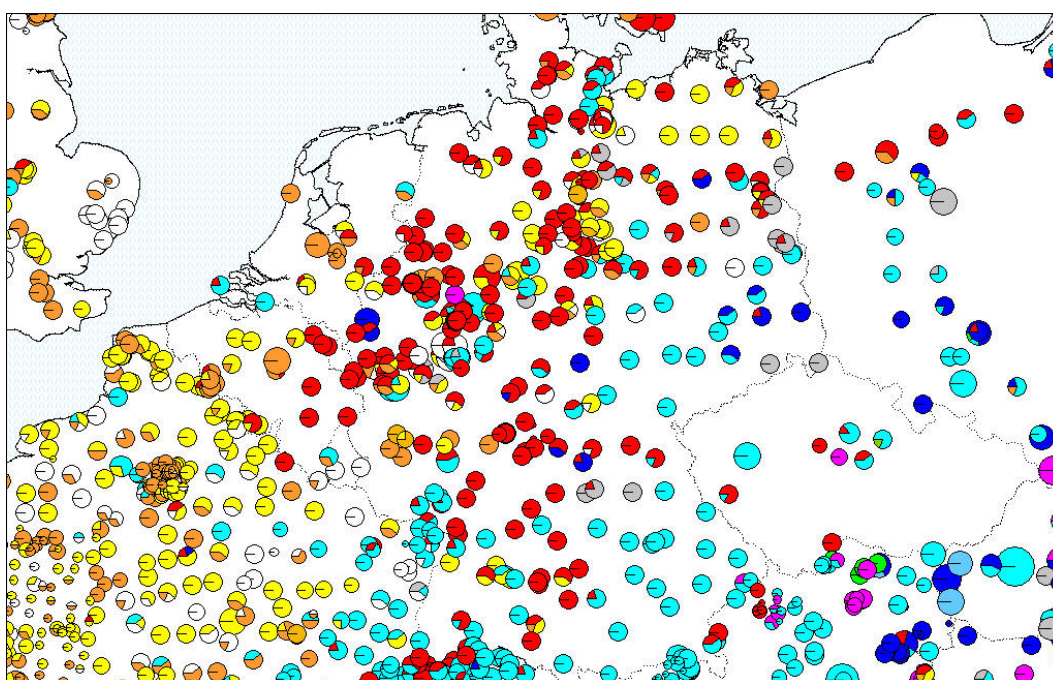


*Figuur 1 Kaart van Europa met geografische verspreiding van haplotypen. Bolletjes geven eikenopstanden aan die gescreend zijn op chloroplast-DNA variatie. Opstanden met een zelfde haplotype worden vertegenwoordigd door dezelfde kleur (naar Petit *et al*, 2002a)*



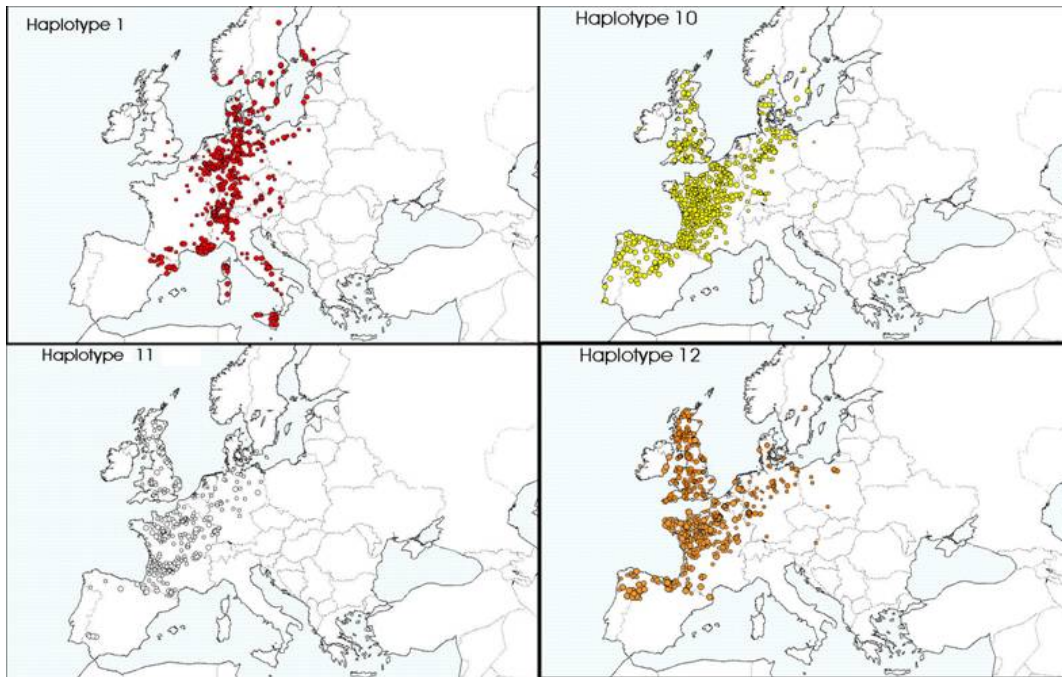
Figuur 2 Migratieroutes van eik (naar Petit et al, 2002b)

In Nederland zijn in totaal vijf haplotypen (1, 7, 10, 11 en 12) geïdentificeerd (König et al, 2002) (Figuur 3).



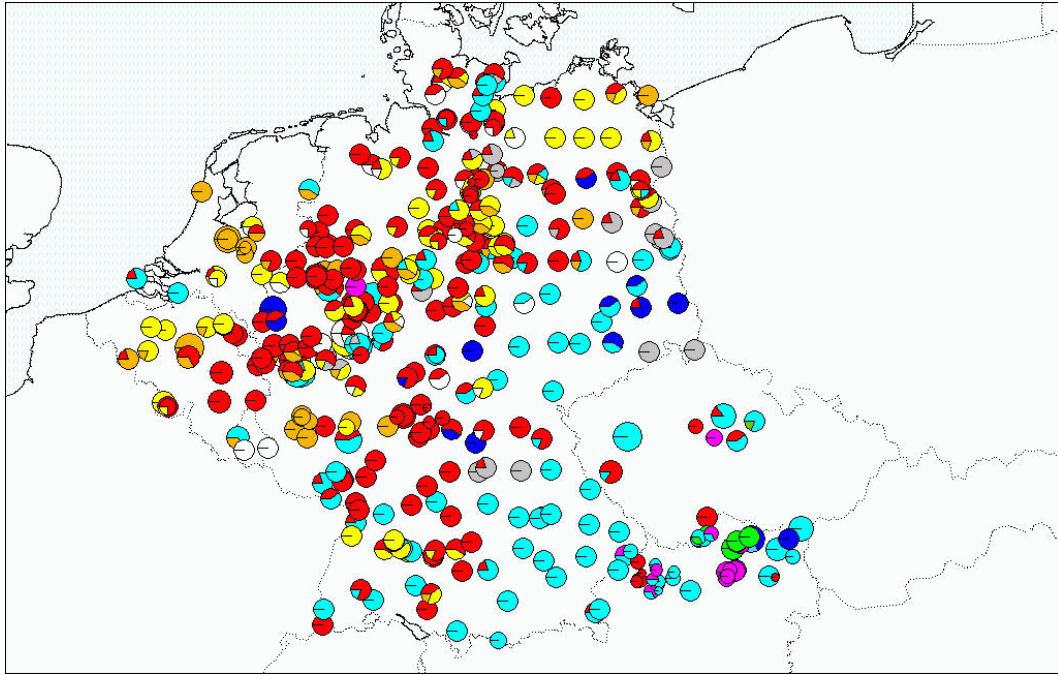
Figuur 3 Haplotypenverspreiding in Nederland en omliggende gebieden (naar König et al, 2002)

Volgens de migratiepatronen wordt er echter vanuit gegaan dat uitsluitend haplotype 10 (geel), 11 (wit) en 12 (oranje) van de Spaanse migratielijn en haplotype 1 (rood) van de Italiaanse migratielijn op een natuurlijke wijze naar Nederland zijn gemigreerd (Figuur 4). Haplotype 1 (rood), van de Italiaanse migratielijn wordt uitsluitend in het zuidoosten van Nederland als autochtoon beschouwd.



Figuur 4 Verspreiding van haplotype 1, 10, 11 en 12 in Europe. (naar Petit *et al*, 2002b)

Haplotype 7 lijkt geïntroduceerd te zijn. Dit haplotype komt niet of nauwelijks voor in Nederland en België en is zeer zeldzaam in grote delen van Duitsland (Noordwesten, Mecklenburg-Vorpommern, Zuid-Hessen en Frankonia). Dit suggereert dat de migratieroute van dit haplotype door Duitsland richting het noorden langs de grens met Tsjechië heeft gelopen (König *et al*, 2002) (Figuur 5). Voor Nederland worden dan ook uitsluitend haplotype 1, 10, 11 en 12 onder bepaalde omstandigheden als autochtoon gezien.



Figuur 5 Verspreiding van haplotype 7 (blauw) door Duitsland (naar König et al, 2002)

Deze geografische genetische structuur van de chloroplast-DNA variatie kan ook gebruikt worden om het autochtone karakter van eikenopstanden te evalueren. Op deze wijze kan bepaald worden of een eikenopstand afstamt van de oorspronkelijke populatie uit één van de refugia tijdens de ijstijden. Eén indicatie voor niet-autochtoon zijn is heterogeniteit van de opstand. Deze benadering gaat uit van de aanname dat het patroon van chloroplast-DNA variatie grotendeels intact is gebleven in gebieden waar geen menselijk ingrijpen of aanplant heeft plaatsgevonden. In Frankrijk bijvoorbeeld worden grote bosgebieden gedomineerd door een enkel cpDNA haplotype. Deze zogenaamde monohaplotype 'lappendeken' structuur kon ontstaan door incidentele lange-afstand dispersie gebeurtenissen tijdens de postglaciale kolonisatie gevolgd door een golf van korte-afstand dispersie (Petit *et al*, 1997). Mogelijk zijn vele generaties nodig om deze 'lappendeken' structuur te verstoren. Op grond van deze voorwaarden wordt verwacht dat een autochtone opstand gefixeerd is voor één haplotype (homogeen). Wanneer deze bestaat uit een mengsel van haplotypen, wordt vermoed dat het materiaal (ten minste ten dele) is geïntroduceerd. Een mengsel van twee haplotypen afkomstig van dezelfde migratielijn zou nog als een natuurlijk fenomeen beschouwd kunnen worden, aangezien beide haplotypen gezamenlijk migreren. Hoewel menselijke invloed ook in dit geval niet kan worden uitgesloten. Een tweede indicatie voor introductie van niet-autochtoon materiaal kan zijn het niet passen van het haplotype van de opstand bij de haplotypen van de migratielijnen die op een natuurlijke wijze naar Nederland zijn gekomen of bij het lokaal voorkomend haplotype (in de omringende opstanden). In dit geval is er een grote geografische afstand tussen de opstand en het gebied waar het corresponderende haplotype in een hoge frequentie voorkomt.

1.3 Doelstelling van het onderzoek

De postglaciale migratie routes van eik bieden de mogelijkheid het autochtone karakter van eikenopstanden nader te evalueren. In deze studie is de chloroplast-haplotype samenstelling van eikenopstanden in de categorie ‘van bekende origine’ van de 7^e Rassenlijst van Bomen bepaald. De resultaten zijn vergeleken met de Europese gegevens om een uitspraak te doen over de fylogenetische oorsprong en het autochtone karakter van deze eikenopstanden.

2 Materiaal en methode

2.1 Bemonsterde eikenopstanden

Van de soorten zomer- en wintereik zijn 51 opstanden in de categorie ‘van bekende origine’ van de 7^e Rassenlijst van Bomen opgenomen. In totaal zijn 48 opstanden bemonsterd. In vijf gevallen betreffen het gemengde opstanden. De bemonsterde opstanden (met opstandnummer) zijn weergegeven in figuur 3 en tabel 1 en 2. Per opstand zijn 5 bomen *at random* door de opstand bemonsterd voor een DNA-analyse. Dit aantal is voldoende in geval van fixatie voor een haplotype, wat wordt verwacht in natuurlijke populaties (Petit *et al*, 1997). Na de eerste DNA-analyses bleek dat het aantal haplotypen per opstand veel hoger kan liggen en is de bemonstering uitgebreid tot 20 bomen per opstand. In geval van een gemengde opstand is het monsteraantal dan 10 bomen per soort.

2.2 Verkorte beschrijving van DNA-analyse

Voor de DNA-isolatie is gebruik gemaakt van een DNA extractie kit (Puregene®, Genra Systems, Minneapolis, USA). De haplotypen in de 48 opstanden werden geïdentificeerd met behulp van PCR-RFLP en een set van cpDNA primers volgens de methode van Dumolin-Lapègue *et al* (1997) en Petit *et al* (2002a). De 32 haplotypen, die in Europa voorkomen kunnen worden gedetecteerd met vier PCRfragmenten, ieder gedigesteerd met 1 restrictie enzym. Voor detectie van haplotypen in de Nederlandse monsters volstaan drie cpDNA fragmenten in combinatie met een restrictie enzym: *trnD/trnT* met *TaqI*, *trnC/trnD* met *TaqI* (Demesure *et al*, 1995) en *trnT/trnF* met *AluI* (Taberlet *et al*, 1991). Door digestie met *TaqI* van het geamplificeerde cpDNAfragment met *trnD/trnT* kunnen haplotype 12 en haplotype 7 onderscheiden worden van haplotype 10/11 en haplotype 1/2/32 en de overige haplotypen. Vervolgens kan met een tweede primer/enzym combinatie (*trnC/trnD-TaqI*) haplotype 1, 2 en 32 van elkaar onderscheiden worden en haplotype 10 van 11 (*trnT/trnF-AluI*). De haplotypen zijn gecodeerd volgens Petit *et al* (2002a).

2.3 Data analyse

Binnen-opstand diversiteit (h_s), totale diversiteit (h_T) en de differentiatie tussen opstanden (G_{ST}) werd berekend met het programma HAPLODIV volgens de methode van Pons & Petit (1985).



Figuur 6 Locatie van bemonsterde zomer- en wintereiken opstanden. Voor gegevens over opstanden zie tabel 1 en 2

3 Resultaten

3.1 Haplotype samenstelling

In totaal werden 5 haplotypen gedetecteerd in de eikenopstanden (voor overzicht zie tabel 1 en 2). Het betreft haplotype 1 van de Italiaanse lijn, haplotype 10, 11, 12 van de Spaanse lijn en haplotype 7 behorende tot de Balkanlijn. Haplotype 1, 10, 11 en 12 worden gevonden in beide soorten. Haplotype 7 wordt echter uitsluitend in zomereik gevonden, namelijk in 9 van de 32 bemonsterde opstanden. Vergeleken met een eerder onderzoek naar chloroplast haplotype variatie in eiken in Nederland (van Dam & de Vries, 1998; König *et al*, 2002) werden geen extra haplotypen gedetecteerd.

Tabel 1 *Herkomst, code en haplotype samenstelling van zomereikopstanden in de 7^e Rassenlijst van Bomen (categorie 'van bekende origine')*

Opstandnr.	Herkomst	Herkomstcode	Aantal bemonsterde bomen				
			Haplotype				
			1	7	10	11	12
1 ¹	Winterswijk-01	NL.SI.1.3.07-01	4			1	
2 ²	Gennep-01	NL.SI.3.5.14-01			9		
3 ³	Winterswijk-02	NL.SI.1.3.07-02	7				
4	Epe-02	NL.SI.2.2.16-01	1	1	14		
5	Bloemendaal-01	NL.SI.5.2.04-01		1			4
6	Castricum-01	NL.SI.5.2.03-01	3		3		9
7	Bergen-02	NL.SI.5.2.08-02	1				18
8	Bergen-01	NL.SI.5.2.08-01	1		1		18
9 ⁴	Nunspeet-01	NL.SI.2.2.13-01			10		
10	Rolde-01	NL.SI.4.3.21-01	1				19
11	Norg-02	NL.SI.4.4.09-02			1		19
12	Grubbenvorst-01	NL.SI.3.5.10-01	2		6	11	1
13	Swalmen-01	NL.SI.3.5.24-01	10		2	8	
14	Neer-01	NL.SI.3.5.19-01	10		7	2	
15	Gieten-01	NL.SI.4.3.17-01	1				19
16	Havelte-04	NL.SI.4.4.02-04	2		2	1	15
17	Vries-01	NL.SI.4.4.12-01				1	19
18	Wassenaar-01	NL.SI.5.2.06-01	1	1			3
19	Wassenaar-02	NL.SI.5.2.06-02	4	2	2		9
20	's-Gravenhage-01	NL.SI.5.2.10-01	1	1	2		1
21	Norg-01	NL.SI.4.4.09-01					20
22	Garderen-02	NL.SI.2.2.05-01	1		2		16
23	Havelte-03	NL.SI.4.4.02-03	1			3	1
24	Baarle-Nassau-01	NL.SI.3.2.08-01			20		
25	Nieuw-Ginneken-01	NL.SI.3.2.13-01		1	4		
26	Domburg-02	NL.SI.5.3.04-02			5		
27	Woensdrecht-03	NL.SI.3.1.05-03	1	3	1		
28	Vries-02	NL.SI.4.4.12-02	1				19
29	Domburg-01	NL.SI.5.3.04-01		4	3		3
30	Losser-01	NL.SI.1.3.13-01	4			1	
31	Huijbergen-01	NL.SI.3.1.04-01	n.d.				
32	Boxmeer-01	NL.SI.3.3.24-01	n.d.				

33	Udenhout-01	NL.SI.3.3.41-01	3	2
34 ⁵	Roerdalen-01	NL.SI.3.5.20-01	17	
35	Havelte-01	NL.SI.4.4.02-01	n.d.	

n.d. = niet bemonsterd.

¹ gemengde opstand met opstand 36

² gemengde opstand met opstand 39

³ gemengde opstand met opstand 37

⁴ gemengde opstand met opstand 45

⁵ gemengde opstand met opstand 52

Tabel 2 Herkomst, code en chloroplast haplotype samenstelling van wintereikopstanden in de 7^e Rassenlijst van Bomen (categorie 'van bekende origine')

Opstandnr.	Herkomst	Herkomstcode	Aantal bemonsterde bomen				
			Haplotype				
			1	7	10	11	12
36 ¹	Winterswijk-05	NL.SI.1.3.07-05	5				
37 ²	Winterswijk-01	NL.SI.1.3.07-01	15				
38	Winterswijk-04	NL.SI.1.3.07-04	5				
39 ³	Gennep-01	NL.SI.3.5.14-01			7		
40	Apeldoorn-01	NL.SI.2.2.24-01	1		6	1	6
41	Apeldoorn-03	NL.SI.2.2.24-03			12		5
42	Ubbergen-01	NL.SI.3.4.04-01			17		2
43	Mook en Middelaar-01	NL.SI.3.5.18-01	1		17		
45 ⁴	Nunspeet-01	NL.SI.2.2.13-01	1		8	1	
46	Ede-01	NL.SI.2.3.03-01	2		2	1	14
47	Margraten-01	NL.SI.3.6.17-01	11		1		8
48	Apeldoorn-02	NL.SI.2.2.24-02	1			3	1
49	Apeldoorn-04	NL.SI.2.2.24-04	2		9	1	
50	Valkenburg aan de Geul-01	NL.SI.3.6.21-01	19				
51	Leusden-01	NL.SI.2.1.09-01					3
52 ⁵	Roerdalen-01	NL.SI.3.5.20-01	20				

¹ gemengde opstand met opstand 1

² gemengde opstand met opstand 3

³ gemengde opstand met opstand 2

⁴ gemengde opstand met opstand 9

⁵ gemengde opstand met opstand 34

De drie meest voorkomende haplotypen in de eikenopstanden zijn haplotype 1 (24.7%), haplotype 10 (26.9%) en 12 (39.6%). De twee overige haplotypen 7 en 11 zijn in lage frequentie aanwezig, resp. 3 en 5.8 % (Tabel 3). Uit eerder onderzoek bleek al dat haplotype 11 meer verspreid voorkomt. In omliggende gebieden van Nederland (België, Nordrhein-Westfalen, Luxemburg) komt haplotype 11 ook in lage frequentie voor (König *et al*, 2002). Uit tabel 3 blijkt tevens dat de Spaanse migratielijn overheerst in Nederland.

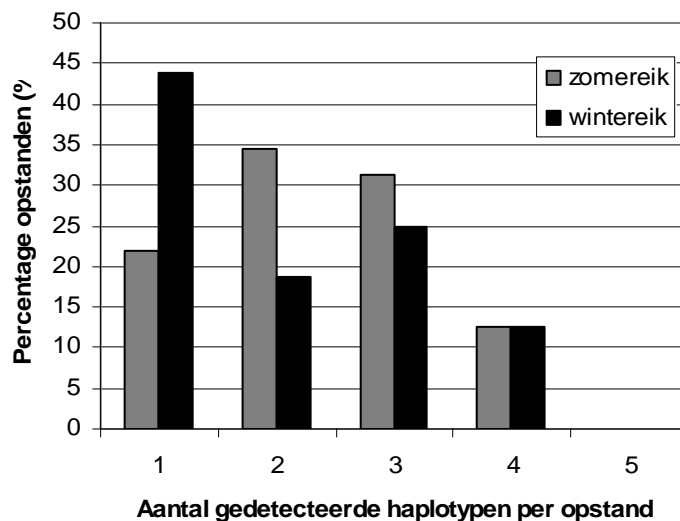
Tussen de soorten zijn opvallende verschillen te zien in haplotype frequentie. Haplotype 7 (Balkanlijn) komt niet voor in de wintereik en wordt in een lage frequentie waargenomen in zomereikopstanden (4.4%). In zomereik overheersen haplotype 10 en 12 (Spaanse lijn), terwijl in de wintereikopstanden relatief veel haplotype 1 (39.9 %) uit Italië aangetroffen wordt. Deze waarneming wordt wel bevestigd door verschil in ruimtelijke bemonstering van de twee soorten, dat gerelateerd is aan verschil in verspreiding. In Brabant, Drenthe en het kustgebied komt wintereik nauwelijks voor, terwijl zomereik hier wel voorkomt. De verspreiding

van wintereik beperkt zich voornamelijk tot de Veluwe, de Utrechtse heuvelrug, de Sallandse heuvelrug, Nijmegen, Meinweggebied rond Roermond en Zuid-Limburg (Prins *et al*, 1993). De rassenlijst wintereikopstanden beperken zich dan ook min of meer tot deze delen van Nederland. In figuur 6 is de geografische verspreiding van de bemonsterde zomer- en wintereiken te zien.

Tabel 3 Haplotype frequentie van de opstanden

Soort	Aantal bemonsterde bomen	Haplotype				
		1 (%)	7 (%)	10 (%)	11 (%)	12 (%)
Zomereik	428	17.3	4.4	21.5	7.0	49.8
Wintereik	208	39.9	0	38.0	3.4	18.8
Beide soorten	636	24.7	3.0	26.9	5.8	39.6

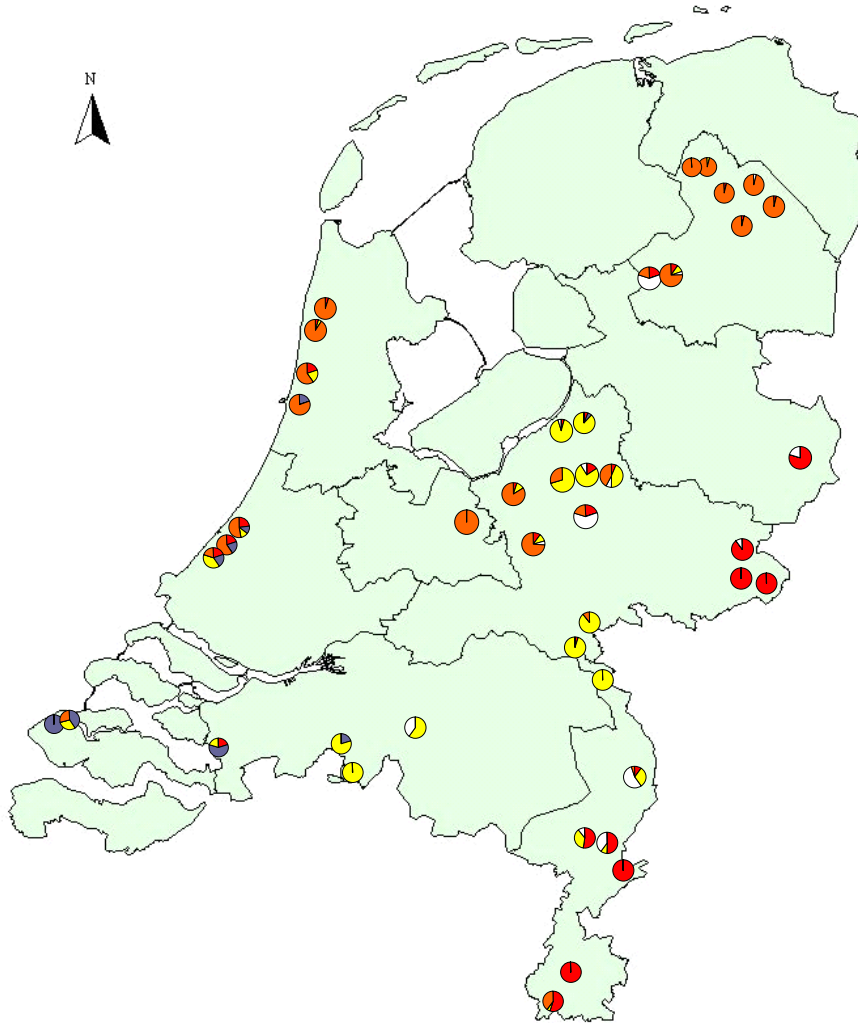
Het aantal gedetecteerde haplotypen varieert sterk tussen de opstanden (Figuur 7). Zeven van de 16 wintereikopstanden (44%) zijn gefixeerd voor één haplotype (zogenaamde monotypische opstanden). Voor de zomereikopstanden is dit aanzienlijk lager, slechts 22%. De overige opstanden bezitten twee, drie of vier haplotypen. De zomereikopstanden bezitten relatief vaak twee haplotypen in een opstand (34%). In bijna alle gevallen betreft het dan opstanden waarbij één haplotype dominant is. De meeste monotypische wintereikopstanden bezitten haplotype 1 (Italië). Geen van de opstanden is gefixeerd voor haplotype 11. Van de vijf gemengde opstanden zijn er drie gefixeerd voor één haplotype (twee opstanden voor haplotype 1 en één opstand voor haplotype 10).



Figuur 7 Aantal haplotypen per opstand dat gedetecteerd is in de opstanden, weergegeven per soort

3.2 Geografische verspreiding van haplotypen in Nederland

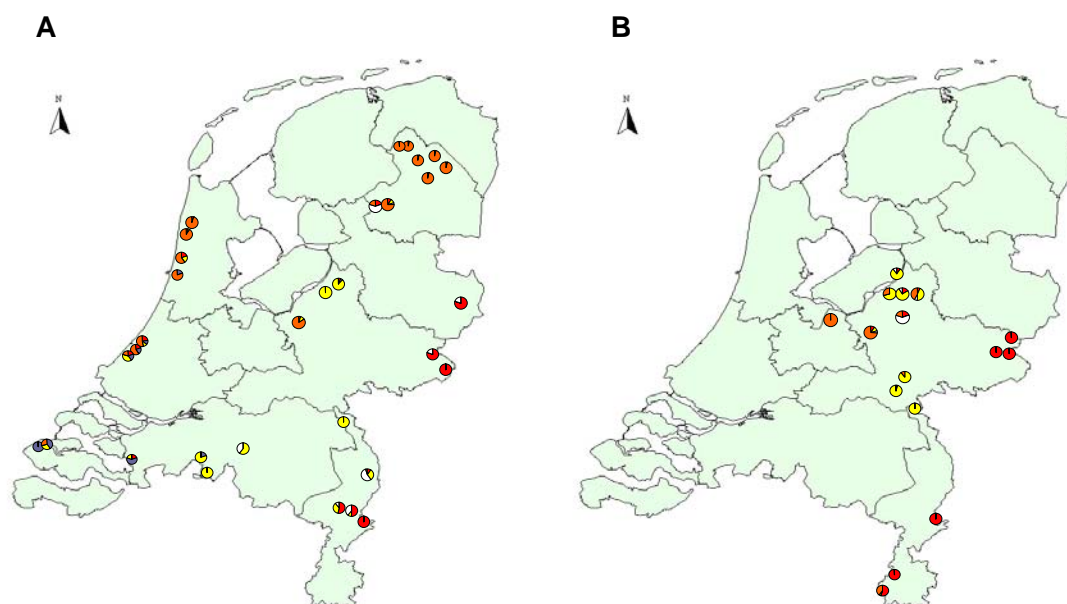
Een kaart met de verspreiding van haplotypen in Nederland is weergegeven in figuur 8. De kaart laat zien dat de geografische verspreiding van de haplotypen niet het zelfde is door Nederland.



Figuur 8 Verspreiding van haplotypen in alle bemonsterde opstanden. Gemengde opstanden zijn als 1 bolletje weergegeven. Elke kleur vertegenwoordigt een haplotype. (rood = haplotype 1, blauw = haplotype 7, geel = haplotype 10, wit = haplotype 11 en oranje = haplotype 12)

Haplotypen van de Spaanse migratielijn, in het bijzonder haplotype 12, zijn het meest wijd verspreid. In het noorden (Drenthe) en noordwesten (Noord-Holland) lijkt haplotype 12 te domineren. In het midden van Nederland (Veluwe) zijn haplotype 10 en 12 het meest algemeen. Haplotype 1 van de Italiaanse lijn wordt voornamelijk in het zuiden en zuidoosten aangetroffen. Haplotype 7 komt frequenter voor in het zuidwesten (Zeeland, West-Brabant), echter dit haplotype wordt meestal gemengd met andere haplotypen aangetroffen. De resultaten bevestigen de eerdere studie van König *et al* (2002) waarin een beperkt aantal (13) natuurlijke populaties in Nederland zijn onderzocht.

De verspreiding van de haplotypen in Nederland stemt overeen met de naburige landen. Haplotypen van de Spaanse lijn zijn via de Atlantische kust richting België, Nederland, Duitsland en Denemarken getrokken (Figuur 2). In Vlaanderen blijken haplotypen 10, 11 en 12 van deze lijn voor te komen, waarbij haplotype 10 het meest algemeen is. Opstanden met haplotype 1 van de Italiaanse lijn worden in België voornamelijk in het oosten gevonden. De migratieroute van de Italiaanse lijn trekt door Duitsland naar Zuid-Scandinavië met enkele westelijke aftakkingen richting Oost-België en het oosten van Nederland. In het oosten van Vlaanderen wordt haplotype 1 ook als autochtoon beschouwd. Haplotype 7 van de Balkanlijn komt algemeen voor in West-Centraal Europa, maar in België en het westelijk deel van Duitsland worden niet of nauwelijks monotypische opstanden gevonden van dit haplotype. In België worden uitsluitend haplotypen 1, 10, 11 en 12 als autochtoon beschouwd (Coart, 2003).



Figuur 9 Verspreiding van haplotypen in bemonsterde opstanden. A: zomereikopstanden, B: wintereikopstanden. Elke kleur vertegenwoordigt een haplotype. (rood = haplotype 1, blauw = haplotype 7, geel = haplotype 10, wit = haplotype 11 en oranje = haplotype 12)

In figuur 9 worden de kaarten van de twee soorten afzonderlijk gepresenteerd. De zomereikopstanden langs de kust blijken relatief vaak polytypisch te zijn, terwijl de zomereikopstanden in Drenthe gedomineerd worden door één haplotype (Figuur 9A). Uit figuur 9 blijkt tevens dat haplotype 1 meer voorkomt in wintereik dan in zomereik. Dit zelfde fenomeen wordt gevonden in België. Zowel voor Nederland als België blijkt dat de geografische verspreiding van haplotype 1 en de verspreiding van de wintereik zich vooral tot het oosten beperkt.

3.3 Diversiteit binnen de opstanden en differentiatie tussen de opstanden

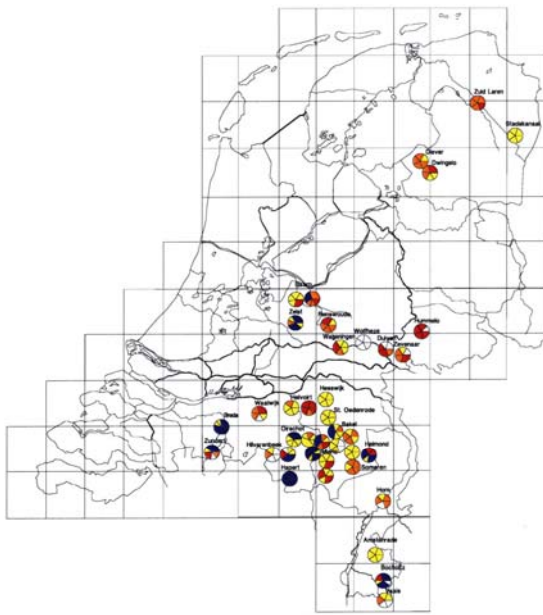
De diversiteit in de zomereikopstanden is hoger dan in de wintereikopstanden (0.338 vs. 0.247), terwijl de differentiatie tussen opstanden in zomereik lager is dan in wintereik (0.550 vs. 0.651) (Tabel 4). Deze trend wordt in heel Europa gevonden. De diversiteit binnen opstanden is in Nederland vergeleken met andere regio's in Europa hoog. Voor andere delen in Europa varieert deze waarde tussen 0.099 en 0.247 voor zomereik en tussen 0.062 en 0.154 voor wintereik. De differentiatie tussen de opstanden in Nederland is daarentegen lager dan elders in Europa (zomereik: $G_{ST} = 0.622 - 0.896$; wintereik: $G_{ST} = 0.797 - 0.924$) (Petit *et al*, 2002a).

Tabel 4 Schattingen van de diversiteit en differentiatie.

Soort	Aantal opstanden	Harmonisch gemiddelde	Aantal haplotypen	h_S^a	h_T^b	G_{ST}^c
Zomereik	32	9.4	5	0.338 (0.051)	0.751 (0.032)	0.550 (0.065)
Wintereik	16	9.0	4	0.247 (0.067)	0.709 (0.037)	0.651 (0.086)
Beide soorten	48	9.3	5	0.308 (0.040)	0.749 (0.016)	0.589 (0.052)

^a diversiteit binnen de opstanden, ^b totale diversiteit, ^c differentiatie tussen de opstanden

In eerder onderzoek is de cpDNA haplotype samenstelling van geselecteerde en getoetste zomereikherkomsten (voornamelijk laanbeplantingen) bepaald (König *et al*, 2002). Ondanks dat dezelfde haplotypen worden gevonden in deze opstanden als in de mogelijk autochtone zomereikopstanden (categorie 'van bekende origine') zijn er duidelijke verschillen tussen de twee categorieën. In de geselecteerde en getoetste zomereikopstanden worden weinig monotypische opstanden gevonden, terwijl ook geen duidelijke ruimtelijke structuur is waar te nemen (Figuur 9). De genetische differentiatie tussen de geselecteerde en getoetste zomereikopstanden is ook twee keer zo laag ($G_{ST} = 0.282$) als in de zomereiken van categorie 'van bekende origine' (König *et al*, 2002).



Figuur 10 Verspreiding van haplotypen in zomereikopstanden (laanbeplantingen) (categorie 'geselecteerd' en 'getoetst'). Elke kleur vertegenwoordigt een haplotype. (rood = haplotype 1, blauw = haplotype 7, geel = haplotype 10, wit = haplotype 11 en oranje = haplotype 12) (naar König et al, 2002)



Figuur 11 Oude bakhoutstoof in zomereikopstand Garderen-02

3.4 Mate van waarschijnlijkheid van autochtoniteit

De haplotypenverspreidingskaart van Europa (Figuur 1) is gebaseerd op natuurlijke eikenopstanden. Deze kaart kan gebruikt worden als een referentiekaart van de genetische structuur welke is opgebouwd tijdens de postglaciale herkolonisatie van Europa. Daardoor kan met deze kaart het autochtone karakter van een eikenopstand geëvalueerd worden. Op basis van deze kaart wordt voor Nederland haplotype 1, 10, 11 en 12 als autochtoon gezien. Haplotype 7 is zeer zeldzaam in Nederland en België en schaars in grote delen van Duitsland (noordwesten, Mecklenburg-Vorpommeren, Hessen) (König *et al*, 2002). Het feit dat haplotype 7 bovendien vaak voorkomt in polytypische opstanden suggereert dat het is aangeplant.

Hieronder worden de bemonsterde eikenopstanden op grond van hun cpDNAhaplotypesamenstelling geëvalueerd op hun autochtoon karakter. Hierbij wordt er vanuit gegaan dat de geldende veldcriteria van toepassing zijn.

't Rot: Winterswijk-01 (NL.SI.1.3.07-01) + Winterswijk-05 (NL.SI.1.3.07-05)

Een gemengde opstand met een mengsel van twee haplotypen (1 en 11), waarbij haplotype 1 domineert. Haplotype 1 wordt gezien als autochtoon voor het zuidoosten van Nederland. De opstand is waarschijnlijk autochtoon.

Genep-01 (NL.SI.3.5.14-01) (zomer- en wintereik)

Een gemengde opstand welke gefixeerd is voor één haplotype (10). DNA-onderzoek bevestigt het autochtone karakter van deze opstand.

Aarnink: Winterswijk-02 (NL.SI.1.3.07-02) + Winterswijk-01 (NL.SI.1.3.07-01)

Een gemengde opstand welke gefixeerd is voor één haplotype (1). Haplotype 1 wordt gezien als autochtoon voor het zuidoosten van Nederland. DNA-onderzoek bevestigt het autochtone karakter van deze opstand.

Epe-02 (NL.SI.2.2.16-01)

Een zomereikopstand met een mengsel van drie haplotypen, waaronder haplotype 7. Haplotype 7 wordt beschouwd als niet-autochtoon voor Nederland. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Bloemendaal-01 (NL.SI.5.2.04-01)

Een zomereikopstand met een mengsel van twee haplotypen, waaronder haplotype 7. Haplotype 7 wordt beschouwd als niet-autochtoon voor dit deel van Nederland. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Castricum-01 (NL.SI.5.2.03-01)

Een zomereikopstand met een mengsel van drie haplotypen. Haplotype 1 wordt niet als autochtoon beschouwd in de kuststreek van Nederland. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Bergen-02 (NL.SI.5.2.08-02)

Een zomereikopstand met een mengsel van twee haplotypen (1, 12), waarbij haplotype 12 domineert. De opstand is waarschijnlijk autochtoon.



Figuur 12 Zomereikopstand in kuststreek (Bergen-02)

Bergen-01 (NL.SI.5.2.08-01)

Een zomereikopstand met een mengsel van drie haplotypen (1, 10, 12). Haplotype 1 wordt niet als autochtoon beschouwd in de kuststreek van Nederland. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Nunspeet-01 (NL.SI.2.2.13-01) (Zomer- en winterreik)

Een gemengde opstand met 3 haplotypen (1, 10, 11). De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Rolde-01 (NL.SI.4.3.21-01)

Een zomereikopstand met een mengsel van twee haplotypen (1, 12). Het dominerende haplotype 12 past bij omringende opstanden. De opstand is waarschijnlijk autochtoon.

Norg-02 (NL.SI.4.4.09-02)

Een zomereikopstand met een mengsel van twee haplotypen (10, 12). Het dominerende haplotype 12 past bij omringende opstanden. De opstand is waarschijnlijk autochtoon.

Grubbenvorst-01 (NL.SI.3.5.10-01)

De zomereikopstand bestaat uit een mengsel van vier haplotypen en is waarschijnlijk (ten dele) aangeplant.

Swalmen-01 (NL.Sl.3.5.24-01)

Een zomereikopstand die bestaat uit een mengsel van 3 haplotypen. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Neer-01 (NL.Sl.3.5.19-01)

Een zomereikopstand die bestaat uit een mengsel van 3 haplotypen. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Gieten-01 (NL.Sl.4.3.17-01)

Een zomereikopstand met twee haplotypen (1, 12). Het dominerende haplotype 12 past bij omringende opstanden. De opstand is waarschijnlijk autochtoon.

Havelte-04 (NL.Sl.4.4.02-04)

Zomereikopstand die bestaat uit een mengsel van vier haplotypen. De opstand is waarschijnlijk (ten dele) aangeplant.

Vries-01 (NL.Sl.4.4.12-01)

Een zomereikopstand met twee haplotypen (11, 12). Het dominerende haplotype 12 past bij omringende opstanden. De opstand is mogelijk autochtoon.

Wassenaar-01 (NL.Sl.5.2.06-01)

Een zomereikopstand met mengsel van drie haplotypen (1, 7, 12), waaronder haplotype 7. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Wassenaar-02 (NL.Sl.5.2.06-02)

Een zomereikopstand met mengsel van vier haplotypen, waaronder haplotype 7. De opstand is waarschijnlijk (ten dele) aangeplant.

's-Gravenhage-01 (NL.Sl.5.2.10-01)

Een zomereikopstand met mengsel van vier haplotypen, waaronder haplotype 7. De opstand is waarschijnlijk (ten dele) aangeplant.

Norg-01 (NL.Sl.4.4.09-01)

Een zomereikopstand, welke gefixeerd is voor één haplotype (12). Het haplotype komt overeen met het dominerende haplotype in de regio. DNA-onderzoek bevestigt het autochtone karakter van deze opstand.

Garderen-02 (NL.Sl.2.2.05-01)

Een zomereikopstand die bestaat uit een mengsel van 3 haplotypen. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Havelte-03 (NL.Sl.4.4.02-03)

Een zomereikopstand die bestaat uit een mengsel van 3 haplotypen. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Baarle-Nassau-01 (NL.Sl.3.2.08-01)

Een zomereikopstand welke gefixeerd is voor één haplotype (10). DNA-onderzoek bevestigt het autochtone karakter van deze opstand.

Nieuw-Ginneken-01 (NL.SI.3.2.13-01)

Een zomereikopstand met twee haplotypen, waaronder haplotype 7. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Domburg-02 (NL.SI.5.3.04-02)

Een zomereikopstand welke gefixeerd is voor haplotype 7. Tot op heden zijn er geen aanwijzingen dat dit haplotype op natuurlijke wijze naar Nederland is gemigreerd. De opstand is mogelijk aangeplant.

Woensdrecht-03 (NL.SI.3.1.05-03)

Een zomereikopstand met drie haplotypen, waaronder haplotype 7. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Vries-02 (NL.SI.4.4.12-02)

Een zomereikopstand met een mengsel van twee haplotypen (1, 12). Het dominerende haplotype 12 past bij omringende opstanden. De opstand is mogelijk autochtoon.

Domburg-01 (NL.SI.5.3.04-01)

Een zomereikopstand met drie haplotypen, waaronder haplotype 7. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.



Figuur 13 Gemengde opstand in 't Rot (Winterswijk-01/05)

Losser-01 (NL.SI.1.3.13-01)

Een zomereikopstand met twee haplotypen. De opstand is mogelijk autochtoon.

Udenhout-01 (NL.SI.3.3.41-01)

Een zomereikopstand met een mengsel van twee haplotypen. De opstand is mogelijk autochtoon.

Roerdalen-01 (NL.SI.3.5.20-01) (zomer- en wintereik)

Een gemengde opstand welke gefixeerd is voor één haplotype (1). Haplotype 1 wordt gezien als autochtoon voor het zuidoosten van Nederland. DNA-onderzoek bevestigt het autochtone karakter van deze opstand.

Winterswijk-04 (NL.SI.1.3.07-04)

Een wintereikopstand welke gefixeerd is voor één haplotype (1). Haplotype van de opstand komt overeen met heersende haplotype in omringende opstanden. DNA-onderzoek bevestigt het autochtone karakter van deze opstand.

Apeldoorn-01 (NL.SI.2.2.24-01)

Een wintereikopstand die bestaat uit een mengsel van 4 haplotypen. De opstand is waarschijnlijk (ten dele) aangeplant.

Apeldoorn-03 (NL.SI.2.2.24-03)

Een wintereikopstand met een mengsel van 2 haplotypen. De opstand is mogelijk autochtoon.

Ubbergen-01 (NL.SI.3.4.04-0)

Een wintereikopstand met een mengsel van 2 haplotypen. De opstand is mogelijk autochtoon.

Mook en Middelaar-01 (NL.SI.3.5.18-01)

Een wintereikopstand met een mengsel van 2 haplotypen. De opstand is mogelijk autochtoon.

Ede-01 (NL.SI.2.3.03-01)

Een wintereikopstand met een mengsel van 4 haplotypen. De opstand is waarschijnlijk (ten dele) aangeplant.

Margraten-01 (NL.SI.3.6.17-01)

Een wintereikopstand met een mengsel van 3 haplotypen. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Apeldoorn-02 (NL.SI.2.2.24-02)

Een wintereikopstand die bestaat uit een mengsel van 3 haplotypen. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Apeldoorn-04 (NL.SI.2.2.24-04)

Een wintereikopstand die bestaat uit een mengsel van 3 haplotypen. De opstand is mogelijk (ten dele) aangeplant.

Valkenburg aan de Geul-01 (NL.SI.3.6.21-01)

Een wintereikopstand welke gefixeerd is voor één haplotype (1). Haplotype 1 wordt gezien als autochtoon voor het zuidoosten van Nederland. DNA-onderzoek bevestigt het autochtone karakter van deze opstand.

Leusden-01 (NL.SI.2.1.09-01)

Een wintereikopstand welke gefixeerd is voor één haplotype (12). DNA-onderzoek bevestigt het autochtone karakter van deze opstand.



Figuur 14 Zomereik opstand in Zeeland (Domburg-01)

4 Conclusies

Identificatie van autochtone eikenopstanden aan de hand van veld- en historische criteria is lastig. Deze studie heeft laten zien dat onderzoek naar de cpDNAvariatie een waardevolle aanvulling is op de criteria die gebruikt worden voor de evaluatie van autochtoniteit van eikenopstanden. De resultaten van dit onderzoek laten zien dat het cpDNAonderzoek in grote lijnen de veldmethode van Maes (1993) bevestigt. De methode maakt het mogelijk de fylogenetische oorsprong van potentiële autochtone eikenopstanden te achterhalen en een uitspraak te doen over het mogelijk autochtone karakter van de opstand door vergelijking met het verwachte patroon van cpDNAhaplotypen in de betreffende regio. Het cpDNAonderzoek ondersteunt het autochtone karakter van een opstand, bepaald op basis van historische en veldcriteria, wanneer:

- het een gemengde opstand van zomer- en wintereik betreft die gefixeerd is voor haplotype 1, 10, 11 of 12.
- het een winter- of zomereikopstand betreft die gefixeerd is voor haplotype 1, 10, 11 of 12.
- het een opstand (wintereik, zomereik of gemengd) betreft met een mengsel van twee haplotypen (1, 10, 11, of 12). Gebieden waar verschillende herkolonisatieroutes of clusters van verschillende haplotypen elkaar ontmoeten blijken meestal gefixeerd te zijn voor één haplotype, maar hier kan menging van twee haplotypen op een natuurlijke wijze niet uitgesloten worden.

Het cpDNAonderzoek bevestigt het autochtone karakter van een opstand niet wanneer:

- het een opstand betreft die uit een mengsel van 3 of meer haplotypen bestaat. De aanwezigheid van drie of meer haplotypen in een opstand duidt hoogstwaarschijnlijk op menselijke inbreng.
- het een opstand betreft waarin haplotype 7 voorkomt. De Balkanlijn, waartoe haplotype 7 behoort, komt niet in België en aangrenzende Duitse gebieden van Nederland voor, wat een onderbreking van de migratielijn betekent wanneer dit haplotype op natuurlijke wijze naar Nederland zou zijn gekomen. De geografische afstand is dusdanig groot tussen opstanden met haplotype 7 en de regio waar dit haplotype in hoge frequentie voorkomt dat het aannemelijk is te veronderstellen dat dit haplotype geïntroduceerd is.

Opstanden met aangeplant materiaal kunnen ook gefixeerd zijn voor een haplotype dat autochtoon is voor het betreffende gebied. Deze translocaties, die binnen een migratielijn plaatsvinden (tussen gebieden waar hetzelfde cpDNAhaplotype voorkomt) kunnen met de cpDNAmethode echter niet gedetecteerd worden. In deze gevallen kan ook cpDNAonderzoek niet een onomstotelijk bewijs voor autochtoniteit leveren, aangezien niet kan worden uitgesloten dat het gaat om niet-lokaal materiaal. Wel kan met cpDNAonderzoek de niet-lokale status van materiaal geïdentificeerd worden. In deze studie kon voor 20 opstanden (4 gemengd, 10 zomereik en 6 wintereik) het autochtone karakter van de opstand bevestigd worden

of althans konden geen aanwijzingen gevonden worden dat de opstand niet-autochtoon zou zijn. In de overige 23 opstanden (1 gemengd, 17 zomereik en 5 wintereik) wees cpDNAonderzoek uit dat mogelijk op één of andere wijze menselijke inbreng heeft plaatsgevonden in de opstand.

Toename van menselijk ingrijpen leidt tot een toename in genetische diversiteit binnen de opstanden, maar ook in afname van de ruimtelijke genetische structuur. Dit wordt duidelijk geïllustreerd door de verschillen tussen de potentiële autochtone opstanden en ‘geselecteerde’ en ‘getoetste’ opstanden (laanbeplantingen). De ‘geselecteerde’ en ‘getoetste’ opstanden afkomstig van kwekerijen en met een mogelijk buitenlandse herkomst laten een grote heterogeniteit zien binnen de opstanden, terwijl de ruimtelijke genetische structuur verdwenen is. Deze resultaten bevestigen eerder onderzoek van König *et al* (2002).

Daarnaast bevestigt het cpDNAonderzoek het vermoeden dat in het westen van Nederland minder autochtone opstanden bewaard zijn gebleven dan in het oostelijk deel van het land. De heterogeniteit van de meeste zomereikopstanden in het westen is een duidelijke aanwijzing dat (ten minste ten dele) materiaal is geïntroduceerd. In het westen is de cultuurdruk veel groter geweest dan in het oosten. Bekend is dat in de 15^e en 16^e eeuw in het westen van het land al veel bomen verhandeld en aangeplant werden (Maes, 2002).

Naast geografische verschillen in mate van autochtoniteit werden ook duidelijke verschillen tussen de soorten gevonden. De veronderstelling dat zomereiken meer verplaatst zijn dan wintereiken wordt ondersteund door de cpDNAresultaten. Een aantal aspecten, zoals de lagere diversiteit binnen opstanden, hogere differentiatie tussen opstanden en de afwezigheid van haplotype 7 in autochtone wintereikopstanden tonen aan dat deze soort minder een ‘sleepsoort’ is geweest dan zomereik.

Literatuur

- Anonymus, 2000. Richtlijn 1999/105/EU van de Raad van 22 december 1999 betreffende het in de handel brengen van bosbouwkundig teeltmateriaal. Publicatieblad nr. L 011 van 15/01/2000. p 17 – 40.
- Anonymus, 2002. Zevende Rassenlijst van Bomen. Commissie voor de samenstelling van de Rassenlijst voor Bosbouwgewassen. Stichting DLO. Centrum voor Genetische Bronnen Nederland. PlantijnCasparie Hilversum. 373 pp.
- Coart, E., 2003. Molecular contributions to the conservation of forest genetic resources in Flanders: Genetic diversity of *Malus sylvestris*, *Quercus* spp. and *Carpinus betulus*. PhD thesis, Universiteit Gent, 187 pp.
- Dam, B.C. van, S.M.G. de Vries, 1998. In de voetsporen van de eik. postglaciale herkolonisatieroutes. *De Levende Natuur* 99 (1): 38-41.
- Demesure, B., Sodzi, N., Petit, R.J., 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* 4:129 – 131.
- Dumolin-Lapègue, S., Demesure, B., Le Corre, V., Fineschi, S., Petit, R.J., 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475 – 1487.
- Heybroek, H.M., 1992. Behoud en ontwikkeling van het genetisch potentieel van onze bomen en struiken. IKC-NBLF en IBN-DLO, Rapport nr. 684, Wageningen, 34 pp.
- König, A.O., B. Ziegenhagen, B.C. van Dam, U.M. Csaikl, E. Coart, B. Degen, K. Burg, S.M.G. de Vries & R.J. Petit. 2002. Chloroplast DNA variation of oaks in western Central Europe and genetic consequences of human influences. *Forest Ecol. Manage.* 156 (1-3): 147-166.
- 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, Rapport nr. 020, Wageningen, 86 pp.
- Maes, N.C.M., 2002. Bomen en struiken in Nederland, inheems, autochtoon, exoot en archeofiet. *Gorteria* 28 (1): 1-24.
- Petit, R.J. Pineau, E., Demesure, B., Bacilieri, R., Ducouso, A., Kremer, A., 1997. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9996-10001.

- Petit, R.J., U.M. Csaikl, S. Bordács, K. Burg, E. Coart, J. Cottrel, B.C. van Dam, J.D. Deans, S. Dumolin-Lapègue, S. Fineschi, R. Finkeldey, A. Gillies, I. Glaz, P.G. Goicoechea, J.S. Jensen, A.O. König, A.J. Lowe, S.F. Madsen, G. Mátyás, R.C. Munro, M. Olalde, M.H. Pemonge, F. Popescu, D. Slade, H. Tabbener, D. Turchini, S.G.M. [S.M.G.] de Vries, B. Ziegenhagen & A. Kremer. 2002a. Chloroplast DNA variation in European white oaks phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecol. Manage.* 156 (1-3): 5-26.
- Petit, R.J., S. Brewer, S. Bordács, K. Burg, R. Cheddadi, E. Coart, J. Cottrell, U.M. Csaikl, B.[C.] van Dam, J.D. Deans, S. Espinel, S. Fineschi, R. Finkeldey, I. Glaz, P.G. Goicoechea, J.S. Jensen, A.O. König, A.J. Lowe, S.F. Madsen, G. Mátyás, R.C. Munro, F. Popescu, D. Slade, H. Tabbener, S.G.M. [S.M.G.] de Vries, B. Ziegenhagen, J.L. de Beaulieu & A. Kremer, 2002b. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecol. Manage.* 156 (1-3): 49-74.
- Pons, O., Petit, R.J., 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. I. Haploid locus. *Theoret. Appl. Genet.* 90: 462- 470.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1105 – 1109.