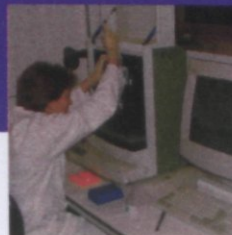
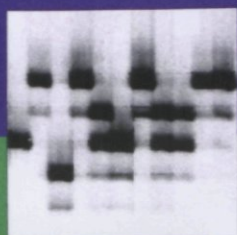




Genetische diversiteit binnen de fokpopulatie van Korhoenders op Nationaal Park De Hoge Veluwe in relatie tot referentiepopulaties

H.A.H. Jansman
J. Bovenschen
M.C. Boerwinkel
M. Perez-Haro
F.J.J. Niewold
H.P. Koelewijn



Genetische diversiteit binnen de fokpopulatie van Korhoenders op Nationaal Park De Hoge Veluwe in relatie tot referentiepopulaties

**H.A.H. Jansman
J. Bovenschen
M.C. Boerwinkel
M. Perez-Haro
F.J.J. Niewold
H.P. Koelewijn**

Alterra – Centrum Ecosystemen

Foto's omslag: Hugh Jansman, Alterra

In opdracht van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Voedselkwaliteit; DWK programma 383.

Genetische diversiteit binnen de fokpopulatie van Korhoenders op Nationaal Park De Hoge Veluwe in relatie tot referentiepopulaties

**H.A.H. Jansman
J. Bovenschen
M.C. Boerwinkel
M. Percz-Haro
F.J.J. Niewold
H.P. Koelewijn**

Alterra – Centrum Ecosystemen

Alterra-Onderzoeksrapport Korhoen 2004-1

Alterra, Wageningen, Oktober 2004

© 2004 Alterra

Postbus 47; 6700 AA Wageningen; Nederland

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

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd 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

1	<i>Inleiding</i>	11
1.1	Het Korhoen en zijn huidige status	11
1.2	Vraagstelling	13
1.3	Werkwijze	14
1.4	Genetische diversiteit	15
2	<i>Monsterverzameling</i>	17
2.1	Nederland en Europa	17
2.2	Fokprogramma van Nationaal Park De Hoge Veluwe	17
3	<i>Moleculaire analyses</i>	19
3.1	Microsatelliet analyse	19
3.2	Mitochondriële DNA analyse	20
4	<i>Resultaten</i>	22
4.1	Microsatelliet analyse	22
4.2	Mitochondriële DNA analyse	27
5	<i>Discussie</i>	29
6	<i>Dankwoord</i>	32
7	<i>Literatuur</i>	33
8	<i>Bijlagen</i>	37
8.1	DNA isolatie met behulp van de Qiagen DNeasy Tissue Kit	37
8.2	Microsatelliet data van de NPDHV monsters	38
8.3	Mitochondriaal DNA data van de NPDHV monsters	40
8.4	IUCN richtlijnen voor herintroducties	41

Woord vooraf

In de nazomer van 2003 zijn financiële middelen toegekend om genetisch onderzoek te verrichten aan de Nederlandse korhoenpopulatie op de Sallandse Heuvelrug. Dit onderzoek is gericht op het vaststellen van de genetische diversiteit van de resterende populatie in vergelijking met buitenlandse referentiepopulaties en de historische variatie in Nederland (op basis van museum materiaal). Deze zomer worden de laatste DNA monsters voor dit onderzoek verzameld, onderzocht en uitgewerkt waarbij dit najaar het eindrapport zal verschijnen. Parallel aan beheer en behoud van de nog enige bestaande populatie wordt al geruime tijd met korhoenders gefokt en bestaat het plan om deze dieren weer uit te zetten op Nationaal Park De Hoge Veluwe. Recent heeft Alterra de opdracht gekregen om de genetische diversiteit van de fokpopulatie te analyseren in relatie tot referentiepopulaties. Medio juni zijn daarvoor de eerste monsters aangeleverd welke medio juli geanalyseerd moeten zijn om eind juli de studie afgerond te hebben, aangezien het verlangen bestaat nog deze nazomer korhoenders uit te zetten. Dit korte tijdsschema heeft tot gevolg dat niet in alle gevallen de meest optimale aanpak heeft kunnen plaatsvinden, mede omdat voor een aantal onderdelen de inbreng van buitenlandse collega's is vereist. Desondanks zijn we er van overtuigd gefundeerde resultaten te kunnen rapporteren.

De auteurs, juli 2004

Samenvatting

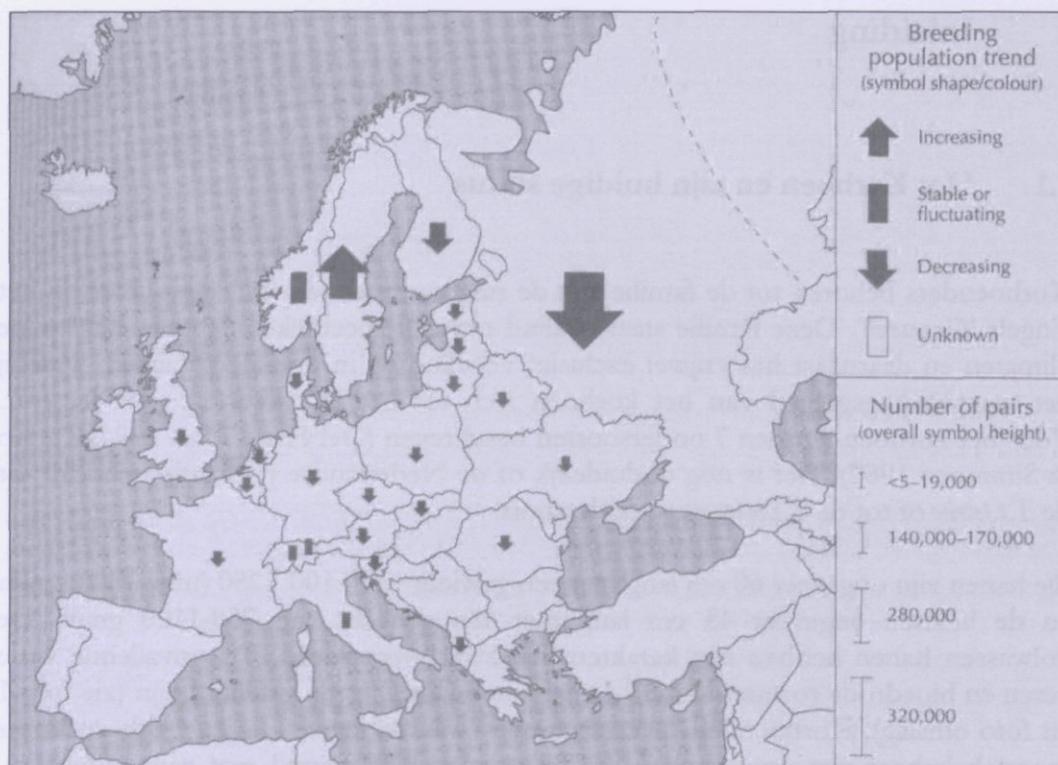
- Op Nationaal Park De Hoge Veluwe (NPDHV) wordt al geruime tijd gefokt met korhoenders met het doel om tot uitzet over te gaan.
- Door LNV is aan Alterra verzocht om de genetische variatie van de fokpopulatie te onderzoeken en daarnaast de verwantschap van de fokpopulatie met de huidige Nederlandse populatie en Europese referentie populaties vast te stellen.
- Voor dit onderzoek zijn 159 monsters uit 7 populaties geanalyseerd voor 8 microsatelliet loci (nucleaire DNA variatie) en daarnaast 14 monsters voor mitochondriële DNA variatie.
- De huidige Nederlandse korhoenpopulatie op de Sallandse Heuvelrug is genetisch enigszins armer in vergelijking met grote vitale Europese referentiepopulaties.
- Uit museum materiaal (historische populatie) bleek dat ook in de vorige eeuw deze variatie al geringer was, maar toch nog groter dan de huidige populatie.
- De historische populatie was, hoewel al wel verschillend, meer verwant aan de onderzochte Europese referentiepopulaties dan de huidige Nederlandse populatie.
- De korhoenders in het fokprogramma van NPDHV zijn genetisch enigszins armer in vergelijking met grote vitale Europese referentiepopulaties.
- Uit populatie genetische analyses blijkt dat de fokpopulatie ten opzichte van alle andere geanalyseerde populaties, inclusief de huidige Nederlandse, in redelijke tot grote mate genetisch gedifferentieerd is.
- Deze differentiatie is waarschijnlijk het gevolg van de niet-natuurlijke populatie processen die bij de meeste fokprogramma's optreden waarbij willekeurige partnerkeuze en geslachtsafhankelijke dispersie niet plaats kunnen vinden. Daarnaast zal de herkomst van de fokdieren een rol spelen.

1 Inleiding

1.1 Het Korhoen en zijn huidige status

Korhoenders behoren tot de familie van de ruigpoothoenders of Tetraonidae, in het Engels 'Grouses'. Deze familie staat bekend om zijn specifieke adaptatie aan koude klimaten en daarnaast het vrijwel exclusief voorkomen in boreale gebieden, waarbij het verspreidingsgebied van het korhoen zich tot het Palearctische deel beperkt. Voor het korhoen worden 7 ondersoorten beschreven (Del Hoyo *et. al.* 1994; Cramp & Simmons 1982). Het is nog onduidelijk of de Nederlandse populatie behoort tot de *T.t.tetrix* of tot de *T.t.britannicus* ondersoort.

De hanen zijn ongeveer 60 cm lang met een gewicht van 1100-1250 (max 1800) gram en de hennen ongeveer 45 cm lang met een gewicht van 750-1100 gram. De volwassen hanen hebben een karakteristiek zwart verenkleed met opvallende witte veren en bloedrode rozetten terwijl de hennen neutraal bruin gekleurd zijn (zie foto 1 en foto omslag). Korhoenders leven in bossen waarbij kapvlaktes en heide en ander mozaïek beheer van groot belang is. Ze voeden zich vooral met zaden (bessen), naalden en verse takjes van planten, bomen en coniferen. Het spijsverteringskanaal is dan ook uniek voor vogels aangezien het in staat is houtige gewassen te verteren. Kleine kuikens eten voornamelijk insecten. Het menu wisselt sterk door het jaar, afhankelijk van de beschikbaarheid en ook het darmkanaal (vooral de lengte) ondergaat jaarlijks een grote verandering. Voortplanting vindt rond april-mei plaats waarna in mei-juni de eieren worden gelegd. Het nest wordt op de grond gebouwd waarin gemiddeld 8 eieren worden gelegd. Indien het broedsel in een vroeg stadium verloren gaat kan een vervolglegsel worden geproduceerd. Na 25-27 dagen broeden, komen de jongen uit. Het zijn nestvlinders die zich snel ontwikkelen. Na 10-14 dagen kunnen de jongen al enigszins vliegen. Hanen zijn zeer plaatstrouw en vertonen een dispersie van maximaal 5 km, terwijl de hennen tot wel 30 km weg kunnen trekken (Caizergues & Ellison 2002). Dit geslachtsverschil in dispersie wordt gezien als een mechanisme om inteelt te vermijden (Höglund *et. al.* 1999). Incidenteel vindt extreme migratie van honderden km plaats (Del Hoyo *et. al.* 1994; Cramp & Simmons 1982). Het korhoen is beroemd om zijn spectaculaire balts. De hanen verzamelen zich op zogenaamde 'leks' of arena's waar ze met veel verengepronk en vocaal geweld proberen concurrenten te intimideren en hennen te lokken. Uit recent onderzoek is gebleken dat slechts een beperkt aantal hanen (~10-20%) verantwoordelijk is voor het merendeel van de bevruchting van hennen (Höglund *et. al.* 1999). In combinatie met de geringe dispersie die hanen afleggen kan dit in gefragmenteerde en geïsoleerde populaties al na enkele generaties leiden tot verschillen in morfologie en gedrag van korhoenders tussen verschillende populaties.



*Figuur 1: Verspreidingsgebied van het Korhoen en de trends van deze populaties. Bron: www.blackgrouse.info / Black grouse European distribution. Tucker, G. M. & Heath, M. F. (1992) *Birds in Europe: their conservation status*. BirdLife International, Cambridge, UK.*

Sinds de tweede helft van de vorige eeuw zijn de korhoenpopulaties in West- en Centraal-Europa sterk achteruit gegaan (figuur 1). Op het West-Europese vasteland zijn nog slechts enkele kleine populaties overgebleven. In Nederland houdt nog altijd een populatie stand op de centrale heide van de Sallandse Heuvelrug in Overijssel. Sinds ongeveer 10 jaar geleden de laatste korhoenders van het nabijgelegen Wierdense Veld zijn verdwenen, is deze populatie volledig geïsoleerd geraakt. De dichtstbijzijnde, eveneens sterk geïsoleerde populaties bevinden zich op een grote afstand van meer dan 200 km. Het betreft de populaties van de Lüneburger Heide in Duitsland en de Hoge Venen in België. Het korhoen staat in het West-Europese deel van zijn verspreidingsgebied mogelijk op het punt van uitsterven.

Korhoenders staan op de rode lijsten van verschillende landen, waaronder Nederland, maar zijn internationaal gezien geen bedreigde soort (IUCN-lower risk, least concern). Zij staan voor de Europese Vogelrichtlijn als Annex I, Annex II/2 en Annex III/2 genoemd (Storch 2000).



Foto 1: Korhen met op de achtergrond een korhaan. Regte hei, jaren '70. Foto Alterra.

1.2 Vraagstelling

In het begin van de vorige eeuw kwam het korhoen nog algemeen voor in Nederland. Momenteel rest alleen nog een populatie op de Sallandse heuvelrug. Het Nationaal Park De Hoge Veluwe (hierna NPDHV) fokt al ruim 20 jaar met korhoenders met als doel deze dieren vroeg of laat weer uit te zetten, zodat het korhoen weer terugkeert op de Veluwe. Om dit te realiseren is daarnaast veel energie gestoken in herstel van het korhoenhabitat. Recent is een studie naar de mogelijkheden voor herintroductie van korhoenders op NPDHV afgerond (Smit 2003). Volgens de auteur kan uitzet van korhoenders verantwoord worden uitgevoerd met goede kansen op een levensvatbare populatie indien het leefgebied wordt vergroot. Naast een ecologische haalbaarheidsstudie is het volgens IUCN richtlijnen noodzakelijk om ook andere belangrijke aspecten te onderzoeken (zie 8.5). Deze richtlijnen geven aan dat genetisch onderzoek naar omvang van de genetische variatie en verwantschap van de te herintroduceren dieren met de huidige populaties van belang is voor een verantwoorde herintroductie. Alterra heeft daarom van NPDHV en LNV de opdracht gekregen antwoord te geven op de volgende vraagstelling:

Wat is de genetische status van de fokpopulatie op NPDHV en hoe verhoudt die zich ten opzichte van de bestaande Nederlandse populatie en buitenlandse referentiepopulaties?

1.3 Werkwijze

Een belangrijk deel van de analyses wordt uitgevoerd ten behoeve van een genetische studie naar de status van de resterende Nederlandse populatie op de Sallandse Heuvelrug. Het in dit rapport beschreven genetische onderzoek naar de fokpopulatie loopt parallel daaraan waarbij veel van de monsters en analyses voor beide vraagstellingen zijn gebruikt. Omdat bij NPDHV echter de wens bestaat deze nazomer nog tot uitzet te kunnen overgaan zijn niet alle analyses en monsters die voor de studie aan de Nederlandse populatie zullen worden verricht en geanalyseerd meegenomen, omdat en nog monsters verzameld en/of onderzocht moeten worden.

Om de vraagstelling uit 1.2 te kunnen beantwoorden zijn korhoenmonsters uit het Noord-West Europese verspreidingsgebied verzameld en geanalyseerd. Voor Nederland zijn veer- en eischaalmonsters verzameld op de Sallandse Heuvelrug. Daarnaast zijn de Nederlandse korhoenders uit de collectie van Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis bemonsterd. Van de fokpopulatie van NPDHV zijn monsters verzameld door de betrokken NPDHV medewerkers. Om een indruk te krijgen van genetische diversiteit in relatief grote, gezonde korhoenpopulaties en om inzicht te krijgen in verwantschappen tussen populaties zijn buitenlandse populaties bij de analyses betrokken. Hiertoe wordt samengewerkt met Dr. Gernot Segelbacher (Max Planck Instituut voor Ornithologie in Radolfzell, Duitsland) en Prof. Jacob Höglund & Jobs Karl Larsson (Universiteit van Uppsala, Zweden). Op deze instituten loopt al enkele jaren onderzoek aan Tetraonidae, waaronder genetisch onderzoek aan het korhoen. De samenwerking met de buitenlandse partners bestaat uit het verstrekken van referentiemonsters om de analyses te Alterra op de zelfde wijze te kunnen verrichten zodat de dataset uitwisselbaar is. Daarnaast zullen gegevens van tenminste twee grote referentiepopulaties worden verstrekt om de Nederlandse gegevens tegen af te zetten. Ten slotte zal een deel van de museum- en veermonsters in Uppsala worden geanalyseerd vanwege de grotere ervaring met deze voor DNA analyses wat moeizamere type monsters (variabele DNA kwaliteit als gevolg van ouderdom) en vanwege de wens de analyses zo spoedig mogelijk afgerond te hebben.

De genetische technieken die worden toegepast zijn microsatelliet en mitochondriaal DNA analyse. De laatste analyse is alleen gedaan aan een geselecteerde set. Microsatellieten zijn zeer variabele delen van het DNA in de celkern. Microsatelliet analyse geeft een indruk van de aanwezige genetische variatie binnen populaties. Daarnaast is de microsatelliet variatie in gezonde populaties vaak zo groot dat de dieren individueel te herkennen zijn aan hun unieke DNA fingerprint en daardoor ook te monitoren zijn. Voor microsatelliet analyse is het noodzakelijk om soortspecifieke primers te ontwikkelen. Voor het korhoen zijn deze ontwikkeld en succesvol toegepast. Mitochondriaal DNA (mtDNA) is conservatief, wat betekent dat het nauwelijks aan veranderingen onderhevig is. Daarnaast erft het alleen via de moeder over, omdat het zich buiten de celkern bevindt. Deze twee eigenschappen maken mtDNA zeer geschikt voor taxonomisch onderzoek. Met behulp van universele primers wordt een stuk DNA geselecteerd en gesequenced, dwz. de base

volgorde van dat stuk DNA wordt bepaald. Variatie in de base volgorde wordt dan gebruikt om de verwantschap te bepalen.

1.4 Genetische diversiteit

Biodiversiteit wordt vaak op drie niveau's gedefinieerd: op het niveau van ecosystemen en habitats, op soortsniveau en op populatie- en individu niveau (genetische biodiversiteit). Om genetische diversiteit te analyseren zijn verschillende technieken ontwikkeld (Bijlsma, 1995). Cellen bevatten nucleair- en mitochondriaal DNA. DNA bevat de genetische informatie die nodig is om een organisme te maken. DNA is opgebouwd uit vier zogeheten *baseparen* (A,T,G en C) die in verschillende volgorden voorkomen. Het DNA is dan een lange keten van baseparen. Door de volgorde van de baseparen tussen individuen te vergelijken, kan gekeken worden of er variatie is en wat de frequentie van de verschillende varianten binnen een populatie is. Indien stukjes van het DNA worden onderzocht die coderen voor een eiwit (functioneel DNA) spreekt men over een *gen* of *genen*. Indien de onderzochte stukjes DNA geen functie, of een onbekende functie hebben spreekt men van een *locus* of *merker*. De mate waarin de verschillende onderdelen van het DNA onderhevig zijn aan mutaties en selectie maakt dat er variabele en conservatieve delen in het genoom te vinden zijn. Afhankelijk van de vraagstelling wordt de meest geschikte techniek toegepast waarbij ook rekening moet worden gehouden met de kwaliteit en de kwantiteit van de te verkrijgen DNA monsters. Uitwerpselen, veren en museummateriaal zijn, in tegenstelling tot weefsel materiaal, in het algemeen niet eenvoudig te analyseren vanwege de verminderde DNA kwaliteit.

De twee standaard parameters voor het weergeven van genetische diversiteit zijn de mate van polymorfisme en het percentage heterozygositeit. *Polymorfisme* betekent dat er meerdere varianten of *allelen* (nucleair DNA) of *haplotypen* (mitochondriaal DNA) van een gen of merker aanwezig zijn in een populatie. Indien een individu van de vader een andere allel heeft meegekregen dan van de moeder, is dit individu *heterozygoot* voor dit gen/merker. Indien het twee dezelfde allelen bezit is het *homozygoot*. Hoe groter het aantal verschillende allelen van een gen/merker binnen een populatie, des te groter de genetische variatie van die populatie. Hoe groter het aantal genen waarvoor een individu heterozygoot is, des te groter is de genetische variatie in dat individu. Het belang van genetische diversiteit laat zich het beste verklaren door genen als pakketjes informatie te beschouwen. Bij een grote variatie aan allelen is er dus veel informatie binnen het individu of populatie aanwezig. Deze informatie hoeft niet direct noodzakelijk te zijn voor de huidige overleving maar kan bij veranderende omgevingsfactoren het verschil betekenen tussen overleven en (uit)sterven.

Kleine populaties lopen, als gevolg van een toevallige combinatie van negatieve demografische- en omgevingsfactoren, een groter risico uit te sterven dan grotere populaties. Zo is de kans dat bij sterfte van de helft van de dieren, bijvoorbeeld door een ziekte of slechte weersomstandigheden, de overblijvende helft bestaat uit dieren van hetzelfde geslacht, aanzienlijk groter bij een populatie van 20 dieren dan bij een populatie van 100 individuen. Naast het numerieke aspect spelen ook populatie-

genetische processen een belangrijke rol bij het voortbestaan van de populaties (Keller & Waller, 2002). Omdat de genetische variatie per individu niet groot kan zijn en daarmee ook het aanpassingsvermogen aan veranderende milieuomstandigheden beperkt is, wordt het adaptatievermogen van een populatie vooral bepaald door de gezamenlijke genetische variatie van de individuen (Booy, 1998). Binnen grote populaties is er over het algemeen een grotere genetische variatie dan binnen kleine populaties. Een proces dat daarbij een belangrijke rol speelt is de *genetische drift*. Bij het doorgeven van de genetische variatie van de ene generatie naar de volgende kan verlies van variatie optreden. Dit effect zal sterker zijn naarmate de populatie omvang kleiner is. De meest extreme vorm van genetische drift treedt op bij paring tussen verwanten. Organismen beschikken dan ook over verschillende mechanismen om *inzeelt* te voorkomen. Een dergelijk mechanisme is bijvoorbeeld geslachtsafhankelijke dispersie, waarbij de mannetjes verder wegtrekken dan de vrouwtjes of juist andersom. Bij kleine, geïsoleerde populaties kan aan een belangrijke voorwaarde voor het behoud van genetische variatie, het min of meer willekeurig kiezen van een partner ("random mating"), niet worden voldaan, omdat er daarvoor te weinig potentiële partners zijn. Behalve als gevolg van genetische drift kan de genetische variatie afnemen door selectie, migratie, inzeelt en *bottlenecks*. Een demografische bottleneck is het proces waarbij een populatie in korte tijd sterk in aantal achteruitgaat. Indien dit een sterke afname van de genetische variatie tot gevolg heeft (als deze bottleneck niet snel door populatiegroei wordt gevolgd) dan spreekt men van een genetische bottleneck.

Afname van de genetische variatie kan leiden tot een verlaagde *fitness*. Onder fitness wordt verstaan het reproductieve succes gedurende het leven van een individu. Hoewel dit niet eenvoudig te analyseren is wordt het vaak gemeten aan de grootte van individuen, fertiliteit, levensverwachting, groeisnelheid en eventueel de metabolische efficiëntie van enkele stoffen.

Voor de vraagstelling in dit rapport is ook nog een ander proces van belang: *genetische adaptatie*. Populaties die geïsoleerd raken doordat zij nieuwe gebieden betrekken en/of omdat uitwisseling via dispersie onmogelijk wordt kunnen als gevolg van selectie en genetische drift hun genetische variatie sterk wijzigen. De mate waarin lokale adaptatie plaats vindt, is enigszins gerelateerd aan de populatieomvang, de duur van de isolatie en de mate waarin het nieuwe leefmilieu verschilt van het oorspronkelijke. *Locale adaptatie* kan betekenen dat bepaalde genen die voordelig zijn in het nieuwe leefmilieu frequenter voorkomen; minder gunstige genen worden uitgeselecteerd. Daarnaast kan *co-adaptatie* plaatsvinden. Dit betekent dat bepaalde genen elkaars werking kunnen verbeteren indien zij in hetzelfde individu aanwezig zijn en dus tegelijkertijd tot expressie kunnen komen. Indien een lokaal geadapteerde populatie weer in contact wordt gebracht met soortgenoten uit een andere populatie, hetzij natuurlijk door het opheffen van een migratiebarrière, hetzij kunstmatig door het uitwisselen van individuen, kan dit leiden tot *uitzeelt* of *outbreeding depression*. Hiermee wordt bedoeld het opheffen van de lokale adaptatie en co-adaptatie wat resulteert in een afnemende fitness. Voor meer informatie betreffende de toepassing van populatiegenetica in het natuurbeheer wordt verwezen naar Frankham *et al.*, 2002.

2 Monsterverzameling

2.1 Nederland en Europa

Voor het genetische onderzoek aan de Nederlandse populatie op de Sallandse Heuvelrug zijn monsters verzameld in de vorm van ruiveren en eischalen. Daarnaast vloog een haan zich dood tegen een afrastering. In het Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis zijn van 33 gebalgede korhoenders uit de periode 1893-1968 stukjes van de teenkussens afgesneden. Vanuit Duitsland zijn genetische data voor korhoenders van de Franse Alpen, Oostenrijk, Schotland, en een geïsoleerde populatie te Rhön in centraal Duitsland verkregen. Vanuit Zweden zijn de genetische data voor korhoenders vanuit Noorwegen en Finland verkregen. Daarnaast zijn DNA monsters opgestuurd om de analyses te Alterra op dezelfde wijze te kunnen verrichten, zodat de resultaten uitwisselbaar zijn. Ook zijn in Zweden de veren en museum monsters geanalyseerd vanwege de grotere ervaring daar met DNA isolatie uit deze toch wat moeilijkere type monsters (1.4). In tabel 1 zijn de monsters met hun herkomst weergegeven.

2.2 Fokprogramma van Nationaal Park De Hoge Veluwe

Namens Nationaal Park De Hoge Veluwe (NPDHV) heeft de heer B. Boers de volgende informatie betreffende de fok verstrekt. Op NPDHV wordt al 24 jaar gefokt met korhoenders. Oorspronkelijk zijn hiervoor Nederlandse korhoenders gebruikt, aangevuld met buitenlandse individuen. In Europa wordt nog op vele locaties gefokt met korhoenders waarbij een soort van stamboek of foklijnen worden bijgehouden. Op basis van dit stamboek beslissen de fokkers bij NPDHV van welke lijn het wenselijk is om een/enkele dier(en) toe te voegen aan het fokprogramma. Hiermee worden dus bewust inteelt effecten vermeden. Het is NPDHV niet bekend wat de oorspronkelijke herkomst is van de dieren die toegevoegd worden aan het fokprogramma. Het is dan ook niet uit te sluiten dat in het fokprogramma de genen aanwezig zijn vanuit verschillende uithoeken van het verspreidingsgebied van het korhoen. Op dit moment omvat de fokgroep 20 hennen en 10 hanen, aangevuld met enkele minder bereidwillige fokexemplaren en daarnaast vele nakomelingen. De fok geschied op 2 locaties vanuit het oogpunt van risicospreiding. Er bestaan 10 rennen, elk met 2 hennen en een haan. Zodra een hen eieren heeft worden deze verwijderd en onder een kip gelegd. Indien een korhen broeds is word een eventueel vervolglegsel wel door haarzelf uitgebroed. Vervolglegsels van niet-broedse korhennen worden onder een kip geplaatst. Zodra de eieren uitkomen worden de kuikens gescheiden van de korhen of kip en onder een warmtelamp geplaatst. Ze worden met de hand opgevoed. Zodra de kuikens 6 tot 8 weken oud zijn worden ze per 25-30 individuen in 80 meter lange uitzetrennen geplaatst. In 2003 zijn door stress als gevolg van o.a. overvliegende roofvogels 45 korhoenders omgekomen.

Op 15 juni 2004 zijn er 10 dode kuikens en 34 eierschalen (ei waaruit een kuiken is gekomen) in diepgevroren toestand aan Alterra geleverd, welke door medewerkers van NPDHV waren verzameld. Begin juli zijn nog eens enkele eischalen, dode kuikens en een dode hen op Alterra afgeleverd. Volgens de heer B. Boers vormen de monsters een goede afspiegeling van alle hennen en hanen.

Tabel 1: Herkomst, aantal (N), monsterperiode en status van de geanalyseerde populaties

Populatie	N	Gebied	Periode	status
NL heden	22	Sallandse Heuvelrug	2003	Geïsoleerd, klein.
NL verleden	33	Nederland	1893-1968	nvt
Fokprogramma	43	?	2004	gezond
Frankrijk	7	Franse alpen	1999	Gezond, lichte teruggang
Oostenrijk	29	Gehele korhoen verspreidingsgebied	1999	Gezond
Rhön	5	Centraal DL	1995	Geïsoleerd, klein, bottleneck. (10-30 hanen)
Schotland	18	3 'leks'	2000	stabiel
Finland	23	Jyväskylä	Jaren '90	stabiel
Noorwegen	30	Östvold (Zuid-Noorwegen)	Jaren '90	stabiel



Foto 2: Korhoen kuiken, Holterheide 1985 (foto: Alterra)

3 Moleculaire analyses

De DNA-isolatie werd uitgevoerd met behulp van de Qiagen DNeasy Tissue kit (Bijlage 8.1). Van de kuikens is een teenkootje gebruikt en van de eierschalen ongeveer 2 cm² waarvan het vlies met een bloedvat duidelijk aanwezig was. Van veren (veldmonsters) werd alleen het topje gebruikt wat zich in de huid bevindt. Op dode korhoenders is sectie verricht waarbij een stukje spierweefsel is verzameld. Te Naturalis is van alle Nederlandse korhoenders in de collectie een stukje van een eeltkussen van een teen afgesneden.

3.1 Microsatelliet analyse

Vier primerparen van de loci TUT1, TUT2, TUT3 en TUT4, ontwikkelt voor het auerhoen *Tetrao urogallus* (Segelbacher *et. al.* 2000), en zeven primerparen van de loci BG10, BG12, BG15, BG16, BG18, BG19 en BG20, ontwikkelt voor het korhoen *Tetrao tetrix* (Stuart *et. al.* 2001), zijn in dit onderzoek gebruikt (tabel 2). In bijlage 8.2 is de microsatelliet variatie voor de monsters van NPDHV weergegeven.

Stukjes van het DNA zijn met behulp van de Polymerase Ketting Reactie (PCR) vermenigvuldigd zodat ze zichtbaar kunnen worden gemaakt. De PCR-reacties werden uitgevoerd met 10 maal verdund DNA-isolaat in een totaal volume van 10 µl met een MJ Research DNA-engine. Alle loci werden in PCR gezet met 1 µl 10x PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH = 8,4, 500 mM KCl), 4,25 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's-cocktail, 0,13 µM van elke primer, 0,16 µl W-1%, 0,16 µl BSA (20 mg/ml) en 0,3 U Taq-DNA polymerase (Invitrogen). De PCR condities bestonden uit een initiële denaturatie van 5 minuten bij 94 °C gevolgd door 35 cycli van 30 seconden van 95 °C, 30 seconden bij een bepaalde annealingtemperatuur (T_a) afhankelijk van het locus (Zie Tabel: 1), 60 seconden bij 72 °C en een final elongation van 7 minuten bij 72 °C. De 5' -end van elke Forward-primer is gesynthetiseerd met een IRD 800 nm label. 5 µl van het amplicon werd na denaturatie in 5 µl loading buffer (99,6 % Formamide, 10 mM EDTA en 0,1 % Broomphenol blauw) voor 2 minuten bij 95 °C, geanalyseerd op een 25 cm lange sequencing gel (6,5 % polyacrylamide, 7 M Urea en 1xTBE) met behulp van de LICOR 4200 DNA analyser. Tijdens de electroforese werden ook positieve controles gebruikt om de allelengtes van de samples te kunnen bepalen.

Voor de analyses zijn van de totale dataset zijn alle monsters verwijderd welke voor meer dan één locus niet gescoord konden worden. Daarnaast zijn enkele loci niet gebruikt omdat de referentiepopulaties niet voor deze loci waren geanalyseerd. Voor enkele loci was de score op de individuele laboratoria verschillend uitgevoerd waardoor er een verschil in basepaarlengte van ±1 of ±2 bases was ontstaan. Voor de data analyse zijn deze verschillen gecorrigeerd met behulp van referentiemonsters. Van de NPDHV monsters zijn alleen de eerste 44 monsters geanalyseerd. Van deze monsters bleek een ei en een kuiken over identieke microsatelliet profielen te

beschikken zodat het vrijwel zeker het ei van dat jong betreft. De resultaten van het ei zijn dan ook buiten beschouwing gelaten om de data analyse niet te beïnvloeden. Met behulp van de in hoofdstuk 4 vermelde populatie-genetische programma's is de data-analyse uitgevoerd. Uiteindelijk zijn 159 monsters uit 7 populaties voor 8 loci geanalyseerd.

Tabel 2: Beschrijving van de elf gebruikte primerparen. De primerparen staan genoteerd in de 5' naar de 3' richting met hun respectievelijke nucleotide repeat, de toegepaste annealing temperatuur (T_a , °C) en fragmentlengte.

Locus	Primer sequentie (5' – 3')	Nucleotide repeat	T_a (°C)	Fragment-lengte (bp)
TUT 1	GGTCTACATTTGGCTCTGACC ATATGGCATCCCAGCTATGG	(CTAT)12	59,0	217
TUT 2	CCGTGTCAAGTTCTCCAAAC TTCAAAGCTGTGTTTCATTAGTTG	(GATA)12	59,0	160
TUT 3	CAGGAGGCCTCAACTAATCACC CGATGCTGGACAGAAGTGAC	(TATC)11	59,0	154
TUT 4	GAGCATCTCCCAGAGTCAGC TGTGAACCAGCAATCTGAGC	(TATC)8	59,0	179
BG10	ATGTTTCATGTCTTCTGGAATAG ATTTGGTTAGTAACGCATAAGC	(GATA)17	53,0	225
BG12	TCTCCTTCTAAACCAGTCATTC TAGTTTCCACAGAGCACATTG	(GATA)29	59,0	232
BG15	AAATATGTTTTGCTAGGGCTTAC TACATTTTTTCATTGTGGACTTC	(CTAT)16	53,0	181
BG16	GTCATTAGTGCTGTCTGTCTATCT TGCTAGGTAGGGTAAAAATGG	(CTAT)15	53,0	161
BG18	CCATAACTTAACTTGCACTTTC CTGATACAAAGATGCCTACAA	(CTAT)17	59,0	168
BG19	CAAGGCGCAACATTAAGATTC TGTATTTTTGGAACTCTGTGTGC	(GATA)13	57,0	178
BG20	AAGCACTTACAATGGTGAGGAC TATGTTTTCTTTTCAGTGGTATG	(GATA)17	59,0	147

3.2 Mitochondriële DNA analyse

De PCR-reactie werd uitgevoerd met 1 µl DNA-isolaat in een totaal volume van 25 µl met een MJ Research DNA-engine. De mtDNA D-loop werd geamplificeerd met gebruikmaking van de primerset PHDL (5' AGG ACT ACG GCT TGA AAA GC

3') en PHDH (5' CAT CTT GGC ATC TTC AGT GCC 3') (Fumihito et. al. 1995) waarbij een amplicon van 1155 ± 2 baseparen ontstaat.

De PCR-mix bestond uit 2,5 μ l 10x PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH = 8,4, 500 mM KCl), 3,5 mM MgCl₂, 250 μ M dNTP's-cocktail, 0,40 μ M van elke primer en 0,75 U Taq-DNA polymerase (Invitrogen). De PCR-conditie wordt gekenmerkt als een Touchdown PCR, met een initiële denaturatie van 3 minuten bij 94 °C gevolgd door 33 cycli van 15 seconden van 94 °C, 15 seconden van 61 °C, Δ -/- 0,3 °C na iedere cyclus, 60 seconden bij 72 °C en een final elongation van 10 minuten bij 72 °C. 5 μ l van het amplicon werd gemengd met 5 μ l loading buffer (40% sucrose en 0,25 % Broomphenol blauw) en geanalyseerd op een 2% agarosegel in 1x TBE elektrolyt. Nadat de agarosegel 20 minuten in contact is gebracht met een ethidiumbromide oplossing (1 mg/l) werd de gel blootgesteld aan UV-licht waardoor de resultaten zichtbaar werden. Van de monsters die succesvol zijn geamplificeerd is een selectie van 20 monsters gemaakt uit de beschikbare populaties welke zijn opgestuurd naar BaseClear Labservices om de sequenties van de monsters te analyseren (tabel 7). De ruwe databestanden zijn te Alterra gecontroleerd en geanalyseerd. De nucleotide sequenties zijn bewerkt met behulp van het programma Chromas v 2.3 (<http://www.techneysisium.com.au/chromas.html>) en handmatig gecontroleerd. Als referentie sequentie voor *Tetrao tetrix* is AF 532459 gedownload van de NCBI data base. Voor elk monster is de uiteindelijke alignment uitgewerkt met behulp van het programma Bioedit v 7.0 (Hall 1999) (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Nucleotide diversiteit en haplotype diversiteit zijn berekend met behulp van het programma DnaSP V 4.0.5. (<http://www.ub.es/dnasp>). De phylogenetische boom is berekend op basis van neighbour-joining (NJ, Tamura-Nei distance; Saitou and Nei 1987) voor de totale mitochondriale control region met het programma MEGA (Kumar, Tamura et al. 1993). De sequentie van een Kaukasische korhoen *Tetrao mlkosiewiczzi* (AJ 2971731) is gebruikt als outgroup voor het maken van de phylogenetische boom.

Foto 3: Jonge korhoenders in het fokprogramma van het Rijks Instituut voor Natuurbeheer (RIN; tegenwoordig Alterra), Leersum, 25-8-1981. Foto Alterra.



4 Resultaten

4.1 Microsatelliet analyse

Om een indruk te krijgen van de genetische variatie is met behulp van de computetprogramma's GenAlEx (Peakall & Smouse 2001) en Genepop (Raymond & Rousset 1995) het gemiddelde aantal allelen (N_a) en het aantal effectieve allelen (N_e) per microsatelliet (N_e) bepaald. Daarnaast is het percentage waargenomen en verwachte heterozygoten (H_o en H_e) in de verschillende populaties bepaald. Het aantal allelen per microsatelliet is een maat voor het aantal varianten dat voor een gen aanwezig is in de bemonsterde populatie. N_e is in vergelijking met N_a een maat voor het aantal allelen onafhankelijk van monster grootte en daardoor beter onderling vergelijkbaar. Het percentage heterozygoten geeft een indruk van het aantal individuen in de bemonsterde populatie dat over twee verschillende varianten van een gen beschikt (tegenover de individuen die voor een gen twee dezelfde varianten bezitten: homozygoten).

*Tabel 3. Analyse van genetische variatie in korhoen populaties gebaseerd op acht microsatelliet loci. n, aantal individuen; N_a , gemiddeld aantal allelen per locus; N_e , effectieve aantal allelen per locus; H_o , waargenomen heterozygositeit; H_e , verwachte heterozygositeit; F_{is} , de gemiddelde inteelt coëfficiënt. M.b.t. F_{is} : * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; andere populaties wijken niet af van nul.*

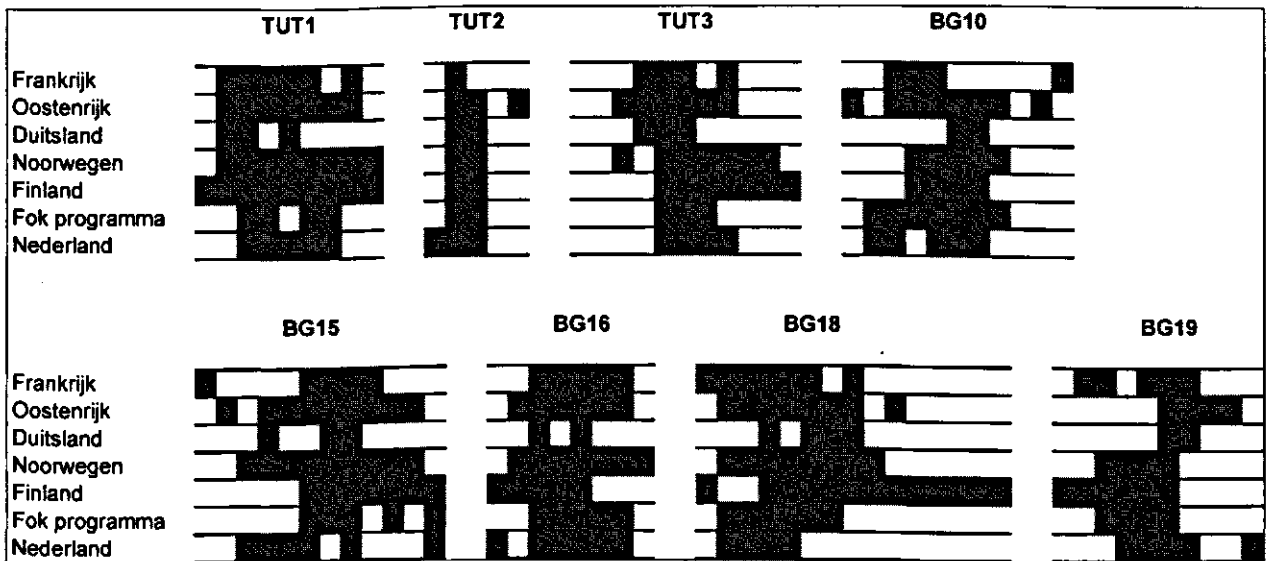
Populatie	n	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{is}
Frankrijk	7	4.5	3.5	0.63	0.67	0.11 *
Oostenrijk	29	6.6	3.6	0.69	0.69	0.01
Duitsland	5	2.6	2.1	0.35	0.53	0.39 **
Noorwegen	30	6.4	3.7	0.67	0.66	0.01
Finland	23	6.6	4.0	0.64	0.65	0.01
Fokprogramma	43	4.6	2.7	0.58	0.59	0.01
Nederland	22	4.4	2.5	0.57	0.58	0.02

Tabel 3 geeft aan dat er een groot verschil in aantal bemonsterde individuen tussen de populaties is. Dit is mogelijk van invloed op de resultaten aangezien het aantal waargenomen allelen over het algemeen sterk afhankelijk is van monster grootte. De grotere gezonde korhoenpopulaties beschikken nog over $\geq 3,5$ effectieve allelen per locus en een H_o van $\geq 0,63$. In geïsoleerde en kleine populaties als Rhön (Duitsland) en de Sallandse Heuvelrug (Nederland) is dit al afgenomen naar een N_e van 2,1 en 2,5 en een H_o van 0,35 en 0,58. Ook het fokprogramma van NPDHV is op basis van deze getallen genetisch armer. De F_{is} wordt berekend door de heterozygoten deficiëntie te bepalen. Een positieve F_{is} geeft aan dat er meer homozygoten zijn dan

verwacht, een negatieve F_{is} geeft een heterozygoten overschot aan. Zoals te verwachten wijken de populaties met de kleine aantallen af. Frankrijk en Duitsland vertonen een heterozygoten deficiëntie. Voor Frankrijk kan dit verklaard worden door de geringe populatieomvang. Voor Duitsland (Rhön) zal dit ook meespelen, maar daarnaast is van deze populatie bekend dat deze door een bottleneck is gegaan en is gereduceerd tot ongeveer 15 hanen. Zeer waarschijnlijk heeft de populatie hierbij veel van zijn genetische variatie verloren. Dit blijkt ook het feit dat de verwachte heterozygositeit H_e 0,53 is terwijl er slechts een waargenomen heterozygositeit H_o is vastgesteld van 0,35.

Tabel 4. Allel diversiteit van acht microsatelliet loci gebaseerd op 159 individuen. Zie ook figuur 2.

Locus	Repeat opbouw	# allelen	Range (min – max) per populatie	Range (baseparen)
TUT1	(CTAT)12	9	3 – 9	197 – 229
TUT2	(GATA)12	4	1 – 3	132 – 148
TUT3	(TATC)11	9	3 – 7	146 – 186
BG10	(GATA)17	10	2 – 8	213 – 253
BG12	(GATA)29	12	3 – 9	167 – 211
BG15	(CTAT)16	8	2 – 7	149 – 177
BG18	(CTAT)17	15	4 – 13	148 – 204
BG19	(GATA)13	10	2 – 7	164 – 200



Figuur 2. Aan of afwezigheid van allelen van acht microsatelliet loci in zeven populaties. Zwarte blokjes duiden op aanwezigheid van een allel en witte blokjes op afwezigheid. Zie tabel 4 voor specifieke informatie.

Tabel 4 laat zien hoeveel allelen per microsatelliet locus zijn aangetroffen en wat de range per populatie is. In figuur 2 is deze verdeling visueel weergegeven. Per microsatelliet locus is per populatie weergegeven welke allelen in die populatie

voorkwamen. Zo is goed te zien dat locus TUT2 weinig variabel is, met slechts 4 allelen. Het kleinste allel (links) en het grootste allel (rechts) komen daarnaast ook nog eens alleen in respectievelijk de Nederlandse en de Oostenrijkse populatie voor. Deze wijze van datapresentatie maakt het eenvoudig om snel te zien welke populaties 'gaten' vertonen in hun allel verdeling. Zo is voor locus BG15 te zien dat in de 'zwarte balk' zich 'witte gaten' voordoen voor bijvoorbeeld de Nederlandse en de Duitse populatie en daarnaast in het fokprogramma. Waarschijnlijk zijn deze allelen verloren gegaan als gevolg van genetische drift.

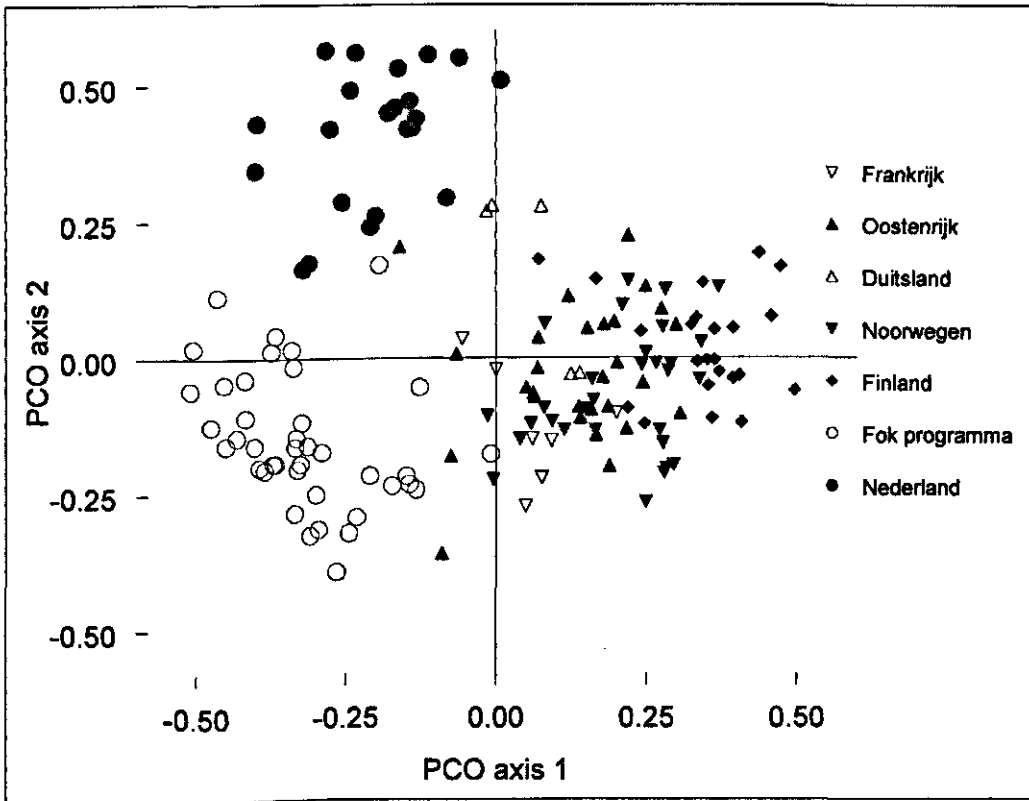
Voor nadere populatiegenetische analyse van de dataset is verondersteld dat alle individuen tot één grote populatie behoren. Binnen deze populatie is structuur gebracht door genetisch verwante dieren te groeperen in clusters. Hiervoor zijn twee methoden gebruikt. Als eerste is het programma STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) gebruikt. Het model dat ten grondslag ligt aan dit programma veronderstelt K (een onbekend aantal) populaties, welke gekarakteriseerd worden door de allel frequenties van een set van onafhankelijke merkers. Het resultaat is een onderverdeling van de totale dataset in een optimaal aantal populaties, waarbij vervolgens wordt aangegeven welk percentage van de oorspronkelijke monsters uit een populatie aan een bepaald cluster worden toegewezen. Naast deze Bayesiaanse cluster procedure is op de dataset een PCO analyse uitgevoerd. Voor de *Principale Coördinaten Analyse* (PCO) is gebruik gemaakt van het programma GENAIX (Peakall & Smouse, 2001). Hierbij wordt eerst de onderlinge genetische afstand tussen alle 159 individuen bepaald en vervolgens is daar met behulp van de PCO structuur in aangebracht. De PCO is een multivariate analyse die probeert de variatie in een dataset zo te combineren en te groeperen dat een inzichtelijker patroon ontstaat. Vaak wordt een PCO analyse grafisch weergegeven door de score van de individuele monsters op de eerste en tweede PCO as weer te geven.

Tabel 5. Samenvatting van de resultaten van een Bayesian cluster analyse met behulp van het programma Structure (Pritchard et al. 2000). Weergegeven is kans waarmee individuen van de oorspronkelijk zeven populaties aan een bepaald cluster worden toegekend. Met vet zijn die populaties weergegeven die karakteristiek zijn voor een cluster.

Populatie	Genetisch cluster				
	1	2	3	4	5
Frankrijk	0.02	0.01	0.07	0.66	0.23
Oostenrijk	0.02	0.02	0.05	0.64	0.27
Duitsland	0.01	0.02	0.30	0.59	0.09
Noorwegen	0.04	0.16	0.02	0.05	0.73
Finland	0.01	0.93	0.02	0.01	0.03
Fok programma	0.89	0.01	0.03	0.06	0.01
Nederland	0.03	0.01	0.93	0.02	0.01

In Tabel 5 zijn de resultaten van de cluster analyse weergegeven. Uit de analyse bleek dat een indeling in vijf clusters (genetisch identieke groepen) het meest optimaal was. De Nederlandse populatie valt voornamelijk in cluster 3; 93% van de onderzochte monsters wordt hierin ingedeeld. Naast Nederland vormen ook Noorwegen (cluster 5), Finland (cluster 2) en het fokprogramma (cluster 1) gescheiden clusters. De

andere populaties zijn minder eenduidig, maar worden grotendeels aan cluster 4 toegewezen. De Duitse populatie, echter, valt naast cluster 4 (59%) ook voor een groot deel in cluster 3 (30%).



Figuur 3. Scores van individuele korboender genotypes op de eerste twee assen van een Principale Coördinaten Analyse. De assen verklaren 13.6 en 8.5 % van de totale variatie.

Figuur 3 toont visueel de clustering van de verschillende populaties. Met deze methode is het van belang te realiseren dat er slechts een weergave in twee dimensies wordt weergegeven. Deze twee assen verklaren wel de meeste variatie. Het is echter mogelijk dat 2 individuen (punten) die dicht bij elkaar worden geplott in deze X-Y grafiek in werkelijkheid op de niet weergegeven Z-as (3^e dimensie) uit elkaar worden getrokken. Des al niet te min weerspiegelt de figuur in grote lijnen de resultaten van tabel 5. Drie van de vier belangrijkste clusters (Nederland, Fokprogramma & Finland) worden in de figuur ook weer duidelijk als groep weergegeven. Noorwegen valt samen met Frankrijk, Oostenrijk en Duitsland maar zal mogelijk op de Z-as beter onderscheiden kunnen worden.

Naast clusteranalyses is voor de dataset ook de mate van genetische differentiatie (F_{st}) tussen populaties berekend. De F_{st} varieert tussen 0 (de populaties zijn identiek, i.e. de allelfrequenties voor de verschillende allelen zijn hetzelfde) en 1 (maximale differentiatie, i.e. de populaties zijn gefixeerd voor verschillende allelen). De grootte van de F_{st} wordt sterk beïnvloed door het dispersie vermogen van een soort. Soorten

met een gering dispersievermogen hebben vaak hogere F_{st} waarden omdat er minder gemakkelijk uitwisseling van genetisch materiaal plaatsvindt in de vorm van migratie. Vaak is het ook zo dat naburige populaties een lagere onderlinge F_{st} hebben dan populaties die ver verwijderd zijn. Ook populaties die door genetische drift sterk in variatie zijn afgenomen kunnen grote F_{st} waarden geven in vergelijking met naburige populaties waar historisch door gene flow grote verwantschap mee bestond. In dergelijke gevallen is het raadzaam de historische variatie in de analyses mee te nemen (zie bijvoorbeeld vergelijkbaar onderzoek aan de Hamster; Jansman et al. 2003). Met behulp van het programma FSTAT (Goudet, 1995) is de F_{st} waarde tussen de verschillende populaties berekend.

Tabel 6: De genetische differentiatie (F_{st}) van korhoenpopulaties.

Populatie	FR	OR	DL	NW	FL	FP	NL
Frankrijk (FR)	-						
Oostenrijk (OR)	0.046	-					
Duitsland (DL)	0.174	0.157	-				
Noorwegen (NW)	0.105	0.063	0.215	-			
Finland (FL)	0.155	0.124	0.231	0.072	-		
Fok programma (FP)	0.154	0.155	0.269	0.161	0.237	-	
Nederland (NL)	0.210	0.168	0.227	0.193	0.232	0.174	-

De F_{st} over de gehele set bedraagt 0.162 ± 0.025 ; $P < 0.001$. Dit duidt op aanzienlijke populatie differentiatie. Hartl & Clark (1997) hanteren de volgende vuistregel voor interpretatie van F_{st} waarden: F_{st} van 0-0.05 geringe differentiatie; 0.05-0.15 matige differentiatie; 0.15-0.25 grote differentiatie en >0.25 zeer grote differentiatie. Deze waarden zijn gebaseerd op analyses verricht met een minder variabelere techniek, de allozym analyse. Bij een variabele merker als microsatelliet analyse moeten deze waarden mogelijk iets liberaler worden geïnterpreteerd. In dat geval duiden de in deze studie aangetroffen F_{st} waarden van ≥ 0.15 (tabel 6; in vet) op redelijke tot grote onderlinge genetische differentiatie. De drie populaties die redelijke tot grote genetische differentiatie tot alle andere populaties vertonen zijn Duitsland, Nederland en het fokprogramma. De twee populaties die geografisch dicht bij elkaar liggen en waarbij het ook waarschijnlijk is dat er nog gene flow middels dispersie plaatsvindt zijn de Alpenpopulaties van Oostenrijk en Frankrijk (Caizergues et al. 2003). Genetisch verschillen zij het minst van elkaar ($F_{st} = 0.046$). Datzelfde geldt ook voor de populaties van Finland en Noorwegen ($F_{st} = 0.072$) Wel is het opvallend dat de Oostenrijkse populatie genetisch gering gedifferentieerd is van de Noorse populatie ($F_{st} = 0.063$).

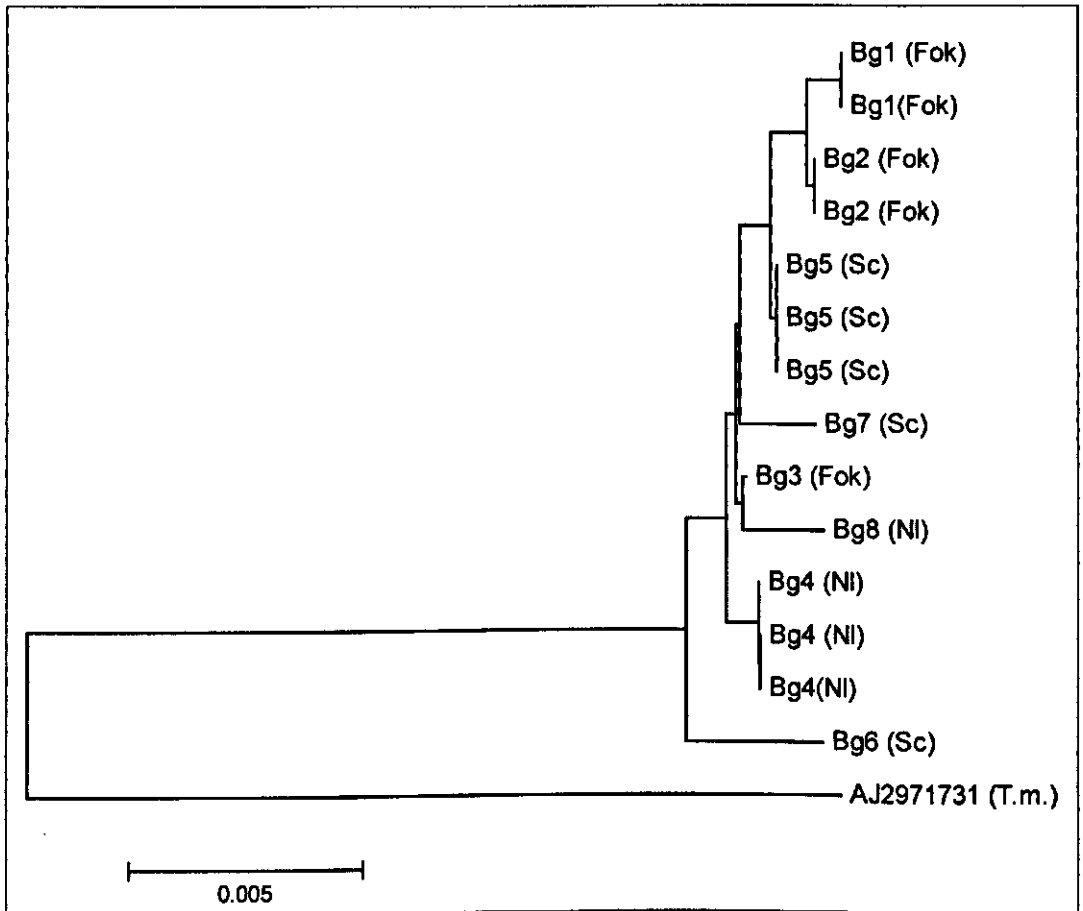
4.2 Mitochondriële DNA analyse

Twintig monsters zijn geselecteerd voor de mtDNA analyses. Zes daarvan leverden helaas geen bruikbare sequentie gegevens op (zie tabel 7). In bijlage 8.3 zijn de sequentie analyses weergegeven met de posities waarop de mutaties zijn aangetroffen.

Tabel 7: mtDNA monsters met hun code, herkomst en haplotype.

NR	Code NR	Herkomst	Haplotype
1	24923	Fok	Bg1
2	24926	Fok	Bg3
3	24929	Fok	Bg1
4	24944	Fok	Bg2
5	24955	Fok	Bg2
6	1	Scandinavie	Bg5
7	8	Scandinavie	Bg5
8	9	Scandinavie	Bg6
9	10	Scandinavie	Bg5
10	3a	Sallandse Heuvelrug	Bg4
11	4a	Sallandse Heuvelrug	Bg4
12	6	Sallandse Heuvelrug	<i>Mislukt</i>
13	8a	Sallandse Heuvelrug	<i>Mislukt</i>
14	12	Sallandse Heuvelrug	Bg8
15	D688	Scandinavie	Bg7
16	D649	Scandinavie	<i>Mislukt</i>
17	796	Alpen	<i>Mislukt</i>
18	806	Alpen	<i>Mislukt</i>
19	897	Alpen	<i>Mislukt</i>
20	231505	Sallandse Heuvelrug	Bg4

* Op dit moment is het nog niet duidelijk of de monsters 1, 8, 9 & 10 van Scandinavische origine zijn, of van een andere Westerse korhoenpopulatie afkomstig. Onze collega's in Zweden gaan dit nog na. Voor de interpretatie van de resultaten heeft dit echter geen invloed.



*Figuur 4: Phylogenetische boom op basis van de mtDNA sequentie analyse (zie ook tabel 7). Fok = Fokprogramma; Sc = Scandinavie; NI = Sallandse Heuvelrug. Als externe referentie is AJ2971731 T.m. meegenomen. Dit betreft een sequentie analyse van het verwante Kaukasisch korhoen *Tetrao mlokosiewiczii*.*

Tabel 7 en figuur 4 laten zien dat er variatie is in de sequentievolverde van de control region van de D-loop op het mtDNA, aangezien er 8 haplotypes zijn vastgesteld in 14 monsters. Binnen het fokprogramma zijn in de 5 onderzochte monsters 3 verschillende haplotypen vastgesteld. Dit betekent dat in ieder geval monsters zijn geselecteerd van in ieder geval 3 moederlijnen, aangezien mtDNA alleen via de moeder overerft. Haplotype BG1 en BG2 zijn alleen in het fokprogramma vastgesteld en deze worden in de figuur als uiterste aftakkingen geprojecteerd. Haplotype BG3 ligt meer centraler in de boom en groepeer samen met sequentie BG8 van de Sallandse heuvelrug. Ook de overige Nederlandse en Scandinavische monsters liggen dicht bij elkaar en verschillen onderling niet veel. Enige uitzondering is haplotype BG6 uit Scandinavie wat een aantal opvallende mutaties vertoont. Helaas zijn de monsters uit de Alpen mislukt zodat zij niet in de analyse meegenomen kunnen worden. De genetische verschillen zijn gering en in combinatie met het kleine monsteraantal en herkomst van de monsters levert deze analyse geen belangrijke bevindingen op, behalve dan dat de onderzochte monsters niet structureel van elkaar afwijken voor dit deel van het DNA.

5 Discussie

In de voorgaande hoofdstukken is uitgebreid ingegaan op de verschillende onderdelen van het onderzoek. Dit hoofdstuk zal de resultaten samen nemen om de vraagstelling, zoals vermeld in hoofdstuk 1, te kunnen beantwoorden.

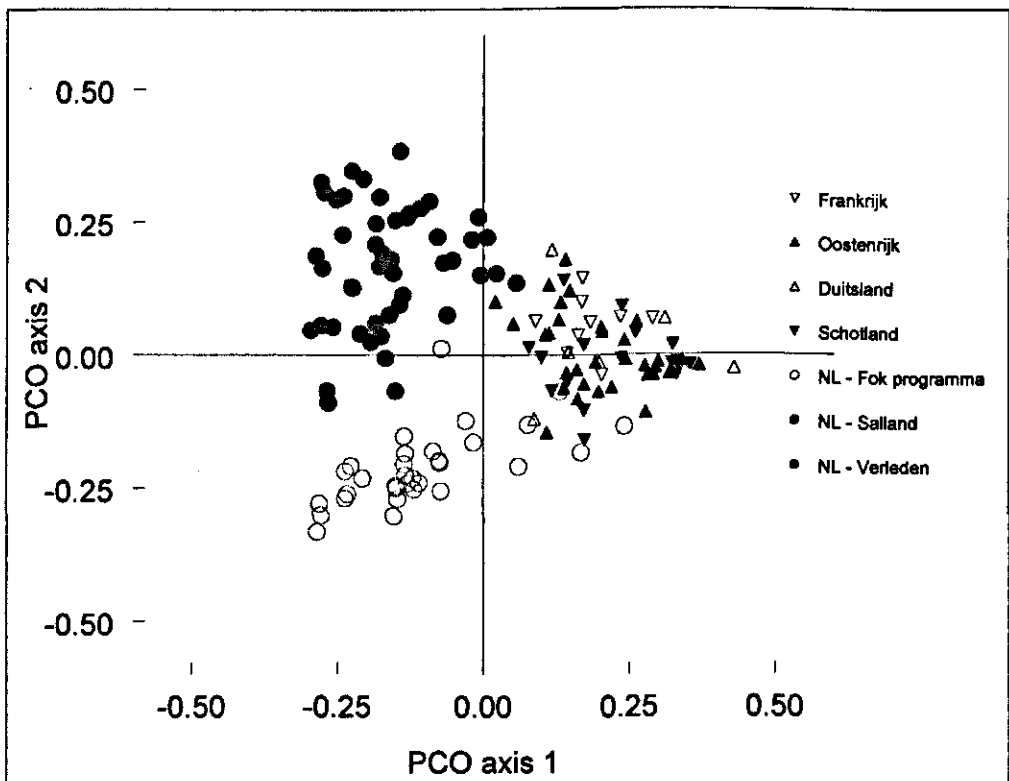
Wat is de genetische status van de fokpopulatie op NPDHV en hoe verhoudt die zich ten opzichte van de bestaande Nederlandse populatie en buitenlandse referentiepopulaties?

De genetische diversiteit van de fokpopulatie op NPDHV is op basis van het gemiddelde aantal allelen per locus (N_a) en heterozygositeit (H_e) geringer dan in de nog grote vitale populaties van de Alpen en Scandinavie. De genetische diversiteit van de Nederlandse korhoenpopulatie is vergelijkbaar met die van NPDHV, en dus ook geringer. Hoewel het museummateriaal nog niet in zijn geheel is geanalyseerd, is op basis van de eerste vier onderzochte loci (Tut1-4) af te leiden dat de genetische diversiteit iets groter was dan in de huidige populatie (historisch $H_o = 0,52$ en $N_e = 2,71$ versus heden $H_o = 0,51$ en $N_e = 2,17$). Caizergues et. al. (2003) onderzochten de genetische structuur van korhoenders in een gefragmenteerde- (Alpen) en een aanéengesloten populatie (Finland). Hierbij werden ca. 500 monsters geanalyseerd met 14 microsatellietprimers. Voor de Alpen werd een percentage heterozygositeit (H_o) van 0,74 waargenomen met een gemiddeld aantal van 5,4 allelen per locus (N_s). Voor Finland was dit vergelijkbaar: een H_o van 0,76 en N_s van 6,3. Ten opzichte van deze studie zijn de in dit rapport vastgestelde waarden voor N_s en H_o aan de lage kant.

Het historische Nederlandse cluster ligt vanuit genetisch oogpunt dichter bij de overige Europese populaties dan de huidige Salland populatie (figuur 5). Hierbij moet worden opgemerkt dat vergelijking van de positie van het historische cluster ten opzichte van het 'Europese' cluster indicatief is, aangezien de historische variatie in Nederland wordt vergeleken met de huidige variatie in de Europese populaties. De Nederlandse populatie heeft geografisch gezien altijd al aan de rand van het verspreidingsgebied gelegen waardoor niet met alle andere Europese populaties uitwisseling van dieren kon plaatsvinden. Dit kan ertoe leiden dat de genetische diversiteit ook een andere samenstelling zal kennen in vergelijking met een populatie in het centrum van het verspreidingsgebied. Mogelijk dat zelfs selectie en lokale adaptatie heeft plaatsgevonden aangezien ook habitat, milieu en klimaat kan verschillen van de populaties in het centrum van het verspreidingsgebied. Opvallend is wel dat historische en ook de hedendaagse Nederlandse populatie al over een geringere genetische diversiteit beschikte en in de genetische analyses aan de rand wordt gesitueerd (figuren 3 & 5), terwijl Scandinavie en de Alpen genetisch gezien overlap vertonen. Recentelijk heeft de isolatie middels genetische drift ertoe geleid dat de Nederlandse populatie qua samenstelling nog verder van het Europese cluster is gedifferentieerd (figuur 5). Daarnaast zal in een kleine geïsoleerde populatie de

diversiteit gaan afnemen. Deze resultaten komen overeen met andere geïsoleerde en kleine korhoenpopulaties in Europa zoals de Rhön populatie die ook in dit onderzoek is meegenomen, maar waarvan de steekproef klein is. De Rhön populatie is in de begin jaren '90 gereduceerd tot een geïsoleerde populatie met slechts 10-15 hanen. De genetische status van de Nederlandse populatie zal in het dit najaar te verschijnen rapport over de Sallandse Heuvelrugpopulatie uitgebreider behandeld worden.

De genetische samenstelling van de fokpopulatie is in enkele opzichten afwijkend waardoor in de Fst analyse de fokpopulatie ten opzichte van alle andere onderzochte populaties in redelijke tot grote mate genetisch gedifferentieerd is (tabel 6). Dit wordt bevestigd door de cluster analyse welke aangeeft dat de fokpopulatie een genetische identieke en aparte groep is (tabel 5; figuur 5). Bij de microsatelliet analyse zijn geen specifieke allelen aangetroffen die alleen binnen het fokprogramma voorkomen. Echter de allelfrequenties zijn wel duidelijk afwijkend. Bij de mitochondriële DNA analyse zijn enkele haplotypen aangetroffen die niet in de andere populaties zijn waargenomen (figuur 4). De verschillen zijn echter gering en ook de kleine steekproef en beperkte herkomst van de monsters maakt een goede conclusie niet mogelijk behalve dan dat er geen opvallende afwijkingen zijn vastgesteld.



Figuur 5. Scores van individuele korhoender genotypen op de eerste twee assen van een Principale Coördinaten Analyse voor de Microsatelliet loci TuT1-4. De assen verklaren 13,9 en 10,6 % van de totale variatie. (In deze figuur zijn in vergelijking met figuur 3 slechts 4 loci gebruikt en is de museum populatie (NL-verleden) en de Schotse groep toegevoegd).

Uit figuur 5 valt op te maken dat er nauwelijks overlap is tussen het cluster van het fokprogramma en de historische Nederlandse populatie op basis van museummonsters. Van een eventuele inbreng van autochtoon Nederlandse korhoenders in het fokprogramma is in de huidige fokpopulatie weinig terug te vinden. Wel is op basis van de figuren 3 & 5 te zien dat enkele Oostenrijkse en Schotse monsters zich in het cluster van het fokprogramma mengen. Mogelijk zijn korhoenders met een Alpine en Schotse herkomst binnen het fokprogramma gebruikt.

Bij fokprogramma's wordt over het algemeen gestreefd naar het behoud van een grote genetische diversiteit. Door een uitgekiend selectie systeem is het daarbij zelfs mogelijk een grotere diversiteit te realiseren dan in vitale wilde populaties wordt aangetroffen. Binnen de fokpopulatie van NPDHV is de variatie echter geringer en daarnaast niet overlappend met omliggende vitale populaties. Het lijkt er dan ook op dat de fokpopulaties waarvan NPDHV zijn dieren betreft ook al geruime tijd in gevangenschap zitten en nauwelijks tot geen verversing krijgen met korhoenders uit het wild. De grote genetische differentiatie ten opzichte van de andere populaties zal in belangrijke mate het gevolg zijn van de niet-natuurlijke populatie processen die bij de meeste fokprogramma's optreden waarbij willekeurige partnerkeuze niet kan plaats vinden. Daarnaast kan in fokprogramma's, zij het onbewust, selectie en adaptatie optreden voor kenmerken die voordelig zijn voor gevangenschap omstandigheden, maar leiden tot een verlaagde fitness indien dieren vanuit de fok weer worden uitgezet (Ebenhard, 1995; Frankham *et al.*, 2002).

Ook is bij korhoenders een verlaagde fitness gevonden in relatie tot heterozygositeit (Höglund *et al.* 2002). Het is dus belangrijk om ervoor te zorgen dat de genetische variatie binnen de Nederlandse korhoen populatie niet verder afneemt. Tevens is het niet uit te sluiten dat als gevolg van de geringere genetische variatie, eventueel in combinatie met selectie en adaptatie aan gevangenschapomstandigheden, de fitness van de korhoenders uit het fokprogramma bij uitzet in het wild verminderd zal zijn in vergelijking met wilde korhoenders.

6 Dankwoord

Om deze genetische studie mogelijk te maken zijn de auteurs veel dank verschuldigd aan Gernot Segelbacher (Duitsland) en Jacob Höglund & Jobs Karl Larsson (Zweden) voor het vertrekken van genetische data, referentiemonsters en de analyse van de museummonsters. Hein van Grouw was behulpzaam door de kwetsbare collectie van korhoenders in Naturalis te 'vernielen' door eeltkussentjes van de tenen af te snijden. Bart Boers heeft namens Nationaal Park De Hoge Veluwe de informatie en monsters van het fokprogramma verstrekt. Paul ten Den en andere vrijwilligers van de vogelwerkgroep op de Sallandse Heuvelrug hebben de belangrijke monsters in de vorm van veren en eischalen van korhoenders op de Sallandse Heuvelrug verzameld. Allen dank daarvoor!

7 Literatuur

Bijlsma, R., 1995. Moleculaire genetische technieken en natuurbeheer. De Levende Natuur, 96^e jaargang, nummer 2.

Booy, G., 1988. Het belang van genetische diversiteit voor de overleving van populaties, literatuurstudie: 1-101. Rapport Centrum voor Plantenveredelings- en Reproductieonderzoek CPRO-DLO, Wageningen.

Caizergues, A., & L.N. Ellison 2002 : Natal dispersal and its consequences in Black Grouse *Tetrao tetrix*. Ibis, 144, 478-487.

Caizergues, A., O. Rätti, P. Helle, L. Rotelli, L. Ellison & J.Y. Rasplus 2003a : Population genetic structure of male black grouse (*Tetrao tetrix* L.) in fragmented vs. continuous landscapes. Molecular ecology 12, 2297-2305.

Caizergues, A., B. Laurent, J.F. Brenot, L. Ellison & J.Y. Rasplus 2003b: Population genetic structure of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in Northern and Western Europe. Molecular ecology 12, 2267-2274.

Cramp, S., & K.E.L. Simmons 1982: Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. Vol. 2: Hawks to bustards. Oxford University Press.

De Hoyo, J., A. Elliott & J. Sargatal eds. 1994 : Handbook of the Birds of the World Vol. 2. New World Vultures to Guinifowl. (Family Tetraonidae / Grouse). Lynx Edicions, Barcelona.

De Vries, S., 2002. Breeding and reintroduction of the Common Hamster in The Netherlands. In: Mercelis, S., Kayser, A. & G. Verbeylen (eds.)

Ebenhard, T., 1995. Conservation breeding as a tool for saving animal species from extinction. TREE 10(11) p438-443.

Frankham, R., J.D. Balou en D.A. Briscoe, 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press

Ford, M.J., 2001. Selection in Captivity during Supportive Breeding May Reduce Fitness in the Wild. Conservation Biology, 16 (3) p815-825.

Fumihito A., Miyake T., Takada M., Ohno S. Kondo N. 1995: The genetic link between the Chinese bamboo partridge (*Bambusicola thoracica*) and the chicken and junglefowls of the genus *Gallus*. Proc Natl Acad Sci USA 92:11053-11056.

Goudet, J., 1995. Fstat: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86: p485-486.

Hall, T. A. (1999). "BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT." *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Hartl, D.L. & A.G. Clark, 1997. *Principles of population genetics*. 3rd edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

Höglund, J., R.V. Alatalo, A. Lundberg, P.T. Rintamäki & J. Lindell 1999: Microsatellite markers reveal the potential for kin selection on black grouse leks. *Proc. R. Lond. B* 266, 813-816.

Höglund, J., S.B. Piertney, R.V. Alatalo, J. Lindell, A. Lundberg & P.T. Rintamäki 2001: Inbreeding depression and male fitness in black grouse. *Proc. R. Lond. B* 269, 711-715.

Jansman, H., 2000. 'Moleculaire Faecologie', een nieuwe onderzoeksmethode. *Zoogdier* 11 (1): p12-16.

Jansman, H.A.H., P.R.F. Chanin & J.F. Dallas, 2001. Monitoring otter populations by DNA typing of spraints. *IUCN Otter Specialist Group Bulletin* 18 (1).

Jansman, H.A.H., A.J.A. van Teeffelen, K. Neumann & H.P. Koelewijn, 2003. Verleden, Heden en Toekomst van de Hamster *Cricetus cricetus* in Nederland vanuit Genetisch Perspectief.; Wageningen, Alterra rapport 861.

Keller L.K. & D.M. Waller, 2002. Inbreeding effects in wild populations. *TREE* 17(5) p230-241.

Kumar, S., K. Tamura, et al. (1993). "MEGA Molecular Evolutionary Genetics Analysis v 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, P.A."

Larsson, J.K., Y.H. Sun, G. Segelbacher & J. Höglund 2003: Microsatellite variation in a Chinese grouse *Bonasa sewerzowi* population: sighs of genetic impoverishment? *Wildlife Biology* 9:4 261-266.

Mercelis, S., A. Kayser & G. Verbeylen (eds.), 2002. The hamster (*Cricetus cricetus* L. 1758): ecology, policy and management of the hamster and its biotope. Proceedings of the 10th Meeting of the Internatinoal Hamsterworkgroup, October 12-14, 2002, Tongeren, Belgium.

Mitchell-Jones, A.J., G. Amori, W. Bogdanowicz, B. Kryštufek, P.J.H. Reijnders, F. Spitzenberger, M. Stubbe, J.B.M. Thissen, V. Vohralík & J. Zima, 1999. *The atlas of European mammals*. T&AD Poyser Ltd., London.

Peakall, R. & P.E. Smouse, 2001. GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia. Available from the internet, accessed 23 June 2003. URL: <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>

Pritchard, J.K., M. Stephens & P. Donnelly, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959. Available from the internet, accessed 23 June 2003. URL: <http://www.stats.ox.ac.uk/~pritch/home.html>

Randi, E. & V. Lucchini 1998: Organisation and Evolution of the Mitochondrial DNA Control Region in the Avian Genus *Alectoris*. *J. Mol. Evol.* 47: 449-462.

Raymond, M. and Rousset, F. 1995: Genepop - population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.

Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees." *Molecular Biology and Evolution* 4: 345-355.

Segelbacher G., R.Paxton, G.Steinbruck, P.Trontelj & I. Storch, 2000: Characterization of microsatellites in capercaillie *Tetrao urogallus* (Aves). *Molecular ecology* 9, 1934-1935.

Segelbacher, G., & I. Storch 2002: Capercaillie in the Alps: genetic evidence of metapopulation structure and population decline. *Molecular ecology* 11, 1669-1677.

Segelbacher, G., J. Höglund & I. Storch 2003: From connectivity to isolation: genetic consequences of population fragmentation in capercaillie across Europe. *Molecular ecology* 12, 1773-1780.

Smit, R. 2003: Korhoenders in het Nationaal Park De Hoge Veluwe? Een studie naar de mogelijkheden voor herintroductie van korhoenders in het Nationaal Park De Hoge Veluwe. Rapport Nummer 0103, Outdoor Vision, Ecologisch onderzoek & fotografie, Wageningen.

Stuart, B.P. & J. Höglund 2001: Polymorphic microsatellite DNA markers in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Molecular Ecology Notes* 1, 303-304.

Van Apeldoorn, R.C., 2002. The root vole (*Microtus oeconomus arenicola*) in the Netherlands: threatened and (un)adapted? *Lutra* 45 (2) p155-166.



Foto 4: Twee bolderende korbanen. Haarlerberg, mei 1986. Foto Alterra.

8 Bijlagen

8.1 DNA isolatie met behulp van de Qiagen DNeasy Tissue Kit

Methode

1. Breng het monstermateriaal over in een steriel epje (1.5 ml)
2. Voeg toe 180 µl ATL, en een beetje kwarts zand en maal het monster fijn met een pellet pestle
3. Voeg toe 20 µl Proteinase K; vortexen en plaats de epjes in stoof bij 55 °C
4. Overnacht laten lyseren
5. Vortex ca.15 seconden
6. Voeg toe 200 µl AL buffer, vortexen, plaats de epjes 10 min. in de stoof bij 70°C
7. Voeg toe 200 µl ethanol 99.8%, vortexen
8. Pipetteer de mix verkregen onder punt 7 in een Qiagen mini spin kolom (incl. opvang buis)
9. Centrifugeer 1 min. full speed (14.000 rpm)
10. Plaats mini spin kolom op lege opvang buis, pipetteer op de kolom 500 µl AW1 buffer
11. Centrifugeer 1 min. full speed (14.000 rpm)
12. Plaats de mini spin kolom op lege opvang buis, pipetteer op de kolom 500 µl AW2 buffer
13. Centrifugeer 3 minuten full speed (14.000 rpm)
14. Plaats de mini spin kolom in steriel epje en pipeteer op de kolom 75 µl AE buffer
15. Incubeer 1 min. bij kamertemperatuur
16. Centrifugeer 1 min. full speed (14.000 rpm)
17. Pipetteer nogmaals 75 µl AE buffer op de kolom
18. Incubeer 1 min. bij kamertemperatuur
19. Centrifugeer 1 min. full speed (14.000 rpm)
20. Verwijder de mini spin kolom. In het epje bevindt zich 150 µl DNA-isolaat
21. Bewaar het DNA tot gebruik in de diepvries (-20 °C)

8.2 Microsatelliet data van de NPDHV monsters

Tabel 8: Microsatelliet gegevens van de 43 geanalyseerde monsters van NPDHV voor 8 loci.

Populatie	ALTERRA ID #	TUT1	TUT2	TUT3	BG10	BG15	BG16	BG18	BG19	Origine van materiaal
Hoge Veluwe001	24902	209	136	162	229	203	157	160	180	teen
		221	136	162	233	203	173	160	180	
Hoge Veluwe002	24903	213	136	162	233	191	173	156	172	teen
		221	140	170	237	203	173	164	180	
Hoge Veluwe003	24904	205	136	166	221	203	173	156	172	teen
		221	140	170	233	211	173	164	180	
Hoge Veluwe004	24905	205	136	166	221	191	161	156	172	teen
		205	136	170	221	203	169	164	180	
Hoge Veluwe005	24907	205	136	166	233	203	161	156	172	teen
		221	136	170	241	211	169	164	180	
Hoge Veluwe006	24908	205	136	162	221	187	169	156	172	teen
		221	136	170	233	191	169	172	172	
Hoge Veluwe007	24909	205	136	166	221	191	161	156	172	teen
		221	136	166	233	191	173	164	180	
Hoge Veluwe008	24910	221	136	162	233	191	157	156	176	teen
		221	136	170	233	191	161	160	180	
Hoge Veluwe009	24911	205	136	166	221	203	169	156	172	teen
		221	136	170	233	211	173	164	180	
Hoge Veluwe010	24912	213	136	166	233	191	169	156	180	vlies ei-schaal
		221	136	170	237	191	169	152	180	
Hoge Veluwe011	24913	213	136	166	237	191	161	156	180	vlies ei-schaal
		213	136	170	237	211	173	164	180	
Hoge Veluwe012	24914	205	136	166	233	191	161	156	172	vlies ei-schaal
		221	136	170	241	191	173	164	180	
Hoge Veluwe013	24915	205	136	166	221	203	161	164	172	vlies ei-schaal
		205	136	170	221	211	169	160	180	
Hoge Veluwe014	24916	205	136	170	221	187	161	156	172	vlies ei-schaal
		217	136	170	233	211	169	172	172	
Hoge Veluwe015	24917	221	136	162	233	187	169	156	184	vlies ei-schaal
		221	136	170	233	211	169	172	180	
Hoge Veluwe016	24918	213	136	166	229	203	169	156	172	vlies ei-schaal
		213	136	166	237	211	169	164	180	
Hoge Veluwe017	24919	221	136	170	233	187	169	156	176	vlies ei-schaal
		221	136	170	233	211	169	164	180	
Hoge Veluwe018	24920	205	136	162	221	191	169	156	172	vlies ei-schaal
		221	136	162	233	211	169	156	176	
Hoge Veluwe019	24921	213	136	166	237	203	169	156	172	vlies ei-schaal
		213	136	166	237	203	169	164	180	
Hoge Veluwe020	24922	213	136	170	229	191	161	160	172	vlies ei-schaal
		213	136	170	237	191	169	164	180	

Hoge Veluwe021	24923	205	136	162	221	187	169	156	172	vlies ei-schaal
		221	136	170	233	191	169	172	172	
Hoge Veluwe022	24924	205	136	170	221	191	157	156	172	vlies ei-schaal
		205	136	170	233	211	161	160	180	
Hoge Veluwe023	24925	205	136	162	217	191	161	160	172	vlies ei-schaal
		221	136	170	217	203	173	164	180	
Hoge Veluwe024	24926	205	136	170	233	191	165	156	180	vlies ei-schaal
		221	136	170	241	191	169	160	176	
Hoge Veluwe025	24927	221	136	162	233	203	173	160	172	vlies ei-schaal
		221	136	170	233	203	173	164	180	
Hoge Veluwe026	24928	213	136	162	229	191	157	156	180	vlies ei-schaal
		213	136	170	229	211	173	160	180	
Hoge Veluwe027	24929	221	136	162	233	187	161	160	176	vlies ei-schaal
		221	140	170	233	203	161	164	180	
Hoge Veluwe028	24930	221	136	170	233	203	161	160	172	vlies ei-schaal
		221	136	170	233	203	173	164	180	
Hoge Veluwe029	24931	205	136	162	221	187	165	164	176	vlies ei-schaal
		205	136	170	225	203	173	168	180	
Hoge Veluwe030	24932	205	136	170	233	203	169	156	180	vlies ei-schaal
		205	136	170	233	203	173	164	180	
Hoge Veluwe031	24933	221	136	170	233	187	161	156	172	vlies ei-schaal
		221	136	170	233	211	169	164	180	
Hoge Veluwe032	24934	205	136	166	233	203	169	156	172	vlies ei-schaal
		205	136	170	233	211	169	164	180	
Hoge Veluwe033	24935	205	136	166	221	191	161	156	172	vlies ei-schaal
		221	140	166	233	191	173	164	180	
Hoge Veluwe034	24936	205	136	166	221	203	173	156	172	vlies ei-schaal
		221	136	170	233	211	173	164	180	
Hoge Veluwe035	24937	205	136	166	233	195	165	156	180	vlies ei-schaal
		221	136	170	233	203	169	164	180	
Hoge Veluwe036	24938	205	136	170	233	191	169	156	180	vlies ei-schaal
		205	136	170	233	191	173	152	180	
Hoge Veluwe037	24939	221	136	162	233	187	161	156	172	vlies ei-schaal
		221	136	170	233	211	161	164	172	
Hoge Veluwe038	24940	205	136	166	233	191	169	156	172	vlies ei-schaal
		221	136	166	241	211	173	152	180	
Hoge Veluwe039	24941	221	136	162	233	187	161	156	172	vlies ei-schaal
		221	136	170	233	191	161	164	172	
Hoge Veluwe040	24942	205	136	166	233	203	161	156	172	vlies ei-schaal
		221	136	170	241	211	169	164	180	
Hoge Veluwe041	24943	205	136	170	221	187	161	156	176	vlies ei-schaal
		205	136	170	221	191	161	164	180	
Hoge Veluwe042	24944	205	136	166	233	191	161	156	172	vlies ei-schaal
		221	140	166	241	203	169	164	180	
Hoge Veluwe043	24945	205	136	166	221	203	169	156	172	vlies ei-schaal
		221	136	170	233	211	173	164	180	

8.3 Mitochondriaal DNA data van de NPDHV monsters

Tabel 9: Variabele nucleotide posities in de mitochondriale controle regio van het korboen.

Nucleotide positie		
Monster #	11122223378 69901786909 50890086137	Haplotype #
1-24923	CTGCCATTAAA	BG1
3-24929	BG1
4-24944G.....	BG2
5-24945G.....	BG2
2-24926	.C...G...G.	BG3
11-4A	.C...G...GT	BG4
20-231505	.C...G...GT	BG4
10-3A	.C...G...GT	BG4
6-1	.C...G.....	BG5
7-8	.C...G.....	BG5
9-10	.C...G.....	BG5
8-9	TC..TGCC...	BG6
15-D688	.CA.....G.	BG7
14-12	.C.T.G..TG.	BG8

Table 10: lokatie van de mutaties voor de verschillende haplotypes. Haplotype frequentie, nucleotide diversiteit (π), haplotype diversiteit (δ) en aantal geanalyseerde monsters (N) van de onderzochte populaties. Alleen de variabele posities zijn weergegeven. Vertikale nummering geeft de positie van de veranderde nucleotide weer ten opzichte van haplotype Bg1. Fok = fokprogramma, Scan = Scandinavie, NL = Sallandse Heuvelrug.

Haplo- type	11122223378 69901786909 50890086137	Fok	Scan	NL
Bg1	CTGCCATTAAA	2		
Bg2G.....	2		
Bg3	.C...G...G.	1		
Bg4	.C...G...GT			3
Bg5	.C...G.....		3	
Bg6	TC..TGCC...		1	
Bg7	.CA.....G.		1	
Bg8	.C.T.G..TG.			1
N		5	5	4
π		0.0013	0.0025	0.0014
δ		0.80	0.70	0.50

8.4 IUCN richtlijnen voor herintroducties

IUCN/SSC Guidelines For Re-Introductions

<http://www.iucn.org/themes/ssc/pubs/policy/reinte.htm>

Binnen de IUCN (International Union for Conservation of Nature and Nature Resources; www.iucn.com) werken veel wetenschappers vrijwillig samen binnen verschillende SSC's (Species Survival Groups), zoals de Re-introduction Specialist Group. Gezamenlijk heeft deze groep van deskundigen richtlijnen voor herintroducties opgesteld. Deze richtlijnen geven een handvat om herintroducties (ecologisch) verantwoord uit te voeren. Hierbij dient te worden opgemerkt dat ze geen dwingend karakter hebben, aangezien ook landen die minder kapitaal krachtig zijn ermee moeten kunnen werken. Een land als Nederland zou in staat moeten zijn om deze richtlijnen optimaal toe te passen.

Op de website is de volledige Engelstalige tekst van de richtlijnen te vinden. Hieronder zijn enkele belangrijke passages vertaald en weergegeven:

Onder herintroductie wordt verstaan: *'Een poging om een soort te introduceren in een gebied dat eens een onderdeel vormde van zijn verspreidingsgebied, maar waar het uitgeroeid of uitgestorven is'*. Het hoofddoel van elke herintroductie zou moeten zijn het vestigen van een levensvatbare, vrij rondlopende populatie van een soort, ondersoort of ras in het wild, die wereldwijd of lokaal uitgestorven of uitgeroeid is. De populatie zou gherintroduceerd moeten worden in het voormalig habitat en verspreidingsgebied van deze soort, ondersoort of ras. De *subdoelen* van een herintroductie zouden kunnen omvatten:

- Vergroting van de lange termijn overlevingskansen van een soort.
- Hervestiging van een hocksteensoort in een ecosysteem.
- Handhaving en/of herstel van de natuurlijke biodiversiteit.
- Verschaffing van lange termijn economische voordelen voor de lokale en/of nationale economie.
- Stimulering van het besef van het belang van natuurbescherming.
- Een combinatie van het bovengenoemde.

Met name voor herintroducties zijn de volgende paragrafen van belang:

(i) Haalbaarheidsstudie en literatuurstudie

Een taxonomische inschatting (het wetenschappelijk proces van de classificatie van het leven) zou gemaakt moeten worden van de te herintroduceren exemplaren. De exemplaren zijn bij voorkeur van dezelfde ondersoort of van hetzelfde ras als de uitgeroeide populatie, tenzij hiervan geen adequate aantallen beschikbaar zijn. Een studie naar de historische informatie over het verlies en het lot van de exemplaren uit het herintroductie gebied, zowel als moleculair-genetische studies moeten ondernomen worden wanneer twijfel bestaat over de taxonomische status van de individuen. Een studie naar de genetische variatie binnen en tussen deze populaties en aanverwante taxa kan ook behulpzaam zijn.

(ii) Beschikbaarheid van geschikte uitzettingsexemplaren

- Het is wenselijk dat de uitzettingsexemplaren uit natuurlijke populaties komen. Wanneer de uitzettingsexemplaren uit meerdere wilde populaties betrokken kunnen worden, zou de verkozen bronpopulatie in het ideale geval genetisch verwant moeten zijn aan de oorspronkelijke inheemse populatie en overeenkomstige ecologische kenmerken (morfologisch, fysiologisch, wat betreft gedrag en habitatvoorkeur) moeten vertonen aan deze populatie.
- Wanneer gevangen exemplaren of kunstmatig voortgeplante exemplaren gebruikt zullen worden, moeten deze afkomstig zijn uit een populatie die zowel wat betreft demografie als genetica op betrouwbare wijze beheerd is, overeenkomstig de principes van de hedendaagse 'conservation biology'.
- Herintroductie zou niet uitgevoerd moeten worden louter en alleen omdat gevangen exemplaren beschikbaar zijn, of omdat men zich wil ontdoen van overtollige exemplaren.

Deze richtlijnen vormen een goed kader waarbinnen maatregelen gericht op de uitzet van een soort afgewogen en ingevuld kunnen worden.