



inbo



Instituut voor
Natuur- en Bosonderzoek

Grote tijm (*Thymus pulegioides* L.). Studie naar de dispersiecapaciteit en genetische herkomsten in Vlaams-Brabant

*An Vanden Broeck, Gunter Kathagen, Robin Guelinckx, Olivier Honnay,
 Joachim Mergeay*

Redacteurs:

An Vanden Broeck, Gunter Kathagen*, Robin Guelinckx, Olivier Honnay*, Joachim Mergeay

Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) is het Vlaams onderzoeks- en kenniscentrum voor natuur en het duurzame beheer en gebruik ervan. Het INBO verricht onderzoek en levert kennis aan al wie het beleid voorbereidt, uitvoert of erin geïnteresseerd is.

Vestigingen:

INBO Geraardsbergen
Gaverstraat 4, 9500 Geraardsbergen
www.inbo.be

*** KU Leuven**

Afdeling Ecologie, Evolutie en Biodiversiteitsbehoud
Labo voor Plantendiversiteit en Populatiebiologie
Kasteelpark Arenberg 31 - bus 2435
3001 Leuven

e-mail:

An.vandenbroeck@inbo.be

Wijze van citeren:

Vanden Broeck A., Kathagen G., Guelinckx R. Honnay O., Mergeay J. (2013). Grote tijm (*Thymus pulegioides* L.)
Studie naar de dispersiecapaciteit en genetische herkomsten in Vlaams-Brabant. Rapporten van het Instituut voor
Natuur- en Bosonderzoek 2013 (INBO.R.2013.722930). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

D/2013/3241/292

INBO.R.2013.722930

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Jurgen Tack

Druk:

Managementondersteunende Diensten van de Vlaamse overheid

Foto cover:

Grote tijm, Wouter Van Landuyt

Dit onderzoek werd uitgevoerd in samenwerking met:

Grote tijm (*Thymus pulegioides* L.)

Studie naar de dispersiecapaciteit en genetische
herkomsten in Vlaams-Brabant

**An Vanden Broeck, Gunter Kathagen, Robin Guelinckx, Olivier
Honnay, Joachim Mergeay**

INBO.R.2013.722930

Samenvatting

Grote tijm is een inheemse soort waarvan het areaal in Vlaanderen de laatste decennia heel sterk is afgenomen. Het Regionaal Landschap Noord-Hageland vzw en enkele Vlaams-Brabantse gemeenten willen de groeiplaatsen van grote tijm in Vlaams-Brabant beschermen en uitbreiden. In deze studie wordt de genetische structuur en de dispersiedynamiek van grote tijm bestudeerd. Er wordt nagegaan of spontane kolonisatie van grote tijm op geschikte locaties en op korte termijn (on)waarschijnlijk is en dus of herintroducties nodig zijn om de groeiplaatsen van grote tijm in Vlaams-Brabant uit te breiden. Via de studie van de genetische structuur worden de meest geschikte bronpopulaties aangewezen voor een eventuele herintroductie. Op basis van de bevindingen en de literatuur worden richtlijnen voor het beheer geformuleerd. De resultaten tonen aan dat grote tijm sterk gelimiteerd is in zaad-dispersie. Het is hierdoor heel onwaarschijnlijk dat de soort spontaan nieuwe groeiplaatsen zal koloniseren. De relictpopulaties maakten tot enkele decennia geleden deel uit van één grote meta-populatie maar zijn al sterk van elkaar gedifferentieerd door genetische drift en verlies aan genetische diversiteit. De populatie uit Meerdaal lijkt af te wijken in genetische samenstelling van de andere populaties en is vermoedelijk het gevolg van een onopzettelijke menselijke introductie. Habitatherstel en -uitbreiding is noodzakelijk om het overleven van de soort op lange termijn te verzekeren.

Aanbevelingen voor beheer en/of beleid

- Beschermen van de huidige groeiplaatsen via een beheer aangepast op heischrale graslanden (maai frequentie, maaitijdstip, schapenbegrazing, ...) en door het verhinderen van bemesting vanuit nabijgelegen percelen.
- Uitbreiden van de groeiplaatsen via herintroducties op geschikte groeiplaatsen. Zaad voor herintroducties kan verzameld worden uit naburige populaties, de populatie van Meerdaal uitgezonderd. Zaden kunnen geoogst worden in het najaar (september – oktober), worden best droog bewaard en gezaaid in het voorjaar op vochtige zaaigrond. De zaden hebben licht nodig voor de kieming en mogen dus niet bedekt worden met bodemsubstraat.

English abstract

In this study we investigated the contemporary long-distance seed dispersal and genetic structure of the grassland specialist *Thymus pulegioides* in an intensively managed agricultural landscape in Flanders (Northern Belgium). Assignment tests revealed very low levels of effective seed dispersal between populations although seed availability and seed viability was not a limited factor. The process of fragmentation has resulted in a high population differentiation and without further incoming gene flow and seed dispersal, the remnant populations are prone to extinction. Our findings illustrate that restoring suitable abiotic habitat conditions in the neighborhood of existing populations does likely not guarantee colonization for this grassland specialist. For the survival of the species, existing populations should be functionally connected and seed addition may be necessary for successful restoration to overcome dispersal limitation.

Inhoudstafel

Inhoud

1	Inleiding.....	8
2	Doel van de studie.....	10
3	Methode en materialen.....	11
3.1	Inzamelen plant materiaal	11
3.2	Zaadgewicht en zaadkieming	11
3.3	DNA-extractie en AFLP-analyse	12
3.4	Genetische diversiteit en populatiestructuur.....	12
3.5	Toewijzingsanalyse	13
4	Resultaten	14
4.1	Zaadgewicht en zaadkieming	14
4.2	Genetische diversiteit en populatiestructuur.....	14
4.3	Toewijzingsanalyses	17
5	Discussie	18
6	Referenties.....	20
7	Bijlage	22

Lijst van figuren

Figuur 1 Grote tijm Bron: Deutschlands Flora in Abbildungen (1796), www.BioLib.de	8
Figuur 2 Voorkomen van grote tijm in Vlaanderen (bollen na 1972- 2004, kaders 1939 - 1971) (Van Landuyt et al. 2006)	9
Figuur 3 Locaties van de bemonsterde populaties grote tijm.....	11
Figuur 4 Frequentie-histogram van de paarsgewijze genetische afstanden (simple matching) tussen 363 individuen van grote tijm op basis van 155 AFLP-fragmenten	14
Figuur 5 Biplots van de principale componentenanalyse uitgevoerd op 363 individuen grote tijm en 155 AFLP-merkers	16
Figuur 6 Resultaten van de toewijzingsanalyse	17

Lijst van tabellen

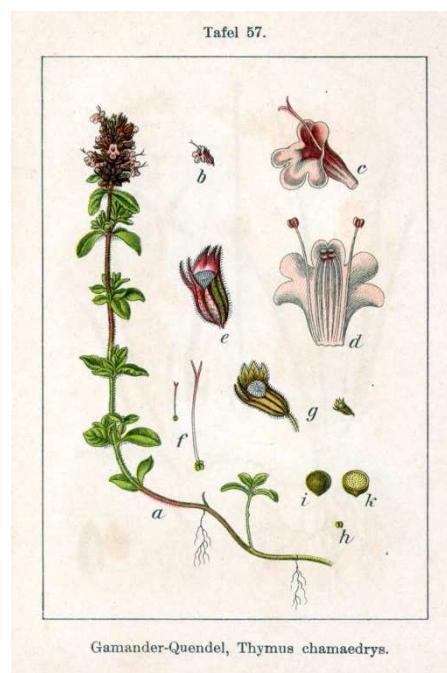
Tabel 1 Bemonsterde locaties van grote tijm voor genetische analyse.	22
Tabel 2 Overzicht van enkele fitnesskenmerken per populatie.....	23

1 Inleiding

Grote tijm is in de provincie Vlaams-Brabant op verschillende locaties recent verdwenen. De provincie heeft intussen herstelmaatregelen ondernomen om het leefgebied op die locaties te herstellen, en wil nagaan of de condities daarvoor effectief weer geschikt zijn, en welk materiaal (zaden of planten) het meest geschikt is als uitgangsmateriaal voor een herintroductie op die locaties. In deze studie wordt aan de hand van genetische technieken bepaald of spontane kolonisatie van geschikte locaties op korte termijn (on)waarschijnlijk is en welke bronpopulaties het meest geschikt zijn voor herintroducties in Vlaams-Brabant.

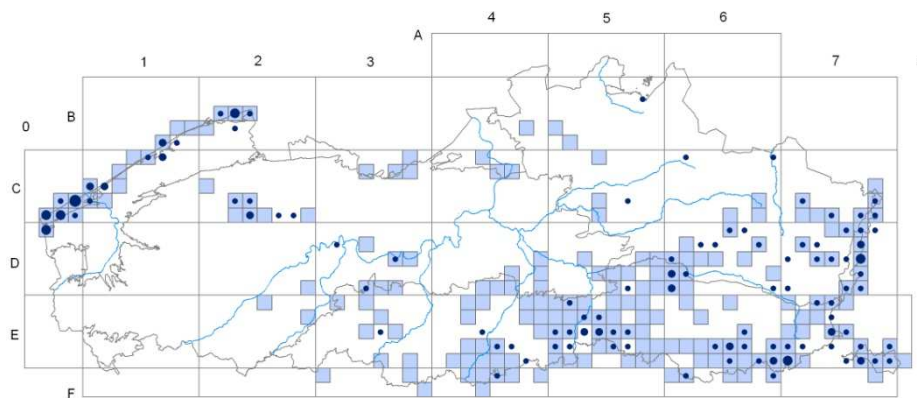
Grote tijm (*Thymus pulegioides* L., syn.: *Thymus ovatus* Mill., *Thymus serpyllum* L. subsp. *chamaedrys* (Fries) Schübl. et Martens) is een inheemse, groenblijvende dwergstruik die behoort tot de lipbloemenfamilie (Lamiaceae). De soort is zeldzaam in Vlaanderen, staat vermeld als kwetsbaar op de Rode Lijst en kent een negatieve trend. Naast grote tijm komt in Vlaanderen nog een tweede tijmsort voor, kleine tijm (*Thymus serpyllum* L.), die heel erg zeldzaam is. Beide soorten kunnen uitkruisen (*Thymus* × *oblongifolius* Opiz) (Stakeliené and Ložiené 2012) maar wegens de uiterste zeldzaamheid van kleine tijm, komen hybriden in Vlaanderen vermoedelijk weinig of niet voor.

Grote tijm is een diploïde ($2n=28$) gynodioëce soort (vrouwelijke individuen en tweeslachtige individuen komen voor binnen eenzelfde populatie), waarbij de tweeslachtige individuen zelfcompatibel zijn. De bloemen bloeien in juli en augustus, worden bestoven door insecten (meestal bijen) en de zaden rijpen in splitvruchten (Pigott 1955). De zaden zijn rijp in september en komen hoofdzakelijk terecht onder de moederplant. Nadien kunnen ze over langere afstanden verspreid worden door bv. schapen (endozoochoor en epizoochoor) (Cosyns 2004). Predatie van zaden door mieren en de daarmee samengaannde verspreiding (myrmecochorie) is ook waargenomen voor tijmsorten (Dauber et al. 2006). De zaden bevatten een zoet aanhangsel (mierenbroodje) dat mieren aantrekt en als voedsel dient. Kieming van tijm vindt plaats op sterk verstoorde, open gronden, meestal na vuur, op vertrappelde gronden door vee of op mierenhopen (Eriksson 1998). De soort kan zich ook vegetatief voortplanten via worteluitlopers.



Figuur 1 Grote tijm Bron: Deutschlands Flora in Abbildungen (1796), www.BioLib.de

Grote tijm komt in Nederland en Vlaanderen voor op droog tot vochtige voedselarme tot matig voedselrijke, neutrale tot zwak-zure, licht gebufferde, humueuze bodems (zand, leem, zavel, mergel en stenige plaatsen). Het is een soort van heischrale graslanden (Nardetea, Natura 2000 code: 6230, verbond *Nardo-Galion saxatilis*) en droge graslanden op zandgrond (*Koelerio-Corynephoretea* verbond). Heischrale graslanden zijn voornamelijk ontstaan in de late middeleeuwen tijdens de grote ontbossingsperiode. Hun ontstaan hangt nauw samen met de heide, ze kwamen vooral voor op delen van de heide die intensiever werden beïnvloed: gemaaide heide, afgebrande heide, brandgangen in de heide (Zwaenepoel et al. 2002). Veranderingen in het landgebruik in Vlaanderen tijdens de voorbije decennia hebben de oppervlakte heischrale graslanden zeer sterk doen teruglopen (Ceulemans 2009). Heischrale graslanden zijn zeer gevoelig voor bemesting, voornamelijk voor stikstof- en fosfordepositie. In de meeste heidegebieden is het oppervlakkige grondwater als gevolg van depositie sterk verzuurd en heeft daardoor geen bufferende werking meer. Tegenwoordig zijn heischrale graslanden grotendeels beperkt tot relictten in lintvormige zones in wegranden en langs paden. In Vlaanderen komt grote tijm nog voor in de duinvalleien en duingrasland langs de kust, op open, schrale zuidgerichte hellingen van holle wegen en wegbermen in het Hageland en op zandige plaatsen in de winterbedding van de Maas. De soort komt nog vrij algemeen voor in Wallonië, behalve in de Hoge Ardennen.



Figuur 2 Voorkomen van grote tijm in Vlaanderen (bollen na 1972- 2004, kaders 1939 -1971) (Van Landuyt et al. 2006)

2 Doel van de studie

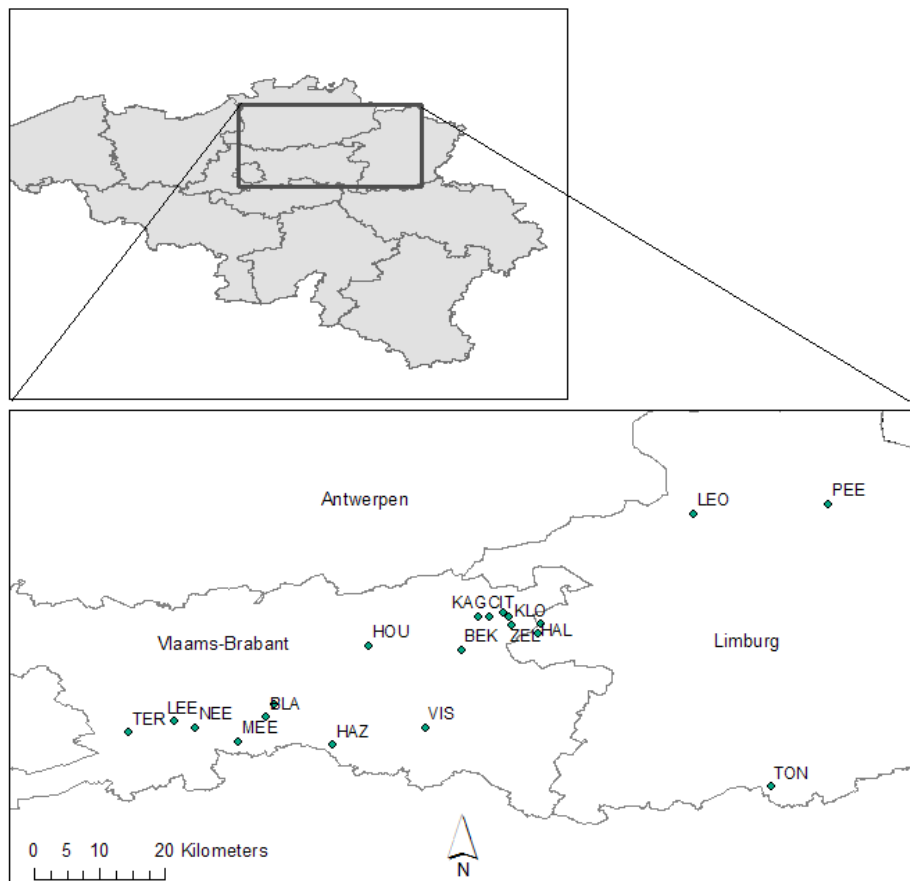
Aan de hand van genetische markers wordt de huidige en historische dispersiedynamiek van grote tijm bestudeerd in Vlaams-Brabant. Er wordt nagegaan of spontane kolonisatie van grote tijm op geschikte locaties op korte termijn (on)waarschijnlijk is en dus of herintroducties nodig zijn om de groeiplaatsen van grote tijm in Vlaams-Brabant uit te breiden. Dit onderzoek heeft tot doel een antwoord te formuleren op volgende vragen:

- Is herintroductie verantwoord vanuit genetisch oogpunt?
- Welke bronpopulaties worden het beste aangewend bij een eventuele herintroductie?

3 Methode en materialen

3.1 Inzamelen plant materiaal

In augustus en september 2012 werden in totaal 20 groeiplaatsen en 417 planten van grote tijm uit de provincies Vlaams-Brabant en Limburg bemonsterd (Bijlage 1). Binnen de provincie Vlaams-Brabant werden alle gekende groeiplaatsen van grote tijm bemonsterd. Vijf nabijgelegen groeiplaatsen uit Limburg werden eveneens meegenomen in het onderzoek. Vrijwel alle populaties werden teruggevonden in kleine landschapselement zoals op taluds, op wegbermen, langs wegen of op perceelsranden. Bladstalen werden verzameld voor DNA-analyse van elke individuele plant met een maximum van 52 planten per locatie. De bladstalen werden bewaard in zakjes met silicagel. Op elke locatie werd de oppervlakte ingenomen door de tijmplanten, ingeschat. Zaden werden verzameld (wanneer beschikbaar) op alle locaties in september en augustus 2012.



Figuur 3 Locaties van de bemonsterde populaties grote tijm

3.2 Zaadgewicht en zaadkieming

Van 20 willekeurige zaden per locatie werd het zaadgewicht bepaald. Per populatie werd ook het kiemingspercentage bepaald (wanneer beschikbaar). Hiervoor werden 20 zaden in een

petrischaal op vochtig karton tot kieming gebracht in de serre met 3 replica's (petriplaten) per populatie.

3.3 DNA-extractie en AFLP-analyse

Genomisch DNA werd geëxtraheerd met de QuickPick™ Plant DNA kit (Isogen Life Science, De Meern, the Netherlands). De AFLP-reactie werd uitgevoerd zoals beschreven in Vos et al. (1995) met de restrictie-ligatie in één stap. Na testen van 17 primer combinaties werden twee primer combinaties geselecteerd die duidelijke AFLP-patronen opleverden met voldoende polymorfismen: EcoRI- ACT/MseI-CAC, EcoRI-ACC/MseI-CTA. De PCR-producten werden gelopen op een capillaire sequencer (ABI 3500, Applied Biosystems). Als standaard werd Genscan 600-LIZ meegelopen (PE Applied Biosystems). De grootte van de bekomen DNA-fragmenten werd bepaald met GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems). Om de herhaalbaarheid van de techniek te testen werden 25 willekeurig gekozen stalen (10%) tweemaal in de analyses meegenomen, vertrekkende vanaf de DNA-extractie (replica's). Een binaire datamatrix (aanwezig (1) – afwezig (0)) werd opgesteld met het automatisch scoringsprogramma RawGeno v 2.0 (R CRAN (Arrigo et al. 2009)) met volgende scoringsparameters: MINBIN = 1, MAXBIN = 2, FREQ = 1, THRESH = 80. De replica's lieten toe niet betrouwbare merkers te verwijderen en vervolgens de fout te berekenen op de bekomen data. De fout werd berekend volgens de methode van Bonin et al. (2004). Loci met een frequentie aan allelen onder 5% of boven 95% werden verwijderd uit de dataset omdat deze niet altijd bijdragen tot betrouwbare informatie (Roesti et al. 2012). De dataset werd getest op potentiële vertekening door homoplasie zoals beschreven in Vekemans et al. (2002).

3.4 Genetische diversiteit en populatiestructuur

Tijm kan zich vegetatief voortplanten via worteluitlopers. Op basis van de AFLP-patronen werden het aantal genetisch unieke individuen per locatie bestudeerd. Kleine verschillen in AFLP-patronen tussen individuen kunnen te wijten zijn aan mutaties, scoringsfouten of technische analysefouten (vb. PCR-artefacten). Het aantal toegelaten verschillen in AFLP-patroon binnen eenzelfde genotype werd bepaald via analyse van de frequentie-histogram van paarsgewijze verschillen in AFLP-patronen (volgens de Simple matching coëfficiënt) tussen de geanalyseerde stalen met het programma AFLPDAT (Ehrich 2006).

De inteeltcoëfficiënt (F_{IS} -waarde) werd berekend met fAFLP (Dasmahapatra et al. 2008). Allelfrequenties werden geschat met AFLP-SURV v 1.0 (Vekemans et al. 2002) met de standaard ingestelde parameters en met een F_{IS} -waarde bekomen via de berekening met fAFLP. Als genetische diversiteitsparameters werden, per locatie en met een maximum van acht stalen per locatie, volgende parameters berekend: aantal polymorfe loci (PPL) en Nei's genetische diversiteit (H_j , analoog aan H_e). Als maat voor zeldzaamheid van AFLP-fragmenten werd de DW-waarde (frequency down-weighted marker values, een zeldzaamheidsindex) berekend met AFLPDAT (Ehrich 2006).

De genetische differentiatie tussen de locaties werd berekend via de F_{ST} -waarde met AFLP-SURV v 1.0 en de analoge Φ_{PT} -waarde (met significantie op basis van 99 permutaties) met GenAEx 6.4 (Peakall and Smouse 2006). De populatiestructuur werd onderzocht via een PCoA (principale coördinaten analyse) op basis van euclidische afstanden met GenAEx 6.4. Locaties waar maar één genetische profiel werd gedetecteerd (nl. in de populaties met code HAL en KLO), werden van de dataset verwijderd voor het bepalen van de populatie genetische differentiatie. Via een manteltest uitgevoerd met GenAEx 6.4 werd nagegaan of populaties die geografisch dicht bij elkaar liggen meer verwant zijn aan elkaar dan populaties die verder van elkaar verwijderd liggen (isolatie door afstand). Voor het berekenen van de p -waarde werden 100 permutaties uitgevoerd. Het al dan niet aanwezig zijn van een ruimtelijke trend in de genetische data werd verder onderzocht met Moran's Eigenvector Maps (MEM) en een redundantie analyse (RDA) volgens Borcard et al. (2011).

3.5 Toewijzingsanalyse

Toewijzingsanalyses werden uitgevoerd met het programma AFLPOP v.1.1. (Duchesne and Bernatchez 2002). In deze analyse worden, voor elk individu en voor alle bemonsterde locaties, de kansen berekend dat het individu behoort tot een specifieke locatie. Wanneer de kans of de waarschijnlijkheid dat een individu tot een populatie X behoort tien maal hoger is dan de waarschijnlijkheid dat het individu behoort tot een andere populatie (maximum likelihood-difference (MLD) = 1) , wordt het individu toegewezen tot die populatie X. We beschouwen hier de toewijzing tot een andere locatie dan deze waar de bemonstering plaatsvond, een gevolg van zaaddispersie omdat dispersie door pollen nooit een dergelijk groot genetisch verschil kan veroorzaken als het toegepaste criterium voor toewijzing (MLD = 1) (zie ook He et al. 2004). Individuen die dit criterium van waarschijnlijkheid niet halen of m.a.w. die toegewezen worden tot een populatie maar met een waarschijnlijkheid die lager ligt dan 10 keer deze van de tweede, meest-waarschijnlijke populatie, worden niet toegewezen. De waarschijnlijkheden worden berekend op basis van de bandfrequenties van de AFLP-profielen. Individuen die volgens deze criteria toegewezen worden tot een populatie die verschilt van de populatie waar het individu werd bemonsterd, worden als mogelijke migranten afkomstig van lange-afstands-zaaddispersie beschouwd. Een mogelijke migrant is dus meer verwant met individuen van een andere locatie dan met de individuen van de bemonsterde locatie. Het programma AFLPOP voorziet ook een test die een indicatie geeft van de betrouwbaarheid van de toewijzingstesten. Die betrouwbaarheidstesten laten ook toe om in te schatten of bepaalde individuen afkomstig zijn van populaties die niet werden bemonsterd, dus van populaties buiten het studiegebied (voor meer details zie Duchesne and Bernatchez 2002). Omdat toewijzingstesten een lage betrouwbaarheid hebben voor kleine populaties, werden locaties met minder dan 5 stalen uitgesloten van deze analyse.

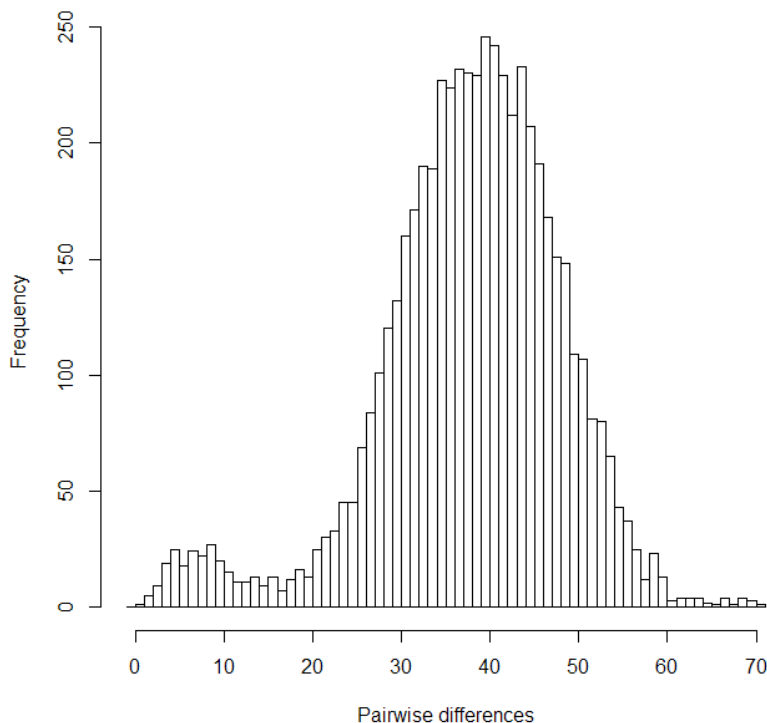
4 Resultaten

4.1 Zaadgewicht en zaadkieming

Er werden zaden verzameld van 16 locaties. Het zaad kiemde voor 12 van de 16 locaties. Kiemingspercentages varieerden van 6 tot 68% met een gemiddelde van 25%. Ook de variatie in zaadgewicht tussen de locaties was hoog (van 0.0038 tot 0.026 g). Het gemiddelde kiemingspercentage en het gemiddelde zaadgewicht per locatie is weergegeven in bijlage, Tabel 2.

4.2 Genetische diversiteit en populatiestructuur

De twee primer combinaties resulteerden in duidelijke AFLP-profielen voor 363 van de 417 bemonsterde individuen (87%). Stalen waarvan de profielen niet duidelijk waren, werden van de dataset verwijderd. In totaal werden 155 polymorfe merkers gescoord. Er werd geen significante correlatie gevonden tussen fragmentgrootte en frequentie waardoor er geen aanwijzingen waren voor homoplasie (EcoRI- ACT/MseI-CAC; $r^2 = -0.223$, $p=0.07$, EcoRI-ACC/MseI-CTA: $r^2 = -0.127$, $p=0.12$). De fout op de AFLP-profielen, berekend op basis van de herhalingen, bedroeg 4.7%. De histogram van de frequenties van de paarsgewijze genetische afstanden vertoonde een bimodiale distributie met een linkerpiek dicht nabij de nul-waarde wat wijst op de aanwezigheid van identieke genotypen (klonen). Op basis van de histogram en de berekende fout op de profielen, werd een grenswaarde van 12 verschillen gehanteerd voor het definiëren van unieke AFLP-profielen (genotypen) en het bepalen van klonaliteit. Dit resulteerde in 287 unieke profielen. De resultaten van klonaliteit en unieke genotypen zijn weergegeven in Bijlage 1.

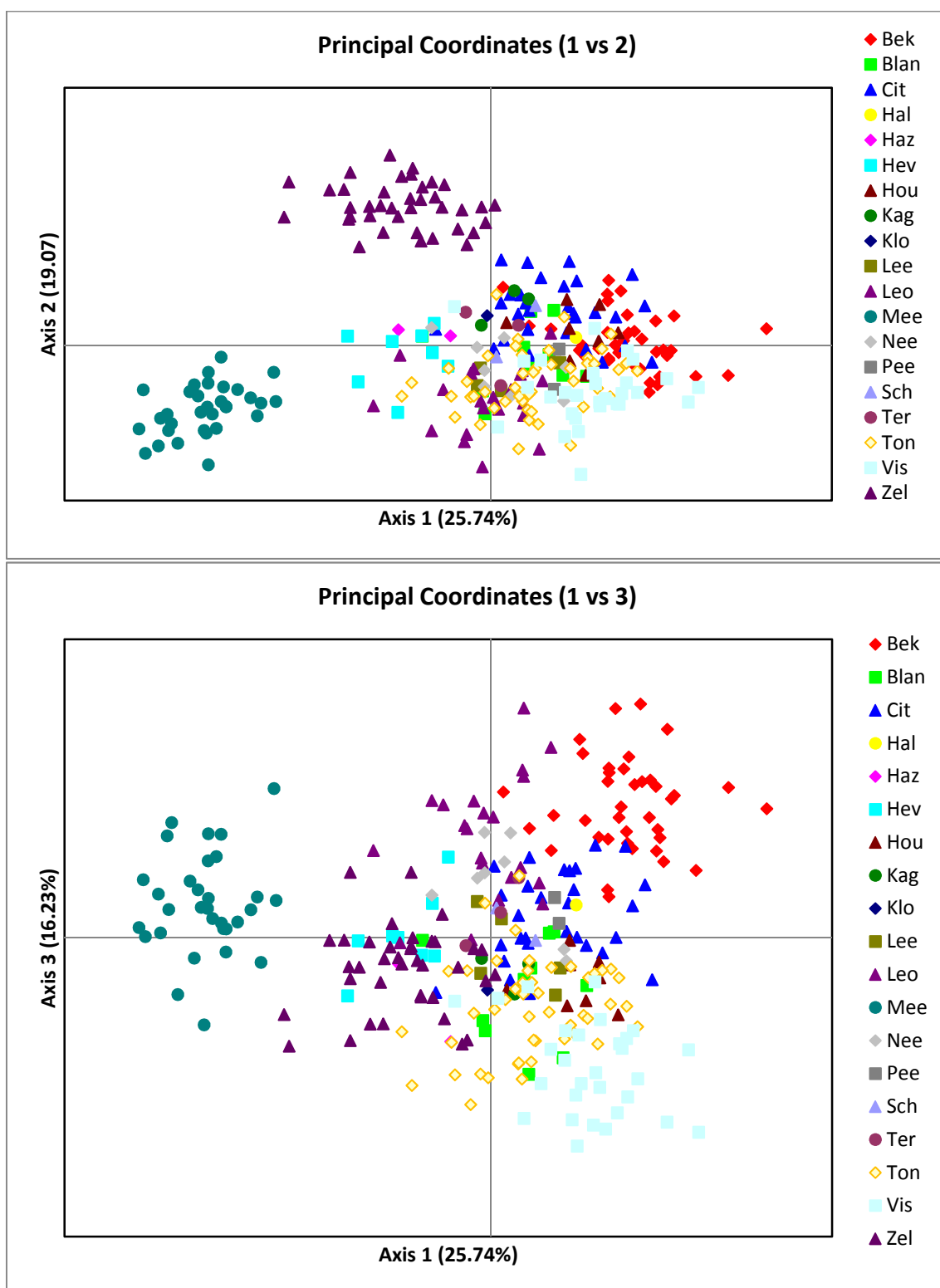


Figuur 4 Frequentie-histogram van de paarsgewijze genetische afstanden (simple matching) tussen 363 individuen van grote tijm op basis van 155 AFLP-fragmenten

De geschatte, gemiddelde inteeltwaarde (F_{IS}), berekend op de 287 genetische profielen was 0.15. Dit komt overeen met een zelfbestuivingsgraad van 26%. De genetische diversiteitsparameters (aantal polymorfe loci (PPL), Nei's genetische diversiteit (H_j) en de zeldzaamheidsindex (DW-waarde) zijn weergegeven in bijlage 1.

Er werd een duidelijke genetische differentiatie waargenomen tussen de populaties binnen het studiegebied. De geschatte waarde voor de gemiddelde F_{ST} was 0.23 (± 0.097 standaardafwijking). De analoge Φ_{PT} -waarde was 0.26 en significant groter dan nul ($P = 0.01$, op basis van 100 permutaties). Dus, ook al lagen de locaties relatief gezien dicht bij elkaar, ongeveer 25% van de totale waargenomen genetische diversiteit werd toegewezen aan de variatie tussen locaties. Algemeen wordt deze hoeveelheid genetische differentiatie als zeer groot beschouwd.

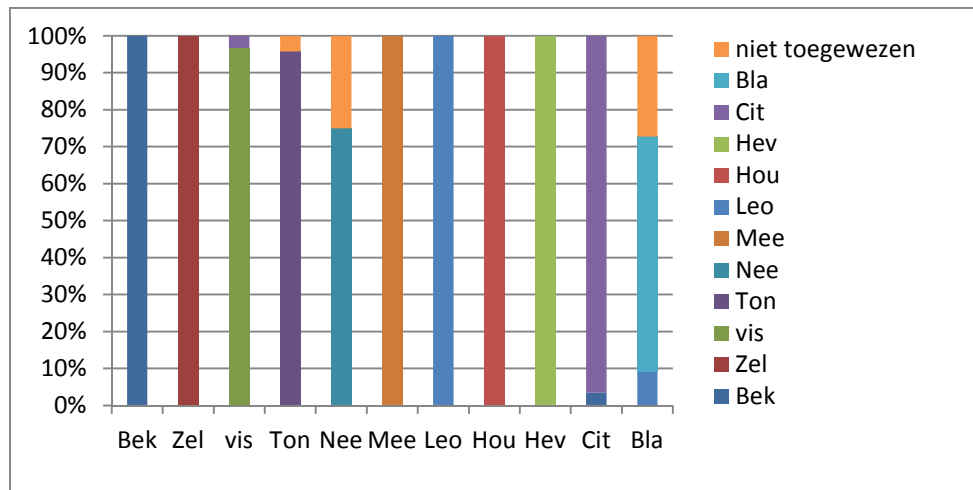
Er werd echter geen patroon van isolatie-door-afstand waargenomen; er was geen significante correlatie tussen de geografische afstand en de genetische afstand ($r = -0.124$, $p = 0.19$). De ruimtelijke analyse gebaseerd op Moran's Eigenvectoren vond ook geen ruimtelijk patroon in de genetische data. Dit was ook duidelijk uit de PCoA die de genetische structuur van de bemonsterde individuen weergeeft. De eerste twee assen geven 45% van de totale genetische variatie weer, de derde as geeft nog eens 16% van de variatie in de data weer. De meeste individuen groeperen samen in één grote cluster, uitgezonderd de individuen bemonsterd in Meerdaal (code Mee) en in mindere mate ook deze van Zelem (code Zel) (Figuur 2).



Figuur 5 Biplots van de principale componentenanalyse uitgevoerd op 363 individuen grote tijm en 155 AFLP-merkers

4.3 Toewijzingsanalysen

De toewijzingstesten werden uitgevoerd op 268 individuen bemonsterd op 11 locaties. Hiervan werden 261 (97.3%) toegewezen volgens het ingestelde criterium van toewijzing ($MLD = 1$). Van de toegewezen individuen, werden 258 (98.9%) individuen toegewezen aan de populatie waar ze werden bemonsterd. Drie individuen (1.1%) werden toegewezen aan een andere populatie dan deze waar ze werden bemonsterd. Deze drie individuen worden beschouwd als mogelijke migranten als gevolg van lange-afstand zaaddispersie. De mogelijke migranten omvatten één individu bemonsterd in BEK en toegewezen aan CIT (afstand tussen de locaties: 6.8 km), één individu bemonsterd in LEO en toegewezen aan BLA (afstand tussen de locaties: 51.4 km) en één individu bemonsterd in CIT en toegewezen aan VIS (afstand tussen de locaties: 18.6 km). Wanneer het criterium voor toewijzing wordt verstrengd tot $MLD = 2$ (de waarschijnlijkheid dat een individu wordt toegewezen aan een specifieke populatie is minstens 100 keer groter dan de waarschijnlijkheid dat het wordt toegewezen aan een andere populatie), daalt het aantal vermoedelijke migranten tot twee. Het individu van LEO dat onder $MLD = 1$ wordt toegewezen aan BLA, wordt onder het criterium $MLD = 2$ niet meer toegewezen. De simulatie-analyse resulteerde in een hoge statistische ondersteuning van de resultaten met een percentage van succes op juiste toewijzing van 99.9%



Figuur 6 Resultaten van de toewijzingsanalyse

5 Discussie

Verlies en reductie van habitat verminderen de kans dat zaden een geschikte plaats vinden om nieuwe locaties te koloniseren. Nochtans is dispersie en kolonisatie noodzakelijk voor een soort om te kunnen overleven op lange termijn (Nathan (Nathan et al. 2003). De resultaten van deze studie tonen aan dat recente migratie door zaden uiterst beperkt is voor grote tijd in het studiegebied. Nochtans blijkt dat de aanwezigheid van kiemkrachtige zaden geen limiterende factor is voor kolonisatie. Slechts enkele individuen (0.7 tot 1.1%, afhankelijk van de strengheid van het criterium voor toewijzing) waren mogelijke migranten afkomstig van zaaddispersie tussen locaties. Frequente genenuitwisseling tussen locaties via pollen is eveneens onwaarschijnlijk aangezien pollendispersie bij planten die door insecten worden bestoven, doorgaans beperkt blijft tot enkele honderden meters (Pasquet et al. 2008). Bovendien zijn kleine populaties minder aantrekkelijk voor insecten en hebben daardoor ook minder kans op bestuiving, waardoor ook de kans op lange-afstandsdispersie van pollen afneemt (Pasquet et al. 2008).

Deze resultaten komen overeen met vorige studies rond tijdsoorten die aantoonen dat zaden van tijd over het algemeen onder de moederplant terecht komen (Belhassen et al. 1987; Eriksson 1998; Pigott 1955). Gelijkaardige lage waarden voor zaaddispersie over lange afstanden werden verkregen voor de aarddistel (*Cirsium acaule*) in de sterk gefragmenteerde kalkgraslanden van de Viroin (1.6% migranten) (Jacquemyn et al. 2010). Daarentegen, in een studie naar de meer algemene echte koekoeksbloem (*Lychnis flos-cuculi*) in natte graslanden in Zwitserland, werden tot 42% migranten (afkomstig van pollen- en zaaddispersie) gevonden (Aavik et al. 2013).

De strategie van korte-afstand dispersie heeft het voordeel dat lege habitats in de nabijheid van de ouderplanten snel ingenomen worden wat een competitief voordeel kan opleveren ten opzichte van andere soorten (Bolker and Pacala 1999). Opdat (meta)populaties op lange termijn zouden kunnen overleven, is echter ook af en toe dispersie over lange afstand nodig. Door lange-afstand-dispersie wordt genetische diversiteit op lokale schaal behouden. Het behouden van de genetische diversiteit is nodig om de leefbaarheid en het evolutiepotentieel van populaties te verzekeren (Bullock et al. 2006). Wanneer populaties niet met elkaar functioneel verbonden zijn door genenuitwisseling, verhoogt de genetische differentiatie tussen populaties. Dit leidt tot een verhoogde impact van genetische drift (verlies van genetische diversiteit door toeval), meer inteelt en inteeltdepressie met een verminderde levensvatbaarheid tot gevolg (Young et al. 1996). In deze studie vonden we voor grote tijd binnen een klein geografisch gebied een hoge graad van genetische differentiatie tussen populaties ($F_{ST} = 0.23$ / $\Phi_{PT} = 0.26$). We vonden ook niet dat nabijgelegen populaties sterker verwant zijn met elkaar dan verafgelegen populaties (geen effect van isolatie-door-afstand). Deze resultaten suggereren dat het verlies aan genetische diversiteit door drift binnen de populaties grote tijd niet gecompenseerd wordt door nieuw binnenkomende genen.

Uit dit onderzoek blijkt ook dat de onderzochte populaties sterk verwant en genetisch vermengd zijn, met uitzondering van de populatie uit Meerdaal (code MEE). De genetische structuur weerspiegelt de historische populatiedynamiek van grote tijd in het studiegebied. Vóór 1972 was grote tijd er algemeen voorkomend (Van Landuyt et al. 2006) en populaties waren veel minder geïsoleerd. De huidige resterende populaties zijn restanten van de vroegere, grote metapopulatie. Er zijn aanwijzingen dat de populatie uit Meerdaal ontstaan is via een onopzettelijke menselijke introductie. Plantmateriaal van grote tijd is hier waarschijnlijk, samen met steengruis uit een Waalse groeve terecht gekomen bij de aanleg van een grindweg, samen met andere typische soorten uit de Ardennen, zoals Witte brunel. De duidelijke genetische onderscheiding van de populatie uit Meerdaal van de andere populaties geeft aan dat deze populatie heel waarschijnlijk een afwijkende (fylo)geografische oorsprong heeft van de rest van de populaties. Conclusie

De relictpopulaties grote tijm in het studiegebied verliezen genetische diversiteit en zijn geïsoleerd. De soort is sterk gelimiteerd in zijn dispersiemogelijkheden waardoor spontane kolonisaties van nieuwe gebieden heel onwaarschijnlijk zijn. Door het wegvallen van begrazingspraktijken van wegbermen en paden, is de kans op zoöchore lange-afstand verbreiding zo goed als onbestaande. Grote tijm wordt ook nog verder bedreigd door degradatie en verlies aan habitat door eutrofiëring wat ook een verruiging van de vegetatie tot gevolg heeft. Stikstofdepositie uit de lucht en bemesting afkomstig van naburige percelen zorgen voor vergrassing en verlies aan habitat. Indien men de soort wil behouden, zullen menselijke ingrepen zoals (her)introducties noodzakelijk zijn. Het materiaal dat bij voorkeur gebruikt wordt voor herintroducties is afkomstig uit een zaadmengsel verzameld in verschillende, omliggende populaties. De populatie van Meerdaal wordt best niet gebruikt als zaadbron omdat deze vermoedelijk afkomstig is van een andere metapopulatie. Uiteraard zijn herintroducties enkel zinvol op geschikte groeiplaatsen. Habitatherstel en -uitbreiding is noodzakelijk om het overleven van de soort op lange termijn te verzekeren. Indien er geen acties worden ondernomen, is het waarschijnlijk dat de soort nog sterker achteruit zal gaan in het gebied en uiteindelijk zal verdwijnen. Het herstel van heischraal grasland is echter niet vanzelfsprekend. Het herwinnen van heischraal grasland uit cultuurgrond is vrijwel onmogelijk waarbij de verandering in de samenstelling van de bodem (fosforaanrijking) het belangrijkste probleem vormt (Zwaenepoel et al. 2002). Het is belangrijk de resterende groeiplaatsen te beschermen door eutrofiëring van nabijgelegen percelen te vermijden (Ceulemans 2009). Specifieke beheermaatregelen gericht op behoud van heischraal grasland, en relatief kort houden van de vegetatie via maaibeheer is aangeraden. Begrazing met schapen en geiten kan ook goede resultaten opleveren (Zwaenepoel et al. 2002)

6 Referenties

Aavik, T., Holderegger, R., Edwards, P.J., Billeter, R., 2013. Patterns of contemporary gene flow suggest low functional connectivity of grasslands in a fragmented agricultural landscape. *Journal of Applied Ecology* 50, 395-403

Arrigo, N., Tuszyński, J.W., Ehrich, D., Gerdes, T., Alvarez, N., 2009. Evaluating the impact of scoring parameters on the structure of intra-specific genetic variation using RawGeno, an R package for automating AFLP scoring. *Bmc Bioinformatics* 10

Belhassen, E., Pomente, D., Traubaud, L., Gouyon, P.H., 1987. Recolonization after fire in *Thymus vulgaris* (L.) – Seed resistance to high temperatures. *Acta Oecologica-Oecologia Plantarum* 8, 135-141

Bolker, B.M., Pacala, S.W., 1999. Spatial moment equations for plant competition: Understanding spatial strategies and the advantages of short dispersal. *American Naturalist* 153, 575-602

Bonin, A., Bellemain, E., Bronken Eidessen, P., Pompanon, F., Brochmann, C., Taberlet, P., 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13, 3261-3273

Borcard, D.L., L.; Gillet, F., 2011. *Numerical Ecology with R*. Springer, New York Dordrecht London Heidelberg.

Bullock, J.M., Shea, K., Skarpaas, O., 2006. Measuring plant dispersal: an introduction to field methods and experimental design. *Plant Ecology* 186, 217-234

Ceulemans, T.H., M.; Honnay, O.; Merckx, R., 2009. Vermesting en soortenrijkdom in heischrale graslanden. *Natuur.focus* 8, 90-95

Cosyns, 2004. Ungulate seed dispersal. Aspects of endozoochory in a semi-natural landscape Ph.D. thesis. Ghent Univ., ghent.

Dasmahapatra, K.K., Lacy, R.C., Amos, W., 2008. Estimating levels of inbreeding using AFLP markers. *Heredity* 100, 286-295

Dauber, J., Rommeler, A., Wolters, V., 2006. The ant *Lasius flavus* alters the viable seed bank in pastures. *European Journal of Soil Biology* 42, Supplement 1, S157-S163

Duchesne, P., Bernatchez, L., 2002. AFLPOP: a computer program for simulated and real population allocation, based on AFLP data. *Molecular Ecology Notes* 2, 380-383

Ehrich, D., 2006. AFLPDAT: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes* 6, 603-604

Eriksson, A., 1998. Regional distribution of *Thymus serpyllum*: management history and dispersal limitation. *Ecography* 21, 35-43

He, T.H., Krauss, S.L., Lamont, B.B., Miller, B.P., Enright, N.J., 2004. Long-distance seed dispersal in a metapopulation of *Banksia hookeriana* inferred from a population allocation analysis of amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Ecology* 13, 1099-1109

Jacquemyn, H., Roldan-Ruiz, I., Honnay, O., 2010. Evidence for demographic bottlenecks and limited gene flow leading to low genetic diversity in a rare thistle. *Conservation Genetics* 11, 1979-1987

Kathagen, 2013. Effecten van habitatfragmentatie en-kwaliteit op de genetische diversiteit in relictpopulaties van *Thymus pulegioides* L. Perspectieven voor de conservatie van een kwetsbare graslandplant. Master thesis, KULeuven.

Nathan, R., Perry, G., Cronin, J.T., Strand, A.E., Cain, M.L., 2003. Methods for estimating long-distance dispersal. *Oikos* 103, 261-273

Pasquet, R.S., Peltier, A., Hufford, M.B., Oudin, E., Saulnier, J., Paul, L., Knudsen, J.T., Herren, H.R., Gepts, P., 2008. Long-distance pollen flow assessment through evaluation of pollinator foraging range suggests transgene escape distances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 13456-13461

Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295

Pigott, C.D., 1955. *Thymus* L. *Journal of Ecology* 43, 365 - 387

Roesti, M., Salzburger, W., Berner, D., 2012. Uninformative polymorphisms bias genome scans for signatures of selection. *Bmc Evolutionary Biology* 12

Stakelienė, V., Ložienė, K., 2012. Gynodioecy in *Thymus pulegioides* L., *T. serpyllum* L., and their hybrid *T. × oblongifolius* Opiz (Lamiaceae): Flower size dimorphism, female frequency, and effect of environmental factors. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-9

Van Landuyt, W., Hoste, I., Vanhecke, L., Van den Bremt, P., Vercruysse, E., De Beer, D., 2006. Atlas van de Flora van Vlaanderen en het Brussels Gewest. Instituut voor natuur- en bosonderzoek, Nationale Plantentuin van België & Flo.Wer, Brussel.

Vekemans, X., Beauwens, M., Lemaire, M., Roldan-Ruiz, I., 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* 11, 139-151

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414

Young, A., Boyle, T., Brown, T., 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* 11, 413-418

Zwaenepoel, A., T'Jollyn, F., Vandenbussche, V., Hoffmann, M., 2002. Systematiek van natuurtypen voor Vlaanderen: 6. Graslanden. WVI, Universiteit Gent, Instituut voor Natuurbehoud i.o.v. AMINAL, afd. Natuur, Ministerie van de Vlaamse Gemeenschap.

7 Bijlage

Tabel 1 Bemonsterde locaties van grote tijm voor genetische analyse.

Opp.: totale oppervlakte ingenomen door individuen grote tijm, NAFLP: aantal geanalyseerde individuen, # G: aantal genetisch verschillende individuen, Gdiv: # genotypes / NAFLP, PPL: percentage polymorfe loci, Hj: Nei's genetische diversiteit met standaardfout tussen haakjes, DW: zeldzaamheidsindex.

Code	Locatie	Provincie	Opp. (m ²)	N	N _{AFLP} P	#G	Gdiv	PPL*	Hj* (S.E.)	DW
SCH	Scherpenheuvel	Vlaams-Brabant	2.38	16	14	2	0.14	20.0	0.10 (0.02)	0.30
KAG	Kaggevinne	Vlaams-Brabant	0.37	7	5	3	0.70	24.8	0.11 (0.02)	0.35
HAZ	Hazenbergh	Vlaams-Brabant	1.70	7	5	2	0.40	34.3	0.16 (0.02)	0.44
PEE	Peer	Limburg	0.12	3	2	2	1.00	40.0	0.19 (0.02)	0.61
HOU	Houwaart berg	Vlaams-Brabant	0.62	12	11	8	0.95	46.7	0.17 (0.02)	0.42
LEE	Leefdaal	Vlaams-Brabant	2.75	10	6	5	0.93	49.5	0.20 (0.02)	0.56
MEE	Meerdalwoud	Vlaams-Brabant	0.54	42	37	32	0.99	49.5	0.18 (0.02)	0.36
TER	Tervuren	Vlaams-Brabant	0.32	6	5	3	0.80	49.5	0.22 (0.02)	0.52
HEV	Heverlee	Vlaams-Brabant	0.69	10	8	8	1.00	59.0	0.22 (0.02)	0.51
CIT	Citadel Diest	Vlaams-Brabant	5.53	35	31	29	1.00	60.0	0.19 (0.02)	0.41
ZEL	Zelem	Limburg	1.07	50	44	38	0.99	61.0	0.19 (0.02)	0.44
TON	Tongeren	Limburg	21.1	54	52	47	0.99	64.8	0.20 (0.02)	0.43
BEK	Bekkevoort	Vlaams-Brabant	28.0	39	38	38	1.00	65.7	0.22 (0.02)	0.45
VIS	Vissenaken	Vlaams-Brabant	14.4	32	29	29	1.00	65.7	0.21 (0.02)	0.45
BLA	Blanden	Vlaams-Brabant	0.82	29	23	10	0.89	66.7	0.21 (0.02)	0.37
LEO	Leopoldsburg	Limburg	3.08	32	26	21	0.98	73.3	0.24 (0.02)	0.48
NEE	Neerijse	Vlaams-Brabant	0.93	21	18	8	0.64	74.3	0.24 (0.02)	0.46
ZIC	Diest	Vlaams-Brabant	0.15	2	0	-	NA	-	-	-
HAL	Halen	Limburg	0.03	5	5	1	0.00	-	-	0.45
KLO	Kloosterberg	Vlaams-Brabant	0.26	5	4	1	0.00	-	-	0.42

Tabel 2 Overzicht van enkele fitnesskenmerken per populatie.

Zaadgewicht uitgedrukt in het gemiddeld gewicht in gram per 1000 zaden;
 kiemingspercentage: het percentage zaden die kiemden tijdens het kiemingsexperiment;
 kiemingssnelheid: het gemiddeld percentage zaden die per dag kiemden.

Code	Locatie	Zaadgewicht (g) per 1000 zaden	Kieming (%)	Kiemsnelheid (gemiddeld aantal zaden /dag)
SCH	Scherpenheuvel	0.0333	0.00	0.00
KAG	Kaggevinne	0.0338	15.00	0.17
HAZ	Hazenbergh	0.0693	3.33	0.04
PEE	Peer	0.0447	NA	NA
HOU	Houwaart berg	NA	20.00	0.25
LEE	Leefdaal	0.1208	15.00	0.15
MEE	Meerdalwoud	0.1871	NA	NA
TER	Tervuren	NA	0.00	0.00
HEV	Heverlee	0.1389	6.67	0.06
CIT	Citadel Diest	0.1034	68.33	0.82
ZEL	Zelem	0.1522	15.00	0.19
TON	Tongeren	0.2567	60.00	0.76
BEK	Bekkevoort	0.1219	48.33	0.59
VIS	Vissenaken	0.1361	NA	NA
BLA	Blanden	NA	36.67	0.44
LEO	Leopoldsburch	0.1228	6.67	0.08
NEE	Neerijse	0.0544	0.00	0.00
ZICH	Diest	0.0485	0.00	0.00
HAL	Halen	0.0875	NA	NA
KLO	Kloosterberg	NA	8.33	8.55