



Vlaanderen
is wetenschap

Herstel van zachthoutooibos met de Europese zwarte populier langs de Gemeenschappelijke Maas Evaluatie van een herintroductieproject

An Vanden Broeck, Karen Cox, Sabrina Neyrinck, Nico De Regge en Alexander Van Braeckel

INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK

Auteurs:

An Vanden Broeck, Karen Cox, Sabrina Neyrinck, Nico De Regge en Alexander Van Braeckel
Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Reviewer:

Lieve Vriens

Het INBO is het onafhankelijk onderzoeksinstituut van de Vlaamse overheid dat via toegepast wetenschappelijk onderzoek, data- en kennisontsluiting het biodiversiteitsbeleid en -beheer onderbouwt en evalueert.

Vestiging:

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

e-mail:

an.vandenbroeck@inbo.be

Wijze van citeren:

A. Vanden Broeck, K. Cox, S. Neyrinck, N. De Regge en A. Van Braeckel (2020). Herstel van zachthoutoibos met de Europese zwarte populier langs de Gemeenschappelijke Maas. Evaluatie van een herintroductieproject. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2020 (33). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
DOI: doi.org/10.21436/inbor.18609931

D/2020/3241/250

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2020 (33)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Maurice Hoffmann

Foto cover:

De Gemeenschappelijke Maas

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van in opdracht van:

De Vlaamse Waterweg nv.



HERSTEL VAN ZACHTHOUTOOIBOS MET DE
EUROPESE ZWARTE POPULIER LANGS DE
GEMEENSCHAPPELIJKE MAAS

Evaluatie van een herintroductieproject

An Vanden Broeck, Karen Cox, Sabrina Neyrinck, Nico De Regge en Alexander Van Braeckel

doi.org/10.21436/inbor.18609931

Voorwoord

Deze opdracht is uitgevoerd binnen het kader van de samenwerkingsovereenkomst tussen De Vlaamse Waterweg nv en het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek als onderdeel van het onderzoeksproject 'Bomenonderzoek'. De auteurs danken Herman Gielen en Joke Verstraelen voor de assistentie op het terrein en het doorgeven van connecties en informatie. Hartelijk dank ook aan Jemp Peeters, Corina Cools, Ward Walraven, David Beyen en Dirk Ottenburghs voor het aanleveren van informatie. We bedanken ook graag Wim De Clercq en Marc Schouppe voor de uitstekende technische assistentie op het veld en in de serre. Tenslotte ook van harte dank aan Lieve Vriens voor het reviewen van dit werk.

Een preprint manuscript van deze studie is beschikbaar op bioRxiv:
<https://biorxiv.org/cgi/content/short/2020.07.02.183699v1>.

Samenvatting

Het herstel van rivieroeverbossen is een prioriteit binnen het biodiversiteitsbehoud en van strategisch belang om de kwetsbaarheid als gevolg van de klimaatverandering te verminderen. De Europese zwarte populier is een kenmerkende soort van zachthoutoibossen en speelt een sleutelrol in de ontwikkeling ervan. Deze inheemse boomsoort is heel sterk achteruit gegaan sinds de indijking en kanalisering van de grote, dynamische rivieren (vanaf de 17^e tot begin 20^e eeuw). Langs de Gemeenschappelijke Maas bevinden zich slechts enkele oude relictbomen, de laatste restanten van de historische natuurlijke populatie in het gebied. Met het herstel van de rivierdynamiek van de Gemeenschappelijke Maas, ook wel Grensmaas genoemd, worden opnieuw kansen gecreëerd voor het herstel van Europees beschermd zachthoutoibos. De weinige relictten van de Europese zwarte populier zijn in aantal onvoldoende aanwezig om te dienen als bronpopulatie voor het spontaan herstel van de soort in het gebied.

Naar aanleiding van de resultaten van een voorstudie uitgevoerd in 1999-2001 (Vanden Broeck et al., 2002) werd daarom een herintroductie uitgevoerd in de periode 2002-2005. Op twee locaties, Groeskens en Negenoord, werden Europese zwarte populieren aangeplant met als doel een bronpopulatie te creëren voor soortzuivere zaden die geschikt habitat kunnen koloniseren. De bomen hebben nu een leeftijd bereikt waarop ze zaden produceren. Cultuurpopulieren komen ook voor in het gebied en vormen een bedreiging voor de ontwikkeling van zachthoutoibos met inheemse Europese zwarte populier. Cultuurpopulieren verspreiden via pollen en zaden genetisch materiaal van exotische populierensoorten (Amerikaanse en Aziatische soorten) en kunnen inkruisen met de inheemse verwante Europese zwarte populier. Vermenging van inheemse en uitheemse soorten kan er op termijn voor zorgen dat de inheemse soort verloren gaat en /of dat populaties minder vitaal worden door een verminderde genetische diversiteit.

In deze studie werd het herintroductieproject geëvalueerd. Net zoals ten tijde van de voorstudie in 1999-2001, worden ook vandaag zaailingen van populier op de grindbanken waargenomen. We vergeleken de genetische herkomst van de zaailingen van populier op de grindbanken voor en na de herintroductie met behulp van nucleaire en chloroplast moleculaire merkers. Verder onderzochten we ook de mate van uitkruising tussen vrouwelijke bomen van Europese zwarte populier en mannelijke bomen van cultuurpopulier aan de hand van DNA-onderzoek en vaderschapsanalyse.

Er kiemen honderden tot duizenden jonge populieren op de grindbanken langs de Gemeenschappelijke Maas. Het zijn hoofdzakelijk zuivere Europese zwarte populieren; 98% van de onderzochte zaailingen kwamen voort uit de herintroductie van Europese zwarte populier. Op afstanden verder dan 1 km van de locaties Groeskens en Negenoord, kiemen nog wel exotische populieren op de grindbanken. Kruisingen tussen vrouwelijke Europese zwarte populier en mannelijke cultuurpopulier waren beperkt voor de onderzochte bomen in de Groeskens en Negenoord; slechts voor 4% van de zaden werd een cultuurpopulier aangewezen als vader. Ook de kaarspopulier, een veel aangeplante cultuurvariëteit, bleek in geen enkel geval de vader te zijn van een zaailing. De resultaten zijn in schril contrast met de situatie voor de herintroductie; toen domineerden de cultuurpopulieren op de grindbanken en bleken ze succesvolle bestuivers te zijn van de vrouwelijke relictten van Europese zwarte populier.



Aanbevelingen voor beheer en/of beleid

De resultaten van deze studie tonen het belang aan van de herintroductie van Europese zwarte populier langs de Gemeenschappelijke Maas. De aangeplante bomen hebben hun rol als bronpopulatie voor soortzuivere zaden vervuld zoals gepland. De zaden die hieruit voortkomen, zijn voornamelijk afkomstig van een kruising tussen Europese zwarte populieren. De enkele zaailingen bemonsterd op de grindbanken die afkomstig waren van cultuurpopulieren, stonden op een afstand verder dan 1 km van de aangeplante bronpopulatie. Cultuurpopulieren zijn wel nog reproductief in het studiegebied, en dit vooral op grote afstand van de Europese zwarte populieren. De aanleg van nog extra zaadbronnen van Europese zwarte populier verspreid over het traject van de Gemeenschappelijke Maas kan de impact van cultuurpopulier nog verder inperken en het herstel van rivierbos met inheemse soorten bevorderen. Een weloverwogen keuze van de genetische herkomst bij nieuwe aanplantingen is belangrijk. Plantsoen dient aangepast te zijn aan de bodem en het klimaat en voldoende genetische variatie te bevatten. De kansen op genenuitwisseling met cultuurpopulier kunnen worden beperkt door het plantsoen zo te kiezen dat overlap in bloeitijd met cultuurpopulier minimaal is.

De meeste jonge populieren op de grindbanken hebben een leeftijd van vermoedelijk twee à drie jaar. Ze hebben het kiemstadium overleefd en bevinden zich in de eerste fase van ontwikkeling van rivierbos. De overlevingskansen van deze jonge populieren is afhankelijk van vele factoren, waaronder vooral de beschikbaarheid van water en zuurstof. Periodes van droogte of overstromingen kunnen fataal zijn en de verjonging vernietigen. Het is daarom belangrijk om de verjonging op langere termijn te monitoren. Geschikte kolonisatiegebieden kunnen op die manier opgespoord worden. Deze gegevens kunnen ingebracht worden in modellen waarmee de ontwikkeling van zachthoutoibos langs de Gemeenschappelijke Maas kan worden voorspeld.

English abstract

The restoration and protection of riparian forests is one of the key priorities in biodiversity conservation and climate change adaptation strategies. As a pioneer species, black poplar plays a key-role in the development of softwood forests in Europe. Unfortunately, the European black poplar is one of the most threatened tree species in Europe, mainly because of the loss of its natural alluvial habitat, especially sand and gravel banks, which allows for successful reproduction, and because of competition and introgression with exotic poplar species. Here, we report on the impact of exotic *Populus* taxa at the initial stages of softwood riparian forest development of the river Meuse on the Dutch-Belgian border almost two decades after reintroducing black poplar and after the re-establishment of the natural river dynamics.

A former study performed in 1999-2000 emphasized the need for planting native *P. nigra* since natural populations were almost gone extinct in the study area. A few isolated relict trees of European black poplar in the study area suggested the presence of natural populations in the past. In contrast to the native poplar species, plantations of cultivated poplars were common in the study area. A reintroduction project of European black poplar was performed in the period 2002-2005. European black poplar was successfully planted on two locations nearby the river; locations Groeskens and Negenoord. The aim was to create seed sources for natural regeneration and thereby to promote the colonisation of native European black poplar in newly restored habitat.

In this study, we evaluated the taxonomy of the poplar seedlings that spontaneously colonised the river banks of the Common Meuse and we determined the frequency of natural hybridization events between male cultivated poplars and the female native European black poplars in the study area. We hereto used a combination of diagnostic chloroplast and nuclear molecular markers that have been proven useful in identifying the taxonomy of *Populus* seedlings. We have compared the results with a similar study performed in 1999-2001 at the same site and before the restoration actions took place.

The majority (98%) of the poplar seedlings from the gravel banks analysed where identified as European black poplar. The sampled seedlings that exhibited genes of exotic poplar species were located at distances of > 1 km from the nearest reintroduction sites of black poplar. This indicates that hybrid poplars still reproduce in the study area, in particular on sites located further away from the reforestation sites of black poplar. Establishing more seed sources of black poplar over the river stretch could further reduce hybrid reproductive success along the Common Meuse.

Almost two decades after reintroducing *P. nigra*, the constitution of the seed and pollen pools changed in the study area in favour of reproduction of the native species and at the expense of the exotic poplar species. This study indicates that, although significant gene flow from exotic poplars is observed in European floodplains, restoration programmes of the native European black poplar can vigorously outcompete the exotic gene flows and strongly reduce the impact of exotic *Populus* taxa on the softwood riparian forest development.

Hundreds of young black poplar seedlings colonized the gravel banks. The survival of poplar seedlings depends on the combination of many factors broadly related to the availability of water and oxygen. Seedling survival should be monitored over large time scales to evaluate the success of this restoration project and to predict riparian forest development along the river Common Meuse.



Inhoudstafel

1	Probleemstelling	8
2	Aanleiding van dit onderzoek.....	11
2.1	Voorstudie (1999-2001)	11
2.1.1	Slechts enkele relicten.....	11
2.1.2	Exotische populieren op de grindbanken.....	11
2.1.3	Uitkruising met cultuurpopulier	11
2.1.4	Mentorpollen helpen Canadapopulier.....	12
2.1.5	Conclusie van de voorstudie	15
2.2	Herintroductieproject (2002-2005).....	16
2.2.1	Twee bronpopulaties	16
2.2.2	Genetische herkomst	17
2.3	Evaluatie herintroductie (2019-2020).....	17
3	Methode.....	19
3.1	Uitgangsmateriaal en labo-analyse.....	19
3.1.1	Zaailingen van populier op de grindbanken.....	19
3.1.2	Nakomelingschap van <i>Populus nigra</i> moederbomen	20
3.1.3	Referentiestalen	20
3.1.4	DNA-extractie	21
3.1.5	Chloroplast DNA merker <i>trnD /TrnT</i>	21
3.1.6	Microsatellieten	21
3.2	Identificatie van hybriden	23
3.2.1	Data-analyse.....	23
4	Resultaten	25
4.1	Diagnostische microsatellieten	25
4.2	Populieren van de grindbanken	25
4.3	Vrij-bestoven nakomelingschap.....	27
5	Discussie.....	28
5.1	Soortzuivere zaden en zaailingen.....	28
5.2	Beperkte invloed van de kaarspopulier	29
5.3	Impact van de herintroductie.....	29
5.4	Implicaties voor beheer.....	29
6	Conclusies.....	31
7	Referenties	32
8	Bijlage.....	35

Lijst van figuren

Figuur 1 Ooibos met Europese zwarte populier naar Wolf et al. (2001).	9
Figuur 2 Schematische voorstelling van competitie tussen pollen op het vruchtbeginsel van een populier (naar Villar et al., 1993).	14
Figuur 3 Studiegebied en locatie van de bronpopulaties van Europese zwarte populier.	16
Figuur 4 Locatie van de bemonsterde zaailingen van populier op de grindbanken. Het aantal per locatie is weergegeven in de cirkels.	19
Figuur 5 Locatie van hybride zaailingen populier met genen van <i>Populus deltoides</i> of <i>P. trichocarpa</i> afkomstig van cultuurpopulier.....	26

Lijst van foto's

Foto 1 Twee Europese zwarte populieren.	8
Foto 2 Karakteristiek ruitvormig blad met bladgal van de bladluis <i>Pemphigus bursarius</i> en zaden van Europese zwarte populier.	10
Foto 3 <i>Populus x canadensis</i> cv. Robusta nabij locatie Groeskens (anno 2019).	13
Foto 4 De grindbanken vormen geschikte vestigingsplaatsen voor zowel inheemse als exotische populieren.	15
Foto 5 Jonge aanplant van Europese zwarte populier langs de grindplas te Negenoord (a) en op locatie Groeskens (b) (anno 2005).	17
Foto 6 Bronpopulatie van Europese zwarte populier, locatie Groeskens (anno 2019).	18
Foto 7 Kolonisatie van Europese zwarte populier op een grindbank (anno 2019).	24
Foto 8 Bronpopulatie van Europese zwarte populier, locatie Negenoord (anno 2019).	27
Foto 9 Zaailing van Europese zwarte populier op een grindbank.....	30

Lijst van tabellen

Tabel 1 Niet-inheemse populierensoorten en hybriden frequent gebruikt in veredelingsprogramma's.....	9
Tabel 2 Aantal geogste zaden, kiemingpercentage en aantal geanalyseerde zaden per moederboom.	20
Tabel 3 Microsatellieten gebruikt in deze studie.	22
Tabel 4 Genetische profielen van de hybride zaailingen voor de vier diagnostische microsatellieten (uitgedrukt in fragmentgrootte van de allelen in bp) en de chloroplast merker	26

1 PROBLEEMSTELLING

De Europese zwarte populier (*Populus nigra* L.), ook zwarte populier genoemd, is een typische soort van rivier- of oobossen. Deze soort is waarschijnlijk de meest zeldzame en bedreigde inheemse boomsoort van Vlaanderen. Natuurlijke populaties zijn volledig verdwenen. Hier en daar staan nog oude, geïsoleerde bomen als restanten van de populaties die vroeger deel uitmaakten van historische rivierbossen. De reeds gekende zwarte populieren die in België voorkomen, vertegenwoordigen slechts een handvol genetisch verschillende exemplaren. Ook elders in Europa is de zwarte populier bedreigd, hoewel de soort nergens zo zeldzaam is als in België waar zijn leefgebied grotendeels werd verwoest.

Ooibossen (vochtige alluviale bossen, habitatcode 91E0) behoren tot één van de meest diverse ecosystemen. Ze vormen het leefgebied van talrijke planten en dieren en leveren belangrijke ecosysteemdiensten; ze breken de kracht van het water, verhinderen grondverzakkingen en bodemerosie en verhogen door sedimentatie ook de oeverbescherming. De Europese zwarte populier speelt een sleutelrol in dit proces. Op plaatsen waar andere soorten het laten afweten, is de Europese zwarte populier in staat zich te vestigen en houdt hij zand- en grindafzetting vast. Hierdoor hoogt het terrein op en wordt de kracht van de rivier getemperd. Zo beschermen oobossen omliggende bewoonde gebieden tegen de grillen van de rivier. Ooibossen kwamen vroeger voor langs de oevers van grote rivieren met een uitgesproken rivierdynamiek zoals de Dender, de IJzer, de Schelde, de Dijle en de Maas. Door bedijking zijn oobossen in de afgelopen eeuwen vrijwel overal omgevormd tot weidegrond en hooilanden. Om waterhuiskundige redenen werd hoog opgaande begroeiing in het winterbed van de grote rivieren niet getolereerd (Vanden Broeck et al., 2002). Deze gronden werden te waardevol gevonden om 'slechts' als bos te gebruiken (Wolf et al., 2001). De natste delen van de uiterwaarden werden in gebruik genomen door uitgestrekte, aangeplante wilgenhakhoutbossen; de grienden.



Foto 1 Twee Europese zwarte populieren.

Natuurlijke populaties van de Europese zwarte populier moesten wijken voor snelgroeïende klonen van cultuurpopulier. Er bestaan verschillende soorten en cultuurvariëteiten populier, maar het is vooral de Euramerikaanse of Canadapopulier (*Populus x canadensis* Moench.) die sinds het einde van de 19e eeuw frequent wordt aangeplant voor houtproductie. De Canadapopulier is een verzamelnaam voor een reeks hybriden die ontstaan zijn uit spontane of kunstmatige kruisingen tussen de Amerikaanse zwarte populier, (*Populus deltoides* W. Bartram ex Marshall) en de Europese zwarte populier. Ook interamerikaanse hybride cultuurpopulieren (*Populus x generosa*, een kruising tussen *P. deltoides* x *P. trichocarpa* Torr. & A. Gray) worden in Vlaanderen veel aangeplant. Cultuurpopulieren verspreiden pollen en zaden en koloniseren ook grindbanken langsheen de Gemeenschappelijke Maas. Naast de concurrentie in kolonisatie van geschikte vestigingsplaatsen, bestaat ook het vermoedelijk gevaar voor introgressie van vreemde genen bij de Europese zwarte populier. De cultuurpopulieren zijn op grote schaal en massaal in het Vlaamse landschap aanwezig en bevatten een zeer beperkte genetische variatie die ze via pollen en zaden in het rivierecosysteem verspreiden. Ook de frequent aangeplante siervariëteit *Populus nigra* cv. *Italica* Du Roi, de kaarspopulier, kan een potentiële bedreiging zijn voor de inheemse zwarte populier. Deze veelvuldig aangeplante variëteit uit de Balkanregio vertegenwoordigt één mannelijk genotype of kloon die doorgaans overvloedig pollen produceert.

Tabel 1 Niet-inheemse populierensoorten en hybriden frequent gebruikt in veredelingsprogramma's.

Soort	Nederlandse benaming	Sectie
<i>Populus deltoides</i>	Amerikaanse zwarte populier	Ageiros
<i>Populus trichocarpa</i>	West-Amerikaanse balsempopulier	Tacamahaca
<i>Populus maximowiczii</i>	Koreaanse balsempopulier	Tacamahaca
<i>P. x canadensis</i> (syn. <i>P. x euramericana</i> ; <i>P. deltoides</i> x <i>P. nigra</i>)	Canadapopulier of Euramerikaanse populier	Ageiros
<i>P. x generosa</i> (<i>P. deltoides</i> x <i>P. trichocarpa</i>)	Interamerikaanse populier	Ageiros x Tacamahaca



Figuur 1 Ooibos met Europese zwarte populier naar Wolf et al. (2001).

Samen met de ooibossen verdween, op enkele restanten na, ook de Europese zwarte populier langs Vlaamse rivieren. Restanten kunnen hier en daar nog gevonden worden in heel Vlaanderen en vooral in de ruime omgeving van grote rivieren. De Europese zwarte populier is één van de vele planten- en diersoorten die dreigen uit te sterven in de komende decennia als gevolg van destructief landgebruik, klimaatverandering, invasieve exoten, ontbossing en vervuiling. Deze soort staat op de Vlaamse rode lijst als bedreigd gecatalogeerd (Van Landuyt et al. 2006). De verwoesting van de biodiversiteit vormt een minstens even grote bedreiging voor de mensheid als de opwarming van de aarde (IPBES, 2019). Toch is er nog tijd om het tij te keren; tijd om te beschermen wat er nog rest en om het leefgebied van de bedreigde soorten te herstellen. De Vlaamse regering streeft ernaar om tegen 2030 de met uitsterven bedreigde soorten te beschermen, de verdere aftakeling van de natuurlijke leefgebieden in te perken en ecosystemen en hun diensten minstens te behouden (Visie nota vizier 2030; <https://do.vlaanderen.be/visienota-vizier-2030-een-2030-doelstellingenkader-voor-vlaanderen>).

Door de klimaatverandering regent het op veel plaatsen meer en harder. Hierdoor krijgen de rivieren meer water te verwerken met het risico op meer frequente overstromingen. In verschillende gebieden worden daarom plannen ontwikkeld om rivieren weer meer ruimte te geven en zo wateroverlast te beperken. Dit biedt opnieuw kansen voor natuurontwikkeling, waaronder de ontwikkeling van soortenrijke ooibossen met Europese zwarte populier. Ook op internationaal niveau staat het herstel van rivierbossen bovenaan de prioriteitenlijst (Europese Biodiversiteitstrategie voor 2030, Europese Overstromingsrichtlijn 2007/60/EC).

De spontane ontwikkeling van zachthoutooibossen of wilgenvloedbossen (*Salicetea purpureae*) is een basisproces dat deel uitmaakt van het ecologisch herstel van de Gemeenschappelijke Maas. Omdat de zwarte populier zo zeldzaam is, is de kans bijna nihil dat de soort het hersteld leefgebied spontaan zal koloniseren. Wetenschappelijk onderbouwde herintroductie- of herstelprojecten zijn daarom noodzakelijk om terug ooibossen met zwarte populier tot stand te laten komen.



Foto 2 Karakteristiek ruitvormig blad met bladgal van de bladluis *Pemphigus bursarius* en zaden van Europese zwarte populier.

Het kruisen van een cultuurvariëteit met een wilde, verwante soort kan ertoe leiden dat het DNA van de cultuurvariëteit blijvend wordt opgenomen in het DNA van de wilde soort. Hybridisatie of kruising tussen twee soorten hoeft niet noodzakelijk tot succesvolle overdracht van genen te leiden. Indien dat wel gebeurt, spreekt men van introgressie of genetische vervuiling. Het kruisen tussen de Canadapopulier en de Europese zwarte populier kan leiden tot het verlies van de Europese zwarte populier als 'zuivere soort' en tot een sterke reductie van de genetische diversiteit met een verminderend aanpassingspotentieel voor de Europese zwarte populier als gevolg. Genetische vervuiling van de Europese zwarte populier treedt op wanneer in de natuurlijke habitat individuen terug te vinden zijn die genen van zowel de Europese als de Amerikaanse zwarte populier bevatten (Vanden Broeck & de Vries, 2011).

Door de grote afstanden tussen de laatste volwassen relictten van zwarte populier langs de Gemeenschappelijke Maas (5 tot 12 km) en door de alom aanwezige cultuurpopulieren, was het ten tijde van de voorstudie, hoogst onwaarschijnlijk dat deze laatste relictten van de Europese zwarte populier zich konden voortplanten. Om deze hypothese te testen, werden in 1999 zaden geogst van een oude zwarte populier in Bilzen. De zaden werden opgekweekt en het DNA werd onderzocht met een combinatie van isozymen met zes nucleaire moleculaire merkers (vijf microsatteliet loci (PMGC14, WPMS09, WPMS16, WPMS14, WPMS20) (<http://poplar2.cfr.washington.edu/pmgc>) en de nucleaire merker win3 (Bradshaw et al., 1994)). In 32 van in totaal 34 opgekweekte zaailingen, werden genen van de Amerikaanse zwarte populier *Populus deltoides* gevonden, wat wijst op kruising met de Canadapopulier (Vanden Broeck et al., 2004).

Langs de Gemeenschappelijk Maas werd introgressie van genen van de Amerikaanse populier *P. deltoides* aangetoond in het genoom van de Europese zwarte populier, wat zeer ongunstig is voor het behoud van de inheemse soort. Tevens werd ook introgressie van *P. trichocarpa* afkomstig van de interamerikaanse hybride cultuurpopulieren (*P. x generosa*) in het genoom van de zaailingen aangetoond via DNA-onderzoek. Het was in deze voorstudie, dat werd gestaafd dat een vrouwelijke Europese zwarte populier succesvol kan kruisen met een mannelijke Canadapopulier (Vanden Broeck et al., 2004). Gelijkaardige studies vonden geen uitkruising (Benetka et al., 1999; Benetka et al., 2002). Deze laatste studies gebeurden op zaden geogst op moederbomen in natuurlijke populaties van zwarte populier, waar dus ook veel stuifmeel van zwarte populier aanwezig was. Dit was dus in tegenstelling met de situatie van de relictbomen van de Gemeenschappelijke Maas die omringd werden door een stuifmeelwolk afkomstig van hybride cultuurpopulier.

2.1.4 Mentorpollen helpen Canadapopulier

Vermenging van genen treedt hoofdzakelijk op in één richting: door kruising met de Canadapopulier als vrouwelijke boom. In tegenstelling tot pollen van de Canadapopulier blijken pollen van de Europese zwarte populier duidelijk wel in staat te zijn om vrouwelijke bloemen van de Canadapopulier succesvol te bestuiven. Genetische vervuiling lijkt dus voornamelijk te gebeuren via zaadproductie van de Canadapopulier, waarbij de pollen die bijdragen aan de zaadproductie voornamelijk afkomstig zijn van de Europese zwarte populier.

Maar evenzeer werden in het veld jonge populieren gevonden die het resultaat waren van succesvolle, spontane kruisingen tussen twee Canadapopulieren onderling. In het veld blijken Canadapopulieren zich dus toch succesvol te kunnen voortplanten via pollen en zaden. Dit is verrassend en lijkt de bevindingen van het experimentele kruisingen, namelijk dat klonen van de Canadapopulier relatief onvruchtbaar zijn (Stettler, 1968), tegen te spreken. Een mogelijke verklaring ligt in de interactie tussen pollen, waarbij pollen van de ene soort in staat zijn pollenbuizen te vormen, waarlangs de pollen van de andere soort het zaadbeginsel kunnen

bereiken (Stettler, 1968). Die 'wegbereiders' worden dan mentorpollen genoemd (Kader 1) (Stettler, 1968; Vanden Broeck et al., 2011; Vanden Broeck & de Vries, 2011).

Het is mogelijk dat mechanismen die lijken op de mentortechniek ook in het veld een rol spelen bij de voortplanting van de Canadapopulier. Wanneer in het veld Canadapopulieren en Europese zwarte populieren gelijktijdig bloeien, ontstaan pollenwolken waar pollen van beide soorten samen voorkomen. Door interactie met pollen van de Europese zwarte populier zou het kunnen dat pollen van de Canadapopulier toch in staat zijn om tot bestuiving over te gaan van vrouwelijke Canadapopulieren, wanneer pollen van zowel Canadapopulier als Europese zwarte populier aanwezig zijn op de stijl (Vanden Broeck et al., 2003b). Deze hypothese werd onderzocht door experimentele kruisingen met pollenmengsels. De resultaten bevestigen de hypothese: in aanwezigheid van pollen van de Europese zwarte populier blijken de anders weinig vitale pollen van de Canadapopulier toch in staat te zijn vrouwelijke Canadapopulieren succesvol te bevruchten. Meer nog: ze zijn nog succesvoller in het bestuiven van hun vrouwelijke soortgenoten dan pollen van de Europese zwarte populier. Uit de controle-experimenten blijkt dat pollen van Europese zwarte populier wel degelijk nodig zijn om bestuiving van hybride Canadapopulier mogelijk te maken (Vanden Broeck et al., 2003b).

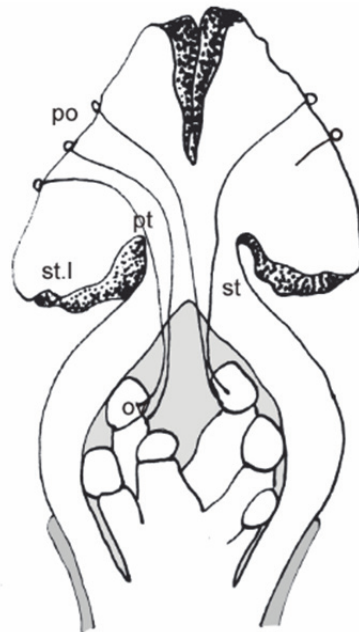
De mate van genetische vervuiling van de inheemse Europese zwarte populier, lijkt heel sterk af te hangen van lokale omstandigheden die ook de samenstelling en de grootte van de pollenwolken bepalen. Wanneer nog grote, oorspronkelijke populaties voorkomen van de Europese zwarte populier langs dynamische rivieren, zoals langs de Loire en de Drôme in Frankrijk en de Mura in Slovenië, lijkt genetische vervuiling zo goed als uitgesloten (Imbert & Lefèvre, 2003). In meer verstoorde habitats waar populaties van de Europese zwarte populier zeer sterk gereduceerd zijn, treedt genetische vervuiling wel frequent op. Dit is bijvoorbeeld het geval in populaties langs de Rijn en de Elbe in Duitsland (Meyer et al., 2018; Ziegenhagen et al., 2008), langs de Morava rivier in Tsjechië (Pospiskova & Salkova, 2006), de Ticino rivier in Italië (Fossati et al., 2003), de Rijn in Nederland (Arens et al., 1998; Smulders et al., 2008a) en de rivieren Thur en Reuss in Zwitserland (Csencsics & Holderegger, 2016).



Foto 3 *Populus x canadensis* cv. Robusta nabij locatie Groeskens (anno 2019).

Kader 1. Mentorpollen

Een kruisingsbarrière tussen twee individuen populier die van nature niet met elkaar kruisen omdat ze genetisch niet compatibel zijn, kan in sommige gevallen kunstmatig omzeild worden door gebruik te maken van mentorpollen in pollenmengsels (Stettler, 1968). Mentorpollen zijn genetisch compatibele pollen die kunstmatig onleefbaar worden gemaakt, bijvoorbeeld door herhaalde cycli van extreme temperatuurschommelingen (-196°C / +40°C). Wanneer de onleefbare, maar genetisch compatibele mentorpollen samen met leefbare, niet-compatibele pollen worden aangewend bij de bestuiving, kan de kruisingsbarrière in sommige gevallen kunstmatig doorbroken worden. De mentorpollen helpen de pollen van de niet-compatibele soort bij de bestuiving via de interactie met het vrouwelijk plantenweefsel (figuur 2). De mentortechniek is bedacht in de jaren '60 in het kader van veredelingsprogramma's. De exacte biochemische mechanismen die hier een rol spelen zijn nog niet volledig opgehelderd. Moleculaire en biochemische herkenningssignalen tussen pollen en stijl die nodig zijn voor de groei van de pollenbuis, spelen hier waarschijnlijk een belangrijke rol in. Wel is duidelijk dat een kruising tussen twee populierensoorten die van nature onmogelijk is (genetisch incompatibel) in het laboratorium soms wel lukt wanneer de mentortechniek wordt toegepast. Mogelijks spelen ook in het veld interacties tussen pollen een rol bij bestuiving van bepaalde soorten (Vanden Broeck et al., 2012).



Figuur 2 Schematische voorstelling van competitie tussen pollen op het vruchtbeginsel van een populier (naar Villar et al., 1993).

Po: pollenkorrel, pt: pollenbuis, st.l.: stempel, st.: stijl.

2.1.5 Conclusie van de voorstudie

Uit de voorstudie werd in 2002 het volgende geconcludeerd;

1. spontaan herstel van populaties Europese Zwarte populier langsheen de Grensmaas is uitgesloten gezien het beperkt aantal resterende relictindividuen,
2. nieuw gevestigde populaties van populier op de grindbanken zijn grotendeels afkomstig van cultuurpopulieren. De hybride cultuurpopulieren vormen bijgevolg een gevaar voor genetische vervuiling.

Gezien het unieke potentieel van natuurontwikkeling en uitgestrektheid van het gebied enerzijds, en de uiterst bedreigde toestand van de Europese zwarte populier en andere doelsoorten anderzijds, werd een snelle actie ter herstel van riviervloedbossen aanbevolen.

Wegens de afwezigheid van naburige bronpopulaties, zal een geherintroduceerde populatie langs de Gemeenschappelijke Maas volledig geïsoleerd zijn. Ze dient daarom voldoende groot te zijn en minimum uit 100 genetische, niet-gerelateerde individuen en bij voorkeur een evenredige geslachtsverhouding te bestaan (Lefèvre et al., 2001).

Rekening houdend met de tijdsperiode nodig om te komen tot zaaddragende bomen (10 tot 15 jaar), werd aanbevolen direct in te grijpen om het natuurontwikkelingsproces in het gebied vooruit te helpen. Het uitstellen van herintroducties van Europese zwarte populier langs de Gemeenschappelijke Maas zou resulteren in een spontaan ontwikkeld vloedbos van Amerikaanse populierensoorten en het verdwijnen van de inheemse Europese zwarte populier.



Foto 4 De grindbanken vormen geschikte vestigingsplaatsen voor zowel inheemse als exotische populieren.

2.2 HERINTRODUCTIEPROJECT (2002-2005)

2.2.1 Twee bronpopulaties

In de periode 2002-2005 werden in totaal 275 Europese zwarte populieren aangeplant op twee locaties in Dilsen-Stokkem, respectievelijk op 0,2 km en 0,05 km van de rivier; i) locatie Groeskens (51°01'01N, 05°46'02E, 0,77 ha, 101 bomen waarvan 81 genetisch verschillende exemplaren) en ii) locatie grindplas Negenoord (51°01'36 N, 05°46'16E 2 ha, 174 bomen, > 90 genetisch verschillende exemplaren) (figuur 3). De plantlocaties werden zo gekozen dat ze in de nabijheid lagen van de rivier en geschikte potentiële kolonisatiegebieden bepaald door het habitatmodel ontwikkeld voor de Gemeenschappelijke Maas (Van Looy et al., 2005).

Het plantsoen bestond uit twee jaar oude bomen met wortel, opgekweekt in de proefkwekerij van het INBO te Grimminge (Geraardsbergen). Ze werden op ruime afstand van elkaar geplant om snelle groei en zaadzetting te bevorderen (9 m x 9 m voor Groeskens en 9 m x 4 m op locatie Negenoord).



Figuur 3 Studiegebied en locatie van de bronpopulaties van Europese zwarte populier.

2.2.2 Genetische herkomst

De bomen geplant in Groeskens waren afkomstig uit de nationale *Populus nigra* genenbank van het INBO (57 genotypes) en de genenbank van Alterra, Nederland (21 genotypes). Dit werd aangevuld met genetisch materiaal afkomstig van natuurlijke *Populus nigra* populaties langs de Rein in Duitsland (23 genotypes) (locatie Kühkopf, FA Groß-Gerau, 48° 48' 56,62 N, 8° 7' 38,60 O). Het genetisch materiaal van de bomen te Negenoord was ook afkomstig van de genenbanken van INBO en Alterra, aangevuld met 90 zaailingen (full-sibs) opgekweekt uit zaad afkomstig van drie gecontroleerde kruisingen uitgevoerd in 2000 tussen Europese zwarte populieren uit de genenbank van het INBO. Alle aangeplante bomen zijn met zekerheid exemplaren van Europese zwarte populier. Ze werden genetisch gescreend op basis van DNA-analysen tijdens het Europees onderzoeksproject 'Europop' (Smulders et al., 2008b; Storme et al., 2004).

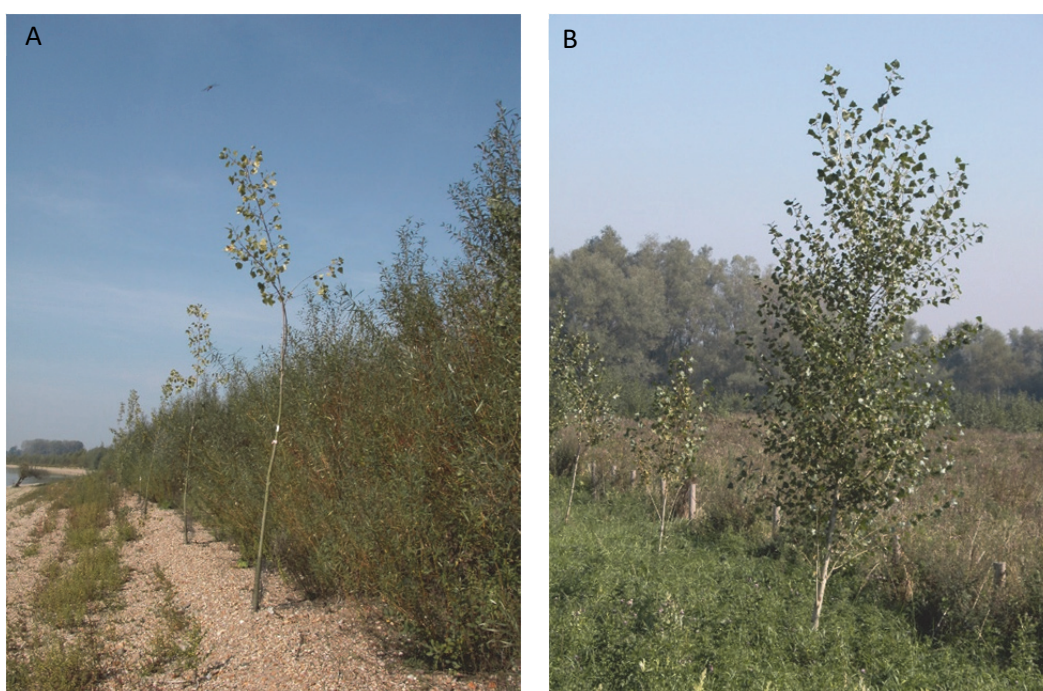


Foto 5 Jonge aanplant van Europese zwarte populier langs de grindplas te Negenoord (a) en op locatie Groeskens (b) (anno 2005).

2.3 EVALUATIE HERINTRODUCTIE (2019-2020)

De bomen hebben nu een leeftijd bereikt waarop ze zaden kunnen produceren. De zaden van de bronpopulaties kunnen soortzuiver zijn en dus afkomstig van een kruising tussen twee aangeplante Europese zwarte populieren onderling, of ze kunnen ook tot stand komen door kruising met de Canadapopulier (*P. x canadensis*) of andere exotische populieren (zoals bv. *P. x generosa*). Soortzuivere zaden en zaailingen kunnen ook het resultaat zijn van bestuiving door de kaarspopulier (*P. nigra* cv. *Italica*). Het is niet wenselijk dat de kaarspopulier zich massaal voortplant op de grindbanken. Op termijn zou dit een populatie met een beperkte genetische diversiteit, een lage effectieve populatiegrootte en lage vitaliteit tot gevolg hebben.

Net zoals tijdens de voorstudie in 2000-2001, worden ook vandaag zaailingen van populier op de grindbanken waargenomen. Twee decennia later willen we opnieuw inzicht krijgen in de genetische herkomst van de zaailingen van populier op die grindbanken.

Concreet willen we de onderstaande vragen beantwoorden:

1. Produceren de aanplantingen van Europese zwarte populier soortzuivere, leefbare zaden in het studiegebied?
2. Is de kaarspopulier een succesvolle bestuiver van vrouwelijke, inheemse Europese zwarte populier in het studiegebied?
3. Van welke genetische oorsprong zijn de kiemplanten van populier op de grindbanken?
4. Welke beheeracties zijn aan te bevelen om de ontwikkeling van zachthoutoibos met inheemse Europese zwarte populier als sleutelsoort te bevorderen?



Foto 6 Bronpopulatie van Europese zwarte populier, locatie Groeskens (anno 2019).

3 METHODE

3.1 UITGANGSMATERIAAL EN LABO-ANALYSE

3.1.1 Zaailingen van populier op de grindbanken

Over een traject van 28 km werden in het najaar van 2018 en 2019 in totaal 154 zaailingen van populier bemonsterd langsheen de grindbanken. Respectievelijk 52 en 102 bladstalen werden verzameld in 2018 en 2019 voor DNA-analyse. Enkel planten die vermoedelijk uit zaden voortkwamen en niet uit vegetatieve vermeerdering (bv. wortelstokken) werden bemonsterd. In de meeste gevallen betrof het zeer jonge, twee- à driejarige zaailingen van 10 tot 50 cm groot. De verjonging van populier over het traject was heel variabel; op sommige grindbanken kwamen de jonge populieren massaal voor terwijl ze op andere grindbanken in veel lagere aantallen voorkwamen. In 2018 gebeurde de bemonstering eerder *ad random* over het hele traject. In 2019 gebeurde de bemonstering op een meer systematische manier; een traject van 9 km langsheen de rivieroever werd afgestapt en op elke locatie die door jonge populieren was gekoloniseerd, werd minstens één (gemiddeld: 1,6) plant bemonsterd. Van elk van deze 154 zaailingen, werd de geografische locatie genoteerd en werd een jong blad verzameld en bewaard in silicagel voor taxonomische identificatie via DNA-analyse. De locatie van de bemonsterde zaailingen is weergegeven in figuur 4.



Figuur 4 Locatie van de bemonsterde zaailingen van populier op de grindbanken. Het aantal per locatie is weergegeven in de cirkels.

3.1.2 Nakomelingschap van *Populus nigra* moederbomen

Begin juni 2018 werd zaadpluis verzameld op de takken onderaan de kroon van zes vrouwelijke Europese zwarte populieren op locatie Groeskens. De zaden werden apart gehouden per moederboom, gescheiden van het zaadpluis en binnen de week na collectie uitgezaaid in potgrond (50% veen / 50% turf) in de serre. In juni 2019 (12/06/2019) werd opnieuw zaadpluis verzameld op negen moederbomen: zes bomen op locatie Groeskens en drie bomen op locatie Negenoord. De zaden werden eveneens van het pluis gescheiden, geteld en nadien uitgezaaid in potgrond in de serre. Voor de zaden verzameld in 2019 werd ook het kiempercentage bepaald. Van de zaailingen werd vervolgens een jong blad verzameld voor DNA-analyse met als doel de vader te identificeren op soort- en of kloonniveau.

Tabel 2 Aantal geogste zaden, kiemingpercentage en aantal geanalyseerde zaden per moederboom. NA: niet beschikbaar.

Jaar van collectie	Locatie	ID moederboom	# zaden	kieming (%)	# geanalyseerde zaailingen
2018	Groeskens	2.16	NA	NA	28
2018	Groeskens	5.20	NA	NA	1
2019	Negenoord	1	160	2,50	4
2019	Negenoord	2	300	3,00	9
2019	Negenoord	3	300	5,67	17
2019	Groeskens	5.25	300	3,00	8
2019	Groeskens	5.20	76	6,58	5
Totaal					72

3.1.3 Referentiestalen

Referentiestalen, populieren waarvan de soort met zekerheid gekend is, zijn nuttig als controlemateriaal om de bruikbaarheid van de moleculaire merkers en de aanwezigheid van soortspecifieke DNA-fragmenten (allelen) te testen. De klonencollectie populier van het INBO bevat klonen van verschillende soorten en hybriden. Deze collectie is opgebouwd over verschillende decennia en bevat individuen verzameld in natuurlijke populaties en commerciële populierenklonen beschreven in het 'International Register of Populus Cultivars' van de 'International Poplar Commission' (<http://www.fao.org/forestry/ipc/>). Uit deze collectie werden 76 stalen genomen als referentiemateriaal behorende tot verschillende secties van het geslacht *Populus*, nl. sectie Aigeiros; *P. deltoides* (4 stalen), *P. nigra* (18 stalen), *P. x canadensis* (37 stalen), de sectie Tacamahaca; *P. trichocarpa* (4 stalen), *P. maximowiczii*, *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii* (3 stalen) en intersectionele hybriden *P. x generosa* (10 stalen). Naast de evaluatie van de bruikbaarheid van de moleculaire merkers en de identificatie van hybriden, werden de mannelijke cultivars van het referentiemateriaal als potentiële vaders meegenomen in de vaderschapsanalyse van het nakomelingschap van de vrij-bestoven *P. nigra* moederbomen. Een lijst van de referentiestalen is weergegeven in bijlage 1.

3.1.4 DNA-extractie

Genomisch DNA (~20 - 50 ng) werd geëxtraheerd uit 5 mg gedroogd blad met de QuickPick Plant DNA kit (Bio-Nobile) en de MagRo 96-M DNA-extractie robot (Bio-Nobile). De kwaliteit van de DNA-extractie werd gecontroleerd op een steekproef (10%) van de stalen via gelelektroforese op 1% agarose gels. DNA-kwantificatie werd uitgevoerd op alle stalen met Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) en de Synergy HT plate reader (BioTek, Vermont, USA).

3.1.5 Chloroplast DNA merker *trnD* /*TrnT*

Chloroplast DNA (afgekort cpDNA) is een klein cirkelvormig stukje DNA dat voorkomt in de chloroplasten van planten en binnen een soort weinig tot geen variatie vertoont. Bij populier wordt het cpDNA maternaal via de moederboom overgeërfd. Het cpDNA locus *trnD* (Demesure et al., 1995) toont variatie tussen de soorten *P. nigra*, *P. deltoides* en *P. trichocarpa* (Heinze, 1998; Meyer et al., 2018). Omdat dit DNA-fragment enkel via de moeder wordt overgeërfd, is het een goede merker om te bepalen of de zaailingen bemonsterd op de grindbanken afkomstig zijn van zaden van *P. deltoides* / *P. x canadensis*, *P. nigra* of *P. trichocarpa* (Csencsics & Holderegger, 2016; Ziegenhagen et al., 2008). We analyseerden het locus *trnD/trnT* vertrekkende van genomisch DNA (~20 - 50 ng) in combinatie met het restrictie-enzyme *Hinfl*, zoals beschreven in Heinze (1998). PCR-reactieproducten werden samen met een referentieladder van 100 bp en enkele referentiestalen van *P. nigra*, *P. x canadensis* en *P. trichocarpa* geanalyseerd via gelelektroforese op 1% agarose gels.

3.1.6 Microsatellieten

Nucleaire microsatellieten zijn geschikt om klonen en hybriden van verschillende populierensoorten te onderscheiden (Rahman et al., 2000; Rahman & Rajora, 2002; Schroeder & Fladung, 2010). We analyseerden negen microsatellietmerkers die bruikbaar zijn om Europese zwarte populier van hybride populier te onderscheiden (Liesebach et al., 2010; Smulders et al., 2001; van der Schoot et al., 2000). In vorige studies werd aangetoond dat volgende microsatellieten soortspecifieke allelen vertonen voor *P. deltoides* en/of voor *P. trichocarpa*: PMGC14 (Fossati et al., 2003; Liesebach et al., 2010), PMGC456 (Liesebach et al., 2010), PMGC2163 (Liesebach et al., 2010), WPMS09 (Fossati et al., 2003; Liesebach et al., 2010) en WPMS20 (Liesebach et al., 2010). Enkele van deze microsatellieten zijn op hetzelfde chromosoom ('linkage group') gelegen: PMGC14 & WPMS20 en WPMS05 & PTR7. Ze kunnen als onafhankelijk van elkaar worden beschouwd omdat ze op een afstand van ten minste 50 centimorgan (cM) gelegen zijn (Gaudet et al., 2008). De microsatellietanalyse werd uitgevoerd op de referentiestalen, het nakomelingschap van de moederbomen en op de zaailingen bemonsterd op de grindbanken, zoals beschreven in Smulders et al. (2001) en van der Schoot et al. (2000). Tien stalen werden in tweevoud geanalyseerd, vertrekkende van een tweede DNA-extractie, om de herhaalbaarheid van de data te bepalen. PCR producten werden geanalyseerd op een ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) met GeneScan-600 LIZ als standaard. De bekomen DNA-profielen werden verder geanalyseerd met het software pakket GeneMapper v.6.0. Stalen die voor minder dan 8 microsatellieten werden gescoord (m.a.w. stalen met > 12% ontbrekende data), werden uit de dataset verwijderd. De lijst van microsatellieten is weergegeven in tabel 3.

Tabel 3 Microsatellieten gebruikt in deze studie.

	Locus	Linkage group'	Repeat motif	Fragmentgrootte (bp)	TA* (°C)	MP**	Dye	Referentie
1	PMGC_14	XIII	CTT	179 - 227	52	1	FAM	PMGC
2	WPMS_05	XII	GT	263 - 291	52	1	VIC	van der Schoot et al. (2000)
3	PMGC_2163	X	GA	198 - 220	52	1	NED	PMGC
4	PMGC_456	II	GA	80 - 136	52	1	NED	PMGC
5	WPMS_16	VII	GTC	128-167	52	1	PET	Smulders et al. (2001)
6	WPMS_09	VI	GT	244 -294	57	2	FAM	Smulders et al. (2001)
7	PTR2	IX	TGG	207 -228	57	2	VIC	Dayanandan et al. (1998)
8	WPMS_20	XIII	TTCTGG	224 - 242	57	2	NED	Smulders et al. (2001)
9	PTR7	XII	(CT)5AT(CT)	230 -250	57	2	PET	Rahman et al. (2000)

LG: Linkage Group; TA: 'Annealing Temperature' voor de PCR-reactie; MP: Multiplex reactie; PMGC: Poplar Molecular Genetics Cooperative.





Foto 7 Kolonisatie van Europese zwarte populier op een grindbank (anno 2019).



4 RESULTATEN

4.1 DIAGNOSTISCHE MICROSATELLIETEN

De microsatellieten leverden perfect herhaalbare resultaten op en een beperkt percentage ontbrekende data (0,07%). Bij de stalen genomen op de grindbanken hadden twee zaailingen hetzelfde genetische profiel. Verder kwam een ander genetisch profiel voor bij drie zaailingen. Het is mogelijk dat enkele zaailingen bij toeval zowel in 2018 als in 2019 werden bemonsterd. Het is ook mogelijk dat sommige bemonsterde zaailingen erg verwant zijn en daarom gelijkaardige profielen opleverden. Elk genetisch profiel werd slechts éénmaal meegenomen voor verdere data-analyse. De data bevestigen het voorkomen van soortspecifieke merkers zoals beschreven door Liesebach et al. (2010) en Fossati et al. (2003) voor de loci PMGC14, PMGC456, PMGC2163 en WPMS09, maar niet voor WPMS20. Voor PMGC14 waren de allelen 192 en 198 specifiek voor *P. deltoides* en *P. x canadensis*, en was allel 200 specifiek voor *P. trichocarpa*, dus ook voorkomend in referentiestalen van *P. x generosa* en *P. trichocarpa x P. maximowiczii*. Voor WPMS09, was allel 232 kenmerkend voor *P. deltoides* en/of *P. x canadensis*, met uitzondering van 16 referentiestalen van *P. x canadensis* die homozygoot waren voor dat locus. Dit kan worden verklaard door hun genetische oorsprong (F2-hybriden of terugkruisingen) of door de aanwezigheid van nulallelen. Voor WPMS20 werd geen soortspecifiek allel gedetecteerd, aangezien het allel van 200 zowel voorkwam bij *P. deltoides* als bij *P. nigra*, zoals ook gerapporteerd door Liesebach et al. (2010). Verder werden ook soortspecifieke allelen waargenomen voor locus PMGC2163 (*P. deltoides*: allel 185; *P. trichocarpa*: allelen 199, 200) en voor locus PMGC456 (*P. deltoides*: allel 82; *P. trichocarpa*: allelen 93 en 109; *P. nigra*: allel 75).

4.2 POPULIEREN VAN DE GRINDBANKEN

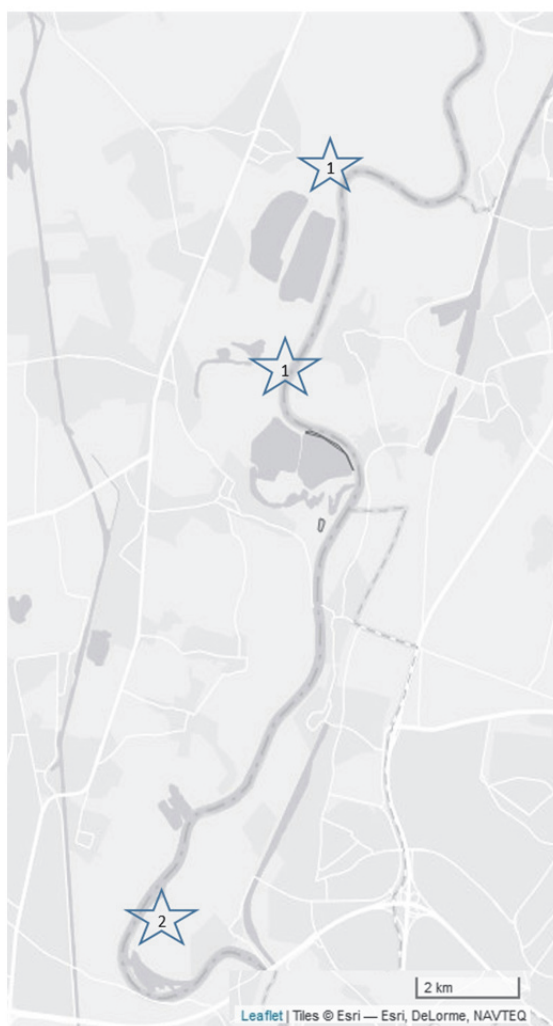
Voor 135 van de 154 bemonsterde zaailingen op de grindbanken, werd een duidelijk patroon bekomen bij het cpDNA locus *trnDT*. Hiervan vertoonden 133 (98,5%) van de zaailingen een patroon specifiek voor *P. nigra* (cpDNA fragment van ~880 bp) wat erop wijst dat ze afkomstig zijn van een vrouwelijke Europese zwarte populier. Deze zaailingen vertoonden ook morfologische bladkenmerken van *P. nigra* (ruitvormig blad met typische nervatuur aan de bladsteel). Verder vertoonden twee zaailingen (1,5%) een fragment specifiek voor *P. trichocarpa* op het cpDNA locus *trnDT* (~1000bp). Deze twee stalen vertoonden ook duidelijk morfologische bladkenmerken van *P. trichocarpa* (zeer groot, eerder ovaal blad). Ze werden verzameld op een afstand van 6 km van de dichtstbijzijnde *P. nigra* aanplant. Het fragment dat op het cpDNA locus *trnDT* specifiek is voor *P. deltoides* (~1135bp), werd bij geen enkele zaailing waargenomen. De data van de diagnostische microsatellieten bevestigen de resultaten van de cpDNA-analyse; de twee zaailingen met een specifiek fragment voor *P. trichocarpa* op locus *trnDT* vertoonden één of meerdere microsatellietallelen specifiek voor *P. trichocarpa*. Voor één van deze twee zaailingen, werden allelen van *P. trichocarpa* waargenomen in homozygote vorm, wat wijst op herkomst uit kruising tussen twee klonen van *P. trichocarpa*, of van *P. x generosa* of van *P. trichocarpa x P. generosa*. Verder werden nog twee zaailingen bemonsterd die DNA-fragmenten specifiek voor *P. deltoides* vertoonden, in heterozygote vorm voor respectievelijk twee en drie diagnostische microsatellieten. Aangezien deze twee zaailingen een specifiek *trnDT* fragment van *P. nigra* vertoonden, zijn ze vermoedelijk afkomstig van een terugkruising van *P. nigra* naar *P. x canadensis*. Samengevat vertoonden slechts vier (2%) van de 154 succesvol geanalyseerde zaailingen op de grindbanken genen van

exotische populierensoorten. De genetische profielen van de hybride zaailingen zijn samengevat in tabel 4.

Tabel 4 Genetische profielen van de hybride zaailingen voor de vier diagnostische microsattelieten (uitgedrukt in fragmentgrootte van de allelen in bp) en de chloroplast marker

	Lab_ID	PMGC14	WPMS09	PMGC2163	PMGC456	cpDNA <i>trnDT</i>
1	19-011120	192 ^D / 207	232 ^D / 264	277 / 185 ^D		N
2	19-011141	198 ^D / 204	232 ^D / 250	304 / 185 ^D	75 / 82 ^D	N
3	19-008000	200 ^T / 204		205 ^T / 249	75 / 109 ^T	T*
4	19-008001	200 ^T / 200 ^T		199 ^T / 205	93 / 109 ^T	T*

D: allel specifiek voor *Populus deltoides*; T: allel specifiek voor *P. trichocarpa*; N: cpDNA fragment specifiek voor *P. nigra*, T*: cpDNA-fragment specifiek voor *P. trichocarpa*.



Figuur 5 Locatie van hybride zaailingen populier met genen van *Populus deltoides* of *P. trichocarpa* afkomstig van cultuurpopulier.

4.3 VRIJ-BESTOVEN NAKOMELINGSCHAP

Er werden zaailingen bekomen van respectievelijk zes en vijf moederbomen van zaad geoogst in 2018 en 2019. De moederbomen vertegenwoordigden twee verschillende genotypes. Het gemiddelde kiemingspercentage van de in totaal 1492 uitgezaaide zaden in 2019 was laag (van 0% tot 6,6% met een gemiddelde van 2,9%). Er werden 74 zaailingen genetisch geanalyseerd. Voor 72 hiervan werden goede genetische profielen bekomen. In geen enkele van deze zaailingen werden soortspecifieke DNA-fragmenten gedetecteerd voor *P. deltoides* of *P. trichocarpa*, wat wijst op de afwezigheid van exotische cultuurpopulier binnen het vaderschap van deze zaailingen. Echter, de resultaten van de vaderschapsanalyse op basis van de microsattelietdata en de referentieklonen als mogelijke vaders, geven een cultivar van *P. x canadensis* aan als een waarschijnlijke vader voor drie zaailingen van een vrij-bestoven moederboom bemonsterd in 2018 (ID 2.16) op locatie Groeskens. De vaderschapsanalyse uitgevoerd met het programma CERVUS resulteerde in een aangewezen vader met een betrouwbaarheid van 95% voor 27 (38%) van de zaailingen en een betrouwbaarheid van 80% voor 48 (67%) van de zaailingen. Voor 24 (33%) van de zaailingen kon geen meest-waarschijnlijke vader worden aangewezen. Voor één zaailing werd het vaderschap toegewezen aan *P. x canadensis* cv. Serotina de Champagne met een betrouwbaarheid van 80% en waarbij het genetisch profiel van de vader overeenkwam met het profiel van deze zaailing, gegeven het gekende profiel van de moeder. Voor een tweede zaailing, werd dezelfde cultivar eveneens toegewezen als vader, waarbij het profiel van de vader op één locus na (PMGC14) overeenkwam met dit van de zaailing. Deze 'mismatch' op het locus PMGC14 is mogelijk te verklaren door een somatische mutatie. Voor een derde zaailing werd *P. x canadensis* cv. Serotina als meest waarschijnlijke vader aangewezen. Deze laatste zaailing vertoonde een 'mismatch' met deze cultivar op twee loci (PMGC14, PTR07). Voor alle andere geanalyseerde zaailingen, was de toegewezen vader een *P. nigra*. Geen enkele zaailing had *P. nigra* cv. Italica als vader. Ook de nabij Groeskens aangeplante *P. x canadensis* cv. Robusta, droeg niet bij aan de bestuiving van de onderzochte moederbomen.



Foto 8 Bronpopulatie van Europese zwarte populier, locatie Negenoord (anno 2019).

5 DISCUSSIE

De resultaten van dit onderzoek tonen het belang aan van een herintroductie van de Europese zwarte populier langs de Gemeenschappelijke Maas na het herstel van de rivierdynamiek en de ontwikkeling van geschikte vestigingsplaatsen. De aanplant van Europese zwarte populier resulteerde in een massale verjonging van de inheemse soort op de grindbanken. Cultuurpopulieren waren duidelijk minder succesvol in hun voortplanting in vergelijking met de periode voor de herintroductie, toen regelmatig zaailingen met genen van cultuurpopulieren werden gedetecteerd (Vanden Broeck et al., 2004).

5.1 SOORTZUIVERE ZADEN EN ZAAILINGEN

De meeste zaailingen van de grindbanken (150 zaailingen of 98%), werden geïdentificeerd als zuivere Europese zwarte populier. De resultaten van de chloroplast DNA-merker (cpDNA locus *trnDT*) geven aan dat deze zaailingen afkomstig waren van zaden van *P. nigra* moederbomen. Aangezien bij deze zaailingen een cpDNA fragment typisch voor Europese zwarte populier werd gevonden, kunnen ze niet afkomstig zijn van een vrouwelijke, eerste-generatie (F1) hybride van *P. x canadensis* omdat deze hybriden steeds het resultaat zijn van een kruising tussen een vrouwelijke *P. deltoides* en een mannelijke *P. nigra*. De kruising in de andere richting is genetisch niet compatibel (Heinze, 1998; Zsuffa, 1974). De afwezigheid van soortspecifieke microsatellietallelen voor *P. deltoides* en *P. trichocarpa* wijst op vaderschap van een *P. nigra*. De overige zaailingen bemonsterd op de grindbanken (4 zaailingen of 2%) vertoonden genen van exotische populieren op de onderzochte microsatellieten. Hiervan vertoonden twee zaailingen genen specifiek voor *P. trichocarpa*. De andere twee zaailingen waren vermoedelijk het resultaat van een terugkruising; een kruising van een mannelijke *P. x canadensis* en een vrouwelijke *P. nigra*.

Het vrij-bestoven nakomelingschap van de *P. nigra* moederbomen vertoonden geen genen van exotische populieren op de onderzochte microsatellietloci. Echter, de vaderschapsanalyse resulteerde wel in een toegewezen cultuurpopulier als vader voor drie (3/72 of 4%) zaailingen; tweemaal werd *P. x canadensis* cv. Serotina de Champagne als vader toegewezen, en éénmaal *P. x canadensis* cv. Serotina. Deze twee cultuurpopulieren zijn vermoedelijk terugkruisingen (BC1 of eerste-generatie 'back-cross'; kruising van *P. x canadensis* en *P. nigra*) en, alhoewel de naam anders doet vermoeden, duidelijk verschillend. Ze verschillen op 7 van de 9 onderzochte microsatellietloci en vertonen ook een verschillende morfologie en fenologie (Broekhuizen, 1960). Het feit dat het vaderschap van deze cultuurpopulieren niet resulteerde in de aanwezigheid van soortspecifieke microsatellietallelen voor *P. deltoides*, is te verklaren door de Mendeliaanse overerving waarbij elke nakomeling slechts één genvariant van een ouder ontvangt. Wanneer vier diagnostische microsatellieten worden onderzocht, is de kans om een genvariant van *P. deltoides* te detecteren in nakomelingen afkomstig van een *P. nigra* en een *P. x canadensis*, 93,75%. Deze kans vermindert tot 68,36% bij een tweede-generatie terugkruising (BC2; een kruising tussen een *P. nigra* en een BC1 - *P. x canadensis* waarvan 75% van het genetisch materiaal van de nakomelingen afkomstig is van *P. nigra*) (Bialozyt et al., 2012). Door bijkomend aan de analyse van diagnostische moleculaire merkers een vaderschapsanalyse uit te voeren, verhoogden we de kansen op detectie van zaailingen voortkomend uit een kruising met cultuurpopulier. Het succes van de vaderschapsanalyse is echter afhankelijk van de vaders die werden meegenomen in de analyse. Enkel voor de mannelijke cultuurpopulieren opgenomen in de referentiestalen kan een uitspraak worden gedaan omtrent mogelijk vaderschap.

////////////////////////////////////

als bronpopulatie voor soortzuivere zaden vervuld zoals gepland. De zaden die hieruit voortkomen, zijn voornamelijk afkomstig van een kruising tussen twee Europese zwarte populieren. De enkele zaailingen bemonsterd op de grindbanken die afkomstig waren van cultuurpopulieren, waren gelegen op een afstand > 1 km van de aangeplante Europese zwarte populier. Het toont aan dat cultuurpopulieren wel nog reproductief zijn in het studiegebied, en dit voornamelijk op grotere afstand van de Europese zwarte populieren. De aanleg van nog extra zaadbronnen van Europese zwarte populier verspreid over het traject van de Gemeenschappelijke Maas kan de impact van cultuurpopulier nog verder inperken en het herstel van rivierbos met inheemse soorten bevorderen. Een weloverwogen keuze van de genetische herkomst bij nieuwe aanplantingen is belangrijk om te voorzien in aangepast plantsoen met voldoende genetische variatie en beperkte kansen op genenuitwisseling met cultuurpopulier (bv. door beperkt overlap in bloeitijd met de kaarspopulier).

De meeste jonge populieren op de grindbanken hebben een leeftijd van vermoedelijk twee à drie jaar. Ze hebben het kiemstadium overleefd en bevinden zich in de eerste fase van ontwikkeling van rivierbos (Van Looy et al., 2004; Van Looy et al., 2005). De overlevingskansen van deze jonge populieren is afhankelijk van vele factoren, waaronder vooral de beschikbaarheid van water en zuurstof. Periodes van droogte of overstromingen kunnen fataal zijn en de verjonging vernietigen. Het is daarom belangrijk om de verjonging op langere termijn te monitoren. Geschikte kolonisatiegebieden kunnen op die manier opgespoord worden. Gegevens over gekoloniseerde sites kunnen meegenomen worden om modellen waarmee de ontwikkeling van zachthout oobos langs de Gemeenschappelijke Maas kan worden voorspeld, te verbeteren (Van Braeckel, 2007).



Foto 9 Zaailing van Europese zwarte populier op een grindbank.

6 CONCLUSIES

1. De aangeplante Europese zwarte populieren op de locaties Groeskens en Negenoord hebben hun rol als bronpopulatie voor soortzuivere zaden vervuld zoals gepland. De zaden die hieruit voortkomen, zijn voornamelijk afkomstig van een kruising tussen twee Europese zwarte populieren en dus soortzuiver. Ze kiemen massaal op de grindbanken.
2. De kaarspopulier is geen succesvolle bestuiver van de autochtone, vrouwelijke Europese zwarte populier omdat deze cultivar vroeger bloeit dan de meeste autochtone Europese zwarte populieren.
3. De jonge populieren die de grindbanken koloniseren zijn hoofdzakelijk zuivere Europese zwarte populieren. Op afstanden verder dan 1 km van de locaties Groeskens en Negenoord, bv. in de omgeving van Meers, kiemen wel exotische populieren op de grindbanken.
4. De aanleg van nieuwe bronpopulaties wordt sterk aanbevolen om de ontwikkeling van zachthoutoibos met inheemse soorten verder te bevorderen. De herkomst van het plantsoen is daarbij belangrijk; het plantsoen dient aangepast te zijn aan de omgeving (bodem en klimaat), soortzuiver te zijn en niet in bloeitijd te overlappen met de kaarspopulier. Ook de verhouding van de mannelijke / vrouwelijke bomen binnen het plantsoen is belangrijk om voldoende genetische variatie op de nakomelingen te verzekeren.
5. De kolonisatie van de jonge populieren op de grindbanken is een eerste stap maar nog geen garantie voor de ontwikkeling van zachthoutoibos. De overlevingskansen van de jonge boompjes in het gebied dient te worden gemonitord. Deze gegevens zijn nodig en nuttig voor het opstellen van modellen die de ontwikkeling van oibos in het gebied voorspellen.



7 REFERENTIES

- Arens P., Coops H., Jansen J., Vosman B. (1998). Molecular genetic analysis of black poplar (*Populus nigra* L.) along Dutch rivers. *Molecular Ecology* 7:11-18.
- Benetka V., Mottl J., Vacková K., Pospíšková M., Dubski M. (1999). Estimation of the introgression level in *Populus nigra* L. populations by means of isozyme gene markers. *Silvae Genetica* 48(5):218-223.
- Benetka V., Vacková K., Bartáková I., Pospíšková M., Rasl M. (2002). Introgression in black poplar (*Populus nigra* L. ssp. *P. nigra*) and its transmission. *Journal of Forest Science* 48(3):115-120.
- Bialozyt R., Rathmacher G., Niggemann M., Ziegenhagen B. (2012). Reconstructing explicit mating schemes in poplar hybrids - a case study in the *Populus nigra* L. - *Populus x canadensis* Moench complex. *Silvae Genetica* 61(4-5):157-167.
- Bradshaw H.D., Jr., Villar M., Watson B.D., Otto K.G., Stewart S., Stettler R.F. (1994). Molecular genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 89:167-178.
- Broekhuizen j.T.M. (1960). Herkomst en nomenclatuur van enige populierencultivars. *Nederlands Bosbouw Tijdschrift* 32(516):153-159.
- Chenault N., Arnaud-Haond S., Juteau M., Valade R., Almeida J.-L., Villar M., Bastien C., Dowkiw A. (2011). SSR-based analysis of clonality, spatial genetic structure and introgression from the Lombardy poplar into a natural population of *Populus nigra* L. along the Loire River. *Tree Genetics & Genomes* 7(6):1249-1262.
- Csencsics D., Holderegger R. (2016). Origin of natural regeneration of black poplar (*Populus nigra* L.) and co-occurrence with hybrid poplar offspring. *Flora* 222:20-26.
- Demesure B., Sodji N., Petit R.J. (1995). A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in Plants. *Molecular Ecology* 4(1):129-131.
- Fossati T., Grassi F., Sala F., Castiglione S. (2003). Molecular analysis of natural populations of *Populus nigra* L. intermingled with cultivated hybrids. *Molecular Ecology* 12:2033-2043.
- Gaudet M., Jorge V., Paolucci I., Beritognolo I., Mugnozza G.S., Sabatti M. (2008). Genetic linkage maps of *Populus nigra* L. including AFLPs, SSRs, SNPs, and sex trait. *Tree Genetics & Genomes* 4(1):25-36.
- Heinze B. (1998). PCR-Based chloroplast DNA assays for the identification of native *Populus nigra* and introduced poplar hybrids in Europe. *Forest Genetics* 5(1):31-38.
- Imbert E., Lefèvre F. (2003). Dispersal and gene flow of *Populus nigra* (Salicaceae) along a dynamic river system. *Journal of Ecology* 91:447-456.
- Lefèvre F., Bordacs S., Cottrell J., Gebhardt K., Smulders M.J.M., Vanden Broeck A., Vornam B., van Dam B.C. (2001). Recommendations for riparian ecosystem management based on the general frame defined in EUFORGEN and results from EUROPOP. Genetic diversity in river populations of European black poplar: implications for riparian eco-system management. Budapest: Csiszar Nyomda.
- Liesebach H., Schneck V., Ewald E. (2010). Clonal fingerprinting in the genus *Populus* L. by nuclear microsatellite loci regarding differences between sections, species and hybrids. *Tree Genetics & Genomes* 6(2):259-269.



- Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B., Pemberton J.M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7:639-655.
- Meyer M., Zacharias M., Morgenstern K., Krabel D., Liesebach H. (2018). Variable genotypes at the cpDNA marker locus trnDT in spontaneous rejuvenation of the species complex around the European black poplar (*Populus nigra* L.) and its relatives collected in Germany. *Landbauforschung* 68(1-2):93-102.
- Oecd. (2000). Consensus document on the biology of *Populus* L. (Poplars). Paris, France: Environment Directorate. Organisation for Economic Co-operation and Development. pp53 p.
- Pospiskova M., Salkova I. (2006). Population structure and parentage analysis of black poplar along the Morava River. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne de Recherche Forestiere* 36(5):1067-1076.
- Rahman M.H., Dayanandan S., Rajora O.P. (2000). Microsatellite DNA markers in *Populus tremuloides*. *Genome* 43:293-297.
- Rahman M.H., Rajora O.P. (2002). Microsatellite DNA fingerprinting, differentiation, and genetic relationships of clones, cultivars, and varieties of six poplar species from three sections of the genus *Populus*. *Genome* 45:1083-1094.
- Schroeder H., Fladung M. (2010). SSR and SNIP markers for the identification of clones, hybrids and species within the genus *Populus*. *Silvae Genetica* 59(6):257-263.
- Smulders M.J.M., Beringen R., Volosyanchuk R., Vanden Broeck A., van der Schoot J., Arens P., Vosman B. (2008a). Natural hybridisation between *Populus nigra* L. and *P. x canadensis* Moench. Hybrid offspring competes for niches along the Rhine river in the Netherlands. *Tree Genetics & Genomes* 4(4):663-675.
- Smulders M.J.M., Cottrell J.E., Lefèvre F., van der Schoot J., Arens P., Vosman B., Tabbener H.E., Grassi F., Fossati T., Castiglione S. et al. (2008b). Structure of the genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: consequences for conservation and restoration. *Forest Ecology and Management* 255(5/6):1388-1399.
- Smulders M.J.M., van der Schoot J., Arens P., Vosman B. (2001). Trinucleotide repeat microsatellite markers for Black poplar (*Populus nigra* L.). *Molecular Ecology Notes* 1:188-190.
- Stettler R.F. (1968). Irradiated mentor pollen: its use in remote hybridization of Black Cottonwood. *Nature* 219:746-747.
- Stettler R.F., Zsuffa L., Wu R. (1996). The role of hybridization in the genetic manipulation of *Populus*. In: Stettler H.D., Bradshaw J.H.E., Heilman P.E., Hinckley T.M. (editors). *Biology of Populus*. Ottawa, Canada.: NRC Research Press. National Research Council of Canada. p 87-112.
- Storme V., Vanden Broeck A., Ivens B., Halfmaerten D., Van Slycken J., Castiglione S., Grassi F., Fossati T., Cottrell J.E., Tabbener H.E. et al. (2004). Ex-situ conservation of Black poplar in Europe: genetic diversity in nine gene bank collections and their value for nature development. *Theoretical and Applied Genetics* 108(6):969-981.
- Van Braeckel A., Van Looy, K. (2007). River restoration along the Border Meuse : evaluation of scenarios for measures and management with an integrated model. *Water: Journal for Integrated Water Management* 30:87-94.
- van der Schoot J., Pospisková M., Vosman B. (2000). Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101:317-322.
- Van Landuyt, W, Vanhecke, L & Hoste, I 2006, Rode lijst van de vaatplanten van Vlaanderen en het Brussels Hoofdstedelijk Gewest. in W. Van Landuyt (ed.), Atlas van de flora van Vlaanderen en het Brussels Gewest.



- Van Looy K., Honnay O., Bossuyt B., Hermy M. (2004). The effects of river embankment and forest fragmentation on the plant species richness and composition of floodplain forests in the Meuse Valley, Belgium. *Belgian Journal of Botany* 136(2):97-108.
- Van Looy K., Severyns J., Jochems H., Smedt F. (2005). Predicting patterns of riparian forest restoration. *Archiv für Hydrobiologie* Vol. 155(No. 1-4 suppl.).
- Vanden Broeck A., Cox K., Michiels B., Verschelde P., Villar M. (2012). With a little help from my friends: hybrid fertility of exotic *Populus x canadensis* enhanced by related native *Populus nigra*. *Biological Invasions* 14(8):1683-1696.
- Vanden Broeck A., Cox K., Quataert P., Van Bockstaele E., Van Slycken J. (2003a). Flowering phenology of *Populus nigra* L., *P. nigra* cv. *Italica* and *P. x canadensis* Moench. and the potential for natural hybridisation in Belgium. *Silvae genetica* 52(5-6):280-283.
- Vanden Broeck A., Cox K., Villar M. (2011). Natural hybridization and potential seed set of sympatric *Populus nigra* and *Populus x canadensis* along the river IJzer in Flanders. ingediend.
- Vanden Broeck A., de Vries S.M.G. (2011). Spontaan herstel van zacht-hout ooibos: complicaties door verspreiding en vermenging van genen bij populier. *De Levende Natuur* 112(2):73-78.
- Vanden Broeck A., Jochems H., Storme V., Van Looy K. (2002). Mogelijkheden tot herstel van levensvatbare populaties Zwarte populier (*Populus nigra* L.) langsheen de Grensmaas. VLINA 00/10: eindrapport. Instituut voor Bosbouw en Wildbeheer, 62 pp.
- Vanden Broeck A., Quataert P., Roldan-Ruiz I., Van Bockstaele E., Van Slycken J. (2003b). Pollen competition in *Populus nigra* females revealed by microsatellite markers. *Forest genetics* 10(3):219-227.
- Vanden Broeck A., Storme V., Cottrell J.E., Boerjan W., Van Bockstaele E., Quataert P., Van Slycken J. (2004). Gene flow between cultivated poplars and native black poplar (*Populus nigra* L.): A case study along the river Meuse on the Dutch-Belgian border. *Forest Ecology and Management* 197(1-6):307-310.
- Villar M., Gaget M., Rougier M., Dumas C. (1993). Pollen-pistil interactions in *Populus*: b-galactosidase activity associated with pollen-tube growth in the crosses *P. nigra* x *P. nigra* and *P. nigra* x *P. alba*. *Sexual Plant Reproduction* 6:249-256.
- Wolf R.J.A.M., Stortelder A.H.F., de Waal R.W., K.W. v.D. (2001). Ooibossen. Stichting Uitgeverij van de Koninklike Nederlandse Natuurhistorische Vereniging N.b., (editor). Utrecht, 200 p.
- Ziegenhagen B., Gneuss S., Rathmacher G., Leyer I., Bialozyt R., Heinze B., Liepelt S. (2008). A fast and simple genetic survey reveals the spread of poplar hybrids at a natural Elbe river site. *Conservation Genetics* 9(2):373-379.
- Zsuffa L. (1974). The Genetics of *Populus nigra* L. *Academia scientiarum et artium slavorum meridionalium* (Zagreb). *Annales Forestales* 6/2:29-53.



8 BIJLAGE

Bijlage 1 Referentiestalen.

D: *Populus deltoides*; DN: *P. x canadensis*; N: *P. nigra*; T: *P. trichocarpa*; TD: *P. x generosa*; TM: *P. trichocarpa x P. maximowiczii*; M: mannelijk; V: vrouwelijk.; - : geslacht niet gekend.

	Referentiestaal	Oorsprong	Soort	Geslacht
1	Delrive	cultivar	D	V
2	Delvignac	cultivar	D	M
3	Delgas	cultivar	D	V
4	Dellinois	cultivar	D	M
5	Marilandica	cultivar	DN	V
6	Robusta	cultivar	DN	M
7	Blauwe van Exaerde	cultivar	DN	M
8	Serotina de Champagne	cultivar	DN	-
9	Degrosso	cultivar	DN	M
10	Gaver	cultivar	DN	M
11	Harff	cultivar	DN	V
12	Ogy	cultivar	DN	M
13	Dorskamp	cultivar	DN	M
14	Gibecq	cultivar	DN	M
15	I-45/51	cultivar	DN	M
16	Serotina	cultivar	DN	M
17	I-214	cultivar	DN	V
18	Allestein	cultivar	DN	V
19	Albelo	cultivar	DN	M
20	Brabantica	cultivar	DN	M
21	Koster	cultivar	DN	M
22	Loens	cultivar	DN	M
23	Ghoy	cultivar	DN	V
24	Muur	cultivar	DN	M
25	Leipzig	cultivar	DN	-
26	Isières	cultivar	DN	M
27	Flachslanden	cultivar	DN	V
28	Tardif de Champagne	cultivar	DN	M
29	Steckby	cultivar	DN	-
30	Guariento	cultivar	DN	V/M
31	Grandis	cultivar	DN	V
32	Neupotz	cultivar	DN	V
33	Primo	cultivar	DN	M
34	Baden	cultivar	DN	-
35	Hees	cultivar	DN	V

36	Ellert	cultivar	DN	M
37	Vesten	cultivar	DN	V
38	Heidemij	cultivar	DN	M
39	Blanc du Poitou	cultivar	DN	M
40	Forndorf	cultivar	DN	V
41	Dikke Eugene	cultivar	DN	-
42	Hochter Bampt	collectie INBO	N	V
43	Noordschote	collectie INBO	N	V
44	Muizen	collectie INBO	N	M
45	Tuytenberg	collectie INBO	N	V
46	3.18_moederboom	collectie INBO	N	V
47	Negenoord2_moederboom	collectie INBO	N	V
48	Italica	cultivar	N	M
49	Genotype C	collectie INBO	N	M
50	Genotype G	collectie INBO	N	M
51	Genotype H	collectie INBO	N	M
52	Genotype M	collectie INBO	N	V
53	Genotype N	collectie INBO	N	M
54	Genotype Q	collectie INBO	N	M
55	Genotype T	collectie INBO	N	V
56	Genotype V	collectie INBO	N	V
57	Genotype X	collectie INBO	N	-
58	Zegelsem	collectie INBO	N	-
59	Linter	collectie INBO	N	M
60	Fritzi Pauley	cultivar	T	V
61	Trichobel	cultivar	T	M
62	Columbia River	cultivar	T	M
63	Fritzi Pauley	cultivar	T	V
64	Grimminge	cultivar	TD	M
65	Donk	cultivar	TD	V
66	Rap	cultivar	TD	V/M
67	Beaupré	cultivar	TD	V
68	Helix	cultivar	TD	-
69	Raspalje	cultivar	TD	V
70	Hunneghem	cultivar	TD	M
71	Hazendans	cultivar	TD	V
72	Unal	cultivar	TD	M
73	Androscoggin	cultivar	TM	M
74	Skado	cultivar	TM	V
75	Bakan	cultivar	TM	V
76	McKee	cultivar	TD	-

