



Vlaanderen
is wetenschap








Traceerbaarheid van bosplantsoen met label 'Plant van Hier'

Een DNA-databank met genetische profielen van
autochtone inheemse boom- en struiksoorten als
basis voor herkomsttracering

Annelore De Ro, Hannes Wilms, Leen Verschaeve, An Van Breusegem, Sabrina Neyrinck, Kristine
Vander Mijnsbrugge, An Vanden Broeck

INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK

Auteurs:

[Annelore De Ro](#) , [Hannes Wilms](#) , [Leen Verschaeve](#) , [An Van Breusegem](#) , [Sabrina Neyrinck](#) , [Kristine Vander Mijnsbrugge](#) , [An Vanden Broeck](#) 

Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Reviewers:

Lieve Vriens, Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Vestiging:

INBO Geraardsbergen

Gaverstraat 4

9500 Geraardsbergen

vlaanderen.be/inbo

e-mail:

annelore.dero@inbo.be

Wijze van citeren:

De Ro A, Wilms H, Verschaeve L, Van Breusegem A, Neyrinck S, Vander Mijnsbrugge K, Vanden Broeck A (2024). Traceerbaarheid van bosplantsoenen met label 'Plant van Hier': Een DNA-databank met genetische profielen van autochtone inheemse boom- en struiksoorten als basis voor herkomsttracering. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2024 (48). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

DOI: doi.org/10.21436/inbor.112683206

D/2024/3241/344

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2024 (48)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Hilde Eggermont

Foto cover:

Annelore De Ro, Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:

Agentschap voor Natuur en Bos,

Herman Teirlinckgebouw, Havenlaan 88 bus 75, 1000 Brussel

AGENTSCHAP
NATUUR & BOS

en in samenwerking met

Agentschap Landbouw en Zeevisserij,

Marie-Elisabeth Belpairegebouw, Simon Bolivarlaan 17, 1000 Brussel en

AVBS FV, sierteelt- en groenfederatie,

Kortrijksesteenweg 1144J, 9051 Sint-Denijs-Westrem

AGENTSCHAP
LANDBOUW &
ZEEVISSERIJ



Dit werk valt onder een [Creative Commons Naamsvermelding-GelijkDelen 4.0 Internationaal-licentie](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

TRACEERBAARHEID VAN BOSPLANTSOEN MET LABEL 'PLANT VAN HIER'

**Een DNA-databank met genetische profielen van
autochtone inheemse boom- en struiksoorten als
basis voor herkomsttracering.**

Annelore De Ro, Hannes Wilms, Leen Verschaeve, An Van Breusegem, Sabrina
Neyrinck, Kristine Vander Mijnsbrugge, An Vanden Broeck

doi.org/10.21436/inbor.112683206

Dankwoord/Voorwoord

De auteurs danken Yorrick Aguas Guerreiro, Nico De Regge, Marc Schouppe en Wim De Clercq voor hulp bij het verzamelen van de stalen en Karen Cox voor de waardevolle bijdrage bij aanvang van het onderzoek. Verder ook dank aan Serge Goossens voor het opkweken van de zaailingen. We danken ook Lieve Vriens voor het kritisch nalezen van dit rapport. Tenslotte danken we het Agentschap Natuur en Bos om deze studie financieel te ondersteunen, en Gudrun Van Langenhove, Marleen Sevenants, Vincent Kint, Lucien Verschoren, Jan Vancayzeele, Martine Waterinckx, Ann Van Essche en Hanne Vermeiren voor constructieve feedback tijdens de stuurgroepvergaderingen.

Samenvatting

De EU-bosstrategie voor 2030 legt de focus op klimaatbestendig bosbeheer om het aanpassingsvermogen en herstellend vermogen van bossen te vergroten. Een essentieel onderdeel hiervan is de keuze van het juiste plantmateriaal bij bebossing. Dit wil zeggen de geschikte boomsoorten met de juiste herkomst. Autochtone bomen en struiken spelen een belangrijke rol in het multifunctioneel bosbeheer. Ze vormen een belangrijk onderdeel van de biodiversiteit in onze bossen. Het bosplantsoen met een autochtone Vlaamse herkomst wordt verkocht onder het kwaliteitslabel 'Plant van Hier', een certificeringsmerk van het Agentschap voor Natuur en Bos. Om de herkomst van het plantsoen te garanderen ontwikkelden we een DNA-databank van genetische profielen van mogelijke ouderbomen, waarbij we gebruik maken van soort-specifieke genetische merkers. Deze databank maakt het mogelijk om 'Plant van Hier'-bosplantsoen over de hele productieketen te traceren: van zaadoogst en opkweek tot aanplant door de eindgebruiker.

Slechts enkele Europese landen maken vandaag de dag gebruik van een methode gebaseerd op genetische profielen om de herkomst van het bosplantsoen te identificeren. Echter, zover we weten, is de methode die we hier uitwerken en die gebaseerd is op een uitgebreide DNA-databank, momenteel uniek binnen Europa. Deze DNA-databank bevat de genetische profielen van zo goed als alle mogelijke ouderbomen die aanwezig zijn binnen 25 Vlaamse autochtone zaadboomgaarden van zeven ecologisch belangrijke boom- en struiksoorten (haagbeuk, hazelaar, sporkehout, steeliep, trilpopulier, wilde lijsterbes en zomerlinde). De profielen werden aan de hand van microsatellietmerkers opgesteld (11 tot 24 merkers per soort). Voor haagbeuk en steeliep werden nieuwe moleculaire merkers ontwikkeld.

De databank dient in eerste instantie om de herkomst van het bosplantsoen verkocht door boomkwekerijen te garanderen aan de hand van ouderschapsanalyses. Het is echter ook belangrijk dat het verkocht bosplantsoen een brede genetische basis heeft. Een hoge genetische diversiteit vergroot namelijk de kans dat bomen goed aangepast zijn aan huidige en toekomstige klimaatomstandigheden. Door de zaadboomgaarden genetisch in kaart te brengen is het mogelijk om genetische diversiteit binnen de zaadboomgaarden te evalueren. We vonden voor alle soorten, behalve voor de in de natuur zeldzaam voorkomende steeliep, een hoge genetische diversiteit. Voor de soorten hazelaar, trilpopulier en zomerlinde gingen we ook de soortzuiverheid van de ouderbomen na door de genetische profielen te vergelijken met de genetische profielen van gekende cultivars of hybridesoorten.

De DNA-databank kan dus niet enkel gebruikt worden om de herkomst van het bosplantsoen te garanderen, maar is ook een hulp voor het beheren van de zaadboomgaarden en ex situ conservatie van genetische diversiteit.

Aanbevelingen voor beheer en/of beleid

In deze studie gingen we na of de **herkomst van bosplantsoen** traceerbaar is met behulp van **genetische merkers**. Voor zeven ecologische belangrijke boom- en struiksoorten stelden we een **DNA-databank** op, op basis van soort-specifieke microsatelliet merkers. De databank bevat de genetische profielen van zo goed als alle mogelijke ouderbomen die aanwezig zijn binnen de Vlaamse autochtone zaadboomgaarden van deze soorten. Zes van de geanalyseerde soorten zijn diploïd (hazelaar, sporkehout, steeliep, trilpopulier, wilde lijsterbes en zomerlinde), wat betekent dat ze tweemaal een complete chromosomenset bevatten. Haagbeuk is daarentegen een polyploïd (in dit geval een octoploïd), wat betekent dat deze soort meer dan tweemaal een complete chromosomenset heeft.

We voerden **ouderschapsanalyses** uit waarbij voor zaailingen mogelijke ouderbomen uit de zaadboomgaarden werden gezocht. Hierbij toonden we aan dat het **voor de diploïde soorten mogelijk is om met de opgestelde DNA-databank de herkomst van het bosplantsoen over de hele keten te traceren**. Dezelfde methode is ook toepasbaar voor polyploïden, maar met een grotere onzekerheid. Het traceren van bosplantsoen werkt dus minder goed voor polyploïde soorten dan voor diploïde.

Daarnaast biedt de DNA-databank nog **andere voordelen**. Zo is het mogelijk om de **genetische diversiteit** binnen de zaadboomgaarden te evalueren. Het is belangrijk dat de zaadboomgaarden, en het bosplantsoen afkomstig hiervan, een hoge genetische diversiteit bevatten. Dit zorgt er namelijk voor dat het plantsoen een hogere kans heeft om zich aan te passen aan een veranderend klimaat. De genetische diversiteit binnen de zaadboomgaarden werd voor alle soorten, behalve steeliep, hoog ingeschat. We raden aan om de boomkwekerijen op de hoogte te stellen van de lage genetische diversiteit binnen de steeliep-zaadboomgaarden. Om zoveel mogelijk genetische diversiteit te behouden binnen het bosplantsoen raden we aan om van zoveel mogelijk verschillende ouderbomen zaad te verzamelen.

Ook de **soortzuiverheid** van de zaadboomgaarden van hazelaar, trilpopulier en zomerlinde werd nagegaan. We vergeleken de genetische profielen van hazelaar met deze van gekende Europese cultivars. De genetische profielen van trilpopulier en zomerlinde werden vergeleken met deze van een paar gekende hybride-soorten en/of cultivars: *Populus x canescens* voor trilpopulier en *Tilia x europaea* cultivar 'Pallida' en cultivar 'Zwarte linde' voor zomerlinde. De **geanalyseerde zaadboomgaarden van de drie soorten zijn soortzuiver**. Hierrond zijn dus geen maatregelen nodig.

Naast de vele mogelijkheden en voordelen die een DNA-databank voor het traceren van bosplantsoen oplevert, zijn er ook enkele **aandachtspunten**. De herkomst van bosplantsoen kan alleen met hoge zekerheid worden getraceerd als de zaden waaruit het plantsoen is opgekweekt afkomstig zijn van één of meerdere ouderbomen die in de databank zijn opgenomen. De DNA-databank biedt slechts een **momentopname**. Het is daarom essentieel om de **DNA-databank actueel en volledig te houden** bij het aanvullen of wijzigen van bestaande zaadboomgaarden. Het up-to-date houden van de DNA-databank vraagt om een **langetermijnplanning en een constante investering**.

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

Verklarende woordenlijst

Allel: een variant van een gen dat zich bevindt op een specifieke locatie (of locus) op een chromosoom.

Allelisch fenotype: beschrijving van het genotype van een individu waarbij enkel de aanwezige allelen bekend zijn maar niet hoeveel keer deze voorkomen. Wanneer bijvoorbeeld allelen A en B aanwezig zijn op een locus in een tetraploïd chromosoom kan het genotype van het locus AABB, maar ook AAAB etc. zijn, het allelisch fenotype is dan AB.

DNA: desoxyribonucleïnezuur, belangrijkste drager van erfelijke informatie.

Dichogamie: wanneer de mannelijke en vrouwelijke bloemen van een individu niet tegelijkertijd bloeien.

Diploïd: een genoom of een cel is diploïd indien de celkern twee exemplaren van elk chromosoom bevat.

Eenslachtig: bij een eenslachtige bloem zijn ofwel enkel mannelijke voortplantingsorganen ofwel enkel vrouwelijke voortplantingsorganen aanwezig.

Eenhuizig: wanneer mannelijke en vrouwelijke bloemen samen op een individu voorkomen.

Gecorrigeerde allelische rijkdom (A_r): het aantal geobserveerde allelen per locus in een populatie gecorrigeerd voor de staalnamegrootte.

Genotype: verwijst naar de genetische samenstelling van een individu, wat de specifieke combinatie van allelen op bepaalde loci of genen vertegenwoordigt.

Genotypering: het bepalen van het genotype.

Genetisch profiel: een genetisch profiel is een unieke set van genetische kenmerken of DNA-sequenties die kenmerkend zijn voor een individu, organisme, of biologisch staal. Het wordt vaak gebruikt voor identificatie, forensische doeleinden, onderzoek naar genetische verwantschappen, en in de landbouw om de herkomst en authenticiteit van planten en dieren te bepalen.

Genetische merker: DNA-fragment (locus) waarop variatie wordt getypeerd binnen en tussen populaties.

Genetische variatie of genetische diversiteit: het totaal aan genetische verschillen tussen individuen binnen een populatie of soort.

Geobserveerde heterozygositeit (H_o): een maat voor genetische diversiteit in een populatie of bestand. H_o ligt per locus tussen 0 en 1. Het locus is dan minder of meer variabel binnen dat individu.

Hardy-Weinberg veronderstellingen: theorema van Hardy-Weinberg veronderstelt dat: de voortplanting in de populatie louter willekeurig gebeurt, er enkel seksuele voortplanting is, er geen natuurlijke selectie is, er geen genetische drift is, er geen genenuitwisseling is en de effectieve populatiegrootte oneindig is. In de populatiegenetica vormt dit het nul-model. Afwijkingen van de verwachte distributie van allelen op loci binnen individuen, binnen populaties en tussen populaties laten toe om inferenties te maken over voortplantingswijze, selectie, drift, genmigratie en populatiegrootte.

Heterozygoot: een organisme is heterozygoot voor een bepaalde eigenschap als het verschillende allelen heeft voor het betreffende gen.



Homozygoot: een organisme is homozygoot voor een bepaalde eigenschap als het identieke allelen heeft voor het betreffende gen.

Inteelt (F_{IS}): het kruisen van nauw verwante individuen binnen een populatie.

Locus (meervoud: loci): de vaste plaats van een gen of een allel op een chromosoom.

Microsatelliet: een stuk repetitief DNA waarin bepaalde DNA-motieven worden herhaald. Het motief kan bestaan uit twee tot tien nucleotiden. Het aantal herhalingen bepaalt over welk allel (variant van een gen) het gaat.

Multiplex: multiplex-polymerasekettingreactie (multiplex PCR) verwijst naar het gebruik van een polymerasekettingreactie om verschillende DNA-sequenties tegelijkertijd te amplificeren in een enkel reactiemengsel. Daarvoor worden meerdere primerparen aan het mengsel toegevoegd.

Mutatie: verandering in het erfelijke materiaal van een organisme.

Polymerasekettingreactie: laboratoriumtechniek waarmee (delen van) DNA-sequenties in zeer grote hoeveelheden vermenigvuldigd (geamplificeerd) kunnen worden waarna verdere analyse mogelijk is.

Polyploid: een genoom of een cel is polyploid indien de celkern meer dan twee chromosomen bevat.

Populatie: een groep organismen van dezelfde soort die (in min of meerdere mate) in tijd of ruimte gescheiden zijn van andere groepen van die soort.

Protandrie: een vorm van dichogamie waarbij de mannelijke bloemen vroeger bloeien dan de vrouwelijke bloemen.

Tweehuizig: wanneer de mannelijke en vrouwelijke bloemen niet samen voorkomen op eenzelfde individu.

Tweeslachtig: de bloem heeft zowel meeldraden en één of meer stampers.

Vegetatieve voortplanting/vermeerdering: ongeslachtelijke voortplanting/vermeerdering, bij planten bijv. via het afscheuren van een deel van de plant en (wortel)uitlopers.

Verwachte heterozygositeit (H_e): het aandeel verwachte heterozygote genotypes onder Hardy-Weinberg evenwicht. De verwachte heterozygositeit is minder gevoelig voor de steeknamegrootte in vergelijking met de geobserveerde heterozygositeit.

English abstract

The EU Forest Strategy for 2030 focuses on climate resilient and resistant forest management to increase the adaptability and resilience of forests. An essential part of this is the selection of the right planting material for reforestation. This means selecting the appropriate tree species with the right provenance. Indigenous trees and shrubs play an important role in multifunctional forest management. They form a significant part of the biodiversity in our forests. Forest reproductive material (FRM) of autochthonous Flemish origin is sold under the quality label 'Plant van Hier', a certification mark of the Agency for Nature and Forests. To ensure the provenance of the seedlings, we developed a DNA-database of genetic profiles of potential parent trees, using species-specific genetic markers. This database enables the traceability of FRM of the 'Plant van Hier' label throughout the entire production chain; from seed harvesting and cultivation to planting by the end user.

Across Europe, only a few countries currently use a method based on genetic profiles to identify the provenance of FRM. However, as far as we know, the method that we developed, which is based on an extensive DNA-database, is currently unique within Europe. This database contains the genetic profiles of almost all possible parent trees present within 25 Flemish autochthonous seed orchards of seven ecologically important tree and shrub species (*Carpinus betulus*, *Corylus avellana*, *Frangula alnus*, *Populus tremula*, *Sorbus aucuparia*, *Tilia platyphyllos* and *Ulmus laevis*). The profiles were established using microsatellite markers (11 to 24 markers per species). New genetic markers were developed for *Carpinus betulus* and *Ulmus laevis*.

The primary aim of the database is to ensure the provenance of FRM sold by tree nurseries through parentage analysis. However, it is also important that sold FRM has a broad genetic database. High genetic diversity increases the likelihood that trees are well adapted to current and future climate conditions. By genetically screening the whole seed orchards, it is possible to evaluate the genetic diversity within them. A high genetic diversity was found for all species, except for *Ulmus laevis*, which has a small distribution range within Flanders and Europe. For *Corylus avellana*, *Populus tremula* and *Tilia platyphyllos*, the species purity of the parent trees was also investigated by comparing their genetic profiles with those of known cultivars or hybrid species.

Thus, the DNA-database can not only be used to guarantee the origin of sold Forest Reproductive Material, but it also serves as an aid for managing seed orchards and ex situ conservation of genetic diversity.

Inhoudstafel

Dankwoord/Voorwoord	2
Samenvatting	3
Aanbevelingen voor beheer en/of beleid	4
Verklarende woordenlijst	5
English abstract	7
1 Inleiding	10
1.1 Herkomstgarantie 'Plant van Hier'	10
1.2 Traceerbaarheid van bosplantsoen in andere landen	10
1.3 Bijkomende toepassingen van de DNA-databank	11
1.4 Stappen in de opmaak van de DNA-databank	12
1.5 Voorwaarden bij de traceerbaarheid	12
1.6 Selectie van soorten en zaadbronnen	13
1.7 Selectie van meest geschikte moleculaire merkers	15
2 Traceren van bosplantsoen	16
2.1 DNA-databank	16
2.2 Staalname	16
2.3 Genotypering	17
2.4 Analyses	18
3 Trilpopulier	20
3.1 Soortenbeschrijving	20
3.2 Methode	22
3.3 Resultaten en discussie	26
3.4 Conclusie	30
4 Hazelaar	31
4.1 Soortenbeschrijving	31
4.2 Methode	33
4.3 Resultaten en discussie	40
4.4 Conclusie	47
5 Haagbeuk	48
5.1 Soortenbeschrijving	48
5.2 Methode	50
5.3 Resultaten en discussie	55
5.4 Conclusie	60
6 Steeliep	61



6.1	Soortenbeschrijving	61
6.2	Methode	63
6.3	Resultaten en discussie.....	69
6.4	Conclusie.....	77
7	Zomerlinde	78
7.1	Soortenbeschrijving	78
7.2	Methode	80
7.3	Resultaten en discussie.....	85
7.4	Conclusie.....	91
8	Sporkehout.....	92
8.1	Soortenbeschrijving	92
8.2	Methode	94
8.3	Resultaten en discussie.....	102
8.4	Conclusie.....	112
9	Wilde lijsterbes.....	113
9.1	Soortenbeschrijving	113
9.2	Methode	115
9.3	Resultaten en discussie.....	122
9.4	Conclusie.....	129
10	Algemene conclusie	130
	Bijlagen.....	136
	Bijlage 1: Aanwezige genotypes.....	136
	Bijlage 2: De bemonsterde zaadboomgaarden van hazelaar die nog niet geanalyseerd werden	166
	Bijlage 3: Microsatelliet merker ontwikkeling AllGenetics & Biology SL.....	168



1 INLEIDING

1.1 HERKOMSTGARANTIE ‘PLANT VAN HIER’

De **EU-bosstrategie voor 2030** legt de focus op klimaatbestendig bosbeheer om het aanpassingsvermogen en herstellend vermogen van bossen te vergroten. Een essentieel onderdeel hiervan is de keuze van het juiste plantmateriaal bij bebossing. Dit wil zeggen de geschikte boomsoorten met de juiste herkomst. Een brede genetische basis vergroot de kans dat bomen goed aangepast zijn aan huidige en toekomstige klimaatomstandigheden.

In Europa wordt 58 procent van de **inheemse boomsoorten met uitsterven bedreigd** (BGCI 2021). Ze zijn bedreigd door genetische erosie: de lokale, autochtone populaties zijn heel sterk in aantal en omvang gedaald waardoor de vitaliteit van de populaties en het voortbestaan in het gedrang komt. Vitale populaties zijn echter cruciaal in het kader van de verwachte klimaatverandering. Acties rond instandhouding (*in situ* en *ex situ*) en uitbreiding van de genetische diversiteit van deze soorten zijn urgent. Een belangrijke actie is het **verzamelen, karakteriseren en behouden van autochtone populaties van inheemse boom- en struiksoorten**.

Het plantsoen dat sinds november 2019 onder het **kwaliteitslabel** van het Agentschap Natuur en Bos (ANB) ‘**Plant van Hier**’ verkocht wordt, speelt een belangrijke rol bij de **instandhouding van de genetische diversiteit van inheemse boom- en struiksoorten**. Bovendien draagt bosplantsoen van autochtone herkomst bij tot de ontwikkeling van **diverse en klimaatrobuuste bossen en houtkanten**. Om de autochtone herkomst van het bosbouwkundig teeltmateriaal van dit label te garanderen, hebben we een **DNA-databank van genetische profielen** samengesteld. Zaadbronnen van een aantal voor de bosbouw belangrijke boom- en struiksoorten zijn volledig genetisch in kaart gebracht. Dit laat toe de **herkomst** van in de handel aangeboden bosplantsoen afkomstig van de gekarakteriseerde zaadbronnen te **verifiëren**.

Deze studie brengt de genetische diversiteit binnen de zaadbronnen in kaart en levert kennis voor een optimaal beheer van de zaadbronnen. Deze kennisopbouw is noodzakelijk voor een optimalisatie van de plantsoenketen, een succesvolle realisatie van de Vlaamse bosuitbreidingsplannen en de ontwikkeling van klimaatrobuuste bossen en houtkanten.

1.2 TRACEERBAARHEID VAN BOSPLANTSOEN IN ANDERE LANDEN

In enkele Europese landen werden er reeds systemen om de herkomst van plantsoen te traceren opgebouwd op basis van genetische profielen. Deze verschillen in aanpak van elkaar.

In **Duitsland** zijn er twee identieke traceringsystemen van het bosbouwkundig teeltmateriaal gebaseerd op genetische merkers, namelijk ‘the Certification Scheme for Tracing the Origin of Forest Reproductive Material’ in het zuiden van Duitsland en ‘FfV Certification’, ondersteund door ISOGEN en ‘the Association of Forest Seeds’ (ISOGEN; <http://www.isogen.de/>) (Konnert & Behm 2006; Konnert et al. 2015; Konnert & Hosius 2008; Konnert & Hussendörfer 2002). Beide traceringsystemen zijn private initiatieven, de genetische analyses worden uitgevoerd door commerciële laboratoria. Bij deze methodes worden er vier verschillende soorten



referentiestalen genomen: (1) zaad van de boom waarvan zaden worden geoogst, (2) plantmateriaal van de boom waarvan zaden worden geoogst, (3) zaden die per stap in het productieproces van het plantsoen apart worden gehouden, en (4) een kleine selectie van zaden en zaailingen die verkocht worden. Via genetische merkers worden deze laatste referentiestalen genetisch vergeleken met de andere referentiestalen om te bepalen of hun oorsprong accuraat is. Om zo efficiënt mogelijk te werken en de kosten te drukken wordt slechts een deel van de stalen geselecteerd voor de genetische controle.

In **Oostenrijk** en **Slovenië** wordt van elke boom waarvan er zaden geoogst werd een staal genomen en opgestuurd naar het respectievelijk instituut voor bosbouwonderzoek door een persoon die ter plekke controle uitvoert (Gömöry et al. 2021). Het staal kan bestaan uit een aantal zaden of knoppen van de boom. Het DNA van deze stalen wordt dan geanalyseerd en de gegevens worden bewaard in een DNA-databank waarmee het DNA van de nakomelingen van de moederbomen wordt vergeleken.

In **Hongarije** is er specifiek voor zwarte populier (*Populus nigra* L.) een traceringsstelsel opgericht (Bordács & Bach 2014). Zij richtten een genetische databank op met alle geselecteerde klonen die opgenomen zijn in de 'National List of Basic Materials' (NLBM). Enkel zaailingen die genetisch getest werden op de zuiverheid van hun taxonomische status kunnen een certificaat krijgen om verkocht te worden.

Voor het genetisch traceringsstelsel in **Vlaanderen** zal van elke mogelijke ouderboom in een autochtone zaadboomgaard van een soort een bladstaal genomen worden voor het bepalen van een genetisch profiel. Deze genetische profielen zijn verzameld in een DNA-databank. In de toekomst kunnen de genetische profielen van het plantsoen dan vergeleken worden met deze aanwezig in de DNA-databank. Het traceren van bosplantsoen gebeurt via een **ouderschapsanalyse** en eventueel ook via **bijkomende toewijzingstesten** waarbij men een onbekend staal tracht toe te wijzen aan een erkende zaadbron die in de databank aanwezig is.

1.3 BIJKOMENDE TOEPASSINGEN VAN DE DNA-DATABANK

De DNA-databank vormt in de eerste plaats de **basis voor een traceringsstelsel voor herkomstgarantie**. Daarnaast biedt een databank met genetische profielen van alle ouderbomen uit erkende zaadbestanden ook andere toepassingen:

1. **Evaluatie van de genetische diversiteit** binnen zaadboomgaarden en belangrijke zaadbronnen en hun nakomelingschap (d.i. het erkend uitgangsmateriaal). Dit is belangrijk voor behoud en efficiënt gebruik van biodiversiteit en voor duurzaam bosbeheer, zeker bij een snel veranderend klimaat. In het licht van de klimaatwijziging streven we naar bosplantsoen dat niet enkel goed aangepast is aan onze groeiomstandigheden, maar ook een zo hoog mogelijke genetische diversiteit bevat.
2. **Een inventaris** en plan van de standplaats van de aanwezige genotypes binnen een zaadboomgaard **vergemakkelijkt de aanleg van nieuwe zaadboomgaarden**.
3. Studie van de **genetische diversiteit binnen autochtone populaties** en natuurlijke processen van uitwisseling van genen tussen populaties (soort-specifiek populatiegenetisch en ecologisch onderzoek).
4. Onderscheiden **van soort-zuivere individuen met verwante (hybride) cultivars** (bv. bij hazelaar, trilpopulier, linde). Dit is nodig om het autochtoon karakter van oogstlocaties te kunnen inschatten.
5. **Ontwikkeling van nieuwe moleculaire merkers en labo-protocollen** voor een aantal soorten die ook voor latere wetenschappelijke studies van nut zullen zijn.



6. Het DNA kan voor lange tijd worden bewaard en kan later ook gebruikt worden in andere **onderzoeksprojecten**, bijvoorbeeld rond functionele genetische diversiteit en aanpassingspotentieel aan klimaatveranderingen.
7. Dit project is een eerste stap in de **traceerbaarheid van bosbouwplantsoen van oogst tot planting**. Eveneens een belangrijk aandachtspunt bij het inschatten van de invloed van klimaatverandering op aangeplante bossen.

1.4 STAPPEN IN DE OPMAAK VAN DE DNA-DATABANK

De opmaak van een databank met genetische profielen van een aantal voor Vlaanderen belangrijke boom- en struiksoorten, omvat de volgende stappen:

1. het **ontwikkelen en/of optimaliseren van soort-specifieke laboprotocolen** voor genotypische identificatie via moleculaire merkers
2. **het verzamelen van bladstalen** van elke plant in de zaadbron
3. **uitvoeren van labo-analyses en data-analyse**: het genetisch screenen van alle ouderbomen binnen een zaadbron (labo-analyses: DNA-extracties en DNA-fragment analyse (PCRs)), bepalen van genotypes aanwezig in de zaadbron, berekenen van genetische diversiteitsparameters, enz.
4. de **opmaak van een globale databank**: samenbrengen van alle data en profielen in een databank, actualisatie van de grondplannen van de zaadbronnen, aanvullen van metadata
5. de **rapportage**: documenteren van alle uitgevoerde stappen en het tot stand komen van de DNA-databank.

1.5 VOORWAARDEN BIJ DE TRACEERBAARHEID

Om de herkomst van bosplantsoen met label 'Plant van Hier' met hoge zekerheid te kunnen traceren, dient een **genetisch profiel opgesteld te worden van elke potentiële ouderboom** van de erkende oogstlocatie. Dit wil zeggen dat elke boom die kan bijdragen tot de zaadproductie in de DNA-databank dient opgenomen te zijn. Dit is een grote uitdaging voor grote zaadbronnen, voornamelijk *in situ* zaadbronnen. Elke boom in het veld dient bemonsterd te worden voor genetische analyse. Maar ook bij *ex situ* zaadboomgaarden moet hiermee rekening worden gehouden. De zaadboomgaarden zijn dynamische systemen die voldoende beheerd moeten worden om natuurlijke opslag en de spontane ontwikkeling van zaailingen binnen de zaadboomgaard tegen te gaan. Wanneer de zaadboomgaarden aangevuld worden met nieuwe ouderbomen moeten deze ook opgenomen worden in de DNA-databank.

Als de meeste, maar niet alle, mogelijke ouderbomen bemonsterd zijn, blijft de traceerbaarheid van een partij plantsoen mogelijk maar met een lagere waarschijnlijkheid. Naarmate het aandeel niet bemonsterde ouderbomen toeneemt wordt de onzekerheid van de ouderschapsanalyse groter.

Bovendien dient het genetisch profiel voldoende informatie te bevatten: de moleculaire merkers dienen voldoende divers te zijn en in een voldoende aantal aanwezig om genetisch verschillende bomen te kunnen identificeren. Er worden daarom per soort specifieke laboprotocolen ontwikkeld.

Ondanks de snelle ontwikkeling van nieuwe technieken en toestellen voor genetische screening, **is de kostprijs voor de opmaak van genetische profielen** nog steeds een beperkende factor bij de opmaak van uitgebreide databanken. Voor elke profiel, worden drie tot vijf PCR-testen uitgevoerd. De Covid-pandemie (van eind 2019 – voorjaar 2022) en de sterk toenemende vraag naar reagentia, heeft de kost voor PCR-testen nog doen toenemen.

Gezien de praktische en budgettaire beperkingen, werd er voor deze studie een **prioritering** opgesteld in verband met de op te nemen soorten en zaadbronnen in de databank.

1.6 SELECTIE VAN SOORTEN EN ZAADBRONNEN

Voor de opzet van de DNA-databank selecteerden we in samenspraak met Agentschap Natuur en Bos (ANB), Agentschap Landbouw en Zeevisserij, en de boomkwekerijsector (AVBS) zeven inheemse boom- en struiksoorten waarvoor een hoge vraag naar autochtoon plantsoen is (Tabel 1). Elke zaadboomgaard met de categorie ‘Van bekende origine’ en met als oorsprong ‘Vermoedelijk autochtoon’ op de Lijst van Aanbevolen Herkomsten (LAH) werd geselecteerd.

Voor hazelaar, wilde lijsterbes en sporkehout werd hierop een uitzondering gemaakt.

- Voor hazelaar werden de zaadboomgaarden geselecteerd waar de laatste jaren actief geogst werd. Voor de selectie maakten we gebruik van de oogstgegevens van de periode 2016 -2020 (Tabel 2). De zaadboomgaarden met de hoogste oogstopbrengst werden mee genomen in de analyses (Tabel 1).
- Voor wilde lijsterbes en sporkehout werden van enkele zaadboomgaarden nagenoeg identieke duplicaten aangelegd. Over de jaren heen werden enkele nieuwe planten toegevoegd aan deze zaadboomgaarden. Bij aanvang van deze studie werd geopteerd om telkens één van beide zaadboomgaarden, deze met de meeste veldcodes, volledig te bemonsteren (Tabel 3). Bij de gelijkaardige zaadboomgaard werden enkel de toegevoegde individuen met veldcodes die niet in de andere zaadboomgaarden voorkomen geanalyseerd.

Zie onder voor een overzicht van de zaadboomgaarden die opgenomen werden in de DNA-databank.

Tabel 1 Overzicht van de soorten en zaadboomgaarden die opgenomen werden in de DNA-databank. Zaadboomgaarden met een asterisk (*) werden niet volledig ingezameld voor analyse.

Soort	Zaadboomgaard	Registrnummer
Trilpopulier - <i>Populus tremula</i> L.	Vloethemveld	1VB4291.1
Hazelaar - <i>Corylus avellana</i>	Oude Kwekerij	1VB4450.3
	Meikensbossen	1VB4450.8
	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
	Veldeker	1VB4450.1
Haagbeuk - <i>Carpinus betulus</i>	Meikensbossen	1VB4180.1
	Eeuwenhout	1VB4180.2
Steeliep - <i>Ulmus laevis</i>	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
	Vloethemveld	1VB4630.1



1.7 SELECTIE VAN MEEST GESCHIKTE MOLECULAIRE MERKERS

Voor de opmaak van de DNA-databank werd bewust gekozen voor microsatelliet merkers (Simple Sequence Repeats, SSR) als moleculaire merkers. Voor de volgende redenen werd er niet voor SNP's (Single Nucleotide Polymorphism) gekozen als moleculaire merkers.

Bij het gebruik van microsatellieten worden steeds dezelfde stukjes in het genoom gerepliceerd. Dit zorgt ervoor dat de genetische profielen van de DNA-databank reproduceerbaar zijn. Wanneer er gebruik wordt gemaakt van SNP's kunnen de genetische profielen enkel gereproduceerd worden aan de hand van een SNP-panel. Op het moment van de start van de opmaak van de databank (2020) waren de kosten voor het ontwikkelen van microsatelliet merkers veel lager dan deze voor het ontwikkelen van SNP-panels. Om de kosten van de opmaak van de databank en de kosten van toekomstige analyses voor het traceringsysteem in te perken werd voor de kost-gunstigere optie gekozen.

De binnen dit project gegenereerde DNA-stalen zullen worden opgenomen in het DNA-archief van het INBO en langdurig worden bewaard. Hierdoor kunnen in de toekomst nieuwe of andere technieken op dezelfde stalen worden toegepast. De DNA-stalen kunnen ook voor andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt. De DNA-stalen zijn op aanvraag beschikbaar.



2 TRACEREN VAN BOSPLANTSOEN

2.1 DNA-DATABANK

De DNA-databank is beschikbaar als een 'comma separated value' (csv)-bestand. Per soort en per geanalyseerde zaadboomgaard worden de genetische profielen (i.e. genotypes) van de mogelijke ouderbomen opgelijst.

De databank is een momentopname en bevat de genetische profielen van de mogelijke ouderbomen in een zaadboomgaard op het moment van bemonstering. Alle stalen zijn verzameld in de periode 2021 – 2024.

Naast de genetische profielen bevat de databank ook volgende metadata: de veldcode, de soortnaam, de naam van de zaadboomgaard en het nummer uit het register van bosbouwkundig uitgangsmateriaal (inbo.be), de oorspronkelijke origine van het genotype en het jaar waarin het genotype ingezameld werd.

Het succesvol traceren van bosplantsoen aan de hand van genetische profielen is afhankelijk van de accurateheid van de DNA-databank. Daarom worden bij voorkeur de profielen van **alle mogelijke ouderbomen** van een zaadoogstlocatie in de DNA-databank opgenomen. Het is daarom aan te raden om de DNA-databank actueel en volledig bij te houden bij het aanvullen of wijzigen van bestaande zaadboomgaarden.

Over de herkomst van te traceren bosplantsoen kan enkel een uitspraak worden gedaan indien de zaden waarvan het plantsoen is opgekweekt, geoogst werden in een zaadboomgaard die in de DNA-databank zit.

De DNA-databank is beschikbaar op **Zenodo (DOI: 10.5281/zenodo.12700122)** onder de CC BY 4.0 – licentie (De Ro et al. 2024).

2.2 STAALNAME

Voor de staalname van het te traceren plantsoen raden we aan om per plant een volgroeid jong, droog en onbeschadigd blad te nemen. In jonge bladeren is de DNA-concentratie hoger dan in oude bladeren, wat resulteert in hogere DNA-concentraties bij de extracties. Dit zorgt ervoor dat de allelen van het genetisch profiel gemakkelijker te scoren zijn. We raden ook aan om van minstens 30 en bij voorkeur 50 individuen, willekeurig verspreid over het staalnameveld, een staal te nemen. Bij menging van oogstlocaties binnen eenzelfde herkomstgebied worden de ouderschapsanalyses minder eenvoudig. In dit geval raden we aan om het aantal bosplantsoen stalen te verhogen en hierbij het percentage van de menging in rekening te brengen.

We raden aan om de blaadjes na staalname meteen in een plastic gripzakje met silicakorrels te bewaren. Op deze manier drogen de blaadjes snel uit waardoor het DNA goed bewaard wordt. Om DNA-contaminatie te vermijden wordt elk blaadje afzonderlijk in een apart papieren zakje met staalnummer bewaard, zie figuur 1. De bladstalen in silicakorrels kunnen enkele maanden in een afgesloten plastic zak op kamertemperatuur worden bewaard.

//



Figuur 1 Voorbeeld van het geschikte staalnamemateriaal. De blaadjes zitten apart in een gelabeld papieren zakje (rechtsboven). Deze kunnen dan bewaard worden in een plastic gripzak met silicagelkorrels (linksboven).

2.3 GENOTYPERING

Voor de genotypering van de stalen moeten dezelfde genetische merkers gebruikt worden als deze die gebruikt zijn in de DNA-databank. Dit is nodig om bij het traceren van plantsoen nieuwe genetische profielen te kunnen vergelijken met deze van mogelijke ouderbomen in de DNA-databank. Microsatellieten variëren van soort tot soort. Verder in het rapport wordt per soort meer informatie gegeven rond de gebruikte microsatellietmerkers (onder andere namen en primersequenties) en de laboratoriumprotocollen.

De microsatellietanalyse kan variëren afhankelijk van de gebruikte apparatuur in het labo. Er kan een klein verschil in absolute grootte van DNA-fragmenten optreden, afhankelijk van het gebruikte DNA-sequentietoestel. Dit hoeft geen probleem te zijn maar vereist wel de analyse van een aantal referentiestalen met gekend genetisch profiel. Het INBO beschikt over een aantal referentiestalen per soort (DNA-samples) die te bekomen zijn op aanvraag. Door de referentiestalen samen met de stalen van het plantsoen te analyseren, kunnen de allelen correct benoemd worden en kunnen nieuwe genetische profielen vergeleken worden met deze in de opgestelde DNA-databank.

In deze studie, uitgevoerd in het onderzoekslaboratorium voor genetische diversiteit van het INBO, werden de genetische profielen opgesteld via DNA-fragmentanalyse met de capillaire sequencer ABI 3500 Genetic Analyzer van Thermo Fisher Scientific (Figuur 2). De labo-protocollen zijn ontwikkeld voor analyse op een vergelijkbaar DNA-sequentietoestel (gebruikte dyes voor multiplex PCRs: 6FAM™, VIC™, NED™, PET™ dyes en de 600 LIZ™ als standaard). Het gebruik van een ander DNA-sequentietoestel vereist kleine aanpassingen aan de labo-protocollen.



Figuur 2 Het DNA-sequentietoestel gebruikt voor deze studie is een ABI 3500 Genetic Analyzer van Thermo Fisher Scientific.

Voor het analyseren van de genetische profielen gebruikten we het programma Geneious Prime 2019.3.2 (<https://www.geneious.com>). De allelen van de stalen moeten correct benoemd worden zodat deze kunnen worden vergeleken met de genetische profielen in de databank. De 'bin sets' en correcte benaming van de allelen per locus zijn ook beschikbaar op Zenodo.

2.4 ANALYSES

In dit onderzoek worden ouderschapsanalyses gebruikt om bosplantsoen te traceren en de bruikbaarheid van de DNA-databank te testen. Hierbij werden stalen verzameld van (1) zaailingen die opgekweekt werden uit zaden afkomstig uit de zaadboomgaarden (positieve controlestalen) en/of (2) planten die niet aanwezig zijn in de zaadboomgaarden (negatieve controlestalen). De analyses die hierbij gebruikt werden zijn ook geschikt om na te gaan of bosplantsoen al dan niet afkomstig is van een zaadboomgaard in de databank.

De volgende multivariaat-analysemethodes werden gebruikt om de herkomst van de te traceren plantenstalen te identificeren:

- Verkennende principale-componentenanalyse (PCA) en/of discriminantanalyse (DAPC). De biplot van deze analyse geeft al een eerste indicatie van genetische gelijkenis tussen het te traceren plantsoen en de ouderbomen in de DNA-databank.
- Ouderschapsanalyses via de methode van de grootste aannemelijkheid of maximum-likelihood-methode. We gebruikten het programma Colony V2.0.6.6 (Jones & Wang 2010) voor de diploïde soorten. Voor haagbeuk, een octoploïde soort, werd het programma Polygene (Huang et al. 2020) gebruikt.

Technische fouten, bijvoorbeeld bij een mutatie op de primer bindingsplaats waardoor allelen niet amplificeren in de PCR-reactie (i.e. nul-allel), kunnen ervoor zorgen een individu foutief niet aan een ouderboom wordt toegewezen, hoewel het individu wel uit de zaadboomgaard afkomstig is. Er dient dus met een foutenmarge rekening gehouden te worden bij de data-analyse en de interpretatie. Van zodra er ouderbomen van de juiste locatie gelinkt kunnen

worden aan één of meerdere planten van het te testen lot, is het heel waarschijnlijk dat op zijn minst een deel van het lot van die locatie afkomstig is.

Verder worden ook genetische diversiteitsparameters berekend en wordt, indien relevant, de soortzuiverheid binnen de zaadboomgaard onderzocht. De genetische diversiteit binnen zaadboomgaarden wordt vergeleken met de genetische diversiteit in natuurlijke populaties, voor zover deze informatie beschikbaar is in de vakliteratuur. Dit geeft een indicatie over de genetische diversiteit binnen de zaadboomgaard en tussen zaadboomgaarden van eenzelfde soort.

Deze analyses worden verder in het rapport per soort uitvoerig besproken.



3 TRILPOPULIER

3.1 SOORTENBESCHRIJVING

3.1.1 Ecologie

De trilpopulier (*Populus tremula*), ook wel de ratelpopulier of de esp genoemd, komt wijdverspreid voor in Europa (Figuur 3). De soort is inheems en algemeen voorkomend in Vlaanderen, en is vooral terug te vinden op zandgronden. Hierdoor is de trilpopulier zeer algemeen in de Kempen en vrij algemeen in de duinen en in delen van de Vlaamse Zandstreek. Ook op de wat zanderige delen van de Leemstreek en het Vlaamse Zandleemgebied is de soort terug te vinden (Figuur 4, Van Landuyt et al. 2006). De trilpopulier is een pioniersoort die gemakkelijk verstoorte sites, zoals kapvlakten en recent ontstaan open plekken door windval, koloniseert. Verder wordt de soort gekarakteriseerd door een snelle juveniele groei, een hoge nood aan lichtinval en een relatief korte levensduur (Børset 1960). Hoewel de soort het best op fertile, goed doorlatende minerale bodem groeit, is de trilpopulier op verschillende bodemsoorten terug te vinden. De soort is winterhard en kan goed tegen droogte (Worrell 1995).

Trilpopulieren zijn tweehuizig, wat betekent dat er zowel mannelijke als vrouwelijke bomen zijn. De bloemen bloeien in de lente voor het ontluiken van de bladeren (maart - april). De bevruchting gebeurt door windbestuiving (Latva-Karjanmaa et al. 2003). Alleenstaande bomen kunnen vanaf hun 10^{de} tot 15^{de} levensjaar zaden beginnen produceren. Trilpopulieren in groep starten echter veel later met het dragen van zaden, waarbij het 20 tot 30 jaar kan duren voor een individu zaad produceert (Børset 1985).

3.1.2 Waarde

De economische waarde van de trilpopulier werd laag ingeschat. Behalve in de duinen, waar zijn breed wortelgestel erosie tegen gaat, werd de soort in het verleden niet veel aangeplant. De trilpopulier heeft echter een grote ecologische waarde. Omdat de bladeren tijdens hun groei veel basische mineralen opnemen, zoals calcium en kalium, zijn de bladeren relatief basenrijk en snel afbreekbaar. De trilpopulier is een zogenaamde rijkstrooiselsoort die de mineralen uit diepere bodemlagen weer beschikbaar maakt voor het bodemecosysteem in de hogere bodemlagen en zo verzuring tegengaat (Kremers et al. 2021). De trilpopulier wordt ook vaak als een sleutelsoort beschouwd. Zo is hij de waardplant voor de in Vlaanderen bedreigde grote weerschijnvlinder (Maes et al. 2021), en is de zachte bast perfect voor vogels die in nestholtes broeden, zoals spechten (Kremers et al. 2021).

3.1.3 Hybridisatie

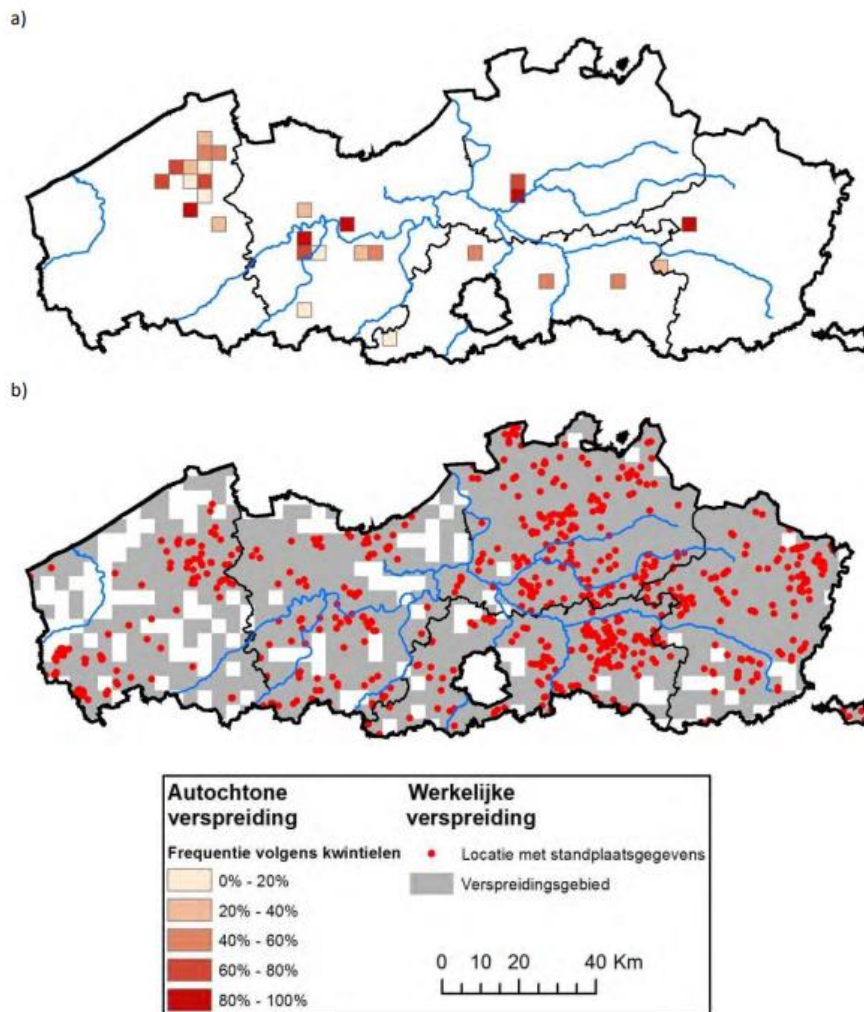
Het genus *Populus* staat onder andere bekend voor veel voorkomende hybridisatie tussen ecologisch verschillende soorten (Eckenwalder 1996; Martinsen et al. 2001; Rajora & Dancik 1992). Zo komt natuurlijke hybridisatie tussen de trilpopulier en de witte abeel (*Populus alba*) vaak voor in Europa. De hybride grauwe populier, of *P. x canescens*, komt in sympatrie voor met de witte abeel langs verschillende Europese riviervalleien (Lexer et al. 2005). De drie soorten worden morfologisch van elkaar onderscheiden aan de hand van het blad en de bracteolen van de bloemkatjes. Maar er is enorm veel variatie binnen elke soort en er bestaan ook intermediaire

//

vormen waardoor het niet altijd gemakkelijk is om een onderscheid te maken tussen de soorten (Eckenwalder 1996; Fischer et al. 2005).



Figuur 3 Het verspreidingsgebied van de trilpopulier in Eurazië. (Bron: Euforgen, Caudullo et al. 2017)



Figuur 4 De autochtone (a) en werkelijke verspreiding (b) van trilpopulier (*Populus tremula*) in Vlaanderen. (Bron: Uyttenbroeck et al. 2014).

3.2 METHODE

3.2.1 Stalen

Voor het opstellen van de genetische profielen van autochtone trilpopulieren (*Populus tremula*) bemonsterden we één autochtone zaadboomgaard: **Vloethenveld** te Zedelgem (1VB4291.1; Figuur 5). In de zomer van 2021 verzamelden we 92 bladstalen van trilpopulier. De bladstalen worden bewaard op silicagel.



Figuur 5 Vloethenveld te Zedelgem (51°08'50,7"N 3°07'24,4"E). De bemonsterde trilpopulieren zijn aangeduid in het lichtgroen.

3.2.2 DNA-extractie

Per individu wogen we 25 à 30 mg bladmateriaal af. Het materiaal werd vervolgens fijn gemalen met de Tissue Lyser II (Qiagen) gedurende 3 minuten bij 30 Hz. Voor de DNA-extractie van de bladstalen volgden we de stappen van de PlantMiniKit van QIAGEN nauwkeurig op. Het DNA werd finaal geëluëerd in 100 µl elutiebuffer. De DNA-stalen werden bewaard bij een temperatuur van -20° C tot verdere analyses. Om de fout op genotypering te bepalen voerden we duplicaat DNA-extracties uit op tien bladstalen.

3.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.2.3.1 Gebouwde microsatellieten

In totaal gebruikten we 20 microsatellieten die in vijf multiplexen (MP of PCR-reacties) werden ingedeeld via het programma Multiplex Manager 1.2 (Holleley & Geerts 2009) (Tabel 4). De primer-paren werden gelabeld met 5' fluorescente label primers (dyes: FAM, VIC, NED, PET).

3.2.3.2 PCR condities

De DNA-stalen werden verdund naar een concentratie van 10 ng/μl. Voor de amplificatie van de microsatellieten gebruikten we de QIAGEN Multiplex PCR kit met de volgende PCR condities: een initiële denaturatiestap gedurende 15 min. op 95 °C, 30 cycli van 30 s op 95 °C, 45 s op de locus-specifieke annealing temperatuur (TA, Tabel 4), en een extensiestap gedurende 45 s op 72 °C, tenslotte een elongatiestap gedurende 10 min. op 72 °C. Hiervoor werd een Biometra Thermocycler gebruikt. Het totale reactievolume bedroeg 10 μl bestaande uit 1 μl template DNA, 5 μl QIAGEN multiplex Master mix (hotstart), primers (forward met label) in verschillende concentraties (Tabel 4) en DEPC water (UltraPure™ Water behandeld met 0,1% diethylpyrocarbonaat) tot een volume van 10 μl.

Voor het bepalen van de fout op genotypering voerden we één tot vijf onafhankelijke replicaat PCR-amplificaties van vijf DNA-stalen uit.

3.2.4 Fragmentanalyse

De PCR producten werden op een ABI 3500 genetic analyzer (Thermo Fisher) gelopen met de GeneScan 600 LIZ standaard (Applied Biosystems). We verdunden de PCR producten van multiplexen 1,3 en 5 tienmaal en de PCR producten van multiplexen 2 en 4 20x alvorens ze op de ABI werden gelopen. Vervolgens analyseerden we de stalen met het programma Geneious Prime 2019.3.2 (<https://www.geneious.com>).

3.2.5 Dataverwerking

3.2.5.1 Analyses loci

In totaal bepaalden we voor **91 individuen** een genetische profiel aan de hand van 20 microsatellieten. Na het vergelijken van de genetische profielen vonden we **44 genotypes** (Bijlage 1.1). Voor de volgende genetische analyses werden enkel de genetische profielen van de unieke genotypes gebruikt.

De totale dataset heeft 7,10% ontbrekende data. Dit is vooral te wijten aan 40% ontbrekende data bij het locus *ORPM_137* en 75% ontbrekende data bij locus *ORPM_127*. Omdat het locus *ORPM_127* bovendien ook niet polymorf is in onze dataset, werd dit locus uit de dataset weg gelaten voor de volgende analyses. De nieuwe dataset bevat 3,32% ontbrekende data. Gebaseerd op de duplicaat extracties en replicaat PCR-amplificaties vonden we een gemiddelde fout op genotypering van 0,79%.

Door de ontbrekende data kon van **1 individu** geen genotype bepaald worden. Bij het vergelijken van genotypes van zaailingen met deze van de databank moet, naast de fout op genotypering, rekening worden gehouden met een **foutenmarge van 2,22%** (1 kans op 45 dat het genotype van een ouderboom niet in de databank zit).

We gebruikten het programma GENEPOP v4.3 (Rousset 2008) om de microsatelliet loci te testen op significante afwijkingen van het Hardy-Weinberg Evenwicht (HWE: i.e. het evenwicht van genotype frequenties dat bereikt wordt in een random kruisende populatie die niet beïnvloed wordt door mutaties, migratie of selectie). Na correctie voor het aantal testen volgens de Bonferroni methode (Bonferroni aangepaste p-waard < 0,0025) (Hochberg 1988) detecteerden we enkel voor het locus *ORPM_327* een significante afwijking. Vervolgens werd met GENEPOP v4.3 elk locus-paar getest op linkage disequilibrium (LD: i.e. de niet-random associatie van allelen op verschillende loci). Hiervoor werd de *Markov chain* methode en standaard settings gebruikt.



Tabel 4 Indeling van de 20 microsatellieten gebruikt voor *Populus tremula* in 5 multiplexen (MP), de gevonden productgrootte (in baseparen), het aantal gevonden allelen per locus, de gebruikte concentratie (in μmol), de annealing temperatuur (TA) en de gebruikte fluorescente kleur. Microsatellieten aangeduid met een * (14) werden ook gebruikt voor het bepalen van de genetische profielen van *P. x canescens*. Bronnen informatie microsatelliet merkers: Tuskan et al. (2006)^a, Smulders et al. (2001)^b, Dayanandan et al. (1998)^c, Rahman et al. (2000)^d, Van der Schoot et al. (2000)^e, Liesebach et al. (2010)^f, Lexer et al. (2005)^g

MP	Locus	Forward primer	Reverse primer	Motief	Productgrootte (bp)	Aantal allelen	TA (°C)	Conc. (μM)	Kleur
1	ORPM_312 ^{*a}	GTGGGGATCAATCCAAAAGA	CCCATATCAAACCATTGAAAAA	CCT	184 - 208	6	57	0,20	FAM
1	ORPM_327 ^{*a}	ATAGACGACCGCGTTTTTCAC	GGAATCGAAACCCTAACATGG	TC	200 - 228	9	57	0,10	VIC
1	WPMS_20 ^{*b}	GTGCGCACATCTATGACTATCG	ATCTTGTAATTCTCCGGGCATCT	TTCTGG	217 - 241	5	57	0,10	NED
1	ORPM_137 ^a	CCGTGCATCTGCTCACTTTA	GCATTTGCAGATGAAATTGGT	AT	181 - 193	4	57	0,40	PET
2	WPMS_14 ^b	CAGCCGCAGCCACTGAGAAATC	GCCTGCTGAGAAGACTGCCTTGAC	CGT	207 - 243	7	57	0,20	FAM
2	PTR2 ^{*c}	AAGAAGAACTCGAAGATGAAGAACT	ACTGACAAAACCCTAATCTAACAA	TGG	199 - 220	7	57	0,20	VIC
2	WPMS_15 ^{*b}	CAACAAACCATCAATGAAGAAGAC	AGAGGGTGTGGGGGTGACTA	CCT	179 - 197	6	57	0,10	NED
2	PTR7 ^{*d}	ATTTGATGCCTCTTCTTCCAGT	TATTTTCATTTCCCTTTGCTTT	(CT)5AT(CT)	219 - 282	21	57	0,20	PET
3	ORPM_29 ^a	TGGTGATCCAGTTTTGGTGA	GTCCTTGAAGCCATGAA	AC	186 - 264	15	52	0,20	FAM
3	WPMS_05 ^{*e}	TTCTTTTTCAACTGCCTAACTT	TGATCCAATAACAGACAGAACA	GT	267 - 303	6	52	0,20	VIC
3	PMGC_2163 ^f	CAATCGAAGGTAAGGTTAGTG	CGTTGGACATAGATCACACG	GA	189 - 193	3	52	0,10	NED
3	WPMS_16 ^{*b}	CTCGTACTATTTCCGATGATGACC	AGATTATTAGGTGGGCCAAGGACT	GTC	155 - 185	7	52	0,10	PET
4	PMGC_2852 ^{*g}	ATAATCTCCCTAGCTTAATTCC	GAATAACATGGATAATGTGTTTG	GA	88 - 128	11	56	0,20	FAM
4	WPMS_19 ^b	AGCCACAGCAAATTCAGATGATGC	CCTGCTGAGAAGACTGCCTTGACA	CAG	187 - 262	12	56	0,20	VIC
4	ORPM_206 ^{*a}	CCGTGGCCATTGACTCTTTA	GAACCCATTTGGTGCAAGAT	GCT	177 - 189	3	56	0,20	NED
4	ORPM_60 ^{*a}	ATAGCGCCAGAAGCAAAAAC	AAGCAGAAAGTCGTAGGTTTCG	AAT	208 - 217	2	56	0,20	PET
5	ORPM_202 ^{*a}	TCGCAAAGATTCTCCAGT	TTCAAATCCCGGTAATGCTC	TAA	174 - 179	3	56	0,20	FAM
5	ORPM_127 ^a	TCAATGAGGGGTGCCATAAT	CTTCCACTTTTGGCCCTTT	TG	191	mono	56	0,20	VIC
5	ORPM_344 ^{*a}	GGAGATTGTCGGAGAATGGA	TGGACGTTACGATAGGAGTGG	TC	226 - 237	6	56	0,20	NED
5	ORPM_220 ^{*a}	AGCTAGCCTGTCGTCGAAGGA	CAAGGAAGCATTCTCGCAAT	TTTA	173 - 182	3	56	0,20	PET



Na correctie voor het aantal testen volgens de Bonferroni methode (Bonferroni aangepaste p-waard $< 0,0003$) (Hochberg 1988) detecteerden we voor 13 paar loci significante LD: *WPMS_16 & ORPM_137*, *WPMS_16 & PTR7*, *PTR7 & ORPM_312*, *PTR7 & WPMS_05*, *PTR7 & PTR2*, *PTR7 & PMGC_2852*, *PMGC_2852 & ORPM_206*, *PMGC_2852 & ORPM_312*, *PMGC_2852 & WPMS_05*, *PMGC_2852 & WPMS_19*, *WPMS_19 & PTR2*, *WPMS_19 & ORPM_344* en *PTR2 & WPMS_14*.

Tenslotte schatten we de frequentie van nul-allelen in via de Dempster methode (Dempster et al. 1977) in het programma GENEPOP v4.3. Voor de vijf loci *ORPM_327*, *WPMS_05*, *ORPM_206*, *ORPM_202* en *ORPM_220* vonden we gemiddelde tot hoge schattingen van nul-allel frequenties ($r > 0,20$).

3.2.5.2 Genetische diversiteit

Met het R-pakket *adegenet* 2.1.10 (Jombart 2008), in het programma R v4.4.0 (R Core Team, 2024), berekenden we de volgende diversiteitsparameters: het gemiddeld aantal geobserveerde allelen per locus (N_a), de gemiddelde geobserveerde heterozygositeit (H_o), Nei's verwachte heterozygositeit (H_e), en de gemiddelde inteeltcoëfficiënt (F_{IS}). We gebruikten de rarefactie methode van het programma HP-Rare v1.0 (Kalinowski 2005) om het gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) gecorrigeerd voor het minimum aantal gegenotypeerde individuen per locus (26 individuen), te berekenen. Met het programma ADZE 1.0 (Szpiech et al. 2008) stelden we een rarefaction curve op.

Deze analyses voerden we uit, ter vergelijking, met en zonder de loci waarvoor we een hoge frequentie nul-allelen vonden. Omdat enkele diversiteitsindices verschilden in waarden voerden we de analyses uit zonder de vijf loci met een hoge nul-allel frequentie.

3.2.5.3 Ouderschapsanalyse

Om de bruikbaarheid van de genetische dataset te testen verzamelden we acht negatieve controlestalen. Deze stalen zijn afkomstig uit Nederland.

We voerden eerst een verkennende PCA (principal components analysis) uit via het R-pakket *adegenet* 2.1.10 (Jombart 2008) via het R-script beschreven in Jenkins (2020). Deze analyse geeft ons een idee over hoe sterk de genotypes van controlestalen lijken op de genotypes uit de databank met de ouderbomen.

Via een ouderschapstest wordt er nagegaan of er ouderbomen kunnen worden toegewezen aan de controlestalen. Met het programma Colony V2.0.6.6 (Jones & Wang 2010) voerden we ParentPair analyses uit. In deze analyse wordt er naar een mogelijke vader- en moederboom gezocht. Bij de resultaten wordt rekening gehouden met mogelijke mismatches tussen de ouderbomen en hun nakomelingen. Mismatches kunnen namelijk ook ontstaan door technische fouten (geen amplificatie, error in het scoren van de allelen... zie 3.2.5.1). We voerden twee analyses uit met telkens een verschillende kans op technische fout: 0,02 en 0,05. Een technische fout van 0,05 laat meer mismatches tussen ouders en nakomelingen toe. Voor de genotypes van de mogelijke vaders en moeders gebruikten we de unieke genotypes binnen alle zaadboomgaarden. We liepen 10 runs per analyse en stelden de kans op het vinden van een vader of moeder telkens in op 0,5.



3.2.5.4 Hybridevorming

Om eventuele hybridisatie tussen trilpopulier en witte abeel op te sporen, bepaalden we ook de genetische profielen van 13 grauwe abelen.

We voeren eerst een verkennende PCA (principal components analysis) uit via het R-pakket *adeigenet* 2.1.10 (Jombart 2008). Deze analyse is gebaseerd op de data van 14 loci (zie Tabel 4). Een PCA is een multivariate analysemethode die inzicht geeft in de samenhang van de bemonsterde individuen op basis van de genetische profielen. Punten die bij elkaar in de buurt liggen in een biplot van een PCA, lijken genetisch sterker op elkaar.

We voerden ook een Bayesiaanse clusteranalyse uit in het programma BAPS6 (Corander & Marttinen 2006) dat genetische groepen kan onderscheiden van elkaar. Een Hardy-Weinberg evenwicht en de afwezigheid van linkage disequilibrium zijn fundamentele assumpties voor deze analyse. Daarom haalden we loci die bewijs vertoonden voor HWE en LD (*ORPM_327*, *WPMS_16*, *PTR7*, *PTR2*, *PMGC_2852*) voor deze analyse uit de dataset.

Voor de BAPS clusteranalyse gebruikten we het ‘non-spatial’ model om de clustering van individuen te bepalen. We liepen 10 onafhankelijke runs met een vaste K-waarde, waarbij de bovengrens op 20 werd ingesteld.

3.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.3.1 Aanwezige genotypes

In totaal bevat de zaadboomgaard Vloethemveld te Zedelgem **44 genotypes** van trilpopulier (Bijlage 1.1).

3.3.2 Genetische diversiteit

In totaal werden er 136 allelen (*N_a*) geobserveerd. Tussen de loci varieert het aantal allelen van 2 tot 21 allelen, met een gemiddeld van 7,2 allelen per locus (Tabel 4). Na het uitsluiten van de 5 loci die een hoge frequentie van nul-allelen vertoonden, schatten we een allelische rijkdom (*A_r*) van 7,19 in. Er is indicatie voor inteelt maar de geschatte, gemiddelde waarde voor de inteelt coëfficiënt *F_{IS}* (gemiddelde ± sd) is laag (0,037 ± 0,029).

De geobserveerde heterozygositeit (*H_o*) varieert van 0,11 tot 0,86 per locus met een gemiddelde van 0,60. De verwachte heterozygositeit (*H_e*) varieert van 0,11 tot 0,91 per locus met een gemiddelde van 0,62.

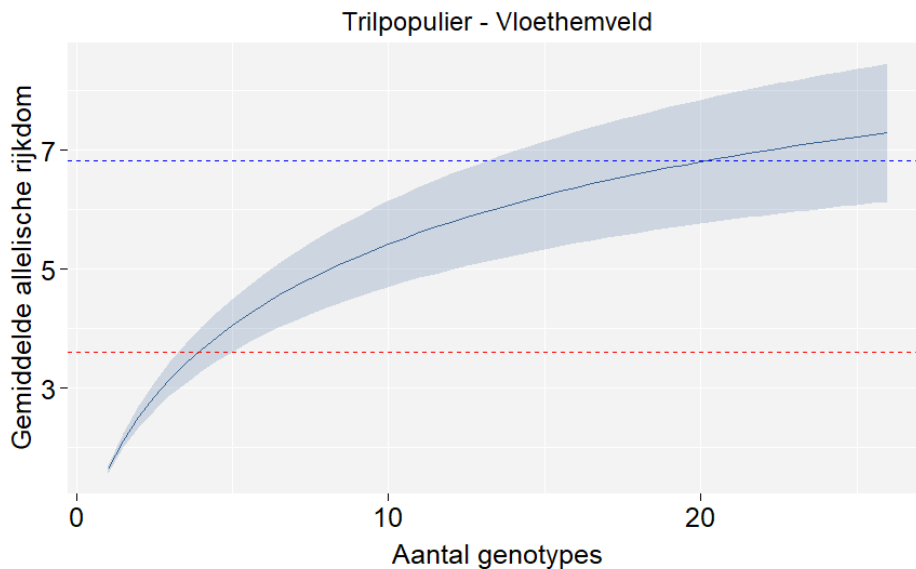
De verwachte heterozygositeit (*H_e*) en allelische rijkdom (*A_r*) zijn indicatoren voor de genetische diversiteit binnen een populatie, in dit geval binnen de zaadboomgaard. Een hoge genetische variatie binnen een populatie is belangrijk voor het aanpassingsvermogen van de populatie aan een veranderend klimaat. In vergelijking met natuurlijke bestanden verspreid over Europa (Tabel 5) bevat de zaadboomgaard een hoge genetische diversiteit.

//

Tabel 5 Het aantal geanalyseerde individuen/genotypes (N), de gemiddelde allelische rijkdom (Ar), geobserveerde heterozygositeit (Ho) en verwachte heterozygositeit (He) binnen natuurlijke trilpopulier bestanden verspreid over Europa.

Locatie	N	Ar	Ho	He	Bron
Vloethemveld	44	7,19	0,57	0,61	
Oostenrijk	48	6,76	0,43	0,53	Lexer et al. 2010
Italië	40	5,02	0,35	0,48	Lexer et al. 2010
Hongarije	40	5,57	0,45	0,55	Lexer et al. 2010
Spanje	9	4,50	/	0,59	Santos-del-Blanco et al. 2012

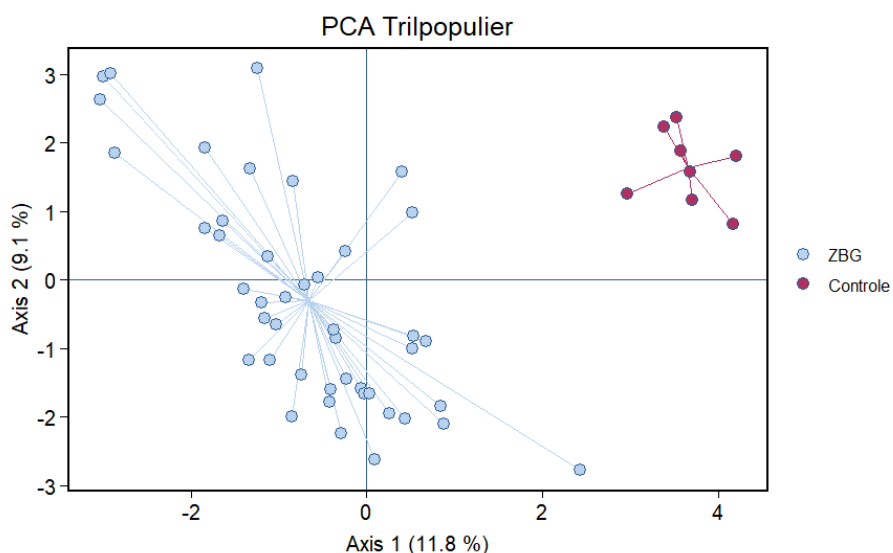
Om 50% van de berekende allelische rijkdom ($Ar = 3,6$) te behouden bij bv. de aanleg van een nieuwe zaadboomgaard via vegetatieve vermeerdering, moeten er minstens vier verschillende genotypes gebruikt worden (Figuur 6, intercept rode lijn). Om 95% van de berekende allelische rijkdom ($Ar = 6,8$) te behouden, moeten er minstens 20 verschillende genotypes gebruikt worden (Figuur 6, intercept blauwe lijn).



Figuur 6 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (Ar) per aantal genotypes weergeeft. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.

3.3.3 Ouderschapsanalyses

De PCA plot toont hoe sterk de genotypes van de negatieve controlestalen lijken op de genotypes die aanwezig zijn in de zaadboomgaarden van trilpopulier. Op figuur 7 zien we dat de genotypes van de negatieve controlestalen niet overlappen met deze van de ouderbomen. Dit geeft al een eerste indicatie dat de stalen niet uit de zaadboomgaarden afkomstig zijn.



Figuur 7 PCA plot voor trilpopulier, axis 1 vs axis 2. De genotypes uit de zaadboomgaard (Vloethemveld) zijn aangeduid in het blauw, de genotypes van de negatieve controlestalen zijn aangeduid in het rood.

Vervolgens voerden we een ouderschapsanalyse uit in Colony (Jones & Wang 2010). Deze analyse werd twee keer uitgevoerd, waarbij we de toelating van technische fouten de eerste streng (0,02; Tabel 12) en de tweede keer iets toegeven (0,05; Tabel 12) instelden.

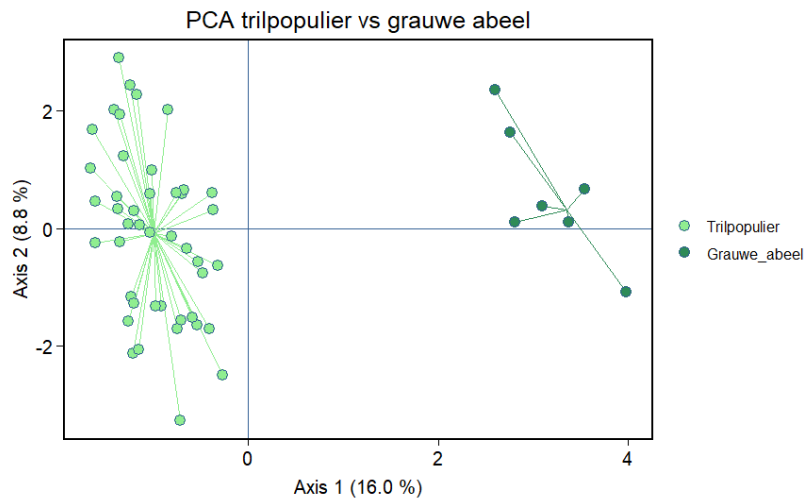
Tabel 6 Resultaat van de ParentPair analyse in Colony met een technische fout van 0,02 (links) en 0,05 (rechts). In een rij waarin geen ouderboom werd aangeduid (-), wordt aangegeven wat de kans is dat de ouderbomen niet in de databank zitten. Prob. = probability of waarschijnlijkheid. Een Prob. = 1 is een waarschijnlijkheid van 100%.

Staal	Mogelijke ouderbomen	Prob.	Mogelijke ouderbomen	Prob.
	Technische fout: 0,02		Technische fout: 0,05	
<i>Negatieve controle</i>				
Trilpop_neg_1	-	1	-	1
Trilpop_neg_2	-	1	-	1
Trilpop_neg_3	-	1	-	0,9999
Trilpop_neg_4	-	1	-	1
Trilpop_neg_5	-	1	-	1
Trilpop_neg_6	-	1	-	1
Trilpop_neg_7	-	1	-	0,9999
Trilpop_neg_8	-	1	-	1

In beide ouderschapsanalyses werd met zeer grote waarschijnlijkheid voor geen enkel negatief controlestaal een ouderboom gevonden. Dit geeft aan dat de negatieve controlestalen inderdaad niet uit de zaadboomgaarden afkomstig zijn.

3.3.4 Hybridevorming

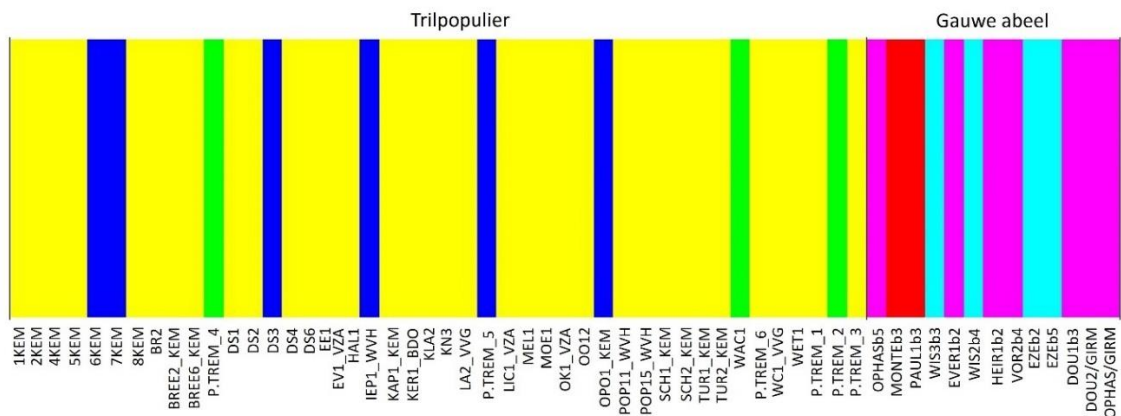
Onderstaande PCA biplot toont hoe sterk de genotypes van de trilpopulieren uit de zaadboomgaard lijken op de genotypes van de grauwe abelen. Wanneer er hybriden, en dus grauwe abelen, aanwezig zouden zijn in de zaadboomgaard, dan zouden enkele individuen aangeduid als trilpopulier in de wolk van de grauwe abelen aanwezig zijn.



Figuur 8 PCA plot voor trilpopulier en grauwe abeel, axis 1 vs axis 2. De genotypes van trilpopulier zijn aangeduid in het lichtgroen, de genotypes van grauwe abeel zijn aangeduid in het donkergroen.

Op de plot zien we echter dat de twee soorten twee aparte groepen vormen (Figuur 8) en er dus geen hybriden aanwezig zijn in Vloethemveld.

De BAPS-plot bevestigt dit (Figuur 9). Hierbij zien we dat alle trilpopulier individuen in andere genetische groepen (geel, groen en donkerblauw) worden ingedeeld dan de grauwe abeel individuen (roze, rood en lichtblauw).



Figuur 9 BAPS-plot die individuen (balk) indeelt in genetische groepen. Onder elke balk wordt het genotype weergegeven. Elke kleur duidt een verschillende genetische groep aan. Het optimaal aantal genetische groepen is zeven.

3.4 CONCLUSIE

- De zaadboomgaard Vloethemveld te Zedelgem bevat 44 verschillende genotypes van trilpopulier.
- Alle trilpopulier individuen bevatten samen een hoge genetische diversiteit. Om 50% van de gemiddelde allelische rijkdom te behouden zijn er minstens vier genotypes nodig, om 95% te behouden zijn er minstens 20 genotypes nodig.
- De zaadboomgaard bevat geen grauwe abeel hybriden, de aanwezige individuen zijn met andere woorden allemaal soortzuivere trilpopulieren.
- De DNA-databank kan voor trilpopulier gebruikt worden om niet-autochtoon bosplantsoen te identificeren.



4 HAZELAAR

4.1 SOORTENBESCHRIJVING

4.1.1 Ecologie

De hazelaar (*Corylus avellana*) komt wijdverspreid voor in Europa (Figuur 10). De soort is inheems en uiterst algemeen in Vlaanderen. De soort groeit op vele soorten bodems maar gedijt het best op een vochthoudende, luchtige, kalkhoudende zandleem- en leembodem. Hierdoor komt de hazelaar in verhouding meer voor in de Leemstreek van Vlaanderen (Figuur 11, Van Landuyt et al. 2006).

De hazelaar is vooral als struik of boom in de ondergroei van gemengde loofbossen terug te vinden (Kull & Niinemets 1993), maar de soort groeit ook langs bosranden, lichtrijke boswegen, brede houtkanten en oeverwallen. De hazelaar prefereert een matig klimaat. De soort kan niet goed tegen hitte maar is wel goed bestand tegen koude temperaturen en vorst, zelfs tijdens het groeiseizoen. Door verschillende aanpassingen in zijn blad kan de hazelaar zowel in lichtrijke als schaduwrijke omgevingen groeien (Catoni et al. 2015).

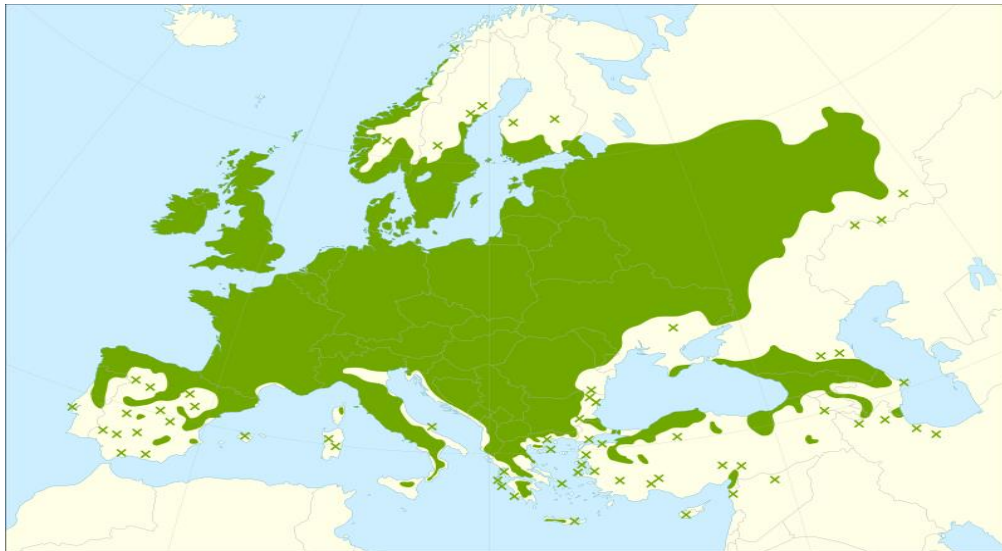
Hazelaars zijn eenhuizig, wat betekent dat er zowel mannelijke als vrouwelijke bloemen op eenzelfde boom voorkomen. De bloemen bloeien lang voor het ontluiken van de bladeren in de periode januari - maart. De mannelijke en vrouwelijke bloemen bloeien echter niet tegelijkertijd (dichogamie): mannelijke katjes bloeien vroeger dan de vrouwelijke bloemen (protandrie). De bevruchting gebeurt door windbestuiving. De hazelaar vertoont sporofytische zelf-incompatibiliteit waardoor er enkel kruisbestuiving plaats kan vinden (Marinoni et al. 2009).

4.1.2 Waarde

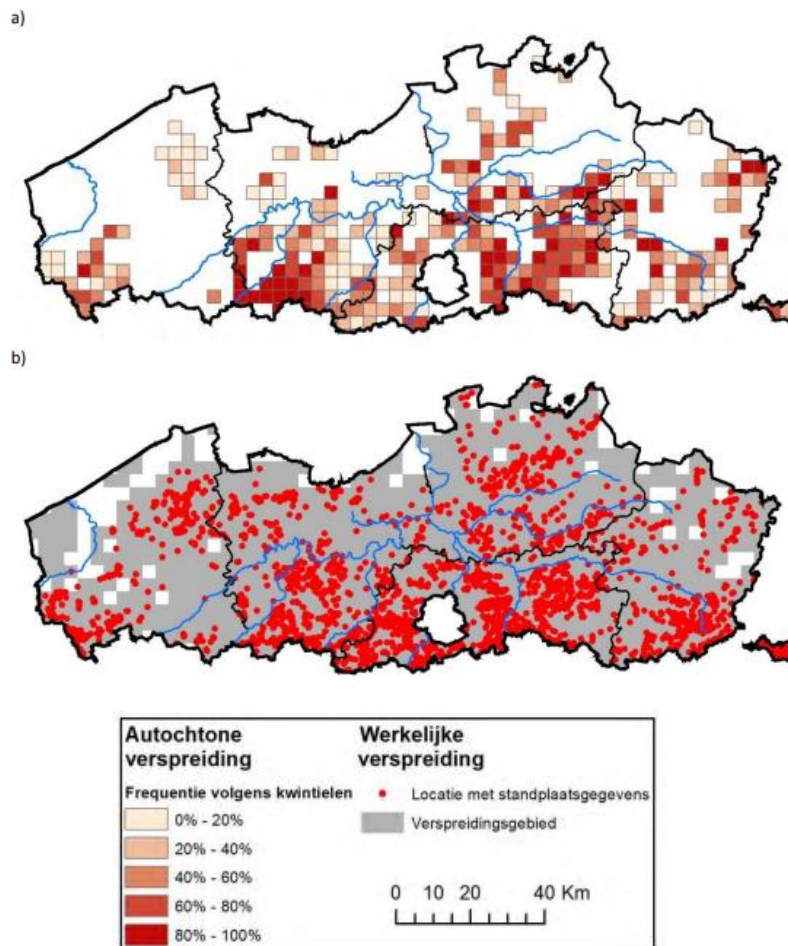
De hazelaar heeft een grote economische waarde door de verkoop van de hazelnoten. Over verschillende eeuwen heen werden er in Europa en Turkije meer dan 400 cultivars van *Corylus avellana* geselecteerd op basis van o.a. de grootte en kwaliteit van de noten. Deze cultivars worden voornamelijk op basis van morfologische kenmerken van de noten uit elkaar gehouden (Mehlenbacher 1991). Dit kan echter zeer moeilijk zijn omdat de morfologische kenmerken vaak beïnvloed worden door omgevingsfactoren en daarom onbetrouwbaar of onnauwkeurige indicatoren zijn van het genotype van de plant. Identificatie van de cultivars is ook zeer moeilijk wanneer de planten jong zijn en nog geen zaden dragen. Aan de hand van genetische merkers kunnen de cultivars wel met zekerheid van elkaar onderscheiden worden (Bassil et al. 2005; Boccacci et al. 2005).

De hazelaar heeft ook ecologische waarde. De noten zijn vooral in de winter een belangrijke voedselbron voor tal van dieren zoals de eekhoorn, de hazelmuis en de gaai. De hazelaar is, net zoals de trilpopulier, ook een rijkstrooiselsoort die via zijn rijk strooisel voedingstoffen, zoals calcium en kalium, terug kan geven aan de bodem.





Figuur 10 Het verspreidingsgebied van de hazelaar (*Corylus avellana*) in Europa. (Bron: Euforgen, Caudullo et al. 2017)



Figuur 11 De autochtone (a) en werkelijke verspreiding (b) van hazelaar (*Corylus avellana*) in Vlaanderen. (Bron: Uyttenbroeck et al. 2014)

4.2 METHODE

4.2.1 Stalen

Voor het opstellen van de genetische profielen van autochtone hazelaars (*Corylus avellana*) bemonsterden we in de zomer van 2021 acht autochtone zaadboomgaarden (Tabel 7). In totaal verzamelden we 919 bladstalen. Op aanvraag van ANB schreef het INBO in 2022 een advies rond het verplaatsen van enkele rijen individuen binnen de zaadboomgaard Nieuw goed te Parijs (De Ro & Vanden Broeck 2022). De resultaten in dit rapport beschrijven de situatie voor de verplaatsing. De bladstalen worden bewaard op silicagel. Omwille van budgettaire redenen analyseerden we in 2022 de stalen van vier zaadboomgaarden, met in totaal 575 bladstalen. We selecteerden deze vier zaadboomgaarden op basis van de oogstgegevens van de periode 2016-2020 (Tabel 7).

Tabel 7 De bemonsterde autochtone zaadboomgaarden van hazelaar met hun locatie, het aantal verzamelde bladstalen en de oogstgegevens van de periode 2016 - 2020 (in kg). De zaadboomgaarden die in 2022 werden geanalyseerd zijn aangeduid met een asterisk (*). De hazelaars in Bos 't Ename werden in 2019 aangeplant.

Zaadboomgaard	Gemeente	Register-nummer	Aantal stalen	Oogstgegevens (kg)					
				2016	2017	2018	2019	2020	Totaal
Bos 't Ename	Ename		72						
Oude Kwekerij *	Brasschaat	1VB4450.3	218	164	30	58	443	71	766
Kriephoek	Kriephoek		140						
Meikensbossen *	Dentergem	1VB4450.8	127				44,1	19,5	63,6
Nieuw goed te Parijs *	Astene	1VB4450.6	167				321,3	0,8	322,1
Scherpenberg	Heuvelland	1VB4450.4	102						
Veldeker *	Hasselt	1VB4450.1	63				32	6,8	38,8
Vloethemveld	Zedelgem	1VB4450.5	30						

4.2.1.1 Geanalyseerde zaadboomgaarden

Hieronder staan de locaties van de geanalyseerde zaadboomgaarden ingekleurd op luchtfoto. Zie bijlage 2 voor kaartjes van de overige locaties die nog niet geanalyseerd werden.



Figuur 12 Nieuw goed te Parijs te Astene (50°58'04,6"N 3°33'27,3"E). De locatie van de bemonsterde hazelaars is aangeduid in het lichtgroen (situatie 2021).



Figuur 13 Veldeker te Hasselt (50°57'41,4"N 5°14'24,7"E). De locatie van de bemonsterde hazelaars is aangeduid in het lichtgroen.





Figuur 14 De Oude Kwekerij te Brasschaat (51°19'26,8"N 4°30'22,5"E). De locatie van de bemonsterde hazelaars is aangeduid in het lichtgroen.



Figuur 15 Meikensbossen te Dentergem (50°58'44,8"N 3°22'28,2"E). De locatie van de bemonsterde hazelaars is aangeduid in het lichtgroen.

4.2.2 DNA-extractie

Per individu wogen we 25 à 30 mg bladmateriaal af. Het materiaal werd vervolgens fijn gemalen met de Tissue Lyser II (Qiagen) gedurende 3 minuten bij 30 Hz. Voor de DNA-extractie van de bladstalen volgden we de stappen van de GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit van EURx nauwkeurig op. Het DNA werd finaal geëlueerd in 100 µl elutiebuffer. De DNA-stalen werden bewaard bij een temperatuur van -20 °C tot verdere analyses. Voor het bepalen van de fout op genotypering voerden we duplicaat DNA-extracties uit op 16 bladstalen.

4.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.2.3.1 Gebruikte microsatellieten

In totaal gebruikten we 24 microsatellieten die in vier PCR multiplexen (MP) werden ingedeeld via het programma Multiplex Manager 1.2 (Holleley & Geerts 2009) (Tabel 8). De primer-paren werden gelabeld met 5' fluorescente label primers (dyes: FAM, VIC, NED, PET).

4.2.3.2 PCR condities

De DNA-stalen werden verdund naar een concentratie van 10 ng/µl. Voor de amplificatie van de microsatellieten gebruikten we de QIAGEN Multiplex PCR kit met de volgende PCR condities: een initiële denaturatiestap gedurende 15 min. op 95 °C, 30 cycli van 30 s op 95 °C, 45 s op de locus-specifieke annealing temperatuur (TA, Tabel 8), en een extensiestap gedurende 45 s op 72 °C, tenslotte een elongatiestap gedurende 10 min. op 72 °C. Hiervoor werd een Biometra Thermocycler gebruikt. Het totale reactievolume bedroeg 10 µl bestaande uit 1 µl template DNA, 5 µl QIAGEN multiplex Master mix (hotstart), primers (forward met label) in verschillende concentraties (Tabel 8) en DEPC water (UltraPure™ Water behandeld met 0,1% diethylpyrocarbonaat) tot een volume van 10 µl.

Voor het bepalen van de fout op genotypering voerden we één tot vijf onafhankelijke replicaat PCR-amplificaties van twintig DNA-stalen uit.

4.2.4 Fragmentanalyse

De PCR producten werden op een ABI 3500 genetic analyzer (Thermo Fisher) gelopen met de GeneScan 600 LIZ standaard (Applied Biosystems). We verdunden de PCR producten van multiplexen 1 en 2 tienmaal en de PCR producten van multiplexen 3 en 4 20x alvorens ze op de ABI werden gelopen. Vervolgens analyseerden we de stalen met het programma Geneious Prime 2019.3.2 (<https://www.geneious.com>).

//

Tabel 8 Indeling van de 24 microsatellieten gebruikt voor *Corylus avellana* in vier multiplexen (MP) met de gevonden productgrootte (in baseparen), het aantal gevonden allelen per locus, de gebruikte concentratie (in μmol), de annealing temperatuur (TA) en de gebruikte fluorescente kleur. De merkers die gebruikt werden voor de vergelijking van de genotypes met de 'WHGC database' zijn aangeduid met een *. Bronnen informatie microsatelliet merkers: Gürcan et al. (2010)^a, Boccacci et al. (2005)^b, Bassil et al. (2005)^c

MP	Locus	Forward primer	Reverse primer	Motief	Product-grootte (bp)	Aantal allelen	TA (°C)	Conc. (μM)	Kleur
1	CaC_A606 ^a	CACCTAGCTTGTTGGTGAAGC	TGACAATAATTAACCTACACACTTT	AC	141 - 151	6	60	0,20	FAM
1	CaC_A602 ^a	AAGAGTGGGGGTGCACTATG	GGATTCATGCCTGCGATACT	(AC)16(AT)6	180 - 224	25	60	0,20	FAM
1	CaC_B602 ^a	TCAGGATGAGACACCTTTACTCT	CCACAGTGGGAATAGCACATTT	(TC)15(CA)10	294 - 314	10	60	0,20	FAM
1	CaC_A613 ^a	CACACGCCTTGCACTCTTT	CCCCTTTCACATGTTTGCTT	(TC)13(CA)12	150 - 178	14	60	0,20	VIC
1	CaC_B619 ^a	AGTCGGCTCCCTTTTCTC	GCGATCTGACCTCATTTTTG	TC	148 - 180	14	60	0,10	NED
1	CaC_B779 ^a	CGCTCTGGACTTGGGATAC	TTGCAGCTCAGATGGTTCAC	CT	224 - 244	10	60	0,10	NED
1	CaC_A616 ^a	CACTCATACCGCAAACCTCCA	ATGGCTTTTGCTTCGTTTTG	AC	139 - 167	13	60	0,10	PET
1	CaC_B791 ^a	CACCAGGACCCTGATACCAT	TCCACAATGATTTTGTGAAAAC	AG	206 - 232	13	60	0,20	PET
2	CaC_A604 ^a	GCTCCCGAGGACTTCCAG	CCACGACATTTCCCTCTCAG	(CT)16(CA)14	132 - 156	12	60	0,20	FAM
2	CaC_B604 ^a	AACAGTCAGCCCCATTCTG	CTTCCCTAATCCCCTCAACC	AG	191 - 247	18	60	0,20	FAM
2	CaC_B603 ^a	TGGTGGTGATAGGGAAGGAG	TCTTTTCTTCTCAATCAGACGA	CT	274 - 310	13	60	0,20	FAM
2	CaC_B789 ^a	GCCACGTCCAGAATCAAAT	CCTCAGGGCTGAGAAGTTGA	AG	143 - 187	17	60	0,20	NED
2	CaC_B625 ^a	CGCAAGTCATTGCACATTTT	GTGTGCTGTGCTCCTTGAA	TC	237 - 285	15	60	0,20	NED
2	CaC_B777 ^a	AGGGAAGGGTGTAGGACGTT	TCGTTTTCTCCACATCACCA	GA	203 - 227	11	60	0,20	PET
3	CaT-B502 ^{*b}	CTCATGACTGCCATTTCTCG	AGGCATGCAGGCTTCACAC	(CT)16GCTTTTCT(CT)5	185 - 209	12	55	0,20	FAM
3	CaC-C028 ^c	CTACCCATCGCTTGACAC	GGAGACTTGTTGCCACAGA	AG	128 - 147	7	55	0,20	FAM
3	CaT-B107 ^{*b}	GTAGGTGCACTTGATGTGCTTTAC	AACACCATATTGAGTCTTTCAAAGC	CT	114 - 153	14	55	0,20	VIC
3	CaT-B504 ^{*b}	CGCCATCTCCATTTCCAAC	CGGAATGGTTTTCTGCTCAG	CT	161 - 186	10	55	0,20	NED
3	CaT-B501 ^{*b}	GAAATTCAATCACACCAATAAGCA	CCTCCCTGTCCCTCATCACTG	GA	108 - 136	13	55	0,20	PET
4	CaT-B507 ^{*b}	CTAAGCTCACCAAGAGGAAGTTGAT	GCTTCTGGGTCTCCTGCTCA	(GA)1GC(GA)2GC(GA)14	180 - 201	12	55	0,20	FAM
4	CaC-B020 ^{*c}	GGGAAAATACTCCAATCGCT	TCACCGAGCCGTACATAATC	GA	257 - 295	13	55	0,20	FAM
4	CaT-B505 ^{*b}	AGAGAACGACTTTGTATGACAAAGA	TTGAACCATTAAATACATCATGTGA	(CT)17CC(CT)2	108 - 142	10	55	0,20	VIC
4	CaT-B508 ^{*b}	GGGTCAAGATTTGATAAAGTGGGA	GCACTCCACTTGTCGTTTTTC	GA	143 - 168	13	55	0,20	NED
4	CaT-B503 ^{*b}	CTCAATCACTCGAACGGATAC	AGCCGATACCAGCCTCTCGC	GA	113 - 135	10	55	0,20	PET



4.2.5 Dataverwerking

4.2.5.1 Analyses loci

In totaal bepaalden we voor **575 individuen** een genetische profiel aan de hand van 24 microsattelieten. Na het vergelijken van de genetische profielen vonden we in totaal **248 genotypes**.

Tabel 9 Overzicht van het aantal individuen en genotypes per geanalyseerde zaadboomgaard van hazelaar.

Zaadboomgaard	Register-nummer	Aantal individuen	Aantal genotypes
Oude Kwekerij	1VB4450.3	218	93
Meikensbossen	1VB4450.8	127	59
Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6	167	55
Veldeker	1VB4450.1	63	44

Voor de volgende genetische analyses werden enkel de genetische profielen van de unieke genotypes gebruikt.

De totale dataset heeft 2,61% ontbrekende data. Gebaseerd op de duplicaat extracties en replicaat PCR-amplificaties vonden we een gemiddelde fout op genotypering van 0,22%. Door de ontbrekende data kon van **één individu in Nieuw goed te Parijs** geen genotype bepaald worden. Bij het vergelijken van genotypes van zaailingen met deze van Nieuw goed te Parijs moet, naast de fout op genotypering, ook rekening worden gehouden met een **foutenmarge van 1,75%** (1 kans op 57 dat het genotype van een ouderboom niet in de DNA-databank zit).

We schatten de frequentie van nul-allelen in via de Dempster methode (Dempster et al. 1977) in het programma GENEPOP v4.3. Geen enkel locus vertoonde gemiddelde tot hoge schattingen van nul-allel frequenties ($r > 0,20$).

4.2.5.2 Genetische diversiteit

Met het R-pakket *adegenet* 2.1.10 (Jombart 2008), in het programma R v4.4.0 (R Core Team, 2024), berekenden we de volgende diversiteitsparameters: gemiddeld aantal geobserveerde allelen per locus (N_a), de gemiddelde geobserveerde heterozygositeit (H_o), Nei's verwachte heterozygositeit (H_e), en de gemiddelde inteeltcoëfficiënt (F_{is}). We gebruikten de rarefactie methode van het programma HP-Rare v1.0 (Kalinowski 2005) om het gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) gecorrigeerd voor het minimum aantal gegenotypeerde individuen per locus (38 individuen per zaadboomgaard, 234 individuen algemeen), te berekenen. Met het programma ADZE 1.0 (Szpiech et al. 2008) stelden we een rarefaction curve op. Voor de parameter Max_G werd dezelfde waarde gebruikt als we voor het berekenen van de A_r gebruikt hebben ($2*38 = 76$ G).

4.2.5.3 Ouderschapsanalyse

Om de bruikbaarheid van de genetische dataset te testen verzamelden we tien negatieve controlestalen. Deze stalen zijn afkomstig uit Oost-Vlaanderen (Haz_neg_1 - 5; Haz_neg_10) en Roemenië (Haz_neg_6 - 9).

//

We voerden eerst een verkennende DAPC (discriminant analysis of principal components) uit via het R-pakket *adegenet* 2.1.10 (Jombart 2008) via het R-script beschreven in Jenkins (2020). Deze analyse geeft ons een idee over hoe sterk de genotypes van de controlestalen lijken op de genotypes uit de databank met de ouderbomen.

Via een ouderschapstest wordt er nagegaan of er ouderbomen kunnen worden toegewezen aan de controlestalen. Met het programma Colony V2.0.6.6 (Jones & Wang 2010) voerden we ParentPair analyses uit. In deze analyse wordt er naar een mogelijke vader- en moederboom gezocht. Bij de resultaten wordt rekening gehouden met mogelijke mismatches tussen de ouderbomen en hun nakomelingen. Mismatches kunnen namelijk ook ontstaan door technische fouten (geen amplificatie, error in het scoren van de allelen... zie 4.2.5.1). We voerden twee analyses uit met telkens een verschillende kans op technische fout: 0,02 en 0,05. Een technische fout van 0,05 laat meer mismatches tussen ouders en nakomelingen toe. Voor de genotypes van de mogelijke vaders en moeders gebruikten we de unieke genotypes binnen alle zaadboomgaarden. We liepen 10 runs per analyse en stelden de kans op het vinden van een vader of moeder telkens in op 0,5.

4.2.5.4 Identificatie cultivars

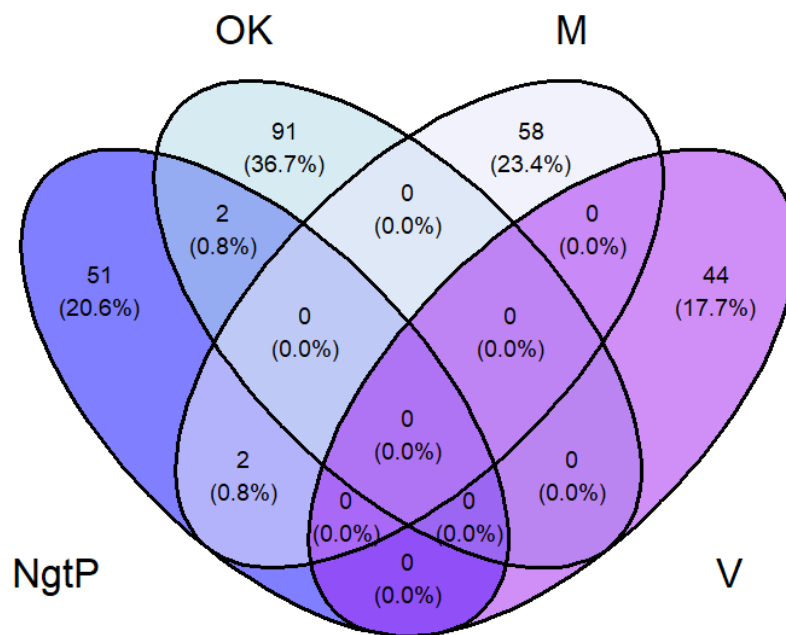
Omdat het moeilijk kan zijn om de cultivars van hazelaar van de oorspronkelijke, autochtone hazelaar te onderscheiden, vergeleken we de genotypes van de verschillende Vlaamse locaties met de genotypes uit een cultivar databank opgesteld door Boccacci et al. (2021). Deze databank bevat 181 genotypes van cultivars die de 'Whole Hazelnut Germplasm Collection' (WHGC) vertegenwoordigen. Deze databank is opgesteld aan de hand van tien microsatelliet merkers. Om de data van Boccacci et al. (2021) te kunnen vergelijken met de data van deze studie, analyseerden we tien referentiestalen uit de WHGC. Deze stalen werden ons bezorgd door Mercè Rovira (IRTA, Spanje). Door een probleem met de amplificatie van één van deze merkers (CaC-B028), gebruikten we negen merkers om de genotypes met elkaar te vergelijken (Tabel 8). Hierdoor hebben twee cultivars in de WHGC databank hetzelfde genotype. Onze data blijft echter bruikbaar om de genotypes tussen beide databanken te vergelijken.



4.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.3.1 Aanwezige genotypes

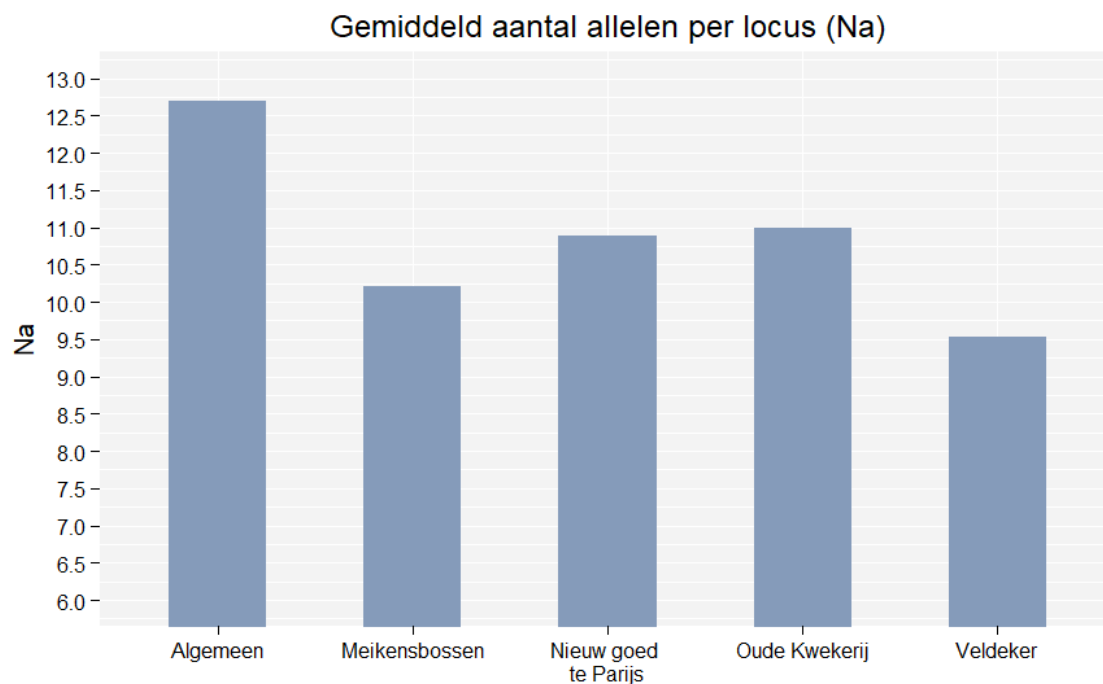
In totaal bevatten de zaadboomgaarden **248 genotypes** van hazelaar. In de zaadboomgaarden Nieuw goed te Parijs, Oude kwekerij, Meikensbossen en Veldeker staan respectievelijk 56, 93, 59 en 44 genotypes (Bijlage 1.2). De zaadboomgaarden hebben grotendeels een unieke samenstelling in genotypes: Nieuw goed te Parijs heeft twee genotypes gemeenschappelijk met Oude kwekerij, en twee met de Meikensbossen (Figuur 16).



Figuur 16 Venn-diagram van de verdeling van de hazelaar genotypes. Het percentage geeft de genotypes per hok ten opzichte van het totaal aantal gevonden genotypes weer. Ngtp = Nieuw goed te Parijs, OK = Oude kwekerij, M = Meikensbossen, V = Veldeker.

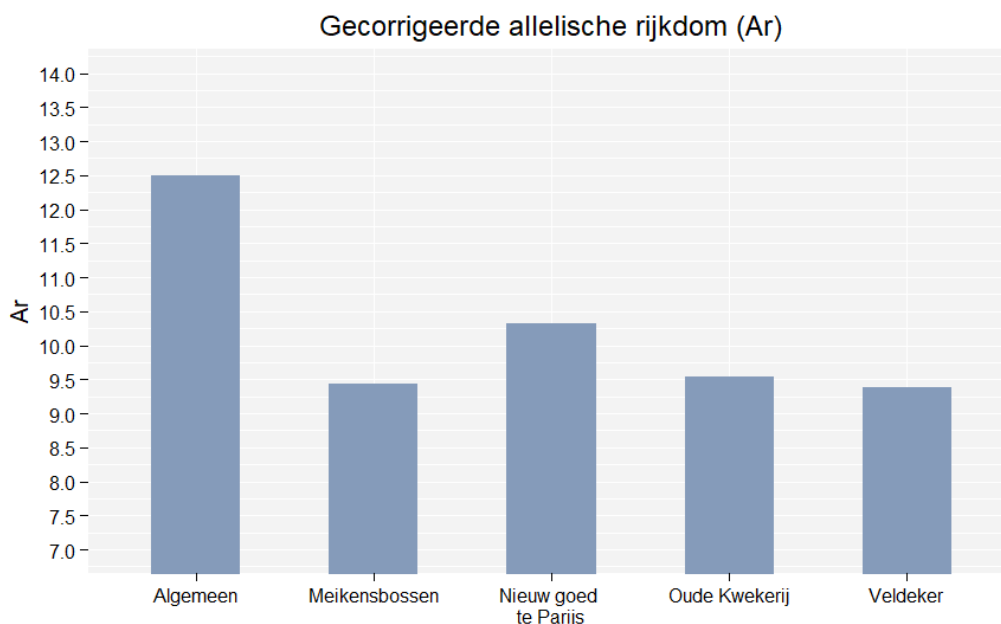
4.3.2 Genetische diversiteit

In totaal werden er 305 allelen (N_a) geobserveerd. Tussen de loci varieert het aantal allelen over alle zaadboomgaarden van 6 tot 25 allelen per locus (Tabel 8), met een gemiddelde van 12,71 allelen per locus. N_a is gelijkwaardig tussen de locaties, en varieert tussen een gemiddelde van 9,54 en 11,00 allelen per locus (Figuur 17).



Figuur 17 Vergelijking van het gemiddeld aantal allelen per locus (N_a) per locatie. ‘Algemeen’ is de N_a van alle zaadboomgaarden samen.

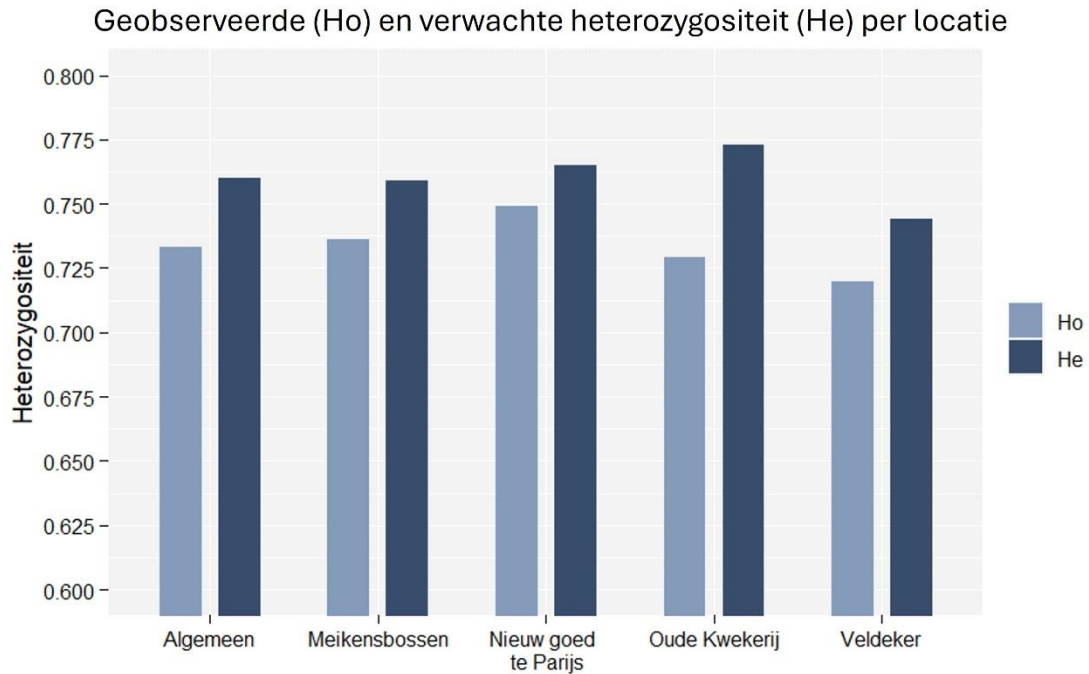
Het gecorrigeerd gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) is iets hoger in de zaadboomgaard Nieuw goed te Parijs, maar is verder gelijkaardig tussen de locaties (Figuur 18). A_r varieert tussen 9,39 en 10,32 met een gemiddelde van 9,67. Als we de genotypes van alle zaadboomgaarden samennemen is de A_r 12,49.



Figuur 18 Vergelijking van de gecorrigeerde allelische rijkdom (A_r) per locatie. ‘Algemeen’ is de A_r van alle zaadboomgaarden samen.



De geobserveerde heterozygositeit (H_o) varieert tussen de loci van 0,26 tot 0,92 per locus met een gemiddelde van 0,73. De verwachte heterozygositeit (H_e) varieert tussen de loci van 0,38 tot 0,88 per locus met een gemiddelde van 0,76. H_o en H_e zijn gelijkaardig tussen de locaties (Figuur 19). De gemiddelde H_o varieert tussen 0,72 en 0,75 per locus. De gemiddelde H_e varieert tussen 0,74 en 0,77 per locus.



Figuur 19 Vergelijking van de geobserveerde (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e) per locatie. 'Algemeen' is het gemiddelde van alle zaadboomgaarden samen.

Op alle locaties is er indicatie voor inteelt. De geschatte gemiddelde waarden voor de inteelt coëfficiënt F_{IS} (gemiddelde \pm sd) zijn echter laag (Algemeen: $0,041 \pm 0,012$; Nieuw goed te Parijs: $0,021 \pm 0,012$; Oude kwekerij: $0,061 \pm 0,019$; Meikensbossen: $0,042 \pm 0,027$; Veldeker: $0,037 \pm 0,031$).

De verwachte heterozygositeit (H_e) en allelische rijkdom (A_r) zijn indicatoren voor de genetische diversiteit binnen een populatie, in dit geval binnen de zaadboomgaarden. Een hoge genetische variatie binnen een populatie is belangrijk voor het aanpassingsvermogen van de populatie aan een veranderend klimaat. De genetische diversiteit in de geanalyseerde zaadboomgaarden is vergelijkbaar met de genetische diversiteit van natuurlijke populaties in Ierland (Tabel 10).

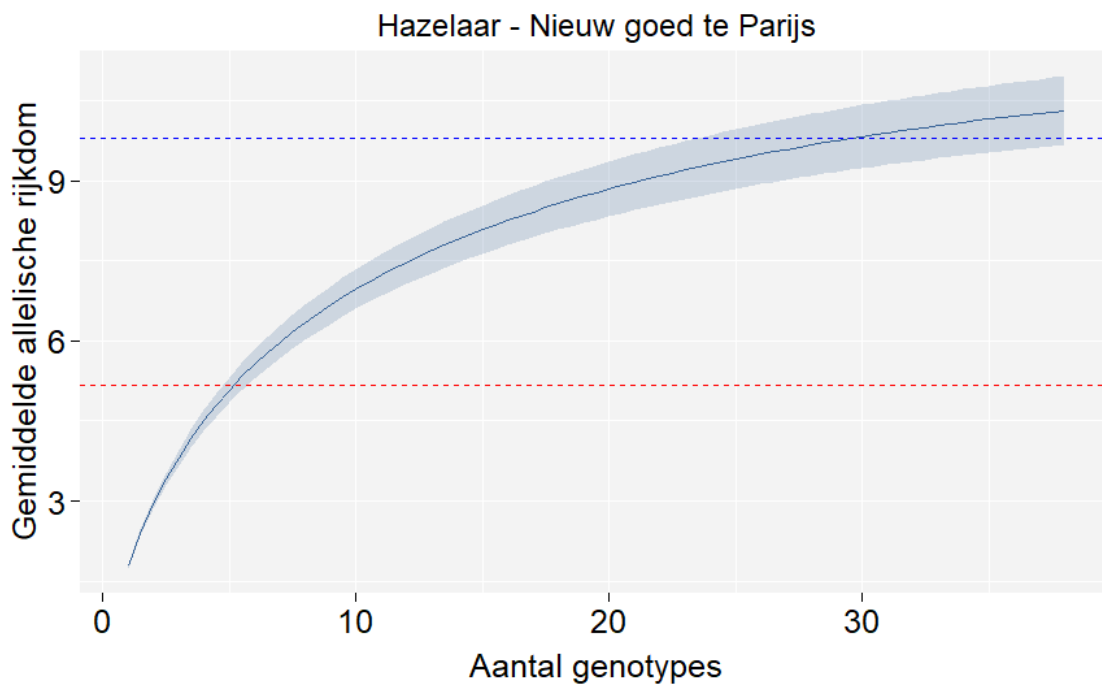
Tabel 10 Aantal geanalyseerde individuen/genotypes (N), de gemiddelde allelische rijkdom (A_r), geobserveerde heterozygositeit (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e) van de geanalyseerde boomgaarden en natuurlijke populaties in Ierland.

Locatie	N	A_r	H_o	H_e	Bron
Geanalyseerde zaadboomgaarden	248	9,67	0,73	0,76	
Ierland	879	8,57	0,73	0,83	Brown et al. 2016

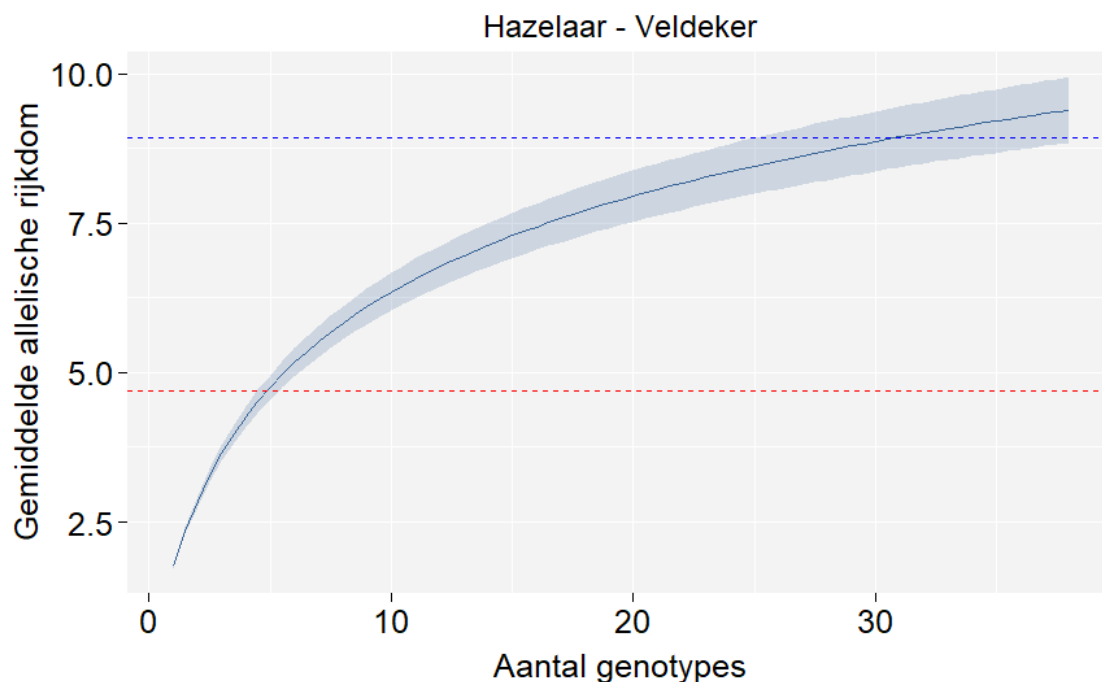
De allelische rijkdom werd binnen de vier locaties even hoog ingeschat. Het aantal genotypes dat nodig is om een bepaald niveau van allelische rijkdom te behouden is daarom voor elke locatie gelijkaardig. Om 50% van de berekende allelische rijkdom te behouden, bij bv. de aanleg van een nieuwe zaadboomgaard via vegetatieve vermeerdering, moeten er minstens vijf verschillende genotypes gebruikt worden (Tabel 11; Figuur 20-23, intercept rode lijn). Om 95% van de berekende allelische rijkdom te behouden, moeten er minstens 30 verschillende genotypes gebruikt worden (Tabel 11; Figuur 20-23, intercept blauwe lijn).

Tabel 11 50% en 95% van de berekende allelische rijkdom (A_r) en het aantal genotypes nodig om deze genetische diversiteit te bereiken per locatie.

Locatie	A_r	50% A_r	# genotypes	95% A_r	# genotypes
Nieuw goed te Parijs	10,32	5,16	5	9,80	30
Oude kwekerij	9,54	4,77	5	9,06	29
Meikensbossen	9,44	4,72	5	8,97	30
Veldeker	9,39	4,70	5	8,92	31



Figuur 20 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Nieuw goed te Parijs. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.



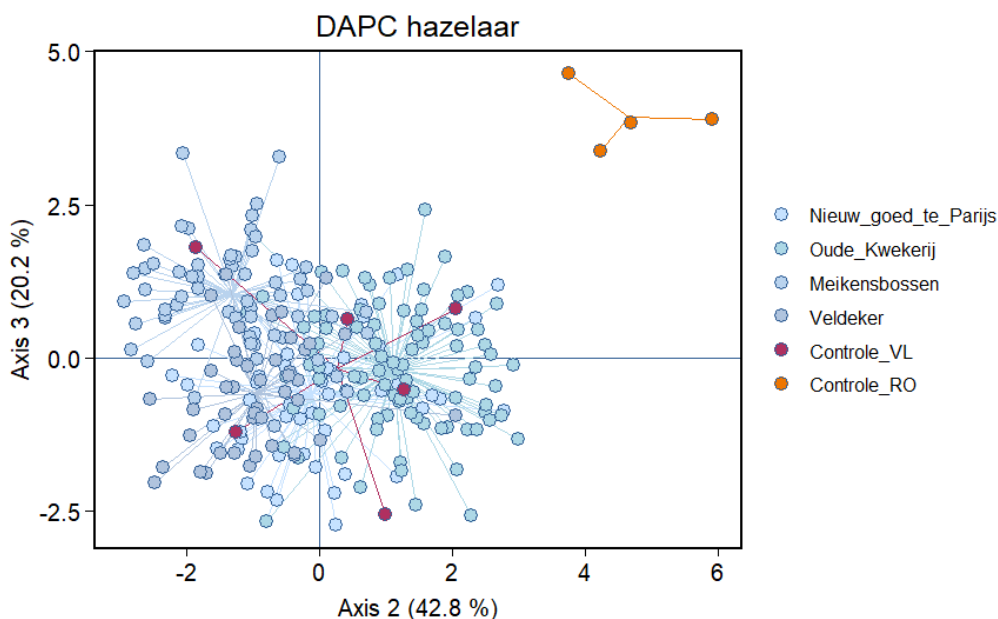
Figuur 23 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Veldeker. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.

4.3.3 Ouderschapsanalyses

De DAPC plot toont hoe sterk de genotypes van de negatieve controlestalen lijken op de genotypes die aanwezig zijn in de zaadboomgaarden van hazelaar.

Op figuur 24 zien we dat de groep van de Roemeense stalen niet overlapt met de groep van de mogelijke ouderbomen. Dit geeft al een eerste indicatie dat deze stalen niet uit de zaadboomgaarden afkomstig zijn. De groep van de Oost-Vlaamse stalen overlapt wel met de groep van de mogelijke ouderbomen. In dit geval moeten de ouderschapsanalyses meer duidelijkheid bieden.





Figuur 24 DAPC plot voor hazelaar, axis 1 vs axis 2. De genotypes uit de zaadboomgaarden (Nieuw goed te Parijs, Oude Kwekerij, Meikensbossen en Veldeker) zijn aangeduid in het blauw, de genotypes van de negatieve controlestalen uit Vlaanderen zijn aangeduid in het rood, deze uit Roemenië zijn aangeduid in oranje.

Vervolgens voerden we een ouderschapsanalyse uit in Colony (Jones & Wang 2010). Deze analyse werd twee keer uitgevoerd, waarbij we de toelating van technische fouten de eerste streng (0,02; Tabel 12) en de tweede keer iets toevender (0,05; Tabel 12) instelden.

Tabel 12 Resultaat van de ParentPair analyse in Colony met een technische fout van 0,02 (links) en 0,05 (rechts). In een rij waarin geen ouderboom werd aangeduid (-), wordt aangegeven wat de kans is dat de ouderbomen niet in de databank zitten. Prob. = probability of waarschijnlijkheid. Een Prob. = 1 is een waarschijnlijkheid van 100%.

Staal	Mogelijke ouderbomen	Prob.	Mogelijke ouderbomen	Prob.
	Technische fout: 0,02		Technische fout: 0,05	
<i>Negatieve controle</i>				
Haz_neg_1 (VL)	-	1	-	1
Haz_neg_2 (VL)	-	1	-	1
Haz_neg_3 (VL)	-	0,9990	- HAM3	0,9781 0,0219
Haz_neg_4 (VL)	-	1	-	0,9968
Haz_neg_5 (VL)	-	0,9885	- C.AVE_60	0,7173 0,2827
Haz_neg_6 (RO)	-	1	-	1
Haz_neg_7 (RO)	-	0,9974	-	0,9990
Haz_neg_8 (RO)	-	0,9947	-	0,9986
Haz_neg_9 (RO)	-	1	-	1
Haz_neg_10 (VL)	-	1	-	1



In beide ouderschapsanalyses werd voor de meeste controlestalen met zeer grote waarschijnlijkheid geen ouderboom gevonden. Aan één controlestaal uit Oost-Vlaanderen (Haz_neg_5) wordt met een lage waarschijnlijkheid (0,2827) een ouderboom toegewezen, maar de kans dat de ouderboom niet in de databank zit is veel hoger (0,7173). Dit geeft aan dat de negatieve controlestalen inderdaad niet uit de zaadboomgaarden afkomstig zijn.

4.3.4 Identificatie cultivars

We vergeleken de 248 genotypes uit de zaadboomgaarden met de cultivar genotypes uit de 'Whole Hazelnut Germplasm Collection' van Boccacci et al. (2021) die de genotypes van 181 cultivars bevat. We vonden geen overeenkomsten tussen de genotypes. Er zitten met andere woorden geen cultivars van de WHGC databank tussen de hazelaars in de geanalyseerde zaadboomgaarden.

4.4 CONCLUSIE

- In totaal bevatten de vier geanalyseerde zaadboomgaarden 248 genotypes. In de zaadboomgaarden Nieuw goed te Parijs, Oude kwekerij, Meikensbossen en Veldeker staan respectievelijk 55, 93, 59 en 44 genotypes.
- Alle hazelaar individuen bevatten samen een hoge genetische diversiteit. Om 50% van de gemiddelde allelische rijkdom van een zaadboomgaard te behouden zijn er minstens vijf genotypes nodig, om 95% te behouden zijn er minstens 29 genotypes nodig.
- De zaadboomgaarden bevatten geen cultivars uit de WHGC databank.
- De DNA-databank kan voor hazelaar gebruikt worden om niet-autochtoon bosplantsoen te identificeren.



5 HAAGBEUK

5.1 SOORTENBESCHRIJVING

5.1.1 Ecologie

Haagbeuk (*Carpinus betulus*) komt over grote delen van gematigd en Zuid-Europa voor (Figuur 25). De soort is inheems en zeer algemeen in Vlaanderen (Figuur 26). Haagbeuk stelt weinig eisen aan zijn standplaats, maar heeft wel een voorkeur voor lemige bodems (Van Landuyt et al. 2006). Verder is de verspreiding van haagbeuk in Vlaanderen in grote mate beïnvloed door de mens, mede doordat de soort vaak in haagvorm wordt aangeplant.

De haagbeuk komt het meeste voor in gemengde bestanden die gedomineerd worden door zomereik en wintereik (eiken-haagbeukenbos). Dit is een typische samenstelling van soorten voor Europese matige bossen (Ellenberg 2009). Verder is de haagbeuk een van de weinige boomsoorten in Europa die sterk schaduw-tolerant is (Savill 2013). Hierdoor groeit de soort zowel goed in de schaduwrijke onderlaag van een bos als op kale en verstoorde bodems waar hij als kolonisator kan optreden.

Haagbeuken zijn eenhuizig, wat betekent dat er zowel mannelijke als vrouwelijke bloemen op eenzelfde boom voorkomen. De bloemen bloeien na het uitlopen van de bladeren in de periode april - mei en worden bevrucht via windbestuiving.

Terwijl de andere soorten in dit rapport diploïd zijn (2n), is de haagbeuk octoploïd (8n). Octoploïde planten zijn planten waarvan elke chromosomenset acht keer voorkomt. Dit maakt het scoren van genetische profielen minder eenvoudig in vergelijking met diploïde planten.

5.1.2 Waarde

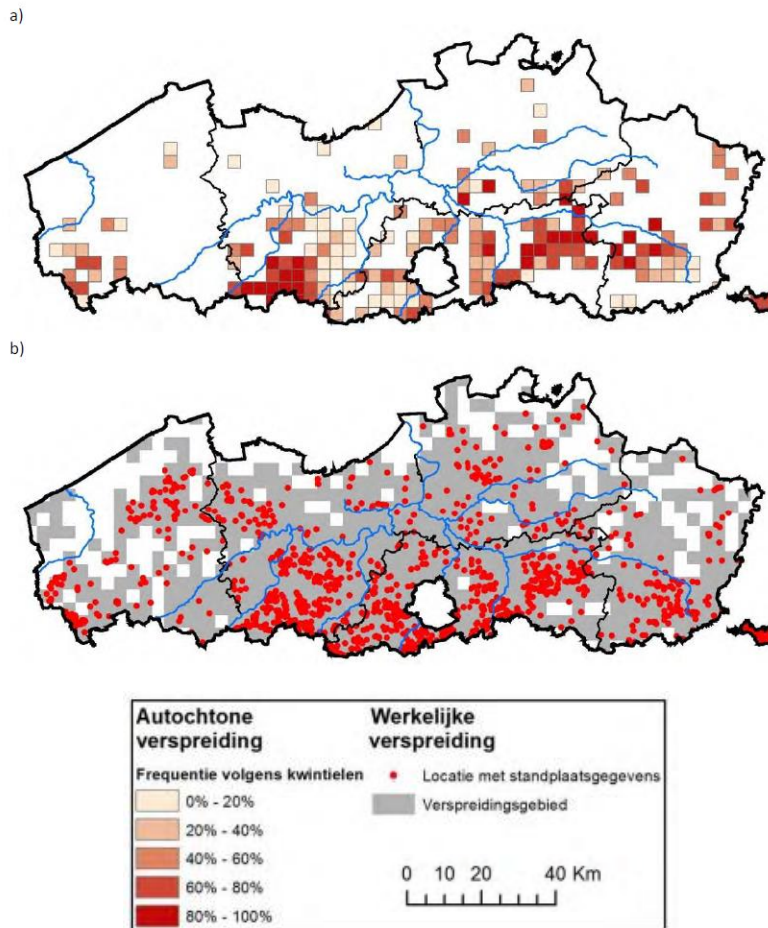
Haagbeuk heeft een sterke regeneratie van de kroon en de verdorde bladeren vallen pas van de takken wanneer de nieuwe blaadjes ontluiken (marcescentie). Hierdoor wordt de haagbeuk vaak in haagvorm aangeplant.

De haagbeuk heeft ook een ecologische waarde. Het is een waardplant voor het vliegend hert (*Lucanus cervus*), een bedreigde keversoort in Vlaanderen (Thomaes et al. 2015). Verder zijn de nootjes van de haagbeuk een voedselbron voor tal van vogels, zoals de appelvink en de boomklever, en tal van zoogdieren, zoals de hazelmuis. De haagbeuk is een veelgebruikte rijkstrooiselsoort die via zijn rijk strooisel voedingsstoffen, zoals calcium en kalium, terug kan geven aan de bodem.

//



Figuur 25 Het verspreidingsgebied van haagbeuk (*Carpinus betulus*) in Europa. (Bron: Euforgen, Caudullo et al. 2017)



Figuur 26 De autochtone (a) en werkelijke verspreiding (b) van haagbeuk (*Carpinus betulus*) in Vlaanderen. (Bron: Uyttenbroeck et al. 2014)

5.2 METHODE

5.2.1 Stalen

Voor het opstellen van de genetische profielen van autochtone haagbeuken (*Carpinus betulus*) bemonsterden we in de zomer van 2021 twee autochtone zaadboomgaarden (Tabel 13). In totaal verzamelden we 193 bladstalen. De bladstalen worden bewaard op silicagel.

Tabel 13 De bemonsterde autochtone zaadboomgaarden van haagbeuk met hun locatie en het aantal verzamelde bladstalen.

Zaadboomgaard	Gemeente	Code locatie	Aantal stalen
Meikensbossen	Dentergem	1VB4180.1	93
Eeuwenhout	Dranouter	1VB4180.2	100

5.2.1.1 Geanalyseerde zaadboomgaarden

Hieronder staan de locaties van de geanalyseerde zaadboomgaarden ingekleurd op luchtfoto.



Figuur 27 Meikensbossen te Dentergem (50°58'44,8"N 3°22'28,2"E). De locatie van de bemonsterde haagbeuken is aangeduid in het geel.





Figuur 28 Eeuwenhout te Dranouter (50°46'12,9"N 2°46'34,3"E). De locatie van de bemonsterde haagbeuken is aangeduid in het geel.

5.2.2 DNA-extractie

Per individu wogen we 25 à 30 mg bladmateriaal af. Het materiaal werd vervolgens fijngemalen met de Tissue Lyser II (Qiagen) gedurende 3 minuten bij 30 Hz. Voor de DNA-extractie van de bladstalen volgden we de stappen van de GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit van EURx nauwkeurig op. Het DNA werd finaal geëluëerd in 100 µl elutiebuffer. De DNA-stalen werden bewaard bij een temperatuur van -20 °C tot verdere analyses. Voor het bepalen van de fout op genotypering voerden we duplicaat DNA-extracties uit op 16 bladstalen.

5.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

5.2.3.1 Gebruikte microsatellieten

In de literatuur zijn er slechts voor enkele loci microsatellieten terug te vinden voor haagbeuk. De genetische profielen van de individuen moeten echter uit voldoende loci bestaan zodat (nauw) verwante individuen van elkaar kunnen worden onderscheiden. Daarom lieten we voor haagbeuk nieuwe microsatellieten ontwikkelen door AllGenetics & Biology SL (www.allgenetics.eu), gebaseerd op sequentieanalyse van het DNA (Bijlage 3).

In totaal gebruikten we 20 microsatellieten die in vier multiplexen (MP) werden ingedeeld via het programma Multiplex Manager 1.2 (Holleley & Geerts 2009) (Tabel 14). De primer-paren werden gelabeld met 5' fluorescente label primers (dyes: FAM, VIC, NED, PET).

5.2.3.2 PCR condities

De DNA-stalen werden verdund naar een concentratie van 10 ng/µl. Voor de amplificatie van de microsatellieten gebruikten we de QIAGEN Multiplex PCR kit met de volgende PCR condities: een initiële denaturatiestap gedurende 15 min. op 95 °C, 35 cycli van 30 s op 95 °C, 45 s op de locus-specifieke annealing temperatuur (TA, Tabel 14), en een extensiestap gedurende 45 s op 72 °C, tenslotte een elongatiestap gedurende 10 min. op 72 °C. Hiervoor werd een Biometra Thermocycler gebruikt.

Tabel 14 Indeling van de 20 microsatellieten gebruikt voor *Carpinus betulus* in 4 multiplexen (MP) met de gevonden productgrootte (in baseparen), het aantal gevonden allelen per locus, de gebruikte concentratie (in μmol), de annealing temperatuur (TA) en de gebruikte fluorescente kleur. Het locus AG_Cbe_263 (*) werd niet gebruikt voor de ouderschapsanalyses door hoge kans op allel mismatch.

MP	Locus	Forward primer	Reverse primer	Motief	Product-grootte (bp)	Aantal allelen	TA (°C)	Conc. (μM)	Kleur
1	AG_Cbe_263*	TGGCATTAACTCAATTCACCA	ACAAACTTTGAGCAGACCCG	AAG	68 - 106	13	61	0,10	FAM
1	AG_Cbe_334	ATACGAAGCACAATCCCCGA	AGATGGAGCGGGACGACT	ATC	144 - 159	6	61	0,10	FAM
1	AG_Cbe_028	AAACATCCAACAACCTTGCC	CCTTTCTTCCCTTGTGGGT	AG	200 - 206	2	61	0,10	FAM
1	AG_Cbe_200	CATCATCCCAGTCTTGTGGT	GTGCCACAATCCTGTTGAAA	AAAT	113 - 125	4	61	0,10	VIC
1	AG_Cbe_484	AGGAGATTGATTTGGTTTGTGA	TTGATATGCGGATAGTGGTGA	AG	108 - 112	3	61	0,20	NED
1	AG_Cbe_021	GCCACCTATGTGCTTGCTCT	TGCTTAAGCTTGGAGCCATT	AG	96 - 109	6	61	0,10	PET
1	AG_Cbe_241	TGATTTGTCTCAACCTTGAC	AGTGTGACCCAAGCCTTGAC	AG	136 - 138	2	61	0,20	PET
2	AG_Cbe_487	GCTTGTTCTTGGTAATATTATGGGA	AAACCCTGCACAAACAAAGC	AG	149 - 188	11	61	0,10	FAM
2	AG_Cbe_072	GATTCTGGGTCTTCGATTGC	CCCTAAACGCCTATTTCCCT	AG	140 - 159	7	61	0,10	VIC
2	AG_Cbe_025	TCTTCAAACACAACCACCA	GGGCATTCTTCTCTTGT	AG	98 - 111	4	61	0,10	NED
2	AG_Cbe_399	CAATATGCCAAGGAGTGGGA	TGTCATGATCAAGAACATACCCA	ACCG	82 - 98	5	61	0,10	PET
2	AG_Cbe_125	TCCACAGCTCAATTCTGTCC	CTTCACATGTTTGAATGCG	AG	142 - 146	3	61	0,10	PET
3	AG_Cbe_473	CTGGTTGTGCATATAAGGAGC	AATTTCCCGGTGATCATGC	AC	142 - 146	2	61	0,10	FAM
3	AG_Cbe_126	TCGGTAGTATCGGAGTCGATG	ACAGTTGCCATTTCTGGAGC	AAG	134 - 137	2	61	0,10	VIC
3	AG_Cbe_147	AATGTTATGCCAGGTGTGG	TCCAACCTCTATTTGTGCCA	AG	120 - 125	3	61	0,10	NED
3	AG_Cbe_036	CCGTTGCTGCTCCTCTTTAG	TCGAGCAATTTAGGCAGACA	AG	86 - 108	12	61	0,10	PET
4	AG_Cbe_045	AAACAGCATGGCTCTGCTTC	ACGAGACTTGGCAGTGAGGT	AAG	142 - 164	8	64	0,10	FAM
4	AG_Cbe_085	CGAGGACCATCTGAATCTGC	CTTGGTCGACTGCAACCTTT	AGG	122 - 128	4	64	0,10	VIC
4	AG_Cbe_318	CTCTTCTGACACCGACGGC	CACAGGTTTCTCAGCCAAT	ACG	107 - 113	2	64	0,10	NED
4	AG_Cbe_108	ACATACTGGTACCGATGCGA	TCGACACCTTGGCCTACTTC	AG	104 - 108	3	64	0,10	PET



genotype van het locus AABB, maar ook AAAB etc. zijn, het fenotype is dan AB). De volgende analyses werden uitgevoerd op basis van het allelisch fenotype van de individuen.

We berekenden de volgende diversiteitsparameters: gemiddeld aantal geobserveerde allelen per locus (N_a), de gemiddelde geobserveerde heterozygositeit (H_o), de verwachte heterozygositeit (H_e), en de gemiddelde inteeltcoëfficiënt (F_{ix}).

Voor polyploïde genotypes worden dezelfde formules voor H_e gebruikt als bij diploïde genotypes. De rationale hierachter is dat H_e als schatter voor genetische diversiteit niet *per se* gebonden is aan de heterozygositeit. De index wordt bij polyploïden beter geïnterpreteerd als 'genendiversiteit'. Wanneer enkel het allelisch fenotype bepaald kan worden (zoals in deze studie), wordt nog een correctie voor de ontbrekende verhoudingen van de allelen binnen het genotype uitgevoerd (Meirmans et al. 2018). Voor de berekening van H_o bij polyploïden moet rekening gehouden worden met 'volledige' en 'gedeeltelijke' heterozygositeit (bv. ABCD vs. AAAB). H_o wordt hierdoor berekend volgens het concept 'gametische heterozygositeit'. Ook voor H_o wordt een correctie voor de ontbrekende allelverhoudingen binnen het genotype uitgevoerd. Omdat H_o in deze situatie echter overschat kan worden, moeten de resultaten voorzichtig geïnterpreteerd worden (Meirmans et al. 2018).

5.2.3.5 Ouderschapsanalyses

Om de bruikbaarheid van de DNA-databank te testen verzamelden we twee soorten controlestalen. Voor de negatieve controle verzamelden we 15 stalen van individuen verspreid over Oost-Vlaanderen. Voor staal Hag_neg_6 kon geen genetisch profiel worden opgesteld, dit staal werd uit de analyses gelaten. Voor de positieve controle verzamelden we stalen van zaailingen afkomstig van zaden van beide geanalyseerde zaadboomgaarden: dertien stalen afkomstig van Eeuwenhout en elf stalen afkomstig van Meikensbossen.

Omdat er voor locus AG_Cbe_263 een hoog aantal mismatches was tussen individuen met dezelfde veldcode (en dus normaal hetzelfde genotype), werd dit locus uit de dataset gehaald voor de ouderschapsanalyses.

We voerden eerste een verkennende PCoA (Principal Coordinate Analyse) uit op basis van Nei's genetic distance (1983) met het programma Polygene (Huang et al. 2020). Deze analyse geeft ons een idee over hoe sterk de genotypes van controlestalen lijken op de genotypes uit de databank met de ouderbomen.

Via een ouderschapstest wordt er nagegaan of er ouderbomen kunnen worden toegewezen aan de controlestalen. Met het programma Polygene V1.7 (Huang et al. 2020) voerden we 'Parent pair (sex unknown)' analyses uit aan de hand van de 'Exclusion' methode. Deze methode sluit mogelijke ouderparen uit op basis van mismatches in het allelisch fenotype.

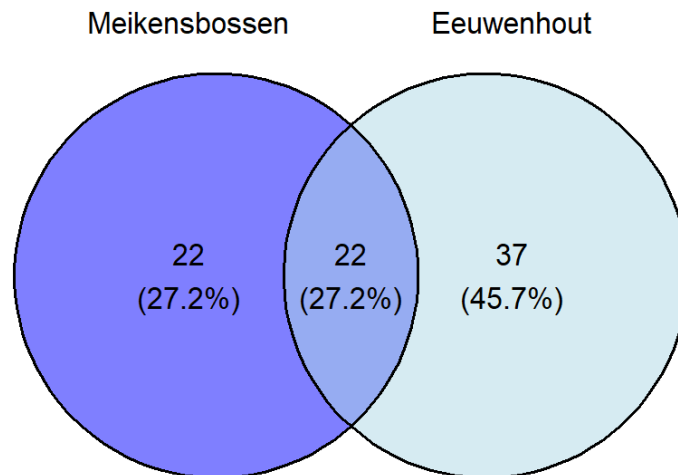
Bij deze methode kan men geen technische fout aangeven zoals bij de methode die we voor de diploïde soorten gebruiken. Hierdoor houdt deze methode geen rekening met mogelijke fouten in het benoemen van de allelen. Deze fouten kunnen echter ontstaan door technische fouten (slechte amplificatie, nul-allelen... zie 6.2.5.1). Omdat haagbeuk een octoploïd is, is de kans op een allel mismatch hoger dan bij de gemakkelijker te scoren diploïde soorten.

//

5.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

5.3.1 Aanwezige genotypes

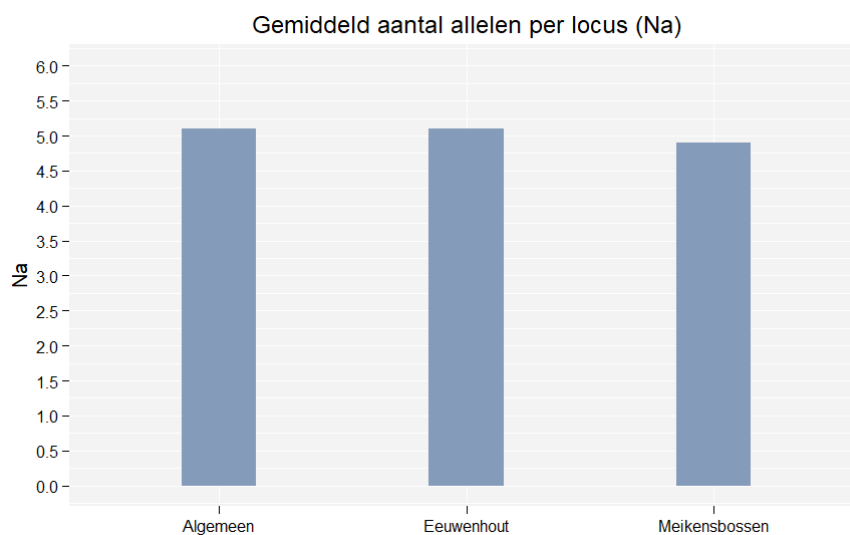
In totaal bevatten de zaadboomgaarden 81 genotypes van haagbeuk. In de zaadboomgaarden Eeuwenhout en Meikensbossen staan respectievelijk 59 en 44 genotypes (Bijlage 1.3). De zaadboomgaarden hebben 22 genotypes gemeenschappelijk (Figuur 29).



Figuur 29 Venn-diagram van de verdeling van de aanwezige genotypes van haagbeuk. Het percentage geeft de genotypes per hok ten opzichte van het totaal aantal gevonden genotypes weer.

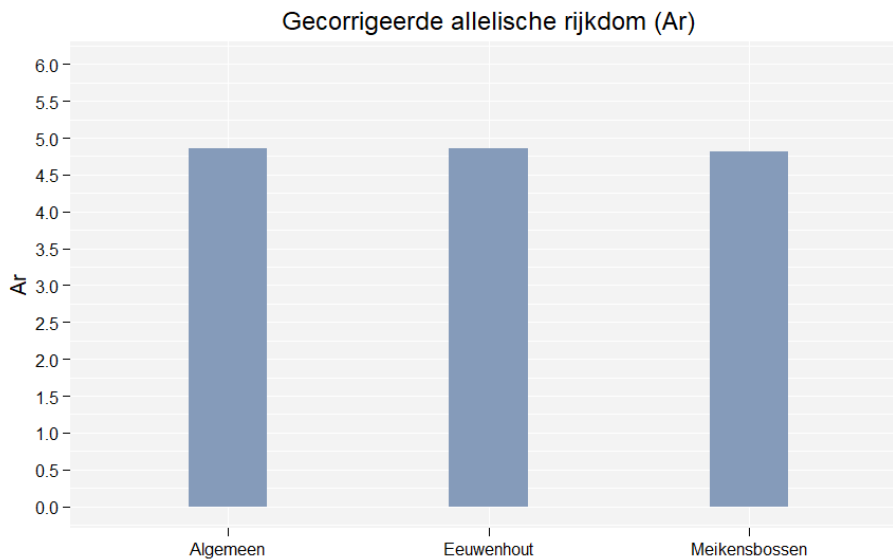
5.3.2 Genetische diversiteit

In totaal werden er 102 allelen (N_a) geobserveerd. Tussen de loci varieert het aantal allelen over alle zaadboomgaarden van 2 tot 13 allelen per locus (Tabel 14), met een gemiddeld van 5,1 allelen per locus. N_a is gelijkaardig tussen de locaties, met een gemiddelde van 5,1 allelen per locus in Eeuwenhout en een gemiddelde van 4,9 allelen per locus in Meikensbossen (Figuur 30).



Figuur 30 Vergelijking van het gemiddeld aantal allelen per locus (N_a) per locatie. 'Algemeen' is de N_a van alle zaadboomgaarden samen.

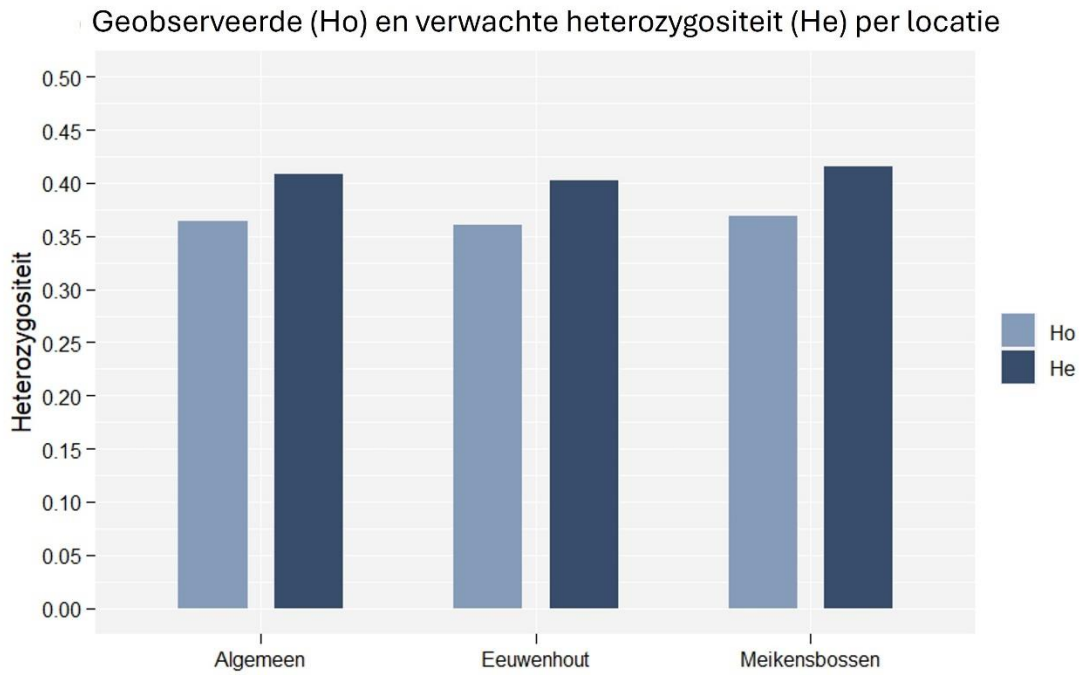
Ook het gecorrigeerd gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) is sterk gelijkaardig tussen beide locaties (Figuur 31). De allelische rijkdom in Eeuwenhout is 4,86. In Meikensbossen is deze 4,82. Als we de genotypes van alle zaadboomgaarden samennemen is de A_r 4,86.



Figuur 31 Vergelijking van de gecorrigeerde allelische rijkdom (A_r) per locatie. 'Algemeen' is de A_r van alle zaadboomgaarden samen.

De geobserveerde heterozygositeit (H_o) varieert tussen de loci van 0,026 tot 0,86 per locus met een gemiddelde van 0,36. De verwachte heterozygositeit (H_e) varieert tussen de loci van 0,026 tot 0,87 per locus met een gemiddelde van 0,43. H_o en H_e zijn beide sterk gelijkaardig tussen de locaties (Figuur 32). De gemiddelde H_o in Eeuwenhout is 0,36 per locus, in Meikensbossen is deze 0,37. De gemiddelde H_e in Eeuwenhout is 0,40 per locus, in Meikensbossen is deze 0,42.





Figuur 32 Vergelijking van de geobserveerde (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e) per locatie. 'Algemeen' is het gemiddelde van alle zaadboomgaarden samen.

De verwachte heterozygositeit (H_e) en allelische rijkdom (A_r) zijn indicatoren voor de genetische diversiteit binnen een populatie, in dit geval binnen de zaadboomgaarden. Een hoge genetische variatie binnen een populatie is belangrijk voor het aanpassingsvermogen van de populatie aan een veranderend klimaat. Bij de aanplanting van bv. een nieuw stuk bos is het belangrijk dat er zaad van verschillende genotypes afkomstig uit de locaties gebruikt worden zodat er voldoende genetische variatie is in de aanplanting.

Op alle locaties is er een lage indicatie voor inteelt (F_{Ix}). Voor beide zaadboomgaarden samen wordt de gemiddelde waarde voor de inteelt inteelt coëfficiënt F_{Ix} geschat op 0,109, voor de Meikensbossen op 0,111 en voor Eeuwenhout op 0,103.

Tot dusver werden nog geen genetische populatiestudies op natuurlijke populaties van haagbeuk uitgevoerd. We kunnen dus ook niet inschatten of de genetische diversiteit binnen de zaadboomgaarden vergelijkbaar is met de genetische diversiteit in natuurlijke populaties.



Tabel 16 Resultaat van de Parent pair analyse in Polygene. Per individu worden twee mogelijke ouderbomen weergegeven, samen met het aantal mismatch allelen. Enkel aan individuen die in de kolom 'zekerheid' drie asterisk (***) hebben staan, wordt met zekerheid ouderbomen toegewezen.

Staal	Mogelijke ouderboom	Allel mismatchen	Mogelijke ouderboom	Allel mismatchen	Zekerheid
<i>Negatieve controle</i>					
Hag_neg_1	BR36	0	E4_VAR	0	
Hag_neg_2	BR36	0	LO20_WVH	0	
Hag_neg_3	BE5	0	BE1	1	
Hag_neg_4	BR33	0	C.BETULUS_12	0	
Hag_neg_5	BE16	0	TW2	0	
Hag_neg_7	BE22	0	C.BETULUS_9	0	
Hag_neg_8	BE2_BDO	0	BR36	0	
Hag_neg_9	BE8	1	BE18	2	
Hag_neg_10	BE1	0	BE21	0	
Hag_neg_11	BE12	0	C.BETULUS_2	0	
Hag_neg_12	ME1_VAR	0	BE8	0	
Hag_neg_13	BE1	0	BE21	0	
Hag_neg_14	BE21	0	C.BETULUS_10	0	
Hag_neg_15	BE22	0	E3_VAR	0	
<i>Positieve controle</i>					
Hag_pos_1	C.BETULUS_20	0	KL22_VAR	0	***
Hag_pos_2	C.BETULUS_12	0	BE18	0	
Hag_pos_3	C.BETULUS_21	0	C.BETULUS_23	0	***
Hag_pos_4	C.BETULUS_23	0	WE3_WVH	0	***
Hag_pos_5	BR36	0	BE18	1	***
Hag_pos_6	BE18	1	BR36	1	
Hag_pos_7	BE16	0	TW11	0	
Hag_pos_8	KL22_VAR	0	BE18	0	
Hag_pos_9	BE16	0	TW11	0	
Hag_pos_10	BE16	0	TW11	0	
Hag_pos_22	C.BETULUS_21	0	E4_VAR	0	***
Hag_pos_23	E4_VAR	0	BE18	0	
Hag_pos_24	BE27	0	TW7	0	
Hag_pos_11	BE8	0	BE1	1	
Hag_pos_12	BE1	0	TW6	0	
Hag_pos_13	BE8	0	BE3	1	
Hag_pos_14	BR36	0	C.BETULUS_8	0	***
Hag_pos_15	BR45_VAR	0	WE3_WVH	0	
Hag_pos_16	C.BETULUS_13	0	TW18	0	***
Hag_pos_17	BR44_VAR	0	C.BETULUS_21	0	***
Hag_pos_18	BR44_VAR	0	C.BETULUS_21	0	***
Hag_pos_19	BE27	1	BE5	1	
Hag_pos_20	BE3	0	C.BETULUS_10	0	
Hag_pos_21	BR44_VAR	0	C.BETULUS_21	0	***



Vervolgens voerden we een ouderschapsanalyses uit in Polygene V1.7 (Huang et al. 2020) (Tabel 16).

Ondanks de genetische gelijkenis tussen de ouderbomen en de negatieve controlestalen afkomstig uit Oost-Vlaanderen (Figuur 33 & 34), werd in de ouderschapsanalyse aan geen enkel negatief controlestaal met zekerheid een paar ouderbomen toegewezen. Dit geeft aan dat er geen ouderbomen zullen worden toegewezen aan zaailingen die niet van de zaadboomgaarden afkomstig zijn.

Bij de positieve controlestalen werd aan tien van de 24 stalen (42%) met zekerheid ouderbomen toegewezen. Voor de stalen afkomstig uit Beukenberg (Hag_pos_1 - 10 en Hag_pos_22 - 24) vonden we voor vijf van de 13 stalen (38%) met zekerheid ouderbomen. Voor de stalen afkomstig uit Eeuwenhout (Hag_pos_11 - 21) vonden we voor vijf van de elf stalen (45%) met zekerheid ouderbomen.

Haagbeuk is een octoploïd (8n). Dit zorgt ervoor dat er gemakkelijker amplificatie- en scoringsfouten optreden, waardoor ouderschapsanalyses moeilijker de juiste ouderparen kunnen aanduiden. In tegenstelling tot de methode die we gebruiken voor de diploïde soorten, kan bij deze methode geen technische fout worden aangegeven. Bovendien moet bij de ouderschapsanalyses voor de zaadboomgaarden rekening gehouden worden met een foutenmarge van 7,81% voor Eeuwenhout en 6,38% voor Meikensbossen doordat enkele ouderbomen niet in de DNA-databank zitten.

Bij de ouderschapsanalyses voor haagbeuk moet dus rekening gehouden worden met een lagere zekerheid. Wanneer aan een aantal individuen een ouderpaar kan worden aangewezen is het heel waarschijnlijk dat de individuen uit de zaadboomgaarden afkomstig zijn.

5.4 CONCLUSIE

- In totaal bevatten de twee geanalyseerde zaadboomgaarden 81 genotypes. In de zaadboomgaarden Eeuwenhout en Meikensbossen staan respectievelijk 59 en 44 genotypes.
- De DNA-databank kan voor haagbeuk gebruikt worden om de herkomst van bosplantsoen te traceren. Voor deze soort moet er echter rekening worden gehouden met een lagere zekerheid.

6 STEELIEP

6.1 SOORTENBESCHRIJVING

6.1.1 Ecologie

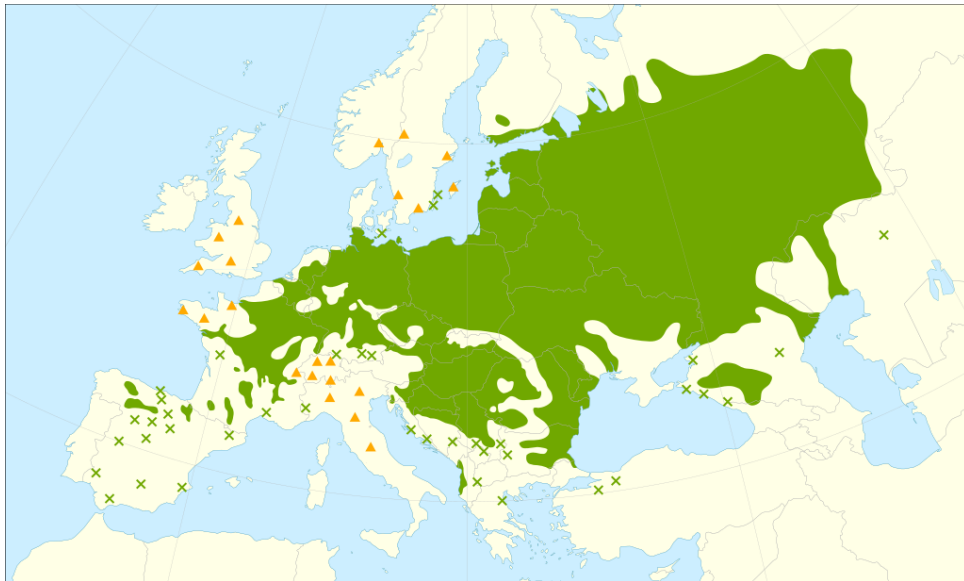
Steeleip of fladderiep (*Ulmus laevis*) komt vooral voor in Centraal- en Oost-Europa (Figuur 35). De soort is inheems maar zeer zeldzaam in Vlaanderen (Figuur 36, Van Landuyt et al. 2006). Steeleip komt typisch voor in hardhoutooibossen langs rivieren, maar kan ook op een matig droge, diepe bodem voorkomen (Collin 2003). Door indijking van de grote rivieren in Vlaanderen komen deze ooibossen echter slechts zeer beperkt voor in Vlaanderen. Ook buiten Vlaanderen komt steeleip vooral in kleine, gefragmenteerde populaties voor.

Steeleipen zijn eenhuizig en de bloemen zijn tweeslachtig (hermafrodiet), wat betekent dat een bloem zowel vrouwelijke als mannelijke organen heeft. De bloemen bloeien voor het uitlopen van de bladeren in de vroege lente en worden bevrucht via windbestuiving (Caudullo & de Rigo 2016).

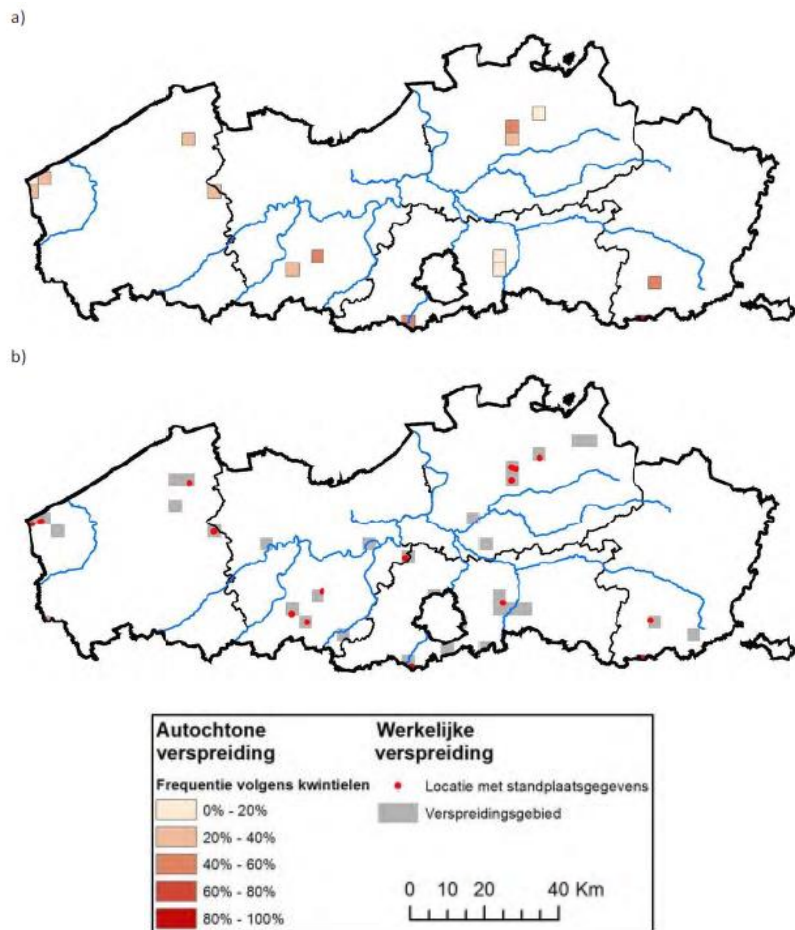
6.1.2 Waarde

Steeleip heeft een lage economische waarde door zijn lage houtdensiteit en zijn slechte kwaliteit voor brandhout (Collin 2003). Steeleip is echter minder vatbaar voor de olmenziekte dan gladde iep (*Ulmus minor*) en ruwe iep (*Ulmus glabra*) (Caudullo & de Rigo 2016; Collin 2002), die wel bekender zijn in Vlaanderen. De schimmel die de olmenziekte verwekt wordt door een schorskever van het genus *Scolytus* maar ook via het wortelgestel verspreid onder de bomen (Mittempergher & Santini 2004). De schorskever preferereert de bast van de gladde en ruwe iep waardoor de ziekte minder verspreid wordt onder de steeleipen.





Figuur 35 Het verspreidingsgebied van steelieep (*Ulmus laevis*) in Europa. (Bron: Euforgen, Caudullo et al. 2017)



Figuur 36 De autochtone (a) en werkelijke verspreiding (b) van steelieep (*Ulmus laevis*) in Vlaanderen. (Bron: Uyttenbroeck et al. 2014)

6.2 METHODE

6.2.1 Stalen

Voor het opstellen van de genetische profielen van autochtone steeliepen (*Ulmus laevis*) bemonsterden we in de lente van 2022 vier autochtone zaadboomgaarden (Tabel 17). In totaal verzamelden we 483 bladstalen. De bladstalen worden bewaard op silicagel.

Tabel 17 De bemonsterde autochtone zaadboomgaarden van steeliep met hun locatie en het aantal verzamelde bladstalen.

Zaadboomgaard	Gemeente	Code locatie	Aantal stalen
Vloethemveld	Zedelgem	1VB4630.1	55
Torrebos-Burkel	Maldegem	1VB4630.2	131
Zusterkloosterbos	Hasselt	1VB4630.3	181
Galgebos	leper	1VB4630.4	116

6.2.1.1 Geanalyseerde zaadboomgaarden

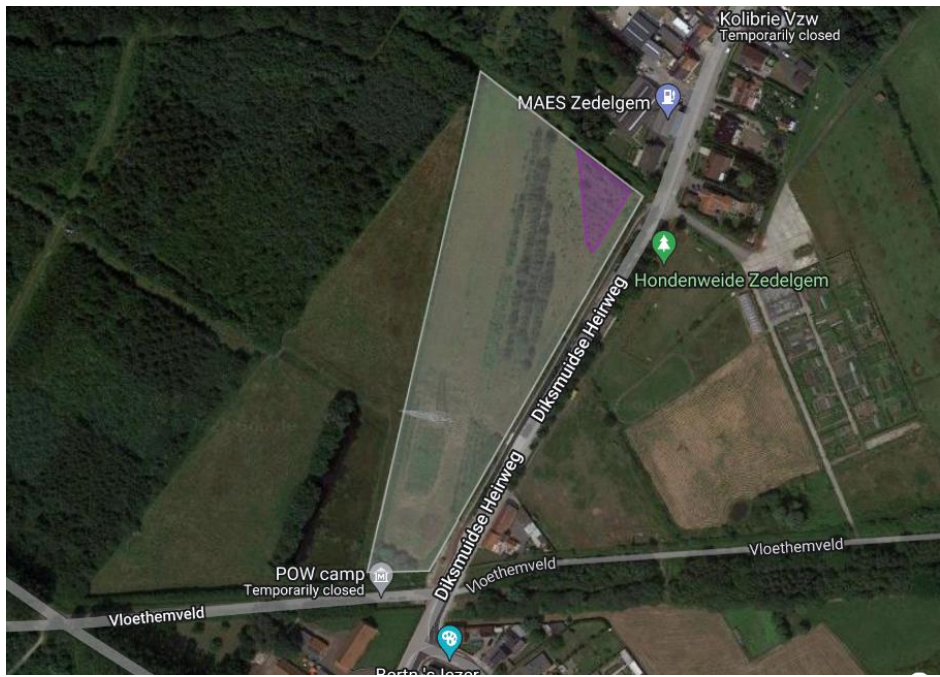
Hieronder staan de locaties van de geanalyseerde zaadboomgaarden ingekleurd op luchtfoto.



Figuur 37 Galgebos te leper (50°52'01,1"N 2°46'30,0"E). De locatie van de bemonsterde steeliepen is aangeduid in het paars.



Figuur 38 Torrebos-Burkel te Maldegem (51°09'28,0"N 3°25'49,7"E). De locatie van de bemonsterde steeliepen is aangeduid in het paars.



Figuur 39 Vloethemveld te Zedelgem (51°08'50,7"N 3°07'24,4"E). De locatie van de bemonsterde steeliepen is aangeduid in het paars.



Figuur 40 Zusterkloosterbos te Hasselt (50°55'26,5"N 5°14'38,9"E). De locatie van de bemonsterde steeliepen is aangeduid in het paars.

6.2.2 DNA-extractie

Per individu wogen we 25 à 30 mg bladmateriaal af. Het materiaal werd vervolgens fijngemalen met de Tissue Lyser II (Qiagen) gedurende 3 minuten bij 30 Hz. Voor de DNA-extractie van de bladstalen volgden we de stappen van de GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit van EURx nauwkeurig op. Het DNA werd finaal geëluëerd in 100 µl elutiebuffer. De DNA-stalen werden bewaard bij een temperatuur van -20 °C tot verdere analyses. Voor het bepalen van de fout op genotypering voerden we duplicaat DNA-extracties uit op tien bladstalen.

6.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

6.2.3.1 Gebruikte microsatellieten

In de literatuur zijn er slechts voor enkele loci microsatellieten terug te vinden voor steeliep. De genetische profielen van de individuen moeten echter uit voldoende loci bestaan zodat (nauw) verwante individuen van elkaar kunnen worden onderscheiden. Daarom lieten we voor steeliep nieuwe microsatellieten ontwikkelen door AllGenetics & Biology SL (www.allgenetics.eu), gebaseerd op sequentieanalyse van het DNA (Bijlage 3). Van deze ontwikkelde microsatellieten bleek slechts een tiental loci polymorf. Daarom selecteerden we ook microsatellieten die door het INBO reeds getest werden op polymorfisme.

In totaal gebruikten we 18 microsatellieten die in vier multiplexen (MP) werden ingedeeld via het programma Multiplex Manager 1.2 (Holleley & Geerts 2009) (Tabel 19). De primer-paren werden gelabeld met 5' fluorescente label primers (dyes: FAM, VIC, NED, PET).

6.2.3.2 PCR condities

De DNA-stalen werden verdund naar een concentratie van 10 ng/µl. Voor de amplificatie van de microsatellieten gebruikten we de QIAGEN Multiplex PCR kit met de volgende PCR condities: een initiële denaturatiestap gedurende 15 min. op 95 °C, 35 cycli van 30 s op 95 °C, 45 s op de locus-specifieke annealing temperatuur (TA, Tabel 19), en een extensiestap gedurende 45 s op 72 °C, tenslotte een elongatiestap gedurende 10 min. op 72 °C. Hiervoor werd een Biometra Thermocycler gebruikt. Het totale reactievolume bedroeg 10 µl bestaande uit 1 µl template

Tabel 19 Indeling van de 18 microsatellieten gebruikt voor *Ulmus laevis* in 4 multiplexen (MP) met de gevonden productgrootte (in baseparen), het aantal allelen gevonden voor het locus, de gebruikte concentratie (in μmol), de annealing temperatuur (TA) en de gebruikte fluorescente kleur. De PCR-producten van MP3 en MP4 (*) werden voor de fragmentanalyse in poolplex gelopen. Bronnen informatie microsatelliet merkers: Whiteley et al. (2003)^a, Zalapa et al. (2008)^b

MP	Locus	Forward primer	Reverse primer	Motief	Product-grootte (bp)	Aantal allelen	TA (°C)	Conc. (μM)	Kleur
1	AG_Ula_249	CCAAGTTGCCGAGAATTGAA	CACCTTTGACCTCCATCACC	AAC	103 - 107	3	63	0,20	FAM
1	AG_Ula_098	ACTGGGCGGTGAAATAATTG	GCACACGTGGACGTTGTATT	AG	180 - 184	4	63	0,20	FAM
1	AG_Ula_331	CACCAATGAGAAGCTGATGTG	TTTCTCGCGACTAATGGCTT	AAG	129 - 148	3	63	0,10	VIC
1	AG_Ula_479	GCTAACCACGAGCTCTAATTG	CTGCCACCTGTTTGGTCTTT	AAG	117 - 120	3	63	0,10	NED
1	AG_Ula_263	CAGACCAGTGCAAGATCGTC	GGAGGACAAATCCCAGAAGG	AAG	90 - 94	3	63	0,10	PET
1	Ulm3 ^a	TCCTGTTTCAGAGACATGCA	GGACCATCTCTTCGCTGTTGT	... (CAG)8 ... (CAG)10 ... (CAG)7	159 - 174	5	63	0,20	PET
2	AG_Ula_363	ATGGTCCACGAGGTGTGAAT	GTCCTAAACATGGCAGCGTG	AT	140 - 145	4	63	0,10	FAM
2	AG_Ula_411	GACCGGCAATCCAATCTCT	AGCTGAAGATTGGCAGTGAGA	AAG	188 - 194	4	63	0,10	FAM
2	AG_Ula_069	CACCACACCATTCTTCATGG	TCCAACGTGGTGAAGATGAG	ATCC	116	3	63	0,10	VIC
2	AG_Ula_277	TAATCCACCTCGACCTCTGG	CCGTACACATTCGGTAGATGC	AT	162	2	63	0,10	VIC
2	AG_Ula_056	GACCAAGTGGATTATTGCGG	CAAACCTCGAAGAGCGAGAC	AG	155 - 161	4	63	0,10	NED
2	Ulm2 ^a	GCGTCTCAGAACAACAGCTTCA	GGCTGCAAGATTGAACTTGAT	CAG	94 - 103	5	63	0,10	PET
2	AG_Ula_391	GATGGGTTGGTTTGACAT	TCTCCCATGGCTTCAATCTC	AC	139	2	63	0,10	PET
3	AG_Ula_386*	TGACATCTCAAGGATTGCCA	AATAACTTACCAGTCACGCGG	AT	115 - 124	6	61	0,10	VIC
3	UR175* ^b	TGCCAATTTGTTGAAATTTACG	TTGTTGGTTGTGGTTTGTGA	TGTA	119 - 232	5	61	0,20	VIC
3	UR188a* ^b	AAAACCTAACGCGTCCCTTCC	ATTTGCTTCAATTGCGAGT	AC	107 - 119	5	61	0,20	NED
4	Ulm19* ^a	ACAAGCATCCTTTATACACAC	TCTATCTCTTCAATTTCTG	(CA)13 ... (CA)3(TG)4	262 - 277	7	54	0,20	FAM
4	Ulm6* ^a	CCTTCATGATTGCAATCGGTA	ACAATAATCGTAACCATCTT	CA	153 - 155	4	54	0,20	PET



6.2.5.2 Genetische diversiteit

Met het R-pakket *adegenet* 2.1.10 (Jombart 2008), in het programma R v4.4.0 (R Core Team, 2024), berekenden we de volgende diversiteitsparameters: gemiddeld aantal geobserveerde allelen per locus (N_a), de gemiddelde geobserveerde heterozygositeit (H_o), Nei's verwachte heterozygositeit (H_e), en de gemiddelde inteeltcoëfficiënt (F_{IS}). We gebruikten de rarefactie methode van het programma HP-Rare v1.0 (Kalinowski 2005) om het gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) gecorrigeerd voor het minimum aantal gegenotypeerde individuen per locus (14 individuen per zaadboomgaard, 144 algemeen), te berekenen. Met het programma ADZE 1.0 (Szpiech et al. 2008) stelden we een rarefaction curve op. Voor de parameter Max_G werd dezelfde waarde gebruikt als we voor het berekenen van de A_r gebruikt hebben ($2 * 14 = 28$ G).

Deze analyses voerden we uit, ter vergelijking, met en zonder loci waarvoor we een hoge frequentie nul-allelen vonden. Alle berekende diversiteitsparameters waren gelijkaardig tussen beide datasets. Voor de volgende resultaten werd de data van alle loci gebruikt.

6.2.5.3 Ouderschapsanalyses

Om de bruikbaarheid van de genetische dataset te testen verzamelden we twee soorten controlestalen. Voor de negatieve controle verzamelden we 15 stalen van zaden met een Nederlandse herkomst (Roggebotzand 01). Voor de positieve controle verzamelden we 15 stalen van zaailingen afkomstig uit zaden van de zaadboomgaard Galgebos.

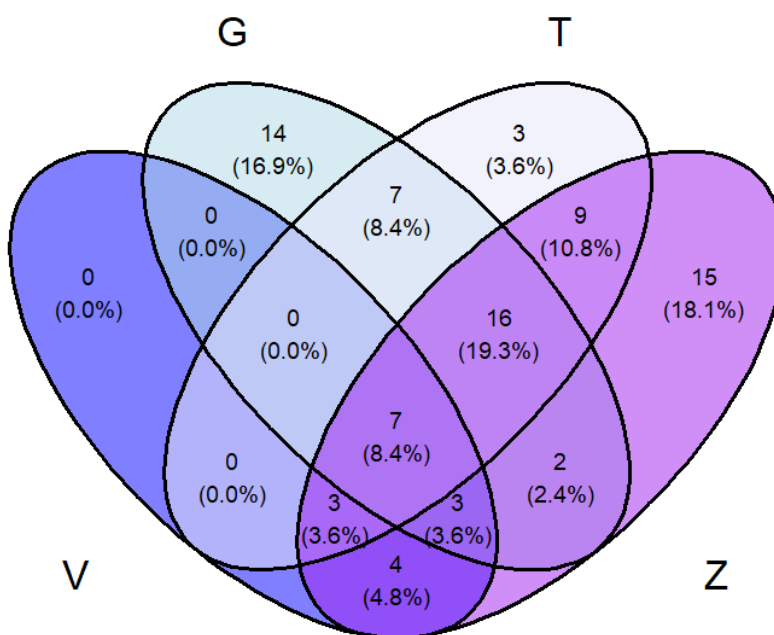
We voerden eerst een verkennende DAPC (discriminant analysis of principal components) uit via het R-pakket *adegenet* 2.1.10 (Jombart 2008) via het R-script beschreven in Jenkins (2020). Deze analyse geeft ons een idee over hoe sterk de genotypes van controlestalen lijken op de genotypes uit de databank met de ouderbomen.

Via een ouderschapstest wordt er nagegaan of er ouderbomen kunnen worden toegewezen aan de controlestalen. Met het programma Colony V2.0.6.6 (Jones & Wang 2010) voerden we ParentPair analyses uit. In deze analyse wordt er naar een mogelijke vader- en moederboom gezocht. Bij de resultaten wordt rekening gehouden met mogelijke mismatches tussen de ouderbomen en hun nakomelingen. Mismatches kunnen namelijk ook ontstaan door technische fouten (geen amplificatie, error in het scoren van de allelen... zie 6.2.5.1). We voerden twee analyses uit met telkens een verschillende kans op technische fout: 0,02 en 0,05. Een technische fout van 0,05 laat meer mismatches tussen ouders en nakomelingen toe. Voor de genotypes van de mogelijke vaders en moeders gebruikten we de unieke genotypes van de zaadboomgaard Galgebos. We liepen 10 runs per analyse en stelden de kans op het vinden van een vader of moeder telkens in op 0,5.

6.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

6.3.1 Aanwezige genotypes

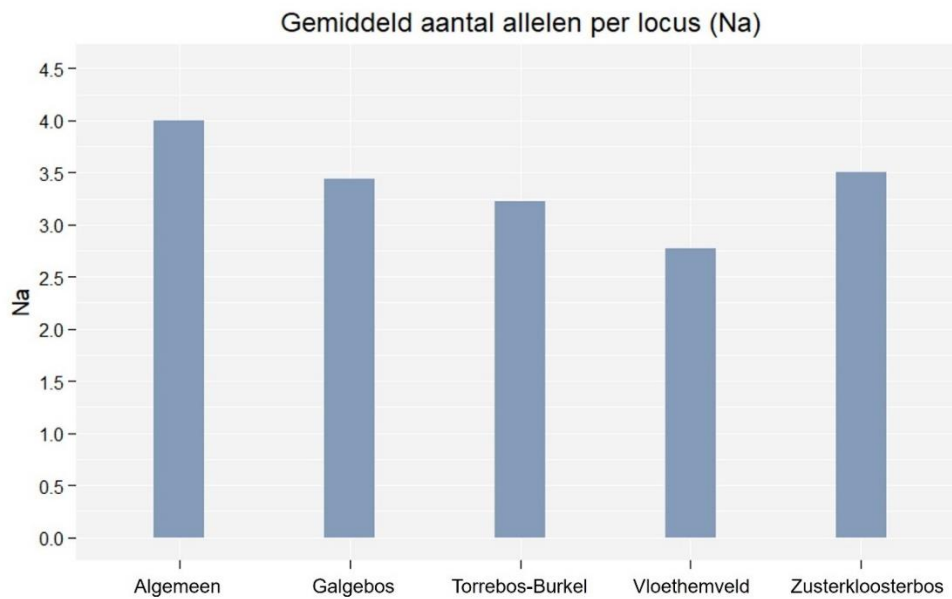
In totaal bevatten de zaadboomgaarden 83 genotypes van steeliep. In de zaadboomgaarden Vloethemveld, Torrebos-Burkel, Zusterkloosterbos en Galgebos staan respectievelijk 17, 45, 59 en 49 genotypes. (Bijlage 1.4). Heel wat genotypes zijn in verschillende zaadboomgaarden aanwezig. De zaadboomgaard Vloethemveld bevat geen genotypes die uniek zijn voor die zaadboomgaard (Figuur 41).



Figuur 41 Venn-diagram van de verdeling van de aanwezige steeliep genotypes. Het percentage geeft de genotypes per hok ten opzichte van het totaal aantal gevonden genotypes weer. V = Vloethemveld, G = Galgebos, T = Torrebos-Burkel, Z = Zusterkloosterbos.

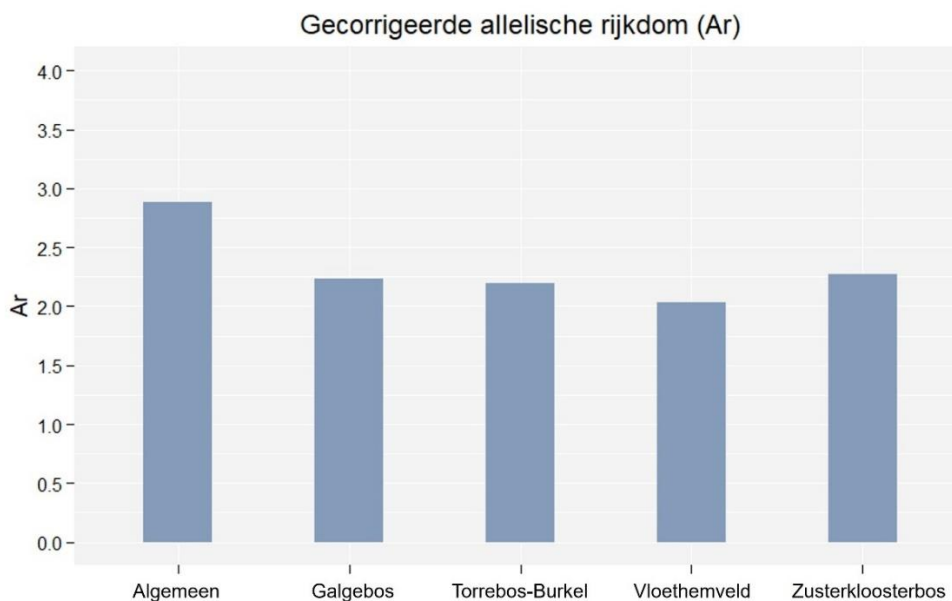
6.3.2 Genetische diversiteit

In totaal werden er slechts 71 allelen (N_a) geobserveerd. Tussen de loci varieert het aantal allelen over alle zaadboomgaarden van 2 tot 7 allelen per locus (Tabel 19), met een gemiddelde van 4 allelen per locus. N_a is gelijkaardig tussen de locaties, en varieert tussen een gemiddelde van 2,78 en 3,61 allelen per locus met een gemiddelde van 3,25 over alle zaadboomgaarden (Figuur 42). Deze N_a is zeer laag ten opzichte van de andere soorten in deze studie.



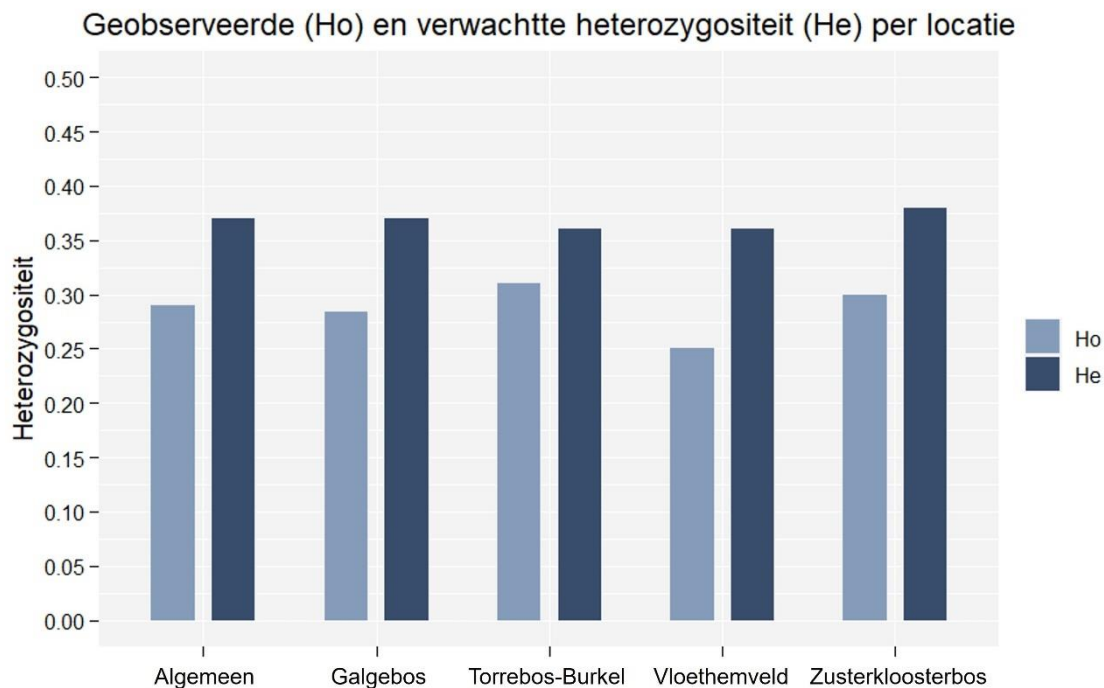
Figuur 42 Vergelijking van het gemiddeld aantal allelen per locus (N_a) per locatie. ‘Algemeen’ is de N_a van alle zaadboomgaarden samen.

Net zoals het gemiddeld aantal allelen per locus, is het gecorrigeerd gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) binnen de zaadboomgaarden en in het algemeen ook laag (Figuur 43). In Vloethemveld vonden we de laagste allelische rijkdom. A_r varieert tussen 2,03 en 2,27 en heeft over alle zaadboomgaarden een waarde van 2,82.



Figuur 43 Vergelijking van het gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) per locatie. ‘Algemeen’ is de A_r van alle zaadboomgaarden samen.

De geobserveerde heterozygositeit (H_o) varieert tussen de loci van 0,00 tot 0,67 per locus met een gemiddelde van 0,29. Twee van de 18 loci zijn monomorf. De verwachte heterozygositeit (H_e) varieert tussen de loci van 0,05 tot 0,70 per locus met een gemiddelde van 0,37. H_o en H_e zijn gelijkaardig tussen de locaties (Figuur 44). De gemiddelde H_o varieert tussen 0,25 en 0,31 per locus. De gemiddelde H_e varieert tussen 0,36 en 0,38 per locus.



Figuur 44 Vergelijking van de geobserveerde (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e) per locatie. ‘Algemeen’ is het gemiddelde van alle zaadboomgaarden samen.

De verwachte heterozygositeit (H_e) en allelische rijkdom (A_r) zijn indicatoren voor de genetische diversiteit binnen een populatie, in dit geval binnen de zaadboomgaarden. Omdat de steeliep zeldzaam is in Vlaanderen, is het niet verrassend dat de genetische diversiteit in onze zaadboomgaarden laag is. Een hoge genetische variatie binnen een populatie is echter zeer belangrijk voor het aanpassingsvermogen van de populatie aan een veranderend klimaat. Voor deze soort is het dus nog meer van belang dat van zoveel mogelijk genotypes zaden verzameld worden bij de oogst.

Op alle locaties is er indicatie voor inteelt. De geschatte gemiddelde waarde voor de inteelt coëfficiënt F_{IS} (gemiddelde \pm sd) is over alle zaadboomgaarden $0,21 \pm 0,22$; voor Vloethemveld $0,30 \pm 0,31$; voor Galgebos $0,24 \pm 0,19$; voor Torrebos-Burkel $0,15 \pm 0,19$ en voor Zusterkloosterbos $0,24 \pm 0,21$. Deze waarden zijn echter niet significant.

De genetische diversiteit in de geanalyseerde zaadboomgaarden is vergelijkbaar met de genetische diversiteit van natuurlijke populaties in Europa (Tabel 20). Dit reflecteert ook het gefragmenteerd voorkomen van de soort binnen Europa.



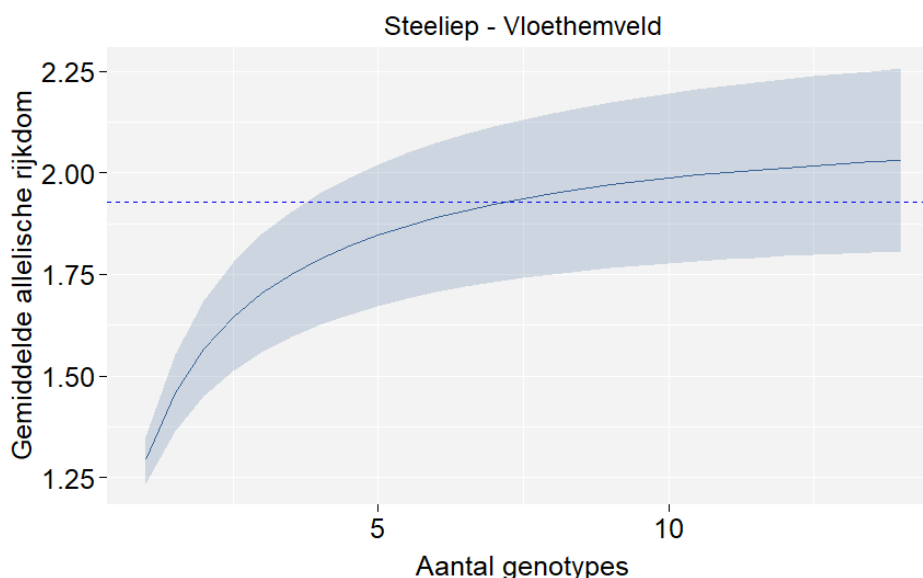
Tabel 20 Het aantal geanalyseerde individuen/genotypes (N), de gemiddelde allelische rijkdom (Ar), geobserveerde heterozygositeit (Ho) en verwachte heterozygositeit (He) van de geanalyseerde boomgaarden en natuurlijke populaties in Europa.

Locatie	N	Ar	Ho	He	Bron
Geanalyseerde zaadboomgaarden	78	2,82	0,29	0,37	
Polen	1672	4,0	0,64	0,55	Litkowiec et al. 2022
Denemarken	91	2,75	0,54	0,55	Nielsen & Kjær 2010
Nederland	20	2,14	0,56	0,50	Nielsen & Kjær 2010

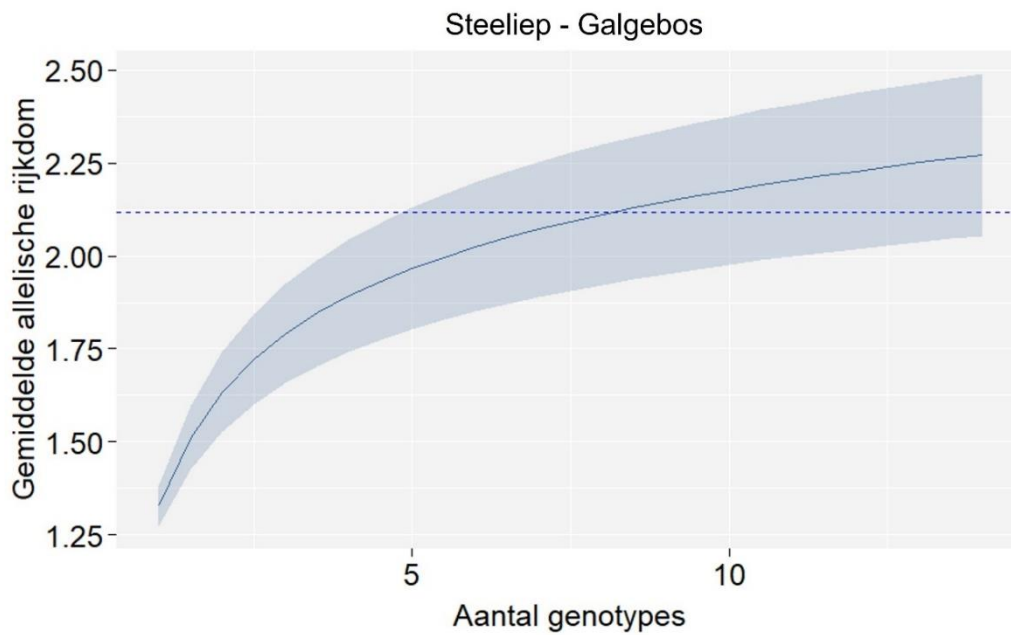
De allelische rijkdom binnen Vloethemveld is lager dan in de andere zaadboomgaarden. Het aantal genotypes dat nodig is om een 95% van allelische rijkdom te behouden, bv. bij de aanleg van een nieuwe zaadboomgaard met vegetatieve vermeerdering is hier minstens zeven. De allelische rijkdom in de andere zaadboomgaarden is gelijkaardig aan elkaar, en om 95% van de berekende allelische rijkdom te behouden, moeten er minstens negen verschillende genotypes gebruikt worden (Tabel 21; Figuur 45-48, intercept blauwe lijn). Omdat de genetische diversiteit binnen deze soort over het algemeen laag is, worden best zo veel mogelijk genotypes meegenomen.

Tabel 21 95% van de berekende allelische rijkdom (Ar) en het aantal genotypes nodig om deze genetische diversiteit te bereiken per locatie.

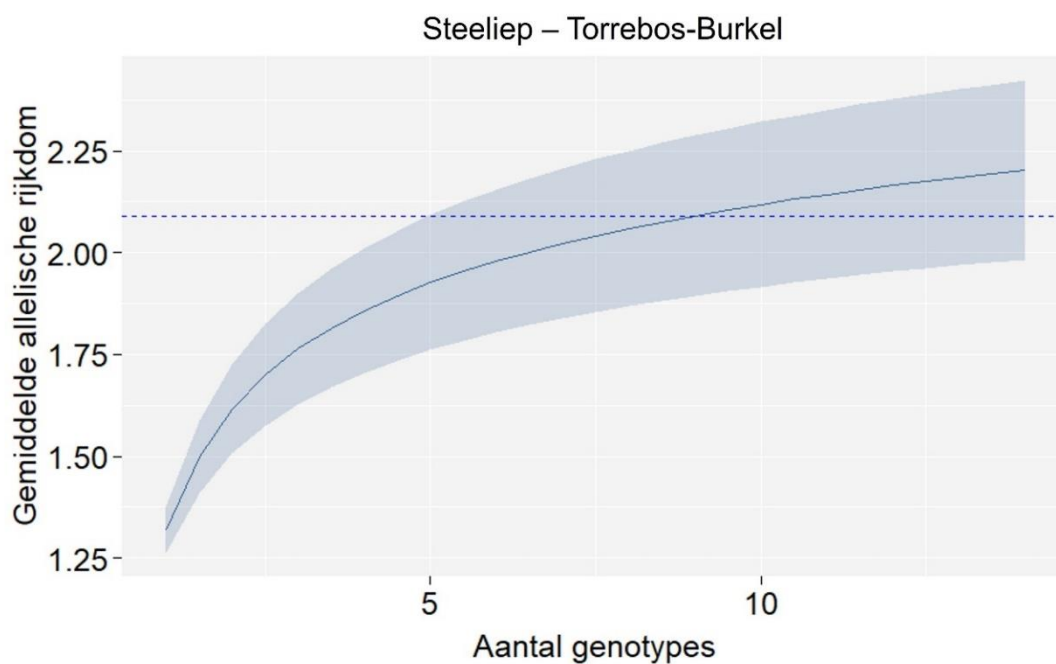
Locatie	Ar	95% Ar	# genotypes
Vloethemveld	2,03	1,93	7
Galgebos	2,23	2,12	9
Torrebos-Burkel	2,20	2,09	9
Zusterkloosterbos	2,27	2,16	10



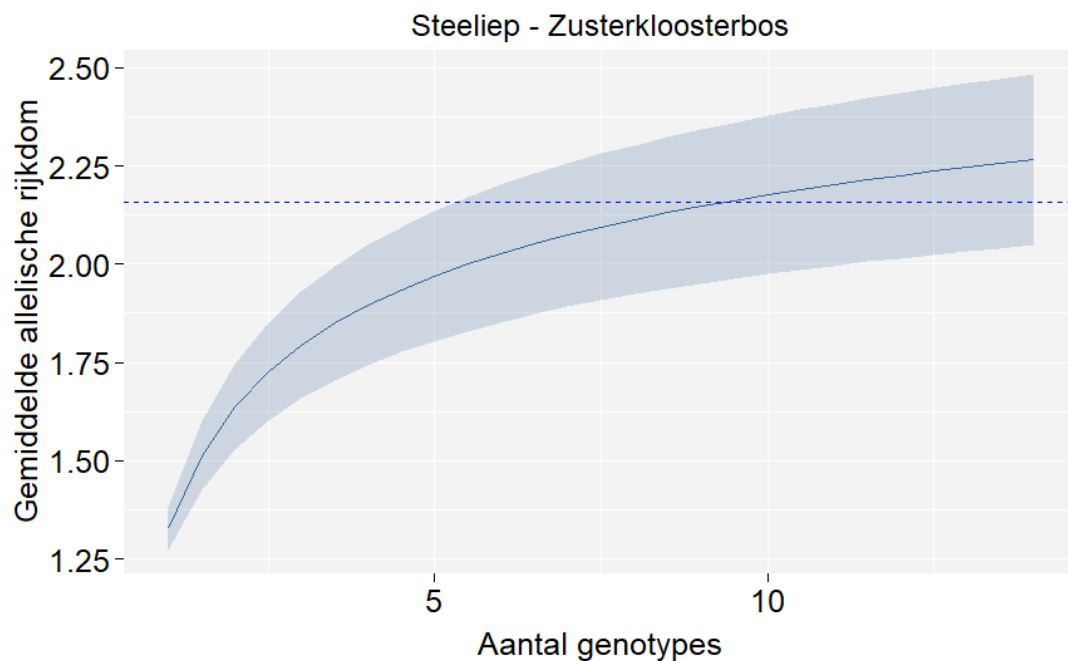
Figuur 45 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (Ar) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Vloethemveld. De blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.



Figuur 46 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Galgebos. De blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.



Figuur 47 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Torrebos-Burkel. De blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.



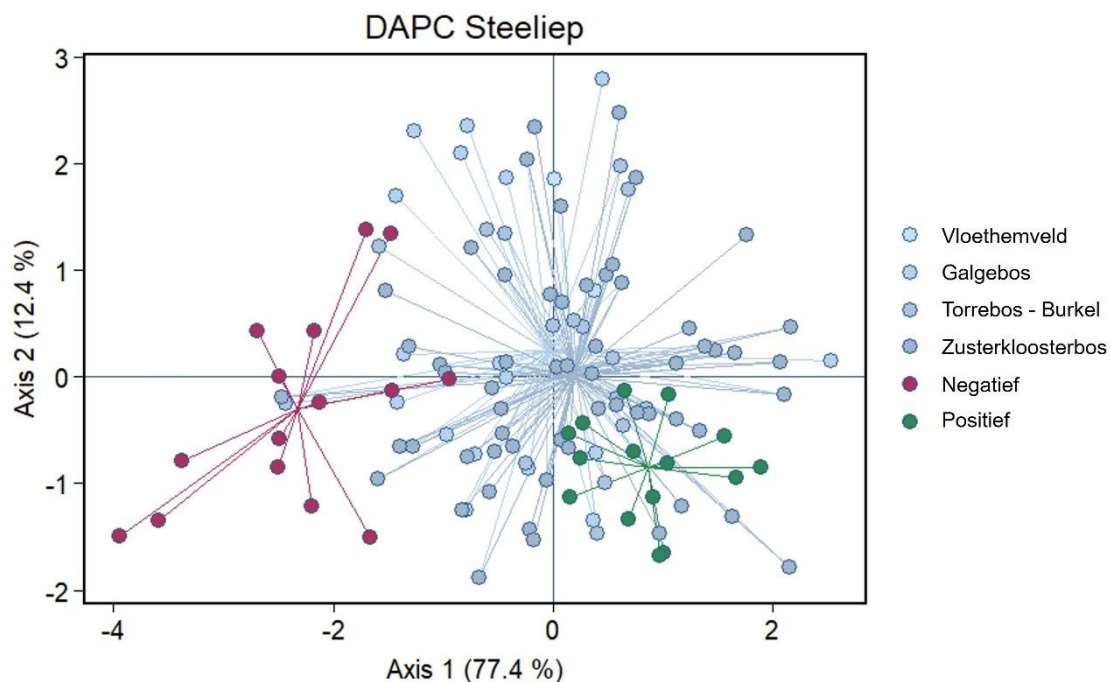
Figuur 48 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Zusterkloosterbos. De blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.

6.3.3 Ouderschapsanalyses

De DAPC plot toont hoe sterk de genotypes van controlestalen lijken op de genotypes die aanwezig zijn de zaadboomgaarden van steeliep.

Op figuur 49 zien we dat de groep van de positieve controlestalen sterk overlapt met de groep genotypes van de ouderbomen. De groep van de negatieve controlestalen overlapt deels met de groep van de ouderbomen, ondanks de Nederlandse herkomst van deze controlestalen. Waarschijnlijk is dit te wijten aan de over het algemeen lage genetische diversiteit binnen de soort.





Figuur 49 DAPC plot voor steelieep. De genotypes uit de zaadboomgaarden (Vloethemveld, Galgebos, Torrebos-Burkel en Zusterkloosterbos) zijn aangeduid in het blauw, de genotypes van de negatieve controlestalen zijn aangeduid in het rood, de genotypes van de positieve controlestalen zijn aangeduid in het groen.

Vervolgens voerden we een ouderschapsanalyse uit in Colony (Jones & Wang 2010). Deze analyse werd twee keer uitgevoerd, waarbij we de toelating van technische fouten de eerste streng (0,02; Tabel 12) en de tweede keer iets toegevender (0,05; Tabel 12) instelden.

Tabel 22 Resultaat van de ParentPair analyse in Colony met een technische fout van 0,02 (links) en 0,05 (rechts). In een rij waarin geen ouderboom werd aangeduid (-), wordt aangegeven wat de kans is dat de ouderbomen niet in de databank zitten. Prob. = probability of waarschijnlijkheid. Een Prob. = 1 is een waarschijnlijkheid van 100%.

Staal	Mogelijke ouderbomen	Prob.	Mogelijke ouderbomen	Prob.
	Technische fout: 0,02		Technische fout: 0,05	
<i>Negatieve controle</i>				
St_neg_1	- SH2	0,5416 0,4584	-	1
St_neg_2	-	1	-	1
St_neg_3	-	1	- GE7_VAR & -	0,9889 0,0111
St_neg_4	-	1	- HAL5/6 & - GE7_VAR & -	0,9626 0,0207 0,0111
St_neg_5	-	1	-	1
St_neg_6	-	1	-	1
St_neg_7	-	1	- HAL5/6 & -	0,8024 0,1343

			HAL8_BDW & -	0,0632
St_neg_8	-	1	-	0,9983
St_neg_9	-	1	-	1
St_neg_10	-	1	-	1
St_neg_11	-	1	-	1
St_neg_12	-	1	-	1
St_neg_13	-	1	- HAL5/6 & - HAL8_BDW	0,8024 0,1343 0,0632
St_neg_14	-	1	-	1
St_neg_15	-	1	- HAL5/6 HAL8_BDW	0,8024 0,1343 0,0632
<i>Positieve controle</i>				
St_pos_1	SH10 & -	1	RU1_BDO & -	0,999
St_pos_2	RU1_BDO & SH2	1	RU1_BDO & SH2	1
St_pos_3	SH6 & -	0,9894	SH6 & -	0,9954
St_pos_4	SH6 & -	0,9894	SH6 & -	0,9954
St_pos_5	SH6 & -	0,9894	SH6 & -	0,9954
St_pos_6	RU1_BDO & SH2	1	RU1_BDO & SH2	1
St_pos_7	SH10 & -	1	RU1_BDO & - SH10 & -	0,9189 0,0801
St_pos_8	HE46 & - HE46 & HE43_BDO	0,8532 0,1468	HE46 & HE43_BDO HE46 & -	0,9715 0,0285
St_pos_9	RU1_BDO & SH2	1	RU1_BDO & SH2	1
St_pos_10	RU1_BDO & SH2	1	RU1_BDO & SH2	1
St_pos_11	HE46 & -	1	HE46 & HE43_BDO HE46 & -	0,6584 0,3416
St_pos_12	SH10 & -	1	SH10 & -	0,9990
St_pos_13	HE46 & - HE46 & HE43_BDO	0,8532 0,1468	HE46 & HE43_BDO HE46 & -	0,9715 0,0258
St_pos_14	SH10 & -	0,9964	SH10 & -	0,9990
St_pos_15	SH10 & -	1	SH10 & -	0,9990

Ondanks de genetische gelijkheid tussen de ouderbomen en de negatieve controlestalen (Figuur 49), werd in beide ouderschapsanalyses aan geen enkel negatief controlestaal met hoge waarschijnlijkheid een ouderboom toegewezen.

Voor het staal St_neg_1 is bij de analyse met de lage technische fout (0,02) de kans dat er wel een ouderboom in de DNA-databank zit bijna even groot als de kans dat er geen aanwezig is. Maar in de analyse met de hogere technische fout (0,05) wordt er met zeer hoge waarschijnlijkheid geen ouderboom toegewezen.

Voor de andere negatieve controlestalen werden er met hoge waarschijnlijkheid geen ouderbomen gevonden in de analyse met de lage technische fout (0,02). In de analyses met de hogere technische fout (0,05) was de kans om geen ouderboom te vinden telkens veel groter (>

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

0,8) dan de kans dat het staal wel van de zaadboomgaard afkomstig was. Hierdoor zijn we zeker dat de negatieve controlestalen inderdaad niet uit de zaadboomgaard afkomstig zijn.

De zaden voor de positieve controlestalen werden in de zaadboomgaard Galgebos verzameld. In zowel de ouderschapsanalyse met de lage (0,02) als de hogere technische fout (0,05) vonden we voor elk individu één of meerdere ouderbomen met een zeer hoge waarschijnlijkheid. Over deze stalen kunnen we dus met zekerheid zeggen dat ze afkomstig zijn uit de zaadboomgaard.

6.4 CONCLUSIE

- In totaal bevatten de vier geanalyseerde zaadboomgaarden 83 genotypes van steeliep. In de zaadboomgaarden Vloethenveld, Torrebos-Burkel, Zusterkloosterbos en Galgebos staan respectievelijk 17, 45, 59 en 49 genotypes.
- Door de zeldzaamheid en gefragmenteerde verspreiding van de soort is het niet verrassend dat alle steeliep zaadboomgaarden een vrij lage genetische diversiteit bevatten. Deze is wel te vergelijken met de genetische diversiteit in andere Europese populaties. Om 95% van de gemiddelde allelische rijkdom van een zaadboomgaard te behouden zijn er minstens zeven genotypes nodig.
- Door de lage genetische diversiteit is het voor deze soort uiterst belangrijk dat er bij zaadoogst van zoveel mogelijk genotypes zaden verzameld worden.
- De DNA-databank kan voor steeliep gebruikt worden om de herkomst van bosplantsoen te traceren.

7 ZOMERLINDE

7.1 SOORTENBESCHRIJVING

7.1.1 Ecologie

Zomerlinde (*Tilia platyphyllos*) komt vooral in Midden- en Zuid-Europa voor (Figuur 50). Deze inheemse soort kwam vroeger vrij algemeen voor in bossen, maar tegenwoordig is de autochtone verspreiding van zomerlinde in Vlaanderen zeer beperkt (Figuur 51). Zomerlinde komt van nature vooral voor in hellingbossen, en gedijt goed op leemgrond, maar kan ook op zanderige grond voorkomen (Svejgaard Jensen 2003).

Zomerlindes zijn eenhuizig en de bloemen zijn tweeslachtig (hermafrodiet), wat betekent dat een bloem zowel vrouwelijke als mannelijke organen heeft. De bloemen bloeien in juni – juli (iets vroeger dan winterlinde), en worden door insecten bevrucht (Eaton et al. 2016).

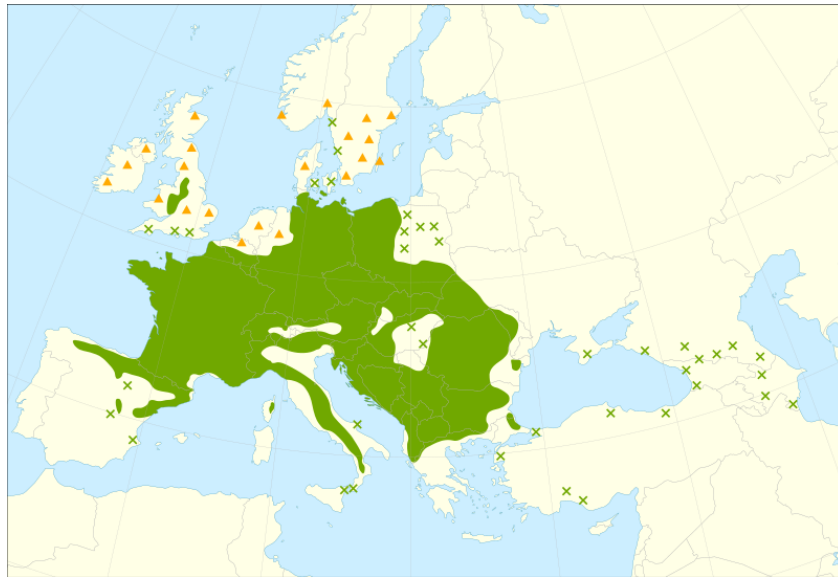
7.1.2 Waarde

Het hout van zomerlinde is sterk maar goed bewerkbaar en wordt al eeuwen gebruikt om in te kerven, maar ook om onder andere muziekinstrumenten te maken. Verder worden lindes vooral langs straten aangeplant, om grote lindelanen te aan te leggen (Eaton et al. 2016).

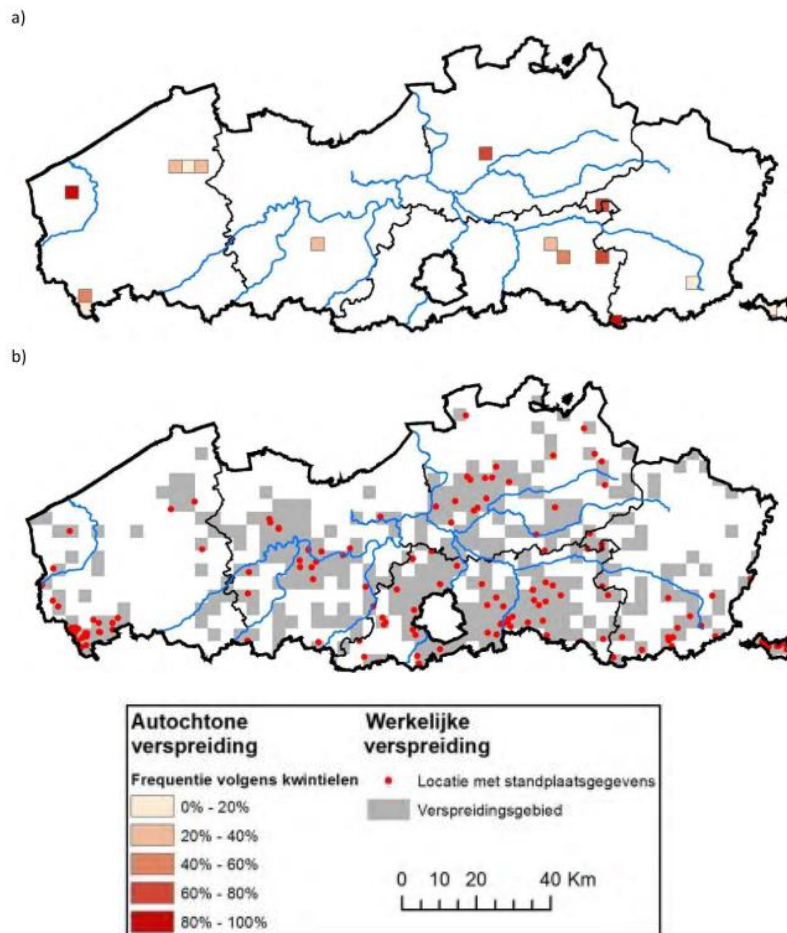
7.1.3 Hybridisatie

Waar zomerlinde en winterlinde (*Tilia cordata*) natuurlijk samen voorkomen in Europa komt ook de hybride *Tilia x europaea* voor. Hoewel de hybride in het wild vrij zeldzaam is (Phuekvilai 2014), wordt *T. x europaea* veeltalig aangeplant in noordwest Europa als sierboom in onder andere parken en lanen (Pigott 2012). Op basis van morfologie werden verschillende klonen van *T. x europaea* beschreven (Pigott 1992; Pigott 2012) waaronder *T. x europaea* 'Pallida' ('Koningslinde') en *T. x europaea* 'Zwarte linde'.





Figuur 50 Het verspreidingsgebied van zomerlinde (*Tilia platyphyllos*) in Europa. (Bron: Euforgen, Caudullo et al. 2017)



Figuur 51 De autochtone (a) en werkelijke verspreiding (b) van zomerlinde (*Tilia platyphyllos*) in Vlaanderen. (Bron: Uyttenbroeck et al. 2014)

7.2 METHODE

7.2.1 Stalen

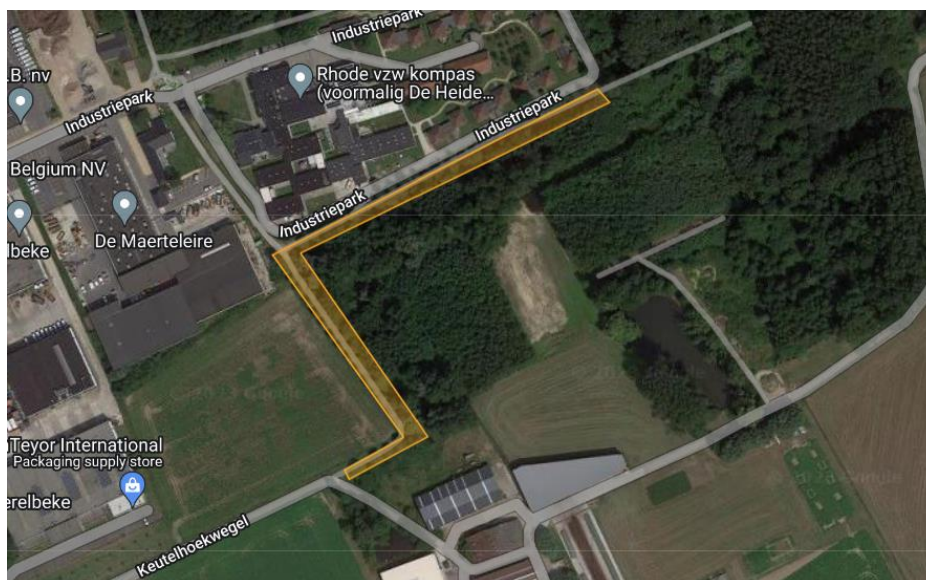
Voor het opstellen van de genetische profielen van autochtone zomerlindes (*Tilia platyphyllos*) bemonsterden we in de lente van 2022 twee autochtone zaadboomgaarden (Tabel 23). In totaal verzamelden we 128 bladstalen. De bladstalen worden bewaard op silicagel.

Tabel 23 De bemonsterde autochtone zaadboomgaarden met hun locatie en het aantal verzamelde bladstalen.

Zaadboomgaard	Gemeente	Code locatie	Aantal stalen
Keutelhoek	Merelbeke	1VB4391.1	51
Scherpenberg	Heuvelland	1VB4391.2	77

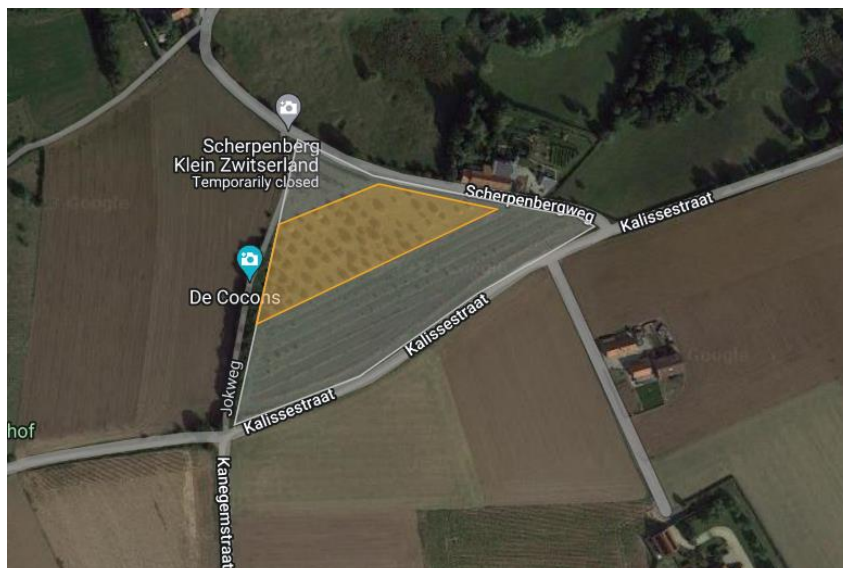
7.2.1.1 Geanalyseerde zaadboomgaarden

Hieronder staan de locaties van de geanalyseerde zaadboomgaarden ingekleurd op luchtfoto.



Figuur 52 Keutelhoek te Merelbeke (50°59'11,4"N 3°46'13,5"E). De locatie van de bemonsterde zomerlindes is aangeduid in het oranje.





Figuur 53 Scherpenberg te Heuvelland (50°47'30,3"N 2°47'01,0"E). De locatie van de bemonsterde zomerlindes is aangeduid in het oranje.

7.2.2 DNA-extractie

Per individu wogen we 25 à 30 mg bladmateriaal af. Het materiaal werd vervolgens fijngemalen met de Tissue Lyser II (Qiagen) gedurende 3 minuten bij 30 Hz. Voor de DNA-extractie van de bladstalen volgden we de stappen van de GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit van EURx nauwkeurig op. Het DNA werd finaal geëluëerd in 100 µl elutiebuffer. De DNA-stalen werden bewaard bij een temperatuur van -20 °C tot verdere analyses. Voor het bepalen van de fout op genotypering voerden we duplicaat DNA-extracties uit op tien bladstalen.

7.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

7.2.3.1 Gebruikte microsatellieten

In totaal gebruikten we 15 microsatellieten die in drie multiplexen (MP) werden ingedeeld via het programma Multiplex Manager 1.2 (Holleley & Geerts 2009) (Tabel 24). De primer-paren werden gelabeld met 5' fluorescente label primers (dyes: FAM, VIC, NED, PET).

7.2.3.2 PCR condities

De DNA-stalen werden verdund naar een concentratie van 10 ng/µl. Voor de amplificatie van de microsatellieten gebruikten we de QIAGEN Multiplex PCR kit met de volgende PCR condities: een initiële denaturatiestap gedurende 15 min. op 95 °C, 35 cycli van 30 s op 95 °C, 45 s op de locus-specifieke annealing temperatuur (TA, Tabel 24), en een extensiestap gedurende 45 s op 72 °C, tenslotte een elongatiestap gedurende 10 min. op 72 °C. Hiervoor werd een Biometra Thermocycler gebruikt. Het totale reactievolume bedroeg 10 µl bestaande uit 1 µl template DNA, 5 µl QIAGEN multiplex Master mix (hotstart), primers (forward met label) in verschillende concentraties (Tabel 24) en DEPC water (UltraPure™ Water behandeld met 0,1% diethylpyrocarbonaat) tot een volume van 10 µl.

Voor het bepalen van de fout op genotypering voerden we één tot vier onafhankelijke replicaat PCR-amplificaties van zes DNA-stalen uit.

Tabel 24 Indeling van de 15 microsatellieten gebruikt voor *Tilia platyphyllos* in 3 multiplexen (MP) met de gevonden productgrootte (in baseparen), het aantal allelen gevonden per locus, de gebruikte concentratie (in μmol), de annealing temperatuur (TA) en de gebruikte fluorescente kleur. Bron informatie microsatelliet merkers: Phuekvilai & Wolff (2013).

MP	Locus	Forward primer	Reverse primer	Motief	Product-grootte (bp)	Aantal allelen	TA (°C)	Conc. (μM)	Kleur
1	Tc920	AAATGTCTTCAGAGTGACTAGATGG	TGCCTCATTATTCTCCTAATTCTC	(AG)12	216 - 236	7	54	0,20	FAM
1	Tc918	AACGGCTAATTACTCCTAGTTTCG	TGTTCTCAGCTCACTACTACCTTTTAC	(AG)12	228 - 230	2	54	0,20	VIC
1	Tc937	AGCCAACCAACTTTTACAATACAG	AGATAAAAGCACATAAATCGATGG	(GA)13	148 - 167	10	54	0,20	NED
1	Tc6	CCATATCTTCTGCCAGTTTTCC	GGACTAATTTCTTCTTTTATTAGGC	T6(GT)12	127 - 145	11	54	0,20	PET
1	Tc7	TTTACTTTTGCCAGTTGTGAGG	CACCTAGAATGCCTCCTATTCG	(GA)13	218 - 263	13	54	0,20	PET
2	Tc31	TTTGCAAAGACTACTCCAAGAATC	AAATCGATGGTCAAGAATAAATC	(CT)16	192 - 212	10	54	0,20	FAM
2	Tc8	CGAAGAACTGTCAAACAACG	AGCTGGGTTTTAGAGGATAGGG	(GA)12	140 - 170	12	54	0,10	VIC
2	Tc943	ATTCATCTTCTCTAAAGCCTTG	GGGAAAGCCTGTGTTAGTTTC	(AC)9(TC)2	142 - 144	3	54	0,20	NED
2	Tc5	TTTTCATACATTTAGAGACTTTTAGCA	TGCATGATTTGTATGTTTAGGG	(GA)2(GT)15(AG)4	141 - 178	15	54	0,20	PET
2	Tc4	ATTTTAGAATGCCAACCTGCTAAG	TATTGAAGTCCATTTCCAATTGTC	(AG)13	219 - 236	14	54	0,20	PET
3	Tc927	AGTCTCCTGTCAAATGCTG	ATCACACTCGTTTATGACATCTTG	(CA)10	140 - 188	14	54	0,10	FAM
3	Tc951	TGTTATGACCTCACTTATAACCAAGT	GGGTGAGCTGACAATATAGAAGAG	(CT)11	150 - 172	5	54	0,20	VIC
3	Tc11	AGCTATGAAAGAAGTATCAAGAGAAAG	CCCCAAGACATTGCAGTAGAAC	(AG)10	140 - 154	6	54	0,10	NED
3	Tc963	CTAACCCATTCTCTTTAATTCTG	GCTTTCATTTTCAGTTTTCTCTAC	(CT)12	227 - 279	17	54	0,20	NED
3	Tc915	ACATCGATTGTATTTCCCTTAAC	GTTGTATTTTGCCTTAACATTG	(AG)13	144 - 193	15	54	0,20	PET



7.2.4 Fragmentanalyse

De PCR producten werden op een ABI 3500 genetic analyzer (Thermo Fisher) gelopen met de GeneScan 600 LIZ standaard (Applied Biosystems). We verdunden de PCR producten van elke MP in een verhouding van 1:50 alvorens ze op de ABI werden gelopen. Vervolgens analyseerden we de stalen met het programma Geneious Prime 2019.3.2 (<https://www.geneious.com>).

7.2.5 Dataverwerking

7.2.5.1 Analyses loci

In totaal bepaalden we voor **128 individuen** een genetische profiel aan de hand van 15 microsatellieten. Na het vergelijken van de genetische profielen vonden we in totaal **47 genotypes**.

Tabel 25 Overzicht van het aantal individuen en genotypes per zaadboomgaard van zomerlinde.

Zaadboomgaard	Code locatie	Aantal individuen	Aantal genotypes
Keutelhoek	1VB4391.1	51	38
Scherpenberg	1VB4391.2	77	34

Voor de volgende genetische analyses werden enkel de genetische profielen van de unieke genotypes gebruikt.

De totale dataset heeft 0,78% ontbrekende data Gebaseerd op de duplicaat extracties en replicaat PCR-amplificaties vonden we een gemiddelde fout op genotypering van 0,00%. Ondanks de ontbrekende data kon van elk zomerlinde individu een genotype bepaald worden.

7.2.5.2 Genetische diversiteit

Met het R-pakket *adegenet* 2.1.10 (Jombart 2008) in R v4.4.0 (R Core Team, 2024) berekenden we de volgende diversiteitsparameters: het gemiddeld aantal geobserveerde allelen per locus (N_a), de gemiddelde geobserveerde heterozygositeit (H_o), Nei's verwachte heterozygositeit (H_e), en de gemiddelde inteeltcoëfficiënt (F_{IS}). We gebruikten de rarefactie methode van het programma HP-Rare v1.0 (Kalinowski 2005) om het gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) gecorrigeerd voor het minimum aantal gegenotypeerde individuen per locus (33 individuen), te berekenen. Met het programma ADZE 1.0 (Szpiech et al. 2008) stelden we een rarefaction curve op. Voor de parameter Max_G werd dezelfde waarde gebruikt als we voor het berekenen van de A_r gebruikt hebben ($2*33 = 66 G$).

Tenslotte schatten we de frequentie van nul-allelen in via de Dempster methode (Dempster et al. 1977) in het programma GENEPOP v4.3. Voor de één locus, *Tc918*, vonden we hoge schattingen van nul-allel frequenties ($r = 0,97$ voor beide locaties).

Deze analyses voerden we, ter vergelijking, met en zonder het locus waarvoor we een hoge frequentie nul-allelen vonden uit. Omdat de waarden van diversiteitsparameters verschillen wanneer *Tc918* uit de dataset wordt gelaten, voerden we de genetische analyses uit zonder locus *Tc918*.



7.2.5.3 Ouderschapsanalyses

Om de bruikbaarheid van de DNA-databank te testen verzamelden we negatieve controlestalen. Deze stalen zijn afkomstig van erfgoedlindes uit Luxemburg (Zo_neg_1 - 5), zomerlindes uit Polen (Zo_neg_7 - 9), en zomerlindes uit de botanische tuin van Meise (Zo_neg_6 & 10). Deze stalen werden eerder door Vanden Broeck et al. (2018) met dezelfde genetische merkers geanalyseerd.

We voerden eerst een verkennende DAPC (discriminant analysis of principal components) uit via het R-pakket *adegenet* 2.1.10 (Jombart 2008) via het R-script beschreven in Jenkins (2020). Deze analyse geeft ons een idee over hoe sterk de genotypes van controlestalen lijken op de genotypes uit de databank met de ouderbomen.

Via een ouderschapstest wordt er nagegaan of er ouderbomen kunnen worden toegewezen aan de controlestalen. Met het programma Colony V2.0.6.6 (Jones & Wang 2010) voerden we ParentPair analyses uit. In deze analyse wordt er naar een mogelijke vader- en moederboom gezocht. Bij de resultaten wordt rekening gehouden met mogelijke mismatches tussen de ouderbomen en hun nakomelingen. Mismatches kunnen namelijk ook ontstaan door technische fouten (geen amplificatie, error in het scoren van de allelen... zie 7.2.5.1). We voerden twee analyses uit met telkens een verschillende kans op technische fout: 0,02 en 0,05. Een technische fout van 0,05 laat meer mismatches tussen ouders en nakomelingen toe. Voor de genotypes van de mogelijke vaders en moeders gebruikten we de unieke genotypes van beide zaadboomgaarden. We liepen 10 runs per analyse en stelden de kans op het vinden van een vader of moeder telkens in op 0,5.

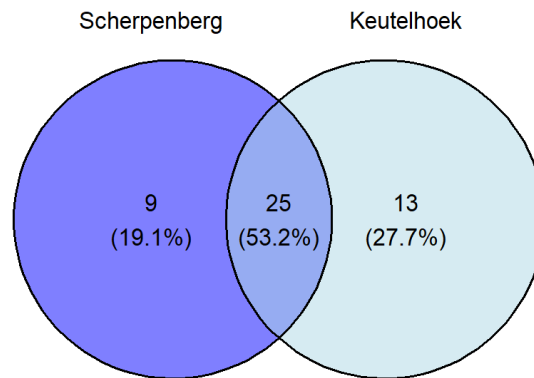
7.2.5.4 Identificatie cultivars

Om na te gaan of er *T. x europaea* 'Pallida' of 'Koningslinde' en *T. x europaea* 'Zwarte linde' cultivars aanwezig zijn in de zaadboomgaarden vergeleken we de genetische profielen van deze cultivars met de genetische profielen van de ouderbomen. De genetische profielen van de cultivars werden ook mee vergeleken in de DAPC analyse (7.2.5.3). De genetische profielen van de cultivars werden eerder geanalyseerd door Vanden Broeck et al. (2018).

7.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

7.3.1 Aanwezige genotypes

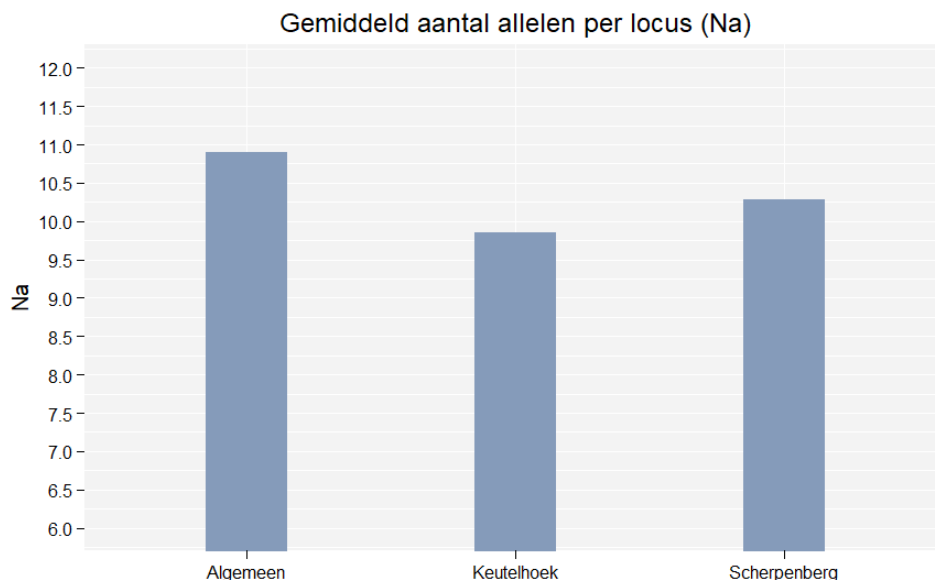
In totaal bevatten de zaadboomgaarden 47 genotypes van zomerlinde. In de zaadboomgaarden Keutelhoek en Scherpenberg staan respectievelijk 38 en 33 genotypes (Bijlage 1.5). Iets meer dan de helft van de genotypes staat zowel in Keutelhoek als Scherpenberg (Figuur 54).



Figuur 54 Venn-diagram van de verdeling van de aanwezige zomerlinde genotypes. Het percentage geeft de genotypes per hok ten opzichte van het totaal aantal gevonden genotypes weer.

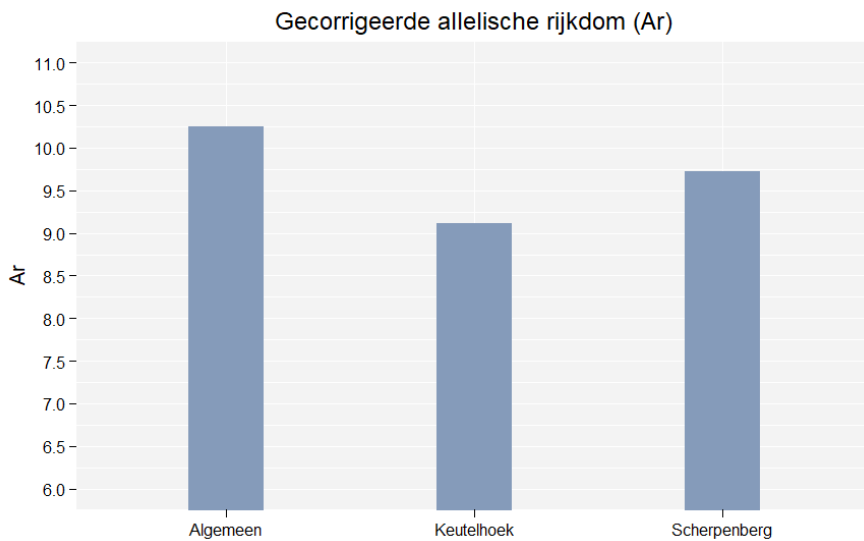
7.3.2 Genetische diversiteit

In totaal werden er 152 allelen (N_a) geobserveerd. Tussen de loci varieert het aantal allelen over alle zaadboomgaarden van 2 tot 17 allelen per locus (Tabel 24), met een gemiddelde van 10,9 allelen per locus. N_a is gelijkaardig tussen de locaties. Voor Keutelhoek werd een gemiddelde van 9,86 allelen per locus gevonden, voor Scherpenberg 10,29 allelen per locus (Figuur 55).



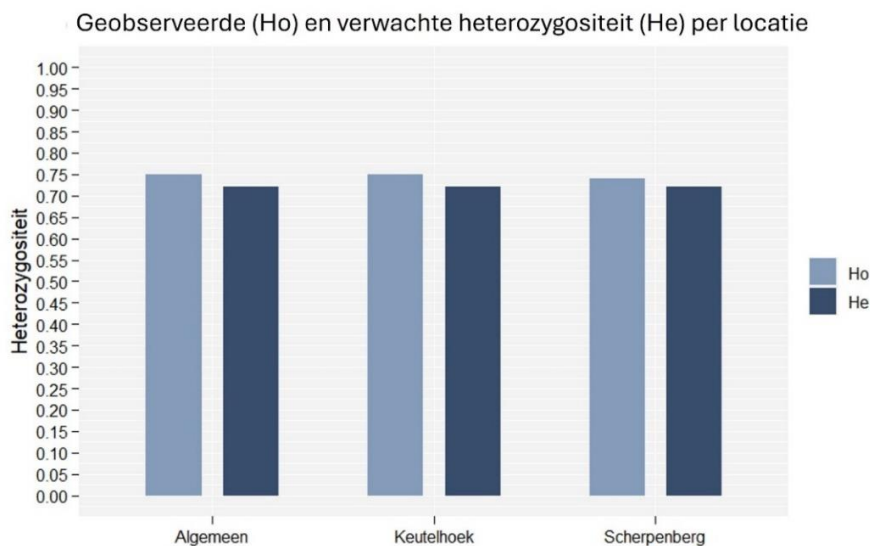
Figuur 55 Vergelijking van het gemiddeld aantal allelen per locus (N_a) per locatie. 'Algemeen' is de N_a van alle zaadboomgaarden samen.

Net zoals het gemiddeld het aantal allelen per locus, is het gecorrigeerde gemiddelde aantal allelen per locus (A_r) gelijkaardig tussen de locaties (Figuur 56). A_r heeft een waarde van 9,11 in Keutelhoek en een waarde van 9,73 in Scherpenberg, met een waarde van 10,31 over beide zaadboomgaarden.



Figuur 56 Vergelijking van het gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) per locatie. ‘Algemeen’ is de A_r van alle zaadboomgaarden samen.

De geobserveerde heterozygositeit (H_o) varieert tussen de loci van 0,06 tot 0,97 per locus met een gemiddelde van 0,75. De verwachte heterozygositeit (H_e) varieert tussen de loci van 0,05 tot 0,87 per locus met een gemiddelde van 0,73. H_o en H_e zijn gelijkaardig tussen de locaties (Figuur 57). De gemiddelde H_o varieert tussen 0,74 en 0,75 per locus. De gemiddelde H_e is voor beide locaties 0,72 per locus.



Figuur 57 Vergelijking van de geobserveerde (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e) per locatie. ‘Algemeen’ is het gemiddelde van alle zaadboomgaarden samen.

De verwachte heterozygositeit (*He*) en allelische rijkdom (*Ar*) zijn indicatoren voor de genetische diversiteit binnen een populatie, in dit geval binnen de zaadboomgaarden. Een hoge genetische variatie binnen een populatie is belangrijk voor het aanpassingsvermogen van de populatie aan een veranderend klimaat.

De geschatte gemiddelde waarden voor de inteelt coëfficiënt F_{IS} (gemiddelde \pm sd) zijn zeer laag en te verwaarlozen (Algemeen: $0,029 \pm 0,059$; Scherpenberg: $0,032 \pm 0,062$; Keutelhoek: $0,026 \pm 0,058$).

De genetische diversiteit in de zaadboomgaarden is vergelijkbaar met de genetische diversiteit van natuurlijke populaties in het Verenigd Koninkrijk en Frankrijk (Tabel 26).

Tabel 26 Het aantal geanalyseerde individuen/genotypes (N), de gemiddelde allelische rijkdom (Ar), geobserveerde heterozygositeit (Ho) en verwachte heterozygositeit (He) van de geanalyseerde boomgaarden en natuurlijke Europese populaties.

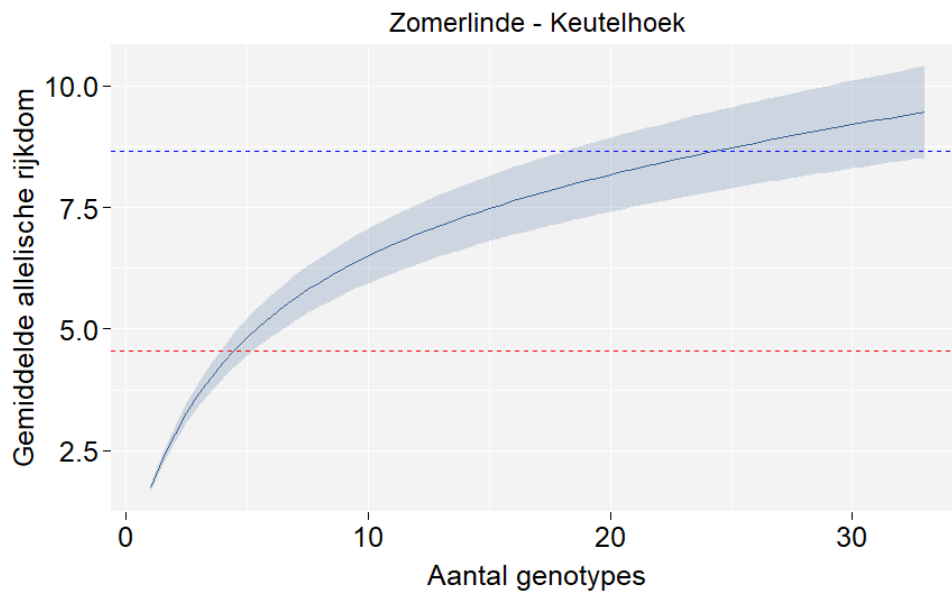
Locatie	N	Ar	Ho	He	Bron
Geanalyseerde zaadboomgaarden	47	10,31	0,75	0,73	
VK	116	/	0,71	0,68	Logan et al. 2015
FR - Issole	20	/	0,77	0,75	Phuekvilai & Wolff 2013
FR – Gorges de la Carnça	20	/	0,70	0,71	Phuekvilai & Wolff 2013

De allelische rijkdom werd binnen de twee locaties even hoog ingeschat. Het aantal genotypes dat nodig is om een bepaald niveau van allelische rijkdom te behouden is daarom voor elke locatie gelijkaardig. Om 50% van de berekende allelische rijkdom te behouden bij bv. de aanleg van een nieuwe zaadboomgaard via vegetatieve vermeerdering, moeten er minstens vijf verschillende genotypes gebruikt worden (Tabel 27; Figuur 58-59, intercept rode lijn). Om 95% van de berekende allelische rijkdom te behouden, moeten er minstens 24 verschillende genotypes gebruikt worden (Tabel 27; Figuur 58-59, intercept blauwe lijn).

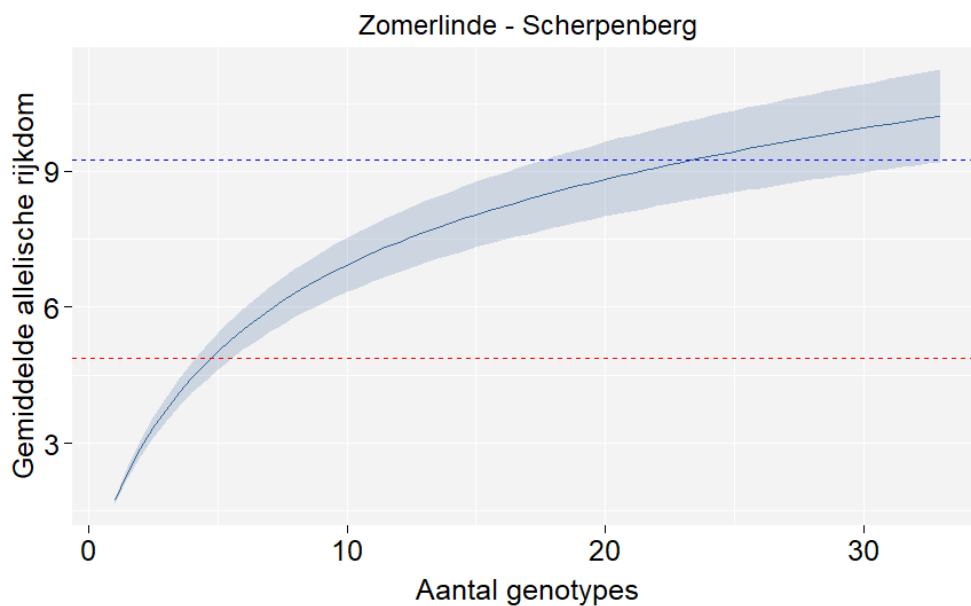
Tabel 27 50% en 95% van de berekende allelische rijkdom (Ar) en het aantal genotypes nodig om deze genetische diversiteit te bereiken per locatie.

Locatie	Ar	50% Ar	# genotypes	95% Ar	# genotypes
Keutelhoek	9,11	4,56	5	8,65	24
Scherpenberg	9,73	4,87	5	9,24	24





Figuur 58 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Keutelhoek. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.

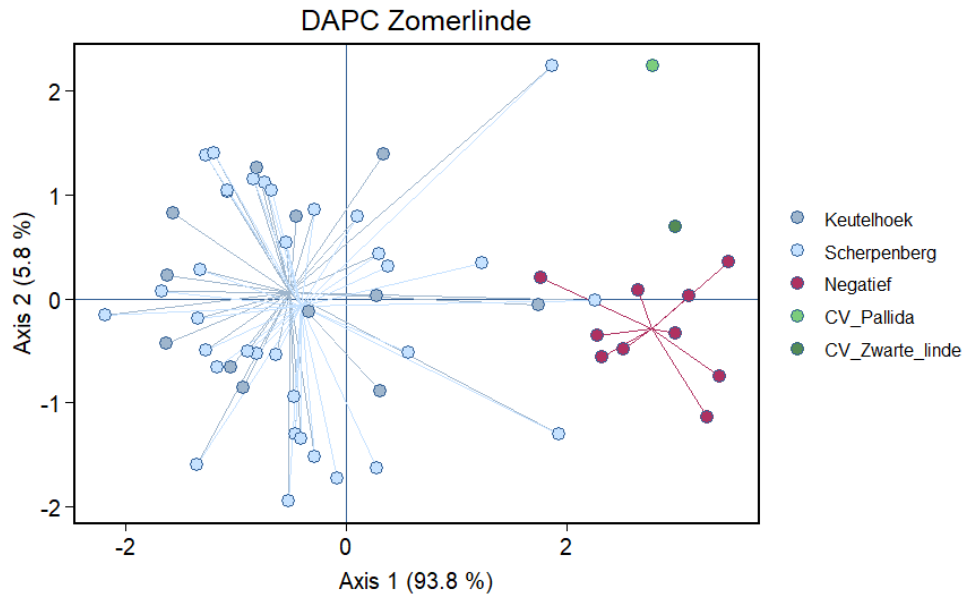


Figuur 59 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Scherpenberg. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.



7.3.3 Ouderschapsanalyses

De DAPC plot toont hoe sterk de genotypes van de negatieve controlestalen lijken op de genotypes die aanwezig zijn in de zaadboomgaarden van zomerlinde. Op figuur 60 zien we een kleine overlap tussen de groep van de negatieve controlestalen en de genotypes van de ouderbomen. Dit geeft al een eerste indicatie dat de stalen eerder niet uit de zaadboomgaarden afkomstig zijn.



Figuur 60 DAPC plot voor zomerlinde, axis 1 vs axis 2. De genotypes uit de zaadboomgaarden (Keutelhoek en Scherpenberg) zijn aangeduid in het blauw, de genotypes van de negatieve controlestalen zijn aangeduid in het rood, de genotypes van de cultivars 'Pallida' (CV_Pallida) en 'Zwarte linde' (CV_Zwarte_linde) zijn aangeduid in het groen.

Vervolgens voerden we een ouderschapsanalyse uit in Colony (Jones & Wang 2010). Deze analyse werd twee keer uitgevoerd, waarbij we de toelating van technische fouten de eerste streng (0,02; Tabel 12) en de tweede keer iets toegevender (0,05; Tabel 12) instelden.

Tabel 28 Resultaat van de ParentPair analyse in Colony met een technische fout van 0,02 (links) en 0,05 (rechts). In een rij waarin geen ouderboom werd aangeduid (-), wordt aangegeven wat de kans is dat de ouderbomen niet in de databank zitten. Prob. = probability of waarschijnlijkheid. Een Prob. = 1 is een waarschijnlijkheid van 100%.

Staal	Mogelijke ouderbomen	Prob.	Mogelijke ouderbomen	Prob.
	Technische fout: 0,02		Technische fout: 0,05	
<i>Negatieve controle</i>				
Zo_neg_1	-	1	-	1
Zo_neg_2	-	1	-	1
Zo_neg_3	-	1	-	1
Zo_neg_4	-	1	-	1
Zo_neg_5	-	1	-	1
Zo_neg_6	-	1	-	1
Zo_neg_7	-	1	-	1
Zo_neg_8	-	1	-	0,9978
Zo_neg_9	-	1	-	1
Zo_neg_10	-	1	-	1

In beide ouderschapsanalyses werd met zeer grote waarschijnlijkheid voor geen enkel negatief controlestaal een ouderboom gevonden. Dit geeft aan dat de negatieve controlestalen inderdaad niet uit de zaadboomgaarden afkomstig zijn.

7.3.4 Identificatie cultivars

De genetische profielen van de genotypes in de zaadboomgaarden werden vergeleken met de genetische profielen van de cultivars *T. x europaea* 'Pallida' of 'Koningslinde' en *T. x europaea* 'Zwarte linde'. Op de DAPC plot (Figuur 60) liggen de punten van de cultivars niet binnen de wolk van de genotypes van de zaadboomgaarden. We vonden ook geen match tussen de genetische profielen wat betekent dat er geen klonen van de cultivars aanwezig zijn in de zaadboomgaarden van zomerlinde.



7.4 CONCLUSIE

- In totaal bevatten de twee geanalyseerde zaadboomgaarden 47 genotypes van zomerlinde. In de zaadboomgaarden Keutelhoek en Scherpenberg staan respectievelijk 38 en 34 genotypes.
- Alle zomerlinde individuen bevatten samen een hoge genetische diversiteit, die vergelijkbaar is met de genetische diversiteit van natuurlijke zomerlinde populaties. Om 50% van de gemiddelde allelische rijkdom van een zaadboomgaard te behouden zijn er minstens vijf genotypes nodig, om 95% te behouden zijn er minstens 24 genotypes nodig.
- In de zaadboomgaarden van zomerlinde bevinden zich geen 'Koningslinde' of 'Zwarte linde' cultivars.
- De DNA-databank kan voor zomerlinde gebruikt worden om de herkomst van bosplantsoen te traceren.



8 SPORKEHOUT

8.1 SOORTENBESCHRIJVING

8.1.1 Ecologie

Sporkehout of vuilboom (*Frangula alnus*, vroeger *Rhamnus frangula*) is een struiksoort die wijdverspreid voorkomt in Europa (Figuur 61). De soort is inheems in Vlaanderen en komt hier zeer algemeen voor (Figuur 62; Van Landuyt et al. 2006). Sporkehout is een lichtminnende pioniersoort die het beste gedijt op vochtige, licht zure bodems, al kan de soort ook op andere bodemsoorten groeien (Zecchin et al. 2016).

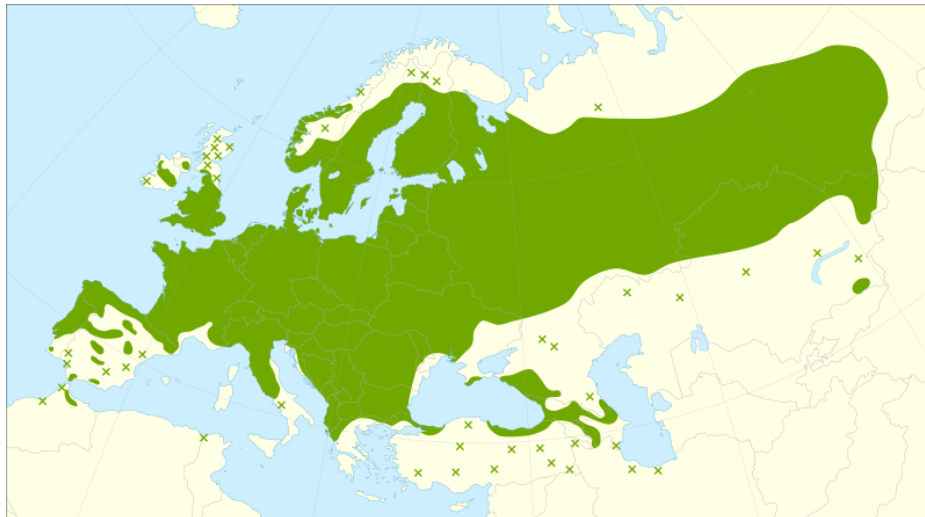
Sporkehout is eenhuizig en de bloemen zijn tweeslachtig (hermafrodit), wat betekent dat een bloem zowel vrouwelijke als mannelijke organen heeft. De bloemen bloeien van mei tot september en trekken veel insecten aan met hun nectar secretie (Zecchin et al. 2016).

8.1.2 Waarde

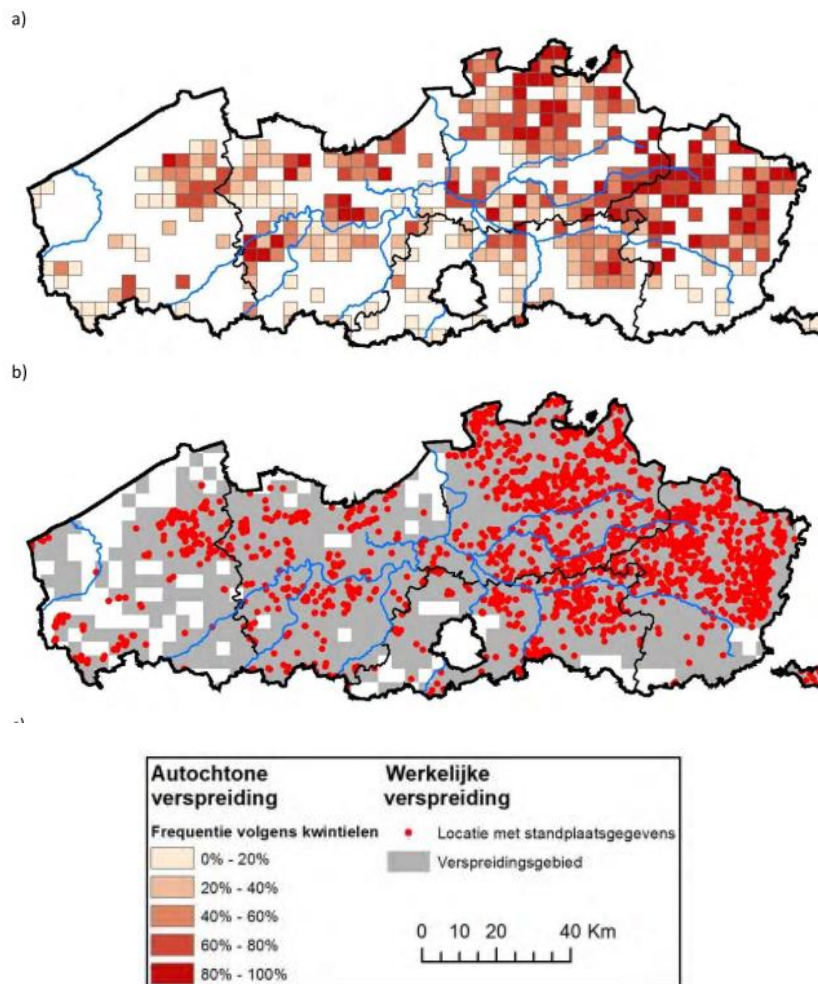
Het hout van sporkehout is zacht en is bruikbaar voor vele doeleinden. Het kan bijvoorbeeld dienen om snel-brandend en kwaliteitsvol houtskool te maken dat voor buskruit gebruikt wordt. Van de bladeren en onrijpe bessen worden ook kleurstoffen gemaakt (Zecchin et al. 2016).

De bessen van sporkehout zijn een voedselbron voor tal van vogelsoorten en kleine zoogdieren. Sporkehout is ook een waardplant voor de citroenvlinder, het boomblauwtje en het in Vlaanderen bedreigde groentje (Maes et al. 2021).





Figuur 61 Het verspreidingsgebied van sporkehout (*Frangula alnus*) in Europa. (Bron: Euforgen, Caudullo et al. 2017)



Figuur 62 De autochtone (a) en werkelijke verspreiding (b) van sporkehout (*Frangula alnus*) in Vlaanderen. (Bron: Uyttenbroeck et al. 2014)

8.2 METHODE

8.2.1 Stalen

Voor het opstellen van de genetische profielen van autochtone sporkehout (*Frangula alnus*) bemonsterden we in de lente van 2022 vier autochtone zaadboomgaarden (Tabel 29). De bladstalen worden bewaard op silicagel. In de lente van 2024 werden bijkomend drie zaadboomgaarden (gedeeltelijk) bemonsterd (Tabel 29). De zaadboomgaarden Gruitrode en Koekelarebos zijn grotendeels kopijen van respectievelijk de Oude Kwekerij en Vloethemveld, die volledig zijn ingezameld. In Gruitrode en Koekelarebos werden enkel individuen ingezameld met een unieke of onbekende veldcode. Uniek wil zeggen dat de veldcode niet in een andere zaadboomgaard van sprokehout staat. Ter controle werden ook de flankerende individuen in de zaadboomgaard ingezameld. De zaadboomgaard De Lovie werd helemaal bemonsterd. In totaal verzamelden we 746 bladstalen. De bladstalen worden bewaard op silicagel.

Tabel 29 De bemonsterde autochtone zaadboomgaarden van sporkehout met hun locatie en het aantal verzamelde bladstalen. Zaadboomgaarden met een asterisk (*) werden gedeeltelijk bemonsterd.

Zaadboomgaard	Gemeente	Code locatie	Aantal stalen
Oude Kwekerij	Brasschaat	1VB4550.2	209
Meikensbossen	Dentergem	1VB4550.8	92
Vloethemveld	Zedelgem	1VB4550.3	129
Beukenberg	Tongeren	1VB4550.1	102
Gruitrode*	Oudsbergen	1VB4550.5	28
Koekelarebos*	Koekelare	1VB4550.4	14
De Lovie	Poperinge	1VB4550.7	172

8.2.1.1 Geanalyseerde zaadboomgaarden

Hieronder staan de locaties van de geanalyseerde zaadboomgaarden ingekleurd op luchtfoto.

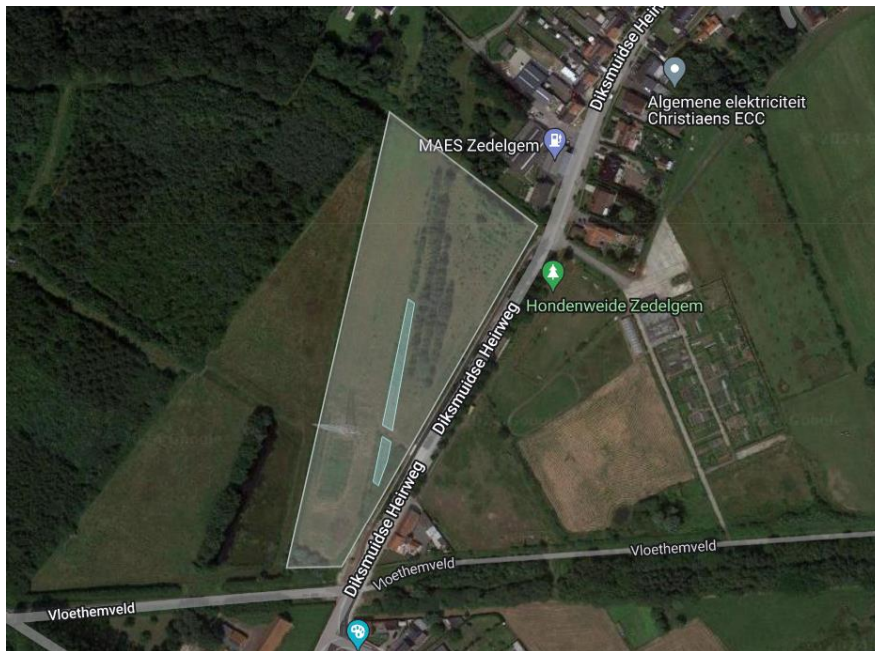


Figuur 63 Oude Kwekerij te Brasschaat (51°19'25.3"N 4°30'22.8"E). De locatie van de bemonsterde sporkehout individuen is aangeduid in het blauw.

//



Figuur 64 Meikensbossen te Dentergem (50°58'39.0"N 3°23'10.1"E). De locatie van de bemonsterde sporkehout individuen is aangeduid in het blauw.



Figuur 65 Vloethemveld te Zedelgem (51°08'51.0"N 3°07'24.4"E). De locatie van de bemonsterde sporkehout individuen is aangeduid in het blauw.



Figuur 66 Beukenberg te Tongeren (50°46'46.7"N 5°26'06.3"E). De locatie van de bemonsterde sporkehout individuen is aangeduid in het blauw.

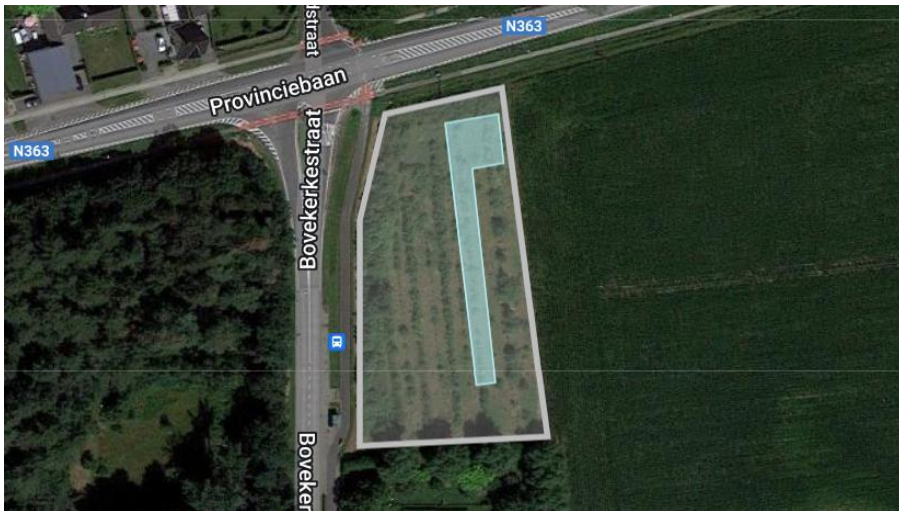


Figuur 67 Gruitrode te Oudsbergen (51°03'45,7"N, 5°34'43,1"E). De locatie van de sporkehout individuen is aangeduid in het blauw.





Figuur 68 De Lovie te Poperinge ($50^{\circ}52'46,0''N$, $2^{\circ}41'10,0''E$). De locatie van de sporkehout individuen is aangeduid in het blauw.



Figuur 69 Koekelarebos te Koekelare ($51^{\circ}04'12,6''N$, $5^{\circ}57'50,0''E$). De locatie van de sporkehout individuen is aangeduid in het blauw.

Tabel 30 Indeling van de 16 microsatellieten gebruikt voor *Frangula alnus* in 3 multiplexen (MP) met de gevonden productgrootte (in baseparen), de gevonden allelen per locus, de gebruikte concentratie (in μmol), de annealing temperatuur (TA) en de gebruikte fluorescente kleur. Loci met een asterisk (*) amplificeerden niet of onduidelijk en werden niet gebruikt voor de genetische profielen. Bron informatie microsatelliet merkers: Rigueiro et al. 2008.

MP	Locus	Forward primer	Reverse primer	Motief	Product-grootte (bp)	Aantal allelen	TA (°C)	Conc. (μM)	Kleur
1	FaB8	CTCAAGAAGATGGGGAGTGTC	ACATGGCATGAGTCACTACGT	AG	220 - 234	8	62	0,20	FAM
1	FaA3*	TTCATTTTCTGTCCCATGC	TGTGAAGCAAACATGAACACC	(CA)12(TA)4	265 - 289	18	62	0,40	FAM
1	FaB7	ATGGAAGGGAGAAGACAGTC	ATCTGAAACCAACAGGACAAC	TC	105 - 126	4	62	0,20	NED
1	FaA125	GAGCCGCTCAAATTAATGATCT	CCTACCTAGCGCTATATGCAAAG	(TG)14(CG)3	83 - 91	2	62	0,20	PET
2	FaA7	CCTTCGCTCAACTAAAAACCA	GATGTTATAGCTGGACCTCAAC	TG	141 - 215	29	60	0,40	FAM
2	FaA110	CAAAGTTAGCCAAAGTCAACTG	CCAACATCAAACCTACTTGAAC	GT	275 - 324	18	60	0,20	FAM
2	FaA104	GGAGGAAGACACAGTTCTGG	CTGGAAAGCAATACCAAGTTG	TG	155 - 174	8	60	0,20	VIC
2	FaA116	TGTTCTCATGCTCTATGTAAC	TTGGTGCTGGTAAGTAACTAG	(GT)13(AT)2	223 - 227	2	60	0,40	VIC
2	FaA12	TCCTCCGAGTCTTCTACC	AAGCCAGATTCAAGCATTG	AC	150 - 162	6	60	0,20	NED
2	FaA106	GCACTTGATTGTTTCAGCAC	AGAGGTGGGTTCCAATTATG	TC	200 - 221	10	60	0,20	NED
2	FaA103*	CCGGATGTCCGAATAGTAG	GTCAGCGATTATAGCAATATCC	AC	/	/	60	0,20	PET
2	FaB102	TAAAGCTGTTTGACAATCTC	ACCATTTTATCTGTTGATCCAG	CT	178 - 194	8	60	0,20	PET
3	FaB9	AGGGTCCAATGTATTTTAGTAG	ACTGGCAAGCACTGTAAG	CT	263 - 285	8	60	0,20	FAM
3	FaB4	TGCAATCACTTCTTTTGAGTTC	ACCAGCATTTGCCACATT	TC	246 - 293	10	60	0,20	VIC
3	FaB101	TGGTGAAAAAGGTTTGTTG	GCATCAAGGATTGTTGTCTC	(TC)6(CCTC)3(TC)20	211 - 227	9	60	0,20	NED
3	FaA8*	TGGAGAAGTTTGGTGTCTTG	GTGGGAAGCGAATGAAAG	(CA)6(CG)5(CA)30(TA)7	119 - 183	16	60	0,20	PET



Tabel 31 Overzicht van het aantal individuen en genotypes per zaadboomgaard van sporkehout. Voor de zaadboomgaarden Gruitrode en Koekelarebos gaat het over vermoedelijke aantallen omdat niet alle individuen bemonsterd zijn.

Zaadboomgaard	Code locatie	Aantal individuen	Aantal genotypes
Oude Kwekerij	1VB4550.2	209	70
Meikensbossen	1VB4550.8	92	31
Vloethemveld	1VB4550.3	129	43
Beukenberg	1VB4550.1	102	34
Gruitrode	1VB4550.5	28	59
Koekelarebos	1VB4550.4	14	39
De Lovie	1VB4550.7	172	61

De totale dataset heeft 8,41% ontbrekende data. Gebaseerd op de duplicaat extracties en replicaat PCR-amplificaties vonden we een gemiddelde fout op genotypering van 0,88%. Door de ontbrekende data kon van **drie sporkehout individuen** geen genotype bepaald worden. Bij het vergelijken van genotypes van zaailingen met deze van de databank moet, naast de fout op genotypering, rekening worden gehouden met een **foutenmarge van 3,13%** (kans van 1 op 32 dat het genotype van een ouderboom niet in de databank zit) voor **Meikensbossen**, en een **foutenmarge van 3,17%** (kans van 2 op 63 dat het genotype van een ouderboom niet in de databank zit) voor **De Lovie**.

Voor de zaadboomgaarden Koekelarebos en Gruitrode moet ook steeds rekening worden gehouden met een foutenmarge aangezien we in deze zaadboomgaarden niet alle individuen bemonsterd hebben. Voor **Koekelarebos** zijn we **zeker** dat **33,3%** van de vermoedelijk aanwezige genotypes ook aanwezig is (13 genotypes van de 39 vermoedelijk aanwezige genotypes geanalyseerd). Voor twee genotypes die vermoedelijk in Koekelarebos voorkomen werd geen genetisch profiel opgesteld. Individuen met de veldcodes van die genotypes werden in de zaadboomgaard Vloethemveld bemonsterd, maar bleken een ander genetisch profiel te hebben. Daarom moet bij het vergelijken van genotypes van zaailingen met deze van de databank ook rekening worden gehouden met een **foutenmarge van 5,13%** (kans van 2 op 39 dat het genotype van een ouderboom niet in de databank zit).

Voor **Gruitrode** zijn we **zeker** dat **42,4%** van de vermoedelijk aanwezige genotypes ook aanwezig zijn (25 genotypes van de 59 vermoedelijk aanwezige genotypes geanalyseerd). Voor zes genotypes die vermoedelijk in Gruitrode voorkomen werd geen genetisch profiel opgesteld. Door de grote uitval van individuen in Gruitrode (54%) was het onduidelijk welke boom welke veldcode had en werden sommige individuen verkeerd ingezameld. Daarom moet bij het vergelijken van genotypes van zaailingen met deze van de databank ook rekening worden gehouden met een **foutenmarge van 10,17%** (kans van 6 op 59 dat het genotype van een ouderboom niet in de databank zit).

Voor de volgende genetische analyses werden enkel de genetische profielen van de unieke genotypes gebruikt. Voor de zaadboomgaarden Gruitrode en Koekelarebos werden ook de genetische profielen van de genotypes die vermoedelijk voorkomen in de zaadboomgaarden (en ook voorkomen in de andere zaadboomgaarden) toegevoegd aan de dataset.

//

8.2.5.2 Genetische diversiteit

Met het R-pakket *adegenet* 2.1.10 (Jombart 2008), in het programma R v4.4.0 (R Core Team, 2024), berekenden we de volgende diversiteitsparameters: het gemiddeld aantal geobserveerde allelen per locus (N_a), de gemiddelde geobserveerde heterozygositeit (H_o), Nei's verwachte heterozygositeit (H_e), en de gemiddelde inteeltcoëfficiënt (F_{IS}). We gebruikten de rarefactie methode van het programma HP-Rare v1.0 (Kalinowski 2005) om het gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) gecorrigeerd voor het minimum aantal gegenotypeerde individuen per locus (22 individuen voor A_r per zaadboomgaard, 147 individuen voor A_r over alle zaadboomgaarden), te berekenen. Met het programma ADZE 1.0 (Szpiech et al. 2008) stelden we een rarefaction curve op. Voor de parameter Max_G werd dezelfde waarde gebruikt als we voor het berekenen van de A_r gebruikt hebben ($22 \times 2 = 44G$).

Tenslotte schatten we de frequentie van nul-allelen in via de Dempster methode (Dempster et al. 1977) in het programma GENEPOP v4.3. De loci FaA125, FaB9 en FaB4 vertonen voor elke locatie gemiddelde tot hoge schattingen van nul-allel frequenties ($r > 0,20$).

De volgende analyses voerden we, ter vergelijking, met en zonder de loci waarvoor we een hoge frequentie nul-allelen vonden uit. Omdat de waarden van de diversiteitsparameters verschillen wanneer loci uit de dataset worden gelaten, voerden we de genetische analyses uit zonder de loci met een hoge schatting van nul-allel frequenties.

8.2.5.3 Ouderschapsanalyses

Om de bruikbaarheid van de genetische dataset te testen verzamelden we twee soorten controlestalen. Voor de negatieve controle werden tien stalen verzameld in Oost-Vlaanderen (Sp_neg_1 - 5, Sp_neg_9 - 10) en Roemenië (Sp_neg_6 - 8). Voor één negatief controlestaal (Sp_neg_1) kon geen genetisch profiel worden opgesteld. Dit staal werd uit de analyses gelaten. Voor de positieve controle verzamelden we acht stalen van zaailingen afkomstig uit zaden van de zaadboomgaard Beukenberg, en zes stalen van zaailingen afkomstig uit de zaadboomgaard Vloethemveld.

We voerden eerst een verkennende DAPC (discriminant analysis of principal components) uit via het R-pakket *adegenet* 2.1.10 (Jombart 2008) via het R-script beschreven in Jenkins (2020). Deze analyse geeft ons een idee over hoe sterk de genotypes van controlestalen lijken op de genotypes uit de databank met de ouderbomen.

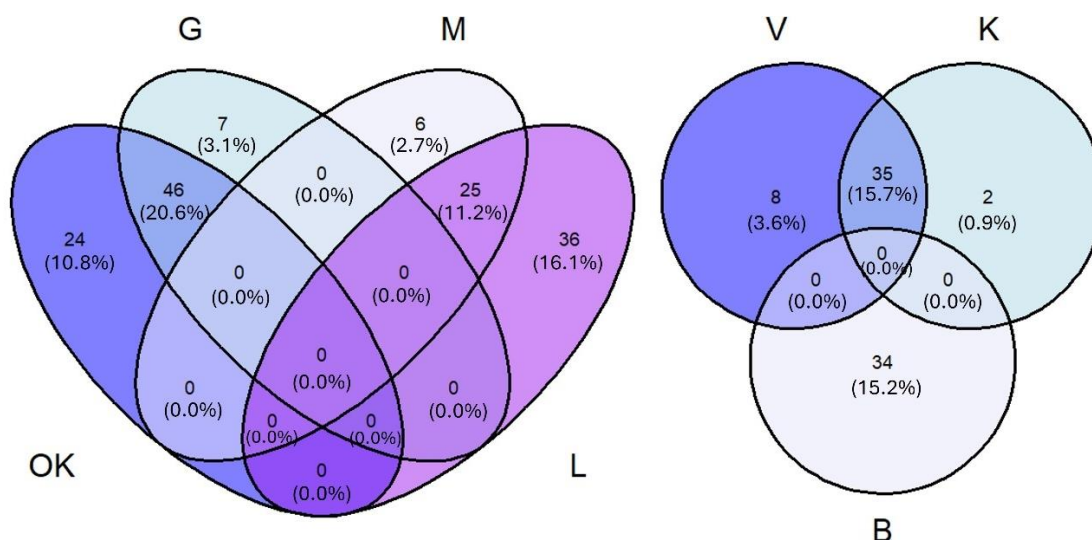
Via een ouderschapstest wordt er nagegaan of er ouderbomen kunnen worden toegewezen aan de controlestalen. Met het programma Colony V2.0.6.6 (Jones & Wang 2010) voerden we ParentPair analyses uit. In deze analyse wordt er naar een mogelijke vader- en moederboom gezocht. Bij de resultaten wordt rekening gehouden met mogelijke mismatches tussen de ouderbomen en hun nakomelingen. Mismatches kunnen namelijk ook ontstaan door technische fouten (geen amplificatie, error in het scoren van de allelen... zie 8.2.5.1). We voerden twee analyses uit met telkens een verschillende kans op technische fout: 0,02 en 0,05. Een technische fout van 0,05 laat meer mismatches tussen ouders en nakomelingen toe. Voor de genotypes van de mogelijke vaders en moeders gebruikten we de unieke genotypes van de zaadboomgaarden Beukenberg en Vloethemveld. We liepen 10 runs per analyse. Wanneer de kans om een vader of moeder te vinden op 0,5 werd ingesteld, vonden we voor maar een klein aantal positieve controlestalen een ouderboom. Daarom verhoogden we de kans om een ouderboom te vinden naar 0,9.



8.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

8.3.1 Aanwezige genotypes

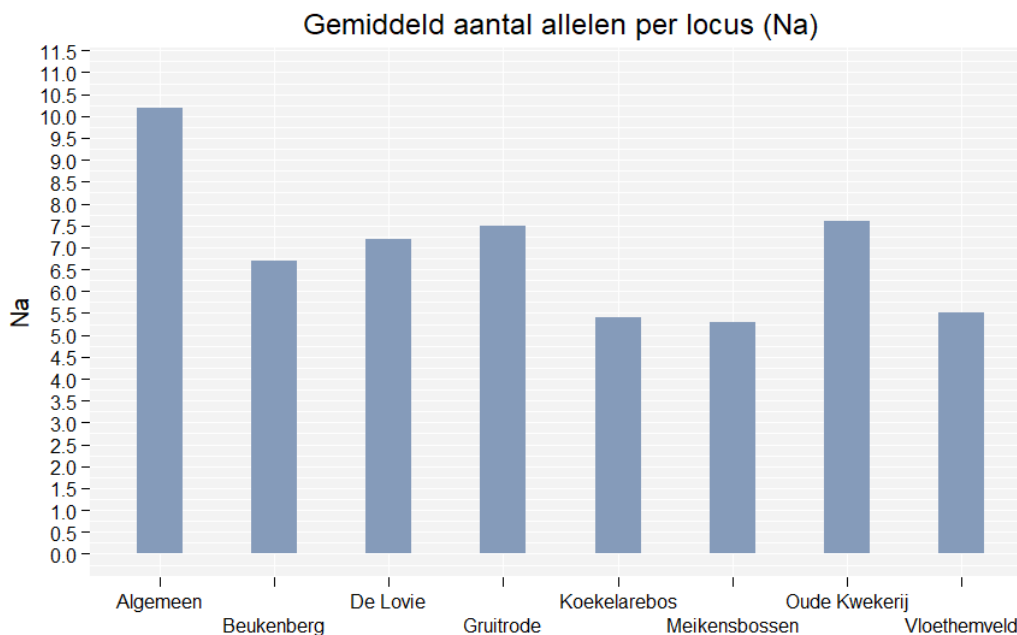
In totaal bevatten de zaadboomgaarden 223 genotypes van sporkehout. In Oude Kwekerij, Meikensbossen, Vloethemveld, Beukenberg en De Lovie staan respectievelijk 70, 31, 43, 34 en 61 genotypes. De zaadboomgaarden Gruitrode en Koekelarebos werden niet volledig ingezameld. Hier staan vermoedelijk 59 en 39 genotypes (Bijlage 1.6). Beukenberg bevat een unieke samenstelling van genotypes. De Oude Kwekerij en Gruitrode, Meikensbossen en De Lovie, en Vloethemveld en Koekelarebos hebben telkens een groot aantal genotypes gemeen, maar er is geen overlap tussen de eerste vier zaadboomgaarden en de laatste twee.



Figuur 70 Venn-diagrammen van de verdeling van de aanwezige sporkehout genotypes. Het percentage geeft de genotypes per hok ten opzichte van het totaal aantal gevonden genotypes weer. OK = Oude Kwekerij, G = Gruitrode, M = Meikensbossen, L = De Lovie; V = Vloethemveld, K = Koekelarebos, B = Beukenberg. De zaadboomgaarden zijn op deze manier in twee diagrammen opgesplitst omdat de twee diagrammen geen genotypes gemeen hebben.

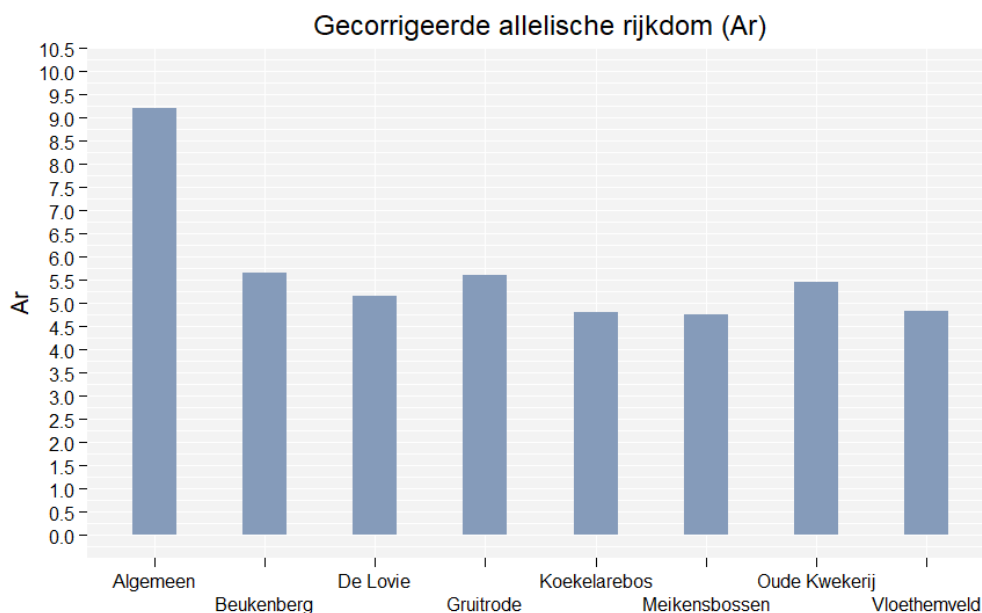
8.3.2 Genetische diversiteit

In totaal werden er 102 allelen (N_a) geobserveerd. Tussen de loci varieert het aantal allelen over alle zaadboomgaarden van 4 tot 29 allelen per locus (Tabel 30), met een gemiddelde van 10,2 allelen per locus. N_a varieert tussen de locaties. Meikensbossen heeft de laagste N_a (5,3), Gruitrode en Oude Kwekerij hebben de hoogste diversiteit (7,6 en 7,5 respectievelijk) (Figuur 71).



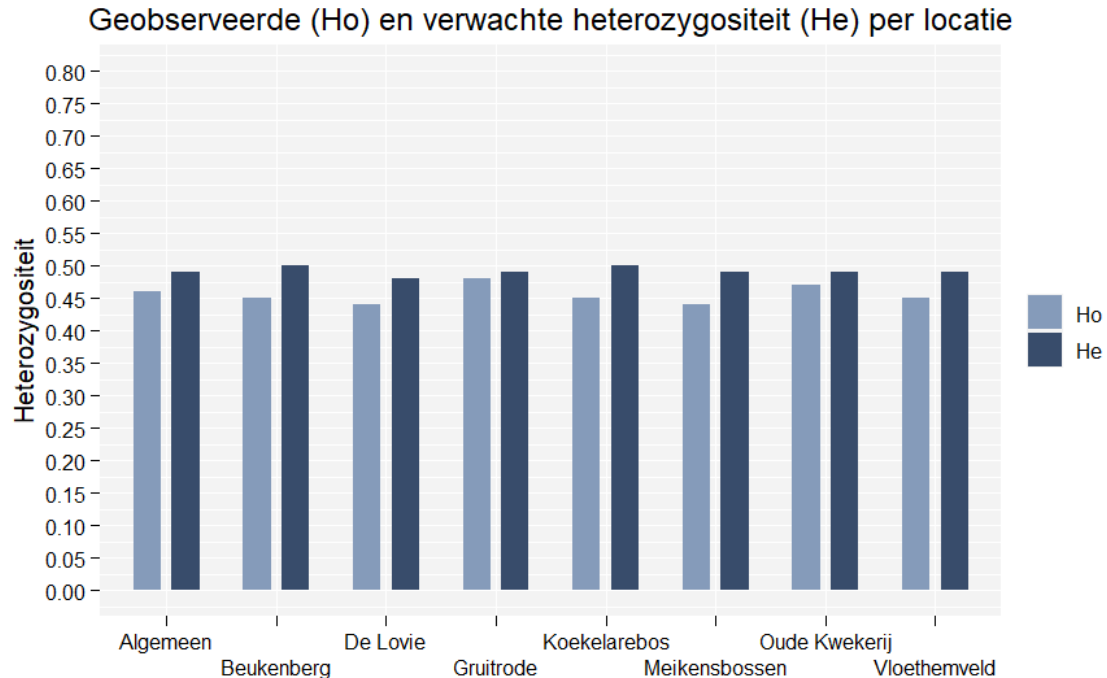
Figuur 71 Vergelijking van het gemiddeld aantal allelen per locus (N_a) per locatie. ‘Algemeen’ is de N_a van alle zaadboomgaarden samen.

Het gecorrigeerd gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) varieert ook tussen de locaties (Figuur 72). Beukenberg heeft de hoogste A_r met een waarde van 5,67. Meikensbossen heeft de laagste A_r met een waarde van 4,75. De A_r van alle genotypes in de zaadboomgaarden samen heeft een veel grotere waarde van 9,21.



Figuur 72 Vergelijking van het gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) per locatie. ‘Algemeen’ is de A_r van alle zaadboomgaarden samen.

De geobserveerde heterozygositeit (H_o) varieert tussen de loci van 0,03 tot 0,78 per locus met een gemiddelde van 0,46. De verwachte heterozygositeit (H_e) varieert tussen de loci van 0,05 tot 0,84 per locus met een gemiddelde van 0,51. H_o en H_e zijn zeer gelijkaardig tussen de locaties (Figuur 73). De gemiddelde H_o varieert tussen 0,44 en 0,48 per locus. De gemiddelde H_e varieert tussen 0,49 en 0,50 per locus.



Figuur 73 Vergelijking van de geobserveerde (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e) per locatie. ‘Algemeen’ is het gemiddelde van alle zaadboomgaarden samen.

De verwachte heterozygositeit (H_e) en allelische rijkdom (A_r) zijn indicatoren voor de genetische diversiteit binnen een populatie, in dit geval binnen de zaadboomgaarden. Een hoge genetische variatie binnen een populatie is belangrijk voor het aanpassingsvermogen van de populatie aan een veranderend klimaat.

Op alle locaties is er een indicatie voor inteelt (F_{IS} , gemiddelde \pm sd; Algemeen: $0,143 \pm 0,184$; Oude Kwekerij: $0,121 \pm 0,169$; Meikensbossen: $0,163 \pm 0,179$; Vloethemveld: $0,155 \pm 0,185$; Beukenberg: $0,151 \pm 0,248$; De Lovie: $0,153 \pm 0,189$; Gruitrode: $0,116 \pm 0,160$; Koekelarebos: $0,167 \pm 0,178$). De waarden zijn echter niet significant.

De genetische diversiteit in de zaadboomgaarden is vergelijkbaar met de genetische diversiteit van natuurlijke populaties in Spanje (Tabel 32). In vergelijking met de geïsoleerde populatie in Ierland is de genetische diversiteit binnen onze zaadboomgaarden groter. Net zoals bij de gefragmenteerde steelpopulaties (sectie 6.3.2), toont dit opnieuw aan dat geïsoleerde populaties typisch een lagere genetische diversiteit hebben.

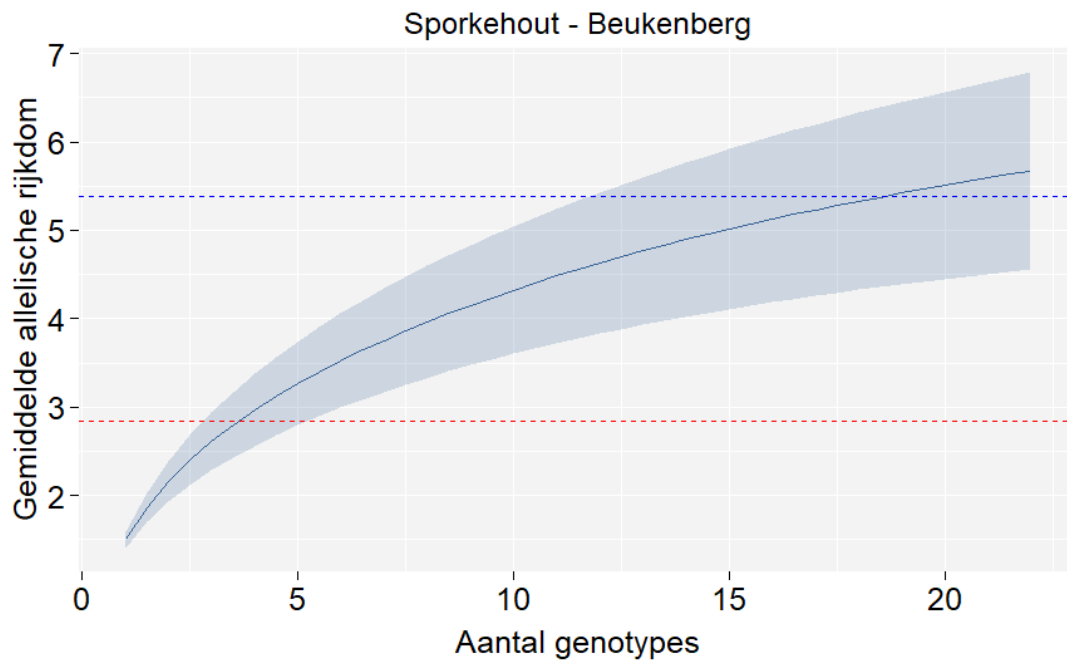
Tabel 32 Het aantal geanalyseerde individuen/genotypes (*N*), de gemiddelde allelische rijkdom (*Ar*), geobserveerde heterozygositeit (*Ho*) en verwachte heterozygositeit (*He*) van de geanalyseerde boomgaarden en natuurlijke Europese populaties.

Locatie	N	Ar	Ho	He	Bron
Geanalyseerde zaadboomgaarden	223	9,21	0,46	0,49	
E – Aljibe	30	/	0,50	0,53	Rigueiro et al. 2008
E – Medio	19	/	0,54	0,52	Rigueiro et al. 2008
E – Puerto Oscuro	23	/	0,44	0,43	Rigueiro et al. 2008
Ierland	132	/	0,31	0,41	Finlay et al. 2017

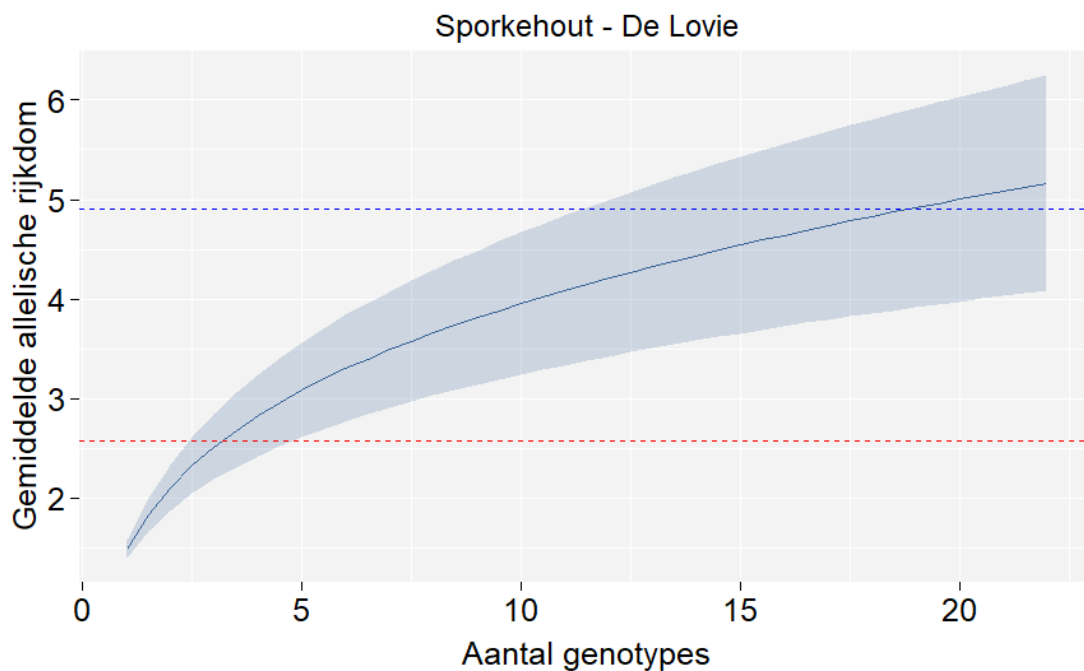
De allelische rijkdom werd binnen de locaties Beukenberg en Oude Kwekerij hoger ingeschat. Toch is het aantal genotypes dat nodig is om een bepaald niveau van allelische rijkdom te behouden voor elke locatie gelijkaardig. Om 50% van de berekende allelische rijkdom te behouden bij bv. de aanleg van een nieuwe zaadboomgaard via vegetatieve vermeerdering, moeten er minstens drie verschillende genotypes gebruikt worden (Tabel 33; Figuur 74-80, intercept rode lijn). Om 95% van de berekende allelische rijkdom te behouden, moeten er minstens 18 verschillende genotypes gebruikt worden (Tabel 33; Figuur 74-80, intercept blauwe lijn).

Tabel 33 50% en 95% van de berekende allelische rijkdom (*Ar*) en het aantal genotypes nodig om deze genetische diversiteit te bereiken per locatie.

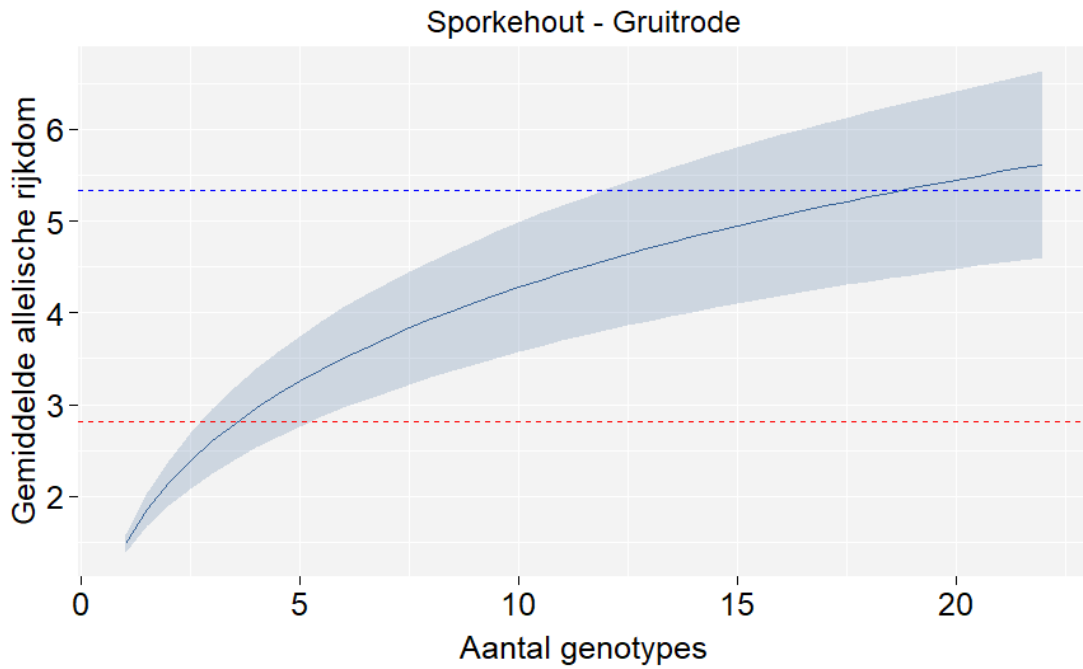
Locatie	Ar	50% Ar	# genotypes	95% Ar	# genotypes
Beukenberg	5,67	2,84	4	5,39	19
De Lovie	5,16	2,58	4	4,90	19
Gruitrode	5,62	2,81	4	5,33	19
Koekelarebos	4,82	2,41	3	4,58	18
Meikensbossen	4,75	2,38	3	4,51	19
Oude Kwekerij	5,45	2,73	4	5,18	19
Vloethemveld	4,84	2,42	3	4,60	18



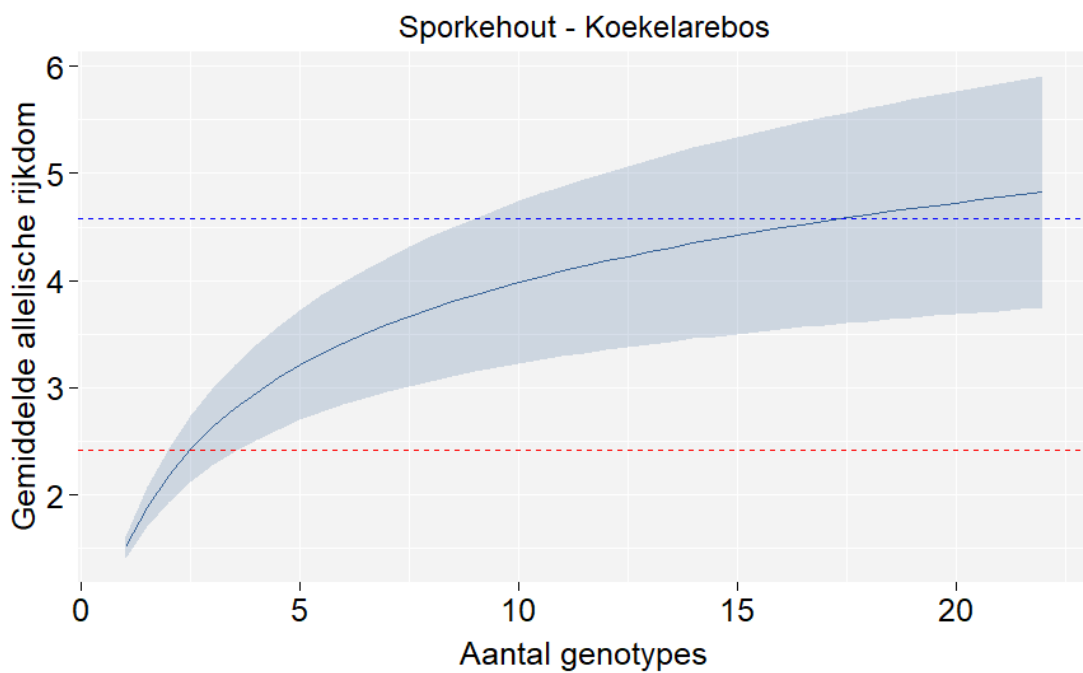
Figuur 74 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Beukenberg. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.



Figuur 75 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard De Lovie. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.

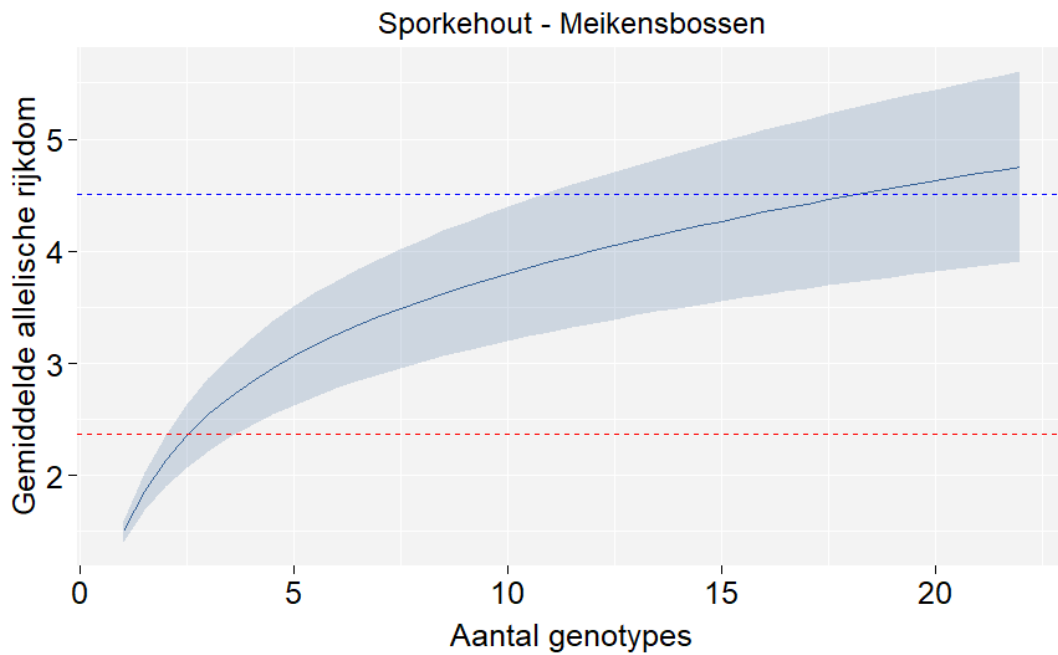


Figuur 76 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Gruitrode. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.

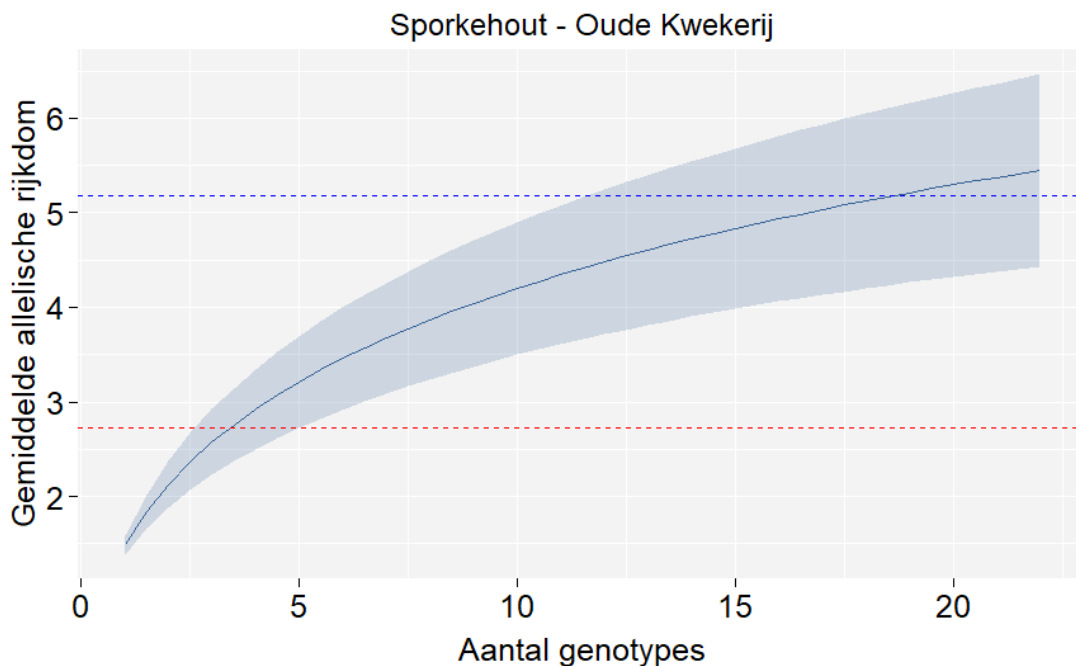


Figuur 77 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Koekelarebos. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.



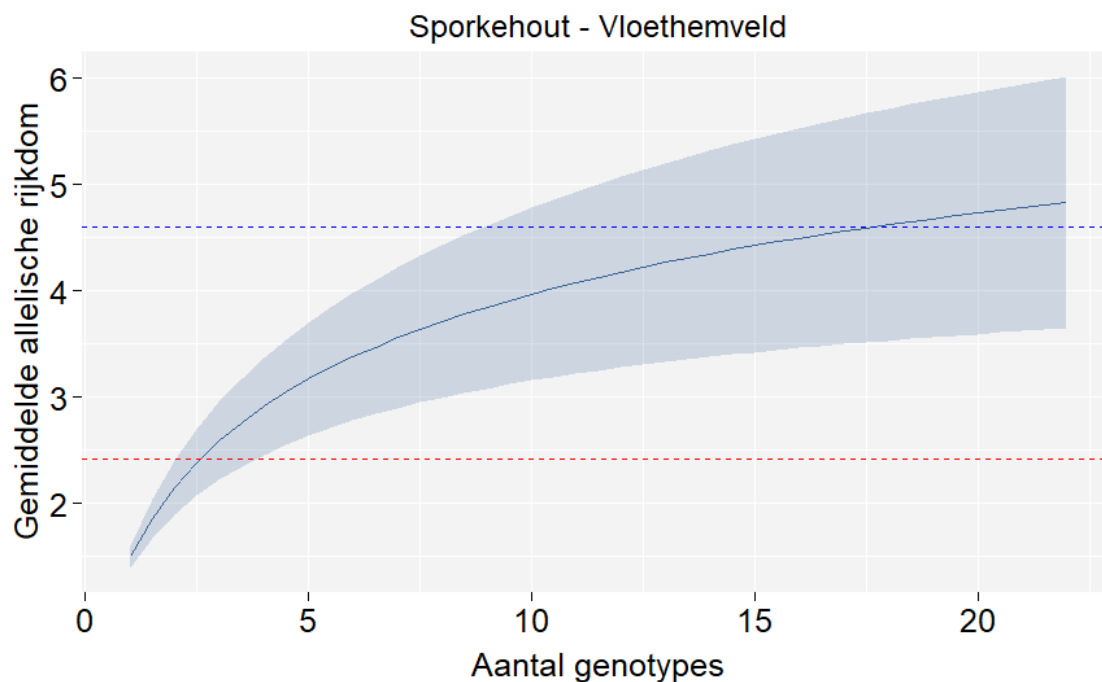


Figuur 78 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Meikensbossen. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.



Figuur 79 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Oude Kwekerij. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.



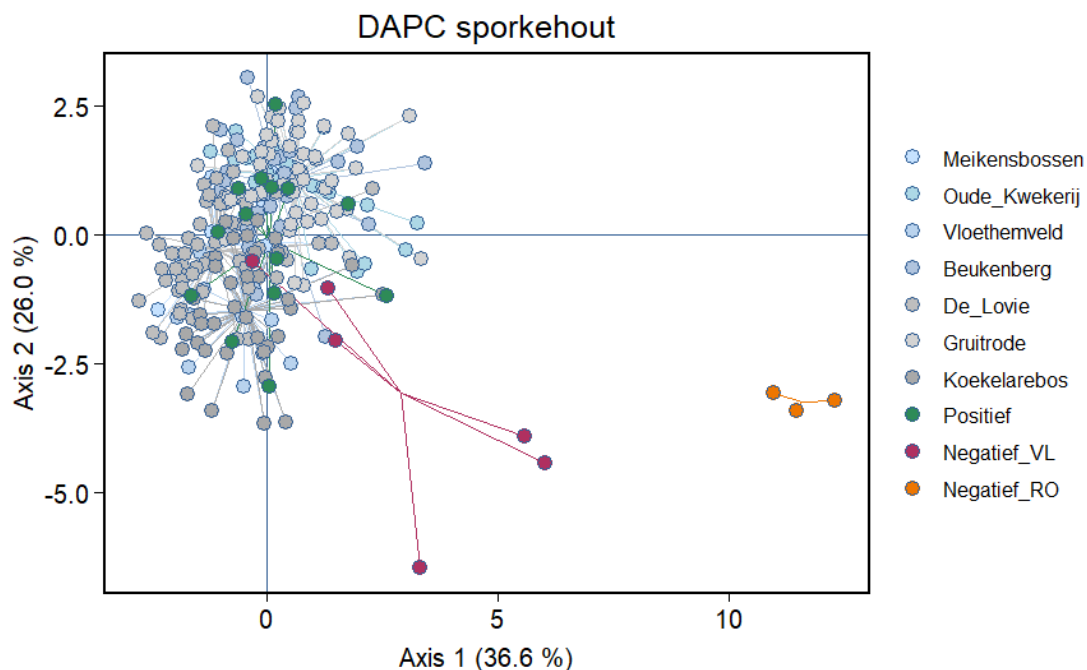


Figuur 80 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Vloethemveld. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.

8.3.3 Ouderschapsanalyses

De DAPC plot toont hoe sterk de genotypes van de positieve en negatieve controlestalen lijken op de genotypes die aanwezig zijn in de zaadboomgaarden van sporkehout.

Op figuur 81 zien we dat de groep van de positieve controlestalen sterk overlapt met de groep van de ouderbomen. De groep van de negatieve controlestalen die afkomstig zijn uit Roemenië overlapt niet met de genotypes van de ouderbomen. Dit geeft al een eerste indicatie dat deze stalen niet uit de zaadboomgaarden afkomstig zijn. De groep van de Oost-Vlaamse stalen overlapt wel deels met de groep van de mogelijke ouderbomen. In dit geval moeten de ouderschapsanalyses meer duidelijkheid bieden.



Figuur 81 DAPC plot voor sporkehout. De genotypes uit de zaadboomgaarden zijn aangeduid in het blauw en lichtgrijs, de genotypes van de negatieve controlestalen uit Vlaanderen (Negatief_VL) zijn aangeduid in het rood, deze uit Roemenië (Negatief_RO) in het oranje. De genotypes van de positieve controlestalen zijn aangeduid in het groen.

Vervolgens voerden we een ouderschapsanalyse uit in Colony (Jones & Wang 2010). Deze analyse werd twee keer uitgevoerd, waarbij we de toelating van technische fouten de eerste streng (0,02; Tabel 12) en de tweede keer iets toegeven (0,05; Tabel 12) instelden.

Tabel 34 Resultaat van de ParentPair analyse in Colony met een technische fout van 0,02 (links) en 0,05 (rechts). In een rij waarin geen ouderboom werd aangeduid (-), wordt aangegeven wat de kans is dat de ouderbomen niet in de databank zitten. Prob. = probability of waarschijnlijkheid. Een Prob. = 1 is een waarschijnlijkheid van 100%.

Staal	Mogelijke ouderbomen	Prob.	Mogelijke ouderbomen	Prob.
	Technische fout: 0,02		Technische fout: 0,05	
<i>Negatieve controle</i>				
Sp_neg_2 (VL)	- F.ALN_37	0,9233 0,0767	-	0,9996
Sp_neg_3 (VL)	-	1	-	1
Sp_neg_4 (VL)	-	1	-	1
Sp_neg_5 (VL)	-	1	-	1
Sp_neg_6 (RO)	-	1	-	1
Sp_neg_7 (RO)	-	1	-	1
Sp_neg_8 (RO)	-	1	-	1
Sp_neg_9 (VL)	-	1	-	1
Sp_neg_10 (VL)	-	1	-	1

<i>Positieve controle</i>				
Sp_pos_1	- F.ALN_30 & -	0,9742 0,0201	F.ALN_31 & - -	0,8656 0,4118
Sp_pos_2	F.ALN_35 & F.ALN_37	1	F.ALN_37 & F.ALN_35 F.ALN_37 & -	0,9837 0,0156
Sp_pos_3	F.ALN_35 & - LIC2 & -	0,9233 0,0722	F.ALN_31 & - -	0,5941 0,4059
Sp_pos_4	F.ALN_35 & - -	0,9158 0,0842	F.ALN_31 & - -	0,8656 0,1344
Sp_pos_5	-	1	F.ALN_31 & - -	0,8656 0,1344
Sp_pos_6	-	0,9799	F.ALN_31 & - -	0,8011 0,1990
Sp_pos_7	LIC2 - LIC2 & F.ALN_24	0,5081 0,4281 0,0639	- F.ALN_24 & -	0,9712 0,0191
Sp_pos_8	F.ALN_35 & F.ALN_37	1	F.ALN_37 & F.ALN_35 F.ALN_37	0,9837 0,0156
Sp_pos_9	WC1 & - LIC2 & -	0,9795 0,0152	- LIC2 & -	0,8823 0,1175
Sp_pos_10	- LIC2 & MO5 LIC2 & -	0,4243 0,3290 0,2429	- LIC2 & - MO5 & -	0,5946 0,2269 0,1785
Sp_pos_11	- MO8 & -	0,8674 0,1288	MO8 & - -	0,5586 0,4414
Sp_pos_12	WC1 & - -	0,9795 0,0205	-	0,9996
Sp_pos_13	MO6 & - -	0,7900 0,2093	- MO6 & -	0,6560 0,3439
Sp_pos_14	LIC2 & - -	0,5719 0,4281	- LIC2 & -	0,7695 0,2305

Ondanks dat sommige Vlaamse negatieve controlestalen genetisch gelijkend zijn aan de ouderbomen (Figuur 81), werd in beide ouderschapsanalyses geen ouderboom toegewezen met hoge waarschijnlijkheid. Aan staal Sp_neg_2 werd enkel in de analyse met een lage technische fout (0,02) met een zeer kleine waarschijnlijkheid een ouderboom toegewezen. Hierdoor zijn we zeker dat de negatieve controlestalen niet uit de zaadboomgaarden afkomstig zijn.

De zaden voor de positieve controlestalen werden in de zaadboomgaarden Beukenberg (Sp_pos_1 - 8) en Vloethemveld (Sp_pos_9 - 14) verzameld. In de ouderschapsanalyse met de lage technische fout (0,02) werd aan 9 van de 14 individuen (64%) minstens één ouder met een hoge waarschijnlijkheid toegewezen. Aan het staal St_pos_7 werd wel een hoge waarschijnlijkheid een ouder (LIC2) toegewezen, maar dit genotype is niet aanwezig in de zaadboomgaard Beukenberg waar het staal vandaan komt, wel in Vloethemveld. De exacte herkomst van de genotypes in Beukenberg is niet bekend. Het genotype LIC2 is mogelijks sterk genetische verwant aan de genotypes van ouderbomen in Beukenberg.



In de ouderschapsanalyse met de hogere technische fout (0,05) werd aan 8 van de 14 individuen (57%) minstens één ouder met een hoge waarschijnlijkheid toegewezen. Als we de resultaten van beide ouderschapsanalyses combineren, werd aan 13 van de 14 stalen (93%) minstens één ouder met hoge waarschijnlijkheid toegewezen. Over deze stalen kunnen we dus met zekerheid zeggen dat ze afkomstig zijn uit de zaadboomgaard.

8.4 CONCLUSIE

- In totaal bevatten de zeven zaadboomgaarden 223 genotypes van sporkehout. In de zaadboomgaarden Oude Kwekerij, Meikensbossen, Vloethemveld, Beukenberg en De Lovie staan respectievelijk 70, 31, 43, 34 en 61 genotypes. De zaadboomgaarden Gruitrode en Koekelarebos werden niet volledig ingezameld. Hier staan vermoedelijk 59 en 39 genotypes .
- Alle sporkehout zaadboomgaarden bevatten een hoge genetische diversiteit, die vergelijkbaar is met de genetische diversiteit van natuurlijke sporkehout populaties. Om 50% van de gemiddelde allelische rijkdom van een zaadboomgaard te behouden zijn er minstens drie genotypes nodig, om 95% te behouden zijn er minstens 18 genotypes nodig.
- De DNA-databank kan voor sporkehout gebruikt worden om de herkomst van bosplantsoen te traceren.



9 WILDE LIJSTERBES

9.1 SOORTENBESCHRIJVING

9.1.1 Ecologie

Wilde lijsterbes (*Sorbus aucuparia*) komt wijdverspreid voor in Europa (Figuur 82). De soort is inheems in Vlaanderen en is er uiterst algemeen, behalve in de polders waar hij vrij zeldzaam is (Van Landuyt et al. 2006; Figuur 83). Wilde lijsterbes gedijt het beste in lichte loofbossen, aan bosranden en in houtkanten op droge tot vochtige, licht zure, voedselarme bodems.

De wilde lijsterbes is eenhuizig en de bloemen zijn tweeslachtig (hermafrodiet), wat betekent dat een bloem zowel vrouwelijke als mannelijke organen heeft. De bloemen bloeien van mei tot juni, en zelfs tot juli in Noord-Europa, en worden bevrucht via insectenbestuiving (Räty et al. 2016).

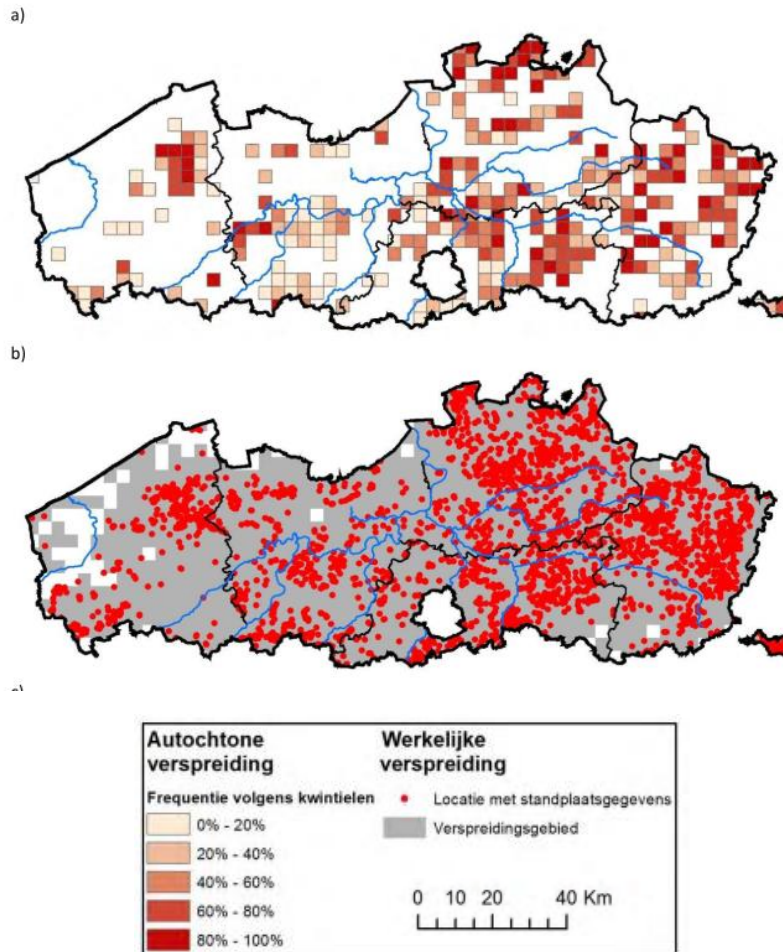
9.1.2 Waarde

Hoewel het hout van de wilde lijsterbes hard is, is het niet geschikt voor buitenshuis gebruik. De bomen worden sinds oudsher wel voor medicinale redenen aangeplant. De bessen bevatten namelijk veel vitamines en antioxidanten. De bessen hebben ook veel ecologische waarde. De bessen blijven tot laat in het jaar aan de bomen hangen, waardoor het een belangrijke voedselbron is voor vele vogels (Räty et al. 2016). De vogels helpen op hun beurt mee het zaad verspreiden.





Figuur 82 Het verspreidingsgebied van wilde lijsterbes (*Sorbus aucuparia*) in Europa. (Bron: Euforgen, Caudullo et al. 2017)



Figuur 83 De autochtone (a) en werkelijke verspreiding (b) van wilde lijsterbes (*Sorbus aucuparia*) in Vlaanderen. (Bron: Uyttenbroeck et al. 2014)

9.2 METHODE

9.2.1 Stalen

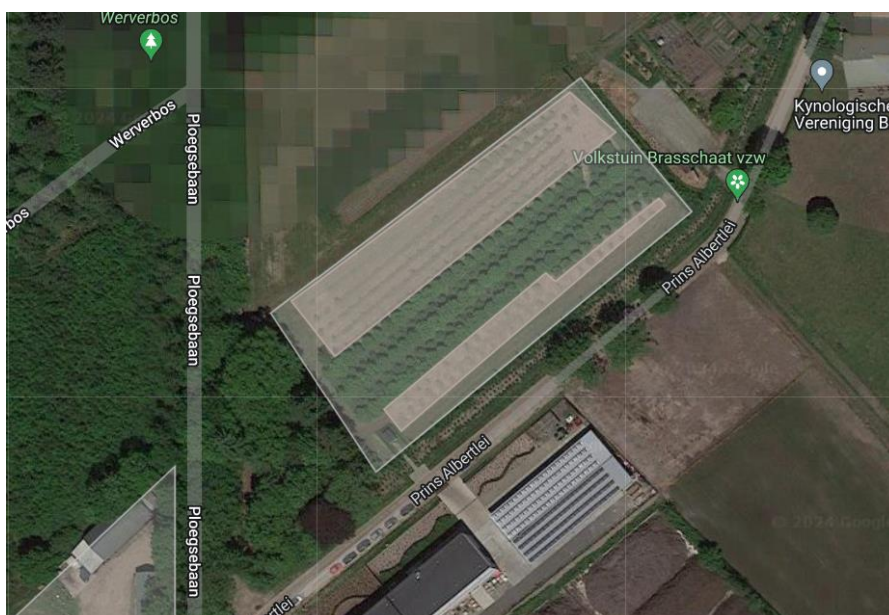
Voor het opstellen van de genetische profielen van autochtone wilde lijsterbes (*Sorbus aucuparia*) bemonsterden we in de lente van 2022 drie autochtone zaadboomgaarden. In de lente van 2024 werden bijkomend twee zaadboomgaarden gedeeltelijk bemonsterd (Tabel 35). Deze zaadboomgaarden zijn grotendeels kopijen van volledig ingezamelde zaadboomgaarden. Hier werden enkel individuen met een uniek of onbekende veldcode ingezameld. Uniek wil zeggen dat de code niet in een andere zaadboomgaard van wilde lijsterbes voorkomt. Ter controle werden ook de flankerende individuen in de zaadboomgaard ingezameld. In totaal verzamelden we 477 bladstalen. De bladstalen worden bewaard op silicagel.

Tabel 35 De bemonsterde autochtone zaadboomgaarden van wilde lijsterbes met hun locatie en het aantal verzamelde bladstalen. Zaadboomgaarden met een asterisk (*) werden gedeeltelijk bemonsterd.

Zaadboomgaard	Gemeente	Code locatie	Aantal stalen
Nieuw goed te Parijs	Astene	1VB4610.2	78
Oude Kwekerij	Brasschaat	1VB4610.1	130
Eeuwenhout	Dranouter	1VB4610.6	193
Gruitrode*	Oudsbergen	1VB4610.4	36
Vloethemveld*	Zedelgem	1VB4610.3	40

9.2.1.1 Geanalyseerde zaadboomgaarden

Hieronder staan de locaties van de geanalyseerde zaadboomgaarden ingekleurd op luchtfoto.



Figuur 84 Oude Kwekerij te Brasschaat (51°19'30,1"N 4°30'28,7"E). De locatie van de bemonsterde wilde lijsterbessen is aangeduid in het bruin.



Figuur 85 Nieuw goed te Parijs te Astene (50°58'04,9"N 3°33'26,5"E). De locatie van de bemonsterde wilde lijsterbessen is aangeduid in het bruin.

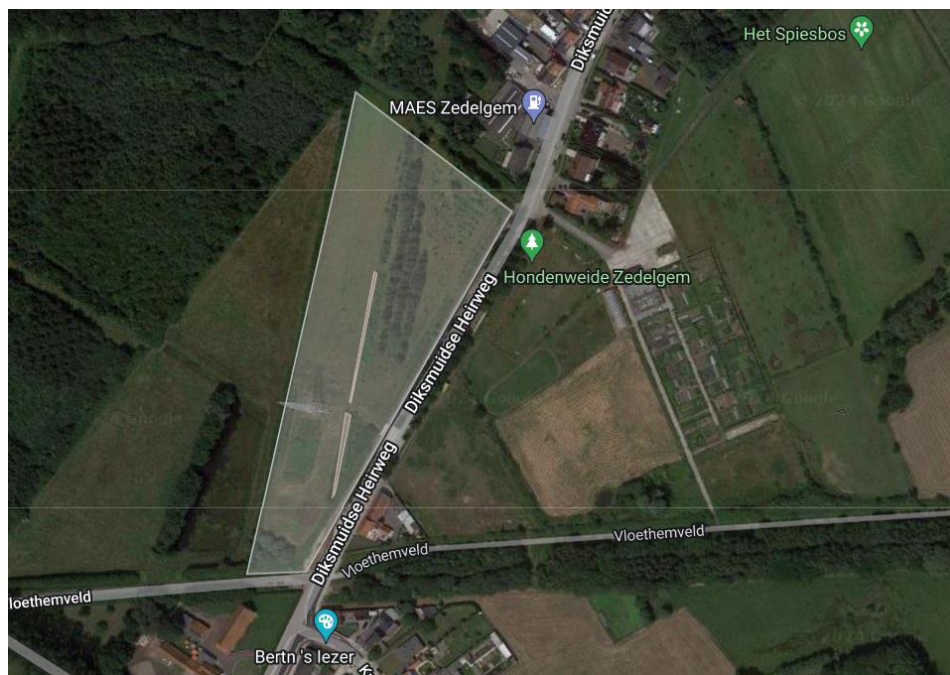


Figuur 86 Eeuwenhout te Dranouter (50°46'09,4"N 2°46'31,9"E). De locatie van de bemonsterde wilde lijsterbessen is aangeduid in het bruin.





Figuur 87 Gruitrode te Oudsbergen (51°03'45,7"N, 5°34'43,1"E). De locatie van de wilde lijsterbessen is aangeduid in het bruin.



Figuur 88 Vloethemveld te Zedelgem (51°08'51,0"N 3°07'24,4"E). De locatie van de wilde lijsterbessen is aangeduid in het bruin.

9.2.2 DNA-extractie

Per individu wogen we 25 à 30 mg (± 2 mg) bladmateriaal af. Het materiaal werd vervolgens fijn gemalen met de Tissue Lyser II (Qiagen) gedurende 3 minuten bij 30 Hz. Voor de DNA-extractie van de bladstalen volgden we de stappen van de GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit van EURx nauwkeurig op. Het DNA werd finaal geëluëerd in 100 μ l elutiebuffer. De DNA-stalen werden bewaard bij een temperatuur van -20 °C tot verdere analyses. Voor het bepalen van de fout op genotypering voerden we duplicaat DNA-extracties uit op tien bladstalen.

9.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

9.2.3.1 Gebruikte microsatellieten

In totaal gebruikten we elf microsatellieten die in drie multiplexen (MP) en één simplex (SP) werden ingedeeld via het programma Multiplex Manager 1.2 (Holleley & Geerts 2009) (Tabel 36). De primer-paren werden met 5' fluorescente label primers gelabeld (dyes: FAM, VIC, NED, PET).

9.2.3.2 PCR condities

De DNA-stalen werden verdund naar een concentratie van 10 ng/ μ l. Voor de amplificatie van de microsatellieten gebruikten we de QIAGEN Multiplex PCR kit met de volgende PCR condities: een initiële denaturatiestap gedurende 15 min. op 95 °C, 30 cycli van 30 s op 95 °C, 45 s op de locus-specifieke annealing temperatuur (TA, Tabel 36), en een extensiestap gedurende 45 s op 72 °C, tenslotte een elongatiestap gedurende 10 min. op 72 °C. Hiervoor werd een Biometra Thermocycler gebruikt. Het totale reactievolume bedroeg 10 μ l bestaande uit 1 μ l template DNA, 5 μ l QIAGEN multiplex Master mix (hotstart), primers (forward met label) in verschillende concentraties (Tabel 36) en DEPC water (UltraPure™ Water behandeld met 0,1% diethylpyrocarbonaat) tot een volume van 10 μ l.

Voor het bepalen van de fout op genotypering voerden we één tot vier onafhankelijke replicaat PCR-amplificaties van 16 DNA-stalen uit.

9.2.4 Fragmentanalyse

De PCR producten werden op een ABI 3500 genetic analyzer (Thermo Fisher) gelopen met de GeneScan 600 LIZ standaard. Vervolgens analyseerden we de stalen met het programma Geneious Prime 2019.3.2 (<https://www.geneious.com>).

9.2.5 Dataverwerking

9.2.5.1 Analyses loci

In totaal bepaalden we voor **477 individuen** een genetische profiel aan de hand van elf microsatellieten. Na het vergelijken van de genetische profielen vonden we in totaal **171 genotypes**.

Voor de zaadboomgaarden **Vloethemveld** en **Gruitrode** werden niet alle individuen geanalyseerd. Enkel individuen met een veldcode die niet in een andere zaadboomgaard van wilde lijsterbes voorkomt werden hier geanalyseerd.

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

Tabel 36 Indeling van de 11 microsatellieten gebruikt voor *Sorbus aucuparia* in 3 multiplexen (MP) en één simplex (SP) met de gevonden productgrootte (in baseparen), de gebruikte concentratie (in μmol), de annealing temperatuur (TA) en de gebruikte fluorescente kleur. Bronnen informatie microsatelliet merkers: Oddou-Muratorio et al. 2001^a, González-González et al. 2010^b, Gianfranceschi et al. 1998^c

MP	Locus	Forward primer	Reverse primer	Motief	Product-grootte (bp)	Aantal allelen	TA (°C)	Conc. (μM)	Kleur
1	MSS1 ^a	ATGTTGGTAGTCATCCCT	GCTCAGATAGCCACTCCCC	GA	145 - 194	18	58	0,20	FAM
1	SA14 ^b	ATGGATTTAGTTAACAGTTGTC	GAGGTA AACCTACCACTATAC	2	192 - 254	25	58	0,20	VIC
1	MSS3 ^a	TGTAATTTCCGTTATTTGCT	TCGCAAGTAACTATGAGTGGG	CA	142	mono	58	0,20	PET
2	SA08 ^b	CAGAGAGAGTGCCTGCCT	GAATTCCTGGCAGTTGCCT	2	234 - 282	17	62	0,20	FAM
2	SA01 ^b	ATGGAGTTGAGCTCCACATC	GGTGGAGGGACAATTGTGTC	2	213 - 254	31	62	0,40	VIC
2	SA03 ^b	CACTTCTCCTGCTGTTGG	ACTACTGCTACTTCTGTGGG	2	212 - 222	2	62	0,20	NED
2	CH01h01 ^c	GAAAGACTTGCACTGGGAGC	GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT	CG	107 - 189	20	62	0,20	PET
2	SA06 ^b	ATTTGATCCATGTGCGACTGCA	TGCAGCGGTTGCAGATTGCA	2	323 - 325	1	62	0,20	PET
3	MSS16 ^a	CTCCCCTTGTGTGATGCC	TTGCCCTCAAAGAATGCC	CT	140 - 142	1	60	0,20	VIC
3	CH01h10 ^b	TGCAAAGATAGGTAGATATATGCCA	AGGAGGGATTGTTGTGCAC	AG	90 - 128	17	60	0,20	PET
SP	SA09 ^b	CTTGTTGGACGGATTTCTTC	CCAATACTTGAGTAGCATAC	2	162 - 260	26	55	0,20	NED



Tabel 37 Overzicht van het aantal individuen en genotypes per zaadboomgaard van wilde lijsterbes. Voor de zaadboomgaarden Gruitrode en Vloethemveld worden het aantal genotypes weergegeven die vermoedelijk aanwezig zijn in de zaadboomgaarden.

Zaadboomgaard	Code locatie	Aantal individuen	Aantal genotypes
Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2	78	30
Oude Kwekerij	1VB4610.1	130	71
Eeuwenhout	1VB4610.6	193	59
Gruitrode	1VB4610.4	36	57
Vloethemveld	1VB4610.3	40	28

De totale dataset heeft 10,08% ontbrekende data. Gebaseerd op de duplicaat extracties en replicaat PCR-amplificaties vonden we een gemiddelde fout op genotypering van 0,23%. Door de ontbrekende data kon van **drie wilde lijsterbes individuen** geen genetisch profiel bepaald worden (één in Gruitrode, twee in Eeuwenhout). Bij het vergelijken van genetische profielen van zaailingen met deze van de databank moet, naast de fout op genotypering, rekening worden gehouden met een **foutenmarge van 3,28%** (kans van 2 op 61 dat genotype van ouderboom niet in de databank zit) voor **Eeuwenhout**.

Voor de zaadboomgaarden Vloethemveld en Gruitrode moet ook steeds rekening worden gehouden met een foutenmarge aangezien we in deze zaadboomgaarden niet alle individuen bemonsterd hebben. Voor **Vloethemveld** zijn we **zeker** dat **96%** van de vermoedelijke aanwezige genotypes ook aanwezig is (27 genotypes van de 28 vermoedelijk aanwezige genotypes geanalyseerd). Het genetische profiel van elk genotype dat vermoedelijk aanwezig is in de zaadboomgaard, is aanwezig in de databank.

Voor **Gruitrode** zijn we **zeker** dat **53,4%** van de vermoedelijk aanwezige genotypes ook aanwezig zijn (31 genotypes van de 58 vermoedelijk aanwezige genotypes geanalyseerd). Voor acht genotypes die vermoedelijk in Gruitrode voorkomen werd geen genetisch profiel opgesteld. Individuen met de veldcodes van die genotypes werden in de andere zaadboomgaarden bemonsterd, maar bleken een ander genetisch profiel te hebben. Hierdoor ontbreken de genetische profielen van zeven vermoedelijk aanwezige genotypes. Door missende data kon van één individu het genotype niet bepaald worden. Bij het vergelijken van genotypes van zaailingen met deze van de databank moet dus ook rekening worden gehouden met een **foutenmarge van 13,79%** (kans van 8 op 58 dat genotype van ouderboom niet in de databank zit).

Voor de volgende genetische analyses werden enkel de genetische profielen van de unieke genotypes gebruikt. Voor de zaadboomgaarden Gruitrode en Vloethemveld werden ook de genetische profielen van de genotypes die vermoedelijk voorkomen in de zaadboomgaarden (en ook voorkomen in de andere zaadboomgaarden) toegevoegd aan de dataset.

9.2.5.2 Genetische diversiteit

Met het R-pakket *adegenet* 2.1.10 (Jombart 2008) in R v4.4.0 (R Core Team, 2024) berekenden we de volgende diversiteitsparameters: het gemiddeld aantal geobserveerde allelen per locus (N_a), de gemiddelde geobserveerde heterozygositeit (H_o), Nei's verwachte heterozygositeit (H_e), en de gemiddelde inteeltcoëfficiënt (F_{IS}). We gebruikten de rarefactie methode van het programma HP-Rare v1.0 (Kalinowski 2005) om het gemiddeld aantal allelen per locus (Ar) gecorrigeerd voor het minimum aantal gegenotypeerde individuen per locus (25 individuen voor Ar per zaadboomgaard, 159 individuen voor Ar over alle zaadboomgaarden), te berekenen. Met

//

het programma ADZE 1.0 (Szpiech et al. 2008) stelden we een rarefaction curve op. Voor de parameter Max_G werd dezelfde waarde gebruikt als we voor het berekenen van de A_r gebruikt hebben ($2 * 25 = 50$ G).

Tenslotte schatten we de frequentie van nul-allelen in via de Dempster methode (Dempster et al. 1977) in het programma GENEPOP v4.3. De loci MSS1, SA09 en MSS16 vertonen voor elke locatie gemiddelde tot hoge schattingen van nul-allel frequenties ($r > 0,20$).

De volgende analyses voerden we, ter vergelijking, met en zonder de loci waarvoor we een hoge frequentie nul-allelen vonden uit. Omdat de waarden van de diversiteitsparameters verschillen wanneer de loci uit de dataset wordt gelaten, voerden we de genetische analyses uit zonder de loci met een hoge schatting van nul-allel frequenties.

9.2.5.3 Ouderschapsanalyses

Om de bruikbaarheid van de genetische dataset te testen werden negatieve controlestalen gebruikt. Deze stalen zijn afkomstig van individuen verspreid over Oost-Vlaanderen.

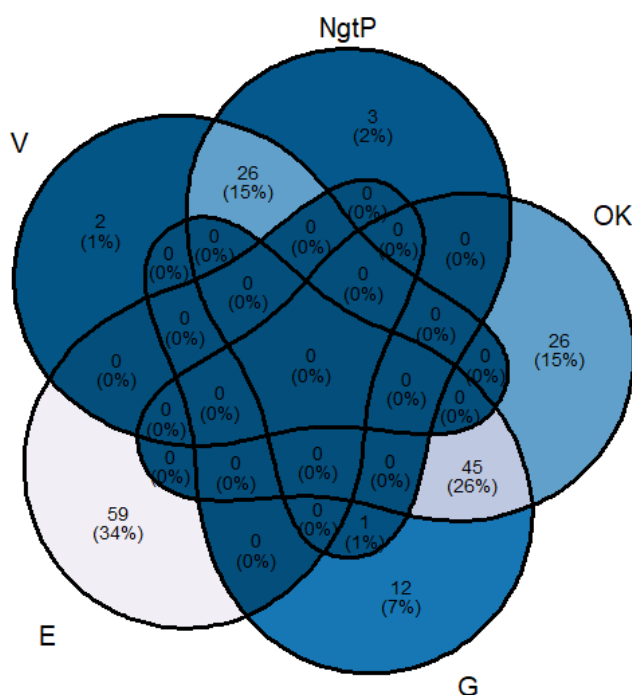
We voeren eerst een verkennende DAPC (discriminant analysis of principal components) uit via het R-pakket *adegenet* 2.1.10 (Jombart 2008) via het R-script beschreven in Jenkins (2020). Deze analyse geeft ons een idee over hoe sterk de genotypes van controlestalen lijken op de genotypes uit de databank met de ouderbomen.

Via een ouderschapstest wordt er nagegaan of er ouderbomen kunnen worden toegewezen aan de controlestalen. Met het programma Colony V2.0.6.6 (Jones & Wang 2010) voerden we ParentPair analyses uit. In deze analyse wordt er naar een mogelijke vader- en moederboom gezocht. Bij de resultaten wordt rekening gehouden met mogelijke mismatches tussen de ouderbomen en hun nakomelingen. Mismatches kunnen namelijk ook ontstaan door technische fouten (geen amplificatie, error in het scoren van de allelen... zie 9.2.5.1). We voerden twee analyses uit met telkens een verschillende kans op technische fout: 0,02 en 0,05. Een technische fout van 0,05 laat meer mismatches tussen ouders en nakomelingen toe. Voor de genotypes van de mogelijke vaders en moeders gebruikten we de unieke genotypes van alle zaadboomgaarden. We liepen 10 runs per analyse en stelden de kans op het vinden van een vader of moeder telkens in op 0,5.

9.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

9.3.1 Aanwezige genotypes

In totaal bevatten de zaadboomgaarden 171 genotypes van wilde lijsterbes. In de zaadboomgaarden Eeuwenhout, Nieuw goed te Parijs en Oude Kwekerij staan respectievelijk 59, 30 en 71 genotypes. Voor de zaadboomgaarden Gruitrode en Vloethemveld werden niet alle individuen geanalyseerd. In deze zaadboomgaarden zijn vermoedelijk 59 en 28 genotypes aanwezig. De zaadboomgaard Eeuwenhout heeft een unieke samenstelling van genotypes. Zoals verwacht hebben Vloethemveld en Nieuw goed te Parijs, en Oude Kwekerij en Gruitrode, veel genotypes gemeenschappelijk (Figuur 89).

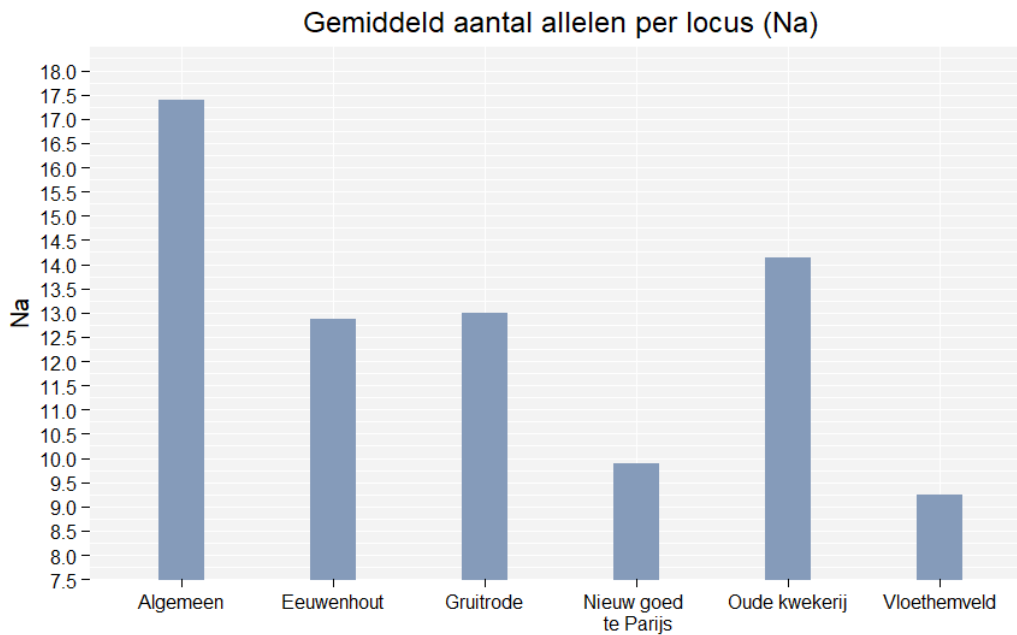


Figuur 89 Venn-diagram van de verdeling van de aanwezige wilde lijsterbes genotypes. Het percentage geeft de genotypes per hok ten opzichte van het totaal aantal gevonden genotypes weer. NgTP = Nieuw goed te Parijs, OK = Oude Kwekerij, G = Gruitrode, E = Eeuwenhout, V = Vloethemveld.

9.3.2 Genetische diversiteit

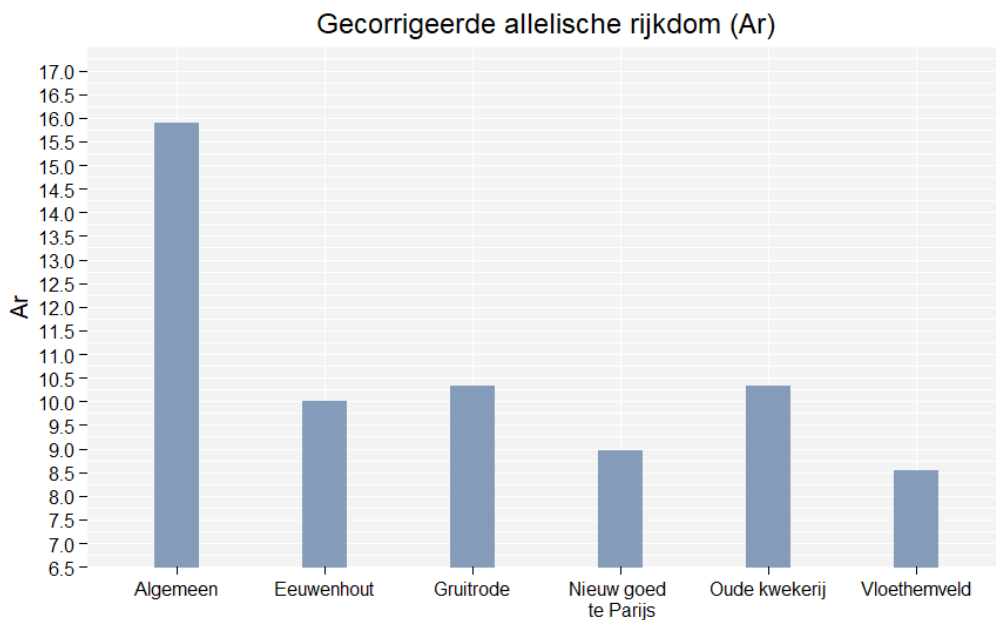
In totaal werden er 139 allelen (N_a) geobserveerd. Tussen de loci varieert het aantal allelen over alle zaadboomgaarden van 1 tot 31 allelen per locus (Tabel 36), met een gemiddelde van 17,4 allelen per locus. N_a varieert tussen de locaties. Vloethemveld en Nieuw goed te Parijs hebben de laagste N_a (respectievelijk 9,25 en 9,88), de Oude Kwekerij heeft de hoogste diversiteit (14,13) (Figuur 90).





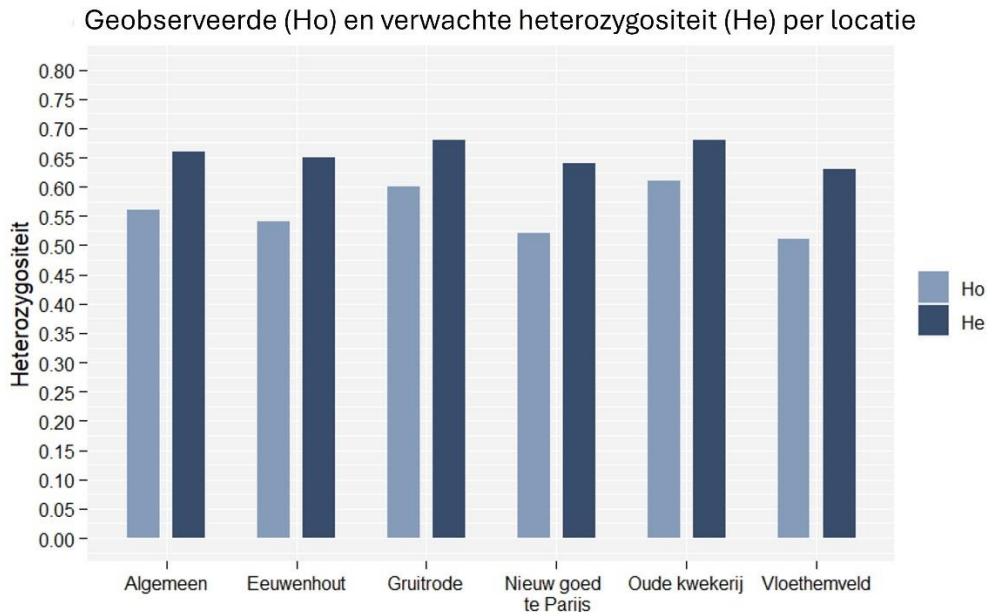
Figuur 90 Vergelijking van het gemiddeld aantal allelen per locus (N_a) per locatie. ‘Algemeen’ is de N_a van alle zaadboomgaarden samen.

Het gecorrigeerde gemiddelde aantal allelen per locus (A_r) varieert ook tussen de locaties (Figuur 91). Oude Kwekerij en Gruitrode (grotendeels kopijen van elkaar) hebben de hoogste A_r met een waarde van 10,3. Vloethemveld en Nieuw goed te Parijs (grotendeels kopijen van elkaar) hebben de laagste A_r met een waarde van respectievelijk 8,55 en 8,96. De A_r van alle genotypes in de zaadboomgaarden samen heeft een veel grotere waarde van 15,89.



Figuur 91 Vergelijking van het gemiddeld aantal allelen per locus (A_r) per locatie. ‘Algemeen’ is de A_r van alle zaadboomgaarden samen

De geobserveerde heterozygositeit (H_o) varieert tussen de loci van 0 tot 0,83 per locus met een gemiddelde van 0,57. De verwachte heterozygositeit (H_e) varieert tussen de loci van 0 tot 0,93 per locus met een gemiddelde van 0,68. H_o en H_e zijn gelijkaardig tussen de locaties (Figuur 92). De gemiddelde H_o varieert tussen 0,51 en 0,61 per locus. De gemiddelde H_e varieert tussen 0,63 en 0,68 per locus.



Figuur 92 Vergelijking van de geobserveerde (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e) per locus per locatie. Ook het gemiddelde over de verschillende locaties is weergegeven (Algemeen).

De verwachte heterozygositeit (H_e) en allelische rijkdom (A_r) zijn indicatoren voor de genetische diversiteit binnen een populatie, in dit geval binnen de zaadboomgaarden. Een hoge genetische variatie binnen een populatie is belangrijk voor het aanpassingsvermogen van de populatie aan een veranderend klimaat.

Op alle locaties is er een indicatie voor inteelt (F_{IS} , gemiddelde \pm sd; Algemeen: $0,168 \pm 0,171$; Eeuwenhout: $0,188 \pm 0,206$; Nieuw goed te Parijs: $0,202 \pm 0,171$; Oude Kwekerij: $0,141 \pm 0,153$; Gruitrode: $0,144 \pm 0,154$; Vloethemveld: $0,203 \pm 0,161$). De waarden zijn echter niet significant.

Tot dusver werden slechts enkele genetische populatiestudies op natuurlijke populaties van wilde lijsterbes uitgevoerd. De enige studie met vergelijkbare diversiteitsparameters vond plaats in Iran (Tabel 38). We kunnen dus ook niet inschatten of de genetische diversiteit binnen de zaadboomgaarden vergelijkbaar is met de genetische diversiteit in natuurlijke Europese populaties.

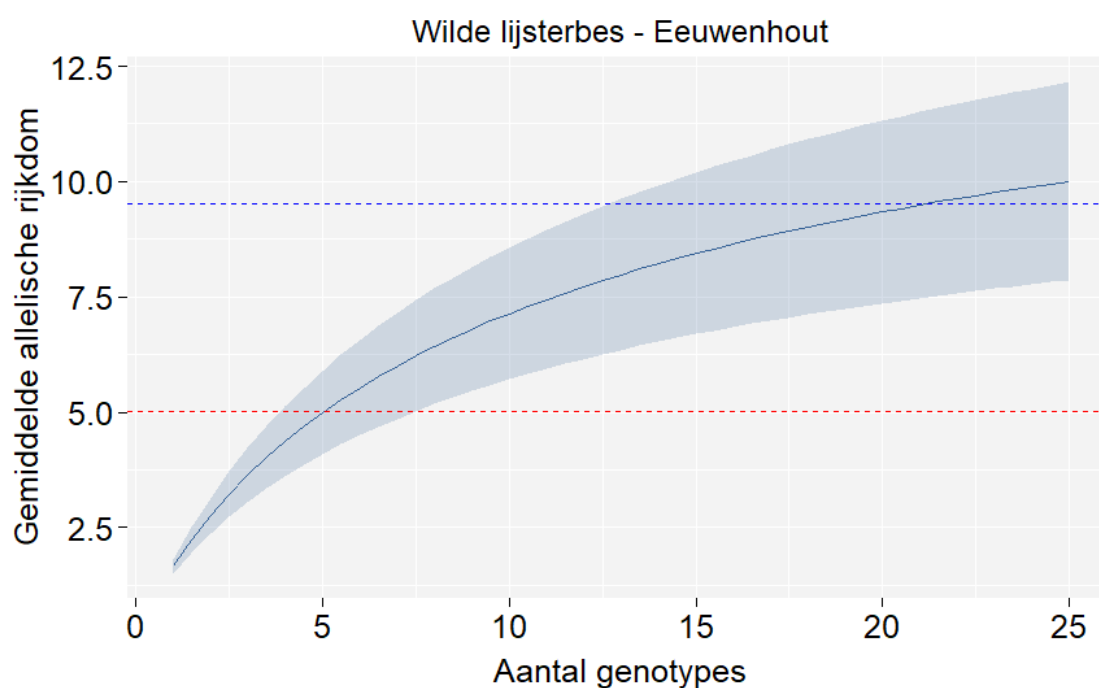
Tabel 38 Het aantal geanalyseerde individuen/genotypes (N), de gemiddelde allelische rijkdom (A_r), geobserveerde heterozygositeit (H_o) en verwachte heterozygositeit (H_e) van de geanalyseerde boomgaarden en een natuurlijke populatie.

Locatie	N	A_r	H_o	H_e	Bron
Geanalyseerde zaadboomgaarden	171	15,89	0,57	0,68	
Iran	78	3,97	0,50	0,67	Yousefzadeh et al. 2021

De allelische rijkdom werd binnen de locaties Oude Kwekerij en Gruitrode hoger ingeschat. Toch is het aantal genotypes dat nodig is om een bepaald niveau van allelische rijkdom te behouden voor elke locatie gelijkaardig. Om 50% van de berekende allelische rijkdom te behouden, bij bv. de aanleg van een nieuwe zaadboomgaard via vegetatieve vermeerdering, moeten er minstens vier verschillende genotypes gebruikt worden (Tabel 39; Figuur 93-97, intercept rode lijn). Om 95% van de berekende allelische rijkdom te behouden, moeten er minstens 21 verschillende genotypes gebruikt worden (Tabel 39; Figuur 93-97, intercept blauwe lijn).

Tabel 39 50% en 95% van de berekende allelische rijkdom (Ar) en het aantal genotypes nodig om deze genetische diversiteit te bereiken per locatie.

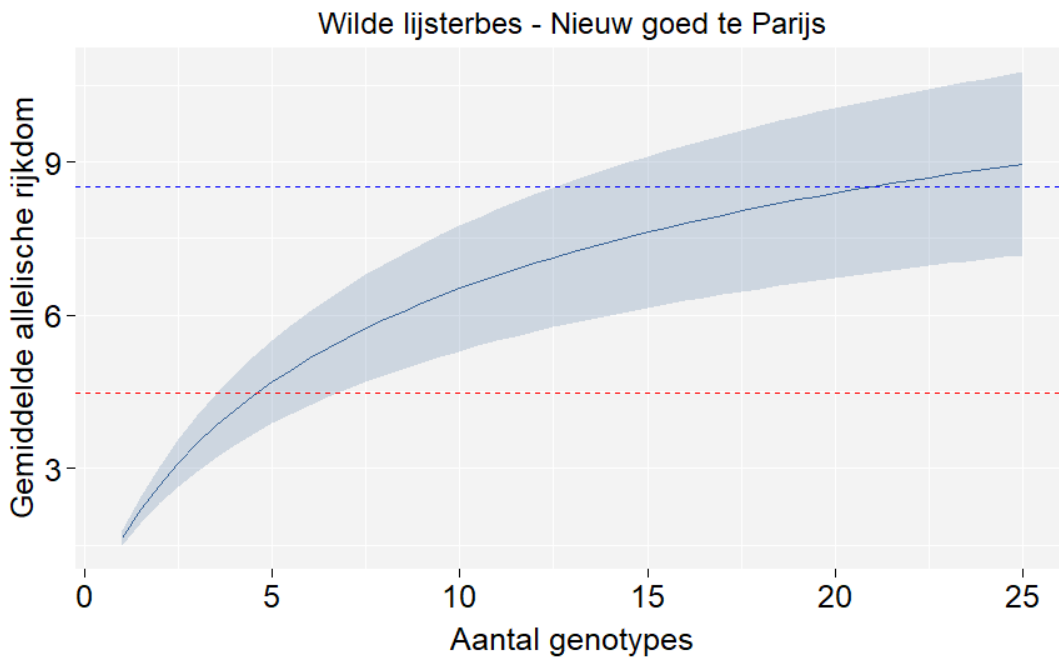
Locatie	Ar	50% Ar	# genotypes	95% Ar	# genotypes
Eeuwenhout	10,01	5,01	5	9,51	21
Gruitrode	10,33	5,17	5	9,81	21
Nieuw goed te Parijs	8,96	4,48	5	8,51	21
Oude kwekerij	10,32	5,16	5	9,80	21
Vloethemveld	8,55	4,28	4	8,12	21



Figuur 93 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (Ar) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Eeuwenhout. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.

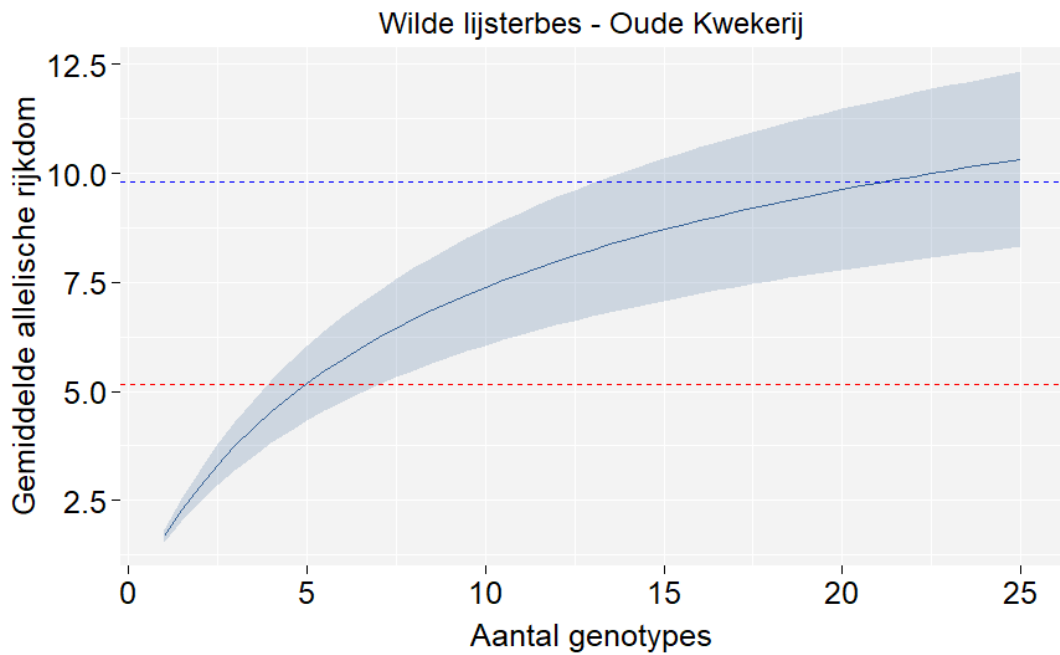


Figuur 94 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Gruitrode. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.

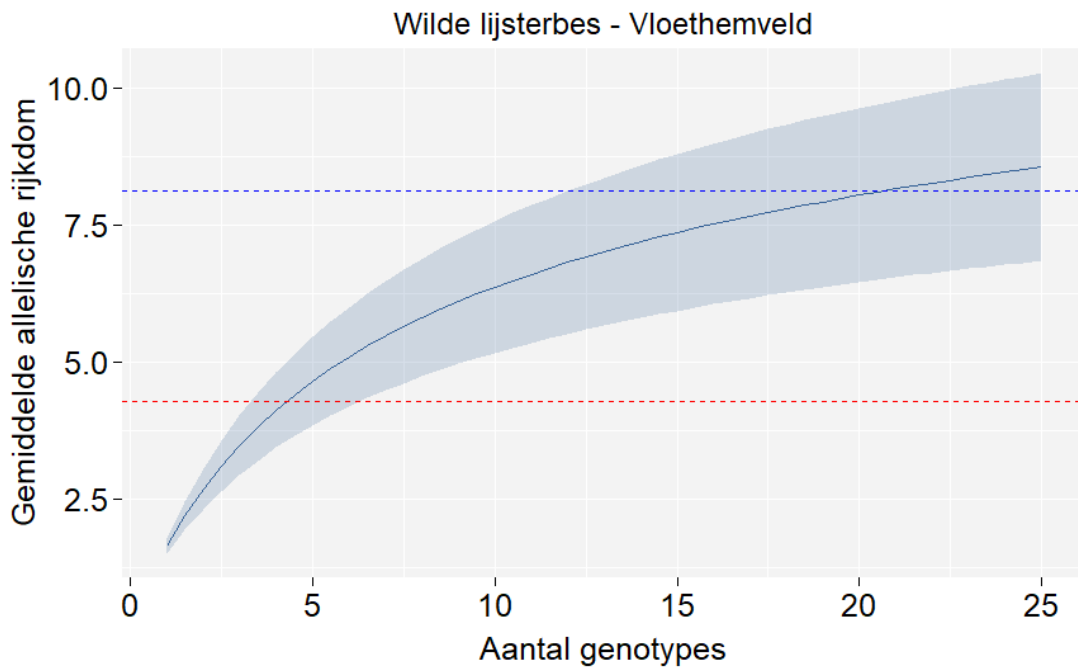


Figuur 95 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Nieuw goed te Parijs. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.

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



Figuur 96 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Oude Kwekerij. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.

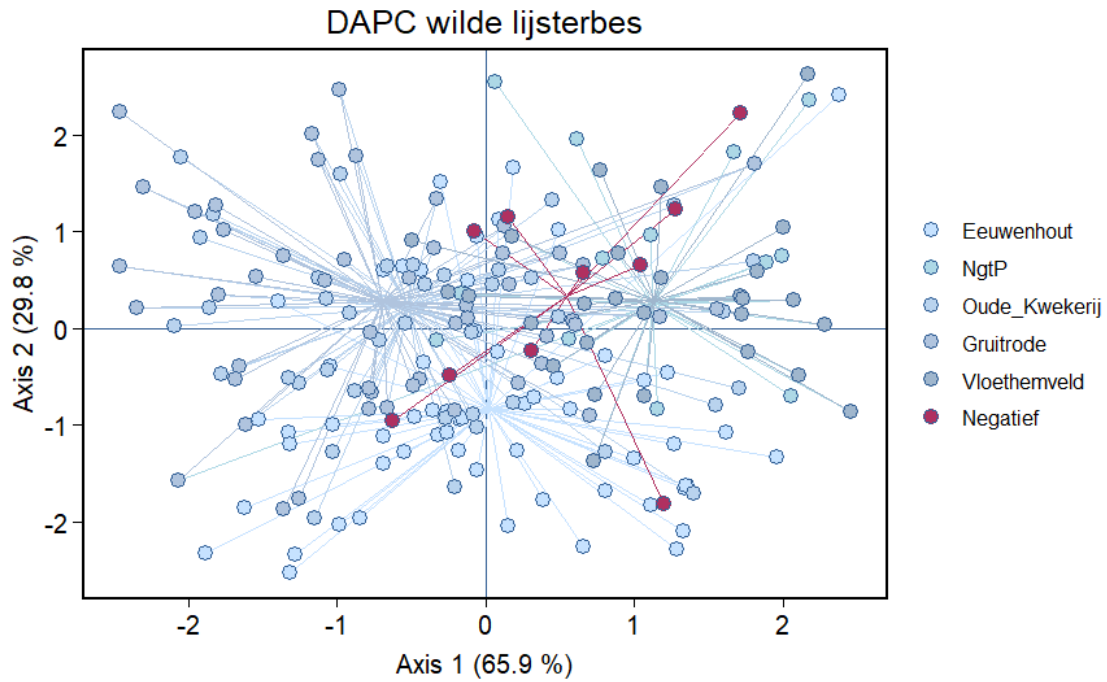


Figuur 97 Rarefaction curve die de gemiddelde allelische rijkdom (A_r) per aantal genotypes weergeeft voor de zaadboomgaard Vloethemveld. De rode stippellijn duidt 50% van de gemiddelde allelische rijkdom aan, de blauwe stippellijn duidt 95% aan. De schaduwzone rond de curve geeft de standaardafwijking weer.



9.3.3 Ouderschapsanalyses

De DAPC plot toont hoe sterk de genotypes van de positieve en negatieve controlestalen lijken op de genotypes die aanwezig zijn in de zaadboomgaarden van wilde lijsterbes. Op figuur 98 zien we dat de groep van de negatieve controlestalen sterk overlapt met deze van de zaadboomgaard genotypes. Doordat de negatieve controlestalen in Oost-Vlaanderen verzameld zijn, lijken de genetische profielen waarschijnlijk sterk op elkaar. De resultaten van de ouderschapsanalyses moeten in dit geval meer duidelijkheid geven over de herkomst van de stalen.



Figuur 98 DAPC plot voor wilde lijsterbes. De genotypes uit de zaadboomgaarden zijn aangeduid in het lichtblauw, de genotypes van de negatieve controlestalen zijn aangeduid in het rood.

Vervolgens voerden we een ouderschapsanalyse uit in Colony (Jones & Wang 2010). Deze analyse werd twee keer uitgevoerd, waarbij we de toelating van technische fouten de eerste streng (0,02; Tabel 12) en de tweede keer iets toegevender (0,05; Tabel 12) instelden.

- Maes D, Fajgenblat M, Herremans M, Piesschaert F, Vantieghem P, Jacobs I, Veraghtert W & Van Dyck H (2021) IUCN Rode Lijst van de dagvlinders in Vlaanderen 2021. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Marinoni DT, Beltramo C, Akkak A, Destefanis ML, Boccacci P & Botta R (2009) Gene expression and sporophytic self-incompatibility in hazelnut. *Acta Horticulturae* 845: 227-232.
- Martinsen GD, Whitham TG, Turek RJ & Keim P (2001) Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution* 55: 1325-1335.
- Mehlenbacher SA (1991) Hazelnuts (*Corylus*). Genetic resources of temperate fruit and nut crops. *Acta Horticulturae* 290: 791-836.
- Meirmans PG, Liu S & van Tienderen PH (2018) The Analysis of Polyploid Genetic Data. *J Hered* 109 (3): 283-296. 10.1093/jhered/esy006
- Mittempergher L & Santini A (2004) *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 13 (161).
- Nielsen LR & Kjær ED (2010) Fine-scale gene flow and genetic structure in a relic *Ulmus laevis* population at its northern range. *Tree Genetics & Genomes* 6 (5): 643-649. 10.1007/s11295-010-0280-3
- Oddou-Muratorio S, Aligon C, Decroocq S, Plomion C, Lamant T & Mush-Demesure B (2001) Microsatellite primers for *Sorbus torminalis* and related species. *Molecular Ecology Notes* 1: 297-299.
- Phuekvilai P. (2014). Relicts, refugia and reticulation: as study of population history, hybrids and phylogeny in the long-lived flowering tree genus *Tilia*. School of Biology, Newcastle University. Promoter.,
- Phuekvilai P & Wolff K (2013) Characterization of microsatellite loci in *Tilia platyphyllos* (Malvaceae) and cross-amplification in related species. *Appl Plant Sci* 1 (4). 10.3732/apps.1200386
- Pigott D (1992) The clones of common lime (*Tilia vulgaris* Hayne) planted in England during the seventeenth and eighteenth centuries. *New Phytol* 121 (3): 487-493. 10.1111/j.1469-8137.1992.tb02949.x
- Pigott D. (2012). Lime-trees and basswoods. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rahman MH, Dayanandan S & Rajora OP (2000) Microsatellite DNA markers in *Populus tremuloides*. *Genome* 43 (2): 293-297.
- Rajora OP & Dancik BP (1992) Genetic characterization and relationships of *Populus alba*, *P. tremula*, and *P. × canescens*, and their clones. *Theor Appl Genet* 84: 291-298.
- Ráty M, Caudullo G & de Rigo D (2016) *Sorbus aucuparia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *In: European Atlas of Forest Tree Species*. San-Miguel-Ayanz J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T & Mauri A (editors) Publ. Off. EU, Luxembourg. p. 176-177.
- Rigueiro C, Arroyo JM, Rodríguez R, Hampe A & Jordano P (2008) Isolation and characterization of 16 polymorphic microsatellite loci for *Frangula alnus* (Rhamnaceae). *Mol Ecol Resour* 9 (3): 984-986. 10.1111/j.1755-0998.2009.02545.x
- Rousset F (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8 (1): 103-106. 10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- Santos-del-Blanco L, de-Lucas AI, González-Martínez SC, Sierra-de-Grado R & Hidalgo E (2012) Extensive Clonal Assemblies in *Populus alba* and *Populus × canescens* from the Iberian Peninsula. *Tree Genetics & Genomes* 9 (2): 499-510. 10.1007/s11295-012-0574-8
- Savill PS (2013) The silviculture of trees used in British forestry. CABI.



- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Smulders M, Van Der Schoot J, Arens P & Vosman B (2001) Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.). *Molecular Ecology Notes* 1 (3): 188-190.
- Svejgaard Jensen J. (2003). EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for lime (*Tillia* spp.). Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute. 6 p.,
- Szpiech ZA, Jakobsson M & Rosenberg NA (2008) ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics* 24 (21): 2498-2504. 10.1093/bioinformatics/btn478
- Thomaes A, Drumont A, Crevecoeur L & Maes D (2015) Red List of the saproxylic scarab beetles (Coleoptera: Lucanidae, Cetoniidae and Dynastidae) for Flanders. *Bulletin de la Société royale belge d'Entomologie* 151 (3): 210-219.
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S & Salamov A (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *science* 313 (5793): 1596-1604.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M & Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40 (15): e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Uyttenbroeck R, De Vos B & Vander Mijnsbrugge K. (2014). Verspreiding en Standplaats van Inheemse Bomen en Struiken in Vlaanderen. Onderzoek naar de relatie tussen voorkomen, bodem en omgevingskenmerken. Brussel: Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. (INBO.R.2014.1388322)
- Van der Schoot J, Pospíšková M, Vosman B & Smulders M (2000) Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101 (1): 317-322.
- Van Landuyt W, Hoste I, Vanhecke L, Van den Bremt P, Vercruyse W & de Beer D. (2006). Atlas van de flora van Vlaanderen en het Brussels Gewest: Flower/Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek/Nationale Plantentuin van België.
- Vanden Broeck A, Cox K, Melosik I, Maes B & Smets K (2018) Genetic diversity loss and homogenization in urban trees: the case of *Tilia × europaea* in Belgium and the Netherlands. *Biodiversity and Conservation* 27 (14): 3777-3792. 10.1007/s10531-018-1628-5
- Whiteley RE, Black-Samuelsson S & Clapham D (2003) Development of microsatellite markers for the European white elm (*Ulmus laevis* Pall.) and cross-species amplification within the genus *Ulmus*. *Molecular Ecology Notes* 3 (4): 598-600. 10.1046/j.1471-8286.2003.00525.x
- Worrell R (1995) European aspen (*Populus tremula* L.): a review with particular reference to Scotland I. Distribution, ecology and genetic variation. *Forestry* 68 (2): 93-105.
- Yousefzadeh H, Raeisi S, Esmailzadeh O, Jalali G, Nasiri M, Walas L & Kozłowski G (2021) Genetic Diversity and Structure of Rear Edge Populations of *Sorbus aucuparia* (Rosaceae) in the Hyrcanian Forest. *Plants (Basel)* 10 (7). 10.3390/plants10071471
- Zalapa JE, Brunet J & Guries RP (2008) Isolation and characterization of microsatellite markers for red elm (*Ulmus rubra* Muhl.) and cross-species amplification with Siberian elm (*Ulmus pumila* L.). *Mol Ecol Resour* 8 (1): 109-112. 10.1111/j.1471-8286.2007.01805.x
- Zecchin B, Caudullo G & de Rigo D (2016) *Frangula alnus* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: European Atlas of Forest Tree Species. San-Miguel-Ayanz J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T & Mauri A (editors)Publ. Off. EU, Luxembourg. p. 96.



BIJLAGEN

BIJLAGE 1: AANWEZIGE GENOTYPES

Bijlage 1.1: Aanwezige genotypes trilpopulier

Tabel B1: De verschillende genotypes van trilpopulier aanwezig in Vloethemveld, met hun oorspronkelijke origine en het aantal individuen aanwezig in de zaadboomgaard.

Genotype	Oorspronkelijke origine	Aantal individuen	Locatie	Code locatie
1KEM	Bree, Eppel, bosje langs ZuurbEEK	1	Vloethemveld	1VB4291.1
2KEM	Bree, Eppel, bosje langs ZuurbEEK	5	Vloethemveld	1VB4291.1
4KEM	Bree, Eppel, bosje langs ZuurbEEK	4	Vloethemveld	1VB4291.1
5KEM	Bree, Eppel, bosje langs ZuurbEEK	3	Vloethemveld	1VB4291.1
6KEM	Bree, Eppel, bosje langs ZuurbEEK	5	Vloethemveld	1VB4291.1
7KEM	Bree, Eppel, bosje langs ZuurbEEK	4	Vloethemveld	1VB4291.1
8KEM	Bree, Eppel, bosje langs ZuurbEEK	2	Vloethemveld	1VB4291.1
BR2	Brugge	1	Vloethemveld	1VB4291.1
BREE2 KEM	Kinrooi, De Brand	1	Vloethemveld	1VB4291.1
BREE6 KEM	Bree, ZuurbEEK/Zuid-Willemsvaart	2	Vloethemveld	1VB4291.1
DS2	Stokkem	3	Vloethemveld	1VB4291.1
DS3	Stokkem, Driebeukenbos	1	Vloethemveld	1VB4291.1
DS4	Stokkem, Driebeukenbos	1	Vloethemveld	1VB4291.1
DS6	Stokkem, Driebeukenbos	2	Vloethemveld	1VB4291.1
EE1	Eeklo, Oostveld	1	Vloethemveld	1VB4291.1
EV1 VZA	Evergem, Heifort	1	Vloethemveld	1VB4291.1
HAL1	Halen	1	Vloethemveld	1VB4291.1
IEP1 WVK	Ieper, Galgebossen	1	Vloethemveld	1VB4291.1
KAP1 KEM	Kapellen, Klein Schietveld	5	Vloethemveld	1VB4291.1
KER1 BDO	Kermt	5	Vloethemveld	1VB4291.1
KLA2	Klaverberg, As	1	Vloethemveld	1VB4291.1
KN3	Knesselare	1	Vloethemveld	1VB4291.1
LA2 VVK	Laarne, Klopperskapelleke	1	Vloethemveld	1VB4291.1
LIC1 VZA	Lichtervelde	1	Vloethemveld	1VB4291.1
MEL1	Melle, Geerbos	3	Vloethemveld	1VB4291.1
MOE1	Moerbeke, Heidebos	4	Vloethemveld	1VB4291.1
OK1 VZA	Oostkamp, Bos ten noorden van de 'Bredels'	3	Vloethemveld	1VB4291.1
OO12	Oostkamp, Warande Gruuthuse	1	Vloethemveld	1VB4291.1
OPO1 KEM	OpglabEEK, Volmolen langs Bosbeek/ Zandstraat	1	Vloethemveld	1VB4291.1
POP11 WVK	Poperinge, Helleketelbos nabij Helleketelweg	1	Vloethemveld	1VB4291.1

//

POP15 WVH	Poperinge, Bosrand Canadabos	1	Vloethemveld	1VB4291.1
SCH1 KEM	Schilde, Putse Heide	2	Vloethemveld	1VB4291.1
SCH2 KEM	Schilde, Turnhoutse baan	1	Vloethemveld	1VB4291.1
TUR1 KEM	Oud-Turnhout, Lage Darisdonk	2	Vloethemveld	1VB4291.1
TUR2 KEM	Oud-Turnhout, Rodegoor	2	Vloethemveld	1VB4291.1
WAC1	Wachtebeke, Hoogstraat	1	Vloethemveld	1VB4291.1
WC1	Wachtebeke, Hoogstraat	2	Vloethemveld	1VB4291.1
WET1	Wetteren, Warandebos	1	Vloethemveld	1VB4291.1
P.TREM_1	Onbekend	1	Vloethemveld	1VB4291.1
P.TREM_2	Onbekend	1	Vloethemveld	1VB4291.1
P.TREM_3	Onbekend	1	Vloethemveld	1VB4291.1
P.TREM_4	Onbekend	4	Vloethemveld	1VB4291.1
P.TREM_5	Onbekend	3	Vloethemveld	1VB4291.1
P.TREM_6	Onbekend	3	Vloethemveld	1VB4291.1

Bijlage 1.2: Aanwezige genotypes hazelaar

Tabel B2 De verschillende genotypes van hazelaar aanwezig in de autochtone zaadboomgaarden, met hun oorspronkelijke origine en het aantal individuen aanwezig in de zaadboomgaard.

Genotype	Oorspronkelijke origine	Aantal individuen	Locatie	Code locatie
DE1	Astene	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
DE2	Astene	2	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
DE6	Astene	2	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
DE8	Astene	4	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
EK11	Eksaarde-Sinaai	6	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
EK2	Eksaarde-Sinaai	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
EK5	Eksaarde-Sinaai	5	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
EK9	Eksaarde-Sinaai	6	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
EV10	Evergem, Heifort	4	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
EV13	Evergem, Heifort	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
EV8	Evergem, Heifort	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
HA1	Onbekend	2	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
HA11	Onbekend	5	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
HA14	Onbekend	7	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
HA2	Onbekend	6	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
HA3	Onbekend	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
HA6	Onbekend	2	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
LA1	Onbekend	4	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
LA10	Onbekend	8	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
LA11	Onbekend	7	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
LA12	Onbekend	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
LA14	Laarne	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
LA16	Laarne	2	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
LA17	Laarne	5	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6

LA20	Laarne	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
LA25	Laarne	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
LA30	Laarne	5	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
LIC4	Lichtervelde, Heihoek	2	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
MER1	Merelbeke, Bruinbos	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
MER2	Merelbeke, Bruinbos	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
MER4	Merelbeke, Bruinbos	5	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
NA1	Nazareth	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
NA2	Nazareth	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
NA3	Nazareth	8	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
NA4	Nazareth	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
NA5	Nazareth	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
OK3	Oostkamp, Houtkant langs de Waterstraat tussen Nieuwenhove en Kampveld	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
OK4	Oostkamp, Houtkant langs de Waterstraat tussen Nieuwenhove en Kampveld	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
OK5	Oostkamp, Houtkant langs de Waterstraat tussen Nieuwenhove en Kampveld	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
OK6	Oostkamp, Houtkant langs de Waterstraat tussen Nieuwenhove en Kampveld	2	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
OK9	Oostkamp, Houtkant langs de Waterstraat tussen Nieuwenhove en Kampveld	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
SH20	Sint-Lievens-Houtem	4	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
SH21	Sint-Lievens-Houtem	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
VO1	Vorte Bossen	7	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
VO3	Vorte Bossen	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
VO4	Vorte Bossen	5	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
VO5	Vorte Bossen	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
WE1	Heuvelland	4	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
C.AVE_13	Onbekend	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
C.AVE_16	Onbekend	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
C.AVE_22	Onbekend	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
C.AVE_82	Onbekend	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
C.AVE_89	Onbekend	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
C.AVE_90	Onbekend	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
C.AVE_91	Onbekend	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4450.6
22	Bree	1	Oude kwekerij	1VB4450.3
AVE25	Onbekend	4	Oude kwekerij	1VB4450.3
AVE5	Onbekend	2	Oude kwekerij	1VB4450.3
BRE10	Bree, Hasselter Broek	3	Oude kwekerij	1VB4450.3

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

C.AVE_46	Onbekend	5	Meikensbossen	1VB4450.8
C.AVE_47	Onbekend	3	Meikensbossen	1VB4450.8
C.AVE_49	Onbekend	5	Meikensbossen	1VB4450.8
C.AVE_57	Onbekend	1	Meikensbossen	1VB4450.8
C.AVE_92	Onbekend	1	Meikensbossen	1VB4450.8
C.AVE_93	Onbekend	1	Meikensbossen	1VB4450.8
C.AVE_94	Onbekend	1	Meikensbossen	1VB4450.8
C.AVE_95	Onbekend	1	Meikensbossen	1VB4450.8
C.AVE_96	Onbekend	1	Meikensbossen	1VB4450.8
C.AVE_123	Onbekend	1	Meikensbossen	1VB4450.8
C.AVE_36	Onbekend	3	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_37	Onbekend	2	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_39	Onbekend	2	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_40	Onbekend	2	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_41	Onbekend	3	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_42	Onbekend	2	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_45	Onbekend	5	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_50	Onbekend	3	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_52	Onbekend	2	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_53	Onbekend	2	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_54	Onbekend	2	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_55	Onbekend	2	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_56	Onbekend	2	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_58	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_59	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_98	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_99	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_100	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_101	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_102	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_103	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_104	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_105	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_106	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_107	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_108	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_109	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_110	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_111	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_112	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_113	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_114	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_115	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_116	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_117	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1

C.AVE_118	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_119	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_120	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_121	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_122	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_127	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_128	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_129	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1
C.AVE_132	Onbekend	1	Veldeker	1VB4450.1

Bijlage 1.3: Aanwezige genotypes haagbeuk

Tabel B3 De verschillende genotypes van haagbeuk aanwezig in de autochtone zaadboomgaarden, met hun oorspronkelijke origine en het aantal individuen aanwezig in de zaadboomgaard.

Genotype	Oorspronkelijke origine	Aantal individuen	Locatie	Code locatie
BE1	Bertembos, Bertem	3	Meikensbossen	1VB4180.1
BE12	Bertembos, Bertem	1	Meikensbossen	1VB4180.1
BE16	Bertembos, Bertem	5	Meikensbossen	1VB4180.1
BE18	Bertembos, Bertem	1	Meikensbossen	1VB4180.1
BE21	Bertembos, Bertem	2	Meikensbossen	1VB4180.1
BE22	Bertembos, Bertem	1	Meikensbossen	1VB4180.1
BE27	Bertembos, Bertem	1	Meikensbossen	1VB4180.1
BE3	Bertembos, Bertem	1	Meikensbossen	1VB4180.1
BE4	Bertembos, Bertem	7	Meikensbossen	1VB4180.1
BE5	Bertembos, Bertem	1	Meikensbossen	1VB4180.1
BE6	Bertembos, Bertem	4	Meikensbossen	1VB4180.1
BE8	Bertembos, Bertem	1	Meikensbossen	1VB4180.1
BR40_VAR	Brakelbos, Brakel	2	Meikensbossen	1VB4180.1
BR42	Brakelbos, Brakel	1	Meikensbossen	1VB4180.1
BR44_VAR	Brakelbos, Brakel	1	Meikensbossen	1VB4180.1
BR45_VAR	Brakelbos, Brakel	2	Meikensbossen	1VB4180.1
KL20_VAR	Doveleenbos, Kluisbergen	2	Meikensbossen	1VB4180.1
KL21_VAR	Doveleenbos, Kluisbergen	2	Meikensbossen	1VB4180.1
LO20	Rode berg (holle weg), Heuvelland	3	Meikensbossen	1VB4180.1
PA1_KEM	Geenhout, Beringen	1	Meikensbossen	1VB4180.1
TW1	Walenbos, Tielt-Winge	1	Meikensbossen	1VB4180.1
TW12	Walenbos, Tielt-Winge	1	Meikensbossen	1VB4180.1
TW13	Walenbos, Tielt-Winge	1	Meikensbossen	1VB4180.1
TW16	Walenbos, Tielt-Winge	3	Meikensbossen	1VB4180.1
TW18	Walenbos, Tielt-Winge	2	Meikensbossen	1VB4180.1
TW19	Walenbos, Tielt-Winge	1	Meikensbossen	1VB4180.1
TW2	Walenbos, Tielt-Winge	1	Meikensbossen	1VB4180.1
TW20	Walenbos, Tielt-Winge	3	Meikensbossen	1VB4180.1



ME1_VAR	Geestgoed, Merelbeke	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
TW11	Walenbos, Tielt-Winge	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
TW13	Walenbos, Tielt-Winge	2	Eeuwenhout	1VB4180.2
TW16	Walenbos, Tielt-Winge	2	Eeuwenhout	1VB4180.2
TW19	Walenbos, Tielt-Winge	2	Eeuwenhout	1VB4180.2
TW2	Walenbos, Tielt-Winge	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
TW21	Holle weg Grove Hoeve, Tielt-Winge	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
TW4_BDO	Walenbos, Tielt-Winge	2	Eeuwenhout	1VB4180.2
TW6	Walenbos, Tielt-Winge	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
TW7	Walenbos, Tielt-Winge	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
WE1_WVH	Vidaigneberg, Heuvelland	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
WE2_WVH	Vidaigneberg, Heuvelland	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
WE3_WVH	Vidaigneberg, Heuvelland	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_1	Bertembos, Bertem	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_4	Bertembos, Bertem	2	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BEULUS_5	Onbekend	3	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_8	Bertembos, Bertem	2	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_11	Bertembos, Bertem	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_12	Bertembos, Bertem	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_13	Bertembos, Bertem	3	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_14	Onbekend	2	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_15	Brakelbos, Brakel	3	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_16	Brakelbos, Brakel	2	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_17	Onbekend	2	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_18	Onbekend	2	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_20	Doveleenbos, Kluisbergen	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_21	Walenbos, Tielt-Winge	2	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_22	Bertembos, Bertem	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_23	Onbekend	2	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_24	Onbekend	1	Eeuwenhout	1VB4180.2
C.BETULUS_25	Onbekend	1	Eeuwenhout	1VB4180.2

Bijlage 1.4: Aanwezige genotypes steeliep

Tabel B4 De verschillende genotypes van steeliep aanwezig in de autochtone zaadboomgaarden, met hun oorspronkelijke origine en het aantal individuen aanwezig in de zaadboomgaard.

Genotype	Oorspronkelijke origine	Aantal individuen	Locatie	Code locatie
BR1	Brakelbos, Brakel	3	Vloethemveld	1VB4630.1
BR2	Brakelbos, Brakel	4	Vloethemveld	1VB4630.1
BR3	Brakelbos, Brakel	4	Vloethemveld	1VB4630.1
BR4	Brakelbos, Brakel	4	Vloethemveld	1VB4630.1
BR5_VAR	Brakelbos, Brakel	2	Vloethemveld	1VB4630.1
HE6/11	Horneveld, Heers	1	Vloethemveld	1VB4630.1
PL1_WVH	Heuvelland	1	Vloethemveld	1VB4630.1



SH1	St.-Lievens-Houtem	1	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
SH2	St.-Lievens-Houtem	1	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
SH6	St.-Lievens-Houtem	2	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
VO1_VZA	Vorte Bossen, Ruislede	1	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
VO3_VZA	Vorte Bossen, Ruislede	1	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
VO4_VZA	Vorte Bossen, Ruislede	1	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
VO5_VZA	Vorte Bossen, Ruislede	1	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
ZO1/2_KEM	Zoerselbos, Zoersel	6	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
ZOE1_KEM	Zoerselbos, Zoersel	4	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
ZOE3_KEM	Zoerselbos, Zoersel	3	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
ZOE4/5_KEM	Zoerselbos, Zoersel	7	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
U.LAE_3	Onbekend	17	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
U.LAE_5	Onbekend	1	Torrebos-Burkel	1VB4630.2
BR1	Brakelbos, Brakel	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
BR2	Brakelbos, Brakel	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
BR3	Brakelbos, Brakel	2	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
BR4	Brakelbos, Brakel	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
BR5_VAR	Brakelbos, Brakel	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
DP11	Calmijnbos, De Panne	2	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
DP12	Calmijnbos, De Panne	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
DP3	Calmijnbos, De Panne	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
DP6_WKU	Calmijnbos, De Panne	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
HAL8_BDW	Lembeekbos, Halle	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
HE33	Horneveld, Heers	3	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
HE44_BDO	Horneveld, Heers	3	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
HE45_KEM	Horneveld, Heers	2	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
HE46	Horneveld, Heers	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
HE50_BDO	Horneveld, Heers	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
HE6/11	Horneveld, Heers	3	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
KE7_BDO	Kermt	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
KE8_BDO	Kermt	2	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
KER10	Hasselt	3	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
KER11	Hasselt	3	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
Li1_KEM	Visbeek bij Kaulil, Lille	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
Li2_KEM	Visbeek bij Kaulil, Lille	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
Li3_KEM	Visbeek bij Kaulil, Lille	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
Li6_KEM	Visbeek bij Kaulil, Lille	2	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
PL1_WVH	Heuvelland	3	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
RU1_BDO	Horneveld, Heers	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
RU2_BDO	Horneveld, Heers	3	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
RU3_BDO	Horneveld, Heers	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
RU4_BDO	Horneveld, Heers	3	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
SH1	St.-Lievens-Houtem	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
SH10	St.-Lievens-Houtem	6	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
SH2	St.-Lievens-Houtem	6	Zusterkloosterbos	1VB4630.3

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

SH3_BDW	St.-Lievens-Houtem	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
SH5	St.-Lievens-Houtem	2	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
SH6	St.-Lievens-Houtem	3	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
SH9	St.-Lievens-Houtem	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
VO1_VZA	Vorte Bossen, Ruislede	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
VO2_VZA	Vorte Bossen, Ruislede	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
VO3_VZA	Vorte Bossen, Ruislede	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
VO4_VZA	Vorte Bossen, Ruislede	4	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
VO5_VZA	Vorte Bossen, Ruislede	2	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
ZO1/2_KEM	Zoerselbos, Zoersel	8	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
ZOE1_KEM	Zoerselbos, Zoersel	2	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
ZOE3_KEM	Zoerselbos, Zoersel	3	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
ZOE4/5_KEM	Zoerselbos, Zoersel	8	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_1	Horneveld, Heers	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_2	Vorte Bossen, Ruislede	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_3	Onbekend	13	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_4	Zoerselbos, Zoersel	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_5	Onbekend	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_6	Onbekend	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_7	Onbekend	3	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_8	Onbekend	3	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_9	Onbekend	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_10	Onbekend	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_11	Onbekend	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_12	Onbekend	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_13	Onbekend	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3
U.LAE_19	Onbekend	1	Zusterkloosterbos	1VB4630.3

Bijlage 1.5: Aanwezige genotypes zomerlinde

Tabel B5 De verschillende genotypes van zomerlinde aanwezig in de autochtone zaadboomgaarden, met hun oorspronkelijke origine en het aantal individuen aanwezig in de zaadboomgaard.

Genotype	Oorspronkelijke origine	Aantal individuen	Locatie	Code locatie
GALTER	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
TP_JEUK2	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
TP5	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL1	Onbekend	3	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL10	Onbekend	2	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL1100	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL17	Onbekend	3	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL18	Onbekend	3	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL19	Onbekend	3	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL20	Onbekend	3	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL22	Onbekend	2	Scherpenberg	1VB4391.2



ZL23	Onbekend	3	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL24	Onbekend	2	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL25	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL28	Onbekend	4	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL29	Onbekend	2	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL3	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL40	Onbekend	3	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL5	Onbekend	4	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL6	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL7	Onbekend	2	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL8	Onbekend	2	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL9	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
ZLA	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
ZLAA	Onbekend	3	Scherpenberg	1VB4391.2
ZLAB	Onbekend	5	Scherpenberg	1VB4391.2
ZLAC	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
ZLAD	Onbekend	3	Scherpenberg	1VB4391.2
ZLD	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
ZLH	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
TPL_1	Onbekend	2	Scherpenberg	1VB4391.2
TPL_2	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
TPL_3	Onbekend	1	Scherpenberg	1VB4391.2
TPL_4	Onbekend	8	Scherpenberg	1VB4391.2
ZL10	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL100	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL12	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL14	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL17	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL18	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL19	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL2	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL20	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL22	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL23	Onbekend	2	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL24	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL28	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL29	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL3	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL30	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL31	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL33	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL36	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL37	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL38	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL39	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1

//

ZL4	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL40	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL5	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL6	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL7	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL8	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZL9	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZLAA	Onbekend	4	Keutelhoek	1VB4391.1
ZLAB	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZLAC	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
ZLAD	Onbekend	2	Keutelhoek	1VB4391.1
ZLF	Onbekend	2	Keutelhoek	1VB4391.1
ZLH	Onbekend	2	Keutelhoek	1VB4391.1
TPL_1	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
TPL_3	Onbekend	1	Keutelhoek	1VB4391.1
TPL_4	Onbekend	7	Keutelhoek	1VB4391.1

Bijlage 1.6: Aanwezige genotypes sporkehout

Tabel B6 De verschillende genotypes van sporkehout aanwezig in de autochtone zaadboomgaarden, met hun oorspronkelijke origine en het aantal individuen aanwezig in de zaadboomgaard. Voor de zaadboomgaarden Gruitrode en Koekelarebos worden de veldcodes weergegeven die op het originele plan van aanplant staan. Genotypes die met zekerheid aanwezig zijn in deze zaadboomgaarden zijn aangeduid in het vet. Omdat we niet met zekerheid kunnen zeggen hoeveel individuen van een genotype er aanwezig zijn in deze zaadboomgaarden worden deze ook niet weergegeven.

Genotype	Oorspronkelijke origine	Aantal individuen	Locatie	Code locatie
BAL1	Balen, Hankse Selsloop	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BAL2	Balen, Hankse Selsloop	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BAL3	Balen, Hankse Selsloop	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BAL4	Balen, Hankse Selsloop	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BAL8	Balen, Hankse Selsloop	1	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BAL9	Balen, Hankse Selsloop	5	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BAL10	Balen, Hankse Selsloop	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BAL11	Balen, Hankse Selsloop	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE1	Meeuwen-Gruitrode, Kiekeshof	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE2	Meeuwen-Gruitrode, Kiekeshof	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE3	Bree, Pollismolen	5	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE4	Bree, Pollismolen	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE5	Bree, Pollismolen	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE8	Kinrooi, De Brand	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE9	Kinrooi, De Brand	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE10	Kinrooi, De Brand	5	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE11	Kinrooi, De Brand	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE12	Kinrooi, De Brand	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE13	Kinrooi, De Brand	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE14	Kinrooi, De Brand	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2



BRE15	Bree, Zandweg bij Zuurbeek	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
BRE16	Bree, Zuurbeek/Zuid-Willemsvaart	5	Oude Kwekerij	1VB4550.2
HEC2	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
HEC3	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
HEC5	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
HEC6	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
HEC7	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
HEC8	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
HOO2	Hoogstraten, Meerselse Bergen	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
HOO4	Hoogstraten, E-10 put Minderhout	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
HOO5	Hoogstraten, E-10 put Minderhout	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
MEE1	Meerhout, Kretskeshoeve	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
MEE2	Meerhout, Kretskeshoeve	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
MEE3	Meerhout, Kretskeshoeve	6	Oude Kwekerij	1VB4550.2
MEE5	Meerhout, Kretskeshoeve	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
MEE6	Meerhout, Kretskeshoeve	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
MEE7	Meerhout, Kretskeshoeve	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
MEE8	Meerhout, Kretskeshoeve	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
MEE9	Meerhout, Kretskeshoeve	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
MEE11	Meerhout, Kretskeshoeve	5	Oude Kwekerij	1VB4550.2
MER1	Merksplas, Brechtstraat	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
RAV2	Ravels, Schoot langd de Aa	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
SCH1	Schilde, Putse Heide	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
SCH4	Schilde, Putse Heide	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
SCH7	Schilde, Putse Heide	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
SCH9	Schilde, Putse Heide	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
SCH10	Schilde, Putse Heide	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
SCH11	Schilde, Turnhoutse baan	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
TUR1	Oud-Turnhout, Lage Darisdonk	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
TUR2	Oud-Turnhout, Lage Darisdonk	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
ZOE1	Zoersel, Zoerselbos/Driehoeksbeemd	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
ZOE2	Zoersel, Zoerselbos/Driehoeksbeemd	1	Oude Kwekerij	1VB4550.2
ZOE4	Zoersel, Zoerselbos/Driehoeksbeemd	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
ZOE5	Zoersel, Zoerselbos/Driehoeksbeemd	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
ZOE9	Zoersel, Zoerselbos/Driehoeksbeemd	4	Oude Kwekerij	1VB4550.2
ZOE10	Zoersel, Zoerselbos/Driehoeksbeemd	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_1	Balen, Hankse Selsloop	1	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_2	Kinrooi, De Brand	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_3	Onbekend	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_4	Meeuwen-Gruitrode, Kiekeshof	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_5	Bree, Zandweg bij Zuurbeek	3	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_6	Kinrooi, De Brand	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_8	Onbekend	1	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_9	Onbekend	2	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_10	Onbekend	1	Oude Kwekerij	1VB4550.2

//

F.ALN_11	Onbekend	1	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_15	Onbekend	1	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_17	Onbekend	1	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_18	Onbekend	1	Oude Kwekerij	1VB4550.2
F.ALN_19	Onbekend	1	Oude Kwekerij	1VB4550.2
IEP1	leper, Galgebossen	2	Meikensbossen	1VB4550.8
IEP2	leper, Galgebossen	4	Meikensbossen	1VB4550.8
IEP3	leper, Galgebossen	1	Meikensbossen	1VB4550.8
IEP4	leper, Galgebossen	1	Meikensbossen	1VB4550.8
IEP5	leper, Galgebossen	3	Meikensbossen	1VB4550.8
LIE2	Liedekerke, nabij Kruisbeek	3	Meikensbossen	1VB4550.8
LIE3	Liedekerke, nabij Kruisbeek	2	Meikensbossen	1VB4550.8
LIE5	Liedekerke, nabij Kruisbeek	1	Meikensbossen	1VB4550.8
LIE6	Liedekerke, nabij Kruisbeek	1	Meikensbossen	1VB4550.8
LIE7	Liedekerke, nabij Kruisbeek	1	Meikensbossen	1VB4550.8
LIE8	Liedekerke, nabij Kruisbeek	3	Meikensbossen	1VB4550.8
LIE10	Liedekerke, nabij Kruisbeek	4	Meikensbossen	1VB4550.8
LIE12	Liedekerke, nabij Kruisbeek	5	Meikensbossen	1VB4550.8
LON1	Londerzeel, Marselaardreef	3	Meikensbossen	1VB4550.8
LON2	Londerzeel, Marselaardreef	4	Meikensbossen	1VB4550.8
LON6	Londerzeel, Marselaardreef	5	Meikensbossen	1VB4550.8
POP3	Poperinge, Helleketelbos	5	Meikensbossen	1VB4550.8
POP7	Poperinge, bosrand Canadabos	3	Meikensbossen	1VB4550.8
POP9	Poperinge, bosrand Canadabos	5	Meikensbossen	1VB4550.8
POP12	Poperinge, bosrand Canadabos	2	Meikensbossen	1VB4550.8
POP21	Poperinge, Bardelenbos	3	Meikensbossen	1VB4550.8
POP24	Poperinge, Bardelenbos	5	Meikensbossen	1VB4550.8
SPL4	St. Pieters Leeuw, Kwade Wegen	4	Meikensbossen	1VB4550.8
SPL5	St. Pieters Leeuw, Kwade Wegen	5	Meikensbossen	1VB4550.8
SPL6	St. Pieters Leeuw, Kwade Wegen	5	Meikensbossen	1VB4550.8
F.ALN_7	Onbekend	2	Meikensbossen	1VB4550.8
F.ALN_12	Onbekend	1	Meikensbossen	1VB4550.8
F.ALN_13	Onbekend	2	Meikensbossen	1VB4550.8
F.ALN_14	Onbekend	1	Meikensbossen	1VB4550.8
F.ALN_16	Onbekend	1	Meikensbossen	1VB4550.8
F.ALN_94	Onbekend	4	Meikensbossen	1VB4550.8
EM11	Erpe-Mere, Molenbeekvallei	2	Vloethemveld	1VB4550.3
EV1	Evergem, Heifort	4	Vloethemveld	1VB4550.3
EV3	Evergem, Heifort	4	Vloethemveld	1VB4550.3
EV4	Evergem, Heifort	2	Vloethemveld	1VB4550.3
LIC1	Lichtervelde, Heihoek	3	Vloethemveld	1VB4550.3
LIC2	Lichtervelde, Heihoek	4	Vloethemveld	1VB4550.3
LIC3	Lichtervelde, Heihoek	2	Vloethemveld	1VB4550.3
LIC5	Lichtervelde, Heihoek	3	Vloethemveld	1VB4550.3
LIC6	Lichtervelde, Heihoek	4	Vloethemveld	1VB4550.3
LIC7	Lichtervelde, Heihoek	3	Vloethemveld	1VB4550.3



BAL4	Balen, Hankse Selsloop	Gruitrode	1VB4550.5
BAL7	Balen, Hankse Selsloop	Gruitrode	1VB4550.5
BAL8	Balen, Hankse Selsloop	Gruitrode	1VB4550.5
BAL9	Balen, Hankse Selsloop	Gruitrode	1VB4550.5
BAL11	Balen, Hankse Selsloop	Gruitrode	1VB4550.5
BRE1	Meeuwen-Gruitrode, Kieskeshof/ Eetsevelderbeek Oost	Gruitrode	1VB4550.5
BRE2	Meeuwen-Gruitrode, Kieskeshof/ Eetsevelderbeek Oost	Gruitrode	1VB4550.5
BRE3	Bree, Pollismolen	Gruitrode	1VB4550.5
BRE4	Bree, Pollismolen	Gruitrode	1VB4550.5
BRE5	Bree, Pollismolen	Gruitrode	1VB4550.5
BRE7	Kinrooi, De Brand	Gruitrode	1VB4550.5
BRE8	Kinrooi, De Brand	Gruitrode	1VB4550.5
BRE9	Kinrooi, De Brand	Gruitrode	1VB4550.5
BRE10	Kinrooi, De Brand	Gruitrode	1VB4550.5
BRE11	Kinrooi, De Brand	Gruitrode	1VB4550.5
BRE12	Kinrooi, De Brand	Gruitrode	1VB4550.5
BRE13	Kinrooi, De Brand	Gruitrode	1VB4550.5
BRE14	Kinrooi, De Brand	Gruitrode	1VB4550.5
BRE15	Bree, zandweg bij Zuurbeek	Gruitrode	1VB4550.5
BRE16	Bree, Zuurbeek/ Zuid-Willemsvaart	Gruitrode	1VB4550.5
HEC1	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	Gruitrode	1VB4550.5
HEC3	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	Gruitrode	1VB4550.5
HEC4	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	Gruitrode	1VB4550.5
HEC5	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	Gruitrode	1VB4550.5
HEC6	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	Gruitrode	1VB4550.5
HEC7	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	Gruitrode	1VB4550.5
HEC8	Hechtel-Eksel, Hechtelse heide	Gruitrode	1VB4550.5
MEE2	Meerhout, Kretskeshoeve	Gruitrode	1VB4550.5
MEE3	Meerhout, Kretskeshoeve	Gruitrode	1VB4550.5
MEE4	Meerhout, Kretskeshoeve	Gruitrode	1VB4550.5
MEE5	Meerhout, Kretskeshoeve	Gruitrode	1VB4550.5
MEE6	Meerhout, Kretskeshoeve	Gruitrode	1VB4550.5
MEE7	Meerhout, Kretskeshoeve	Gruitrode	1VB4550.5
MEE8	Meerhout, Kretskeshoeve	Gruitrode	1VB4550.5
MEE10	Meerhout, Kretskeshoeve	Gruitrode	1VB4550.5
MEE11	Meerhout, Kretskeshoeve	Gruitrode	1VB4550.5
RAV2	Ravels, Schoot langs de Aa	Gruitrode	1VB4550.5
SCH1	Schilde, Putse heide	Gruitrode	1VB4550.5
SCH2	Schilde, Putse heide	Gruitrode	1VB4550.5
SCH3	Schilde, Putse heide	Gruitrode	1VB4550.5
SCH4	Schilde, Putse heide	Gruitrode	1VB4550.5
SCH7	Schilde, Putse heide	Gruitrode	1VB4550.5
SCH8	Schilde, Putse heide	Gruitrode	1VB4550.5
TUR1	Oud-Turnhout, Lage Darisdonk	Gruitrode	1VB4550.5
TUR2	Oud-Turnhout, Lage Darisdonk	Gruitrode	1VB4550.5



WC11	Wachtebeke, Hoogstraat	Koekelarebos	1VB4550.4
WC12	Wachtebeke, Hoogstraat	Koekelarebos	1VB4550.4
WC15	Wachtebeke, Hoogstraat	Koekelarebos	1VB4550.4
WC16	Wachtebeke, Paardenkerhof	Koekelarebos	1VB4550.4
F.ALN_92	Onbekend	Koekelarebos	1VB4550.4
F.ALN_95	Onbekend	Koekelarebos	1VB4550.4

Bijlage 1.7: Aanwezige genotypes wilde lijsterbes

Tabel B7 De verschillende genotypes van wilde lijsterbes aanwezig in de autochtone zaadboomgaarden, met hun oorspronkelijke origine en het aantal individuen aanwezig op de zaadboomgaard. Voor de zaadboomgaarden Gruitrode en Vloethemveld worden de veldcodes weergegeven die op het originele plan van aanplant staan. Genotypes die met zekerheid aanwezig zijn in deze zaadboomgaarden zijn aangeduid in het vet. Omdat we niet met zekerheid kunnen zeggen hoeveel individuen van een genotype aanwezig zijn in deze zaadboomgaarden worden deze ook niet weergegeven.

Genotype	Oorspronkelijke origine	Aantal individuen	Locatie	Code locatie
BR1	Brakel, Brakelbos	3	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR2	Brakel, Brakelbos	3	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR30	Brakel	4	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR31	Brakel	6	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR32	Brakel	5	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR33	Brakel	2	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR34	Brakel	5	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR35	Brakel	4	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR38	Brakel	4	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR39	Brakel	3	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR40	Brakel, Brakelbos	4	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR41	Brakel, Brakelbos	1	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR42	Brakel, Brakelbos	3	Eeuwenhout	1VB4610.6
BR43	Brakel, Brakelbos	3	Eeuwenhout	1VB4610.6
KE1	Kemmel	3	Eeuwenhout	1VB4610.6
KE3	Kemmel	6	Eeuwenhout	1VB4610.6
KL30	Kluisbergen	1	Eeuwenhout	1VB4610.6
KL31	Kluisbergen	4	Eeuwenhout	1VB4610.6
KL32	Kluisbergen	1	Eeuwenhout	1VB4610.6
LO1	Loker	6	Eeuwenhout	1VB4610.6
LO2	Loker	4	Eeuwenhout	1VB4610.6
LO3	Loker	5	Eeuwenhout	1VB4610.6
LO4	Loker	5	Eeuwenhout	1VB4610.6
LO5	Loker	3	Eeuwenhout	1VB4610.6
LO6	Loker	2	Eeuwenhout	1VB4610.6
ME2	Merelbeke, Geestgoed	4	Eeuwenhout	1VB4610.6
ME3	Merelbeke, Geestgoed	3	Eeuwenhout	1VB4610.6
ME4	Merelbeke, Geestgoed	3	Eeuwenhout	1VB4610.6
ME30	Merelbeke	4	Eeuwenhout	1VB4610.6
ME31	Merelbeke	4	Eeuwenhout	1VB4610.6



OK1	Oostkamp, Houtkant langs de Waterstraat tussen Nieuwenhove en Kampveld	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
OK3	Oostkamp	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
OK5	Oostkamp	2	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
OK6	Oostkamp	2	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
OK7	Oostkamp, Bos ten noorden van de Breidels	4	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
OK8	Oostkamp	4	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
WC1	Wachtebeke, Penen	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
WC2	Wachtebeke, Penen	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
WC3	Wachtebeke, Penen	4	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
WC4	Wachtebeke, Penen	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
WC5	Wachtebeke, Penen	3	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
WC6	Wachtebeke, Penen	4	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
WC7	Wachtebeke, Penen	4	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
WC8	Wachtebeke, Penen	2	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
WC9	Wachtebeke, Penen	4	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
S.AUC_19	Onbekend	1	Nieuw goed te Parijs	1VB4610.2
BRE1	Meeuwen-Gruitrode, Kieskeshof/Eetseveldebeek Oost	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE4	Meeuwen-Gruitrode	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE5	Meeuwen-Gruitrode	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE8	Meeuwen-Gruitrode	3	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE10	Bree, Pollismolen	3	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE12	Bree, Pollismolen	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE14	Kinrooi, De Brand	4	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE16	Kinrooi, De Brand	3	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE17	Kinrooi, De Brand	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE18	Kinrooi, De Brand	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE20	Kinrooi, De Brand	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE23	Bree, Zandweg bij Zuurbek	3	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE26	Bree, Zuurbek/Zuid-Willemsvaart	4	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE28	Bree, Zuurbek/Zuid-Willemsvaart	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE29	Bree, Zuurbek/Zuid-Willemsvaart	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE33	Bree, Zuurbek/Zuid-Willemsvaart	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
BRE34	Bree, Zuurbek/Zuid-Willemsvaart	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
HOO2	Hoogstraten, E-10 put	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
HOO3	Hoogstraten, E-10 put	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
HOO4	Hoogstraten, E-10 put	4	Oude Kwekerij	1VB4610.1
HOO5	Hoogstraten, E-10 put	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1

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

HOO6	Hoogstraten, E-10 put	3	Oude Kwekerij	1VB4610.1
HOO7	Hoogstraten, E-10 put	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
MAS1	Zandhoven - Massenhoven	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
MAS2	Zandhoven - Massenhoven	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
MAS3	Zandhoven - Massenhoven	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
MAS4	Zandhoven - Massenhoven	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
MAS4KEM	Zandhoven - Massenhoven	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
MAS5	Zandhoven - Massenhoven	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
MAS6	Zandhoven - Massenhoven	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
MAS7	Zandhoven - Massenhoven	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
MAS8	Zandhoven - Massenhoven	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
MER1	Merksplas, Bremstraat	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
MER2	Merksplas, Bremstraat	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
PAA1	Beringen, Brelaar	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
PAA2	Beringen, Brelaar	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
RAV1	Ravels, Schoot langs de Aa	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
RAV2	Ravels, Schoot langs de Aa	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
RAV3	Ravels, Schoot langs de Aa	3	Oude Kwekerij	1VB4610.1
RAV4	Ravels, Schoot langs de Aa	4	Oude Kwekerij	1VB4610.1
RAV6	Ravels, Schoot langs de Aa	3	Oude Kwekerij	1VB4610.1
RAV7	Ravels, Schoot langs de Aa	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
RAV9	Ravels, Schoot langs de Aa	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
SCH1	Schilde, Putse Heide	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
TUR2	Oud-Turnhout, Lage Darisdonk	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
TUR3	Oud-Turnhout, Lage Darisdonk	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
TUR4	Oud-Turnhout, Lage Darisdonk	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
TUR5	Oud-Turnhout, Lage Darisdonk	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
VOS2	Vosselaar, boskant	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
ZOE1	Zoersel, Zoerselbos/Driehoeksbeemd	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
ZOE2	Zoersel	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
ZOE3	Zoersel	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
ZOE4	Zoersel	3	Oude Kwekerij	1VB4610.1
ZOE5	Zoersel	3	Oude Kwekerij	1VB4610.1
ZOE6	Zoersel	3	Oude Kwekerij	1VB4610.1
ZOE7	Zoersel	3	Oude Kwekerij	1VB4610.1
ZOE9	Zoersel	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
ZOE10	Zoersel	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
ZOE11	Zoersel	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
S.AUC_2	Onbekend	4	Oude Kwekerij	1VB4610.1
S.AUC_3	Onbekend	4	Oude Kwekerij	1VB4610.1
S.AUC_4	Onbekend	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
S.AUC_5	Onbekend	2	Oude Kwekerij	1VB4610.1
S.AUC_9	Onbekend	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
S.AUC_11	Onbekend	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1
S.AUC_15	Onbekend	1	Oude Kwekerij	1VB4610.1



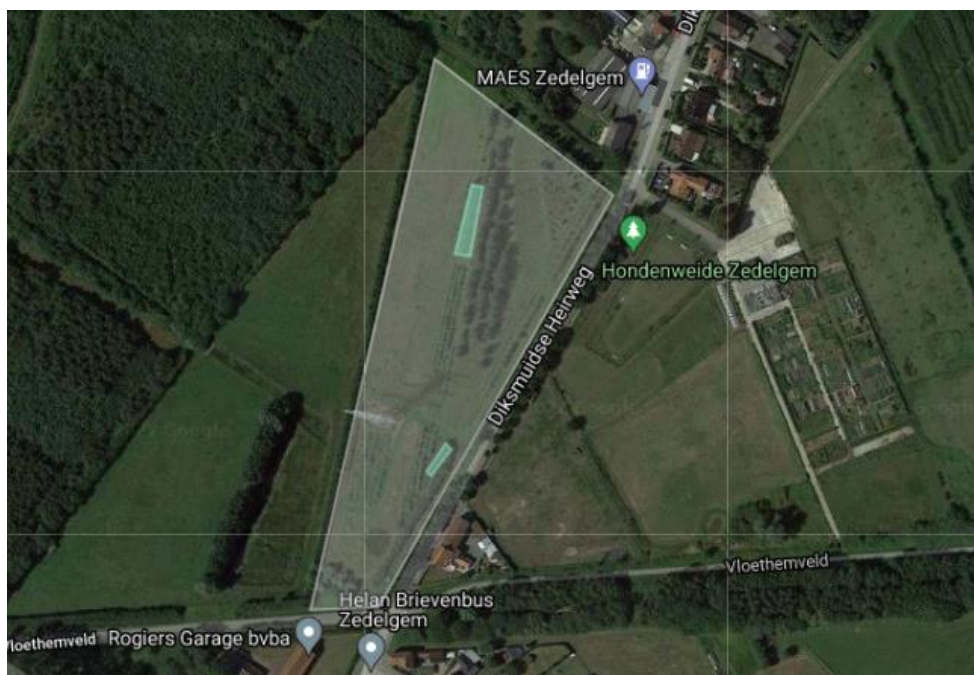
OK5	Oostkamp	Vloethemveld	1VB4610.3
OK6	Oostkamp	Vloethemveld	1VB4610.3
OK7	Oostkamp, Bos ten noorden van de Breidels	Vloethemveld	1VB4610.3
OK8	Oostkamp	Vloethemveld	1VB4610.3
WC2	Wachtebeke, Penen	Vloethemveld	1VB4610.3
WC3	Wachtebeke, Hoogstraat	Vloethemveld	1VB4610.3
WC4	Wachtebeke, Hoogstraat	Vloethemveld	1VB4610.3
WC5	Wachtebeke, Hoogstraat	Vloethemveld	1VB4610.3
WC6	Wachtebeke, Hoogstraat	Vloethemveld	1VB4610.3
WC7	Wachtebeke, Hoogstraat	Vloethemveld	1VB4610.3
WC8	Wachtebeke, Hoogstraat	Vloethemveld	1VB4610.3
WC9	Wachtebeke, Hoogstraat	Vloethemveld	1VB4610.3



BIJLAGE 2: DE BEMONSTERDE ZAADBOOMGAARDEN VAN HAZELAAR DIE NOG NIET GEANALYSEERD WERDEN



Figuur B1 Bos 't Ename te Ename (50°51'09,2"N 3°38'51,0"E). De bemonsterde hazelaars zijn aangeduid in het groen.



Figuur B2 Vloethemveld te Zedelgem (51°08'51,5"N 3°07'25,0"E). De bemonsterde hazelaars zijn aangeduid in het groen.





Figuur B3 Scherpenberg te Heuveland (50°47'29,6"N 2°47'01,1"E). De bemonsterde hazelaars zijn aangeduid in het groen.



Figuur B4 De Kriephoek te Kriephoek (50°57'19,2"N 3°39'48,7"E). De bemonsterde hazelaars zijn aangeduid in het groen.

BIJLAGE 3: MICROSATELLIET MERKER ONTWIKKELING ALLGENETICS & BIOLOGY SL

Voor de soorten haagbeuk en steeliep werden nieuwe microsatelliet merkers ontwikkeld. Voor haagbeuk werden hiervoor stalen uit de zaadboomgaarden Meikensbossen en Eeuwenhout gebruikt, voor steeliep stalen uit de zaadboomgaard Torrebos-Burkel. De ontwikkeling van microsatellieten en genotypering van de eerder vermelde stalen werden uitgevoerd door AllGenetics & Biology SL (www.allgenetics.eu). Er werd een genomische DNA-bibliotheek aangelegd met een Nextera XT DNA Library Preparation kit (Illumina). Hierbij werd de gebruiksaanwijzing strikt gevolgd.

De DNA-bibliotheek werd met de volgende microsatelliet motieven verrijkt: AC, AG, ACG en ATCT. De DNA-bibliotheek werd vervolgens gesequeneerd met het Illumina MiSeq platform (PE300). Er werden 5.191.783 paired-end reads geproduceerd. Met het programma FastQC 0.11.15 werd de kwaliteit van de ruwe sequentiedata gecontroleerd. Reads met een lage kwaliteit werden geïdentificeerd en getrimd met het programma Trimmomatic 0.36 (Bolger et al. 2014; Bioinformatics btu170). Om zeker te zijn dat enkel reads met een hoge kwaliteit in de volgende stappen werden gebruikt, werd er een tweede kwaliteitscontrole uitgevoerd met FastQC 0.11.15. De reads werden vervolgens in het programma Geneious 8.1.9 (Biomatters Ltd.) en met zelfontwikkelde scripts verwerkt. De primers werden in het programma Primer (Kouressaar & Remm 2007; Untergasser et al. 2012), geïmplementeerd in Geneious 10.2.3, ontworpen. De primer-paren hybridiseren via de flankerende regio's van de microsatellietmotieven.

In totaal werden er 73 primer-paren, ingedeeld in 22 multiplexen, getest en gecontroleerd op polymorfisme. PCR's werden uitgevoerd volgens Schuelke (2000). De volgende universele sequenties werden gebruikt als oligonucleotidestaarten: M13 (5' GGA AAC AGC TAT GAC CAT 3'), CAG (5' CAG TCG GGC GTC ATC 3'), en T3 (5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3'). De drie oligonucleotiden werden respectievelijk met de HEX dye, de FAM dye, en de TAMRA dye gelabeld. De PCR's werden in een finaal reactievolume van 12,5 µL uitgevoerd. De samenstelling bestond uit 1 µL DNA (10 ng/µL), 6,25 µL van de Type-it Microsatellite PCR kit (Qiagen), 4 µL PCR-grade water, en 1,25 µL van de primermix. Het optimale PCR protocol bestond uit de volgende stappen: een initiële denaturatiestap gedurende 5 min. op 95 °C, gevolgd door 30 cycli bestaande uit 30 s op 95 °C, 90 s op 57 °C en 30 s op 72 °C, 8 cycli bestaande uit 30 s op 95 °C, 90 s op 53 °C, en 30 s op 72 °C; en een finale extensiestap gedurende 30 min. op 68 °C. Vervolgens werd er een fragmentanalyse uitgevoerd op de PCR producten met een ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA). Allelen werden met Geneious 10.2.3 benoemd.

//