



Vlaanderen
is wetenschap



Genetische screening van autochtoon teeltmateriaal van erkende herkomst

Karen Cox, An Van Breusegem, Leen Verschaeve, Sabrina Neyrinck & An Vanden Broeck

INSTITUUT
NATUUR- EN BOSONDERZOEK

Auteurs:

Karen Cox, An Van Breusegem, Leen Verschaeve, Sabrina Neyrinck & An Vanden Broeck
Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

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

Reviewers:

Gudrun Van Langenhove (ANB)

Vestiging:

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

e-mail:

an.vandenbroeck@inbo.be
karen.cox@inbo.be

Wijze van citeren:

Cox K. & Vanden Broeck A. (2019). Genetische screening van autochtoon teeltmateriaal van erkende herkomst. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2019 (52). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
DOI: doi.org/10.21436/inbor.17359583

D/2019/3241/318

Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2019 (52)

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Maurice Hoffmann

Foto cover:

Bemonstering blad voor genetisch onderzoek (Yves Adams)

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:

Agentschap voor Natuur en Bos



Vlaanderen
is wetenschap

Genetische screening van autochtoon teeltmateriaal van erkende herkomst

**Karen Cox, An Van Breusegem, Leen Verschaeve, Sabrina Neyrinck & An
Vanden Broeck**

doi.org/10.21436/inbor.17359583

Dankwoord

De auteurs danken Wilfried Rentmeesters, Eddy Hubrechts, Reinhart Cromphout en Kristine Vander Mijnsbrugge voor de hulp bij de staalnamen.

Samenvatting

Het Agentschap voor Natuur en Bos (ANB) onderneemt al jaren acties om de aandacht voor en het gebruik van plantsoenen van lokale herkomst te bevorderen. Zoals elk ander bosbouwkundig teeltmateriaal wordt ook autochtoon plantsoen van erkende herkomst volgens Europese regelgeving gecontroleerd en voorzien van een certificaat, het document van de leverancier. Om een idee te krijgen over de betrouwbaarheid van de herkomst van verhandeld plantsoen werd aan ons Instituut gevraagd enkele leveringen van plantsoenen genetisch te vergelijken met het uitgangsmateriaal zoals vermeld op het document van de leverancier. Zo werden verschillende partijen plantsoenen van zomereik (*Quercus robur*) en winterlinde (*Tilia cordata*) onderzocht, twee herkomsten per soort.

Moederchapsanalyses wezen uit dat het plantsoen van winterlinde zeer waarschijnlijk afkomstig is van 'De Dauw' en 'Meikensbossen'. Voor het plantsoen van zomereik is het eerder onwaarschijnlijk dat het document van de leverancier de juiste herkomst weergeeft.

Aanbevelingen voor beheer en/of beleid

Uit de resultaten van deze studie blijkt dat de herkomst van autochtoon, bosbouwkundig teeltmateriaal beschreven op het document van de leverancier niet altijd overeenkomt met de werkelijke herkomst. Het lijkt dan ook noodzakelijk een striktere controle toe te passen van zaadoogst tot verhandeling en/of een systeem van genetische screening van het plantsoen op te richten.

English abstract

For years the Agency for Nature and Forests (ANB) has been taking steps to promote the use of local forest reproductive material. Like any other forest reproductive material, plants of approved, autochthonous stands are inspected according to European regulations and provided with a certificate, the supplier's document. To get an idea about the reliability of the provenance of marketed reproductive material, our Institute was asked to genetically compare a few batches of planting stock with the alleged basic material as stated on the supplier's document. Particularly, plants of Pedunculate Oak (*Quercus robur*) and Small Leaved Lime (*Tilia cordata*), two provenances each, were investigated.

Maternity analyses proved the planted stock of Small Leaved Lime to originate from the approved seed orchards 'De Dauw' and 'Meikensbossen'. In contrast, the plants of Pedunculate Oak were unlikely to be raised from seeds harvested in the autochthonous seed stand and orchard mentioned on the certificate.

Inhoudstafel

Dankwoord	4
Samenvatting	5
English abstract.....	6
Inhoudstafel	8
Lijst van figuren.....	9
Lijst van tabellen.....	9
Doelstelling van het onderzoek	10
1. Winterlinde (<i>Tilia cordata</i>).....	11
1.1 Stalen.....	11
1.2 DNA-extractie en microsatellietanalyse	11
1.3 Data-analyse.....	11
1.4 Resultaten	12
1.5 Conclusie	15
2. Zomereik (<i>Quercus robur</i>)	16
2.1 Stalen.....	16
2.2 DNA-extractie en microsatellietanalyse	16
2.3 Data verwerking.....	17
2.4 Resultaten	17
2.5 Conclusie	21
Referenties	22
Bijlage 1: Microsatelliet merkers die werden gebruikt voor de genotypering van de stalen winterlinde.	23
Bijlage 2: Individuen van verschillende groepen met één ouder gemeenschappelijk met een probabilmteit $P > 0.85$ zoals bepaald met Colony.	24

Lijst van figuren

- Figuur 1** Biplot van de Principale Coördinaten Analyse op basis van 14 microsatelliet merkers en 236 genetische profielen van winterlinde. De eerste en de tweede as vertegenwoordigen respectievelijk 21,8% en 18,2% van de genetische variatie. De verklaring van de codes is weergegeven in Tabel 1.....13
- Figuur 2** Biplot van de Principale Coördinaten Analyse op basis van 14 microsatelliet merkers en 236 genetische profielen van winterlinde. De tweede en de derde as vertegenwoordigen respectievelijk 18,2% en 17,7% van de genetische variatie. De verklaring van de codes is weergegeven in Tabel 2.....13
- Figuur 3** PCA plot van de eerste en tweede as van alle geanalyseerde zomereiken. De codes verwijzen naar de verschillende groepen stalen (ouderbestanden en plantsoen) gegeven in Tabel 4. De eerste en tweede as verklaren respectievelijk 3,9 en 3,5% van de variatie.....19
- Figuur 4** PCA plot van de eerste en tweede as van de ouderbomen (DBBm), de opgekweekte eikels (DBBs) en het plantsoen van 'Driebeukenbos' (auto2-dbb). De eerste en tweede as verklaren respectievelijk 5,7 en 4,4% van de variatie.....19
- Figuur 5** PCA plot van de eerste en tweede as van de ouderbomen (WDM) en het plantsoen van 'Warenduinen' (auto1-wd). De eerste en tweede as verklaren respectievelijk 4,5 en 4,2% van de variatie.....20

Lijst van tabellen

- Tabel 1** Stalen succesvol genetisch geanalyseerd. *Voor het uitgangsmateriaal 'Meikensbossen' en 'De Dauw' is het aantal stalen met een uniek genetisch profiel weergegeven tussen haakjes.....12
- Tabel 2** Aantal stalen met private allelen.....14
- Tabel 3** Resultaten van de moederschapsanalyse voor de zaailingen en het plantsoen winterlinde geogst in de zaadtuinen van Meikensbossen en De Dauw.....14
- Tabel 4** Herkomsten van zomereik opgenomen in de studie. * 67 bomen in Driebeukenbos werden bemonsterd, waarvan 56 met een uniek label (d.i. zonder klonen). Na genetische analyse blijkt één van de klonen geen kloon te zijn, maar een uniek profiel te hebben.....16
- Tabel 5** Parsgewijze F_{ST} waarden onder de diagonaal en p-waarden boven de diagonaal. Voor de codes van de groepen verwijzen we naar Tabel 1.....18

Doelstelling van het onderzoek

ANB wenst de aandacht voor en het gebruik van aangepast plantsoen te verhogen. Een belangrijke schakel in dit proces is de betrouwbaarheid van het verhandelde teeltmateriaal. Plantsoen dat verhandeld wordt onder de noemer 'autochtoon' dient uiteraard afkomstig te zijn van erkend, autochtoon uitgangsmateriaal. Indien dit onderzoek aantoont dat verhandeld autochtoon plantsoen terecht van erkend autochtoon uitgangsmateriaal afkomstig is, kan ANB voluit van start gaan met het programma 'Plant van hier'.

In deze studie wordt de genetische identiteit van erkend teeltmateriaal van autochtone herkomst van zomereik (*Quercus robur*) en winterlinde (*Tilia cordata*) onderzocht dat via een document van de leverancier op de markt wordt gebracht. De genetische identiteit van in de handel beschikbaar autochtoon plantsoen wordt vergeleken met de genetische identiteit van het erkend uitgangsmateriaal waarvan het plantsoen volgens het document van de leverancier afkomstig is. Deze studie werd uitgevoerd op vraag van het Agentschap Natuur en Bos.

1. Winterlinde (*Tilia cordata*)

1.1 Stalen

Autochtoon plantsoen ('plant van hier') vergezeld van een herkomstcertificaat (document van de leverancier) en afkomstig van drie boomkwekers / -verkopers (verder genoemd kweker 1, kweker 2 en kweker 3), werd verkregen via ANB in de winter van 2017 – 2018. Er werden telkens 50 planten per lot (en dus per kweker) geleverd. Het plantsoen werd ingekuuld, en in de daarop volgende lente (2018) werd, voor elk lot, de helft van de planten *ad random* bemonsterd voor genetische analyse. Bladstalen werden verzameld en bewaard in silicagel. In de periode april – mei 2018 werden alle volwassen bomen van de erkende autochtone zaadtuinen 'De Dauw' te Meerdaalwoud en 'Meikensbossen' te Dentergem, bemonsterd. Per boom werd een jong blad verzameld en bewaard in silicagel. In de zaadtuin 'Meikensbossen' werd ook zaad geogst in de herfst van 2017, de zaden werden uitgezaaid in de serre op INBO en bemonsterd voor genetische analyse in de lente van 2018. Een overzicht van de onderzochte planten weergegeven in Tabel 1.

1.2 DNA-extractie en microsatellietanalyse

Er werden 14 stalen in tweevoud in de analyse mee genomen (een tweede bladstaal) om de herhaalbaarheid van de analyses te bepalen. DNA-extractie werd uitgevoerd op de bladstalen met de QuickPick™ XLPlant DNA kit (Isogen Life Science, De Meern, Nederland) op de robot MagRo 8-M robotisch werkstation (Bio-Nobile). De genetische identiteit van het plantsoen werd onderzocht via 14 microsatelliet-merkers (Bijlage 1) ontwikkeld en beschreven voor *Tilia* sp. door Phuekvilai en Wolff (2013).

PCR-amplificatie werd uitgevoerd in 10 µL multiplex reacties met volgende samenstellen: 5 ng DNA, 1x Multiplex Master Mix (Qiagen), 0.1 of 0.2 mM per primer combinatie (afhankelijk van de primer combinatie), Forward primers werden gemerkt met fluorescente merkers FAM, HEX, VIC, NED en PET. De PCR-reactie omvatte een initiële pre-denaturatie stap van 15 min op 95°C, vervolgens 35 cycli van 30 s op 95°C, 45 s op 54°C, 45 s op 72°C en tenslotte een extensie-stap van 10 min op 72°C. De LIZ-600 standaard werd gebruikt als interne standaard voor het bepalen van de grootte van de DNA-fragmenten (allelen). De metingen werden uitgevoerd op een ABI 3500 analyzer (Applied Biosystems) met de LIZ-600 standaard en geanalyseerd met het programma GeneMapper 4.1 (Thermo Fisher Scientific).

1.3 Data-analyse

Eenzelfde staal kan, bij herhaling, kleine verschillen vertonen in de genetische profielen als gevolg van technische artefacten (PCR-artefacten, verschillen in de kwaliteit van het DNA, ...). Aan de hand van 14 stalen die in tweemaal geanalyseerd werden (vertrekkende van twee bladstalen en verschillende DNA-extracties), werd de fout op de data bepaald.

Op basis van de genetische profielen werden klonen opgespoord binnen de zaadtuinen 'De Dauw' (Meerdaalwoud) en 'Meikensbossen' (Dentergem). Van alle klonen werd één individu behouden in de verdere analyse.

Een Principale Coördinaten Analyse (PCoA) werd uitgevoerd op de totale set van stalen (zaadtuinen en plantsoen) om de variatie binnen de data te visualiseren en inzicht te krijgen in de groepering van de stalen. Ook een Analysis of Molecular Variance (AMOVA) werd uitgevoerd om de genetische variatie binnen en tussen de vooraf bepaalde groepen te kwantificeren.

Het aantal private allelen werd bepaald. Private allelen zijn zeldzame allelen (varianten van een gen) die uniek zijn voor een vooraf bepaalde groep van stalen.

Er werd ook een moederschapsanalyse uitgevoerd op het plantsoen met de bemonsterde bomen van de zaadtuinen als potentiële moederbomen. De moederschapsanalyse voor het plantsoen met herkomst 'De Dauw' werd uitgevoerd op het plantsoen van kweker 1 en kweker 2. De 63 genetisch verschillende bomen uit de zaadtuin 'De Dauw' werden in de analyse opgenomen als kandidaat-moeders. De moederschapsanalyse voor het plantsoen afkomstig van 'Eikenbossen' werd uitgevoerd op het plantsoen afkomstig van kweker 3 en de zaailingen opgekweekt in 2017 door INBO met als kandidaat-moeders 107 genetisch verschillende moederbomen uit de zaadtuin 'Meikensbossen'.

De analyses werden uitgevoerd met de programma's GenAlEx v.6.4 (Peakall & Smouse, 2006) en Cervus 3.0.7 (Kalinowski et al., 2007).

1.4 Resultaten

In totaal werden 309 stalen succesvol geanalyseerd voor 14 microsatellieten (**Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**). Het aantal allelen per locus varieert van 5 tot 32, met een gemiddelde over alle loci van 10,7 (**Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**). Het percentage ontbrekende data in de totale dataset was 3%. De 14 stalen die tweemaal geanalyseerd werden, vertoonden geen verschillen in de genetische profielen. In de zaadtuinen 'De Dauw' en 'Meikensbossen' werden respectievelijk 63 (63/86 of 73%) en 107 (107/130 of 82%) genetisch verschillende bomen bemonsterd.

De PCoA groepeerde alle stalen binnen eenzelfde **homogene groep (Figuur 1, Figuur 2)**. De zaadtuinen 'De Dauw' en 'Meikensbossen' zijn opgebouwd uit klonen van dezelfde autochtone winterlindes en het is daarom logisch dat ze eenzelfde genenpoel vormen. **Ook het plantsoen van de drie kwekers, behoort tot eenzelfde homogene genenpoel.** Uit de AMOVA bleek dat slechts 5% van de genetische variatie toe te schrijven is aan het verschil tussen de groepen ($\Phi_{PT} = 0.051$, met een waarschijnlijkheid van $P(\text{rand} \geq \text{data}) = 0.01$ berekend op basis van 999 permutaties over de totale dataset).

Van het geanalyseerd plantsoen van de drie kwekers, vertoont **een klein aantal stalen private allelen** (respectievelijk 6, 3 en 2 stalen met private allelen); allelen die niet terug te vinden zijn in de zaadtuinen (

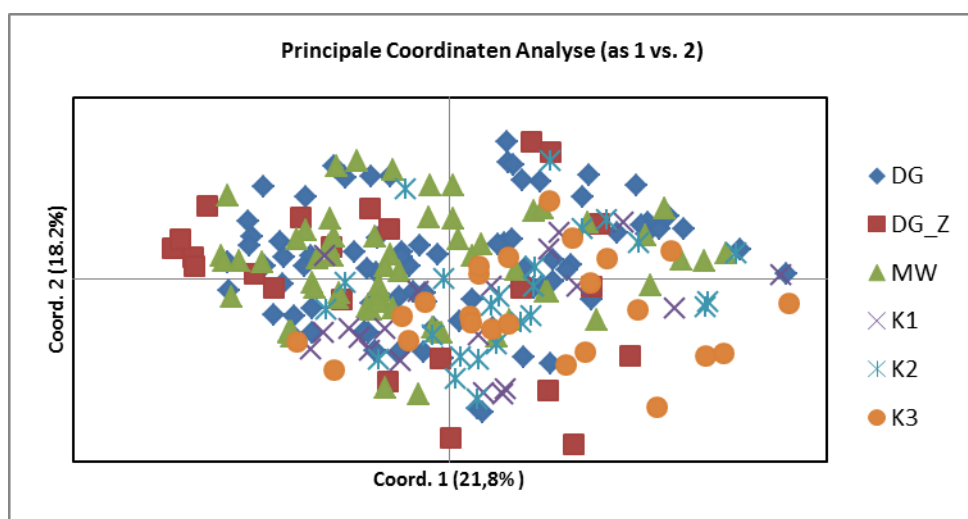
	Aantal stalen met private allelen
Meikensbossen (Dentergem)	10
Meikensbossen (Dentergem) - zaailingen	2
De Dauw (Meerdaalwoud)	11
Plantsoen via Kweker 1	6
Plantsoen via Kweker 2	3
Plantsoen via Kweker 3	2

). In de meeste gevallen, vertonen die stalen slechts één privaat allel (in twee uitzonderingen worden twee private allelen waargenomen binnen een staal). Private allelen kunnen ontstaan tijdens de vorming van zaaden (crossing-over in de meiose), als gevolg van een mutatie, of door bestuiving met pollen afkomstig van buiten de zaadtuin.

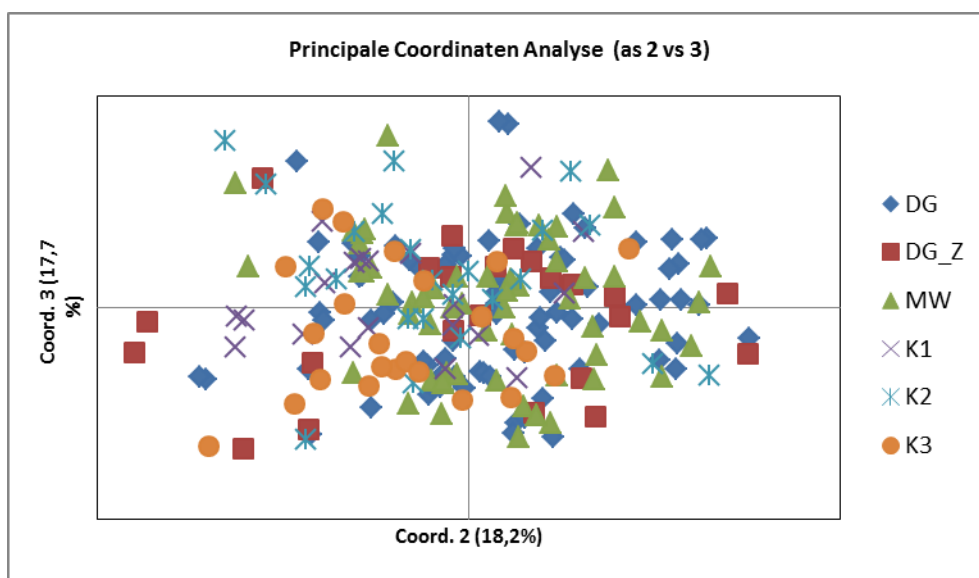
Voor 67% van de planten van het onderzocht plantsoen, kon een moederboom worden toegewezen met relatief hoge zekerheid (Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.). Deze planten verschilden met een kandidaat moeder op geen enkele of op slechts één microsatelliet locus. Indien twee loci met ongelijkheden met de vermoedelijke moederboom worden toegelaten (omwille van technische fouten of nul allelen), kunnen, op één plant na, alle onderzochte planten van kweker 1 en kweker 2 worden toegewezen aan een vermoedelijke moederboom. Ook de meeste van de geanalyseerde planten van kweker 3 (23/25), verschilden op maximum twee microsatellietloci van een kandidaat moederboom.

Tabel 1 Stalen succesvol genetisch geanalyseerd. *Voor het uitgangsmateriaal 'Meikensbossen' en 'De Dauw' is het aantal stalen met een uniek genetisch profiel weergegeven tussen haakjes.

Oorsprong stalen	Code	Aantal planten beschikbaar	Aantal planten genetisch geanalyseerd*
Meikensbossen (Dentergem)	DG	130	130 (107)
Meikensbossen (Dentergem) - zaailingen	DG_Z	23	23
De Dauw (Meerdaalwoud)	MW	86	86 (63)
Plantsoen via Kweker 1 (De Dauw)	K1	50	22
Plantsoen via Kweker 2 (De Dauw)	K2	50	24
Plantsoen via Kweker 3 (Meikensbossen)	K3	50	24
<i>Totaal</i>			309



Figuur 1 Biplot van de Principale Coördinaten Analyse op basis van 14 microsatelliet markers en 236 genetische profielen van winterlinde. De eerste en de tweede as vertegenwoordigen respectievelijk 21,8% en 18,2% van de genetische variatie. De verklaring van de codes is weergegeven in Tabel 1.



Figuur 2 Biplot van de Principale Coördinaten Analyse op basis van 14 microsatelliet markers en 236 genetische profielen van winterlinde. De tweede en de derde as vertegenwoordigen respectievelijk 18,2% en 17,7% van de genetische variatie. De verklaring van de codes is weergegeven in Tabel 2.

Tabel 2 Aantal stalen met private allelen

Aantal stalen met private allelen	
Meikensbossen (Dentergem)	10
Meikensbossen (Dentergem) - zaailingen	2
De Dauw (Meerdaalwoud)	11
Plantsoen via Kweker 1	6
Plantsoen via Kweker 2	3
Plantsoen via Kweker 3	2

Tabel 3 Resultaten van de moederschapsanalyse voor de zaailingen en het plantsoen winterlinde geogst in de zaadtuinen van Meikensbossen en De Dauw.

Oorsprong	Aantal zaailingen die overeenkomen met één of meerdere moederbomen in de geogste zaadtuin					Aantal zaailingen geanalyseerd
	100% (0 loci mismatch)	93% (1 locus mismatch)	85% (2 loci mismatch)	78% (3 loci mismatch)	71% (4 loci mismatch)	
Zaadtuin 'De Dauw'						
Plantsoen via Kweker 1	3	10	8	0	0	21
Plantsoen via Kweker 2	2	13	8	1	0	24
<i>Totaal</i>	5	23	16	1	0	
Zaadtuin 'Meikensbossen'						
Plantsoen via Kweker 3	6	13	4	1	1	25
Meikensbossen zaailingen	20	4	3	0	0	
<i>Totaal</i>	26	17	7	1	0	

1.5 Conclusie

Dit onderzoek toont aan dat het **verhandeld autochtoon plantsoen van winterlinde** onderzocht in deze studie, met een aan zekerheid grenzende **waarschijnlijkheid terecht van erkend autochtoon uitgangsmateriaal afkomstig** is.

2. Zomereik (*Quercus robur*)

2.1 Stalen

Plantsoenen van twee erkende, autochtone herkomsten werden via bemiddeling van ANB aan het INBO geleverd met een document van de leverancier gedurende het najaar van 2017 tot het voorjaar van 2018. De herkomsten betreffen: 'Driebeukenbos', een zaadtuin van autochtone zomereik, en 'Warandeduinen', een autochtone zaadbron. Ongeveer 50 planten van elke herkomst werden afgeleverd. Hiervan namen we bladmateriaal van respectievelijk 31 en 47 bomen wat op silicagel werd bewaard (Tabel 4). Daarnaast werd ook niet-autochtoon plantsoenen van vier leveringen ter beschikking gesteld met als herkomst 'Rood Klooster', 'Dronkemansweg' en 'Tafelenbos'. Van 'Dronkemansweg' waren twee afzonderlijke leveringen, van 'Rood Klooster' één levering. Hiervan werden telkens maximaal tien bomen bemonsterd. Deze herkomsten kunnen als extra referentie benut worden om na te gaan in hoeverre autochtoon en niet-autochtoon plantsoenen van elkaar verschillen.

Tabel 4 Herkomsten van zomereik opgenomen in de studie. * 67 bomen in Driebeukenbos werden bemonsterd, waarvan 56 met een uniek label (d.i. zonder klonen). Na genetische analyse blijkt één van de klonen geen kloon te zijn, maar een uniek profiel te hebben.

Oorsprong stalen	Code	Aantal individuen bemonsterd	Aantal individuen succesvol geanalyseerd
Driebeukenbos	DBBm	67 (56*)	67 (57*)
zaailingen Driebeukenbos	DBBs	72	72
plantsoen Driebeukenbos	auto2-dbb	31	29
Warandeduinen	WDm	150	141
plantsoen Warandeduinen	auto1-wd	47	45
plantsoen Dronkemansweg - partij1	nt-auto1-dw	10	10
plantsoen Dronkemansweg - partij2	nt-auto3-dw	10	10
plantsoen Tafelenbos	nt-auto2-tb	8	8
plantsoen Rood Klooster	nt-auto5-rk	10	9

Omdat een zaadtuin doorgaans geen coherente genetische samenstelling heeft, is het belangrijk dat alle potentiële ouderbomen bemonsterd worden. Een zaadtuin heeft geen natuurlijke evolutie doorgemaakt zoals een bosbestand (mits ze niet aangeplant werd met uiteenlopende herkomsten), maar bestaat uit een verzameling van verschillende, soms sterk uiteenlopende genotypen. Bij aanleg van de zaadtuin werd eerst elk genotype meerdere keren vermeerderd en als herhalingen/klonen in de zaadtuin aangeplant. Personeel van ANB, dat zorgde voor de staalname in 'Driebeukenbos', nam daarom op basis van een plan van aanleg een bladstaal per genotype. In het najaar van 2017 werden daarnaast eikels geoogst onder 16 verschillende, potentiële moederbomen. Van gemiddeld vijf gekiemde zaailingen per mogelijke moederboom werd een blad bemonsterd. De herkomst van deze planten is bijgevolg gekend en kan als controle dienen voor de resolutie van de genetische merkers.

Omdat we geen voorkennis hebben over de mate van genetisch onderscheid tussen en binnen de Vlaamse herkomsten van zomereik, wilden we eveneens een groot aandeel van 'Warandeduinen' bemonsteren in plaats van met een kleine steekproef te werken. Als het onderscheid tussen populaties klein is, dan zijn toewijzingstesten niet sluitend. Het aantal eiken in 'Warandeduinen' wordt geschat op een 150-tal. ANB heeft bijgevolg 150 bomen bemonsterd. Met zulke ruime staalname kon ook hier met een ouderschapsanalyse gewerkt worden.

2.2 DNA-extractie en microsatellietanalyse

DNA werd geëxtraheerd uit gemalen bladstalen met het MagRo 8-M robotisch werkstation (Bio-Nobile). We gebruikten 20 microsatellieten als genetische merkers zoals beschreven door Guichoux et al. (2011). De merkers werden oorspronkelijk ontwikkeld door Dow et al. (1995), Durand et al. (2010), Kampfer et al. (1998) en Steinkellner et al. (1997). Ook de PCR-condities werden aangehouden behalve de primerconcentratie. Deze was 0,20 µM voor

alle primers behalve voor de merkers PIE152 (0,60 μ M), PIE239 (0,40 μ M) en QrZAG11 (0,40 μ M). PCR-producten werden 20 keer verdund en gelopen op een ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) met de LIZ-600 standaard. Allelgroottes werden geanalyseerd met GeneMapper 4.1 (Thermo Fisher Scientific). 17 stalen werden vanaf DNA twee tot vijf keer binnen en tussen platen herhaald om de technische fout te bepalen. Stalen met ontbrekende waarden voor meer dan de helft van de 20 merkers werden achterwege gelaten of opnieuw geanalyseerd als deze noodzakelijk waren voor de vraagstelling.

2.3 Dataverwerking

Enkel de Warandeduinen kunnen we als een natuurlijke populatie beschouwen. Of bepaalde merkers afwijken van assumpties die gemaakt worden tijdens de verdere dataverwerking, werd dan ook voornamelijk beoordeeld binnen deze populatie. Afwijkingen van het Hardy-Weinberg evenwicht werden nagegaan met behulp van het programma Genepop 4.3 (Rousset, 2008), alsook of paren merkers in linkage disequilibrium verkeren. Correctie voor multiple testing werd met de Bonferroni-procedure uitgevoerd. De aanwezigheid van nulallelens werd onderzocht met behulp van Genepop met de maximum likelihood methode, waarbij het EM algoritme van Dempster et al. (1977) gebruikt wordt.

We berekenden daarop de paarsgewijze populatiedifferentiatie (F_{ST}) tussen de verschillende moederbestanden en groepen teeltmateriaal. Via een principale componentenanalyse (PCA), hier uitgevoerd met het R package *adegenet* 2.1.1 (Jombart, 2008) in R 3.5.1 (R Core Team, 2018), kunnen we ook het mogelijke onderscheid tussen individuen en groepen visualiseren. Vervolgens voerden we een verwantschapsanalyse uit met het programma Colony 2.0.6.5 (Jones & Wang, 2010; Wang, 2004; Wang & Santure, 2009). Het werkt volgens een *maximum likelihood* of maximale waarschijnlijkheidsaanpak. Je kan hier de technische fout per merker op basis van de herhalingen meenemen in de analyse, alsook de mate waarin allelen niet amplificeren tijdens de PCR (d.i. *allelic dropout*). Deze proportie werd eveneens bepaald op basis van de herhalingen (gereduceerd tot twee herhalingen per individu) met het programma Pedant wat eveneens een *maximum likelihood* methode hanteert (Johnson & Haydon, 2007a; Johnson & Haydon, 2007b). Naast het identificeren van de ouders, kan je ook nagaan welke individuen één of beide ouders delen. Initieel werd al het plantsoen en de zaailingen van 'Driebeukenbos' als nakomelingen ingevoerd en de bemonsterde bomen in 'Driebeukenbos' en 'Warandeduinen' als potentiële moeders en vaders. Zomereik is immers eenhuizig. Daarnaast kan ook het paringssysteem, hier polygaam, ingegeven worden. Vervolgens werden de analyses voor beide herkomsten, 'Driebeukenbos' en 'Warandeduinen', apart uitgevoerd. De technische fout werd eerst bewust zeer laag gehouden op 0,0001, maar daarna opgedreven tot 0,02 om meer mismatches tussen ouders en nakomelingen toe te laten.

Om meer zekerheid te verkrijgen over de resultaten werd een tweede methode benut via het programma Cervus 3.0.7 (Kalinowski et al., 2007). We voerden hier een moederschapsanalyse uit. Ook de vaders kunnen uiteraard binnen het ouderbestand voorkomen, maar de kans is groter dat je de moeders kan aanwijzen omdat de geogste eikels niet ver van de moederbomen vallen, terwijl pollen zeer ver kunnen vliegen onder invloed van de wind en dus net zo goed van buiten het bestand kunnen komen. Op basis van de genotypen worden eerst de allelfrequenties berekend waarmee simulaties worden uitgevoerd om enerzijds de bruikbaarheid van de merkers te evalueren en anderzijds een grenswaarde te berekenen die de betrouwbaarheid van de toewijzingen van potentiële moeders bij de analyse van de echte dataset bepaalt. We simuleerden hiervoor 10.000 nakomelingen. Het totaal aantal kandidaat-moeders werd voor 'Driebeukenbos' op 65 en voor 'Warandeduinen' op 170 geschat. Hiermee geef je aan dat je niet alle ouderbomen hebt bemonsterd.

Tenslotte werden nog toewijzingstesten uitgevoerd met GeneClass2 (Piry et al., 2004). In tegenstelling tot voorgaande analyses proberen we hier geen specifieke ouderbomen te identificeren, maar na te gaan of het plantsoen afkomstig kan zijn van de referentiepopulaties. Het criterium van Rannala & Mountain (1997) werd geselecteerd voor de schatting van de waarschijnlijkheid, terwijl de probabilliteit van toewijzing voor elk individu tot elke referentiepopulatie werd geschat met het algoritme van Paetkau et al. (2004). Als significantieniveau werd 0,01 gehanteerd.

2.4 Resultaten

Er waren negen stalen (een staal van plantsoen 'Driebeukenbos', zeven stalen uit ouderbestand 'Warandeduinen' en een staal van plantsoen 'Rood Klooster') die voor meer dan de helft van de 20 merkers geen amplificatie vertoonden. Daarnaast waren er ook vijf stalen (een staal plantsoen 'Driebeukenbos', twee stalen van plantsoen

‘Warandeduinen’ en twee stalen uit het ouderbestand ‘Warandeduinen’) die ook na herhaling geen eenduidige genotypen opleverden. Deze stalen werden weggelaten voor verdere dataverwerking (Tabel 4).

Geen enkele merker vertoonde afwijkingen van het Hardy-Weinberg evenwicht. Maximaal 5% nulallelens lijkt voor te komen per merker binnen het ouderbestand ‘Warandeduinen’. Er waren vele paren merkers in linkage disequilibrium (LD). Vooral merkers PIE258, QrZAG11 en QrZAG7 leken met vele andere merkers in LD te zijn in de groepen ‘Warandeduinen’, ‘Warandeduinen’ plantsoenen en zaailingen van ‘Driebeukenbos’. Een analyse met Colony werd daarom herhaald zonder deze merkers en de resultaten hiervan werden vergeleken met deze van de analyse met alle merkers (zie verder). De herhalingen van DNA bleken perfect vergelijkbaar.

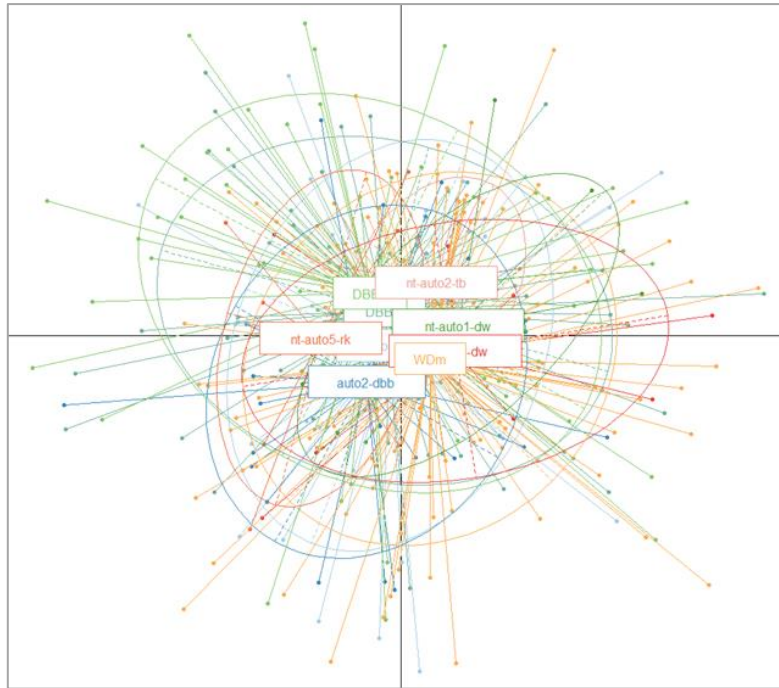
Sommige stalen leken eenzelfde genotype te hebben. Het kan hier gaan over nauwe verwanten (individuen die dezelfde (verwante) ouders hebben) ofwel over bomen die per ongeluk twee keer bemonsterd werden. Ook bleek hieruit dat bepaalde bomen in Driebeukenbos niet de juiste code hadden meegekregen op basis van het plan van aanleg. Zo hadden HE32 en LA50 hetzelfde genetisch profiel. OPOE2 en OPOE3, en daarnaast HE3 en HE35 deelden ook hetzelfde genotype, maar hier kan het opnieuw gaan over zeer nauwe verwanten. Voor elf genotypen uit ‘Driebeukenbos’ werden toch meerdere stalen afgeleverd. Dit gaat hier over stalen van klonen. De genotypen van één paar klonen (VOS10) weken zeer sterk van elkaar af, vermoedelijk door een fout in het plan van aanleg. Beide genotypen werden daarom meegenomen als kandidaat-ouders in de analyses. Ook werden eikels verzameld onder moederboom HB5, maar werden geen bladstalen afgeleverd van de moederboom zelf.

De paarsgewijze F_{ST} waarden waren doorgaans zeer laag ($< 0,05$; Tabel 5). De differentiatie tussen niet-autochtone herkomsten en de autochtone zijn wat hoger, maar niet-significant verschillend van nul. Dit komt door het beperkt aantal stalen van de niet-autochtone herkomsten.

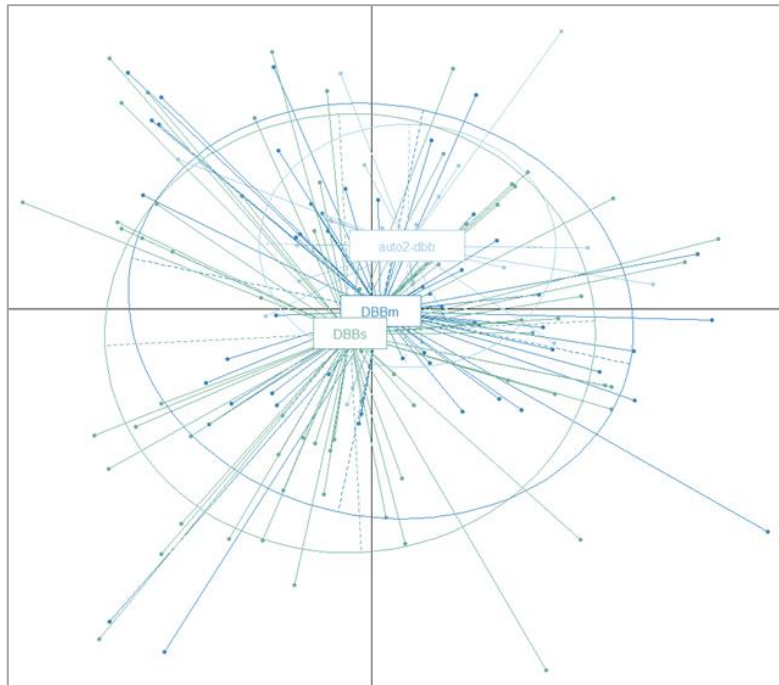
Tabel 5 Paarsgewijze F_{ST} waarden onder de diagonaal en p-waarden boven de diagonaal. Voor de codes van de groepen verwijzen we naar Tabel 1.

	auto1-wd	auto2-dbb	DBBm	DBBs	nt-auto1-dw	nt-auto2-tb	nt-auto3-dw	nt-auto4-tb	nt-auto5-rk	WDM
auto1-wd	0,000	0,013	0,013	0,001	0,019	0,003	0,033	0,191	0,026	0,001
auto2-dbb	0,010	0,000	0,006	0,001	0,012	0,002	0,054	0,080	0,009	0,002
DBBm	0,007	0,010	0,000	0,351	0,136	0,057	0,128	0,158	0,036	0,001
DBBs	0,009	0,012	0,004	0,000	0,030	0,033	0,010	0,115	0,057	0,001
nt-auto1-dw	0,023	0,027	0,018	0,021	0,000	0,138	0,510	0,352	0,052	0,028
nt-auto2-tb	0,030	0,034	0,023	0,025	0,037	0,000	0,029	0,199	0,206	0,057
nt-auto3-dw	0,021	0,022	0,018	0,021	0,027	0,041	0,000	0,728	0,005	0,171
nt-auto4-tb	0,025	0,029	0,024	0,024	0,034	0,040	0,026	0,000	0,077	0,277
nt-auto5-rk	0,024	0,027	0,023	0,021	0,037	0,034	0,042	0,041	0,000	0,012
WDM	0,006	0,009	0,005	0,007	0,019	0,022	0,016	0,021	0,023	0,000

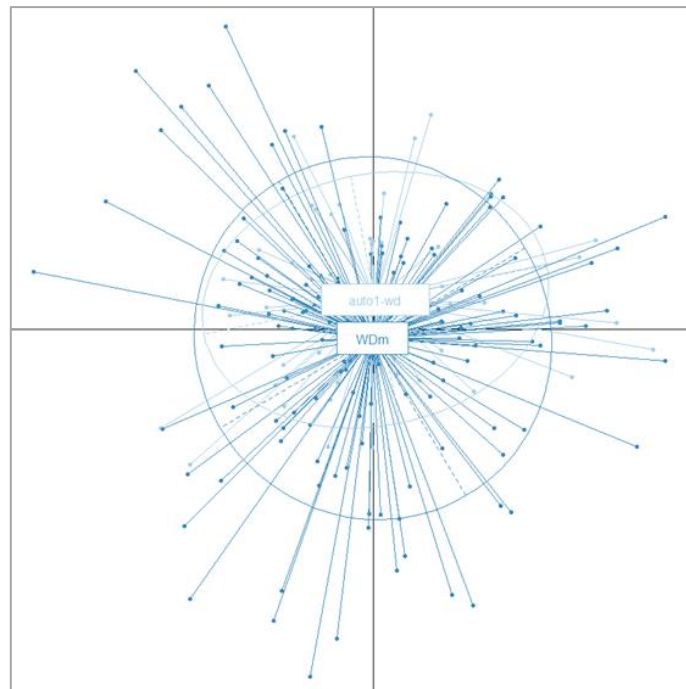
Het beperkte onderscheid tussen de verschillende groepen stalen bleek ook uit de PCA waar alle groepen elkaar grotendeels overlappen (Figuur 3). Als we de ouderbestanden samen met het bijhorende plantsoen a part in een PCA plot bekijken (Figuren 4 en 5), dan blijkt opnieuw een duidelijke overlap. Het plantsoen van ‘Driebeukenbos’ wijkt misschien een weinig af van de zaadtuin, terwijl de zaailingen uit de zaadtuin wat spreiding en centroeïde betreffen bijna perfect overeenkomen met de zaadtuin (Figuur 2). De overige assen geven geen nieuwe patronen weer (resultaten niet getoond).



Figuur 3 PCA plot van de eerste en tweede as van alle geanalyseerde zomereiken. De codes verwijzen naar de verschillende groepen stalen (ouderbestanden en plantsoen) gegeven in Tabel 4. De eerste en tweede as verklaren respectievelijk 3,9 en 3,5% van de variantie.



Figuur 4 PCA plot van de eerste en tweede as van de ouderbomen (DBBm), de opgekweekte eikels (DBBs) en het plantsoen van 'Driebeukenbos' (auto2-dbb). De eerste en tweede as verklaren respectievelijk 5,7 en 4,4% van de variantie.



Figuur 5 PCA plot van de eerste en tweede as van de ouderbomen (WDM) en het plantsoen van 'Warandeduinen' (auto1-wd). De eerste en tweede as verklaren respectievelijk 4,5 en 4,2% van de variantie.

De verwantschapsanalyse uitgevoerd met Colony op de volledige dataset (met een technische fout van 0,0001) identificeert voor bijna alle zaailingen opgekweekt uit eikels van 'Driebeukenbos' een vader of moeder van de zaadtuin. Deze is niet noodzakelijk de boom waaronder de zaden werden verzameld, maar in de meeste gevallen wel. Voor acht zaailingen van de 72 werd geen ouder geïdentificeerd. Maar hiervan hebben zes zaailingen een (niet-geïdentificeerde) ouder gemeen met andere zaailingen die onder dezelfde boom werden verzameld. Noch het plantsoen van 'Driebeukenbos', noch het plantsoen van 'Warandeduinen' kreeg een kandidaat-ouder toegewezen. Een verrassend resultaat is de toewijzing van moederbomen uit 'Warandeduinen' aan niet-autochtoon plantsoen. Voor 'Tafelenbos' (nt-auto2-tb) gebeurde dit voor twee planten. Voor een van beide leveringen van plantsoen van 'Dronkemansweg' was dit het geval voor acht planten van de 10 onderzochte stalen, terwijl er geen matches opdoken voor de andere levering. Omdat we geen referentiestalen hebben van het uitgangsmateriaal van de niet-autochtone herkomsten, kunnen we niet nagaan in hoeverre zij genetisch lijken op de zaadbron 'Warandeduinen'.

Nakomelingen met een ouder gemeenschappelijk werden vooral gevonden binnen eenzelfde groep en dan vooral binnen de zaailingen van 'Driebeukenbos' (DBBs). Dergelijke halfbroer/halfzus-relaties tussen nakomelingen van verschillende groepen werden ook gevonden (zie Bijlage 2), zoals voor vijf planten van plantsoen met herkomst 'Driebeukenbos' met zaailingen uit dezelfde zaadtuin. Maar doorgaans zijn de combinaties van herkomsten niet logisch. Het achterhalen van dit type verwantschap is niet eenvoudig en sterk afhankelijk van de resolutie van de merkers, zeker wanneer het onderscheid tussen de groepen klein is. Deze informatie moet dan ook met de nodige omzichtigheid gebruikt worden. In ieder geval geeft ook dit geen duidelijke link weer tussen het autochtone plantsoen en hun vermelde herkomst.

Wanneer de analyse voor 'Driebeukenbos' en voor 'Warandeduinen' apart gelopen werd, leverde dat dezelfde resultaten op. Dit veranderde niet na verhogen van de technische fout of het verwijderen van mogelijk problematische merkers (d.w.z. deze die potentieel in LD waren met andere merkers).

De simulaties uitgevoerd met Cervus gaven aan dat voor 93% een moederboom kan toegewezen worden met een zekerheid van minimaal 95% op basis van alle genotypen van 'Driebeukenbos', dus zowel van de ouderbomen als van de zaailingen en het plantsoen. Voor 'Warandeduinen' was deze 83%. Deze getallen veranderden niet onder een minimale zekerheid van 80%. Opnieuw kregen bijna alle zaailingen opgekweekt uit geogste eikels in Driebeukenbos een moederboom uit de zaadtuin toegewezen. Enkel voor zes zaailingen was dit niet het geval. De toegewezen moeders verschilden maximaal maar voor één locus van de nakomelingen, behalve voor één zaailing

waar drie loci verschilden van de moederboom. Maar één individu uit het plantsoen van 'Driebeukenbos' kreeg een moederboom toegewezen met hoge zekerheid. Deze vertoonde voor twee merkers een verschil in allelen met de moederboom. Voor de overige planten van dit plantsoen waren er enkel toewijzingen met een zekerheid beneden 80%; ze vertoonden verschillen over drie loci (acht planten) of meer met de kandidaat-moeders. Binnen het plantsoen van 'Warandeduinen' kregen vijf planten een moeder met hoge zekerheid toegewezen. Ze vertoonden een maximum van twee mismatches over alle merkers. Tien andere toewijzingen met lage zekerheid (< 80%) verschilden ook voor 2 loci van een kandidaat moeder. De overige planten hadden drie niet-overeenkomende merkers (24 planten) of meer met kandidaat moederbomen.

Omdat de populatiedifferentiatie bijzonder laag is tussen de hier onderzochte groepen zomereiken, gaven de toewijzingstesten geen eenduidige resultaten (hier niet getoond).

2.5 Conclusie

Op basis van beide resultaten verkregen met Colony en Cervus blijkt het **onderzochte, autochtone plantsoen van zomereik waarschijnlijk niet afkomstig te zijn van de herkomst zoals vermeld op het document van de leverancier**. Hoogstens bij enkele planten bestaat er twijfel, omdat de resultaten uit Cervus en Colony niet volledig gelijk waren. Omdat er geen duidelijk onderscheid bestaat tussen de verschillende herkomsten, kunnen geen alternatieve methodes dan ouderschapsanalyses gebruikt worden. Het is vrijwel onmogelijk dat er in 'Driebeukenbos' vele potentiële moederbomen niet bemonsterd werden. Je zou hier toch verwachten dat er moederbomen geïdentificeerd zouden worden voor de meerderheid van de onderzochte planten van het geleverde plantsoen. In 'Warandeduinen' is het mogelijk dat het plantsoen verzameld werd op die plaats waar net geen moederbomen werden bemonsterd, maar eerder onwaarschijnlijk vanwege de ruime staalname.

Referenties

- Dempster A.P., Laird N.M., Rubin D.B. (1977). Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J Roy Stat B Met*:1-38.
- Dow B.D., Ashley M.V., Howe H.F. (1995). Characterization of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theor Appl Genet* 91(1):137-141.
- Durand J., Bodénès C., Chancerel E., Frigerio J.-M., Vendramin G., Sebastiani F., Buonamici A., Gailing O., Koelewijn H.-P., Villani F. et al. (2010). A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. *BMC Genomics* 11(1):570.
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Léger P., Petit R.J. (2011). Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.). *Mol Ecol Resour* 11(3):578-585.
- Johnson P.C.D., Haydon D.T. (2007a). Maximum-likelihood estimation of allelic dropout and false allele error rates from microsatellite genotypes in the absence of reference data. *Genetics* 175(2):827-842.
- Johnson P.C.D., Haydon D.T. (2007b). Software for quantifying and simulating microsatellite genotyping error. *Bioinform Biol Insights* 1:71-75.
- Jombart T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24(11):1403-1405.
- Jones O.R., Wang J. (2010). COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol Ecol Resour* 10(3):551-555.
- Kalinowski S.T., Taper M.L., Marshall T.C. (2007). Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16(5):1099-1106.
- Kampfer S., Lexer C., Gloss J., Steinkellner H. (1998). Characterization of (GA)_n microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas* 129(2):183-186.
- Paetkau D., Slade R., Burden M., Estoup A. (2004). Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Mol Ecol* 13(1):55-65.
- Peakall R., Smouse P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6(1):288-295.
- Phuekvilai P., Wolff K. (2013). Characterization of microsatellite loci in *Tilia platyphyllos* (Malvaceae) and cross-amplification in related species. *Appl Plant Sci* 1(4).
- Piry S., Alapetite A., Cornuet J.M., Paetkau D., Baudouin L., Estoup A. (2004). GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *J Hered* 95(6):536-539.
- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rannala B., Mountain J.L. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17):9197-9201.
- Rousset F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8(1):103-106.
- Steinkellner H., Fluch S., Turetschek E., Lexer C., Streiff R., Kremer A., Burg K., Glössl J. (1997). Identification and characterization of (GA/CT)_n-microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Mol Biol* 33(6):1093-1096.
- Wang J. (2004). Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* 166(4):1963-1979.
- Wang J., Santure A.W. (2009). Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics* 181(4):1579-1594.

Bijlage 1: Microsatelliet merkers die werden gebruikt voor de genotypering van de stalen winterlinde.

	Naam merker	Repeat motif	Bereik allelen		Aantal allelen*	Multiplex reactie
			MIN (bp)	MAX (bp)		
1	Tc6	(GA) 13	123	147	10	1
2	Tc920	(GA)2(GT)15(AG)3	211	240	11	1
3	Tc937	(AG)13	145	175	6	1
4	Tc7	(GA) 13	232	236	9	1
5	Tc4	T6 (GT)12	214	241	14	2
6	Tc8	(GA) 13	135	174	5	2
7	Tc31	(GA)12	188	217	6	2
8	Tc943	(CA)10	137	152	10	2
9	Tc5	(AG)12	137	169	16	2
10	Tc11	(AG)13	127	164	5	3
11	Tc915	(CT) 16	139	190	5	3
12	Tc927	(AG)12	134	192	5	3
13	Tc963	(CT)11	225	295	32	3
14	Tc951	(CT)12	142	177	5	3

* Aantal allelen geobserveerd binnen de 309 geanalyseerde stalen van winterlinde.

Bijlage 2: Individuen van verschillende groepen met één ouder gemeenschappelijk met een probabiliteit $P > 0.85$ zoals bepaald met Colony.

Logische verbanden tussen herkomsten zijn aangeduid in het groen, niet-logische verbanden in het oranje.

Individu 1	Individu 2	Herkomst 1	Herkomst 2	P
AUTO2-28	GER4-1	Driebeukenbos (auto2-dbb)	Driebeukenbos (DBBs)	0.973
AUTO2-21	KLA5-5	Driebeukenbos (auto2-dbb)	Driebeukenbos (DBBs)	0.97
AUTO2-29	VOS8-2	Driebeukenbos (auto2-dbb)	Driebeukenbos (DBBs)	0.937
AUTO2-3	HB5B-4	Driebeukenbos (auto2-dbb)	Driebeukenbos (DBBs)	0.898
AUTO2-26	HB5B-3	Driebeukenbos (auto2-dbb)	Driebeukenbos (DBBs)	0.871
NIET-AUTO1-2	NIET-AUTO3-4	Dronkemansweg (nt-auto1-dw)	Dronkemansweg (nt-auto3-dw)	0.857
AUTO1-37	NIET-AUTO2-4	Warandeduinen (auto1-wd)	Tafelenbos (nt-auto2-tb)	0.983
AUTO1-14	HE33-1	Warandeduinen (auto1-wd)	Driebeukenbos (DBBs)	0.974
AUTO1-33	NIET-AUTO1-5	Warandeduinen (auto1-wd)	Dronkemansweg (nt-auto1-dw)	0.958
AUTO1-45	AUTO2-10	Warandeduinen (auto1-wd)	Driebeukenbos (auto2-dbb)	0.954
AUTO2-25	NIET-AUTO3-8	Driebeukenbos (auto2-dbb)	Dronkemansweg (nt-auto3-dw)	0.951
HB3B-1	NIET-AUTO2-3	Driebeukenbos (DBBs)	Tafelenbos (nt-auto2-tb)	0.943
AUTO1-19	NIET-AUTO2-5	Warandeduinen (auto1-wd)	Tafelenbos (nt-auto2-tb)	0.941
AUTO1-12	NIET-AUTO1-5	Warandeduinen (auto1-wd)	Dronkemansweg (nt-auto1-dw)	0.94
AUTO1-22	HE33-1	Warandeduinen (auto1-wd)	Driebeukenbos (DBBs)	0.938
AUTO1-28	VOS8-1	Warandeduinen (auto1-wd)	Driebeukenbos (DBBs)	0.918
AUTO2-2	NIET-AUTO1-2	Driebeukenbos (auto2-dbb)	Dronkemansweg (nt-auto1-dw)	0.91
AUTO1-41	HB3A-1	Warandeduinen (auto1-wd)	Driebeukenbos (DBBs)	0.902
AUTO2-11	NIET-AUTO5-7	Driebeukenbos (auto2-dbb)	Rood Klooster (nt-auto5-rk)	0.902
AUTO2-8	NIET-AUTO5-7	Driebeukenbos (auto2-dbb)	Rood Klooster (nt-auto5-rk)	0.902
HE14-1	NIET-AUTO5-3	Driebeukenbos (DBBs)	Rood Klooster (nt-auto5-rk)	0.894
AUTO2-31	NIET-AUTO3-10	Driebeukenbos (auto2-dbb)	Dronkemansweg (nt-auto3-dw)	0.889
AUTO1-6	AUTO2-23	Warandeduinen (auto1-wd)	Driebeukenbos (auto2-dbb)	0.884
AUTO1-7	NIET-AUTO5-6	Warandeduinen (auto1-wd)	Rood Klooster (nt-auto5-rk)	0.879
AUTO1-31	NIET-AUTO3-1	Warandeduinen (auto1-wd)	Dronkemansweg (nt-auto3-dw)	0.876
AUTO1-28	NIET-AUTO3-7	Warandeduinen (auto1-wd)	Dronkemansweg (nt-auto3-dw)	0.873
AUTO2-17	NIET-AUTO5-6	Driebeukenbos (auto2-dbb)	Rood Klooster (nt-auto5-rk)	0.871
AUTO2-25	NIET-AUTO3-6	Driebeukenbos (auto2-dbb)	Dronkemansweg (nt-auto3-dw)	0.859
AUTO1-28	VOS8-5	Warandeduinen (auto1-wd)	Driebeukenbos (DBBs)	0.857
AUTO1-26	AUTO2-29	Warandeduinen (auto1-wd)	Driebeukenbos (auto2-dbb)	0.856
AUTO1-35	HB5B-4	Warandeduinen (auto1-wd)	Driebeukenbos (DBBs)	0.852