

Verjonging van Beuk in het Zoniënwoud

Terug van weggeweest door ectomycorrhizale schimmels?

Teun Everts, Margaux Boeraeve, Kris Vandekerkhoue, Luc De Keersmaeker, Peter Van de Kerckhoue & Hans Jacquemyn

Schimmels spelen een belangrijke rol in bosesystemen. Ze zorgen niet alleen voor de afbraak van organisch materiaal, maar leveren ook essentiële voedingsstoffen en water aan bomen in ruil voor suikers die geproduceerd worden door de bomen. Op die manier kunnen schimmels ook een rol spelen bij de natuurlijke verjonging van bossen. In deze bijdrage onderzochten we of en in welke mate schimmels de verjonging van Beuk *Fagus sylvatica* beïnvloeden. Het Zoniënwoud is daarvoor een uitgelezen onderzoeksterrein: Beuk is er al sinds mensenheugenis aanwezig en recent is natuurlijke verjonging er fors toegenomen.



Een eerstejaars beukenzaailing (linksboven) en een meerjarig Beukje (linksonder) op de bosbodem. (© Margaux Boeraeve)

Rechts: openingen in het kronendak ten gevolge van windworp of afsterven van volwassen Beuken creëren verjongingsmogelijkheden. (© Teun Everts)

Natuurlijke dynamiek van beukenbossen

Natuurlijke verjonging van bossen is een spontaan en continu proces waarbij oude bomen zonder tussenkomst van de mens vervangen worden door nieuwe exemplaren. Het is een vereiste voor de generatiewisseling in bossen en is afhankelijk van het succesvol kiemen en opgroeien van jonge boompjes. Onder het dichte kronendak gevormd door volwassen bomen is er echter weinig licht en dat belemmert de fotosynthese van kiemplanten en jonge boompjes. Bovendien is er aanzienlijke ondergrondse competitie om de schaarse voedingsstoffen. Deze factoren zorgen ervoor dat er een grote uitval is bij jonge en opgroeiende boompjes. Deze fase in de verjonging vormt dan ook een ware demografische flessenhals, die een grote impact heeft op het verdere verloop van de bosontwikkeling (Booth & Hoeksema 2010). Dit is zeker het geval voor beukenbossen. Die zijn namelijk zo donker dat gemiddeld slechts vijf procent van het totale inkomende zonlicht de bosbodem bereikt. Beuk kan echter meer schaduw verdragen dan andere boomsoorten die in onze regio's voorkomen zoals *Es Fraxinus excelsior*, esdoornen of eiken. Jonge Beukjes kunnen in deze donkere omstandigheden een aanzienlijke tijd overleven, terwijl andere, minder schaduwtolerante bomen het onderspit zouden delven. Toch is succesvolle beukenverjonging afhankelijk van het omwaaien (windworp) of afsterven van oude bomen. Dit creëert immers gaten in het kronendak waardoor de hoeveelheid licht op de bosbodem lokaal sterk toeneemt, met een vlotte groeirespons van de jonge boompjes als gevolg. Het kronendak sluit zich weer relatief snel, waardoor de groei van de jonge Beukjes stilvalt. Dit proces moet zich meerdere malen herhalen vooraleer enkele verjongende Beuken erin slagen het kronendak te bereiken en mee de bovenetage te vormen. Vooral bij relatief kleine gaten in het kronendak hebben Beuken een competitief voordeel tegenover andere boomsoorten en wordt de dominantie van Beuk behouden. Bij het ontstaan van grotere openingen door het afsterven of omvallen van meerdere bomen tegelijk zullen minder schaduwtolerante, snelgroeiende soorten die zich bovendien vlotter verspreiden, zoals berken, de bovenhand nemen. Beuken worden daarom ook 'small-gap specialists' genoemd (Canham 1988).

Ectomycorrhizale zwammen

Naast licht spelen ook andere factoren een rol in de natuurlijke verjonging van Beuk. Zo zijn Beuken, net als het merendeel van de boomsoorten in onze gematigde bossen, afhankelijk van een associatie met zogenaamde 'ectomycorrhizale' zwammen om onder andere de ongunstige omstandigheden in de onderetage het hoofd te bieden. Deze samenwerking is naar schatting 200 tot 150 miljoen jaar geleden meermaals en onafhankelijk van elkaar ontstaan. Ectomycorrhizale zwammen zijn wereldwijd verspreid en hun soortenrijkdom wordt geraamd op 20.000 tot 25.000 (Brundrett & Tedersoo 2018). Karakteristieke vertegenwoordigers die ook frequent voorkomen in beukenbossen zijn onder andere amanieten zoals de Parelamaniet *Amanita rubescens*, melkzwammen zoals de Beukenmelkzwam *Lactarius fluens* en boleten zoals de Kastanjeboleet *Imleria badia*. Bomen en zwammen kunnen onderling een intensieve interactie aangaan met elkaar wanneer ectomycorrhizale zwammen de wortels van jonge boompjes bereiken. Dat kan gebeuren via sporen, sclerotia



Enkele karakteristieke ectomycorrhiza-vormende zwammen die dikwijls in beukenbossen teruggevonden kunnen worden. Boven: Beukenmelkzwam *Lactarius fluens*, onder: Kastanjeboleet *Imleria badia*. (© Margaux Boeraeve)

(robuuste pakketjes van zwamvlokken) of schimmeldraden. Vervolgens vestigen deze zwammen zich tussen de epidermale cellen van de beukenwortels en van hieruit vertrekken schimmeldraden die als het ware de bodem verkennen en op zoek gaan naar voedingsstoffen. Ectomycorrhizazwammen groeien dus in en rond wortels en functioneren als verlengstukken van het wortelstelsel van de gastheerplant. Ze verhogen de opname van voedingsstoffen en water en beschermen de plant tegen ziektes en parasieten. Daarenboven kunnen de zwammen enzymen afscheiden die complexe organische stoffen afbreken en zo de beschikbaarheid van bepaalde voedingsstoffen voor de gastheer verhogen. In ruil ontvangen ze een deel van de suikers die de plant aanmaakt door middel van fotosynthese. In het algemeen hebben beide partijen baat bij deze samenwerking en spreken we dus van een mutualisme.

Ondergrondse netwerken

Doordat een Beuk met verschillende ectomycorrhizazwammen kan geassocieerd zijn en een zwam met verschillende Beuken, ontstaat er ondergronds een uitgebreid mycorrhizanetwerk. Via deze connecties worden anorganische voedingsstoffen, koolstof en water uitgewisseld tussen verschillende Beuken, wat kan compenseren voor de donkere omstandigheden in de onderetage en de wortelcompetitie om voedingsstoffen. Meer nog, waarschuwingssignalen kunnen snel en doelgericht uitgewisseld worden en ook kan een stervende boom zijn voedingsstoffen afstaan aan het netwerk en zo zijn opvolgers voeden (Simard et al. 1997, 2002). Hierdoor neemt de overleving, groei, gezondheid en het competitief vermogen van Beuken verbonden door eenzelfde netwerk toe. Bomen kunnen dus via verschillende mycorrhizanetwerken in verbinding staan met anderen. Zo werden in een oud bos in Canada, bestaande uit Douglasspar *Pseudotsuga menziesii*, in een proefvlak van 600 m² de mycorrhizanetwerken van twee truffelsoorten in kaart gebracht. De onderzoekers constateerden dat één boom in verbinding kon staan met tot wel 47 andere bomen, waaronder ook zaailingen, en concludeerden dat zulk een efficiënt en robuust zwammenetwerk fundamenteel is voor de verjonging van bossen (Beiler et al. 2009).

De ectomycorrhizale zwammen op de wortelstelsels van nabijgelegen volwassen bomen vormen een belangrijke bron van ectomycorrhizapartners voor de zaailingen (Jonsson et al. 1999). De jonge boompjes worden op die manier geïntegreerd in het grotere mycorrhiza netwerk, dat voornamelijk ondersteund wordt door de grotere bomen. Hierdoor wordt de voedsel- en watervoorziening van jonge Beukjes bevorderd (van der Heijden & Horton 2009). Aangezien jonge Beukjes via deze weg bijgestaan worden in afwachting op gunstigere omstandigheden zijn deze mycorrhizanetwerken uiterst belangrijk voor de natuurlijke verjonging van Beuk (Read 1997, Selosse et al. 2006). Zo kunnen jonge Beukjes de donkere periodes overleven en snel doorgroeien wanneer het kronendak plots geopend wordt.

Het Zoniënwood, de groene long van Brussel

We onderzochten welke ectomycorrhizale zwammen voorkomen in de bodem en op wortels van Beuken in het Zoniënwood en of ze ook hier de verjonging van Beuk beïnvloeden. Het Zoniënwood is een eeuwenoud boscomplex aan de rand van Brussel dat hoofdzakelijk gedomineerd wordt door Beuk. Dit bos met een oppervlakte van 4.400 hectaren strekt zich uit over het Brussels Hoofdstedelijk Gewest, Vlaanderen en Wallonië en het geniet in de drie gewesten bescherming als Natura 2000 gebied. Hoewel het door verschillende wegen wordt doorsneden, herbergt het Zoniënwood een hoge biodiversiteit. Zo komen er 144 soorten bosplanten voor, waaronder een hele reeks oudbosindicatoren zoals Wilde hyacint *Hyacinthoides non-scripta* en Bosanemoon *Anemone nemorosa* (Hermy et al. 1999), 15 van de 21 in België voorkomende vleurmuizen waaronder de Bosvleermuis *Nyctalus leisleri*, een honderdtal vogelsoorten en een uitgebreid assortiment watervogels, amfibieën en insecten (Brussels Instituut voor Milieubeheer 2012, Vandekerckhove et al. 2018).

Het Zoniënwood is een van de weinige West-Europese bossen waar de natuurlijke dominantie van Beuk in de voorbije eeuwen behouden bleef, omdat het steeds als een hooghoutbos beheerd werd. Deze beheervorm laat bomen uitgroeien tot grote volwassen exemplaren uitgaande van zaad met het oog op de productie van lange, rechte stammen. De meeste andere bossen in onze regio werden beheerd als middelhout met eiken als overstaanders. Hierbij bestaat de onderetage uit een hakhoutlaag waarbij bomen op jonge leeftijd worden gekapt tot net boven de stambasis, zodat de overblijvende stronk weer kan uitschieten. Bij middelhout verdwijnen de Beuken uit de menging omdat ze geen hakhoutbeheer verdragen. In tegenstelling tot wat vaak wordt verondersteld, suggereren pollenanalyses en historische geschreven bronnen dat de Beuken in het Zoniënwood oorspronkelijk autochtoon zijn en niet ingevoerd (Vandekerckhove et al. 2018). In het Zoniënwood bevindt zich ook het grootste bosreservaat van Vlaanderen: het Joseph Zwaenepoel reservaat (235 ha). Twee derde van de bestanden hier zijn ouder dan 200 jaar en omwille van de ecologische gelijkenissen met (oer)oude beukenbossen werd dit reservaat recentelijk door de UNESCO erkend als werelderfgoed. Het reservaat omvat een 'kernvlakte' van 15 ha waar sinds 1983 elke vorm van bosbeheer werd stopgezet, wat de natuur toeliet haar eigen onverstoorde gang te gaan.

Beukenverjonging: een ingewikkeld verhaal

Ondanks de hoge natuurlijkheid van het Zoniënwood is het voortbestaan van de dominante positie van Beuk hier niet vanzelfsprekend. Gedurende het grootste deel van de twintigste eeuw werd de gebrekkige natuurlijke verjonging van Beuk in het Zoniënwood als een hardnekkig probleem gezien omdat het uitblijven van een nieuwe generatie bomen finaal de eigenheid van het bos in gedrang zou kunnen brengen. Dit werd voor het eerst gerapporteerd door houtvester Colleaux in 1923 toen hij opmerkte dat op slechts 150 van de 1.700 hectaren bos natuurlijke verjonging van Beuk optrad (Colleaux 1923). Aan de start van de eenentwintigste eeuw bleek de toestand verder verslechterd: natuurlijk gevestigde Beukjes, ouder dan drie jaar, waren zo goed als afwezig.

Een monitoringsstudie enkele jaren later toonde aan dat het probleem alleszins niet veroorzaakt werd door de zaadproductie van Beuk (Sioen et al. 2008). Zaadpredatie door Houtduiven *Columba palumbus*, eekhoorns en muizen bleek hoog te zijn, maar het was onduidelijk of die bepalend was (Van der Aa et al. 2004). Een andere factor die de natuurlijke verjonging van bossen kan tegenwerken is bodemverdichting. Hierdoor kunnen de water- en luchthuishouding, wortelontwikkeling, opname van voedingsstoffen, gasuitwisseling met de atmosfeer enz. belemmerd worden. Gezien de graad van bodemcompactie enorm varieert doorheen het Zoniënwood en succesvolle verjonging overal afwezig bleef, kan deze factor op zich niet doorslaggevend zijn. Andere condities die verjonging beïnvloeden zoals de kiemkracht van het zaad, het doorbreken van dormantie, kieming, voorziening van voedingsstoffen en toxische bodemelementen bleken ook niet van die grootteorde te zijn dat ze succesvolle regeneratie van Beuk beletten (De Vos 2005). Een allesomvattende verklaring bleef dus voorlopig uit.



Figuur 1. Schematische weergave van de metabarcoding methode om soorten te identificeren op basis van DNA. Elke kleur komt overeen met een specifieke schimmelsoort. De eerste stap bestaat uit het isoleren van het genetisch materiaal uit wortel- en bodemstalen. Vervolgens wordt de samenstelling van één specifiek DNA-stukje (de ITS2 regio van het ribosomaal DNA) geanalyseerd. Door dit te vergelijken met referentiedatabanken konden we achterhalen welke ectomycorrhizale zwammen in welke maten aanwezig waren in de respectievelijke stalen.

Vanaf 2007-2008 begon in het Joseph Zwaenepoel reservaat, en wellicht al iets eerder op sommige plekken elders in het Zoniënwoud, weer succesvolle beukenverjonging op te treden, de daaropvolgende jaren zelfs op meer en meer plaatsen. Momenteel worden overal in het bos, vaak in clusters, talrijke zaailingen en jonge boompjes vastgesteld waarvan sommigen meer dan vier meter hoog zijn. De reden waarom de natuurlijke beukenverjonging voorheen afwezig was en nu succesvol is, is opnieuw een raadsel. Verschillende hypothesen werden al aangehaald. Na de zware winterstormen van 1990 onstonden heel wat gaten in het kronendak waardoor het Zoniënwoud licht- en structuurrijker werd, mogelijks net voldoende om de gevestigde verjonging mogelijk te maken. In de voorbije decennia vestigde ook de Havik *Accipiter gentilis* zich in het het Zoniënwoud. Recent onderzoek toonde aan dat zijn dieet voor 70% bestaat uit Houtduif (Fasol 2011), wat de zaadpredatie in de afgelopen jaren sterk gereduceerd zou kunnen hebben.

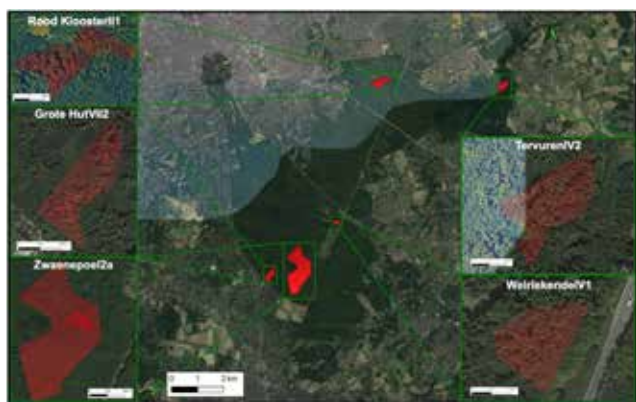
Een belangrijke factor die beukenverjonging kan beïnvloeden, en die tot nu toe onderbelicht bleef, is het voorkomen van geschikte ectomycorrhizale schimmels. De voorbije eeuw was het Zoniënwoud onderhevig aan hoge atmosferische depositie van potentieel verzurende en vermestende polluenten: begin twintigste eeuw was dat vooral zwavel (o.a. van verbranding van steenkool in de Brusselse agglomeratie), terwijl de laatste decennia vooral stikstofdepositie een groot probleem vormde. Gezien ectomycorrhizale zwamgemeenschappen sterk negatief

beïnvloed worden door stikstofdepositie (de Witte et al. 2017, van der Linde et al. 2018), is het mogelijk dat hun ondersteunende rol in beukenverjonging daarom teniet werd gedaan. De laatste twee decennia is de depositie van stikstof in het bos duidelijk afgenomen en sinds een aantal jaren is er zelfs sprake van spontaan bodemherstel (daling van de ionenconcentraties in de bodemoplossing en toegenomen bodem pH) (Roskams et al. 2011, Verstraeten 2018). Daarom kunnen we veronderstellen dat ectomycorrhizale zwamgemeenschappen zich recent tenminste gedeeltelijk hebben hersteld en zo bijgedragen hebben aan de terugkeer van succesvolle natuurlijke beukenverjonging. Een manier om deze hypothese te testen is door na te gaan of bepaalde essentiële zwammen nu meer voorkomen dan enkele jaren geleden. Maar dit vraagt historische data en die zijn helaas niet beschikbaar. Als alternatief bekeken we daarom locaties in het huidige bos met en zonder doorgroeiende verjonging in voor het overige zo gelijkaardig mogelijke omstandigheden. Daarbij gingen we na welke schimmels op kiemplanten en oudere boompjes voorkomen en of deze schimmels ook in de bodem kunnen teruggevonden worden. Meer specifiek trachtten we te achterhalen of er een verband bestaat tussen ectomycorrhizale zwamgemeenschappen en de aan- of afwezigheid van hedendaagse beukenverjonging in het Zoniënwoud.

DNA als moleculaire barcode

Omwille van hun verborgen levenswijze en problemen bij morfologische identificatie (zowel van vruchtlichamen als van de schimmeldraden in en rond wortels), is onderzoek naar ectomycorrhizazwammen niet vanzelfsprekend. Dankzij moderne moleculaire technieken is het echter mogelijk om soortengemeenschappen van zwammen in detail te bestuderen door DNA uit wortels of bodems te isoleren en daar één bepaald stukje DNA (de 'barcode') uit te halen. Door de samenstelling van dit stukje te vergelijken met referentiedatabanken kunnen zwammen vervolgens geïdentificeerd worden, om zo de aanwezige zwamgemeenschappen in kaart te brengen. Deze 'metabarcoding' techniek pasten we toe op bodem- en wortelstalen van jonge Beukjes (Figuur 1).

Verspreid over vijf locaties in het Zoniënwoud bakenden we op plaatsen waar succesvolle verjonging afwezig (N = 64) en aanwezig (N = 123) was, proefvlakken van 100 vierkante meter af. Ongeveer de helft daarvan ligt in het Joseph Zwaenepoel reservaat (Figuur 2). In elk proefvlak verzamelden we bodemstalen (N = 163) en wortels van zaailingen (N = 74) of jonge boompjes (N = 97), afhankelijk van de aanwezigheid van zaailingen al dan niet

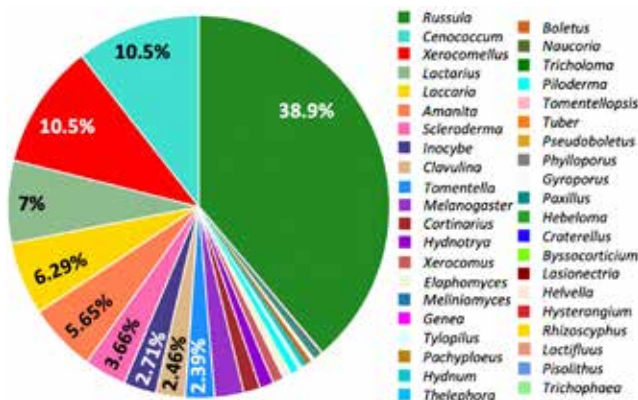


Figuur 2. Overzicht van de locaties in het Zoniënwoud waar stalen werden genomen. Elke locatie wordt weergegeven als een rode polygoon en is bijgevoegd met een inzet, waar de individuele staalnameplots worden weergegeven als rode punten. De meeste stalen werden genomen in het Joseph Zwaenepoel reservaat (N = 170). Andere locaties werden minder intensief gesampeld: Rood KloosterI1 (N = 51), Grote hutVII2 (N = 46), TervurenIV2 (N = 34) en WelriekendelV1 (N = 33).

in eenzelfde proefvlak als jonge boompjes. We deden dit zowel in de typisch donkere condities als onder openingen in het kronendak. Omdat naar schatting slechts 2% van al de schimmels zijn beschreven (Taylor et al. 2014) verschaft het hanteren van een genetische methodiek een vollediger beeld van de aanwezige ectomycorrhizale schimmelgemeenschappen. Daarom isoleerden we voor elk staal het aanwezige DNA en ontleedden we een specifiek deeltje ervan dat eerder geschikt is gebleken om de identiteit van schimmels te achterhalen. Vervolgens werden de bekomen DNA stukjes die voor 97% gelijkend waren per staal samengevoegd in zogenaamde Operational Taxonomic Units (OTU's), die als een 'proxy' voor soorten kunnen beschouwd worden. Door daarna de structuur van de DNA fragmenten van deze OTU's ('sequenties') te vergelijken met deze opgeslagen in referentiedatabanken, werden de bekomen OTU's gerelateerd aan een bepaalde schimmelsoort of geslacht. Hierbij moet de kanttekening gemaakt worden dat de determinatie op soortniveau onzekerheid met zich mee brengt als gevolg van onder andere limitaties in de referentiedatabanken. Deze resultaten moeten daarom met enige voorzichtigheid benaderd worden. Toch slaagden we er zo in de samenstelling van de ectomycorrhizale zwamgemeenschappen in de bodem en op de wortels van Beuk te achterhalen en konden we deze in verband brengen met de aan- of afwezigheid van verjonging.

Diversiteit van ectomycorrhizale zwammen in het Zoniënwoud

In totaal vonden we 246 OTU's die tot 41 ectomycorrhizale schimmelgeslachten behoorden. Met 50 OTU's waren zwammen van het geslacht *Russula* het meest dominant aanwezig in ectomycorrhizagemeenschappen van het Zoniënwoud (Figuur 3). Daarnaast bleken ook *Cenococcum*, fluweelboleten *Xerocomellus*, melkzwammen *Lactarius*, fopzwammen *Laccaria* en amanieten *Amanita* de ectomycorrhizagemeenschappen te domineren, wat in grote lijnen overeenkomt met de zwammen die in de meerderheid van Europese door Beuk gedomineerde bossen worden teruggevonden (Rosinger et al. 2017). De genetische analyses gaven verder weer dat de talrijkst voorkomende zwammen de Geelwitte russula *Russula ochroleuca*, *Cenococcum*



Figuur 3. Over alle stalen heen (bodem- en wortelstalen) werden in totaal 246 OTU's (een genetische proxy voor soorten) voor ectomycorrhizale zwammen gevonden die tot 41 genera behoorden. Met 38,9% van alle lezingen (het aantal keer dat een OTU wordt teruggevonden) was het genus *Russula* het meest frequent aanwezig, gevolgd door *Cenococcum* en fluweelboleten *Xerocomellus*.

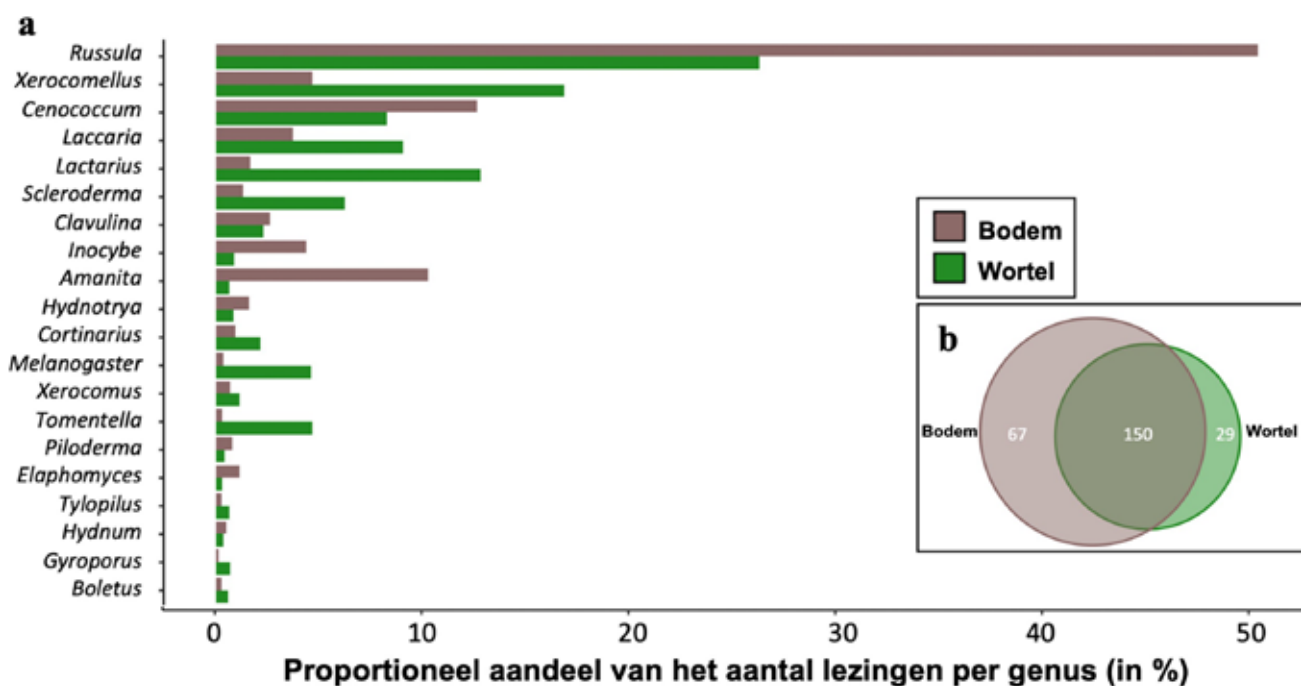
geophilum, de Purperbruine fluweelboleet *Xerocomellus pru-natus*, de Grofplaatrussula *Russula nigricans* en de Bitterzoete melkzwam *Lactarius subdulcis* waren. Een andere veel voorkomende ectomycorrhizale fungus was de Amethystzwam *Laccaria amethystina*. Eerder onderzoek vond een positieve associatie tussen het voorkomen van deze zwam en het aantal zaailingen van Beuk (Grebenc et al. 2009).

De een belangrijker dan de andere?

Hoewel ectomycorrhizale schimmels zich via sporen en sclerotia kunnen verspreiden, lijken veel soorten in weinig verstoorde bossen de wortels van hun gastheren via vegetatieve groei te koloniseren (Newton 1992). Ondanks dat recentere onderzoeken wijzen op een groter belang van verbreiding via sporen (Redecker et al. 2001), valt het merendeel van de sporen niet ver van de paddenstoel (Galante et al. 2011). De zwamgemeenschappen die we in de bodemstalen terugvonden kunnen dus geïnterpreteerd worden als het lokaal assortiment van potentiële ectomycorrhizapartners van verjongende Beukjes, voorzien door nabijgelegen volwassen Beuken. Gezien schimmelsoorten verschillen in hun capaciteit om zich vegetatief te verbreiden (Agerer 2001) en voedingsstoffen uit de bodem te verwerven (Hobbie & Agerer 2010, Pena & Polle 2014), hebben de zwammen die lokaal geassocieerd zijn met volwassen Beuken een grote invloed op de ectomycorrhizale schimmelgemeenschappen van verjongende Beukjes (Dickie et al. 2002).

Uit onze resultaten bleek echter dat ectomycorrhizale zwamgemeenschappen sterk verschilden tussen bodem- en wortelstalen. Ondanks dat deze bevinding mogelijk beïnvloed werd doordat genera verschillend investeren in de omvang van hun schimmeldraden, lijkt dit te suggereren dat er een soort selectie is van zwammen aan de wortel van de jonge Beukjes. Hoewel voor een ander type mycorrhiza reeds werd aangetoond dat de gastheerplant meer suikers kan sturen naar meer voordelige zwammen (Bever et al. 2009), blijft dit voor ectomycorrhiza nog in het ongewisse. Bovendien merkten we op dat russula's *Russula*, amanieten *Amanita*, *Cenococcum* en vezelkoppen *Inocybe* gemiddeld talrijker aanwezig waren in bodem- dan in wortelstalen (Figuur 4a). Zwammen behorende tot de genera melkzwammen *Lactarius*, fluweelboleten *Xerocomellus*, fopzwammen *Laccaria*, aardappelbovisten *Scleroderma*, inkttruffels *Melanogaster* en rouwkorstjes *Tomentella* daarentegen kwamen gemiddeld meer voor in wortelstalen, wat suggereert dat deze een belangrijke rol spelen vroeg in de verjonging van Beuk. Meer specifiek toonden statistische analyses aan dat in onze studie de Bitterzoete melkzwam *Lactarius subdulcis*, de Rimpelende melkzwam *L. tabidus*, de Rossige inkttruffel *Melanogaster intermedius*, de Roze berkenrussula *Russula betularum*, het Gewoon rouwkorstje *Tomentella sublilacina*, *Cenococcum geophilum*, en de Amethystzwam *Laccaria amethystina* sterker geassocieerd waren met wortelstalen dan met bodemstalen en dus mogelijk een cruciale rol spelen bij verjonging van Beuk.

Ondanks deze verschillen werd een grote meerderheid van de OTU's teruggevonden zowel in bodem- als in wortelstalen (Figuur 4b). Deze bevindingen suggereren daarom dat jonge Beukjes effectief geïntegreerd worden in de reeds aanwezige



Figuur 4. (a) Verschillen in proportioneel aandeel van aantal lezingen voor de twintig meest voorkomende ectomycorrhizale zwamgenera in bodem- (bruin) en wortelstalen (groen). (b) Verdeling van de 246 bekomen OTU's (een genetisch analoog voor soorten) over bodem- en wortelstalen: 150 OTU's werden zowel teruggevonden in bodem- als wortelstalen, terwijl 67 OTU's enkel in bodem- en 29 OTU's enkel in wortelstalen werden teruggevonden.

mycorrhizanetwerken die onderhouden worden door de volwassen bomen. Volwassen Beuken staan zo waarschijnlijk jongere individuen bij in hun voorziening van voedingsstoffen en water en functioneren dus als 'nurse trees', wat voor verschillende boomsoorten al werd aangetoond (Fleming 1983, Jonsson et al. 1999, Dickie et al. 2002).

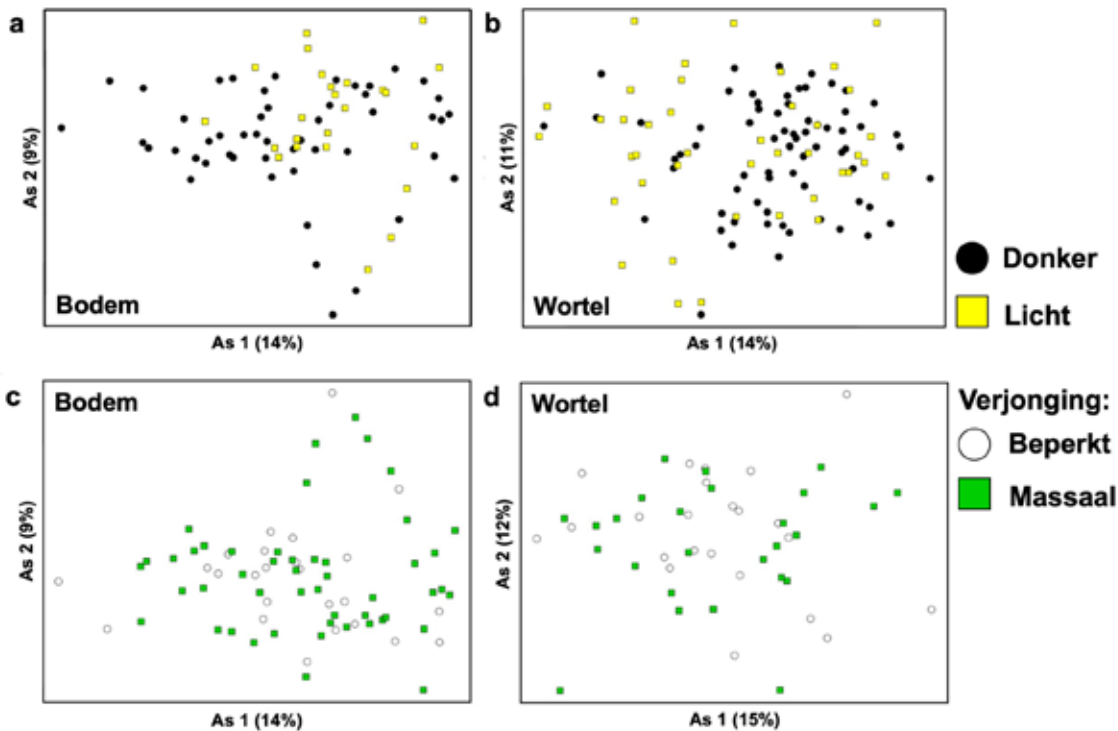
De link met natuurlijke beukenverjonging

Omdat verjonging van Beuk in het Zoniënwoud momenteel sterk geclusterd voorkomt en niet exclusief onder openingen in het kronendak plaatsgrijpt, zochten we ook naar verschillen in ectomycorrhizale zwamgemeenschappen op plaatsen met en zonder succesvolle verjonging. Om dit na te gaan richtten we

ons enkel op het Joseph Zwaenepoel reservaat, aangezien het hier effectief gaat om volledig spontaan ontwikkelende natuurlijke verjonging, terwijl op de vier andere bemonsterde locaties verjonging vaak nog gestimuleerd wordt via het bosbeheer. Als eerste blijkt uit de analyses dat de ectomycorrhizale zwamgemeenschappen, zowel in de bodem als op wortels van jonge Beukjes, niet beduidend verschillen onder openingen in het kronendak enerzijds en onder een gesloten kronendak anderzijds (Figuur 5a,b). In lijn met de verwachtingen betekent dit dat verjongende Beukjes onder een gesloten kronendak alleszins niet beperkt worden door hun ectomycorrhizale symbionten in hun vermogen tot doorgroeien. Vervolgens vergeleken we de zwamgemeenschappen in de bodem tussen proefvlakken waar succesvolle verjonging abundant was en waar deze grotendeels



Links: Amethystzwam *Laccaria amethystina* op de voorgrond, met enkele beukenzaailingen op de achtergrond. Rechts: Bitterzoete melkzwam *Lactarius subdulcis*. Uit onze studie bleek dat deze ectomycorrhizale schimmelsoorten, naast enkele anderen, typisch geassocieerd zijn met wortelstalen van jonge Beukjes. (© Peter Van de Kerckhove)



Figuur 5. Visuele weergave van vergelijkingen tussen ectomycorrhizale zwamgemeenschappen. Ieder puntje stelt een wortel- of bodemstaal voor en de afstand tussen punten geeft aan hoe sterk stalen verschillen in schimmelmilieus. Wanneer twee stalen sterk gelijkend zijn qua soortensamenstelling staan ze dicht bijeen, terwijl ver uiteen liggende punten sterk verschillen. Gezien deze gemeenschappen bestaan uit vele soorten, kan een tweedimensionale figuur niet de complete variatie weergeven. Daarom geeft iedere as weer welk aandeel van de variatie in gemeenschapssamenstelling het beschrijft. Zowel voor bodem- (a) als wortelstalen (b) verschillen ectomycorrhizale zwamgemeenschappen niet beduidend onder gaten in het kronendak (gele vierkantjes) en in donkere (zwarte bolletjes) condities. Zowel de zwamgemeenschappen in de bodem (c) als op wortels van zaailingen (d) verschilden ook niet significant in proefvlakken met massale verjonging enerzijds (groene vierkantjes) en beperkte verjonging anderzijds (witte bolletjes). Dit alles suggereert dat ectomycorrhizale zwamgemeenschappen in het reservaat niet de bepalende factor zijn voor het voorkomen van natuurlijke verjonging van Beuk.

afwezig was. Hier konden we uit onze dataset geen significante verschillen vaststellen (Figuur 5c). Ten slotte bekeken we of er een verschil was in ectomycorrhizale zwamgemeenschappen die we vonden op zaailingen in proefvlakken met massale versus beperkte verjonging. Zo konden we nagaan of deze zwammen het voorkomen van beukenverjonging al dan niet beïnvloedden. Dit bleek ook niet het geval te zijn (Figuur 5d). Alles tezamen betekent dit dat hedendaagse succesvolle beukenverjonging hier vermoedelijk dus niet gelimiteerd is door een afwezigheid van geschikte ectomycorrhizapartners. Bevestigt dit dat ectomycorrhizale zwamgemeenschappen voldoende zijn hersteld, en is dan het uitblijven van verjonging op veel plekken in het Zoniënwoud nu nog een toevals- of na-ijlingseffect? Of zijn dan toch andere factoren zoals bodemcondities, het microklimaat of de lichtbeschikbaarheid doorslaggevend? Verdere analyses zijn nodig om hier definitief een uitspraak over te maken.

Conclusie

Ectomycorrhizale schimmels vormen een fundamentele component in bosesystemen die vaak over het hoofd gezien wordt in het bosbeheer. Zo verzekert de symbiose tussen deze bodemorganismen en Beuken een zelfvoorzienend verjongingspatroon door voedingsstoffen en water aan te leveren aan jonge Beukjes via ondergrondse netwerken, zolang er geen al te grote gaten in het kronendak ontstaan (anders nemen

snelgroeïende, lichtminnende soorten de bovenhand). Net daarom zijn grootschalige en intensieve beheervormen die deze schimmelnetwerken omwoelen door het verwijderen van nurse trees nefast voor de natuurlijke verjonging van Beuk (zie ook Grebenc et al. 2009). Onze resultaten suggereren dat de genera *Lactarius*, *Xerocomellus*, *Laccaria*, *Scleroderma*, *Melanogaster* en *Tomentella* belangrijke ectomycorrhizapartners zijn tijdens de eerste levensstadia van Beuk. Aangezien de schimmelmilieus in de bodem en eerstejaars zaailingen niet verschilden tussen proefvlakken met en zonder succesvolle verjonging, lijkt het alvast niet (meer) een gebrek aan mycorrhizapartners te zijn dat een beperking vormt voor succesvolle verjonging in het Zoniënwoud. Verder onderzoek is nodig om uit te maken wat dan wel succesvolle verjonging decennia lang heeft verhinderd.

SUMMARY

Everts T., Boeraeve M., Vandekerckhove K., De Keersmaecker L., Van de Kerckhove P. & Jacquemyn H. 2020. Natural regeneration of Beech in the Sonian Forest: reemerged due to ectomycorrhizal fungi? *Natuur.focus* 19(3): 124-131 [In Dutch].

The Sonian Forest is a 4.400 ha ancient woodland complex near the city of Brussels, dominated by European Beech *Fagus sylvatica*. Beech regeneration here has been problematic for decades, but now it can be observed frequently, scattered across the forest. Because European Beech is an obligate ectomycorrhizal species, we hypothesized that Beech regeneration had been limited by the absence of suitable ectomycorrhizal fungi. To assess the role of ectomycorrhizal fungi in European Beech regeneration, we determined their communities in seedlings and saplings and compared soil communities between plots with and without regeneration. Our results suggested that regenerating Beeches are incorporated in mycorrhizal networks of the mature Beeches, but ectomycorrhizal fungal communities associating with young Beeches had a higher abundance of *Lactarius*, *Xerocomellus*, *Laccaria*, *Scleroderma*, *Melanogaster* and *Tomentella*. These results indicate that these fungi might be important for seedling establishment. Neither ectomycorrhizal fungal communities associated with seedlings nor soil communities differed between plots with abundant regeneration and plots without established regeneration. Overall these results show that ectomycorrhizal fungi play a role in Beech regeneration, but it remains unclear whether it was the decisive factor explaining lack of regeneration in the past and spatial variation in contemporary Beech regeneration.

DANKWOORD

Onze dankbetuiging gaat uit naar regiobeheerder Patrick Huvenne voor de toelating voor dit onderzoek en naar boswachters Johan Bennekens en Erik Bartholomees voor het uitzoeken van bosbestanden waar we stalen konden nemen geschikt voor onze vraagstelling. Marc Esprit en Stefaan Goessens (INBO) hielpen mee bij het localiseren en selecteren van de staalnamepunten. De onderzoeksgroep Plant Conservation and Population Biology van het departement Biologie aan de KU Leuven en het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) financierden de DNA-analyses. Ook willen we graag Gerrit Peeters en Kasper Van Acker bedanken voor de hulp in het verwezenlijken van de analyses.

AUTEURS

Teun Everts, Kris Vandekerckhove, Luc De Keersmaecker en Peter Van de Kerckhove zijn wetenschappelijk medewerkers aan het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO). Margaux Boeraeve is postdoctoraal onderzoeker aan de onderzoeksgroep Plant Conservation and Population Biology van de KU Leuven. Hans Jacquemyn is professor in dezelfde onderzoeksgroep. Deze studie maakte deel uit van de masterproef Biologie van Teun Everts.

CONTACT

E-mail: teun.everts@inbo.be

REFERENTIES

Agerer R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 11: 107-114.
Beiler K.J., Durall D.M., Simard S.W., Maxwell S.A. & Kretzer A.M. 2009. Architecture of the wood-wide web. *Rhizopogon* spp. genets link multiple Douglas-fir cohorts. *New Phytologist* 185: 543-553.
Bever J.D., Richardson S.C., Lawrence B.M., Holmes J. & Watson M. 2009. Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecological Letters* 12: 13-21.
Booth M.G. & Hoeksema J.S. 2010. Mycorrhizal networks counteract competitive effects of canopy trees on seedling survival. *Ecology* 91: 2294-2302.
Brundrett M.C. & Tederso L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220: 1108-1115.

Brussels Instituut voor Milieubeheer. 2012. Het Zoniënwoud, een duik in de groene long van Brussel. Infofiches over de groene ruimten van het Brussels Hoofdstedelijk Gewest.
Canham C.D. 1988. Growth and canopy architecture of shade tolerant trees. Response to canopy gaps. *Ecology* 69: 786-795.
Colleaux H. 1923. La régénération naturelle du Hêtre dans la forêt de Soignes. *Bulletin de la Société Royale Forestière de Belgique* 26: 114-130, 186-199.
De Vos A. 2005. Bodemcompactie en de invloed op de natuurlijke verjonging van Beuk in het Zoniënwoud. IBW.Bb R 2005.004. Instituut voor Bosbouw en Wildbeheer.
de Witte L.C., Rosenstock N.P., van der Linde S. & Braun S. 2017. Nitrogen deposition changes ectomycorrhizal communities in Swiss Beech forests. *Science of the Total Environment* 605-606: 1083-1096.
Dickie I.A., Koide R.T. & Steiner K.C. 2002. Influences of established trees on mycorrhizal nutrition and growth of *Quercus rubra* seedlings. *Ecological Monographs* 72: 505-521.
Fasol M. 2011. Adaptation comportementale et progression de l'Autour des palombes *Accipiter gentilis* en Moyenne-Belgique. *Aves* 48(1): 1-18.
Fleming L.V. 1983. Succession of mycorrhizal fungi on birch: infection of seedlings planted around mature trees. *Plant and Soil* 71: 263-267.
Galante T.E., Horton T.R. & Swaney D.P. 2011. 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field-and modeling-based study. *Mycologia* 103: 1175-1183.
Grebenc T., Christensen M., Vilhar U., Čater M., Martín M. P., Simončič P. et al. 2009. Response of ectomycorrhizal community structure to gap opening in natural and managed temperate beech-dominated forests. *Canadian Journal of Forest Research* 39: 1375-1386.
Hermy M., Honnay O., Firbank L., Grashof-Bokdam C. & Lawesson J. E. 1999. An ecological comparison between ancient and other forest plant species of Europe and the implications for forest conservation. *Biological Conservation* 91: 9-22.
Hobbie E.A. & Agerer R. 2010. Nitrogen isotopes in ectomycorrhizal sporocarps correspond to belowground exploration types. *Plant and Soil* 327: 71-83.
Jonsson L., Dahlberg A., Nilsson M.-C., Kårén O. & Zackrisson O. 1999. Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. *New Phytologist* 142: 151-162.
Newton A.C. 1992. Towards a functional classification of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 2: 75-79.
Pena R. & Polle A. 2014. Attributing functions to ectomycorrhizal fungal identities in assemblages for nitrogen acquisition under stress. *ISME Journal* 8: 321-330.
Read D. 1997. Mycorrhizal fungi. The ties that bind. *Nature* 388: 517-518.
Redecker D., Szaro T.M., Bowman R.J. & Bruns T.D. 2001. Small genets of *Lactarius aanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal successions. *Molecular ecology* 10: 1025-1034.
Rosinger C., Sandén H. & Godbold D.L. 2017. Ectomycorrhizal diversity in Beech dominated stands in Central Europe. In: Martin L., Gamboni M. & Grenni P. (red.). *Soil biological communities and ecosystem resilience*. Springer Nature, Cham, Switzerland, pp. 143-156.
Roskams P., Sioen, G. & Verstraeten A. 2011. Vitaliteit en dynamiek van bosecosystemen in een veranderend milieu: Toestand en trends in het Zoniënwoud. Paper gepresenteerd op Colloquium Zoniënwoud, Brussel.
Selosse M.-A., Richard F., He X. & Simard S.W. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology and Evolution* 21:621-628.
Simard S.W., Perry D.A., Jones M.D., Molina R. et al. 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388: 579-582.
Simard S.W., Jones M.D. & Durall D.M. 2002. Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. In: van der Heijden M.G.A. & Sanders I.R. (red.). *Mycorrhizal ecology. Ecological Studies (Analysis and Synthesis) vol 157*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 33-74.
Sioen G., Roskams P., Verschelde P., Van der Aa B. & Verstraeten A. 2008. Monitoring the masting behaviour of Beech *Fagus sylvatica* in Flanders (Belgium). Research Institute for Nature and Forest, Geraardsbergen.
Taylor D.L., Hollingsworth T.N., McFarland J.W., Lennon N.J., Nusbaum C. & Ruess R.W. 2014. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecological Monographs* 84: 3-20.
Vandekerckhove K., Deforce K. & Bastiaens J. 2018. Historic-ecological position of Beech in the area of the Sonian Forest and an overview of beech-forest-related biodiversity present in the forest. Argumentatie in het kader van het UNESCO-erkenningsdossier. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (29).
Van der Aa B., De Vos B., Quivy V., Grulois C. & Loyer S. 2004. Beukverjonging in het Zoniënwoud, natuurlijk? *Bosrevue* 9: 1-4.
van der Heijden M. G. A. & Horton T. R. 2009. Socialism in soil? the importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* 97: 1139-1150.
van der Linde S., Suz L.M., Orme C.D.L., Bidartondo M.I. et al. 2018. Environment and host as large-scale controls of ectomycorrhizal fungi. *Nature* 558: 243-248.
Verstraeten A. 2018. Evolution of soil solution chemistry in temperate forests under decreasing atmospheric deposition in Flanders. Doctoraatsproefschrift, Universiteit Gent.