

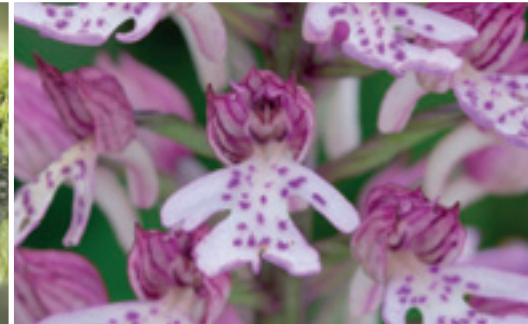
# Natuur.focus

Afgiftekantoor  
Antwerpen X  
P209602

Toelating – gesloten verpakking

Retouradres: Natuurpunt,  
Coxiestraat 11,  
2800 Mechelen

VLAAMS DRIEMAANDELIJKS TIJDSCHRIFT OVER NATUURSTUDIE & -BEHEER – DECEMBER 2012 – JAARGANG 11 – NUMMER 4  
VERSCHIJNT IN MAART, JUNI, SEPTEMBER EN DECEMBER



Focus op biogeochemie

De Stierkikker in Vlaanderen

Hybridisatie bij orchideeën



natuurpunt   
Studie

# Hybridisatie bij orchideeën en implicaties voor natuurbehoud

Hans Jacquemyn, Rein Brys, Isabel Roldán-Ruiz & Olivier Honnay

Hybridisatie is een fundamenteel biologisch proces dat tot nieuwe soorten kan leiden. Dit proces is eerder zeldzaam maar kan in sommige gevallen een belangrijke bedreiging vormen voor de overleving van een van de oudersoorten, vooral wanneer die soort zeldzaam is. In deze bijdrage gaan we na of hybridisatie een potentiële bedreiging vormt voor de overleving van enkele van onze inheemse orchideesoorten.



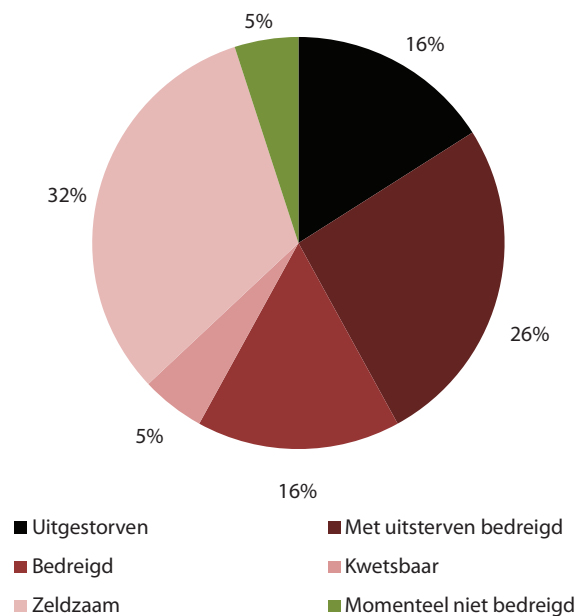
*Hybride van Purperorchis en Soldaatje (foto: Vilda/Rollin Verlinde)*

## Inleiding

Hybridisatie is het proces waarbij individuen van twee verschillende soorten onderling kruisen en levensvatbare nakomelingen voortbrengen. Hoewel onderzoek heeft aangetoond dat hybridisatie een belangrijk evolutionair proces is dat heeft bijgedragen tot soortvorming bij de hogere plantensoorten (Stebbins 1950, Paun et al. 2009), kan het op korte termijn ook een aantal problemen veroorzaken voor het behoud van populaties, in het bijzonder van zeldzame soorten (Levin et al. 1996, Allendorf et al. 2001, Wolf et al. 2001). Dit besef is pas recent gegroeid toen Amerikaanse onderzoekers op basis van een uitgebreide literatuurstudie aantoonde dat een aanzienlijk aantal planten- en diersoorten uitgestorven is door toedoen van hybridisatie (Levin et al. 1996, Rhymer & Simberloff 1996). Hybridisatie blijkt vooral problematisch te zijn voor zeldzame soorten die in contact komen met andere soorten die veel talrijker zijn (Wolf et al. 2001). En bekend voorbeeld is *Argyranthemum coronifolium*, een zeldzame plant waarvan slechts zeven populaties gekend zijn op Tenerife (Canarische Eilanden). Deze populaties verkeerden in een goede toestand tot het moment dat een weg werd aangelegd op de lava die voordien de populaties scheidde van andere soorten van hetzelfde geslacht. Doordat een andere soort van het geslacht zo het leefgebied van *A. coronifolium* wist te koloniseren en kon kruisen met de soort, bevatten drie van de zeven populaties nu alleen nog maar hybriden of individuen van de nieuwe soort (Levin et al. 1996).

Veel soorten hebben echter om hybridisatie te voorkomen mechanismen ontwikkeld waardoor planten geheel of gedeeltelijk reproductief van elkaar geïsoleerd zijn (Ramsey et al. 2003, Coyne & Orr 2004). Men spreekt in dit geval van reproductieve barrières die de kruising tussen soorten op een bepaald moment in de levenscyclus van de plant gaan tegenwerken of helemaal tegenhouden. Zo kan het zijn dat twee plantensoorten nooit samen voorkomen omdat ze totaal verschillende standplaatsvereisten hebben. Het kan ook dat de soorten geen bestuivers delen of op verschillende tijdstippen bloeien waardoor er geen pollen kan uitgewisseld worden. Deze soorten zijn dan reproductief geïsoleerd van elkaar door barrières die verhinderen dat er bevruchting plaatsvindt (pre-zygotische barrières). Daarnaast zijn er ook post-zygotische barrières, i.e. barrières die verhinderen dat de bevruchte zaadknop uitgroeit tot een volwassen individu.

Zo kan de kruising tussen verschillende soorten lege vruchten opleveren of zaden die niet leefbaar zijn of niet kiemen. Het gemak waarmee hybridisatie tussen soorten plaatsgrijpt, zal dus in grote mate afhangen van het relatieve belang van elk van deze reproductieve barrières.



Figuur 1. Zeldzaamheid van onze inheemse orchideesoorten (data uit Van Landuyt et al. 2006).

In de orchideeënfamilie komt hybridisatie geregeld voor, zelfs tussen soorten van verschillende geslachten (Willing & Willing 1985, Kretzschmar et al. 2007). Nochtans is het niet altijd gemakkelijk om hybridisatie in orchideeën vast te stellen. In de meeste gevallen wordt het al of niet voorkomen van hybridisatie nog vaak vastgesteld op basis van morfologische kenmerken. Maar deze vaststellingen zijn niet altijd even betrouwbaar omdat niet alle morfologische variatie een genetische basis heeft (een groot deel van die variatie wordt immers bepaald door de lokale groeiomstandigheden) en omdat de variatie soms groter is binnen soorten dan tussen soorten. De identificatie van hybriden op basis van morfologische kenmerken veronderstelt ook dat de hybriden wat betreft hun uiterlijke kenmerken intermediair zijn, maar dat is niet altijd zo. Daarnaast kunnen fertiele hybriden opnieuw kruisen met hun zuivere oudersoorten, waardoor een zogenaamde hybridenzwerm kan ontstaan, waarin de hybriden morfologisch niet meer te onderscheiden zijn van de oudersoorten. Bovendien ontbreken in de meeste gevallen zelfs gedetailleerde morfologische metingen, wat objectieve identificatie van hybriden verder bemoeilijkt. Met de opkomst van moleculaire genetische merkers wordt de identificatie van hybriden aanzienlijk vergemakkelijkt. Het aantal studies dat moleculaire merkers heeft gebruikt om hybridisatie in orchideeën en hogere planten in het algemeen aan te tonen, is echter nog altijd beperkt en de meeste vaststellingen gebeuren nog altijd op vermeende verschillen in morfologische kenmerken.

De meeste orchideesoorten zijn erg zeldzaam in Vlaanderen (Figuur 1) en gedurende de laatste vijf decennia zijn minstens acht soorten uitgestorven (Jacquelyn et al. 2005). De belangrijkste oorzaken voor de sterke achteruitgang van onze inheemse orchideeën zijn te vinden in een steeds verderschrijdende achteruitgang en versnippering van hun

### BOX 1: Verklarende woordenlijst

**Hybridisatie:** kruising tussen individuen van genetisch duidelijk onderscheiden populaties, ongeacht de taxonomische status van populaties.

**Hybridenzwerm:** een populatie van individuen die allemaal ontstaan zijn door hybridisatie, meestal door meerdere generaties van terugkruisingen met de oudersoorten en kruisingen tussen hybriden.

**Hybride zone:** een gebied waar twee genetisch verschillende populaties met elkaar in contact komen en hybridiseren.

**Introgressie:** de beweging van een gen van een soort in de genenpool van een andere soort door herhaaldelijke terugkruisingen van hybride individuen met een van zijn ouders.

**Zuivere populatie:** een populatie waarin geen hybridisatie heeft plaatsgevonden en die dus enkel individuen van de ouderpopulatie bevat.



Poppenorchis  
*Orchis anthropophora*



Soldaatje  
*Orchis militaris*



Purperorchis  
*Orchis purpurea*



Italiaanse orchis  
*Orchis italica*



Galilea orchis  
*Orchis galilaea*

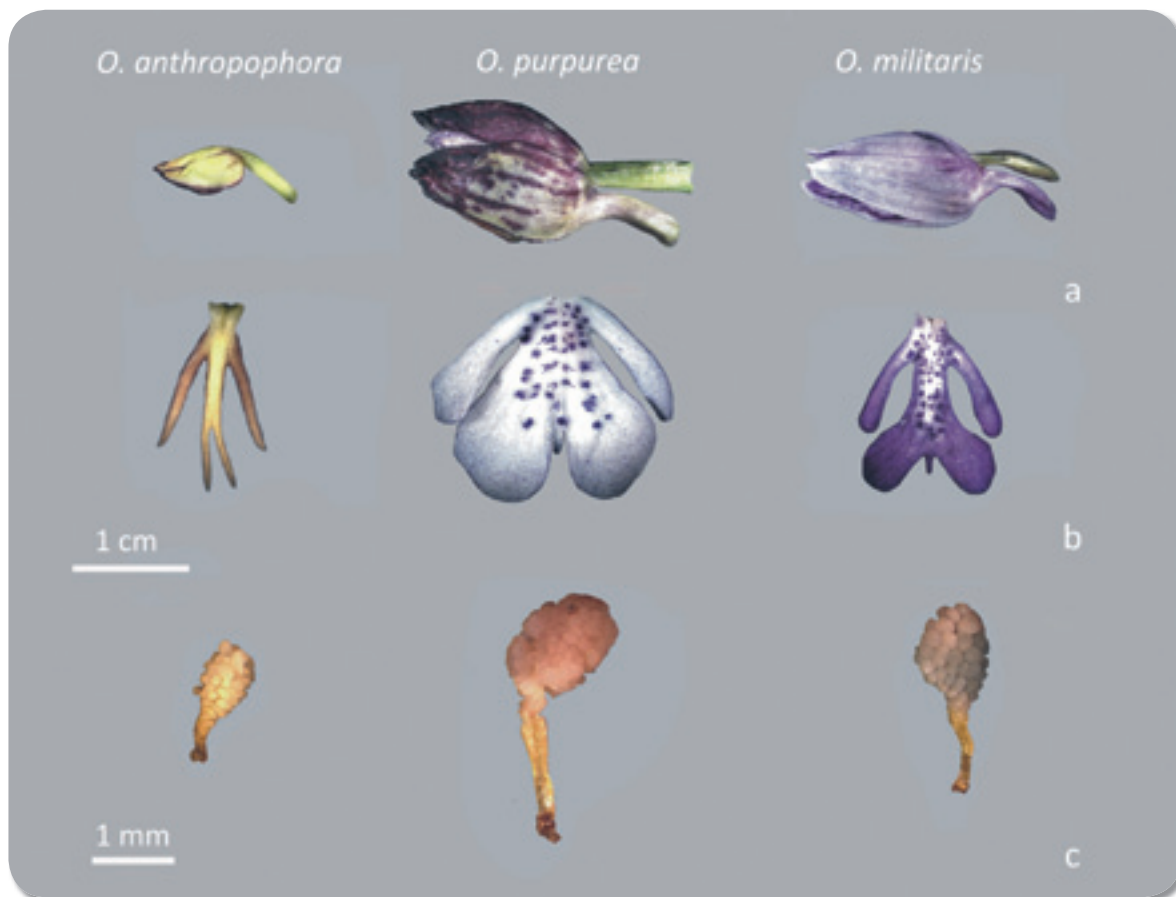


Gele mensenorchis  
*Orchis punctulata*

Figuur 2. Verschillende soorten van de antropomorfe groep van het geslacht *Orchis*. Enkel de drie bovenste soorten worden in Vlaanderen teruggevonden.

leefgebied. Zo zorgen vermessing en ontwatering ervoor dat veel groeiplaatsen niet langer geschikt zijn voor orchideeën. Daarnaast kunnen ook veranderingen in biotische interacties (bv. bestuiving of associaties met mycorrhizale schimmels) de leefbaarheid op lange termijn beïnvloeden (Swarts en Dixon 2009). We verwachten dat hybridisatie ook impact kan hebben op de langetermijnoverleving van enkele zeldzame orchideeën, maar dit werd nog maar weinig onderzocht. Het doel van dit onderzoek was na te gaan of hybridisatie een bedreiging kan vormen voor het voortbestaan van enkele bij ons erg zeldzaam voorkomende orchideesoorten. Hiervoor richtten we ons op drie soorten van het geslacht *Orchis*: Poppenorchis *Orchis anthropophora*, Soldaatje *O. militaris* en Purperorchis *O. purpurea*. Eerst gingen we na welke factoren

de reproductieve isolatie van de drie soorten bepalen. Daartoe werden experimentele bestuivingen uitgevoerd om de vruchtzetting, zaadkwaliteit en kieming van de verschillende kruisingen te onderzoeken. Om de invloed van pre-zygotische barrières te kennen, werd op basis van informatie in de literatuur een overzicht gemaakt van alle bekende bestuivers. Daarnaast onderzochten we ook of hybridisatie voorkomt in natuurlijke veldcondities. Hiervoor werd onderzoek uitgevoerd op een van de weinige locaties in België (in de buurt van Eben-Emael) waar deze drie soorten samen voorkomen (sympatrische populatie) in relatief omvangrijke aantallen. Aanvullend werden eveneens zuivere (allopatrische) populaties van deze drie soorten geselecteerd, die als referentiepopulaties in het onderzoek fungeerden.



Figuur 3. Verschillen in bloemmorfolgie tussen Poppenorchis *Orchis anthropophora*, Purperorchis *O. purpurea* en Soldaatje *O. militaris*.

## Studiesoorten

Poppenorchis, Soldaatje en Purperorchis behoren tot de zogenaamde 'antropomorfische groep' van het geslacht *Orchis* (Bateman et al. 2003, Kretzschmar et al. 2007). Tot deze groep worden ook nog Aapjesorchis *Orchis simia*, de Italiaanse orchis *O. italica*, de Gele mensorchis *O. punctulata* en de Galilea orchis *O. galilaea* gerekend. Ze onderscheidt zich van de overige soorten van het geslacht *Orchis*, de zogenaamde *Mascula* groep, doordat de lip van de bloemen lobben heeft die doen denken aan armen en benen (Figuren 2 en 3). Deze drie soorten zijn bijzonder zeldzaam in Vlaanderen (Van Landuyt et al. 2006) en de overige vermelde soorten van deze antropomorfische groep komen in Vlaanderen niet voor.

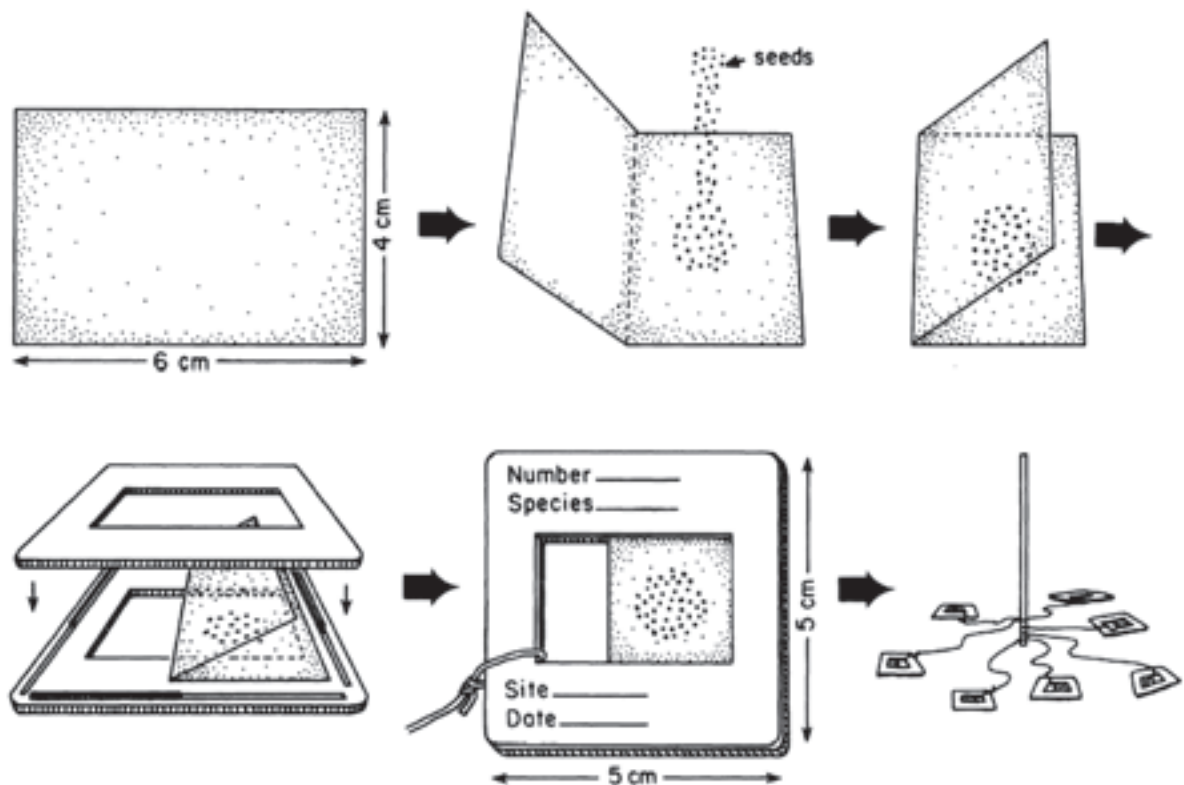
De Poppenorchis komt voornamelijk voor op zonnige plaatsen in kalkgraslanden en aangrenzende zoomvegetaties (Jacquemyn et al. 2011). In tegenstelling tot de twee andere soorten heeft ze geen of een zeer korte spoor, waarin minimale hoeveelheden nectar geproduceerd worden (Figuur 3). De bloemen zijn lichtgroen tot geelgroen met af en toe een rode rand en zijn opmerkelijk kleiner dan die van Purperorchis en Soldaatje. De lip heeft twee zijslippen en een langere, aan de top in twee gespleten middenslip, die samen de vorm hebben van een poppetje met afhangende ledematen (Kreutz & Dekker 2000). De soort komt voornamelijk in het Middellandse Zeegebied voor, waar ze in grote populaties kan aangetroffen worden. Bij ons bereikt ze de noordelijke grens van haar verspreidingsareaal (Jacquemyn et al. 2011). De Purperorchis wordt voornamelijk teruggevonden in struwelen en zomen, lichte hellingbossen en hun mantels, maar de soort kan ook overleven in kalkgraslanden (Kreutz & Dekker 2000). Hier vindt men haar meestal terug in de schaduw

van struiken of kleine bomen. De planten kunnen zeer groot worden en soms meer dan honderd bloemen bevatten (Jacquemyn & Brys 2010). Net als bij het Soldaatje zijn de bladeren breed eivormig, donkergroen en glanzend. De bloemen zijn zeer variabel in vorm en kleur, van wit tot donkerpaars. De bovenkant van de bloem is bruin/paars aangelopen en daarom gemakkelijk te herkennen. De lip bestaat uit drie lobben, waarbij de middenlob bestaat uit twee deellobben met daartussenin een zeer klein middenlobje (Figuur 3). Dikwijls kunnen donkerbruine of paarse papillen op de lip aangetroffen worden.

Het Soldaatje tenslotte kent een zeer grote verspreiding (van de Atlantische kust tot in Mongolië) en komt voornamelijk op kalkgraslanden in volle zon voor, maar ook aan bosranden en in struweelgemeenschappen (Kretzschmar et al. 2007). Het Soldaatje heeft grote ongevlekte, groene, eivormig tot eivormig lancetachtige bladeren. De bloemen zijn vrij groot en lichtpaars, terwijl de bovenkant dikwijls zilverachtig-paars is. De lip bestaat uit drie lobben, waarbij de smalle middenlob zich aan het uiteinde opnieuw deelt in twee afgeronde, verbrede lobben, met daartussen een zeer klein middenlobje (Figuur 3). De twee zijlobben zijn smaller dan die van Purperorchis en de middenlob is vaak bezet met paarse haarbundeltjes.

## Dataverzameling Experimenteel werk

In een eerste fase van het onderzoek wilden we nagaan of hybridisatie tussen de drie soorten überhaupt mogelijk is en welke de belangrijkste reproductieve barrières zijn die het voorkomen van hybridisatie beïnvloeden. Hiervoor werden

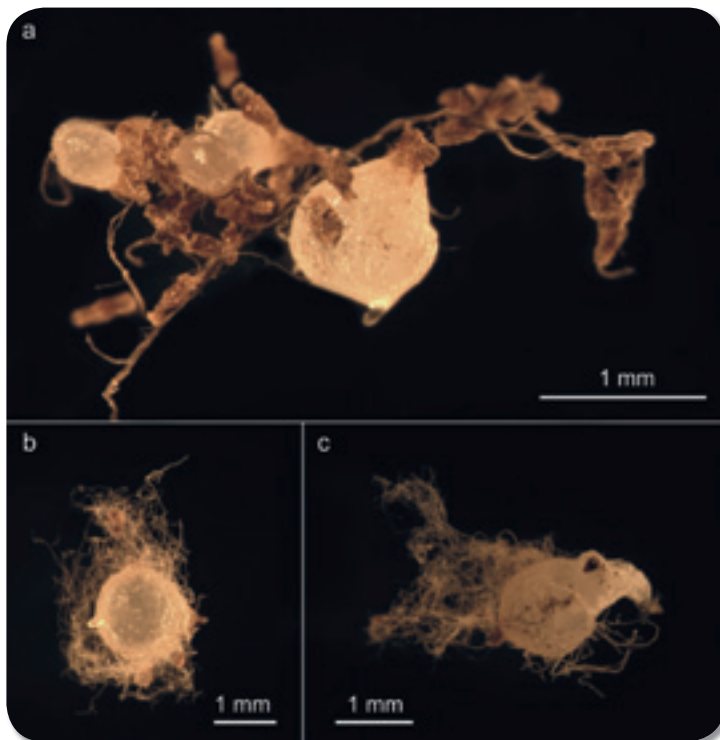


Figuur 4. Methode om op basis van zaadpakketjes kieming bij orchideeën te kwantificeren. De zaden worden in fijn fytoplankton gelegd dat in diaraampjes wordt gestopt. Die worden enige maanden onder de grond begraven, waarna ze terug opgegraven worden. Indien kieming heeft plaatsgevonden, kunnen zogenaamde protocormen of zelfs kiemplanten in de zaadpakketjes teruggevonden worden (bron: Rasmussen & Whigham 1993).

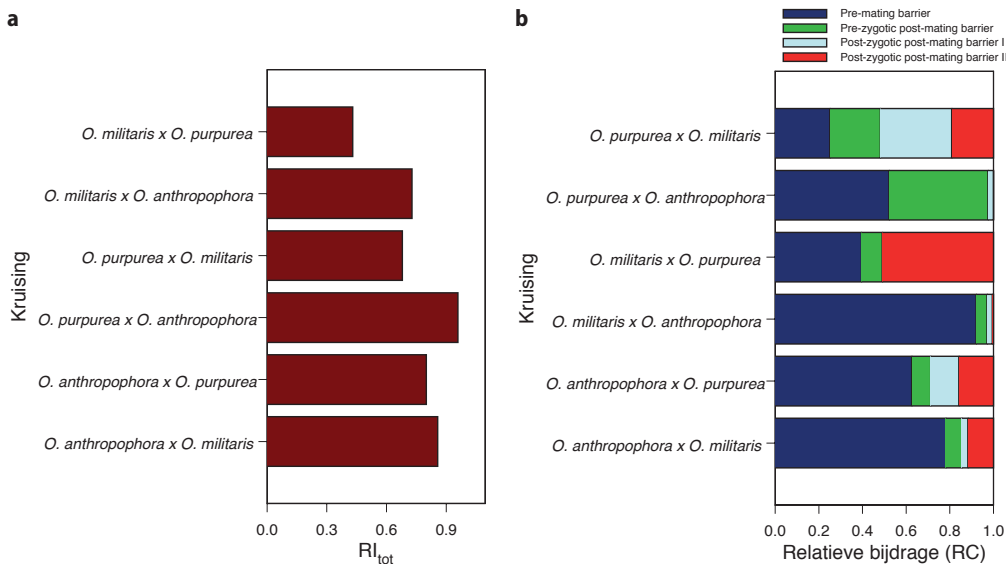
handbestuivingen uitgevoerd die toelaten het reproductieve succes te meten wanneer verschillende soorten onderling kruisen. Voor elke soort werden in een zuivere populatie (waarvan geweten is dat er nooit meer dan één soort is voorgekomen) willekeurig 30 planten geselecteerd, waarvan er

tien bestoven werden met pollen van de eigen soort en twintig met pollen van de twee andere soorten. De bestuivingen werden uitgevoerd met een tandenstoker, waarmee de pollinaria eenvoudig uit de bloemen kunnen verwijderd worden en op de stigma van een andere plant aangebracht worden. Per plant werden tien bloemen bestoven, wat resulteerde in een totaal van 900 bloemen (3 soorten x 30 planten per soort x 10 bloemen per plant) die op die manier bestoven werden. Deze bestuivingen werden half mei uitgevoerd, wanneer de drie soorten gelijktijdig bloeiden. Wanneer de zaden rijp waren, werd eerst het aantal vruchten geteld en werden van elke plant drie vruchten geoogst om het percentage levensvatbare zaden te tellen. Dit werd bepaald met een eenvoudige tetrazoliumtest, waarbij het embryo van levensvatbare zaden rood kleurt en niet-levensvatbare zaden ongekleurd blijven. Na kleuring werd voor elke vrucht de proportie levensvatbare zaden bepaald. Doordat de vruchten ruim voor ze opspringen geoogst werden, werd introductie van hybride planten vermeden.

Omdat sommige auteurs erop gewezen hebben dat testen op basis van tetrazolium niet altijd even betrouwbaar zijn om de leefbaarheid van hybride zaden te bepalen (Haggar & Malmgren 2012), werd een grootschalig kiemingsexperiment opgezet. Hiervoor werden de overige vruchten van de experimentele kruisingen geoogst, de zaden gemengd en in de studiepopulatie te kiemen gelegd. Daarvoor maakten we gebruik van kleine zaadpakketjes die bestaan uit diaraampjes en fijn fytoplanktonnet waarin de zaden gelegd worden (Figuur 4). Het netje heeft een maaswijdte die klein genoeg is om de zaden in het zaadpakketje te houden en bodemorganismen buiten te houden, maar groot genoeg om schimmels de zaden te laten penetreren en kieming op gang te



Figuur 5. Protocormen die teruggevonden werden in de zaadpakketjes in de studiepopulatie. De protocormen zijn afkomstig van zaden die werden bekomen uit verschillende kruisingen: a) *O. militaris* x *O. purpurea*, b) *O. purpurea* x *O. anthropophora* en c) *O. anthropophora* x *O. militaris*.

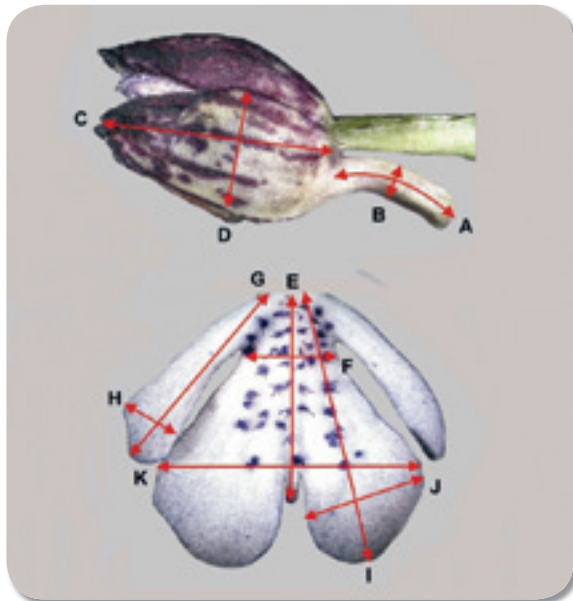


Figuur 6. Totale reproductieve isolatie bepaald op basis van pollinatoren overlap, vruchtzetting, zaadkwaliteit en kieming en relatieve bijdragen van elke barrière voor kruisingen tussen *Orchis anthropophora*, *O. militaris* en *O. purpurea*. De eerste soortnaam is de moederplant, de tweede is de vaderplant.

brenge (Rasmussen & Whigham 1993). Hybride zaden kunnen zo niet uit de zaadpakketjes ontsnappen en per ongeluk in het perceel terecht komen. De zaadpakketjes werden op regelmatige afstanden in de studiepopulatie te kiemen gelegd. Vier transecten (7,5 meter apart) werden uitgelegd en langs elk transect werden om de twee meter telkens negen zaadpakketjes (voor elke kruising één) verticaal in de bodem gestopt. De zaden werden in september in de bodem

### Hybridisatie onder natuurlijke veldcondities

In een tweede fase van het onderzoek gingen we na of voorspellingen op basis van reproductieve isolatie bevestigd worden in natuurlijke veldomstandigheden. Meer concreet verwachtten we dat soorten die sterk reproductief geïsoleerd zijn van elkaar slechts in zeer beperkte mate of niet met elkaar zullen hybridiseren, terwijl soorten die een lage reproductieve isolatie kennen gemakkelijk met elkaar zullen kruisen en hybriden vormen. Om deze hypothesen te testen werd een studiepopulatie geselecteerd waarin de drie soorten in grote aantallen aanwezig waren. De studiepopulatie was gelegen in een kalkgrasland in de buurt van Eben-Emael. In de studiepopulatie werd een proefvlak van 20 op 30 meter uitgelegd, waarbinnen de positie van elke bloeiende plant nauwkeurig bepaald werd. Van elke plant werd de graad van hybridisatie bepaald op basis van moleculaire merkers en morfologische metingen. Hiervoor werd van elke plant een bloem verzameld, gedissecteerd en digitaal gefotografeerd. Deze foto's werden gebruikt om verschillende bloemkenmerken op te meten (Figuur 7). Van elke plant werd ook een blad ingezameld voor genetische analyse. We gebruikten de AFLP techniek om de genetische status van elke plant te bepalen. Deze moleculaire techniek wordt vaak gebruikt in hybridisatieonderzoek. Het DNA wordt hierbij op basis van bepaalde enzymen in kleine stukjes geknipt, die vervolgens vermeerderd en op grootte gescheiden worden. Nadien wordt de aan- of afwezigheid van deze stukjes DNA gebruikt om verwantschap tussen individuen te bepalen. Tevens werden bladmateriaal en bloemgegevens verzameld van twee allopatrische populaties waarvan aangenomen werd dat ze nooit eerder in contact zijn gekomen met de andere soorten. Deze populaties dienden dan ook als referentie om de graad van hybridisatie tegen af te wegen.



Figuur 7. Grafische weergave van de bloemkenmerken die in deze studie werden opgemeten. A) lengte van de spoor, B) breedte van de spoor, C) lengte van het buitenste periant segment, D) breedte van het buitenste periant segment, E) lengte van de torso, F) breedte van de torso, G) lengte van de arm, H) breedte van de arm, I) lengte van het been, J) breedte van het been en K) breedte van de lip.

begraven. Anderhalf jaar later werden de zaadpakketjes terug opgegraven en werd de kieming onder een microscoop vastgesteld. De eerste stadia van succesvolle kieming kunnen worden onderscheiden door de aanwezigheid van protocormen (Figuur 5). Dit zijn knolvormige structuren die nog volledig afhankelijk zijn van schimmels en het begin vormen van de ontwikkeling van een tuber of knol waaruit dan in een later stadium de eerste blaadjes tot ontwikkeling komen.

Met behulp van statistische clustertechnieken werden de gegevens geanalyseerd. Voor elk individu werd een hybridisatie-index berekend. Dit is een index die varieert tussen 0 (zuiver individu van soort A) en 1 (zuiver individu van soort B). Tussentijdse waarden duiden op hybride planten. Indien hybridisatie niet verder gaat dan het F1 stadium, zal de hybride-index 0,5 bedragen. Daarnaast gingen we ook na of hybride planten morfologisch intermediair waren t.o.v. de

Tabel 1. Vruchtzetting, zaadkwaliteit en zaadkieming van negen verschillende kruisingen tussen *Orchis anthropophora* (A), *O. militaris* (M) and *O. purpurea* (P). De eerste letter geeft de moederplant weer, de tweede letter staat voor de vaderplant. Waarden ( $\pm$  SD) zijn het gemiddelde van kruisingen die uitgevoerd werden op tien planten. Waarden met verschillende subscripts geven aan dat ze significant verschillend zijn van elkaar.

Kruising	Vruchtzetting (%)	Zaadkwaliteit (%)	Kieming <sup>1</sup>
AA	92.50 $\pm$ 6.22 b	79.44 $\pm$ 15.79 c	0.64
AM	80.77 $\pm$ 8.49 b	68.35 $\pm$ 22.37 bc	0.38
AP	86.25 $\pm$ 9.18 b	60.41 $\pm$ 25.83 bc	0.39
MA	89.29 $\pm$ 8.87 b	70.47 $\pm$ 14.69 bc	0.74
MM	95.38 $\pm$ 4.96 b	78.78 $\pm$ 14.15 c	0.75
MP	94.68 $\pm$ 7.24 b	77.62 $\pm$ 15.61 bc	0.54
PA	16.90 $\pm$ 16.23 a	27.47 $\pm$ 14.94 a	0.95
PM	78.31 $\pm$ 27.56 b	32.74 $\pm$ 27.07 a	0.68
PP	91.11 $\pm$ 7.82 b	51.43 $\pm$ 8.99 ab	0.96

<sup>1</sup> Proportie zaadpakketjes waarin ten minste één protocorm werd geobserveerd.

zuivere planten en of de genetische gegevens in overeenstemming waren met de morfologische metingen. Hiervoor correleerden we hybridisatie-indices op basis van de genetische gegevens met indices op basis van de morfologische metingen (zie Jacquemyn et al. 2012 voor meer details).

### Belangrijkste resultaten Reproductieve isolatie

In de meeste gevallen leidden de interspecifieke bestuivingen tot een hoge vruchtzetting (>80%) (Tabel 1). Enkel in het geval waarbij Purperorchis als moederplant fungeerde en Poppenorchis als vaderplant werd een lage vruchtzetting gevonden (<20%). De proportie levensvatbare zaden toonde echter een veel grotere variatie. Ongeveer 80% van alle zaden hadden een levensvatbaar embryo in zuivere kruisingen van Poppenorchis, terwijl in kruisingen waarbij Purperorchis als pollenacceptor fungeerde en Poppenorchis als pollendonor slechts 27% van de zaden levensvatbaar was. In het algemeen resulteerden kruisingen met Poppenorchis en Soldaatje als pollenacceptor in een hoge proportie levensvatbare zaden, terwijl in kruisingen met Purperorchis als moederplant de kwaliteit van de zaden doorgaans laag was. Als we kijken naar de kieming, dan blijkt dat voor alle kruisingen zaadpakketjes werden teruggevonden waarin tenminste één protocorm aanwezig was. Bij sommige kruisingen trad in bijna alle zaadpakketjes succesvolle kieming op, wat

aangeeft dat hybride zaden van de onderzochte soorten gemakkelijk kunnen kiemen onder veldomstandigheden. Enkel in het geval waar Poppenorchis in de kruisingen betrokken was als moederplant, was de kieming beperkt.

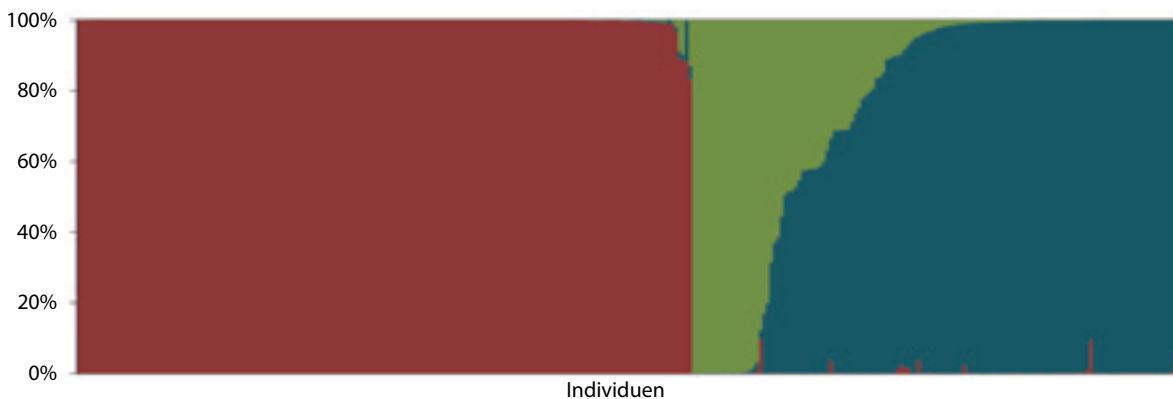
Als we de waarden van zaadkwaliteit en kiemsucces gebruiken om de maat van reproductieve isolatie uit te rekenen, dan blijkt deze te variëren tussen 0,18 (vlotte hybridisatie) voor kruisingen tussen Soldaatje en Purperorchis en 0,90 (moeilijke hybridisatie) voor kruisingen tussen Purperorchis en Poppenorchis (Figuur 6). Op basis van deze gegevens kunnen we dus verwachten dat hybridisatie tussen Soldaatje en Purperorchis gemakkelijk kan plaatsvinden in natuurlijke populaties waar beide soorten samen voorkomen, terwijl hybridisatie tussen Poppenorchis en Purperorchis veel moeilijker zal gebeuren. We kunnen met andere woorden verwachten dat in natuurlijke populaties waar de drie soorten samen voorkomen, hybriden tussen Soldaatje en Purperorchis frequent kunnen voorkomen, maar dat hybriden tussen Poppenorchis en Purperorchis niet of veel minder frequent aanwezig zullen zijn.

### Hybridisatie in het veld

De genetische gegevens bevestigen voorgaande resultaten en wijzen op een substantiële hybridisatie in de bestudeerde populatie tussen Purperorchis en Soldaatje, maar niet tussen Poppenorchis en de twee andere soorten (Figuur 8). Bijna alle individuen van Poppenorchis waren genetisch duidelijk onderscheiden van de twee andere soorten. Individuen van Purperorchis en Soldaatjes langs de andere kant vertoonden een continue uitwisseling van genetisch materiaal die typisch is voor hybridenzwermen. De morfologische gegevens zijn hiermee in overeenstemming en geven ook een continue overgang weer tussen zuivere Soldaatjes en zuivere Purperorchissen (Figuren 9 en 10). Als we de hybride-index uitrekenen voor alle Purperorchissen en Soldaatjes, dan stellen we een continue overgang vast tussen Soldaatje (hybride-index 0) en Purperorchis (hybride-index 1) (Figuur 11).

### Discussie Hybridisatie in *Orchis*

Hybridisatie komt regelmatig voor in het geslacht *Orchis* wanneer verschillende soorten samen voorkomen in dezelfde populatie. Kretzschmar et al. (2007) geven niet minder dan 37 verschillende soortencombinaties weer waarvoor hybridisatie is waargenomen in het veld, al of niet op basis van morfometrische metingen of moleculaire genetische data.



Figuur 8. Resultaten van de genetische clusteranalyse. Elke lijn stelt een individu weer (n = 315). Individuen in rood stellen zuivere Poppenorchissen voor, individuen in blauw zijn zuivere Soldaatjes en individuen in groen zijn zuivere Paarse orchissen. Individuen met meerdere kleuren zijn hybriden. De grootte van de balk geeft de invloed van de verschillende soorten weer.

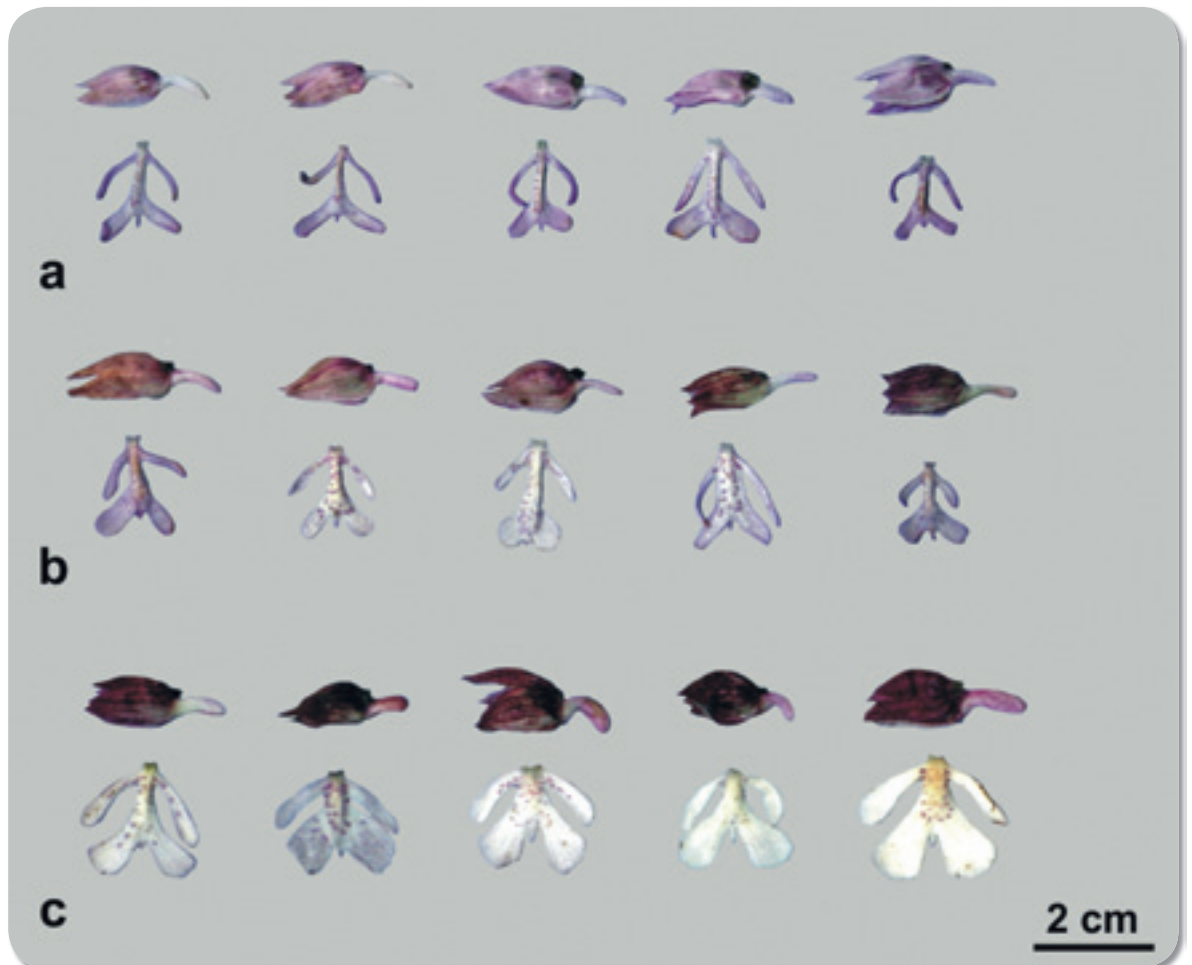




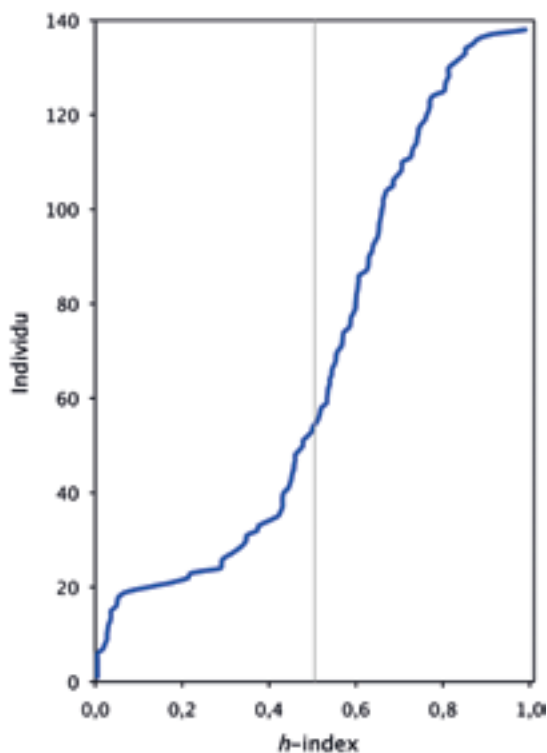
Figuur 9. Hybriden tussen Soldaatje en Purperorchis (voorground) en een zuiver individu van Purperorchis (achtergrond) in een natuurlijke groeiplaats in Eben-Emael.

Opvallend is wel dat tussen soorten van het ondergeslacht *Orchis* en het ondergeslacht *Masculae* tot op heden geen hybriden zijn waargenomen. Uit recent onderzoek waarin de gemiddelde reproductieve isolatie vergeleken werd tussen de twee soortengroepen (Scopece et al. 2010) blijkt dat soorten binnen elk ondergeslacht minder reproductief geïsoleerd zijn van elkaar dan tussen de soortengroepen (gemiddelde isolatie 0,18 en 0,22 voor soorten binnen *Orchis* en *Masculae* respectievelijk, en 0,54 voor soorten tussen *Orchis* en *Masculae*). Hierbij moet vermeld worden dat maar één maat voor reproductieve isolatie werd gebruikt (nl. embryo mortaliteit). Het is duidelijk dat idealiter meerdere reproductieve barrières beschouwd moeten worden.

Mogelijk houdt het feit dat hybridisatie wel frequent voorkomt tussen soorten binnen een ondergeslacht, maar niet tussen soorten van verschillende ondergeslachten ook verband met verschillen in bloemorfologie. Recent onderzoek naar de morfologische variatie tussen deze soorten lijkt dit te ondersteunen. Op basis van 22 verschillende vegetatieve en bloemkenmerken toonden Tyteca et al. (2012) aan dat de soorten van de twee ondergeslachten morfologisch zeer sterk van elkaar verschillen, wat de uitwisseling van pollen kan tegenwerken. Deze auteurs toonden verder aan dat soorten van het ondergeslacht *Masculae* voornamelijk door bijen en hommels bestoven werden, terwijl soorten van het ondergeslacht *Orchis* relatief meer door kevers bestoven werden.



Figuur 10. Overgang in bloemkenmerken van zuivere Soldaatjes (bovenste rij), hybriden (middelste rij) en zuivere Purperorchis individuen (onderste rij). Merk de geleidelijke overgang in kleur van de bovenste sepalen op, gaande van zilverachtig-paars in zuivere Soldaatjes naar bruin in zuivere Purperorchissen. Hybriden zitten hier ergens tussenin.



*Figuur 11. Hybride-indices uitgerekend voor 140 individuen die bemonsterd werden in de hybride populatie bestaande uit Soldaatjes en Purperorchissen. Deze figuur geeft fractie van het genoom weer dat overgeërfd werd van Purperorchis. Een waarde 0 duidt op een zuiver Soldaatje en een waarde 1 duidt op een zuivere Purperorchis. De individuen werden geordend volgens toenemende hybride indices.*

### Hybridisatie tussen Poppenorchis, Soldaatje en Purperorchis

De resultaten van de experimentele bestuivingen en het kiemingsexperiment suggereren dat hybridisatie tussen Soldaatje en Purperorchis gemakkelijker zou moeten verlopen dan tussen beide soorten en Poppenorchis. De soorten vertonen ook een uitgesproken verschil in bloemorfologie en bestuiversgemeenschap. Daar waar Poppenorchis in hoofdzaak wordt bestoven door kleine kevers, worden Purperorchis en Soldaatje voornamelijk bestoven door bijen en hommels (van der Cingel 1995, Claessens & Kleynen 2011). Als gevolg was de gemiddelde reproductieve isolatie tussen Soldaatje en Purperorchis laag. Verder bleken de hybriden ook niet steriel te zijn, waardoor gemakkelijk terugkruisingen tussen hybriden en zuivere individuen kunnen plaatsgrijpen en er dus introgressie en vorming van hybridenzwermen kan optreden.

Deze verwachtingen worden duidelijk bevestigd wanneer we de patronen van hybridisatie in veldomstandigheden bekijken. Er werden zeer weinig aanwijzingen gevonden die duiden op substantiële hybridisatie tussen Poppenorchis en de twee andere soorten. Langs de andere kant geven de morfologische en genetische data duidelijk aan dat morfologische en genetische homogenisatie heeft plaatsgevonden tussen Purperorchis en Soldaatje, waarbij evenwel meer individuen voorkomen die gelijken op Purperorchis dan op Soldaatje. Zonder te veel op de details in te gaan, toonden Jacquemyn et al. (2012a) aan dat dit voornamelijk te wijten was aan het feit dat planten met bloemen die morfologisch meer op Purperorchis geleken een reproductief voordeel

hadden ten opzichte van planten die meer op Soldaatje leken. Bovendien bleek de kieming van zaden van Purperorchis en van eerste orde hybriden minder gebonden aan lokale kiemingscondities dan zaden van Soldaatje of hybride zaden waarin Soldaatje de moederplant was (Jacquemyn et al. 2012b). Toch werden nog enkele zuivere Soldaatjes in de studiepopulatie waargenomen.

### Implicaties voor natuurbehoud

Onze gegevens geven aan de hybridisatie in de onderzochte soorten het voortbestaan van de populaties in het gedrang kan brengen. Dit geldt in het bijzonder voor de Purperorchis, waarvan haast geen zuivere individuen meer werden teruggevonden in de populatie. Purperorchis bereikt in onze streken de noordgrens van haar areaal en is zeer zeldzaam. In de Voerstreek zijn er een tiental populaties en aan de overkant van de Maas komen ook nog een paar populaties voor. Voor de rest is de soort afwezig in Vlaanderen. Het is duidelijk dat de hier beschreven hybridisatiepatronen een nefaste invloed hebben op de overleving van de soort op lange termijn. Het is dus wenselijk om in de toekomst hybridisatie tussen de soorten zoveel mogelijk te vermijden. Dit kan gebeuren door een van de soorten te verplaatsen. Aangezien orchideeën voor hun overleving grotendeels afhankelijk zijn van schimmels, is dit niet aangewezen. Een andere, meer duurzame oplossing bestaat erin de habitatomstandigheden zo te laten ontwikkelen dat ze niet langer geschikt zijn voor een van de twee soorten. Waarschijnlijk is de zeer snelle hybridisatie in het bestudeerde grasland het gevolg van het feit dat het om een opengemaakt bosperceel gaat, waardoor Soldaatje en Purperorchis plots in de mogelijkheid verkeerden om samen



*Figuur 12. Kruising tussen Soldaatje en Poppenorchis (foto: Vilda/Rollin Verlinde)*

voor te komen. Gelukkig is het aantal standplaatsen waar beide soorten voorkomen beperkt en is de kans tot verder introgressie eerder klein.

De hier geschetste problematiek beperkt zich niet tot soorten van het geslacht *Orchis*. In het geslacht Handekenskruid *Dactylorhiza* bijvoorbeeld doen zich gelijkaardige processen voor. Onderzoek naar hybridisatie tussen Vleeskleurige orchis *D. incarnata*, Bosorchis *D. fuchsii* en Rietorchis

*D. praetermissa* in soortenrijke duinpannen aan onze kust toonde aan dat ook deze soorten gemakkelijk hybridiseren, zelfs al verschilden ze in ploïdieniveau (De hert et al. 2012). In tegenstelling tot de situatie in *Orchis* werden hier wel aanwijzingen gevonden dat de soorten onderling kruisen en er werden zelfs triple hybriden gevonden. Dit zijn hybriden die DNA van de drie soorten in hun genoom bevatten.

## Summary:

JACQUEMYN H., BRYN R., ROLDÁN-RUIZ I. & HONNAY O. 2012. HYBRIDIZATION IN ORCHIDS AND IMPLICATIONS FOR NATURE CONSERVATION. *NATUUR.FOCUS* 11(4): 150-159 [IN DUTCH].

Hybridization is a fundamental biological process that may threaten the long-term survival of many plant and animal species. Hybridization can be especially problematic for rare species that come into contact with other species that are more abundant. In this article we investigated whether hybridization may threaten the survival of rare orchids in Flanders. We experimentally investigated the strength of post-mating barriers up to the seed germination stage acting between

three species of the genus *Orchis* (*O. anthropophora*, *O. militaris* and *O. purpurea*). We also assessed the extent of hybridization in a natural hybrid zone. Total post-mating reproductive isolation varied between 0.18 and 0.90, indicating that in none of the species crosses the investigated species were completely reproductively isolated from each other. Using both molecular and morphological analyses we also show that extensive genetic and morphological homogenization and asymmetric introgression occurred between *O. militaris* and *O. purpurea*, but not between *O. anthropophora* and the other two species. Overall, these results indicate that natural hybridization may be an important threat to the long-term survival of rare orchid species.

## DANK

Dit onderzoek werd mogelijk gemaakt door financiële steun van het Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek – Vlaanderen (project G.0592.08) en de Europese Onderzoeksraad (ERC starting grant 260601 – MYCASOR). Wij danken Sabine van Glabeke en Nancy Mergan voor het uitvoeren van de genetische analyses.

## AUTEURS:

Hans Jacquemyn en Olivier Honnay zijn professor aan het Laboratorium van Plantendiversiteit en –populatiebiologie van de KU Leuven. Rein Bryn is post-doctoraal onderzoeker aan het hetzelfde labo. Isabel Roldán-Ruiz is hoofd van de eenheid Groei en Ontwikkeling van het Instituut voor Landbouw en Visserijonderzoek (ILVO).

## CONTACT:

Hans Jacquemyn, KU Leuven, Departement Biologie, Afdeling Ecologie, Evolutie en Biodiversiteit, Kasteelpark Arenberg 31, 3001 Heverlee.

E-mail: hans.jacquemyn@bio.kuleuven.be

## Referenties

Allendorf F.W., Leary R.F., Spruell P. & Wenburg J.K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 613-622.

Bateman R.M., Hollingsworth P.M., Preston J., Yi-Bo L., Pridgeon A.M. & Chase M.W. 2003. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidaceae and selected Habenariaceae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 1-40.

Claessens J. & Kleynen J. 2011. The Flower of the European Orchid. Form and Function. Schrijven-Lippertz, Voerendaal/Stein, Nederland.

Coyne J.A. & Orr H.A. 2004. Speciation. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.

De hert K., Jacquemyn H., Van Glabeke S., Roldán-Ruiz I., Vandepitte K., Leus L. & Honnay O. 2012. Reproductive isolation and hybridization in sympatric populations of three *Dactylorhiza* species (Orchidaceae) with different ploidy levels. *Annals of Botany* 109: 709-720.

Fay M.F., Smith R.J., Zuiderduin K., Hooper E., Samuel R., Bateman R.M. & Chase M.W. 2007. How does hybridization influence the decision making process in conservation? The genus *Orchis* (Orchidaceae) as a case history. *Lankesteriana* 7: 135-137.

Haggar, J. & Malmgren, S. 2012. Much ado about almost nothing? Part One. *Journal of the Hardy Orchid Society* 9: 85-90.

Jacquemyn H., Bryn R., Hermy M. & Willems J. H. 2005. Does nectar reward affect rarity and extinction probabilities of orchid species? An assessment using historical records from Belgium and the Netherlands. *Biological Conservation* 121: 257-263.

Jacquemyn H. & Bryn R. 2010. Temporal and spatial variation in flower and fruit production in a food-deceptive orchid: A five-year study. *Plant Biology* 12: 145-153.

Jacquemyn H., Bryn R. & Hutchings M.J. 2011. Biological Flora of the British Isles: *Orchis anthropophora*. *Journal of Ecology* 99: 1551-1556.

Jacquemyn H., Bryn R., Honnay O. & Roldán-Ruiz I. 2012a. Asymmetric gene introgression in two closely related *Orchis* species: evidence from morphometric and genetic analyses. *BMC Evolutionary Biology* 12: 178.

Jacquemyn H., Bryn R., Honnay O., Roldán-Ruiz I., Lievens B. & Wiegand T. 2012. Non-random spatial structuring of orchids in a hybrid zone of three *Orchis* species. *New Phytologist* 193: 454-464.

Kretzschmar H., Eccarius W. & Dietrich H. 2007. The orchid genera *Anacamptis*, *Orchis*, *Neotinea*. EchinoMedia Verlag, Bürgel, Duitsland.

Kreutz C.A.J. & Dekker H. 2000. De Orchideeën van Nederland – Ecologie, Verspreiding, Bedreiging, Beheer. Kreutz and Seckel, Landgraaf & Raalte, Nederland.

Levin D.A., Fransico-Ortega J.K. & Jansen R.K. 1996. Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology* 10: 10-16.

Paun O., Forest F., Fay M.F. & Chase M.W. 2009. Hybrid speciation in angiosperms: parental divergence drives ploidy. *New Phytologist* 182: 507-518.

Ramsey J., Bradshaw H. D. & Schemske D. W. 2003. Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution* 57: 1520-1534.

Rasmussen H. N. & Whigham D. F. 1993. Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial ecology. *American Journal of Botany* 80: 1374-1378.

Rhymer J.M. & Simberloff D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 83-109.

Scopece G., Cozzolino S. & Bateman R.M. 2010. Just what is a genus? Comparing levels of postzygotic isolation to test alternative taxonomic hypotheses in Orchidaceae subtribe Orchidinae. *Taxon* 59: 1754-1764.

Stebbins G.L. 1950. Variation and Evolution in Plants. Columbia University Press, New York.

Swarts N.D. & Dixon K.W. 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany* 104: 543-556.

Tyteca D., Ceinos M., Gathoye J.L., Bryn R. & Jacquemyn H. 2012. On the morphological, biological and genetic heterogeneity of the genus *Orchis* (Orchidaceae, Orchidinae). *Phytotaxa*: in druk.

Van der Cingel N.A. 1995. An Atlas of Orchid Pollination. European Orchids. Balkema, Rotterdam.

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

Willing B. & Willing E. 1985. Bibliographie über die Orchideen Europas und der Mittelmeerländer. *Englera* 5: 1-280.

Wolf D.E., Takebayashi N. & Rieseberg L.H. 2001. Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology* 15: 1039-1053.