

Natuur.focus

Afgiftekantoor
9099 Gent X
P209602

Toelating – gesloten verpakking

Retouradres: Natuurpunt,
Coxiestraat 11,
2800 Mechelen

VLAAMS DRIEMAANDELIJKS TIJDSCHRIFT OVER NATUURSTUDIE & -BEHEER – DECEMBER 2014 – JAARGANG 13 – NUMMER 4
VERSCHIJNT IN MAART, JUNI, SEPTEMBER EN DECEMBER



**Zaadverbreiding bij
de Groenknolorchis**



**Geelgerande waterroofkevers
in Vlaanderen**



**De Kempense heidelibel
in Midden-Limburg**



Weg met de wind

Zaadverbreiding over lange afstanden bij de Groenknolorchis

An Vanden Broeck, Wouter Van Landuyt & Karen Cox

Terwijl inspanningen worden geleverd om via natuurbeheer potentieel geschikte groeiplaatsen te herstellen, is het onzeker of specifieke doelsoorten deze herstelde gebieden spontaan kunnen bereiken. De manier waarop plantensoorten hun zaden verbreiden, is dan ook cruciaal voor hun voortbestaan. Dit is zeker zo voor pionierssoorten zoals orchideeën, waarvan lokale populaties doorgaans een kort leven zijn beschoren. Dat orchideeën hun zaden over lange afstanden kunnen verbreiden staat vast, maar hoe groot zijn die afstanden juist? Komen die zaden ook terecht op de weinige geschikte groeiplaatsen? En zo ja, zullen de zaden ook effectief kiemen?

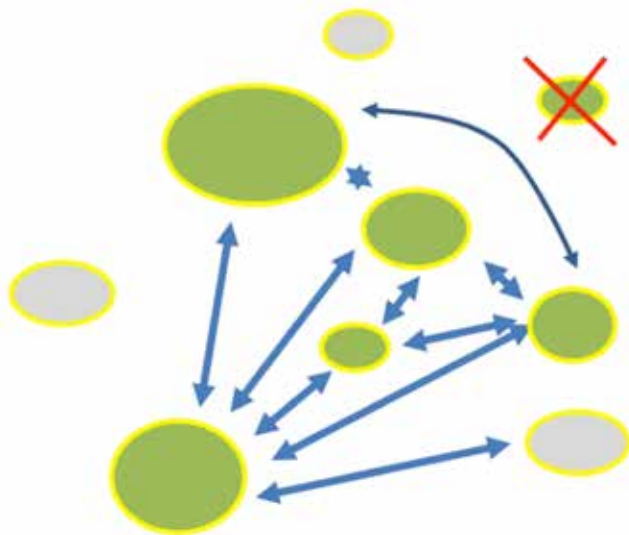


Groenknolorchis in de haven van Antwerpen. (foto: Vilda/Jeroen Mentens)

Genetische uitwisseling en metapopulaties

Via verbreiding over lange afstanden kan een soort nieuwe gebieden koloniseren en kunnen bestaande, ver uit elkaar gelegen populaties genetisch materiaal uitwisselen waardoor de totale genetische variatie wordt behouden. Lokale populaties die met elkaar in contact staan via genetische uitwisseling vormen samen een metapopulatie (Figuur 1). Kleine populaties die deel uitmaken van een metapopulatie zijn minder gevoelig voor inteelt en genetische drift (zie Box 1 voor een verklarende woordenlijst) dan kleine populaties waartussen geen uitwisseling van genetisch materiaal mogelijk is. Inzicht in de mate van genetische uitwisseling is dus nodig om te bepalen of er sprake is van een metapopulatie-structuur en om de leefbaarheid van populaties in te schatten.

Bij planten gebeurt de uitwisseling van genetisch materiaal voornamelijk via pollen en zaden. In tegenstelling tot zaadverbreiding over korte afstand, bijvoorbeeld binnen een populatie, is zaadverbreiding over lange afstanden moeilijk te onderzoeken. Zeker voor stoffijne zaden die met de wind worden meegedragen, zoals die van orchideeën, is het niet mogelijk om op het moment van verbreiding achter de zaden aan te hollen om te kijken waar ze terechtkomen (zie Soons et al. 2004). DNA-merkers kunnen helpen bij het in kaart brengen van de zaadverbreiding. Via DNA-merkers kunnen verwantschappen binnen en tussen populaties zichtbaar worden gemaakt. Ondanks de snelle opmars van het gebruik van DNA-merkers in ecologisch onderzoek, zijn empirische studies die zaadverbreiding over lange afstanden kwantificeren toch nog zeldzaam. Dit komt omdat men daarvoor alle populaties in een groot gebied moet identificeren en bemonsteren, wat in veel gevallen om praktische en financiële redenen niet haalbaar is. Voor zeldzame soorten waarvan de groeiplaatsen goed gekend zijn, wordt dit wel haalbaar. De Groenknolorchis *Liparis loeselii* is zo een soort. De groeilocaties van de Groenknolorchis zijn goed gekend onder meer omdat de toestand van deze beschermde soort zesjaarlijks moet gerapporteerd worden in het kader van de implementatie van de Habitatrichtlijn 92/43/EEG (soort van Bijlage II).



Figuur 1. Metapopulatie met lokale extinctions en kolonisations van leefgebieden waarbij de leefgebieden in een overbrugbare afstand van elkaar gelegen zijn. Groene ovaal: bezet leefgebied, grijze ovaal: geschikt maar actueel niet bezet leefgebied, pijl: uitwisseling tussen leefgebieden via pollen of zaden, X: lokale extinctie. Lokale extinctie kan tijdelijk zijn, omdat individuen zich terug kunnen vestigen na kolonisatie vanuit bezette leefgebieden.

In deze studie maken we op basis van DNA-merkers een inschatting van de afstanden die zaden van de Groenknolorchis kunnen afleggen in een sterk versnipperd leefgebied. We onderzoeken of lokale groeiplaatsen met elkaar in verbinding staan via het uitwisselen van genetisch materiaal en of ze dus een metapopulatie vormen. We gaan na in welke mate de versnippering van het leefgebied problematisch is voor het voortbestaan van de Groenknolorchis. Naast onderzoek naar de verbreiding van de soort zoeken we in deze studie ook naar genetische eigenschappen die verbonden zijn met specifieke aanpassingen aan een van de twee habitats waar de Groenknolorchis voorkomt: veenbodems en minerale bodems. Op die manier kunnen we inschatten of we al dan niet te maken hebben met twee ecotypen bij de Groenknolorchis.

Onopvallend en zeldzaam

De Groenknolorchis is een onopvallende, overblijvende plant met twee vetglanzende bladeren die in juni uit de bovengrondse stengelknol tevoorschijn komen (Figuur 2). De plant vormt einde juni – begin juli één tot twee bloemstengels met meestal vier tot acht tweeslachtige, kleine, groengele bloemen. In de zaaddozen die tot in de winter gesloten blijven, rijpen duizenden minuscule zaden. De zaden van de Groenknolorchis komen hoofdzakelijk tot stand door zelfbestuiving. De soort produceert geen nectar en bestuiving door insecten is zelden waargenomen (Catling 1980). Vegetatieve voortplanting door de vorming van nieuwe wortelknollen is ook mogelijk. Dormantie van de wortelknollen treedt waarschijnlijk niet op. Of de soort een zaadbank vormt is niet geweten, maar over het algemeen vormen orchideeën geen of een kortlevende zaadbank (maximum enkele jaren) (Whigham et al. 2006). Een bloeiende Groenknolorchis kan gemakkelijk vele duizenden uiterst lichte zaden produceren. Deze ballonachtige zaden kunnen via de wind lange afstanden afleggen (Arditti 1980) (Figuur 3).

In Vlaanderen is de Groenknolorchis een uiterst zeldzame soort. Zowel het aantal populaties als het aantal individuen per populatie is erg klein in vergelijking met de ons omringende landen (Odé & Bolier 2003, Valentin et al. 2010, Van Landuyt 2009). Momenteel zijn er slechts twee locaties in België bekend waar de Groenknolorchis voorkomt: het Meergoor nabij Mol en de Waaslandhaven in Beveren (locatie 'Haasop'). De populatie in het Meergoor bevindt zich op alkalisch laagveen en is zeer klein. De aantallen variëren er van drie tot tien individuen (zes exemplaren in 2007, drie exemplaren in 2012). In Beveren bevindt zich een grote populatie op een in 1980 met kalkrijk zand opgespoten terrein. Bij de vondst in 2007 telde deze populatie enkele honderden individuen, in 2013 werden 3.000 individuen geteld. Hoewel de soort altijd zeldzaam is geweest in Vlaanderen, kwam ze vóór 1958 op verschillende plaatsen langs de Belgische kust voor met vondsten in De Panne, Oostduinkerke, Nieuwpoort en

Box 1: Verklarende woordenlijst

AFLP: Amplified fragment length polymorphism. Een techniek om tot een genetische vingerafdruk of DNA-profiel te komen.

Ecotype: een ondersoort of variëteit aangepast aan specifieke milieucondities en waarvan die aanpassingen vastliggen in het genetisch materiaal.

DNA: desoxyribonucleïnezuur, belangrijkste drager van erfelijke informatie.

DNA-merker: een stukje DNA.

Gen: eenheid van erfelijke informatie.

Genoom: het geheel van erfelijke informatie in een cel.

Genetische drift: verlies aan genetische diversiteit door toevalsprocessen. Genetische drift leidt altijd tot verhoging van genetische differentiatie tussen populaties

Neutrale merkers: DNA-fragmenten die niet onder selectie staan. Ze hebben geen invloed op de overlevingskansen of op het voortplantingssucces van een organisme.

Niet-neutrale merkers: DNA-fragmenten die (nabij genen gelegen zijn die) onder selectie staan. Selectie zorgt ervoor dat individuen die beter aangepast zijn aan hun omgeving hogere overlevingskansen hebben of succesvoller zijn in hun voortplanting dan individuen die minder goed aangepast zijn aan hun omgeving.

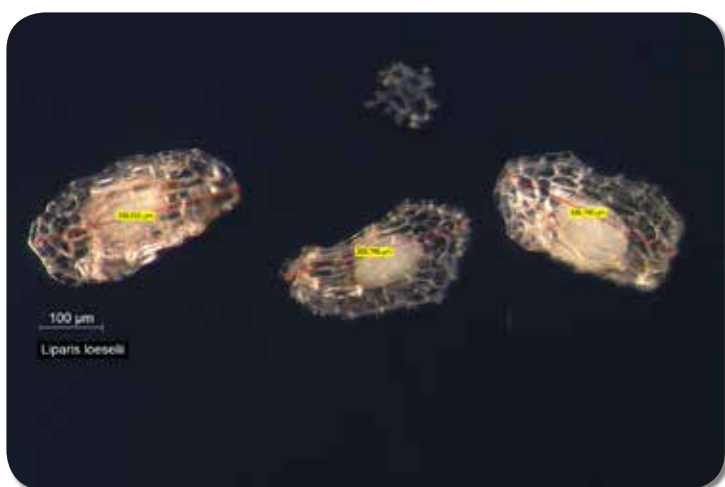
Inteelt: het kruisen van nauw verwante individuen binnen een populatie. Inteelt kan leiden tot inteeltdepressie en een afname van vruchtbaarheid of vitaliteit van nakomelingen.

Zelfbestuiving: het terecht komen van eigen stuifmeel op de stempel van dezelfde bloem of op de stempel van een bloem op dezelfde plant. Indien zelfbestuiving succesvol is, leidt het tot zelfbevruchting.

Zelfbestuivingslijn: nakomelingen die gevormd worden na zelfbevruchting van een plant. Deze nakomelingen zijn sterk genetisch verwant.



Figuur 2. Groenknolorchis, bloeiende en vegetatieve scheut van eenzelfde individu (Beveren, Haasop 2013). (foto: Wouter Van Landuyt).



Figuur 3. Stoffijne zaden van Groenknolorchis. (foto: Wouter Van Landuyt).

Blankenberge-Zeebrugge (Robyns 1958). In de Polders kwam de soort ook voor in Hoboken en op Antwerpen-Linkeroever. In de Kempen werd Groenknolorchis gevonden in Oelegem, Neerpelt en Zutendaal. Verder zijn er nog voormalige locaties gerapporteerd in het Brabants district in Berg, Pécrot (Waals-Brabant), Hollain (Henegouwen) en Péruwelz (Marais de la Roë) (Henegouwen) (Figuren 4 en 5).

De achteruitgang van de Groenknolorchis in België is al enkele decennia aan de gang. De voornaamste reden is het verdwijnen van geschikte groeiplaatsen. Langs de Belgische kust was dit onder meer te wijten aan een sterke verdroging van de duingebieden, o. a. door drinkwaterwinning (wegvallen van kalkrijk grondwater) en door bemalingen ten behoeve van bouwactiviteiten (Leten et al. 2012). In Wallonië zijn geen groeiplaatsen meer gekend. In Belgisch Lotharingen werd eenmalig één exemplaar gevonden in 1987 (Van Landuyt et al. 2014).

Bij onze noorder- en zuiderburen is de toestand voor de Groenknolorchis veel gunstiger en komt de soort nog op enkele tientallen locaties voor. In Nederland zijn er nog groeiplaatsen te vinden in Zeeuws-Vlaanderen (Grevelingen), in de duinen van Zuid-Holland (Voorne) en langs de kust op de Waddeneilanden. Verder komen nog populaties voor in Noordwest-Overijssel (De Wieden), Zuid-Friesland en het veengebied tussen Utrecht en Noord- en Zuid-Holland (Odé & Bolier 2003). In Frankrijk komt de Groenknolorchis voor in 13

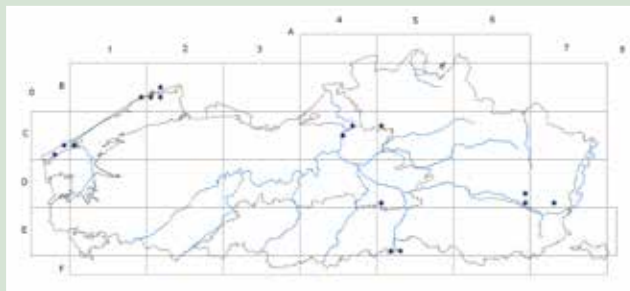
regio's (Nord-Pas-de-Calais, Picardië, Haute-Ardenne, Lorraine, Franche-Comté, Rhône-Alpes, Aquitaine, Poitou-Charentes, Bretagne en Corsica) (Valentin et al. 2010).

Eén soort, twee habitats

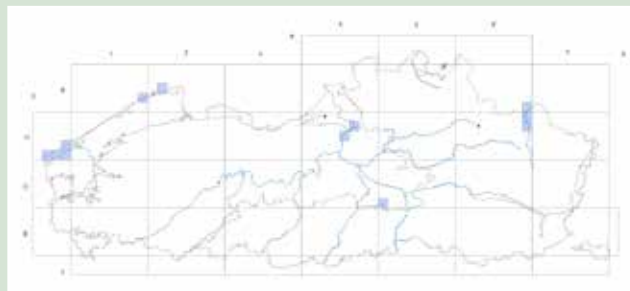
De Groenknolorchis is een pionier die zich ontwikkelt in een vroeg successiestadium in vrij open kruidenvegetaties. De soort kan evenwel ook nog korte tijd standhouden in open struweel. Lokale populaties overleven doorgaans slechts enkele tientallen jaren (Wheeler et al. 1998). Voor overleving op lange termijn is de soort dus afhankelijk van verbreiding naar nieuwe groeiplaatsen. De Groenknolorchis is hoofdzakelijk een zelfbestuiver. Bij zelfbestuiving wordt stuifmeel overgebracht naar de stempel van dezelfde bloem. Indien deze bevruchting succesvol is, kunnen duizenden zaden ontstaan uit een enkele plant. Een zelfbestuivende plant kan dus zelf en onafhankelijk van soortgenoten zaden produceren. Bijgevolg kan uit één zaadje van de Groenknolorchis dat uitgroeit toe een bloeiende plant een volledig nieuwe lokale populatie ontstaan.

Er zijn twee verschillende habitats waar de Groenknolorchis wordt aangetroffen: organische, alkalische laagveenmoerassen (Figuur 6) en minerale bodems (vochtige duinpannen, strandvlakten en opgespoten terreinen) (Figuur 7). De vegetaties op organisch laagveen worden gekenmerkt door de aanwezigheid van Wateraardbei *Comarum palustre*, Draadzegge *Carex lasiocarpa*, Waterdriehblad *Menyanthes trifoliata* en Slang wollegras *Eriophorum gracile*. In dit vegetatietype komt Groenknolorchis vaak voor op de rand van zeggebulten of in kussens (veen)mos. Op minerale bodems zijn Fioringras *Agrostis stolonifera*, Moeraswespenorchis *Epipactis palustris*, Kruiwilg *Salix repens* en Parnassia *Parnassia palustris* frequente begeleiders (Van Landuyt et al. 2014). De standplaatsen worden gevoed door baserijk, eventueel zwak brak, grond- of oppervlaktewater en zijn een groot deel van het jaar erg nat. Nutriënten kunnen wel aanwezig zijn maar zijn over het algemeen weinig beschikbaar doordat ze aan calcium of ijzer gebonden zijn.

In de literatuur worden soms twee ondersoorten of ecotypen onderscheiden voor de Groenknolorchis naargelang de standplaats: de breedbladige variëteit uit de duingebieden (var. ovata Ridd. Ex Godfery) en de smalbladige variëteit uit de veen- en berggebieden (Wheeler et al. 1998). Ecotypen komen tot stand als gevolg van een interactie tussen genetische variatie en milieu. Sterk verschillende milieuomstandigheden, bijvoorbeeld sterke verschillen in standplaats, kunnen leiden tot een sterke selectiedruk. Indien natuurlijke selectie gedurende een lange tijd inwerkt op een populatie, evolueert die populatie in een bepaalde richting. Zo kan een populatie na een zekere tijd beter aangepast zijn aan bijvoorbeeld specifieke standplaatscondities. Bijgevolg kunnen populaties zo sterk genetisch gaan verschillen dat er sprake is van ecotypen. Genenuitwisseling kan dit proces van lokale aanpassing vertragen of zelfs tenietdoen. Bij frequente genenuitwisseling gaan lokale genetische eigenschappen over het algemeen verloren. Ook de tijd waarbinnen natuurlijke selectie kan inspelen op de genetische diversiteit is bepalend voor het aanpassingsvermogen van een lokale populatie. Populaties die gekenmerkt worden door een relatief korte levensduur bouwen minder snel genetische eigenschappen op verbonden met aanpassingen aan lokale omstandigheden.



Figuur 4. Verspreiding van de Groenknolorchis in Vlaanderen in de periode 1850-1938. (bron: Van Landuyt et al. 2006)



Figuur 5. Verspreiding van de Groenknolorchis in Vlaanderen in de periode 1939-1971 (blauwe kilometerhokken) en de periode 1972-2014 (stip). (bron: Van Landuyt et al. 2006)

Als men de genetische variatie van een soort wil behouden, is het van belang die specifieke genetische aanpassingen of ecotypen te kennen. Verschillende ecotypen vereisen soms een verschillend beheer. Inzicht in het genetische aanpassingsvermogen is eveneens van belang bij het bepalen van de veerkracht van soorten na milieudrukken zoals drainage, overmatig oppompen van grondwater en eutrofiëring. Voor de Groenknolorchis is het onduidelijk of de planten op veenbodems genetisch verschillen van deze op minerale bodems en of we dus kunnen spreken van twee ecotypen. Uiterlijke morfologische verschillen hoeven immers niet steeds een gevolg te zijn van genetische verschillen. Een screening van het genetisch materiaal kan inzicht verschaffen in de genetische eigenschappen die specifiek zijn voor een bepaald milieu.

Een populatie-genetisch onderzoek Staalnamen

Voor deze studie hebben we alle groeiplaatsen van de Groenknolorchis in Noordwest-Frankrijk, België en Nederland in kaart gebracht. Locaties met Groenknolorchis werden bemonsterd over een afstand van ongeveer 600 km van Normandië in Noordwest-Frankrijk tot de Waddeneilanden in Noord-Nederland. Naast de twee gekende locaties in Vlaanderen werden nog 18 locaties in Nederland en 10 locaties in Noordwest-Frankrijk geanalyseerd. Twee locaties in Nederland werden niet bemonsterd omdat hier respectievelijk slechts één en drie planten van de Groenknolorchis werden gerapporteerd (Odé & Bolier 2003). Van een derde Nederlandse locatie (Texel, Waddeneilanden) die een grote populatie bevat, werden wel stalen verzameld maar hiervan werden geen goede

genetische profielen bekomen. In Noordwest-Frankrijk werden stalen verzameld van 12 van de 14 gekende locaties. Voor het focusgebied van deze studie (Noordwest-Frankrijk, België en Nederland), werden dus 30 van de 35 huidige groeiplaatsen van Groenknolorchis genetisch onderzocht. Deze omvatten 8 locaties gelegen in veengebieden en 22 locaties gelegen op minerale bodems (voornamelijk duinpannen) (Figuur 7). Voor de uitbreiding van het referentiekader voor de studie van mogelijke genetische aanpassingen aan het habitatype werden verder ook nog bemonsterd: een populatie in de Franse Alpen, vijf populaties in de Sloveense Alpen en twee populaties in Hongarije (Tabel 1). In totaal werden 422 volwassen individuen geanalyseerd, afkomstig van 38 locaties, waarvan 16 in veengebieden en 22 in duinpannen. Het aantal aanwezige Groenknolorchissen per locatie varieerde van enkele tot duizenden individuen en daarom fluctueerde ook het aantal bemonsterde planten per locatie sterk: van drie tot 72. In grote populaties werden de individuen willekeurig bemonsterd met minstens één meter tussen de bemonsterde planten. Alle individuen die in deze studie werden geanalyseerd zijn dus heel waarschijnlijk afkomstig van seksuele voortplanting en niet van vegetatieve voortplanting. Per bemonsterd individu werd, na het bekomen van de nodige vergunningen, een stuk bladmateriaal genomen ongeveer ter grootte van een tweeuromuntstuk. Deze stalen hadden geen noemenswaardige schadelijke gevolgen voor de planten.

Genetische analyse

DNA-merkers werden bekomen via de AFLP-techniek. Hierdoor werden DNA-merkers bekomen die verspreid voorkomen



Figuur 6. Groeiplaats van Groenknolorchis in een laagveenmoeras (Frankrijk, departement Nord-Pas-de-Calais, Villiers, Marais de Villiers). (foto: Wouter Van Landuyt).



Figuur 7. Groeiplaats van Groenknolorchis in een duinpanne (Frankrijk, departement Nord-Pas-de-Calais, Merlimont). (foto: Wouter Van Landuyt).

Tabel 1. Staalnamelocaties van *Groenknolorchis*. Nc: geschatte census populatiegrootte met tussen haakjes het jaar van observatie, N: aantal bemonsterde individuen.

Land	Lokatie	Code	Habitat	Nc	N
Nederland	Schiermonnikoog, Waddeneilanden	Schie	duin	108 (2003)	6
	Ameland, Waddeneilanden	Amela	duin	329 (2009)	9
	Terschelling, Waddeneilanden	Tersc	duin	1.071 (2003)	19
	Vlieland, Waddeneilanden	Vliel	duin	300 (2011)	9
	De Weerribben	Dewee	veen	1.208 (2003)	37
	De Wieden	Dewie	veen	282 (2003)	8
	Ankeveense plassen, Ankeveen	Ankev	veen	116 (2003)	5
	Het Hol, Loosdrecht	HetHo	veen	855 (2003)	9
	Nieuwkoopse plassen, Nieuwkoop	Nieuw	veen	318 (2003)	4
	Beerweg - Europort, Hoek van Holland	Beerw	duin	160 (2009)	10
	Oostvoornse meer, Voorne	Oostv	duin	101 (2003)	10
	Voorne Duin, Voorne	Voorn	duin	100 (2003)	6
	Hompelvoet, Grevelingenmeer	Hompe	duin	70 (2009)	17
	Veermansplaat, Grevelingenmeer	Veerm	duin	20.000 (2009)	21
	Stampersplaat, Grevelingenmeer	Stamp	duin	1.600 (2009)	14
	Dwars-in-de-weg, Grevelingenmeer	Dwars	duin	31 (2009)	12
	Verklikkerduinen, Schouwen-Duiveland	Verkl	duin	328 (2003)	23
Inlaag Hoofdplaat, Hoofdplaat	Inlaa	duin	557 (2003)	13	
België	Haasop -Waastrandhaven, Beveren	Haasop	duin	481 (2009)	30
	Meergoor, Mol	Meerg	veen	5 (2009)	5
Frankrijk	Dune Dewulf	DeWulf	duin	3 (2009)	3
	Dune du Slack, Ambleteuse	Slack	duin	650 (2009)	16
	Panne 11, Baie de la Canche, Camiers	Canch11	duin	800 (2009)	5
	Panne 21-22, Baie de la Canche, Camiers	Canch21	duin	805 (2009)	14
	Marais de Villiers, Villiers	Villi	veen	42 (2009)	18
	Camping des Dunes, Stella plage	Stell	duin	3 (2009)	3
	Panne 16, Merlimont	Merli16	duin	489 (2009)	10
	Panne 18, Merlimont	Merli18	duin	4 (2009)	3
	Blangy-Tronville	Blang	veen	458 (2009)	15
	Le Havre	LeHav	duin	400 (2009)	20
Marais des Etelles, La Tables des Etelles	Etell	veen	65 (2009)	15	
Hongarije	Lake Velencei	Velen	veen	3.000 (2009)	14
	Szigetcsép-up	Sziget	veen	500 (2009)	5
Slovenië	Breg	Breg	veen	20 (2009)	3
	Crni potok	Crni	veen	43 (2009)	2
	Drenik	Dreni	veen	42 (2009)	3
	Sajevac	Sajev	veen	35 (2009)	2
	Trzin	Trzin	veen	37 (2009)	4

over het totale genoom en die toelaten genetische verschillen tussen individuen te kwantificeren. Er werden 451 polymorfe merkers gescoord; dit zijn DNA-fragmenten waarvan meer dan één vorm bestaat en die dus tussen individuen kunnen verschillen. Elke plant had een uniek genetisch profiel.

Toewijzingstesten

Zaadverbreiding over lange afstanden werd onderzocht via toewijzingstesten op basis van de genetische profielen.

Hierbij werd, voor elk individu en voor alle bemonsterde locaties, de kans berekend dat het individu behoort tot een specifieke populatie. Toewijzingstesten werden uitgevoerd met AFLPOP v.1.1. (Duchesne & Bernatchez 2002). Wanneer de kans dat een individu tot een bepaalde populatie behoort tienmaal hoger is dan de kans dat het behoort tot een andere populatie, werd het individu toegewezen aan die ene populatie. We gaan ervan uit dat de toewijzing aan een andere locatie dan deze waar de bemonstering plaatsvond een gevolg is

van zaadverbreiding omdat uitwisseling van genetisch materiaal door pollen bij de Groenknolorchis wellicht heel beperkt is omwille van zelfbestuiving en de korte afstanden die eventuele bestuivende insecten kunnen afleggen. Bovendien leidt pollenuitwisseling tot kleinere genetische verschillen tussen populaties dan de uitwisseling van zaden (He et al. 2004). Individuen die het vooropgestelde criterium van waarschijnlijkheid niet halen, die m.a.w. toegewezen worden aan een populatie maar met een waarschijnlijkheid die lager ligt dan tien keer deze van de tweede, meest-waarschijnlijke bronpopulatie, worden niet toegewezen. Deze analyses werden toegepast voor alle populaties van België en Nederland enerzijds en voor de populaties van Noordwest-Frankrijk anderzijds. De hele toewijzingsanalyse werd vervolgens ook nog eens toegepast op het totale gebied (Noordwest-Frankrijk, België en Nederland), dus met alle populaties van Noordwest-Frankrijk, België en Nederland als mogelijke bronpopulaties. Dit om de resultaten van de toewijzingstesten uitgevoerd op verschillende geografische schalen met elkaar te kunnen vergelijken en zo inzicht te verschaffen omtrent de betrouwbaarheid van de toewijzingstesten.

Genetische aanwijzingen voor aanpassing aan het habitattype

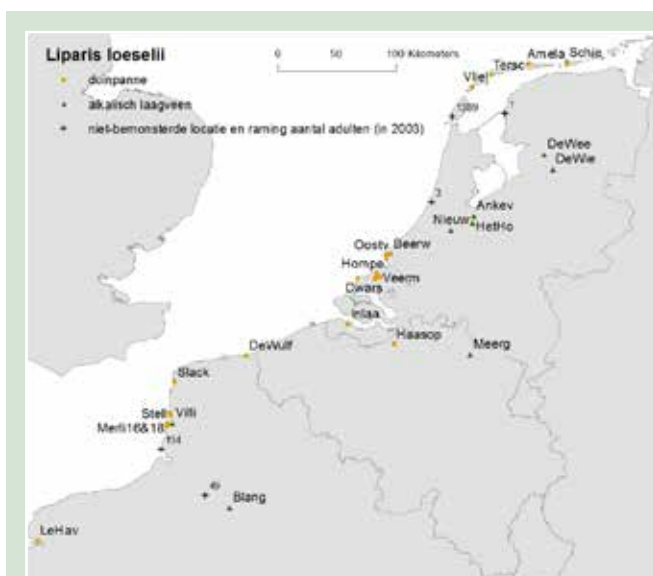
Via een screening van de genetische profielen zochten we naar mogelijke verbanden tussen genetische markers en eigenschappen die verbonden zijn met specifieke aanpassingen aan een van de twee groeiplaatsen van de Groenknolorchis: veenbodems en minerale bodems. Hiertoe groepeerden we de individuen volgens hun groeiplaats en zochten we naar DNA-fragmenten die in de buurt liggen van genen onder selectie gerelateerd met de standplaats. Wanneer dergelijke fragmenten gevonden werden (na correctie voor mogelijk vals-positieve resultaten), was dat een indicatie voor een genetische eigenschap verbonden met aanpassing aan de groeiplaats. We gebruikten hiervoor twee verschillende statistische

methoden geïmplementeerd in BAYESCAN 2.01 (Foll et al. 2008) en MCEZA (Antao & Beaumont 2011). Details over de gebruikte methode van deze genetische analyses zijn te vinden in Vanden Broeck et al. (2014).

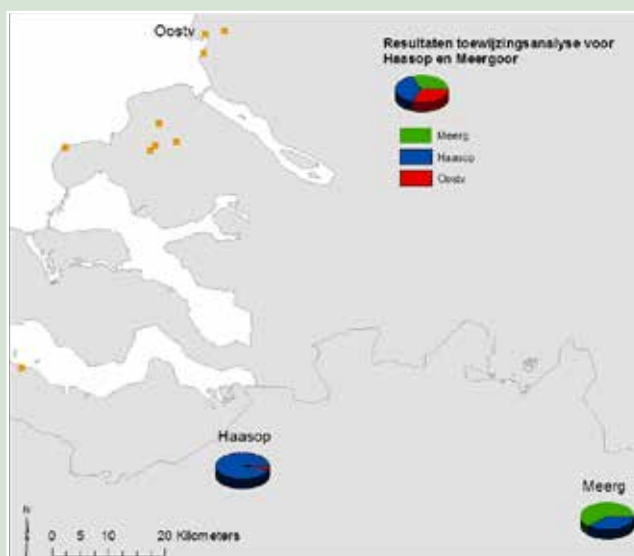
Hoe ver is ver?

De resultaten van deze studie suggereren dat de zaden van de Groenknolorchis inderdaad over tientallen tot zelfs honderden kilometers worden verbreid. We noteerden een gemiddelde verbreidingsafstand van 50 km voor Noordwest-Frankrijk en 20 km voor de regio België en Nederland, met uitschieters tot 220 km. Vermoedelijke migranten kwamen over het algemeen wel, maar zeker niet steeds, van de meest nabijgelegen populaties (Figuur 9). Het percentage geschatte individuen afkomstig van zaadverbreiding tussen deelpopulaties was hoog; ongeveer 15% van de bemonsterde planten werd aangeduid als vermoedelijke migrant. Dus 15% van de bemonsterde planten werden verondersteld afkomstig te zijn van zaad geproduceerd op een andere locatie dan deze waar de volwassen plant werd bemonsterd. Voor de regio België en Nederland kwam de richting van zaadverbreiding (van bron- naar doelpopulatie) voornamelijk overeen met de op één na meest voorkomende windrichting (na de heersende overzeese westenwinden). Voor Noordwest-Frankrijk was de voornaamste verspreidingsrichting eveneens de tweede meest voorkomende windrichting (noordwesten) samen met de noordoostelijke richting.

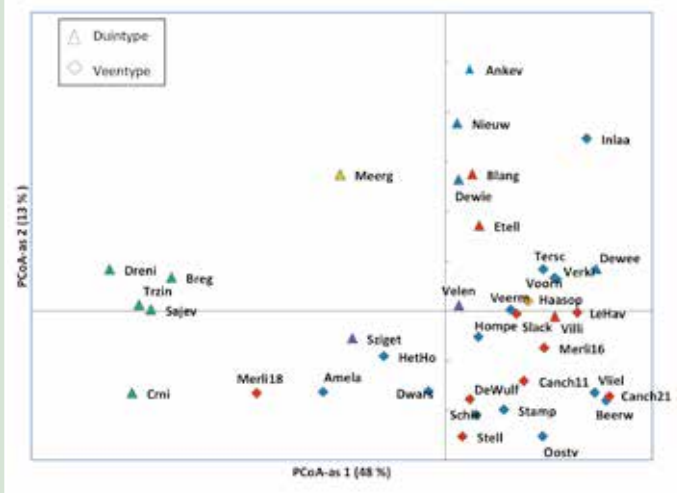
De resultaten van de toewijzingsanalyse uitgevoerd op het totale gebied (dus met alle locaties van Noordwest-Frankrijk, België en Nederland als mogelijke bronlocaties) veranderde weinig aan de toewijzingen van de vermoedelijke migranten in België en Nederland (4 van de 61 migranten werden dan toegewezen aan een bronpopulatie van Noordwest-Frankrijk in plaats van aan een bronpopulatie uit België of Nederland). Voor Noordwest-Frankrijk was de wijziging in de toegewezen oorsprong groter wanneer de toewijzingsanalyse werd



Figuur 8. Gekende groeiplaatsen van de Groenknolorchis in Noordwest-Frankrijk, België en Nederland. Populaties aangeduid met een gele stip (locatie op minerale bodem) en groene driehoek (locatie op veenbodem) werden genetisch geanalyseerd.



Figuur 9. Resultaten van de toewijzingsanalyse voor de Vlaamse groeiplaatsen van de Groenknolorchis. Voor de locaties Haasop en Meergoor wordt aangegeven aan welke locatie de bemonsterde individuen werden toegewezen op basis van de genetische profielen met AFLPOP v.1.1.



Figuur 10. Visualisatie van de genetische verschillen tussen de onderzochte populaties aan de hand van een multivariate (principaal component) analyse. De twee assen geven samen 61% van de variatie weer aanwezig in de AFLP-dataset. Deelpopulaties die bij elkaar gelegen zijn in de figuur hebben doorgaans een hogere genetische verwantschap dan deelpopulaties die verder van elkaar gelegen zijn. De deelpopulaties uit Nederland (blauw), Frankrijk (rood), de twee Belgische (geel) en zelfs de Hongaarse populaties (paars) groeperen grotendeels in eenzelfde groep wat wijst op een sterke genetische verwantschap. De Sloveense populaties (groen) groeperen eerder apart van de andere populaties.

uitgevoerd op het totale gebied; voor 7 van de 29 vermoedelijke migranten wijzigde de vermoedelijke oorsprong van een Franse bronpopulatie naar een Belgische of Nederlandse bronpopulatie. De resultaten van de toewijzingsanalyse zijn dus betrouwbaarder voor het gebied België en Nederland dan voor Noordwest-Frankrijk. Dit is voornamelijk te wijten aan de lage aantallen Groenknolorchis (en dus hier noodzakelijkerwijze ook het lage aantal stalen) voor vijf Franse locaties waardoor de betrouwbaarheid van de toewijzingstesten daalt. Er zijn twee belangrijke bemerkingen bij de interpretatie van deze resultaten. Vooreerst is het aantal geanalyseerde stalen voor enkele locaties laag in verhouding met het aantal aanwezige individuen op de locatie. Hierdoor vergroot de kans dat, binnen een deelpopulatie, sommige zelfbestuivingslijnen niet werden bemonsterd. Dus kan het zijn dat een individu toegewezen wordt aan een andere deelpopulatie terwijl het in werkelijkheid toch afkomstig is van een niet-bemonsterde zelfbestuivingslijn binnen de deelpopulatie. Hierdoor kan de lange-afstandsverbreiding worden overschat. Ten tweede kunnen veronderstelde migranten ook afkomstig zijn van verbreiding die enkele generaties eerder plaatsvond in een periode dat de soort nog voorkwam in meer nabijgelegen, maar intussen verdwenen populaties. Dit leidt eveneens tot een overschatting van verbreiding. Deze kans is eerder klein omdat de meeste huidige lokale populaties relatief jong zijn en pas ontstaan zijn toen de soort al zeldzaam was in het studiegebied.

Deze bemerkingen in acht genomen moeten het bekomen percentage veronderstelde migranten (15 %) en de verbroedingsafstanden als ruwe schattingen worden beschouwd. Het exacte aantal migranten blijft moeilijk te bepalen. Toch hebben we voldoende aanwijzingen om te kunnen besluiten dat genetische uitwisseling tussen groeilocaties van Groenknolorchis mogelijk is over tientallen tot honderden

kilometers en dit in een zeer gefragmenteerd landschap. De verspreide groeiplaatsen van de Groenknolorchis in Noordwest-Frankrijk, België en Nederland gedragen zich als een grote metapopulatie waarbij de deelpopulaties onderling min of meer met elkaar in contact staan via genetische uitwisseling. De meeste onderzochte groeiplaatsen vertoonden een sterke genetische vermenging (Figuur 9), met uitzondering van enkele relatief jonge deelpopulaties (bv. locatie Haasop (Beveren) en de locatie in duinen Dewulf (Leffrinckoucke, Frankrijk). Deze genetische vermenging zorgt voor een verhoogde genetische diversiteit van de deelpopulaties waardoor die minder gevoelig worden voor inteelt en genetische drift. Zaadverbreiding over lange afstand maakt de kolonisatie van geïsoleerde, nieuwe gebieden mogelijk. Wanneer sterk geïsoleerde gebieden verschillende keren gekoloniseerd worden, zijn de kolonisators meestal afkomstig van verschillende zaadbronnen, wat de genetische diversiteit vergroot. Een dergelijke zaadverbreiding over lange afstanden, waarbij ook in geïsoleerde gebieden regelmatig diasporen (zaden of sporen) terecht komen van diverse genetische oorsprong, werd ook waargenomen voor andere taxa die zich vooral door de wind verbreiden zoals varens (De Groot et al. 2012), mossen (Robinson & Miller 2013) en fungi (Wingen et al. 2013).

Aanpassing aan de habitat

In deze studie vonden we geen sterke genetische aanwijzingen die de indeling van de Groenknolorchis in twee ecotypen ondersteunt. Op basis van de neutrale merkers zien we geen duidelijk onderscheid maar eerder een sterke genetische verwantschap tussen de populaties gelegen in duin- en laagveengebieden (Figuur 10). Deze neutrale merkers leveren informatie over processen van genetische uitwisseling en genetische drift (neutrale processen) maar leveren geen informatie over specifieke aanpassing aan het habitat als gevolg van natuurlijke selectie. Die specifieke aanpassingen vinden meestal hun oorzaak in enkele genen waar men gericht naar op zoek moet gaan. Alhoewel AFLP-merkers doorgaans neutraal zijn, kunnen ze in sommige gevallen ook niet-neutraal zijn en dus verbonden met specifieke genen onder selectie. Bij het zoeken naar dergelijke merkers onder selectie vonden we slechts zwakke signalen die kunnen wijzen op een lokale genetische aanpassing aan de standplaats. Er werd slechts één DNA-fragment geïdentificeerd als mogelijk verbonden met genetische aanpassing aan het habitatype (veenbodem of minerale bodem) als gevolg van selectiedruk. Dit kan enkel worden bevestigd via een diepgaande studie specifiek gericht op de rol van dat DNA-fragment en de nabijgelegen functionele genen, wat buiten de doelstellingen van deze studie ligt. Waarschijnlijk zorgt de hoge mate van genetische uitwisseling tussen de deelpopulaties ervoor dat lokale aanpassingen, als ze al aanwezig zouden zijn, snel vervagen.

Conclusie

De Groenknolorchis kan mogelijk zijn zaden verbreiden over afstanden van tientallen tot zelfs honderden kilometers. De verbreiding en beschikbaarheid van zaden is dus waarschijnlijk geen beperkende factor voor de kolonisatie van nieuwe geschikte gebieden. We kunnen echter geen uitspraak doen over hoe frequent verbreiding over lange afstanden plaatsvindt binnen een bepaalde tijdsperiode. Wel blijkt uit de genetische vermenging en de relatieve korte levensduur van

lokale populaties dat zaadverbreiding over lange afstanden niet uitzonderlijk is. De sterk versnipperde groeilocaties in Noordwest-Frankrijk, België en Nederland vormen samen een grote metapopulatie waarbij alle deelpopulaties via genetische uitwisseling verbonden zijn. Voor metapopulaties zijn lokale extincties en koloniaties normale processen. Omdat verbreiding geen directe limitatie voor kolonisatie vormt, dienen instandhoudingsmaatregelen voor deze soort zich vooral te

richten op de uitbreiding van geschikte groeiplaatsen met de juiste biotische en abiotische groeicondities. Voor een duurzaam behoud is dus een netwerk van geschikte groeiplaatsen op landschapsniveau noodzakelijk. De bescherming en instandhouding van de huidige populaties moet uiteraard ook in acht genomen worden omdat ze dienen als bronpopulaties voor nieuwe koloniaties.

Summary:

VANDEN BROECK A., VAN LANDUYT W. & COX K. 2014. GONE WITH THE WIND. LONG-DISTANCE SEED DISPERSAL OF THE FEN ORCHID. *NATUUR.FOCUS* 13(4): 148-155 [IN DUTCH].

Long-distance dispersal and adaptive divergence are key aspects in metapopulation dynamics and ecological speciation. Long-distance dispersal is hard to detect and only a few empirical studies have estimated dispersal in combination with adaptive divergence. The aim of this study was to investigate effective long-distance dispersal and adaptive divergence in the Fen Orchid *Liparis loeselii*. We used amplified fragment length polymorphism (AFLP) based assignment tests to quantify effective long-distance dispersal in Northwest Europe. In addition, genomic divergence between Fen Orchid populations occupying two distinguishable habitats, wet dune slacks and alkaline fens, was investigated by a genome scan based on 451 AFLP loci. We found remarkably high levels of effective long-distance seed dispersal and low levels of adaptive divergence. At least 15% of the assigned individuals likely originated from among-population dispersal events, with dispersal distances up to 220 km. We detected only one AFLP-marker possibly reflecting adaptive divergence. The findings of this study suggest that the homogenizing effect of effective long-distance seed dispersal may overwhelm divergent selection associated to habitat type in Fen Orchids in Northwest Europe. Habitat fragmentation is likely not a major issue for the Fen Orchid. Conservation actions should focus on the preservation of the current populations as they act as seed sources for new colonizations and on the conservation and restoration of currently unoccupied habitat fragments because they may be critical for long-term persistence of the metapopulation.

AUTEURS:

An Vanden Broeck, Karen Cox en Wouter Van Landuyt zijn onderzoekers aan het Instituut voor Natuur en Bosonderzoek.

CONTACT:

An Vanden Broeck, Instituut voor Natuur- en bosonderzoek, Gaverstraat 4, 9500 Geraardsbergen
E-mail: an.vandenbroeck@inbo.be

Dank

We danken de vele enthousiaste mensen die informatie aanleverden over de groeilocaties van de Groenknolorchis of hielpen bij het verzamelen van bladstalen voor dit onderzoek. Van harte dank aan Johan Krol, Kees de Kraker, Wim van Wijngaarden, Pieter Slim, Remko Andeweg, Arjen Zonderland, Cathy Liu, Zoltán Illyés, Gregor Boží, Branko Dolinar, Bertille Valentin, Véronique Bonnet, Julien Buchet en de natuurwachers van Noordwest-Frankrijk. Verder danken we ook Sabine van Glabeke, Leen Verschaeve, Nancy Van Liefvering, An Van Breusegem, David Halfmaerten en Sabrina Neyrinck voor de laboratoriumanalyses. Onze oprechte dank gaat ook uit naar de plaatselijke autoriteiten voor het verlenen van de nodige vergunningen voor de staalnamen. Ten slotte danken we Gerard Oostermeijer, Arjen de Groot en Patrick Meirmans voor het toesturen van stalen en voor de suggesties en commentaren bij de data-analyse.

Referenties

- Antao T. & Beaumont M.A. 2011. Mchaza: a workbench to detect selection using dominant markers. *Bioinformatics* 27: 1717-1718.
- Arditti J. 1980. Aspects of the Physiology of Orchids. In: *Advances in Botanical Research*. Woolhouse H.W. (ed.), pp. 421-655. Academic Press. Londen.
- Catling P.M. 1980. Rain-assisted autogamy in *Liparis loeselii*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 107: 525-529.
- De Groot G.A., During H.J., Ansell S.W., Schneider H., Bremer P., Wubs E.R.J. et al. 2012. Diverse spore rains and limited local exchange shape fern genetic diversity in a recently created habitat colonized by long-distance dispersal. *Annals of Botany* 109: 965-978.
- Duchesne P. & Bernatchez L. 2002. AFLPOP: a computer program for simulated and real population allocation, based on AFLP data. *Molecular Ecology Notes* 2: 380-383.
- Foll M., Beaumont M.A. & Gaggiotti O. 2008. An approximate Bayesian computation approach to overcome biases that arise when using amplified fragment length polymorphism markers to study population structure. *Genetics* 179: 927-939.
- He T.H., Krauss S.L., Lamont B.B., Miller B.P. & Enright N.J. 2004. Long-distance seed dispersal in a metapopulation of *Banksia hookeriana* inferred from a population allocation analysis of amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Ecology* 13: 1099-1109.
- Leten M., Provoost S. & Lehouck V. 2012. Orchideeën aan de kust. *De Grote Rede* 32: 2-8.
- Odé B. & Bollier A. 2003. Groenknolorchis op de kaart. *Gorteria* 29: 33-37.
- Robinson S.C. & Miller N.G. 2013. Bryophyte diversity on Adirondack alpine summits is maintained by dissemination and establishment of vegetative fragments and spores. *Bryologist* 116: 382-391.
- Robyns A. 1958. *Liparis loeselii*. En voie de disparition en Belgique. *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique* 91: 79-92.
- Soons M.B., Heil G.W., Nathan R. & Katul G.G. 2004. Determinants of long-distance seed dispersal by wind in grasslands. *Ecology* 85: 3056-3068.

- Valentin B., Toussaint B., Duhamel F. & Valet J.-M. 2010. Plan national d'actions en faveur du *Liparis de Loesel* *Liparis loeselii* 2010-2014. Conservatoire botanique national de Baillieul - Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement durable et de la Mer, Baillieul.
- Van Landuyt W., Gyselincx R., T'Jollyn F. & Vanden Broeck A. 2014. Groenknolorchis *Liparis loeselii* in Vlaanderen: ecologie, populatiedynamica en potenties. Rapport Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Van Landuyt W., Hoste I., Vanhecke L., Van den Bremt P., Vercruyse E. & 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, Brussel.
- Van Landuyt W. 2009. Gewestelijke doelen voor de soorten van de Europese Habitatrichtlijn, Vaatplanten. In: Gewestelijke doelstellingen voor de habitats en soorten van de Europese Habitat- en Vogelrichtlijn voor Vlaanderen. Mededelingen van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek INBO.M.2009.6. Paelinckx D. (ed.), pp. 327-332.
- Vanden Broeck A., Van Landuyt W., Cox K., De Bruyn L., Gyselings R., Oostermeijer G. et al. 2014. High levels of effective long-distance dispersal may blur ecotypic divergence in a rare terrestrial orchid. *BMC Ecology* 14: 20.
- Vanden Broeck A., Van Landuyt W., Cox K., Gyselings R., De Bruyn L. & Mergaey J. 2014. De Groenknolorchis *Liparis loeselii*. Zaadverbreiding en lokale adaptatie. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Wheeler B.D., Lambley P.W. & Geeson J. 1998. *Liparis loeselii* in eastern England: constraints on distribution and population development. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126: 141-158.
- Whigham D.F., O'Neill J.P., Rasmussen H.N., Caldwell B.A. & McCormick M.K. 2006. Seed longevity in terrestrial orchids - Potential for persistent in situ seed banks. *Biological Conservation* 129: 24-30.
- Wingen L.U., Shaw M.W. & Brown J.K.M. 2013. Long-distance dispersal and its influence on adaptation to host resistance in a heterogeneous landscape. *Plant Pathology* 62: 9-20.