



Kan Vlaanderen het tij nog keren voor de Paling?



Translocatie van **graslandsoorten** • **Fantoompopulaties** en extinctieschuld

De Duinwespenorchis: **evolutie in actie**

Evolutie in actie

Behoud van de zeldzame Duinwespenorchis in de kustduinen

Hans Jacquemyn, Hanne De Kort, An Vanden Broeck & Rein Brys

In het natuurbeheer vandaag staan soorten centraal, maar soms is het niet duidelijk wat exact een soort is. Soorten en hun populaties evolueren immers afhankelijk van de omgeving waarin ze voorkomen en kunnen zo aanleiding geven tot nieuwe soorten. Maar waar de ene soort stopt en de andere begint is soms niet duidelijk. Toch is het voor het beheer van soortendiversiteit belangrijk om soortvorming te begrijpen en te herkennen. In deze bijdrage willen we een lans breken voor een meer genuanceerde visie op het soortenconcept en aangeven dat natuurbeheer ook kan en moet gericht zijn op het behoud van de evolutionaire processen die tot nieuwe soorten leiden.

Wat is een soort?

Een van de belangrijkste doelstellingen van het natuurbeheer vandaag bestaat erin om op lange termijn het behoud van soorten te verzekeren en op die manier een zo groot mogelijke diversiteit aan soorten na te streven. Daarom is het belangrijk om soorten te kunnen herkennen, wat in de praktijk niet altijd even eenduidig is. Want wat is een soort eigenlijk? En welke populaties van een soort wil je daarbij behouden? Eeuwenlang hebben biologen en natuurfilosofen geworsteld met de term 'soort' en het soortbegrip heeft in de loop der tijden dan ook een aantal ingrijpende veranderingen ondergaan. Aristoteles (384 – 322 BC) was een van de eersten die het concept 'soort' probeerde te vatten door een classificatie van soorten voor te stellen. In zijn optiek waren alle levende wezens geordend in een onveranderlijke toestand van perfectie, die wordt gereflecteerd in hun vorm (Gr: eidos). Aristoteles creëerde een eigen classificatiesysteem waarin hij een onderscheid maakte tussen twee grote groepen dieren: soorten met bloed en soorten zonder. De eerste groep omvatte de levendbarende viervoeters (zoogdieren), de vogels, de eierleggende viervoeters (reptielen en amfibieën), de vissen

en de walvissen. Voor de planten, die hij als 'lagere' levensvormen beschouwde, stelde Aristoteles geen classificatie op. Het was wachten tot de Engelse botanist John Ray voor een eerste definitie van een plantensoort (zie **Box 1**).

Kenmerkend voor Aristoteles' classificatie is de notie dat soorten als onveranderlijke entiteiten worden beschouwd. Dit vinden we onder andere ook terug bij Linnaeus (1707 – 1778) die het principe van de binomiale nomenclatuur introduceerde (Linnaeus 1735), waarbij elke soort een geslachtsnaam en een soortnaam heeft, zoals *Vulpes vulpes* Vos, *Turdus merula* Merel of *Anemone nemorosa* Bosanemoon. Het duurde tot de negentiende eeuw vooraleer duidelijk werd dat soorten evolueren en op termijn aanleiding kunnen geven tot het ontstaan van nieuwe soorten. Een van de fundamentele grondleggers van dit nieuwe idee was Charles Darwin (1809 – 1882). Op zijn 22ste kon hij aan boord van de HMS Beagle een bijna vijf jaar durende wereldreis (1831-1836) maken waarop hij levende organismen observeerde en documenteerde en een uitgebreide collectie fossielen aanlegde. Op basis van deze collecties en observaties ontdekte Darwin dat soorten niet eeuwig hetzelfde blijven maar evolueren en dat het

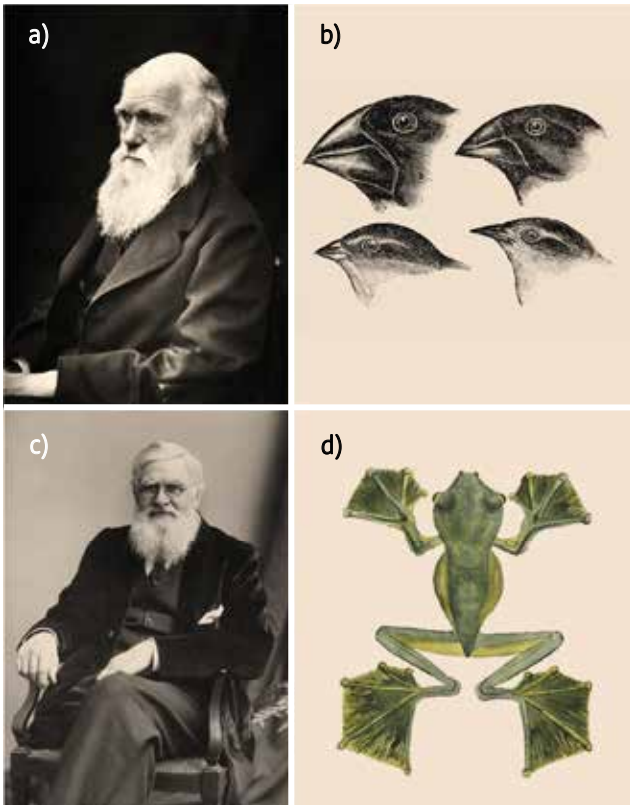
Box 1:

John Ray (1627-1705) wordt algemeen beschouwd als de grondlegger van het soortbegrip bij planten. In zijn *Historia Plantarum* schreef hij:

'No surer criterion for determining species has occurred to me than the distinguishing features that perpetuate themselves in propagation from seed. Thus, no matter what variations occur in the individuals or the species, if they spring from the seed of one and the same plant, they are accidental variations and not such as to distinguish a species ... Animals likewise that differ specifically preserve their distinct species permanently; one species never springs from the seed of another nor vice versa.'

Dit concept gaat er dus van uit dat een soort een eenheid is, waarvan bij voortplanting de kenmerkende eigenschappen in dezelfde gedaante opnieuw tevoorschijn komen in zijn/haar nakomelingen.





Figuur 1. Charles Darwin (a) en Alfred Russel Wallace (c) kwamen onafhankelijk van elkaar tot de conclusie dat soorten zich aanpassen aan hun omgeving en dat natuurlijke selectie het onderliggende mechanisme is dat deze evolutie stuurt. Darwin beriep zich hierbij op zijn observaties van onder andere de Galapagos vinken (b), terwijl Wallace zijn bevindingen ondersteunde met observaties van de Zwartvoetboomkikker *Rhacophorus nigropalmatus* (d), ook wel de Wallace vliegende boomkikker genoemd.

mechanisme dat ten grondslag ligt aan deze evolutie natuurlijke selectie is. Een welgekend voorbeeld hiervan zijn de vinken op de Galapagos eilanden, waarvan Darwin voor het eerst aantoonde dat deze nauw verwante vogels zich op elk van de verschillende eilanden morfologisch hadden gedifferentieerd door zich op verschillende voedselbronnen toe te leggen. Als gevolg hiervan vertoonden de vinken subtiele verschillen in de vorm van hun bek (Figuur 1). Darwin suggereerde dan ook om soorten niet langer te classificeren op basis van wat ze deden, maar op basis van wat ze waren en waar ze vandaan kwamen, omdat soorten volgens hem slechts een arbitrair deel van de 'Tree of Life' zijn. Deze observaties vormden uiteindelijk de basis van zijn majestueuze boek 'On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life'.

Ongeveer op hetzelfde moment dat Darwin zijn ideeën rond de evolutie van soorten ontwikkelde, reisde aan de andere kant van de wereld Alfred Russel Wallace (1823 - 1913) (Figuur 1c) doorheen de Maleisische Archipel. Hij stelde vast dat gerelateerde soorten samen voorkomen in ruimte en tijd. Hieruit concludeerde hij dat het leven zoals dat werd waargenomen het resultaat is van een diversifiërend, genealogisch proces. Een welgekend voorbeeld dat hij hiervoor aanhaalde, is de Wallace vliegende kikker *Rhacophorus nigropalmatus* (Figuur 1d). Dit is een grote boomkikker die vliezen tussen de tenen heeft

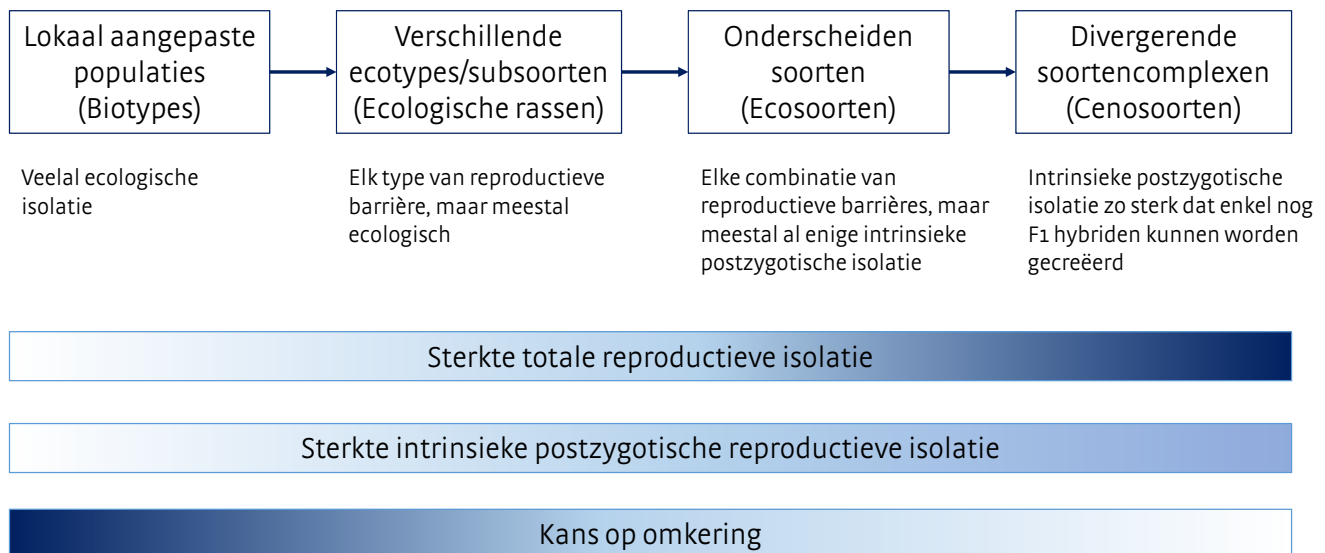
ontwikkeld om zich zwevend van de ene naar de andere boom te begeven. Onafhankelijk van Darwin kwam Wallace dus ook tot de vaststelling dat soorten evolueren. Wat echter nog ontbrak in zijn ideeën waren inzichten omtrent de mechanismen die maken dat soorten evolueren. Tijdens een hevige malaria-aanval kwam Wallace, geïnspireerd door het lezen van het werk van Thomas Malthus, op het idee dat beter aangepaste groepen op termijn minder goed aangepaste groepen gradueel vervangen. Later schreef Wallace deze ideeën neer in een artikel dat als titel had 'On the tendency of varieties to depart indefinitely from the original type' en kwam hij onafhankelijk van Darwin tot de idee van soortvorming door natuurlijke selectie.

Ecotypes of ecologische rassen

Dat soorten evolueren en er op die manier nieuwe soorten kunnen ontstaan, lijkt niemand vandaag de dag nog te betwisten. Meestal verloopt deze evolutie echter erg traag en kunnen er in de loop van dit diversificatie- of soortvormingsproces enkele overgangsfases vastgesteld worden (Figuur 2). Deze overgangsfases worden ook wel eens 'ecotypes' of 'ecologische rassen' genoemd. Taxonomen noemen dit dan weer 'varianten' of 'ondersoorten'. De eerste die een poging heeft gedaan om verschillende stadia in het soortvormingsproces te herkennen en aan te duiden was opnieuw Alfred Russel Wallace (Wallace 1865). De term ecotype werd later voor het eerst gebruikt door de Zweedse evolutiebioloog Göte Turesson (1892-1970), waarmee hij ecologisch onderscheidbare populaties wou aanduiden die aangepast zijn aan de lokale groei-omstandigheden. De Amerikaanse biologen Jens Clausen, David Keck en William Hiesey hebben het werk van Turesson verdergezet. Zij voerden een groot aantal experimenten uit waarbij planten van dezelfde soort, maar afkomstig uit verschillende leefgebieden, werden overgeplant in elkaars leefgebied. Zo konden ze nagaan hoe populaties afkomstig uit gebieden met verschillende omgevingscondities morfologisch, fysiologisch en demografisch reageren op contrasterende omgevingscondities. Zij deden hun onderzoek in het Sierra Nevada gebergte in de buurt van California, waarbij ze proefgebieden installeerden langs de kust, op een hoogte van 1.400 meter en in alpien gebied op 3.000 meter hoogte. Hun resultaten toonden aan dat planten die in verschillende gebieden voorkwamen zich hadden aangepast aan de heersende omstandigheden. In zijn boek 'Stages in the Evolution of Plant Species' kwam Clausen (1951) met de term 'Ecological races' op de proppen. Volgens Clausen ontstaan deze ecologische rassen deels doordat ze zich aangepast hebben aan de lokale groei-omstandigheden en deels omdat ze reproductief van elkaar geïsoleerd geraken en dus moeilijker met elkaar kunnen kruisen (Figuur 2).

Het geslacht *Wespenorchis*

Met ongeveer 27.000 soorten (Dressler 2005) vormt de orchideënfamilie (Orchidaceae) een van de meest soortenrijke plantenfamilies binnen de Bedektzadigen. Orchideeën ontstonden ongeveer 112 miljoen jaar geleden, hoogst waarschijnlijk in Australië (Givnish et al. 2016). Vanuit Australië koloniseerden ze Antarctica, dat op dat moment nog niet bedekt werd door ijs, en maakten ze nadien de sprong naar Zuid-Amerika waar ze verder



Figuur 2. Hypothetische voorstelling van de verschillende tussenstadia die tijdens het soortvormingsproces volgens de Amerikaanse bioloog Jens Clausen (1951) kunnen herkend worden (aangepast naar Lowry 2012). Reproductieve isolatie stelt hierbij een maat voor voor de mate waarin divergerende populaties nog met elkaar kunnen kruisen. Verschillende reproductieve barrières dragen bij tot reproductieve isolatie. Deze kunnen opgedeeld worden in prezygotische (voor bevruchting) barrières en postzygotische (na bevruchting) barrières. De eerste generatie hybriden na kruising tussen twee soorten worden F1 hybriden genoemd. Wanneer de kruisende soorten dermate ver van elkaar gedivergeerd zijn, slagen deze F1 hybriden er niet meer in nakomelingen voort te brengen. We zeggen dan dat de soorten effectief 'reproductief geïsoleerd' zijn van elkaar.

diversifieerden (Givnish et al. 2016). Omwille van het groot aantal soorten en de snelle diversificatie vormen orchideeën een uitstekende soortengroep om evolutie en soortvorming te bestuderen. Daarnaast kent deze soortengroep een groot aantal soorten waarvan de taxonomie niet duidelijk is. Denk bijvoorbeeld aan het geslacht spiegelorchis *Ophrys* waarvan recent 353 soorten werden beschreven (Delforge 2016). Allicht gaat het hier niet om duidelijk afgebakende soorten, maar om varianten of ecotypes die reproductief niet sterk van elkaar geïsoleerd zijn.

Een ander taxonomisch complex geslacht van orchideeën, waarin zelfs experts nog moeilijk hun weg vinden, is het geslacht wespenorchis *Epipactis*. Zo is het aantal soorten binnen dit geslacht de laatste decennia spectaculair toegenomen. Delforge (1995) erkende in 1995 36 soorten in Europa, maar zes jaar later was het aantal soorten al opgelopen tot 56, een toename van maar liefst 55% (Delforge 2001). Veelal gaat het hier om soorten met een beperkt verspreidingsgebied die morfologisch vaak niet sterk van elkaar verschillen en in veel gevallen is het niet duidelijk of het echt om aparte soorten gaat, dan wel om ondersoorten of varianten (ecotypes) van bestaande soorten. Hoewel het misschien niet de meest spectaculaire orchideeën zijn, bieden soorten van het geslacht wespenorchis een aantal interessante studiemogelijkheden. Zo wordt het geslacht gekenmerkt door mixotrofie (Selosse et al. 2004, Hynson et al. 2016, Jacquemyn et al. 2017b), waarbij planten koolstof verwerken door gedeeltelijk zelf aan fotosynthese te doen en een deel van hun nutriënten bekomen via associaties met schimmels. Deze schimmels vormen op hun beurt vaak een associatie met bomen en fungeren dus als een soort van tussenstation, waarbij koolstof gevormd door middel van fotosynthese door de boom via de schimmel aan de orchidee wordt geleverd. Zo is het van de Kleinbladige wespenorchis *Epipactis microphylla* geweten dat deze soort zo associaties vormt met verschillende truffelsoorten *Tuber* sp. (Selosse et al. 2004).

De bloemen van *Epipactis* produceren overvloedig nectar en worden voornamelijk bestoven door wespen *Vespa* sp., terwijl andere insecten zoals hommels of bijen de bloemen van *Epipactis* soorten grotendeels links laten liggen. Onderzoek naar het geurprofiel van de bloemen van de Breedbladige wespenorchis *E. helleborine* en de Paarse wespenorchis *E. purpurata* heeft aangetoond dat deze specifieke vluchtige aromatische componenten uitzenden die erg gelijkaardig zijn aan aromatische stoffen die normaal worden uitgezonden door beschadigd planteweefsel. Deze worden ook green-leaf volatiles (GLVs) genoemd. Wanneer een plant aangevallen wordt door een herbivoor, zal ze geurstoffen uitzenden die parasitaire wespen aantrekken, die op hun beurt de belagers van de plant aanvallen (Brodmann et al. 2008). Sommige van de componenten die in het geurprofiel van de bloemen van deze twee *Epipactis* soorten werden aangetroffen, worden bijvoorbeeld ook uitgezonden door koolbladeren die aangevallen worden door rupsen van het Klein koolwitje *Pieris rapae*. Daarnaast worden in de nectar van wespenorchis ook een reeks bacteriën en gisten teruggevonden die gespecialiseerd zijn in het overleven in suikerrijke milieus (Jacquemyn et al. 2013). Zo werden recent nog twee nieuwe soorten bacteriën van het geslacht *Rosenbergiella* (*Rosenbergiella epipactidis* en *R. collisarenosi*) beschreven, die allebei geïsoleerd werden uit de nectar van de Moeraswespenorchis *E. palustris* (Lenaerts et al. 2014).

De Duinwespenorchis

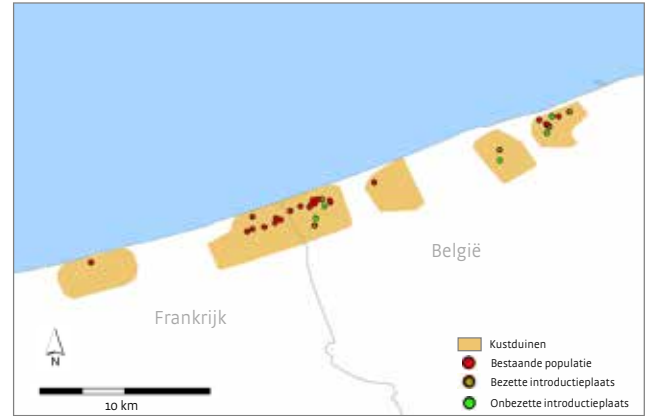
Een voorbeeld van een *Epipactis*-soort waarvan de taxonomie niet duidelijk is, is de Duinwespenorchis. Sommige auteurs (Delforge et al. 1991, Delforge 2006) beschouwen de Duinwespenorchis als een aparte soort (*Epipactis neerlandica*), andere (Tyteca & Dufrêne 1994, Claessens et al. 1998, Ehlers & Pedersen 2000, Pedersen & Ehlers 2000, Kreutz & Dekker 2000) als een ondersoort van de Breedbladige wespenorchis (*Epipactis helleborine* subsp. *neerlandica*) en nog anderen (Kapteyn den

Bouwmeester 1989, 2012) als een variant van de Breedbladige wespenorchis (*Epipactis helleborine* var. *neerlandica*). Om de zaak nog complexer te maken erkende Delforge (2006) een variant van de Duinwespenorchis, die *Epipactis neerlandica* var. *renzii* wordt genoemd of *E. helleborine* subsp. *neerlandica* var. *renzii* en een zeer beperkt verspreidingsgebied in het noorden van Denemarken kent. Kunt u nog volgen?

Er wordt algemeen van uitgegaan dat varianten van de Breedbladige wespenorchis, zoals de Duinwespenorchis, een recente oorsprong kennen en zich vrij snel hebben aangepast aan de vaak extreme omgevingscondities van de leefgebieden die ze koloniseerden (Squirrell et al. 2002, Tranchida-Lombardo et al. 2011). Het exacte tijdstip waarop deze processen zich hebben voltrokken en wanneer deze varianten zich van hun moedersoort hebben afgesplitst is niet zo eenvoudig te bepalen. Er zijn evenwel technieken beschikbaar die op basis van moleculaire merkers toelaten te bepalen wanneer een populatie zich genetisch begint te onderscheiden van een andere populatie. Zonder al teveel op de methode in te gaan, kunnen hierbij bepaalde hypothetische scenario's vooropgesteld worden die het ontstaan van een populatie verklaren en kan via statistische modellen worden getoetst welk evolutionair scenario het meest plausibel is. In het geval van de Duinwespenorchis construeerden we twee mogelijke scenario's, één waarbij het bosecotype van de Breedbladige wespenorchis de ouder is van de Duinwespenorchis en een alternatief scenario dat vooropstelt dat de Duinwespenorchis de ouder is van het bosecotype van de



Figuur 3. Verspreiding van het bos- en duinecotype van de Breedbladige wespenorchis *Epipactis helleborine* in Europa. De verspreiding van het bosecotype wordt in het groen weergegeven, van het duinecotype in het rood.



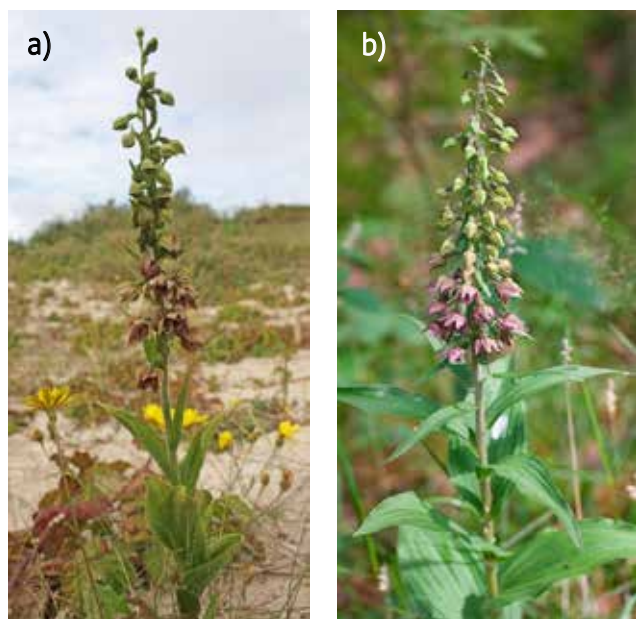
Figuur 4. Overzicht van de bestudeerde duinpopulaties van de Breedbladige wespenorchis *Epipactis helleborine*. In het rood worden bestaande populaties weergegeven, in het groen plaatsen waar kiemingsexperimenten werden uitgevoerd.

Breedbladige wespenorchis. Tegelijkertijd onderzochten we voor beide scenario's het tijdstip waarop de twee taxa zich van elkaar hebben onderscheiden. Met een aan 100% grenzende graad van waarschijnlijkheid kon scenario 1 aanvaard worden, waarmee het algemeen vermoeden, dat de Duinwespenorchis is ontstaan uit het bosecotype van de Breedbladige wespenorchis, inderdaad bevestigd wordt. Interessanter is echter de vaststelling dat dit proces zich evolutionair gezien heel recent heeft voorgedaan (slechts 50 generaties geleden). We kunnen dus stellen dat de Duinwespenorchis zich vermoedelijk recent van het bosecotype van de Breedbladige wespenorchis heeft afgesplitst.

Het verspreidingsgebied van de Duinwespenorchis is niet zo goed gekend omdat ze vaak moeilijk opgemerkt wordt onder kruipwilg- of duindoornstruwelen in de overgang naar het nattere deel van duinpannes. De Duinwespenorchis lijkt echter een zeer beperkt verspreidingsgebied te kennen langsheen de Noordzee. Zo komt de soort slechts op een beperkt aantal vindplaatsen voor in Nederland (duinen bij Zandvoort, bij Bergen en op Schiermonnikoog) (Kreutz & Dekker 2000), langsheen de kust van Normandië (Delforge 2005) en in Denemarken (Pedersen & Ehlers 2000) (Figuur 3). In Vlaanderen werden in de zomer van 2015 een twintigtal groeiplaatsen teruggevonden in het gebied tussen Nieuwpoort en De Panne (Figuur 4). De meeste populaties waren echter erg klein en bevatten niet meer dan 50 individuen (minimum 3, maximum 140, gemiddeld 29). Deze populaties werden meestal teruggevonden aan de rand van natte duinpannes, waarin vaak in het nattere gedeelte ook Moeraswespenorchis werd teruggevonden. De twee soorten lijken elkaar te vermijden en komen nauwelijks door elkaar voor.

Is de Duinwespenorchis een aparte soort?

De volgende vraag is of we de Duinwespenorchis als een aparte soort moeten beschouwen, in dit geval zou ze dan *Epipactis neerlandica* genoemd worden, of eerder als een ondersoort van de Breedbladige wespenorchis, die we dan *E. helleborine* subsp. *neerlandica* zouden noemen. We weten reeds dat de Duinwespenorchis genetisch verschilt van de Breedbladige wespenorchis (Jacquemyn et al. 2017a). Naast deze verschillen



Figuur 5. Verschillen in algemene verschijningsvorm van de Breedbladige wespenorchis *Epipactis helleborine* tussen planten uit a) duinpopulaties en b) bospopulaties.

in DNA verschillen de individuen van de Duinwespenorchis ook morfologisch van de Breedbladige wespenorchis (**Figuur 5**). Hierbij is de Duinwespenorchis doorgaans kleiner en meer gedrongen dan de Breedbladige wespenorchis (gemiddeld 32,19 cm hoog versus 60,33 cm), wat misschien een aanpassing is aan de meer winderige omstandigheden aan de kust of aan de drogere omstandigheden in kustduinen. De planten bezitten ook minder bloemen (respectievelijk 25 en 33 bloemen). De vorm van de bloemen verschilde daarentegen niet erg tussen beide ecotypes (Jacquemyn et al. 2017a). Deze gegevens zijn in overeenstemming met eerdere studies die de morfologie vergeleken hebben tussen individuen van duinpopulaties en van bospopulaties (Kapteyn den Bouwmeester 1989, 2012, Claessens et al. 1998, Van den Bussche 2000). Dus op basis van genetische en een aantal morfologische kenmerken is het verleidelijk om de twee taxa als aparte soorten te erkennen.

Wanneer we echter naar de vrucht- en zaadzetting kijken nadat we de twee taxa met elkaar gekruist hebben, dan blijkt dat ze perfect in staat zijn om elkaar te bestuiven en zaad te zetten. De vrucht- en zaadzetting na kruising tussen taxa is namelijk even hoog in vergelijking met het reproductieve succes wanneer individuen binnen beide taxa met elkaar gekruist worden. Dit geeft aan dat reproductieve isolatie na bestuiving zeer zwak ontwikkeld is en bevestigt de recente afsplitsing van de Duinwespenorchis van de Breedbladige wespenorchis. Op basis van deze gegevens kunnen we dus moeilijk van een aparte soort spreken (zie ook **Figuur 2**), maar eerder ecotypes in het beginstadium van soortvorming.

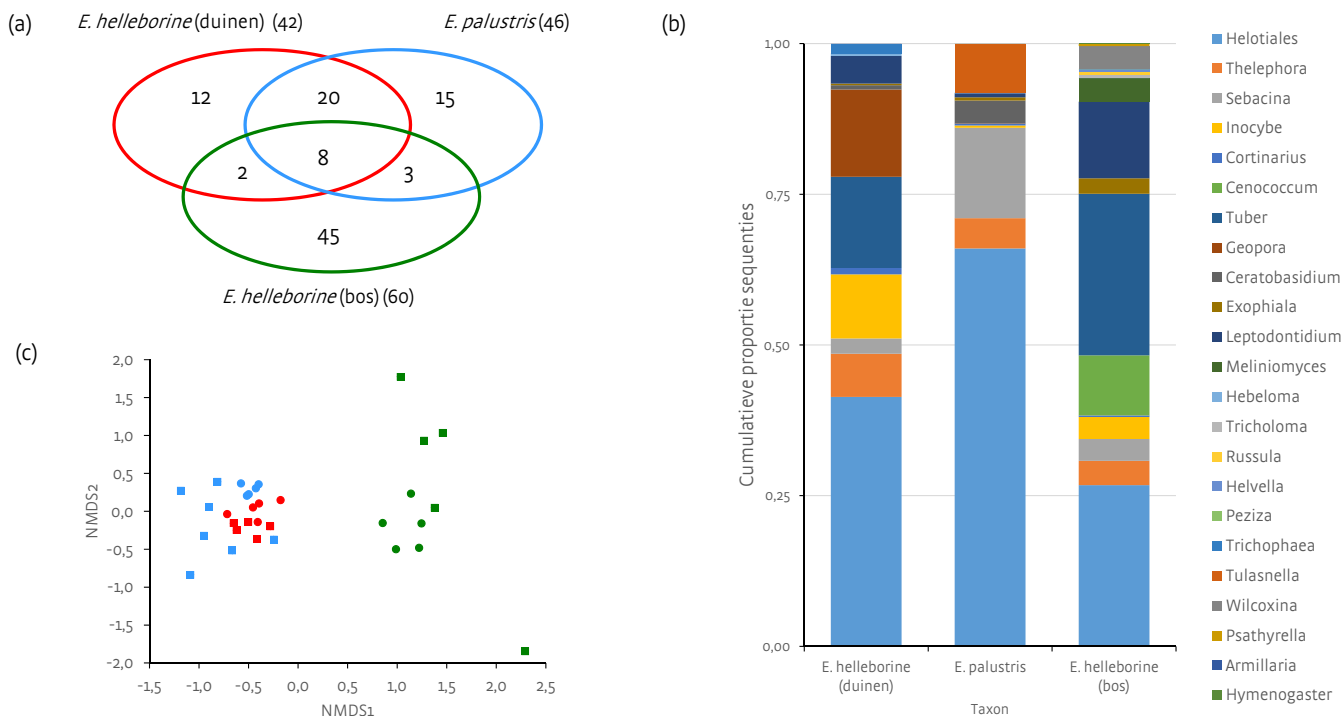
Mycorrhiza, kieming en ecologische isolatie

Orchideeën zijn afhankelijk van schimmels voor de kieming van hun zaden. De zaden zijn immers zo klein dat ze geen reservestoffen meegekregen hebben en bijgevolg een beroep

op schimmels moeten doen om de kieming op gang te brengen. Verschillende orchideesoorten gebruiken hiervoor andere soorten schimmels om hun zaden te doen kiemen. Onderzoek naar de schimmelgemeenschappen van zeven orchideesoorten die samen in duinpannen voorkomen, toonde duidelijk aan dat soorten van het geslacht handekenskruid *Dactylorhiza* met totaal andere schimmels associëren dan bv. soorten van het geslacht wespenorchis (Jacquemyn et al. 2017b). Ook de Groenknolorchis *Liparis loeselii*, die eveneens in kalkrijke duinpannen kan teruggevonden worden, associeerde met nog eens totaal andere schimmels. Vermits de Breedbladige wespenorchis voornamelijk in bos voorkomt en de omgevingsomstandigheden grondig verschillen tussen bossen en duinpannen, kan verwacht worden dat de schimmel-gemeenschappen waarmee het boscotype associeert grondig verschilt van deze waarmee het duinecotype associeert en dat deze verschillen een invloed kunnen uitoefenen op de kieming. Als de verschillen dermate groot zijn, is het misschien zelfs mogelijk dat zaden van duinpopulaties niet meer kiemen in bossen en omgekeerd, dat zaden van bospopulaties niet kiemen in de duinen. Men spreekt in dit geval van ecologische isolatie (**Figuur 2**).

Om dit na te gaan vergeleken we de schimmelgemeenschappen van twee duinpopulaties met deze van twee bospopulaties. Tegelijkertijd namen we ook enkele stalen van de Moeraswespenorchis *Epipactis palustris*, die vaak samen voorkomt met de duinvorm. Uit de resultaten bleek duidelijk dat de schimmelgemeenschappen sterk verschilden tussen bos- en duinpopulaties (**Figuur 6**). De duinpopulaties van *E. helleborine* bleken veel meer schimmels gemeen te hebben met de Moeraswespenorchis dan met de bospopulaties (**Figuur 6a**). Hierdoor verschilden de schimmelgemeenschappen die teruggevonden werden in typische bospopulaties van *E. helleborine* sterk van die van de Moeraswespenorchis en de Duinwespenorchis (**Figuren 6b, c**). Schimmelsoorten uit de geslachten *Cenococcum* of *Wilcoxina* werden bijvoorbeeld niet teruggevonden in de duinen, terwijl deze wel regelmatig werden teruggevonden in bospopulaties (**Figuur 6b**).

Vervolgens voerden we kiemingsexperimenten uit, waarbij we zaden van zowel de duin- als bospopulaties lieten kiemen in duinen en bossen. Op die manier konden we nagaan of de geobserveerde verschillen in schimmelgemeenschappen de kieming van zaden beïnvloeden. Zaden werden hierbij in zaadpakketjes in de grond gebracht. Deze zaadpakketjes zijn diaplaatjes waarin een fytoplankton-netje wordt aangebracht waarin de zaden worden uitgestrooid en kunnen kiemen. De diaplaatjes werden zowel in de duin- als de bospopulaties verticaal in de bodem ingegraven. Na ongeveer 18 maanden onder de grond verbleven te hebben werden de diaplaatjes opgegraven en werd de kieming bepaald. De kieming van orchideezaden verloopt vrij traag en verschillende stadia kunnen tijdens het kiemingproces waargenomen worden (**Figuur 7**). Voordat een orchideezaad (a) effectief ontkiemt, zwelt het embryo van het zaad aanzienlijk op (b). Hierna breekt er een knolvormige structuur, de protocorm, door de zaadhuid (c) en ontwikkelt deze zich verder, waarbij verschillende stadia van protocorm ontwikkeling doorlopen worden (d-e). Pas in een later stadium, wat soms meerdere jaren kan duren, ontwikkelen de bladeren



Figuur 6. Verschillen in schimmelgemeenschappen tussen Moeraswespenorchis *Epipactis palustris* en duin- en bospopulaties van de Breedbladige wespenorchis *E. helleborine*. (a) Het aantal schimmels dat gedeeld wordt door de drie taxa en die uniek zijn voor elk taxon. (b) Gedetailleerde weergave van de schimmelgemeenschappen die in elk taxon worden teruggevonden. (c) Visuele voorstelling van de verschillen in gemeenschapsamenstelling tussen populaties van Moeraswespenorchis (blauw) en duinpopulaties (rood) en bospopulaties (groen) van de Breedbladige wespenorchis. Deze figuur is het resultaat van een multivariate analyse: punten (individuen) die dicht bij elkaar liggen hebben zeer gelijkaardige schimmelgemeenschappen. Punten die ver uit elkaar liggen hebben sterk verschillende schimmelgemeenschappen.

zich en zal de plant voor het eerst boven de grond verschijnen. Voor dit onderzoek bepaalden we zowel het aantal kiemende zaden als het aantal protocormen dat in elk zaadpakketje teruggevonden werd.

De resultaten van dit kiemonderzoek geven duidelijk weer dat zaden van de duinpopulaties regelmatig kiemden in de duinen (**Figuur 8a**) en ook uitgroeiden tot protocormen (**Figuur 8b**). Wanneer deze zaden echter in bossen werden uitgezaaid, kwamen beduidend minder zaden tot kieming en groeiden ze ook merkkelijk minder door tot een protocorm. De resultaten zijn nog duidelijker wanneer we kijken naar zaden van de bospopulaties. Ook hier zien we dat zaden frequent kiemen wanneer ze in bos worden begraven, maar bijna niet kiemen wanneer ze in duinen worden begraven. Gemiddeld werden meer dan vier protocormen in een zaadpakketje teruggevonden wanneer zaden in bos werden begraven, maar geen enkele protocorm werd gevormd wanneer deze zaden in duinen werden ingezaaid. Dit geeft aan dat het voor zaden van bospopulaties zeer moeilijk zal zijn om duinen te koloniseren, als ze hier al terecht kunnen komen. Een mooi voorbeeld van ecologische isolatie dus.

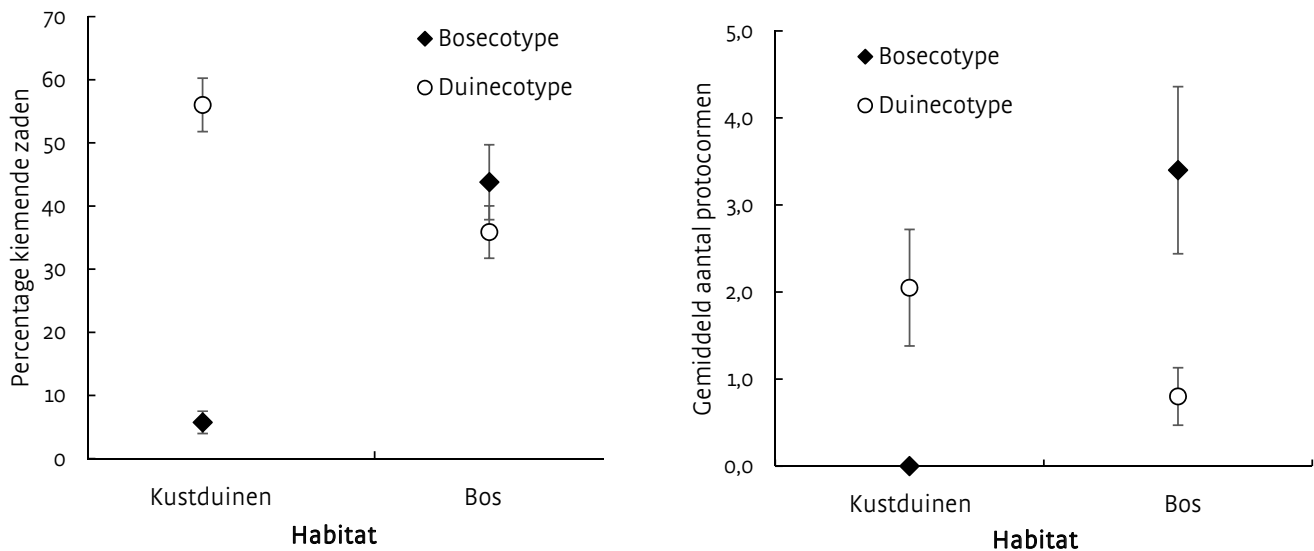
Implicaties voor natuurbehoud

De betreunde Franse biologe Isabelle Olivieri (1957-2016) schreef dat natuurbehoud niet alleen leefgebieden, soortenrijkdom of individuele soorten moet beschermen, maar ook de evolutionaire processen die tot diversiteit leiden (Olivieri et al. 2016). Het hoeft geen betoog dat de recente kolonisatie van

de duinen door de Breedbladige wespenorchis heeft geleid tot snelle veranderingen in uiterlijke kenmerken die mogelijk een aanpassing zijn aan duinmilieus. In die zin zien we hier evolutie



Figuur 7. Verschillende stadia in het kiemingsproces van *Epipactis* zaden. (a) Zaad met een levensvatbaar embryo, (b) opgezwollen zaad met schimmeldraden duidelijk aanwezig, (c) ontwikkeling tot een knolvormige structuur of protocorm en (d-e) verdere ontwikkeling van de protocorm. Pas in een later stadium ontwikkelen de bladeren zich en zal de plant voor het eerst boven de grond verschijnen. Gedurende het hele kiemingsproces zijn de zaden en protocormen afhankelijk van schimmels.



Figuur 8. Verschillen in kieming en ontwikkeling van protocormen tussen zaden die verzameld werden in duin- en bospopulaties en die te kiemen werden gelegd in beide leefgebieden.

dus bijna letterlijk aan het werk. Spijtig genoeg bestaan de meeste populaties van de Duinwespenorchis slechts uit een beperkt aantal individuen en deze individuen komen dan ook nog eens bijna uitsluitend in bijzondere micro-habitats voor. Dat maakt dat het voor deze potentieel nieuwe soort niet eenvoudig is om haar areaal uit te breiden of haar populaties te vergroten. Nochtans geven onze kiemexperimenten weer dat er in de Belgische kustduinen nog voldoende habitatplekjes aanwezig zijn waar de soort kan kiemen en de zaden kunnen uitgroeien tot volwassen planten. We zijn dus al bij al niet te pessimistisch over het voortbestaan van dit bijzondere ecotype, maar wensen toch aan te stippen dat verdere kartering en opvolging van bestaande populaties aangewezen zijn. We weten bijvoorbeeld niet hoe stabiel de onderzochte populaties zijn en aan welke invloeden ze onderhevig zijn. Het is bijvoorbeeld algemeen gekend dat de Duinwespenorchis erg afhankelijk is van de dynamiek van duinvorming, aangezien de soort haar optimale standplaatsen heeft op de rand van stuifduinen die nog niet volledig zijn ingepalmd door struwelen. Ook is niet goed geweten welk effect langdurige droogte tijdens de zomermaanden op deze soort en haar overleving heeft of hoe hoge waterstanden in de winter de overleving van dit ecotype beïnvloeden. Worden jaarlijks wel voldoende vruchten en zaden geproduceerd om voldoende kiemplanten te garanderen? Zijn deze populaties volledig geïsoleerd van bestaande populaties van de Breedbladige wespenorchis en indien niet, hoe beïnvloedt instroom van genetisch materiaal van deze populaties de verdere evolutie en ecologie van het duinecotype? Het beantwoorden van deze en andere vragen kan leiden tot een beter begrip van soortvorming in orchideeën en planten in het algemeen en tegelijk dienen als een hefboom voor betere maatregelen die tot doel hebben om duinsystemen en hun dynamiek te beschermen of te herstellen. Dit zal niet enkel de Duinwespenorchis ten goede komen, maar ook een hele reeks van andere zeldzame soorten die in dit habitat hun optimum vinden. In deze context is het verontrustend te moeten vaststellen dat in een artikel van Van den Bussche

(2000) gewag wordt gemaakt van een populatie bestaande uit meer dan duizend individuen. Het is niet helemaal duidelijk om welke populatie het hier juist gaat, maar onze data geven weer dat het merendeel van de door ons teruggevonden populaties uit niet meer dan vijftig individuen bestond en dat de grootste populatie slechts een honderdtal individuen bevatte.

Conclusie

De Duinwespenorchis kan beschouwd worden als een variant van de Breedbladige wespenorchis. Vooralnog hebben we onvoldoende redenen om de Duinwespenorchis als een aparte soort te beschouwen. Deze variant splitste zich pas heel recent af van de Breedbladige wespenorchis en de twee taxa kruisen ook nog makkelijk onderling. Dit neemt niet weg dat duinpopulaties niet interessant kunnen zijn. Integendeel, wij zijn van oordeel dat vanuit het standpunt van natuurbehoud deze populaties absolute bescherming behoeven vermits we hierin evolutie als het ware aan het werk kunnen zien. In die zin beschermen we niet een soort, maar eerder het proces dat tot een nieuwe soort kan leiden. De Duinwespenorchis is trouwens geen uniek geval. Andere voorbeelden van soorten die zich aan het duinmilieu aangepast hebben, zijn reigersbek (Duinreigersbek en Gewone reigersbek), melkdistel (Duinmelkdistel en Akkermelkdistel), viooltje (Duinviooltje en Driekleurig viooltje), dravik (Duindravik en Zachte dravik) en zwenkgras (Duinzwenkgras en Rood zwenkgras). Vermits deze soorten geen algemene bescherming genieten, lijkt het ons aangewezen om in beleidsplannen meer aandacht te geven aan ecotypes opdat evolutionaire processen en de verdere ontwikkeling tot aparte soorten niet in het gedrang worden gebracht.

SUMMARY

Jacquemyn H., De Kort H., Vanden Broeck A. & Brys R. 2018. Evolution in action. Conservation of dune populations of *Epipactis helleborine* in coastal dunes. *Natuur.focus* 17(1): 29-36. [in Dutch]

Ecological speciation is the process by which one species diverges into two distinct phylogenetic lineages that gradually become reproductively isolated from each other after they have colonized a new habitat. Because ecological speciation typically occurs across a continuum of time and several intermediate stages, often called ecological races or ecotypes, can be discerned during the speciation process, it may result in a complex of taxa among which species limits are difficult to define. A typical example of a species group among which species limits are difficult to define is the genus *Epipactis*. It contains a complex of autogamous and non-autogamous taxa that may have arisen after the colonization of new habitats, followed by rapid adaptation and evolutionary changes in key traits that allow establishment and survival in these newly colonized habitats. However, the taxonomic status of these species is problematic and different authors have treated the taxonomy of *Epipactis* in different ways, some recognizing the different taxa as distinct species, others considering them only as minor intraspecific variants or ecological races. Here we present the results of genomic, meta-genomic and morphological analyses aimed at investigating the taxonomic status of coastal dune populations of the widespread terrestrial orchid *Epipactis helleborine*. Investigations of the mycorrhizal fungi associating with coastal dune populations and typical forest populations has shown that they associate with significantly different fungal communities. Crossing experiments show that both taxa easily cross and produce viable seeds. However, germination of seeds of dune populations in forest habitat and vice versa was always lower than that of seeds of coastal populations in dune habitats or of forest populations in forest habitat, leading to strong reproductive isolation as a result of immigrant inviability. Genomic analyses using SNP markers further revealed that coastal dune populations diverged only about 50 generations ago from inland populations, went through a significant bottleneck and were most likely the result of a single colonization event. The sampled dune populations also showed very little genetic differentiation and no apparent spatial genetic structure was observed. Overall these results are consistent with a process of genetic divergence after a single very recent colonization event followed by extensive gene flow among populations. From a taxonomic point of view coastal dune populations of *E. helleborine* should not be treated as a separate species, but rather as an ecotype.

AUTEURS

Rein Brys en An Vanden Broeck zijn wetenschappelijk medewerkers aan het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO). Hanne De Kort en Hans Jacquemyn zijn postdoctoraal medewerker en onderzoeksprofessor aan de KU Leuven (Departement Biologie, labo voor plantendiversiteit en populatiebiologie).

CONTACT

Hans Jacquemyn, Departement Biologie, Kasteelpark Arenberg 31, bus 2435, 3001 Heverlee.

E-mail: hans.jacquemyn@kuleuven.be

DANKWOORD

Dit artikel kwam tot stand in het kader van een afgelopen ERC-project (MYCASOR – 260601). We willen Karolien Coenen bedanken voor haar hulp met de morfologische analyses, Sabrina Neyrinck voor lab-assistentie en Michael Waud voor de moleculaire analyses voor het bepalen van de schimmelgemeenschappen. Marc Leten willen we bedanken voor de assistentie bij de zoektocht naar populaties en een aangename dag aan zee die helaas een negatieve bijklank kreeg door een vandalenstreek.

REFERENTIES

Brodmann J., Twele R., Francke W., Hölzler G., Zhang Q.-H. & Ayasse M. 2008. Orchids mimic green-leaf volatiles to attract prey-hunting wasps for pollination. *Current Biology* 18: 740-744.

Claessens J., Kleynen J. & Wielinga R. 1998. Some notes on *Epipactis helleborine* (L.) Crantz ssp. *neerlandica* (Vermeulen) Butler and *Epipactis renzii* K. Robatsch. *Eurorchis* 10: 55-64.

Clausen J. 1951. Stages in the evolution of plant species. Cornell University Press, Ithaca, NY.

Delforge P. 1995. Orchids of Britain and Europe. Harper-Collins, London, UK.

Delforge P. 2001. Guide Des Orchidées d'Europe. Delachaux et Niestlé, Lausanne, Switzerland.

Delforge P. 2016. Orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient. 4th edition. Delachaux et Niestlé, Lausanne, Switzerland.

Dressler RL. 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.

Ehlers B.K. & Pedersen H.E. 2000. Genetic variation in three species of *Epipactis* (Orchidaceae): geographic scale and evolutionary inferences. *Biological Journal of the Linnean Society* 69: 411-430.

Givnish T.J., Spalink D., Ames M., Lyon S.P., Hunter S.J. Zuluaga A. et al. 2016. Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. *Journal of Biogeography* 43: 1905-1916.

Hynson N. A., Schiebold J. M.-I. & Gebauer G. 2016. Plant family identity distinguishes patterns of carbon and nitrogen stable isotope abundance and nitrogen concentration in mycoheterotrophic plants associated with ectomycorrhizal fungi. *Annals of Botany* 118: 467-479.

Jacquemyn H., Lenaerts M., Tyteca D. & Lievens B. 2013. Microbial diversity in the floral nectar of seven *Epipactis* (Orchidaceae) species. *MicrobiologyOpen* 2: 644-658.

Jacquemyn H., De Kort H., Vanden Broeck A & Brys R. 2017a. Immigrant and extrinsic hybrid seed inviability contribute to reproductive isolation between forest and dune ecotypes of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). *Oikos*, in press.

Jacquemyn H., Waud M., Brys R., Lallemand F., Courty P.-E., Robionek A. et al. 2017b. Mycorrhizal associations and trophic modes in coexisting orchids. An ecological continuum between auto- and mixotrophy. *Frontiers in Plant Science* 8: 1497.

Kapteyn den Bouwmeester D.W. 1989. *Epipactis helleborine* var. *neerlandica* Vermeulen: problematiek, veldwaarnemingen, bestuivers. *Eurorchis* 1: 93-112.

Kapteyn den Bouwmeester D.W. 2012. *Epipactis helleborine* var. *neerlandica* Vermeulen: onderzoek tussen 1989 en 2011. *Liparis* 18: 37-47.

Kreutz C.A.J. & Dekker H. 2000. De orchideeën van Nederland. Ecologie, verspreiding, bedreiging, beheer. Uitgeverij Kreutz and Seckel.

Lenaerts M., Alvarez-Perez S., de Vega C., Van Assche A., Johnson S.D., Willems K.A. et al. 2014. *Rosenbergiella australoborealis* sp. nov., *Rosenbergiella collisarenosi* sp. nov. and *Rosenbergiella epipactidis* sp. nov., three novel bacterial species isolated from floral nectar. *Systematic and Applied Microbiology* 37: 402-411.

Linnaeus C. 1735. Systema naturae, sive regna tria naturae systematice proposita per classes, ordines, genera, & species. Lugduni Batavorum. Haak., Leiden. pp. 1-12.

Lowry D.B. 2012. Ecotypes and the controversy over stages in the formation of new species. *Biological Journal of the Linnean Society* 106: 241-257.

Pedersen H.E. & Ehlers B.K. 2000. Local evolution of obligate autogamy in *Epipactis helleborine* subsp. *neerlandica* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 223: 173-183.

Selosse M.-A., Faccio G., Scappaticci G. & Bonfante P. 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* 47: 416-426.

Squirrell J., Hollingsworth P.M., Bateman R.M., Tebbit M.C. & Hollingsworth M.L. 2002. Taxonomic complexity and breeding system transitions: conservation genetics of the *Epipactis leptochila* complex (Orchidaceae). *Molecular Ecology* 11: 1957-1964.

Tranchida-Lombardo V., Cafasso D., Cristaudo A. & Cozzolino S. 2011. Phylogeographic patterns, genetic affinities and morphological differentiation between *Epipactis helleborine* and related lineages in a Mediterranean glacial refugium. *Annals of Botany* 107: 427-436.

Tyteca, D. & Dufrêne, M. 1994. Biostatistical studies of western European allogamous populations of the *Epipactis helleborine* (L.) Cratz group (Orchidaceae). *Systematic Botany* 19: 424-442.

Van den Bussche W. 2000. Eerste tussentijds verslag betreffende het onderzoek naar de status van *Epipactis helleborine* var. *neerlandica*. *Liparis* 6: 43-48.

Wallace A.R. 1865. On the phenomena of variation and geographic distribution as illustrated by the Papilionidae of Malayan region. *Transactions of the Linnean Society of London* 25: 1-71.