

De fylogenie van de Europese orchideeën

MARTIN W. VAN DEN HOORN^{‡‡}

Samenvatting

Met de komst van moleculair-genetische technieken hebben taxonomen nieuwe mogelijkheden gekregen om fylogenetische relaties tussen soorten te bepalen. Ook op de orchideeënfamilie zijn deze technieken de afgelopen tien jaar toegepast. Vaak zijn de uitkomsten van deze analyses een bevestiging van de heersende taxonomische opvattingen, maar soms leiden ze ook tot verrassende resultaten. Zo heeft het toepassen van taxonomisch DNA-onderzoek binnen de Orchidinae niet geleid tot de vorming van nieuwe genera. Wel zijn er enkele genera opgeheven en zijn er wat soorten van genus verwisseld. Uit meerdere DNA-analyses blijkt dat het genus *Orchis* uit drie groepen met een verschillende oorsprong bestaat en dat twee van deze groepen samenhangen met de tot dan toe monotypische genera *Anacamptis* en *Neotinea*. De uitbreiding van het genus *Anacamptis* blijkt verrassend goed te passen bij in het veld waargenomen hybridisatiepatronen. Het monotypische genus *Aceras* blijkt te behoren tot de overgebleven *Orchissen*. Het monotypische genus *Coeloglossum* blijkt zeer verwant met *Dactylorhiza* te zijn en is door sommige auteurs dan ook opgenomen in *Dactylorhiza*. Het genus *Nigritella* op zijn beurt blijkt zeer verwant te zijn met *Gymnadenia* en is hierin opgegaan. Behalve dat sommige soorten van genus zijn verwisseld is er ook meer duidelijkheid gekomen over de relaties tussen sommige genera. Zo blijken *Chamorchis* en *Traunsteinera* nauw verwant te zijn. Hetzelfde geldt voor de genera *Steveniella*, *Comperia*, *Barlia* en *Himantoglossum*. Gedetailleerd onderzoek aan het genus *Dactylorhiza* heeft geleid tot fascinerende inzichten in de oorsprong van tetraploïde taxa. Over de fylogenetica van de genera *Ophrys* en *Serapias* was tot voor kort nog weinig duidelijk. Met de beschikbaarheid van geavanceerdere technieken is voor het genus *Ophrys* een eerste stap gemaakt naar meer inzicht in de onderlinge relatie tussen de soorten.

Zusammenfassung

Dank der Verfügbarkeit molekulargenetischer Verfahren haben die Taxonomen jetzt neue Möglichkeiten, phylogenetische Beziehungen zwischen Arten festzustellen. Auch auf die Orchideenfamilie hat man in den letzten zehn Jahren diese Verfahren angewandt. Oft bestätigen die Analysen die gängigen taxonomischen Auffassungen, aber ab und zu sind die Ergebnisse überraschend. So hat die taxonomische DNA-Forschung nicht zur Schaffung neuer Genera

^{‡‡} ALTERRA, CENTRUM ECOSYSTEMEN, POSTBUS 47, NL-6700 AA WAGENINGEN (NL)

geführt. Einige Genera wurden aber aufgehoben und einige Arten haben das Genus gewechselt. Mehrere DNA-Analysen haben ausgewiesen, dass das Genus *Orchis* aus drei Gruppen verschiedener Herkunft besteht und dass zwei dieser Gruppen mit den bisher als monotypisch betrachteten Genera *Anacamptis* und *Neotinea* zusammenhängen. Es zeigt sich, dass die Erweiterung des Genus *Anacamptis* überraschend gut zu den im Feld beobachteten Hybridisierungsmustern passt. Auch stellte sich heraus, dass das monotypische Genus *Aceras* zu den übriggebliebenen *Orchis*-Arten gehört. Das monotypische Genus *Coeloglossum* zeigte sich als nahe verwandt mit *Dactylorhiza* und wurde von einigen Autoren deshalb in *Dactylorhiza* eingegliedert. Das Genus *Nigritella* aber zeigte eine große Verwandtschaft mit *Gymnadenia* und wurde in *Gymnadenia* aufgenommen. Nicht nur haben einige Arten das Genus gewechselt, auch ist das Verhältnis zwischen einigen Genera deutlicher geworden. *Chamorchis* und *Traunsteinera* zeigten sich als nahe verwandt. Gleiches trifft für *Steveniella*, *Comperia*, *Barlia* und *Himantoglossum* zu. Genaue Untersuchungen am Genus *Dactylorhiza* führten zu faszinierenden Erkenntnissen über das Entstehen tetraploider Taxa. Bis vor kurzem war wenig über die Phylogenetik der Genera *Serapias* und *Ophrys* bekannt. Dank der Verfügbarkeit fortgeschrittener Verfahren hat man einen ersten Schritt zur Vertiefung der Einsicht in das gegenseitige Verhältnis zwischen den *Ophrys*-Arten getan.

Summary

With the availability of molecular genetic techniques, taxonomists are provided with new possibilities to determine phylogenetic relationships between species. In the last ten years, these techniques have also been applied to the Orchid family. The outcome of these analyses is often a confirmation of prevailing taxonomic concepts, but sometimes they have led to surprising results. The application of taxonomic DNA-research has not resulted in the formation of new genera within the subtribe *Orchidinae*. Some genera have been abolished and some species have been exchanged between genera. Several DNA-analyses demonstrate that the genus *Orchis* exists of three groups with a different origin. Two of these three groups turn out to belong to the hitherto monospecific genera *Anacamptis* and *Neotinea*. The expansion of the genus *Anacamptis* fits in surprisingly well with the hybridisation patterns observed in the field. The monospecific genus *Aceras* proved to be a member of the remaining part of *Orchis*. The monospecific *Coeloglossum* appears to be very closely related to *Dactylorhiza*, and some authors have included it in *Dactylorhiza*. In turn, the genus *Nigritella* appears to be very closely related to *Gymnadenia* and has been merged with *Gymnadenia*. Besides the exchange of species between genera, there is also more clarity about the relationships between some genera. The genera *Chamorchis* and *Traunsteinera* turned out to be closely related. The same

conclusion has been drawn for the genera *Steveniella*, *Comperia*, *Barlia* en *Himantoglossum*. Detailed research of the genus *Dactylorhiza* has led to fascinating insights on the origin of tetraploid taxa. Until recently, little was known about the phylogenetics of the genera *Serapias* and *Ophrys*. With the availability of more advanced techniques a first step has been made towards more insight in the mutual relationships between the species of the genus *Ophrys*.

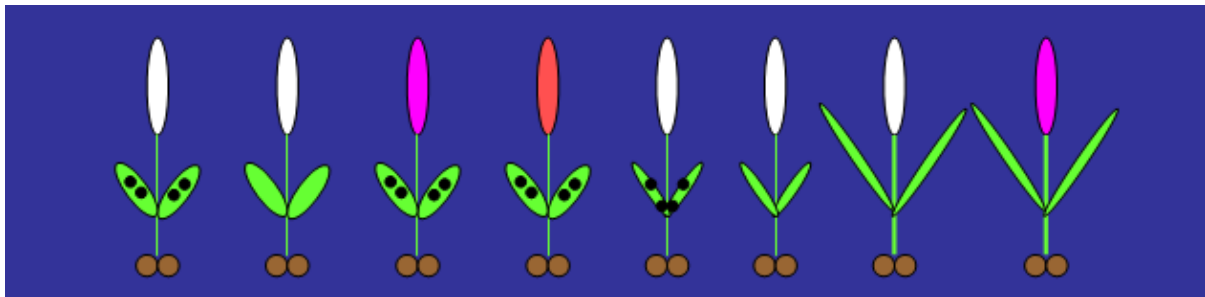
Inleiding

De moderne taxonomie heeft twee hoofddoelen. Enerzijds is dit het determineren en classificeren van individuen en anderzijds het verenigen van geclassificeerde individuen in groepen die evolutionair aan elkaar verwant zijn. De basiseenheid van de taxonomie is de soort. Tot één soort worden gerekend alle populaties of groepen van populaties waarvan de leden onder natuurlijke omstandigheden potentieel in staat zijn tot het verkrijgen van vruchtbare nakomelingen. Voor een uitgebreidere beschrijving van het begrip soort verwijs ik naar Van den Hoorn (2005) en Bock (2004). Dit artikel beperkt zich tot de onderlinge relaties van soorten die behoren tot de genera *Aceras*, *Anacamptis*, *Barlia*, *Chamorchis*, *Comperia*, *Coeloglossum*, *Dactylorhiza*, *Gymnadenia*, *Himantoglossum*, *Ophrys*, *Orchis*, *Neotinea*, *Nigritella* en *Traunsteinera* en is grotendeels ontleend aan het artikel: "Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae)" van Bateman *et al.* (2003). Waar mogelijk zijn de bevindingen van Bateman *et al.* (2003) aangevuld met resultaten uit andere onderzoeken. De bedoeling van dit artikel is om op eenvoudige wijze inzicht te verschaffen in de principes van fylogenetisch onderzoek en om de belangrijkste resultaten van dit onderzoek van de afgelopen tien jaar vereenvoudigd weer te geven, zodat er meer inzicht ontstaat in de naamswijziging die in steeds meer flora's gehanteerd wordt. De naamgeving van de in dit artikel genoemde taxa is gelijk aan die van de geciteerde artikelen.

In deze tekst worden regelmatig chromosoomaantallen genoemd. Deze zijn niet eenvoudig te bepalen en in de literatuur kunnen daarom per taxon nogal eens verschillende aantallen worden vermeld. De in dit artikel genoemde chromosoomaantallen komen alle, behalve als er naar een andere bron wordt gerefereerd, uit Pridgeon *et al.* 2001. In deze bron worden opmerkingen en kanttekeningen geplaatst bij afwijkende opgaven. Deze heb ik niet in de tekst opgenomen en ik verwijs geïnteresseerde lezers dan ook door naar deze bron. [Noot van de auteur: De in dit artikel opgenomen verwantschapsschema's zijn, voor de leesbaarheid van dit artikel, allen enigszins aangepast. Lezers die verder in de materie willen duiken verwijs ik nadrukkelijk naar de originele publicaties.]

Hoe worden evolutionaire relaties tussen soorten bepaald?

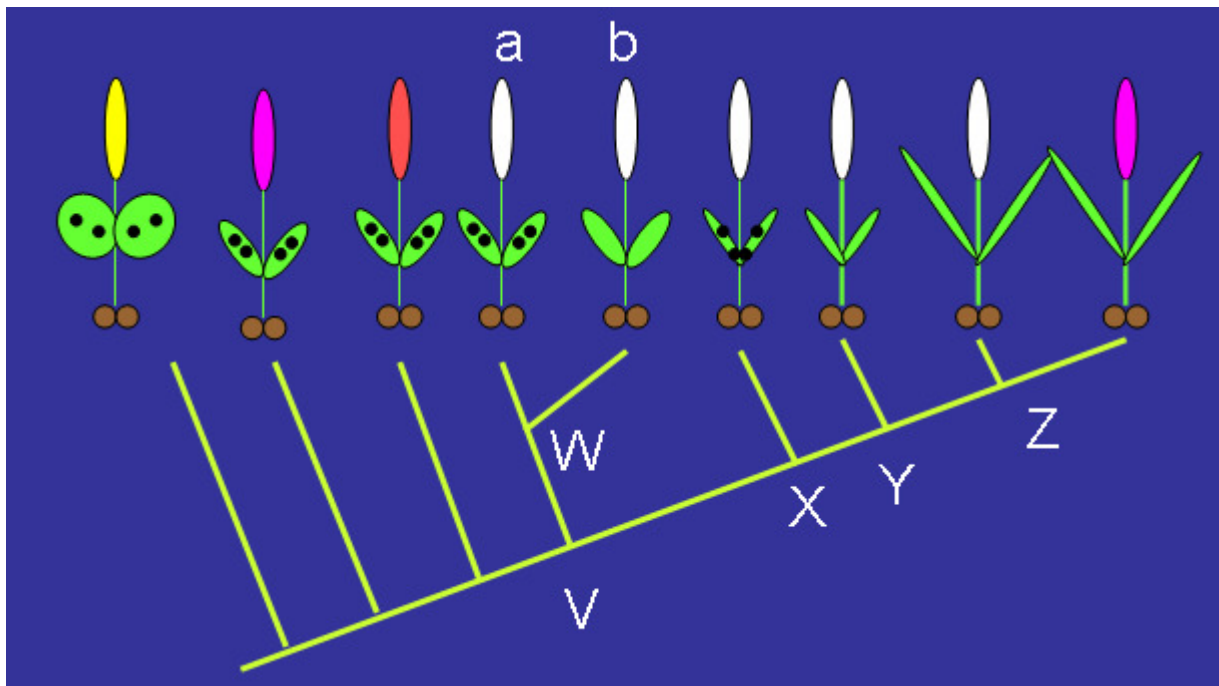
Wetenschappers die onderzoek doen naar fylogenetische relaties tussen taxa, zijn op zoek naar de eenvoudigste theorie die de waargenomen overeenkomsten tussen de te bestuderen taxa verklaart. Om dit principe wat duidelijker te maken zijn in figuur 1 acht verschillende hypothetische orchideeënsoorten weergegeven. De soorten verschillen van elkaar in bloemkleur, bladpigmentatie en bladmorphologie.



Figuur 1: Acht verschillende orchideeënsoorten, wat is hun relatie?

Om meer inzicht te krijgen in de onderlinge relaties tussen deze soorten vergelijken wetenschappers ze met één of meer andere soorten. Deze andere soorten, die de outgroup worden genoemd, zijn verwant aan de te onderzoeken soorten. Ze zijn er echter minder aan verwant dan dat de te onderzoeken soorten onderling verwant zijn. Uit de vergelijking tussen de outgroup en de te onderzoeken soorten proberen wetenschappers te achterhalen welke van de waargenomen eigenschappen “primitief” (al aanwezig bij een gezamenlijke voorouder) zijn en welke eigenschappen er later zijn ontwikkeld dan wel verloren zijn gegaan.

In figuur 2 zijn de soorten uit figuur 1 vergeleken met een outgroup. We zien dat alle soorten de eigenschap knolvormige wortels met de outgroup delen. Een volgend primitief karakter is de bladpigmentatie. De eerste drie orchideeën delen dit karakter met de outgroup. We gaan er daarom vanuit dat deze drie soorten het meest aan de outgroup verwant zijn. De plaatsing van de roze (derde plant) en de rode (vierde plant) soort met gevlekte bladeren is willekeurig, ze hadden ook omgedraaid kunnen worden. Ze worden wel dichterbij de outgroup geplaatst dan de witte omdat ze net als de outgroup bloempigmenten bevatten (we gaan er voor het gemak even vanuit dat de gele, rode en roze pigmenten ten aanzien van samenstelling op elkaar lijken). Op moment V is er een taxon geweest dat zijn bloempigmenten heeft verloren en dit taxon ligt ten oorsprong aan zowel de gevlekte witte smalbladige soorten als de gevlekte witte breedbladige soorten. Op moment W en Y zijn er soorten ontstaan die ook de bladpigmentatie hebben verloren. Uiteindelijk is er op moment Z een taxon ontstaan dat weer de mogelijkheid heeft verkregen tot het produceren van een paars pigment.



Figuur 2: Acht verschillende orchideeënsoorten vergeleken met een outgroup

Naar welke groepen zijn wetenschappers op zoek?

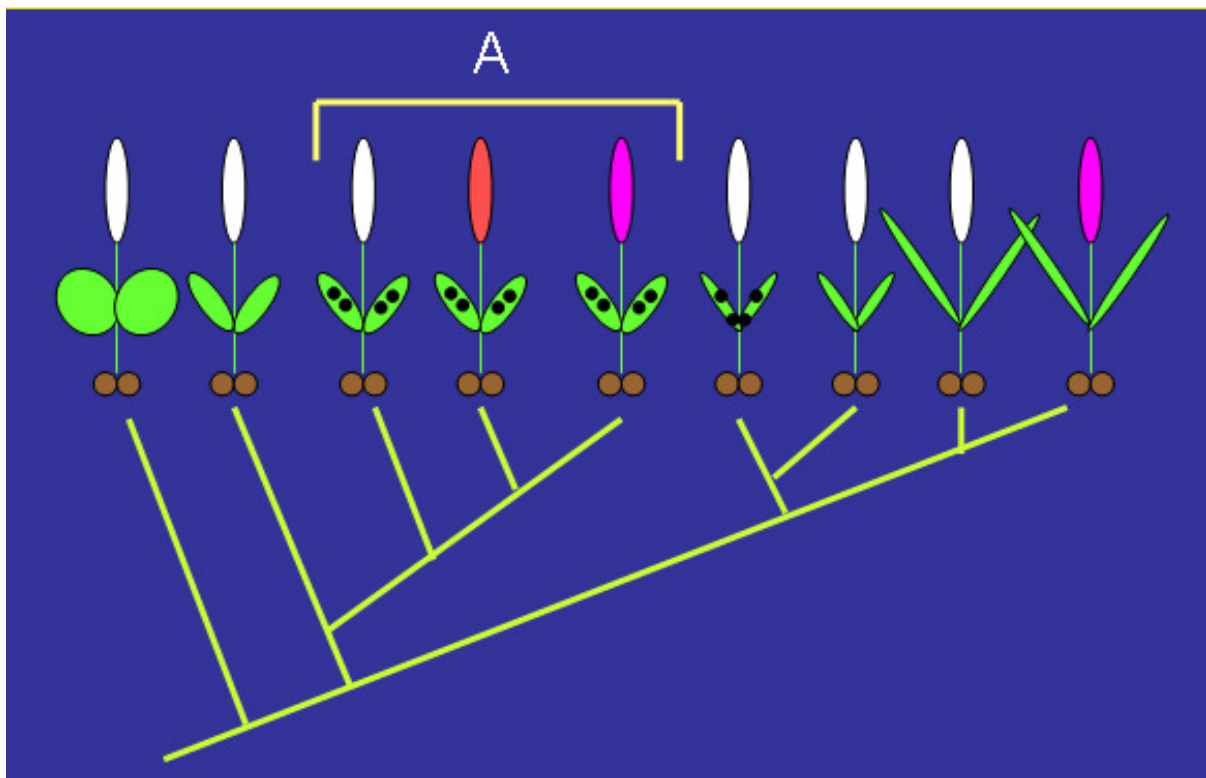
De taxonomie accepteert alleen groepen die monofyletisch zijn. Monofyletische groepen zijn groepen die slechts één oorsprong hebben. In figuur 2 zijn dit bijvoorbeeld alle soorten die vanaf moment W of X ontstaan zijn. Zouden we een groep willen onderscheiden van alleen witte orchideeën, dan creëren we een parafyletische groep. Een parafyletische groep is een groep die weliswaar één oorsprong heeft (in dit voorbeeld moment V), maar waar een deel van is weggelaten. In dit voorbeeld missen we dan de smalbladige paarse orchidee. Wanneer we een groep zouden willen maken van alleen ongevlekte soorten, dan creëren we een polyfyletische groep. Een polyfyletische groep is een groep waarvan de leden meerdere ontstaansmomenten hebben gehad. In dit voorbeeld dan moment W en Y.

Hoe stabiel is nu zo'n fylogenetische indeling?

Wanneer we naar plant a en b in figuur 2 kijken, dan zien we dat deze maar in één eigenschap van elkaar verschillen. Binnen deze analyse kunnen deze planten dan ook geheel legitiem van plaats wisselen. Hun plaatsing is volkomen willekeurig en hangt af van de evolutionaire hypothese die de onderzoeker aanhangt. Het zal duidelijk zijn dat wanneer er binnen een fylogenetische analyse maar weinig onderscheidende eigenschappen voorhanden zijn, het totale beeld geheel kan wijzigen wanneer een nieuw taxon wordt toegevoegd, wanneer er meer onderscheidende eigenschappen bekend worden of wanneer er een andere outgroup wordt gekozen. Dit laatste is weergegeven in figuur 3. Aan de

uitkomst van een dergelijke analyse kan dan ook maar weinig waarde worden gehecht.

De mate waarin een uitkomst van een fylogenetische analyse bestand is tegen het toevoegen van nieuwe informatie noemen we de robuustheid. Deze robuustheid van een fylogenetische indeling kan met een computerprogramma wiskundig worden getest. Globaal komt het er op neer dat er wordt uitgezocht hoeveel eigenschappen van een taxon of groep van taxa moeten worden vervangen door eigenschappen van andere taxa binnen de gegevensset, voordat de indeling verandert. Wanneer de eigenschap bladpigmentatie van groep A in figuur 3 wordt gewijzigd, blijft de figuur gelijk. Het wijzigen van de eigenschap bladbreedte verandert de figuur echter totaal. De mate van robuustheid wordt in het Engels “bootstrap support” genoemd en wordt uitgedrukt in een percentage. Wanneer een groep van taxa een hoog percentage bootstrap support (bijvoorbeeld > 80%) bezit, betekent dit dat de leden van deze groep onderling veel unieke eigenschappen delen die andere groepen niet bezitten en een dergelijke indeling wordt dan als betrouwbaar bestempeld. (Het bovenstaande is ontleend aan Chase 1999.)



Figuur 3: Acht verschillende orchideeënsoorten vergeleken met andere een outgroup

Morfologie versus moleculaire genetica

Bloemmorfologie is altijd de belangrijkste pijler geweest van de orchideeëntaxonomie (Chase 1999). Bloemen hebben echter maar relatief weinig verschillende eigenschappen en zijn door bestuiversvoorkeuren waarschijnlijk relatief makkelijk en snel te beïnvloeden. Ook andere morfologische eigenschappen zijn maar beperkt voorhanden en het verzamelen ervan is heel arbeidsintensief. Zo gebruikten Freudenstein *et al.* (1999) voor hun fylogenetische analyse van de orchideeënfamilie slechts 53 morfologische karakters. Naast de beperktheid van het aantal aanwezige morfologische eigenschappen is het ook vaak moeilijk om te achterhalen of twee verschillende sterk op elkaar gelijkende eigenschappen nu uit elkaar of onafhankelijk van elkaar ontstaan zijn. Vanwege deze problemen wordt er steeds meer gebruik gemaakt van moleculair-genetische technieken. In dit artikel wordt er globaal aan drie verschillende technieken gerefereerd, waarvan de essentie hieronder kort besproken wordt.

Allozymtechnieken

Een organisme maakt voor zijn functioneren gebruik van tal van enzymen. De code voor het maken van een enzym ligt opgeslagen in het DNA. Wanneer tijdens de vorming van zaad- en eicellen het DNA van een organisme wordt doorgegeven aan het nageslacht, is de kans aanwezig dat er tijdens het kopiëren van het DNA een foutje optreedt. Vaak zal dit resulteren in een code voor een niet werkend enzym en zal het nageslacht niet levensvatbaar zijn. Soms echter resulteert dit in een enzym van een wat andere samenstelling, maar functioneert het even goed als het originele enzym. Twee verschillende enzymen met dezelfde werking worden allozymen genoemd. In fylogenetische analyses wordt van verschillende enzymen bekeken hoeveel varianten er zijn en hoe deze zijn verdeeld over de onderzochte taxa. Planten met vergelijkbare allozymen worden als verwant beschouwd en planten met verschillende allozymen als minder verwant.

De lengte van DNA-fragmenten

Een andere moleculair-genetische techniek is de RFPL-methode. RFPL staat voor Restriction Fragment Length Polymorphism en deze methode kijkt naar de lengte van DNA-fragmenten wanneer een DNA-molecuul wordt behandeld met knipenzymen. Een DNA-molecuul is opgebouwd uit vier verschillende bouwstenen. Deze bouwstenen worden aangeduid met de letters A,C,G en T. Een DNA-molecuul kan worden gezien als een heel lang woord bestaande uit talloze combinaties van deze vier letters. Knipenzymen herkennen bepaalde lettercombinaties en knippen het DNA-molecuul op deze combinaties door, en creëren zo een mix van DNA-fragmenten van verschillende lengte. Door nu de lengte van de DNA-fragmenten van verschillende soorten onderling te

vergelijken kan men een idee van de verwantschap krijgen. Nadeel van deze methode is dat er alleen wordt gekeken naar de lengte van de fragmenten en niet naar de inhoud.

De inhoud van DNA

De meest geavanceerde moleculair-genetische methode kijkt naar de inhoud van het DNA. Van een bepaald stuk DNA waarvan men weet of vermoedt dat er veel variatie te verwachten is, wordt de volgorde van de bouwstenen A,C,G en T bepaald en vergeleken met de volgorde van hetzelfde stuk DNA bij andere planten. Het voordeel van de laatste methode, die DNA-sequencing wordt genoemd, is dat er nu een vrijwel onuitputtelijke bron van informatie ontstaat. Mocht het onderzochte stuk DNA in een fylogenetische analyse niet voldoende bootstrap support opleveren, dan kan er relatief eenvoudig een ander stuk DNA worden onderzocht en worden toegevoegd aan de analyse. Een voorbeeld hiervan zullen we zien bij de behandeling van de genera *Coeloglossum* en *Dactylorhiza*. Het overgrote deel van het DNA van een plant zit in de kern van elke plantencel en is een mix van het DNA van de beide ouderplanten. Behalve in de celkern bevindt zich bij planten onder andere ook nog een beetje DNA in de chloroplasten (bladgroenkorrels). Het DNA in de chloroplasten erft alleen over van moeder- op dochterplant en is dus heel bruikbaar in onderzoek naar hybridisatie.

Een in taxonomische en fylogenetische studies veel gebruikt stuk DNA uit de celkern is het ITS-DNA. ITS-DNA bevat veel variatie en is zelfs uit kleine hoeveelheden DNA relatief eenvoudig te vermeerderen (Baldwin *et al.* 1995). Wanneer het gebruik van ITS-DNA niet voldoende informatie oplevert, wordt er in recentere studies vaak ook gekeken naar het verwante ETS-DNA.

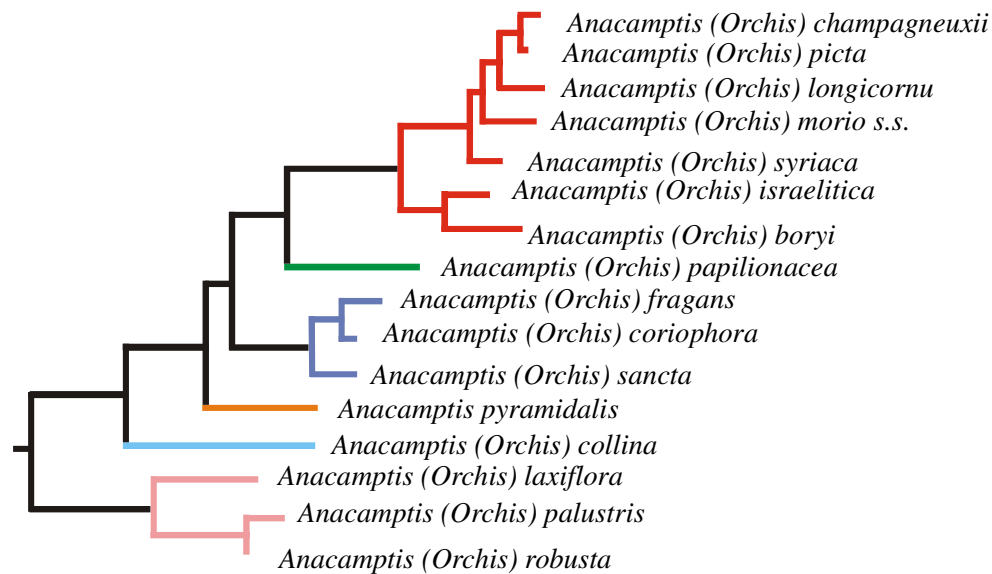
Het gebruik van moleculaire technieken binnen de subtribus Orchidinae

In de laatste twee decennia zijn er verschillende moleculair-genetische analyses uitgevoerd op soorten binnen de subtribus Orchidinae. Over het algemeen hebben de allozym-, RFPL- en chloroplast-DNA analyses weinig duidelijkheid opgeleverd over de fylogenetische relaties binnen de Orchidinae. Oorzaken van deze tegenvallende resultaten waren onder andere het te lage aantal onderzochte taxa en/of een onjuiste keuze van de outgroup. Cozzolino *et al.* publiceerden in 1996 de eerste resultaten van DNA-sequencing van een stukje DNA uit de celkern. Na de analyse van Cozzolino volgden er andere en vaak uitgebreidere analyses waarin meer DNA en meer soorten werden geanalyseerd (Pridgeon *et al.*, 1997, Bateman *et al.* 1997, Aceto *et al.* 1999, Cozzolino *et al.* 2001). In 2003 werd de meest uitgebreide analyse gepubliceerd door Bateman *et al.* en deze zal als leidraad dienen voor dit artikel; het is een uitbreiding en verfijning

van vorige onderzoeken. Eerder gepubliceerde resultaten die overeenstemmen met Bateman *et al.* (2003), zoals bijvoorbeeld de opdeling van *Orchis s.l.*, zullen daarom niet apart als referentie worden genoemd. In de analyse van Bateman *et al.* (2003) werden 187 taxa vergeleken. Het gebruikte DNA leverde 744 kenmerken op waarvan er uiteindelijk 443 bruikbaar bleken voor de analyse, die twaalf duidelijke groepen opleverde. Het grootse deel van deze groepen heeft een hoge bootstrap support, maar de relaties tussen de groepen is onduidelijk. De genera *Aceras*, *Anacamptis*, *Barlia*, *Chamorchis*, *Comperia*, *Coeloglossum*, *Dactylorhiza*, *Gymnadenia*, *Himantoglossum*, *Ophrys*, *Orchis*, *Neotinea*, *Nigritella* en *Traunsteinera* worden verdeeld over negen groepen, die in deze bijdrage één voor één de revue zullen passeren, waar mogelijk aangevuld met resultaten uit andere onderzoeken.

Groep *Anacamptis s.l.*

Een van de duidelijkste uitkomsten van de analyse van Bateman *et al.* (2003) is dat het genus *Orchis*, zoals dat bijvoorbeeld in Delforge 1995 wordt gehanteerd, niet monofyletisch is maar uit drie verschillende groepen bestaat. Erg verrassend is dit natuurlijk niet, want een ieder die enigszins thuis is in de Europese orchideeën weet dat de bloemvariabiliteit binnen *Orchis s.l.* veel groter is dan binnen de andere Europese genera, zoals *Dactylorhiza*, *Ophrys* of *Serapias*. Dit is in het verleden door meerdere auteurs onderkend en er zijn dan ook meerdere pogingen ondernomen om delen van *Orchis s.l.* onder te brengen in nieuwe genera. Voorbeelden hiervan zijn de taxa *O. papilionacea s.l.* en *O. collina* die door Löve & Löve in 1972 zijn ondergebracht in het genus *Vermeulenia* (Löve & Löve, 1972) of de taxa *O. coriophora s.l.* en *O. sancta* die op basis van pigmentanalyses door Klein & Strack zijn ondergebracht in *Anteriorchis*. (Strack *et al.* 1989). Juist deze bovenstaande taxa waarvoor al eens voorstellen waren gedaan om ze van *Orchis* af te splitsen bleken in de genoemde analyses samen met de taxa rond *O. morio* en *O. palustris* een monofyletische groep te vormen. Onverwacht was echter dat in deze groep ook *Anacamptis pyramidalis* terechtkwam. Het door Bateman *et al.* (2003) gepubliceerde verwantschapsschema van deze groep, die we vanaf nu *Anacamptis s.l.* noemen, is weergegeven in figuur 4.

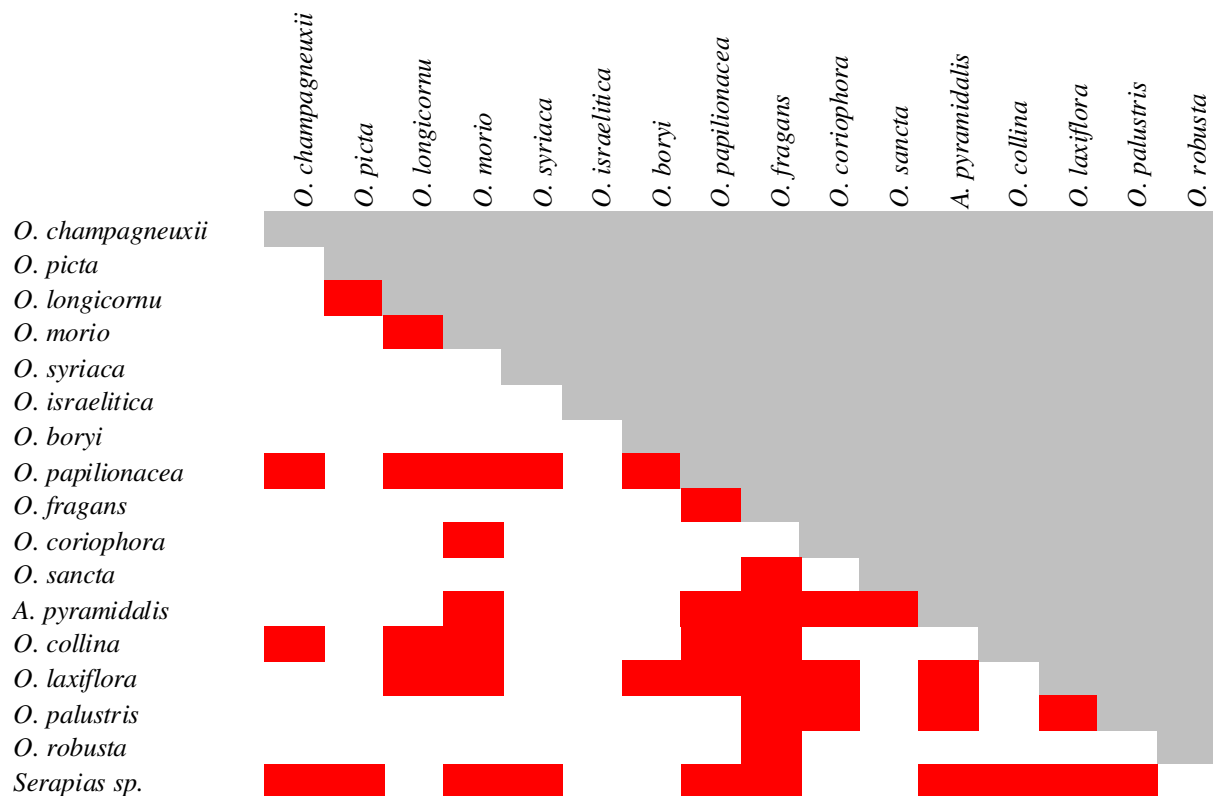


Figuur 4: Het verwantschapsschema van *Anacamptis* s.l., gewijzigd naar Bateman et al. (2003)

In de figuur is te zien dat de taxa die worden gerekend tot de *O. morio*-groep (rood), de *O. coriophora*-groep (donkerblauw) en de *O. palustris*-groep (roze) in de analyse ook per groep bij elkaar komen. Deze groepen hebben elk een bootstrap support van 99 tot 100% en dus een heel eigen karakter. De *O. morio*-groep is verder onder te verdelen in de *O. israelitica/boryi*-groep (bootstrap support 92%) en de *champagneuxii/picta/longicornu/morio/syriaca*-groep (bootstrap support 90%). Deze tweedeling is terug te vinden in hun bloeiwijze. Bij *O. israelitica* en *O. boryi* openen zich eerst de bloemen aan de bovenzijde van de bloeiaar, bij de andere groep openen zich eerst de bloemen aan de onderzijde. *O. picta* groepeerd met bootstrap support van 65 % samen met *O. champagneuxii* en ligt dus dichterbij *O. champagneuxii* dan bij *O. morio*.

De taxa *A. pyramidalis* (oranje), *O. papilionacea* (groen) en *O. collina* (lichtblauw) hebben elk een eigen karakter en de plaatsing van deze taxa binnen het verwantschapsschema is vrij willekeurig. Toch hebben ze samen met de *O. morio*-groep en de *O. coriophora*-groep een bootstrap support van 89%. Hun onderlinge plaatsing binnen het verwantschapsschema is dan wel niet duidelijk, maar dat ze erin thuishoren wel! Wordt aan deze groepen ook nog de *O. palustris*-groep toegevoegd, dan daalt de bootstrap support naar 59%. Hieruit is te concluderen dat de *O. palustris*-groep minder goed past binnen *Anacamptis* s.l. en dat ze mogelijk als een apart genus kan worden opgevat. Bateman et al. (2003) melden echter dat chloroplast-DNA-gegevens wel wijzen op een echt *Anacamptis*-karakter van de *O. palustris*-groep. De enige soort uit de *O. palustris*-groep die Cozzolino et al. (2001) wel hebben geanalyseerd en Bateman et al. 2003 niet, is *O. dinsmorei*. Uit deze analyse kwam naar voren dat *O. dinsmorei* behoort tot de *O. palustris*-groep en dus ook een lid van *Anacamptis* s.l. is.

Op het eerste gezicht is *Anacamptis s.l.* een heterogene groep. Wanneer we echter een en ander beter bekijken, dan zien we dat deze groep wel degelijk eigenschappen heeft die haar afscheiden van de rest van *Orchis s.l.* Alle taxa van *Anacamptis s.l.* hebben bijvoorbeeld 36 chromosomen. De enige uitzondering hierop is *O. papilionacea* met 32 chromosomen. De overige twee *Orchis s.l.*-groepen hebben over het algemeen 42 of $2 \times 42 = 84$ chromosomen. (Pridgeon *et al.* 2001). Een ander aspect betreft het hybridisatiepatroon. In figuur 5 is een overzicht gegeven van hybridisaties van taxa uit *Anacamptis s.l.* Alleen de door Bateman *et al.* (2003) geanalyseerde taxa zijn weergegeven. Voor dit overzicht is gebruik gemaakt van de door Klein (2004) opgegeven geverifieerde hybriden, aangevuld met de hybride van *O. fragrans* x *O. robusta* (Bateman *et al.* 2004).



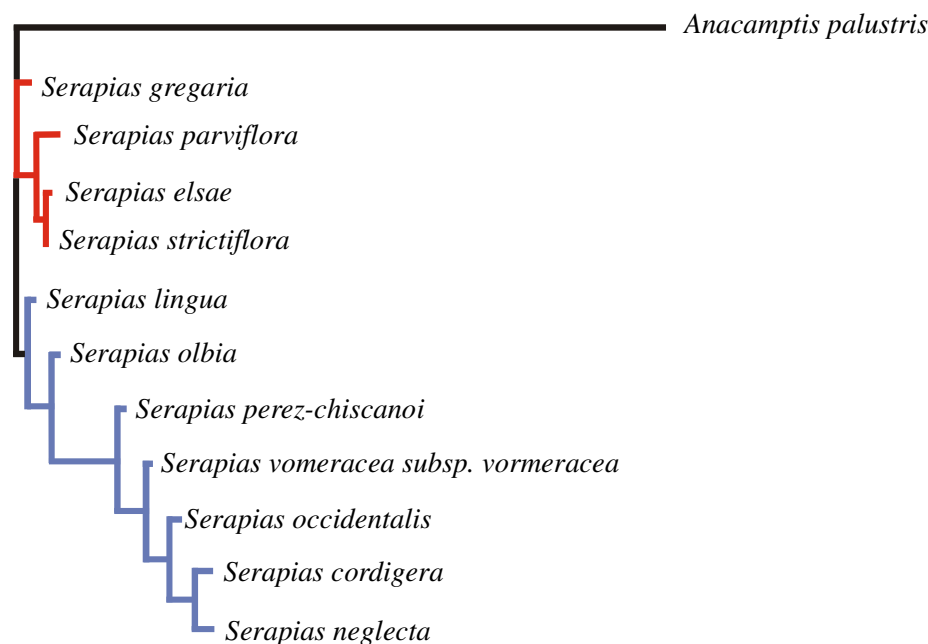
Figuur 5: Hybridisaties bij *Anacamptis s.l.*

Wanneer we het schema goed bekijken, zien we dat de taxa van *Anacamptis s.l.* over het algemeen hybridiseren met leden van de eigen groep en met *Serapias*. Volgens Bateman (2004) is betrouwbaar bewijs voor hybridisaties met andere genera dan *Serapias* erg zeldzaam en moeten zulke meldingen met de nodige scepsis worden beoordeeld, zeker wanneer het taxa uit de rest van *Orchis s.l.* betreft. Sowieso stelt Bateman dat elke opgave van een hybride eigenlijk

morfometrisch en moleculair-genetisch onderzocht dient te worden om de waarde van de hybride vast te stellen. Zo toonden Pellegrino *et al.* (2000) bijvoorbeeld aan dat een veronderstelde hybride tussen *Neotinea maculata* en *Aceras anthropophorum* niets anders was dan een afwijkende *N. maculata*. Concluderend kunnen we stellen dat het hybridisatiepatroon van de taxa die tot *Anacamptis s.l.* worden gerekend, een natuurlijke verwantschap tussen de taxa onderstreept.

Groep *Serapias*

Uit de analyse van Bateman *et al.* (2003) volgde dat het genus *Serapias* een monofyletische groep is (bootstrap support 100%). *Serapias* is het meest aan *Anacamptis s.l.* verwant. Deze verwantschap wordt niet ondersteund door een hoge bootstrap support, maar is wel in lijn met de van *Serapias* bekende hybridisaties. Die vinden alleen plaats met taxa uit de *Anacamptis s.l.* groep. Verder hebben ze net als *Anacamptis s.l.* 36 chromosomen. Een uitzondering hierop zijn *S. lingua* met 72 (2 x 36) en *S. olbia* met 108 (3 x 36) chromosomen (Venhuis *et al.* 2007). Binnen de zeven door Bateman *et al.* (2003) geanalyseerde taxa was geen noemenswaardige variatie in het ITS-DNA te ontdekken en er werd dus niets duidelijk over de relaties binnen het genus. Iets meer inzicht geeft het artikel van Venhuis *et al.* (2007). Hierin werden elf taxa op 23 morfologische kernmerken onderzocht en dit leverde het verwantschapsschema op dat is afgebeeld in figuur 6. De onderzochte taxa zijn in twee groepen te verdelen: een kleinbloemige groep (rood) bestaande uit *S. gregaria*, *S. parviflora*, *S. elsae* en *S. strictiflora* en een grootbloemige groep (blauw) bestaande uit de overige taxa.



Figuur 6: Verwantschapsschema van *Serapias*, gewijzigd naar Venhuis *et al.* 2007

Uit analyses die in dit artikel worden besproken, komen verder nog de volgende vier interessante zaken naar voren:

1. Vanwege zijn hexaploïde chromosoomaantal is *S. olbia* waarschijnlijk van hybridogene oorsprong. De ene ouder is waarschijnlijk de tetraploïde *S. lingua* is en de andere ouder is mogelijk *S. vomeracea* subsp. *vomeracea*.
2. *S. lingua* is mogelijk een tetraploïde afstammeling van *S. strictiflora*.
3. *S. occidentalis* is een intermediair tussen *S. vomeracea* subsp. *vomeracea* en *S. cordigera* en dit is een indicatie dat dit taxon van hybridogene oorsprong is.
4. *S. elsaе* lijkt zo op *S. strictiflora* dat ze kan worden beschouwd als variëteit van *S. strictiflora*

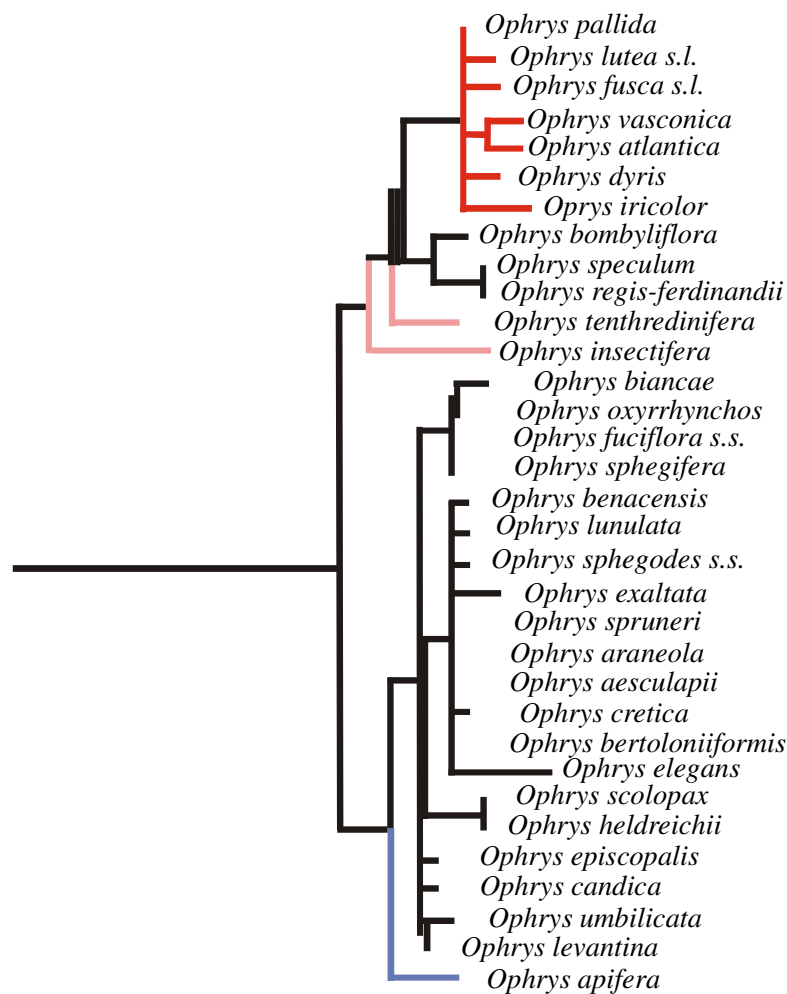
Groep *Ophrys*

Net als *Serapias*, is *Ophrys* in de analyse van Bateman *et al.* (2003) een duidelijke monofyletische groep (100 % bootstrap support) die verwant is aan *Serapias* en *Anacamptis s.l.* Hybridisaties tussen *Ophrys* en andere genera zijn niet bekend, maar *Ophrys*-taxa hebben net als *Anacamptis s.l.* en *Serapias* 36 of 72 (2 x 36) chromosomen. Bateman *et al.* (2003) hebben 33 *Ophrys*-taxa geanalyseerd. Soliva *et al.* (2001) hebben in een vergelijkbare studie, waarin zowel ITS-DNA als chloroplast-DNA is vergeleken, 32 taxa geanalyseerd. Beide studies, die 15 taxa gemeen hebben, kwamen tot de conclusie dat er binnen het onderzochte DNA van het genus *Ophrys* maar zeer weinig variatie aanwezig is en dat er dus maar weinig duidelijk is over de onderlinge relaties tussen de *Ophrys*-taxa. De studie van Bateman geeft de meeste informatie en het verkregen verwantschapsschema is afgebeeld in figuur 7. In deze analyse wordt het genus *Ophrys* verdeeld in twee groepen. De ene groep bestaat uit taxa met over het algemeen een relatief eenvoudige lip, de andere groep bestaat uit taxa met een veel complexere driedimensionale lip.

In zowel de studie van Bateman *et al.* (2003) als die van Soliva *et al.* (2001) kwam de *O. fusca-lutea* groep (rood) als monofyletisch naar voren. De *O. fusca-lutea* groep bevat in de analyse van Bateman ook *O. pallida*, een taxon dat zowel wat lijkt op *O. bombyliflora* als op de *O. fusca-lutea* taxa. Soliva *et al.* (2001) hebben dit taxon niet geanalyseerd. In figuur 7 is te zien dat een opdeling van het genus in de twee secties *Pseudophrys* (afzetting van pollinia op het achterlijf van de bestuiver) en *Euophrys* (afzetting van pollinia op de kop van de bestuiver), niet opgaat. De sectie *Pseudophrys* (de *fusca-lutea* groep) is weliswaar monofyletisch, maar de sectie *Euophrys* blijkt parafyletisch te zijn.

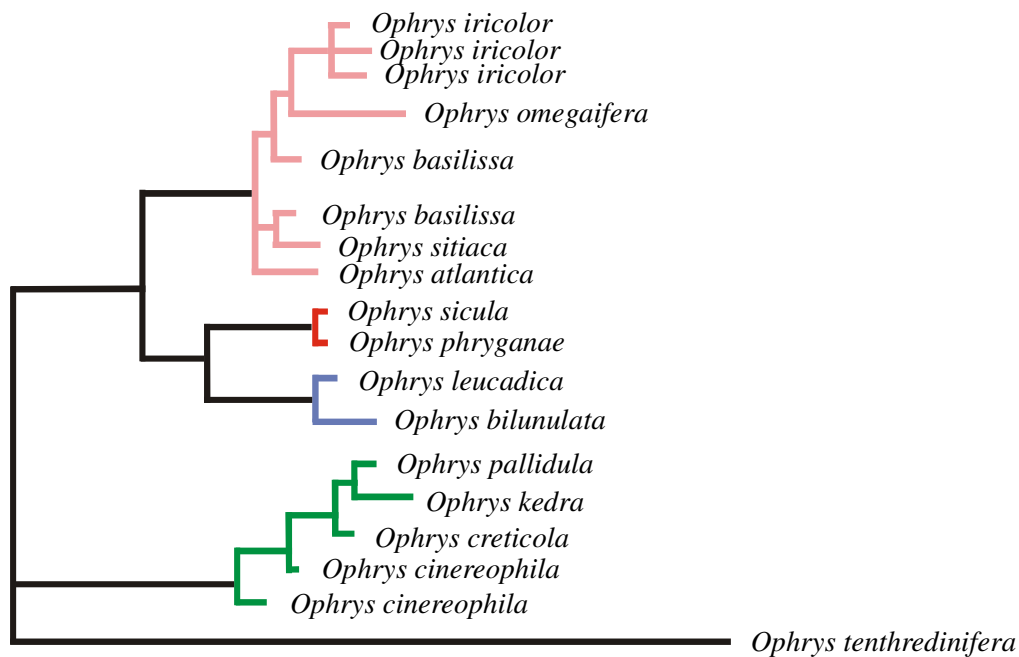
Een ander resultaat van deze studie is dat *O. apifera* (blauw) een “oude” afscheiding lijkt te zijn binnen de groep met een complexe driedimensionale lip.

De taxa *O. insectifera* en *O. tenthredinifera* (roze) waren volgens Bateman *et al.* (2003) moeilijk te plaatsen. In de analyse van Bateman is *O. insectifera* meer geassocieerd met de *Ophrys*-taxa met een eenvoudige lip, in de analyse van Soliva *et al.* lijkt *O. insectifera* meer geassocieerd te zijn met de andere groep. Het zal duidelijk zijn dat vanwege de geringe genetische variatie in het onderzochte DNA er niet te veel waarde aan bovenstaande uitkomsten kan worden gehecht. Uitgebreidere en meer geavanceerde technieken zijn nodig om meer duidelijkheid te krijgen over de relaties binnen het genus *Ophrys*. Een eerste stap hierin is gemaakt door Schlüter *et al.* (2007) die een ander en veel complexer deel van het DNA binnen de sectie *Pseudophrys* hebben geanalyseerd. Een samenvatting daarvan is weergegeven in figuur 8. Uit al hun berekeningen kwam naar voren dat de taxa *O. sicula* en *O. phryganae* één groep vormen (rood) en dat dit een zustergroep is van de morfologisch hier sterk op gelijkende *O. leucadica* en *O. bilunulata* (blauw). Beide groepen samen vormen een zustergroep van de taxa rond *O. omegaifera* (roze), waartoe ook *O. iricolor* en *O. atlantica* blijken te behoren. De laatste groep (groen) bevat *O.*



cinereophila en enkele (nog niet alle formeel beschreven) taxa van Kreta.

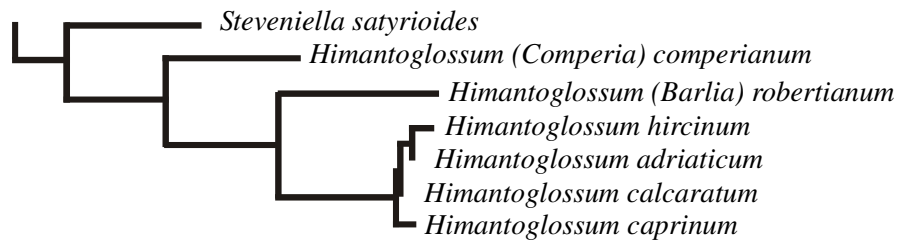
Figuur 7: Het door Bateman et al. verkregen verwantschapsschema van *Ophrys*, gewijzigd naar Bateman et al. 2003



Figuur 8: Het door Schlüter et al. verkregen verwantschapsschema van *Ophrys*, gewijzigd naar Schlüter et al. 2007

Groep *Steveniella*, *Comperia*, *Barlia* en *Himantoglossum*

De volgende monofyletische groep die uit de analyse van Bateman *et al.* (2003) naar voren komt, is een zustergroep van de vorige drie groepen en bestaat uit de genera *Steveniella*, *Comperia*, *Barlia* en *Himantoglossum* (figuur 9). Ook de vier genera zelf zijn op zich monofyletisch. De kern van de groep wordt gevormd door het genus *Himantoglossum*, met een bootstrap support van 100%. Verwant aan dit genus is het genus *Barlia*, ook met een bootstrap support van 100%. *Comperia* op zijn beurt is weer verwant aan de vorige twee genera met een bootstrap support van 87%. *Steveniella* is als laatste genus, met een bootstrap support <50% , verwant aan de rest. Wanneer we de regels van de monofylie volgen, dan is het verdedigbaar om alle genera onder te brengen in één groot genus. Maar ook de combinatie *Himantoglossum* en *Barlia*, of de combinatie *Himantoglossum*, *Barlia* en *Comperia* zouden als een genus kunnen worden aangemerkt (zie bijvoorbeeld Delforge 2001). In tegenstelling tot de vorige groepen heeft deze *Steveniella/Comperia/Barlia/Himantoglossum*-groep geen gemeenschappelijk chromosoomaantal. *Comperia* heeft 30 chromosomen, *Himantoglossum* en *Barlia* hebben er 36 en *Steveniella* 38.

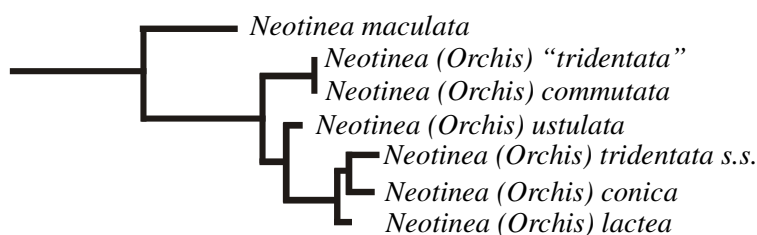


Figuur 9: Het door Bateman et al. (2003) verkegen verwantschapsschema van *Himantoglossum*, *Barlia*, *Comperia* en *Steveniella*, gewijzigd naar Bateman et al. (2003)

Groep *Neotinea s.l.*

Zoals onder de groep *Anacamptis s.l.* al is aangegeven, is in deze analyse het genus *Orchis* in drie groepen uiteengevallen. De tweede groep daarvan bestaat uit de taxa *O. tridentata*, *O. commutata*, *O. ustulata*, *O. lactea* en *O. conica*. Deze vormen samen met *Neotinea maculata* een monofyletische groep met een bootstrap support van 100% (figuur 10). Ze vormen een zustergroep van de vorige vier groepen.

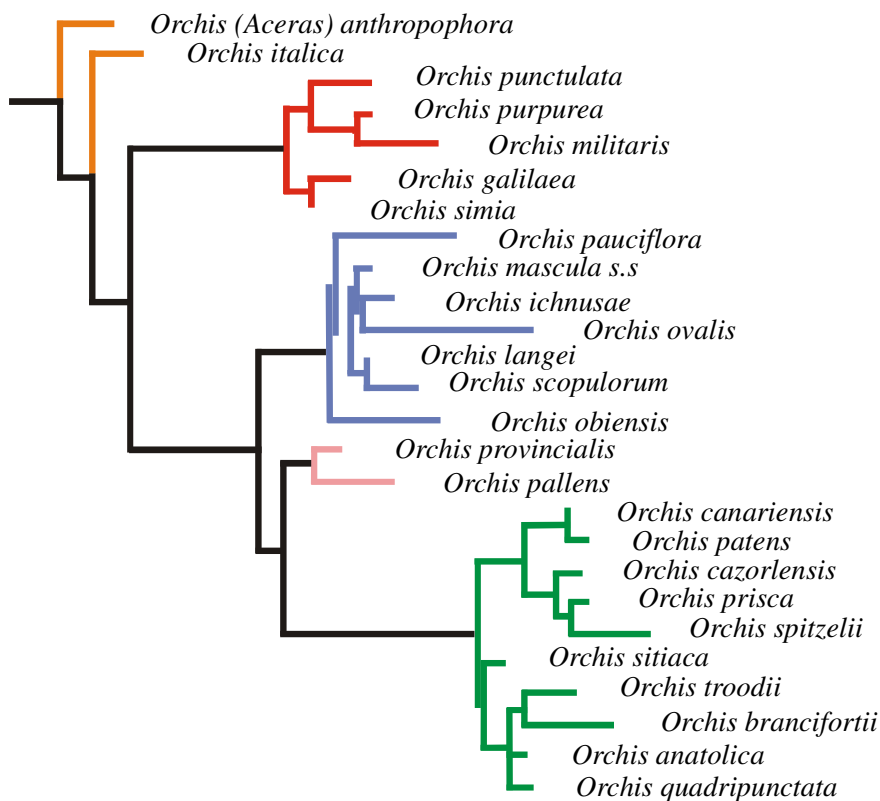
Ook de taxa die afkomstig zijn uit het genus *Orchis* vormen een monofyletische groep met een bootstrap support van 100%. Deze *O. tridentata* groep zou eventueel als een apart, nieuw te beschrijven genus naast *N. maculata* kunnen worden opgevat. Er zijn echter meerdere overeenkomsten tussen *N. maculata* en andere taxa die er voor pleiten om het geheel als één genus te zien. Zo hebben alle taxa kleine bloemen en een drielobbig lip. Verder heeft recent onderzoek aangetoond dat de zaden van *Neotinea s.l.* een duidelijke eigen combinatie van vorm en structuur hebben en de onderzoekers concluderen dan ook dat dit een valide ondersteuning is voor de monofylie van *Neotinea s.l.* (Gamarra et al. 2007). Ten slotte hebben de leden van *Neotinea s.l.* een chromosoomaantal van 42 of 84 (2 x 42). Deze aantallen hebben ze gemeenschappelijk met *Orchis s.s.*, maar het scheidt ze wel af van *Anacamptis s.l.* Het onderzoek van Bateman et al. (2003) bracht verder aan het licht dat er behoorlijke genetische verschillen bestaan tussen *O. commutata* en *O. tridentata*. Dit ontkracht de hypothese dat *O. commutata* een tetraploïde vorm van *O. tridentata* is. De in figuur 10 weergegeven *Neotinea (Orchis) "tridentata"* berust volgens Bateman et al. (2003) op een determinatiefout en deze wordt door hem gerekend tot *Orchis commutata*.



Figuur 10: Het door Bateman et al. (2003) verkregen verwantschapsschema van *Neotinea s.l.* gewijzigd naar Bateman et al. (2003)

Groep *Orchis* s.s.

De overgebleven *Orchissen* (figuur 11) vormen in de analyse van Bateman *et al.* (2003) tezamen met *Aceras anthropophorum* een monofyletische groep (Bootstrap support 97%). De groep heeft een chromosoomaantal van 42 of 84 (2 x 42). *Aceras anthropophorum* en *O. italica* (oranje) zijn de oudste afscheidingen binnen de groep. Tussen de analyses van Bateman *et al.* (2003), Aceto *et al.* (1999) en Cozzolino *et al.* (2001) zitten kleine verschillen in de onderlinge plaatsing van deze twee taxa, maar in alle analyses zitten ze aan de basis van het genus *Orchis* s.s. Binnen *Orchis* s.s. vormen de overige “antropomorfe” taxa een monofyletische groep. Hybridisaties tussen *A. anthropophorum* en leden van deze groep versterken het beeld van een nauwe relatie tussen *A. anthropophorum* en (een deel van) *Orchis* s.s. De rest van *Orchis* s.s. valt in de volgende groepen uiteen: de geel bloeiende combinatie *O. pallens/provincialis* (roze, bootstrap support 77%), de taxa rond *O. mascula*, inclusief de geel bloeiende *O. pauciflora* (blauw, bootstrap support 97%) en het *O. spitzelii/anatolica/quadrupunctata*-complex (groen, bootstrap support 100%). Het feit dat de geelbloeiende *O. pauciflora* niet samen groepeert met geel bloeiende *O. pallens* en *O. provincialis* is door Bateman *et al.* (2003) extra geverifieerd door een ander exemplaar uit een ander land te analyseren. Het resultaat bleef hetzelfde. Cozzolino *et al.* (2001) en Aceto *et al.* 1999 vonden echter dat *O. provincialis* meer verwant was aan *O. mascula* dan aan *O. pauciflora*.



Verrassend is ook dat *O. spitzelii* meer verwant is aan *O. prisca* dan aan *O. cazorlensis*.

Figuur 11: Het door Bateman *et al.* (2003) verkregen verwantschapsschema van *Orchis* s.s. met *Aceras* gewijzigd naar Bateman *et al.* (2003)

Groep *Traunsteinera/Chamorchis*

Een heel verrassende uitkomst van de analyse van Bateman *et al.* (2003) is dat de alpine/boreale taxa *Traunsteinera* en *Chamorchis* samen een monofyletische groep vormen (bootstrap support 100%). Morfologisch lijken ze geheel niet op elkaar en ten aanzien van de bloeiwijze zou men eerder verwachten dat *Traunsteinera* bijvoorbeeld verwant is met *Neotinea* en *Chamorchis* bijvoorbeeld met *Coeloglossum*. Het enige dat beide taxa ogenschijnlijk bindt is hun habitat en het is aannemelijk dat een gezamenlijke voorouder ook een alpine en/of boreale verspreiding heeft gehad.

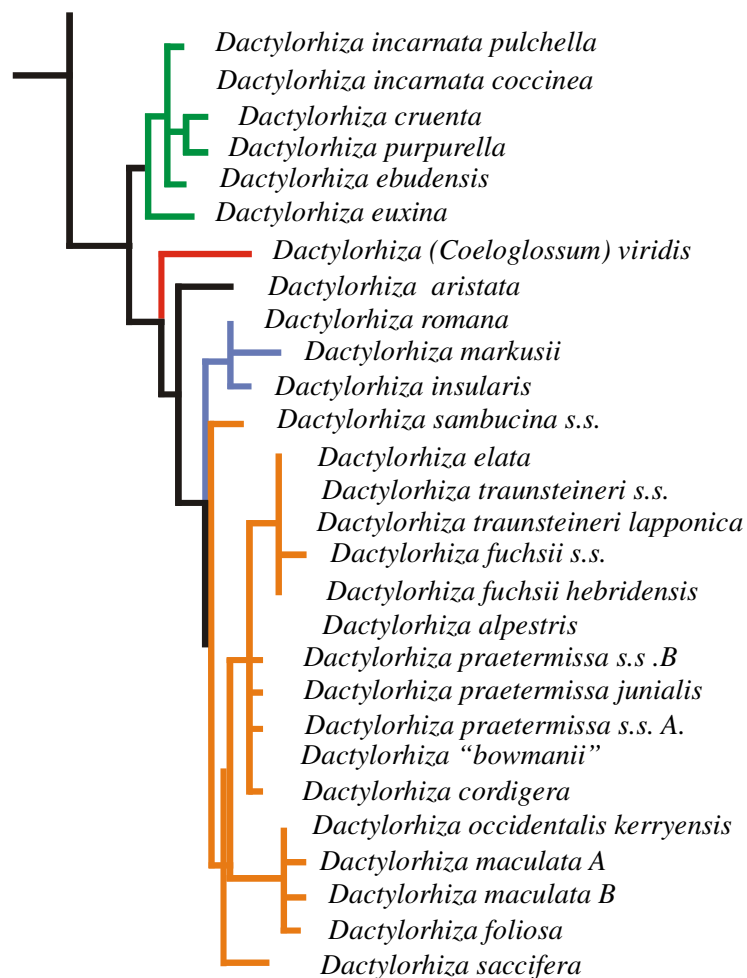
Groep *Dactylorhiza/Coeloglossum*

De volgende monofyletische groep die uit de analyse van Bateman *et al.* (2003) naar voren komt is de combinatie van de genera *Dactylorhiza* en *Coeloglossum* (figuur 12). Omdat *Coeloglossum viride* in de oorspronkelijke analyse van Pridgeon *et al.* (1997) midden tussen de *Dactylorhiza*'s terecht kwam, besloten Bateman *et al.* (1997) dat *Coeloglossum* tot de *Dactylorhiza*'s gerekend diende te worden. Het genus *Dactylorhiza* zou immers anders parafyletisch worden. De nauwe relatie tussen *Dactylorhiza* en *Coeloglossum* was, vanwege het incidenteel optreden van kruisingen tussen de beide genera, al langer bekend. Weinigen hadden echter verwacht dat het van *Dactylorhiza* morfologisch totaal afwijkende genus *Coeloglossum* een onderdeel van *Dactylorhiza* zou blijken te zijn. En het is ook maar de vraag of dit zo is. Bateman *et al.* (1997) hebben door het onderbrengen van *Coeloglossum* bij *Dactylorhiza* wetenschappelijk gezien de enige juiste weg bewandeld, maar hadden vanwege de lage variatie in het onderzochte ITS-DNA mijns inziens wat gereserveerder moeten zijn. Door Devos *et al.* (2006a) is namelijk opnieuw een DNA-analyse van *Coeloglossum* en een deel van het genus *Dactylorhiza* uitgevoerd. Naast ITS-DNA is ook ETS-DNA onderzocht. De combinatie van deze twee typen DNA had een groter oplossend vermogen dan het ITS-DNA alleen en in deze analyse kwam *Coeloglossum* weer als zelfstandig genus naar voren, weliswaar zeer nauw verwant aan *Dactylorhiza*. Bateman is echter nog niet overtuigd van de noodzaak om *Coeloglossum* als zelfstandig genus te zien, dus het laatste woord is hierover nog niet gesproken (Bateman 2007).

Wanneer we verder kijken in het geslacht *Dactylorhiza*, dan komen in de analyse van Bateman *et al.* (2003) drie monofyletische groepen naar voren. Als eerste zijn daar de taxa rond *D. incarnata* (groen). De klassieke *D. incarnata*-taxa groeperen samen met een bootstrap support van 76 %. Wordt ook *D. euxina* tot deze groep gerekend, dan daalt het bootstrap support naar 51%. *D. euxina* lijkt dus niet zo goed bij de overige *D. incarnata* taxa te passen. Dit wordt ondersteund door allozymstudies van Hedrén (2001). Hij komt tot de conclusie

dat er binnen de taxa rond *D. incarnata* geen verschil zit in de door hem onderzochte allozymen, maar dat *D. euxina* hier echt van afwijkt.

De volgende twee groepen zijn de geel gekleurde *Dactylorhiza*'s, zonder *D. sambucina* (blauw, bootstrap support 91%) en de tetraploïde taxa aangevuld met *D. sambucina* en de taxa rond *D. fuchsii* en *D. maculata* (oranje, bootstrap support <50%). *D. iberica* is door Bateman *et al.* (2003) pas in een laat stadium van zijn onderzoek op juiste wijze geanalyseerd en kon niet meer worden afgebeeld in het verwantschapsschema. In de tekst vermeldt hij dat *D. iberica* bij *C. viride* en *D. aristata* wordt geplaatst. Ook Hedrén (2001) komt tot de conclusie dat *D. iberica* t.a.v. de door hem onderzochte allozymen een totaal eigen plaats in neemt en dus geen nauw verwante taxa kent.



Figuur 12 : Het door Bateman *et al.* (2003) verkregen verwantschapsschema van *Dactylorhiza* met *Coeloglossum* gewijzigd naar Bateman *et al.* (2003)

Over het algemeen zijn de verschillen die door Bateman *et al.* (2003) in het ITS–DNA zijn gevonden niet erg groot en veel waarde kan aan deze indeling dan ook niet worden gehecht. Het betreft een eerste aanzet en ook de hybridogene oorsprong van veel taxa bemoeilijkt een juiste interpretatie. Aan het genus *Dactylorhiza* is de afgelopen jaren echter veel onderzoek verricht en de belangrijkste resultaten zullen worden besproken

***Dactylorhiza romana/sambucina*-complex**

Hoewel de analyse van Bateman *et al.* (2003) suggereert dat het *D. romana/sambucina*-complex niet monofyletisch is, wijst een onderzoek van Hedrén *et al.* (2001) hier wel op. Pedersen (2006) beschouwt het complex in ieder geval als een aparte morfologische en biologische groep, afgescheiden van de rest. Pedersen heeft in 2006 een onderzoek aan allozymen en morfologie gepubliceerd van taxa uit deze groep. Onderzocht zijn: *D. sambucina*, *D. markusii*, *D. romana*, *D. insularis*, *D. flavescens* en een indeterminabel taxon uit Spanje. Met uitzondering van de triploïde *D. insularis* en het mogelijk tetraploïde onbekende taxon uit Spanje, zijn alle soorten diploïd. De allozymgegevens suggereren dat er een duidelijk verschil tussen *D. sambucina* aan de ene kant en *D. romana s.s.*, *D. flavescens* en *D. markusii* aan de andere kant is. Dit ondersteunt dus de tweedeling van Bateman *et al.* (2003). Binnen *D. romana s.l.* is er een relatief duidelijke scheiding tussen *D. romana s.s.*, *D. markusii* en *D. flavescens*. De *D. markusii* onderzocht op Sicilië lijkt sterker op *D. romana s.s.* dan op de onderzochte Spaanse *D. markusii*. Op basis van allozym- en morfometrische data rekent Pedersen (2006) de Siciliaanse *D. markusii* tot *D. romana s.s.* en de Spaanse tot een apart taxon. Hij beschrijft dit taxon als *D. romana ssp. guimaraesii*. *Dactylorhiza flavescens* wijkt te weinig af van *D. romana* en wordt beschreven als *D. romana ssp. georgica*.

Het niet-determineerbare taxon uit Spanje is waarschijnlijk een allotetraploïd. De morfometrische data en de combinatie van morfometrische data en allozymgegevens geven genoeg aanleiding om het indeterminabele taxon af te scheiden van *D. insularis* en het wordt door Pedersen (2006) beschreven als *D. cantabrica*. Zowel de relatieve genetische verschillen tussen locale populaties als de absolute graad van genetische differentiatie waren in verhouding met de andere diploïde taxa het hoogste bij *D. romana s.s.* Hieruit kan worden geconcludeerd dat *D. romana s.s.* de oudste binnen de groep is en dit taxon zal dan ook het dichtste bij een gezamenlijke voorouder staan. Vanwege de hoge genetische diversiteit die gevonden is binnen *D. romana s.l.* en *D. sambucina*, is hun evolutionaire scheiding waarschijnlijk het gevolg van een splitsing van de oerpopulatie in twee vrij grote subpopulaties. De relatief grote genetische diversiteit van *D. romana ssp. georgica* maakt het voor de hand liggend dat de vorming van dat taxon het gevolg is van een verdere (gedeeltelijke) opdeling

van *D. romana*. *Dactylorhiza romana* ssp. *guimaraesii* heeft maar een geringe genetische variatie en is dus waarschijnlijk het resultaat van een isolatie van een kleine randpopulatie van *D. romana*.

Het onderzoek van Pedersen onderschrijft de conclusie van Bullini *et al.* (2001) dat *D. insularis* waarschijnlijk het resultaat is van een kruising tussen *D. sambucina* en *D. romana* s.s., maar noemt ook als mogelijkheid *D. sambucina* x *D. romana* ssp. *guimaraesii*. Ook *D. cantabrica* is waarschijnlijk het resultaat van een kruising tussen *D. sambucina* en *D. romana* ssp. *romana*/*D. romana* ssp. *guimaraesii*. Ook *D. insularis* x *D. sambucina* is een mogelijkheid.

***Dactylorhiza maculata*-complex**

Uit de allozymonderzoeken van Hedrén (1996, 2001) komt naar voren dat ten aanzien van de door hem onderzochte allozymen er geen verschillen zitten tussen *D. maculata*, *D. fuchsii* en *D. saccifera*, en hij rekent ze alle drie tot *D. maculata* s.l. Onduidelijk is echter hoe deze drie taxa zich onderling verhouden. Hierin is meer duidelijkheid gekomen door de DNA-analyses van Devos *et al.* (2005). Zij hebben ITS- en ETS-DNA van *D. maculata*, *D. fuchsii*, *D. saccifera* en *D. foliosa* vergeleken. Aan de hand hiervan bleken deze vier taxa goed van elkaar te scheiden. Ze hebben dus elk duidelijk een eigen karakter. Een deel van de onderzochte *D. fuchsii*'s echter bleek te groeperen met *D. maculata* of *D. saccifera*. Dit betekent dat er in de door Devos *et al.* (2006b) onderzochte *D. fuchsii*'s dus drie afstammingslijnen te onderscheiden waren. Eén bestaande uit zuivere *D. fuchsii*'s, één uit *D. fuchsii*'s met deels *D. saccifera*-DNA en één uit *D. fuchsii*'s met deels *D. maculata*-DNA. De auteurs concluderen hieruit dat er kennelijk hybridisaties plaatsvinden (of hebben gevonden) tussen *D. fuchsii* en de andere twee taxa. Vanwege het feit dat *D. maculata* tetraploïd is en *D. fuchsii* diploïd liggen frequente hybridisaties (met fertiele nakomelingen) tussen beide taxa niet voor de hand. Zowel Devos *et al.* (2003) als Hedrén (2003) concluderen echter dat dergelijke hybridisaties waarschijnlijk regelmatig voorkomen. Sinds de publicatie van Hedréns allozymstudie in 1996 is de heersende hypothese dat *D. maculata* een autotetraploïde soort is die ontstaan is uit de diploïde *D. fuchsii*. Alle DNA-onderzoeken (Bateman *et al.* 2003, Hedrén *et al.* 2001, Devos *et al.* 2006b) wijzen er echter op dat *D. maculata* sterk verwant is met *D. foliosa*. Deze endemische soort van Madeira is vanwege zijn geïsoleerde voorkomen nooit als mogelijke oudersoort van *D. maculata* gezien. Devos *et al.* (2006b) suggereren dan ook dat *D. maculata* door autopolyploidie afstamt van een (nu waarschijnlijk uitgestorven) op *D. foliosa* lijkende voorouder en niet van een aan *D. fuchsii* verwant taxon.

De tetraploïde *Dactylorhiza*'s

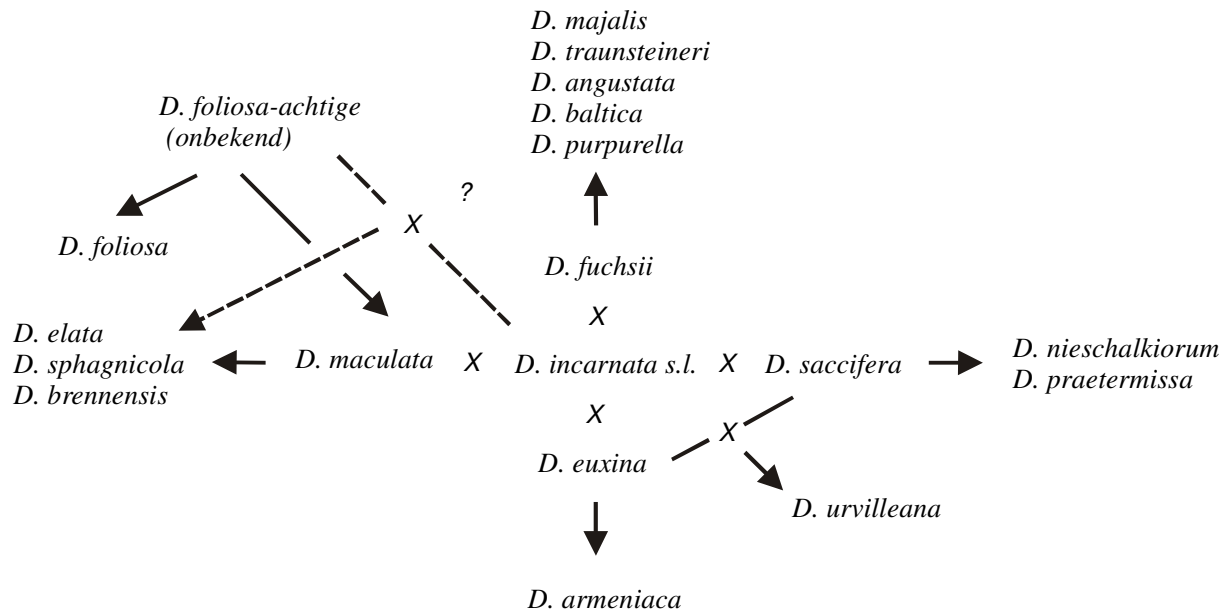
Hedrén (1996, 2001) deelt met behulp van allozymstudies de door hem onderzochte diploïde *Dactylorhiza*'s, samen met de tetraploïde *D. maculata*, in de volgende vier groepen in:

1. *D. incarnata* s.l. (*D. incarnata* s.s., *D. cruenta*, *D. ochroleuca*, *D. osmanica* en *D. umbrosa*),
2. *D. maculata* s.l. (*D. fuchsii*, *D. maculata* s.s., en *D. saccifera*)
3. *D. euxina*
4. *D. iberica*

Aan de hand van allozymen toont Hedrén (1996) aan dat de tetraploïde *Dactylorhiza*'s uit Noord- en West-Europa het gevolg zijn van herhaalde hybridisaties tussen *D. incarnata* s.l. en *D. maculata* s.l. Sommige van deze tetraploïde taxa zijn genetisch coherent over grote gebieden, andere zijn van veel recentere oorsprong en komen slechts op een paar locaties voor. In Turkije speelt nog een derde hybridisatiepartner in de vorm van *D. euxina* een rol en daar liggen de relaties veel gecompliceerder. *Dactylorhiza armeniaca* lijkt het gevolg te zijn van een hybridisatie tussen *D. euxina* en *D. incarnata* s.l., *D. nieschalkiorum* is waarschijnlijk het resultaat van een kruising tussen *D. saccifera* en *D. incarnata* s.l. en *D. urvilleana* van een kruising tussen *D. saccifera* en *D. euxina* (Hedrén 2001).

Alhoewel allozymstudies interessante aspecten over de oorsprong van de tetraploïde *Dactylorhiza*'s aan het licht brengen, missen ze toch het nodige aan oplossend vermogen. Meer duidelijkheid geven de DNA-analyses van Devos *et al.* (2006b). Zij komen tot de volgende conclusies: *D. elata*, *D. brennensis* en *D. sphagnicola* zijn het product van kruisingen tussen *D. maculata* (of zijn diploïde voorouder) en *D. incarnata*. *Dactylorhiza majalis*, *D. traunsteineri*, en *D. angustata* zijn het gevolg van kruisingen tussen de onder het *D. maculata*-complex besproken zuivere *D. fuchsii*-lijn en *D. incarnata* s.l. *D. praetermissa* is waarschijnlijk het resultaat van een kruising tussen *D. saccifera* en *D. incarnata*. Shipunov *et al.* (2005) hebben onderzoek gedaan naar de oorsprong van *D. baltica*. Zij komen tot de conclusie dat ook *D. baltica* een kruisingsproduct is van *D. fuchsii* en *D. incarnata*. De taxa die tot *D. baltica* worden gerekend zijn waarschijnlijk een verzameling van meerdere recente een vaak locale hybridisaties. Volgens Shipunov *et al.* (2005) is de situatie voor *D. purpurella* vergelijkbaar.

Figuur 13 geeft het geheel nog eens schematisch weer:



Figuur 13: Onderlinge relaties tussen *Dactylorhiza*'s

Groep *Gymnadenia s.l.*

Nauw verwant aan de groep *Dactylorhiza/Coeloglossum* (bootstrap support tussen beide groepen 82 %) is de monofyletische groep bestaande uit *Gymnadenia* en *Nigritella* (bootstrap support 100%). In figuur 14 is het verwantschapsschema van *Gymnadenia* en *Nigritella* weergegeven. In 2006 is het verwantschapsschema nog verder uitgebreid met *G. frivaldii* en dit taxon komt in de analyse tussen *G. borealis* en *G. densiflora* te liggen (Bateman *et al.* 2006). Net zoals *Coeloglossum* midden tussen de *Dactylorhiza*'s terecht kwam, komt *Nigritella* tussen de *Gymnadenia*'s terecht. Om ervoor te zorgen dat *Gymnadenia* geen parafyletisch geslacht wordt is *Nigritella* door Bateman *et al.* 1997 dan ook weer opnieuw opgenomen in *Gymnadenia* (Reichenbach rekende *N. nigra* in 1856 al tot *Gymnadenia*). En net zoals bij *Coeloglossum* en *Dactylorhiza* was de nauwe relatie tussen *Gymnadenia* en *Nigritella* door het optreden van hybriden al bekend. De bootstrap support tussen *G. densiflora* en *Nigritella* (90%) is echter veel hoger dan tussen *Coeloglossum* en zijn *Dactylorhiza*-zuster groep (63%) en is dus een sterke aanwijzing dat *Nigritella* echt tot *Gymnadenia* behoort.



Figuur 14: Het door Bateman et al. (2003) verkregen verwantschapsschema van *Gymnadenia* met *Nigritella* gewijzigd naar Bateman et al. (2003)

Toch zijn er enkele bedenkingen op te werpen. Allozymanalyses (Hedrén *et al.* 2000) en ongepubliceerde chloroplast-DNA-analyses (vermelding in Bateman et al. 2006) geven aan dat *Gymnadenia* en *Nigritella* weliswaar sterk verwant zijn, maar niet noodzakelijk tot één genus behoren. Bateman *et al.* (2006) gaan er vanuit dat *Nigritella* een pedomorfe vorm van *Gymnadenia* is. Een pedomorfe vorm is een verschijning waarin de ontwikkeling van de bloem vroegtijdig is stopgezet. Kort door de bocht gezegd, zou een nog niet volledig ontwikkelde *Gymnadenia*-bloem dan lijken op die van een *Nigritella*. Minder sterke vormen van pedomorfie zouden kunnen hebben geleid tot *G. frivaldii* en *G. odoratissima*. Deze taxa hebben immers een korte spoor en een veel minder uitgesproken drielobbige lip. Een andere mogelijkheid voor de herkomst van *G. frivaldii* is een kruising tussen *G. odoratissima* en *N. rhellicani* (Bateman *et al.* 2006). Voor een vergelijking zie Delforge 2006 pagina 151 en 155. Mocht deze hypothese juist zijn, dan is dit niet het enige geval van kruising tussen *Gymnadenia* en *Nigritella* die heeft geleid tot een nieuwe soort. Ook *Nigritella runei* vindt volgens Hedrén (1999) zijn oorsprong in zo'n kruising, namelijk tussen *G. conopsea* en *N. nigra*.

Omdat in alle onderzoeken de nauwe relatie tussen *Gymnadenia* en *Nigritella* naar voren komt en gegeven het feit dat *N. runei* en mogelijk *G. frivaldii* het product zijn van *Gymnadenia* x *Nigritella*, kan ik, zeker gecombineerd met de hypothese dat *Nigritella* een pedomorfe vorm van *Gymnadenia* is, op dit moment niets anders dan concluderen dat *Nigritella* een onderdeel van *Gymnadenia* is.

Een ander opmerkelijk aspect van de groep *Gymnadenia/Nigritella* is het feit dat de morfologisch goed te onderscheiden *G. odoratissima* en *G. conopsea* sterk verwant zijn, terwijl de vaak als varianten van *G. conopsea* aangemerkte *G. densiflora* en *G. borealis* hier veel verder van af staan. Een duidelijk verschil tussen *G. densiflora* en *G. conopsea* is zowel moleculair-genetisch aan te tonen als morfometrisch (Marholt *et al.* 2005). Bateman *et al.* 2006 maken echter melding van een Bulgaarse *G. densiflora*, die ten aanzien van het onderzochte DNA identiek was aan *G. conopsea* en beschouwen deze dan ook als een foutief gedetermineerd exemplaar. Mocht deze redenering juist zijn, dan zijn er dus *G. densiflora*-planten die heel sterk lijken op sommige forse *G. conopsea*-planten,

maar in werkelijkheid een heel andere oorsprong hebben. Waarschijnlijk is er rond *G. conopsea* nog veel te ontdekken!

De ITS-DNA-analyses konden geen onderscheid maken tussen de drie onderzochte *Nigritella*-soorten. Allozymonderzoek van Hedrén *et al.* (2000) heeft toch enkele interessante aspecten over de onderlinge relaties tussen de *Nigritella*-taxa aan het licht gebracht. De tetraploïde *N. (nigra subsp.) austriaca* en *N. (nigra subsp.) iberica* zijn nauw verwant aan de triploïde *N. (nigra subsp.) nigra* en zijn waarschijnlijk het product van een kruising tussen *N. (nigra subsp.) nigra* en een diploïd taxon. *N. archiducis-joannis* en *N. widderi* stammen vermoedelijk af van een vergelijkbare set van voorouders. Hetzelfde kan worden geconcludeerd voor *N. miniata* en *N. stiriaca*. *Nigritella buschmanniae* is waarschijnlijk het product van een kruising tussen *N. widderi* en een diploïd taxon.

Conclusie

Moleculair-genetische technieken hebben veel duidelijk gemaakt over de onderlinge relaties tussen de Europese orchideeën. De op het eerste gezicht soms merkwaardige indelingen blijken vaak verrassend goed te kloppen bij waargenomen hybridisatiepatronen en chromosoomaantallen. De huidige beschikbare technieken brengen binnen de genera *Dactylorhiza* en *Gymnadenia* intrigerende mechanismen van soortvorming aan het licht. Toch blijft er nog veel onduidelijk. Voor gedetailleerdere inzichten binnen de genera *Ophrys*, *Serapias* en in mindere mate *Dactylorhiza*, zijn meer verfijnde methoden nodig.

Literatuur

Aceto S., Caputo P., Cozzolino S., Gaudio L., Moretti A. 1999. Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13:67–76.

Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter M.J., Wojciechowski M.F., Campbell C.S., and Donoghue M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence in angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri botanical garden* 82: 247–277.

Bateman R.M., Pridgeon A.M., Chase M.W. 1997. Phylogenetics of the subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences 2. Infrageneric relationships and taxonomic revision to achieve monophyly of *Orchis* sensu stricto. *Lindleyana* 12: 113-141.

Bateman R.M., Hollingsworth P.M., Preston J., Yi-Bo L., Pridgeon A.M., Chase M.W. 2003. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected

Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 1–40.

Bateman R.M., Hollingsworth P.M. 2004. Morphological and molecular investigation of the parentage and maternity of *Anacamptis x albuferensis* (*A. fragrans* x *A. robusta*), a new hybrid orchid from Mallorca, Spain. *Taxon* 53(1): 43-54.

Bateman R.M. 2004. Hybridisation evidence supports the new improved *Anacamptis*. *Journal of the Hardy Orchid Society* 1(2) no. 32: 34-42.

Bateman R.M., Rudall P.J., James K.E. 2006 Phylogenetic context, generic affinities and evolutionary origin of the enigmatic Balkan orchid *Gymnadenia frivaldii* Hampe ex Griseb. *Taxon* 55 (1): 107-118.

Bateman R.M. 2007. Whatever happened to the genus *Orchis*? *The Orchid Review*. Vol. 115 No. 1278. November-December p. 322-329

Bock W.J. 2004. Species: the concept, category and taxon. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 42: 178-190, Berlin.

Bullini L., Cianchi R., Arduino P., De Bonis L. Mosco M.C., Verardi A., Porretta D., Corria B., Rossi W. 2001. Molecular evidence for allopolyploid speciation and a single origin of the western Mediterranean orchid *Dactylorhiza insularis* (Orchidaceae) *Botanical Journal of the Linnean Society* 72: 193–201

Cozzolino S., Caputo P., Aceto S., Rossi W., De Luca P. 1996. Testing the usefulness of ITS1 sequence as a tool to infer relationships in *Orchis* L. *Delpinoa* 33/34: 77-85

Cozzolino S., Aceto S., Caputo P., Widmer A., Dafni A. 2001. Speciation processes in Eastern Mediterranean *Orchis* s.l. species: molecular evidence and the role of pollination biology.

Israel Journal of Plant Sciences 49: 91–103.

Chase M.W. 1999. Molecular systematics, parsimony and Orchid classification. In: *Genera Orchidacearum. General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae*. Oxford University Press 81-88.

Devos N., Tyteca D., Rapé O. Wesselingh R.A., Jacquemart A.L. 2003. Patterns of chloroplast diversity among Western European *Dactylorhiza* species (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 245 85-97.

Devos N., Oh S.H., Raspé O., Jacquemart A.L., Manos P.S. 2005. Nuclear ribosomal DNA sequence variation and evolution of spotted marsh-orchids (*Dactylorhiza maculata* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 658-580.

Devos N., Raspé O., Jacquemart A.L., Tyteca D. 2006a. On the monophyly of *Dactylorhiza Necker* ex Nevski (Orchidaceae): is *Coeloglossum viride* (L.)

Hartman a *Dactylorhiza* ? Botanical Journal of the Linnean Society 152: 261–269

Devos N., Raspé O., Oh S.H., Tyteca D., Jacquemart A.L. 2006b. The evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) allotetraploid complex: Insights from nrDNA and cpDNA PCR-RFLP data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:767-778

Delforge P. 1995. *Orchids of Britain & Europe*. HarperCollinsPublishers London 480pp

Delforge P. 2006. *Orchids of Europe, North Africa and the middle East*. A&C Black London 640pp.

Freudenstein J.V., Rasmussen F.N. 1999. What does morphology tell us about orchid relationships? A cladistic analysis. *American Journal of Botany* 86: 225–248.

Gamarra R., Dorda E., Scrugli A. 2007. Seed micromorphology in the genus *Neotinea* Rchb.f.

(Orchidaceae, Orchidinae) *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 133–140

Hedrén M. 1996. Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae): evidence from allozyme markers. *Plant Systematics and Evolution* 201: 31–55.

Hedrén M. 1999. Kommentarer om brudkullan och dess ursprung [Comment on *Gymnigritella runei* (Orchidaceae) and its origin.]. *Svensk Botanisk Tidsskrift* 93: 145–151.

Hedrén M., Klein E., Teppner H. 2000. Evolution of polyploids in the European orchid genus *Nigritella*; evidence from allozyme data. *Phyton* 40: 239–275.

Hedrén M. 2001. Systematics of the *Dactylorhiza euxina/incarnata/maculata* polyploid complex (Orchidaceae) in Turkey: evidence from allozyme data. *Plant Systematics and Evolution* 229:23-44

Hedrén M., Fay M.F.H., Chase M.W. 2001. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 88:1868-1880.

Hoorn M.W. van den 2005. *Het soortbegrip bij orchideeën*. *Eurorchis* 17:43-53. KNNV Utrecht.

Klein E. 2004. Das intersektionale und intergenetische Hybridisierungsgeschehen in der Gattung *Orchis* (Orchidaceae – Orchidinae) und seine Relevanz für die systematische Gliederung dieser Gattung. *Journal Europäischer Orchideen* 36 (3): 637-659.

Löve A., Löve D. 1972. *Vermeulenia* - A new genus of orchids. *Acta Bot. Neerl.* 21: 553–554.

- Marhold K., Jongepierová I., Krahulcová A., Kučera J. 2005. Morphological and karyological differentiation of *Gymnadenia densiflora* and *G. conopsea* in the Czech Republic and Slovakia. *Preslia, Praha* 77:159-176.
- Pedersen H.Æ. 2006. Systematics and evolution of the *Dactylorhiza romana/sambucina* polyploid complex (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 152:405-434.
- Pellegrino G., Scrugli A., Caputo P., D'Emerico S., Cozzolino S. 2000. *x* *Neotiaceras mattinatae* phenotype: is a hybrid always a hybrid? *Journal Europäischer Orchideen* 32(1):113-122.
- Pridgeon A.M., Bateman R.M., Cox A.V., Hapeman J.R., Chase M.W. 1997. Phylogenetics of the subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis* sensu lato. *Lindleyana* 12:89-109
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W., Rasmussen F.N. 2001. *Genera Orchidacearum* Volume 2 Orchidoidea (Part 1). Oxford University Press. 416 pp.
- Schlüter P.M., Kohl G., Stuessy T.F., Paulus H.F. 2007. A screen of low-copy nuclear genes reveals the LFY gene as phylogenetically informative in closely related species of orchids (*Ophrys*). *Taxon* 56 (2) :493-504
- Shipunov A.B., Fay M.F., Chase M.W. 2005. Evolution of *Dactylorhiza baltica* (Orchidaceae) in European Russia: evidence from molecular markers and morphology. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147:257-274
- Strack D., Busch E., Klein E. 1989. Anthocyanin patterns in european orchids and their taxonomic and phylogenetic relevance. *Phytochemistry* 28(8): 2127-2139
- Soliva M., Kocyan A., Widmer A. 2001. Molecular phylogenetics of the sexually deceptive orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20: 78–88.
- Venhuis C., Venhuis P., Oostermeijer J.B.G., Tienderen P.H. 2007. Morphological systematics of *Serapias* L. (Orchidaceae) in Southwest Europe. *Plant Systematics and Evolution* 265: 165–177