
Duinwespenorchis: standplaatsvariatie of soort in wording?

Marije Kuiper¹, Gerard Oostermeijer¹ en Barbara Gravendeel²

¹ Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteem Dynamica (IBED), Postbus 94248, 1090 GE Amsterdam

² Nationaal Herbarium Nederland, Universiteit Leiden, Einsteinweg 2, 2333 CC Leiden

De zeldzame duinwespenorchis (*Epipactis helleborine* ssp. *neerlandica*) (Vermeulen 1958, Kapteyn den Boumeester 1989, Claessens & Kleynen 1991) komt alleen voor langs de Noordzeekust van West-Europa, en in Nederland zijn slechts enkele tientallen populaties bekend. De duinwespenorchis is officieel een ondersoort van de algemenere brede wespenorchis (*Epipactis helleborine* ssp. *helleborine*). Of het nu een variëteit, ondersoort of soort is kan pas bepaald worden als het type-exemplaar (het "anker" van een taxonomische naam) teruggevonden wordt voor nadere analyses. In het veld zijn er enkele duidelijke verschillen in ecologie, voortplanting en uiterlijk met de brede wespenorchis. Het afgelopen jaar is hier onderzoek naar gedaan.

Het ontstaan van soorten

Soortvorming is een boeiend proces waarover we steeds meer te weten komen. In het Darwinjaar wordt aan evolutie uiteraard veel aandacht besteed. Darwin heeft veel onderzoek naar orchideeën gedaan en een interessant boek (Darwin 1885) geschreven "om de zeer diverse aanpassingen van orchideeën aan bestuivers ter bevordering van kruisbestuiving te laten zien".

Voor soortvorming is het vermijden van kruisbevruchting met andere soorten van fundamenteel belang. Er moeten bepaalde barrières ontstaan om dat te verhinderen. Als er geen kruisbevruchting meer plaatsvindt raken afwijkende individuen genetisch geïsoleerd van de oorspronkelijke populatie, zodat de ontstane verschillen gehandhaafd blijven. Bij langdurige isolatie zal de nieuwe populatie steeds meer van de oorspronkelijke gaan verschillen, totdat er uiteindelijk verschillende soorten zijn gevormd.

Voortplantingsbarrières kunnen door verschillende factoren ontstaan. Wij hebben van een aantal factoren het belang voor de evolutie van de duinwespenorchis onderzocht. We bespreken achtereenvolgens groeiplaats, bloeitijd, bestuivers, voortplantingsmethode, levensvatbaarheid van bastaarden en



Figuur 1. Omheinde duinwespenorchis populatie in Meijendel. Foto: Tania Livschultz.

soortspecificiteit van wortelschimmels. We hebben bovendien de uiterlijke verschillen tussen de duin- en brede wespenorchis geanalyseerd.

Groeiplaatsverschillen

De duinwespenorchis komt in de duinen voor in zandige, open vegetaties of tussen kruipwilgstruweel (Fig. 1), dat enige bescherming biedt tegen konijnenvraat (Kapteyn den Boumeester 1989). De brede wespenorchis groeit op allerlei bodemtypes in naald- en loofbos, weilanden, wegbermen, tuinen en stedelijk gebied (Kreutz & Dekker 2000). De voorkeur voor verschillende leefgebieden zal de genetische uitwisseling tussen duin- en brede wespenorchis beperken, maar is geen sluitende barrière. In overgangsgebieden tussen bos en duin, of langs wegen in het duingebied kunnen ze namelijk toch vlak bij elkaar groeien. Of er dan kruisbestuiving plaatsvindt, is afhankelijk van de onderlinge afstand en de vliegafstanden van bestuivers.

Bloeitijdverschillen

De brede wespenorchis bloeit van midden juli tot eind augustus (Kreutz & Dekker 2000). De duinwespenorchis begint later met bloeien, variërend van eind juli in Zandvoort tot eind augustus op Schiermonnikoog (Kreutz & Dekker 2000). De gemiddelde bloeitijd loopt van begin augustus tot half oktober (Kapteyn den Boumeester 1989, Claessens, Kleynen & Wielinga 1998). De bloeiperiodes overlappen dus gedeeltelijk, en de ondersoorten zijn hierdoor niet volledig van elkaar geïsoleerd. De duinwespenorchis bloeit over het algemeen wel een paar weken later dan de brede. Dit betekent dat alleen de vroege bloemen van de duinwespenorchis bestoven kunnen worden door de brede wespenorchis, terwijl dat voor late bloemen onwaarschijnlijk is.

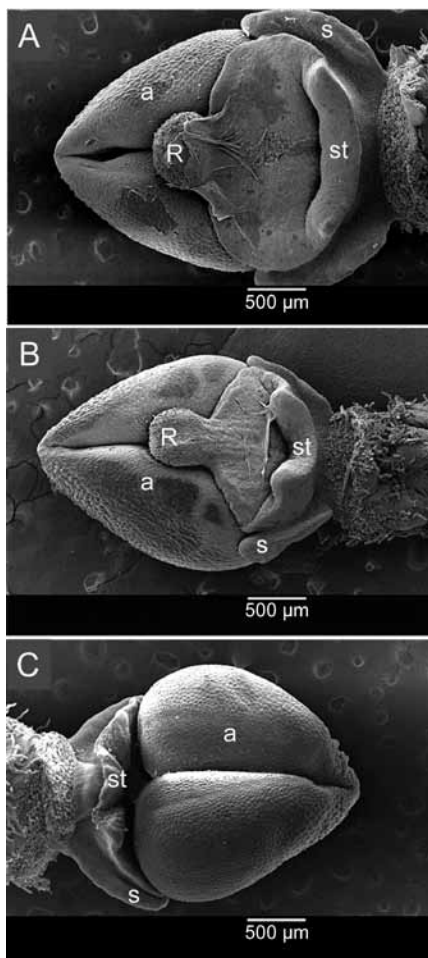
Verschillen in bestuivers

Wespenorchissen doen hun naam eer aan en zijn aangepast aan bestuiving door wespen (Claessens & Kleynen 1991). De bloemen trekken wespen aan en hun vorm zorgt ervoor dat een nectar-drinkende wesp pollinia op zijn voorhoofd geplakt krijgt, op precies de goede plek voor overdracht naar de stempel van een volgende bloem. Ook het bloeitijdstip is aangepast aan de levenscyclus van wespen, die aan het eind van de zomer de overstap maken van dierlijk voedsel (eiwitten voor het broed) naar nectar (eigen energievoorziening).

De hoofdbestuivers van de brede wespenorchis zijn soorten van de wespengeslachten *Vespula*, *Dolichovespula* en *Paravespula* (Darwin 1895, Van der Cingel 1995). Ook de duinwespenorchis wordt vooral hierdoor bestoven (Fig. 2); vaak waargenomen zijn *Dolichovespula saxonica* (Saxische wesp), *D. media* (middelste wesp) en *D. sylvestris* (boswesp) (Darwin 1895, Van den Bussche 2000). De duinwespenorchis heeft dus dezelfde bestuivers als de brede wespenorchis, en wanneer ze dicht bij elkaar bloeien is kruisbestuiving zeer waarschijnlijk. De kans erop neemt echter snel af met toenemende afstand. Uit genetisch onderzoek bleek dat kruisbevruchting van wespenorchissen zeer lokaal plaatsvindt (Ehlers & Pedersen 2000), waarschijnlijk doordat wespen binnen een vrij klein gebied actief zijn (Ehlers & Pedersen 2000).



Figuur 2. Bestuiving van een duinwespenorchis door een langkopwesp (*Dolichovespula* sp.) in Schoorl. Foto: Rogier van Vugt.



Figuur 3. Elektronenmicroscopfoto's van opengeprepareerde bloemknoppen van de brede (A) en duinwespenorchis (B) en variëteit *renzii* (C). a: vruchtbare meeldraad; r: rostellum; st: stempel; s: onvruchtbare meeldraad. Foto's: Marije Kuiper.

Verschillen in voortplantingsmethode

Wanneer een soort 'overschakelt' van kruis- naar zelfbestuiving leidt dat vaak tot een sterke reductie van de kans op genenuitwisseling met andere soorten. Hoewel de brede wespenorchis zichzelf kan bevruchten, komt spontane zelfbestuiving binnen één bloem zelden voor, omdat de bloembouw dit verhindert. Planten in gazen kooitjes die bloembezoek verhinderden produceerden geen vruchten en zaden (Ehlers, Olesen & Ågren 2002). Voor de duinwespenorchis is de situatie minder duidelijk. Er is waargenomen dat de pollinia tijdens zeer warm, droog weer uitdroogden en op de stempel vielen (Claessens, Kleynen & Wielinga 1998), maar het is de vraag of dat stuifmeel nog kiemkrachtig was. Bovendien zijn deze weersomstandigheden nogal uitzonderlijk. Onze kooiexperimenten tijdens minder warme zomers hebben nooit zaden opgeleverd.

Een tot Noord-Denemarken beperkte variëteit *renzii* van de duinwespenorchis is wel duidelijk aangepast aan spontane zelfbestuiving (Goodisman, Matthews & Crozier 2001). De *renzii*-bloemen missen de belangrijkste structuur om zelfbestuiving te voorkomen, het rostellum. Dit is een bolvormig uitgroeisels tussen helmknoppen en stempel, dat voorkomt dat de pollinia op de stempel vallen, en tevens de kleefstof produceert waarmee ze op insecten plakken.

Door een elektronenmicroscop fotografeerden we opengeprepareerde bloemknoppen van de duin- en brede wespenorchis en var. *renzii* in verschillende ontwikkelingsstadia, om de aanwezigheid van het rostellum te onderzoeken. Daaruit blijkt dat de bloemen van duinwespenorchissen het meeste lijken op die van de brede wespenorchis. Beiden hebben een sterk ontwikkeld, ongeveer even groot rostellum. Bij var. *renzii* was inderdaad geen rostellum te zien (Fig. 3).

Levensvatbaarheid van bastaarden

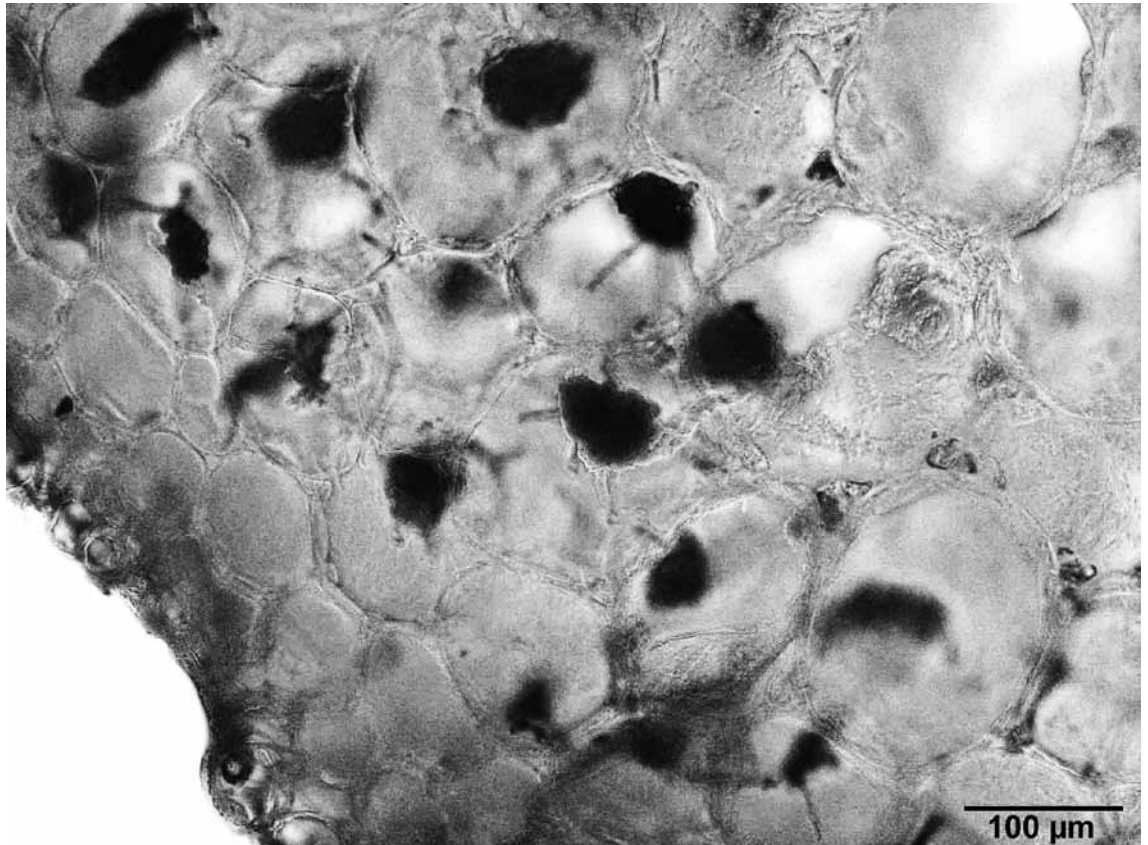
Wanneer genetisch verschillende soorten uitkruisen, komen na de bevruchting vaak storingen voor, die bijvoorbeeld resulteren in chromosoomafwijkingen, waardoor de bastaardzaden embryo's bevatten die niet levensvatbaar zijn. Planten die gekruist zijn met een andere soort produceren daardoor vaak lagere percentages levensvatbare zaden.

In 2007 hebben we met de hand planten van de duin- en brede wespenorchis kruisbestoven. Daarna zijn er gazen kooitjes overgezet om natuurlijke bestuiving te voorkomen. Onder de microscoop is per kruising van 100-300 zaden onderzocht of deze een levend embryo bevatten. Alle kruisbestuivingen, zowel binnen als tussen de ondersoorten, leverden meer dan 95% levensvatbare zaden. De brede en de duinwespenorchis kunnen kennelijk dus probleemloos met elkaar kruisen. We hebben niet onderzocht of bastaarderding effect heeft op kieming en groei.

Verschillen in wortelschimmels

De stoffijne orchideeënzaden bevatten amper voedselreserves. Daarom hebben orchideeën bepaalde bodemschimmels nodig die het plantje tijdens de eerste levensfase van voedingsstoffen voorzien. Deze schimmels groeien de wortels in (Fig. 4) en de samenlevingsvorm wordt dan ook *mycorrhiza* genoemd, wat letterlijk 'schimmelwortel' betekent. Recentelijk is ontdekt dat veel orchideeën schimmels in hun wortels hebben van het type dat vooral gevonden wordt op wortels van bomen en struiken, de zogenaamde *ectomycorrhiza* (Bidartondo, Brughardt, Gebauer, Bruns & Read 2004). Via deze schimmels onttrekken ze voedingsstoffen aan de bomen¹⁴. Hierdoor kunnen ze bv. groeien op sterk beschaduwde plaatsen waar te weinig licht is voor fotosynthese.

Orchideeën zijn doorgaans geïnfecteerd met specifieke schimmelsoorten. Wij hebben onderzocht of de duinwespenorchis, vanwege zijn afwijkende en extreme standplaats met minder houtige planten, andere



Figuur 4. Lichtmicroscopfoto van schimmels in de wortel van een duinwespenorchis. Schaal 100 µm.

Foto: Marije Kuiper.

soorten wortelschimmels heeft dan de brede wespenorchis. Daarvoor hebben we wortels van beide ondersoorten verzameld en genetisch vergeleken met specifieke schimmelsoorten.

De gevonden schimmelsoorten waren inderdaad allemaal *ectomycorrhiza*. Dit suggereert dat ook de duinwespenorchis nutriënten onttrekt aan houtige planten, zoals de kruipwilg, maar om dit te bewijzen zijn speciale metingen nodig (Gebauer & Meyer 2003). In duinwespenorchiswortels zijn twee soorten schimmels gevonden, die beide ook in de brede wespenorchis voorkwamen: *Trichophaea woolhopeia* en *Tuber sp.* In de brede wespenorchis vonden we ook nog twee andere schimmelsoorten (*Inocybe nitidiuscula* en *Tomentella sp.*). Schimmels die specifiek waren voor de duinwespenorchis hebben we dus niet gevonden.

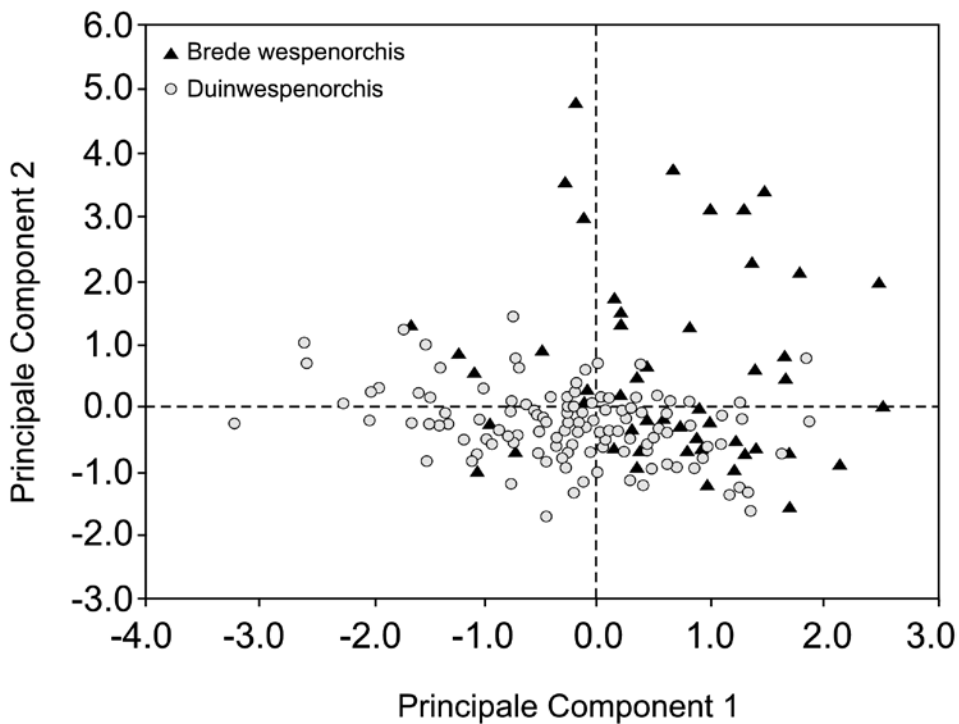
We verzamelden wortels van de brede wespenorchis op drie verschillende locaties, onder resp. zomereik, hazelaar en haagbeuk. Onder elke boomsoort werd een andere wortelschimmel aangetroffen.

Waarschijnlijk bepaalt de nabijgelegen boomsoort indirect met welke schimmels de brede wespenorchis samenleeft. Uitgebreider onderzoek is echter nodig, omdat wij te weinig planten onderzochten.

Volgroeide orchideeënplanten hebben vaak andere soorten wortelschimmels dan kiemende zaadjes of zaailingen (Bidartondo & Read 2008). Om dit te onderzoeken hebben we voor een vervollexperiment kleine zakjes van nylon gaas met zaden van duin- en brede wespenorchis begraven: deels in de duinen bij kruipwilg, deels onder populieren meer landinwaarts en deels onder hazelaar in grasland. Over twee jaar kunnen we de schimmelsoorten in de kiemplantjes bepalen. Deze proef levert ook gegevens over kiemingspercentages van de ondersoorten op hun eigen standplaats en op die van de andere ondersoort.

Uiterlijke verschillen

Voor onderzoek naar uiterlijke kenmerken zijn 178 herbariumexemplaren, 127 van de duin- en 51 van de brede wespenorchis, uit het Nationaal Herbarium Leiden opgemeten. Deze waren verzameld over heel Nederland. Ondanks intensief zoeken werden helaas geen type-exemplaren gevonden. In totaal zijn 30 kenmerken gemeten, zoals plantlengte, bladlengte en -breedte, aantal bloemen, lengte van de bloei-



Figuur 5. Variatie in uiterlijk van brede (helleborine) en duinwespenorchis (*neerlandica*) langs de eerste twee assen van de Principale Componenten Analyse.

wijze en stand van de schutbladeren. De resultaten zijn geanalyseerd met een Principale Componenten Analyse (PCA), waarmee wordt onderzocht welke planten op grond van alle kenmerken tegelijk het meest op elkaar lijken. De kenmerken die het meest zeggen over alle gemeten variatie vormen samen de zogeheten Principale Componenten.

Alle gemeten planten zijn tegen de twee hoofd-principale componenten uitgezet. De horizontale component was samengesteld uit verschillende bloemkenmerken, waaronder lengte van de kelkbladen, de kroonbladen, het onderste deel van de lip en de lengte van de onderste bloem. De verticale component was samengesteld uit onder meer de lengte en breedte van de schutbladeren en de verhouding tussen schutblad- en bloemlengte. Als beide ondersoorten grote uiterlijke verschillen vertonen, dan zouden in de grafiek twee duidelijk van elkaar gescheiden puntenwolken te zien zijn, waarbij elk punt een gemeten exemplaar representeert.

Dat zien we echter niet in Figuur 5, waar elke duinwespenorchis is weergegeven als open rondje, en elke brede wespenorchis als dicht driehoekje. De rondjes en driehoekjes vormen geen aparte groepen, maar liggen door elkaar in één grote puntenwolk. Planten van de brede wespenorchis vertonen grotere uiterlijke verschillen, vooral langs de verticale as. Dit komt door de zeer verschillende standplaatsen van de brede wespenorchis, van voedselrijke, zonnige wegbermen tot voedselarme, schaduwrijke naaldbossen. Duinwespenorchissen lijken duidelijk meer op elkaar, hetgeen overeenkomt met de kritischer standplaatsen.

We hebben ook uitgerekend welke uiterlijke kenmerken het meest bruikbaar zijn om beide ondersoorten te onderscheiden met behulp van een Discriminant Analyse, en dat zijn de lengte en stand van de schutbladen. De duinwespenorchis heeft meestal kortere schutbladen (gemiddeld 23 mm) dan de brede (36 mm). De schutbladen van de duinwespenorchis staan meestal omhoog en die van de brede juist omlaag. De duinwespenorchis heeft verder gemiddeld smallere stengelbladen, een kortere bloeiwijze en meer bloemen. Deze kenmerken zijn in de praktijk echter minder bruikbaar omdat de verschillen tussen de ondersoorten kleiner zijn dan de grote variatie erbinnen. Plantlengte, vaak genoemd als onderscheidend kenmerk, was in onze analyse geen belangrijk verschil.

Conclusies

De duinwespenorchis en de brede wespenorchis zijn genetisch niet volledig gescheiden. Ze worden door dezelfde wespensoorten bestoven en onderlinge kruisbestuiving levert een hoog percentage levensvatbare zaden. Er zijn geen aanpassingen in de bloembouw van de duinwespenorchis die spontane zelfbestuiving vergemakkelijken. Hoewel spontane zelfbestuiving wellicht onder extreme omstandigheden optreedt, is kruisbestuiving waarschijnlijk de regel. Wat in de praktijk wel de mate van uitkruising zal beperken is het verschil in groeiplaats in combinatie met slechts lokaal actieve bestuivers. Alleen tussen

vlak bij elkaar groeiende populaties kan dus genetische uitwisseling plaatsvinden. Ook de slechts gedeeltelijk overlappende bloeitijden zullen de kansen op kruisbestuiving sterk verkleinen.

De analyses van uiterlijke kenmerken laat zien dat duin- en brede wespenorchis weinig verschillen. De brede wespenorchis blijkt meer uiterlijke variatie te vertonen dan de duinwespenorchis, waarschijnlijk veroorzaakt door de grotere verscheidenheid aan leefmilieus. De schutbladen zijn het beste kenmerk om beide ondersoorten van elkaar te onderscheiden, omdat ze kleiner zijn en omhoog in plaats van omlaag staan in de duinwespenorchis. In volgroeide duinwespenorchissen zijn geen specifieke wortelschimmels gevonden. Er wordt nog onderzocht of er wellicht andere schimmelsoorten aangetroffen worden in ontkiemende zaden. Pas na afloop van dit experiment en analyse van het type-exemplaar van de duinwespenorchis kan een definitief antwoord worden gegeven op de vraag of we hier met een standplaatsvariatie of soort in wording te maken hebben.

Dankwoord

Dit onderzoek was onmogelijk geweest zonder de ondersteuning van Harrie van der Hagen (Dunea, voorheen Duinwaterbedrijf Zuid-Holland). De kosten werden gedragen door het Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteem Dynamica (IBED) van de Universiteit van Amsterdam en de Leidse vestiging van het Nationaal Herbarium Nederland, onder ontheffing van de Flora- en Faunawet, artikel FF/75A/2003/171.

Literatuur

- Bidartondo MI, B Burghardt, G Gebauer, TD Bruns en DJ Read (2004) Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 271: 1799–1806.
- Bidartondo MI & DJ Read (2008) Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology* 17: 3707–3716.
- Claessens J & J Kleynen (1991). Het geslacht *Epipactis* in de Benelux: bloembioologische beschrijvingen en soorttypische kenmerken. *Eurorchis* 3: 5–25.
- Claessens J, J Kleynen & R Wielinga (1998). Some notes on *Epipactis helleborine* (L.) Crantz ssp. *neerlandica* (Vermeulen) Buttler and *Epipactis Renzii* K. Robatsch. *Eurorchis* 10: 55–64.
- Darwin C (1885). On the various contrivances by which orchids are fertilised by insects. J. Murray, London.
- Ehlers, BK & HÆ Pedersen (2000). Genetic variation in three species of *Epipactis* (Orchidaceae): geographic scale and evolutionary inferences. *Biological Journal of the Linnean Society* 69: 411–430.
- Ehlers BK, JM Olesen & J Ågren (2002) Floral morphology and reproductive success in the orchid *Epipactis helleborine*: regional and local across-habitat variation. *Plant Systematics and Evolution* 236: 19–32.
- Gebauer G & M Meyer (2003) ¹⁵N and ¹³C natural abundance of autotrophic and mycoheterotrophic orchids provides new insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* 160: 209–233.
- Goodisman MAD, RW Matthews & RH Crozier (2001). Hierarchical genetic structure of the introduced wasp *Vespula germanica* in Australia. *Molecular Ecology* 10: 1423–1432.
- Kapteyn den Boumeester DW (1989). *Epipactis helleborine* var. *neerlandica* Vermeulen – problematiek, veldwaarnemingen, bestuivers. *Eurorchis* 1: 93–112.
- Kreutz CAJ & H Dekker (2000). De orchideeën van Nederland: ecologie, verspreiding, bedreiging, beheer, pp. 90-95 en 237-239. BJ Seckel en CAJ Kreutz, Landgraaf.
- Pedersen, HÆ en BK Ehlers (2000). Local evolution of obligate autogamy in *Epipactis helleborine* subsp. *neerlandica* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 223: 173–183.
- Van der Cingel NA (1995). An atlas of Orchid pollination – European orchids, pp. 81–82. A.A. Balkema publishers, Rotterdam.
- Van den Bussche W (2000). Eerste tussentijds verslag betreffende het onderzoek naar de status van *Epipactis helleborine* var. *neerlandica*. *Liparis* 6: 43–48
- Vermeulen P (1958). Orchidaceae. *Flora Neerlandica* 1: 100–105.