



**inbo**



Instituut voor  
Natuur- en Bosonderzoek

## **De groenknolorchis (*Liparis loeselii* L.)** Zaadverbreiding en lokale adaptatie

*An Vanden Broeck, Wouter Van Landuyt, Karen Cox, Ralf Gyselings,  
Luc De Bruyn en Joachim Mergeay*

**Auteurs:**

An Vanden Broeck, Wouter Van Landuyt, Karen Cox, Ralf Gyselings, Luc De Bruyn en Joachim Mergeay  
*Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek*

Het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) is het Vlaams onderzoeks- en kenniscentrum voor natuur en het duurzame beheer en gebruik ervan. Het INBO verricht onderzoek en levert kennis aan al wie het beleid voorbereidt, uitvoert of erin geïnteresseerd is.

**Vestiging:**

INBO Geraardsbergen  
Gaverstraat 4, 9500 Geraardsbergen  
www.inbo.be

**e-mail:**

an.vandenbroeck@inbo.be

**Wijze van citeren:**

Vanden Broeck A., Van Landuyt W., Cox K., Gyselings R., De Bruyn L. & Mergeay J. (2014). De groenknolorchis (*Liparis loeselii* L.). Zaadverbreding en lokale adaptatie. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2014 (INBO.R.2014.1561208). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

**D/2014/3241/077**

**INBO.R.2014.1561208**

**ISSN: 1782-9054**

**Verantwoordelijke uitgever:**

Jurgen Tack

**Druk:**

Managementondersteunende Diensten van de Vlaamse overheid

**Foto cover:**

Wouter Van Landuyt



# **De groenknolorchis (*Liparis loeselii* L.)**

Zaadverbreiding en lokale adaptatie

**An Vanden Broeck, Wouter Van Landuyt, Karen Cox, Ralf Gyselings, Luc De Bruyn en Joachim Mergeay**

## Dankwoord

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



Figuur 1 Staalnamen van groenknolorchis op de Veermansplaat in de Grevenlingen te Zeeland (foto: Wim Van Wijngaarden)

## Samenvatting

Door de versnippering van het leefgebied moeten planten zich steeds over grotere afstanden verbreiden. Terwijl inspanningen worden geleverd om via natuurbeheer potentieel geschikte groeiplaatsen te herstellen, blijft de vraag of specifieke doelsoorten deze herstelde gebieden spontaan kunnen bereiken, vooral wanneer bronpopulaties veraf gelegen zijn. Inzicht in de processen van lokale aanpassing en zaadverbreiding zijn belangrijk voor de afbakening van populaties bij het opstellen van instandhoudingsdoelstellingen.

Deze studie bestudeert de zaadverbreiding over lange afstanden en genetische aanpassingen aan het habitat bij de groenknolorchis (*Liparis loeselii* (L.) Rich.). Via toewijzingstesten gebaseerd op genetische profielen (AFLP-profielen) van individuele planten aan huidige groeilocaties binnen Noordwest-Europa (Noordwest-Frankrijk, België, Nederland) wordt een inschatting gemaakt van de effectieve zaadverbreiding over lange afstanden. Aan de hand van een genoom scan zochten we naar mogelijke verbanden tussen genetische merkers en eigenschappen die verbonden zijn met specifieke aanpassingen aan één van de twee typische groeiplaatsen van de groenknolorchis: natte duinpannen en alkalische laagvenen. Lokale aanpassing aan een specifieke groeiplaats kan een oorzaak zijn van het ontstaan van 'ondersoorten'.

De resultaten van dit onderzoek suggereren opmerkelijk hoge waarden voor zaadverbreiding over lange afstanden. Afhankelijk van het studiegebied (België en Nederland of Noordwest-Frankrijk) waren 15% tot 16% van de bemonsterde individuen veronderstelde migranten afkomstig van zaadverbreiding tussen locaties. Verbreidingsafstanden tot 220 km werden waargenomen. Ook de genetische structuur en de genetische diversiteit wijzen in de richting van frequente uitwisseling van genen via zaaddispersie. Hoewel deze waarden waarschijnlijk een overschatting zijn van de huidige connectiviteit tussen populaties, suggereren de resultaten dat de groenknolorchis in staat is tot kolonisatie over lange afstanden en uitwisseling van genen tussen populaties in een versnipperd leefgebied. Koloniaties over lange afstanden komen vermoedelijk frequenter voor bij de groenknolorchis dan oorspronkelijk werd verondersteld.

We vonden enkele zwakke signalen van lokale aanpassing aan het specifiek habitattypen (duin vs. alkalisch laagveen) op niveau van individuele populaties. Er waren echter geen grote genetische verschillen tussen de populaties die voorkomen op de twee verschillende habitattypen, wat wijst op genenuitwisseling tussen populaties van de twee habitattypen. Het is dus mogelijk dat genenuitwisseling tussen populaties het effect vervaagt van genetische aanpassingen aan de specifieke standplaats.

## Aanbevelingen voor beheer en/of beleid

De groenknolorchis (*Liparis loeselii*) is een prioritair te beschermen soort waarvoor, via gerichte maatregelen, de instandhouding dient te worden gewaarborgd volgens de Europese habitatrichtlijn.

De resultaten van deze studie suggereren dat de verbreiding van zaden over lange afstanden niet uitzonderlijk is bij deze pioniersoort. De onderzochte populaties van de groenknolorchis gedragen zich als één grote maar ijle metapopulatie waarbij de verschillende deelpopulaties min of meer met elkaar in verbinding staan via de uitwisseling van zaden. De verbreiding en beschikbaarheid van zaden is dus waarschijnlijk geen sterk beperkende factor voor de kolonisatie van nieuwe geschikte gebieden, ook als bronpopulaties veraf gelegen zijn. Aangezien de groenknolorchis een zelfbestuiver is, kan een nieuwe populatie ontstaan uit één enkel zaadje.

Voor deze soort met een uitgesproken metapopulatiedynamiek zijn lokale extincties en koloniaties natuurlijke processen. De instandhouding van de groenknolorchis dient zich daarom vooral te richten op de uitbreiding van geschikte groeiplaatsen met de juiste biotische en abiotische bodemcondities. Voor een duurzaam behoud is een netwerk van geschikte groeiplaatsen op landschapsniveau noodzakelijk. Naast een grondige kennis van de ecologie is daarom ook een duidelijk inzicht nodig in de biotische en abiotische habitatvereisten. De bescherming en instandhouding van de huidige populaties is eveneens belangrijk omdat ze dienen als bronpopulaties voor nieuwe koloniaties.

Tijdens deze studie werd ook opgemerkt dat de zaaddozen van de groenknolorchis zeer lang gesloten blijven. De zaaddozen van de groenknolorchis waren nog gesloten in december, in tegenstelling tot deze van andere orchideeënsoorten (vb. rietorchis, vleeskleurige orchis, moeraswespenorchis) die op dezelfde locaties voorkwamen (waarnemingen in 2014; populaties Hazop (Antwerpen) en Dune Dewulf (Leffrincoecke)). Gezien maaien in de vroege lente vaak technisch moeilijk haalbaar is door de hoge waterstanden kan het nuttig zijn een deel van de bloeiende planten te merken en deze plaatselijk te sparen bij een maaibeurt zo laat mogelijk in het najaar.



Figuur 2 De groenknolorchis (locatie Hazop te Beveren) (foto: An Vanden Broeck)

## English abstract

Gene flow and adaptive divergence are key aspects in metapopulation dynamics and ecological speciation. Long-distance dispersal is hard to detect and few studies estimate dispersal in combination with adaptive divergence. The aim of this study was to investigate effective long-distance dispersal and adaptive divergence in the fen orchid (*Liparis loeselii* (L.) Rich.). We used amplified fragment length polymorphism (AFLP)-based assignment tests to quantify effective long-distance dispersal at two different regions in Northwest Europe. In addition, genomic divergence between fen orchid populations occupying two distinguishable habitats, wet dune slacks and alkaline fens, was investigated by a genome scan approach at different spatial scales (continental, landscape and regional) and based on 451 AFLP loci.

We expected that different habitats would contribute to strong divergence and restricted gene flow resulting in isolation-by-adaptation. Instead, we found remarkably high levels of effective long-distance seed dispersal and low levels of adaptive divergence. Depending on the studied region, at least 15.2 to 16.5% of the assigned individuals likely originated from among-population dispersal events with dispersal distances up to 220 km. Six (1.3%) 'outlier' loci, potentially reflecting local adaptation to habitat-type, were identified with high statistical support. Of these, only one (0.22%) was a replicated outlier in multiple independent dune-fen population comparisons and thus possibly reflecting truly parallel divergence. Signals of adaptation in response to habitat type were most evident at the scale of individual populations.

The findings of this study suggest that the homogenizing effect of effective long-distance seed dispersal may overwhelm divergent selection associated to habitat type in fen orchids in Northwest Europe.

# Inhoudstafel

## Inhoud

<b>1</b>	<b>Inleiding.....</b>	<b>10</b>
1.1	Situering .....	10
1.2	Ecologie .....	10
1.3	Verspreiding en trends .....	12
<b>2</b>	<b>Doel van deze studie .....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Werkwijze .....</b>	<b>15</b>
3.1	Inzamelen plant materiaal en studiegebied .....	15
3.2	DNA-extractie en AFLP-analyse .....	16
3.3	Vegetatieve vermeerdering en zelfbestuiving .....	17
3.4	Genetische diversiteit en populatiestructuur.....	17
3.5	Zaadverbreding over lange afstand .....	18
3.5.1	Toewijzingsanalyse .....	18
3.5.2	Effect van de bronpopulaties op de toewijzingen.....	19
3.5.3	Effect van het aantal AFLP-merkers op de toewijzingen .....	19
3.6	Genetische aanwijzingen voor lokale aanpassingen .....	19
<b>4</b>	<b>Resultaten en bespreking .....</b>	<b>22</b>
4.1	Vegetatieve vermeerdering en zelfbestuiving .....	22
4.2	Genetische diversiteit en populatiestructuur.....	22
4.3	Zaadverbreding over lange afstand .....	25
4.3.1	Toewijzingsanalyse .....	25
4.3.2	Effect van de bronpopulaties en het aantal merkers op de toewijzingen.....	26
4.4	Genetische aanwijzingen voor lokale aanpassingen .....	28
<b>5</b>	<b>Conclusie.....</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>Referenties.....</b>	<b>30</b>
<b>7</b>	<b>Bijlage .....</b>	<b>32</b>



## Lijst van figuren

Figuur 1 Staalnamen van groenknolorchis op de Veermansplaat in de Grevenlingen te Zeeland (foto: Wim Van Wijngaarden) .....	4
Figuur 2 De groenknolorchis (locatie Hazop te Beveren) (foto: An Vanden Broeck) .....	6
Figuur 3 De groenknolorchis ( <i>Liparis loeselii</i> ) (Flora Batava, Jan Kops. Deel 4 (1822)) .....	11
Figuur 4 Verspreidingsgebied van de groenknolorchis (volgens Hultén en Fries, 1986) .....	12
Figuur 5 De twee specifieke groeiplaatsen van de groenknolorchis: natte duinpanne (Merlimont, Nord-Pas-de-Calais, Frankrijk) en alkalisch laagveen (Marais de Villiers, Nord-Pas-de-Calais, Frankrijk) (foto's: Wouter Van Landuyt) .....	13
Figuur 6 Locaties van groenknolorchis en de verschillende geografische schalen gebruikt in de analyse naar genetische aanpassingen .....	16
Figuur 7 Ruimtelijke patronen van de genetische diversiteit berekend via de Shannon index en op basis van een 25 km rooster .....	23
Figuur 8 Biplot van de Principale Coördinaten Analyse uitgevoerd op 38 populaties van groenknolorchis en berekend op basis van genetische afstanden tussen populaties (driehoek: laagveenhabitat, ruit: duin habitat) .....	24
Figuur 9 Boomstructuur van de 38 populaties van groenknolorchis berekend via paarsgewijze genetische afstanden .....	24
Figuur 10 Zaden van de groenknolorchis (foto: Wouter Van Landuyt) .....	26
Figuur 11 Resultaten van de toewijzingsanalyses van de bemonsterde groenknolorchissen voor de regio België / Nederland en voor Noordwest-Frankrijk .....	27
Figuur 12 Grafische voorstelling van de Bayesiaanse clusteranalyse uitgevoerd op 422 groenknolorchissen en berekend voor 266 merkers en 28 cluster .....	34

# 1 Inleiding

## 1.1 Situering

De groenknolorchis (*Liparis loeselii* L. L.C.M. Rich.) is een kleine, onopvallende orchidee. De soort is internationaal beschermd via de Europese Habitatrichtlijn (Richtlijn 92/43/EEG). Voor de lidstaten van de Europese Unie is de groenknolorchis hierdoor een prioritair te beschermen soort waarvoor, via gerichte maatregelen, de instandhouding dient te worden gewaarborgd. Een eerste logische stap in de instandhouding is de bescherming en het herstel van de natuurlijke, huidige groeiplaatsen. Vervolgens vereist de instandhouding dat de omvang van de populaties niet afneemt, bij voorkeur toeneemt en dat nieuwe populaties zich vestigen op hersteld habitat.

Het inschatten van de kansen op spontane kolonisations en dus nieuwe vestigingen vereist een goede kennis van de verbredingsecologie van de soort. Ook voor het uitschakelen van genetische informatie tussen populaties is migratie essentieel. Planten die voorkomen op sterk geïsoleerde groeiplaatsen zijn vooral afhankelijk van verbreding over lange afstanden. Orchideeën worden verondersteld hiertoe in staat te zijn omdat ze in grote hoeveelheden, uiterst kleine, stoffijne zaden produceren (zie figuur 10) die door de wind over lange afstanden kunnen worden verspreid. Toch zijn er weinig studies die de zaadverbreding over lange afstand van wilde orchideeën in een sterk gefragmenteerd landschap kwantificeren. In deze studie trachten we een inschatting te maken van de afstanden die de zaden van groenknolorchis kunnen afleggen in een sterk gefragmenteerd leefgebied. We gaan ook na hoe de verspreidingsecologie de ruimtelijke genetische variatie van de groenknolorchis beïnvloedt.

De groenknolorchis komt voor in twee ecologisch verschillende groeiplaatsen: natte, jonge duinpannen en laagvenen onder invloed van basenrijk grondwater (alkalische laagvenen). In de literatuur worden soms twee variëteiten of ecotypen onderscheiden binnen de groenknolorchis; het alkalisch laagveentype en het duintype (Wheeler et al. 1998) (zie verder). Ecotypen komen tot stand wanneer planten aangepast zijn aan een specifiek milieu. Deze aanpassing gebeurt via natuurlijke selectie en wordt vastgelegd in het genetisch materiaal van de plant. Het is de initiële fase van het ontstaan van nieuwe soorten. Een screening van het genetisch materiaal kan dus inzicht verschaffen in de genetische eigenschappen die specifiek zijn voor een bepaald milieu. In deze studie gaan we op zoek naar genetische merkers (DNA-fragmenten) verbonden met genetische eigenschappen die specifiek zijn voor ofwel het duintype ofwel het laagveentype. De resultaten leveren argumenten voor het al dan niet opdelen van de groenknolorchis in twee ecotypes of taxonomische ondersoorten.

Aan de hand van de resultaten van deze studie formuleren we richtlijnen voor de instandhouding van de groenknolorchis in Vlaanderen.

## 1.2 Ecologie

De groenknolorchis is een pionierssoort van voedselarme en basenrijke, vochtige milieus: enerzijds nat kalkrijk zand in duinvalleien, anderzijds venige substraten in de door kalkrijke kwel gevoede laagvenen (Spanoghe et al. 2008). Deze soort staat vooral in lage vegetaties en vestigt zich op open plekken in duinvalleien die in de winter zeer nat zijn (of zelfs onder water kunnen staan) of op mostapijten in alkalische laagvenen.

De groenknolorchis is een diploïde ( $2n = 26$ ), overblijvende plant met twee vetglanzende bladeren die in juni uit de bovengrondse stengelknol tevoorschijn komen. De plant vormt einde juni – begin juli één tot twee bloemstengels met meestal 4 tot 8 tweeslachtige, kleine, groengele bloemen. In de zaaddozen die tot in de winter gesloten blijven rijpen duizenden

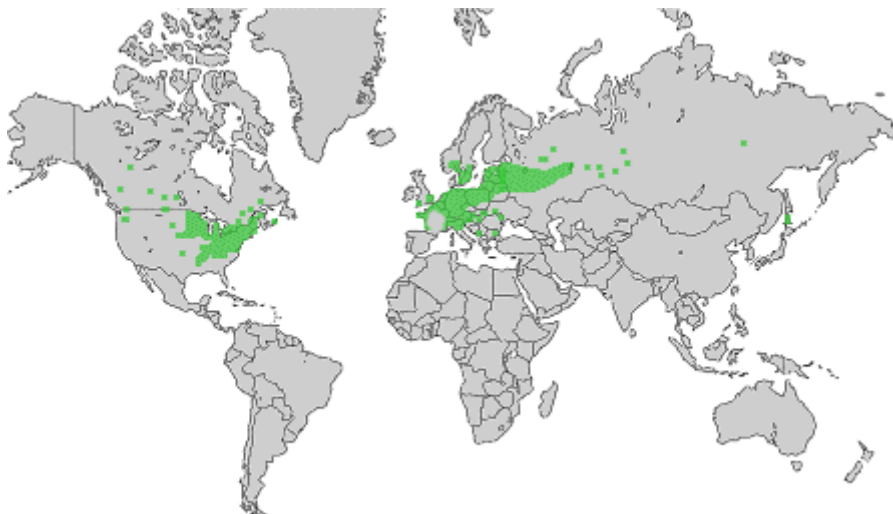
zaden. De groenknolorchis produceert geen nectar en bestuiving door insecten is zelden waargenomen. De soort wordt daarom verondersteld zich hoofdzakelijk via zelfbestuiving voort te planten. Het proces van zelfbestuiving kan via regen- en/of dauwdruppels worden bevorderd (Catling 1980). Vegetatieve voortplanting via de vorming van nieuwe wortelknollen is eveneens mogelijk. Dormantie van de wortelknollen treedt waarschijnlijk niet op. Of de soort een zaadbank vormt is niet geweten, maar over het algemeen vormen orchideeën geen of een kortlevende zaadbank (maximum enkele jaren) (Whigham et al. 2006). Sommige auteurs onderscheiden twee botanische variëteiten of ecotypes; de breedbladige variëteit uit de duingebieden (var. *Ovata* Ridd. Ex Godfery) en de smalbladige variëteit uit de veen- en berggebieden (Wheeler et al. 1998). Voor een uitgebreide beschrijving van de ecologie van de groenknolorchis verwijzen we naar Claessens en Kleynen (2011).



Figuur 3 De groenknolorchis (*Liparis loeselii*) (Flora Batava, Jan Kops. Deel 4 (1822))

### 1.3 Verspreiding en trends

Het natuurlijk verspreidingsgebied van de groenknolorchis strekt zich uit over de gematigde klimaatzones van Europa, Noord-Amerika en Oost-Azië.



Figuur 4 Verspreidingsgebied van de groenknolorchis (volgens Hultén en Fries, 1986)

De soort is in heel Europa de laatste decennia heel sterk afgenomen en is om die reden opgenomen in de lijst van soorten waarvoor in heel Europa speciale beschermingsmaatregelen moeten worden genomen. Hij staat zowel op de Belgische (Van Landuyt et al. 2006). als op de Nederlandse ([http://nl.wikipedia.org/wiki/Nederlandse\\_Rode\\_Lijst\\_\(planten\)](http://nl.wikipedia.org/wiki/Nederlandse_Rode_Lijst_(planten))) Rode lijst van planten als sterk afgenomen en vrij zeldzaam

De achteruitgang van de groenknolorchis in België is al enkele decennia aan de gang (Robyns 1958; Spanoghe et al. 2008). Voor 1958 kwam de soort nog op verschillende plaatsen voor langs de Belgische kust met vondsten in De Panne (duinen tussen De Panne en de Franse grens, 1932–1956), Oostduinkerke (1928–1952), Nieuwpoort (19<sup>e</sup> eeuw) en Blankenberge-Zeebrugge (1864–1891) (Robyns 1958). In de Polders kwam de soort voor te Hoboken (1919-1932) en op Antwerpen-Linkeroever (Vlaams Hoofd, 1940–1958). In de Kempen werd groenknolorchis gevonden te Oelegem (1865–1908), Neerpelt (1947–1953) en Zutendaal (19<sup>e</sup> eeuw). Verder zijn er nog locaties gerapporteerd in het Brabants district te Berg (1862–1943), Pécrot (1872–1903), Hollain (1885–1889) en Péruwelz (Marais de la Roë, 1842–1862).

Van de hoger vermelde gekende locaties, bleven er in 1958 nog slechts vier over; De Panne, Oostduinkerke, Antwerpen-Linkeroever en Neerpelt (Robyns 1958).

Na 1958 werden nog drie nieuwe vindplaatsen gerapporteerd in de Kempen te Mol (1975 – 2009), in Lotharingen te Vance (Landbruch laagveen, 1987 – nadien niet meer terug gevonden) en in de Waaslandhaven te Beveren (Spanoghe et al. 2008).

Vandaag zijn er nog slechts twee locaties in België waar groenknolorchis voorkomt: het Meergoor nabij Mol en de Waaslandhaven te Beveren. Beide locaties liggen in beschermd natuurgebied. De populatie in het alkalisch laagveen te Meergoor is zeer klein en de aantallen variëren van 5 tot 10 individuen (pers. mededeling conservator Jan Dirckx). Te Beveren bevindt er zich een grote populatie die bij de vondst in 2008 enkele honderden

individuen telde en in 2013, 3000 planten (bloeiende en niet-bloeiende planten). Deze populatie bevindt zich op een in 1980 met kalkrijk zand opgespoten terrein dat zich ontwikkelde tot een vrij open wilgen- en berkenstruweel en deels ook tot rietveld. Deze populatie wordt sinds 2008 intensief opgevolgd door het INBO.

De voornaamste reden van de achteruitgang van de groenknolorchis is het verdwijnen van geschikte groeiplaatsen. Langs de Belgische kust was dit onder meer te wijten aan een sterke verdroging van de duingebieden door drinkwaterwinning, bemalingen ten behoeve van bouwactiviteiten en directe afwatering van neerslagwater (Leten 2012). Half-natuurlijke duingraslanden en pannen die vroeger als veeweide werden gebruikt, werden begin 20<sup>e</sup> eeuw door de landbouw verlaten en overgroeiden met grassen en struiken. Door een combinatie van verdroging, uitbreiding van struikgewas, industriële activiteiten en een toenemende recreatieve druk op het gebied, verdwenen veel groeiplaatsen van kenmerkende duinsoorten (Leten 2012).

Door gerichte natuurbeheerplannen wordt gewerkt aan herstel van natuurlijke groeiplaatsen van vele bedreigde soorten. Langs de kust wordt de waterwinning stapsgewijs afgebouwd en via natuurbegrazing en maaibeheer worden competitieve grassen en struwelen lokaal verwijderd. Door het dynamisch systeem van duingebieden ontstaan nog steeds regelmatig jonge, vochtige duinpannen die een potentieel geschikte groeiplaats vormen voor vele bedreigde soorten zoals de groenknolorchis. Ook in de Waaslandhaven worden nieuwe potentieel geschikte groeiplaatsen gecreëerd. Elke infrastructurele activiteit tracht men te compenseren door natuurontwikkeling.



Figuur 5 De twee specifieke groeiplaatsen van de groenknolorchis: natte duinpanne (Merlimont, Nord-Pas-de-Calais, Frankrijk) en alkalisch laagveen (Marais de Villiers, Nord-Pas-de-Calais, Frankrijk) (foto's: Wouter Van Landuyt)

## 2 Doel van deze studie

Deze studie is opgesteld om inzicht te krijgen in de afstand die de zaden van de groenknolorchis kunnen overbruggen om nieuwe locaties te koloniseren. Hiernaast onderzoeken we ook de genetische verschillen van de twee beschreven variëteiten of ecotypes van groenknolorchis; de breedbladige variëteit uit de duingebieden (var. *ovata* Ridd. Ex Godfery) en de smalbladige variëteit uit de veen- en berggebieden (zie Wheeler et al. 1998). We zoeken hierbij naar genetische aanwijzingen voor erfelijke aanpassingen aan het specifiek ecotooptype (duinpanne en alkalisch laagveen). Tenslotte heeft deze studie tot doel de kennis te vergroten omtrent de ecologie en voortplantingsstrategie van de groenknolorchis zoals de mate van vegetatieve vermeerdering, zelfbestuiving en het uitwisseling van genen. Aan de hand van de resultaten stellen we richtlijnen op voor de instandhouding van de soort.

De studie focust op de populaties van groenknolorchis in België, Nederland en Noordwest-Frankrijk. Daarnaast worden ook populaties uit de Franse Alpen, Slovenië en Hongarije mee opgenomen om het referentiekader verder uit te breiden. We gebruiken genetische merkers (Amplified Fragment Length Polymorfism, AFLP) om aan de hand van de genetische structuur en de genetische diversiteit inzicht te verkrijgen in de zaadverbreiding en de genetische aanpassingen aan de standplaats.

## 3 Werkwijze

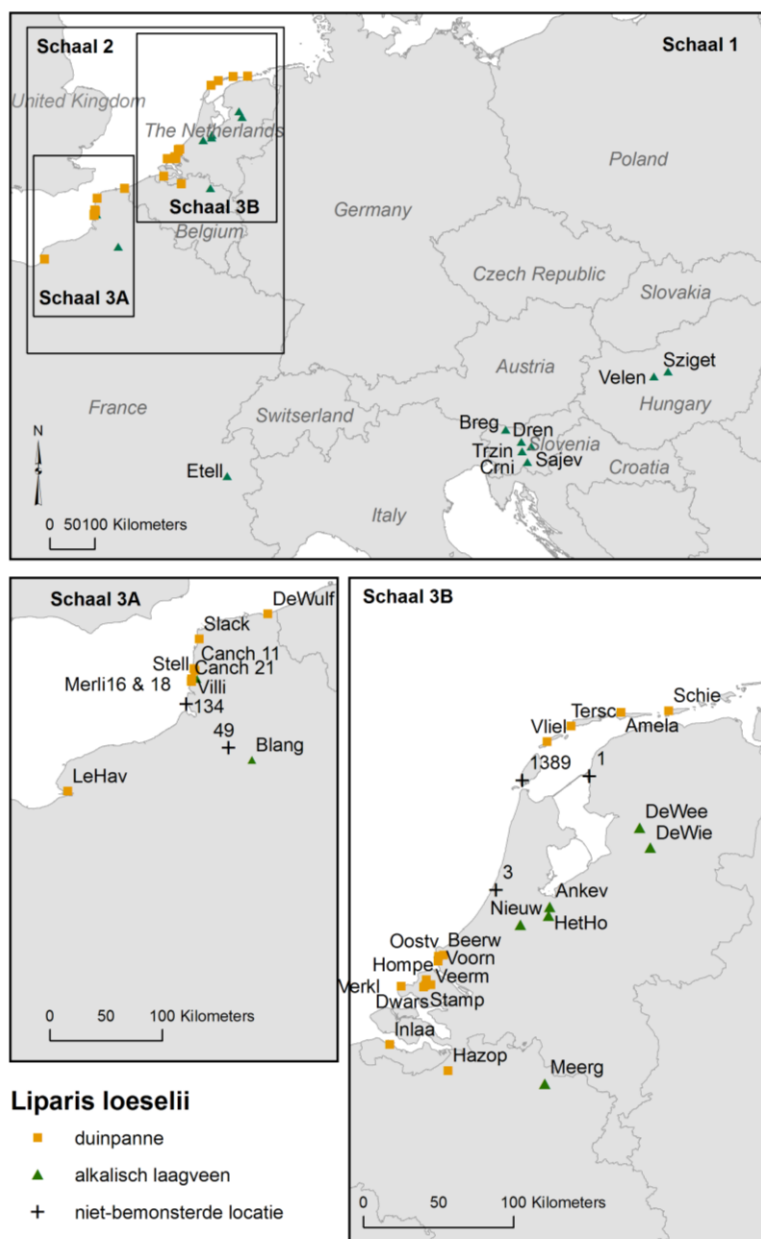
### 3.1 Inzamelen plant materiaal en studiegebied

De locaties van de groenknolorchis in Frankrijk, Nederland en België zijn goed gekend en goed gedocumenteerd onder meer omdat het een orchidee betreft waar in het algemeen veel aandacht aan wordt besteed, en omdat de toestand van de soort zes-jaarlijks dient gerapporteerd te worden in het kader van de implementatie van de Habitatrichtlijn 92/43/EEG (vb. zie Odé and Bolier 2003; Spanoghe et al. 2008; Valentin et al. 2010). Dit laat ons toe de meerderheid (al dan niet alle) huidige groeiplaatsen van de groenknolorchis langs de Noordzeekust met een goede betrouwbaarheid in kaart te brengen.

Locaties met groenknolorchis werden bemonsterd over een afstand van ongeveer 600 km van Normandië in Noordwest-Frankrijk tot en met de Waddeneilanden in Noord-Nederland. Naast de twee gekende locaties in Vlaanderen (Meergoor te Mol en Hazop te Beveren), werden 18 locaties in Nederland en 10 locaties in Noordwest-Frankrijk geanalyseerd. Twee locaties in Nederland werden niet bemonsterd omdat er hier respectievelijk slechts één en drie planten van de groenknolorchis werden gerapporteerd (Odé and Bolier 2003). Van een derde Nederlandse locatie (Texel, Waddeneilanden) die een grote populatie bevat, werden wel stalen verzameld maar hiervan werden geen goede genetische profielen bekomen en daarom werd deze locatie niet meegenomen in de analyses. In Noordwest-Frankrijk werden stalen verzameld van 12 van de 14 gekende locaties. Voor het focusgebied van deze studie (Noordwest-Frankrijk-België-Nederland), werden dus 30 van de 35 huidige groeiplaatsen van groenknolorchis geanalyseerd. Deze omvatten 8 locaties gelegen in alkalische laagvenen en 22 locaties gelegen in vochtige duinpannen.

Om het referentiekader uit te breiden, werden verder ook nog de volgende locaties bemonsterd: één populatie in de Franse Alpen (Le marais des Etelles), vijf populaties in de Sloveense Alpen en twee populaties in Hongarije.

In totaal werden 422 volwassen planten geanalyseerd afkomstig van 38 locaties waarvan 22 gelegen waren in duinpannen en 16 in alkalische laagvenen. De staalnamen gebeurden deels in 2003 (10 locaties) en deels in 2009 (28 locaties). Het aantal bemonsterde planten per locatie, van 3 tot 72, varieerde met het aantal aanwezige planten, gaande van enkele tot duizenden. In grote populaties werden de individuen willekeurig bemonsterd met minstens één meter tussen de bemonsterde planten om het bemonsteren van genetisch identieke planten (i.e. klonen) zo veel mogelijk te vermijden. Per bemonsterd individu werd een stuk bladmateriaal genomen ongeveer ter grootte van een twee-euro-muntstuk. Deze staalnamen hadden geen zichtbaar negatief effect op de planten. Voor de staalnamen werden de nodige vergunningen bekomen. Meer informatie over de bemonsterde locaties is te vinden in figuur 6 en in tabel 1 in de bijlage. Voor de locaties die niet werden bemonsterd (aangeduid met een '+' in figuur 6), wordt het geschatte aantal aanwezige individuen op de locatie weergegeven op de kaart in figuur 6.



Figuur 6 Locaties van groenknolorchis en de verschillende geografische schalen gebruikt in de analyse naar genetische aanpassingen.

### 3.2 DNA-extractie en AFLP-analyse

Genomisch DNA werd geëxtraheerd met de QuickPick™ Plant DNA kit (Isogen Life Science, De Meern, Nederland). De AFLP-reactie werd uitgevoerd zoals beschreven in Vos et al. (1995) met de restrictie-ligatie in één stap. Na testen van ongeveer 40 primer combinaties werden vier primer combinaties geselecteerd die duidelijke AFLP patronen opleverden met voldoende polymorfismen: EcoRI-ACT/MseI-CAC, EcoRI-ACT/MseI-CTA, EcoRI- ACT/MseI-CTC en EcoRI- ACT/MseI-CAA. De PCR-producten werden gelopen op een capillaire sequencer (ABI 3500, Applied Biosystems). Als standaard werd Genscan 600-LIZ meegelopen (PE Applied Biosystems). De grootte van de bekomen DNA-fragmenten werd bepaald met GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems). Om de herhaalbaarheid van de techniek



te testen werden 40 willekeurig gekozen stalen tweemaal in de analyses meegenomen, vertrekkende vanaf de DNA-extractie (replica's). Een binaire datamatrix (aanwezig (1) – afwezig (0)) werd opgesteld met het automatisch scoringsprogramma RawGeno v 2.0 (R CRAN (Arrigo et al. 2009)) met volgende scoringsparameters: MINBIN = 1, MAXBIN = 2, FREQ = 1, THRESH = 80. De replica's lieten toe niet betrouwbare merkers te verwijderen en vervolgens de fout te berekenen op de bekomen data. De fout werd berekend volgens de methode van Bonin et al. (2004). Loci met een frequentie aan allelen onder 5% of boven 95% werden verwijderd uit de dataset (zie Roesti et al. 2012)..

### 3.3 Vegetatieve vermeerdering en zelfbestuiving

De groenknolorchis kan zich vegetatief voortplanten via wortelknollen. Planten die zich vegetatief voortplanten hebben identieke genetische profielen. Op basis van de AFLP-profielen kan men het aantal identieke genotypen (klonen) bepalen en dus een inzicht krijgen in de mate van vegetatieve voortplanting in een populatie.

Kleine verschillen in AFLP-patronen tussen individuen kunnen echter ook te wijten zijn aan somatische mutaties, scoringsfouten of technische analysefouten (vb. PCR-artefacten). Het aantal toegelaten verschillen in AFLP-patroon binnen eenzelfde genotype (kloon) werd bepaald via analyse van de replica's en de daarop berekende scorings- en analysefout.

De mate van zelfbestuiving ( $s$ ) werd geschat op basis van de AFLP-profielen met het programma INSTRUCT (Gao et al. 2007) (betrouwbaarheid: 95%). Via deze geschatte waarde voor de gemiddelde zelfbestuivingsgraad, kan de gemiddelde inteeltcoëfficiënt of fixatiewaarde ( $F_{IS}$ -waarde) worden berekend ( $F_{IS} = s/(2-s)$ ).

### 3.4 Genetische diversiteit en populatiestructuur

Een gereduceerde dataset van 266 polymorfe merkers (exclusief fragmenten die de dataset kunnen vertekenen door homoplasie) werd gebruikt voor de berekening van de genetische diversiteit en genetische structuur.

Voor de berekende  $F_{IS}$ -waarde werden allelfrequenties geschat met AFLP-SURV v 1.0 (Vekemans et al. 2002). Als genetische diversiteitsparameters werden de proportie van polymorfe loci (PPL) en Nei's genetische diversiteit ( $H_j$ , analoog aan  $H_e$ ) berekend, met een maximum van acht stalen per locatie (als correctie voor ongelijke staalnamegrootte). Als maat voor de zeldzaamheid van AFLP-fragmenten werd de DW-waarde ('frequency down-weighted marker values', een zeldzaamheidsindex) berekend met AFLPDAT (Ehrich 2006).

Ruimtelijke patronen in genetische diversiteit binnen het studiegebied werden in kaart gebracht door middel van een 25 km rooster waarbij voor elk roosterpunt de Shannon index werd berekend uitgaande van vijf stalen binnen een radius van 35 km rond elk roosterpunt. Omdat de Shannon index gevoelig is voor de staalnamegrootte en deze sterk varieerde tussen de locaties, werd de berekening 100 keer herhaald (100 'bootstraps', 'resampling' met teruglegging) voor telkens vijf stalen willekeurig geselecteerd binnen de radius. Vervolgens werden de gemiddelde waarden per roosterpunt in kaart gebracht (methode volgens Arrigo et al. 2010).

De genetische differentiatie tussen de locaties werd berekend via de  $F_{ST}$ -waarde met AFLP-SURV v 1.0 en de analoge  $\phi_{PT}$ -waarde (met significantie op basis van 99 permutaties) met GenAlEx 6.4 (Peakall and Smouse 2006).  $F_{ST}$ - en  $\phi_{PT}$ -waarden zijn een maat voor de differentiatie tussen populaties / locaties. Deze waarden variëren van 0 tot 1. Hoe kleiner deze waarden, hoe meer verwant populaties zijn.

De populatiestructuur werd onderzocht via een principale coördinaten analyse (PCoA) en een dendrogram of boomstructuur (Neighbour-joining Tree, midpoint rooted). Populaties die dicht bij elkaar voorkomen in de biplot van de PCoA of die voorkomen binnen dezelfde tak van het dendrogram zijn genetisch verwant aan elkaar. De bootstrapwaarden op de boomstructuur geven de sterkte van de clustering weer; lage bootstrapwaarden (vb. waarden < 70) geven aan dat de positie van de populatie in de cluster niet zeker is. De PCoA en de boomstructuur werden opgesteld op basis van de paarsgewijze genetische afstanden tussen populaties (Nei 1972) met GenAEx 6.4 (voor de PCoA) en met de modules NEIGHBOR en CONSENSE van het programma PHYLIP v 3.69 (Felsenstein 1993) (voor het dendrogram, 100 'bootstraps'). Verder werd de genetische structuur binnen het studiegebied ook onderzocht via een Bayesiaanse clustermethode met het programma INSTRUCT (modelspecificaties: admixt, K van 1 tot 28, 200 000 iteraties, 100 000 burn-in, 20 thinning interval). Het programma INSTRUCT is een clusterprogramma ontwikkeld voor zelfbestuivende soorten.

Via een manteltest uitgevoerd met GenAEx 6.4 werd nagegaan of populaties die geografisch dicht bij elkaar liggen meer verwant zijn aan elkaar dan populaties die verder van elkaar verwijderd liggen (isolatie door afstand). Voor het berekenen van de p-waarde werden 100 permutaties uitgevoerd.

## **3.5 Zaadverbreiding over lange afstand**

### **3.5.1 Toewijzingsanalyse**

In de toewijzingsanalyse wordt, voor elk individu en voor alle bemonsterde locaties, de kans berekend dat het individu behoort tot een specifieke locatie. Toewijzingsanalyses werden uitgevoerd met het programma AFLPOP v.1.1. (Duchesne and Bernatchez 2002). De waarschijnlijkheden worden berekend op basis van de bandfrequenties van de AFLP-profielen. Wanneer de kans of de waarschijnlijkheid dat een individu tot een populatie X behoort tien maal hoger is dan de waarschijnlijkheid dat het individu behoort tot een andere populatie (maximum likelihood-difference (MLD) = 1), wordt het individu toegewezen tot populatie X. We beschouwen hier de toewijzing tot een andere locatie dan deze waar de bemonstering plaatsvond, een waarschijnlijk gevolg van zaadverbreiding omdat genenuitwisseling door pollen nooit een dergelijk groot genetisch verschil kan veroorzaken als het toegepaste criterium voor toewijzing (MLD = 1) (zie ook He et al. 2004). Bovendien is genenverspreiding via pollen bij de groenknolorchis waarschijnlijk uiterst beperkt door het zelfbestuivend karakter van de soort. Individuen die het criterium voor toewijzing niet halen of m.a.w. die toegewezen worden tot een populatie maar met een waarschijnlijkheid die lager ligt dan 10 keer deze van de tweede, meest-waarschijnlijke populatie, worden niet toegewezen.

Individuen die volgens deze criteria toegewezen worden tot een populatie die verschilt van de populatie waar het individu werd bemonsterd, worden als mogelijke migranten afkomstig van lange-afstand-zaadverbreiding beschouwd. Een mogelijke migrant is dus meer verwant met individuen van een andere locatie dan met de individuen van de locatie waar de mogelijke migrant werd bemonsterd. Het programma AFLPOP voorziet ook een test die een indicatie geeft van de betrouwbaarheid van de toewijzingstesten. Die betrouwbaarheidstesten laten ook toe om in te schatten of bepaalde individuen afkomstig zijn van populaties die niet werden bemonsterd, dus van populaties buiten het studiegebied (voor meer details zie Duchesne and Bernatchez 2002).

De toewijzingsanalyse werd uitgevoerd binnen twee gebieden; 1) Noordwest-Frankrijk en 2) België en Nederland, met de populaties van de Waddeneilanden uitgezonderd omwille van ontbrekende data voor de populatie te Texel.

Voor Noordwest-Frankrijk werden toewijzingstesten uitgevoerd op 107 individuen bemonsterd op 9 locaties die in deze analyse meegenomen werden als mogelijke

bronpopulaties. Vooraf werd de AFLP-dataset nog gecheckt op de aanwezigheid van redundante merkers; binnen sets van merkers die dezelfde genetische informatie leveren, werd telkens één merker behouden. Twee merkers werden verwijderd wat het totaal aantal AFLP-merkers voor deze toewijzingsanalyse op 449 (451 – 2) bracht.

Voor de regio België – Nederland, werden toewijzingstesten uitgevoerd op 224 individuen bemonsterd op 16 locaties. Er werden geen redundante merkers gevonden. De toewijzingsanalyses gebeurden hier dus op basis van 451 AFLP-merkers.

Aangezien de groenknolorchis hoofdzakelijk een zelfbestuiver is, kan in principe een hele populatie ontstaan uit één enkel zaadje. In dit opzicht kunnen, binnen eenzelfde populatie, individuen die als mogelijke migranten werden aangewezen door de toewijzingsanalyse en afkomstig zijn van eenzelfde bronpopulatie, ook afkomstig zijn van slechts één migrant uit die specifieke bronpopulatie, dat zich nadien via zelfbestuiving voortplantte op de doellocatie. Daarom beschouwen we het aantal verschillende combinaties van bron- en doelpopulatie als ondergrens voor het geschatte percentage individuen afkomstig van zaaddispersie over lange afstand. Deze ondergrens is, omwille van de voortplantingsstrategie van de soort, de meest waarschijnlijke benadering voor de geschatte waarde van lange-afstandsdispersie.

### 3.5.2 Effect van de bronpopulaties op de toewijzingen

Om het effect van (ontbrekende) potentiële bronpopulaties op de toewijzingsanalyse na te gaan, werd de analyse ook uitgevoerd op de totale regio Noordwest-Frankrijk, België en Nederland met in totaal 25 (9 Noordwest Franse + 16 Belgisch/Nederlandse) potentiële bronpopulaties (opnieuw zonder de populaties van de Waddeneilanden door ontbrekende data voor Texel). Deze resultaten werden dan vergeleken met de resultaten van de toewijzingsanalyses binnen de deelgebieden 1) Noordwest-Frankrijk en 2) België en Nederland, zonder Waddeneilanden.

Om het effect van uitsluiting van de vier geanalyseerde populaties van de Nederlandse Waddeneilanden na te gaan op de resultaten van de toewijzingen, werden de toewijzingen ook uitgevoerd voor alle geanalyseerde stalen van België en Nederland met de vier geanalyseerde populaties van de Waddeneilanden eveneens opgenomen als potentiële bronpopulaties (dus  $16 + 4 = 20$  bronpopulaties). Deze resultaten werden dan vergeleken met de resultaten van de toewijzingsanalyse van dezelfde stalen binnen de regio België / Nederland, maar zonder de Waddeneilanden als potentiële bronpopulaties.

### 3.5.3 Effect van het aantal AFLP-merkers op de toewijzingen

Ook het effect van het aantal merkers op de resultaten van de toewijzingsanalyse werd nagegaan door de toewijzingsanalyses te herhalen op basis van een deel van de merkers. Merkers die een hoger risico vertonen op homoplasie (DNA-fragmenten die als identiek (homoloog) worden beschouwd, maar toch verschillen) werden uit de dataset verwijderd (fragmenten < 200 bp voor primer combinatie EcoRI-ACT/MseI-CTA) en de toewijzingstesten werden opnieuw herhaald binnen de twee regio's; 1) Noordwest-Frankrijk en 2) België en Nederland, met de populaties van de Waddeneilanden uitgezonderd. De resultaten werden dan vergeleken met de resultaten van de toewijzingsanalyses bekomen binnen dezelfde gebieden maar met de totale merkerset.

## 3.6 Genetische aanwijzingen voor lokale aanpassingen

De AFLP-analyse genereert voor elk individu honderden genetische merkers; DNA-fragmenten die over het algemeen willekeurig verdeeld zijn over het totale genoom. Bij

neutrale evolutionaire processen zoals genenuitwisseling, genetische drift en inteelt, reageert elke plaats (locus) binnen het genoom van een individu op een gelijkaardige wijze. Dit is niet het geval bij natuurlijke selectie. Door een verandering in één of enkele genen (vb. door een mutatie), kan een individu voordelige of nadelige eigenschappen ontwikkelen waardoor het beter of minder goed aangepast is aan een bepaalde omgeving. Door natuurlijke selectie zullen vooral die nakomelingen overleven die voordelige eigenschappen met zich meedragen. Over het algemeen zal het genoom van deze bevoordeelde individuen weinig verschillen van hun soortgenoten, uitgezonderd in en nabij die genen die aan de basis liggen van de voordelige, erfelijke aanpassing. De genen met gunstige eigenschappen en ook naburige genen onder natuurlijke selectiedruk, differentiëren zich dus van de rest van het genoom en zijn via een genoom scan op te sporen als uitschieters ('outlier' loci). Lokale aanpassing aan een specifieke groeiplaats of habitat, kan aan de oorzaak liggen van het ontstaan van 'ondersoorten' en op lange termijn zelfs het ontstaan van nieuwe soorten (wanneer beide ondersoorten niet meer succesvol met elkaar kruisen). Dit initieel proces van soortvorming noemt men isolatie-door-aanpassing ('isolation by adaptation').

Via een genoom scan zoeken we naar mogelijke verbanden tussen genetische merkers en eigenschappen die verbonden zijn met specifieke aanpassingen aan één van de twee groeiplaatsen van de groenknolorchis: natte duinpannen of alkalisch laagveen. Hiertoe groeperen we de individuen volgens hun groeiplaats (duinpanne of laagveen) en zoeken we naar DNA-fragmenten die zich gedragen als uitschieters. Wanneer er uitschieters gevonden worden, is dat een mogelijke indicatie voor een genetische eigenschap verbonden met aanpassing aan de groeiplaats. De studie van hoge aantallen genetische merkers verhoogt de kans op de detectie van genetische wijzigingen verbonden met lokale aanpassingen (als die er zijn). Echter, het verhoogt ook de kans op vals positieve resultaten. Bij een hoog aantal merkers verhoogt de kans dat er een uitschieter voorkomt door toeval. Er zijn verschillende statistische methodes uitgewerkt die het risico op vals positieve resultaten beperkt houden (in deze studie werd de kans op vals positieve resultaten vooraf ingesteld op max 5% ). Desondanks de mogelijkheid hiervoor een correctie in rekening te brengen, dienen de resultaten met voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd.

We gebruiken hier twee verschillende methodes voor de detectie van DNA-fragmenten die mogelijk specifiek zijn voor de standplaats; een Bayesiaanse methode geïmplementeerd in het programma BAYESCAN 2.01 (Foll et al. 2008) en een methode gebaseerd op simulaties uitgewerkt in het programma MCEZA (Antao and Beaumont 2011). We gaan ervan uit dat uitschieters die door beide methoden worden gevonden, goede kandidaten zijn als signalen van lokale aanpassingen.

Voor het opsporen van uitschieters met BAYESCAN en MCEZA, groeperen we alle stalen volgens groeiplaats (duin of laagveen) op drie verschillende geografische niveau's:

- 1) op continentaal niveau met alle bemonsterde individuen (figuur 6, schaal 1:  $n_{\text{duin}} = 273$ ,  $n_{\text{laagveen}} = 117$ )
- 2) op regionaal niveau van Noordwest-Frankrijk, België en Nederland (figuur 6, schaal 2:  $n_{\text{duin}} = 273$ ,  $n_{\text{laagveen}} = 101$ )
- 3) op landschappelijk niveau van Noordwest-Frankrijk (figuur 6, schaal 3a:  $n_{\text{duin}} = 74$ ,  $n_{\text{laagveen}} = 33$ ) en van België - Nederland (figuur 6, schaal 3b:  $n_{\text{duin}} = 273$ ,  $n_{\text{laagveen}} = 101$ )

Omdat genetische aanpassingen ook heel lokaal kunnen optreden, testten we ook alle paarsgewijze combinaties van duin- en laagveenpopulaties binnen Noordwest-Frankrijk, België en Nederland (schaal 2) op mogelijke uitschieters met BAYESCAN. Hierbij nemen we de paarsgewijze combinaties van populaties gelegen in eenzelfde habitat (duin vs. duin, laagveen vs. laagveen) als controle. Een uitschieter wordt dus enkel beschouwd als mogelijke uitschieter verbonden met genetische aanpassing aan het habitat, indien de

uitschieter voorkomt in minstens één paarsgewijze combinatie van duin- en laagveenpopulaties en in geen enkele paarsgewijze combinatie van twee duinpopulaties of twee laagveenpopulaties. We beschouwen een genetische merker enkel als uitschieter indien BAYESCAN aangeeft dat er sterke bewijzen zijn voor selectie (het criterium  $P(\alpha \neq 0) > 0.91$ ; i.e. 'strong evidence for selection'). Aangezien de methode gevoelig is voor lage aantallen, werden de analyses enkel uitgevoerd indien minstens 15 geanalyseerde stalen per populatie beschikbaar waren of werden naburige populaties van eenzelfde habitat samengevoegd.

## 4 Resultaten en bespreking

### 4.1 Vegetatieve vermeerdering en zelfbestuiving

In totaal werden 451 polymorfe merkers gescoord voor 422 individuen bemonsterd op 38 locaties. Stalen waarvan de profielen voor één of meerdere primer combinaties niet duidelijk waren, werden vooraf uit de dataset verwijderd en dus niet meegenomen in analyses (dit geldt bijvoorbeeld voor de stalen bemonsterd in Texel). De scorings- en analysefout op de AFLP-profielen bedroeg 2.4% per locus. Deze fout ligt binnen de verwachte waarden voor AFLP-analysen.

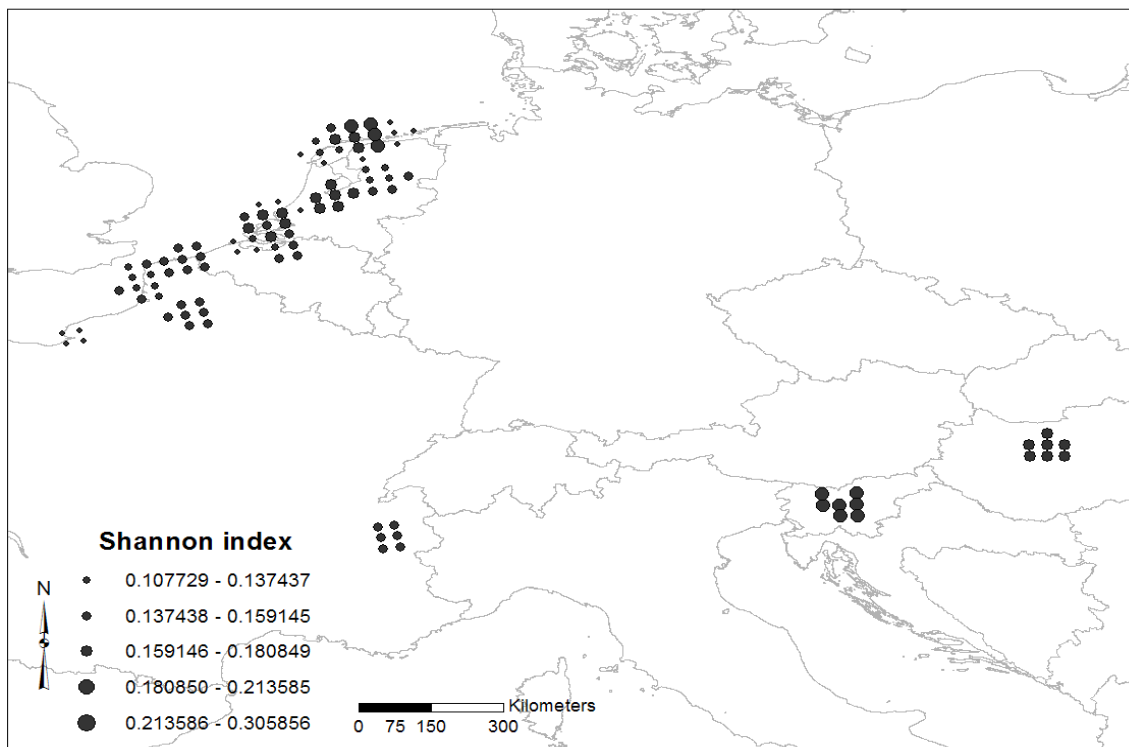
Alle AFLP-profielen waren uniek. Er werden dus, na correctie voor de fout op de profielen, geen identieke genotypes (dus geen klonen) waargenomen binnen de bemonsterde stalen. Het dient opgemerkt dat bij de staalnamen planten bemonsterd werden die minstens één meter van elkaar verwijderd waren. Op deze manier werden orchissen die vlak naast elkaar stonden en dus waarschijnlijk waren ontstaan uit vegetatieve vermeerdering via de vorming van nieuwe wortelknollen, bewust vermeden. Dormantie van de stengelknol komt waarschijnlijk niet voor bij deze soort. Alle individuen die in deze studie werden geanalyseerd zijn bijgevolg waarschijnlijk afkomstig van zaden.

De gemiddelde geschatte waarde voor de zelfbestuivingsgraad per populatie was 91% ( $\pm 5.5$  standaardafwijking). Dit bevestigt het vermoeden dat de groenknolorchis hoofdzakelijk een zelfbestuiver is. Een zelfbestuivingsgraad van 91% komt overeen met een inteeltcoëfficiënt ( $F_{IS}$ ) van 0.83.

### 4.2 Genetische diversiteit en populatiestructuur

De genetische diversiteit was relatief groot, gezien de hoge mate van zelfbestuiving. De berekende genetische diversiteitsparameters per populatie (PPL,  $H_j$ , DW) worden weergegeven in tabel 1 in bijlage. Het percentage polymorfe loci varieerde van 32 tot 52% met een gemiddelde van 59%.  $H_j$  varieerde van 0.13 tot 0.35 met een gemiddelde van 0.20. Een vergelijkbare genetische variatie werd ook waargenomen bij andere, in hoofdzaak zelfbestuivende orchideeën (vb. *Neotinea maculata* (Duffy et al. 2009)). Ook bij een zelfbestuiver kan tijdens de vorming van gameten de genetische variatie toenemen tijdens de celdeling (meiose) door het uitwisseling van chromatidesegmenten tussen de homologe chromosomen.

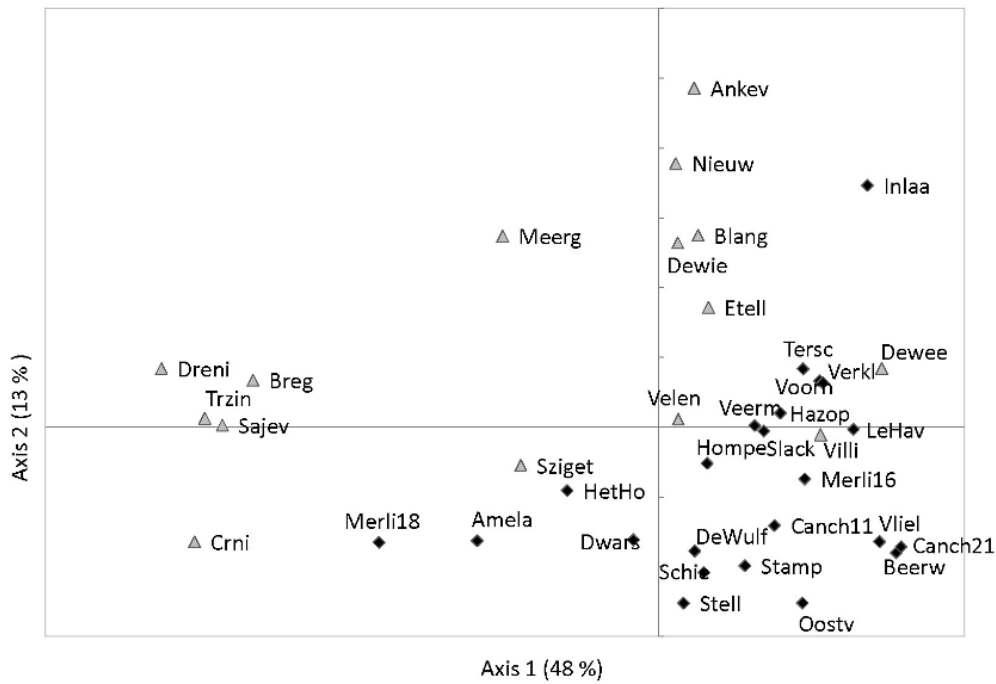
Er was geen duidelijk ruimtelijk patroon zichtbaar in de genetische diversiteit (figuur 7). De hoogste waarden voor de genetische diversiteitsparameters werden gevonden voor de Sloveense populaties en in mindere mate ook voor de populatie te Ameland.



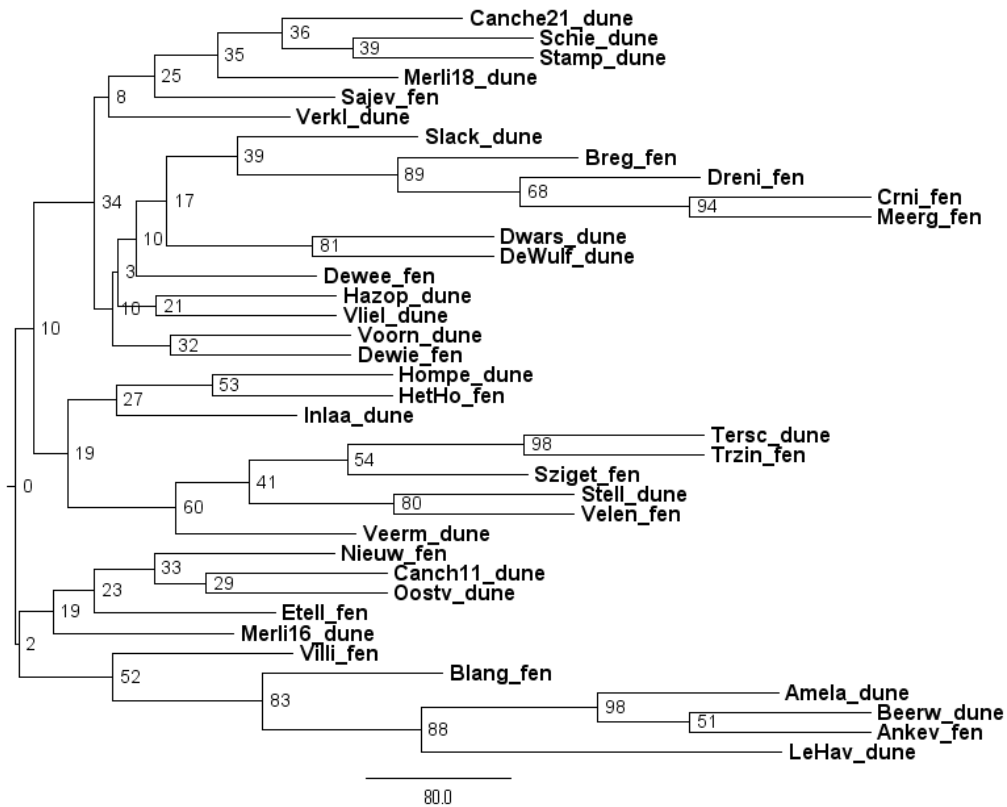
Figuur 7 Ruimtelijke patronen van de genetische diversiteit berekend via de Shannon index en op basis van een 25 km rooster

De waargenomen genetische differentiatie tussen locaties was relatief laag, gezien de omvang van het ruimtelijke gebied waarbinnen de locaties werden bemonsterd. De geschatte waarde voor de gemiddelde  $F_{ST}$  was 0.09 ( $\pm 0.1$  standaardafwijking). De analoge  $\Phi_{PT}$ -waarde was 0.13 en significant groter dan nul ( $P = 0.01$ , op basis van 100 permutaties). Dus, ook al lagen de locaties over het algemeen ver van elkaar, slechts 9% tot 13% (afhankelijk van de berekende parameter nl.  $F_{ST}$  of  $\Phi_{PT}$ ) van de totale waargenomen genetische diversiteit werd toegewezen aan de variatie tussen locaties.

We vonden geen duidelijke ruimtelijke genetische structuur en geen significante 'isolatie-door-afstand' ( $r_{xy} = -0.015$ , ( $r_{xy}\text{-rand} \geq r_{xy}\text{-data} = 0.44$ ). Dus, veraf gelegen populaties waren niet noodzakelijk meer verschillend van elkaar dan nabij gelegen populaties. De biplot die de eerste twee assen weergeeft van de PCoA (figuur 8) toont aan dat er geen duidelijk genetisch te onderscheiden groepen zijn tussen de populaties; ze clusteren allemaal min of meer samen in één grote groep. Ook de boomstructuur (figuur 9) geeft geen logische groepering van de populaties volgens geografische ligging weer op basis van de genetische data. De lengte van de takken respecteren de genetische afstanden tussen de populaties en de bootstrapwaarden aan de knooppunten geven weer hoeveel keer per 100 gemaakte boomstructuren die specifieke uitsplitsing werd bekomen. De over het algemeen lage bootstrapwaarden op de knooppunten tonen aan dat er geen duidelijk onderscheiden groepen van populaties zijn. Er is ook geen duidelijke groepering van de populaties per habitattype, wat ook te verwachten was aangezien deze boomstructuur is opgesteld aan de hand van AFLP-merkers die over het algemeen onder neutrale selectie staan. Naast de PCoA en de boomstructuur, toont ook de Bayesiaanse clustermethode een gebrek aan logische groepering van de populaties (zie figuur 12 in bijlage). De Bayesiaanse clustermethode toont nog eens aan dat er veel genetische vermenging is tussen populaties.



Figuur 8 Biplot van de Principale Coördinaten Analyse uitgevoerd op 38 populaties van groenknolorchis en berekend op basis van genetische afstanden tussen populaties (driehoek: laagveenhabitat, ruit: duin habitat)



Figuur 9 Boomstructuur van de 38 populaties van groenknolorchis berekend via paarsgewijze genetische afstanden



## 4.3 Zaadverbreiding over lange afstand

### 4.3.1 Toewijzingsanalyse

De resultaten van de toewijzingsanalyse suggereren opvallend hoge waarden voor lange-afstandsverbreiding bij de groenknolorchis. Afhankelijk van het studiegebied (België en Nederland of Noordwest-Frankrijk) waren 15% tot 16% van de bemonsterde individuen veronderstelde migranten afkomstig van zaadverbreiding tussen locaties. Deze percentages vertegenwoordigen het aantal verschillende combinaties van bron-(zaad-) en doelpopulatie per locatie.

Voor het studiegebied België & Nederland, kwam de richting van zaadverbreiding voornamelijk overeen met tweede meest voorkomende windrichting (na de heersende overzeese westenwinden). Voor Noordwest-Frankrijk, was de voornaamste verspreidingsrichting eveneens de tweede meest voorkomende windrichting (noordwesten) samen met de noordoostelijke richting. Vermoedelijke migranten kwamen niet noodzakelijk van de meest nabijgelegen populaties en verspreidingsafstanden tot 220 km werden waargenomen (met een gemiddelde van 50 km voor Noordwest-Frankrijk en 20 km voor België / Nederland).

Een bloeiende groenknolorchis kan makkelijk vele duizenden, uiterst lichte zaden produceren die luchtkamers bevatten. Deze ballonachtige zaden kunnen via de wind lange afstanden afleggen (Arditti 1980).

Bij de toewijzingsstesten gebruikten we een relatief streng criterium voor toewijzing (MLD = 1 of minstens 10 keer meer verwant met de toegewezen locatie dan met een andere bemonsterde locatie) en deze testen waren gebaseerd op een groot aantal informatieve merkers (449 en 451 voor respectievelijk Noordwest-Frankrijk en België & Nederland) waardoor het succes op juiste toewijzing vergroot. Toch is het waarschijnlijk dat de hoger vermelde waarden van lange-afstandsverbreiding een overschatting zijn van de werkelijke lange-afstandsverbreiding. Er zijn twee belangrijke bemerkingen die men in beschouwing dient te nemen bij de interpretatie van de resultaten. Vooreerst is het aantal geanalyseerde stalen (tabel 1 in ijlage ; N: aantal geanalyseerde stalen) voor verschillende locaties laag in verhouding met het aantal aanwezige individuen op de locatie (tabel 1 in ijlage; Nc: census populatiegrootte). Hierdoor vergroot de kans dat verschillende zelfbestuivingslijnen niet werden bemonsterd. Als gevolg hiervan kan een individu foutief worden toegewezen. Dit heeft een overschatting van de lange-afstandsverbreiding tot gevolg. Ten tweede is het ook mogelijk dat, voor oude populaties, veronderstelde migranten afkomstig zijn van verbreiding die enkele generaties geleden plaatsvond in een periode dat de soort nog frequenter voorkwam, wat eveneens leidt tot een overschatting van verbreiding. Dit kan mogelijk het geval zijn voor veronderstelde migranten uit de laagveengebieden eerder dan voor de duinpopulaties waarvan geweten is dat ze redelijk jong zijn en pas zijn ontstaan toen de soort al zeldzaam was in het studiegebied.



Figuur 10 Zaden van de groenknolorchis (foto: Wouter Van Landuyt)

#### 4.3.2 Effect van de bronpopulaties en het aantal merkers op de toewijzingen

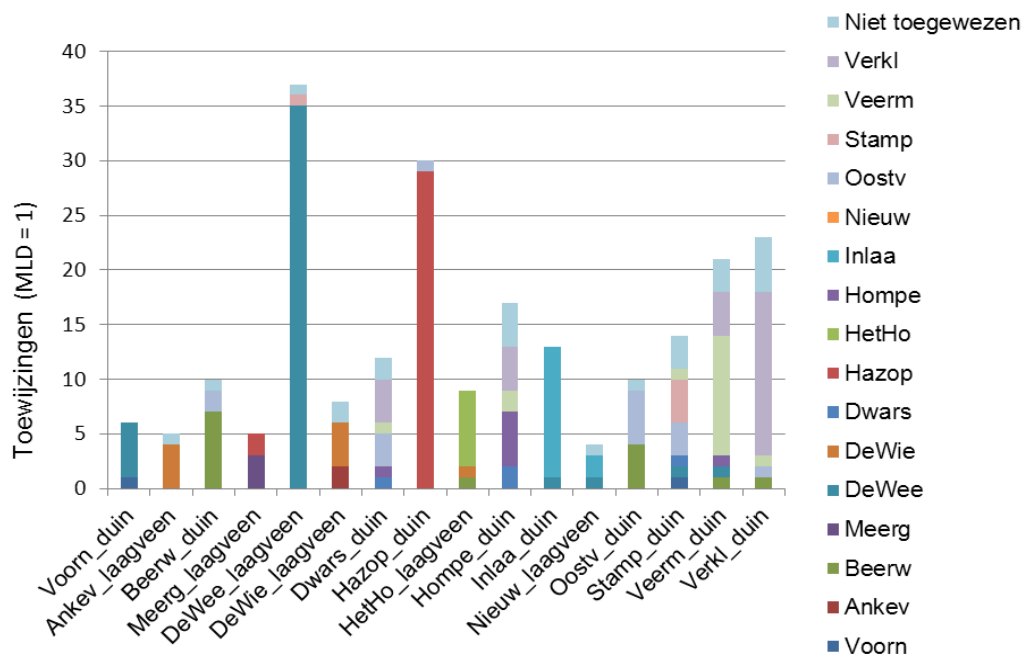
Wanneer alle bemonsterde locaties van zowel België, Nederland als Noordwest-Frankrijk als bronpopulaties worden meegenomen in de toewijzingsanalyses, verandert dit de toewijzing van vier op 61 (6%) mogelijke migranten voor de regio België & Nederland. Deze vier stalen worden in dat geval toegewezen aan een populatie uit Noordwest-Frankrijk.

Voor de stalen van Noordwest-Frankrijk is het effect van de meegenomen bronpopulaties op de analyseresultaten groter: voor zeven van de 24 (29%) vermoedelijke migranten verandert de vermoedelijke bronpopulatie van een naburige Franse naar een Belgisch-Nederlandse locatie.

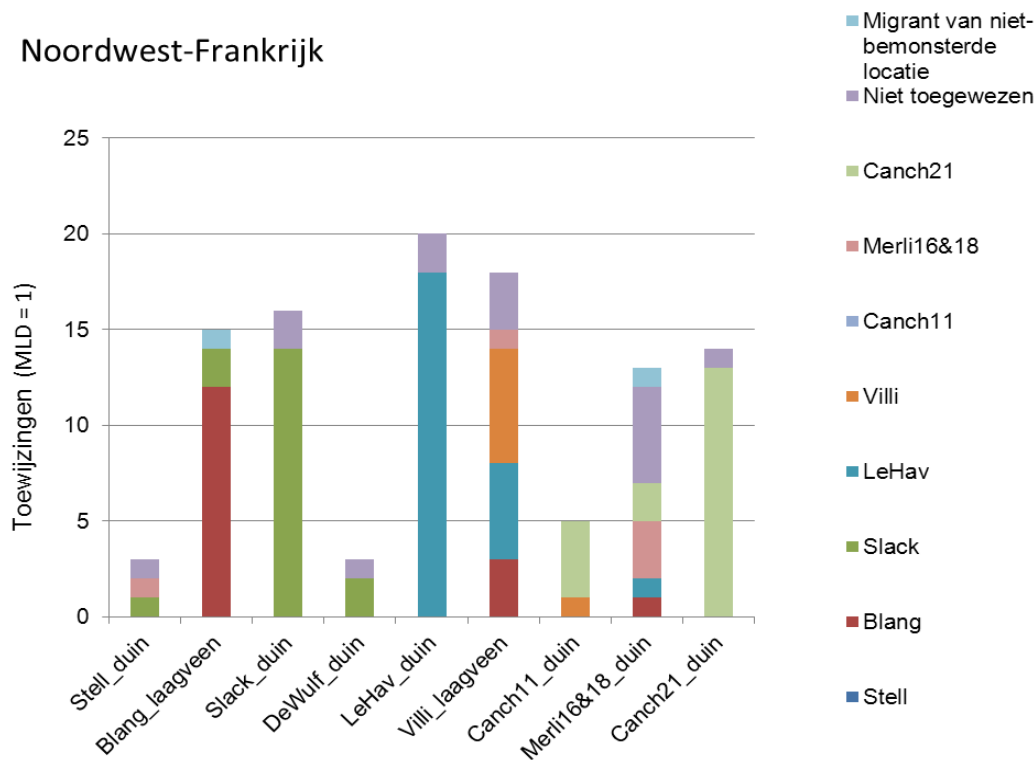
Het toevoegen van de geanalyseerde populaties van de Waddeneilanden als mogelijke bronpopulaties bij de toewijzingstesten van de Belgische & Nederlandse stalen, verandert de mogelijke bronpopulatie voor drie (5%) vermoedelijke migranten.

Wanneer de toewijzingsanalyses werden uitgevoerd op een gereduceerde dataset (met 376 / 378 merkers in plaats van 449 / 451 merkers), veranderde dit de toewijzing van 5 (2,5%) mogelijke migranten voor de regio België / Nederland en voor twee (2,2 %) individuen voor de regio Noordwest-Frankrijk. Een vermindering van het aantal merkers had vooral ook een stijging tot gevolg van het aantal stalen die niet met voldoende betrouwbaarheid konden toegewezen worden aan één bepaalde populatie.

## België & Nederland



## Noordwest-Frankrijk



Figuur 11 Resultaten van de toewijzingsanalyses van de bemonsterde groenknolorchissen voor de regio België / Nederland en voor Noordwest-Frankrijk

#### **4.4 Genetische aanwijzingen voor lokale aanpassingen**

We vonden één AFLP-merker (uitschieter ID 167 , ACTcta48) die geassocieerd werd met de groeiplaats (duin vs. laagveen) door beide programma's (BAYESCAN en MCEZA) wanneer we alle geanalyseerde stalen groepeerden volgens habitat op continentaal niveau (schaal 1). Maar, omdat deze merker ook voorkwam als uitschieter in een paarsgewijze vergelijking van twee populaties gelegen in eenzelfde habitat (beiden in laagveen), dus in een controlevergelijking, werd deze uitschieter niet beschouwd als zijnde kenmerkend voor het genetisch verschil te wijten aan de groeiplaats. Zowel op continentaal (schaal 1), regionaal (schaal 2) of landschappelijk niveau (schaal 3) werden geen andere AFLP-merkers gedetecteerd die wijzen op een genetische aanpassing karakteristiek voor het habitat.

Bij de paarsgewijze vergelijkingen van populaties werden wel uitschieters gevonden die mogelijk verbonden zijn met aanpassingen aan de groeiplaats. Zes (1,3%) AFLP-merkers kwamen voor als uitschieter in ten minste één paarsgewijze vergelijking van een duin- met een laagveenpopulatie en niet in een controlevergelijking van twee populaties uit het zelfde habitat. Van deze zes AFLP-merkers die mogelijk wel verbonden zijn met genen die bijdragen aan specifieke genetische aanpassing aan het habitat, werd één AFLP-merker (met identificatie ID 431) als uitschieter waargenomen in drie paarsgewijze populatievergelijkingen waarvan twee statistisch onafhankelijk waren (deze onafhankelijke paarsgewijze vergelijkingen omvatten telkens verschillende populaties). Deze laatste uitschieter ID 431 is daarom een degelijke kandidaat als mogelijke DNA-fragment verbonden met genetische aanpassing aan het habitatype.

Uit deze genomscane besluiten we dat er zwakke signalen gevonden zijn dat de groenknolorchis genetische aanpassingen vertoont aan de specifieke groeiplaats (duinpanne of laagveen). Of deze kandidaat-merkers wel degelijk verbonden zijn met genen karakteristiek aan het habitat, kan enkel via verder onderzoek worden bevestigd.

## 5 Conclusie

De resultaten van deze studie suggereren dat de groenknolorchis in staat is zaden te verbreiden over lange afstanden. Tussen de populaties van de duin- en laagveengebieden werden geen grote genetische verschillen gevonden. De versnipperde groeiplaatsen van de groenknolorchis in Noordwest-Frankrijk, België en Nederland gedragen zich als één grote metapopulatie waarbij de deelpopulaties onderling min of meer met elkaar in contact staan via de uitwisseling van zaden. De huidige groeiplaatsen kunnen dus als bronpopulatie dienen voor de kolonisatie van nieuwe gebieden, zelfs indien deze veraf gelegen zijn van de herstelde groeiplaatsen. De verbreiding en beschikbaarheid van zaden is dus waarschijnlijk geen beperkende factor voor de kolonisatie van nieuwe geschikte gebieden. Voor de instandhouding van de soort op lange termijn dienen vooral de geschikte groeiplaatsen te worden uitgebreid. Op korte termijn is het belangrijk de huidige groeilocaties te beschermen omdat ze kunnen dienen als zaadbron voor de kolonisatie van nieuwe gebieden. Om deze resultaten te kunnen bevestigen en om inzicht te krijgen in de specifieke groeiplaatsvereisten zijn zaai- en/of transplantatie-experimenten nodig waarbij de geschikte biotische (vb. mycorrhiza) en abiotische bodemcondities (vb. vochthuishouding) worden bepaald.

## 6 Referenties

- Antao, T., Beaumont, M.A., 2011. Mcheza: a workbench to detect selection using dominant markers. *Bioinformatics* 27, 1717-1718
- Arditti, J., 1980. Aspects of the physiology of orchids, In *Advances in Botanical Research*. ed. H.W. Woolhouse, pp. 421-655. Academic Press.
- Arrigo, N., Felber, F., Parisod, C., Buerki, S., Alvarez, N., David, J., Guadagnuolo, R., 2010. Origin and expansion of the allotetraploid *Aegilops geniculata*, a wild relative of wheat. *New Phytologist* 187, 1170-1180
- Arrigo, N., Tuszyński, J.W., Ehrich, D., Gerdes, T., Alvarez, N., 2009. Evaluating the impact of scoring parameters on the structure of intra-specific genetic variation using RawGeno, an R package for automating AFLP scoring. *Bmc Bioinformatics* 10, 33
- Bonin, A., Bellemain, E., Bronken Eidessen, P., Pompanon, F., Brochmann, C., Taberlet, P., 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13, 3261-3273
- Catling, P.M., 1980. Rain-assisted autogamy in *Liparis loeselii* (L.) C Rich (Orchidaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 107, 525-529
- Claessens, J., Kleynen, J., 2011. The flower of the European orchid. Form and function. Schrijen-Lippertz, Voerendaal/Stein.
- Duchesne, P., Bernatchez, L., 2002. AFLPOP: a computer program for simulated and real population allocation, based on AFLP data. *Molecular Ecology Notes* 2, 380-383
- Duffy, K.J., Scopece, G., Cozzolino, S., Fay, M.F., Smith, R.J., Stout, J.C., 2009. Ecology and genetic diversity of the dense-flowered orchid, *Neotinea maculata*, at the centre and edge of its range. *Annals of Botany* 104, 507-516
- Ehrich, D., 2006. AFLPDAT: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes* 6, 603-604
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Foll, M., Beaumont, M.A., Gaggiotti, O., 2008. An approximate Bayesian computation approach to overcome biases that arise when using amplified fragment length polymorphism markers to study population structure. *Genetics* 179, 927-939
- Gao, H., Williamson, S., Bustamante, C.D., 2007. A Markov chain Monte Carlo approach for joint inference of population structure and inbreeding rates from multilocus genotype data. *Genetics* 176, 1635-1651
- He, T.H., Krauss, S.L., Lamont, B.B., Miller, B.P., Enright, N.J., 2004. Long-distance seed dispersal in a metapopulation of *Banksia hookeriana* inferred from a population allocation analysis of amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Ecology* 13, 1099-1109

- Hultén, E., Fries, M., 1986. Atlas of North European Vascular Plants. Koeltz Scientific Books Königstein.
- Leten, M., Provoost, S., Lehouck, V., 2012. Orchideeën aan de kust. De Grote Rede
- Nei, M., 1972. Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist* 106, 283-292
- Odé, B., Bolier, A., 2003. Groenknolorchis op de kaart. *Gorteria* 29, 33-37
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295
- Robyns, A., 1958. *Liparis loeselii* (L.) L.C. Rich. En voie de disparition en Belgique. *BulBulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique* 91, 79-92
- Roesti, M., Salzburger, W., Berner, D., 2012. Uninformative polymorphisms bias genome scans for signatures of selection. *Bmc Evolutionary Biology* 12, 94
- Spanoghe, G., Van Landuyt, W., Gyselings, R., 2008. Nieuwe vindplaats van Groenknolorchis (*Liparis loeselii*) in de Waaslandhaven. *Dumortiera* 95, 1-3
- Valentin, B., Toussaint, B., Duhamel, F., Valet, J.-M., 2010. Plan national d'actions en faveur du *Liparis de Loesel* (*Liparis loeselii*) 2010-2014. Conservatoire botanique national de Bailleuil - Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement durable et de la Mer, Bailleuil.
- Van Landuyt, W., Vanhecke, L., Hoste, I., 2006. Rode Lijst van de vaatplanten van Vlaanderen en het Brussels Hoofdstedelijk Gewest, In Atlas van de Flora van Vlaanderen en het Brussels Gewest. eds W. Van Landuyt, I. Hoste, L. Vanhecke, W. Vercruysse, P. Van den Bremt, D. De Beer. INBO and Nationale Plantentuin van België, Brussel.
- Vekemans, X., Beauwens, M., Lemaire, M., Roldán-Ruiz, I., 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* 11, 139-151
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414
- Wheeler, B.D., Lambley, P.W., Geeson, J., 1998. *Liparis loeselii*(L.) Rich. in eastern England: constraints on distribution and population development. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126, 141-158
- Whigham, D.F., O'Neill, J.P., Rasmussen, H.N., Caldwell, B.A., McCormick, M.K., 2006. Seed longevity in terrestrial orchids - Potential for persistent in situ seed banks. *Biological Conservation* 129, 24-30

## 7 Bijlage

Tabel 1 Staalnamelocaties groenknolorchis. Nc: schatting van de census populatiegrootte (met jaar van schatting), N: het aantal geanalyseerde stalen met AFLP, DW; zeldzaamheidsindex, PPL: percentage polymorfe loci, Hj: Nei's genetische diversiteit

Land	Locatie	Code	Ecotype	Nc	N	DW	PPL <sub>1</sub>	Hj <sup>1,2</sup>
Nederland	Schiermonnikoog, Wadden	Schie	duin	108 (2003)	6	0.50	50	0.17
	Ameland, Wadden	Amela	duin	329 (2009)	9	0.95	82	0.31
	Terschelling, Wadden	Tersc	duin	1071 (2003)	19	0.61	68	0.19
	Vlieland Kroonspolder, Vlieland, Wadden	Vliel	duin	300 (2011)	9	0.48	57	0.17
	De Weerribben	Dewee	laagveen	1208 (2003)	37	0.54	61	0.16
	De Wieden	Dewie	laagveen	282 (2003)	8	0.58	63	0.20
	Ankeveense plassen, Ankeveen	Ankev	laagveen	116 (2003)	5	0.55	50	0.15
	Het Hol, Loosdrecht	HetHo	laagveen	855 (2003)	9	0.72	69	0.25
	Nieuwkoopse plassen, Nieuwkoop	Nieuw	laagveen	318 (2003)	4	0.52	48	0.17
	Beerweg - Europort, Hoek van Holland	Beerw	duin	160 (2009)	10	0.35	36	0.13
	Oostvoornse meer, Voorne	Oostv	duin	101 (2003)	10	0.48	37	0.14
	Voorne Duin, Voorne	Voorn	duin	100 (2003)	6	0.54	55	0.16
	Hompelvoet, Grevelingenmeer	Hompe	duin	70 (2009)	17	0.76	69	0.22
	Veermansplaat, Grevelingenmeer	Veerm	duin	20000 (2009)	21	0.68	72	0.22
	Stampersplaat, Grevelingenmeer	Stamp	duin	1600 (2009)	14	0.65	71	0.23
	Dwars in de weg, Grevelingenmeer	Dwars	duin	31 (2009)	12	0.76	76	0.26
	België	Verklikkerduinen, Schouwen-Duiveland	Verkl	duin	328 (2003)	23	0.66	72
Inlaag Hoofdplaat, Hoofdplaat		Inlaa	duin	557 (2003)	13	0.53	32	0.13
Frankrijk	Haazop - Waaslandhaven, Beveren	Hazop	duin	481(2009)	30	0.65	42	0.16
	Meergoor, Mol	Meerg	laagveen	5 (2009)	5	0.93	69	0.24
Frankrijk	Dune de Wulf	DeWulf	duin	3 (2009)	3	0.52	44	0.14



	Dune du Slack, Ambleteuse	Slack	duin	650 (2009)	16	0.61	62	0.17
	Panne 11 Baie de la Canche, Camiers	Canch11	duin	800 (2009)	5	0.45	45	0.13
	Panne 21-22 Baie de la Canche, Camiers	Canch21	duin	805 (2009)	14	0.42	55	0.15
	Marais de Villiers, Villiers	Villi	laagveen	42 (2009)	18	0.56	37	0.14
	Camping des Dune, Stella plage	Stell	duin	3 (2009)	3	0.56	46	0.16
	Panne 16 Merlimont	Merli16	duin	489 (2009)	10	0.46	56	0.15
	Panne 18 Merlimont	Merli18	duin	4 (2009)	3	0.78	56	0.27
	Blangy-Tronville	Blang	laagveen	458 (2009)	15	0.68	71	0.20
	Le Havre	LeHav	duin	400 (2009)	20	0.52	57	0.15
	Marais des Etelles, La Tables des Etelles	Etell	laagveen	65 (2009)	15	0.64	69	0.20
Hongarije	Lake Velencei	Velen	laagveen	3000 (2009)	14	0.72	69	0.21
	Szigetcsép-up	Sziget	laagveen	500 (2009)	5	0.76	63	0.26
Slovenië	Breg	Breg	laagveen	20 (2009)	3	1.03	61	0.30
	Crni potok	Crni	laagveen	43.(2009)	2	1.03	56	0.30
	Drenik	Dreni	laagveen	42 (2009)	3	1.4	73	0.35
	Sajevac	Sajev	laagveen	35 (2009)	2	0.96	53	0.26
	Trzin	Trzin	laagveen	37 (2009)	4	1.4	76	0.35



Figuur 12 Grafische voorstelling van de Bayesiaanse clusteranalyse uitgevoerd op 422 groenknolorchissen en berekend voor 266 merkers en 28 cluster