

Polyplöidie in Viooltje (*Viola L.*)

Kevin van den Hof (Nationaal Herbarium Nederland/Universiteit Leiden Branch,
Postbus 9514, 2300 RA Leiden, e-mail: vandenhof@nhn.leidenuniv.nl)

Polyplöidie in Viooltje (*Viola L.*)

Verschillende soorten die verwant zijn aan *Viola persicifolia* zijn, net als vele andere *Viola*-soorten, het resultaat van hybridisatie tussen twee of meer vooroudersoorten. Deze soorten zijn dus niet het resultaat van dichotome evolutie (het afsplitsen van een vooroudersoort), maar zijn het resultaat van reticulate evolutie. Deze verwantschappen zijn goed in kaart te brengen door in moleculair onderzoek gebruik te maken van genen waarvan verscheidene kopieën aanwezig zijn in het genoom. Zo'n gen is bijvoorbeeld het gen *Chalcone Synthase*. In *Viola* zijn voor dit gen drie kopieën aanwezig. Bij één van deze kopieën komen verschillende allelen voor, die voor een aantal soorten de reticulate patronen duidelijk naar voren laten komen. Door het hier gepresenteerde moleculair onderzoek zijn niet alleen de nauwste verwanten voor *V. persicifolia* gevonden, maar kon ook hun reticulate verwantschappen worden aangetoond.

Polyplöidy in *Viola L.*

A number of species related to *Viola persicifolia* have resulted from hybridization between two or more parental species. Hence, these hybrid species do not result from a dichotomous pattern of evolution, originating from one ancestor, but from reticulate evolution. The best way to unravel the reticulate patterns is by molecular research using a gene of which multiple copies are present in the genome. Such a gene is the gene *Chalcone Synthase*. In the genus *Viola*, three copies of this gene are present, of which one has multiple alleles. These alleles have proved useful in unravelling the reticulate relationships between several *Viola* species. In the molecular study presented here, not only the closest relatives of *V. persicifolia* could be clarified, but the reticulate relationships between these relatives could be recovered as well.

Inleiding

In de 23^e editie van Heukels' Flora van Nederland¹ staat bij Melkviooltje (*Viola persicifolia* Schreb.²) vermeld dat er twee variëteiten worden onderscheiden, namelijk: *Viola persicifolia* var. *persicifolia* (Veenmelkviooltje) en *V. persicifolia* var. *lacteaeoides* (Heidemelkviooltje). Verder wordt vermeld dat de taxonomische status van deze variëteiten wordt onderzocht. Als promovendus verbonden aan het Nationaal Herbarium Nederland ben ik degene die zich met dit onderzoek bezig houdt. Zoals veel Gorteria-lezers misschien al weten, bestaat er al lange tijd discussie over de taxonomische status van de twee variëteiten van het Melkviooltje die in Nederland onderscheiden worden. *Viola persicifolia* var. *lacteaeoides* (Heidemelkviooltje) wordt door sommigen gezien als een mogelijk endemische soort of ondersoort voor de Nederlandse flora³, anderen, waaronder Ruud van der Meijden, aarzelden om *V. persicifolia* in infraspecifieke taxa te verdelen.⁴ Aan mij de taak om met moleculaire DNA-technieken te onderzoeken of er genetische verschillen waar

te nemen zijn tussen deze twee variëteiten om zo uitsluitel te kunnen geven over hun taxonomische status. Voordat ik me echter op dit vraagstuk kon storten wilde ik eerst weten welke *Viola*-soorten de nauwste verwanten zijn van *V. persicifolia*. Mijn eerste bevindingen wil ik in dit artikel toelichten.

Viola* subsectie *Rostratae

Viola persicifolia maakt in het geslacht *Viola* deel uit van sectie *Viola* subsectie *Rostratae*. Deze subsectie omvat ongeveer 50 soorten met een wijde verspreiding over de gematigde streken van het noordelijk halfrond. In Europa komen ongeveer 20 soorten voor. Sommige zullen bij de Gorteria-lezer wel bekend zijn van de Nederlandse flora: *Viola rupestris*, *V. riviniana*, *V. reichenbachiana* en *V. canina*. Andere soorten zijn wellicht bij floristen bekend die ook met de flora van omliggende landen te maken hebben, zoals *V. elatior*, *V. mirabilis* en *V. pumila*.

Hybridisatie en polyploidie

Binnen het geslacht *Viola* is, net als in veel andere plantengeslachten, hybridisatie een algemeen voorkomend verschijnsel. Hybriden zijn vaak steriel. Soms kan bij hybriden het aantal chromosomen verdubbelen; dit proces noemen we polyploidisatie. Deze polyploïden waarvan het genoom bestaat chromosomensets van twee verschillende oudersoorten worden allopolyploïden genoemd. Door een dergelijke chromosoomverdubbeling kunnen steriele hybriden vruchtbaar worden.

Zulke vruchtbaar geworden polyploïden kunnen zich voortplanten. Ze kunnen kruisen met soortgelijke polyploïden, met polyploïden die zijn ontstaan uit andere oudersoorten, of terugkruisen met één van de oudersoorten zelf. Van al deze mogelijkheden zijn kruisingsproducten gevonden, ook in het geslacht *Viola*. Allopolyploïden en hun kruisingsproducten kunnen zich op lange termijn isoleren van hun vooroudersoorten en zo een nieuwe soort vormen.

Veel *Viola*-soorten die we tegenwoordig kennen zijn allopolyploïden. Valentine⁵ en Moore & Harvey⁶ hebben door middel van kruisingsexperimenten en het bestuderen van de chromosomen van de kruisingsproducten uit deze experimenten de relaties tussen een aantal polyploïde viooltjes en hun oudersoorten weten te bepalen. *Viola riviniana* is bijvoorbeeld het resultaat van hybridisatie tussen *V. reichenbachiana* en een tot nu toe onbekende, waarschijnlijk uitgestorven, *Viola*-soort, waarna polyploidisatie is opgetreden (Fig. 1). *Viola canina* is het resultaat van hybridisatie tussen *V. persicifolia* en dezelfde voorgaande onbekende soort (Fig. 1). Veel recente *Viola*-soorten zijn dus geen afsplitsing van één vooroudersoort (dichotome evolutie), maar zijn het resultaat van hybridisatie tussen twee of meer vooroudersoorten, dit wordt reticulate evolutie genoemd (Fig. 2).

Chalcone Synthase-genfamilie in *Viola*

Omdat reticulate patronen belangrijk zijn bij het bepalen van de nauwste verwanten van *Viola persicifolia*, heb ik voor mijn moleculaire onderzoek het gen *Chalcone Synthase* (*CHS*) gekozen. Het enzym chalcone-synthase dat dit gen produceert is onder andere betrokken bij de pigmentatie van bloemen en vruchten, de ontwikkeling van pollen en de bescherming tegen UV-straling.⁷ Van dit gen zijn in veel plantensoorten verscheidene kopieën aanwezig⁸, variërend van twee in *Arabidopsis*⁹ tot wel acht in bijvoorbeeld *Petunia*.¹⁰ Alle verschillende kopieën van een gen bij elkaar worden een genfamilie genoemd. Zo hebben we hier dus met de *Chalcone Synthase*-genfamilie te maken. Verschillende kopieën van genen kunnen door een aantal oorzaken ontstaan, één hiervan is polyploidisatie. In het genus *Viola* heb ik drie kopieën van de *Chalcone Synthase*-genfamilie ontdekt.

Naast het feit, dat van één gen verschillende kopieën naast elkaar op hetzelfde chromosoom of op andere chromosomen kunnen liggen, kunnen van deze afzonderlijke kopieën ook weer verschillende vormen bestaan, die noemen we allelen. Het gen voor oogkleur bij mensen, bijvoorbeeld, bepaalt de kleur van onze ogen, maar er zijn verschillende vormen van dit gen, allelen dus, waardoor mensen verschillende oogkleuren hebben. In het geslacht *Viola* is voor twee van de drie gevonden kopieën van *CHS* maar één allel aanwezig. Van één kopie heb ik echter bij een aantal soorten verschillende allelen gevonden.

Door alle genkopieën en hun allelen te sequensen (dat is het bepalen van de basenvolgorde in een gen), heb ik niet alleen de evolutionaire verwantschappen kunnen bepalen tussen de verschillende genkopieën van de *Chalcone Synthase*-genfamilie, maar ook de verwantschappen tussen de verschillende *Viola*-soorten. Met behulp van

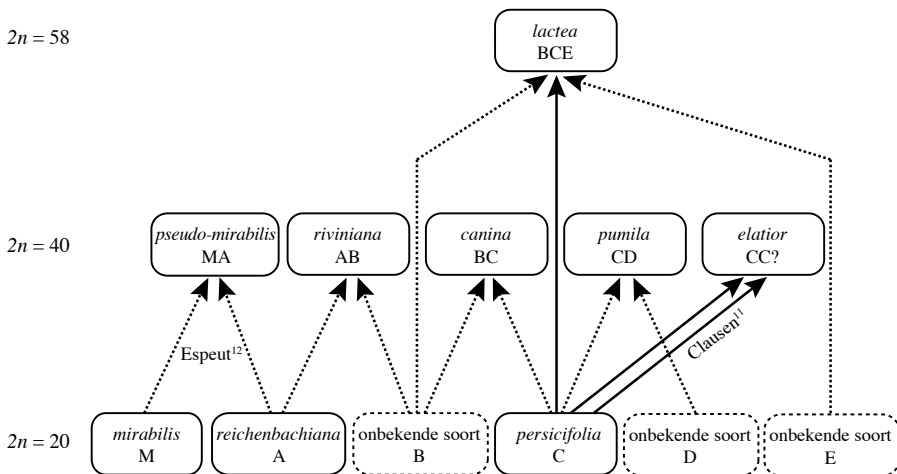


Fig. 1. De hypothetische relaties tussen de verschillende genoomtypen die aanwezig zijn in een aantal *Viola*-soorten. Mogelijk uitgestorven taxa zijn omrand met een stippellijn. Data afkomstig van Moore & Harvey⁶, behalve waar aangegeven.^{11 12}

de allelen binnen één genkopie heb ik de reticulate patronen die Valentine⁵ en Moore & Harvey⁶ hadden waargenomen kunnen bevestigen op DNA-niveau. Dat was nog niet eerder gedaan. In Fig. 2 is een gedeelte van de *Chalcone Synthase*-genenboom afgebeeld. Ter vereenvoudiging van de Figuur is alleen genkopie 2 van het *Chalcone Synthase*-gen opgenomen, de genkopie waarvan er meer allelen aanwezig zijn; de genkopieën 1 en 3, elk met maar één allel, zijn op dit niveau niet informatief en zijn niet in detail weergegeven. Het verschil met de fylogenetische stamboom die men normaal ziet, is dat in de genenboom niet de verwantschappen tussen de verschillende *Viola*-soorten worden weergegeven, maar de verwantschap tussen de verschillende kopieën en allelen van de *Chalcone Synthase*-genfamilie. In de genenboom zien we dat, bijvoorbeeld, *V. canina* op twee plaatsen in de boom voorkomt. Iedere plaats in de boom staat voor een ander allel dat voor *V. canina* gevonden is voor *CHS* genkopie 2.

Opvallend is dat één allel van *Viola canina* in een monofyletische groep samen met *V. riviniana* zit. Het tweede allel komt terecht in een monofyletische groep met onder andere *V. persicifolia*. Het tweede allel van *V. riviniana* komt weer ergens anders terecht, namelijk in een monofyletische groep met *V. reichenbachiana*.

Wanneer we terug grijpen op de ontdekkingen van Moore & Harvey⁶ dan zien we dat deze relaties in de genenboom wel degelijk logisch zijn. *Viola canina* is immers een allopoloïd bestaande uit het onbekende genoomtype B en genoomtype C afkomstig van *V. persicifolia*. Daarom is één allel meer verwant met soorten die genoomtype C hebben en het andere allel meer verwant met soorten die genoomtype B bezitten. Hetzelfde geldt voor *V. riviniana*, één allel komt samen met *V. canina* en andere soorten die genoomtype B hebben en het andere allel komt terecht in een monofyletische groep met *V. reichenbachiana*, de oudersoort met genoomtype A.

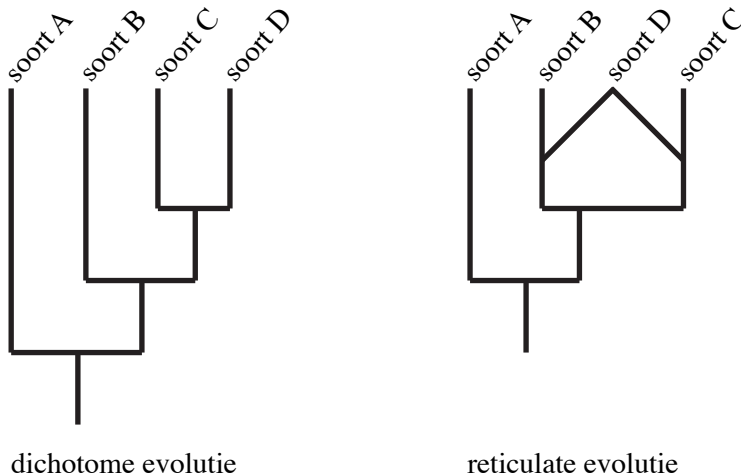


Fig. 2. Dichotome evolutie versus reticulate evolutie. Links is te zien dat soort D is ontstaan door zich af te splitsen van soort C. Dit wordt dichotome evolutie genoemd. Rechts is soort D het product van hybridisatie tussen soorten B en C. Dit wordt reticulate evolutie genoemd.

Verder is duidelijk dat de soorten die het genoom type C hebben, logischerwijs ook de nauwste verwanten van *V. persicifolia* zijn. Dit zijn *V. canina*, *V. elatior*, *V. lactea* en *V. pumila*. Al deze soorten zijn polyploïden.

Zo zien we dat *Viola pumila* behalve genoomtype C ook genoomtype D bezit. Genoomtype D heeft geen eigen tak in de genenboom zoals genoomtypen A, B en C, maar is terug te vinden binnen de tak van genoomtype B. Hieruit zou afgeleid kunnen worden dat genoom type D nauw verwant is met genoomtype B, maar het kan ook zo zijn dat andere taxa met genoomtype D niet vertegenwoordigd zijn in deze analyse, waardoor dit allel op deze positie terecht komt.

Voor *Viola lactea* is de situatie nog ingewikkelder. Deze soort is namelijk een hexaploid en heeft niet twee, maar drie genoomtypen, namelijk: B, C en E. De plaatsing van twee allelen valt gemakkelijk te verklaren aan de hand van de bevindingen van

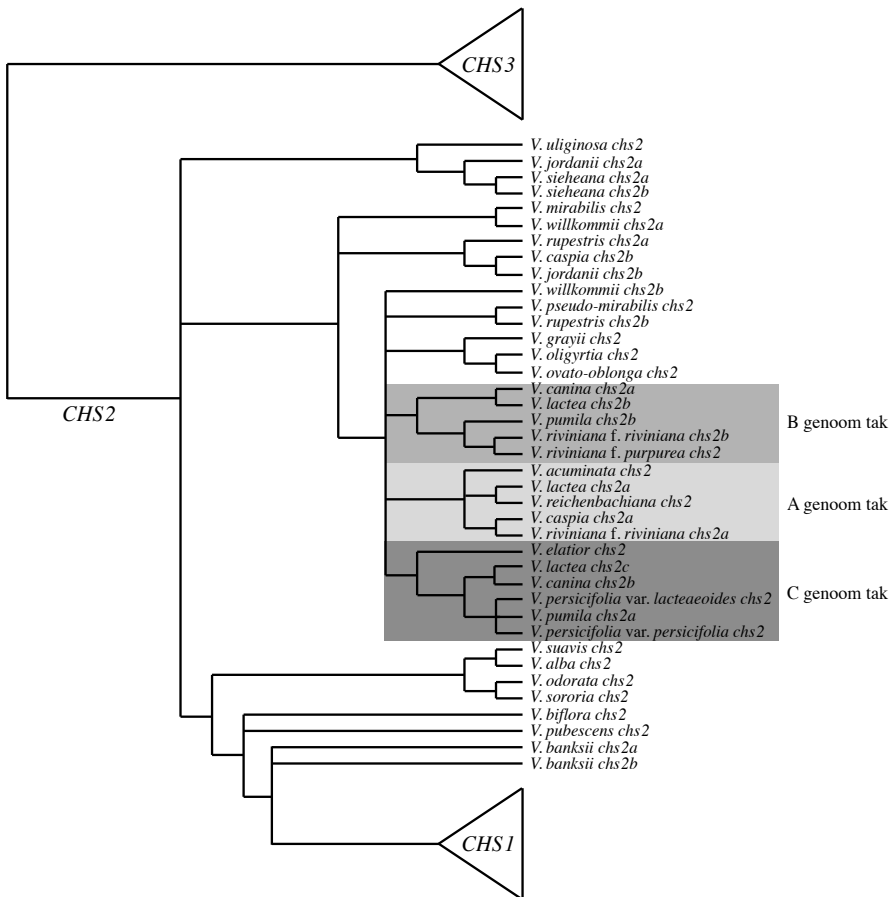


Fig. 3. De genenboom van het *Chalcone Synthase*-gen. Ter vereenvoudiging is alleen kopie 2 van het *Chalcone Synthase*-gen met al zijn allelen in detail weergegeven. De verschillende grijzen vakken geven de takken aan met de verschillende genoomtypen die door Moore & Harvey⁶ beschreven zijn.

Moore & Harvey.⁶ Deze allelen vallen, zoals te verwachten is, in de takken met genoomtypen B en C. Het derde allel (genoomtype E) lijkt meer verwant te zijn met allelen van genoomtype A. Hier kan dus hetzelfde aan de hand zijn als met genoomtype D van *V. pumila*: het genoomtype E is of meer verwant met genoomtype A of taxa met genoomtype E zijn niet vertegenwoordigd in deze analyse, waardoor dit allel op deze positie terecht komt.

Conclusies

Clausen¹¹ beweerde dat *Viola elatior* een autopolyploid is van *V. persicifolia*. Een autopolyploid is een polyploid met maar één oudersoort. Clausens hypothese is zeer waarschijnlijk juist, aangezien we maar één allel in *CHS* genkopie 2 vinden. Ook andere analysemethoden die recentelijk zijn toegepast, suggereren dat *V. elatior* een autopolyploid is.¹³

Zo hebben we met behulp van een gen met verscheidene kopieën voor *V. persicifolia* niet alleen de nauwste verwanten van deze soort kunnen vinden, maar ook de reticulate relaties met andere soorten kunnen aantonen.

De relaties binnen een groep organismen waarbij hybridisatie en polyploidie voor reticulate verwantschapspatronen zorgt, zoals bij *Viola*, kan dus goed bestudeerd worden door naar genen te kijken waarvan verscheidene kopieën in het genoom voorkomen.

1. R. van der Meijden. 2005. Heukels' Flora van Nederland, ed. 23. Wolters-Noordhoff, Groningen.
2. Uit recent taxonomisch onderzoek is gebleken dat de naam *Viola persicifolia* Schreb. zeer waarschijnlijk niet slaat op Melkvioltje, maar op een soort die tegenwoordig *V. elatior* Fries. genoemd wordt. Er is daarom een voorstel ingediend bij de *International Association for Plant Taxonomy* om de naam *V. persicifolia* te verwerpen en voortaan *V. stagnina* Kit. te gebruiken. Deze naam is wel altijd eenduidig gebruikt voor Melkvioltje. Gemakshalve wordt voor Melkvioltje in dit artikel echter nog de wetenschappelijke naam aangehouden die in de laatste editie van de Heukels' Flora¹ wordt gebruikt (*V. persicifolia*).
3. E.J. Weeda. 2001. Melkvioltje (*Viola persicifolia* Schreber) in Nederland in verleden en heden. 1. Variëteiten, voorkomen, standplaats en plantensociologische positie. *Stratiotes* 23: 73–103.
4. R. van der Meijden. 1996. Heukels' Flora van Nederland, ed. 22. Wolters-Noordhoff, Groningen.
5. D.H. Valentine. 1958. Cytotaxonomy of the Rostrate violets. *Proc. Linn. Soc. London* 169: 132–134.
6. D.M. Moore & M.J. Harvey. 1961. Cytogenetic relationships of *Viola lactea* SM. and other West European Arosulate violets. *New Phytol.* 60: 85–95.
7. J.B. Harborne. 1994. *The Flavonoids; Advances in Research since 1986*. Chapman & Hall, Londen.
8. M.L. Durbin, G.H. Learn, G.A. Huttley & M.T. Clegg. 1995. Evolution of the chalcone synthase gene family in the genus *Ipomoea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 3338–3342.
9. W.K. Wang, B.A. Schaal, Y.M. Chiou, N. Murakami, X.J. Ge, C.C. Huang & T.Y. Chiang. 2007. Diverse selective modes among orthologs/paralogs of the chalcone synthase (Chs) gene family of *Arabidopsis thaliana* and its relative *A. halleri* ssp. *gemmifera*. *Mol. Phyl. Evol.* 44: 503–520.
10. R.E. Koes, C.E. Spelt, J. Mol, A. Gerats. 1987. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): sequence homology, chromosomal localization and evolutionary aspects. *Plant Mol. Biol.* 10: 159–169.
11. J. Clausen. 1927. Chromosome number and the relationship of species in the genus *Viola*. *Ann. Bot.* 61: 677–714.

12. M. Espeut. 1999. Errata et addenda de l'article: "Approche du genre *Viola* dans le Midi Méditerranéen français". *Monde Pl.* 467: 7–9.
13. Persoonlijke mededeling van T. Marcussen per e-mail, dd. 08-11-2007.

Appendix: verklarende termenlijst

- Allel — Eén van de verschillende vormen die een bepaald gen kan aannemen. Hier is dus niet sprake van een extra kopie, maar van een andere verschijningsvorm.
- Allopolyploïd — Een hybride organisme met twee of meer complete set chromosomen van twee of meer verschillende soorten.
- Autopolyploïd — Een organisme waarbij (ooit) chromosoomverdubbeling is opgetreden, zonder dat er sprake is van hybridisatie.
- Dichotome evolutie — Het ontstaan van soorten na afsplitsing van één vooroudersoort (Fig. 2).
- Fylogenie — De evolutionaire geschiedenis van een bepaalde taxonomische groep weergegeven in een stamboom.
- Genenboom — Een stamboom van de verschillende kopieën en allelen van een bepaald gen.
- Genenfamilie — Een groep nauw verwante genen ontstaan uit een bepaald voorouderlijk gen. Deze genen kunnen al dan niet op hetzelfde chromosoom liggen.
- Genkopie — Een kopie van een bepaald gen. Deze kopie kan al dan niet op hetzelfde chromosoom liggen als het gen waar het een kopie van is (oudergen). De functie van zo'n kopie kan verloren zijn gegaan, maar de kopie kan ook een eigen functie verworven hebben.
- Monofyletische groep — Groep van soorten bestaand uit een vooroudersoort en al zijn nakomelingen.
- Reticulate evolutie — Het ontstaan van soorten na hybridisatie tussen twee vooroudersoorten (Fig. 2).