

## Vrouwenschoentje in het Limburgse heuvelland: te mooi om waar te zijn?

*Barbara Gravendeel, Nederlands Centrum voor Biodiversiteit Naturalis, Einsteinweg 2, 2333 CC Leiden*

*Nigel Harle, Rijksweg 52, 6247 AJ Gronsvelt*

*Steven Bekker & Nicky Hoebe, Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteem Dynamica, Science Park 904, 1098 XH, Amsterdam*

*Michael F. Fay, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW9 3AB, United Kingdom*

**In mei 2009 werd in een beschermd kalkgrasland in Zuid-Limburg een wel zéér verrassende plantenvondst gedaan: een rijk bloeiend groepje Vrouwenschoentjes (*Cypripedium calceolus* L.), een markante orchidee die nooit eerder in Nederland is gesignaleerd. Gezien de unieke aard van deze vondst werd besloten een DNA-onderzoek uit te voeren, om meer over de herkomst van de planten te weten te komen.**

### BEDREIGD 'BOEGBEELD'

Wellicht meer dan enige andere plantensoort in Europa geniet het Vrouwenschoentje een haast legendarische status, niet alleen bij plantenkenners en natuurliefhebbers maar ook in bredere kring. Met haar grote, markant gekleurde en bijzonder gebouwde bloemen [figuur 1] doet ze haast tropisch aan, en geldt terecht als een van de allerfraaiste Europese planten. Zelfs onder de vele prachtige orchideeën die ons continent rijk is, springt Vrouwenschoentje eruit, en pronkt door heel Europa op de kaft van menige natuurgids.

Deze status ligt niet alleen aan de schoonheid van de soort, maar ook aan haar ernstige achteruitgang in veruit het grootste gedeelte van haar verspreidingsgebied. Hoewel haar potentiële areaal het overgrote deel van Eurazië bestrijkt, zijn er nauwelijks meer gebieden waar de soort talrijk voorkomt. Deze sterke achteruitgang in de laatste eeuwen en decennia is vooral aan twee factoren te wijten: het overenthousiast plukken van de o-zo-aantrekkelijke bloemen (met name voor hoteltafels in bepaalde toeristische gebieden en herbariumcollecties), en het verlies aan geschikt biotoop, door fysieke vernietiging of ecologische verstoring (door onder andere nutriëntenverrijking).

Het Vrouwenschoentje is in alle Europese landen wettelijk beschermd. Binnen de Europese Unie loopt sinds 2000 een beschermingsprogramma dat specifiek op de soort is gericht, als 'boegbeeld' van het natuurbeschermingsbeleid (EUROPEAN ENVIRONMENTAL AGENCY, 2009).

Hoewel de soort in veel Europese landen altijd relatief schaars is geweest, wordt ze als inheems beschouwd in alle landen van Centraal- en West-Europa op Ierland, Portugal, Nederland en waarschijnlijk Bel-

gië na. In Groot-Brittannië was de soort altijd tot enkele gebieden in het noorden van Engeland beperkt, maar is sinds lange tijd tot één (thans streng bewaakte) wilde plant teruggedrongen. Een bescheiden herintroductieprogramma is hier begonnen (LLEWELLYN, 2010). In België is de soort eenmaal in de negentiende eeuw gesignaleerd, bij Freilange in de buurt van Arlon (CRÉPIN, 1884), maar in de aangehaalde flora wordt aan de natuurlijke status van deze vondst getwijfeld. In het aangrenzende Luxemburg is ze wel inheems, en vermoedelijk nog op een enkele plaats aanwezig. In het iets noordoostelijker gelegen Duitse Eifelgebied groeit de soort stellig nog, en hetzelfde geldt voor andere delen van het Duitse midden- en hooggebergte (ARBEITSKREISE HEIMISCHE ORCHIDEEN, 2005). Elders is de soort ook van lager gelegen gebieden bekend, onder andere in Denemarken en Estland. Ook in Frankrijk, Italië en Spanje komt de soort op diverse hoogten voor, hoewel niet in de mediterrane kustgebieden (DELFORGE, 2007). In de landen van oost- en zuidoost-Europa komt ze verspreid voor (KULL, 1999).

In de meeste van deze landen is de soort vrijwel overal teruggedrongen tot kleine, al of niet beschermde groeiplaatsen, met een klein en slinkend aantal exemplaren (KULL, 1999). Volgens een recente evaluatie van de sinds 1992 van kracht zijnde Europese Habitatrichtlijn is de feitelijke bescherming (conservation status) van Vrouwenschoentje alleen in het Alpiene district 'gunstig' te noemen. In het Atlantische district is deze 'slecht' en in de overige vier onderscheiden districten 'onvoldoende' (EUROPEAN ENVIRONMENTAL AGENCY, 2009). Alleen in enkele



FIGUUR 1

*De fraaie bloeiwijze van het Vrouwenschoentje (Cypripedium calceolus) (foto: N. Harle).*

## FIGUUR 2

De Zuid-Limburgse Vrouwenschoentjes (*Cypripedium calceolus*), samen met onder andere Herfsttijloos (*Colchicum autumnale*), Aardbeiganzerik (*Potentilla sterilis*), Kleine pimpernel (*Sanguisorba minor*) en Dauwbraam (*Rubus caesius*) (foto: N. Harle).

gebieden in Estland, Polen, de Karpaten en de Alpen komt de soort in redelijke aantallen nog verspreid voor (ECCARIUS 2009; KULL, 1999; PLANTAEUROPA, z.j.).

## DE ZUID-LIMBURGSE PLANTEN

Op 4 mei 2009 werd bij een vegetatieopname in een beschermd grasland in Zuid-Limburg door de tweede auteur een groepje bloeiende Vrouwenschoentjes aangetroffen. Op vier stengels pronkten vijf bloemen, waarvan twee op de top van hun bloei [figuur 2]. Daarnaast waren er drie steriele bladrozetten. Het ging om relatief lage planten, in bloei niet hoger dan zo'n 18 cm. De cluster stond vrij dicht opeen en nam ongeveer 30 bij 50 cm in beslag. Omdat deze orchideeënsoort zich met een wortelstok ontwikkelt (SHEFFERSON *et al.*, 2005) lijkt het aannemelijk dat dit één enkele plant vertegenwoordigt, maar zonder opgraven kon dit niet worden bevestigd.

Nauwkeurige inspectie van de bodem direct bij de planten bracht geen spoor van vergraving aan het licht. Ook de begeleidende begroeiing, hieronder beschreven, was zo te zien niet verstoord. Er waren aldus geen tekens van opzettelijke aanplant. Toch was de soort hier niet eerder opgemerkt.

In dit kleine graslandreservaat groeien diverse in Nederland zeldzame plantensoorten, waaronder enkele ernstig bedreigde. Ter bescherming van niet alleen de Vrouwenschoentjes maar ook van deze andere soorten is besloten de locatie hier niet te specificeren. Wat volgt is echter een vrijwel volledige beschrijving van de groeiplaats.

De planten stonden in een smal, hellend (20°), op het zuiden geëxposeerd graslandperceel, dat tussen twee bosdelen ligt ingeklemd. In vroegere tijden werd het terrein door schapen beweid. Na een periode van verwaarlozing na de Tweede Wereldoorlog is door de huidige beheerder rond 1960 begonnen met een jaarlijkse maaibeurt. In 1982 is het terrein vergroot, door het kappen van een klein deel van het omringende bos. Sindsdien is een begrazingsregime ingesteld, thans bestaande uit het éénmaal per jaar begrazen door Mergellandschappen. Het terrein is voor het publiek afgesloten en alleen met vergunning te betreden.

Zoals op veel plaatsen in de Zuid-Limburgse dalen en droogdalen, vertoont deze helling een kenmerkend verloop in bodemomstandigheden en plantengroei. Als gevolg van zeer langdurige geologische en ook antropogene processen is in dit grasland een ecologisch gradient ontstaan die vaak over korte afstand een grote variatie aan zowel planten als dieren vertoont.

Qua vegetatie bestaat het betreffende gebied, van boven- tot onderaan de helling, over een afstand van nog geen 100 meter uit een overgang van een droge, voedselarme biotoop met soorten als Struikheide (*Calluna vulgaris*) en Valse salie (*Teucrium scorodonium*) via een goed ontwikkelde kalkgraslandstrook met soorten van het Verbond der matige droge kalkgraslanden (MESOBROMION ERECTII) en het Marjoleinverbond (TRIFOLIUM MEDII) vanaf het punt dat de mergel begint te dagzomen, naar een vochtiger en voedselrijker colluvium onderaan de helling (zie bijvoorbeeld SCHAMINÉE *et al.*, 1996).



Deze kleine strook grasland, met een oppervlakte van een halve hectare, is aan weerszijden omgeven door oud, soortenrijk hellingbos en is hierdoor aan de randen enigszins beschaduwd. Op het perceel zelf staan twee forse struiken Zuurbes (*Berberis vulgaris*) en Eenstijlige meidoorn (*Crataegus monogyna*), die ook plaatselijke schaduw bieden.

De Vrouwenschoentjes stonden halverwege de helling, in de volle zon, op het niveau van de bovenkant van de kalklaag, op enigszins vlak terrein vlakbij de bovenrand van een eeuwenoude erosiegeul naar een kleine opening in het kalkkroetsmassief dat hier dagzooft. In de onmiddellijke omgeving van de planten groeien Herfsttijloos (*Colchicum autumnale*), Aardbeiganzerik (*Potentilla sterilis*), Kleine pimpernel (*Sanguisorba minor*), Kleine ratelaar (*Rhinanthus minor*), Wilde marjolein (*Origanum vulgare*) en Dauwbraam (*Rubus caesius*). Er is ter plekke geen moslaag aanwezig.

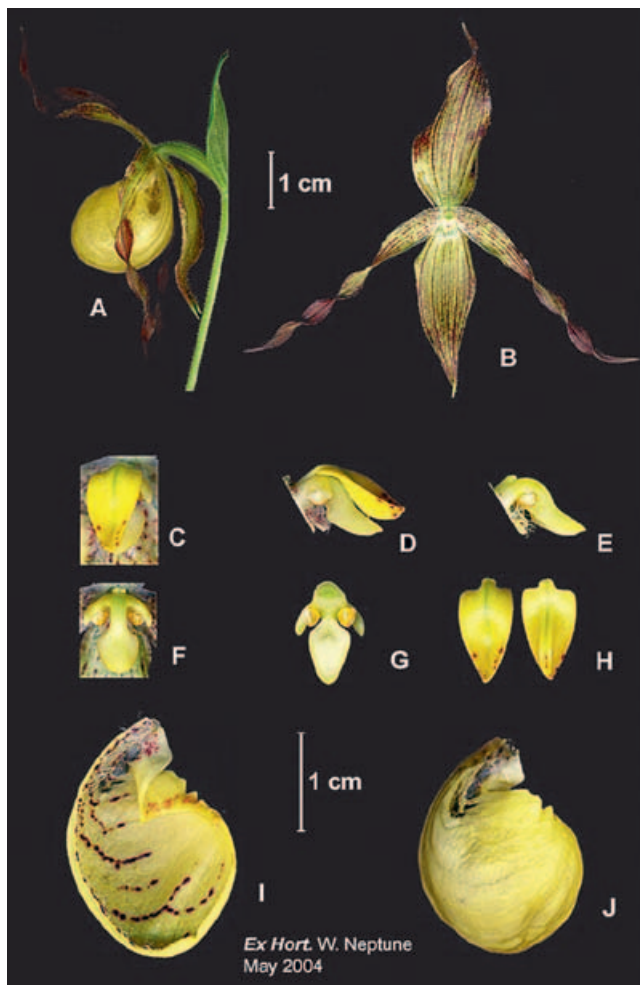
Binnen een straal van 10 tot 20 meter groeien op dit kalkhoudende gedeelte van de helling verder onder andere Duifkruid (*Scabiosa columbaria*), Borstelkrans (*Clinopodium vulgare*), Geelhartje (*Linum catharticum*), Gewone agrimonie (*Agrimonia eupatoria*), Geel walstro (*Galium verum*), Knolboterbloem (*Ranunculus bulbosus*), Fraai duizendguldenkruid (*Centaurea pulchellum*), Gewone rolklaver (*Lotus corniculatus*), Voorjaarszegge (*Carex caryophylla*), Zeegroene zegge (*Carex flacca*), Bevertjes (*Briza media*), Bergdravik (*Bromopsis erecta*) en ook enkele orchideeënsoorten, waaronder Soldaatje (*Orchis militaris*) en Grote keverorchis (*Neottia ovata*).

## POTENTIEEL VOORKOMEN IN ZUID-LIMBURG

De vraag nu is natuurlijk of de plant of planten hier uit eigen beweging terecht zijn gekomen, of dat van opzettelijke aanplant sprake is. Hoewel iedere kenner van de Noordwest-Europese flora intuïtief voor het tweede antwoord zal gaan, dient een bijzondere plantenvondst als deze objectief op zijn merites te worden beoordeeld. Hieronder volgt derhalve een korte uiteenzetting van de verschillende aspecten die bij deze beschouwing aan de orde zijn geweest.

## Morfologie

Ten eerste was er natuurlijk de determinatie op basis van uiterlijke kenmerken. De Noord-Amerikaanse *Cypripedium parviflorum* Salisb. [figuur 3] vertoont veel gelijkenis met *Cypripedium calceolus*. Als de aangetroffen planten tot *Cypripedium parviflorum* behoorden, zou de discussie natuurlijk snel gesloten zijn. Na het bekijken van onder andere de vorm van het staminodium, het deel van het helmhokje



FIGUUR 3

*De Noord-Amerikaanse Cypripedium parviflorum.*

theoretisch bezwaar te zijn. Deze soort groeit verspreid door vrijwel heel Europa, ook noordelijker en oostelijker dan Nederland, veelal onder klimatologische omstandigheden die niet noemenswaardig van de Zuid-Limburgse lijken af te wijken. Ook de vochtige, kalkhoudende bodem past in het bekende plaatje van deze soort.

#### Biotoop

In het verlengde hiervan, tenslotte, lijkt de biotoop als zodanig, zoals in de vegetatie weerspiegeld, binnen de ecologische bandbreedte van de soort te passen. Hoewel Vrouwenschoentje over het algemeen een voorkeur vertoont voor licht beschaduwde bossen en open plekken daarin, is ze ook van struweel en open kalkgrasland bekend (KULL, 1999). Zoals vermeld, wordt het onderhavige perceel grasland annex struweel aan weerszijden door oud bos omgeven en heeft zelf een begroeiing die vooral elementen van kalkstruweel en -grasland omvat.

Alles overziend is er zo op het eerste gezicht geen objectief doorslaggevende reden waarom deze plant in Zuid-Limburg niet onder geschikte omstandigheden zou kunnen gedijen. Dat dit, voor zover bekend, nooit eerder is vastgesteld, hoeft in onze tijd geen rotsvaste zekerheid meer te bieden. Met de op gang zijnde klimaatveranderingen zijn er immers genoeg voorbeelden bekend van plantensoorten waarvan er thans een verschuiving in areaal te constateren valt (TAMIS *et al.*, 2003; OZINGA *et al.*, 2007).

Toch bleef de vondst van zo'n uitzonderlijke plantensoort in het inmiddels lang niet overal even natuurlijke Zuid-Limburgse heuvelland terecht argwaan wekken. Na de nodige discussie was behoefte aan definitief uitsluitel en tegen deze achtergrond werd in overleg met het Nederlands Centrum voor Biodiversiteit Naturalis en de beheerder van het betreffende terrein besloten een klein bladmonster te nemen, teneinde het DNA-profiel van de plant te kunnen vaststellen, om zodoende meer over de geografische herkomst van de planten te weten te komen<sup>1</sup>. Deze soort is zó zeldzaam, en fungeert tegelijk zó als 'boegbeeld' van menig natuurbeleid, dat hij geldt als een van de weinige plantensoorten ter wereld waarvoor een begin is gemaakt met het genetisch ontrafelen van populaties op regionaal niveau. Dit DNA-onderzoek zal nu worden toegelicht en de resultaten ervan kritisch geanalyseerd. Van daaruit zullen enkele bredere conclusies worden getrokken.

#### HET DNA-ONDERZOEK

DNA-onderzoek wordt tegenwoordig meer en meer ingezet om zeldzame en met uitsterven bedreigde orchideeënpopulaties beter te kunnen beschermen. Het genoom van Vrouwenschoentjes is helaas te groot voor 'fingerprint'-technieken (FAY & COWAN, 2001). Om die reden zijn recentelijk microsatelliet-regio's ontwikkeld voor genetisch onderzoek aan Vrouwenschoentjes (FAY *et al.*, 2009).

#### Microsatellieten

Microsatellieten zijn kleine hypervariabele stukjes DNA. De hier onderzochte regio's liggen in het chloroplastgenoom en bevatten een vast aantal AT's (Adenines en Thymines) in de sequentie. Het aantal AT's kan variëren van enige tientallen tot vele honderden en bepaalt

vlak boven de stamper, dat spatelvormig bleek, werd bevestigd dat het inderdaad om *Cypripedium calceolus* ging. Het staminodium van *Cypripedium parviflorum* is driehoekig van vorm [figuur 3 D-G].

#### Sporen ter plaatse

Vervolgens moest de fysieke staat van de groeiplaats worden gezien. Zoals gezegd, was geen spoor van verstoring te bekennen, noch in de bodem (vergravingssporen), noch in termen van de plantengroei (onderbreking, of aanwezigheid van soorten die op verstoring wijzen).

#### Populaties in de buurt

Een derde, cruciale vraag betrof een potentiële zaadbron voor deze in Nederland en België geheel ontbrekende soort. De dichtstbijzijnde groeiplaats ligt in de Duitse Eifel, hemelsbreed zo'n 80 km naar het zuid-zuidoosten. Zaadtransport over zo'n afstand valt zeker niet uit te sluiten (FAY *et al.*, 2009). Zoals bij alle orchideeën zijn de zaden van het Vrouwenschoentje uiterst klein en kunnen gemakkelijk over lange afstand worden vervoerd. Omdat ze enigszins afgeplat zijn en relatief veel lucht bevatten, zijn ze bij deze soort voor windverspreiding zelfs goed aangepast (KULL, 1999). Aldus lijkt aanvoer via de wind over een dergelijke afstand zeker mogelijk.

#### Standplaats

In de vierde plaats moest er naar het heersende klimaat en de fysieke standplaats worden gekeken: zou het Vrouwenschoentje, voor zover bekend, überhaupt op zo'n soort Zuid-Limburgse groeiplaats kunnen overleven? Wat klimaat betreft, lijkt er op het eerste gezicht geen



de totale lengte van de microsatelliet. De lengte zegt iets over de verwantschap van een individu met andere individuen binnen dezelfde populatie en in de buurt liggende populaties. Hoe verwanter planten met elkaar zijn, hoe meer hun AT-motieven in lengte met elkaar overeenkomen. Microsatellieten zijn inmiddels niet alleen ontwikkeld voor genetisch onderzoek aan Vrouwenschoentjes, maar ook voor anacamptis (*Anacamptis spec.*) (COZZOLINO *et al.*, 2007), handekenskruid (*Dactylorhiza spec.*) (PILLON *et al.*, 2007), orchis (*Orchis spec.*) (BATEMAN *et al.*, 2008) en schroeforchis (*Spiranthes spec.*) (FORREST *et al.*, 2004). Er kan informatie mee verzameld worden over de geografische herkomst van planten. Ook kan een beeld verkregen worden van de genetische diversiteit van populaties om de mate van inteelt te bepalen. Als alle overgebleven planten uit een kleine restpopulatie genetisch identiek blijken te zijn, kan besloten worden om 'vers bloed' te introduceren in de vorm van pollen van planten uit andere en genetisch meer diverse populaties. Het is belangrijk dat hiervoor genetisch verwante planten gebruikt worden. Microsatellieten worden veel gebruikt om geschikte kandidaten te selecteren voor herintroducties van plaatselijk met uitsterven bedreigde plantensoorten.

**Bemonstering en DNA-amplificatie**

Door FAY *et al.* (2009) is bladmateriaal verzameld van planten uit Vrouwenschoentjespopulaties in Denemarken, Engeland, Estland, Frankrijk, Italië, Oostenrijk, Polen, Spanje, Zweden en Zwitserland. Het aantal bemonsterde planten per populatie varieerde tussen de één en 37 individuen. Soms kon maar één populatie per land onderzocht worden, soms wel tien verschillende populaties. Van de Nederlandse populatie is van één plant een bladmonster genomen, waaruit met gebruik van standaardprocedures DNA is geëxtraheerd en geamplificeerd<sup>2</sup>.

**Netwerkreconstructie**

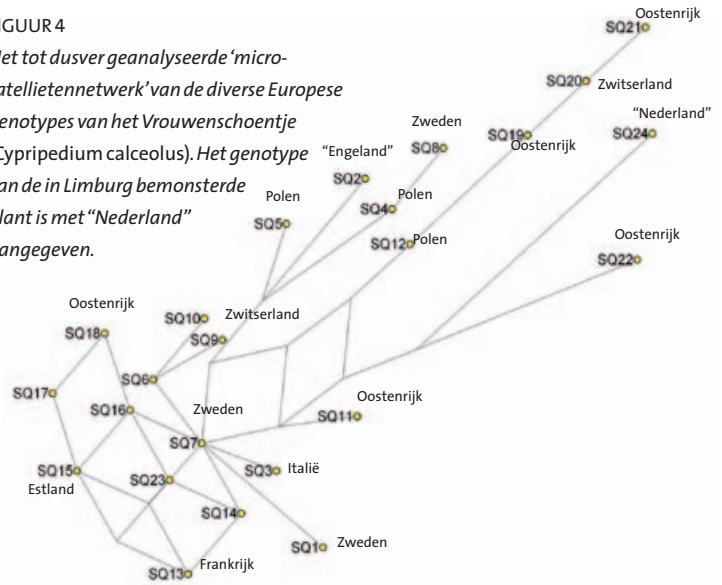
Netwerkreconstructies werden uitgevoerd met het programma NETWORK (www.fluxus-engineering.com). Gevonden genotypes worden bij zo'n analyse met elkaar vergeleken en aan elkaar gelinkt. Planten die genetisch sterk op elkaar lijken komen in zo'n netwerk dicht bij elkaar uit: de verbindende lijnen zijn kort. Planten die genetisch erg van elkaar verschillen komen in het netwerk op ver van elkaar verwijderde plaatsen terecht: de verbindende lijnen zijn lang. Gevonden genotypes in dit netwerk zijn in geel aangegeven en hebben een SQ nummer. Het gereconstrueerde netwerk is weergegeven in figuur 4.

**Genetische diversiteit**

De populaties Vrouwenschoentjes met de hoogste genetische diversiteit zijn te vinden in Estland, Frankrijk, Oostenrijk, Polen, Zweden en Zwitserland. De hoge genetische diversiteit van de centraal Europese populaties kan waarschijnlijk verklaard worden uit het feit dat deze regio's tijdens de laatste ijstijd niet bedekt waren met ijs en als refugia dienden. In de Scandinavische populaties zijn mogelijk planten bij elkaar gekomen uit verschillende ijstijdrefugia. Veel van de gevonden

FIGUUR 4

Het tot dusver geanalyseerde 'microsatellietennetwerk' van de diverse Europese genotypes van het Vrouwenschoentje (*Cypripedium calceolus*). Het genotype van de in Limburg bemonsterde plant is met "Nederland" aangegeven.



genotypes zijn uniek: in figuur 4 zijn ze aangegeven met de naam van het bijbehorende land. Genotypes SQ6,14,16,17 en 23 komen in meerdere landen voor en zijn dus breder verspreid.

**Geografische herkomst**

In de eerder uitgevoerde netwerkreconstructies van FAY *et al.* (2009) kwam één bepaald Engels genotype in het netwerk terecht bij Estlandse, Poolse en Zweedse genotypes. Van deze plant werd al vermoed dat het een geïntroduceerd individu betrof en de genetische analyses bevestigden de niet inheemse oorsprong. Dit exemplaar (genotype SQ2) is in figuur 4 aangegeven met "Engeland". Het in dit onderzoek geanalyseerde Nederlandse exemplaar (genotype SQ24) kwam in het netwerk terecht dichtbij twee Oostenrijkse genotypes (SQ11 en SQ22) en ver van geografisch dichterbij gelegen genotypes uit Frankrijk en Zwitserland. Het genotype van de Nederlandse plant had in één van de geanalyseerde microsatellieten (de *accD-psal* regio) verder een zeer lang en uniek AT-motief. Ook hier wijzen genetische analyses mogelijk op een niet inheemse oorsprong. Het genotype is daarom in figuur 4 aangegeven met "Nederland", dus ook tussen aanhalingstekens.



FIGUUR 5

De Zuid-Limburgse Vrouwenschoentjes (*Cypripedium calceolus*): een onzekere toekomst (foto: N. Harle).

## CONCLUSIES

### Aanplant

Het hier gepresenteerde DNA-onderzoek laat zien dat de huidige populatie van Vrouwenschoentje in Nederland hier waarschijnlijk niet op eigen kracht is terechtgekomen. Het is hoogst onwaarschijnlijk dat orchideeën uit de Oostenrijkse Alpen via een natuurlijke weg in Zuid-Limburg terechtkomen. Het valt niet helemaal uit te sluiten dat de Nederlandse planten wellicht toch elders uit Europa afkomstig zijn omdat nog niet alle Europese populaties genetisch gescreend zijn. Aanvullende genetische analyses van met name planten uit de Duitse Eifel en Luxemburg zullen hier in de toekomst uitsluitsel over geven. Biologiestudenten Steven Bekker en Nicky Hoebe hebben onlangs al een eerste stap in die richting gezet. Zij wisten één van de drie microsatellieten (de *trnL-trnF* spacer) te sequencen van een herbariumexemplaar aanwezig in de collectie van NCB Naturalis. Dit Vrouwenschoentje was in 1879 verzameld door Kats in Hessen. Het genotype van deze plant bleek wijdverspreid in Europa en was eerder ontdekt in Engelse, Franse, Duitse, Zwitserse, Poolse, Zweedse en Estlandse planten. Het veel uniekere genotype van het geanalyseerde Nederlandse exemplaar kwam hier niet mee overeen. Het laatste restje twijfel over de oorsprong van de Nederlandse Vrouwenschoentjes verdween toen later in het seizoen nog drie orchideeënsoorten in het terrein gingen bloeien die daar nooit eerder gevonden waren. Het planten van niet-inheemse soorten in natuurterreinen is helaas een populaire bezigheid (VAN DER HAGEN, 2008). Ook via andere wegen kunnen nieuwe plantensoorten in ons land terechtkomen. Voorbeelden hiervan zijn nog kiemkrachtige zaden van exotische soorten in mengsels voor zogenaamde 'bloemenbermen' (GRAVENDEEL & KOOPS, 1997) en vee- en vogelvoer (VAN DENDEREN *et al.*, 2010).

### Het gevaar van niet verwante genotypes

Op zich zijn de nu gevonden Vrouwenschoentjes een aanwinst voor de Nederlandse inheemse flora. Wat echter als in de nabije toekomst nieuwe planten van deze orchideeënsoort ons land vanuit bijvoorbeeld de Eifel of Luxemburg via natuurlijke weg weten te bereiken? Deze planten zullen dan gemakkelijk kruisen met de al aanwezige planten uit Oostenrijk, waardoor zij hun oorspronkelijke genetische identiteit zullen verliezen. Door zogenaamde 'outbreeding depression' is het mogelijk dat de soort dan weer snel uit ons land zal ver-

dwijnen. Om deze reden is het Engelse Vrouwenschoentje dat niet van inheemse oorsprong bleek verder van het Engelse herintroductieprogramma uitgesloten (FAY *et al.*, 2009). De beherende instantie die over de huidige Nederlandse Vrouwenschoentjes gaat, is zich nog aan het beraden over het te voeren beleid [figuur 5]. In het voorjaar van 2010 verschenen de planten niet opnieuw boven de grond en mogelijk is de soort inmiddels weer verdwenen uit Nederland.

### Toekomst

Het moge duidelijk zijn dat de huidige Vrouwenschoentjes in Limburg bij opnieuw verschijnen goed in de gaten gehouden zullen moeten worden. Als nieuwe immigranten opduiken, zal ook hun DNA gescreend moeten worden om te kijken waar ze vandaan komen. De volledige genotypes van populaties uit de Duitse Eifel en Luxemburg en bij kwekers verkochte planten zullen dan ook moeten worden bepaald en meegenomen in het onderzoek. Als blijkt dat nieuwe Nederlandse planten uit geografisch nabijgelegen populaties afkomstig zijn, zal snel actie ondernomen moeten worden om genetische vervuiling tegen te gaan. Wie weet zal de soort ons land op korte termijn ook op eigen kracht weten te bereiken. Het zou dan toch wel erg jammer zijn als het Vrouwenschoentje in Nederland door verkeerd beleid weer het onderspit delft.

## DANKWOORD

*De auteurs willen Karel Kreutz en Maarten Christenhusz hartelijk danken voor het kritisch doorlezen van een eerdere versie van dit artikel. Gustavo Romero (Oakes Ames Orchid Herbarium, Harvard University) stelde de scan van *Cypripedium parviflorum* beschikbaar. We zijn de beherende instantie erkentelijk voor het verstrekken van de benodigde vergunning.*

## Noten

1. Er is ook één bloem verzameld die op sterk water in het Natuurhistorisch Museum Maastricht wordt bewaard. Blad- en bloemcollecties zijn gemaakt onder ontheffing Flora- en Faunawet FF/75A/2009/038.
2. Uit een stengelblad is met een CTAB-protocol DNA geëxtraheerd voor amplificatie van de *accD-psal* spacer, het *rps16* intron en de *trnL-trnF* spacer.

## Summary

### LADY'S SLIPPER ORCHID IN LIMBURG: NATURAL DISPERSAL OR ILLEGAL PLANTING?

In May 2009 a group of flowering Lady's slipper orchids (*Cypripedium calceolus*) was discovered in a protected chalk grassland in the south of the Dutch province of Limburg, the first recorded occurrence of this species in the Netherlands. To establish the likely provenance of the plants, a DNA analysis was carried out using highly variable microsatellites located in the plastid genome. After a brief review of the European distribution and

current status of this rare orchid species, we report the methods and results of the DNA study and conclude that the Limburg specimens are likely to be derived from stock from the Austrian Alps and must in all likelihood have been planted by a local 'enthusiast'.

## Literatuur

- ARBEITSKREISE HEIMISCHE ORCHIDEEN, 2005. Die Orchideen Deutschlands. AHO Verlag, Thüringen.
- BATEMAN, R.M., R.J. SMITH & M.F. FAY, 2008. Morphometric and population genetic analyses elucidate the origin, evolutionary significance and conservation implications of *Orchis x angusticruris* (*O. purpu-*

*rea* x *O. simia*), a hybrid orchid new to Britain. Botanical Journal of the Linnean Society 157 (4): 687-711.

- COZZOLINO, S., D. CAFASSO, G. PELLEGRINO, A. MUSACCHIO & A. WIDMER, 2007. Genetic variation in time and space: the use of herbarium specimens to reconstruct patterns of genetic variation in the endangered orchid *Anacamptis palustris*. Conservation Genetics 8 (3): 629-639.
- CRÉPIN, F., 1884. Manuel de la Flore de Belgique, 5e édition. Charles Desoer, Liège.
- DELFORGE, P., 2007. Guide des orchidées de France, de Suisse et du Benelux. Delachaux et Niestlé, Paris.
- DENDEREN VAN, P.D., W.L.M. TAMIS & J.L.C.H. VAN VALKENBURG, 2010. Risico's van introductie van exotische plantensoorten, in het bijzonder uit het geslacht *Ambrosia* L., via import van zaden voor met name

veevoer en vogelvoer. *Gorteria* 34(3): 67-85.

- ECCARIUS, W., 2009. Die Orchideengattung *Cypripedium*. EchinoMedia Verlag, Bürgel.
- EUROPEAN ENVIRONMENTAL AGENCY, 2009. Progress towards the European 2010 biodiversity target. EEA Report no 4/2009. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- FAY, M.F. & R.S. COWAN, 2001. Plastid microsatellites in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae): genetic fingerprints from herbarium specimens. *Lindleyana* 16(3): 151-156.
- FAY, M.F., R. BONE, I. KAHANDAWALA, J. GREENSMITH, S. HARRIS, H.AE. PEDERSEN, M.J. INGROUILLE & C. LEXER, 2009. Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) with a focus on north-western Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms. *Annals of Botany* 104(3): 517-525.
- FORREST, A.D., M.L. HOLLINGSWORTH, P.M. HOLLINGSWORTH, C. SYDES & R.M. BATEMAN, 2004. Population genetic structure in European populations of *Spiran-*

*thes romanzoffiana* set in the context of other genetic studies on orchids. *Heredity* 92(3): 218-227.

- GRAVENEEL, B. & C.G. KOOPS, 1997. Prachtanjer (*Dianthus superbus* L.) terug in Nederland, maar... via natuurlijke weg? *Gorteria* 23(4): 102-106.
- HAGEN, G.J.M. VAN DER, 2008. Weer nieuwe 'verfraaiingen' van het duin! *Holland's Duinen* 52: 56-58.
- KULL, T, 1999. Biological Flora of the British Isles, no 208: *Cypripedium calceolus*. *Journal of Ecology* 87(5): 913-924.
- LLEWELLYN, P., 2010. Wild flowers of the British Isles. *Cypripedium calceolus*, lady's slipper orchid. 26 mei 2009. 22 februari 2010. [http://www.ukwildflowers.com/Web\\_pages/cypripedium\\_calceolus\\_ladys\\_slipper\\_orchid.htm](http://www.ukwildflowers.com/Web_pages/cypripedium_calceolus_ladys_slipper_orchid.htm).
- OZINGA, W.A., M. BAKKENES & J.H.J. SCHAMINÉE, 2007. Sensitivity of Dutch vascular plants to climate change and habitat fragmentation – A preliminary assessment based on plant traits in relation to past trends and future projections. WOt-rapport 49.

Wettelijke Onderzoekstaken Natuur & Milieu. Wageningen.

- PILLON, Y., M.F. FAY & M. HEDREN, 2007. Evolution and temporal diversification of western European polyploid species complexes in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Taxon* 56(4): 1185-1208.
- PLANTAEUROPA, z.j. Factsheet Lady's Slipper (*Cypripedium calceolus*). 22 februari 2010. <http://www.plantaeuropa.org/assets/EIP%20files/T7%20-%20Lady%20Slipper%20conservation%20project.pdf>.
- SCHAMINÉE, J.H.J., A.H.F. STORTELDER & E.J. WEEDA, 1996. De vegetatie van Nederland. Deel 3. Plantengemeenschappen van graslanden, zomen en droge heide. Opulus Press, Uppsala/Leiden.
- SHEFFERSON, R.P., T. KULL & K. TALI, 2005. Adult whole-plant dormancy induced by stress in long-lived orchids. *Ecology* 86(11): 3099-3104.
- TAMIS, W., M. VAN 'T ZELFDE & R. VAN DER MEIJDEN, 2003. Effecten van klimaatverandering op planten in Nederland. *Gorteria* 29(4): 93-98.

## MEDEDELING

### Goed nieuws over de Steenbikker

In het Natuurhistorisch Maandblad van juli 2010 werden gegevens vergeleken over de landslakkenfauna van Limburg uit 1900-1930 en uit 1999-2009 (KEULEN & MAJOUR, 2010). Gesteld werd dat er in die periode van bijna een eeuw waarschijnlijk maar één soort landslak uit Limburg was verdwenen: de Steenbikker (*Helicogona lapicida*). Alleen in 1966 was er nog eens een levende Steenbikker aangetroffen in Bemelen (SCHUITEMA, 1967).

Binnen enkele dagen na verschijning van het artikel ontving Stef Keulen een telefoontje van mevrouw Regina Vlijm uit Apeldoorn, die meldde dat zij op 8 mei 2010 twee levende Steenbikkers in het Savelsbos had gevonden en gefotografeerd [figuur 1]. Bij bezoeken door leden van de Mollusken Studiegroep Limburg aan de door haar opgegeven locatie werd zowel op 4 als op 24 juli een vers, leeg huisje van een volwassen Steenbikker gevonden. De vindplaats is een bijzonder biotoop omdat daar in de leemachtige helling van een droogdal veel scherven van

vuursteen aanwezig zijn. Deze scherven zijn waarschijnlijk overblijfselen van bewerking van vuurstenen afkomstig uit de in de buurt gelegen prehistorische vuursteenmijnen. Voor alle duidelijkheid: de Steenbikker splitst zelf geen (vuur)stenen, maar graast waarschijnlijk algen van gladde oppervlakken zoals van stenen en de schors van Beuken (*Fagus sylvatica*) (BOGON, 1990).

#### Prehistorie

De Steenbikker [figuur 2] kwam ook in het verre verleden al in het Savelsbos voor. Tussen circa 3950 - 2650 voor Christus werd er in de ondergrond van het bos vuursteen gedolven. De schachten van deze vuursteenmijnen begonnen op het plateau en waren maximaal twaalf meter diep. Een gedeelte van deze mijnen is tussen 1964 en 1972 uitgegraven. Het vrijkomende materiaal werd minutieus onderzocht. Behalve 14.549 opgegraven haken, kloppers en (na afslagen resterende) kernstenen vond men ook 15.771 slakkenhuis-

jes van in totaal 24 soorten, waaronder 66 exemplaren van de Steenbikker (RADEMAKERS, 1998).

Vrijwel alle slakkenhuisjes zijn gevonden in de schachten. De in onbruik geraakte schachten zijn langzaam gevuld geraakt met allerlei materiaal uit de omgeving, waaronder de slakkenhuisjes. Opvallend is ook de aanwezigheid van 52 exemplaren van de Grote torenslak (*Ena montana*) onder deze slakkenhuisjes. Van de Grote torenslak is sinds het begin van onderzoek naar Limburgse landslakken, eind 19<sup>e</sup> eeuw, nooit een populatie gevonden. Toch zijn de Steenbikker en de Grote torenslak vroeger wijder verspreid geweest in Limburg, zoals blijkt uit vondsten van beide soorten in de ondergrond van een kalkmoeras bij Weustenrade (KEULEN, 1998). De ouderdom van deze vondsten is niet bepaald, maar komt mogelijk ongeveer overeen met de ouderdom van de in de vuursteenmijnen gevonden huisjes.

#### Conclusie

Veranderingen in het landschap en het milieu in Limburg hebben over vaak kortere perioden dan een eeuw voor verschillende diergroepen tot aanzienlijk verlies van soorten geleid. Van de dagvlinders bijvoorbeeld zijn sinds het begin van de 20<sup>e</sup> eeuw 17 van de 70 soorten uit Nederland verdwenen (VLIJ-



FIGUUR 1  
Levende Steenbikker (*Helicogona lapicida*) uit het Savelsbos (a) het huisje van de onderzijde gezien en (b) van de zijkant (foto's: R. Vlijm).