

SOORTEN EN SOORTVORMING IN HET *HEBELOMA CRUSTULINIFORME*-COMPLEX

Duur K. Aanen

Zoological Institute, Division of population ecology, University of Copenhagen, Universitetsparken 15, 2100 Copenhagen, Denemarken. Email: dkaanen@zi.ku.dk

Aanen, D.K. 2001. Species and speciation in the *Hebeloma crustuliniforme*-complex. *Coolia* 44(4): 197-207.

This article is a short summary of an evolutionary-taxonomic research on the *Hebeloma crustuliniforme* complex. The central questions in this study were: 'How can we delimit and recognize species in this complex?' and 'How have the species evolved?' The main results and conclusions are described.

Samenvatting

Dit artikel is een samenvatting van een evolutionair-taxonomisch onderzoek aan het *Hebeloma crustuliniforme*-complex. De volgende vragen stonden centraal: "Op welke manier kunnen we soorten omgrenzen en herkennen in dit complex?" en "Hoe zijn de soorten ontstaan?" De werkwijze die gebruikt is om deze en onderliggende onderzoeksvragen te beantwoorden was als volgt:

1. Het bepalen van ICG's (InterCompatibiliteitsGroepen, biologische soorten). Uit kruisingsexperimenten die met 110 collecties van *Hebeloma*'s werden uitgevoerd, konden 20 biologische soorten worden onderscheiden.
2. Het zo nauwkeurig mogelijk vaststellen van evolutionaire relaties tussen ICG's. Hieruit bleek dat de genoemde 20 ICG's konden worden gesplitst in twee groepen die geen unieke gemeenschappelijke laatste voorouder hebben. De ene groep bleek vooral bij wilgen en populieren voor te komen, de andere groep bij andere bomen.
3. Het nauwkeuriger onderzoeken van nauw verwante ICG's, bij voorkeur slechts gedeeltelijk reproductief geïsoleerde ICG's, om het proces van het ontstaan van reproductieve isolatie te kunnen bestuderen/reconstrueren. In het algemeen werd gevonden dat kruisingsbarrières geleidelijk ontstaan bij een toename van de genetische verschillen, maar er waren enkele uitzonderingen.
4. Het afleiden van een gemakkelijker te hanteren soortbegrip voor het *Hebeloma crustuliniforme*-complex, gebaseerd op morfologische herkenning van (combinaties van) biologische soorten die een unieke gemeenschappelijke voorouder hebben. Binnen de 20 kruisingsgroepen konden ten minste twee en ten hoogste vier soorten onderscheiden worden. Verdere splitsing wordt problematisch door gebrek aan kwalitatieve morfologische kenmerken en de plasticiteit van kwantitatieve kenmerken.

Inleiding

Het oudste beroep ter wereld wordt in Europa met uitsterven bedreigd.

Genesis 2: 19: En zoals de mens elk levend wezen noemen zou, zo zou het heten.

B. Buyck. 1999. Taxonomists are an endangered species in Europe. Nature 401: 321.

Volgens het bijbelboek Genesis is taxonoom het oudste beroep ter wereld. Adam is begonnen met de immense taak van het benoemen van de soorten, de taak van de taxonoom. Het beroep van taxonoom is echter geëvolueerd met de komst van nieuwe technieken, die het onderzoeken van de *evolutie* van soorten mogelijk maken. In dit artikel wil ik een voorbeeld laten zien van de evolutie van soorten in het *Hebeloma crustuliniforme*-complex.

Vele NMV-leden hebben lange tijd hun hoop gevestigd op mij om tot een

oplossing te komen voor het 'Hebeloma-probleem'. Eerlijk gezegd heb ik altijd moeite gehad met deze benadering van mijn onderzoek: *Hebeloma* als een probleem. Als je streeft naar het herkennen van morfologisch duidelijk afgegrensde eenheden als soorten, dan vormt *Hebeloma* inderdaad een probleem. En omdat in zoveel groepen er inderdaad sprake is (of lijkt te zijn) van goed herkenbare soorten, verwachten we misschien wel snel dat dat voor alle groepen wel zal gelden en zijn we dus teleurgesteld dat in sommige groepen de discrete eenheden niet bestaan. Een oplossing voor dat 'Hebeloma-probleem' is er dan misschien helemaal niet. Ik hoop in dit artikel duidelijk te maken wat de mogelijke oorzaken van de problemen bij 'het geval *Hebeloma*' zijn en dat het 'Hebeloma-probleem' als een interessant voorbeeld van recente soortvorming kan worden beschouwd.

Het *Hebeloma crustuliniforme*-complex (Radijsvaalhoed-complex) is een groep nauw verwante plaatjeszwammen (Agaricales, Basidiomycota). Tot dit soortencomplex behoren enkele algemene *Hebeloma*-soorten, zoals *H. crustuliniforme* (Radijsvaalhoed), *H. velutipes* (Opaalvaalhoed), *H. pusillum* (Wilgenvaalhoed) en *H. leucosarx* (Radijsvaalhoed). Alle soorten van het *H. crustuliniforme*-complex vormen ectomycorrhiza's. Ectomycorrhiza is een wederzijds voordelige symbiose tussen een schimmel en een plant, meestal een boom. Zoals bekend, behoren *Hebeloma*-soorten tot de meest frustrerende soorten paddestoelen als het gaat om determinatie. De omgrenzing van soorten in dit soortencomplex was tot nu toe gebaseerd op morfologische kenmerken van de vruchtlichamen (de paddestoelen). Op die manier was echter geen ondubbelzinnige omgrenzing van de soorten gevonden: verschillende onderzoekers onderscheidden verschillende aantallen soorten. Toen ik met mijn onderzoek begon was het idee dat er tussen de 5 en 20 soorten uit dit complex in Nederland zouden voorkomen. In dit onderzoek stonden de volgende vragen centraal:

1. Op welke manier kunnen we soorten omgrenzen en herkennen in dit complex?
2. Hoe zijn de soorten ontstaan?

Soorten en soortvorming

In mijn proefschrift is het **biologisch-soortconcept** als het basale soortconcept gehanteerd: individuen behoren tot één soort als ze samen vruchtbare nakomelingen kunnen produceren (zie Fig. 1). Dit biologisch soortconcept is ook bij paddestoelen toepasbaar, hoewel er enkele praktische complicaties (kunnen) optreden. Daarom worden biologische soorten bij seksuele Basidiomyceten meestal gedefinieerd door het testen van seksuele intercompatibiliteit: kunnen monokaryons van verschillende individuen met elkaar fuseren en een stabiel dikaryon vormen. Om deze reden is het preciezer een biologische soort aan te duiden met de term InterCompatibiliteitsGroep (ICG). Het is de vraag of het criterium van intercompatibiliteit niet ruimer is dan dat van vruchtbaarheid, bijvoorbeeld als het ontstane dikaryon minder goed groeit of een afwijkend groeipatroon vertoont.

De vraag hoe soorten zijn ontstaan (speciatie) hangt natuurlijk af van hoe we soorten definiëren. Aangezien hier het biologisch-soortbegrip gehanteerd is, kunnen we het ontstaan van soorten gelijkstellen met het ontstaan van reproductieve isolatie, waarvan seksuele incompatibiliteit (d.w.z. afwezigheid van intercompatibiliteit) bij seksuele Basidiomyceten de belangrijkste vorm is. De werkwijze die gebruikt is om de verschillende onderzoeksvragen te beantwoorden is als volgt:

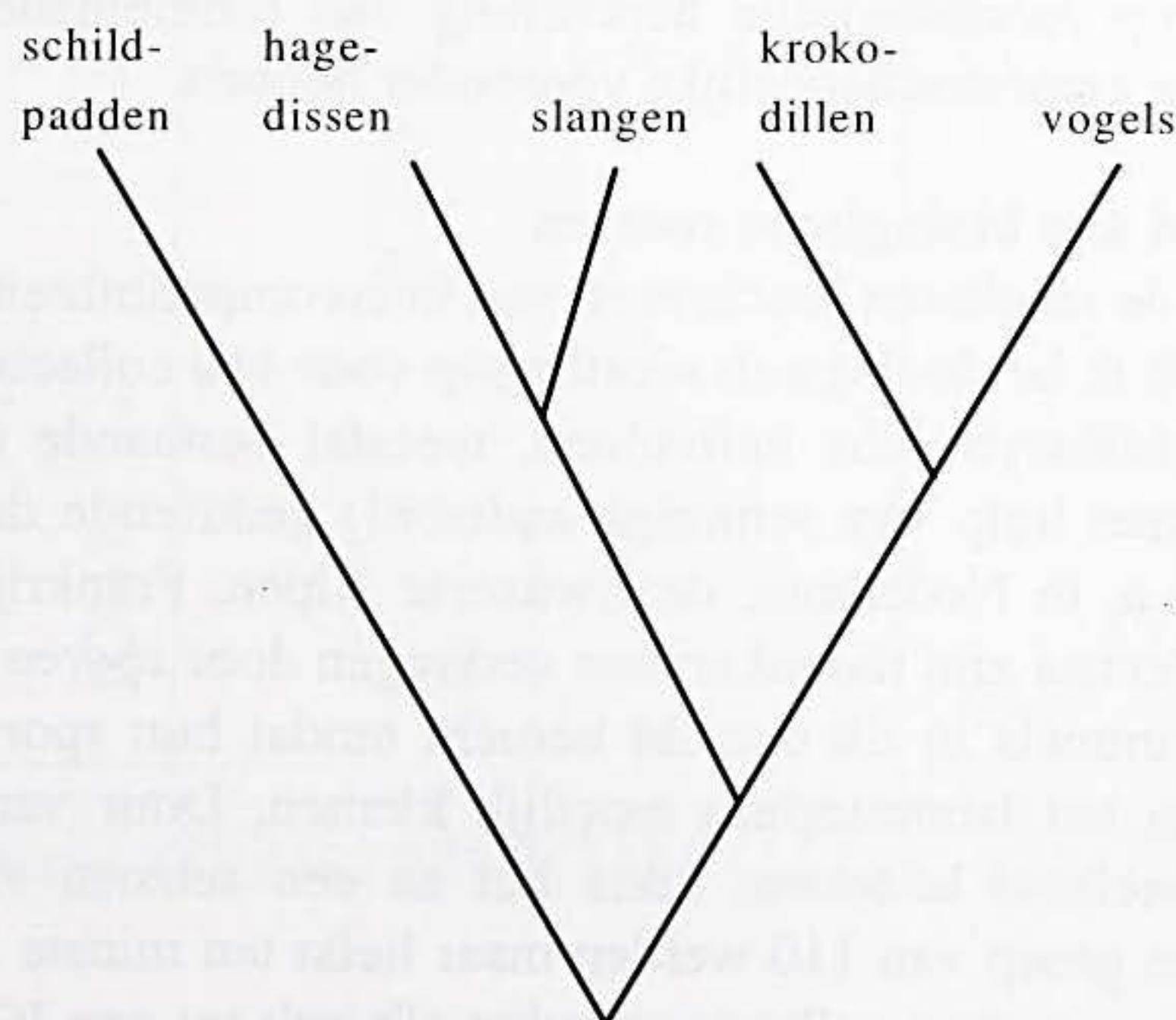
TERMINOLOGIE

Binnen een eukaryote cel (schimmels behoren tot de eukaryoten) bevinden zich onder andere een **kern** (bij schimmels soms meer dan één) en **mitochondriën**. Beide bezitten **DNA**, waarvan de samenstelling bruikbaar kan zijn om evolutionaire stambomen te reconstrueren. Mitochondriën zijn waarschijnlijk ooit vrijlevende bacteriën geweest die in symbiose zijn gegaan met de voorouder van eukaryoten.

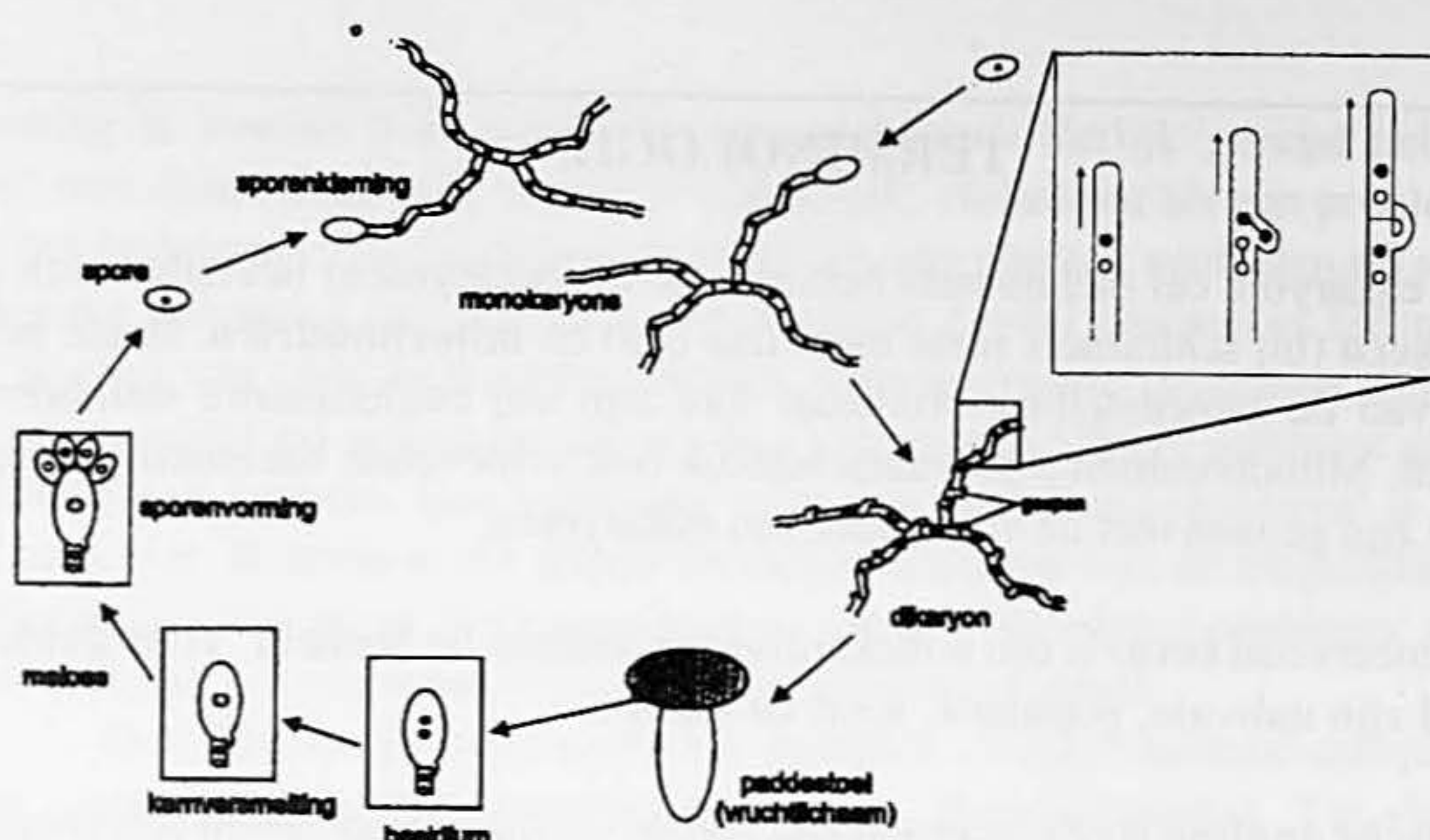
Een **taxon** (meervoud **taxa**) is een willekeurige taxonomische eenheid. Voorbeelden van zo'n eenheid zijn individu, populatie, soort en klasse.

Een **cladistische analyse** is een reconstructie van de verwantschap tussen een groep taxa, gebaseerd op gemeenschappelijke **verworven** kenmerken. Alleen gemeenschappelijke verworven kenmerken zijn informatief voor gemeenschappelijke afstamming en niet gemeenschappelijke **primitieve** kenmerken. Als we een fylogenie van zoogdieren reconstrueren, dan is het bezit van vier ledematen binnen deze groep een primitief kenmerk en zegt dus niets over verwantschap tussen de bezitters van vier ledematen. Het bezit van vinnen daarentegen, is informatief voor de verwantschap tussen walvissen en dolfijnen in deze groep. In een cladistische analyse moeten dus verworven kenmerken onderscheiden worden van primitieve. Hier bestaan verschillende technieken voor, waar ik hier niet verder op in ga.

De uitkomst van een cladistische analyse is een hypothese over de evolutionaire verwantschap tussen een groep taxa. Een **fylogenie** is de grafische weergave van zo'n hypothese. Binnen zo'n fylogenie kunnen **monofyletische**, **parafyletische** en **polyfyletische** groepen worden onderscheiden. Een monofyletische groep is een groep met een unieke laatste gemeenschappelijke voorouder. Een monofyletische groep wordt ook wel **clade** of **natuurlijke groep** genoemd. Parafyletische en polyfyletische groepen heb-



ben geen unieke laatste gemeenschappelijke voorouder (het onderscheid tussen beide is enigszins arbitrair en is in het kader van dit verhaal niet van belang). In het volgende voorbeeld zien we bijvoorbeeld dat vogels een monofyletische groep vormen, de laatste gemeenschappelijk voorouder van alle vogels is uniek voor de vogels. Reptielen vormen echter een parafyletische groep: de laatste gemeenschappelijke voorouder van alle reptielen is immers ook de voorouder van de vogels en is dus niet uniek voor de reptielen!



Figuur 1. De levenscyclus van heterothallische Basidiomyceten. Bij seksuele Basidiomyceten is een monokaryon het mycelium dat ontstaat uit een gekiemde spore; alle cellen van een monokaryon hebben één kern. Een dikaryon ontstaat uit fusie van twee monokaryons. Alle cellen in een dikaryon hebben twee afzonderlijke kernen, één van ieder monokaryon. Dikaryons kunnen microscopisch gemakkelijk van monokaryons onderscheiden worden door het bezit van gespen (zie kader in de figuur). Tweekernige mycelia kunnen vruchtlichamen (paddestoelen) vormen, waarin de kernversmelting plaats vindt, gevolgd door meiose en sporenvorming. In het kader staat schematisch aangegeven hoe gespen ontstaan, als 'littekens' van het verdelingsproces van de twee kernen in een dikaryotische cel over de twee nieuwe cellen.

1. Het bepalen van ICG's (InterCompatibiliteitsGroepen, biologische soorten);
2. Het zo nauwkeurig mogelijk vaststellen van evolutionaire relaties tussen ICG's;
3. Het nauwkeuriger onderzoeken van 'nauw verwante ICG's, bij voorkeur slechts gedeeltelijk reproductief geïsoleerde ICG's, om het proces van het ontstaan van reproductieve isolatie te kunnen bestuderen/reconstrueren;
4. Het afleiden van een gemakkelijker te hanteren soortbegrip voor het *Hebeloma crustuliniforme*-complex, gebaseerd op morfologische herkenning van (combinaties) van biologische soorten die een unieke gemeenschappelijke voorouder hebben.

Intercompatibiliteitstesten: een veelheid aan biologische soorten

In hoofdstuk 2 van mijn proefschrift zijn de resultaten beschreven van intercompatibiliteitstesten in dit soortencomplex. In totaal heb ik het biologisch soortbegrip voor 110 collecties toegepast. Deze verzameling collecties (dikaryotische individuen, meestal bestaande uit meerdere vruchtlichamen) is door mij (met hulp van sommige anderen!) gedurende drie jaren in noordwest-Europa aangelegd (o.a. in Nederland, de Zwitserse Alpen, Frankrijk, Duitsland en Zweden). Voor al deze collecties zijn monokaryons verkregen door sporen te laten kiemen. Nu zijn ectomycorizaschimmels in dit opzicht berucht omdat hun sporen onder gecontroleerde omstandigheden in het laboratorium moeilijk kiemen. Door verse sporen te gebruiken en een grote hoeveelheid te testen, lukte het na een seizoen van ploeteren echter uiteindelijk. Binnen deze groep van 110 werden maar liefst ten minste 20 biologische soorten (ICG's) gevonden; twee andere collecties zouden elk ook tot een ICG

	95 03	96 73	96 74	96 75	96 18	96 21	96 20	95 70	96 26	96 27	96 71	96 77	96 82	96 83	96 84	96 85	96 02	96 06	96 07	96 08	96 09	96 13	96 14	96 15	96 16	96 17	96 05	96 72	96 80	96 86	96 93	96 99	95 11	96 79	95 46	95 81	96 89	96 91			
9503-2		+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9673-5			+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9674-9				+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9675-3	ICG1				+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
9618-3						+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
9621-3							-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
9620-2								-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9570-2									+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9626-1										+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9627-1											+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9671-2												+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9677-5													+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9682-9														+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9683-6															+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9684-1																+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9685-1																	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9602-4																	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9606-1																		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9607-5																			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
9608-4																				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
9609-2																					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
9613-9																						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
9614-2																							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
9615-2																								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
9616-3																									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
9617-9																										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
9605-14																													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
9672-1																														+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
9680-1																															+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9686-9																																+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9693-8																																	+	+	+	+	+	+	+	+	
9699-1																																		+	+	+	+	+	+	+	
9511-1																																			+	+	+	+	+	+	
9679-1																																				+	+	+	+	+	
9546-8																																									
9581-1																																									
9689-7																																									
9691-9																																									
																</																									

Figuur 2. Resultaten van intercompatibiliteitstesten tussen 38 collecties behorende tot *H. crustuliniforme* s.s. en *H. alpinum*. Combinaties die resulteerden in dikaryons (gekaracteriseerd door gespen) zijn aangegeven met een + en combinaties waar dit niet het geval was met een -. Combinaties met tekenen van verminderde compatibiliteit (tussen groepen) zijn aangegeven met een *. Binnen deze groep zijn 5 ICG's te onderscheiden en tussen enkele ICG's is er partiële compatibiliteit (zie tekst voor verder details).

kunnen horen, maar omdat ook andere verklaringen mogelijk waren voor het niet optreden van compatibiliteit, heb ik deze maar niet meegeteld.

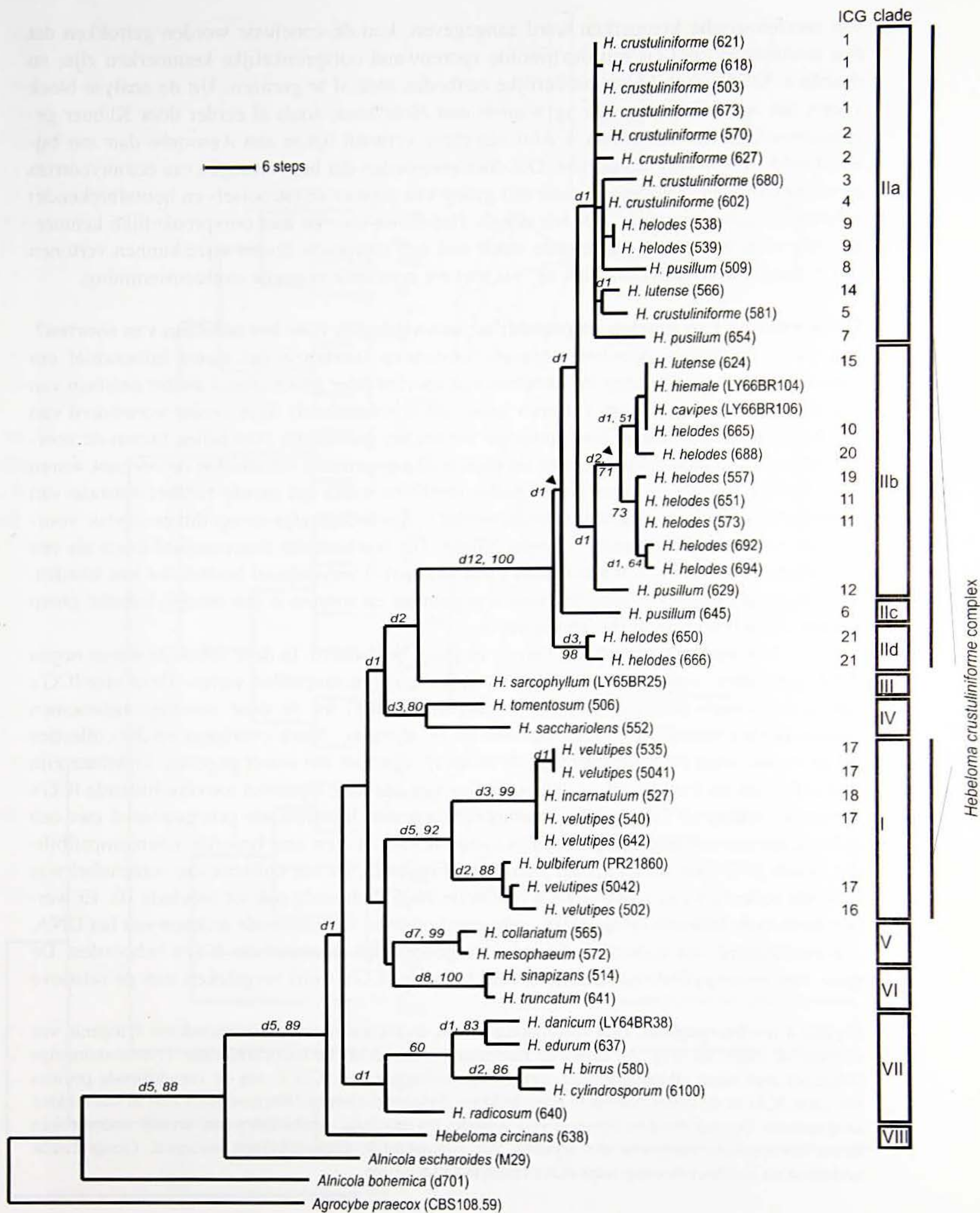
Om met een voorbeeld te illustreren hoe de resultaten van die kruisingstesten er uit zien, zijn in Figuur 2 de resultaten weergegeven van kruisingstesten tussen 38 collecties behorende tot *H. crustuliniforme* s.s. en *H. alpinum*. Zoals te zien zijn er binnen deze groep 5 ICG's gevonden. Binnen zo'n groep zijn verreweg de meeste combinaties compatibel, terwijl tussen de groepen vrijwel alle combinaties incompatibel zijn. Door dit patroon (vrijwel altijd compatibiliteit binnen groepen, vrijwel nooit compatibiliteit tussen groepen) kunnen we vrijwel elke collectie ondubbelzinnig tot één ICG rekenen. Eén collectie (9605), gevonden in de Alpen, was compatibel met alle collecties uit zowel 3 als 4! Strikt genomen zouden we deze collectie dus tot twee soorten moeten rekenen (als dat zou kunnen).

Evolutionaire verwantschappen binnen het *Hebeloma crustuliniforme*-complex en positie binnen het genus *Hebeloma*

In hoofdstuk 3 werden evolutionaire verwantschappen bestudeerd tussen de gevonden ICG's en tussen deze en de overige groepen binnen het geslacht *Hebeloma*. Deze verwantschappen werden afgeleid door een cladistische analyse te doen op de basenparen van een stukje DNA, de zgn. ITS, van een groot aantal collecties. Uit deze analyse bleek dat de 20 gevonden ICG's geen unieke gemeenschappelijke voorouder hebben, maar twee groepen vormen die ieder een andere unieke laatste gemeenschappelijke voorouder hebben (Figuur 3). Eén van deze twee groepen bestond uit drie ICG's (clade I, *H. velutipes*/*H. incarnatum*), de andere uit 17 ICG's (clade II, *H. crustuliniforme*/*H. pusillum*/*H. helodes*). De meeste ICG's binnen deze laatste clade waren zeer nauw verwant, wat bleek uit het feit dat het stukje DNA tussen die ICG's vrijwel geen verschillen vertoonde. Het grootste deel van de ICG's binnen deze clade toonde een voorkeur voor Salicaceae (wilg en populier) als gastheer. Maar liefst 74% van de collecties uit deze clade waren bij deze bomen verzameld. De ICG die aan de basis lijkt te staan van deze groep, ICG 21, was echter niet bij Salicaceae gevonden. Dit wijst erop dat de wisseling van gastheervoorkeur is gevolgd door uitgebreide en snelle soortvorming. In clade I was slechts 7% van de collecties verzameld bij Salicaceae. Het overgrote deel kwam van bomen als berk, eik, beuk en den. Dit tegengestelde patroon (veel soorten na gastheerwisseling en specialisatie tegenover weinig soorten bij een minder gespecialiseerde groep) zou er op kunnen wijzen dat gastgeerspecialisatie de kans op soortvorming vergroot en dat soorten met een brede gastheerkeuze minder snel nieuwe soorten kunnen vormen.

Verschillende andere goed ondersteunde monofyletische groepen werden gevonden binnen het geslacht *Hebeloma*, maar de verwantschappen *tussen* deze groepen konden niet met grote zekerheid gereconstrueerd worden. Daarom was het onmogelijk een nieuwe indeling binnen het geslacht *Hebeloma* voor te stellen. Als op dit cladogram het ontstaan

Figuur 3 (rechterpagina). Fylogenetische verwantschappen in het geslacht *Hebeloma*, gebaseerd op ITS-sequenties. *Agrocybe praecox* is als buitengroep gebruikt en twee soorten van *Alnicola* zijn ook in de analyse opgenomen. Voor details over de fylogenetische analyse wordt verwezen naar mijn proefschrift. Rechts van de boom zijn de ICG's waartoe collecties behoren aangegeven. De belangrijkste monofyletische groepen die te herkennen zijn, zijn ook aangegeven. Het *Hebeloma crustuliniforme*-complex vormt geen monofyletische groep, zoals aangegeven.



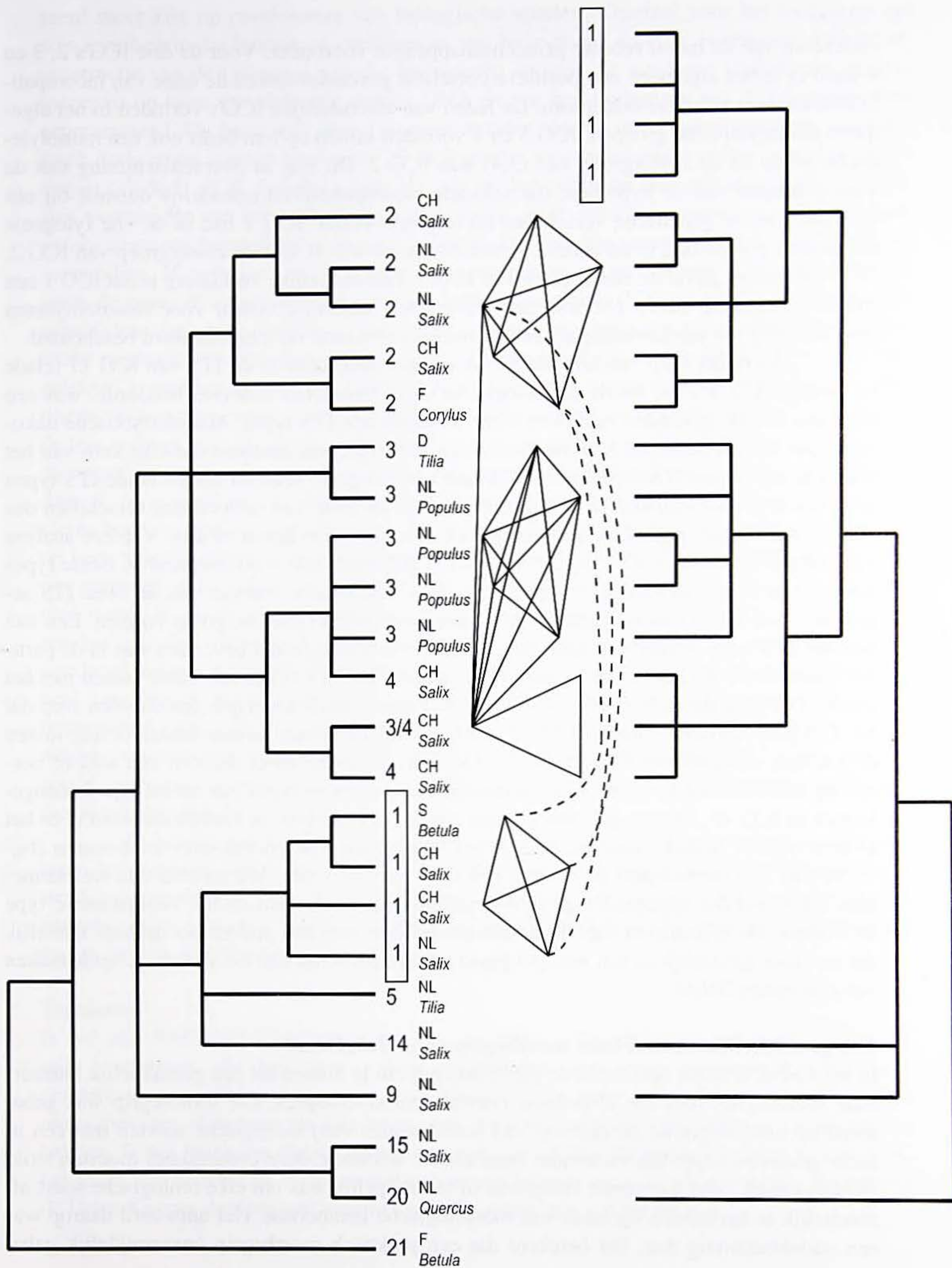
van morfologische kenmerken werd aangegeven, kon de conclusie worden getrokken dat een wortelende steel en een dextrinoïde sporenwand oorspronkelijke kenmerken zijn, en daardoor NIET geschikt om natuurlijke eenheden mee af te grenzen. Uit de analyse bleek voorts dat *Alnicola* zeer nauw verwant is met *Hebeloma*, zoals al eerder door Kühner geconstateerd, en dat *Hebeloma* + *Alnicola* meer verwant lijken aan *Agrocybe* dan aan bijvoorbeeld *Cortinarius* of *Inocybe*. Dat doet vermoeden dat het vermogen om ectomycoriza te vormen binnen *Hebeloma* vanuit een groep van saprotrofe (strooisel- en houtafbrekende) schimmels geëvolueerd is. Het feit dat de *Hebeloma*-soorten met oorspronkelijke kenmerken (de soorten met een wortelende steel) ook een saprotrofe levenswijze kunnen vertonen (op brandplekken, muizennesten, etc.) is met die conclusie in goede overeenstemming.

Het grensvlak van soorten en populaties: aanwijzingen voor het ontstaan van soorten?

Het grensvlak tussen populaties binnen soorten en soorten is het meest informatief om aanwijzingen te vinden voor het ontstaan van soorten (hier gedefinieerd als het ontstaan van reproductieve isolatie of het verloren gaan van kruisbaarheid). Hoe verder verwijderd van het soortvormingsmoment, hoe groter de verwachte genetische verschillen tussen de soorten, maar des te moeilijker het is te bepalen welke genetische verschillen de *oorzaak* waren voor het ontstaan van soorten ('divergentie-eerst') en welke het *gevolg* van het ontstaan van reproductieve isolatie ('incompatibiliteit-eerst'). Bovendien zijn er op dit grensvlak voorbeelden te vinden van partiële compatibiliteit. Dit betekent dat intercompatibiliteit als een kwantitatief en niet als een kwalitatief ('alles-of-niets') verschijnsel bestudeerd kan worden. Een voorbeeld van zo'n grensvlak tussen populaties en soorten is een monofyletische groep binnen clade II (subclade IIa, zie Figuur 3).

In hoofdstuk 4 werd deze groep in detail bestudeerd. In deze subclade waren negen ICG's gevonden, waarvan er vier slechts gedeeltelijk incompatibel waren. Deze vier ICG's behoorden samen met een volledig incompatibele ICG tot de door sommige taxonomen onderscheiden soorten *H. crustuliniforme* en *H. alpinum*. (Merk overigens op dat collecties uit de Alpen, waar (te?) gemakkelijk de naam *H. alpinum* aan wordt gegeven, kruisbaar zijn met collecties uit Nederland; en dat collecties van dezelfde alpenwei tot verschillende ICG's bleken te behoren.) De partiële incompatibiliteit was hiërarchisch georganiseerd met een redelijk niveau van intercompatibiliteit tussen ICG 3 en 4 en zeer beperkte intercompatibiliteit tussen ICG 2 en 3/4 en tussen 1 en 2 (zie Figuur 2). De ene collectie die compatibel was met alle collecties van zowel 3 als 4 (collectie 9605) behoorde ook tot subclade IIa. Er werden twee verschillende fylogenieën, gebaseerd op twee verschillende stukken van het DNA, gereconstrueerd van collecties die tot deze gedeeltelijk compatibele ICG's behoorden. De mate van incompatibiliteit tussen de verschillende ICG's werd vergeleken met de relatieve

Figuur 4 (rechterpagina). Een vergelijking tussen de nucleaire en de mitochondriële fylogenie van soorten uit clade IIa (Fig. 3). Links de nucleaire boom, rechts de mitochondriële. Overeenkomstige collecties zijn naast elkaar geplaatst, behalve de collecties van ICG 1, om de verschillende posities van deze ICG in de beide bomen te benadrukken. Seksuele-compatibiliteitsrelaties zijn in het midden aangegeven. Ononderbroken lijnen geven volledig compatibele combinaties aan, terwijl onderbroken lijnen combinaties aangeven die tekenen van verminderde compatibiliteit vertonen. Geografische herkomst en gastheer-boomgenera zijn eveneens aangegeven.



ouderdom van de meest recente gemeenschappelijke voorouder. Voor de drie ICG's 2, 3 en 4 werd er in het algemeen een positieve correlatie gevonden tussen de mate van incompatibiliteit en deze relatieve ouderdom. De leden van afzonderlijke ICG's vormden in het algemeen monofyletische groepen, ICG 3 en 4 vormden samen op hun beurt ook een monofyletische groep en de zustergroep van (3,4) was ICG 2. Dit was in overeenstemming met de voorspellingen van de hypothese dat seksuele incompatibiliteit geleidelijk ontstaat bij een toename van de genetische verschillen (divergentie-eerst). ICG 1 had in de ene fylogenie een andere positie dan in de andere. In het ene geval was ICG 1 de zustergroep van ICG 2, en in het andere geval de zustergroep van ICG 5. Een mogelijke verklaring is dat ICG 1 een hybride oorsprong heeft. Dit was een verrassende uitkomst, omdat voor basidiomyceten soortvorming via bastaardering als een nauwelijks bestaand verschijnsel werd beschouwd.

Het onderwerp van hoofdstuk 5 is een polymorfisme in de ITS van ICG 17 (clade I). Binnen ICG 17, die tot de morfologische soort *Hebeloma velutipes* behoorde, was een dikaryon (d504) gevonden met twee sterk verschillende ITS-types. Monokaryotische nakomelingen van dit dikaryon hadden slechts één ITS-type, wat aantoonde dat elke kern van het dikaryon zijn eigen ITS-type heeft. Blijkbaar was het grote verschil tussen beide ITS-typen geen beletsel voor kruisbaarheid, wat betekent dat de mate van moleculaire verschillen dus geen criterium kan zijn of twee collecties tot dezelfde soort horen of niet. Verdere analyse van collecties van deze ICG toonde aan dat het polymorfisme wijdverspreid is. Beide types komen zowel in Amerika als Europa voor. Een cladistische analyse van de twee ITS-sequenties van ICG 17 toonde aan dat ze samen geen monofyletische groep vormen. Eén van de twee ITS-types vormt een clade samen met het unieke type dat gevonden was in de partieel compatibele ICG 16 en het andere ITS-type van ICG 17 vormt een clade samen met het unieke ITS-type dat in ICG 18 gevonden was. Verschillende aanwijzingen duiden erop dat het ITS-polymorfisme binnen ICG 17 niet het resultaat is van recente bastaardering tussen de partieel compatibele ICG 16 en 17. Het polymorfisme moet daarom een andere oorsprong hebben. Een aannemelijke verklaring is dat de twee types pas recent zijn samengekomen in ICG 17. Dit zou gebeurd kunnen zijn als het ene type in Europa ontstaan is en het andere type in Noord-Amerika, en met het verplaatsen van bomen over continenten (bijvoorbeeld de Douglasspar) de beide typen ook verplaatst zijn. We moeten dan wel aannemen dat zowel het 'Europese' type in Amerika is terechtgekomen als het 'Amerikaanse' type in Europa. De uitkomsten van dit hoofdstuk hebben nog een andere boodschap, namelijk dat het zeer gevaarlijk is om een fylogenie te reconstrueren als we slechts gebruik maken van één stukje DNA!

Een gemakkelijk hanteerbaar soortbegrip voor *Hebeloma*?

In hoofdstuk 6 wordt een methode gepresenteerd om te komen tot een gemakkelijk hanteerbaar soortbegrip voor het *Hebeloma crustuliniforme*-complex. Dit soortbegrip was gebaseerd op morfologische herkenning van (combinaties van) biologische soorten met een unieke gemeenschappelijk voorouder (met andere woorden: deze combinaties moesten strikt monofyletisch zijn). De eerste vraag was of het mogelijk was om elke biologische soort afzonderlijk te herkennen op basis van morfologische kenmerken. Het antwoord daarop was een ondubbelzinnig nee. Dit betekent dat een praktisch soortbegrip onvermijdelijk geba-

seerd moet zijn op *combinaties* van biologische soorten. Cruciaal voor het toepassen van zo'n soortbegrip dat bestaat uit combinaties van biologische soorten, is een betrouwbare reconstructie van de fylogenie van die biologische soorten. Er werd een cladistische analyse toegepast op twee verschillende stukjes DNA en een beste schatting van de fylogenie werd gepresenteerd. Op basis van deze fylogenie konden slechts twee monofyletische, morfologisch herkenbare soorten binnen de 20 biologische soorten erkend worden, namelijk *H. velutipes* (clade I) en *H. helodes* (clade II). Als we het criterium van strikte monofylie enigszins verruimden tot het eveneens erkennen van parafyletische soorten (soorten die geen *unieke* gemeenschappelijke voorouder hebben), konden drie soorten erkend worden: *H. incarnatum*, *H. velutipes* en *H. helodes*. Een stamboom waarin de vijf ICG's, die morfologisch de naam *H. crustuliniforme* zouden hebben gekregen, (ICG's 1 t/m 5) geforceerd een monofyletische groep vormden, kon statistisch niet worden verworpen. (Met deze statistische methoden kunnen alternatieven voor de beste schatting van de fylogenie worden vergeleken; vooral bij kleine verschillen in het DNA blijkt nogal eens dat alternatieve schattingen vrijwel even goed zijn, en in zulke gevallen zouden we misschien niet al te streng in de leer moeten zijn om alleen de beste reconstructie te accepteren.) Op basis van deze 'gedwongen' boom konden met behulp van het verruimde criterium vier soorten erkend worden: *H. incarnatum*, *H. velutipes*, *H. crustuliniforme* en *H. helodes*. Collecties met een kleine hoed en een lange slanke steel, die gewoonlijk *H. pusillum* worden genoemd, bleken op verschillende plaatsen in de fylogenie op te duiken, maar een boom waarin deze collecties gedwongen bij elkaar werden geplaatst, moest statistisch worden verworpen. En daarmee moest *H. pusillum* dus worden opgeheven of afgeschaft. Het beperkte vermogen om een biologisch-soortbegrip te vertalen naar een gemakkelijk hanteerbaar soortbegrip werd verklaard door een gebrek aan kwalitatieve morfologische kenmerken en de veranderlijkheid van kwantitatieve kenmerken (grootte van het vruchtlichaam, hoed/steel-verhouding, hoeveelheid velum op de hoed en de daarmee samenhangende hoedkleur). Op basis van de nauwe verwantschap tussen de ICG's werd aannemelijk gemaakt, dat het vinden van een goede overeenstemming tussen een biologisch-soortbegrip en een morfologisch-soortbegrip niet waarschijnlijk is.

In het laatste hoofdstuk werden de resultaten die in dit proefschrift beschreven staan geïntegreerd en in een breder kader geplaatst. Richtingen voor vervolgonderzoek werden gesuggereerd. Een belangrijke aanbeveling was dat nieuwe fylogenetische studies nadrukkelijker rekening dienen te houden met de mogelijkheid van genetische uitwisseling tussen genetisch gedivergeerde populaties.

Tenslotte

Ik wil alle NMV-leden bedanken die mij, op welke wijze dan ook, geholpen hebben bij mijn onderzoek. Ik heb nog enkele exemplaren van mijn proefschrift over voor geïnteresseerden. Thom Kuyper en Rolf Hoekstra zijn mijn begeleiders geweest bij mijn onderzoek aan *Hebeloma* en hun komt veel dank toe voor de wijze waarop zij dit gedaan hebben. Ik wil Peter-Jan Keizer bedanken voor zijn aanmoedigingen dit artikel te schrijven, het lezen van de tekst en voor het maken van een opzetje voor de samenvatting. Tevens wil ik Thom Kuyper dankzeggen voor het grondig doorlezen van dit artikel.