

Samenvatting & Conclusies

De *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep (=Spathelioideae sensu Chase *et al.*, 1999; =Cneoroideae sensu Kubitzki *et al.*, 2011) bestaat uit zeven kleine geslachten die tot de orde van de Sapindales behoren. De geslachten waren vroeger onderdelen van verschillende families van de Sapindales voordat de eerste moleculair-fylogenetische studies (Chase *et al.*, 1999) een indicatie voor een hechtere verwantschap opleverden. Deze indicaties waren niet sterk ondersteund qua statistiek en zijn moeilijk te begrijpen als men de morfologie van de geslachten in beschouwing neemt.

Dit proefschrift bevat een gedetailleerde moleculair-fylogenetische analyse van de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep. Vijf regio's van het chloroplast DNA (*atpB*, *psbA-trnH*, *rbcL*, *rps16*, *trnL-trnF*) werden voor alle geslachten (*Cedrelopsis* inbegrepen) en 83.3% van de soorten gesequenced, en fylogenetische analyses werden met "maximum parsimony", "maximum likelihood" en "Bayesian inference" berekend. Bayesian methodes werden gebruikt voor moleculaire datering en een 'ancestral area reconstruction' (Reconstructie van het oorspronkelijke gebied van voorkomen). Coupes voor vergelijkende anatomische studies werden gemaakt voor lichtmicroscopie en voor elektronenmicroscopie. Al bekende kenmerken van de verschillende soorten werden via een literatuurstudie bijeengebracht.

Aan de hand van de beschrevene moleculair biologische, statistische en microscopische methoden was het mogelijk om de onderzoeksvragen opgesteld in **hoofdstuk 1** en de volgende vragen te beantwoorden:

Is de Spathelia / Ptaeroxylon groep monofyletisch en hoe zit het met de verwantschap met de wijnruitfamilie (Rutaceae)?

Moleculair-fylogenetische analyses van Rutaceae (Chase *et al.*, 1999; Groppo *et al.*, 2008) leverden op dat de Rutaceae sensu stricto (s.s.) en de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep zuster groepen zijn. Echter, Chase *et al.* (1999) en Groppo *et al.* (2008) gebruikten enkel maximum parsimony voor de stamboom bepaling. Er werden slechts twee regio's van het chloroplast DNA gesequenced en de statistische ondersteuning voor de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep evenals het aantal bemonsterde soorten binnen de groep waren heel laag. In **hoofdstuk 3** werden drie methodes voor de stamboom bepaling gebruikt (maximum parsimony, maximum likelihood, Bayesian inference) en er werden vijf regio's van het chloroplast DNA gesequenced. De drie methodes tonen met een hoge statistische ondersteuning aan dat de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep monofyletisch is, en dat ze de zuster groep van de Rutaceae s.s. zijn. De voorlopige resultaten van Chase *et al.* (1999) en Groppo *et al.* (2008) worden dus bevestigd. Omdat Rutaceae s.s. en de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep zuster groepen zijn, moet er een besluit genomen worden of de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep zal worden beschouwd als een subfamilie van de

Rutaceae, of als een aparte familie, of als meerdere kleine families.

Rutaceae (Spathelioideae), of Cneoraceae, Harrisoniaceae, Ptaeroxylaceae en Spatheliaceae?

De beslissing over de opname of afsplitsing van de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep hangt, vanwege de zustergroeprelatie, vooral af van de evaluatie van anatomische en morfologische kenmerken. Een opname van de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep in de Rutaceae zou zinnig zijn indien de belangrijkste kenmerken van de Rutaceae tenminste in sommige genera van de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep aanwezig zijn. Indien dit niet zo is, zou de groep apart moet worden geplaatst onder de vroegere familienaam Cneoraceae. Als alternatief zou het mogelijk zijn om de groep vanwege de grote morfologische verschillen in vier kleine families op te splitsen: de Cneoraceae (alleen *Cneorum*), de Harrisoniaceae (alleen *Harrisonia*), de Ptaeroxylaceae (*Bottegoa*, *Cedrelopsis* en *Ptaeroxylon* [Nieshout]) en de Spatheliaceae (*Dictyoloma*, *Sohnreyia* en *Spathelia*).

Vergelijkende anatomische en morfologische studies tonen aan, dat meerdere typische kenmerken van Rutaceae in de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep aanwezig zijn, namelijk het sterk ontwikkelde intrastaminale diskusnectarium (interstaminaal bij *Cneorum*), de doorschijnende klieren in de bladeren en een cellaag van cellen met spiraalvormige wandverdichtingen in de zaadhuid (tracheïdaal tegmen). Naast deze karakteristieke kenmerken van de Rutaceae komen in de bladeren van alle geslachten van de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep met uitzondering van *Dictyoloma* oliecellen voor die in Rutaceae heel zeldzaam zijn. Oliecellen zijn in sommige geslachten van Rutaceae aanwezig (Metcalfe & Chalk, 1957; Baas & Gregory, 1985) en dus is dit kenmerk niet in tegenspraak met de tegenwoordige omschrijving van de Rutaceae. Naast de anatomische en morfologische kenmerken zijn er ook chemische studies die voor een opname van de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep in de Rutaceae pleiten. Limonoïde, alkaloïde en coumarine zijn karakteristieke secundaire componenten van de twee groepen.

Een opname van de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep in de Rutaceae lijkt opportuun en wordt in **hoofdstuk 3** voorgesteld. De naam 'Spathelioideae' wordt voor de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep geopperd en de subfamilie Spathelioideae wordt vanwege de grote morfologische verschillen in vier tribus (Cneoreae, Harrisonieae, Ptaeroxyleae, Spathelieae) opgesplitst.

Kort voor de afwerking van dit proefschrift werd een nieuwe classificatie van de Rutaceae gepubliceerd (Kubitzki *et al.*, 2011), waar de naam 'Cneoroideae' wordt gebruikt voor de *Spathelia* / *Ptaeroxylon* groep. Echter worden de woorden 'Cneoroideae' en 'subfamily' (subfamilie) niet genoemd in de originele publicatie (Webb, 1842), die door Kubitzki *et al.* (2011) wordt geciteerd.

De indeling in vier triben benadrukt de morfologische en anatomische verschillen van de Spathelioideae genera. Maar er zijn desondanks gemeenschappelijke kenmerken voor de Spathelioideae. De oliecellen in de bladeren zijn mogelijk een synapomorfie van de Spathelioideae. Alle genera met uitzondering van *Harrisonia* hebben haplostemone bloemen. De filamenten van de meeldraden van *Dictyoloma*, *Harrisonia* en *Spathelia* hebben gevleugelde en behaarde aanhangsels en licht gevleugelde filamenten zijn ook bij *Bottegoa* aanwezig. Daarnaast zijn er ook fytochemische aanwijzingen voor een samenvoeging tot één subfamilie: Chromonen komen in alle Spathelioideae voor en zijn dus een potentieel synapomorfie van de Spathelioideae.

Zijn de zeven geslachten van de Spathelioideae monofyletisch?

Moleculair-fylogenetische analyses tonen met hoge statistische ondersteuning ('bootstrap' en 'posterior probability' waardes) aan, dat de meeste geslachten monofyletisch zijn. Vanwege de grote morfologische verschillen en de verschillende en normaliter niet overlappende arealen van de geslachten was dit resultaat verwacht. Drie geslachten zijn monotypisch en zijn dus per definitie monofyletisch.

De genera *Cedrelopsis* en *Ptaeroxylon* lijken sterk op elkaar, maar zijn door meerdere kenmerken van elkaar onderscheidbaar. De resultaten van **hoofdstuk 3** tonen aan dat het monotypische geslacht *Ptaeroxylon* tot *Cedrelopsis* behoort, maar hiervoor is de statistische ondersteuning heel laag. In **hoofdstuk 2** zijn ze zustergenera met een hoge statistische ondersteuning. Het geslacht *Spathelia* heeft een wijde verspreiding van noordelijk Zuid-Amerika tot de Caribische Eilanden. De Zuid-Amerikaanse soorten zijn duidelijk verschillend van de Caribische soorten. De Zuid-Amerikaanse soorten van *Spathelia* werden vroeger geklasseerd als aparte genera – *Diomma* Engl. Ex Harms en *Sohnreyia* K. Krause – en door Cowan & Brizicky (1960) opgenomen in *Spathelia*. De resultaten van **hoofdstuk 3** tonen aan dat de Zuid-Amerikaanse soorten van *Spathelia* een aparte lijn vormen en dat de Caribische soorten de zustergroep van het Zuid-Amerikaanse geslacht *Dictyoloma* zijn. Het genus *Spathelia* sensu Cowan & Brizicky (1960) is daarom niet monofyletisch en de Zuid-Amerikaanse soorten moeten van *Spathelia* worden afgesplitst om een monofyletisch genus *Spathelia* te behouden. De genusnaam *Sohnreyia* werd derhalve hergebruikt en omvat nu alle Zuid-Amerikaanse soorten van *Spathelia*. *Sohnreyia* en *Spathelia* zijn onvertakte palmboomachtige planten die afsterven nadat ze vruchten hebben geproduceerd. Zoals *Sohnreyia* en *Spathelia* heeft *Dictyoloma* terminale bloeiwijzen, maar een sympodiale groei komt voor bij *Dictyoloma*. Daarom is het mogelijk dat de plant na de bloei verder kan groeien. Het genetische mechanisme van de vertakking van de stam is misschien gelijk en de voorouder van de drie geslachten was mogelijk en onvertakt boom. De sympodiale vertakking van de stam zou in dit geval zijn ontstaan in de *Dictyoloma* lijn.

Wat is de fylogenetische positie van Cedrelopsis en wat zijn de consequenties voor de familie Ptaeroxylaceae?

Bij de start van deze studie waren geen DNA-sequenties voor *Cedrelopsis* bekend. Op basis van morfologische kenmerken, blijkt *Cedrelopsis* nauw verwant te zijn met *Ptaeroxylon*. Deze verwantschap werd met moleculair-fylogenetische methodes bevestigd (**hoofdstukken 2 en 3**). Verder was het mogelijk om aan te tonen dat *Bottegoa* de zustergroep van *Cedrelopsis* en *Ptaeroxylon* is (**hoofdstukken 2 en 3**). De drie genera werden op basis van anatomische en morfologische kenmerken samen in de kleine familie Ptaeroxylaceae geplaatst (Van der Ham *et al.*, 1995). Dit proefschrift levert de eerste moleculairbiologische indicatie voor de monofylie van de Ptaeroxylaceae. De vroegere familie Ptaeroxylaceae wordt voortaan als tribus Ptaeroxyleae binnen de Rutaceae erkend (**hoofdstuk 3**).

Is het geslacht Cneorum een overblijfsel uit het vroege Tertiair?

Cneorum is een klein geslacht vanuit het westelijke Middellandse Zeegebied en de Canarische Eilanden. De ontdekking van een soort uit Cuba had een grote invloed op de taxonomische

positie en op de schatting van de ouderdom van *Cneorum*. Vanwege de trans-Atlantische verspreiding werd het geslacht vaak als relict uit het vroege Tertiair beschouwd (Borhidi, 1991; Riera *et al.*, 2002). Deze zienswijze werd door, voor Sapindales uitzonderlijke morfologische kenmerken, zoals drietallige bloemen en een interstaminale nectardiscus gestaafd. Macro-morfologische en palynologische studies (Lobreau-Callen & Jérémie, 1986) tonen aan dat er geen verschillen zijn tussen de Cubaanse soort *C. trimerum* en de Mediterrane soort *C. tricoccon*. Anderzijds werden grote verschillen in de houtanatomie vastgesteld (Carlquist, 1988). In **hoofdstuk 4** wordt beschreven dat de meeste herbariumvellen van *C. trimerum* verkeerd geïdentificeerd waren en in werkelijkheid tot de geslachten *Hypericum* [hertshooi] of *Schoepfia* behoren. Het type van *C. trimerum* is wellicht het enige betrouwbare exemplaar van *Cneorum* uit Cuba. In tegenstelling tot alle vroegere inzichten komt de houtanatomie van het type van *C. trimerum* helemaal overeen met de houtanatomie van de Mediterrane soort (**hoofdstuk 4**). Ook zijn er bijna geen verschillen op DNA niveau. In een moleculair-fylogenetische analyse vormde het type uit Cuba een polytomie met meerdere exemplaren van *C. tricoccon* en er is niet van de vooronderstelling uit te gaan dat de Cubaanse *C. trimerum* een aparte soort is (**hoofdstuk 4**). De verspreiding van *Cneorum* in Cuba is meer dan waarschijnlijk niet natuurlijk en het genus werd vermoedelijk geïntroduceerd door de mens. De verspreiding levert dus geen argument voor de hypothese dat *Cneorum* een relict uit het vroege Tertiair is. Moleculaire dateringanalyses (**hoofdstuk 5**) leveren immers verdere argumenten op tegen een oorsprong in het vroege Tertiair. De voorouders van *Cneorum* en de Ptaeroxylaceae lijn zijn misschien in het Eoceen of Oligoceen van elkaar gescheiden en de opsplitsing van de recente soorten gebeurde wellicht in het late Oligoceen of Mioceen.

Wanneer en waar zijn de Spathelioideae ontstaan?

Moleculaire datering (**hoofdstuk 5**) wijst erop dat de Rutaceae en de Spathelioideae in het Boven-Krijt zijn ontstaan. Derhalve zou de opsplitsing in een neotropische en een paleotropische lijn van de Spathelioideae misschien te jong zijn om door het uit elkaar vallen van Gondwana (119-105Ma voor de splitsing van Zuid-Amerika en Afrika) veroorzaakt te zijn. Hoewel het gedeelte van de Rutaceae-stamboom (Toddalioideae s.l. zoals beschreven in **hoofdstuk 5**) dat de meeste Amerikaanse genera omvat niet goed opgelost en ondersteund is, zijn er indicaties dat de oorsprong van de Rutaceae in de Oude Wereld te situeren is (Kubitzki *et al.*, 2011; **hoofdstuk 5**). Gesteld dat dit juist is, ligt de oorsprong van de Spathelioideae waarschijnlijk in centraal westelijk en centraal Afrika. De Spathelioideae bevatten een neotropische en een paleotropische groep en de splitsing van de twee groepen is wellicht een resultaat van een langeafstandverspreiding gedurende het Boven-Krijt of Paleoceen, toen de Afrikaanse en de Zuid-Amerikaanse continenten nog dichtbij elkaar gelegen waren. Binnen de neotropische groep gebeurde een verspreiding van noordelijk Zuid-Amerika in de richting van de Caribische Eilanden (genus *Spathelia*). Een landbrug via de tegenwoordige Kleine Antillen ofwel een reeks van dichtbij elkaar gelegen eilanden zou deze migratie mogelijk kunnen gemaakt hebben. Fluctuaties in de zeespiegel tijdens het Pleistoceen hebben de landmassa's in het Caribisch gedeelte meerdere keren verbonden en weer gescheiden. Het resultaat hiervan was wellicht een isolatie van populaties die soortvorming in het genus *Spathelia* heeft veroorzaakt. De paleotropische groep van de Spathelioideae komt waarschijnlijk uit Afrika en daarvandaan hebben meerdere verspreidingen naar het Middellands Zeegebied en de Ca-

narische Eilanden, Madagaskar en Zuidoost-Azië (noordelijk Australië inbegrepen) plaatsgevonden.

Toekomstige studies

De stelling: “*Science, in the very act of solving problems, creates more of them*” van Abraham Flexner (1930) is natuurlijk ook van toepassing op dit proefschrift.

De fylogenie van de Spathelioideae is goed opgelost en ondersteund voor alle genera en de meeste soorten, maar niet voor *Spathelia* en *Cedrelopsis*.

Spathelia brittonii – de enige soort uit westelijk Cuba – is de zustergroep van de rest van de *Spathelia* soorten. Bovendien vormen de Jamaicaanse soorten een monofyletisch groep. Verdere relaties tussen de soorten konden niet worden bepaald. Merkwaardig genoeg vormden de drie in **hoofdstuk 3** bemonsterde exemplaren van *S. splendens* geen monofyletisch groep, zoals op basis van de unieke morfologie te verwachten was. In **hoofdstuk 5** werd vastgesteld dat de splitsing van de *Spathelia* soorten van de regio Oost Cuba – Jamaica – Bahama’s heel recent gebeurde. Het gebruik van bijkomende, en vooral van meer veranderlijke, DNA regio’s zou nuttig kunnen zijn om de precieze relaties te verklaren. Een vergelijking van kern- en chloroplast DNA en een microsatellietstudie zou kunnen helpen om te bepalen in hoeverre hybridisatie was/is betrokken bij de soortvorming van *Spathelia*.

In deze studie was het mogelijk om DNA sequenties voor 83.3% van de soorten van de Spathelioideae te genereren. De ontbrekende soorten horen bijna allemaal tot het Malagassische genus *Cedrelopsis*. Dit genus werd opgesplitst in twee groepen of subgenera: *Cedrelopsis* A en *Cedrelopsis* B (Leroy *et al.*, 1990). **Hoofdstuk 3** levert de eerste indicatie dat de twee groepen monofyletisch zijn, maar het is nodig om alle soorten van *Cedrelopsis* in een fylogenetische analyse op te nemen voordat uiteindelijke conclusies over de relaties binnen *Cedrelopsis* kunnen worden getrokken.

Een groot probleem met betrekking tot *Cedrelopsis* is de incomplete kennis van de soorten. Meerdere soorten zijn alleen bekend van bloeiende exemplaren of exemplaren met enkel vruchten. Dit maakt het moeilijk om de soorten te vergelijken en een determinatiesleutel op te stellen. Aanvullende collecties zijn nodig om de onvolledigheden in de soortbeschrijvingen te kunnen invullen en om te evalueren of de huidige soortbeschrijvingen juist en verdedigbaar zijn.

