

Fenotypische plasticiteit en nomenclatuur van Melkviooltje (*Viola stagnina* – *V. persicifolia* nom. ambig. propos.)

Kevin van den Hof^{1*}, Thomas Marcussen², Ronald (R.G.) van den Berg³, Eddy (E.J.) Weeda⁴ & Barbara Gravendeel¹

1. Naturalis Biodiversity Center, Postbus 9514, 2300 RA Leiden
2. CEES, Department of Biology, University of Oslo, P.O. Box 1066, Blindern, NO 0316 Oslo, Noorwegen
3. Leerstoelgroep Biosystematiek - Wageningen UR, Generaal Foulkesweg 37, 6703 BL Wageningen
4. Alterra, Droevendaalsesteeg 3, Postbus 47, 6700 AA Wageningen

* Voor correspondentie: Kevin van den Hof, e-mail: k.van.den.hof@rijkzwaan.nl

Fenotypische plasticiteit en nomenclatuur van Melkviooltje (*Viola stagnina* – *V. persicifolia* nom. ambig. propos.)

De taxonomie van *Viola stagnina* (Melkviooltje) is bestudeerd met behulp van elektronenmicroscopisch onderzoek, een transplantatie-experiment, kruisingen en chromosoomtellingen. Uit de analyses blijkt dat de hoogte van de planten, bladkleur, grootte en vorm van de steunblaadjes en vorm van de stijl veel fenotypische variatie vertoont tussen de twee vormen van *V. stagnina* die binnen Nederland voorkomen, te weten var. *stagnina* (Veenmelkviooltje) en var. *lacteoides* (Heidemelkviooltje). Het door ons uitgevoerde transplantatie-experiment laat zien dat een aantal van deze kenmerken beïnvloed wordt door abiotische factoren zoals licht en vochtigheid. Er zijn echter ook kenmerken zoals lengte van de bladsteel en bladschijf die significant van elkaar blijven verschillen onder gelijke omstandigheden en dus veroorzaakt worden door genetische differentiatie. Een kruisingsexperiment toont aan dat planten bestoven met pollen van de andere vorm nog steeds levensvatbare zaden opleveren, hetgeen ook verwacht mag worden bij kruising van taxa die nog tot dezelfde soort behoren. Er werd ook geen verschil in het aantal chromosomen gevonden. Op basis van al eerder gevonden genetische en morfologische verschillen en de uitkomsten van de hier gepresenteerde gegevens vinden we dat de endemische vorm van *V. stagnina* als aparte variëteit *lacteoides* erkend moet blijven worden. Voor de taxonomische status van aparte (onder)soort verschillen de twee vormen nog te weinig en overlappen ze geografisch te veel.

INTRODUCTIE

Melkviooltje (*Viola stagnina* Kit. ex Schult., syn. *V. persicifolia* auct. non Schreb.) is een wijd verspreide, maar zeldzame plantensoort, die in heel Europa voorkomt met uitzondering van het mediterrane en (sub)arctische gebied, en zuidoostelijk deel van Europa.¹ Britse, Ierse, Belgische en Nederlandse populaties van Melkviooltje vormen de meest westelijke grens van het verspreidingsgebied. In Nederland is Melkviooltje met name te vinden in de Rijndelta en de IJsselvallei. In totaal zijn er nog elf vindplaatsen bekend in Nederland waar Melkviooltje voorkomt. In België beschouwt men Melkviooltje zo goed als uitgestorven.²

Phenotypic plasticity and nomenclature of *Viola stagnina* (*V. persicifolia* nom. ambig. propos.)

Kevin van den Hof^{1*}, Thomas Marcussen², Ronald (R.G.) van den Berg³, Eddy (E.J.) Weeda⁴ & Barbara Gravendeel¹

1. Naturalis Biodiversity Center, Postbus 9514, 2300 RA Leiden
2. CEES, Department of Biology, University of Oslo, P.O. Box 1066, Blindern, NO 0316 Oslo, Noorwegen
3. Leerstoelgroep Biosystematiek - Wageningen UR, Generaal Foulkesweg 37, 6703 BL Wageningen
4. Alterra, Droevendaalsesteeg 3, Postbus 47, 6700 AA Wageningen

* For correspondence: Kevin van den Hof, e-mail: k.van.den.hof@rijkszwaaan.nl

Phenotypic plasticity and nomenclature of *Viola stagnina* (*V. persicifolia* nom. ambig. propos.)

In this study, we provide additional evidence for the taxonomic delimitation of *Viola stagnina* based on a scanning electronic microscope study, a common garden experiment, a crossing experiment and chromosome counts. Plant height, leaf color, stipule size and shape, and differences in stigma shape all display large phenotypic plasticity among var. *stagnina* and var. *lacteoides*, the two varieties of *V. stagnina* occurring in the Netherlands. These characters are influenced by abiotic factors such as light and humidity. However, differences in petiole length and lamina size remained present during the experiment, probably due to a genetic basis. A crossing experiment and chromosome count provided evidence that the two varieties are not reproductively isolated. Based on other studies demonstrating morphological and genetic differences, and the new results presented here, we conclude that the endemic var. *lacteoides* deserves the taxonomic status of a separate variety. In our opinion, it cannot yet be considered a separate (sub)species as geographical and morphological differences with var. *stagnina* are still too subtle.

INTRODUCTION

The European Fen Violet (*Viola stagnina* Kit. ex Schult., syn. *V. persicifolia* auct. non Schreb.) is a widespread but rare plant species, occurring throughout Europe with the exception of the Mediterranean, the southeast and extreme north.¹ Populations of *V. stagnina* from Great Britain, Ireland, Belgium and the Netherlands lie on the western margin of the species' distribution range. In Belgium, the species is considered to be nearly extinct.² In the Netherlands, *V. stagnina* is known from several localities in the Rhine delta and IJssel valley. Today, only eleven Dutch localities are known where *V. stagnina* still occurs.

Melkviooltje is een pionierssoort met een voorkeur voor natte en tijdelijke onder water gelopen gebieden met veel licht, zoals moerasachtige gebieden en overstromingsgebieden van beken en rivieren.³⁻⁵ In voedselrijke gebieden kan Melkviooltje zich alleen handhaven als er regelmatig verstoring plaatsvindt.^{5 6} De soort komt zowel op basische als zure grondtypen voor en is erg gevoelig voor droogte. Het draineren van landbouwgrond en kanaliseren van beekjes en rivieren heeft in grote delen van Europa tot een sterke afname van Melkviooltje geleid.⁴

Melkviooltje behoort tot sect. *Viola* subsect. *Rostratae* (Kupffer) W.Becker. Binnen deze subsectie vormt Melkviooltje, samen met de soorten *Viola canina* L. (Hondsviooltje), *V. elatior* Fries (Hoog viooltje), *V. lactea* Sm. (Echt melkviooltje) en *V. pumila* Chaix, de serie *Arosulatae* (Borbás) V.I.V.Nikitin. Al deze soorten komen voor in overstromingsgebieden en worden alleen gekenmerkt door de afwezigheid van een basale bladrozet. In Nederland komen alleen Melkviooltje en Hondsviooltje voor, maar in België kunnen, met uitzondering van *V. elatior*, ook de andere soorten van deze serie gevonden worden.

Morfologische en cytologische studies hebben uitgewezen dat Melkviooltje als paleotetraploïd ($2n = 20$) betrokken is geweest bij het ontstaan alle andere polyploïde soorten van de serie *Arosulatae*.⁸ *Viola elatior* ($2n = 40$) is een autopolloïd van Melkviooltje ($2n = 20$).^{7 8} *Viola canina* ($2n = 40$), *V. lactea* ($2n = 58$) en *V. pumila* ($2n = 40$) zijn allopolloïden. Melkviooltje als één van de ouders waarschijnlijk betrokken is geweest bij de vorming van deze allopolloïden.⁸⁻¹⁰

Een recente genetische studie heeft uitgewezen dat *Viola lactea*, die in morfologisch en ecologisch opzicht sterk lijkt op Melkviooltje, minder verwant is met Melkviooltje dan in eerste instantie werd aangenomen.⁸ Een fylogenetische analyse van de *Chalcone Synthase*-genfamilie heeft uitgewezen dat *V. lactea* nauwer verwant is met *V. canina*, terwijl Melkviooltje op basis van deze analyse juist meer verwantschap toont met *V. pumila*. Deze fylogenetische resultaten bevestigden de reeds eerder gedane observaties met betrekking tot grootte en vorm van de chromosomen en de chromosoomparing tijdens de meiose van de viooltjes in kwestie.^{10 11}

In veel Europese Flora's, inclusief de Flora van België¹² en Heukels' Flora¹³ van Nederland, krijgt Melkviooltje de wetenschappelijke naam *Viola persicifolia* Schreb. Een nomenclatuuronderzoek heeft echter uitgewezen, dat deze wetenschappelijk naam refereert aan *V. elatior*, en niet aan Melkviooltje.¹⁴ Om deze reden is daarom voorgesteld de naam *V. persicifolia* officieel te verwerpen.¹⁵ In deze publicatie wordt daarom de eenduidige naam *V. stagnina* gebruikt als wetenschappelijke naam van Melkviooltje.

In Nederland zijn twee vormen van Melkviooltje beschreven, Veenmelkviooltje (var. *stagnina*) en Heidemelkviooltje (var. *lacteoides* W.Becker & Kloos). Deze laatste vorm werd lange tijd verward met *V. lactea* Sm.¹⁶ Echter, nadat Kloos (op. cit.) de Duitse Viooltjes-expert Becker had geraadpleegd, kwamen zij samen tot de conclusie dat exemplaren van Heidemelkviooltje niet tot *V. lactea* behoorden, maar dat het een nieuwe vorm van Melkviooltje betrof die endemisch is voor Nederland. Ze doopten deze vorm *V. persicifolia* var. '*lacteaeoides*' W.Becker & Kloos.¹⁶ De variëteit werd uiteindelijk door Kloos voor het eerst opgenomen in de Geïllustreerde Flora van Nederland.¹⁷

In 1927 werd Heidemelkviooltje voor het eerst in de Heukels' Schoolflora voor Nederland¹⁸ opgenomen. Nederlandse botanici na Kloos twijfelden echter aan de onderverdeling van Melkviooltje in twee infraspecifieke taxa en daarom kwam de variëteit Heidemelkviooltje niet meer voor in de daarop volgende edities van de Heukels' Flora.

Viola stagnina is a pioneer species favouring wet and temporarily flooded, sunny habitats such as floodplains, fens and marshes.^{3–5} In nutrient rich environments, it needs regular disturbance to successfully compete with other plant species.^{5–6} The species can grow on both basic and acidic soil types and is very sensitive towards drought. The drainage of wetlands and canalisation of rivers and brooks have led to a strong decline of *V. stagnina* in many parts of Europe.⁴

Viola stagnina is a member of sect. *Viola* subsect. *Rostratae* (Kupffer) W.Becker, and belongs to a small group of floodplain *Viola* species characterized by the lack of a basal leaf rosette frequently referred to as series *Arosulatae* (Borbás) V.I.V.Nikitin. *Viola canina* L., *V. elatior* Fries, *V. lactea* Sm., and *V. pumila* Chaix are the other members of the *Arosulatae* series, of which *V. canina* and *V. lactea* can also be found in Belgium. In the Netherlands, the arosulate violets are only represented by *V. canina* and *V. stagnina*.

Morphological, cytological and molecular studies have pointed out that *V. stagnina*, as a paleotetraploid ($2n = 20$), was involved in the polyploid origins of all the other arosulate species, i.e. by autopolyploidy in *V. elatior* ($2n = 40$)^{7–8} and by allopolyploidy in *V. canina* ($2n = 40$), *V. pumila* ($2n = 40$) and *V. lactea* ($2n = 58$).^{8–10}

A recent genetic study revealed that the morphologically and ecologically closely resembling species *Viola lactea* is only distantly related to *V. stagnina*.⁸ Phylogenetic analyses of Chalcone Synthase sequences showed *V. lactea* to be much closer related to *V. canina*. *Viola stagnina* was found to be most closely related to *V. pumila*. These results confirmed earlier observations on shared sizes, shapes and pairing of chromosomes.^{10–11}

In many European Flora's, including the latest editions of the Floras of Belgium, Luxemburg, France, and the Netherlands^{12–13}, *Viola stagnina* is listed under the name *V. persicifolia* Schreb. However, a nomenclatural study¹⁴ has shown that this name should be interpreted as referring to *V. elatior*. The name *V. persicifolia* is therefore proposed for rejection.¹⁵ In the present publication we use the unambiguous name *V. stagnina*.

For the Netherlands, two varieties of *Viola stagnina* have been described, i.e. var. *stagnina* and var. *lacteoides* W.Becker & Kloos. This second variety was long held to belong to the related *V. lactea* Sm.¹⁶ Kloos (op. cit.) was the first to identify it with *V. stagnina* and, after having consulted the German *Viola* expert W. Becker, Kloos and Becker concluded that Kloos' specimens did not belong to *V. lactea*, but to a new variety of *V. stagnina* being endemic to the Netherlands, which they named *V. persicifolia* var. '*lacteaeoides*' W.Becker & Kloos.¹⁶ In 1924, Kloos included this variety in Heimans et al.'s Geïllustreerde Flora van Nederland.¹⁷

In 1927, *Viola stagnina* var. *lacteoides* was mentioned for the first time in Heukels' Schooflora voor Nederland.¹⁸ Dutch botanists after Kloos, however, doubted the subdivision of *V. stagnina* into two infraspecific taxa and in the following editions of this Flora, the varieties were omitted until the 19th edition in 1977, in which they reappeared as separate subspecies.¹⁹ In the addenda, Den Held described subsp. *lacteoides* as having a straight stigma, as opposed to hooked in subsp. *stagnina*, and as having a spur exceeding the appendices of the calyx, while remaining enveloped in subsp. *stagnina*. In the following edition of this Flora²⁰, however, it was remarked that the taxonomy of the species was under investigation and that the infraspecific taxa within *V. stagnina* were provisionally treated as varieties until further notice, while in the subsequent edition²¹, the differences were considered too small again to warrant even infraspecific recognition.

In de editie van 1977, de negentiende¹⁹, maakte het taxon zijn rentree, dit keer als ondersoort. Den Held beschreef ondersoort *lacteoides* in de addenda en onderscheidde deze op basis van de vorm van de stigma en de lengte van de spoor ten opzichte van de kelkaanhangsels. De stigma van ondersoort *lacteoides* zou recht zijn, terwijl de stigma van *stagnina* gebogen zou zijn. Daarnaast zou de spoor van *lacteoides* voorbij de kelkaanhangsels uitsteken, waar deze er bij *stagnina* tussen verborgen blijft. In de daarop volgende edities van de Heukels' Flora werd de taxonomische status van Heidemelkviooltje wederom in twijfel getrokken. In de twintigste editie²⁰ werd Heidemelkviooltje weer als een variëteit in plaats van een ondersoort beschouwd, en in de éénnentwintigste editie werd vanwege de geringe morfologische verschillen tussen beide taxa zelfs in zijn geheel getwijfeld aan een onderverdeling van Melkviooltje in infra-specifieke taxa.²¹

Weeda^{4 22} verschilde duidelijk met Van der Meijden²¹ van mening en pleitte in twee artikelen over Melkviooltje in Nederland^{4 22} juist voor het onderscheiden van twee infraspecifieke taxa. Zijn opvatting was enerzijds gebaseerd op de waarnemingen van Kloos en Den Held en anderzijds op het geografische verspreidingspatroon van de twee vormen van Melkviooltje (Fig. 1). Veenmelkviooltje komt voor in het Holocene deel van Nederland, en dan voornamelijk in overstromingsgebieden van rivieren en beken. Het verspreidingsgebied van Heidemelkviooltje ligt voornamelijk in het Pleistocene deel van Nederland, waar het taxon voornamelijk wordt aangetroffen in de IJsselvallei op relatief droge standplaatsen op laag geleden heideterreinen op klei en veenachtige grond.²²

In afwachting van de resultaten van de huidige studie en vanwege de voorlopige uitkomsten van het hieronder beschreven transplantatie-experiment heeft Van der Meijden in zijn laatste editie van de Heukels' Flora¹³ Heidemelkviooltje wederom als variëteit opgenomen.

De discussie die bestaat tussen botanici over de taxonomische status van Heide- en Veenmelkviooltje hebben Van den Hof et al.²³ proberen te slechten met behulp van DNA-fingerprinting technieken en een analyse van macromorfologische kenmerken van de twee vormen van Melkviooltje en nauw verwante soorten. Zij kwamen tot de conclusie dat de twee vormen van Melkviooltje de taxonomische status van variëteit verdienen.

Met de huidige studie worden aanvullende bewijzen hiervoor geleverd door: (1) de fenotypische plasticiteit van (micro)morfologische kenmerken te analyseren in een transplantatie-experiment, (2) de infraspecifieke compatibiliteit te bestuderen aan de hand van infraspecifieke kruisingen en (3) een chromosoomtelling uit te voeren. In de Melkviooltje-literatuur na de publicatie van de wetenschappelijke variëteitnaam van Heidemelkviooltje door Kloos¹⁷ is het epiteton van die wetenschappelijke naam op verschillende manieren gespeld, daarom is ook de nomenclatuur van Heidemelkviooltje bestudeerd.

→

Fig. 1. Verspreiding van *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof (Heidemelkviooltje, ■) and *V. stagnina* Kit. ex Schult. var. *stagnina* (Veenmelkviooltje, ●) in Nederland na 1980. Het kaartje is gebaseerd op gegevens van FLORON.

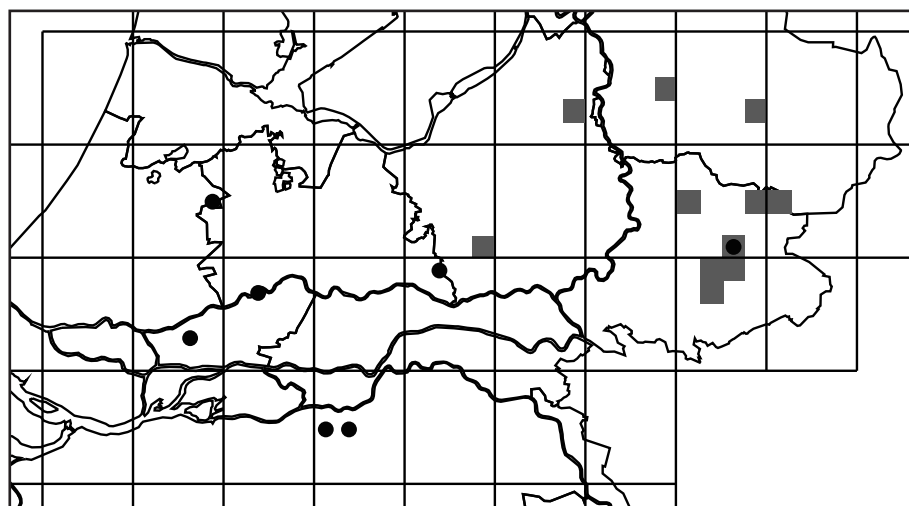
Fig. 1. Distribution of *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof (■) and *V. stagnina* Kit. ex Schult. var. *stagnina* (●) in the Netherlands since 1980 based on FLORON data.

Weeda^{4 22} devoted two papers to *Viola stagnina* in the Netherlands. He pleaded for a subdivision of the species into two varieties based on the morphological differences mentioned by Kloos¹⁶ and Den Held.¹⁹ Weeda also alluded to the different geographical distributions with only a small overlap (Fig. 1) further supporting such subdivision. *Viola stagnina* var. *stagnina* is found in the Holocene part of the Netherlands where it grows mainly in fen meadows and on the floodplains of river and brook valleys. The main distribution of var. *lacteoides*, on the other hand, is restricted to the Pleistocene part of the Netherlands, where it is mainly found in the valley of the River IJssel, where it occurs on the lower parts of wet heathlands on loamy and peaty soil.²²

In anticipation of the present study and based on preliminary results of the common garden experiment that is described here, Van der Meijden reinstated the two varieties again in his last edition of Heukels' Flora.¹³

Van den Hof et al.²³ intended to settle the ongoing debate among Dutch botanists about the taxonomic status of the two *Viola stagnina* morphs by employing the DNA fingerprinting technique AFLPs and by studying macromorphological characters of *V. stagnina* and its closest relatives. They concluded that there are indeed two different morphs of *V. stagnina* present in the Netherlands, which can best be recognised as varieties.

In this paper, we provide additional evidence for the fact that we are dealing with two separate varieties of *Viola stagnina* by (1) studying phenotypic plasticity of several additional (micro)morphological characters in a common garden experiment, 2) by testing infraspecific compatibility by means of an infraspecific cross, and 3) by carrying out chromosome counts. In the publications after Kloos' first description, the epithet of the *lacteoides* variety was spelled in many different ways. We therefore investigated the nomenclature of this variety as well.



MATERIAAL EN METHODEN

Bloemmorfologie

Volledig ontwikkelde bloemen werden gefixeerd in FAA (18:1:1 mengsel van ethanol (50%), azijnzuur, formaline). Monsters werden gedehydrateerd met behulp van alcohol en vervolgens gedroogd met een Balzers CPD 030 kritisch punt droger. De gedroogde preparaten werden gecoat met platina in een BAL-TEC SCD 005 sputter coater en vervolgens bestudeerd met een JEOL JSM-5300 Scanning Electronen Microscoop (SEM). Van beide Melkviooltje-variëteiten zijn digitale foto's gemaakt van de spoor en stijl.

Transplantatie-experiment

Om na te gaan of vegetatieve kenmerken zoals de lengte van de steunblaadjes, bladstelen, bladgrootte en -kleur in Melkviooltje door de omgeving bepaald worden of een genetische basis hebben, werd een transplantatie-experiment uitgevoerd. In totaal werden zes jonge planten van beide Melkviooltje-variëteiten verzameld in de lente van 2008. Exemplaren van Heidemelkviooltje werden verzameld in het Kienveen, een terrein nabij Zutphen. De exemplaren van Veenmelkviooltje waren afkomstig uit de Bennekomse Hooilanden, een terrein in de buurt van Wageningen. Deze vindplaatsen werden uitgekozen, omdat (1) exemplaren van beide terreinen duidelijk te identificeren waren als behorend tot één van de twee vormen en (2) beide populaties relatief groot waren. De verzamelde planten werden onder gecontroleerde condities verder opgekweekt in Leiden. De planten groeiden op onder normale lichtcondities en stonden op een substraat van turf, grond en zand. De gemiddelde temperatuur was 20 °C. Metingen aan bladgrootte, bladsteellengte en de lengte van de steunblaadjes werden na zeven maanden uitgevoerd met behulp van een schuifmaat.

Levensvatbaarheid van de zaden

Planten van beide variëteiten werden bestoven met pollen van de andere variëteit om te zien of dit levensvatbare zaden zou opleveren. Na handmatige bestuiving in het veld werden de planten afgeschermd om bestuiving door middel van insecten te voorkomen. Na zes weken werden alle doosvruchten verzameld. De zaden uit deze doosvruchten werden gekleurd door ze vijf dagen te weken in een oplossing van 50% melkzuur. Zaden met een embryo werden als levensvatbaar gescoord.

Chromosoomtellingen

Vers geoogste worteltopjes van Heidemelkviooltje werden 24 uur lang gefixeerd in een Carnoy-oplossing (ethanol (99,9%) en azijnzuur (99,7%) in een verhouding van 3:1). Na fixatie werden de worteltopjes overgebracht in een aceto-carmin oplossing en kort gekookt. Na kleuring werd de mitose van de cellen in de worteltopjes bestudeerd met behulp van een licht microscoop (LM) met een 1000× vergroting.

MATERIAL AND METHODS

Flower morphology

Fully developed flowers were fixed in FAA (18:1:1 mixture of ethanol (50%), acetic acid, formalin). Samples were dehydrated through ethanol series and subsequently dried with a Balzers CPD 030 critical point drier. Dried samples were mounted, sputter-coated with platinum in a BAL-TEC SCD 005 cool sputter coater and observed with a JEOL JSM-5300 Scanning Electronic Microscope (SEM). Spurs and stylar heads of both varieties of *V. stagnina* were digitally photographed.

Common Garden experiment

To investigate whether vegetative characters such as stipule length, petiole length, lamina size and lamina colour are environmentally or genetically controlled in *Viola stagnina*, a common garden experiment was carried out. A total of six seedlings from both varieties of *V. stagnina* were collected in spring 2008. Individuals of var. *lacteoides* were gathered in Kienveen, a locality near Zutphen (Province of Overijssel). Individuals of var. *stagnina* were gathered from the Bennekomse Hooilanden near Wageningen (Province of Gelderland). Both sites were chosen, because (1) individuals could be clearly identified as belonging to either one of the varieties and because (2) at both localities a relatively large population was present. The seedlings harvested were transplanted to an indoor nursery and grown under moderate light conditions in a substrate containing peat, forest soil, and sand. The mean temperature at this nursery was 20 °C. Measurements on lamina size, petiole length, and stipule length were made after seven months on fresh leaves using calipers. In total, three plants per population were measured.

Seed viability

Manual cross pollinations were carried out between both *Viola stagnina* varieties in order to determine whether cross pollinated plants could produce viable seeds. After manual pollination in the field, the plants were bagged to prevent additional pollination by insects. This was done with individuals from both varieties and with reciprocal crossings. After six weeks, all resulting seed capsules were harvested. Seeds were stained by macerating them in a 50% lactic acid solution for five days. Viability was assumed when seeds contained an embryo.

Chromosome counts

Freshly harvested root tips of *V. stagnina* var. *lacteoides* plants were fixated in a Carnoy solution (3:1 solution of ethanol (99.9%) and acetic acid (99.7%), respectively) for at least 24 hours. After fixation, the root tips were transferred to an aceto-carmin solution and shortly boiled. After staining, mitosis of cells in the root tips was observed using Light Microscopy (LM) at 1000× magnification.

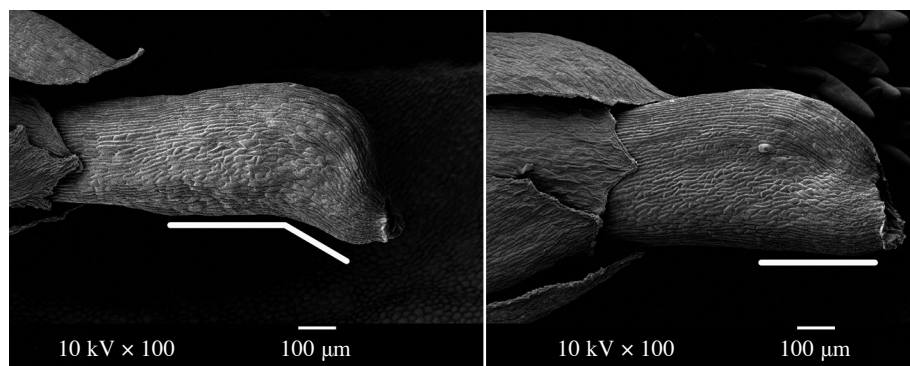


Fig. 2. SEM foto's van het stigma van een open bloem van *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *stagnina* (Veenmelkviooltje; rechts) en *V. stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof (Heidemelkviooltje; links). De witte lijnen geven een indicatie van de mate van kromming. Foto's: Bertie Joan van Heuven, Naturalis.

Fig. 2. SEM pictures of the stigma of a mature flower of *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *stagnina* at the right, and *V. stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof at the left. The white lines indicate the amount of curving. Photographs by Bertie Joan van Heuven, Naturalis.

RESULTATEN

Bloemmorfologie

In de SEM-foto's van de volledig ontwikkelde bloemen is te zien dat de vorm van het stigma en lengte van de spoor binnen beide variëteiten variatie vertonen. Exemplaren van beide variëteiten bleken zowel bloemen met een gebogen stigma als bloemen met een rechte stigma te hebben, waarbij de stigma binnen dezelfde plant bovendien zowel kaal als behaard kon zijn (Fig. 2). De spoorlengte varieerde tussen de 4,5–9,5 mm voor Heidemelkviooltje en 4,0–9,0 mm voor Veenmelkviooltje. Dit laat zien dat er een overlap van 90% bestaat tussen beide variëteiten. De kelkaanhangsels daarentegen waren significant langer bij exemplaren van Veenmelkviooltje, waardoor de spoor minder uitstak dan bij exemplaren van Heidemelkviooltje.

Transplantatie-experiment

Blijvende verschillen in bladkleur tussen Heide- en Veenmelkviooltje werden niet waargenomen in het transplantatie-experiment. De bladen van Veenmelkviooltje werden donkerder, terwijl die van Heidemelkviooltje juist lichter werden. Ondanks het feit dat planten van beide variëteiten veel groter werden dan normaal het geval is onder natuurlijke omstandigheden in het veld, bleven beide variëteiten van elkaar verschillen in bladsteellengte en de grootte van de bladschijf (Fig. 3). Het verschil in lengte van de steunblaadjes tussen beide variëteiten verdween.



Fig. 3. Planten van *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *stagnina* (Veenmelkviooltje; links) en *V. stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof (Heidemelkviooltje; rechts) uit het transplantatie-experiment. De verschillen in bladsteellengte en bladschijfgrootte van de middelste en bovenste bladen tussen beide variëteiten zijn duidelijk zichtbaar. Foto: Kevin van den Hof, Naturalis.

Fig. 3. Plants of *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *stagnina* (left) en *V. stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof (right) from the Common Garden experiment. The differences in petiole length and lamina size of the middle and upper stem leaves between the two varieties are clearly visible. Photograph by Kevin van den Hof, Naturalis.

RESULTS

Flower morphology

SEM pictures of fully developed flowers of both varieties of *V. stagnina* revealed that stigma shape and spur length, contrary to Den Held's observations¹⁹, were variable within each variety. Individuals of both varieties had stigmas that were either hooked or straight (Fig. 2) and both glabrous and papillose stigmas. Spur length varied between 4.5–9.5 mm for var. *stagnina* and 4.0–9.0 mm for var. *lacteoides*, thus showing an overlap of 90%. The fully developed sepal appendages, on the other hand, were found to be significantly longer in var. *stagnina* so that its spur exceeds less as compared with *lacteoides*.

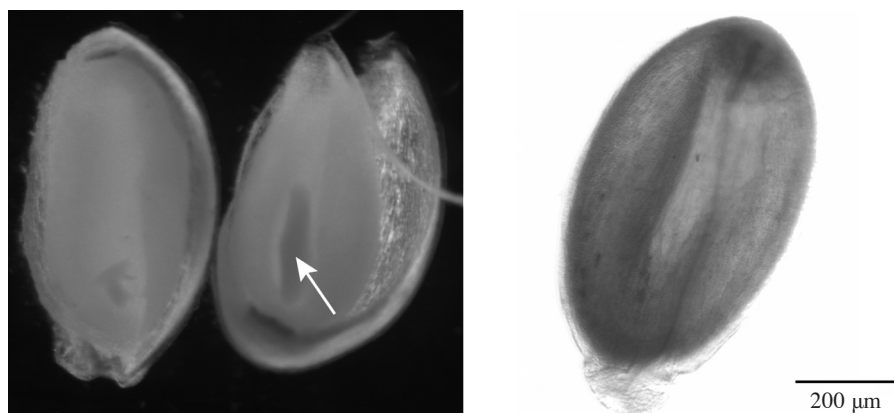


Fig. 4. LM foto's van zaden van de F1 die voortkwam uit een kruising tussen *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof (Heidemelkviooltje) en *V. stagnina* Kit. ex Schult. var. *stagnina* (Veenmelkviooltje). A. Dit zaad werd als niet levensvatbaar beschouwd omdat het geen embryo bevatte. B. Dit zaad werd als levensvatbaar beschouwd omdat het een embryo bevatte (aangegeven met een witte pijl). C. Dit zaad was niet levensvatbaar. Foto's: Bertie Joan van Heuven, Naturalis.

Fig. 4. LM pictures of seeds of F1 crosses between *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof and *V. stagnina* Kit. ex Schult. var. *stagnina*. A. This seed was cut in half and is aborted as it lacks an embryo; B. This seed is viable and contains an embryo (indicated with a white arrow); C. This seed is hollow and thus aborted. Photographs by Bertie Joan van Heuven, Naturalis.

Levensvatbaarheid van de zaden

In totaal werden 62 zaden verzameld van de kruisbestoven Heidemelkviooltjes, waarvan 59 levensvatbaar waren (95,2%). Van de kruisbestoven exemplaren van Veenmelkviooltje werden 118 zaden geoogst, waarvan er 11 levensvatbaar waren (9,1%) (Fig. 4).

Chromosoomtellingen

Er kon niet één cel gevonden worden in het worteltopmateriaal van Heidemelkviooltje waarin chromosomen dusdanig in het equatorvlak lagen dat ze gefotografeerd of geteld konden worden. Door meerdere cellen in de metafase van de mitose te bestuderen van verschillende worteltopjes kon echter worden vastgesteld dat Heidemelkviooltje hetzelfde chromosoomaantal heeft als Veenmelkviooltje, namelijk $2n = 20$.^{9 10}

DISCUSSIE

Bloemmorfologie

In tegenstelling tot Den Held's bevindingen¹⁹ blijkt uit deze studie dat de stigmavorm te variabel is om te gebruiken als onderscheidend kenmerk tussen de twee vormen van Melkviooltje. In exemplaren van zowel Heide- als Veenmelkviooltje werden zowel

Common Garden experiment

Differences in lamina colour and plant height between both varieties of *V. stagnina* disappeared in the common garden experiment. The leaves of var. *stagnina* became darker, while those of var. *lacteoides* became lighter. Although plants from both varieties grew much bigger than usually observed in the field, the initial differences in petiole length and lamina size remained present (Fig. 3). Stipules of both varieties, however, became much more reduced compared to those of plants in the wild and initial length differences disappeared.

Seed viability

In total, 62 seeds were gathered from the cross-pollinated plants of var. *lacteoides*, of which 59 were considered to be viable (95.2%). The cross-pollinated var. *stagnina* plants yielded 118 seeds, of which 111 were considered to be viable (94.1%) (Fig. 4).

Chromosome counts

We could not find a single good cell in which all chromosomes were nicely aligned at the equatorial plane in such a way that the chromosomes could be easily counted or even photographed. However, by examining multiple cells in the metaphase stage of mitosis in different root tips, we were able to determine that *Viola stagnina* var. *lacteoides* has $2n = 20$ chromosomes just like *V. stagnina* var. *stagnina*.^{9 10}

DISCUSSION

Flower morphology

In contrast to Den Held's findings, we consider the stigma shape too variable in both varieties of *Viola stagnina* to be useful as a discriminating character. In individuals of both varieties straight as well as hooked stigmas occur. Presumably, the occasional presence of hooked stigmas in chasmogamous flowers is attributed to transitions towards cleistogamous flowers, which are self-pollinating and occur later in the season in both varieties. By delayed bending, the stigma may come into contact with pollen released from the anthers and laying scattered on the petals.^{24 25} Another floral character that has been used to distinguish between *Viola* species is the indument of the style. This character is, for instance, used to distinguish between *V. laricicola* Marcussen and *V. riviniana* Rchb.²⁶ *Viola laricicola* has a densely papillose stigma, while *V. riviniana* has a more or less glabrous stigma. In both *V. stagnina* varieties, however, papillose and glabrous styles were found.

The only floral characters that differ significantly between both varieties are quantitative. The lateral and ventral petals of var. *lacteoides* are narrower than those of var. *stagnina*. The fully developed sepal appendages are significantly longer in var. *stagnina* so that the spur remains enveloped in the appendages. The difference in length of the sepal appendages between var. *lacteoides* and var. *stagnina* is probably not caused by a shift in pollinator preference, because the spur length itself does not significantly differ between the two varieties. The spurred flower of most *Viola* species is adapted to a wide array of pollinating insect species with intermediate and long tongues.^{27 28} Although

rechte als gebogen stigma's aangetroffen. De aanwezigheid van gebogen stigma's kan wellicht worden toegeschreven aan de overgang van chasmogame bloemen naar cleistogame bloemen, welke zelfbestuivend zijn en in beide vormen van Melkviooltje later in het seizoen voorkomen. Door het vertraagd krom trekken van de stigma kan deze in contact komen met pollen die reeds uit de antheren is gevallen en op de kroonbladen ligt.^{24 25} Een ander bloemmorfolologisch kenmerk dat gebruikt wordt om *Viola*-soorten te onderscheiden is de beharing van de stijl. Zo worden bijvoorbeeld aan de hand van dit kenmerk *V. laricicola* Marcussen en *V. riviniana* Rchb. (Bleeksporig bosviooltje) van elkaar onderscheiden.²⁶ *Viola laricicola* heeft een dichtbehaarde stijl, terwijl de stijl van *V. riviniana* zo goed als kaal is. In exemplaren van beide vormen van Melkviooltje werden echter zowel kale als behaarde stijlen aangetroffen.

In Melkviooltje zijn wel kwantitatieve kenmerken in de bloemmorfologie waargenomen die significant verschillend zijn voor de twee vormen. Zo zijn de zijdelingse en onderste kroonbladen van Heidemelkviooltje significant kleiner dan die van Veenmelkviooltje. Verder zijn de kelkaanhangsels van volledig ontwikkelde bloemen van Veenmelkviooltje significant langer dan de kelkaanhangsels van Heidemelkviooltje. De spoor steekt daardoor bij Heidemelkviooltje verder uit dan bij Veenmelkviooltje, waardoor de schijn wordt gewekt dat de spoor van het Heidemelkviooltje groter is. Het lengteverschil van de kelkaanhangsels tussen beide vormen wordt zeer waarschijnlijk niet veroorzaakt door andere bestuivers, omdat de spoorlengte zelf niet significant verschillend is tussen de beide vormen van Melkviooltje. Het is waarschijnlijker dat verschillen in abiotische factoren, gekoppeld aan de verschillende habitats waarin de twee vormen voorkomen, de differentiatie veroorzaakt. Een alternatieve hypothese is, dat beide vormen in de tijd gedeeltelijk van elkaar geïsoleerd zijn geraakt, waardoor actieve genetische differentiatie willekeurige morfologische differentiatie heeft veroorzaakt. Niet alle morfologische veranderingen zijn het gevolg van gerichte selectie en het milieu kan daar ook invloed op hebben.³³ Het is zeker mogelijk dat neutrale fenotypische differentiatie tussen beide vormen Melkviooltje heeft plaatsgevonden sinds deze vormen van elkaar geïsoleerd zijn geraakt, waardoor slechts kleine verschillen in bloemmorfologie genetisch zijn gefixeerd.

Transplantatie-experiment

Bladen zijn tijdens hun ontwikkeling erg gevoelig voor lichtintensiteit.²⁹ Lichtintensiteit wordt daarom gezien als een belangrijke factor in de totstandkoming van de uiteindelijke bladvorm. Verschillen in bladvorm tussen zon- en schaduwbladeren zijn doorgaans groot³⁰ en vele studies laten zien dat er een fundamenteel verschil in functie is tussen beide type bladen. Verschillen in planthoogte, bladkleur en lengte van de steunblaadjes die normaal worden waargenomen tussen beide vormen van Melkviooltje verdwenen in het transplantatie-experiment. Deze eigenschappen tonen een grote mate van fenotypische plasticiteit, wat wil zeggen dat milieuomstandigheden deze eigenschappen sterk beïnvloeden. De verschillen in bladsteellengte en bladschijfgrootte tussen de twee variëteiten (Fig. 3) verdwenen echter niet. Dit duidt erop, dat deze kenmerken juist door een sterke genetische component waren beïnvloed en in veel mindere mate milieu afhankelijk zijn.

pollinators of *V. stagnina* have never been studied, it is unlikely that this species has developed a very specialised pollinator preference, because its flower morphology is very similar to those of other *Viola* species adapted to a variety of pollinating insects.^{27 28} Hence, the differentiation between the two varieties is probably not caused by a shift in pollinators, but by environmental factors linked to the different habitats. As an alternative hypothesis, var. *lacteoides* and var. *stagnina* could be considered at least partially isolated, which means that some populations may have started to differ from each other morphologically as they could no longer exchange genetic material, and ‘random’ morphological differentiation could be presently accumulating as a result of this partial isolation. Not all morphological changes require a directional or selectionistic argument, nor do they need to have a purely environmental basis.³³ It is certainly possible that neutral phenotypic differentiation has been occurring since the first isolation event between the two varieties, with the result that modest floral differences or tendencies have become genetically fixed.

Common Garden experiment

Leaves are very responsive to the light intensities under which they develop²⁹ and the light regime is therefore an important factor determining final leaf shape. Differences observed between ‘sun’ and ‘shade’ leaves are usually large³⁰ and many studies demonstrate fundamental differences in form and function of sun and shade leaves. Differences in plant height, leaf colour and stipule length between both varieties of *V. stagnina* disappeared in our common garden experiment, which indicates that these characters are responsive to environmental conditions and display a large phenotypic plasticity. Differences in petiole length and lamina size (Fig. 3), however, remained present over time, indicating that these characters are probably determined genetically.

In a previous study by Bergdolt³¹, it is stated that leaf colour of several different *Viola* species is probably not influenced by abiotic factors, and that it can be considered as a good character for species recognition. However, in the same study he demonstrates that the abaxial side of *V. canina* leaves can become darker coloured under the influence of light. This is a common response in plants and may also occur in *V. stagnina*, being one of the progenitors of *V. canina*.

Specimens of *Viola stagnina* var. *stagnina* mostly grow on floodplains of rivers and brooks, or on lakeshores as is mostly the case in Scandinavia. In these environments, the plants are regularly flooded. Specimens of *V. stagnina* var. *lacteoides*, however, grow in wet heath lands, which are only flooded irregularly by rainfall. The soils in which plants of *V. stagnina* var. *lacteoides* plants grow are also sandier compared to the soils in which var. *stagnina* usually grows, making them more susceptible to drought. Plants of *V. stagnina* var. *lacteoides* are therefore more frequently exposed to periods of drought than var. *stagnina*, which may account for their smaller habit and thicker leaves.

Uit een studie van Bergdolt³¹ blijkt, dat de bladkleur van een aantal Viooltjes-soorten niet beïnvloed wordt door abiotische factoren en dat de bladkleur goed gebruikt kan worden om soorten te herkennen. Tegelijkertijd toont dezelfde studie aan, dat de abaxiale zijde (onderzijde) van bladeren van Hondsviooltje donkerder kunnen worden onder invloed van licht. Dit wordt vaak ook in andere soorten waargenomen en kan ook het geval zijn voor Melkviooltje, zeker aangezien het één van de voorouder-soorten van Hondsviooltje is.

Veenmelkviooltje komt voornamelijk voor in overstromingsgebieden van beken en rivieren en in natte weiden op klei en veen, maar ook op de oevers van meren, zoals dat meestal het geval is in Scandinavië. Planten van Veenmelkviooltje staan daarom regelmatig onder water. Heidemelkviooltje daarentegen komt voor in natte heideterreinen. Deze terreinen komen alleen onder water te staan als er sprake is van grote hoeveelheden neerslag. De bodem waarop Heidemelkviooltje voorkomt bestaat daarnaast voor een veel groter deel uit zand. Heidemelkviooltje moet daarom beter aangepast zijn aan periodes van droogte, wat er zeer waarschijnlijk toe heeft geleid dat deze vorm van Melkviooltje kleiner is en dikkere bladeren heeft.

Levensvatbaarheid van de zaden

De levensvatbaarheid van de zaden uit de infraspécifieke kruisingen liet zien dat de twee vormen van Melkviooltje niet reproductief geïsoleerd zijn van elkaar. Experimentele kruisingen tussen Melkviooltje en Hondsviooltje resulteerden ook in grote aantallen levensvatbare zaden. Uit deze zaden groeiden uiteindelijk goed ontwikkelde, maar volledig steriele planten.³² Hybriden tussen Melkviooltje en een aantal soorten van *Viola* subsect. *Rostratae* zijn waargenomen, maar ook deze waren steriel.¹⁰ Verder onderzoek met de F1 van de infraspécifieke kruising tussen Heide- en Veenmelkviooltje zal moeten uitwijzen of deze infraspécifieke hybriden steriel dan wel fertiel zijn. Het moet echter gezegd worden dat veel interspecifieke kruisingen binnen het geslacht *Viola* kiemkrachtig zaad opleveren. Het bestuderen van de kiemkracht van zaden die voortkomen uit de infraspécifieke kruisingen tussen de twee vormen Melkviooltje zal daarom waarschijnlijk minder inzichten geven in mogelijke reproductieve barrières dan een studie naar de vitaliteit van het pollen. Kleuringsexperimenten met pollen zullen daarom verder moeten uitwijzen of de twee vormen van Melkviooltje reproductief geïsoleerd zijn van elkaar. Daarnaast is gebleken dat hybriden tussen soorten binnen *V.* subsect. *Melanium* (Ging.) V.I. Nikitin en subsect. *Boreali-americanae* (W. Becker) Gil-ad over het algemeen fertiel zijn. Fertiliteit is daarom geen goed criterium om de taxonomische rang van de twee vormen van Melkviooltje op te baseren.

Chromosoom-aantallen

Het aantal chromosomen van Heidemelkviooltje ($2n = 20$) laat zien dat Kloos inderdaad gelijk had met zijn observatie dat het om een nieuwe vorm van Melkviooltje gaat en niet een vorm van *V. lactea* ($2n = 58$), zoals voorgangers van Kloos beweerden. Een nauwere verwantschap met andere arosulate Viooltjes-soorten is ook niet waarschijnlijk, omdat al deze soorten octoploid zijn ($2n = 40$).

Een alternatieve hypothese van Weeda, dat Heidemelkviooltje ($2n = 20$) het resultaat zou zijn van een kruising tussen Melkviooltje ($2n = 20$) en Hondsviooltje ($2n = 40$)

Seed viability

The viability of the seeds resulting from our infraspecific cross experiments indicate that both varieties of *Viola stagnina* are not reproductively isolated. Experimental crosses between *V. stagnina* and *V. canina* resulted in the production of many viable seeds as well. These interspecific hybrid seeds ultimately produced well developed but completely sterile plants.³² Hybrids of *V. stagnina* with various other species of subsect. *Rostratae* are known, but these are all sterile as well.¹⁰ Future research with F_1 plants resulting from a cross between var. *lacteoides* and var. *stagnina* is necessary to test the fertility of these infraspecific hybrids. It must be stated, however, that viable seeds occur in many interspecific hybrids of *Viola* (H. Ballard, personal communication). Seed viability, therefore, provides little insight into ‘fertility’ of crosses, i.e. not as much as pollen stainability usually does. A pollen stainability experiment should, therefore, be carried out as well to further investigate reproductive isolation.

It should be noted, however, that within certain *Viola* groups, e.g. subsect. *Melanium* (Ging.) V.I. Nikitin and the ‘acaulescent blue’ violets of subsect. *Boreali-americanae* (W. Becker) Gil-ad, interspecific hybrids can be predominately fertile, although their parents are utterly different morphologically and are regarded by everybody as fully distinct species. Fertility by itself should not be used as the sole criterion for determining the taxonomic rank of plants.

Chromosome counts

The chromosome number of *Viola stagnina* var. *lacteoides* ($2n = 20$) indicates that Kloos’ observation that this taxon is a new variety of *V. stagnina*, instead of one of *V. lactea* ($2n = 58$) as previous botanists assumed, is correct. A closer relationship with other arosulate violets than *V. stagnina* is also unlikely, since *V. canina*, *V. elatior*, and *V. pumila* are all octoploids ($2n = 40$).

According to an alternative hypothesis by Weeda⁴, *Viola stagnina* var. *lacteoides* ($2n = 20$) might have resulted from a cross between *V. stagnina* ($2n = 20$) and *V. canina* ($2n = 40$). This hypothesis seems unlikely as well. Unreduced F_1 hybrids of such a cross would have a chromosome number of $2n = 30$. It is impossible to distinguish hybrids from the parents by only their chromosome number. A study based on chromosome number, chromosome morphology and fertility of numerous populations of *V. stagnina* and *V. canina* in Norway found no evidence for crosses between both species.³² Although introgression could have occurred in the case of *V. stagnina* var. *lacteoides*, it is very unlikely. The AFLP data from both *V. stagnina* varieties and allies by Van den Hof et al.²³ show that accessions of the hybrid *V. xritschliana* W. Becker are very closely related to *V. canina*, while all var. *lacteoides* accessions are very closely related to *V. stagnina* var. *stagnina*. When var. *lacteoides* would have resulted from introgression between *V. stagnina* and *V. canina*, the accessions of var. *lacteoides* would be expected to be closer related to *V. canina* than to *V. stagnina*.

Nomenclature

The Dutch variety of the Fen Violet was originally published as *Viola persicifolia* var. *lactaeoides* W. Becker & Kloos.¹⁶ We would like to preserve the rank of variety for this taxon, but for a number of reasons its scientific name is incorrect and should

is ook niet waarschijnlijk, omdat het chromosoomaantal van de F1-hybride ontstaan uit normale, gereduceerde gameten dan $2n = 30$ zou worden. Op basis van alleen het chromosoomaantal is het meestal onmogelijk om hybriden te onderscheiden van de ouders. Een Noors onderzoek, waarin naast chromosoomaantallen ook chromosoommorfologie en vruchtbaarheid van populaties Melkviooltje en Hondsviooltje zijn bestudeerd, heeft niet kunnen aantonen dat er kruisingen tussen deze twee soorten hebben plaatsgevonden.³² Weeda's hypothese dat Heidemelkviooltje het resultaat zou zijn van introgressie tussen Hondsviooltje en Melkviooltje wordt ook niet ondersteund door AFLP-data.²³ Deze wijzen uit dat exemplaren van de hybride *V. ×ritschliana* W.Becker nauwer verwant zijn met Hondsviooltje dan met Melkviooltje, terwijl exemplaren van Heidemelkviooltje juist nauwer verwant zijn met Veenmelkviooltje. Wanneer Heidemelkviooltje zou afstammen van een hybride tussen Melkviooltje en Hondsviooltje, zouden de exemplaren van Heidemelkviooltje juist nauwer verwant zijn geweest met Hondsviooltje. Dit is echter niet het geval.

Nomenclatuur

De botanische naam van Heidemelkviooltje is voor het eerst gepubliceerd als *Viola persicifolia* var. *lactaeoides* W.Becker & Kloos.¹⁶ Hoewel we Heidemelkviooltje als variëteit van Melkviooltje willen handhaven, is de wetenschappelijke naam van Becker & Kloos¹⁶ om verschillende redenen onjuist. De onjuistheden worden door Danihelka et al.¹⁴ en Van den Hof et al.¹⁵ beschreven; zij hebben voorgesteld dat het epiteton niet 'persicifolia', maar 'stagnina' moet zijn. Daarnaast is de spelling van 'lactaeoides' onjuist. Deze naam is een incorrecte samenvoeging van de elementen 'lactea' en 'oides', wat 'lijkend [-oides] op lactea' moet betekenen. De correcte samenvoeging van de twee elementen is 'lacteoides'. De genitief van 'lactea' is 'lacteae'. In een samenvoeging verdwijnt 'ae' waardoor 'lacte' overblijft. Wanneer 'lacte' wordt samengevoegd met achtervoegsel '-oides' komt er in dit geval geen verbindings 'i' aan te pas, omdat 'lacte' op een klinker eindigt. De correcte verbuiging van het epiteton van Heidemelkviooltje is daarom 'lacteoides'. De voorgaande spellingswijzen 'lactaeoides',^{13 16} 'lacteoides',³⁴ en 'lactaeoides'²¹ zijn onjuist volgens artikel 32.7 en 60.8 van de 'International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants', waarin bovendien ook staat dat incorrecte Latijnse wordeinden van bijvoegelijke epitetonen gecorrigeerd dienen te worden.³⁵

De nieuwe combinatie *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof voor Heidemelkviooltje is formeel gepubliceerd in Van den Hof.³⁶ Heidemelkviooltje verschilt van Veenmelkviooltje, de meer algemene variëteit van *V. stagnina*, door zijn kortere bladstelen en kleinere bladschijven. Daarnaast zijn de zijdelingse en onderste kroonbladen kleiner dan die van Veenmelkviooltje en zijn de kelk-aanhangsels korter, waardoor de spoor verder lijkt uit te steken. Heidemelkviooltje komt voor op natte heide op leem en zand, terwijl Veenmelkviooltje voornamelijk voorkomt op klei en veen in overstromingsgebieden van beken en rivieren en in natte weiden.

Weeda³⁷ heeft recentelijk een lectotype voor *Viola stagnina* var. *lacteoides* voorgesteld, maar hij heeft echter nagelaten om de tekst 'hier aangewezen' op te nemen in zijn lectotypificatie, waardoor deze ongeldig is volgens artikel 7.11 van de 'International Code of Nomenclature'.³⁵ Het exemplaar voorgesteld door Weeda is echter een geschikt lectotype, omdat Kloos¹⁶ had besloten om dit taxon als een nieuwe variëteit te beschrijven,

be changed. Danihelka et al.¹⁴ and Van den Hof et al.¹⁵ explained why the name *V. persicifolia* should be changed into *V. stagnina*. In addition, the correct merge of the two elements ‘lactea’ and ‘oides’ from the original epithet is ‘lacteoides’, because it is a compound formed from ‘lactea’ and ‘-oides’, denoting resemblance. The genitive case of ‘lactea’ is ‘lacteae’. In compounds these ‘ae’ endings are removed. The suffix ‘-oides’ should in this case be added without a connecting ‘i’ because ‘lacte’ ends with a vowel. The correct declination of the epithet for the Dutch variety of *V. stagnina* is, therefore, ‘lacteoides’ and the previously used adjectives ‘lacteaeoides’^{13 16}, ‘lacteoides’³⁴ and ‘lactaeoides’²¹ are incorrect according to articles 32.7 and 60.8 of the ‘International Code of Nomenclature’, which state that errors in improper Latin termination of adjectival epithets should be corrected.³⁵

The new combination *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof was formally described by Van den Hof.³⁶ It differs from *V. stagnina* var. *stagnina* in its shorter petioles and smaller lamina. Furthermore, the dorsal and ventral petals are narrower than those of the common variety and the sepal appendages are shorter causing the spur to exceed the sepal appendages. *Viola stagnina* var. *lacteoides* is restricted to wet heathlands on loamy and sandy soil, while the more common var. *stagnina* occurs in fen meadows in river floodplains and brook valleys on loamy and peaty soil.

Weeda³⁷ recently proposed a lectotype for *Viola stagnina* var. *lacteoides*, but he failed to include the statement ‘designated here’ in his proposal, by which his lectotypification is therefore invalid according to article 7.11 of the ‘International Code of Nomenclature’.³⁵ The specimen proposed by Weeda is an appropriate lectotype. The main argument for this is that Kloos¹⁶ decided to describe the taxon as a distinct variety after having collected specimens from this locality and observing these in the garden. We therefore formally designate the specimen of *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof collected on May 27th, 1922, by J. Jansen and A.W. Kloos in the heathlands around Wijchen, Province of Gelderland, as the lectotype on the next page. This specimen is kept in the herbarium of Naturalis Biodiversity Center in Leiden (L; Herb. Lugd. Bat. No. 954.140.997, plant in upper left corner of the sheet).

nadat hij van deze vindplaats een exemplaar had verzameld en geobserveerd had in zijn tuin. Om deze reden wijzen wij hierbij formeel als lectotype van *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof het herbariumexemplaar aan dat op 27 mei 1922 is verzameld door J. Jansen en A.W. Kloos op de “Heidegronden rond Wijchen”. Dit exemplaar (L; Herb. Lugd. Bat. No. 954.140.997, plant in linkerbovenhoek van het vel; *hic designatus*) bevindt zich in het herbarium van het Naturalis Biodiversity Center in Leiden.

Sleutel voor de arosulate Viooltjes-soorten van Nederland*

- 1 Plant met ondergrondse uitlopers. Spoor minder dan twee keer zo lang als de kelkaanhangsels → 2
- Plant zonder ondergrondse uitlopers. Spoor meer dan twee keer zo lang als de kelkaanhangsels → 3
- 2 Spoor van het onderste kroonblad (tot 2 mm lang) niet of amper voorbij de kelkaanhangsels reikend. Bladschijf van de middelste en bovenste bladeren relatief groot (2,5–5,0 cm lang en 0,8–2,0 cm breed); bladsteel 1,2–3,2 cm lang. Planten meestal bleekgroen en relatief hoog (7–25 cm): ***Viola stagnina*** Kit. ex Schult. var. ***stagnina*** | Veenmelkviooltje (Fig. 6; Fig. 7A)
- Spoor van het onderste kroonblad (3–4 mm lang) duidelijk voorbij de kelkaanhangsels reikend. Bladschijf van de middelste en bovenste bladeren relatief klein (1,2–2,2 cm lang en 0,6–1,1 cm breed); bladsteel 0,6–1,4 cm lang. Planten meestal donkergroen en klein blijvend (2,4–8,0 cm): ***Viola stagnina*** Kit. ex Schult. var. ***lacteoides*** (W.Becker & Kloos) Van den Hof | Heidemelkviooltje (Fig. 6; Fig. 7B)
3. Bloemen lichtblauw tot wit van kleur, met opvallende donkerrode of paarse beadering. Basis van de bladschijf cuneaat, zelden rond. Planten relatief hoog (7–25 cm): ***Viola lactea*** Sm. | Echt melkviooltje (Fig. 7C)
- Bloemen donkerblauw of violet van kleur, zonder opvallende beadering. Basis van de bladschijf (diep) cordaat, zelden truncaat. Planten erg hoog (30–40 cm): ***Viola canina*** L. | Hondsviooltje (Fig. 7D)

* Deze sleutel heeft alleen betrekking op soorten zonder bladrozet en bevat daarom geen soorten als *V. reichenbachiana* Boreau (Donkersporig bosviooltje) en *V. riviniana* Rchb. (Bleeksporig bosviooltje).

CONCLUSIE

Onze (micro)morfologische studie wijst uit dat de vorm van het stigma variabel is binnen Melkviooltje. De spoorlengte blijkt niet significant verschillend te zijn tussen de twee variëteiten. De kelkaanhangsels verschillen daarentegen wel significant in lengte. De kelkaanhangsels van Heidemelkviooltje zijn significant kleiner, waardoor de spoor verder lijkt uit te steken. De zijdelingse en onderste kroonbladen zijn ook significant kleiner dan bij Veenmelkviooltje.

Het transplantatie-experiment toont aan dat er fenotypische plasticiteit bestaat in plantgrootte, bladkleur en de vorm en lengte van de steunblaadjes. Deze kenmerken worden dus sterk beïnvloed door abiotische factoren zoals bodemtype, vochtigheid

Key to the arosulate *Viola* species in the Netherlands and Belgium*

1. - Stems arising at intervals from roots creeping underground. Corolla-spur less than twice as long as the sepal appendages → 2
- Stems not arising from stolons or roots. Corolla-spur more than twice as long as the sepal appendages → 3
2. Spur of the ventral petal (up to 2 mm long) not or only slightly exceeding the sepal appendages. Lamina of the middle and upper stem leaves relatively large (2.5–5.0 cm long and 0.8–2.0 cm wide); petiole 1.2–3.2 cm long. Plants usually pale green, relatively tall (7–25 cm): ***Viola stagnina*** Kit. ex Schult. var. ***stagnina*** (Fig. 5; Fig. 7A)
- Spur of the ventral petal (3–4 mm long) clearly exceeding the sepal appendages. Lamina of the middle and upper stem leaves relatively small (1.2–2.2 cm long and 0.6–1.1 cm wide); petiole 0.6–1.4 cm long. Plants usually dark green, remaining quite small (2.4–8.0 cm): ***Viola stagnina*** Kit. ex Schult. var. ***lacteoides*** (W.Becker & Kloos) Van den Hof (Fig. 6; Fig. 7B)
3. Flowers very pale blue to white with a distinct dark reddish or purplish venation. Leaf base cuneate, rarely rounded. Plants relatively tall (7–25 cm): ***Viola lactea*** Sm. (Fig. 7C)
- Flowers blue-violet, lacking venation. Leaf base (deeply) cordate, rarely truncate. Plants very tall (30–40 cm): ***Viola canina*** L. (Fig. 7D)

* This key only concerns species without a basal rosette and therefore does not include species with a basal rosette, e.g. *Viola reichenbachiana* Boreau and *V. riviniana* Rechb.

CONCLUSIONS

Our morphological studies showed that stigma shape is variable within both varieties of *Viola stagnina* and that spur length was not significantly different between these varieties either. Sepal appendages, on the other hand, are significantly shorter in var. *lacteoides* than in var. *stagnina* and the ventral and dorsal petals of var. *lacteoides* are narrower than those of var. *stagnina*.

Our common garden experiment demonstrates that plasticity in plant height, leaf colour and stipule length and shape in *V. stagnina* are caused by differences in abiotic factors such as soil type, humidity and light intensity. The observed differences in lamina size and petiole length, however, are genetically fixed between the two varieties. A future common garden experiment with flowering plants should indicate which flower characters are influenced by environmental factors and which are determined genetically. Preliminary data gathered by the second author showed that var. *lacteoides* invests much more in cleistogamous flowers than var. *stagnina*.

Crossings showed that both varieties are not yet reproductively isolated, which is supported by our observations that they have identical chromosome numbers.

Based on the above and earlier published observations, we conclude that var. *stagnina* and var. *lacteoides* differ sufficiently in genetic, geographical, and morphological characters to recognize them as different varieties of *Viola stagnina*. As the differences are still quite small we do not think that they deserve the status of separate (sub)species yet.

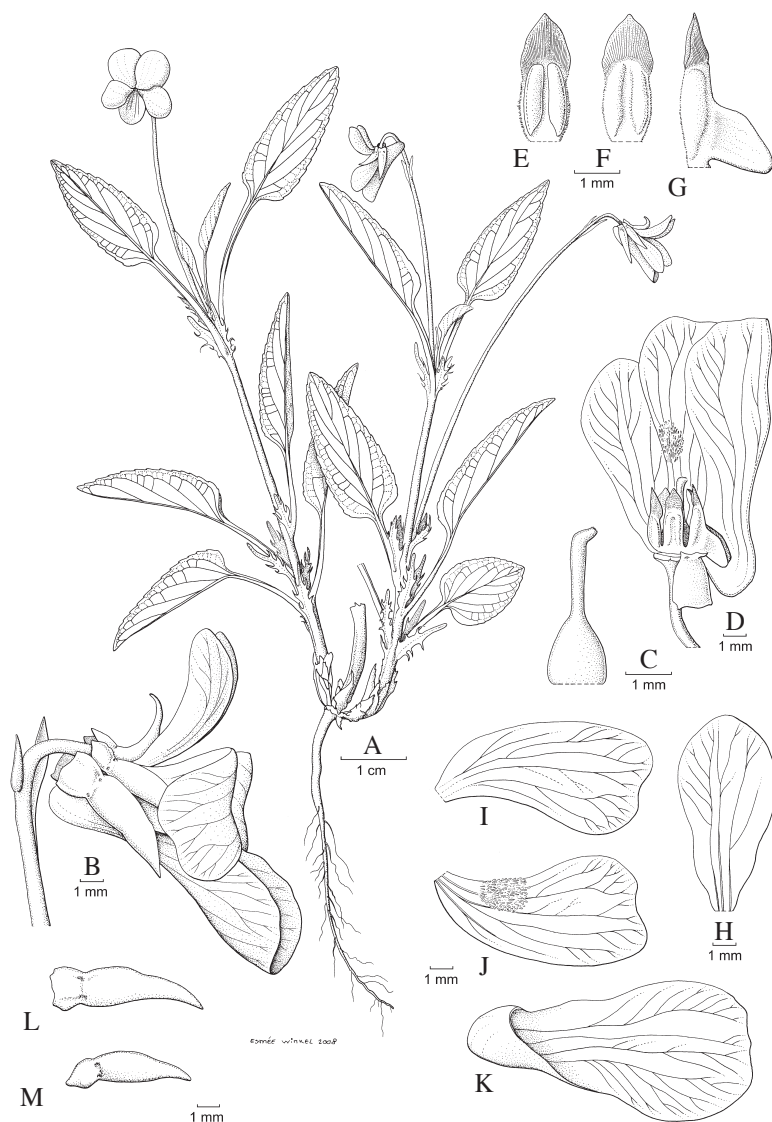


Fig. 5. *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *stagnina* (Veenmelkviooltje). A. Hele plant; B. Zijkant van de bloem; C. Stamper; D. Zijkant van de bloem met meeldraden en stamper; E. Adaxiale kant van de bovenste meeldraad; F. Abaxiale kant van de bovenste meeldraad; G. Zijkant van de gespoorde onderste meeldraad; H. Bovenste kroonblad; I. Zijdelings kroonblad; J. Zijdelings kroonblad met franjes; K. Onderste kroonblad met spoor; L. Onderste kelkblad; M. Bovenste kelkblad. Illustraties: Esmée Winkel, Naturalis.

Fig. 5. *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *stagnina*. A. Habit; B. Lateral view of the flower; C. Gynoecium; D. Lateral view of the flower with male and female reproductive organs; E. Adaxial view of the upper stamen; F. Abaxial view of the upper stamen; G. Side view of the spurred lower stamen; H. Dorsal petal; I. Lateral petal; J. Lateral petal with fimbriae; K. Ventral petal with spur; L. Lower sepal; M. Upper sepal. Illustrations by Esmée Winkel, Naturalis.

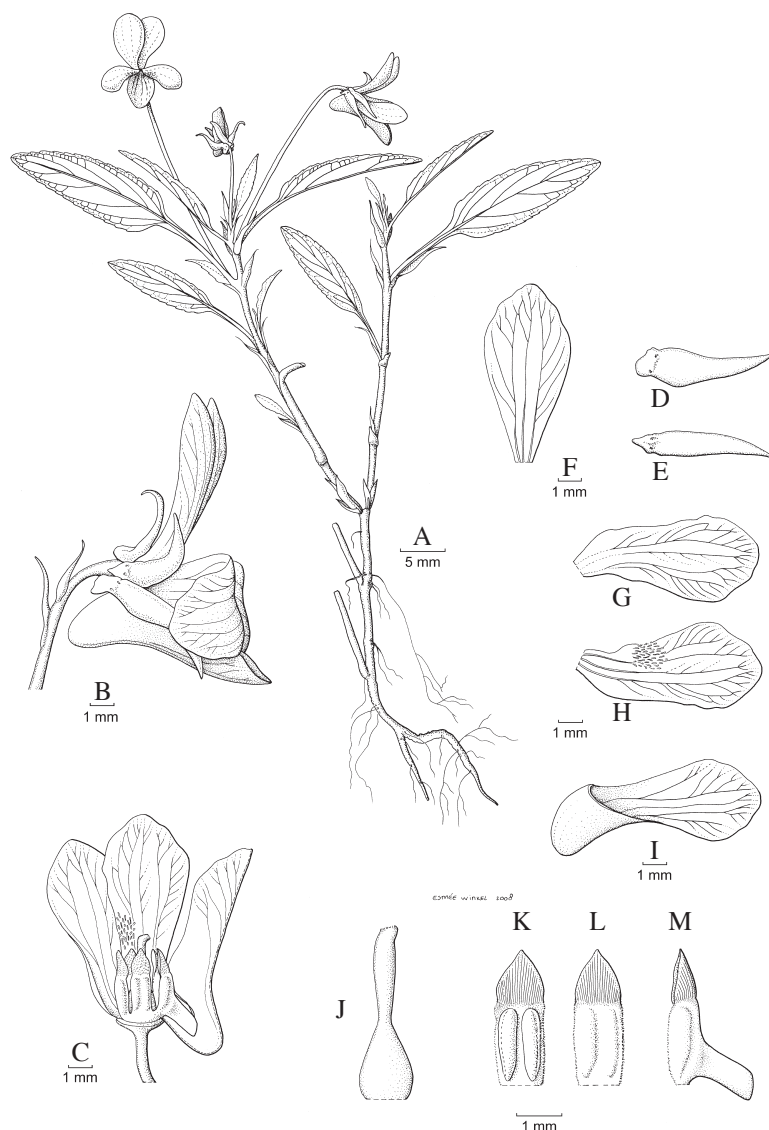


Fig. 6. *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof (Heidemelk-viooltje). A. Hele plant; B. Zijkant van de bloem; C. Zijkant van de bloem met meeldraden en stamper; D. Onderste kelkblad; E. Bovenste kelkblad; F. Bovenste kroonblad; G. Zijdelings kroonblad; H. Zijdelings kroonblad met franjes; I. Onderste kroonblad met spoor; J. Stamper; K. Adaxiale kant van de bovenste meeldraad; L. Abaxiale kant van de bovenste meeldraad; M. Zijkant van de gespoorde onderste meeldraad. Illustraties: Esmée Winkel, Naturalis.

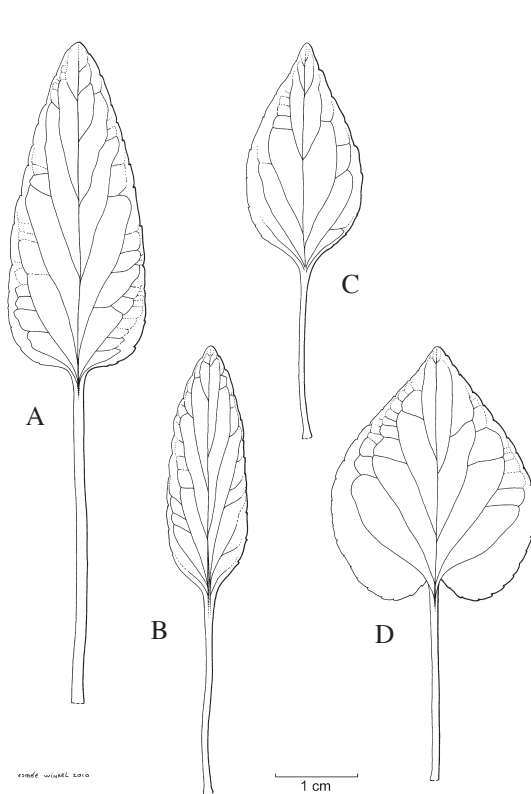
Fig. 6. *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof. A. Habit; B. Lateral view of the flower; C. Lateral view of the flower with male and female reproductive organs; D. Lower sepal; E. Upper sepal; F. Dorsal petal; G. Lateral petal; H. Lateral petal with fimbriae; I. Ventral petal with spur; J. Gynoecium; K. Adaxial view of the upper stamen; L. Abaxial view of the upper stamen; M. Side view of the spurred lower stamen. Illustrations by Esmée Winkel, Naturalis.

en lichtintensiteit. De bladschijfgrootte en bladsteellengte, daarentegen, blijken juist bepaald te worden door een genetische component en minder afhankelijk te zijn van abiotische factoren. Een vervollexperiment met bloeiende planten kan uitwijzen of de generatieve kenmerken die verschillen tussen Heide- en Veenmelkviooltje overwegend door genetische dan wel abiotische factoren bepaald worden. Nog niet gepubliceerde data verzameld door de tweede auteur lijken erop te wijzen dat Heidemelkviooltje meer investeert in het maken van cleistogame bloemen dan Veenmelkviooltje. Kruisingen wijzen uit dat de variëteiten niet reproductief gescheiden zijn. Beide variëteiten hebben hetzelfde aantal chromosomen.

Op basis van bovenstaande en al eerder gepubliceerde bevindingen concluderen wij dat Heidemelkviooltje en Veenmelkviooltje genetisch, geografisch en morfologisch voldoende van elkaar verschillen om ze als aparte variëteiten te erkennen. Vanwege de geringe verschillen kunnen deze taxa naar onze mening (nog) niet als aparte (onder-) soorten worden onderscheiden.

→
Fig. 7. Bladvormen. A. *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *stagnina* (Veenmelkviooltje), nagetekend van *Petermann s.n.* (L); B. *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof, nagetekend van *Van Soest 6081* (L); C. *V. lactea* Sm. (Echt melkviooltje), nagetekend van *Sandwith s.n.*, 7 juni 1937 (L); D. *V. canina* L. (Hondsviooltje), nagetekend van *W.J. Barsje s.n.*, 8 juni 1961 (L). Alle bladen zijn in het midden van de stengel aangehecht. Illustraties: Esmée Winkel, Naturalis.

Fig. 7. Leaf shapes. A. *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *stagnina*, drawn from *Petermann s.n.* (L); B. *Viola stagnina* Kit. ex Schult. var. *lacteoides* (W.Becker & Kloos) Van den Hof, drawn from *Van Soest 6081* (L); C. *V. lactea* Sm., drawn from *Sandwith s.n.*, June 7, 1937 (L); D. *V. canina* L., drawn from *W.J. Barsje s.n.*, June 8, 1961 (L). All leaves are located at the middle of the stem. Illustrations by Esmée Winkel, Naturalis.



EINDNOTEN / ENDNOTES

1. E. Hulten & M. Fries. 1986. Atlas of North European vascular plants north of the tropic of cancer II. Koeltz Scientific Books, Königstein.
2. A. Zwaenepoel & L. Vanallemeersch. 2007. *Viola persicifolia* na 127 jaar opnieuw opgedoken in België. *Dumortiera* 91: 1–6.
3. D.H. Valentine, H. Merxmüller & A. Schmidt. 1968. *Viola* L. In: T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters & D.A. Webb (red./eds.) *Flora Europaea* 2: 270–282. Cambridge Press, Cambridge.
4. E.J. Weeda. 2002. Melkviooltje (*Viola persicifolia* Schreber) in Nederland in verleden en heden. 2. Vergelijking met gegevens van elders en een historische interpretatie. *Stratiotes* 24: 3–12.
5. R.L. Eckstein, N. Hölzel & J. Danihelka. 2006. Biological Flora of Central Europe: *V. elatior*, *V. pumila* and *V. stagnina*. *Perspect. Pl. Ecol. Evol. Syst.* 8: 45–66.
6. N. Hölzel. 2003. Re-assessing the ecology of rare flood-meadow violets (*Viola elatior*, *V. pumila*, *V. persicifolia*) with large phytosociological data sets. *Folia Geobot.* 38: 281–298.
7. J. Clausen. 1927. Chromosome number and the relationship of species in the genus *Viola*. *Ann. Bot. (Oxford)* 41: 677–714.
8. K. van den Hof, R.G. van den Berg & B. Gravendeel. 2008. Chalcone gene lineage diversification confirms allopolyploid evolutionary relationships of European Rostrate Violets. *Molec. Biol. Evol.* 25: 2099–2108.
9. D.H. Valentine. 1958. Cytotaxonomy of the Rostrate violets. *Proc. Linn. Soc. London* 169: 132–134.
10. D.M. Moore & M.J. Harvey. 1961. Cytogenetic relationships of *Viola lactea* SM. and other West European Arosulate violets. *New Phytol.* 60: 85–95.
11. K. van den Hof. 2009. Polyploidie in Viooltje (*Viola* L.). *Gorteria* 33: 149–155.
12. J. Lambinon, L. Delvosalle & J. Duvigneaud. 2004. Nouvelle Flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des Régions Voisines, ed. 5. Jardin Botanique National de Belgique, Meise.
13. R. van der Meijden. 2005. Heukels' Flora van Nederland, ed. 23. Wolters-Noordhoff, Groningen/Houten.
14. J. Danihelka, K. van den Hof, T. Marcussen & B. Jonsell. 2010. *Viola montana* and *V. persicifolia* (Violaceae): two names to be rejected. *Taxon* 59: 1869–1878.
15. K. van den Hof, J. Danihelka, T. Marcussen, B. Jonsell, R.G. van den Berg & B. Gravendeel. 2010. Proposal to reject the names *Viola montana* and *V. persicifolia* (Violaceae). *Taxon* 59: 1900–1902.
16. A.W. Kloos. 1924. Het geslacht *Viola* in Nederland. *Nederlandsch kruidkundig archief* 33-34: 138–208.
17. E. Heimans, H.W. Heinsius & J.P. Thijssse. 1924. Geïllustreerde Flora van Nederland, ed. 6. W. Versluys, Amsterdam.
18. H. Heukels. 1927. Schooflora voor Nederland, ed. 17. P. Noordhoff, Groningen.
19. S.J. van Ooststroom. 1977. Flora van Nederland, ed. 19. Wolters-Noordhoff, Groningen.
20. R. van der Meijden. 1983. Heukels' Flora van Nederland, ed. 20. Groningen, Wolters-Noordhoff.
21. R. van der Meijden. 1990. Heukels' Flora van Nederland, ed. 21. Groningen, Wolters-Noordhoff.
22. E.J. Weeda. 2001. Melkviooltje (*Viola persicifolia* Schreber) in Nederland in verleden en heden. 1. Variëteiten, voorkomen, standplaats en plantensociologische positie. *Stratiotes* 23: 73–103.
23. K. van den Hof, R.G. van den Berg & B. Gravendeel (in bewerking/in review). Combined analyses of AFLP markers and morphology confirm the taxonomic status of *Viola stagnina* var. *lacteoides*. *Conserv. Genet.*
24. E.M. Lord. 1981. Cleistogamy: a tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. *Bot. Rev. (Lancaster)* 47, 4: 421–449.
25. T.M. Culley. 2002. Reproductive biology and delayed selfing in *Viola pubescens* (Violaceae), an understory herb with chasmogamous and cleistogamous flowers. *Int. J. Pl. Sci.* 163: 113–122.

26. T. Marcussen. 2003. A new Violet species from the south-west Alps. Bot. J. Linn. Soc. 142: 119–123.
27. A.J. Beattie. 1971. Pollination mechanisms in *Viola*. New Phytol. 70: 343–360.
28. A.J. Beattie. 1974. Floral evolution in *Viola*. Ann. Missouri Bot. Gard. 61: 781–793.
29. N.G. Dengler. 1994. The influence of light on leaf development. In: M. Iqbal (ed), Growth patterns in vascular plants: 100–136. Dioscorides Press, Portland, OR.
30. J.R. Evans, S. von Caemmerer & W.W. Adams. 1988. Ecology of photosynthesis in sun and shade. CSIRO, Melbourne.
31. E. Bergdolt. 1932. Morphologische und physiologische Untersuchungen über *Viola* zugleich ein Betrag zur Lösung des Problems der Kleistogamie. Bot. Abh. 20: 1–120.
32. V. Røren, O. Stabbetorp & L. Borgen. 1994. Hybridization between *Viola canina* and *V. persicifolia* in Norway. Nordic J. Bot. 14: 165–172.
33. H.E. Ballard Jr., persoonlijke mededeling per e-mail/personal communication by email (9 juni/ June 9, 2010).
34. E. Heimans, H.W. Heinsius & J.P. Thijsse. 1965. Geïllustreerde Flora van Nederland. W. Versluys, Amsterdam.
35. J. McNeill, F.R. Barrie, W.R. Buck, V. Demoulin, W. Greuter, D.L. Hawksworth, P.S. Herendeen, S. Knapp, K. Marhold, J. Prado, W.F. Prud'homme van Reine, G.F. Smith, J.H. Wiersema & N.J. Turland. 2012. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). Regnum Veg. 154. (webpublication: www.iapt-taxon.org/nomen/main.php).
36. K. van den Hof. 2010. Evolution of *Viola stagnina* and its Sisterspecies by Hybridization and Polyploidization. Proefschrift Universiteit Leiden/PhD thesis Leiden University. Nautilus, Leiden.
37. E.J. Weeda. 2010. Boekbesprekingen. Kevin van den Hof, 2010. Evolution of *Viola stagnina* and its Sisterspecies by Hybridization and Polyploidization. Proefschrift, Netherlands Centre for Biodiversity Naturalis, section NHN, Leiden, 112 p. Stratiotes 40/41: 69–71.