

Het belang van moleculaire kenmerken voor de plantensystematiek

Pieter B. Pelsler (Oklahoma State University, Botany Department, 104 Life Sciences East, Stillwater, Oklahoma 74078-3013, USA;
e-mail: pieter.pelsler@okstate.edu)

Het belang van moleculaire kenmerken voor de plantensystematiek

In de 23^e druk van de Heukels' Flora van Nederland wordt een classificatie van bloemplanten gebruikt die erg verschillend is van de classificaties in eerdere drukken. Deze nieuwe classificatie is het resultaat van nieuwe inzichten in de evolutionaire verwantschappen tussen plantenfamilies die voortgekomen zijn uit verwantschapsanalyses van moleculaire gegevens. In dit artikel bespreek ik waarom moleculaire gegevens zo nuttig zijn om verwantschapsrelaties te reconstrueren en geef ik twee voorbeelden van hoe deze gegevens gebruikt worden om evolutionaire processen te bestuderen die aan deze relaties ten grondslag liggen.

The importance of molecular characters for plant systematics

The 23rd edition of the '*Heukels' Flora van Nederland*' [Heukels' Flora of the Netherlands] presents a classification of flowering plants that is very different from any classification scheme used in previous editions of this Dutch Flora. These taxonomic changes are due to new insights into the evolutionary relationships between plant families obtained from the results of phylogenetic analyses using molecular data. In this paper, I outline why analyses of molecular data are powerful tools for reconstructing evolutionary relationships and I give two examples of how these data can be used to learn more about the evolutionary processes which underlie these patterns of relationship.

Inleiding

De aandachtige lezer van de Heukels' Flora zal vast wel eens door de inleidende hoofdstukken van het boek gebladerd hebben. In dit gedeelte van de 23^e druk staat een hoofdstuk¹ dat de indeling van plantenfamilies in ordes en klassen behandelt. Hierin wordt uitgelegd dat, net als in alle andere toonaangevende Flora's, plantensoorten in de Heukels' niet alfabetisch of op bloemkleur, maar volgens hun evolutionaire verwantschappen (gemeenschappelijke afstamming van een vooroudersoort) ingedeeld zijn. Deze rangschikking is hiërarchisch (genest) en volgt het Linneaanse classificatiesysteem: soorten maken deel uit van geslachten, geslachten van families, families van ordes, en ordes van klassen, etc. Blader maar eens met me mee door de Flora: Jakobskruiskruid (*Jacobaea vulgaris*, p. 615 in de Heukels') en Waterkruiskruid (*Jacobaea aquatica*, p. 614) zijn bijvoorbeeld beide geplaatst in het geslacht Jakobskruid (*Jacobaea*, p. 614–615), Jakobskruid is een van de vele geslachten in de Compositiefamilie (Asteraceae, p. 586–636), welke deel uit maakt van de orde Asterales (p. 580–636). Deze orde is op zijn beurt samen met enkele andere ordes in de Campanuliden-klasse (Campanulopsida, p. 545–636) geplaatst. Omdat informatie over evolutionaire verwantschappen de basis vormt van elk wetenschappelijk biologisch onderzoek^{1 2} is het een logische keuze om soorten juist volgens dit criterium een plekje in het Linneaanse classificatiesysteem te geven en zo is dat ook in de Heukels' gebeurd. De Flora beschrijft dus niet alleen hoe plantensoorten

in Nederland er uit zien en waar ze voorkomen, maar geeft de lezer ook informatie over hun evolutionaire verwantschappen en is daarmee meer dan een catalogus van de Nederlandse flora.

Naarmate er meer biologisch onderzoek verricht wordt, krijgen we meer inzicht in evolutionaire verwantschappen. Soms laten nieuwe onderzoeksresultaten zien dat we onze eerdere ideeën over verwantschappen bij moeten stellen en dit heeft dan als gevolg dat classificaties herzien moeten worden om een juist beeld van onze kennis over de evolutie van plantengroepen te blijven geven. Dit is bijvoorbeeld de reden waarom de indeling van de 23^e druk van de Heukels' verschilt van de 22^e druk. Een voorbeeld dat ik elders uitgebreider besproken heb³: de semi-parasitaire soorten van de Helmkruidfamilie (Scrophulariaceae), zoals Ratelaar (*Rhinanthus*) en Ogenstroost (*Euphrasia*), bleken nauwer verwant te zijn met leden van de parasitaire Bremraapfamilie (Orobanchaceae) dan met vele andere Helmkruiden en zijn dus in de 23^e druk van de Helmkruidfamilie naar de Bremraapfamilie verhuisd.

In het eerder genoemde inleidende hoofdstuk van de Flora wordt uitgelegd waarom de verschillen in indeling tussen de 22^e en 23^e druk zoveel groter zijn dan tussen eerdere drukken. Dit is grotendeels het gevolg van het doorvoeren van de nieuwe inzichten in de samenstelling en verwantschappen van plantenfamilies die het resultaat zijn van het gebruik van moleculaire technieken bij het reconstrueren van de evolutionaire geschiedenis van plantensoorten. Moleculaire data, met name DNA-sequentiedata, blijken hiervoor veel informatiever te zijn dan eerder gebruikte gegevens, zoals uiterlijke kenmerken. In dit artikel wil ik uitleggen waarom moleculaire data zo krachtig zijn en twee voorbeelden geven van hoe deze gegevens gebruikt kunnen worden om verschillende aspecten van evolutie beter te kunnen begrijpen.

En DAT is nou de kracht van DNA ...

Evolutionaire verwantschappen worden onderzocht door overeenkomsten en verschillen tussen soorten te analyseren. Het achterliggende idee hierbij is, dat als twee soorten wat betreft een bepaald kenmerk meer op elkaar lijken dan op een derde soort, dit als een aanwijzing gezien kan worden dat die twee soorten nauwer verwant zijn met elkaar. Neem bijvoorbeeld de beharing van Jakobskruid, Waterkruid en Zilverkruid (*Jacobaea maritima*): het feit dat de zilverachtige beharing van Zilverkruid niet aanwezig is op Jakobskruid en Waterkruid zou er op kunnen duiden dat deze twee soorten nauwer met elkaar verwant zijn dan met Zilverkruid. Er zijn vele soorten kenmerken die gebruikt kunnen worden om de evolutionaire geschiedenis van een groep soorten te reconstrueren, bijvoorbeeld uiterlijke kenmerken zoals bladstand of aantal meeldraden, chemische kenmerken zoals de aanwezigheid van bepaalde afweerstoffen, en gedragskenmerken zoals zangpatronen bij vogels. Het enige criterium waaraan een kenmerk moet voldoen om mogelijk iets over het verloop van de evolutionaire geschiedenis te kunnen zeggen, is dat het een erfelijk kenmerk moet betreffen. Als twee planten bijvoorbeeld sterk op elkaar lijken omdat ze door de zelfde tuinman gesnoeid zijn (of twee buurkinderen die naar dezelfde kapper gaan), dan wil dat nog niet zeggen dat ze ook nauw verwant aan elkaar zijn!

Elk individueel kenmerk is als een hypothese van evolutionaire verwantschap te beschouwen en hoe meer kenmerken er dus onder de loep worden genomen, des te duidelijker het wordt hoe een groep soorten onderling verwant is. En juist om deze reden kiezen biologen voor het gebruik van moleculaire kenmerken voor verwantschapsonderzoek. Het DNA van een organisme bestaat namelijk uit miljoenen bouwstenen die elk in vier vormen kunnen voorkomen: de basen adenine, guanine, thymine en cytosine. Elk van deze vele bouwstenen kan als een apart kenmerk gebruikt worden voor het onderzoeken van verwantschappen. Met de ontwikkeling van nieuwe technologie om deze genetische code voor delen van het genoom te achterhalen (het zogenaamde DNA-sequencing) is het relatief eenvoudig geworden om data-sets voor verwantschapsonderzoek te genereren die tientallen malen groter zijn dan data-sets die met behulp van – voorheen veel gebruikte – uiterlijke kenmerken van planten verkregen kunnen worden.

Naast een kwantitatief voordeel (meer kenmerken leveren meer gegevens over verwantschapsrelaties) heeft het gebruik van DNA kenmerken ook enkele kwalitatieve voordelen in vergelijking met uiterlijke kenmerken. Veel uiterlijke kenmerken die ons opvallen en waar we onze eerste indruk over evolutionaire verwantschappen op baseren, zijn kenmerken die onder sterke selectiedruk staan. Hiermee bedoel ik dat omgevingsfactoren bepalen hoe een kenmerk zich uit, waardoor die kenmerken wel een goed beeld geven van overeenkomstige omgevingsfactoren, maar een verkeerd beeld geven van verwantschapsrelaties. Neem bijvoorbeeld ‘cactussen’ in de Oude Wereld (Europa, Afrika, Azië) en de Nieuwe Wereld (Amerika). Hoewel deze ‘cactussen’ op het eerste gezicht erg op elkaar lijken (doornen, vlezig en een kleine oppervlakte/inhoud verhouding) zijn ze helemaal niet zo nauw met elkaar verwant. De cactussen van de Nieuwe Wereld vormen de familie Cactaceae, maar die uit de Oude Wereld zijn leden van de Wolfsmelkfamilie (Euphorbiaceae). Zowel de Cactaceae als de cactusvormige Wolfsmelken groeien in hele droge gebieden, waar je als plant alleen maar kan overleven als je veel water op kan slaan (vlezige stengels) en verdamping zoveel mogelijk tegen kan gaan (kleine oppervlakte/inhoud verhouding). Natuurlijk is zo’n plant met een waterreservoir in de woestijn een aantrekkelijk hapje (drinkje?) voor dieren en doornen helpen dus om vraat te beperken. Omgevingsfactoren (hier dus droogte en hoge temperaturen) kunnen er dus voor zorgen dat planten zich op een bepaalde manier aan moeten passen aan hun omgeving om te kunnen overleven. Hierdoor kunnen planten wat betreft hun uiterlijk heel erg gaan verschillen van nauw verwante soorten die niet onder dezelfde selectiedruk van de omgeving staan (bijvoorbeeld, in het geval van cactusvormige Wolfsmelken, andere Wolfsmelksoorten die niet in de woestijn groeien) en juist meer op niet-verwante soorten gaan lijken.

Ook bestuivers kunnen voor een zodanige selectiedruk zorgen dat niet-verwante planten wat betreft hun bloemen toch erg op elkaar zijn gaan lijken. Spectaculaire voorbeelden hiervan zijn bijvoorbeeld in de Orchideeënfamilie (Orchidaceae) te vinden.⁴ In gevallen waar de selectiedruk voor bepaalde uiterlijke kenmerken erg hoog is, is het belangrijk om over andere kenmerken te kunnen beschikken die niet aan dezelfde druk onderhevig zijn. De bloemen van Cactussen en cactusvormige Wolfsmelken zien er bijvoorbeeld heel anders uit en vertellen de oplettende botanicus dus al dat voorzichtigheid geboden is bij het interpreteren van uiterlijke kenmerken in deze plantengroepen.

DNA-kenmerken kunnen in gevallen waarin verschillende uiterlijke kenmerken verschillende verwantschapspatronen suggereren een uitkomst bieden. Zolang de delen van het DNA die gesequenced worden geen betrekking hebben op de uiterlijke kenmerken die een onderzoeker wil gebruiken voor het bepalen van verwantschappen, vormen deze moleculaire kenmerken een onafhankelijke data-set die kan bepalen welke uiterlijke kenmerken geschikt zijn als gegevens voor verwantschapsonderzoek en welke kenmerken een incorrect beeld van evolutionaire verwantschappen geven. DNA-kenmerken kunnen dus zeer krachtige gegevens zijn voor verwantschapsonderzoek. Toch is het belangrijk om te beseffen dat een DNA-kenmerk niet per definitie beter is dan een uiterlijk kenmerk of welk ander type kenmerk dan ook. Ook bij het gebruiken van moleculaire kenmerken is voorzichtigheid geboden, omdat soms ook deze kenmerken onder selectiedruk staan. Het voert echter te ver om dit onderwerp in dit artikel te behandelen. In het geval van verwantschapsanalyses betekent dit, dat naarmate meer onafhankelijke kenmerken hetzelfde beeld van de verwantschappen tussen soorten geven, het aannemelijker wordt dat die kenmerken verwantschapsrelaties juist weerspiegelen.

DNA en de herkomst en verspreiding van soorten

Verwantschapsanalyses geven niet alleen informatie over hoe soorten van elkaar afstammen. De evolutionaire stambomen die in zulke analyses worden gereconstrueerd, kunnen ook als een raamwerk gebruikt worden om naast evolutionaire patronen (bijvoorbeeld verwantschappen) ook de evolutionaire processen te bestuderen die ten grondslag aan deze patronen liggen. Eén van deze processen is de verspreiding van plantengroepen naar gebieden waar ze voorheen nog niet voorkwamen. Dit is een onderdeel een vakgebied dat biogeografie genoemd wordt. Door te bepalen waar in de wereld de soorten in een evolutionaire stamboom voorkomen, kun je achterhalen waar hun vooroudersoorten groeiden en zo niet alleen bepalen via welke migratieroutes een plantengroep in een bepaald gebied terecht is gekomen, maar ook waar een plantengroep ontstaan is. Als een plantensoort bijvoorbeeld in Afrika voorkomt, maar alle nauw verwante soorten en hun vooroudersoort alleen in Europa te vinden zijn, dan zou dit er op kunnen duiden dat deze soortengroep zich van Europa naar Afrika verspreid heeft. Zulke analyses hebben bijvoorbeeld aangetoond dat de Compositiefamilie waarschijnlijk in Zuid-Amerika ontstaan is⁵ en van daaruit via verschillende routes de andere werelddelen bereikt heeft. Dankzij het beschikbaar komen van DNA-sequentiegegevens kunnen we zelfs nog meer te weten komen over de geografische herkomst van soorten: we kunnen achterhalen wanneer planten groepen ontstaan zijn en wanneer ze een nieuw verspreidingsgebied bereikt hebben. DNA-sequentiedata voegen dus een nieuwe dimensie aan verwantschapsonderzoek toe: de factor 'tijd'. In tegenstelling tot andere kenmerken, kunnen DNA-kenmerken informatie over de ouderdom van evolutionaire gebeurtenissen geven, omdat we van enkele goed bestudeerde delen van het DNA weten hoe snel daarin veranderingen optreden. Als we dus weten dat de afzonderlijke bouwstenen van een bepaald gen (de bases adenine, guanine, thymine en cytosine) gemiddeld 0,005 mutaties per miljoen jaar ondergaan en als

we observeren dat twee soorten sinds ze uit een gemeenschappelijke voorouder-soort ontstaan zijn in dit gen gemiddeld per bouwsteen 0,05 mutaties ondergaan hebben, dan moeten ze dus 10 miljoen jaar geleden ontstaan zijn ($0,005/0,05=10$). Kennis over waar en wanneer een soortengroep ontstaan is, kan ons veel informatie geven over de context waarin belangrijke evolutionaire veranderingen hebben plaatsgevonden en soms zelfs een verklaring voor deze processen geven. Zo kunnen we, als we weten waar en wanneer een soortengroep ontstaan is, bepalen of deze gebeurtenis samen viel met klimatologische veranderingen, zoals het komen of gaan van ijstijden, of geologische gebeurtenissen, zoals gebergtevorming, het ontstaan van eilanden, of het samenkomen/uiteendrijven van continentale platen.

Eén van de, naar mijn mening, meest opmerkelijke onthullingen die moleculaire dateringsmethoden ons gebracht hebben met betrekking tot de biogeografie van planten is het belang van lange afstandsverspreiding. Niet zo lang geleden werd vaak aangenomen, dat plantengroepen die op verschillende continenten voorkomen zich van het ene naar het andere continent hebben verspreid in de tijd dat die continenten nog aan elkaar vast zaten.⁶ Afrika en Zuid-Amerika vormden bijvoorbeeld tot zo'n 100 tot 120 miljoen jaar één continent. Een soortengroep die zowel voorkomt in westelijk Afrika als in het oosten van Zuid-Amerika, zou zich dus best wel eens van Afrika naar Zuid-Amerika verspreid kunnen hebben voordat die continenten uit elkaar dreven. De alternatieve verklaring, lange afstandsverspreiding van het ene continent naar het andere in een meer recente tijd waarin de continenten al ver van elkaar verwijderd waren, werd veelal als onwaarschijnlijk afgedaan. Nu we over de mogelijkheid beschikken om verspreidingen met behulp van moleculaire gegevens te dateren, kunnen we deze hypothesen testen: als de verspreiding van Afrika naar Zuid-Amerika bijvoorbeeld 10 miljoen jaar geleden gebeurd is, dan moet dit wel via lange afstandsverspreiding gebeurd zijn, omdat beide continenten sinds ongeveer 100 tot 120 miljoen jaar geleden van elkaar gescheiden zijn. Uit dit soort onderzoek blijkt, dat lange afstandsverspreiding veel algemener is dan eerst gedacht werd en dat we onze ideeën over de verspreidingscapaciteit van soorten dus aan moeten passen.

Moleculaire dateringsmethoden hebben niet alleen een enorme impact aan het vakgebied van de biogeografie gegeven. Ook in andere biologische disciplines leiden deze technieken tot revolutionaire ontdekkingen. We kunnen met behulp van informatie over veranderingen van bepaalde uiterlijke en genetische kenmerken in de tijd bijvoorbeeld ook bepalen hoe snel soorten evolueren en wanneer veranderingen in mutatie-snelheid hebben plaatsgevonden.

DNA en hybridisatie

Hoewel verschillende soorten zich normaal gesproken niet met elkaar voortplanten, gebeurt dit soms toch. Dit proces wordt hybridisatie genoemd. Vaak gaat het om populaties die in de loop van de tijd een periode van elkaar geïsoleerd zijn geraakt, en daardoor zo van elkaar zijn gaan verschillen dat mensen ze als verschillende soorten zijn gaan beschouwen, maar toch nog genoeg genetische overeenkomsten hebben om zich met elkaar voort te kunnen planten als planten van beide groepen dicht genoeg

bij elkaar groeien om te kunnen kruisen. Hybridisatie is voor biologen een erg interessant fenomeen, omdat het een zeldzame gelegenheid geeft om soortsvorming ‘in actie’ te bestuderen. Je zou de soorten die met elkaar hybridiseren namelijk als jonge soorten kunnen zien, die onder sommige omstandigheden op den duur zo van elkaar kunnen gaan verschillen dat ze zich in de toekomst niet meer gezamenlijk voort zullen planten, maar in andere situaties weer samen kunnen smelten tot één soort. Maar om hybriden te kunnen bestuderen, moet je ze wel als zodanig kunnen herkennen! Als plantengroepen wat betreft hun uiterlijke kenmerken zowel wat van één bepaalde soort weg hebben en ook wat van een andere soort, dan kan dit wel eens komen doordat deze plantengroep het resultaat is van hybridisatie tussen beide soorten. Bonte luzerne (*Medicago varia*) is een mooi voorbeeld van een typische hybride. Deze soort is ontstaan uit een kruising tussen Luzerne (*Medicago sativa*) en Sikkelklaver (*Medicago falcata*). De hybride zit wat betreft uiterlijke kenmerken tussen beide soorten in. Luzerne heeft bijvoorbeeld meestal donker blauwe bloemen, Sikkelklaver heeft gele bloemen en Bonte luzerne heeft bloemen die in de knop paarsachtig zijn, daarna groenig worden en tenslotte overgaan in geel. Een vergelijkbaar verschijnsel laat zich zien in de vorm van de vruchten. De vruchten van Luzerne zijn spiraalvormig gewonden met anderhalve tot drieënhalve winding, Sikkelklaver heeft recht tot sikkelvormige vruchten die hoogstens een kwart van een cirkel beschrijven en de vruchten van Bonte luzerne maken een halve tot anderhalve winding.

Soms is het echter een stuk moeilijker om een hybride te herkennen, zeker als het om hybriden gaat tussen soorten die zelf veel variatie in uiterlijke kenmerken vertonen, heel erg op elkaar lijken, of als één van de hybridenvormende oudersoorten uitgestorven is. In zulke gevallen kunnen moleculaire kenmerken goed van pas komen. De hybride tussen Jakobskruiskruid en Waterkruiskruid is een voorbeeld van een moeilijk te herkennen hybride. Dat komt omdat beide soorten niet alleen erg variabel zijn in bijvoorbeeld grootte, bladvorm, aantal bloemhoofdjes en vorm van de bloeiwijze, maar ook omdat planten er vaak atypisch uit zien omdat ze regelmatig op standplaatsen groeien die gemaaid worden. Bovendien lijkt de hybride te groeien in een habitat dat ergens tussen de meestal vrij droge standplaatsen van Jakobskruiskruid en de vochtige standplaatsen van Waterkruiskruid in zit. Daardoor kan het moeilijk zijn om er achter te komen of de uiterlijke verschillen met typische Jakobskruiskruid en Waterkruiskruid planten veroorzaakt door een ongebruikelijke standplaats of door genetische verschillen. Moleculair onderzoek toonde in dit geval echter aan, dat de planten inderdaad hybriden waren, omdat ze zowel soortspecifieke genetische kenmerken van Jakobskruiskruid als Waterkruiskruid bevatten.⁷

Als twee plantensoorten met elkaar kruisen, dan kunnen de hybride-planten die hierdoor ontstaan zich soms ook weer voortplanten met de ‘oudersoorten’. Dit wordt terugkruisen genoemd. Als terugkruising plaats vindt, kan het zelfs nog moeilijker worden om de hybriden van de oudersoorten te onderscheiden. Stel je maar eens voor: als de hybride tussen Jakobskruiskruid en Waterkruiskruid al moeilijk te herkennen is, dan zal dit nog moeilijker zijn als er door terugkruisen ook nog eens planten ontstaan die wat hun uiterlijk betreft tussen de hybride en Jakobskruiskruid of Waterkruiskruid in staan. Dankzij moleculaire methoden weten we dat dit nou precies het geval is geweest in Het Zwanenwater, een natuurgebied in Noord-Holland.

De moleculaire techniek die Heather Kirk en haar Leidse collega's gebruikt hebben om de hybridenvorming tussen Jakobskruid en Waterkruid in Het Zwanenwater te bestuderen geeft zo'n gedetailleerd beeld van dit proces, dat deze onderzoekers er zelfs achterkwamen dat de hybriden meestal met Jakobskruid-planten terugkruisen en dat de kruising tussen een hybrideplant en Waterkruid dus maar zelden plaatsvindt.⁷

Ten slotte

Het gebruik van moleculaire kenmerken in het bestuderen van evolutionaire verwantschappen heeft tot een enorme impuls in de plantensystematiek geleid. Deze relatief nieuwe bron van kenmerken heeft onderzoekers niet alleen meer en betrouwbaarder gegevens geleverd waarmee verwantschappen tussen planten bestudeerd kunnen worden, maar stelt ons ook in staat om meer te begrijpen van de evolutionaire processen die ten grondslag liggen aan deze verwantschappen. Zo kunnen we nu dankzij moleculaire dateringsmethoden soortvormingprocessen, areaaluitbreidingen, en veranderingen in bijvoorbeeld morfologische, anatomische en moleculaire kenmerken in een evolutionair-historische context plaatsen. Daarnaast maken moleculaire gegevens het ook mogelijk om genetische veranderingen in kaart te brengen en daardoor processen zoals soortvorming en hybridisatie beter te kunnen begrijpen.

Hoewel nieuwe inzichten in de verwantschappen van plantensoorten een directe invloed hebben op de naamgeving en indeling van planten, werden de resultaten van moleculair systematisch onderzoek aanvankelijk door veel Flora-schrijvers met argusogen bekeken en zeker niet altijd overgenomen. Met het schrijven van de 23^e editie van de Heukels' Flora was Ruud van der Meijden wereldwijd de eerste Flora-schrijver die besloot om een indeling van plantenfamilies te gebruiken die geheel gebaseerd is op de resultaten van moleculair verwantschapsonderzoek.⁸ Deze beslissing markeert een nieuwe periode in het schrijven van Flora's, waarin zowel uiterlijke als moleculaire kenmerken gebruikt worden om de huidige kennis van de diversiteit en evolutionaire verwantschappen tussen planten zo accuraat mogelijk te presenteren. Bedankt, Ruud!

1. B. Gravendeel, D. Mabberley & R. van der Meijden. 2005. Een andere indeling van plantenfamilies. In: R. van der Meijden, Heukels' Flora van Nederland, pp. 12–19. Wolters-Noordhoff, Groningen/Houten.
2. P.B. Pelser. 2000. Moleculaire evolutie in de systematiek. *Gorteria* 26: 249–250.
3. P.B. Pelser. 2003. De ontmanteling van de Helmkruidfamilie (Scrophulariaceae). *Gorteria* 29: 117–124.
4. P.B. Pelser. 2002. Spoorzoeken in de Orchideeën: naamsveranderingen als consequenties van modern systematisch onderzoek. *Gorteria* 28: 113–118.
5. K. Bremer. 1994. *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Timber Press, Portland.
6. A. de Queiroz. 2005. The resurrection of oceanic dispersal in historical biogeography. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 68–74.
7. H. Kirk, M. Máčel, P.G.L. Klinkhamer & K. Vrieling. 2004. Natural hybridization between *Senecio jacobaea* and *Senecio aquaticus*: molecular and chemical evidence. *Mol. Ecol.* 13: 2267–2274.
8. D. Mabberley, persoonlijke mededeling.