

# Moleculaire systematiek van mossen: stand van zaken met voorbeelden uit de Europese mosflora

Michael Stech (Nationaal Herbarium Nederland/Universiteit Leiden Branch,  
Postbus 9514, 2300 RA Leiden; e-mail: stech@nhn.leidenuniv.nl)

## **Bryophyte molecular systematics – current state of affairs with examples from the European bryoflora**

A brief overview of the current state of bryophyte systematics by using molecular data for inferring phylogenetic relationships of bryophytes and the development of the publication record is given. The impact of molecular data on bryophyte taxonomy and systematics is discussed with an emphasis on the West- and Central-European bryoflora. As an example of how molecular analyses can contribute to resolve difficult species complexes, analyses of DNA sequences (*psbA-trnH* spacer, ITS2) and AFLP fingerprinting of six taxa of the *Hypnum cupressiforme* Hedw. complex are presented.

## **Moleculaire systematiek van mossen: stand van zaken met voorbeelden uit de Europese mosflora**

Dit artikel geeft een kort overzicht van de huidige stand van zaken van de systematiek van de mossen als gevolg van het gebruik van moleculaire data voor het ontrafelen van fylogenetische verwantschappen bij mossen en de ontwikkelingen tot de weergave daarvan in wetenschappelijke publicaties. De consequenties van het moleculair onderzoek voor de taxonomie en systematiek van mossen wordt bediscussieerd met voorbeelden uit de West- en Midden-Europese mosflora. Fylogenetische analyses gebaseerd op DNA-sequenties (*psbA-trnH* spacer, ITS2) en AFLP *fingerprinting* van 6 taxa uit het *Hypnum cupressiforme*-complex laten zien hoe moleculaire analyses kunnen bijdragen aan het ontrafelen van moeilijke soortcomplexen.

## **Inleiding**

De afgelopen twintig jaar heeft moleculair onderzoek een ongekend groot effect gehad op ons begrip van de evolutie van planten en ons geheel nieuwe inzichten gegeven in de fylogenetische verwantschappen tussen plantengroepen op alle taxonomische niveaus variërend van fyla tot soorten en populaties. Moleculaire technieken, zoals het vermenigvuldigen van bepaalde DNA-regio's door de *polymerase chain reaction* (PCR) en geautomatiseerd sequensen, de ontwikkeling van theoretische modellen voor fylogenetische reconstructies en de enorme toename van computer-capaciteit heeft de basis gelegd voor het analyseren van veelal omvangrijke datasets van moleculaire gegevens.

Moleculaire kenmerken komen uit drie verschillende bronnen met moleculaire informatie: (1) sequenties van specifieke coderende of niet-coderende DNA-regio's, (2) de structuurkenmerken van het genoom (bijvoorbeeld de volgorde van de genen, aanwinst of verlies van genen of de plaats en mate van voorkomen van niet-coderende regio's) en (3) genetische 'vingerafdrukken' (*fingerprints*) die vaak geen onderscheid maken van specifieke DNA-regio's, maar informatie geven over het gehele genoom.

Een groot voordeel van moleculaire verwantschapsanalyses bij planten is de mogelijkheid om DNA-sequenties te bepalen van drie verschillende genomen, namelijk kern-DNA, mitochondriaal DNA en chloroplast-DNA.

Van de bloemplanten, die in het huidige geologische tijdperk de meest soortenrijke plantengroep vertegenwoordigen, zijn voor planten de meeste moleculaire gegevens bekend en het grootste aantal wetenschappelijke publicaties over moleculair systematisch onderzoek verschenen. Toch neemt de moleculaire kennis van andere plantengroepen snel toe. Voor mossen is momenteel een grote hoeveelheid moleculaire data beschikbaar. In dit artikel wordt een kort algemeen overzicht gegeven van de huidige stand van zaken met betrekking tot moleculaire fylogenetische verwantschapsanalyses en de gevolgen daarvan voor de inzichten in de taxonomie en de systematiek van mossen, aangevuld met voorbeelden van de gevolgen voor West- en Midden-Europese soorten. Om te laten zien hoe moleculaire analyses een bijdrage kunnen leveren aan het ontrafelen van moeilijke soortcomplexen, worden in dit artikel nieuwe moleculaire gegevens gebruikt om inzicht te krijgen in de fylogenetische verwantschapsrelaties tussen zes taxa uit het *Hypnum cupressiforme*-complex (Gesnaveld klauwtjesmos en verwante soorten).

### **Moleculaire systematiek van mossen**

De eerste DNA-sequenties van mossen werden al in het begin van de jaren tachtig van de vorige eeuw gepubliceerd<sup>1</sup>, maar pas tien jaar later verschenen de eerste fylogenetische verwantschapsreconstructies van mossen die waren gebaseerd op moleculair onderzoek. Bij deze eerste fylogenetische studies stond het onderzoek naar de verwantschapsrelaties tussen de drie hoofdgroepen van de mossen (blad-, lever- en hauwmossen) met die van de andere landplanten centraal (Fig. 1). Hoewel de vroege evolutie van de landplanten nog steeds een belangrijk onderwerp van studie is – en de discussie over de verwantschapsrelaties tussen de blad-, lever- en hauwmossen en de vaatplanten pas recent een consensus heeft bereikt<sup>2</sup> – richten de meeste moleculaire publicaties zich nu op vraagstukken op lagere taxonomische niveaus. Deze vraagstukken gaan bijvoorbeeld over de omgrenzing van families, geslachten en soorten, moleculaire analyses van verspreidingspatronen en de genetische structuur van populaties. Onder meer Goffinet<sup>3</sup>, Quandt & Stech<sup>4</sup>, Shaw & Renzaglia<sup>5</sup> en Stech & Frey<sup>6</sup> hebben een overzicht gegeven van het moleculair systematisch onderzoek en de neerslag daarvan in wetenschappelijke publicaties. Een combinatie van moleculair en morfologisch onderzoek heeft recent geleid tot een herziening van de classificatie van de lever-, blad- en hauwmossen in de 2<sup>e</sup> editie van *Bryophyte Biology*<sup>7</sup> en de 13<sup>e</sup> editie van Engler's *Syllabus of Plant Families*.<sup>8</sup>

Eind 2008 waren er al meer dan 350 wetenschappelijke publicaties verschenen met daarin moleculaire datasets van mossen die zijn gebaseerd op DNA-sequenties en DNA-*fingerprinting*. De voortgang van het ter beschikking komen van moleculaire gegevens van mossen staat weergegeven in Fig. 1. Daarnaast zijn er kleinere aantallen overzichtsartikelen, technische mededelingen, onderzoeken gebaseerd op *fingerprinting* met isozymen en artikelen die zich richten op fylogenetisch onderzoek van andere plantengroepen waarin vertegenwoordigers van mossen een bijrol spelen, die

hier niet in beschouwing worden genomen en niet in Fig. 1 zijn opgenomen. Figuur 1 laat zien, dat het merendeel van de 353 publicaties betrekking heeft op bladmossen (231 publicaties, ca. 65%). Pas de laatste vijf jaar is het aantal publicaties met fylogenetische verwantschapsreconstructies van levermossen gebaseerd op moleculaire data belangrijk toegenomen (tot nu toe 92 publicaties), hoewel slechts een paar grote geslachten in detail zijn bestudeerd, waaronder *Plagiochila* (Varentjesmos).

### Impact van moleculaire analyses met voorbeelden uit de Europese mosflora

Gezien de kosten van moleculair onderzoek is de hoeveelheid kennis die de afgelopen 15 jaar met moleculair onderzoek aan mossen is vergaard bijzonder indrukwekkend. Die kennis heeft geleid tot geheel nieuwe inzichten in de evolutie, de biogeografie, de systematiek en de classificatie van mossen, in het bijzonder die van taxa op het niveau van families en daarboven. Het is daarnaast echter bijzonder interessant om te weten hoe moleculair onderzoek ons idee over geslachts- en soortomgrenzingen heeft veranderd (en gaat veranderen), en hoe zich dat vertaalt naar de floristiek en het natuurbeheer.

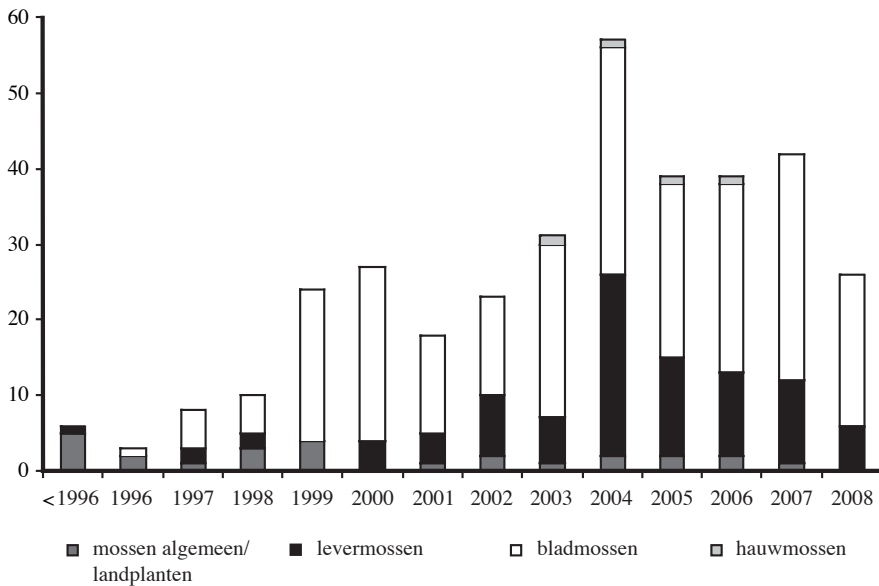


Fig. 1. Het aantal moleculair-systematische publicaties over mossen in de loop van de tijd tot eind 2008. Alleen publicaties met originele datasets die zijn gebaseerd op DNA-sequenties en DNA-*fingerprints* zijn in beschouwing genomen (in totaal 353 publicaties). Niet in beschouwing genomen zijn: publicaties waarin de focus ligt op andere plantengroepen en mossen een bijrol spelen, overzichtsartikelen zonder originele datasets, artikelen over methoden en technieken en publicaties die geheel zijn gebaseerd op *fingerprinting* met isozymen.

De West- en Midden-Europese mosflora is in de wereld het best bekend. De kennis is vastgelegd in taxonomische revisies en een aantal goede Blad- en Levermosflora's en -determinatietabellen. West- en Midden-Europese mostaxa zijn daarmee bij uitstek geschikt voor moleculair onderzoek. Zulk onderzoek kent echter zijn beperkingen. Meestal kan van een groep die wordt bestudeerd alleen maar moleculair onderzoek aan een selectie van taxa uit die groep worden gedaan, omdat niet van ieder taxon voldoende materiaal beschikbaar is. Soms zijn taxa erg zeldzaam en is er simpelweg geen materiaal voor handen. Het sequensen van DNA uit (vaak oud) herbariummateriaal is moeilijk en lukt niet altijd. Van types kan slechts in uitzonderlijke gevallen wat materiaal voor moleculair onderzoek worden opgeofferd, omdat zij niet vervangbaar zijn. Het uitvoeren van taxonomische revisies die geheel zijn gebaseerd op morfologisch én moleculair onderzoek is daarmee problematisch, zeker als het soortenrijke geslachten betreft.

Ondanks deze beperkingen zijn moleculaire kenmerken uitermate nuttig bij het ontrafelen van taxonomische problemen, omdat ze een onafhankelijke set gegevens vormen, die vergeleken kan worden, nee vergeleken moet worden, met de morfologische en anatomische kenmerken die vroeger werden gebruikt voor het beschrijven, omgrenzen en classificeren van taxa. Een goed voorbeeld hiervan voor Europese mossen is het geslacht *Amphidium* (Druiprotmos), waarover vanwege het ontbreken van een peristoom al een lange tijd een discussie bestond of het geslacht nu in de orde Dicranales (met een enkelvoudig peristoom) of in de Orthotrichales (met een dubbel peristoom) moest worden geplaatst. Moleculair onderzoek<sup>9</sup> liet niet alleen zien dat het geslacht in de Dicranales moest worden geplaatst, maar gaf ook nieuw inzicht in de morfologische en anatomische kenmerken die deze classificatie ondersteunen.

Er zijn intussen zelfs een aantal nieuwe soorten beschreven naar aanleiding van moleculair onderzoek, en soms zijn soorten zelfs gebaseerd op moleculaire kenmerken. In sommige gevallen, zoals bij *Platyhypnidium mutatum* Ochyra & Vanderpoorten uit het Zwarte Woud (Duitsland)<sup>10</sup> en *Palustriella pluristratosa* Stech & J.-P. Frahm uit het Zwitserse kanton Wallis<sup>11</sup>, is de soortomgrenzing gebaseerd op morfologische kenmerken, maar is de evolutionaire verwantschap van de betreffende soort, en daarmee de systematische classificatie, vastgesteld door het moleculaire onderzoek. Problematisch is het voorkomen van genetisch sterk verschillende, maar morfologisch identieke populaties binnen morfologische soorten (kryptische 'moleculaire' soorten). Dit fenomeen wordt steeds vaker gevonden.<sup>12-15</sup> Als er enig onderscheid tussen deze populaties gevonden wordt, bijvoorbeeld ecologische variatie, dan kan de omgrenzing van de 'moleculaire' soorten gemakkelijker worden geaccepteerd. Een voorbeeld hiervan is de Nieuw-Zeelandse levermossoort *Treubia lacunosoides* T. Pfeiffer, W. Frey & Stech<sup>16</sup>, een nieuwe soort die op tamelijk open plaatsen groeit en voorheen werd gezien als de 'zonnenvorm' van *Treubia lacunosa* (Colenso) Prosk.

Hoewel het wetenschappelijk gezien volkomen correct zou zijn om kryptische 'moleculaire' soorten te onderscheiden, is het uitermate onpraktisch om dat te doen als het onderscheid alleen maar uit moleculaire kenmerken bestaat. Zelfs als moleculaire stamboomtakken overeenkomen met geografische gebieden, zoals de Oude Wereld en Nieuwe Wereld takken van *Campylopus pilifer* Brid.<sup>13</sup> (Stijf Kronkelsteeltje), dan nog is het aan te raden eerst naar differentiërende, niet-moleculaire kenmerken te zoeken voordat taxonomische beslissingen worden genomen.

Voor natuurbehoud en -beheer is het echter wel belangrijk om kryptische soorten en intraspecifieke moleculaire variatie en het voorkomen en de verspreiding van deze variatie in kaart te brengen, ook als de intraspecifieke vormen geen formele naam hebben. Bij het aanwijzen van natuurgebieden en het vaststellen van natuurbeheersmaatregelen kunnen moleculaire onderzoeksresultaten worden meegenomen om de natuurlijke genetische variatie beter in stand te kunnen houden en te beschermen.

Tot dusver is in het moleculaire onderzoek de meeste aandacht uitgegaan naar de verwantschapsrelaties tussen de drie hoofdgroepen van de mossen en de indeling van hogere taxa. Daarnaast was het onderzoek vooral gericht op bladmosses. Het is dan ook nauwelijks een wonder, dat er geen tot weinig moleculair onderzoek is gedaan aan met name soortenrijke levermosgeslachten, waarvan sommige vertegenwoordigers, zoals *Frullania* (Roestmos), *Jungermannia* (Oortjesmos), *Lophozia* (Trapmos), en *Scapania* (Schoffemos) belangrijke componenten zijn van de Europese mosflora. Hier ligt dan ook een belangrijke taak voor de toekomst.

Een ander groot probleem zijn de soortcomplexen van nauw verwante dan wel intraspecifieke taxa, waarbij verschillende taxonomen en Flora-bewerkers verschillende soortomgrenzingen hanteren. Hieronder wordt *Hypnum cupressiforme* als voorbeeld van zo'n complex gegeven.

### **Gebruik van moleculair onderzoek om soortcomplexen te ontrafelen: *Hypnum cupressiforme* s.l.**

*Hypnum cupressiforme* s.l. is een soortcomplex met een grote morfologische variabiliteit. In de meest recente Europese Flora<sup>17</sup> worden zes soorten onderscheiden: *H. cupressiforme* Hedw. s.str. (Echt klauwtjesmos), *H. lacunosum* (Brid.) G.F.Hoffman ex Brid. (Groot klauwtjesmos), *H. andoi* A.J.E.Sm. (Bosklauwtjesmos), *H. resupinatum* Taylor (Zijdeklauwtjesmos), *H. jutlandicum* Holmen & Warncke (Heideklauwtjesmos) en *H. heseleri* Ando & Higuchi. In de Britse Mosflora<sup>18</sup> wordt bovendien *H. uncinulatum* Jur. op soortsniveau behandeld en wordt *H. imponens* Hedw. (Goudklauwtjesmos) tot het *H. cupressiforme*-complex gerekend, terwijl *H. heseleri* als twijfelachtige soort wordt beschouwd.<sup>19</sup> In de Nederlandse Flora's worden van deze taxa slechts drie<sup>25</sup> (*H. cupressiforme*, *H. jutlandicum* en *H. imponens*) tot vier<sup>26</sup> (*H. cupressiforme*, *H. jutlandicum*, *H. andoi* en *H. imponens*) op soortniveau onderscheiden.

---

→ volgende twee pagina's

Fig. 2. Foto's van het herbariummateriaal van verschillende taxa van het *Hypnum cupressiforme*-complex dat voor de moleculaire analyses voor het ontrafelen van dit soortcomplex is gebruikt. Afgebeeld zijn planten van: de normale en de filiforme-vorm van *H. andoi* A.J.E.Smith s.str., *H. cupressiforme* Hedw. en de lacunosum-vorm van deze soort (ook wel onderscheiden als *H. lacunosum* (Brid.) G.F.Hoffman ex Brid.), *H. jutlandicum* en *H. uncinulatum*. De planten worden bewaard in de Leidse collectie van het Nationaal Herbarium Nederland. De maatstreepjes komen overeen met 1 cm. Foto's: Ben Kieft, Nationaal Herbarium Nederland.



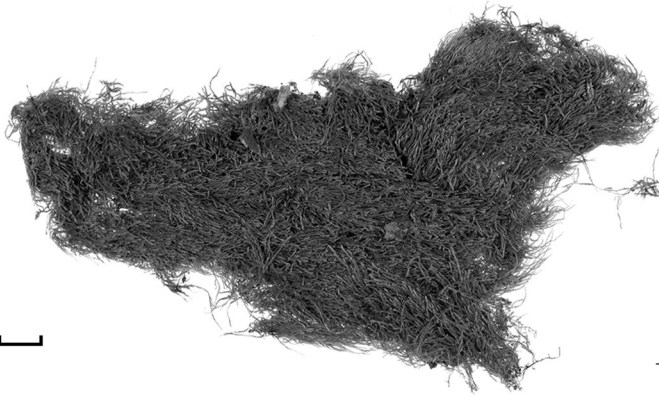
*Hypnum andoi*  
Stech B051105.8  
(= DNA nr 735)



*Hypnum cupressiforme*  
Stech B050323.2  
(= DNA nr 732)



*Hypnum jutlandicum*  
Stech B050323.1  
(= DNA nr 731)



*Hypnum andoi*  
– filiforme-vorm  
*Steck B050323.3*  
(= DNA nr 733)



*Hypnum cupressiforme*  
– lacunosum-vorm  
*Steck 04-198*  
(= DNA nr 518)



*Hypnum uncinulatum*  
*Steck 04-367*  
(= DNA nr 525)

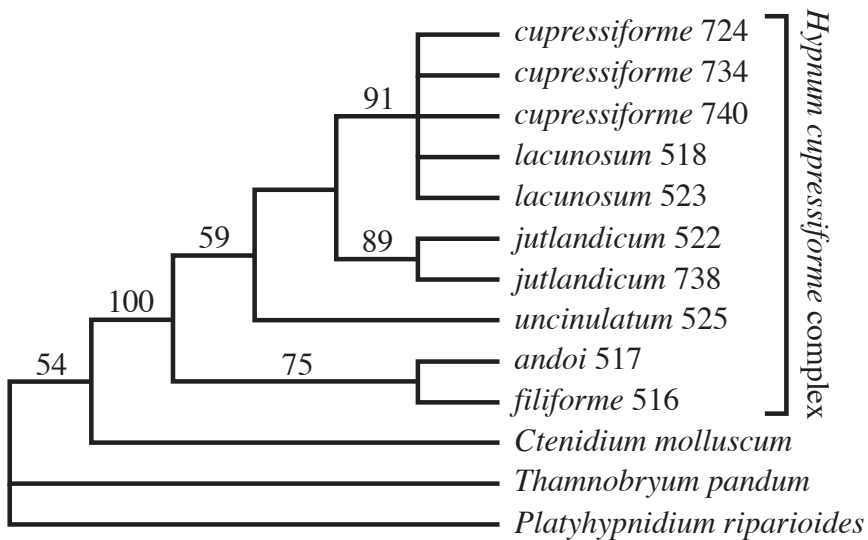


Fig. 3. De enige meest parsimone stamboom<sup>33</sup> uit de DNA-sequentieanalyse van de *psbA-trnH* spacer van het plastide-DNA en ITS2-sequenties van het ribosomaal kern-DNA van herbariummateriaal van 10 *Hypnum*-planten en één plant van *Ctenidium molluscum* (Hedw.) Mitt., met als buitengroepvertegenwoordigers één plant van *Platyhypnidium riparioides* (Hedw.) Dixon en één van *Thamnobryum pandum* (Hook.f. & Wilson) I.G.Stone & G.A.M.Scott. De mate van statistische ondersteuning van de stamboomtakken wordt aangegeven door zogeheten *bootstrap values* (met maximale waarde 100).

De kracht van moleculaire gegevens om moeilijke soortcomplexen te ontrafelen wordt hier gedemonstreerd aan de hand van zes taxa binnen het *Hypnum cupressiforme*-complex: *H. andoi*, *H. cupressiforme*, *H. jutlandicum*, *H. lacunosum*, *H. uncinulatum* en *H. andoi* var. *filiforme* (volgens Smith, 2004<sup>18</sup>; Fig. 2).

Voor het onderzoek werden twee sets moleculaire gegevens met elkaar vergeleken. De ene set omvatte niet-coderende DNA-sequenties van de regio tussen de genen *psbA* en *trnH* (de *psbA-trnH* spacer) van het chloroplastgenoom en de regio tussen de genen 5.8S en 26S (de interne transcribeerde spacer 2) van het ribosomaal kern-DNA. Hiervoor werd herbariummateriaal van tien *Hypnum*-planten gesequencet, met daarnaast materiaal van *Ctenidium molluscum* (Hedw.) Mitt. (Kammos) als een andere vertegenwoordiger van de Hypnaceae, en met *Platyhypnidium riparioides* (Hedw.) Dixon (Waternalms; Brachytheciaceae) en *Thamnobryum pandum* (Hook.f. & Wilson) I.G.Stone & G.A.M.Scott (Thamnobryaceae) als buitengroepvertegenwoordigers. De tweede set gegevens omvatte DNA-fingerprints die zijn gebaseerd op AFLP's<sup>27</sup> van 19 planten van het *Hypnum cupressiforme* complex.

Voor de DNA-fingerprinting en het bepalen van de DNA-sequenties<sup>28</sup> werden de methoden gebruikt die zijn beschreven in Stech & Frey<sup>6</sup>, Stech<sup>29</sup> en Pfeiffer et al.<sup>30</sup>



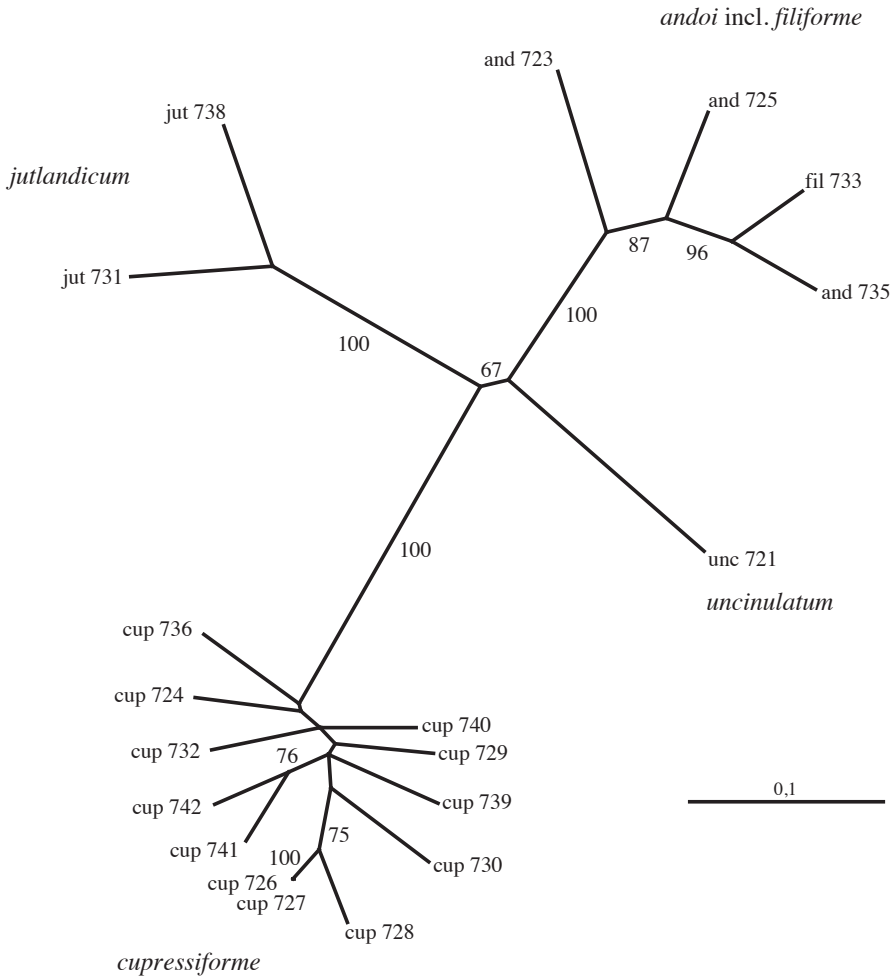


Fig. 4. Neighbor-joining-stamboom<sup>33</sup> van 19 planten van *Hypnum cupressiforme* s.l. gebaseerd op gecombineerde AFLP-fingerprints (primer combinaties M-CTA/E-AAC en M-CTA/E-ACC). De mate van statistische ondersteuning van de stamboomtakken wordt aangegeven door bootstrap values (met maximale waarde 100).

De sequenties zijn handmatig in kaart gebracht met behulp van het computerprogramma PhyDE<sup>®</sup> v0.983.<sup>31</sup> De fylogenetische analyses werden uitgevoerd met het programma winPAUP 4.0b10.<sup>32 33</sup>

De analyses resulteerden in twee reconstructies van verwantschapsrelaties (stambomen) van het *Hypnum cupressiforme*-complex (Fig. 3 & 4). De DNA-sequentieanalyse resulteerde in één meest parsimone stamboom<sup>34</sup> (Fig. 3), waarin

het *H. cupressiforme*-complex met een maximale statistische ondersteuning (100% BS<sup>35</sup>) als een monofyletische groep wordt beschouwd. Binnen deze groep kunnen vier stamboomtakken worden onderscheiden: (1) *H. cupressiforme* s.str. + *lacunosum* (91% BS), (2) *jutlandicum* (89%), (3) *H. andoi* + *filiforme* (75%), en (4) *H. uncinulatum* (verwantschapsrelaties onvoldoende ondersteund). Deze stamboomtakken worden ook in de fenetische stamboom van de AFLP-fingerprintanalyses aangetroffen (Fig. 4), waarbij zowel de tak *H. andoi* + *filiforme*, als die van *H. cupressiforme* s.str. (*H. lacunosum* kon nog niet in de AFLP-analyses worden meegenomen) en *H. jutlandicum* maximaal worden ondersteund (100% BS).

Deze vier groepen zijn moleculair zo sterk van elkaar verschillend dat ze als aparte soorten moeten worden beschouwd, die dus moleculair duidelijk te identificeren zijn: *Hypnum andoi* A.J.E.Smith, *H. cupressiforme* Hedw., *H. jutlandicum* Holmen & Warnke en *H. uncinulatum* Jur. De moleculaire resultaten laten tevens zien, dat de filiforme-vorm moleculair niet verschilt van de normale vorm van *H. andoi* en dat de lacunosum-vorm moleculair niet significant verschilt van *H. cupressiforme* s.str. Deze twee taxa kunnen dan ook hoogstens als intraspecifieke taxa worden onderscheiden. In het geval van *H. lacunosum* ondersteunen de moleculaire gegevens dus de opvatting van de auteurs van de Nederlandse Flora's<sup>25 26</sup>, die dit taxon als niet meer dan een extreme vorm van *H. cupressiforme* beschouwden.

Slanke, bijna draadvormige planten van *Hypnum* met parallele takken en rechte bladen (filiforme-vormen)<sup>36</sup> hebben in het verleden voor veel taxonomische verwarring gezorgd. Zulke planten komen veel voor bij *H. andoi*, maar worden ook aangetroffen bij *H. cupressiforme* (inclusief *H. resupinatum*). Daarnaast worden ook overgangsvormen gevonden tussen zulke planten en de meer karakteristieke vormen van deze soorten. De twee slanke planten die voor dit onderzoek zijn geanalyseerd behoren beide tot *H. andoi*.

## Conclusie en blik op de toekomst

Hoewel het aantal onderzochte taxa en het aantal geanalyseerde planten in het voorliggende onderzoek beperkt is, zijn de resultaten veelbelovend voor een uitgebreider vervolgonderzoek. Bovendien laat het onderzoek zien, dat een moleculaire benadering uitermate geschikt is om soortcomplexen te ontrafelen. Bij *Hypnum* sluiten de moleculaire resultaten vrijwel naadloos aan bij een aantal al bestaande indelingen (ook al omdat in het verleden vanwege de complexiteit voor *Hypnum* veel verschillende classificaties zijn voorgesteld), waaruit dan de classificatie kan worden geselecteerd die het best aansluit bij de topologie van de moleculaire stamboom.

Mocht moleculair onderzoek onverwacht met totaal andere resultaten komen, dan is een gedegen evaluatie van zowel de moleculaire data als de in fylogenetische analyses of classificatie gebruikte morfologische kenmerken noodzakelijk voordat de gevonden resultaten tot een nieuwe classificatie of andere soortomgrenzingen mag leiden. Bij zowel morfologisch als moleculair onderzoek kunnen dezelfde beperkingen en problemen optreden, zoals een te kleine steekproef of te veel homoplasië (zelfde kenmerktoestanden, maar onafhankelijk van elkaar ontstaan) in de gebruikte dataset.

Moleculair onderzoek heeft de afgelopen jaren echter aangetoond, dat in veel gevallen de morfologische en anatomische kenmerken die voorheen waren gebruikt voor het classificeren, geen synapomorfieën zijn, maar in de evolutie zijn ontstaan door convergentie of parallele evolutie. De betreffende, op morfologie gebaseerde classificaties zijn dan geen natuurlijke classificaties, maar kunstmatige classificaties die geen goed beeld geven van de evolutionaire geschiedenis van de geclassificeerde groep. Moleculair onderzoek, uiteraard mits goed uitgevoerd, kan ons een beter beeld geven van de evolutionaire geschiedenis, en daarmee onszelf weer een nieuwe kijk geven op morfologische kenmerken en hun ontstaan. Als gevolg hiervan zullen moleculaire gegevens voor zeker de eerstkomende jaren nog voortdurend onze ideeën over de verwantschapsrelaties tussen organismen bijstellen en veranderen.

1. K. Katoh, H. Hori & S. Osawa. 1983. The nucleotide sequences of 5S ribosomal RNAs from four Bryophyta-species. *Nucl. Acids Res.* 11: 5671–5674.
2. Y.-L. Qiu, L. Li, B. Wang, Z. Chen, V. Knoop, M. Groth-Malonek, O. Dombrowska, J. Lee, L. Kent, J. Rest, G.F. Estabrook, T.A. Hendry, D.W. Taylor, C.M. Testa, M. Ambros, B. Crandall-Stotler, J. Duff, M. Stech, W. Frey, D. Quandt & C.C. Davis. 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 15511–15516.
3. B. Goffinet. 2003. Bibliography of systematic and population genetic studies of Bryophytes based on DNA data II. *Cryptogamie, Bryol.* 25: 181–185.
4. D. Quandt & M. Stech. 2003. Molecular systematics of bryophytes in context of land plant phylogeny. In: A.K. Sharma & A. Sharma (red.) *Plant Genome: Biodiversity and Evolution*. Vol. 1, Part A, pp. 267–295. Science Publishers, Enfield, New Hampshire.
5. J. Shaw & K. Renzaglia. 2004. Phylogeny and diversification of bryophytes. *Amer. J. Bot.* 91: 1557–1581.
6. M. Stech & W. Frey. 2008. A morpho-molecular classification of the mosses (Bryophyta). *Nova Hedwigia* 85: 1–21.
7. B. Goffinet & A.J. Shaw (red.). 2008. *Bryophyte Biology*, ed. 2. Cambridge University Press, Cambridge.
8. W. Frey & M. Stech. 2009. Marchantiophyta, Bryophyta, Anthocerotophyta. In: W. Frey (red.), *Syllabus of Plant Families. A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien*, ed. 13. Part 3. Bryophytes and seedless Vascular Plants. Gebr. Borntraeger, Stuttgart.
9. M. Stech. 1999. A molecular systematic contribution to the position of *Amphidium* Schimp. (Rhabdoweisiaceae, Bryopsida). *Nova Hedwigia* 68: 291–300.
10. R. Ochyra & A. Vanderpoorten. 1999. *Platyhypnidium mutatum*, a mysterious new moss from Germany. *J. Bryol.* 21: 183–189.
11. M. Stech & J.-P. Frahm. 2001. *Palustriella pluristratosa* spec. nov., a new aquatic moss species with pluristratose lamina from Switzerland. *Bot. Helv.* 111: 139–150.
12. A.J. Shaw. 2001. Biogeographic pattern and cryptic speciation in bryophytes. *J. Biogeogr.* 28: 253–261.
13. M. Stech & J. Dohrmann. 2004. Molecular relationships and biogeography of two Gondwanan *Campylopus* species, *C. pilifer* and *C. introflexus* (Dicranaceae). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 98: 415–431.
14. K. Feldberg, H. Groth, R. Wilson, A. Schäfer-Verwimp & J. Heinrichs. 2004. Cryptic speciation in *Herbertus* (Herbertaceae, Jungermanniopsida): Range and morphology of *Herbertus sendtneri* inferred from ITS sequences. *Pl. Syst. Evol.* 249: 247–261.
15. C.C. Fernandez, J.R. Shevock, A.N. Glazer & J.N. Thompson. 2006. Cryptic species within the cosmopolitan desiccation-tolerant moss *Grimmia laevigata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 637–642.
16. T. Pfeiffer, W. Frey & M. Stech. 2002. A new species of *Treubia* from New Zealand based on molecular evidence. *Studies in austral temperate rain forest bryophytes* 20. *Nova Hedwigia* 75: 241–253.

17. J.-P. Frahm. 2006. Mosses. In: W. Frey, J.-P. Frahm, E. Fischer & W. Lobin. The Liverworts, Mosses and Ferns of Europe (red. T.L. Blockeel). Harley Books, Colchester.
18. A.J.E. Smith. 2004. Moss flora of Britain and Ireland, ed. 2. Cambridge University Press, Cambridge.
19. *Hypnum heseleri* werd twintig jaar geleden ontdekt in de omgeving van Saarbrücken (Duitsland) en werd een jaar later ook in de Burgvallen bij het Anlooërdiepje (Drenthe) gevonden.<sup>20 21</sup> Al voor het formele beschrijven van deze soort bestond discussie over diens status. In hetzelfde nummer van het botanische tijdschrift waarin *H. heseleri* door Ando & Higuchi<sup>22</sup> beschreven wordt, laten Van Zanten & Hofman<sup>23</sup> zien, dat deze soort niet meer is dan een abnormale vorm van *H. cupressiforme*; een verkorte versie van dit laatste artikel is ook in het Nederlands verschenen.<sup>24</sup>
20. J.-P. Frahm. 1990. Mysteriöses Moos im Saarland. Bryologische Rundbriefe 2: 7–8.
21. B.O. van Zanten. 1990. Een nieuw mysterieus mos voor de Nederlandse bryoflora. Buxbaumiella 23: 30–36.
22. H. Ando & M. Higuchi. 1994. *Hypnum heseleri* sp. nov. (Hypnaceae), a curious new moss from Europe. J. Hattori Bot. Lab. 75:97–105.
23. B.O. van Zanten & A. Hofman. 1994. On the possible origin and taxonomic status of *Hypnum heseleri* Ando & Higuchi. J. Hattori Bot. Lab. 75: 107–117.
24. B.O. van Zanten. 1993. Nieuwe inzichten in de taxonomie en herkomst van het mysterieuze mos. Buxbaumiella 30: 11–19.
25. A. Touw & W.V. Rubers. 1989. De Nederlandse Bladmossen. Flora en verspreidingsatlas van de Nederlandse Musci (*Sphagnum* uitgezonderd). KNNV Uitgeverij, Utrecht.
26. H. Siebel & H.J. During. 2006. Beknopte mosflora van Nederland en België. KNNV Uitgeverij, Utrecht.
27. AFLP® is de afkorting van *Amplified Fragment Length Polymorphisms*; de bandenpatronen worden gegenereerd met de selectieve *primer*-combinaties M-CTA/E-AAC en M-CTA/E-ACC.
28. De sequenties zijn gedeponeerd in de GenBank database met de volgende toegangsnummers voor de *psbA-trnH* spacer: EU163580, EU163582, EU163585, GQ849566–GQ849575; en de de volgende toegangsnummers voor ITS2: AF231004, AY010311, en GQ849576–GQ849586 (zie: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).
29. M. Stech. 2004. Supraspecific circumscription and classification of *Campylopus* Brid. (Dicranaceae, Bryopsida) based on molecular data. Syst. Bot. 29: 817–824.
30. T. Pfeiffer, E. Zippel, S. Fritz & M. Stech. 2005. Application of the non-radioactive biotin-streptavidin system to visualise AFLP fragments. Mol. Ecol. Notes 5: 673–675.
31. K. Müller, J. Müller, C. Neinhuis & D. Quandt. 2006. PhyDE – Phylogenetic Data Editor, v0.983 (zie: [www.phyde.de](http://www.phyde.de)).
32. D.L. Swofford. 2002. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods) version 4.0b10. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
33. Bij de fylogenetische analyses van de sequentiedata werd het *maximum parsimony*-criterium gebruikt (MP). Hiermee worden de meest parsimone stambomen gevonden, dat wil zeggen de verwantschapsreconstructies die met het kleinste aantal (hypothetische) evolutionaire veranderingen in de sequenties de geanalyseerde sequenties verklaren. Met de AFLP-data werden paarsgewijs de genetische afstanden tussen de verschillende genotypen bepaald en werd vervolgens een fenetische analyse uitgevoerd volgens de *neighbor-joining*-methode (NJ). Zie voor een verdere uitleg van de gebruikte methode: T. Pfeiffer, S. Fritz, M. Stech & W. Frey. 2006. Vegetative reproduction and clonal diversity in *Rhytidium rugosum* (Rhytidiaceae, Bryopsida) inferred by morpho-anatomical and molecular analysis. J. Plant Res. 119: 125–135.
34. Lengte 98 stappen; consistency index 0,898; retention index 0,868.
35. BS = *bootstrap support*, een maat voor de statistische ondersteuning van de stamboomtakken. In alle analyses werden *heuristic bootstrap searches* uitgevoerd (verdere informatie is te verkrijgen bij de auteur).
36. H. Ando. 1992. Studies on the genus *Hypnum* Hedw. (VIII). Hikobia 11: 111–123.