

De verschillende genoomgewichten van Europese *Ficaria* Huds. (Ranunculaceae) duiden op acht soorten

Ben Zonneveld (Naturalis Biodiversity Center, Postbus 9517, 2300 RA Leiden;
e-mail: ben.zonneveld@naturalis.nl)

De verschillende genoom gewichten van Europese *Ficaria* Huds. (Ranunculaceae), duiden op acht soorten

Het gewicht van het DNA in de celkern, zoals gemeten met de flow cytometer met propidium-jodide, is gebruikt om de verwantschappen te bepalen tussen verschillende taxa van het genus *Ficaria* (Ranunculaceae). De hoeveelheid DNA per kern (2C-waarde) varieert voor de diploïden van 12,5 pg tot 23,2 pg. De drie tetraploïden variëren van 30,1 voor *F. chrysocephala* (P.D.Sell) Zonn. comb. nov. tot 36,2 pg voor *F. fascicularis*. Daarom – ondanks de recente literatuur die meestal aan ondersoorten de voorkeur geeft – worden de taxa hier opgevat als soorten. Speenkruid (*F. verna*) zoals oorspronkelijk beschreven door Linnaeus, is waarschijnlijk van Nederlandse of Zweedse oorsprong. Het is een bijna volledig steriele tetraploïde die na de bloei overgaat tot het maken van okselknolletjes. Er is echter geen duidelijk verband voor de andere soorten tussen de ploïdie en het maken van okselknolletjes. De hoeveelheid DNA per kern duidt er op, dat de in Nederland veruit meest algemene *F. verna* waarschijnlijk een allotetraploïde hybride is van de soorten *F. calthifolia* en *F. ambigua* (syn. *F. fertilis*). Het *Ficaria*-materiaal van Oostenrijk (als *F. calthifolia*) heeft 15,5 pg voor het diploïde taxon en precies het dubbele voor de tetraploïd met 31,2 pg (ontvangen als *F. verna*). Een plant van Kazachstan is waarschijnlijk *F. stepporum*. Het zustergeslacht van *Ficaria*, *Coptidium*, heeft 27,0 pg voor een mogelijke triploïde. Bijzonder is de verspreiding van die planten die ongeveer 30 pg DNA per kern hebben. Deze worden gewoonlijk beschouwd als *F. chrysocephala*, maar zijn gemeten van ver van elkaar gelegen gebieden, van Letland, Bulgarije, Kreta, Servië tot Noord-Portugal.

Genoomgrootte wordt hier samen met de beschikbare morfologische en geografische gegevens beschouwd.

Introductie

Speenkruid, *Ficaria* Huds. (Ranunculaceae) is een kleine, overblijvende plant, die vroeg in het voorjaar bloeit. De plant heeft onbehaarde, glanzende en hartvormige bladeren, heldergele bloemen en vormt ondergrondse knolletjes. Speenkruid is door heel Europa, westelijk Azië en Noord-Afrika verspreid, en is ook in de Verenigde Staten, Canada en Nieuw Zeeland ingeburgerd.

De taxonomie van *Ficaria* is moeilijk omdat de planten zowel tussen als binnen de soorten erg variabel zijn. Er is veel discussie of het bij de taxa die kunnen worden onderscheiden om ondersoorten of om soorten gaat.^{1–3} Er was ook veel discussie of het bij de Speenkruiden om een apart geslacht *Ficaria* gaat of om een groep binnen *Ranunculus*. Recent moleculaire onderzoek^{4–7} maakt echter duidelijk, dat *Ficaria* met zijn zustergeslacht *Coptidium* (Prantl) Å.Löve & D.Löve ex Tzvelev een aparte tak vormen buiten *Ranunculus*.

Ranunculus ficaria is voor het eerst beschreven door Linnaeus gebaseerd op Nederlandse of Zweedse planten, en in beide landen groeide toen alleen de tetraploïd. Het artikel van Veldkamp in deze aflevering van *Gorteria* gaat hier nader op in.⁸

Genome sizes of European *Ficaria* Huds. (Ranunculaceae) indicate eight separate species

B.J.M. Zonneveld (Naturalis Biodiversity Center, Postbus 9517, 2300 RA Leiden; e-mail: ben.zonneveld@naturalis.nl)

Genome sizes of *Ficaria* Huds. (Ranunculaceae) indicate eight separate species

Nuclear genome size, as measured by flow cytometry with propidium iodide, was used to investigate the relationships within the genus *Ficaria* Huds. (Ranunculaceae). For the five diploids the genome size (2C) ranges from 12.5 pg to 23.2 pg. The three tetraploids range from 30.1 for *F. chrysocephala* (P.D.Sell) Zonn. comb. nov. to 36.2 pg for *F. fascicularis*. Therefore – despite the recent literature considering them often as subspecies – they are here regarded as species. Lesser Celandine (*F. verna*) as originally described by Linnaeus is probably of Dutch or Swedish provenance. It is a nearly sterile tetraploid with axillary bulbils. For the other species, there seems to be no relation between ploidy and bulbil formation. The amounts of DNA per nucleus suggests that the common tetraploid *F. verna* is probably an allotetraploid with *F. calthifolia* and *F. ambigua* (syn. *F. fertilis*) as parents. The *Ficaria* material from Austria (as *F. calthifolia*) has 15.5 pg for the diploid form and with 31.2 pg precisely double that amount for the tetraploid form (reported as *F. verna*). The plant from Kazakhstan probably belongs to *F. stepporum*. The sister genus of *Ficaria*, *Coptidium*, has 27.0 pg for a likely triploid. Peculiar is the wide distribution of tetraploid plants that have approximately 30 pg. These plants are generally considered to belong to *F. chrysocephala* and come from distantly located areas as northern Portugal, Bulgaria, Crete, Serbia and Latvia.

In this study, the genome sizes are evaluated in combination with available morphological and geographical data.

Introduction

Ficaria Huds. (Ranunculaceae) is a small, early spring-flowering perennial with glabrous, shiny green, heart-shaped leaves, and bright yellow flowers. It forms numerous clavate root tubers. It prefers damp ground and is found throughout Europa, North Africa and western Asia. It is also naturalized in the USA, Canada, and New Zealand.

The taxonomy of *Ficaria* is rather difficult, because the plants show much infraspecific and interspecific morphological variability. Hence, there has been considerable discussion about whether the various *Ficaria* taxa should be treated at infraspecific level or represent separate species.^{1–3} Likewise, there has been a discussion about whether *Ficaria* is best treated as an infrageneric group within the genus *Ranunculus* L. or whether it should be treated as a separate genus. Recent molecular studies^{4–7}, however, have made clear that *Ficaria* with its sister genus *Coptidium* (Prantl) Å.Löve & D.Löve ex Tzvelev form together a branch that is separate from *Ranunculus*.

Ranunculus ficaria was first described by Linnaeus and is probably based on a Dutch or Swedish plant. Only the tetraploid form is found in these countries. This is treated in detail in Veldkamp's paper in this issue of *Gorteria*.⁸

Het aantal chromosomen per kern is in vele *Ficaria*-taxa geteld. Barros Neves⁹ (1942) vond $2n = 16, 24$ en 32 for *Ranunculus ficaria* L. van Coimbra, Portugal. Laegaard¹⁰ berichtte in 1966 over de eerste diploïd in Denemarken, met $2n = 16$, als *F. ambigua* Boreau (syn. *F. fertilis*). Eerder al had Bocher¹¹ $2n = 32$ geteld voor de algemene tetraploïd *F. verna*. Voor Spanje is $2n = 16, 24$ en 32 gerapporteerd voor *F. grandiflora* Robert (syn. *F. ficariiformis*).¹² In Oostenrijk is $2n = 16$ en $2n = 32$ geteld voor *F. calthifolia* Rchb. en *F. verna* susp. *bulbifer* (de laatste waarschijnlijk de tetraploïde vorm van *F. calthifolia*) door Greilhuber.¹³ Marsden-Jones & Turill¹⁴ telden $2n = 32$ voor *F. chrysocephala* (P.D.Sell) Zonn. comb. nov. Voor *F. fascicularis* C.Koch (syn. *F. kochii*) is $2n = 32$ gevonden.¹⁵ In Groot-Brittannië werden zelfs 889 taxa geteld van 222 populaties met voor de diploïd *F. ambigua* (syn. *F. fertilis*) $2n = 16$ en voor de tetraploïd *F. verna* $2n = 32$, tevens werden ook enkele triploïden gevonden.¹⁶ Pogan & Wcislo¹⁷ telden chromosomen in *Ficaria*-taxa van vele Europese landen en hebben ook een goed overzicht gemaakt van wat er al eerder was geteld. Zelfs hexaploïde planten ($2n = 48$) worden soms genoemd.^{3 12}

Veldkamp schreef voor deze aflevering van *Gorteria* een uitstekend verslag van *Ficaria* met een uitgebreide discussie van de nomenclatuur.⁸ Het voorliggende artikel kan beschouwd worden als een uitbreiding en ondersteuning van Veldkamps verhaal gebaseerd op de nieuwe gegevens over de genoomgrootte. In tegenstelling tot de zeven ondersoorten van Veldkamp, zijn er naar mijn mening acht goede Speenkruid-soorten te onderscheiden. Ik laat dat in het vervolg van dit artikel zien.

Om de verwantschap tussen de *Ficaria* taxa verder op te helderen, worden de klassieke taxonomische kenmerken gebaseerd op uiterlijk en spreiding hier aangevuld met gegevens over de hoeveelheid DNA per kern (genoomgrootte). Deze zijn nauwelijks eerder onderzocht bij *Ficaria*. Genoomgrootte werd eerder gemeten in '*Ranunculus ficaria*'^{18–20}, waarbij diploïden met 18,7 tot 21,6 pg, tetraploïden met 31,5 tot 38,2 pg en een triploïd met 28,4 pg werden gerapporteerd. Het ging waarschijnlijk om *F. verna*, *F. ambigua* en hun hybride. Vesely et al.²¹ vonden voor *F. calthifolia* en *F. verna* 12,89 en 29,01 pg.

Voor mijn onderzoek zijn 98 verschillende planten, die alle de hier geaccepteerde soorten omvatten, in totaal 360 maal gemeten om de onderlinge verwantschap voor *Ficaria* beter te kunnen begrijpen. De uitkomsten werden ook vergeleken met die van het circumboreaal-arctische zusterslacht *Coptidium*.

De hoeveelheid DNA per kern wordt gemeten met een flow cytometer met propidiumjodide als fluorescerende stof, dat specifiek het hele DNA kleurt. DAPI, een ander veel gebruikte DNA kleuring, kleurt alleen de A- en T-basen (adenine en thymine) van het DNA, waarvan het gehalte varieert per plantensoort. Ook als alle planten van een geslacht hetzelfde chromosoomgetal hebben, kan toch de hoeveelheid DNA per kern een factor 2–3 verschillen. Dit kan goed helpen om toch de soorten uit elkaar te houden en hybridisatie aan te tonen.²² Greilhuber^{23 24} heeft duidelijk laten zien dat in principe voor elke plant een vaste hoeveelheid DNA per kern wordt gevonden.

De evolutie van de genoomgrootte heeft de laatste jaren meer aandacht gekregen. 'Primitieve' angiospermen worden nu verondersteld een klein genoom gehad te hebben: in verschillende 'moderne' taxa hebben toenames tot een factor 1000 plaatsgevonden.²⁵ Flow cytometry is met succes gebruikt om de genoomgrootte te

Chromosome numbers have been counted for many *Ficaria* taxa. Barros Neves⁹ (1942) reported $2n = 16, 24$ and 32 for *Ranunculus ficaria* L. of Coimbra, Portugal. In 1966 Laegaard¹⁰ found the first diploid in Denmark, with $2n = 16$, as *F. ambigua* Boreau (syn. *F. fertilis*). Earlier, Bocher¹¹ counted $2n = 32$ for the common tetraploid *F. verna*. In Spain $2n = 16, 24$ and 32 has been reported for *F. grandiflora* Robert (syn. *F. ficariiformis*).¹² For Austria $2n = 16$ and $2n = 32$ was counted for *F. calthifolia* Rchb. and *F. verna* susp. *bulbifer* (probably the tetraploid form of *F. calthifolia*) by Greilhuber.¹³ Marsden-Jones & Turill¹⁴ counted $2n = 32$ for *F. chrysocephala* (P.D.Sell) Zonn. comb. nov. For *F. fascicularis* C.Koch (syn. *F. kochii*) $2n = 32$ was found.¹⁴ In the United Kingdom chromosomes were counted extensively in 889 plants from 222 populations, resulting in $2n = 16$ for the diploid *F. ambigua* (syn. *F. fertilis*) and $2n = 32$ for the tetraploid *F. verna*; a few triploid plants ($2n = 24$) were found as well.¹⁶ Pogan & Wcislo¹⁷ counted chromosome numbers in *Ficaria* taxa from many of the European countries and gave a nice overview of the chromosome counts reported in the literature. Even hexaploid plants ($2n = 48$) are occasionally reported.^{3 12}

In this issue of *Gorteria*, Veldkamp wrote an excellent paper on the genus with extensive bibliographical notes and a detailed discussion of the nomenclature. The present article can be considered a DNA-based supportive extension of Veldkamp's work. However, in my opinion the differences in genome size support the recognition of eight separate species within *Ficaria*, not the seven subspecies recognised by Veldkamp.

To elucidate the relationships between *Ficaria* taxa, the classical taxonomic traits based on morphological characters and the geographical distribution are supplemented here with data on nuclear DNA content (genome size). These data have not been investigated in detail before in a systematic study on *Ficaria*. Genome sizes were measured for '*Ranunculus ficaria*'^{18–20}, for which diploids with 18.7 to 21.6 pg, a triploid with 28.4 pg and tetraploids with 31.5 to 38.2 pg were reported, likely based on *F. verna*, *F. ambigua* and their hybrid. Vesely et al.²¹ measured *F. calthifolia* and *F. verna* with 12.89 and 29.01 pg, respectively.

For the present study, 98 different plants representing all *Ficaria* species that are accepted in this study were measured 360 times in an attempt to obtain a better understanding of the relationships within *Ficaria*. The results were also compared with those of the circumboreal arctic sister genus *Coptidium*.

Nuclear DNA content can conveniently be measured by flow cytometry using propidium iodide, a stoichiometric DNA stain that intercalates in the double helix, making the whole DNA fluorescent. DAPI, another DNA stain, colors only the variable content of A- and T-bases of the DNA. Where many species in a genus have the same chromosome number, differences in genome size (DNA 2C-value) have proven to be very effective in delimiting infrageneric divisions in a number of taxa.²² Greilhuber^{23 24} has clearly shown that infraspecific variation of genome size is much less than often assumed.

In recent years, the evolution of genome size has received increased attention. Nowadays, 'primitive' angiosperms are supposed to have had small genomes; in various modern taxa increases in genome size of up to a factor 1000 have independently occurred.²⁵ Flow cytometry was successfully used to measure the 2C-value for the

bepalen voor genera van de Coniferales, *Galanthus* L., *Haworthia* Duval, *Helleborus* L., *Hosta* Tratt., *Narcissus* L., *Nerine* Herb., *Tulipa* L. enzovoorts.^{26–30} In dit artikel wordt getoond, dat genomgrootte voldoende is om onderscheid te maken tussen de acht taxa van *Ficaria* op soortsniveau.

Verschillen in genomgrootte van 1 picogram (pg; 1 picogram = 10^{-12} gram) verkregen met flow cytometry komen overeen met een verschil van bijna 1.000.000.000 DNA-basenparen, niet een aantal die je er overnacht erbij kan krijgen of verliezen. Daarom kunnen de met door flow cytometry bepaalde genomgroottes heel goed cladogrammen (reconstructies van evolutionaire verwantschappen, ‘stambomen’) ondersteunen, die zelf meestal gebaseerd zijn op informatie over slechts een paar duizend basenparen. Daarom is de hoeveelheid DNA per kern (2C-waarde, kortweg genomgrootte genoemd) is hier bepaald voor 98 planten van *Ficaria*. Omdat er verschillen van meerdere picogrammen gevonden zijn tussen de acht taxa, worden alle ondersoorten zoals voorgesteld door Veldkamp in deze aflevering van *Gorteria*⁸ – die zich daarbij baseerde op Sell³¹ – door mij beschouwd als soorten.

Ficaria stepporum P.Smirn. komt voor in Rusland en Kazachstan. Een plant verzameld in Oeralsk (Oral), Noordwest-Kazachstan, behoort waarschijnlijk tot deze soort.

Materiaal en methoden

Plantenmateriaal

Nederlands plantenmateriaal heb ik grotendeels zelf verzameld; buitenlands plantenmateriaal werd door anderen verzameld (zie Bijlage 1). Zoveel mogelijk werden er planten uit het wild gebruikt en er werd voor gezorgd dat de planten goed gedetermineerd werden.

Flow cytometrische metingen van de genomgrootte (2C)

Kernen werden bij voorkeur geïsoleerd van bladstelen. Als die de reis niet hadden overleefd werden broedknollen of wortelknollen gebruikt met een vergelijkbaar resultaat.

Voor het isoleren van kernen werd stukjes bladsteel van 1 cm lengte of stukjes wortelknol of okselknol van 0,5 cm lengte gebruikt. Deze werden samen met een stukje van de interne standaard, *Agave americana* L. ‘Aureomarginata’, fijngehakt (zie onder). Het fijnhakken gebeurde met een nieuw scheermesje in een Petri-schaal in 0,25 ml celkern-isolatie buffer waaraan 0,25 mg RNase/ml was toegevoegd.²⁶ Na het toevoegen van 1,75 ml propidiumjodide-oplossing (50 mg PJ/l in buffer) werd de suspensie gefiltreerd door een nylon filter met openingen van 30 μ m. De fluorescentie van de kernen werd 30 en 60 min na het toevoegen van de propidiumjodide-oplossing gemeten. Hiervoor werd een Partec CA-II flow cytometer gebruikt. De optische weg bevatte een HBO-kwiklamp, filters KG1, BG12, dichroïsche spiegel TK500, filter OG570 en een Leitz 50 \times 1 waterimmersie objectief. De gegevens werden geanalyseerd door middel van DPAC software (Partec GmbH). Het 2C DNA-gehalte van het onbekende materiaal werd berekend als het gemiddelde van de onbekende piek gedeeld door het gemiddelde van de *Agave*-piek en vermenigvuldigd met de genomgrootte van de *Agave*-standaard. Tenminste twee metingen werden gedaan voor elk onbekend monster, met ongeveer 5000 kernen. De meeste histogrammen vertoonden een variatiecoëfficiënt van minder dan 5%. De standaarddeviatie is berekend voor het DNA-gehalte per kern voor elke soort door alle relevante metingen erbij te betrekken.

Interne standaard en absolute hoeveelheid DNA per kern

Bij het meten van de hoeveelheid DNA per kern is het noodzakelijk om het materiaal van de onbekende tegelijk met de interne standaard fijn te hakken. De standaard moet niet al te ver van

genera of the Coniferales, *Galanthus* L., *Haworthia* Duval, *Helleborus* L., *Hosta* Tratt., *Narcissus* L., *Nerine* Herb., *Tulipa* L., etc.^{26–30} In this paper, it is shown that genome size is sufficient to distinguish the eight *Ficaria* taxa at the species level.

Genome size differences of 1 picogram (pg) obtained with flow cytometry amount to a difference of nearly 1,000,000,000 base pairs, not a number that is easily acquired overnight. Hence, genome size data can corroborate cladograms that are based on the sequences of just a few 1,000 base pairs. Therefore, the amount of nuclear DNA (2C value, for short: genome size) was determined for 98 *Ficaria* plants. Because differences in genome size of several pg have been found between the eight taxa that could be recognised in the study, all subspecies accepted by Veldkamp in this issue of *Gorteria*⁸ – who followed Sell's taxonomic treatment³¹ – are recognised here as separate species.

Ficaria stepporum P.Smirn. occurs in Russia and Kazakhstan. A plant collected from Uralsk (Oral), Northwest Kazakhstan, probably belongs to this species.

Materials and Methods

Plant material

Dutch plant material has mainly been collected by myself; plant material from abroad has been collected by other people (see Appendix 1). Where possible, material of known wild origin was used. Care was taken to ensure correct identification of all plants.

Flow cytometric measurement of DNA 2C-value

If available, nuclei were extracted from petioles. If these did not survive the journey, tubers or axillary bulbils were used with similar results.

For the isolation of nuclei, a piece of about 1 cm of the petiole or ½ cm of the tuber was chopped together with a piece of *Agave americana* L. 'Aureomarginata', which is used as an internal standard (see below). The chopping was done with a new razor blade in a Petri dish in 0.25 ml nuclei-isolation buffer to which 0.25 mg RNase/ml was added.²⁶ After adding 1.75 ml propidium iodide solution (50 mg PI/l in buffer) the suspension with nuclei was filtered through a 30 µm nylon filter. The fluorescence of the nuclei was measured half an hour and one hour after addition of propidium iodide, using a Partec CA-II flow cytometer. The optical path contained a HBO mercury lamp, filters KG1, BG12, dichroic mirror TK500, filter OG570 and a Leitz 50 × 1 water immersion objective. Data were analyzed by means of DPAC software (Partec GmbH). The 2C DNA content of the sample was calculated as the sample peak mean, divided by the *Agave* peak mean, and multiplied with the amount of DNA of the *Agave* standard. At least two different samples, with each at least 5000 nuclei, were measured twice for each clone. Most histograms revealed a Coefficient of Variation of less than 5%. The standard deviation was calculated for the DNA content of each species, using all relevant measurements.

Internal Standard and absolute DNA content values

When measuring nuclear DNA content by means of flow cytometry, it is necessary to chop tissue from the plant of interest together with an internal standard: this standard must be as close as possible to the plants of interest. In this way, variation in signal intensities due to staining kinetics, to light absorption and quenching by sample components, as well as to instrument and other variables, is reduced to a minimum. *Agave americana* was chosen as internal standard for *Ficaria*. *Agave americana* is available year-round, can withstand several weeks without water and, being a large plant, a single specimen can serve a lifetime for this purpose, thereby further reducing variation in readings. Furthermore, *Agave* has a low background in propidium iodide measurements and show a single G₀ peak, almost lacking G₂ arrest.

de onbekende af liggen. Op deze manier worden variabelen, zoals variaties in intensiteit van het signaal, lichtabsorptie en quencing door de suspensie zowel als instrumentvariatie tot een minimum beperkt. *Agave americana* 'Aureomarginata' is gekozen als interne standaard voor *Ficaria*. Als vaste plant is *Agave americana* het hele jaar beschikbaar, het maakt niet uit als ze een paar weken geen water krijgt en een enkele plant kan levenslang mee gaan. Hierdoor wordt ook de variatie inherent aan gezaaide standaards voorkomen. *Agave* geeft ook een lage achtergrond met propidiumjodide en heeft een enkele G_0 piek, bijna zonder een G_2 piekje.

Verse menselijke leucocyten van de man ($2C = 7,0$ pg; 1 picogram = 10^{-12} gram = 0.978×10^9 basenparen³²) werd gekozen als primaire standaard.³³ Dit geeft $2C = 15,9$ pg voor kernen van *Agave americana* L. 'Aureomarginata'. Gebaseerd op een gepubliceerde genoomgrootte voor de mens van 6.294×10^9 basenparen werd de genoomgrootte van de mens berekend als $6,436$ pg.³² Dit is echter gebaseerd op een menselijk sequentie, waar grote stukken met herhalingen niet goed gesequenced konden worden. Dus uiteindelijk zal het menselijk genoom misschien niet ver van de 7 pg per kern afliggen.

Resultaten en discussie

Algemeen

De diploïde soorten verschilden tot een factor twee in genoomgrootte. Dit is minder voor de drie tetraploïde soorten. De voornaamste uiterlijke verschillen tussen de soorten zijn de aan- of afwezigheid van okselknolletjes, de ploïdie en de bloemgrootte; de verspreiding is ook een belangrijk kenmerk. Genoomgrootte zoals hier onderzocht (Tabel 1, Bijlage 1), complementeert het werk van Veldkamp in deze aflevering van *Gorteria*⁸, wiens classificatie op uiterlijke kenmerken en verspreiding is gebaseerd.

Het verband tussen diploïde en tetraploïde soorten

Ploïdie lijkt geen belangrijke rol te spelen in de soortsvorming bij *Ficaria*. Eerdere cytologische onderzoeken toonden aan dat meer dan de helft van de soorten diploïd is. Dit wordt hier bevestigd: vijf van de acht soorten zijn diploïd (Tabel 1). Er werden geen triploïden gevonden, hoewel die wel eerder gevonden zijn in Groot-Brittannië, Duitsland, Portugal en Spanje^{9 14 16 31}, waar zowel diploïden als tetraploïden voorkomen.

De hoeveelheid DNA per kern werd gemeten in 98 planten. Het was in de meeste gevallen mogelijk om, gebaseerd op de genoomgrootte, een niet benaamde plant aan een soort toe te wijzen.

Vijf diploïde soorten hadden met DNA gewichten van 12,5, 15,5, 18,4, 20,0, en 23,2 pg per kern behoorlijk grote verschillen. Hetzelfde geldt voor de tetraploïde planten met 29,7, 33,5, en 36,2 pg per kern. De diploïde vorm van *Ficaria calthifolia* in Oostenrijk met 15,5 pg past bij een tetraploïde vorm met 31,3 pg (gewoonlijk toegeschreven aan *F. verna*) van Oostenrijk en ook Polen. Een grote plant van wel 40 cm hoog van Portugal, waar de diploïde en tetraploïde vormen van *F. ficaroides* (Bory & Chaub) Halácsy vermeld worden, is tetraploïd met 34,6 pg. Een diploïde plant van Griekenland die ook als *F. ficaroides* werd geïdentificeerd heeft 18,4 pg per kern.

Ficaria verna lijkt een allotetraploïd te zijn. Zowel *F. ambigua* als *F. verna* komen voor in Groot-Brittannië. Het verdubbelen van de hoeveelheid DNA per kern van *F. ambigua* (20 pg) tot 40 pg, wat een autotetraploïd zou opleveren, duidt echter niet op een verband met de slechts 33,5 pg gevonden voor de tetraploïd *F. verna*.

Fresh male human leucocytes ($2C = 7.0$ pg; (1 picogram = 10^{-12} gram = 0.978×10^9 base pairs³² were chosen as primary standard³³. This yields $2C = 15.9$ pg for nuclei of *Agave americana* L. 'Aureomarginata'. Based on a published male human genome size of 6.294×10^9 base pairs, the nucleus of humans was calculated as containing 6.436 pg.³² However, this is based on a human sequence in which the size of the very large repeat sequences could not accurately be determined. So probably, the genome size of humans is closer to 7 pg than now envisioned.

Results and Discussion

General

The diploid species differ up to a factor 2 in DNA $2C$ -value. This is less for the three tetraploid species. The main morphological distinctions between the species are the presence or absence of tubers, the ploidy, and the flower size; the distribution is also an important discriminating character. Genome size as investigated here (Table 1, Appendix 1), complements Veldkamp's work in this issue of *Gorteria*, whose classification is mainly based on morphological and geographical characters.⁸

The relationship between diploid and tetraploid species

Ploidy does not seem to play a significant role in the speciation processes within *Ficaria*. Earlier cytological investigations on *Ficaria* showed that more than half of the species are diploid. This is confirmed here: five out of the eight species are diploid (Table 1). Triploids were not found, although they have been reported from the United Kingdom, Germany, Portugal, and Spain^{9 14 16 31}, where diploid and tetraploid plants occur as well.

Nuclear DNA content was measured in 98 plants of *Ficaria*. In most cases, it proved to be possible to identify an unknown accession to a certain species solely based on the DNA $2C$ -value.

The genome sizes of five diploid species showed significant differences with, respectively, 12.5, 15.5, 18.4, 20.0, and 23.2 pg. Significant differences are also found for the tetraploid plants with, respectively, 29.7, 33.6, and 36.2 pg. The diploid form of *Ficaria calthifolia* from Austria with 15.5 pg is matched by a tetraploid form with 31.3 pg (usually ascribed to *F. verna*) from the same country and from Poland. A large plant, up to 40 cm, from Portugal, where both the diploid and tetraploid *F. ficaroides* (Bory & Chaub) Halácsy occur, is tetraploid with 34.6 pg. A plant from Greece, which was also identified as *F. ficaroides*, is diploid with 18.4 pg.

Ficaria verna seems to be an allotetraploid. In the United Kingdom, both *F. ambigua* and *F. verna* occur, but simply doubling the genome size of *F. ambigua* (20 pg) results in 40 pg, which seems to be too different from the 33.5 pg measured for the tetraploid *F. verna* to be explained by an autotetraploid origin of the latter. More likely, *Ficaria verna* is the doubled hybrid of *F. ambigua* (20 pg) \times *F. calthifolia* (15.5 pg), although *F. ficaroides* (18.4 pg) as one of the parents cannot be excluded either.

The lowest DNA $2C$ -value is found in a plant collected by De Groot in the vicinity of Uralsk, Northwest Kazakhstan. With only 12.5 pg, the genome size is far below the next value of 15.2 pg measured for *F. calthifolia*. *Ficaria stepporum* has

Tabel 1. Samenvatting van de metingen van de acht *Ficaria*-soorten met hun gemiddelde genomgrootte, de chromosoomaantallen (2n), het aantal metingen, het aantal gemeten planten, de aanwezigheid (+) of afwezigheid (–) van okselknolletjes en de herkomst van de gemeten planten.
* Het chromosoomaantal van *Ficaria stepporum* P.Smirn. is afgeleid van het genomgewicht.

— Summary of the measurements for the eight *Ficaria* species with their average genome size, the chromosome numbers (2n), the number of measurements (#meas.), the number of measured plants (#plants), the presence (+) or absence (–) of axillary bulbils, and the origin of the measured plants.

* The chromosome number of *Ficaria stepporum* P.Smirn. is derived from the genome size.

— Afkortingen / Abbreviations: cv = cultivar, GB = Groot-Brittannië / Great Britain, GR = Griekenland / Greece, NL = Nederland / the Netherlands, NW = Noorwegen / Norway, KAZ = Noordwest-Kazachstan/ Northwest Kazakhstan.

	gemiddeld — average	2n	aantal metingen — #meas.	aantal planten — #plants	oksel- knolletjes — axillary bulbils	herkomst gemeten planten — origin measured plants
? <i>Ficaria stepporum</i> P.Smirn.	12,5	16*	8	1	–	Oeralsk / Uralsk, KAZ
<i>Ficaria calthifolia</i> Rchb.	15,5	16	10	2	–	Oostenrijk / Austria
<i>Ficaria calthifolia</i> Rchb. tetraploid (ontvangen als <i>F. verna</i>)	31,3	32	16	8	+	Oostenrijk / Austria Polen / Poland
<i>Ficaria ficaroides</i> (Bory & C haub) Halaczy	18,4	16	18	5	–	Mnt Chelmos, GR
<i>Ficaria ficaroides</i> (Bory&Chaub) Halaczy tetraploid	34,6	32	4	1	+	Elvas, Portugal
<i>Ficaria ambigua</i> Boreau (ontv. als <i>F. fertilis</i>)	20,0	16	57	18	–	NW, GB (cv), Schotland, Ierland, Spanje, Italië — NW, GB (cv), Scotland, Ireland, Spain, Italy

Het is waarschijnlijker dat het hier gaat om de verdubbelde hybride van *F. ambigua* (20 pg) met *F. calthifolia* (15,5 pg), ofschoon *F. ficaroides* (18,4 pg) als een van de ouders niet uit te sluiten is.

Veruit de kleinste hoeveelheid DNA per kern is gevonden voor een plant uit Oeralsk, Noordwest-Kazachstan, verzameld door Jacques de Groot. Met slechts 12,5 pg is de hoeveelheid ver beneden de daarop volgende waarde van 15,2 pg van *Ficaria calthifolia*.

	gemiddeld — average	2n	aantal metingen — #meas.	aantal planten — #plants	oksel- knolletjes — axillary bulbils	herkomst gemeten planten — origin measured plants
<i>Ficaria grandiflora</i> Robert (ontv. als <i>F. ficariiformis</i>)	23,2	16	25	6	+ !	Spanje (cv) — Spain (cv)
<i>Ficaria chrysocephala</i> (P.D.Sell) J.F.Veldkamp	30,1	32	24	7	– !	Portugal, Servië, Bulgarije, GR, Letland, Frankrijk — Portugal, Spain, Serbia, Bulgaria, GR, Latvia, France (cv)
<i>Ficaria verna</i> Huds. (<i>F. ambigua</i> × <i>calthifolia</i> ?)	33,5	32	174	46	+	NW, NL, GB, Schotland, Ierland, België, Frankrijk, Zwitserland, Portugal — NW, NL, GB, Scotland, Ireland, Belgium, France, Switzerland, Portugal
<i>Ficaria fascicularis</i> C.Koch (ontv. als <i>F. kochii</i>)	36,2	32	8	1	– !	Kaukasus — Caucasus
<i>Ficaria ambigua</i> × <i>grandiflora</i> ?	22,1	16*	16	3	–	GB: Brazen Hussy, Cupreus, Auriant- tiaca
cf. <i>Coptidium</i> × <i>spitsbergense</i>	27,0	24*	4	1		Spitsbergen (Svalbard, NW)

been considered a synonym of *F. calthifolia*, but is treated as a separate species here. *Ficaria stepporum* occurs in Russia and Kazakhstan. Based on this distribution, the plant from Uralsk, Northwest Kazakhstan, probably belongs to this species (Fig. 1).

In most cases polyploidy as such is not an argument (any longer) to assign a taxon specific status. Therefore, I have refrained to separate the tetraploid forms from the diploid ones and did not provide them with a different name.

Fig. 1. Verspreiding van *Ficaria stepporum* P.Smirn. in Europa. Het kaartje is gebaseerd op Fig. 6 van het artikel van Veldkamp in deze aflevering van *Gorteria*.⁸ De vindplaats van de plant uit Oeralsk, Noordwest-Kazachstan (zie tekst), wordt weergegeven met een driehoekje.

— Distribution of *Ficaria stepporum* P.Smirn. in Europe. The map is based on Fig. 6 in Veldkamp's paper in this issue of *Gorteria*.⁸ The location of the plant from Uralsk, Northwest Kazakhstan, is marked with a triangle. — Kaartje / Map: Hans Kruijer.

Ficaria stepporum wordt soms beschouwd als een synoniem van *F. calthifolia*, maar vanwege het grote verschil in hoeveelheid DNA per kern wordt hij hier als een aparte soort opgevat. *Ficaria stepporum* komt voor in Rusland en Kazachstan. Gezien deze verspreiding behoort de plant uit Oeralsk waarschijnlijk tot deze soort (Fig. 1).

In de meeste gevallen wordt polyploidie op zich niet meer gezien als een argument om een taxon als een aparte soort te beschouwen. Daarom heb ik er van afgezien om de tetraploïde vormen als apart van de diploïden te onderscheiden en een andere naam te geven.

Ook is *Ficaria* vergeleken met haar circumboreaal-arctische zuster geslacht *Coptidium*, waarvan materiaal is verzameld door Michael Stech en Hans Kruijer op Spitsbergen. Hierbij werd 27,0 pg per kern gemeten. De zeldzame *C. lapponicum* (L.) Tzvelev met gele bloemen is diploïd en de nog zeldzamere *C. pallassii* (Schltdl.) Tzvelev met witte bloemen is tetraploïd.¹⁵ Als het geoorloofd is om op de genomgroottes van *Ficaria* af te gaan, dan zou het bij de planten van Spitsbergen kunnen gaan om de triploïde *C. xspitbergense* (Hadac) Lufarov & Probe met bleekgele bloemen, ook omdat dit het op Spitsbergen meest voorkomende *Coptidium*-taxon is.

Okselknolletjes

In een kunstmatig gemaakte tetraploïde van de diploïde *Ficaria ambigua* werden geen okselknolletjes gevonden.³⁶ De kunstmatige tetraploïde had ook een lagere stuifmeelfertiliteit van 30% vergeleken met de algemene tetraploïde *F. verna* met een stuifmeelfertiliteit van 70%. Omdat allotetraploïden vaak meer fertiel zijn, lijkt dit nog een indicatie dat het bij *F. verna* om een allotetraploïd gaat.

Het is ook aangetoond dat tetraploïden op meer schaduwrijke plekken voorkomen. De veronderstelling is, dat daar dan meer tijd is om de okselknolletjes te laten groeien, omdat de planten langer groen blijven.³⁵ Opvallend is ook, dat er geen verband is tussen het hebben van okselknolletjes en het ploïdieniveau³¹ (Tabel 2). De meest algemene soort, *Ficaria verna* (tetraploïd), heeft okselknolletjes. Dit heeft er toe geleid, dat bijna elke Speenkruidplant met broedbolletjes *F. verna* (of *Ranunculus ficaria*) werd genoemd. Van de diploïde *F. grandiflora* Robert wordt echter gezegd, dat hij okselknolletjes heeft, terwijl de tetraploïden *F. chrysocephala* en *F. fascicularis* geen okselknolletjes lijken te hebben.³⁵ Men kan zich afvragen of de grote geografische verspreiding van *F. chrysocephala*, van Portugal via Griekenland tot Letland, niet duidt op meerdere soorten met vergelijkbare hoeveelheden DNA per kern.



The genome size of *Ficaria* has also been compared with that of the circumboreal arctic sister genus *Coptidium*. Material of this genus from Spitsbergen, collected by Stech and Kruijer, was measured and possessed 27.0 pg. The rare *C. lapponicum* (L.) Tzvelev with yellow flowers is diploid and the even rarer *C. pallasi* (Schtdl.) Tzvelev with white flowers is tetraploid.¹⁵ If it is allowed to use the 2C-values of *Ficaria* as an indication, the obtained value for the Spitsbergen material suggests that our plant is the triploid *C. ×spitbergense* (Hadac) Lufarov & Probe, which has pale yellow flowers and is also by far the most common *Coptidium* on Spitsbergen.

Axillary bulbils

In artificial tetraploids of *Ficaria ambigua*, obtained by doubling the number of chromosomes, no axillary bulbils were found.³⁶ The artificial autotetraploids had also a lower pollen fertility, 30% versus 70% for the common tetraploid *F. verna*. In addition to the amount of DNA per nucleus, this also suggest that *F. verna* is of allotetraploid origin.

It has been shown that tetraploids prefer more shaded places. Plants in shaded places have more time to produce axillary bulbils, because their growing season is longer and they remain longer green.³⁵ Peculiar is the fact that there seems to be no correlation between ploidy and axillary bulbil production.³¹ The most common species, *Ficaria verna* (tetraploid), has bulbils. As a consequence, nearly all *Ficaria* plants with axillary bulbils were identified as *F. verna* (or *Ranunculus ficaria*). The diploid *F. grandiflora* Robert, however, is said to have axillary bulbils as well. On the other hand, axillary bulbils seem to be absent from the tetraploid species *F. chrysocephala* and *F. fascicularis*.³⁵ Because of the large distribution area of *F. chrysocephala*, ranging from Portugal via Greece to Latvia, one might speculate which overlooked species with similar genome sizes might be masquerading under that name.

Taxonomische gevolgen

Rekening houdend met Veldkamps gegevens in deze aflevering van *Gorteria*⁸ en de nieuwe gegevens die uit het flow cytometer-onderzoek zijn voortgekomen, worden hier acht *Ficaria*-soorten onderscheiden. Deze soorten zijn gebaseerd op de zeven ondersoorten die door Jan-Frits Veldkamp in deze aflevering van *Gorteria* worden onderscheiden.⁸ *Ficaria stepporum* is hier, vanwege de genoomgrootte van de plant uit Kazachstan, ook als een aparte soort beschouwd, maar wordt door Jan-Frits Veldkamp voorlopig als synoniem van subsp. *calthifolia* gezien.⁸

1. *Ficaria verna* Huds.

Synoniem / Synonym — *Ficaria verna* Huds. subsp. *verna*

Verspreiding — West-Europa tot Centraal-Azië. Verwilderd in Canada, de Verenigde Staten³⁴ en Nieuw-Zeeland.

Distribution — West Europe to Central Asia. Naturalized in Canada, the USA³⁴, and New Zealand.

2. *Ficaria calthifolia* Rchb.

Synoniem / Synonym — *Ficaria verna* Huds. subsp. *calthifolia* (Rchb.) Rchb. ex Nyman

Verspreiding — Midden- tot Oost- en Zuidoost-Europa. Verwilderd in de Verenigde Staten³⁴ en Nieuw Zeeland.

Distribution — Central Europe to East and Southeast Europe. Naturalized in the USA and New Zealand.

3. *Ficaria chrysocephala* (P.D.Sell) Zonn., comb. nov.

Synoniem / Synonym — *Ficaria verna* Huds. subsp. *chrysocephala* (P.D.Sell) Stace

Basioniem / Basionym — *Ranunculus ficaria* L. subsp. *chrysocephalus* P.D.Sell, Bot. J. Linn. Soc. 106: 117. 1991. — Type: *W.T. Stearn, 4 Apr 1931* (CGE, holotype).

Verspreiding — Griekenland, Kreta. Planten met vergelijkbare genoomgewichten ook in Portugal, Spanje, Bulgarije, Servië, Letland en Ierland (Tabel 1). In cultuur en verwilderd in de Verenigde Staten.³⁴

Distribution — Greece, Crete. Plants with similar genome sizes also in Portugal, Spain, Bulgaria, Serbia, Latvia, and Ireland (Table 1). Cultivated and naturalized in the USA.³⁴

4. *Ficaria ambigua* Boreau

Synoniem / Synonym — *Ficaria verna* Huds. subsp. *fertilis* (A.R.Clapham ex Laegaard) Stace

Verspreiding — Zuidwest-Noorwegen, Groot-Britannië, Frankrijk; zeldzaam in België en Nederland. Planten met vergelijkbare genoomgewichten ook in Italië, Spanje, en bij meerdere cultivars in Groot-Britannië (Tabel 1).

Distribution — Southwest Norway, United Kingdom, France; rare in Belgium and naturalizing in the Netherlands. Plants with similar genome sizes also in Italy, Spain, and of several cultivars in Great Britain (Table 1).

Taxonomic implications

Based on the data provided by Veldkamp in this issue of *Gorteria*⁸ and the new genome size data obtained in this study, eight *Ficaria* species are recognised here. This classification is based on Veldkamp's seven subspecies of *Ficaria verna* in this issue of *Gorteria*.⁸ However, based on the genome size of the plant from Kazakhstan, *F. stepporum* is provisionally accepted here as a separate species, and excluded from *F. verna* subsp. *calthifolia* sensu Veldkamp.⁸

5. *Ficaria grandiflora* Robert

Synoniem / Synonym — *Ficaria verna* Huds. subsp. *ficariiformis* (F.W.Schulz) Soó

Verspreiding — Middellandse Zee-gebied (Marokko, Algerije, Tunesië, Libië, Portugal, Spanje, Italië, Malta, oostkust van de Adriatische Zee, de zuidoostelijke Balkan en rond de Egeïsche Zee, Kreta, Turkije, Cyprus, West-Syrië, Libanon en Noord-Israël). Verwilderd in Groot-Brittannië³⁷, de Verenigde Staten³⁴ en Nieuw-Zeeland.

Distribution — Mediterranean (Morocco, Algeria, Tunisia, Libya, Portugal, Spain, Italy, Malta, the eastern coast of the Adriatic Sea, the southeastern Balkans and around the Aegean Sea, Crete, Turkey, Cyprus, West Syria, Lebanon, North Israel). Naturalized in Great Britain³⁷, the USA³⁴, and New Zealand.

6. *Ficaria ficarioides* (Bory & Chaub.) Halácsy

Synoniem / Synonym — *Ficaria verna* Huds. subsp. *ficarioides* (Bory & Chaub.) Veldk.

Verspreiding — Griekenland, Karpathos, Zuid-Turkije.

Distribution — Greece, Karpathos, South Turkey.

7. *Ficaria fascicularis* C.Koch

Synoniem / Synonym — *Ranunculus kochii* Ledeb. — *Ficaria verna* Huds. subsp. *kochii* (Ledeb.) Veldk.

Verspreiding — Kaukasus, Zuid-Turkije (Anatolië) tot Irak en Iran.

Distribution — Caucasus, South Turkey (Anatolia) to Iraq and Iran.

8. ?*Ficaria stepporum* P.Smirn.

Verspreiding — Rusland, Kazachstan.

Distribution — Russia, Kazakhstan.

Opmerking: de voor dit onderzoek gemeten plant (*J.J. de Groot s.n., 2013*) uit Noordwest-Kazachstan behoort waarschijnlijk tot deze soort.

Note: Our plant (*J.J. de Groot s.n., 2013*) from Northwest Kazakhstan probably belongs to this species.

Conclusies

Flow cytometry kan worden beschouwd als een snelle en goedkope manier om voor de systematiek relevante gegevens te genereren. Bovendien kan het levend materiaal, zoals geïmporteerde bollen, meten zonder dat er uiterlijk veel te zien is.

Het verschil tussen de laagste en hoogste hoeveelheid DNA per kern bij de diploïden van *Ficaria*, 12,5 versus 23,2 pg, is 10,7 pg. Dit bijna 100 % verschil moet – bij hetzelfde ploïdie-niveau – het resultaat zijn van een groot aantal genetische veranderingen. Afhankelijk van de grootte van het genoom komt 1 pg ongeveer overeen met enkele duizenden genen. Daarom kan men niet zeggen dat flow cytometry een taxonomie oplevert die op slechts één eigenschap berust.

Het grootste genoom in diploïde *Ficaria* heeft ongeveer 10^{10} meer basenparen dan het kleinste en heeft dus gemiddeld chromosomen die twee keer zo groot zijn. De gegevens zoals hier gepresenteerd, komen grotendeels overeen met de meest recente classificatie van *Ficaria*.

Sommige cultivars, zoals men die vooral in Groot-Britannië kweekt, kunnen op grond van hun genoomgrootte het best verklaard worden als vormen van de diploïde *Ficaria ambigua*. Andere cultivars, met wat meer DNA per kern, lijken beter te passen bij de hybride *F. ambigua* × *grandiflora*. De diploïdie van ongeveer 30% van de planten in Groot-Britannië is, denk ik, de reden dat afwijkende vormen wel daar gevonden worden, maar niet in Nederland (het komt niet omdat er te kort Speenkruid is in Nederland). Pas in 1976 is er in Nederland een diploïde, waarschijnlijk ingevoerde *Ficaria* gevonden.³⁶

Dankwoord

Alle mensen zoals genoemd in Bijlage 1 worden hartelijk bedankt voor hun bijdragen. Jacques J. de Groot wordt bedankt voor zijn speciale inspanning om materiaal te verzamelen van *Ficaria* in Noordwest-Kazachstan. Ik wil ook Jan-Frits Veldkamp bedanken voor diens nomenclatorische onderzoek, waarop dit artikel ook is gebaseerd.

Conclusions

Flow cytometry can be considered a quick and useful method to produce data that are relevant to systematics. Moreover, the method can be used to investigate imported bulbs, precluding the need to grow them to maturity for identification purposes. Flow cytometry as a taxonomic and diagnostic tool is applicable even in the case of dormant bulbs or sterile plants, and therefore has applications for conservation monitoring.

In *Ficaria*, the difference between the highest and lowest DNA content, 12.5 versus 23.2 pg, for the diploids is 10.7 pg. This nearly 100% difference in DNA content – within the same ploidy level – must have resulted from a vast number of genomic changes. Depending on the size of the total genome, 1 picogram corresponds with thousand genes. Taxonomy based on flow cytometry results is, therefore, not a one-character based taxonomy.

The largest genome in *Ficaria* contains roughly 10^{10} more base pairs than the smallest genome and has chromosomes that are on average twice as long. The data presented here for the nuclear DNA content agrees in most respects with the most recent classification of *Ficaria*.

A few cultivars, in particular those cultivated in the United Kingdom, can best be explained as being forms of the diploid *Ficaria ambigua*. Others could be *F. ambigua* × *grandiflora* hybrids. The diploidy of about 30% of the plants in the United Kingdom is likely the reason that deviating forms (mutants) occur fairly frequently there. Such deviating forms are not known from the Netherlands, probably because of the absence of diploids. The first diploid in the Netherlands was found in 1976 and has probably been introduced there.³⁶

Acknowledgements

We thank all the people as mentioned in Appendix 1 who combined a Mediterranean holiday with some collecting trips. Also Jacques de Groot is thanked for making a special effort to collect the material of *Ficaria* in NW Kazakhstan. I also like to thank J.F. Veldkamp for performing the nomenclatural groundwork on which this article is based.

EINDNOTEN / ENDNOTES

1. G. Hegi. 1911. *Illustrierte Flora von Mittel-Europa* 3: 384. Lehman, München.
2. T.G. Tutin. 1964. In: T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.H. Valentine, S.M. Walters & D.A. Webb (red.), *Flora europaea* 1. Lycopodiaceae to Platanaceae: 233–234. Cambridge University Press, Cambridge.
3. R. Soó & A. Borhidi. 1966. Über einige Formenkreise der ungarischen und karpatischen Flora IV. *Ficaria*. *Ann. Univ. Sci. Budapest Rolando Eötvös, Sect. Biol.* 8: 297–300.
4. E. Hörandl, O. Paun, J.T. Johansson, C. Lehnebach, T. Armstrong, L. Chen, P. Lockhart. 2005. Phylogenetic relationships and evolutionary traits in *Ranunculus* s.l. (Ranunculaceae) inferred from ITS sequence analysis. *Molec. Phylogen. Evol.* 36: 305–327.
5. O. Paun, C. Lehnebach, J.T. Johansson, P. Lockhart & E. Hörandl. 2005. Phylogenetic relationships and biogeography of *Ranunculus* and allied genera Ranunculaceae in the Mediterranean region and in the European alpine system. *Taxon* 54: 911–930.
6. C.A. Lehnebach, A. Cano, C. Monsalve, P. McLenachan, E. Hörandl & P. Lockhart. 2007. Phylogenetic relationships of the monotypic Peruvian genus *Laccopetalum* (Ranunculaceae). *Pl. Syst. Evol.* 264: 109–116.
7. K. Emadzade, C. Lehnebach, P. Lockhart & E. Horandl. 2010. A molecular phylogeny, morphology and classification of genera of Ranunculeae (Ranunculaceae). *Taxon* 59(3): 809–829.
8. J.F. Veldkamp. 2015. De nomenclatuur van Speenkruiden (*Ficaria verna* Huds. s.l., Ranunculaceae). *Gorteria* 37: 84–116. (Deze aflevering van *Gorteria*).
9. J. Barros Neves. 1942. Sobre a cariologia de *Ranunculus ficaria* L. *Bot. Soc. Brot., Ser. 2*, 16: 169–181.
10. S. Laegaard. 1966. *Ranunculus ficaria* ssp. *fertilis* in Denmark. *Bot. Tidskr.* 61: 295–297.
11. T.W. Böcher. 1938. Cytological studies in the genus *Ranunculus* L. *Dansk Bot. Ark.* 9: 1–33.
12. J.C. Diosdado & J.E. Pastor. 1996. Consideraciones citotaxonomicas del genero *Ranunculus* L. (Ranunculaceae) and la peninsula Iberica. *An. Jard. Bot. Madrid* 54: 166–178.
13. J. Greilhuber. 1974. Ein Chromosomensatz von *Ranunculus ficaria* ssp. *calthifolius*. *Mitt. Bot. Arbeitsgem. Oberösterreich.-Landesmus. Linz.* 6: 3–6.
14. E.M. Marsden-Jones & W.B. Turrill. 1952. Studies on *Ranunculus ficaria*. *J. Genetics* 50: 522–534.
15. A. Löve & D. Löve. 1982. Reports. In: A. Löve (red.), *IOPB chromosome number reports LXXXVI*. *Taxon* 31: 583–587.
16. J.B.B. Gill, B.M.G. Jones, C.J. Marchant, J. Mcleish, & D.J. Ockendon. 1972. The distribution of chromosome races of *Ranunculus ficaria* L. in the British Isles. *Ann. Bot. (Oxford)* 36: 31–47.
17. E. Pogan & H. Weislo. 1975. Studies in *Ranunculus ficaria* L. III. Karyotype analysis. *Acta Biol. Cracov., Ser. Bot.*, 18: 79–102.
18. D. Goepfert. 1974. Karyotypes and DNA content in species of *Ranunculus* L. and related genera. *Bot. Not.* 127: 464–489.
19. P.D. Smith & M.D. Bennett. 1975. DNA variation in the genus *Ranunculus*. *Heredity* 35: 231–239.
20. B.J.M. Zonneveld, I.J. Leitch & M.D. Bennett. 2005. First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. *Ann. Bot. (Oxford)* 96: 229–244.
21. P. Vesely, P. Bures, P. Smarda & T. Pavlicek. 2011. Genome size and DNA base composition of geophytes: the mirror of phenology and ecology? *Ann. Bot. (Oxford)* 109: 65–75.
22. D. Ohri. 1998. Genome size variation and plant systematics. *Ann. Bot. (Oxford)* 82, Suppl. A: 750–812.
23. J. Greilhuber. 1998. Intraspecific variation in genome size: A critical reassessment. *Ann. Bot. (Oxford)* 82, Suppl. A: 27–35.
24. J. Greilhuber. 2005. Intraspecific variation in genome size in angiosperms, identifying its existence. *Ann. Bot. (Oxford)* 95: 91–98.

25. I. Leitch, M.W. Chase & M.D. Bennett. 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Ann. Bot.* 82 (Oxford), Suppl. A: 85–94.
26. B.J.M. Zonneveld & F. van Iren. 2001. Genome size and pollen viability as taxonomic criteria: Application to the genus *Hosta*. *Plant Biol.* 3: 176–185.
27. B.J.M. Zonneveld. 2008. The systematic value of nuclear DNA content for all species of *Narcissus* L. (Amaryllidaceae). *Pl. Syst. Evol.* 275: 109–132.
28. B.J.M. Zonneveld. 2009. The systematic value of nuclear genome size for all species of *Tulipa* L. (Liliaceae). *Pl. Syst. Evol.* 281: 217–245.
29. B.J.M. Zonneveld. 2012. Conifer genome sizes of 172 species, covering 64 out of 67 genera, range from 8 to 72 picogram. *Nordic J. Bot.* 30: 490–502.
30. B.J.M. Zonneveld. 2014. Nuclear genome sizes of 343 accessions of wild collected *Haworthia* and *Astroloba*, Asphodelaceae, Aloolioideae, compared with the genome sizes of *Chortolirion*, *Gasteria* and 83 *Aloe* species. *Pl. Syst. Evol.* 301, 3: 931–953.
31. P.D. Sell. 1994. *Ranunculus ficaria* L. sensu lato. *Watsonia* 20: 41–50.
32. J. Doležel, H. Bartos, H. Voglmayer, & J. Greilhuber. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51a: 127–128.
33. T.R. Tiersch, R.W. Chandler, S.S.M. Wachtel & S. Ellias. 1989. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry* 10: 706–710.
34. A.R. Post, A. Krings, W.A. Wall & J.C. Neal. 2009. Introduced lesser celandine *Ranunculus ficaria*, Ranunculaceae and its putative subspecies in the United States: a morphometric analysis. *J. Bot. Res. Inst. Texas* 3:193–209.
35. G.G. Nicholson. 1983. Studies on the distribution and the relationship between the chromosome races of *Ranunculus ficaria* L. in S.E. Yorkshire. *Watsonia* 14: 321–328.
36. T.W.J. Gadella. 1977. Diploid *Ranunculus ficaria* L. in the Netherlands. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. C.* 80: 80–82.
37. C. Stace. 2010. *New Flora of the British Isles*, ed. 3. Cambridge University Press, Cambridge.

Bijlage 1 / Appendix 1

— Metingen van *Ficaria*-soorten met hun genoomgewicht (2C-waarde) bepaald uit een aantal metingen (n), het gemiddelde genoomgewicht van de soort (GW), de standaarddeviatie (SD), en de herkomst en de verzamelaars van de betreffende collectie (BZ = Ben Zonneveld, de auteur).

— Measurements of *Ficaria* species with their genome sizes (2C value) based on a number of measurements (n), the average genome size of the species (GW), the standard deviation (SD), and the origin and the collector of the collections measured for this study.

— Afkortingen / Abbreviations: BZ = Ben Zonneveld (de auteur / the author), cv = cultivar, GB = Groot-Brittannië / Great Britain, GR = Griekenland/Greece, NL = Nederland / the Netherlands, NW = Noorwegen / Norway, KAZ = Noordwest-Kazachstan/ Northwest Kazakhstan.

2C-waarde — 2C value	GW	SD	n	herkomst — origin	verzamelaar(s) — collector(s)
<i>?FICARIA STEPPORUM</i>					
12,5	12,5	0,27	8	KAZ, Oeralsk / Uralsk	J.J. de Groot
<i>FICARIA CALTHIFOLIA</i>					
15,8	15,5	0,06	4	Oostenrijk / Austria 2, Z. Marcktal, Emarthof	L.Ehrendorfer-Schratt
15,1		0,42	6	Oostenrijk 3, au-7867/2	L.Ehrendorfer-Schratt
<i>FICARIA CALTHIFOLIA TETRAPLOID</i>					
31,1	31,3	0,00	2	Polen / Poland 1, Choszczno	J. Koopman
31,9		1,00	2	Polen / Poland 2, Choszczno	J. Koopman
31,5		0,86	2	Polen / Poland 3, Choszczno	J. Koopman
30,7		0,21	2	Oostenrijk / Austria 1, Marck/Donau	L.Ehrendorfer-Schratt
31,4		0,29	2	Oostenrijk / Austria 4 Irenental, Neupurkershof	I. Krisai-Greilhuber
31,7		0,21	2	Polen / Poland 1, Bierzwnik	J. Koopman
31,2		0,07	2	Polen / Poland 2, Bierzwnik	J. Koopman
31,1		1,06	2	Polen / Poland 3, Bierzwnik	J. Koopman
<i>FICARIA FICAROIDES</i>					
18,2	18,4	0,18	4	GR, Mnt Chelmos 3	H. & M. Aanesen
18,4		0,12	4	GR, Mnt Chelmos 1	H. & M. Aanesen
18,4		0,20	4	GR, Mnt Chelmos 2	H. & M. Aanesen
18,5		0,57	4	GR, Mnt Chelmos 4	H. & M. Aanesen
18,7		0,19	2	GR, Mnt Chelmos 5	H. & M. Aanesen

Genome sizes of European Ficaria — English and Dutch Appendix
(continued)

2C-waarde — 2C value	GW	SD	n	herkomst — origin	verzamelaar(s) — collector(s)
<i>FICARIA FICAROIDES TETRAPLOID</i>					
34,6		0,21	4	Portugal, Elvas, O. Villa Boim	W. de Wilde / B. Duyfjes
<i>FICARIA AMBIGUA</i>					
19,4	20,0	0,00	2	GB, 'EA Bowles' 1	J. Sirkett
19,6		0,07	2	Schotland / Scotland / Scotland, Pertshire, Allt Gulabin 1	L. Tucker
19,6		0,11	2	GB, 'Salmons White'	W. Boens
19,7		0,35	2	Schotland / Scotland, Angus, Martins Den 1	L. Tucker
19,8		0,34	4	NW 3 Harr, Rogaland	H. Vik-mo
19,6		0,05	4	NW 4 Hellesto, Rogaland	H. Vik-mo
20,1		0,14	4	GB, 'Colarette'	L. de Jager
20,0		0,21	2	Schotland / Scotland, Angus, Martins Den 2	L. Tucker
20,0		0,07	2	Schotland / Scotland, Pertshire, Allt Gulabin 2	L. Tucker
20,0		0,38	18	GB, 'Double flower'	hort. BZ
20,8		0,21	2	GB, 'Double Bronze'	J. Sirkett
20,0		0,14	2	Ierland / Ireland, New Ross garden	BZ
19,5		0,49	2	Ierland / Ireland, Derreen garden	BZ
20,7		0,21	2	Italië / Italy, Sardinië / Sardinia 1006 m	E. Hörandl / F. Grunweis
20,8		0,21	2	Italië / Italy, Sardinië / Sardinia 1577 m	E. Hörandl / F. Grunweis
20,2		0,59	3	Noord-Spanje / North Spain, Zamora, above Salamanca	L. Tucker
20,2		0,21	2	Noord-Spanje / North Spain, Zamora, Rio Nero	L. Tucker
<i>FICARIA AMBIGUA × GRANDIFLORA</i>					
22,6	22,1	0,35	2	GB, 'Cupreus'	J. Sirkett
22,1		0,57	2	GB, 'Auriantica'	J. Sirkett
21,7		0,86	12	GB, 'Brazen Hussy'	hort. BZ
<i>FICARIA GRANDIFLORA</i>					
22,5	23,2	0,78	2	Spanje / Spain, Zuid-Magina / South Magina, Jaen 2	L. Tucker
22,8		0,40	2	Spanje / Spain, Cazorla, Barossa v.	L. Tucker

*Genoomgewichten van Europese Ficaria — Nederlandse en Engelse Bijlage
(vervolg)*

2C-waarde — 2C value	GW	SD	n	herkomst — origin	verzamelaar(s) — collector(s)
23,0		0,57	2	Spanje / Spain, Zuid-Magina / South Magina, Jaen 1	L. Tucker
23,1		0,44	15	Spanje / Spain, Andalusië / Andalusia	hort. BZ
23,5			2	Spanje / Spain, El Picacho Mnts, Andalusië / Andalusia	L. Tucker
23,9		0,21	2	GB, hortorum	J. Sirkett
<i>FICARIA CHRYSOCEPHALA</i>					
29,7	30,1	0,50	4	GR, Kreta	J. Kruizinga
29,5		0,42	2	Bulgarije, Stara planina	
30,0		0,49	4	Noord-Portugal / North Portugal, Montesinho	L. Tucker
29,9		0,35	2	Servië / Serbia, Andrevlje	Koos
29,5		0,07	2	Ierland / Ireland, Bot. Garden	BZ
30,3		0,40	4	Letland / Latvia, Salaspils	Arnis Seisum
30,4		0,63	4	Letland / Latvia, Lielvarde	Arnis Seisum
31,8		0,25	2	Frankrijk / France, 'E.A. Bowles' 2	L. de Jager
<i>FICARIA VERNA</i>					
31,9	33,5	0,29	4	NW 1, Flatholmen (Trondheim)	H. Vik-mo
32,1		0,41	4	NW 6, Flatholmen	H. Vik-mo
32,4		0,71	4	NW 7, Lauglolia	H. Vik-mo
31,8		0,42	4	NW 8, Midsanden	H. Vik-mo
31,9		0,78	8	NL, Wijk aan Zee, Parkpl. 3 (Stripe)	BZ
32,0		0,00	2	NL, Deil, langs de Linge / along the River Linge	BZ met zaad / with seed
32,3		0,33	2	NL, langs de Linge / along the River Linge	BZ met zaad / with seed
32,8		0,34	2	NL	J.F. Veldkamp met zaad / with seed
32,0		0,21	2	NL, Wageningen, Belmonte	BZ
32,2		0,49	2	NL, Heveadorp	BZ
32,2		0,15	2	NL, Wageningen	BZ
32,3		0,28	2	NL, Heemskerk	BZ
32,5		0,34	2	NL, Eys, Limburg	B. te Linde
32,7		0,71	2	NL, Nieuwleusen	BZ
32,8		0,47	2	NL, Wijk aan Zee, duin 1	BZ
32,8		0,83	6	NL, Leiden, Naturalis	BZ
32,9		1,00	4	NL, Driebergen	BZ

Genome sizes of European Ficaria — English and Dutch Appendix
(continued)

2C-waarde — 2C value	GW	SD	n	herkomst — origin	verzamelaar(s) — collector(s)
33,0		0,42	4	NL, Leiden, Schouwenhove	BZ
33,1		0,42	2	NL, Hillegom, KAVB	BZ
33,4		0,93	6	NL, Katwijk, Panbos	BZ
33,5		0,80	4	België, Bois de Berthem	H. van Bogaert
33,6		0,96	4	België	R. van der Aart
33,7		0,52	2	Frankrijk / France, Normandie (hort?)	R. de Boer
33,8		0,71	12	NL, Leiden, kas/poort	BZ
33,8		0,21	2	België, Wingene	W. Boens
34,1		0,89	6	NL, Wijk aan Zee Parkpl.2	BZ
34,1		0,85	2	NL, Woerden	BZ
34,2		0,07	2	NL, Bloemendaal, Berkenrode	BZ
34,4		0,21	2	NL, Utrecht, Amelisweerd	BZ
34,4		0,31	2	NL, Noordwijk, Duinweg 2	BZ
34,5		0,21	2	NL, Leiderdorp	W. de Priester
35,4		0,76	6	NL, Noordwijk, Duinweg 1	BZ
33,0		0,21	2	Frankrijk / France, Thann	N. Kempen
33,9		0,40	4	Frankrijk / France, Yonne, Chassy	W. de Priester
34,2		0,42	2	Zwitserland / Switzerland, Dornach	N. Kempen
35,0		0,42	2	Frankrijk / France, Lac Passe- ciere, Nievre	W. de Priester
35,3		0,91	3	Frankrijk / France, Fourques	L. de Jager
33,7		0,92	2	Ierland / Ireland, Birr Garden	BZ
33,9		0,88	2	Schotland / Scotland, Blairgowrie	L. Tucker
34,1		0,53	4	NW 5, Nord-Varhaug, Rogaland	H. Vik-mo
34,2		1,04	2	Noord-Ierland / North Ireland, Omagh	B. Duncan
34,3		0,18	2	NW 2, Knarrevik (Bergen)	H. Vik-mo
34,3		0,22	2	Schotland / Scotland, Inver- gowrie	L. Tucker
35,4		0,66	8	GB, Surrey, Claygate	B. Mathew
36,0		0,29	2	Schotland / Scotland, Dundee	L. Tucker
33,3		0,23	2	NW	H. Aanesen
<i>FICARIA FASCICULARIS</i>					
36,2	36,2	0,51	8	Kaukasus / Caucasus	W. de Goede
cf. COPTIDIUM × SPITSBERGENSE					
27,0	27,0	10,00	4	Spitsbergen (Svalbard, NW)	M. Stech / J.D. Kruijer

Erratum

In mijn *Ficaria*-artikel in het laatste nummer van *Gorteria* (*Gorteria* 37, aflevering 3/4: De verschillende genomengewichten van Europese *Ficaria* Huds.(Ranunculaceae) duiden op acht soorten) staat in Tabel 1 op pag. 127 abusievelijk: *Ficaria chrysocephala* (P.D.Sell) J.F.Veldkamp. Hier had moeten staan: *Ficaria chrysocephala* (P.D.Sell) Zonn. De auteur van deze combinatie, B.J.M. Zonneveld (ondergetekende), staat op pag. 130 wel goed vermeld.

In my *Ficaria* paper in the last issue of *Gorteria* (*Gorteria* 37, issue 3/4: Genome sizes of European *Ficaria* Huds.(Ranunculaceae) indicate eight separate species) in Table 1 on p. 127 is erroneously listed: *Ficaria chrysocephala* (P.D.Sell) J.F.Veldkamp. This should have been: *Ficaria chrysocephala* (P.D.Sell) Zonn. This combination is correctly attributed to B.J.M. Zonneveld (the present writer) on p. 130.

BEN J.M. ZONNEVELD