

Holger Zetsche

Die Phylogeographie des Artkomplexes *Pulsatilla alpina* (Ranunculaceae)

urn:nbn:de:gbv:3-000008982

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008982>]

Die Phylogeographie des Artkomplexes *Pulsatilla alpina* (Ranunculaceae)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Holger Zetzsche

geb. am 14.05.1971 in Altenburg (Thür.)

Gutachter

1. Prof. Dr. Eckehart J. Jäger
2. Prof. Dr. Martin Röser
3. Prof. Dr. Herbert Hurka

Halle (Saale), 21. Dezember 2004

urn:nbn:de:gbv:3-000008982

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008982>]

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	V
Zusammenfassung	VII
1. Einleitung	1
1.1. Die Gattung <i>Pulsatilla</i>	2
1.2. Die Sektion <i>Preonanthus</i>	5
1.3. Der Artkomplex von <i>Pulsatilla alpina</i>	7
1.3.1. Biologie des Artkomplexes von <i>Pulsatilla alpina</i>	7
1.3.2. Die Sippen des Artkomplexes von <i>Pulsatilla alpina</i>	8
1.3.3. Auffassungen zur Evolution und pleistozänen Ausbreitungsgeschichte der Sektion <i>Preonanthus</i> und des Artkomplexes <i>Pulsatilla alpina</i>	15
1.3.4. Hybridisierung und Introgression im Artkomplex	18
1.4. Phylogeographie subalpiner und alpiner Arten	19
2. Hypothesen	21
2.1. Hypothesen zur Herkunft und Phylogeographie des Artkomplexes	21
2.2. Verifikation der Hypothesen	23
3. Einführung in die Theorie der Methoden	24
3.1. Morphologische Daten	24
3.2. Molekulare Marker	24
3.3. Sequenzanalyse	26
3.4. Methoden zur Rekonstruktion der Phylogenie	29
3.4.1. Distanzmethoden	30
3.4.2. Maximum Parsimony und Maximum Likelihood	31
3.4.3. Statistische Bewertung molekularer Phylogenien	33
3.5. Datierung phylogenetischer Daten	35
3.5.1. Molecular-clock-Hypothese	35
3.5.2. Relative-rate-Test	36
3.5.3. Likelihood-ratio-Test	37
3.5.4. Penalized Likelihood	37
3.6. Analyse kombinierter Datensätze	38

3.6.1.	Kombination molekularer Datensätze	38
3.6.2.	Korrelationsanalysen molekularer und morphologischer Daten	39
3.6.3.	Methoden zur geographischen Analyse phylogenetischer Daten	40
4.	Material und Methoden	43
4.1.	Untersuchungsgebiet, Pflanzenmaterial und ökologische Parameter	43
4.2.	Aufbereitung und Analyse der DNA	44
4.3.	Analyse der Datensätze	48
4.3.1.	Anwendung der phylogenetischen Rekonstruktionsmethoden	48
4.3.2.	Bestimmung der Variabilität der Substitutionsraten und molekulare Datierung	49
4.3.3.	Anwendung der Methoden zur Analyse kombinierter Datensätze	50
5.	Ergebnisse	53
5.1.	Sequenz- und Haplotypenanalyse des Chloroplasten-Spacers <i>trnL-trnF</i>	53
5.1.1.	Molekulare Merkmale der <i>trnL-trnF</i> -Region	53
5.1.2.	Haplotypendiversität und Vorkommen	54
5.1.3.	Phylogenetische Analyse der <i>trnL-trnF</i> -Region	55
5.1.4.	Nested-clade-Analyse der <i>trnL-trnF</i> -Fragmente lf1 und lf2	58
5.1.5.	Chloroplasten-Haplotypen in den Unterarten und Morphotypen des Artkomplexes	60
5.2.	Sequenzanalyse der ITS-Region	61
5.2.1.	Molekulare Merkmale der ITS-Region	61
5.2.2.	Analyse der ITS-Region des Artkomplexes in der Gattung <i>Pulsatilla</i>	62
5.2.3.	Analyse der ITS-Region innerhalb des Artkomplexes	64
5.2.4.	Analyse einzelner ITS-Polymorphismen	66
5.2.5.	Die Einordnung problematischer Akzessionen	67
5.3.	Analyse der kombinierten ITS- und <i>trnL-trnF</i> -Sequenzen	68
5.4.	Datierung der phylogenetischen Knoten	70
5.4.1.	ITS-Topologie für die Bestimmung der Divergenzzeiten	70
5.4.2.	<i>Clocklike</i> -Datierung und Penalized-Likelihood-Datierung	70
5.5.	Korrelationsanalysen	73
5.5.1.	Korrelationsanalyse morphologischer und phylogenetischer Daten	73
5.5.2.	Evolution morphologischer und ökologische Merkmale	76
6.	Diskussion	79
6.1.	Die Sektion <i>Preonanthus</i> in der Gattung <i>Pulsatilla</i>	79
6.1.1.	Revision der Sektionsgliederung, Monophylie der Sektion und nächste Verwandte	79
6.1.2.	Asiatischer Ursprung und Zeitraum der Abspaltung	80
6.2.	Phylogenie und Alter der Sektion <i>Preonanthus</i>	81

6.2.1.	Phylogenie und Divergenz der Sippen der Sektion <i>Preonanthus</i>	81
6.2.2.	Sicherheit und Methodenkritik der Datierung	83
6.3.	Die Evolution der molekularen und morphologischen Merkmale des Artkomplexes	84
6.3.1.	Die Evolution des cp-Spacers <i>trnL-trnF</i> und des Kern-DNA-Spacers ITS	84
6.3.2.	Evolution morphologischer und ökologischer Merkmale	86
6.3.3.	Merkmale der frühen europäischen Populationen	88
6.4.	Die Phylogeographie des Artkomplexes	90
6.4.1.	Herkunft des Artkomplexes, Radiation in Europa und alte Ausbreitungswellen	91
6.4.2.	Jüngere Migrationsbewegungen und aktuelle Verteilungsmuster	92
6.4.3.	Phylogeographie der <i>API</i> -Gruppe	93
6.4.4.	Phylogeographie der <i>PIC</i> -Gruppe	95
6.4.5.	Phylogeographie der <i>ALP</i> -Gruppe	96
6.4.6.	Gab es ein frühes Verbreitungszentrum in Italien und Korsika?	98
6.4.7.	Klima, Arealodynamik und Spenderpopulationen der heutigen Vorkommen	99
6.4.8.	Vergleich der Nested-clade-Analyse und der F-Statistik	100
6.5.	Die Sippen des Artkomplexes	101
6.5.1.	<i>Apiifolia</i> -Clade	101
6.5.2.	<i>Alpicola</i> -Clade und die <i>alpicola</i> -Population vom Brocken	103
6.5.3.	<i>Alpina</i> -Clade	105
6.5.4.	Taxonomie des Artkomplexes	106
6.6.	Hybridisierung und Introgression	107
6.6.1.	Sippen mit hybridogenem Einfluss	108
7.	Thesen zur Dissertation	111
8.	Literatur	115
9.	Anhang	123

Danksagung

Natürlich möchte ich nicht behaupten, dass ich diese Doktorarbeit ganz ohne fremde Unterstützung hinbekommen hätte. Gerade die phylogenetischen Methoden waren am Beginn der Untersuchungen Neuland für mich. Mit dem Wissen aus den Veröffentlichungen allein wäre ich vermutlich gescheitert. An dieser Stelle möchte ich mich deshalb bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Prof. Eckehart Jäger. Er hat mir die Anregung zu dieser Doktorarbeit und dazu gegeben, mich mit Hilfe der modernen molekularsystematischen Methoden an eine unserer mitteldeutschen Leitpflanzen heranzuwagen. Die immer anregenden Diskussionen besonders zu den geobotanischen Fragen ("Es wird gemeinhin zu wenig gedacht und zu viel gerechnet.") und die kritische Durchsicht des Manuskripts waren und sind ein großer Gewinn für mich.

Ohne Frank Blattner wäre ich nicht nach Gatersleben gekommen und für vier Jahre geblieben. Er hat mich mit seiner Erfahrung in den molekularen Methoden und den Sequenzanalysen gewissermaßen an die Hand genommen und stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Den Diskussionen um die Auswertung meines Datenwustes hat er geduldig Stand gehalten und mir zuversichtlich vertraut, die Geschichte der Brockenanemone zu entwirren. Schließlich geht auch der geplante einjährige Amerikaaufenthalt zur Verbesserung meiner *english skills* auf seine Beziehungen zurück. Und: Einen echten Pfälzer Saumagen essen wir auch noch, oder?

Prof. Konrad Bachmann danke ich dafür, dass er mir ermöglicht hat, von der kreativen wissenschaftlichen Atmosphäre des Instituts in Gatersleben zu profitieren, obwohl die Zusammenarbeit zugegebenermaßen auf etwas unorthodoxe Weise zustande kam. Die täglichen 10-Uhr-Frühstücksdiskussionen über den neuesten Haplotypenbaum, den jüngsten Rückfall in den Artglauben, die Auswüchse des Fernsehprogramms oder die aktuellen Entwicklungen im und um den Bachmannschen Garten werden unvergessen bleiben.

Was wäre die molekulare Arbeit ohne die unermüdliche Hilfestellung der Laborengel? Ein langwieriges und mitunter tristes Geschäft! Besonders Petra Oswald, Manuela Kretschmann und Christina Koch gilt mein Dank für ihre engagierte Hilfe.

Ralf Horres, Birgit Gemeinholzer, Heike Schmuths, Sabine Jacob, Alok Varshney, Thomas Funke, Elke Döring, Thomas Janssen und Ivana Stehlik danke ich für die herzerfrischend-menschliche Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch hier am IPK, für die gemütlichen Abendbrote, den Kaffee- und Tee-Zimmerservice, den leckeren Kuchen, die Kinobesuche und unsere gemeinsamen Wein-, Bier- und Basketballstunden.

Daniel Moser hat mit seiner biometrischen Arbeit über die Alpenanemone den Grundstein für diese phylogeographische Untersuchung gelegt. Er hat mich zu meinem Dank darüber hinaus mit seinen morphologischen Daten und seinem Herbarmaterial üppig ausgestattet. Klaus Pistricks Hilfsbereitschaft beim Bestellen der Belege aus den Herbarien dieser Welt und beim Überwinden nomenklatorischer Hürden ist wirklich mustergültig.

Für das Bereitstellen des Pflanzenmaterials und die Möglichkeit der Einsichtnahme in die alten Aufsammlungen danke ich auch den Mitarbeitern der Herbarien in Berlin-Dahlem, Bern, Göttingen, Halle, Jena und Zürich.

Ich danke Friedrich Ebel, dem ehemaligen wissenschaftlichen Leiter des Botanischen Gartens in Halle und Vorkämpfer für die Neugestaltung des Brockengartens. Er stand mir ebenso wie Gunther Karste vom Nationalpark Hochharz mit zahlreichen Informationen zur Geschichte der subalpinen Arten des Brockens und des Brockengartens zur Seite.

Meine Familie und meine Freunde in Altenburg und Ostthüringen hatten es auch nicht leicht mit mir, machte ich mich doch in den letzten Jahren etwas rar. Es tut gut zu wissen, dass man jederzeit in die Heimat zurückkommen kann und dort herzlich empfangen wird.

Gern erinnere ich mich an die Urlaubssammelreise in die Auvergne, die Pyrenäen und in die Sierra Cantabrica mit Alexandra und Agnes Effmert aus meiner alten Wohngemeinschaft. Und ach ja, Ruth Ermentrauts aufmunternde Emails vom anderen Ende des Internets: es gibt auch noch andere Themen als die Brockenanemone.

Dem Land Sachsen-Anhalt gilt mein Dank für das Graduierten-Stipendium.

Die geistreichen Kolumnen von Marc Faber und die zahlreichen fundierten Beiträge aus dem Tradecentre-Board sind für den entschlossfreudigen Leser überaus inspirierend. Die aufwendigen Sammelreisen wurden finanziell erst durch die Umsetzung der dort geschilderten Ideen ermöglicht.

Schließlich bedanke ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie, meinen beiden lieben Frauen Bettina und Helene. Sie haben mit ihrem beständigen Rückhalt und ihrer Geduld mit dem oft fehlenden und mitunter sehr ermüdeten Mann und Papa einen unschätzbaren Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Zusammenfassung

Die Sektion *Preonanthus* der Gattung *Pulsatilla* umfasst die Arten *Pulsatilla occidentalis*, *P. aurea* und *P. alpina*. Der stark diverse Artkomplex *P. alpina* wird weiter in bis zu 11 Morphotypen unterteilt. In der vorliegenden Arbeit werden die phylogenetischen Beziehungen dieser Sippen, die Evolution ihrer Merkmale und ihre Migrationsgeschichte untersucht und die Ursachen, die zur heutigen Verteilung der Verwandtschaftslinien geführt haben, diskutiert.

Von 367 Individuen aus 67 Populationen aller Arten und Morphotypen der Sektion wurden drei molekulare Datensätze (ITS und zwei Fragmente des Chloroplasten-Spacers *trnL-trnF*) erstellt und phylogenetisch (Neighbour-Joining, Maximum Parsimonie) und phylogeographisch (F-Statistik, *nested-clade*-Analyse) analysiert. Die phylogenetischen Knoten wurden nach dem *relative-rate*-Test und mit dem Penalized-Likelihood-Verfahren datiert. Die Evolution der Merkmale wurde mit einem erweiterten Mantel-Test und der PGLS-Methode (*phylogenetic generalized least square method*) unter Verwendung der molekularen Daten und eines gegebenen Datensatzes mit 24 morphologischen und ökologischen Merkmalen rekonstruiert.

Die Ergebnisse zeigen die Monophylie der Sektion *Preonanthus* und des Artkomplexes. Die Vorfahren der Sektion und des Artkomplexes stammen aus den Gebirgen Asiens und haben sich im Miozän von den anderen Sippen der Gattung *Pulsatilla* getrennt. Die Diversifikation von *Preonanthus* begann vor 5,6 Ma mit der Abtrennung der heute in den Rocky Mountains vorkommenden *P. occidentalis*. Etwa seit der Plio-Pleistozängrenze entwickeln sich die Populationen von *Pulsatilla alpina* und der kaukasischen *P. aurea* getrennt. Die europäischen Gebirge wurden über den südlichen Balkan und entlang der Apenninen besiedelt. Aus den Daten lässt sich für *P. alpina* ein frühes Diversifikationszentrum auf den Apenninen, Korsika und den südwestlichen Alpen ableiten. Die Hauptmigrationsrichtung innerhalb von Europa verlief von Südosten nach Westen.

Die adaptive Radiation von *P. alpina* in Europa begann vor 1,4 Ma und führte bis vor etwa 0,4 Ma zur Herausbildung der Hauptverwandtschaftskreise, dem *Alpicola*-Clade, *Apiifolia*-Clade und *Alpina*-Clade. Die ersten europäischen Populationen gehen auf feinblättrige, kalktolerante, tatsächlich weißblühende Vorfahren zurück. Die Anpassung an Kalkgesteinsböden ist nur einmal am Beginn der europäischen Radiation erfolgt und ging im *Alpicola*-Clade und im *apiifolia*-Morphotyp sekundär wieder verloren. Die gelbe Blütenfarbe innerhalb des Morphotyps *apiifolia* ist ein abgeleitetes Merkmal.

Die drei Hauptverwandtschaftskreise sind genetisch voneinander isoliert und zeigen eine deutliche regionale sowie bodenchemische Bindung. Der überregionale Genfluss (über 500 km) ist deutlich eingeschränkt. Infolge der engen Bandbreite und der hohen Konstanz der ökologischen Ansprüche von *P. alpina* oszillierte das Areal während des Pleistozäns sehr stark. Die Spenderpopulationen der heutigen Vorkommen befanden sich dennoch überwiegend in den Vorgebirgsregionen der heutigen Verbreitungsgebiete oder in den Gebirgen selbst.

Der *Apiifolia*-Clade dominiert im Süden- und Westen des Areals von *P. alpina*. Er enthält die Morphotypen *austroalpina*, *cantabrica*, *cyrnea*, *font-queri* und *millefoliata* als phylogenetische Basisgruppen und den Morphotyp *apiifolia* als abgeleitete Hauptgruppe.

Der calcifuge *Alpicola*-Clade vereinigt fast alle Populationen der Morphotypen *alpicola* und *austriaca*. Die Vorfahren des *Alpicola*-Clades etablierten sich zuerst in den Ostalpen und darauf in den südlichen Karpaten. Nach einer schnellen Expansion nach Westen in die Sierra Cantabrica haben die Populationen in einer zweiten Migrationswelle von Nordspanien ausgehend das herzynische Gebirge erreicht und sich nach Osten bis in die Hohe Tatra ausgedehnt. Die *alpicola*-Population des Brockens kommt seit dem letzten Glazial ununterbrochen in der Harzregion vor und ist seitdem biogeographisch isoliert.

Der *Alpina*-Clade enthält die Populationen des monophyletischen, calcicolen, morphologisch einheitlichen und genetisch diversen *alpina*-Morphotyps als Kernsippe. Er ist auf die Nord- und Nordwestalpen und den Jura beschränkt.

Hybridisierung und Introgression treten zwischen Individuen benachbarter Morphotypen und zwischen allen Hauptclades regelmäßig auf. Der Morphotyp *ochroleuca* ist ein junger, polytoper Hybrid und der Morphotyp *cottianaea* ist eine alte, stabile Hybridsippe. Eine hybridogene Vergangenheit haben auch die Morphotypen *montis-niveae* und *cyrnea*.

Die ITS-Evolution von *P. alpina* widerspiegelt beispielhaft ein lokales Entstehen und Ausharren von Populationen sowie die Rekombination expansiver Metapopulationen an ihren Verbreitungsgrenzen.

Die Ergebnisse der Evolution des Chloroplastenspacers *trnL-trnF* weisen darauf hin, dass der Anteil von Duplikationen unmittelbarer Nachbarsequenzen unterschätzt wird und dass das *slipped-strand-mispairing*-Modell der Mikrosatellitenevolution korrekturbedürftig ist. Eine größere Längenänderung eines Mikrosatelliten muss nicht schrittweise erfolgen, sondern kann auch durch eine einzige Duplikation oder Deletion verursacht werden.

Kontinuierliche morphologische Merkmale divergieren innerhalb von *P. alpina* sehr schnell, wesentlich schneller als es zur Bildung neuer Arten kommt. Eine Kombination dieser Merkmale eignet sich auf intraspezifischen Niveau sehr gut als diagnostischer Marker für die phylogenetische Verwandtschaft.

1. Einleitung

Der Harz ist das nördlichste deutsche Mittelgebirge mit natürlicher subalpiner Heidevegetation. Die charakteristischen Pflanzenarten des Brockengipfels werden als Glazialrelikte angesehen. Sie sind heute in ihrem Bestand stark gefährdet.

Die Populationen dieser Arten sind biogeographisch isoliert. Zu ihnen zählen die Alpen- bzw. Brocken-Anemone *Pulsatilla alpina* (L.) Delarbre subsp. *alpicola* H. Neum, die Alpen-Habichtskräuter *Hieracium alpinum* L. und *H. nigrescens* Willd., die Zweifarben-Weide *Salix bicolor* Ehrh. ex Willd., die Starre Segge *Carex bigelowii* Torr. ex Schweinitz und die Scheiden-Segge *Carex vaginata* Tausch. Ihre nächsten Verwandten findet man erst in den Alpen, in den Vogesen oder im Riesengebirge.

Pulsatilla alpina subsp. *alpicola* gilt als Charakter- und Leitart des Brockens und ist die Vorzeigepflanze des gesamten Nationalparks Hochharz. Die Pflanze trägt wegen ihrer auffälligen Vorkommen auf dem Brockenplateau den deutschen Namen „Brocken-Anemone“. Die gesamte Art *Pulsatilla alpina* ist eine der am meisten beachteten Arten der subalpinen und alpinen Bergwiesen und Mattenvegetation in Europa. Wegen ihrer großräumigen Arealdisjunktion vor allem innerhalb der europäischen Gebirge und wegen ihrer morphologischen Variabilität ist die Art auch von evolutionsbiologischem und systematischem Interesse. Trotz intensiver morphologischer Studien, die die Abgrenzung der einzelnen Sippen der Alpenanemone erheblich verbessert haben, blieben die Aussagen über die verwandtschaftlichen Beziehungen dieser Sippen und die Rekonstruktion ihrer Verbreitungsgeschichte spekulativ.

Durch die faszinierenden Möglichkeiten der modernen molekularbiologischen und statistischen Methoden der Phylogeographie ergibt sich jetzt die Möglichkeit, die alten Hypothesen zu prüfen und offenen Fragen neu nachzugehen.

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel verfasst, (i) die phylogenetischen Beziehungen aller morphologisch und karyologisch differenzierten Sippen des Artkomplexes der Alpenanemone *Pulsatilla alpina* zu klären, (ii) die Verbreitung der phylogenetischen Sippen innerhalb des Gesamtareals zu bestimmen, (iii) die Divergenzzeiten, Migrationswege und die Evolution der Merkmale der einzelnen Verwandtschaftslinien zu rekonstruieren und (iv) die Ursachen, die die heutigen Verbreitungsmuster bewirkt haben, zu diskutieren. Von besonderem Interesse ist, welche morphologischen oder genotypischen Besonderheiten die Population von der Brocken-Kuppe aufweist, wie ihre verwandtschaftliche Stellung innerhalb des Artkomplexes ist, woher sie stammt und wie lange sie schon in der Region auftritt.

Den bisherigen Auffassungen zur Verwandtschaft und Evolution der Sektion *Preonanthus* und des Artkomplexes *Pulsatilla alpina* wird in dieser Arbeit in Kapitel 1. verhältnismäßig viel Raum eingeräumt.

Einerseits wurde damit das Ziel verfolgt, möglichst viele nahverwandte Außengruppen in die erste molekularsystematische Analyse dieser Sippe einzubeziehen. Nur so lässt sich eine abgesicherte Phylogenie für den Artkomplex ableiten. Die Anwendung molekularer Methoden hatte in mehreren anderen Verwandtschaftskreisen, nicht zuletzt bei *Anemone*, auch auf Gattungsniveau zu Revisionen geführt, die die auf morphologischen Merkmalen basierenden Phylogenien „wie Kartenhäuser zum Einsturz“ brachten.

Andererseits werden die Ansichten der früheren Autoren zur Phylogenie und Verbreitungsgeschichte der Sippe in Kapitel 2. zu klar formulierten, überprüfbaren Hypothesen verdichtet. Damit soll vermieden werden, dass aus den Daten *ad-hoc*-Rekonstruktionen abgeleitet werden.

Die Theorie der verwendeten phylogenetischen und phylogeographischen Rekonstruktionsmethoden wird in Kapitel 3. ebenfalls sehr ausführlich besprochen. Diese Methoden stellen in aller Regel statistische Hilfsmittel dar, die auf vereinfachten Annahmen der Sequenzevolution und der Ausbreitung der Populationen in Raum und Zeit beruhen. Die Verlockung „genaue Zahlen“ unkritisch zu interpretieren kann dazu führen, aus den molekularen Daten übergenaue oder falsche Schlussfolgerungen zu ziehen.

1.1. Die Gattung *Pulsatilla*

Verbreitung und Systematik der Gattung *Pulsatilla*

Die Gattung der Küchenschellen, *Pulsatilla* Mill., umfaßt etwa 30 Arten und ist nordhemisphärisch-zirkumpolar, meridional bis subarktisch verbreitet. Die Arten kommen vorwiegend im Bergland und im Gebirge vor. Küchenschellen sind perenne Stauden, die bevorzugt auf offenen Standorten, auf Halbtrockenrasen, in Kiefernsteppenwäldern, in subalpinen Zwergstrauchheiden und auf alpinen Matten wachsen. Charakteristisch für alle Arten der Gattung ist der sich mit der Fruchtreife stark verlängernde, behaarte Griffel. Die auf Sachalin endemische Gattung *Miyakea* Miyabe et Takewaki steht *Pulsatilla* morphologisch am nächsten. Sie weicht nur durch ihre ungeteilten Grundblätter von der Gattung ab (Meusel & al. 1965).

Die Gattung *Pulsatilla* ist monophyletisch. Sie gehört mit der Gattung *Hepatica* Mill. und der Gattung *Anemone* L. zur *Anemone*-Gruppe und steht phylogenetisch innerhalb der paraphyletischen Gattung *Anemone* (Hoot & al. 1994). Das morphologische Mannigfaltigkeitszentrum der Gattung *Pulsatilla* liegt in Mittel- und Ostasien. Weil dort heute noch vier von fünf Sektionen der Gattung vorkommen, wird das Entstehungs- und Differenzierungszentrum von *Pulsatilla* in diesem Gebiet vermutet

(Zimmermann 1952, Aichele & Schwegler 1957). Der Schwesterclade von *Pulsatilla* umschließt die Gattung *Knowltonia* Salisbury sowie die Arten der *Anemone caffra*- und der *Anemone crassifolia*-Gruppe. Die Arten des Schwesterclades kommen im südlichen Afrika und auf Tasmanien, also ausschließlich südhemisphärisch vor (Hoot & al. 1994).

Die taxonomische Klassifizierung und Gliederung der Küchenschellen und ihre Einstufung als eigene Gattung (= *Pulsatilla*) oder als Untergattung von *Anemone* (= *Anemone pulsatilla* s.l.) war lange Zeit umstritten. Die Geschichte der Taxonomie der Küchenschellen wird von Aichele & Schwegler (1957) ausführlich dargestellt, auf eine Wiederholung wird an dieser Stelle verzichtet. Die heute gebräuchliche Gliederung der Gattung in fünf Sektionen stammt von diesen Autoren. Sie folgt den Prinzipien Verwandtschaft und praktische Brauchbarkeit. Die Einschätzung der natürlich-phylogenetischen Verwandtschaft basiert auf den Kriterien: (i) abgestufte morphologisch-anatomische Ähnlichkeit, (ii) Verbreitung der Sippen und (iii) Chromosomenzahlen. Eine Revision der Gattung auf molekularer Grundlage wurde bislang nicht durchgeführt.

Die artenreichste Sektion *Pulsatilla* umfasst die Küchenschellen im engeren Sinne (u. a. *P. vernalis*, *P. vulgaris* s.l., *P. pratensis* s.l., *P. albana* s.l.). Die Sektion hat ein holarktisches Gesamtareal in der submeridionalen bis borealen Florenzone. Als deren nächste Verwandte gelten die ostasiatisch (China, Mandschurei, japanische Inseln, Korea, Dahurien) verbreiteten Arten der Sektion *Semicampanaria* (u. a. *P. cernua* und *P. chinensis*).

Die folgenden drei Sektionen bilden lt. Aichele & Schwegler ebenfalls eine verwandtschaftliche Gruppe. Sie sind durch zahlreiche primitive Merkmale miteinander verbunden. Die Sektion *Iostemon* mit der einzigen, endemischen Spezies *P. kostyczewii* (Korsh) Juz. ist auf den Pamir beschränkt. Die einzige Art der Sektion *Preonanthopsis*, *P. taraoi* (Makino) Takeda, ist nur auf den japanischen Inseln und den Kurilen heimisch. Die Sektion *Preonanthus* gruppiert die weiß- und gelbblühenden, europäischen, kaukasischen und nordwestamerikanischen Gebirgssippen.

Die Abb. 1 veranschaulicht die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Sektionen der Gattung. Obwohl die Darstellung ebenfalls von Aichele & Schwegler stammt, bildet sie eine gemeinsame Verwandtschaft der Sektionen *Preonanthus*, *Preonanthopsis* und *Iostemon*, die diese drei Sektionen von einer gemeinsamen Sektionengruppe *Semicampanaria* und *Pulsatilla* trennt, nicht eindeutig ab.

Die Autoren halten die Herausbildung und Entfaltung einer „Urpreonanthus“ im Tertiär in Asien für wahrscheinlich. Die „Urpreonanthopsis“ hat sich davon später abgespalten und soll aus den mittelasiatischen Gebirgen nach Japan gekommen sein. Die „Uriostemon“ könnte über die südaltaischen Gebirgszüge im Pamir in ihr heutiges Verbreitungsgebiet gelangt sein.

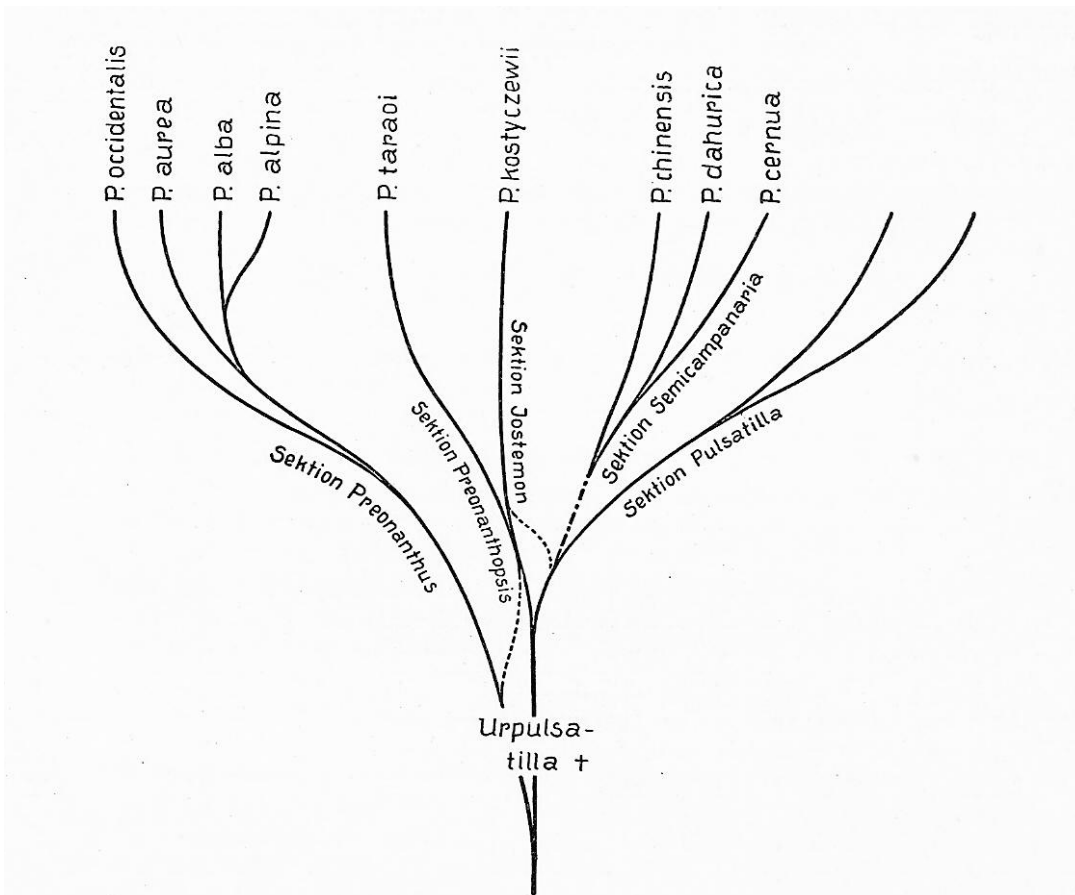


Abb. 1: Die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Sektionen der Gattung *Pulsatilla* nach Aichele & Schwegler (1957). Die gestrichelten Linien veranschaulichen alternative Möglichkeiten der Verbindung der Sektionen. Die Darstellung stimmt mit der schriftlichen Schilderung der Verwandtschaftsbeziehungen bei Aichele & Schwegler nicht völlig überein.

Von der Gattung *Pulsatilla*, bzw. von der die Küchenschellen einschließenden Gattung *Anemone*, wurden bisher keine Makrofossilien gefunden. Bei paläobotanischen Pollenanalysen wurden beide Gattungen bisher nicht explizit berücksichtigt. Das Alter der Gattung *Pulsatilla* und des Artkomplexes von *Pulsatilla alpina* kann deshalb nur indirekt abgeschätzt werden.

Die vorwiegend holarktisch verbreitete Familie der Ranunculaceae ist eine abgeleitete Familie laurasischen Ursprungs, die in der Evolution der Angiospermen vergleichsweise spät erstmalig auftrat. Nach der molekularen Datierung von Sanderson (1997) entwickelte sich tricolpater Pollen und parallel dazu der Clade der Eudicots an der Kreide-Tertiär-Grenze vor 100 bis 125 Millionen Jahren (Ma). Die Familie der Ranunculaceae ist demnach etwa 80 bis 100 Ma alt. Nach der geologischen Datierung sind die alttertiären Fossilien der Gattung *Helleborites* Hr. zirka 65 Ma alt. Diese Gattung steht *Helleborus* L. nahe und bestimmt damit das Minimalalter für die ursprünglichen Sippen der Unterfamilie der Ranunculoideae (Mai 1995, Jensen & al. 1995). *Clematis* L. ist für die Gattungen der *Anemone*-Gruppe eine Schwester- bzw. Außengruppe (Hoot & al. 1994). Takhtajan (1974) erwähnt eine *Clematis uralensis* Dorof. aus dem Oligozän Sibiriens mit einem Alter von 23 bis 35 Ma. Auf Grund ihrer besonderen morphologischen Anpassungen kann *Clematis* nicht als direkter Vorfahr der

Gattungsgruppe *Anemone* angesehen werden. Die direkten Vorläufer von *Anemone*, *Pulsatilla* und *Hepatica* sollten demnach bereits im Oligozän gelebt haben. Die ersten Vertreter der Gattung *Pulsatilla* sind der Hootschen Phylogenie zu Folge wesentlich jünger.

1.2. Die Sektion *Preonanthus*

Die Arten der Sektion *Preonanthus*

Die Sektion *Preonanthus* (Ehrh.) DC ist morphologisch innerhalb der Gattung *Pulsatilla* sehr gut abgegrenzt. Die Hochblätter sind nicht miteinander verwachsen und laubblattähnlich. Die Rosette ist auf 1 bis 3 Blätter reduziert. Im Unterschied zu den gewöhnlichen Küchenschellen (Sektionen *Pulsatilla* und *Semicampanaria*) werden die Staubblätter nie zu Nektarienträgern umgebildet. Die Sektion fasst die eng verwandten Arten *P. occidentalis* (Watson) Freyn, *P. aurea* (Sommier et Levier) Juzepczuk und *P. alpina* (L.) Delarbre zusammen.

P. occidentalis kommt in den Rocky Mountains von Alaska bis in die südliche Sierra Nevada vor. Sie hat deutlich abweichende walzenförmige Sammelfrüchte und sehr tief eingeschnittene (fiederschnittige), wenigzipflige Blattfiedern 2. Ordnung. Die Laubblattfarbe ist hellgrün. Die Tepalen sind meist weiß, es treten aber regelmäßig auch cremeweiße bis hellgelbe Blüten auf. Die Filamente sind im Vergleich zu *P. alpina*, ähnlich wie bei *P. aurea*, relativ lang. Nach Huynh (1970) ist die Art wegen ihres tricolpaten bis eu-pantocolpaten Pollens innerhalb der Sektion isoliert. Die Art wächst auf silikatischem (ausschließlich?) Gestein auf Standorten der alpinen Stufe. Sie tritt selten auch auf subalpinen Waldgrenzstandorten auf.

Die westkaukasisch verbreitete *P. aurea* (Sommier et Levier) Juzepczuk tritt in zwei Teilarealen auf. Die nördlichen, größeren Bestände findet man im Großen Kaukasus (42°30' bis 44°N und 40° bis 43° 30'E). Die südlichen Vorkommen liegen im Gebirge Meschetskij Chrebet in Georgien. Die Blattmorphologie ist ähnlich wie die von *P. occidentalis* und des *P. alpina*-Morphotyps *millefoliata*. Die Tepalen haben eine goldgelbe Farbe und glänzen rötlich. Trotz ihrer Ähnlichkeit in der Blütenfarbe unterscheidet sich die Sippe laubblattmorphologisch und physiognomisch deutlich von *P. alpina* subsp. *apiifolia*. Die Art ist an offene, subalpine bis alpine Standorte auf silikatischem Gestein bzw. an saure Ton-Quarz-Böden gebunden.

In der zentraleuropäischen *P. alpina* wird eine Vielzahl morphologisch und ökologisch variabler, chorologisch disjunkter Sippen zusammengefasst. Sie wird daher im folgenden auch als Artkomplex bezeichnet.

Charakteristisch für die Sektion ist die konstante Chromosomenzahl $2n=16$. Baumberger (1970) hat einmalig tetraploide Individuen bestimmt, die aus dem nördlichen Tschechien und aus dem Simmental

(Berner Oberland) stammen sollen. Die Angaben werden von Moser (1996), der selbst an zahlreichen Populationen Chromosomenuntersuchungen durchgeführt hat, bezweifelt.

Areal und pflanzensoziologische Bindung der Sektion *Preonanthus*

Das Areal der Sektion ist bei Meusel & al. (1965) beschrieben und wurde von Jalas & Suominen (1989) und Moser (1996) überarbeitet (vgl. Abb. 2). Die Arten der Sektion haben ein ozeanisches submeridional-alpines bis boreal-montanes Verbreitungsgebiet. Die Arealdiagnose lautet: „sm/alp – temp/salp-(b/mo) · oz₁₋₃ EUR+WAm“. Die Arten sind typische Elemente der Floren der subalpinen mitteleuropäischen Hoch- und Mittelgebirge, der alpinen, nordiberischen, nordapenninischen bzw. der Floren des Kaukasus und der Rocky Mountains. Auffallend ist die Beschränkung der Vorkommen auf die Westseitenklimate Eurasiens und Nordamerikas.

Das spontane Areal entspricht etwa dem heutigen Vorkommen. Die natürlichen Vorkommen von *Pulsatilla alpina* in Nordspanien und auf Korsika sind durch Schafbeweidung stark reduziert. Einige Populationen vor allem im Harz, im Riesengebirge, in den Nord- und den Ostalpen sind durch anthropogene Nutzung stark beeinträchtigt (Moser 1996). Nach eigenen Beobachtungen fördert mäßige Beweidung durch Kühe die Verbreitung von *P. alpina* auf subalpinen Bergwiesen in den Nord- und Nordwest-Alpen.

Die Arealgrenze und die Verbreitung in Alaska ist nicht sicher bekannt.

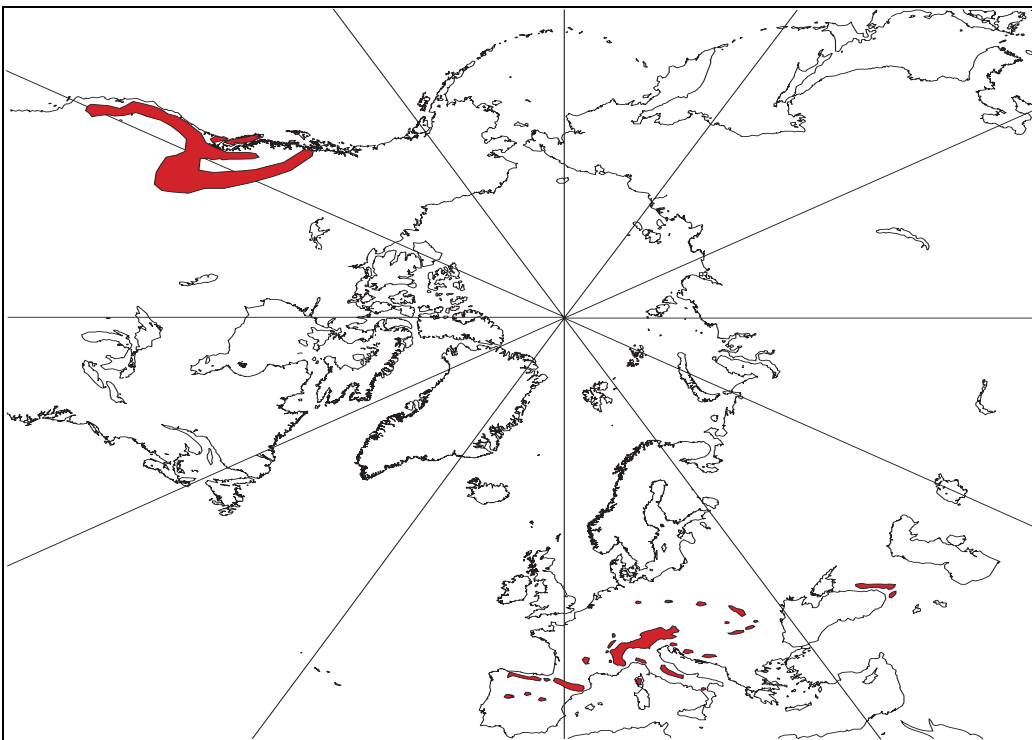


Abb. 2: Verbreitung des Sektion *Preonanthus* (rote Flächen) in der Holarktis mit den Arten *P. alpina* in den zentraleuropäischen Gebirgen, *P. aurea* im Kaukasus und *P. occidentalis* in den Rocky Mountains auf der Basis der Verbreitungskarte von Meusel & al. (1965), ergänzt durch die Angaben von Moser (1996).

Alle Arten und Unterarten der Sektion sind Volllichtpflanzen und kommen in und oberhalb der Krummholzstufe vor. Einige Populationen können in offene subalpine Fichten- und in Lärchenbestände vordringen. Die Vorkommen liegen nie oberhalb von 2900m NN bzw. oberhalb der alpinen Höhenstufe. Im nördlichen Teil des Areals findet man bei *Pulsatilla alpina* Standorte in allen Expositionen. Im südlichen Verbreitungsgebiet ist, wegen der diskontinuierlichen Wasserversorgung an südexponierten Standorten im Sommer, eine Nord- bis Nordost-Exposition deutlich häufiger.

Der pflanzensoziologische Schwerpunkt liegt bei *P. alpina* subsp. *alpina* an frischen Standorten innerhalb der Seslerietalia (alpine Kalkrasen) und für *P. aurea* sowie *P. alpina* subsp. *alpicola* und *apiifolia* den Borstgras- und Zwergstrauchheiden-Gesellschaften des Nardions (Ellenberg 1996, Moser 1996). Die pflanzensoziologische Bindung von *P. occidentalis* ist lt. Moser nicht bearbeitet.

Die auffällige Arealdisjunktion zwischen den Gebirgen Süd- und Mitteleuropas und den Rocky Mountains kommt auch bei *Anemone baldensis* und innerhalb der Gattung *Androsace* vor. Ein derartiges Muster tritt aus chorologischer Sicht selten auf. Christ (1882) und Heer (1885) sehen darin ein „hohes Alter der Arealformen“, erläutern diese Hypothese aber nicht näher.

1.3. Der Artkomplex von *Pulsatilla alpina*

1.3.1. Biologie des Artkomplexes von *Pulsatilla alpina*

Die Angaben zur Biologie fassen die Untersuchungen mehrerer Autoren (Zimmermann 1952, Aichele & Schwegler 1957, Moser 1996) zusammen und schließen eigene Beobachtungen ein.

Pulsatilla alpina ist ein sommergrüner Hemikryptophyt. Der Einteilung nach Wuchsformen folgend, handelt es sich um eine pleiokormartige Halbrosettenstaude.

Ein Individuum lässt sich in drei Bereiche gliedern: die Pfahlwurzel, das Pleiokorm und der bzw. die Blütensprosse. Die Pfahlwurzel ist bis zu 35 cm lang und hat einen Durchmesser von bis zu 2 cm. Ihre querwellige Rinde verweist auf Fähigkeit zum Wurzelzug. Die Pfahlwurzel trägt dünne Seitenwurzeln (1 – 4 mm im Querschnitt), die sich bis zur 4. Ordnung verzweigen. Das rhizomartige Pleiokorm trägt je nach Art bzw. Morphotyp 2 bis 8 Innovationstrieb, die zu Blütensprossen auswachsen können. Bei der *P. alpina*-Unterart *alpicola* werden Ausläufer mit sproßbürtiger Bewurzelung gebildet. Die Ausläufer bleiben immer mit der Mutterpflanze verbunden, eine klonale Vermehrung erfolgt nicht. Ein Blütensproß besteht aus ein bis drei Grundblättern (Rosette) und einem zur Blütezeit etwa auf halber Höhe bis zur Blüte inserierenden Hochblattquirl, der aus drei laubblattartigen Blättern zusammengesetzt ist. Ein Blütensproß erreicht, je nach Art oder Unterart eine Höhe von 20 - 45 (- 80) cm. Je Blütensproß wird eine Blüte mit meist 6 (5 – 12) weißen, hellgelben oder gelben Tepalen und zahlreichen gelben Staubblättern gebildet. Weiße Blüten sind außen oft violett überlaufen. Die bis zu

120 Fruchtblätter tragen je eine Samenanlage. Die Blüten werden (fakultativ) allogam durch Hummeln, Bienen und Schwebfliegen bestäubt. Zur Fruchtreife wachsen die behaarten Griffel auf eine Länge von 3 bis 6 cm aus.

Der Jahreszyklus beginnt Ende April bis Mai. Der Beginn der Sproßentwicklung kann sich an Schneefeldern je nach Beginn der Schneeschmelze bis Anfang Juli verzögern. Im Zuge des sehr raschen Austreibens der Innovationsknospen erfolgt die volle Entwicklung der Blüten und Laubblätter fast parallel. Die Vollblüte dauert von Mai bis Juni. Regelmäßig treten im Juli und August an proleptischen Seitentrieben „Sommerblüten“ auf. Die ersten Blüten des Jahres haben oft eine (stark) erhöhte Staubblattzahl, spät im Jahreszyklus treten mitunter fast rein weibliche Blüten auf. Die Früchte und Samen reifen im Juli bis August, vereinzelt im Juni und September. Die Ausbreitung der „Federschweifflieger“-Früchte erfolgt anemo- und zoochor. Die Früchte bohren sich mit Hilfe des Federgriffels bei wechselnder Feuchte unter hygroskopischen Bewegungen in den Boden.

Die Keimungsrate ist unter optimalen Bedingungen, wenn die gerade ausgereiften Samen ausgesät werden, mit zirka 70% unerwartet hoch. Trotzdem wurden an natürlichen Standorten nur zweimal Keimlinge gefunden, am Puy de Sancy (Auvergne) und am Stausee Ibon im Valle di Canfranc (Pyrenäen). Für die Ausbildung einer Samenbank gibt es keine Bestätigung. Das Juvenilstadium dauert unter konkurrenzarmen Bedingungen 4 bis 5 Jahre. Bei Konkurrenz blühen die Pflanzen aber auch im 7. Jahr noch nicht unbedingt. Bis zur Blühfähigkeit erneuern sich die Pflanzen monopodial. Später werden die Blühsprosse durch die in den Achseln der Knospenschuppen angelegten Erneuerungstrieb jährlich sympodial fortgesetzt. Das maximale Alter der Pflanzen beträgt mindestens 20 Jahre. Eine Regeneration der Pflanzen kann nur aus dem Pleiokorm erfolgen. Wurzelsprosse wurden nie beobachtet.

1.3.2. Die Sippen des Artkomplexes von *Pulsatilla alpina*

Die vorliegende Arbeit folgt zunächst, ohne damit eine Wertung vorzunehmen, der verbreiteten systematischen Auffassung von Jalas & Suominen (1989). *Pulsatilla alpina* wird demnach in die Unterarten *alpina* (L.) Delarbre, *alpicola* H. Neum., *apiifolia* (Scop.) Nyman., *font-queri* Lainz & Monts., *cantabrica* Lainz und *cyrnea* Gamisans aufgespalten. Die Einteilung von Jalas & Suominen (1989) basiert, wie die der meisten aktuellen Floren, auf den Untersuchungen von Aichele & Schwegler (1957).

Zur intraspezifischen Gliederung von *P. alpina* gibt es verschiedene Auffassungen. Mehrere Autoren betrachten die Unterart *alpicola* als eigene Art *Pulsatilla alba* (Aichele & Schwegler 1957, Tutin 1964, Akeroyd 1993). Die Unterarten *font-queri*, *cantabrica* und *cyrnea* werden von Damboldt & Zimmermann (1974), Tutin (1964) und Aichele & Schwegler (1957) als Teil der umfassenden Unterart *alpina* behandelt.

Moser (1996) stützt seine Gliederung auf eine umfassende biometrische Analyse von über 600 Individuen. Er schlägt eine komplette Revision von *P. alpina* und eine Aufspaltung in 11 Unterarten vor. Der wesentliche Unterschied besteht in der Auflösung der weißblühenden Unterart *alpina* in die Sippen *alpina* s.str., *millefoliata*, *austroalpina*, *cottianaea* und *montis-niveae*. Die Ergebnisse wurden bislang nicht gültig publiziert. Die morphologischen Daten sind von überdurchschnittlich hohem Wert. Sie wurden an Pflanzen erhoben, die unter standardisierten Gewächshausbedingungen kultiviert wurden. Zur Einteilung verwendete Moser auch karyologische, chorologische, ökologische und pflanzensoziologische Daten sowie die Ergebnisse einer Proteinanalyse (Isoenzyme). Die Sippen im Sinne von Moser werden in der vorliegenden Arbeit als „Morphotypen“ bezeichnet, die Namen werden denen der taxonomischen Klassifikation von Jalas & Suominen (1989) gegenübergestellt. Die Tab. 1 stellt die Sippen der beiden Gliederungsvorschläge parallel zusammen.

Tab. 1: Systematische Gliederung des Artkomplexes *P. alpina* nach Jalas & Souminen (1989) und Moser (1996).

Jalas & Suominen (1989)	Moser (1996)
<i>P. alpina</i>	<i>P. alpina</i>
subsp. <i>alpicola</i>	(subsp.) <i>alpicola</i> (subsp.) <i>austriaca</i>
subsp. <i>cantabrica</i>	(subsp.) <i>cantabrica</i>
subsp. <i>apiifolia</i>	(subsp.) <i>apiifolia</i>
subsp. <i>alpina</i> s.l.	(subsp.) <i>cottianaea</i> (subsp.) <i>montis-niveae</i> (subsp.) <i>austroalpina</i>
	(subsp.) <i>alpina</i> s.str. (subsp.) <i>millefoliata</i>
subsp. <i>font-queri</i>	(subsp.) <i>font-queri</i>
subsp. <i>cyrnea</i>	(subsp.) <i>cyrnea</i>

Die nachfolgende Besprechung der Gliederung von *P. alpina* bereitet die Daten von Moser (1996) nach der Interpretation des Autors auf, weil die Ausführungen Mosers an einigen Stellen sehr widersprüchlich sind. Die Hypothesen zur Merkmalsevolution und intraspezifischen Verwandtschaft des Artkomplexes, die u.a. in dieser Untersuchung geprüft werden sollen, werden gemäß dieser Besprechung in Kap. 2.1. formuliert. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen ausgewählte morphologische Eigenschaften der Sippen des Artkomplexes.

Innerhalb der Art *P. alpina* lassen sich die disjunkten Vorkommen der temperaten westeuropäischen und zentraleuropäischen Mittelgebirge und Hochgebirge zum Morphotyp *alpicola* (= subsp. *alpicola*) zusammenfassen. Dazu zählen die Bestände in den Karpaten, der Hohen Tatra, dem Riesengebirge,

dem Harz, den Vogesen, der Auvergne und im Kantabrischen Gebirge. Die Sippe hat einige eigene morphologische Merkmale, kleine weiße Tepalen, eine abweichend niedrige Wuchshöhe, einen aus Blattbasen gebildeten Faserschopf um die Innovationsknospen und eine geringe Blattzipfelzahl an Blatffiedern 3. Ordnung. Charakteristisch sind die unterirdischen, rhizomartigen Ausläufer. Im Gegensatz zum *alpicola*-Morphotyp wurden an Pflanzen von *P. aurea* ebenso wie an *P. occidentalis* und bei allen weiteren Sippen von *P. alpina* nie Ausläufer gefunden. Die Merkmale des Morphotyps sind über das gesamte Verbreitungsgebiet konstant. *Alpicola*-Individuen bevorzugen Volllichtstandorte, sie kommen aber auch in der Krummholzzone vor. Die weißblühende Sippe wächst ausschließlich auf Urgesteinsböden. Aus pflanzengeographischen Erwägungen wurde der Morphotyp *austriaca* (=subsp. *alpicola*) von dem sehr ähnlichen *alpicola*-Morphotyp abgetrennt. Die Sippe ist auf die Ostalpen begrenzt. Einige *austriaca*-Populationen wachsen auf neutralen bis kalkhaltigen Böden und weisen auch in ihrer Wuchshöhe, der Anzahl der Blattzipfel und im Blütendurchmesser Beziehungen zum Morphotyp *alpina* auf. Moser weist allerdings darauf hin, dass zwischen den Sippen *austriaca* und *alpicola* keine deutlichen morphologischen, karyologischen oder enzymelektrophoretischen Unterschiede bestehen.

Der nordwestalpine Morphotyp *alpina* s.str. (subsp. *alpina* p.p. bei Jalas & Suominen) lässt sich chorologisch gut abgrenzen und ist morphologisch einheitlich. Sie kommt im Jura und von den Französischen Westalpen südlich von Grenoble bis zu den Bayerischen Alpen und den Nordtiroler Kalkalpen vor. Isolierte Populationen findet man am Pierre Avoi (Penninische Alpen) und im Samnaun (Rhätische Alpen). Die ausschließlich weißblühende Unterart hat länglich ausgebildete, weniger tief eingeschnittene Blatffiedern 3. Ordnung und eine relativ hohe Anzahl an Blattzipfeln. Die Behaarung des Laubblattrandes und der -unterseite verschwindet mit der vollständigen Entwicklung des Blattes fast ganz. Um die Innovationsknospen verbleibt bei den Pflanzen keine faserige Blattbasenhülle. Der Morphotyp *alpina* kommt fast ausschließlich auf kalkreichem Untergrund vor. Einige, auch morphologisch abweichende Populationen in den Französischen Westalpen wachsen auf tonig-silikatischen Böden. Neben den Volllichtstandorten findet man den Morphotyp an leicht schattigen Stellen in subalpinen Fichtenbeständen. Wegen ihrer morphologischen und karyologischen Ähnlichkeit wurden von Moser (1996) zwischen dem Morphotyp *alpina* und den Morphotypen *millefoliata* und *font-queri* verwandtschaftliche Beziehungen vermutet.

Der feinblättrige, weißblütige Morphotyp *millefoliata* (subsp. *alpina* p.p. bei Jalas & Suominen) besiedelt sowohl silikat- als auch kalkreiche Standorte. Das Areal in den Westalpen ist geschlossen. Isolierte Vorkommen findet man im Etruskischen Apennin, in den Abruzzen und, als südlichste Population des Artkomplexes in Europa, am kalabrischen Monte-Pollino-Massiv. Die Blatt- und Blütenstiele sind rötlich-violett getönt. Die Blatffiedern 3. Ordnung sind vielzipfelig und relativ breit. Die Anzahl der Grundblätter pro Ramet ist erhöht. Der Morphotyp zeigt damit leichte Beziehungen zur kaukasischen *P. aurea*. Die Isoenzymdaten und der Chromosomenmuster verweisen allerdings auf eine Verwandtschaft mit dem Morphotyp *alpina*. Der Morphotyp ist morphologisch nicht homogen. Neben den Ähnlichkeiten zu *P. aurea* und zum Morphotyp *alpina* gibt es Individuen, die

morphologisch zwischen *millefoliata* und *austroalpina* stehen. Sie sind damit letztlich auch den Morphotypen *apiifolia* und *cyrnea* ähnlich.

Der von Lainz & Montserrat (1984) auch als Unterart beschriebene, calciphile Morphotyp *font-queri* kommt in den südlichen Kalkgebirgen der Pyrenäen und in der Serrania de Cuenca vor. Er zeigt nach Moser (1996) starke morphologische und karyologische Ähnlichkeiten mit dem Morphotyp *millefoliata*. Die Sippe hat kleine, behaarte Blattfiedern 3. Ordnung und sehr viele Blattzipfel. Typisch sind die kleinen, weißen, weit geöffneten Blüten. Der Blütenstiel wächst mit der Reife der Sammelfrucht sehr weit aus. Eine Frucht trägt vergleichsweise wenige reife Samen. Der Morphotyp *font-queri* wächst meist an nordexponierten subalpinen Kalkschuttstandorten und ist pflanzensoziologisch mit *Pinus uncinata* eng vergesellschaftet. Der auf Korsika (Monte Rotondo, Monte Cinto, Monte Traunato, Monte d'Oro, Monte Paglia Orba) endemische Morphotyp *cyrnea* (subsp. *cyrnea* bei Jalas & Suominen) hat eine weiße bis cremegelbe Blütenfarbe. Trotz der abweichenden ökologischen Bodenansprüche (Silikat) erinnert seine Morphologie an die der Morphotypen *millefoliata*, *apiifolia* bzw. *austroalpina*.

Der schwefelgelb blühende Typ *apiifolia* (subsp. *apiifolia*) vertritt die Morphotypen der Unterart *alpina* in den Alpen vikariierend auf silikatischem Gestein. Die *apiifolia*-Sippe besitzt in den West- und Zentralalpen (Tendamassiv bis Nordtiroler Alpen) und in den Zentral- und Ostpyrenäen ein weitgehend geschlossenes Areal. Isolierte Vorkommen sind aus dem Hochland von Kastilien und der Auvergne bekannt. Auffällig ist die geringe morphologische Plastizität des Morphotyps *apiifolia*. Selbst die Pflanzen der isolierten Standorte unterscheiden sich nicht von den übrigen Vorkommen. Die Pflanzen haben einen sehr typischen Laubblattschnitt. Die Blattfiedern 3. Ordnung sind wenigzipflig, relativ breit und wesentlich weniger tief eingeschnitten als die des Morphotyps *alpina*. Die Laubblattbehaarung bleibt am voll entwickelten Blatt bis zur Fruchtreife erhalten. Der Morphotyp gedeiht häufig auf offenen subalpinen bis alpinen, beweideten (ungedüngten) staudenreichen Bergwiesen und Borstgrasweiden. Charakteristisch sind hochwüchsige, die Krautschicht dominierende Bestände in lichten, bodenfrischen subalpinen Lärchenwäldern. Die folgenden drei Morphotypen sind, trotz ihrer weißen Blütenfarbe, dem *apiifolia*-Typ laubblattmorphologisch ähnlich. Der Morphotyp *cottianaea* ist in den Cottischen Alpen (Mont-Cenis-Gebiet) endemisch. Die Pollenkörner sind abweichend von allen anderen Sippen tripurat. Er ist mit einer Höhe von bis zu 80 cm ungewöhnlich wüchsig, hat sehr große weiße bis hellgelbe Blütenblätter, deren Anzahl oft erhöht ist. Neben den Vorkommen in Lärchenwäldern und Bergwiesen bzw. Matten der subalpinen und alpinen Stufe etablieren sich einige Pflanzen des *cottianaea*-Typs auch an ruderal beeinflussten Standorten dieser Vegetationsstufe. Der typische Morphotyp der Süd- und Südostalpen *austroalpina* wurde von Moser neu beschrieben. Sein Areal umfasst Populationen von kalkbeeinflussten, relativ trockenen Böden in den Gebirgszügen an den Oberitalienischen Seen, in den südlichen Dolomiten, am Triglav, in den Karawanken und dem kroatischen Kapela-Gebirge. Die Laubblattspreite ist fast farnartig segmentiert und ausgebreitet. Die Blattfiedern 3. Ordnung haben eine mittlere Blattzipfelzahl. Zur Blütezeit sind die Laubblätter bereits voll entwickelt. Der Blütendurchmesser ist vergleichsweise groß. Die

weißblühende, caliciphile Sippe des Kantabrischen Gebirges, der Morphotyp *cantabrica* (subsp. *cantabrica* bei Jalas & Suominen), wird auf Grund ihrer geographischen Isolation als eigenständiges Taxon aufgefasst. Sie unterscheidet sich nur durch die Kombination ihrer morphologischen Merkmale und auch dann nur schwach von den anderen Morphotypen. Ihre systematische und verwandtschaftliche Stellung ist unsicher. Die morphologische Analyse ordnet sie in eine Gruppe mit dem Morphotyp *apiifolia*. Ökologisch und nach dem Karyotyp weist sie auch Ähnlichkeiten zum Morphotyp *alpina* auf.

Physiognomisch und morphologisch eigenständig ist der endemische ostalpine Morphotyp *montis-niveae*. Er kommt nur in den östlichen Österreichischen und Steirischen Kalkalpen vor. Die stets hochwüchsigen, weißblühenden Pflanzen haben sehr große Blattfiedern 3. Ordnung, eine stark reduzierte Blattzipfelanzahl und ungewöhnlich derbe, meist rotviolett überlaufene Blätter. Die von Moser untersuchten Individuen dieses Typs besitzen ein eigenes Isoenzym-Bandenmuster, aber ein Karyotyp-Diagramm, das den Individuen des *alpina*-Typs sehr ähnlich ist. Morphologisch steht die Sippe dem *austroalpina*-Typ am nächsten.

Die Variabilität des Artkomplexes zeigt sich in folgenden Merkmalen: Substratbindung, Ausläuferbildung, Blütenfarbe, Laubblattmorphologie, Laubblattgröße, Wuchshöhe, Blütengröße, Tepalenzahl, Behaarungsstärke, Blütenstiellänge und Divergenz zwischen Laubblatt- und Blütenentwicklung.

Im Süden des Verbreitungsgebietes erfolgt, vermutlich infolge der durch Sommertrockenheit verkürzten Vegetationsperiode, die Laubblattentwicklung sofort mit der Blütenentwicklung. Die vergrößerte Laubblattfläche bei *montis-niveae* erscheint als Anpassung an lichtschwächere Standorte. Die Bildung von Ausläufern bei *alpicola* und *austriaca* in wenig skelettreichen, stark humosen, frisch bis feuchten Zwergstrauchgesellschaften kann ebenfalls als ökologische Anpassung gedeutet werden. Die enge Substratbindung der verschiedenen Morphotypen an kalk- oder silikatbeeinflusste Böden ist sippenspezifisch. Allerdings wurden in diesem Zusammenhang bislang keine morphologischen Merkmale gefunden, die als Anpassung an den Standort gedeutet werden könnten. Bei ultrastrukturellen und tiefgreifenden genetischen Untersuchungen könnten dabei weitere sippenspezifische Merkmale gefunden werden.

Die meisten spezifischen Merkmale der einzelnen Morphotypen lassen sich bei kritischer Betrachtung nur bedingt als selektive Anpassung an bestimmte Standorte auffassen. Sie erscheinen in der Mehrheit eher als zufällige morphologische Divergenz zwischen reproduktiv isolierten Sippen infolge genetischer Drift.

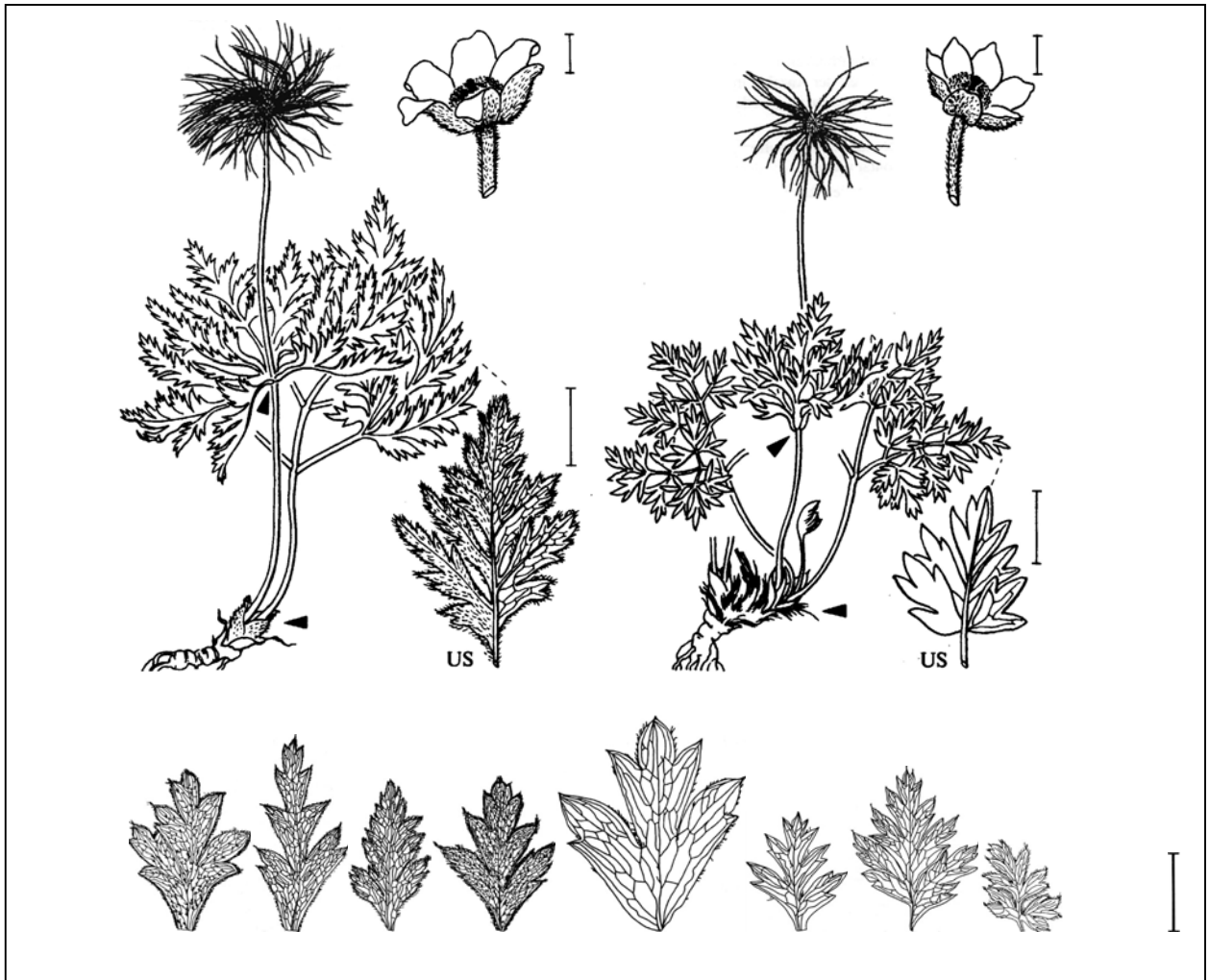


Abb. 3: Morphologie und Variabilität von *Pulsatilla alpina*. Obere Reihe: subsp. *alpina* (bzw. subsp. *apiifolia*), links; rechts: subsp. *alpicola* incl. subsp. *austriaca*. Untere Reihe: Blattfiedern 3. Ordnung (v.l.n.r. subsp. *alpina*, *apiifolia*, *austroalpina*, *cantabrica*, *cottianaea*, *montis-niveae*, *cyrnea*, *millefoliata*, *font-queri* und *alpicola*). Der Maßstab symbolisiert eine Länge von 10 mm (Zeichnungen auf der Grundlage von Jäger & Werner 1995, oben, und Moser 1996, unten; verändert).

Abb. 4 (Farbtafel, S. 14). Obere Reihe: *P. alpina* subsp. *alpicola*, links: im Vordergrund blühende Pflanze mit Hochblattquirl und zwei Grundblättern; rechts: Blüte des Morphotyps x *ochroleuca*. Mittlere Reihe, links: subsp. *alpina*, blühende Pflanze; rechts: subsp. *apiifolia*, blühende Pflanze mit zahlreichen Blüten. Untere Reihe, links: subsp. *montis-niveae*, fruchtende Pflanze am Wiener Schneeberg (Österreichische Kalkalpen). Mitte: Zwergstrauchheide am Standort der subsp. *alpicola* auf dem Brocken (Harz); rechts: leicht beschatteter Felsstandort der subsp. *font-queri* in der Sierra del Cadi (Pyrenäen).



1.3.3. Auffassungen zur Evolution und pleistozänen Ausbreitungsgeschichte der Sektion *Preonanthus* und des Artkomplexes *Pulsatilla alpina*

Vermutungen über die Evolution und die pleistozäne Ausbreitungsgeschichte der Sektion *Preonanthus* findet man bei Zimmerman (1952), Aichele & Schwegler (1957), Damboldt & Zimmermann (1974) und Moser (1996). Weil die Aussagen im wesentlichen auf dem Prinzip der abgestuften morphologischen Ähnlichkeit der Sippen beruhen, haben sie meist einen sehr spekulativen Charakter. Das Entstehungsgebiet der Sektion wird in Asien im Tertiär vermutet. Obwohl Moser eine postglaziale Fernausbreitung nach Nordamerika nicht völlig ausschließt, sollte die Trennung zwischen *P. occidentalis* und den heute europäisch verbreiteten Sippen nicht in jüngster Zeit erfolgt sein. Die morphologischen Abweichungen, wie der Pollentyp und die Form der Sammelfrucht, sind dafür zu deutlich. Aus dem asiatischen Entstehungsgebiet sollen die Vorläufer von *P. occidentalis* lt. Aichele & Schwegler nach Osten über Alaska auf den amerikanischen Kontinent gekommen sein. Die Ausbreitung von Asien nach Westen erfolgte diesen Autoren und Moser zu Folge über den Kaukasus und die Gebirge des Balkans in die Alpen, die Apenninen und die zentraleuropäischen Mittelgebirge sowie auf die Iberische Halbinsel. Alternativ vertreten Walter & Straka (1970) die These, dass *P. alpina* von der nordamerikanischen *P. occidentalis* abstammt und dass sie seit den quartären Kaltzeiten in den europäischen Gebirgen vorkommt.

Die folgenden Hypothesen zur Ausbreitungsgeschichte des Artkomplexes wurden von Moser (1996) zusammengefasst oder neu formuliert bzw. können aus den erhobenen Daten geschlussfolgert werden. Die *alpicola*-Populationen in den Karpaten sind wahrscheinlich der gemeinsame Ursprung aller heutigen Vorkommen von *alpicola* und *austriaca*. Auf Grund des stark disjunkten Areals wird dieser Verwandtschaftskreis als älteste zentraleuropäische Sippe des Artkomplexes angesehen.

Aus den Daten von Moser ergibt sich, dass die Sippe in einer Ausbreitungswelle entlang der herzynischen Mittelgebirge bis in das kantabrische Gebirge gelangt ist. Eine Einwanderung von Individuen aus den Vogesen über den Jura und die Nord- und Westalpen in die Zentralalpen war nach Mosers Auffassung wegen der dominierenden Kalksteinböden nicht möglich. Der Morphotyp *alpicola* war schon während des letzten Glazials so ähnlich verbreitet wie heute. Aus klimatischen Gründen konnten die Vorkommen nacheiszeitlich kein geschlossenes Areal mehr bilden.

Die Individuen der Morphotypen *alpicola* und *austriaca* sind nah miteinander verwandt. Die Ostalpen (*austriaca*-Typ) wurden, ausgehend von den Karpaten, spätestens während der letzten Eiszeit besiedelt. Der Morphotyp *austriaca* dürfte sich nacheiszeitlich aus ostalpinen Refugien in die ehemals vergletscherten Gebiete der Alpen ausgebreitet haben. Von östlicher in westliche Richtung wurde für den *austriaca*-Morphotyp eine zunehmende Wuchshöhe und Organgröße sowie das Auftreten auf neutralen und kalkhaltigen Böden nachgewiesen. Diese Veränderungen wurden von Moser als postglaziale Genintrogression durch Hybridisierung mit dem *alpina*-Morphotyp interpretiert.

Die Entwicklung und Differenzierung der Morphotypen der Unterarten *alpina* und *apiifolia* erfolgte nach Moser erst nach der Herausbildung der Unterart *alpicola*. Eine adaptive Radiation in den verschiedenen Standorten in den Alpen erscheint möglich. In welcher Zeit das geschehen sein könnte, darüber werden weder bei Moser (1996) noch bei Zimmermann (1952), Aichele & Schwegler (1957) oder Damboldt & Zimmermann (1974) Angaben gemacht. Im heutigen geschlossenen Verbreitungsgebiet des Morphotyps *alpina* in den nördlichen Alpen und im Jura sieht Moser das Resultat einer postglazialen Neubesiedelung aus unvergletschert gebliebenen Refugialräumen. Interessant ist, dass man den Morphotyp in den Zentralalpen vor allem auf Nunatakkern (z. B. am Pierre Avoi) findet. Da der Morphotyp morphologisch wenig variabel ist, sollte zwischen den einzelnen Populationen trotzdem über lange Zeit genetischer Kontakt bestanden haben.

Die Morphotypen *millefoliata* und *font-queri* weisen hinsichtlich ihrer Morphologie und ihrer Standortansprüche enge Beziehungen zueinander auf. Ein geschlossenes größeres Areal während des letzten Glazials soll nach der Auffassung von Moser innerhalb der letzten 10000 Jahre in die heutigen zwei Teilverbreitungsgebiete getrennt worden sein.

Der korsische *cyrnea*-Typ stammt vom Morphotyp *millefoliata* ab, vermutlich von Beständen aus dem nördlichen Apennin (Monte Orsaro, Monte Cimone). Beide Morphotypen weisen den gleichen Karyotyp auf (Moser 1996). Da *cyrnea*-Individuen einige eigene morphologische Merkmale zeigen und in ihren autökologischen Ansprüchen (Silikatgestein) abweichen, ist davon auszugehen, dass sich die isolierten Vorkommen seit geraumer Zeit selbständig weiterentwickelt haben. Die Besiedelung Korsikas ist offensichtlich nicht in der Nacheiszeit erfolgt. Die Auffassung von Gamisans (1985), dass die Sippen *cyrnea* mit *alpicola* nahe verwandt sind, ist wegen der deutlichen morphologischen Differenzen abzulehnen.

Alle Vorkommen des Morphotyps *apiifolia* sind morphologisch sehr ähnlich. Nach der Auffassung von Moser soll die Sippe postglazial aus mehreren, eiszeitlich nicht vergletscherten Gebieten von den Westalpen aus in die Ostalpen vorgedrungen sein. Wegen ihrer morphologischen Ähnlichkeit wird vermutet, dass zwischen den Populationen in den Pyrenäen, den spanischen Mittelgebirgen, der Auvergne und in den Alpen bis in die jüngste Zeit ein genetischer Austausch bestand. Die disjunkten, südalpinen Vorkommen des Morphotyps *australpina* sollen diesem Autor zu Folge ihre Ursache in der nacheiszeitlichen Klimaveränderung haben. Die Sippen *australpina* und *montis-niveae* in den Österreichischen Kalkalpen sind heute auf Standorte beschränkt, die während des letzten Glazials eisfrei geblieben waren. Eine postglaziale Expansion scheint daher für beide Sippen nicht angezeigt.

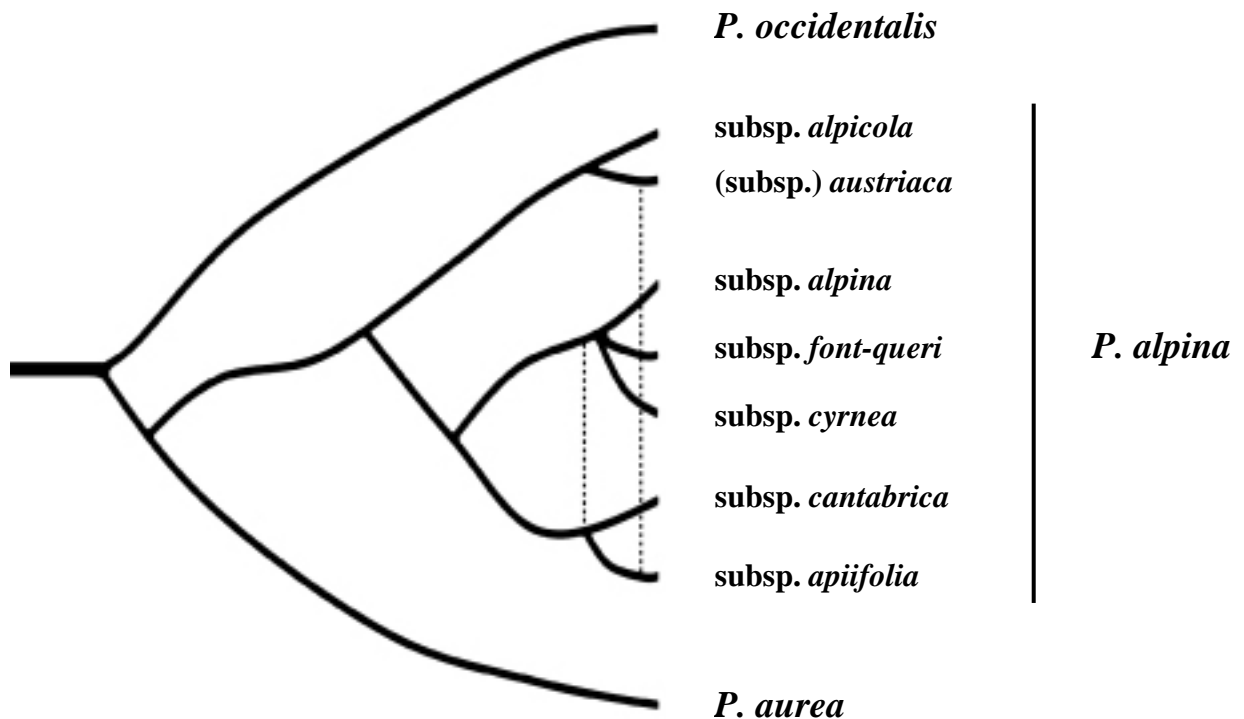


Abb. 5: Die verwandtschaftlichen Beziehungen in der Sektion *Preonanthus* und im Artkomplex *Pulsatilla alpina* nach der Auffassung von Aichele & Schwegler (1957), Jalas & Suominen (1989) und Moser (1996). Die Abbildung wurde verändert. Die gestrichelten Linien zeigen Genfluss an.

Die nördlichste Population des Verbreitungsgebietes von *Pulsatilla alpina* findet man im Harz, auf dem Brocken-Plateau. Sie wird, wie die Populationen der anderen dort auftretenden subalpin-alpinen Arten, meist als Glazialrelikt bezeichnet. Eine im Vergleich zu anderen isolierten Populationen erhöhte genetische Variabilität oder eigene molekulare Merkmale würden für die Population eine Dauerbesiedlung des Brockengebietes seit bzw. nach der Eiszeit bestätigen. Im Gegensatz dazu kann bei einer geringen Diversität nicht sicher zwischen *bottleneck*-Effekt und Fernausbreitung unterschieden werden. Würde eine Dauerbesiedlung bestätigt, kann wegen der ökologischen Erfordernisse von *Pulsatilla alpina* auch auf eine permanente postglaziale Waldfreiheit auf dem Brocken geschlossen werden.

Die Frage, ob die Brockenkuppe seit Beginn des Postglazials andauernd waldfrei war, wurde von verschiedenen Autoren kontrovers diskutiert. Die Pollenuntersuchungen von Beug & al. (1999) konnten für die Zeit des Atlantikums keine Anzeichen für die charakteristische subalpine Heidevegetation belegen. Nach der Auffassung von Heynert (1970) ist die Waldgrenze anthropogen bedingt. Die charakteristische Artenzusammensetzung und die Ausbreitungsstrategien der Arten stützen dagegen die Ansicht, dass es sich um eine natürliche Waldgrenze handelt (Schubert 1960, Stöcker 1961). Die natürliche Wald- und Baumgrenze am Brockengipfel ist teilweise die Folge des Höhenklimas am Brocken. Sie ist nach Haeupler (1970) aber v.a. durch die extreme Windwirkung des isoliert stehenden Gipfel zu begründen. Diese Auffassung wird durch die Untersuchungen von Weigel (1957) zur Wuchshöhe und Bekronung der Fichte im Brockengebiet unterstützt. Eine weitere

Möglichkeit des Überdauerns des Atlantikums boten vermutlich die ausgedehnten Granitblockhalden im Bereich der Brockenkuppe. Ähnlich wie heute einige Individuen von *Hieracium nigrescens*, die derzeit auch unterhalb der Baumgrenze in einigen Blockhalden vorkommen, könnte für *P. alpina* eine Dauerbesiedlung also wenigstens aus orographisch-edaphischen Gründen möglich gewesen sein.

Bereits Thal erwähnt in seiner „Sylva Hercynia“ 1588 *Pulsatilla alpina*, *Hieracium alpinum* und *Salix bicolor* für den Brocken („Die Anemone mit der großen weißen Blume, mit einem beblätterten, handhohen Stängel und mit steifhaarigen, weit ausgebreiteten, mannigfach zerschnittenen Blättern ist dem Brockengipfel eigentümlich“, Zitat nach Kison & al. 1994). Eine bewusste anthropogene Ansiedelung dieser Arten vor 1588 ist ebenfalls unwahrscheinlich.

Von Interesse ist darüber hinaus, wo die nächsten Verwandten der Brocken-Sippe vorkommen und welchen genetischen Abstand sie voneinander haben. Wegen des vergleichsweise genau anzugebenden Minimalalters der Sippentrennung im Spätglazial könnte dann gegebenenfalls auch ein phylogenetischer Baum kalibriert werden. Neben den Fossilfunden von *Clematis uralensis* und einiger weiterer Ranunculaceae-Arten könnten damit die Hypothesen zur zeitlichen Dimension der Differenzierungsprozesse innerhalb des gesamten Artkomplexes geprüft werden.

1.3.4. Hybridisierung und Introgression im Artkomplex

Die Areale der einzelnen Morphotypen sind nicht vollständig vikariant. In den Kontaktzonen sind regelmäßig intermediäre Übergangsformen finden.

Moser (1996) konnte mit Kulturexperimenten zeigen, dass die Merkmale der Morphotypen und ihrer Hybriden nicht substratabhängig sind. An Standorten, an denen oft Silikat- und Kalksteinböden in unmittelbarer Nähe vorkommen, z. B. am Pierre Avoi, an der Schynige Platte, im Wallis, in den Dolomiten bei Canazei, gedeihen neben den Morphotypen *alpina* und *apiifolia* hellgelbe, stark behaarte Individuen mit einer intermediären Laubblattform. Die mutmaßlichen Hybriden werden entsprechend ihrer taxonomischen Beschreibung *P. x ochroleuca* (Bruegg) Dalla Torre & Sarntheim hier als Morphotyp *ochroleuca* bezeichnet.

In den Kontaktzonen der beschriebenen Morphotypen wurden vom Autor häufig Populationen mit Individuen gefunden, die die Eigenschaften beider Eltern besitzen. Da die Merkmale der Elternsippen und ihre Verteilung in diesen Populationen fast kontinuierlich sind, werden sie als Introgressionsformen bzw. als Hybridschwärme gedeutet. In den Westalpen und im Etruskischen Apennin (zwischen den Morphotypen *millefoliata*, *apiifolia* und *alpina*), den Südalpen (zwischen *austroalpina* und *apiifolia*), den Ostalpen (zwischen *austroalpina* und *montis-niveae*) und in den Pyrenäen (zwischen *apiifolia*, *cantabrica* und *font-queri*) gelingt eine saubere morphologische Sippentrennung deshalb nur mit Abstrichen.

Auch der Morphotyp *cottianaea*, der Endemit in den Cottischen Alpen, ist wahrscheinlich eine Hybridsippe. Unter Beteiligung der Morphotypen *apiifolia* und *millefoliata* entstand eine morphologisch stabile Gruppe von Populationen. Das Karyodiagramm der von Moser untersuchten *cottianaea*-Individuen gleicht dem des *apiifolia*-Morphotyps. Die starke Wüchsigkeit der Pflanzen dieses Morphotyps wird vom Autor als positiver Heterosiseffekt aufgefasst.

Hybriden werden nur zwischen den Unterarten bzw. Morphotypen innerhalb des Artkomplexes und wahrscheinlich innerhalb der Sektion *Preonanthus* gebildet, nie mit den „echten“ Küchenschellen der Sektionen *Pulsatilla* und *Semicampanaria* (Damboldt & Zimmermann 1974). Einzig Major (nach Meusel & al. 1965) beschreibt „Übergänge“ zwischen *P. nuttalliana* (Sektion *Pulsatilla*) und *P. occidentalis* im Südwesten der USA. Die Angaben wurden aber von keinem weiteren Autor bestätigt.

1.4. Phylogeographie subalpiner und alpiner Arten

Der Begriff Phylogeographie wurde von J. C. Avise im Jahr 1987 eingeführt. Die Phylogeographie ist ein junger Wissenschaftszweig im Überschneidungsbereich der Populationsgenetik, der Biogeographie und der molekularen Systematik zwischen Populations- und Gattungsniveau. Gegenstand der Phylogeographie sind die verwandtschaftlichen Beziehungen und die räumliche Verteilung einzelner Abstammungslinien.

Innerhalb der letzten Jahre wurden zahlreiche subalpin-alpinen und arktisch-alpine Gefäßpflanzenarten phylogeographisch untersucht (Brochmann & al. 1996b, Hungerer & Kadereit 1998, Abbott & al. 2000, Stehlik & al. 2001b, Kropf & al. 2002). Die Arbeiten zeigen, wie mit Hilfe molekularer Marker biogeographische Hypothesen erfolgreich bearbeitet werden können. Die pleistozänen Klimaschwankungen bewirkten besonders dynamische, kleinräumliche und überregionale Migrationsbewegungen. Die Pflanzenarten der Gebirge waren besonders davon betroffen, weil horizontale Ausweichbewegungen im Gebirge überhaupt möglich sind und weil ein bedeutender Teil der heutigen montanen bis nivalen Standorte vergletschert war. Stehlik & al. (2001a) verdeutlichen, dass ein Überdauern ungünstiger Klimaperioden sowohl in periglazialen Refugien als auch auf lokal eisfreien Standorten (Nunatakkern) möglich war. Letztlich ist jede Art und jede Unterart, ihren ökologischen Ansprüchen, ihrem Verbreitungsmuster, ihren Fortpflanzungsstrategien und ihrem lokalen Ausbreitungserfolg folgend, einzigartig in ihrer Evolution und ihrer Verbreitungsgeschichte.

Die korrekte Interpretation der Verteilung einzelner genealogischer Linien und ihrer Ursachen erfordert weitere, populationsbiologische, reproduktionsbiologische, paläobotanische, geologische, klimatologische und chorologische Informationen. Erst damit können biologisch sinnvolle Hypothesen über die Refugialräume und Migrationsbewegungen der Sippen und die Dauer der Divergenz zwischen den Verwandtschaftslinien abgeleitet werden.

Die Kenntnis des Areal und der morphologischen bzw. der genetischen Variabilität ist eine wesentliche Voraussetzung für die Analyse. Da die genealogische Verwandtschaft vor einer Untersuchung oft unbekannt ist, sollten Individuen aller morphologischen Typen und aller Teilareale einbezogen werden.

Das Areal von *P. alpina* besteht aus zahlreichen Teilarealen. Disjunktionen können grundsätzlich verschiedene Ursachen haben: historische, ökologische oder genetische. Nach den ökologischen Ansprüchen der Sippe sind die Verbreitungslücken bei *P. alpina* nicht historisch (bislang noch keine erfolgreiche, aber potentiell mögliche Etablierung in den Verbreitungslücken), sondern klimatisch und substrat-bedingt. Kleine Exklaven mit größerer Entfernung vom Hauptareal treten ebenfalls häufig auf. Wären diese Vorkommen auf eine Ausweitung des Areals zurückzuführen, müssten die Populationen phylogenetisch direkt von anderen Individuen, i.d.R. aus dem Hauptareal abstammen. Ist eine isolierte Population genetisch sehr variabel und darin benachbarten Vorkommen ähnlich, kann eine Fernausbreitung ausgeschlossen werden. Die biogeographisch isolierten Populationen des Artkomplexes werden aber meist als Glazialrelikte angesehen, die durch Arealregression entstanden sind. Genotypisch sind deshalb deutliche Anzeichen unterbrochenen Genflusses und genetischer Drift, wie ein verarmtes Haplotypenspektrum und eigene, abgeleitete Haplotypen zu erwarten. Die Vorkommen des Morphotyps *ochroleuca* sind wahrscheinlich ein Beispiel für ein disjunktes Areal, das genetisch bedingt ist. Durch eine mehrmalige unabhängige Kreuzung zwischen Individuen gleicher Eltersippen können morphologisch und genetisch sehr ähnliche Hybriden in räumlich getrennten Gebieten (polytop) entstehen.

Im alpinen Hauptareal kommen sieben der 11 vikariierenden Sippen vor. Die West- bzw. Südwestalpen bilden das Mannigfaltigkeitszentrum und als Region mit der höchsten Populationsdichte auch das Häufigkeitszentrum des Artkomplexes. Die hohe Diversität sollte sich auch genotypisch widerspiegeln.

Ein ähnliches genotypisches Bild (Haplotypenverteilung) wie bei räumlich isolierten Reliktsippen würde innerhalb des Hauptareals darauf hinweisen, dass die Populationen bzw. Morphotypen oder Unterarten schon durch Kreuzungsbarrieren voneinander getrennt sind. Der Speziationsprozess wäre dann schon weiter fortgeschritten. Bislang wird ein eigener Haplotypenpool, entsprechend der biologischen Artdefinition, nur für die einzelnen Arten erwartet. An den Verbreitungsgrenzen zwischen den Unterarten und Morphotypen sollte noch eine deutliche genetische Vermischung nachweisbar sein.

2. Hypothesen

2. 1. Hypothesen zur Herkunft und Phylogeographie des Artkomplexes

Die Auffassungen zur Verwandtschaft, Evolution und Ausbreitungsgeschichte der Sektion *Preonanthus* und des Artkomplexes *P. alpina* nach Aichele & Schwegler (1957), Tutin (1964), Damboldt & Zimmermann (1974), Akeroyd (1993) oder Moser (1996) werden an dieser Stelle zu Hypothesen verdichtet, die mit Hilfe der molekularen und phylogeographischen Analysen umfassend geprüft bzw. verifiziert werden sollen. Sie stellen in dieser Form die Ansicht des Autors vor der Erhebung und Auswertung der molekularen Daten dar.

Die Sektion *Preonanthus* in der Gattung *Pulsatilla*

(A) Die Sektion *Preonanthus* ist monophyletisch. Die Herausbildung der Vorfahren der Sektion und ihrer nächsten Verwandten, der Vorfahren von *Pulsatilla kostyczewii* (Sektion *Iostemon*) und *Pulsatilla taraoi* (Sektion *Preonanthopsis*) begann im Tertiär in den zentralasiatischen Gebirgen (nach Aichele & Schwegler 1957).

Phylogenie und Alter der Sektion *Preonanthus*

(B) Zur Sektion *Preonanthus* gehören die drei Arten *P. aurea*, *P. alpina* und die phylogenetisch zuerst abgespaltene Sippe *P. occidentalis*. *Pulsatilla aurea* ist nicht näher mit dem ebenfalls gelbblühenden *P. alpina*-Morphotyp *apiifolia* verwandt (nach Aichele & Schwegler 1957).

Pulsatilla alpina untergliedert sich in drei Verwandtschaftskreise. Die Unterart *alpicola* umfasst die eng verwandten Morphotypen *alpicola* und *austriaca*. Aus denen leiten sich einerseits die Gruppe mit den Morphotypen *alpina*, *millefoliata*, *font-queri* und *cyrnea* und andererseits die Morphotypengruppe mit *apiifolia*, *cottianaea*, *austroalpina*, *montis-niveae* und *cantabrica* ab. Die Differenzierung des Artkomplexes begann im Pleistozän und hält bis heute an. Einige Morphotypen haben sich erst seit dem letzten Glazial neu herausgebildet (Zusammenfassung und Interpretation der Daten von Moser 1996).

Die Phylogeographie des Artkomplexes

(C) Die Vorfahren der Art *P. alpina* breiteten sich ausgehend von den Karpaten in die zentraleuropäischen Gebirge aus (Moser).

Die heutigen Sippen entstanden durch adaptive Radiation in Zentraleuropa. Das Hauptareal in den West- und Südwestalpen ist das morphologische Mannigfaltigkeitszentrum und das genotypische Diversitätszentrum (Zetzsche, basierend auf den Daten von Moser 1996 und Aichele & Schwegler 1957).

Die einzelnen genealogischen Linien zeigen eine Ausbreitung von Ost nach West an. Die Vorposten-Populationen im Süden der Alpen und die Populationen der Mittelgebirge des herzynischen Bogens sind Reliktpopulationen, die durch Arealregression infolge klimatischer Veränderungen isoliert wurden (Interpretation der Daten von Moser 1996).

Die Evolution der Merkmale des Artkomplexes

(D) Alle europäischen Populationen gehen auf die gleichen, weißblühenden Vorfahren silikatischer Böden mit *alpicola*-ähnlicher Laubblattmorphologie zurück. Die Anpassung an Kalkgesteinsböden ist zweimal entstanden und tritt in den Morphotypengruppe von *alpina* und von *apiifolia* auf. Die gelbe Blütenfarbe innerhalb des Morphotyps *apiifolia* ist ein abgeleitetes Merkmal. Die Laubblattmerkmale eignen sich als diagnostische Merkmale zur Beschreibung der Phylogenie des Artkomplexes (Interpretation der Daten von Moser 1996).

Die Sippen von *Pulsatilla alpina*

(E) Der Morphotyp *alpicola* ist die phylogenetisch älteste Sippe von *P. alpina*. Alle heutigen Populationen, auch die des *austriaca*-Morphotyps, leiten sich von Individuen aus den Karpaten ab. Die Populationen beider Morphotypen sind morphologisch und genetisch wenig variabel und innerhalb der Art isoliert (nach Moser 1996).

Die Population vom Brocken gehört zum Morphotyp *alpicola* und ist spätestens seit dem letzten Glazial reproduktiv isoliert. In der Brockenregion kommt seit dem letzten Glazial ununterbrochen eine *alpicola*-Population vor (nach Schubert 1960, Kison & al. 1994 und Moser 1996).

(F) Die Morphotypen *alpina*, *millefoliata*, *font-queri* und *cyrnea* sind eng miteinander verwandt. Die Populationen des morphologisch einheitlichen *alpina*-Typs in den Nordalpen stehen untereinander in einem engen genetischen Kontakt. Die Populationen der Morphotypen *font-queri* und *millefoliata* trennten sich erst nacheiszeitlich. Der korsische Morphotyp *cyrnea* stammt von Individuen des *millefoliata*-Typs ab (Moser 1996).

(G) Die Individuen des einheitlichen, gelbblütigen Morphotyps *apiifolia* sind über ihr gesamtes Verbreitungsgebiet genetisch wenig variabel. Die Sippe ist phylogenetisch jung und nicht näher mit der ebenfalls gelbblühenden *P. aurea* verwandt. Die Populationen des reliktsichen Morphotyps *montis-niveae* haben sich allopatrisch vom *austroalpina*-Morphotyp differenziert (Moser 1996).

Hybridisierung und Introgression

(H) Hybridisierung und Introgression tritt v.a. bei sympatrischen Vorkommen zwischen den Morphotypen (und Unterarten) auf. Die Elternsippen der polytopen, hybridogenen Sippe *ochroleuca* sind die Morphotypen *alpina* und *apiifolia*. Der endemische, stabile Morphotyp *cottianaea* ist aus dem Morphotyp *millefoliata* und *apiifolia* durch Hybridisierung entstanden und heute reproduktiv isoliert

(Interpretation der Daten von Moser 1996). Individuen des *alpicola*-Morphotyps können mit Individuen anderer Morphotypen unter natürlichen Bedingungen keine Hybriden bilden. Einige Populationen mit *austriaca*-Morphotyp zeigen postglaziale Genintrogression durch Individuen des Morphotyps *alpina* (Moser 1996).

2.2. Verifikation der Hypothesen

Die in den Kapiteln 3. und 4. beschriebenen Methoden werden zu Ergebnissen führen, die die Verifikation der Hypothesen ermöglicht.

Die Topologie der rekonstruierten Phylogenie bestimmt, welche Thesen zur Verwandtschaft der Sippen als bestätigt angesehen werden und welche zu verwerfen sind.

Als Maß für die genetische Variabilität wird die Haplotypenvariabilität einzelner Populationen und Morphotypen bzw. Akzessionen bestimmt und miteinander verglichen. Damit sind die Aussagen zur relativen genetischen Diversität der einzelnen Akzessionen bzw. der Sippen verifizierbar.

Die *nested-clade*-Analyse und die F-Statistik bewertet die Thesen zur Stärke des Genflusses zwischen den betrachteten Unterarten, Morphotypen, Akzessionen und Abstammungslinien statistisch. Die Gültigkeit der vorgeschlagenen Migrationsrouten kann damit geprüft, bzw. aus der Verwandtschaft und der räumlichen Verteilung der Haplotypen abgeleitet werden.

Die Hypothesen zur historischen Ausprägung morphologischer Merkmale und ökologischer Anpassungen werden auf der Basis der Phylogenie getestet. Welche morphologischen Merkmale die Phylogenie diagnostizieren, wird die Korrelationsanalyse zwischen morphologischen und DNA-Sequenzmerkmalen zeigen.

3. Einführung in die Theorie der Methoden

3.1. Morphologische Daten

Die Analyse morphologischer Merkmale bildet auch heute die Grundlage phylogenetischer Untersuchungen. Morphologische Merkmale sind der Beobachtung leicht zugänglich und bilden, wegen ihrer Verschiedenheit und ihrer komplexen genomischen Grundlage, einen großen Teil des Genoms ab. Zudem ermöglichen bislang nur morphologische Merkmale, die Pflanzen unter Feldbedingungen mit vertretbarem Aufwand zu identifizieren und zu sammeln.

Ein Problem bei der Datenerhebung ergibt sich aus der morphologischen Plastizität der Individuen. Es kann nicht immer sicher unterschieden werden, ob es sich um eine umweltbedingte Merkmalsänderung handelt oder ob tatsächlich genetische Unterschiede repräsentiert werden. Schwierigkeiten bestehen auch bei der Unterscheidung von Homologien und Analogien sowie bei der Bestimmung der Richtung einer Merkmalsänderung, ob es sich also um ein ursprüngliches oder abgeleitetes Merkmal handelt. Sind die zu analysierenden Sippen phylogenetisch zu weit voneinander entfernt, steht eine ausreichende Anzahl vergleichbarer Merkmale oft nicht zu Verfügung.

Die entscheidende Schwäche morphologischer Merkmale folgt aus dem biologischen Paradigma von der Richtung der Merkmalsausprägung (Gen → Transkript → Merkmal). Da ausschließlich die genetische Information vererbt wird, sind die primären phylogenetischen Signale ebenfalls nur in den molekularen Merkmalen zu finden.

3.2. Molekulare Marker

Mit der Einführung neuer biochemischer und molekularbiologischer Techniken zum Beginn und verstärkt ab Mitte des 20. Jahrhunderts hat die systematisch-phylogenetische Forschung eine Renaissance erfahren. Zunächst lieferten immunologische Studien Daten zur Ähnlichkeit in der Proteinausstattung auf höherem taxonomischen Niveau (Nuttall 1904). Weitere wichtige Fortschritte waren die Sequenzierung des Insulins durch Sanger im Jahr 1954 und die phylogenetische Analyse von Proteinsequenzen (Zuckerandl & Pauling 1962). Etwas später gelangen mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese von Isoenzymen auch systematische Vergleiche zwischen nahverwandten Organismen (Harris 1966, Hubby & Lewontin 1966). Mit der Entwicklung der *fingerprint*-Methode RFLP (Palmer & Zamir 1982), der enzymatischen DNA-Sequenzierung (Sanger & al. 1977) und der Polymerasekettenreaktion (Mullis & Falloona 1987) stehen seit Ende der 80er Jahre die Basistechniken zur Verfügung, die phylogenetische Untersuchungen auf allen verwandtschaftlichen Ebenen direkt an der Erbsubstanz ermöglichen.

Molekulare Merkmale (molekulare Marker) besitzen gegenüber anderen Merkmalen wesentliche Vorteile. Die DNA ist das grundlegende Molekül der Vererbung der genetischen Information. Da die Mechanismen der Vererbung und der Merkmalsmutationen relativ gut verstanden sind, lässt sich aus dem Vergleich homologer DNA-Sequenzen die verwandtschaftliche Entfernung direkt bestimmen. Die Erkennung der Merkmale ist objektiv, weil nur eine bestimmte Anzahl diskreter Merkmalsausprägungen (vier Nukleotide) möglich ist. Im Gegensatz zur Erfassung morphologischer Merkmale, die oft ein „systematisches Taktgefühl“ (Aichele & Schwegler 1957) erfordern, kommen unabhängige DNA-Analysen grundsätzlich zum gleichen Ergebnis. Die große Anzahl an im Prinzip gleichwertigen DNA-Merkmalen ist allein ein wichtiger Vorzug vor den klassischen Alternativen. Wegen der dramatisch diversen Mutationsraten unterschiedlicher DNA-Abschnitte bilden DNA-Marker ein ideales Werkzeug zur Erfassung der intra- und interspezifischen Variabilität zwischen Organismen nahezu jeden Verwandtschaftsgrades.

Für die Analyse von molekularen Markern bei Pflanzen können drei Genome, das Kern-, das Chloroplasten- und das Mitochondriengenom genutzt werden.

Die Kern-DNA ist in Chromosomen organisiert und dominiert mit einem Anteil von mehr als 99% am Gesamtgenom die DNA-Menge der Zelle. Durch sexuelle Rekombination werden die maternalen und paternalen Erbanlagen nach den Mendelschen Regeln aufgespalten. Das Genom enthält kodierende DNA-Abschnitte (Exons) als einzeln auftretende *single-copy*-Gene und als Genfamilien. Ein Großteil des Kerngenoms besteht aus nichtkodierender, meist hochrepetitiver *junk*-DNA. Obwohl zahlreiche Gene und die in ihnen enthaltenen (Introns) bzw. an sie angrenzenden (Spacer) nichtkodierenden Bereiche analysiert wurden, werden für phylogenetische Analysen bislang nur wenige Kernmarker verwendet. Die *Internal Transcribed Spacer*-Region zwischen den hoch konservierten rDNA-Genen (26S, 5,8S und 18S) ist der bislang am häufigsten verwendete Kernmarker. Charakteristisch für die ITS-Region ist ihr mehrfaches Auftreten als Genfamilie mit jeweils mehreren tausend tandemartig wiederholten Kopien (Appels & Honeycutt 1982). Bei der ITS-Evolution treten einige Besonderheiten auf, die man mit dem Begriff *concerted evolution* beschreibt (Arnheim 1983). Dabei kommt es durch nichtmendelsche, ungleiche Rekombination zur Homogenisierung der ITS-Regionen einer Tandemgruppe und zeitlich verzögert zur Vereinheitlichung der ITS-Sequenzen des ganzen Kerngenoms (Dover 1986, Blattner 2004). In jungen Hybriden kann deshalb noch heterozygote ITS nachgewiesen werden (Whittall & al. 2000). Rekombinierte elterliche ITS-Regionen können auch so homogenisiert werden, dass sich in Hybriden mosaikartige ITS-Sequenzen durchsetzen (Eckelmann 2002). Da die Homogenisierung in vielen Pflanzengruppen zeitlich etwa parallel mit der Artbildung verläuft, eignet sich die Region besonders für phylogenetische Fragestellungen zwischen Art- und Gattungsniveau.

Die Genome der Organellen sind strukturell und funktional vereinfachte Bakteriengenome. Sie werden bei den meisten Angiospermen ausschließlich maternal und ohne Rekombination vererbt. Das gilt

auch für die Chloroplasten der *Pulsatilla*-Arten. Organellengenome enthalten ebenfalls konservierte kodierende und schnell evolvierende, nichtkodierende Bereiche. Auch sie eignen sich prinzipiell für phylogenetische Studien auf jedem taxonomischen Niveau. Die DNA der Organellen wird nicht durch *crossing over* verändert. Im Gegensatz zur nukleären DNA ergibt sich damit der Vorteil, dass sich Mutationen zeitlich parallel zur Evolution einzelner Verwandtschaftslinien akkumulieren. Die Analyse der Organellen-DNA ermöglicht deshalb Aussagen über die relative zeitliche phylogenetische Herkunft (ursprünglich vs. abgeleitet) der genealogischen Haplotyplinien.

Bei Untersuchungen an Pflanzen wurden Chloroplastenmarker häufig erfolgreich verwendet. Das Chloroplastengenom enthält zahlreiche Spacer und Introns zwischen den Genen der Chloroplasten-tRNAs, die für Studien zwischen Populations- und Gattungsniveau sehr gut geeignet sind. Besonders erfolgreich wurde bisher der hochvariable Spacer zwischen dem Lysin-tRNA-Exon *trnL* (UAA-3') und dem tRNA-Gen für Phenylalanin *trnF* (GAA) eingesetzt (vgl. Taberlet & al. 1991 und Kelchner 2000).

Das Mitochondriengenom der Pflanzen ist im Durchschnitt wesentlich größer als das von Pilzen oder Tieren, weist aber keine auffällig erhöhte Anzahl an Genen auf. Wegen des extemen Anteils an *junk*-DNA ist das Chondriom strukturell sehr instabil. Für die Angiospermen sind universell einsetzbare Primersequenzen für das Intron der Cytochromoxidase (*cox*) bekannt (Laroche & al. 1997, Petersen & al. 2003). Es ist zu erwarten, dass Mitochondrien-Sequenzen in Zukunft für phylogenetische Studien auch auf niedrigem taxonomischen Niveau häufiger eingesetzt werden.

3.3. Sequenzanalyse

Alle phylogenetischen Analyseverfahren von DNA-Abschnitten beruhen auf der Bestimmung der mutativen Variation der Basensequenz, auf Punktmutationen, Deletionen und Insertionen (= Indels).

Die intraspezifische Variabilität wird meist mit den Methoden des genetischen Fingerabdrucks (*fingerprint*) bestimmt. Bei der Methode *restriction fragment length polymorphism* (RFLP, Botstein & al. 1980) wird die genomische DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten. Die DNA-Polymorphismen in den Restriktionsschnittstellen zwischen verschiedener Akzessionen resultieren in Unterschieden in den Fragmentlängen. Der Nachteil der RFLPs liegt in der vergleichsweise großen Menge benötigter DNA. Alternativ werden seit Anfang der 90er Jahre PCR-basierte Techniken eingesetzt. Bei der RAPD-Methode (*random amplified polymorphic DNA*) werden Oligonukleotide, die aus etwa zehn Basen bestehen und eine zufällige, aber bekannte Basenfolge aufweisen, als PCR-Primer verwendet. Die Oligonukleotid-Primer fungieren als Erkennungssequenz. Durch die PCR-Amplifikation erhält man ein Fragmentgemisch, das sich wegen der DNA-Polymorphismen zwischen verschiedenen Akzessionen unterscheidet und elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert werden kann. Die

wesentliche Schwäche der Methode, die geringe Reproduzierbarkeit von RAPDs, ergibt sich aus der Abhängigkeit der Genauigkeit des Primerannealings von den PCR-Reaktionsbedingungen (Harris 1995, van der Zande & Bijlsma 1995). Die PCR-Technik *amplified fragment length polymorphism*, AFLP, Vos & al. 1995) vereint die Vorzüge von RAPDs und RFLPs.

Mikrosatelliten oder *simple sequence repeats* (SSRs) sind repetitive DNA-Abschnitte, die aus sich wiederholenden Modulen von meist bis zu drei Basen (z. B. A/T, GA/TC, AGC/GCT, TTG/CAA) aufgebaut sind. Verschiedene Akzessionen können sich in der Anzahl der Module unterscheiden. Die Methode liefert reproduzierbare und akkumulierbare Daten und eignet auch für die Unterscheidung von homozygoten und heterozygoten Individuen. Die Technik ist sehr kostenintensiv, weil für jede Verwandtschaftsgruppe spezifische flankierende Primer neu entwickelt werden müssen.

PCR

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, ein benötigtes DNA-Fragment aus wenig Ausgangs-DNA (*template*) selektiv in nahezu beliebiger Menge zu synthetisieren. Die von Saiki & al. (1985) beschriebene Methode läuft in drei Hauptschritten ab. Während der Denaturierung werden die DNA-Doppelstränge bei Temperaturen um 95°C physikalisch „geschmolzen“, die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Nukleotiden der beiden DNA-Einzelstränge werden aufgelöst. Durch kontinuierliche Temperaturabsenkung kommt es bei Erreichen der Annealingtemperatur zur Hybridisierung der im Überschuß vorliegenden, locuspezifischen Oligonukleotide (Primer) an die komplementären DNA-Abschnitte der *template*-DNA (Annealing). Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Länge und der Basenfolge des Primers. Während der Elongation wird die Temperatur auf zirka 72°C, die optimalen Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase erhöht. Die Polymerase synthetisiert unter Verlängerung des Oligonukleotids einen neuen komplementären DNA-Strang (Extension). Durch die zyklische Wiederholung der Schritte ist eine exponentielle Vermehrung der Fragmente möglich.

Sequenzierung

Die Sequenzierung wird im wesentlichen nach der Standardmethode von Sanger (Sanger & al. 1977) durchgeführt. Nach der Denaturierung wird die DNA mit einem Primer hybridisiert und im Elongationsschritt mit Hilfe der Polymerase verlängert. Neben den Desoxynukleotiden enthält der Reaktionsansatz mit Fluoreszenzfarbstoffen gelabelte Didesoxynukleotide (im Gegensatz zur Methode von Sanger). Werden sie anstelle der Desoxynukleotide in den zu verlängernden DNA-Strang eingebaut, führen sie auf Grund ihrer chemischen Struktur zum Kettenabbruch. Die Sequenzierreaktion führt zu einem Fragmentgemisch. Das denaturierte Fragmentgemisch wird über ein Acrylgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die durch ihr letztes (Di-)-Nukleotid charakteristisch

gelabelten Fragmente trennen sich ihrer Länge entsprechend auf und beschreiben so die Art und Position jeder Base innerhalb des Fragmentes.

Nur die DNA-Sequenzdaten liefern die direkte Sequenzinformation. In der vorliegenden Arbeit werden sie vorrangig verwendet, da sie als nichtanonyme Marker im Gegensatz zu *fingerprints* (RAPD, ISSR, AFLP) akkumulierbare und meist reproduzierbare Informationen ergeben.

Single-Enzyme-AFLP (se-AFLP)

Zur Analyse der intraspezifischen Diversität des Artkomplexes sollte die *fingerprint*-Technik AFLP (Vos & al. 1995) angewendet werden. Da das Probenmaterial sowohl nahverwandte Individuen als auch weiter entfernte Sippen enthielt, deren Bandenmuster sich nach einem Vorversuch als nicht mehr homologisierbar erwiesen haben, wurde die klassische AFLP-Methode etwas modifiziert.

Bei der *single-enzyme*-AFLP wurde mit *EcoRI* nur ein Restriktionsenzym eingesetzt. *EcoRI* schneidet unter Bildung sogenannter *sticky ends* am Ende der palindromischen 6-bp-Erkennungssequenz (GAATTC). Die Anzahl der gebildeten Fragmente bleibt im Gegensatz zum klassischen AFLP-Verfahren relativ gering. Vorteil und Ziel dieser Modifikation ist es, einerseits eine relativ geringere Anzahl längenpolymorpher Fragmente zu erhalten und, wegen der niedrigen Gesamtfragmentzahl, andererseits die finanziell günstige Agarosegelelektrophese zur Auftrennung des Fragmentgemischs nutzen zu können.

Die se-AFLP-Variante wird wie die AFLP-Methode in vier Schritten durchgeführt. Während der Restriktion wurde, abweichend vom Standardprotokoll, die verdünnte, aliquotierte genomische DNA zunächst bei 37°C mit *EcoRI* enzymatisch in 12 Stunden verdaut, das Fragmentgemisch mit Isopropanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Der gesonderte Restriktionsschritt wurde notwendig, da die vorliegende genomische DNA von *Pulsatilla alpina* offenbar Stoffe enthielt, die eine vollständige Restriktion bei 22°C nicht gewährleisten. Für den Restriktions-Ligations-Schritt wird die restriktierte DNA mit dem oligomeren *EcoRI*₊-Adapter equimolar gemischt und innerhalb von 14 Stunden bei 22°C mit dem Adapter an beiden *sticky ends* ligiert. Während der Ligationsreaktion muss das Restriktionsenzym *EcoRI* im Gemisch aktiv sein, weil die Ligase alle doppelsträngigen *sticky-ends*-Fragmente unspezifisch ligiert, also Fragment-DNA-Adapter- und Fragment-DNA-Fragment-DNA-Komplexe bildet. Im Reaktionsgemisch reichern sich zunehmend Adapter-Fragment-Adapter-Komplexe an, weil diese im Gegensatz zu reinen Fragment-Komplexen durch *EcoRI* nicht mehr gespalten werden können. Die präselektive und die selektive Amplifikation wurde nach dem von Vos & al. (1995) vorgeschlagenen Protokoll durchgeführt.

Für die selektive Amplifikation wurde ein im Vergleich zu AFLPs um ein bis zwei Basen verlängerter Primer verwendet, um die Anzahl der Fragmente so zu verringern, dass die Auftrennung über das Agarosegel eindeutige Signale liefert. Die DNA-Konzentration wurde vor jeder Amplifikation nach Elektrophorese mit 1,5%igem Agarosegel festgestellt und durch Zugabe von

zweifach destilliertem Wasser mit einer Verdünnung von 1:1 bis 1:20 ausgeglichen. Die Tests ergaben, dass ein Multiplexen, das parallele Ansetzen identischer Reaktionsgemische und Mischen vor dem Auftragen auf das Agarosegel notwendig war, um einige sehr variable Banden von der Auswertung auszuschließen.

Die Reproduzierbarkeit der se-AFLP-Methode wurde getestet und ist bei DNA-Isolaten gleicher Lagerdauer und bei der Verwendung des gleichen DNA-Isolationsverfahrens über alle Schritte zufriedenstellend gegeben. Die beiden Bedingungen waren für die vorliegende Studie nicht gewährleistet, weil die DNA mit Verfahren verschiedener Firmen und im Laufe von zwei Jahren schrittweise isoliert wurde. Die erhobenen Daten wurden deshalb nicht in die vorliegende Untersuchung einbezogen. Der aktuelle Stand der Evaluierung der se-AFLP-Methode und das Laborprotokoll können bei Bedarf vom Autor angefordert werden.

3.4. Methoden zur Rekonstruktion der Phylogenie

Mit den Methoden der Stammbaumrekonstruktion versucht man die gemeinsame evolutive Geschichte ausgewählter Lebewesen in Form eines meist gerichteten Baumes nachzuvollziehen. Den Methoden liegt die Beobachtung zu Grunde, dass die abgestufte Ähnlichkeit verglichener Organismen Ausdruck ihrer Verwandtschaft ist. Molekulare Merkmale und speziell die Nukleotide der DNA eignen sich dazu in besonderem Maße, weil die Trennung der Akzessionen ihre Ursache in mutativen Veränderungen der Erbinformation hat.

Zur Analyse molekularer Sequenzdaten wurden verschiedene Verfahren entwickelt, die oft in quantitative, die Ähnlichkeit messende „Distanzmethoden“ und qualitative, merkmalsbasierende „kladistische Methoden“ unterschieden werden.

Die Qualität der Stammbaumrekonstruktion hängt wesentlich vom richtigen Alignment ab. Das heißt, die Basenpositionen der zu vergleichenden Sequenzen müssen ortholog sein und sollten möglichst fehlerfrei bestimmt werden. Das Erstellen des Alignments setzt bereits einige Hypothesen über die Sequenzevolution, z. B. die Häufigkeit von Indels sowie der Art der Nukleotidaustausche voraus.

Die Darstellung der Distanz- und heuristischen Daten erfolgt gewöhnlich in Form eines dichotomen oder polytomen Stammbaumes. Diese Darstellung ist idealisiert. Allgegenwärtige biologische Phänomene wie *crossing over*, Hybridisierung, Introgression (= Rekombination) und Homoplasie können damit nicht abgebildet werden. (Diese Phänomene können z. B. mit Hilfe des Programms SplitsTree (Huson 1998) auf der Grundlage der Sequenzmerkmale als Netzwerk vereinfacht veranschaulicht werden.)

3.4.1. Distanzmethoden

Die grundlegende Idee der Distanzmethoden (Fitch & Margoliash 1967) beruht darauf, die Anzahl gemeinsamer bzw. abweichender Merkmale zu bestimmen, daraus ein Ähnlichkeitsmaß zu berechnen und die Distanzwerte zu einem Baum zu verrechnen. Die Qualität der Merkmale bleibt dabei völlig unberücksichtigt. Es spielt also keine Rolle, ob gemeinsame analoge, symplesiomorphe oder synapomorphe Merkmale gezählt werden.

Zunächst werden alle Sequenzen paarweise miteinander verglichen und jeweils ein Distanzwert berechnet. Der Distanzwert ist auch ein Maß für die durchschnittliche Substitutionsrate für ein Sequenzpaar. Aus den Werten aller Sequenzpaare wird eine Distanzmatrix gebildet. Mit verschiedenen Evolutionsmodellen versucht man, den komplexen Prozeß der Sequenzevolution zu modellieren. Ziel ist es, die Genauigkeit des Distanzwertes entsprechend empirisch beobachteter Daten der Sequenzevolution zu korrigieren, dass er die evolutionäre Distanz genauer wiedergibt. Die Grundannahme für alle Evolutionsmodelle ist, dass die Nukleotidsubstitution als stochastischer Prozeß abläuft und dass eine bestimmte Substitution mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit auftritt. Die einfache p-Distanz misst die prozentuale Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen. Dabei werden identische Positionen mit 1 und Positionen mit verschiedenen Basen mit 0 verrechnet. Das von Jukes & Cantor (1969) vorgeschlagene Einparameter-Modell korrigiert das Auftreten multipler Substitutionen zwischen stark voneinander abweichenden Sequenzen. Unabhängig von der Art der Basensubstitution wird nur eine Änderungswahrscheinlichkeit für alle Nukleotide angenommen. Die durchschnittliche Häufigkeit aller vier Nukleotide sollte etwa 1/4 betragen. Das Kimura-2-Parameter-Modell (Kimura 1980) berücksichtigt zusätzlich die empirisch belegte Tatsache, dass nicht alle Arten von Basensubstitutionen gleich wahrscheinlich sind. Die Änderungswahrscheinlichkeiten für Transversionen und Transitionen werden getrennt geschätzt und korrigiert. Auch die Modelle nach Hasegawa und Tamura-Nei, das GTR-Modell (*general time reversible*), die Berücksichtigung synonymen und nichtsynonymen Substitutionen und der Gamma-Distanz versuchen real beobachtete Nukleotidhäufigkeiten bzw. Änderungswahrscheinlichkeiten bestimmter Arten von Basensubstitutionen zu schätzen und zu korrigieren. Die Anwendung dieser spezifischer Modelle ist aber nur sinnvoll, wenn eine ausreichend hohe Zahl von Basensubstitutionen zwischen den untersuchten Sequenzen besteht. Sie bieten unter erhöhtem Rechenaufwand dann die Möglichkeit, den Datensatz, d.h. die Distanzwerte zu optimieren.

In einem zweiten Schritt werden auf der Basis der korrigierten Distanzwerte mit Hilfe von bestimmten Clusteralgorithmen iterierend die Sequenzpaare bzw. Sequenzpaargruppen gesucht, die sich am ähnlichsten sind. Die Ähnlichkeit der Sequenzpaare und Sequenzpaargruppen wird als Stammbaum dargestellt. Für das einfache Clusterverfahren *unweighted pair group method with arithmetic means*, UPGMA, müssen konstante Substitutionsraten vorhanden sein. Es gilt deshalb als veraltet.

Die von Saitou & Nei (1987) entwickelte *neighbor-joining*-Methode, NJ, verwendet ein Näherungsverfahren, um den Baum zu bestimmen, der die Summe aller Astlängen minimiert

(*minimum evolution tree*). Die Methode beginnt mit einem sternförmigen, nichthierarchischen Baum, der alle Akzessionen enthält. Durch *neighbor joining* werden unter Knotenbildung und durch Verwendung der Distanzwerte, schrittweise die ähnlichsten Akzessionen bzw. die Nachbarclades des Stammbaumes bestimmt. Die Länge der Äste des Baumes repräsentiert gleichzeitig die Distanz zwischen zwei Akzessionen. Die kleinste Astlängensumme ist das Optimalitätskriterium, das verwendet wird, um zwischen alternativen Verzweigungen oder Bäumen zu wählen. Unter der Voraussetzung genau bestimmter evolutiver Distanzen, findet die NJ-Methode effizient die Stammbaumtopologie. Weil die Methode vergleichsweise wenig Rechenkapazität benötigt, können mit ihr auch sehr große Datensätze ausgewertet werden. Im Unterschied zu UPGMA funktioniert die NJ-Methode auch dann, wenn die Substitutionsraten der Sequenzen variieren.

Der Nachteil der Distanzmethoden besteht darin, dass die aus den Basensubstitutionen resultierenden Merkmalsänderungen zu einem einzigen Distanzwert reduziert werden. Es können also gleiche Distanzwerte entstehen, obwohl die zugrunde liegenden Sequenzen verschieden sind. Merkmale, die für die Auflösung der Verwandtschaft von Bedeutung sein können, gehen teilweise verloren.

3.4.2. Maximum Parsimony und Maximum Likelihood

Die Methoden *maximum parsimony* und *maximum likelihood* verwenden konkrete Merkmalsausprägungen an orthologen Positionen innerhalb eines Locus, um einen Stammbaum zu rekonstruieren. Bei genauer Betrachtung handelt es sich um Verfahren, die einen gegebenen Sequenzdatensatz phylogenetisch bewerten.

Die kladistische Methode *maximum parsimony*, MP (Farris 1970), beruht auf dem theoretischen Parsimonie-Prinzip, darauf, die einfachste Lösung eines Problems als die beste anzunehmen. Das Prinzip ist auch auf DNA-Sequenzen anwendbar. Der alignierte Sequenzdatensatz wird dazu in homologe, *parsimony*-informativ, wenn die gleichen Nukleotide an einem Locus in einigen aber nicht in allen Sequenzen vorhanden sind, und in *parsimony*-nichtinformativ Nukleotide unterteilt. Das MP-Verfahren konstruiert zunächst eine Vielzahl möglicher Baumtopologien. Da die Anzahl der möglichen Topologien mit zunehmender Anzahl an Akzessionen extrem ansteigt, wurden verschiedene Suchstrategien entwickelt, um den Kalkulationsaufwand zu begrenzen. *Exhaustive search* ist die einfachste Suchstrategie, bei der alle möglichen Topologien nach dem Parsimonie-Prinzip bewertet werden. Sie garantiert den kürzesten Stammbaum bzw. die kürzesten Stammbäume zu finden, ist aber wegen den Rechenaufwandes nur für relativ kleine Datensätze bis etwa 12 Akzessionen sinnvoll anwendbar. Auch das *branch-and-bound*-Verfahren garantiert das Auffinden des/der kürzesten MP-Baumes. Während der Berechnung werden dabei bereits berechnete Teilbäume, die längere Astlängen aufweisen, nicht mehr berücksichtigt. Das *heuristic-search*-Verfahren wird bei Datensätzen mit über 22 Akzessionen angewendet. Zur Berechnung werden an einen Startbaum, der

z. B. durch eine NJ-Analyse generiert wurde, durch Knotenbildung an beliebigen Sequenzpositionen sukzessiv neue Akzessionen angeknüpft und die Astlängen berechnet. Das Auffinden des kürzesten Baumes ist bei dieser Methode nicht gesichert.

Die Gesamtsumme aller für die Erklärung eines bestimmten Stammbaumes benötigten Substitutionen ist ein Maß für die Qualität dieser Baumtopologie. Der beste Stammbaum bzw. die besten Stammbäume nach dem Parsimonie-Prinzip (*most parsimonious trees*) erklären die Unterschiede zwischen den Sequenzen aller berücksichtigten Akzessionen mit der geringsten Anzahl an Substitutionen. Eine Aussage über die Evolutionsrichtung, d.h. über ursprüngliche und abgeleitete Merkmale, wird möglich, wenn die gemeinsamen Basenpositionen eines Clades mit denen einer sicheren Außengruppe (*outgroup*) verglichen werden. Mit der MP-Methode ist es auch möglich, Hypothesen der Sequenzen ancestraler Sippen zu bilden.

Mit dem MP-Ansatz werden oft mehrere gleich lange kürzeste Bäume gefunden. Diese Bäume können in einem statistischen Verfahren, bei dem berechnet wird, welche Verzweigungsmuster wie häufig in den kürzesten Bäumen auftreten, zu einem Konsensus-Baum zusammengefasst werden. Die Darstellung erfolgt als Kladogramm, bei dem die Aussagen über die Anzahl der Substitutionen, durch die einzelne Verzweigungen gestützt sind, verloren gehen. Ein *strict consensus tree* enthält nur Verzweigungen, die in allen kürzesten Bäumen vorkommen. Ein *majority rule tree* zeigt die Verzweigungen, die in mehr als 50% aller Bäume auftreten und ein *semistrict consensus tree* enthält die Verzweigungen verschiedener Bäume, die einander nicht widersprechen. Die Darstellung als *strict consensus tree* und *majority rule tree* wird in der vorliegenden Arbeit bevorzugt.

Die MP-Methode erreicht ihre Grenzen, wenn die beobachteten Sequenzpositionen hochvariabel sind (Jin & Nei 1990). Akzessionen, die Sequenzabschnitte mit einer überdurchschnittlichen Substitutionsrate enthalten, bilden sehr lange Astabschnitte im Stammbaum (*long branch attraction*). Die Rekonstruktion dieser Regionen mit Hilfe von MP ergibt nicht immer die evolutiv richtige Baumtopologie (Felsenstein 1978).

Die Methode *maximum likelihood*, ML, ist ein stochastisches Verfahren, das von Felsenstein (1981) zur Stammbaumrekonstruktion aus Sequenzdaten eingeführt wurde. Der Unterschied zu MP besteht darin, dass die Baumtopologie als die beste ausgewählt wird, die die Sequenzvariabilität eines Gesamtdatensatzes mit der höchsten Wahrscheinlichkeit erklärt bzw. unterstützt. Die ML-Methode benötigt mindestens folgende Annahmen der Sequenzevolution: (i) die Nukleotidpositionen evolvieren unabhängig voneinander, (ii) die geringste Zahl an Merkmalsänderungen ist die wahrscheinlichste und (iii) die Substitutionen treten eher an längeren Ästen eines Baumes auf. Entsprechend der Erläuterungen zur Anwendung der Evolutionsmodelle zur Korrektur der Distanzmaße (siehe Kap. 3.4.1.), muss auch bei der ML-Methode ein Evolutionsmodell gewählt werden, das die Häufigkeiten und Übergangswahrscheinlichkeiten aller Typen von Nukleotidsubstitutionen beschreibt. Die Software MODELTEST 3.06 PPC (Posada & Crandall 1998) bestimmt für jeden spezifischen Sequenzdatensatz das optimale Evolutionsmodell aus 56 verschiedenen Modellen. Dabei wird das Evolutionsmodell

gewählt, dass bei einer möglichst geringen Anzahl variabler Parameter (niedriger Freiheitsgrad) einen möglichst hohen *log-likelihood*-Testwert erzielt.

Die Wahrscheinlichkeit, in Form des *log-likelihood*-Wertes, muss für jede Baumtopologie berechnet werden. Bei der Berechnung des Wertes wird ebenfalls der *branch-and-bound*- bzw. der *heuristic-search*-Ansatz verwendet, weil die ML-Berechnung mit zunehmender Anzahl an Akzessionen und mit zunehmender Sequenzlänge sehr zeitintensiv wird. Um das Auffinden des wahrscheinlichsten Baumes zu erleichtern, werden meist die NJ- und der Konsensusbaum der MP-Analyse als Startbaum verwendet.

Mit Hilfe von Computersimulationen, unter Gültigkeit der Hypothesen zur Evolution von DNA-Sequenzen, wurde versucht, die Effektivität der verschiedenen Rekonstruktionsmethoden zu testen. Nach Kuhner & Felsenstein (1994) findet ML die Baumtopologie, die die Sequenzvariabilität eines Datensatzes selbst bei stark divergierenden Substitutionsraten am besten beschreibt. Die Unterschiede zwischen der ML- und der MP-Topologie sollten, entsprechend den Untersuchungen von Felsenstein (1983) und Felsenstein & Sober (1986) bei geringer genetischer Divergenz eher gering sein. Bei vergleichsweise wenigen informativen Merkmalen erbringt die NJ-Methode oft die besten Phylogenien (Holder & Lewis 2003).

3.4.3. Statistische Bewertung molekularer Phylogenien

Die vorgestellten phylogenetischen Verfahren versuchen in Form einer Baumtopologie die Evolutionsgeschichte zu rekonstruieren. Dabei wird aber keine Aussage darüber getroffen, welche Qualität ein errechneter Stammbaum hat, wie gut eine divergente Entwicklung zwischen zwei Akzessionen gesichert ist oder in welchem Maße der Datensatz widersprüchliche Hypothesen stützen würde.

Goodness-of-fit-Indizes

Die *goodness-of-fit*-Indizes werden zur Beurteilung der Qualität von MP-Phylogenien berechnet. Sie beschreiben, wie gut die errechnete Baumtopologie den zu Grunde liegenden Datensatz repräsentieren. Der *consistency index*, CI (Kluge & Farris 1969), ist ein Durchschnittswert für das Auftreten von Homoplasien in einem Datensatz. Er wird für jede Merkmalsänderung, die mehrfach unabhängig auftritt, also homoplastisch ist, als Quotient aus eins und der Anzahl der unabhängigen Merkmalsänderungen errechnet. Der Wert für den *retention index*, RI (Farris 1989), beschreibt das Verhältnis der vorhandenen zur maximal möglichen Anzahl von unabhängigen Merkmalsänderungen. Für beide Maßzahlen gilt, dass ein Datensatz umso genauer von der Topologie beschrieben wird, je näher der Wert bei eins liegt.

Die Güte des CI und des RI hängen maßgeblich vom Probenumfang ab. Datensätze mit einer stark divergierenden Anzahl an Akzessionen sind mit diesen Indices nicht sicher vergleichbar.

Bootstrap

Das von Efron (1982) vorgeschlagene und von Felsenstein (1985) erstmals für phylogenetische Berechnungen angewendete Bewertungsverfahren wird bei Distanzmethoden und bei heuristischen Methoden häufig eingesetzt, um die Robustheit phylogenetischer Hypothesen zu prüfen. Bootstrap-Stichproben werden gebildet, indem der alignierte Datensatz wiederholt neu angeordnet wird. Aus dem Ausgangsdatsatz wird eine vorgegebene Anzahl Pseudomatrizen erstellt, die die Größe des Originaldatsatzes hat. Eine Pseudomatrix enthält eine Teilmenge der Ausgangsmerkmale mit Wiederholungen einzelner Merkmale. Jede Pseudomatrix wird nach der verwendeten phylogenetischen Methode neu berechnet und die Existenz wiederkehrender Verzweigungen in der Baumtopologie gezählt. Bei Berücksichtigung aller Pseudomatrizen kann durch die Berechnung einer Konsenstopologie für jede Verzweigung ein prozentualer Konfidenzwert angegeben werden. Der Bootstrapwert misst, wie gut einzelne Verzweigungen auf Grund des Datensatzes abgesichert sind. Er enthält keine Aussage darüber, wie gut eine Topologie den Datensatz repräsentiert.

Die Aussagequalität von Bootstrapwerten ist wegen der Berechnung mit zufällig veränderten Merkmalen umstritten. Nach Felsenstein (1985, 1988) bedeutet ein Wert von über 95%, dass eine Verzweigung so gut abgesichert ist, dass für die verbundenen Akzessionen eine monophyletische Entstehung angenommen werden kann. Hillis & Bull (1993) weisen mit ihren Vergleich von computersimulierten und echten DNA-Sequenzen darauf hin, dass sogar mehr als 95% aller Verzweigungen mit einer Bootstrapunterstützung von mehr als 70% als statistisch sehr gut abgesichert gelten können. Die Berechnung des Bootstraps von großen Datensätzen ist bei heuristischen Verfahren und besonders bei ML auch mit modernen Computern sehr zeitaufwendig oder kann nicht durchgeführt werden.

Decay-Index

Eine alternative Methode zur Abschätzung der topologischen Stabilität eines phylogenetischen Baumes ist der Decay-Index oder *Bremer support* (Bremer 1988, Donoghue & al. 1992). Sein Vorteil liegt darin, dass die Originaldatenmatrix vollständig verwendet wird. Damit gehen alle Merkmale, die eine Verzweigung unterstützen, in die Bewertung ein. Bei dieser Methode werden alle Bäume zu einem Konsensbaum vereinigt, die um eine bestimmte Anzahl an Schritten länger sind als der sparsamste Baum (*most parsimonious tree*) sind. Der Decay-Index (d) gibt an, ab welcher Länge ein Clade nicht mehr unterstützt wird. Je größer der Decay-Wert, umso besser ist eine Verzweigung abgesichert. Der Decay Index kann ausschließlich auf MP-Analysen angewendet werden.

Skewness

Die Skewness (g1-Wert) ist geeignet, die Signifikanz des phylogenetischen Signals einer bestimmten Topologie im Vergleich mit zufällig erzeugten Topologien zu bewerten. Sie misst die Abweichung der Baum­längen­verteilung einer phylogenetischen Analyse von einer Normalverteilung.

Simulationen an zufälligen und an Datensätzen mit zahlreichen Homoplasien oder mit geringem Informationsgehalt haben gezeigt, dass die Baum­längen­verteilung dann etwa einer Normalverteilung entspricht (Huelsenbeck 1991, Hillis & Huelsenbeck 1992). Datensätze mit phylogenetischer Information haben dagegen sehr wenige kürzeste Bäume und wenige Bäume in der Umgebung der kürzesten Bäume. Sie weisen eine Rechtsschiefe auf. Der g1-Wert ist von der Anzahl der analysierten Akzessionen, der Art der Merkmale (binär oder mehrstufig) und der Anzahl variabler Merkmale abhängig. Das phylogenetische Signal eines Datensatzes kann durch Vergleich mit den entsprechenden kritischen Schwellenwerten (vgl. Hillis & Huelsenbeck 1992) auf Signifikanz und Stärke geprüft werden.

3.5. Datierung phylogenetischer Daten

3.5.1. Molecular-clock-Hypothese

Die *molecular-clock*-Hypothese, d.h. die Annahme der Existenz einer konstanten Rate der molekularen Evolution, wurde zuerst für Proteine von Zuckerkandl & Pauling (1965) postuliert. Sarich & Wilson (1973) zeigten, dass der zeitliche Takt der molekularen Uhr im wesentlichen der physikalischen und nicht der biologischen Generationszeit folgt. Obwohl konstante Evolutionsraten meist nicht angenommen werden können (z. B. Langley & Fitch 1974, Li & Wu 1985), wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, das Divergenzalter der Linien in phylogenetischen Untersuchungen dennoch abzuschätzen (Li & Bousquet 1992, Takezaki & al. 1995, Britton 2002, Sanderson 2002).

Die im folgenden vorgestellten Berechnungsverfahren schätzen das relative Alter aller Knoten eines phylogenetischen Baumes. Die absolute Divergenzzeit zwischen den Linien kann nur bestimmt werden, wenn wenigstens ein Fossil oder ein geologisches Ereignisses, das einen Knoten des Baumes repräsentiert, zur Kalibrierung verwendet wird. Gewöhnlich wird das älteste verfügbare Fossil, das morphologisch sicher einer Gattung oder Spezies zugeordnet werden kann, als erster Repräsentant dieser Sippe bzw. Linie genutzt. Sein Alter beschreibt damit lediglich das Minimalalter des Knotens, das seine Linie von seiner Schwesterlinie trennt. Das Maximalalter eines Knotens kann aus theoretischen Gründen nicht sicher angegeben werden.

Wegen der Unsicherheiten bei der geologischen Datierung sollte das Alter von Fossilien als Zeitintervall angegeben werden. Es erscheint entgegen der üblichen Praxis angeraten, bei der Angabe der kalkulierten Divergenzzeit auf eine sinnvolle mathematische Genauigkeit zu achten.

3.5.2. Relative-rate-Test

Der *relative-rate*-Test (RRT) wurde von Sarich & Wilson (1973) entwickelt, um zu testen, ob die Aminosäuresubstitutionen in zwei verschiedenen Akzessionen seit dem Zeitpunkt ihrer Trennung mit der gleichen Geschwindigkeit, also gemäß einer molekularen Uhr verlief. Wu & Li (1985) haben den Test so erweitert, dass er auf Nukleotidsubstitutionen anwendbar ist. Grundsätzlich wird dabei die relative evolutionäre Distanz zwischen einer Akzession A und einer Referenzakzession und einer Akzession B und der Referenzakzession bestimmt. Damit können die Substitutionsraten aller Akzessionen miteinander verglichen werden. Es wird angenommen, dass das Auftreten der Substitutionen einem Poissonprozess folgt. Die Substitutionsraten können abhängig von der Substitutionsart, der Kodonposition, der Nukleotidposition und von ihrer Lage innerhalb des untersuchten Locus variieren. Mit K2WULI (Jermiin 1996) steht eine Software zur Berechnung des RRT zur Verfügung, die das Kimura-2-Parameter-Modell zur Bestimmung der evolutionären Distanzen verwendet (Kimura 1980). Die Annahme von Jukes & Cantor, dass die Substitutionsrate für alle Paare der vier Nukleotide gleich ist, wird dabei so spezifiziert, dass Transitionen und Transversionen getrennt bewertet werden.

Da die Verteilung der Substitutionsraten einer Standardnormalverteilung folgt, kann ein t-Test für unabhängige Mittelwerte genutzt werden, um einzuschätzen, ob die Substitutionsraten von je zwei Akzessionen signifikante Unterschiede zeigen. (Für die Gültigkeit des Tests sollte die Anzahl der Substitutionen jeweils 20 überschreiten.) Der Test lehnt die Nullhypothese, dass zwischen den Substitutionsraten von je zwei Akzessionen kein Unterschied besteht, bei einem Wahrscheinlichkeitsniveau von 95% ab, wenn der absolute z-Wert 1,96 übersteigt. Gilt die Nullhypothese, kann die Phylogenie mit Hilfe der durchschnittlichen Divergenz aller Akzessionen im Vergleich zur Außengruppe in eine ultrametrische Topologie überführt werden. Der Abstand der Verzweigungen ist dann proportional zu ihren Divergenzzeiten.

Der Nachteil des *relative-rate*-Tests besteht darin, dass jeweils nur zwei Sequenzen direkt miteinander verglichen werden können. Da die Tests bei der Analyse mehrerer Akzessionen nicht unabhängig sind, kann es zu statistischen Überlagerungen kommen, so dass eine Aussage für den gesamten phylogenetischen Baum oder einen Subbaum unklar bleibt.

3.5.3. Likelihood-ratio-Test

Der *likelihood-ratio*-Test (LRT) wurde entwickelt, um die Übereinstimmungsgüte (*goodness of fit*) zwischen zwei alternativen phylogenetischen Modellen statistisch objektiv bestimmen zu können. Die theoretische Basis des LRT ist bei Felsenstein (1981) und Swofford & al. (1996) detailliert erklärt. Der Test wird verwendet, um zu prüfen, ob sich der *likelihood*-Wert eines optimalen Baumes mit variabler Substitutionsrate vom selben Baum unter der Annahme einer molekularen Uhr signifikant unterscheidet. Die Differenz der *likelihood*-Werte folgt annähernd einer Chi-Quadrat-Verteilung. Unter Berücksichtigung der Anzahl der Akzessionen im Datensatz und des Signifikanzgrades ($P=0,01$ oder $0,05$) kann der kritische Schwellenwert zur Bewertung der Nullhypothese mit Hilfe statistischer Standardtafeln bestimmt werden. (Der Test darf nur angewendet werden, wenn das Substitutionsmodell und die Topologie der zu vergleichenden Bäume identisch sind und der einzige variable Parameter die Substitutionsrate ist.)

Wird die Nullhypothese einer konstanter Substitutionsrate abgelehnt, ist eine einfache Linearisierung der Astlängen des optimalen Baumes nicht zulässig. Eine Datierung auf der Grundlage der relativen Knotenabstände liefert dann keine optimalen Ergebnisse. Da die komplexe Datierungsmethode *penalized likelihood* (PL) nur dann optimal einsetzbar ist, wenn die Substitutionsraten im Datensatz variieren, folgt aus dem Ergebnis des LRT unmittelbar auch, ob PL angewendet werden darf (Sanderson 2002).

3.5.4. Penalized Likelihood

Die Substitutionsraten zwischen verschiedenen Akzessionen und Clades höherer Ordnung sind oft sehr unterschiedlich. Eine genaue Erfassung des Maßes der Ratenvariation der Abstammungslinien gelingt kaum. Die von Sanderson (2002) empfohlene Methode *penalized likelihood*, PL, ist eine semiparametrische Glättungsmethode, bei der jeder Abstammungslinie einer Phylogenie eine eigene Substitutionsrate zugewilligt wird. Die Raten starkvariiierender Linien werden durch eine Strafkorrektur, den variablen Glättungsparameters λ korrigiert. Der Wert von λ beeinflusst die Substitutionsraten und die Alter der Knoten. Eine objektive Methode für die Bestimmung der optimalen Stärke der Glättung ist eine Kreuzvalidierung auf der Grundlage der gegebenen Baumtopologie und Astlängen. Durch sequentielles Entfernen kleiner Teildatensätze, der terminalen Äste der Baumes, werden die Parameter Substitutionsrate und Knotenalter bei gegebenem Glättungsparameter bestimmt und nachfolgend die Modellparameter errechnet, die die entfernten Daten am besten vorhersagen. Der optimale Glättungswert ergibt sich, wenn der Vorhersagefehler zur Korrektur aller geprüften Teildatensätze minimal wird. Die Genauigkeit der Altersschätzung der Knoten mit PL ist den *clocklike*-Methoden und den alternativen Glättungsmethoden wie *non*

parametric rates smoothing (NPRS) dann überlegen, wenn die Substitutionsraten stark variieren (Sanderson 2002). Die PL-Berechnungen können mit der internetverfügbaren Software „r8s“ ausgeführt werden (Sanderson 2003).

PL kann die Altersdaten mehrerer Fossilien für die Kalibrierung berücksichtigen. Ein einfacher Test zur Abschätzung der Datierungsgenauigkeit besteht darin, jeweils nur ein oder wenige von allen zur Verfügung stehenden Altersdaten zur Kalkulation zu verwenden bzw. das Maximalalter zu variieren, etwa die Obergrenze der geologischen Periode, das Alter der ältesten Vorkommen der untersuchten Pflanzenfamilie oder Ordnung. Damit kann die Zuverlässigkeit der Zeitbestimmung abgeschätzt werden.

3.6. Analyse kombinierter Datensätze

3.6.1. Kombination molekularer Datensätze

Verschiedene molekulare Datensätze enthalten oft sich ergänzende und widersprüchliche Informationen (Kellog & al. 1994). Ein Weg, sich dem Ziel einer möglichst genauen phylogenetischen Rekonstruktion zu nähern, ist die Kombination unterschiedlicher Datensätze (Hillis 1987).

Mit dem *total evidence*-Ansatz werden alle Daten in einer gemeinsamen Datenmatrix integriert und gemeinsam analysiert. Verwendet man dabei kladistische Verfahren, können grundsätzlich alle Daten kombiniert werden. Im Gegensatz dazu sollten bei Distanzverfahren nur gleichartige Datensätze gemeinsam analysiert werden, weil die zur Korrektur verwendeten Evolutionsmodelle für verschiedene Daten nicht sinnvoll kombiniert werden können. *Likelihood*-Methoden können nur bei reinen Sequenzdatensätzen angewendet werden. Unterscheidet sich der Informationsgehalt unterschiedlicher Datensätze beträchtlich, sollten die Merkmale für eine gemeinsame Analyse durch einen Korrekturfaktor gewichtet werden. Gewöhnlich werden dabei unterschiedliche Sequenzlängen oder die Anzahl polymorpher bzw. informativer Merkmale korrigiert. Da objektiv nicht zu entscheiden ist, wieviel phylogenetische Information in einem konkreten Merkmal enthalten ist, kann ein allgemeines Kriterium zur Bestimmung des Korrekturfaktors nicht angegeben werden.

Unter dem Begriff *taxonomic congruence* werden einige Verfahren zusammengefasst, die die Baumtopologien separat analysierter Datensätze bewerten (Bledsoe & Raikow 1990, Baum 1992). Die Bildung einer Konsenstopologie reduziert dabei zwar den Informationsgehalt, verdeutlicht aber alle sicheren Verzweigungen, die durch die kombinierten Datensätze unterstützt werden. Durch eine Gegenüberstellung alternativer Topologien unterschiedlicher Datensätze können widersprüchliche Verzweigungen herausgearbeitet werden, die z. B. Hinweise auf Hybridisierungsereignisse zwischen den untersuchten Akzessionen geben. Verschiedene Marker, z. B. Kern- und Chloroplastenmarker, unterscheiden sich in ihrer Evolution und Vererbung maßgeblich voneinander. Die auftretenden

Widersprüche zwischen den Datensätzen sind deshalb auf mögliche biologische Ursachen zu untersuchen.

Die Untersuchungen verschiedener Autoren zeigen, dass die Datenkombination die statistische Absicherung der resultierenden Phylogenien verbessern, Polytomien auflösen und Rekombination aufdecken kann (Olmstead & Sweere 1994, Hoot & Crane 1995, Eckelmann 2002). Wegen der Probleme der Objektivierbarkeit der Korrektur und der maßgeblichen Unterschiede in der Evolution verschiedener Marker ist die Zulässigkeit der Kombinationsverfahren trotzdem umstritten (Bull & al. 1993, Hillis 1995, Huelsenbeck & al. 1996).

3.6.2. Korrelationsanalysen molekularer und morphologischer Daten

Korrelationsanalyse, Manteltest, Mantelkorrelogramme

Der einfache Mantel-Test besteht darin, den Grad und die Signifikanz der Korrelation zwischen zwei Distanzmatrizen, z. B. zwischen genetischer und morphologischer, zu bestimmen und zu testen. Der Korrelationswert R_m , oder Mantel-r, ist als Verhältnis aus dem Kreuzprodukt der Matrizen und der Quadratwurzel aus dem Produkt der Summenquadrate der Matrizen definiert. Partielle Mantel-Tests, so genannte Mantel-Korrelogramme werden genutzt, um in diesem Fall die morphologischen Distanzen zwischen den Populationen, als Funktion der genetischen Distanz, in Form der kombinierten Sequenzdaten, zu quantifizieren. Für die Analyse werden die Werte für die genetischen Entfernungen zwischen den Populationen gemäß Oden & Sokal (1986) zu Distanzklassen zusammengefasst. Die korrespondierenden Mantel R_m -Werte werden dann für jede Distanzklasse getrennt berechnet. Die R_m -Werte werden durch Permutation der Ausgangsdaten statistisch auf Signifikanz getestet. Im Gegensatz zum klassischen Mantel-Test können Mantel-Korrelogramme auch nichtlineare Trends zwischen den Datenmatrizen aufdecken (Burgman & Williams 1995).

Rekonstruktion historischer Merkmalsausprägungen

Die vergleichenden phylogenetischen Methoden *phylogenetic generalized least square method* PGLS, *Felsenstein's independent contrasts*, FIC, *spatial autoregressive method*, ARM, *phylogenetic eigenvector regression*, PVR, werden eingesetzt, um evolutionsbiologische Parameter zu schätzen und Hypothesen zur Richtung und zur Intensität der Merkmalsevolution zu testen. Eine Grundannahme aller Methoden ist eine gesicherte Phylogenie, eine zweite, dass das zu untersuchende Merkmal entlang dieser Phylogenie evolviert. Die Unterschiede der Methoden betreffen das Modell der Merkmalsevolution, ob also angenommen wird, dass die Merkmalsänderungen durch zufällige genetische Drift oder durch Drift und Selektion bewirkt werden. Überraschenderweise haben die Computersimulationen von Martins & al. (2002) ergeben, dass alle genannten Methoden gute

statistische Ergebnisse unabhängig von den Details des zugrunde liegenden Evolutionsmodells erzielen.

Eine besondere Anwendung der PGLS-Methode (Martins & Hansen 1997) ermöglicht die Rekonstruktion historischer morphologischer und molekularer Merkmalsausprägungen. Im Rahmen eines Ansatzes der quadratischen Regression werden die Messwerte für die bestehenden Akzessionen in Abhängigkeit von phylogenetischen Parametern und von Fehlerparametern kombiniert. Die phylogenetischen Parameter beschreiben in welcher Weise die mikroevolutionären Prozesse die Ähnlichkeit zwischen den Vorfahren und heutigen Akzessionen beeinflussen. Die Fehlerparameter beziehen die (evtl. gegebene) Merkmalsvariation einer Akzessionen und die Standardabweichung der Messwerte (durch Schätzung aus den Messwerten selbst) in die Berechnung ein. Das Modell sagt jeden früheren Zustand als gewichtetes Mittel der Messwerte der übrigen Akzessionen auf der Grundlage der Phylogenie vorher. Die angegebene Varianz kann als Ausdruck der Aussagesicherheit aufgefasst werden.

3.6.3. Methoden zur geographischen Analyse phylogenetischer Daten

Für die phylogeographische Analyse werden verschiedene Modelle genutzt, um räumliche und historische Prozesse voneinander zu trennen. Die Methoden zur Untersuchung der (räumlichen) Populationsstruktur orientieren sich am Hardy-Weinberg-Modell. Nach diesem Modell befinden sich ideale, unendlich große Populationen bei Zufallspaarung im Gleichgewicht, das durch Selektion oder Mutation nicht verändert wird. Alle Abweichungen vom Gleichgewicht werden durch Isolation und genetische Drift hervorgerufen und können mit den Methoden AMOVA, F-Statistik und Manteltest statistisch untersucht werden.

Seltene historische Ereignisse können maßgeblichen Einfluss auf die Evolution von Populationen haben. Beim Koaleszenz-Modell (Kingman 1982) wird die Evolutionsgeschichte einer Population oder einer Sippe auf den Stammbaum einer Stichprobe von bekannten DNA-Sequenzen reduziert (Koaleszent). Alle Allele der Stichprobe werden auf einen einzigen gemeinsamen Vorläufer den *most recent common ancestor*, MRCA zurückgeführt. Im Gegensatz zum Hardy-Weinberg-Modell werden die Häufigkeit und die evolutionäre Beziehung der Allele der Stichprobe analysiert. Die Anwendung des Modells auf reale Daten, z.B. mit Hilfe der *nested-clade*-Analyse, erlaubt Aussagen wie die Faktoren Populationsstruktur, Migration und Selektion in der Vergangenheit auf eine Population bzw. Sippe eingewirkt haben.

Haplotypendiversität, AMOVA

Als Standardindex für die Haplotypendiversität eignet sich der auf Haplotypdaten angepasste Parameter *gene diversity*. Er wird nach der Formel $H = n / (n-1) \times (1 - \sum p_i^2)$ geschätzt (Nei 1987). Dabei

misst n die Anzahl der Kopien eines Haplotyps der Probe und p_i die Probenhäufigkeit des i -ten Haplotyps.

Die Methode *analysis of molecular variance* (AMOVA, Excoffier & al. 1992) wird zur Analyse von hierarchisch strukturierten Populationen auf der Grundlage der Haplotypendiversität bzw. der genetischen Distanz zwischen den Populationen eingesetzt.

Für die AMOVA wird eine *a-priori*-Struktur durch die Gruppierung der Akzessionen definiert, z. B. alle Akzessionen eines Gebirges oder alle Akzessionen eines Morphotyps. Die Analyse bestimmt die Varianz aller Teilkomponenten der hierarchischen Struktur, d.h. sie berechnet, wieviel der Gesamtvarianz aller Haplotypen durch die Variabilität (i) innerhalb der Akzession, (ii) zwischen den Akzessionen eines Gebirges oder eines Morphotyps und (iii) zwischen den Gebirgen oder Morphotypen erklärt wird.

F-Statistik, Mantelkorrelogramme

Die F-Statistik geht auf ein Konzept zur Bestimmung des *Fixierungsindex*, F , aus der Heterozygotität zurück (Wright 1978). Der Index vergleicht die erwartete Heterozygotität einer Population einer höheren hierarchischen Stufe unter Hardy-Weinberg-Bedingungen mit der tatsächlichen, reduzierten Heterozygotität auf einer niedrigeren Stufe. Die F-Parameter werden genutzt, geographisch strukturierte Populationen zu analysieren (Weir & Cockerham 1984). Der wichtigste Index, F_{st} , kombiniert die Reduktion der Heterozygotität aller (Sub-)populationen mit der Heterozygotität aller einbezogenen Populationen. F_{st} -Werte liegen zwischen null und eins. Der Wert null zeigt an, dass keine geographische Struktur oder gleiche Allelfrequenzen in allen Subpopulationen vorhanden sind. Ein F_{st} -Wert von eins zeigt eine Beschränkung der Allele auf die (Sub-)populationen an bzw. muss als vollständige Isolation interpretiert werden. Der paarweise F_{st} -Wert wird als ein Maß für die genetische Isolation zwischen zwei Populationen in einem kurzfristigen evolutiven Rahmen genutzt (Reynolds & al. 1983, Slatkin 1995).

Mantel-Korrelogramme können auch berechnet werden, um die genetischen Distanzen der Populationen, in Form der paarweisen F_{st} -Werte, als Funktion der geographischen Distanz darzustellen. Die Funktion gibt dann Auskunft darüber, bis zu welcher räumlichen Entfernung ein Genfluss zwischen den Populationen nachweisbar ist.

Nested-clade-Analyse

Die von Templeton & al. (1987) entwickelte und auf dem Koaleszenz-Ansatz basierende *nested-clade*-Analyse (NCA) ist ein statistisches Werkzeug zur Rekonstruktion der Evolutionsgeschichte von Populationen. Das Prinzip der NCA liegt darin, die räumlichen Verteilungsmuster relativ ursprünglicher zu relativ abgeleiteten Haplotypen stochastisch zu bewerten.

Eine Grundlage der NCA bildet ein *minimum spanning tree*, der die phylogenetische Verbindung der Haplotypen durch Mutationsschritte anzeigt. Mit Hilfe der Software TCS 1.13 (Clement & al. 2001, verfügbar unter: http://InBio.byu.edu/Faculty/kac/crandall_lab/tcs.htm) kann aus den Sequenzen der

Haplotypen ein *minimum spanning network* berechnet werden. Der TCS-Algorithmus, der bei Clement & al. (2000) beschrieben ist, nutzt das heuristische Kriterium der statistischen Parsimonie, um die Verknüpfung von jeweils zwei Haplotypen zu rechtfertigen. Dieses 95%-Plausibilitätsargument begrenzt die maximal zulässige Anzahl an Mutationsschritten, mit der Haplotypen noch verbunden werden dürfen. Das abgeleitete Netzwerk, das noch zweideutige Mutationsschritte (*ambiguous steps*) enthalten kann, ist unter Berücksichtigung der Vorhersagen der Koaleszenz-Theorie in einen *minimum spanning tree* zu überführen (Templeton & Sing 1993, Crandall & Templeton 1993). Schließlich sind jeweils Gruppen von verwandten Haplotypen auf verschiedenen hierarchischen Stufen zu Clades zusammenzufassen und nach den Regeln von Templeton & al. (1987) in das *nested clade design* zu überführen.

Die Analyse kann mit der Software GEODIS 2.0 (Posada & al. 2000) ausgeführt werden. Im ersten Teil (*exact contingency test*) wird mit Hilfe der Chi-Quadrat-Statistik berechnet, ob die geographische Verteilung der Individuen eines Clades signifikant von einer Normalverteilung abweicht oder nicht. Die geographischen Koordinaten der Populationen werden dann genutzt, um zwei Distanzparameter zu berechnen (*geographic distance analysis*). Der D_c -Wert quantifiziert die geographische Verbreitung der Haplotypen eines Clades und der D_n -Wert misst den Grad der Verschiebung eines Clades vom geographischen Zentrum des ihn enthaltenden genesteten Clades der nächsthöheren Hierarchiestufe. Darüber hinaus werden für jede *nested-clade*-Stufe I-T-Parameter kalkuliert, die das Verhältnis von jüngeren, abgeleiteten (*tip*) zu älteren, inneren (*interior*) Haplotypen oder Clades beschreiben.

Mit Hilfe eines dichotomen Schlüssels können aus den Signifikanzwerten der Distanzparameter die cladespezifischen historischen Populationsprozesse abgeleitet werden (Templeton & al. 1995, Templeton 2004). GEODIS 2.0 steht im Internet unter http://inbio.byu.edu/Faculty/kac/crandall_lab/geodis.htm für den Download zur Verfügung.

Wie Stehlik (2002) mit einem Methodenvergleich zeigt, ist die NCA bei ausreichender genetischer Variation herkömmlichen phylogeographischen Methoden überlegen. Nach einer Simulationsstudie von Knowles & Maddison (2002), die wesentliche Schwächen der NCA bei der Interpretation der erhobenen Parameter offenlegt, wurde der Ableitungsschlüssel von Templeton (2004) noch einmal verbessert.

4. Material und Methoden

4.1. Untersuchungsgebiet, Pflanzenmaterial und ökologische Parameter

Das Hauptuntersuchungsgebiet entspricht fast vollständig dem Areal der Alpenanemone *P. alpina*. Insgesamt wurden von 65 verschiedenen Standorten in den Alpen, den Vogesen, der Auvergne, den Pyrenäen, dem Cantabrischen Gebirge, den Abruzzen, der Hohen Tatra und dem Riesengebirge 367 Pflanzenproben gesammelt. Die Standorte wurden so ausgewählt, dass sie das gesamte Areal und alle bislang differenzierten Morphotypen (siehe Kap. 1.3.2.) von *P. alpina* repräsentieren. Die taxonomische Benennung der Akzessionen erfolgte mit dem Bestimmungsschlüssel von Moser (1996). An jedem Standort wurden von 7 bis 10 Individuen von einer Fläche von zirka 400 m² Laubblattproben entnommen. Von jedem Standort wurden ein bis zwei Individuen als Beleg herbarisiert. Dazu wurde der Standort und typische Vertreter der Population jeweils auch fotografisch dokumentiert. Zum Untersuchungsmaterial gehörten darüber hinaus 51 Herbarbelege von 15 weiteren Standorten. Zusätzlich wurden drei Herbarbelege der kaukasischen *P. aurea* und zwei der nordwestamerikanischen *P. occidentalis*, den beiden weiteren Arten Sektion *Preonanthus*, sowie zehn Belege von Arten aller übrigen vier Sektionen der Gattung *Pulsatilla* als Außengruppen untersucht. Die Proben von acht zusätzlichen Ranunculaceae-Arten (siehe Tab. A1) wurden teilweise als Außengruppen für die phylogenetische Rekonstruktion und teilweise für die molekulare Datierung verwendet.

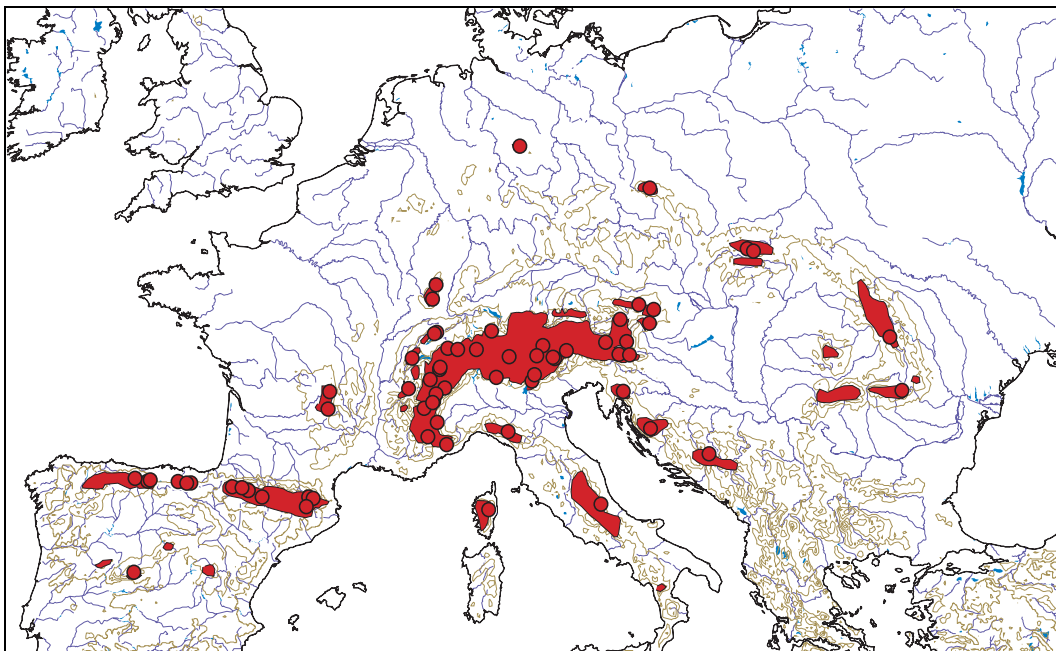


Abb. 6: Verbreitung von *Pulsatilla alpina* (rote Flächen); dargestellt als Zusammenfassung der Teilverbreitungskarten der Morphotypen von Moser (1996). Die Standorte, die durch die molekularen Analysen repräsentiert sind, sind als schwarze Ringe abgebildet. Ihre Koordinaten sind der Tab. A1 im Anhang zu entnehmen.

An jedem Standort wurden die Parameter Höhe und Exposition bestimmt. Sie sind, zusammen mit den geographischen Daten, der Probengröße, dem wissenschaftlichen Namen der Akzession und der Herbarnummer der untersuchten Populationen bzw. der Individuen in Tab. A1 (Anhang) zusammengefasst. Die Belegexemplare sind im Herbarium des IPK Gatersleben (GAT) hinterlegt. Die Karte auf Abb. 6 zeigt die Standorte der aufgesuchten Populationen im Vergleich mit dem Areal des Artkomplexes. Die Quellen für den Bezug des Probenmaterials über den Herbaraustausch sind ebenfalls in Tab. A1 angegeben.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden 24 morphologische und zwei ökologische (pH-Wert, Substrat) Merkmale der Untersuchungen von Moser (1996) übernommen. Jedes morphologische Merkmal wurden von Moser an jeweils 20 Individuen mehrerer Populationen vermessen und die Daten zu sippenspezifischen Mittelwerten und Standardabweichungen zusammengefasst. Die Zugehörigkeit der Individuen zu einer bestimmten Population lässt sich nachträglich nicht mehr rekonstruieren. Die Verwendung der Durchschnittswerte ist nach Auffassung des Autors trotzdem gerechtfertigt, weil die Herkünfte der von Moser untersuchten Pflanzen denen der vorliegenden Untersuchung weitgehend entsprechen. In der Tab. A12 sind die verwendeten morphologischen Merkmale als Durchschnittswerte für alle Arten und Morphotypen aufgeführt.

4.2. Aufbereitung und Analyse der DNA

DNA-Isolation

Die gesammelten frischen Blattspitzen junger Laubblätter wurden für jedes Individuum getrennt in Papiertüten aufbewahrt. Die Trocknung erfolgte mit Silika-Gel. Durch den sehr schnellen Wasserentzug der Proben kann eine Degeneration der DNA weitestgehend verhindert werden (Chase & Hills 1991). Die weitere Aufbewahrung der Proben erfolgte in luftdicht verschlossenen Plastikbehältern. Für die Sequenzanalysen der ITS und des *trnL-trnF*-Spacers wurde von den Herbarbelegen je zirka 1cm² Laubblatt entnommen. Das getrocknete Pflanzenmaterial (zirka 100 bis 150 mg) wurde in einer Kugelmühle von Typ Savant FP120 unter Zugabe von je zwei Stahlkugeln 20 Sekunden gemahlen.

Die genomische DNA wurde unter Verwendung des DNeasy Plant DNA Extraktions Kit (QIAGEN) isoliert. Um die Ausbeute und die DNA-Qualität zu erhöhen, wurde das vorgegebene Arbeitsprotokoll (DNeasy Plant Mini Handbook 2000) leicht modifiziert. Die gefällte DNA wurde in zwei getrennten Schritten mit je 500 µl AW-Puffer gewaschen und anschließend trocken zentrifugiert. Die DNA-Elution erfolgte mit 120 µl auf 60°C erwärmtem AE-Puffer. Die Elutionslösung enthält die DNA des Zellkerns, der Plastiden und der Mitochondrien. Die Prüfung des DNA-Gehalts und seiner Qualität

erfolgte mit je 2 µl DNA-Lösung durch Gelelektrophorese in einem 1,5%igen Agarosegel. Die DNA wurde auf einen mittleren Gehalt von 10 ng/µl aliquotiert und bei -20°C langfristig aufbewahrt.

PCR und DNA-Purifikation

Zur Synthese des ITS der rDNA und der Chloroplasten-Spacer werden vorrangig universelle Primer verwendet. Diese Primer liegen an die Spacer flankierenden, hochkonservierten Genregionen und sind über ein weites taxonomisches Spektrum einsetzbar (White & al. 1990, Taberlet & al. 1991, Blattner 1999). Zur Untersuchung des Herbarmaterials wurden zusätzlich *Pulsatilla*-spezifische, interne Chloroplastenprimer abgeleitet.

Die Amplifikationsreaktionen für alle Fragmente wurden mit dem GeneAmp Thermocycler PCR 9700 von PE (Applied Biosystems) nach dem Standardprotokoll durchgeführt (Tab. 2, 3 und 4). Für die Sequenzierreaktion wurde eine Ausgangsmenge von 100 µl aus je zwei PCR-Reaktionsansätzen amplifiziert.

Tab. 2: Sequenzen der PCR-Primer für die Amplifikation der gesamten ITS-Region, der ITS1 und der ITS2 der rDNA nach Blattner (1999) und Blattner & al. (2001) und der Teilfragmente des *trnL-trnF*-Spacers lf1 und lf2 für den *Pulsatilla alpina*-Komplex nach Taberlet & al. (1991) und Zetzsche (unpubl.)

Universelle ITS Primer (5'-3')	Universelle <i>trnL-trnF</i> Primer (5'-3')
ITS-A: GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG	lf-uf: GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
ITS-B: CTTTCTCCGCTTATGATATG	lf-ur: ATTTGAACTGGTGACACGAG
ITS-C: GCAATTCACACCAAGTATCGC	
ITS-D: CTCTCGGCAACGGATATCTCG	<i>Pulsatilla</i>-spezifische <i>trnL-trnF</i> Primer (5'-3')
ITS-sf: CAACGTTCTAGGTGAACCTGCGG	lf-pa-sf: GGAGAAAAGGCCTCTCTTA
ITS-sr: CTAAACTCAGCGGGTAGTCCC	lf-pa-sr: TTCCTTTCTCCTAGATGTTGA

Tab. 3: Reaktionsansatz und Primerkombinationen für je 100 µl PCR-Produkt der *Pulsatilla alpina*-Loci: ITS, ITS1, ITS2 und der *trnL-trnF*-Teilfragmente lf1 und lf2.

Reaktionsansatz	2 x 50µl	
Komponente	Volumen	Konzentration
Wasser _{Tri-Dest.}	57,00 µl	
PCR-Puffer (Qiagen)	10,00 µl	10 x
Q-Solution (Qiagen)	16,00 µl	5 x
MgCl ₂ (Qiagen)	5,55 µl	25 nmol/µl
dNTPs (2,5 mM)	4,00 µl	2,5 nmol/µl
Primer 1 (50pmol/µl)	1,00 µl	50 pmol/µl
Primer 2 (50pmol/µl)	1,00 µl	50 pmol/µl
Taq-Polymerase (Qiagen)	0,45 µl	5 units/µl
DNA (aliquot.)	5,00 µl	~ 10 ng/µl

Tab. 3: Reaktionsansatz und Primerkombinationen für die PCR: Fortsetzung.

Amplifikationsprodukt	Primerkombinationen
ITS	ITS-A, ITS-B
ITS 1	ITS-A, ITS-C
ITS 2	ITS-B, ITS-D
<i>trnL-trnF</i> 1 (lf1)	lf-uf, lf-pa-sr
<i>trnL-trnF</i> 2 (lf2)	lf-pa-sf, lf-ur

Tab. 4: PCR-Protokoll für die DNA-Amplifikation mit dem GeneAmp Thermocycler PCR 9700 (Applied Biosystems)

PCR-Protokoll

Denaturierung	3'	95 °C
Denaturierung	0,5'	95 °C
Annealing	1'	52 °C 35 Zyklen
Elongation	1'	70 °C
Schlussphase	8'	70 °C

Die Qualität und DNA-Konzentration der Amplifikate wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese auf einem 1,5%igen Gel geprüft. Die Reinigung der Amplifikate erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraktion Kits nach dem Standardprotokoll von QIAGEN. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden über eine Agarosegelelektrophorese von den übrigen, unerwünschten PCR-Produkten getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Kits gereinigt. Abschließend wurde die Menge des Puffers bei der abschließenden DNA-Eluierung so variiert, dass die DNA-Konzentrationen der Amplifikate ähnlich waren. Bei Herbarmaterial war die Amplifikation in einigen Fällen schwierig, die DNA-Konzentration der Isolate ist teilweise sehr gering und die DNA mehr oder weniger stark degeneriert. Durch Reamplifikation, eine nochmalige PCR mit dem gereinigtem PCR-Produkt als *template*, konnte auch in diesen Fällen i.d.R. eine ausreichende Fragmentmenge für die Sequenzierung hergestellt werden.

Sequenzierung

Für die Sequenzierreaktion wurde das ABI Prism® dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit und das entsprechende Arbeitsprotokoll von Applied Biosystems verwendet (vgl. Tab. 5, 6). Die Sequenzierreaktion wurde für alle Amplifikationsprodukte unter Verwendung des entsprechenden Primers jeweils in beide DNA-Strangrichtungen durchgeführt. Zum Sequenzieren der Chloroplastenfragmente wurden die Primer eingesetzt, die auch zur Amplifikation verwendet wurden (lf-uf, lf-pa-sr, lf-pa-sf, lf-ur). Die Sequenzierreaktion der ITS-Amplifikate erfolgte unter Verwendung der universellen Primer ITS-C und ITS-D und der *nested*-Primer ITS-sf und ITS-sr.

Tab. 5: Reaktionsansatz und PCR-Protokoll für die Sequenzierreaktion

Reaktionsansatz

Komponente	Volumen	Konzentration
dRhodamin-Mix (Applied Biosystems)	3,00 µl	
PCR-Puffer (Qiagen)	0,30 µl	10 x
Q-Solution (Qiagen)	2,00 µl	5 x
Primer	1,00 µl	10 pmol/µl
DNA-Amplifikat	5-7,00 µl	
H ₂ O	0-1,70 µl	

Tab. 6: Protokoll für die Sequenzierreaktion mit dem GeneAmp Thermocycler PCR 9700 (Applied Biosystems)

Protokoll für die Sequenzierreaktion

Denaturierung	15 [“]	95°C	
Denaturierung	15 [“]	95°C	60 Zyklen
Annealing	40 [“]	52°C	
Elongation	40 [“]	60°C	
Schlußphase	10 [“]	60°C	

Das Reaktionsgemisch, die Sequenzierreaktion, wurde laut Arbeitsprotokoll (Tab. 7) mit Ethanol gefällt, bei 4°C 45 min lang zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in einem Waschschrift mit 150 µl 70%igem Ethanol gereinigt. Nach einer zweiten Zentrifugation für 20 min bei 4°C wurde, nach abermaligem Verwerfen des Überstandes, die pellierte DNA bei Raumtemperatur getrocknet.

Tab. 7: Protokoll für die Fällung des Fragmentgemischs der Sequenzierreaktion.

Fällungsreaktion

Sequenzierprodukt	13 µl
NaCH ₃ COO (3M)	4 µl
H ₂ O	40 µl
C ₂ H ₄ OH (96%)	150 µl

Die Auftrennung der Fragmente der Sequenzierreaktion wurde auf einem ABI 377 DNA-Sequenzierer durchgeführt. Die Ausgabe der Sequenzdaten erfolgte als Chromatogramm.

4.3. Analyse der Datensätze

4.3.1. Anwendung der phylogenetischen Rekonstruktionsmethoden

Editieren und Alignment

Die Chromatogramme wurden unter Verwendung der Software SequencherTM 4.1 (Gene Codes Corporation, 2000) manuell überprüft und editiert, um Detektionsfehler zu korrigieren.

Das Alignment der Sequenzen beider DNA-Strangrichtungen einer Probe wurde ebenfalls mit Sequencher durchgeführt und als Konsenssequenz gespeichert. Traten Widersprüche auf, wurden die Sequenzdaten anhand der Chromatogramme nochmals geprüft und das Nukleotid gewählt, welches das deutlichere Signal lieferte.

Die Gesamtalignments der Konsenssequenzen wurden für alle Marker bzw. Fragmente mit Clustal X (Jeanmougin & al. 1998) berechnet und manuell mit dem Programm Se-AL v2.0a9 (Rambaut 2002) optimiert. Das Alignment des ITS-Datensatzes für die Gattung *Pulsatilla* war insgesamt unproblematisch, weil zwischen den Akzessionen nur eine begrenzte Anzahl an Substitutionen und Indels auftraten. Wegen der geringen Anzahl an Homoplasien ließen auch die Datensätze der *trnL-trnF*-Fragmente unter Beachtung der von Kelchner (2000) beschriebenen Mechanismen der Evolution nichtkodierender cpDNA trotz der hohen Indel-Anzahl ohne Schwierigkeiten im Alignment anordnen.

Sequenzanalyse

Die Analyse der alignierten Sequenzdaten mit Distanz- und heuristischen Methoden (incl. ML) erfolgte fast ausschließlich mit der Software PAUP 4.0b10 (Swofford 2002).

Für alle ITS-Datensätze wurden mit MODELTEST 3.06 PPC (Posada & Crandall 1998) die optimalen Evolutionsmodelle bestimmt, um die korrekten genetischen Distanzen für die nachfolgende phylogenetische Rekonstruktion berechnen zu können. Die Indels der Chloroplastendatensätze und des kombinierten Datensatzes wurden für alle Analyseverfahren jeweils als eine Mutation und wegen der Indelüberlappung als binäre Merkmale (*presence/absence*) kodiert. Die Distanzberechnungen erfolgten in diesem Fall mit dem Jukes-Cantor-Modell. Die phylogenetischen Bäume für diese genetischen Distanzen wurden anschließend im NJ-Verfahren berechnet. Bei sehr wenigen informativen Merkmalen pro Datensatz wurden die NJ-Analysen zum Vergleich einer stärkeren Auflösung auch mit absoluten Distanzen und mit unkorrigierten p-Distanzen kalkuliert. Die Bootstrap-Analysen wurden für alle Datensätze mit 1000 Wiederholungen gerechnet.

Auch die ML-Analysen wurden, wenn möglich, mit den nach MODELTEST optimalen Evolutionsmodellen durchgeführt. Eine Bootstrap-Analyse war wegen extremer Rechenzeiten in keinem Fall möglich.

Die MP-Analysen der alignierten Sequenzen wurden für alle Datensätze ungewichtet und mit dem *heuristic-search*-Modus unter den folgenden Bedingungen ausgeführt: Wahl des Startbaumes via *stepwise addition*, *TBR-branch-swapping*, die Behandlung von Einbasendeletionen (*gaps*) als *additional state*, *MULTREES* und *ACCTRAN*. Unsichere Sequenzpositionen (*ambiguities*) wurden konservativ als unbestimmtes Nukleotid N kodiert, so dass für die Sequenzanalyse nur sichere variable Merkmale verwendet wurden.

Die statistischen Parameter Consistency Index, Retention Index, Decay Index und die Länge wurden für alle Bäume erhoben. Die Skewness wurde mit 10000 zufälligen Bäumen und die MP-Bootstrapwerte mit 1000 Wiederholungen berechnet.

Die *minimum spanning networks* wurden auf der Grundlage der Indel-kodierten Datensätze der *trnL-trnF*-Fragmente mit dem Computerprogramm TCS 1.13 (Clement & al. 2001) berechnet. *Gaps* wurden hier ebenfalls als fünfte Nukleotidausprägung zugelassen.

PAUP wurde auch benutzt, um die G/C-Gehalte der Sequenzen zu bestimmen.

4.3.2. Bestimmung der Variabilität der Substitutionsraten und molekulare Datierung

Der ITS-Datensatz für molekulare Datierung umfasst insgesamt 24 Akzessionen, u.a. die Ranunculaceae-Arten *Thalictrum simplex* L., *Ranunculus gramineus* L., *Clematis recta* L. und *Helleborus orientalis* Lam. Wegen der genetischen Unterschiede dieser Arten enthielt der Datensatz mehrere hochvariable, nicht alignierbare Sequenzbereiche, die aus der phylogenetischen Berechnung ausgeschlossen wurden.

Die Konstanz der Substitutionsraten im Datensatz wurde mit zwei verschiedenen statistischen Verfahren getestet.

Der *relative-rate*-Test (RRT) wurde auf der Basis paarweiser K2P-Distanzen unter Verwendung der Sequenz von *Helleborus orientalis* als Außengruppe durchgeführt. Die Distanzwerte und die z-Statistik wurden mit Hilfe der Software K2WULI berechnet.

Für den *likelihood-ratio*-Test (LRT) wurde HKY85 mit Hilfe von MODELTEST als optimales Evolutionsmodell abgeleitet. Unter Verwendung von PAUP 4.0b10 wurden dann alternative NJ-Topologien aus ML-Distanzen unter Annahme (entspricht der Nullhypothese) und ohne die Annahme einer Molekularen Uhr kalkuliert. Anschließend wurden die ML-Werte der beiden Topologien mit einem sogenannten globalen LRT auf eine signifikante Abweichung geprüft. Der LRT wurde auf der Grundlage des K2P-Modells wiederholt.

Die angegebenen Ranunculaceae-Arten wurden zur Kalibrierung herangezogen, da von ihren Gattungen Fossilien gefunden wurden, die jeweils eine Schätzung des Gattungsmindestalters erlauben. Berücksichtigt wurden die ältesten bekannten Fossilfunde von *Clematis* (23,3-35,4 Ma), *Thalictrum* (30,0-36,6 Ma), *Ranunculus* (30,0-36,6 Ma) und *Helleborites* (57,8-66,4 Ma) (vgl. Takhtajan 1974 und Mai 1995). Die Mittel- und Extremwerte der Wertebereiche für das Fossilienalter wurden jeweils als Kalibrierungspunkte für die molekulare Datierung verwendet. Die fossile Gattung *Helleborites* ist nach Mai (1995) älter als *Helleborus* L., aber eng mit dieser verwandt. Die Altersobergrenze der geologischen Schicht, aus der die ältesten Funde von *Helleborites* stammen (66,4 Ma), wird deshalb als Maximalalter für die Entstehung von *Helleborus* verwendet. Ein Minimalalter für *Helleborus* wurde nicht geschätzt.

Der RRT zeigt eine Ratenkonstanz zwischen den Akzessionen der Innengruppe des Datensatzes. Aus der durchschnittlichen ITS-Divergenzrate wurde dann unter Verwendung der Kalibrierungspunkte die mittlere, maximale und minimale Mutationsrate für die Ranunculaceae und das absolute Alter der Knoten der Topologie berechnet.

Die NJ-Topologie (ML-Distanzen mit dem HKY85-Modell) ohne Annahme einer Molekularen Uhr bildete die Grundlage für die PL-Datierung. Alle PL-Kalkulationen wurden mit dem Computerprogramm r8s v.1.60 (Sanderson 2003) ausgeführt. Der optimale Wert für den Glättungsparameter, der die inhomogenen Substitutionsraten des Datensatzes in PL korrigiert, wird in r8s durch die Kreuzvalidierung bestimmt. Der Glättungsparameter wurde dafür von 10^0 bis 10^3 in Schritten von 0,05 im Exponent variiert. Für die Abschätzung der Genauigkeit der Datierung wurden die PL-Analysen unter Variation des Maximalalters der Fossilien bis +20% in Schritten von 2% und der Anzahl der verwendeten Fossilien wiederholt durchgeführt.

4.3.3. Anwendung der Methoden zur Analyse kombinierter Datensätze

Korrelationsanalyse morphologischer und molekularer Merkmale

Alle 24 morphologischen Merkmale wurden jeweils mit einem Manteltest und einem Mantelkorrelogramm unter Verwendung der Software R PACKAGE 4.0 (Casgrain & Legendre 1999) auf ihre Korrelation mit der genetischen Distanz zwischen den Akzessionen getestet. Für die Analyse wurden je zehn äquidistante Distanzklassen aus genetischen Entfernungen des kombinierten ITS-*trnL-trnF*-Datensatzes gebildet. Die Rm-Werte wurden durch 1000fache Permutation der Ausgangsdaten auf Signifikanz getestet.

Im Gegensatz zu vergleichbaren phylogenetischen Analysen werden die morphologischen Daten in dieser Arbeit aus den in Kap. 3.1. aufgeführten Gründen nicht mit dem molekularen Datensatz zu einem gemeinsamen Stammbaum kombiniert.

Rekonstruktion historischer Merkmalsausprägungen

Die PGLS-Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms COMPARE 4.5 (Martins 2003) ausgeführt. Die phylogenetische Grundlage bildete eine MP-Topologie des kombinierten molekularen Datensatzes, der jeweils einen Vertreter aller Arten und Morphotypen des Artkomplexes und der beiden weiteren Arten der Sektion *Preonanthus* enthielt. Die hybridogen beeinflussten Morphotypen wurden von der MP-Berechnung ausgeschlossen.

Die Polytomien der Phylogenie wurden, nach den Vorgaben der Autoren der Software, durch Einfügen von sehr kurzen Astabschnitten in Dichotomien aufgelöst. Das künstliche Erzeugen von Verzweigungen ist erlaubt, weil entlang der kurzen Abschnitte nahezu keine Merkmalsänderungen auftreten.

Geographische Analyse phylogenetischer Daten

Die AMOVA wurde mit der Software ARLEQUIN ver. 2000 (Schneider & al. 2000) berechnet. Die Werte für die Varianzkomponenten werden gegen die Nullhypothese, dass im Datensatz keine hierarchische Struktur enthalten ist, auf Signifikanz getestet. Die Nullhypothese wurde durch 1000fache Permutation der Ausgangsdaten generiert.

Alle F-Parameter wurden ebenfalls mit dem Programm ARLEQUIN kalkuliert. Die Werte wurden durch Permutation der Haplotypen zwischen den Populationen auf Signifikanz gegen die Nullhypothese, dass sich die Populationen nicht unterscheiden, getestet.

Die Manteltests- und Korrelogramme für die Messung der Abhängigkeit der genetischen von den räumlichen Distanzen zwischen den Populationen wurden mit dem R PACKAGE 4.0 ausgeführt. Die geographischen Distanzen wurden zu zehn Distanzklassen äquidistant zusammengefasst. Sie enthalten so jeweils eine möglichst ähnliche Anzahl F_{st} -Werte. Die R_m -Werte wurden für jede Distanzklasse kalkuliert und durch Permutation der Ausgangsdaten statistisch auf Signifikanz geprüft.

Für die *nested-clade*-Analyse wurden die *minimum spanning networks*, MSN, unter Verwendung des Programms TCS 1.13 (Clement & al. 2001) für beide Fragmente berechnet.

Wegen des Auftretens von Homoplasien, die verursachen die netzartige Struktur des MSN, ist die genaue Position einiger Haplotypen bzw. ihre phylogenetische Stellung als Vorfahr oder Abkömmling nicht gesichert (lf1: 8, 9, 15, 18, 19, 20, 25; lf2: API, API-mitpyr, API-40fq; siehe Abb. 10 und 11).

Für die Anwendung der *nested-clade*-Analyse wurden die MSNs unter Berücksichtigung des Koaleszenzmodells in *minimum spanning trees* umgewandelt. Für das Fragment lf1 wurde der Haplotyp 15 als Abkömmling von 16, 20 von 22 und 18 von 19 aufgefasst. Der Haplotyp 8 wurde als Nachfahre von 9 interpretiert. Beide zusammen (Clade 1-6) sind vom Basishaplotyp (= BHT) 16 abgeleitet. In der Region, in der der seltene Haplotyp 15 vorkommt, ist der BHT 16 am häufigsten. Das gilt auch für den Clade 1-6 im Verhältnis zu Typ 16, für Typ 8 zu Typ 9 und für Typ 18 zu Typ 19. Unter Berücksichtigung der gesamten *trnL-trnF*-Sequenz kann der Typ 25 weder von Clade 3-2 noch von 3-3 als direkter Vorfahre gelten.

Für das If2-Fragment wurde die Ableitung des seltenen Typs *API-40fq* von *API* aus zwei Gründen bevorzugt. Neben der relativen Häufigkeit der Haplotypen erscheint eine Deletion eines duplizierten DNA-Abschnittes wahrscheinlicher als das zweifach-unabhängige Entstehen einer identischen Punktmutation (= *single nucleotide polymorphism* = SNP).

Die *minimum spanning trees* wurden nach den Regeln von Templeton & al. (1987) und Templeton & Sing (1993) manuell in ein *nested clade design* konvertiert (siehe Anhang, Abb. A1).

Die Signifikanz der berechneten Dc- und Dn-Werte und der I-T-Parameter wurde jeweils gegen eine Nullhypothese aus 1000 Permutationen des gegebenen Datensatzes getestet.

5. Ergebnisse

5.1. Sequenz- und Haplotypenanalyse des Chloroplasten-Spacers *trnL-trnF*

5.1.1. Molekulare Merkmale der *trnL-trnF*-Region

Die Nukleotidmerkmale der sequenzierten *trnL-trnF*-Region des *P. alpina*-Komplexes sind in Tab. 8 zusammengestellt. Die gesamte Region ist 453 bis 513 bp lang und hat einen mittleren G/C-Gehalt von 30,1%. Die beiden Teilfragmente lf1 und lf2 unterscheiden sich auffällig in ihren G/C-Gehalten (26,2 vs. 34,2%), in der Häufigkeit von Indels (36 vs. 2) sowie in der Anzahl der SNPs (10 vs. 4). Die Substitutionsrate des lf1-Fragments ist fast sechsmal größer als die des lf2-Fragments.

Tab. 8: Sequenzmerkmale des Chloroplasten-Spacers *trnL-trnF* von 359 Individuen und 67 Akzessionen von *P. aurea*, *P. occidentalis* und vom Artkomplex *P. alpina*.

Sequenzmerkmal	lf1	lf2	<i>trnL-trnF</i>
Probenanzahl	359	105	105
Länge (bp)	220-278	233-251	453-513
Länge des Alignments	334	251	585
Indels (bp)	36	2	38
Länge der Indels (bp)	1-51	18	1-51
SNPs	10	4	14
Ø GC Gehalt (%)	26,2	34,2	30,1
Substitutionsrate (bp ⁻¹)	0,14	0,0024	0,089
Konstante Positionen	288	244	533
Variable Positionen	14	4	18
Informative Positionen	32	2	34
Haplotypen	36	7	39
Ø H (Nei's Haplotypendiversität)	0,2202	0,053	-
h _T (Gesamtdiversität)	0,913	0,702	-
F _{st} -Wert	0,751	0,937	-

Die hohe Variabilität des Fragments lf1 resultiert aus einer komplexen, mit 14 bis 72 bp ungewöhnlich langen, repetitiven Sequenz. Sie besteht fast ausschließlich aus A- und T-Nukleotiden. Der Vergleich mit einigen evolutiv nahstehenden und Außengruppenarten (*Callianthemum anemonoides* (Zahlbr.) Endl. ex Heynh., *P. pratensis* (L.) Mill., *P. vulgaris* Mill., *P. vernalis* (L.) Mill., *P. chinensis* (Bunge) Regel) zeigt die Herkunft der repetitiven Sequenz. Sie entstand aus einem Mikrosatelliten mit einem AATT-Motiv und expandierte schrittweise durch Duplikation. In einigen Haplotypen treten in diesem

Sequenzbereich Deletionen (Länge 1-51 bp) auf, die im Zusammenhang mit *stem-loop*-Strukturen stehen.

5.1.2. Haplotypendiversität und Vorkommen

Für die Fragmente lassen sich 36 (lf1) und 7 (lf2) Haplotypen unterscheiden. Die absolute und relative Häufigkeit einzelner Haplotypen ist sehr unterschiedlich (vgl. Abb. 10 und 11). Die Haplotypendiversität in den Populationen, gemessen durch H (*Nei's diversity*, Nei 1987; siehe Kap. 3.6.3.) variiert auffällig von 0 bis 0,81 (lf1) bzw. von 0 bis 0,67 (lf2). Erwartungsgemäß ist sie in geographisch isolierten Populationen sehr niedrig (z. B. Brocken, Harz; Campo Imperatore, Abruzzen; Wiener Schneeberg, Ostalpen). Innerhalb der Populationen des kontinuierlichen Verbreitungsgebietes liegt sie deutlich höher. Das Diversitätszentrum des Artkomplexes befindet sich heute in den Nord- und den Westalpen (Stockhorn, Nordwest-Alpen; Col de la Cayolle, Westalpen). Eine erhöhte Diversität ist auch in der Auvergne und im Jura zu beobachten (Tab. A2, Abb. 7).

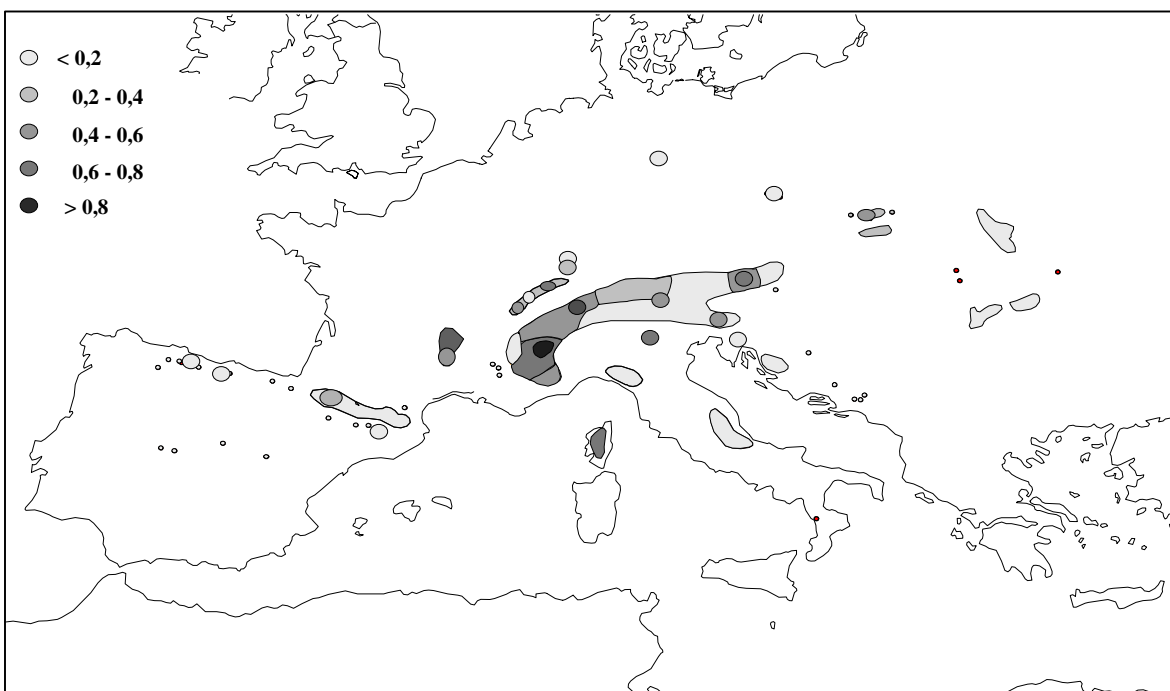


Abb. 7: Haplotypendiversität (H) der Populationen von *Pulsatilla alpina*, hellgrau = geringe Diversität, dunkelgrau = hohe Diversität auf der Grundlage von 65 Populationen des gesamten Verbreitungsgebietes.

Der überwiegende Teil der Haplotypen hat eine klare geographische Bindung. Diese Hypothese wird durch die χ^2 -Statistik der NCA bestätigt (siehe Tab. 9). Wenige Haplotypen sind häufig und haben große oder sehr große Areale (16, 28, 29, 31). Zahlreiche Haplotypen mit meist wenigen Individuen kommen nur in bestimmten Regionen oder in einzelnen Populationen vor (z. B. 9, 11, 15, 33). Die

sehr hohen F_{st} -Werte ($\bar{\varnothing}$ 0,75 für lf1 bzw. 0,94 für lf2, Tab. 8) zeigen, dass der Genfluß zwischen den Populationen stark eingeschränkt ist. Die Mantelkorrelation für beide Fragmente legt nahe, dass der überregionale Genfluß, etwa über 500 km zu vernachlässigen ist (siehe Abb. 8). (Der F_{st} -Wert ist dann sehr groß, wenn sich die Haplotypfrequenzen zwischen den Populationen stark unterscheiden, bzw. wenn in den Populationen eigene Haplotypen dominieren.)

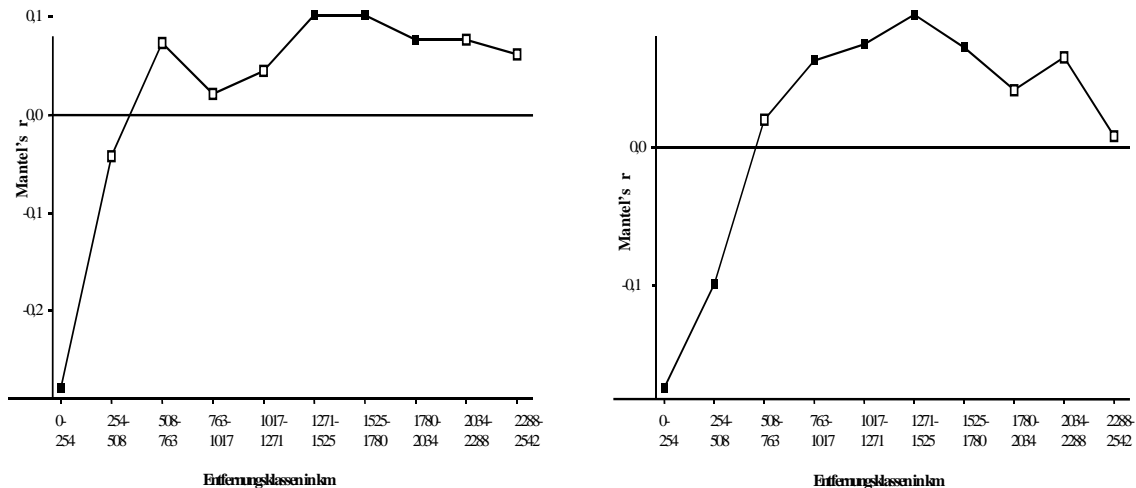


Abb. 8: Mantelkorrelogramme der genetischen Distanz (paarweise F_{st} -Werte, berechnet mit R PACKAGE 4.0) in Abhängigkeit von der geographischen Distanz von 65 Populationen von *Pulsatilla alpina* für die *trnL-trnF* Fragments lf1 (links) und lf2 (rechts). Ausgefüllte Quadrate zeigen von Null abweichende Werte auf dem 0,05-Signifikanzniveau nach der *regular-Bonferroni*-Korrektur an.

5.1.3. Phylogenetische Analyse der *trnL-trnF*-Region

Die Rekonstruktion der verwandtschaftlichen Verhältnisse der gesamten *trnL-trnF*-Region basiert auf einer MP-Analyse. Die Skewness von -0,362 zeigt ein signifikantes phylogenetisches Signal für den Datensatz an (Grenzwert für 71 variable Merkmale, 44 Akzessionen; ** = -0,11). Die MP-Topologie wird hier allein dargestellt. Sie entspricht nahezu der NJ-Berechnung. Die Abb. 9 zeigt einen von 32 sparsamsten MP-Bäumen. Der Haplotyp (*OCC*) von *P. occidentalis* bildet eine Schwestergruppe zu allen anderen Haplotypen. Schwesterclades bilden einerseits die Haplotypen des *API*-Typs zu den Haplotypen des *ALP*- und des *PIC*-Typs und diese untereinander. Bemerkenswert ist die phylogenetische Stellung des seltenen Haplotyps *API-cors* (Korsika), der als Urhaplotyp der Haplotypen des *API*-Typs aufgefasst werden kann. Die frühe Abspaltung der Chloroplasten von *P. aurea* von einem ursprünglichen Chloroplasten des *API*-Typs erhält keine Bootstrap-Absicherung (Absicherung <50%).

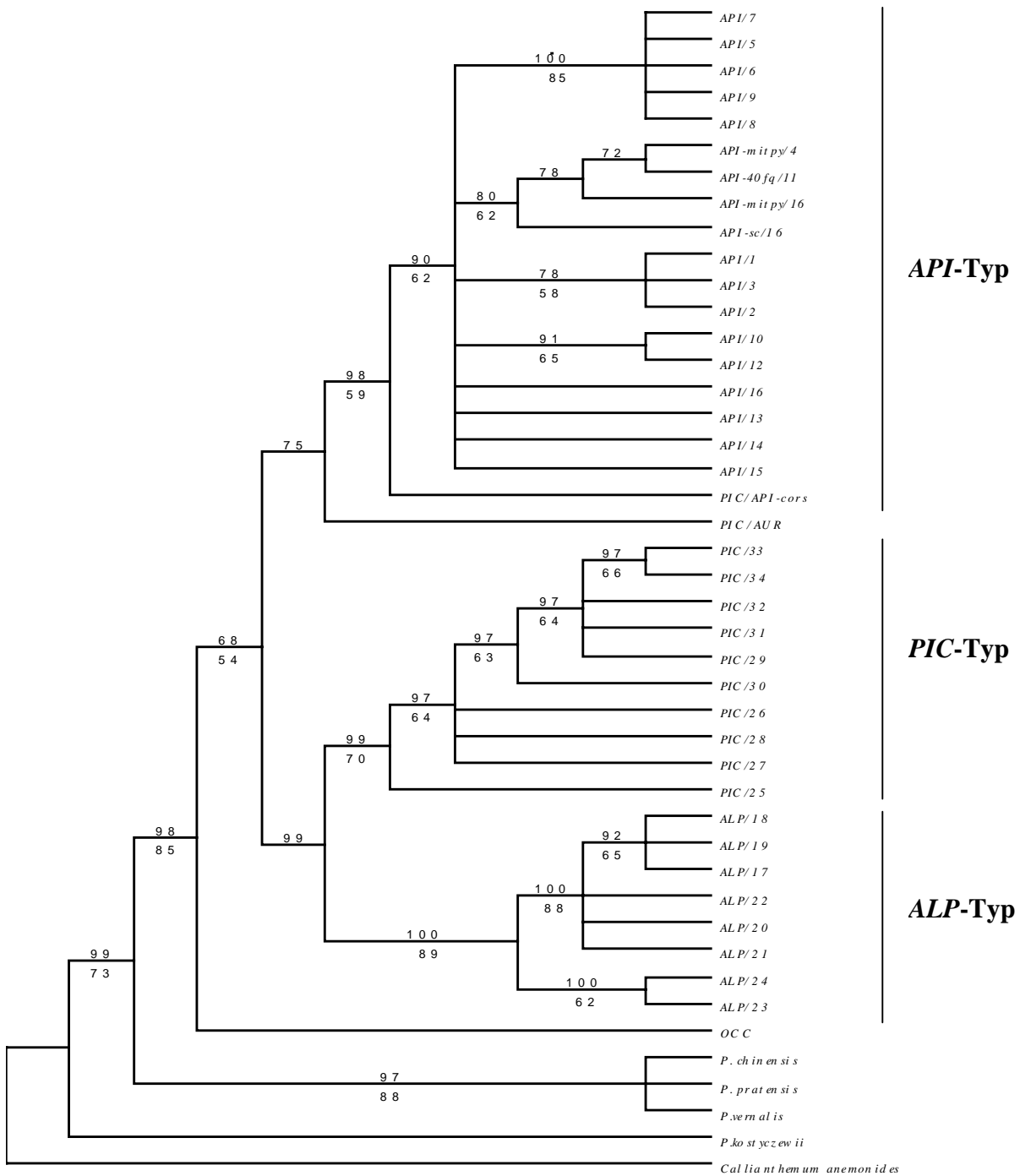


Abb. 9: *Majority-rule-consensus-Baum* von 32 besten Bäumen (Länge 118, CI 0,958, RI 0,970) der Parsimonieanalyse der Haplotypen der gesamten *trnL-trnF*-Region des Artkomplexes von *P. alpina*. Die Haplotypbezeichnungen setzen sich aus dem lf2- und lf1-Haplotypnamen zusammen. *Majority-rule-consensus*-Werte sind oberhalb der Äste verzeichnet, Bootstap-Werte (>50%) unterhalb. Der hochvariable Poly-T-Mikrosatellit wurde von der Analyse ausgeschlossen.

Die *minimum spanning networks* der Abb. 10 und 11 veranschaulichen die Evolution des *trnL-trnF*-Spacers im Artkomplex. Unter dem Kriterium der statistischen Parsimonie sind für das lf1-Fragment bei einer Länge von 334 bps (bzw. 251 für lf2) sieben (sechs) verbindene Mutationsschritte erlaubt (P ≤ 0,959 für lf1 und lf2). Das phylogenetische Netzwerk des lf2-Fragments ist statistisch uneingeschränkt abgesichert. Wegen der maximalen Länge von 16 Mutationsschritten zwischen den entferntesten Haplotypen im lf1-Fragment resultieren daraus 3 Subnetzwerke (*API*-, *PIC*- und *ALP*-Gruppe), die mit den in der phylogenetischen Analyse gefundenen Clades korrespondieren (vgl. Abb. 9). Die Verbindung dieser drei Haplotypgruppen, der Subnetzwerke, wird aber durch die Struktur des lf2-Netzwerkes und die MP-Analyse unterstützt und deshalb beibehalten.

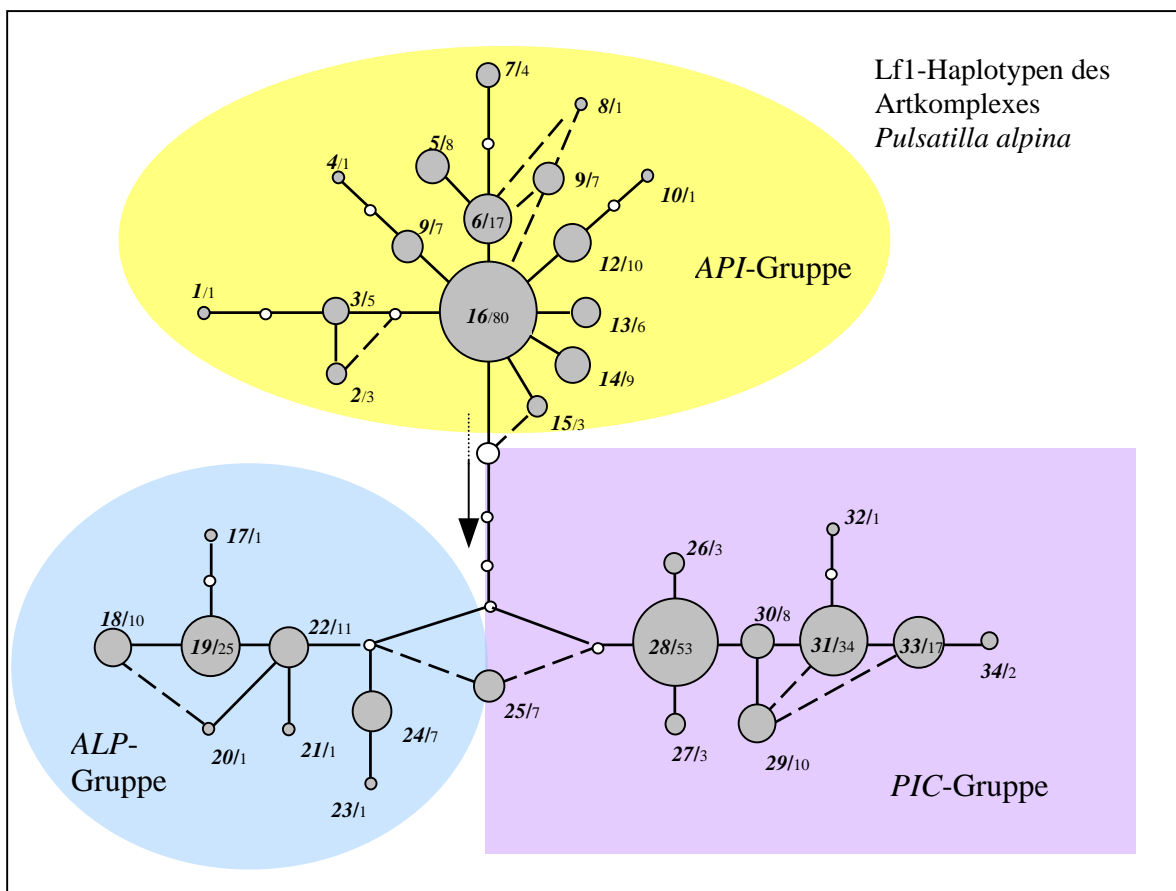


Abb. 10: *Minimum spanning haplotype network* für das *trnL-trnF*-Fragment lf1 des *Pulsatilla-alpina*-Komplexes berechnet mit TCS 1.13. Die erste Zahl gibt den Namen des Haplotyps an, die zweite Zahl in wievielen Individuen der Haplotyp auftrat. Die weißen Kreisflächen veranschaulichen verbindende Haplotypen, die nicht detektiert wurden. Der große weiße Kreis zeigt die Wurzel der Phylogenie, der Pfeil die Evolutionsrichtung. Die unterbrochenen Linien geben alternative Mutationsschritte an. Die Beziehung zu den hier nicht angegebenen Haplotypen *OCC* (*P. occidentalis*) und *AUR* (*P. aurea*) ist unsicher.

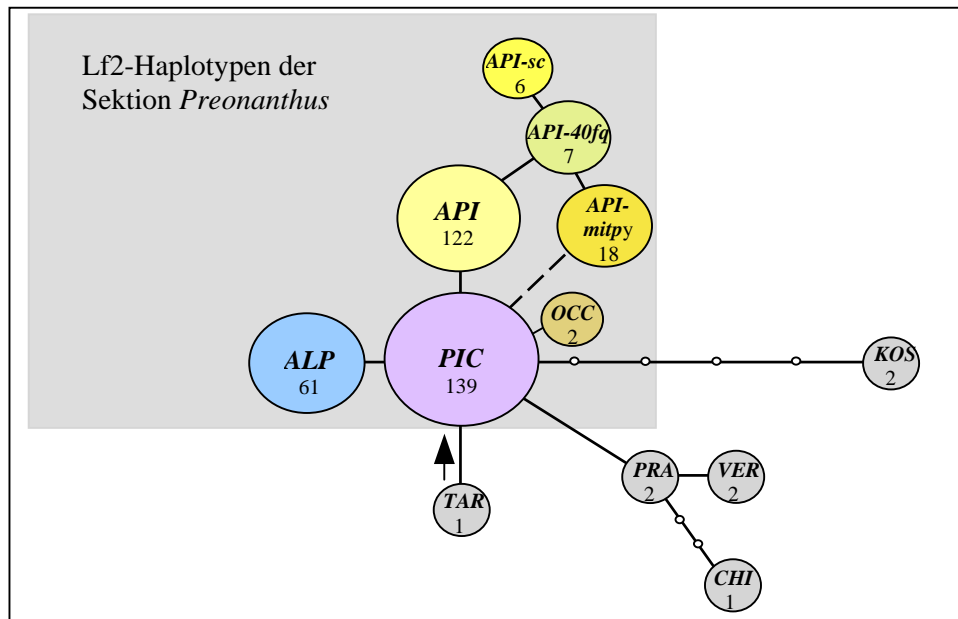


Abb. 11: *Minimum spanning haplotype network* für das *trnL-trnF*-Fragment lf2 der Sektion *Preonanthus* und die Haplotypen *TAR* (*P. taraoi*, Sektion *Preonanthopsis*), *KOS* (*P. kostyczewii*, Sektion *Iostemon*) *PRA* und *VER* (*P. pratensis*, *P. vernalis*, Sektion *Pulsatilla*) sowie *CHI* (*P. chinensis*, Sektion *Semicampanaria*) berechnet mit TCS 1.13. Die Zahl hinter dem Haplotypnamen gibt an, in wievielen Individuen der Haplotyp detektiert wurde. Die weißen Kreisflächen veranschaulichen verbindende Haplotypen, die nicht detektiert wurden. Der Pfeil zeigt die Evolutionsrichtung an. Die unterbrochenen Linien geben alternative Mutationsschritte an.

5.1.4. Nested-clade-Analyse der *trnL-trnF*-Fragmente lf1 und lf2

Die *nested-clade*-Analyse (NCA) bestätigt eine signifikante geographische Bindung für die Mehrheit der Haplotypengruppen und für verschiedene verwandtschaftlicher Hierachiestufen für beide Fragmente (siehe Tab. 9; vgl. Abb. A1, *nested-clade*-Design). Die verschiedenen Haplotypen des *ALP*-Typs kommen ausschließlich im Jura und in den nördlichen und westlichen Alpen vor. Die Haplotypen des *API*-Typs dominieren im Süden des Areals, in den Pyrenäen und in der Sierra Cantabrica. Die Haplotypen des *PIC*-Typs dominieren im Osten des Verbreitungsgebietes und in den Mittelgebirgen nördlich der Alpen (vgl. Abb. 25 und 28).

Für das lf1-Fragment wurden vier Haupttypen historischer Prozesse festgestellt: eingeschränkter Genfluss (Isolation durch Entfernung) für die Clades 1-10, (1-14), 2-2, 2-4 und 3-1, allopatrische Fragmentierung für 1-4, (1-6), (1-15), 2-6, 2-7 und 3-3 sowie Arealerweiterung (kontinuierlich oder durch Fernausbreitung) für die Clades 1-15, 2-1, 2-5 und 3-2. Die Hauptclades des Gesamtkladogramms sind historisch und geographisch getrennt (historische Fragmentierung). Die Parameter für die Clades 1-8 und 2-3 lassen keine Entscheidung zwischen den Prozessen eingeschränkter Genfluss und Arealerweiterung zu. Keine Aussage zur geographischen Bindung der Haplotypen wurde für den Clade 1-12, zwischen dem weitverbreiteten Haplotyp 22 und dem Typ 21 in den Nordwestalpen, und für die zwei Populationen des Clades 1-17 in der Hohen Tatra abgeleitet. Die

Ursache dafür ist ein zu geringer Probenumfang, wie im Fall des Clades 1-12, vollständige Durchmischung der Haplotypen durch kontinuierlichen Genfluß, wie für den Clade 1-17, oder eine diskontinuierliche Verteilung der besammelten Standorte. Eine schwache bis sehr schwache geographische Bindung wurde für die Clades 1-14, 2-4 und 2-5 festgestellt. Die abgeleiteten historischen Vorgänge sind für diese Clades entsprechend unsicher.

Der dominierende Prozess für das lf2-Fragment ist allopatrische Fragmentierung (Clade 1-1 und Gesamtkladogramm). Der Genaustausch zwischen den im lf2-Clade 1-2 zusammengefassten Populationen mit *API*-Chloroplasten ist stark eingeschränkt. Vereinzelt kam es dort aber zu Fernausbreitung (begrenzter Genfluss, aber mit einzelnen Fernausbreitungsereignissen).

Tab. 9: *Nested-clade*-Analyse der geographischen Assoziation von Haplotypen und ihre Interpretation nach Posada & al. (2000) für die *trnL-trnF*-Fragmente lf1 und lf2 von 65 Populationen des Artkomplexes von *Pulsatilla alpina* (bei lf2 zusätzlich auch die 2 Akzessionen von *P. occidentalis* und *P. aurea*). Die Ableitung der demographischen Ereignisse erfolgte nach dem verbesserten Schlüssel von Templeton (2004). Die hier nicht aufgelisteten Clades wurden nicht in die Berechnung einbezogen, weil in ihnen nur ein Haplotyp und/oder keine geographische Variation auftrat. Einteilung der Clades nach dem *nested-clade*-Design (siehe Abb. A1). P = Wahrscheinlichkeit ob der zufällige χ^2 -Wert größer oder gleich dem beobachteten ist; *: signifikant mit $p < 0,05$, erhoben auf der Basis von 1000 Permutationen des Ausgangsdatensatzes).

Lf1 Clade	Verbreitung	χ^2 Statistik	P	Demographisches Ereignis
Clade 1-4	Auvergne, Pyrenäen	25,00	0,000*	Allopatrische Fragmentierung
Clade 1-6	Apenninen, Korsika	9,00	0,111	(Allopatrische Fragmentierung)
Clade 1-8	Alpen, Pyrenäen, Sierra Cantabrica, Korsika, Kroatien	396,44	0,000*	Arealerweiterung oder begrenzter Genfluss
Clade 1-10	Zentralalpen, Jura, WAlpen	20,46	0,000*	Begrenzter Genfluss (Isolation durch Entfernung)
Clade 1-11	Jura, WAlpen	16,70	0,007*	Kontinuierliche Arealerweiterung
Clade 1-12	Jura, WAlpen	7,88	0,442	Keine geographische Assoziation der Haplotypen
Clade 1-14	Bosnien, Karpaten, EAlpen	35,84	0,098	Begrenzter Genfluss (Isolation durch Entfernung)
Clade 1-15	Pyrenäen, Auvergne, Riesengebirge, Harz, Vogesen	89,05	0,000*	Fernausbreitung vermutlich mit nachfolgender Fragmentierung
Clade 1-17	Hohe Tatra	0,17	1,000	Keine geographische Assoziation der Haplotypen
Clade 2-1	Cottische Alpen	10,00	0,032*	Kontinuierliche Arealerweiterung
Clade 2-2	Auvergne, Pyrenäen	15,33	0,003*	Begrenzter Genfluss (Isolation durch Entfernung)
Clade 2-3	Alpen, Apenninen, Pyrenäen, Sierra Cantabrica, Korsika, Kroatien	153,21	0,002*	Arealerweiterung oder begrenzter Genfluss
Clade 2-4	Zentralalpen, Jura, WAlpen	13,53	0,068	Begrenzter Genfluss (Isolation durch Entfernung)
Clade 2-5	Jura, WAlpen	10,80	0,061	Kontinuierliche Arealerweiterung
Clade 2-6	Apenninen, Bosnien, Karpaten, EAlpen	65,00	0,000*	Allopatrische Fragmentierung
Clade 2-7	Sierra Cantabrica, Auvergne, Vogesen, Harz, Riesengebirge, Hohe Tatra	89,14	0,000*	Allopatrische Fragmentierung
Clade 3-1	Alpen, Apenninen, Auvergne, Pyrenäen, Sierra Cantabrica, Korsika, Kroatien	310,63	0,000*	Begrenzter Genfluss (Isolation durch Entfernung)
Clade 3-2	Zentralalpen, Jura, WAlpen	44,54	0,000*	Kontinuierliche Arealerweiterung
Clade 3-3	Wie Clades 2-6 und 2-7	137,00	0,000*	Allopatrische Fragmentierung
Gesamt- kladogramm	Europäische Gebirge (alle Clades)	663,16	0,000*	Historische Fragmentierung

Tab. 9: *Nested-clade*-Analyse: Fortsetzung.

Lf2 Clade	Verbreitung	χ^2 Statistik	P	Demographisches Ereignis
Clade 1-1	Rocky Mountains, Kaukasus, Apenninen, EAlpen, Bosnien, Karpaten, Sierra Cantabrica, Auvergne, Vogesen, Harz, Riesengebirge, Hohe Tatra	404,00	0,000*	Allopatrische Fragmentierung
Clade 1-2	Apenninen, Korsika, Alpen, Kroatien, Auvergne, Pyrenäen, Sierra Cantabrica, Zentralspanien	458,00	0,000*	Begrenzter Genfluss mit wenig Fernausbreitung (oder historischer Genfluss und Aussterben arealverbindender Populationen)
Gesamt- kladogramm	Rocky Mountains, Europäische Gebirge (alle Clades)	324,52	0,000*	Allopatrische Fragmentierung

5.1.5. Chloroplasten-Haplotypen in den Unterarten und Morphotypen des Artkomplexes

Pulsatilla occidentalis, *P. aurea* und *P. alpina* mit ihren getrennten Arealen sind, betrachtet man die gesamte *trnL-trnF*-Region, jeweils durch einen eigenen, nichtüberlappenden Satz von Haplotypen charakterisiert. Zwischen den vorgeschlagenen Unterarten und Morphotypen im Artkomplex von *P. alpina* ist das Bild komplexer (vgl. Tab. A5).

Die Unterart *alpicola* ist, wenn damit die Morphotypen *alpicola* und *austriaca* zusammengefasst werden, sehr gut von den übrigen Sippen abgegrenzt. Es dominierten eine Gruppe verwandter, mit anderen Unterarten wenig überlappender Haplotypen vom *PIC*-Typ (92,9%). Seltener treten auch Haplotypen des *API*-Typs (7,1%) auf.

Auch in der Unterart *cyrnea* dominieren mit 75% eigene Haplotypen des *API*-Typs (100%). Eine im wesentlichen auf eine Haplotypengruppe begrenzte, aber stark überlappende Haplotypenausstattung haben die Unterarten *apiifolia* (*API*-Typ 97,9%, *ALP*-Typ 2,1%), *font-queri* (*API* 100%) und *cantabrica* (*API* 100%).

Die Anteile der Haplotypen für die Unterart *alpina* betragen insgesamt: *PIC* 17,6%, *API* 43,4%, *ALP* 39%). Die nordalpinen Populationen, die den Morphotyp *alpina* bilden, sind durch Chloroplasten vom *ALP*-Typ gekennzeichnet. Die Populationen in den Südalpen, die traditionell ebenfalls zur Unterart *alpina* gestellt wurden, haben dagegen ausschließlich Chloroplasten vom *PIC*- und vom *API*-Typ.

5.2. Sequenzanalyse der ITS-Region

5.2.1. Molekulare Merkmale der ITS-Region

Die vollständige ITS-Region (ITS1, 5,8S rDNA, ITS2) wurde für 161 Individuen aller 67 Populationen des Artkomplexes und von *P. occidentalis* und *P. aurea* jeweils in beiden DNA-Strangrichtungen erfolgreich sequenziert. Für einige Proben, vornehmlich Herbarbelege, wurde die PCR und die Sequenzierung für die Teilfragmente ITS1 und ITS2 getrennt durchgeführt. Zahlreiche Vertreter aller Sektionen von *Pulsatilla* sowie *Callianthemum anemonoides* und *Clematis recta* wurden als Außengruppen (vgl. Kap. 1.1.) in die Analyse einbezogen. Dazu gehören auch die GenBank-verfügbaren ITS-Sequenzen von *Pulsatilla cernua* (Thunbg.) Bercht et Presl, *Anemone antucensis* Poepp., *Myosurus minimus* L. und *Clematis afoliata* Buchanan (siehe Tab. A1). Die den Arten der Sektion *Preonanthus* nahestehende *Pulsatilla taraoi* war als Herbarbeleg vorhanden. Allerdings konnte die ITS-Region für alle drei Akzessionen dieser Spezies nur in geringster Konzentration amplifiziert werden. Es war bei ihnen nicht möglich, die PCR-Fragmente erfolgreich zu reamplifizieren oder zu klonieren.

In Tab. 10 sind einige ausgewählte molekulare Merkmale der ITS-Region des *P. alpina*-Komplexes aufgelistet. Die Region hat eine Länge von 507 bis 509 Basenpaaren, weist einen mittleren G/C-Gehalt von 57,2% auf und zeigt eine Substitutionsrate von 0,084 bp⁻¹. Die Länge, der G/C-Gehalt und die Substitutionsrate sind zwischen den Akzessionen des Artkomplexes sehr ähnlich. Zwei von drei Indels treten an Polynukleotidketten auf. SNPs sind im Vergleich zu Indels 13 mal häufiger. Der Artkomplex unterscheidet sich in allen genannten Merkmalen kaum von den übrigen *Pulsatilla*-Arten. Die ITS-Region der Außengruppe *Anemone antucensis* ist länger und weist einen geringeren G/C-Gehalt auf. Der ITS der Akzessionen *Callianthemum anemonoides*, *Clematis afoliata* und *Clematis recta* (495 bp, 479 bp, 485 bp) sind kürzer und zeigen einen leicht erhöhten G/C-Gehalt (60,0%, 59,3%, 59,5%).

Die ITS-Fragmente zeigen hinsichtlich des G/C-Gehaltes keine klaren Unterschiede zu anderen Gefäßpflanzensippen. Das ITS2-Fragment ist aber deutlich kürzer als bei anderen Arten (vgl. Baldwin & al. 1995). Die G/C-Gehalte in absteigender Reihenfolge sind für ITS2 62,6%, bei einer Länge von 148 bis 149 bp, für ITS1 56,5% (196 bp) und 53,3% für die 5,8S rDNA (165 bp).

Das ITS1-Fragment ist im Durchschnitt wesentlich variabler als das ITS2-Fragment und als der kodierende Bereich 5,8S rDNA. Da sechs der sieben SNPs in der 5,8S-Untereinheit jeweils nur in einer Akzession vorkommen, relativiert sich die hohe Zahl von SNPs in diesem Abschnitt. Die Substitutionshäufigkeiten der beiden ITS-Fragmente sind nicht grundsätzlich proportional zueinander. Die Akzessionen von *P. alpina* s.str. haben z. B. im ITS2 im Vergleich zu allen anderen Akzessionen eine sehr hohe Substitutionsrate.

Das ITS-Alignment für den Artkomplex hat eine Gesamtlänge von 510 bp und unter Berücksichtigung aller Außengruppen von 539 bp. Beide Alignments sind in den Tabellen A6 und A7 im Anhang aufgeführt.

Tab. 10: Sequenzmerkmale der Teilfragmente der ITS-Region von 161 Individuen und 67 Akzessionen von *P. aurea*, *P. occidentalis* und vom Artkomplex *P. alpina*.

Sequenzmerkmal	ITS1	ITS2	5,8S rDNA	ITS
Probenanzahl	161	161	161	161
Länge (bp)	195-196	148-149	165	507-509
Länge des Alignments (bp)	196	149	165	510
Indels (bp)	1	2	0	3
Länge der Indels (bp)	1	1	0	1
SNPs	23	10	7	40
Ø GC Gehalt (%)	56,49	62,57	53,29	57,2
Substitutionsrate (bp ⁻¹)	0,12	0,081	0,04	0,084
Konstante Positionen	172	137	158	470
Variable Positionen	15	8	6	29
Informative Positionen	9	4	1	14

5.2.2. Analyse der ITS-Region des Artkomplexes in der Gattung *Pulsatilla*

Die Analyse der ITS-Region mit Vertretern aller Sektionen, aller *Preonanthus*-Arten und je einem Vertreter aller Morphotypen des *P. alpina*-Komplexes mit den Analysemethoden NJ und MP resultiert in einer identischen Baumtopologie. Unter Verwendung von MODELTEST wurde das Modell GTR+G als optimales Evolutionsmodell zur Berechnung der *maximum-likelihood*-Distanzen (ML-Distanzen) bestimmt. Die Abb. 12 zeigt die NJ-Phylogenie der phänetischen Analyse.

Der Datensatz enthält ein starkes phylogenetisches Signal (Skewness $g1 = -0,824$; Grenzwert für 112 variable Merkmale und 25 Akzessionen $** = -0,12$). Alle *Pulsatilla*-Arten bilden einen gut abgesicherten Clade. *Pulsatilla kostyczewii* bildet eine innerhalb der Gattung isoliert stehende Schwestergruppe zu den monophyletischen „echten“ Küchenschellen und den monophyletischen Alpenanemonen der Sektion *Preonanthus*, die ihrerseits gut definierte Schwestergruppen bilden. Innerhalb der Sektion ist nur *P. occidentalis* von allen weiteren Sippen sicher als monophyletisch abzugrenzen. Die genannten Verzweigungen werden durch NJ-Bootstrapwerte zwischen 84% und 97% und in der MP-Analyse durch Majority-Rule-Consensus-Werte von 100% unterstützt, sind also als signifikant einzustufen. Die Gruppierung der Arten bzw. Morphotypen innerhalb des Clades der *P. alpina* und *P. aurea* umfasst, ist weniger deutlich. Eine isolierte Stellung von *P. aurea* wird von beiden Analyseverfahren zwar durch die Topologie bestätigt, erhält durch die NJ-Bootstrap- und die MP-Majority-Rule-Consensus-Werte aber keine statistische Absicherung.

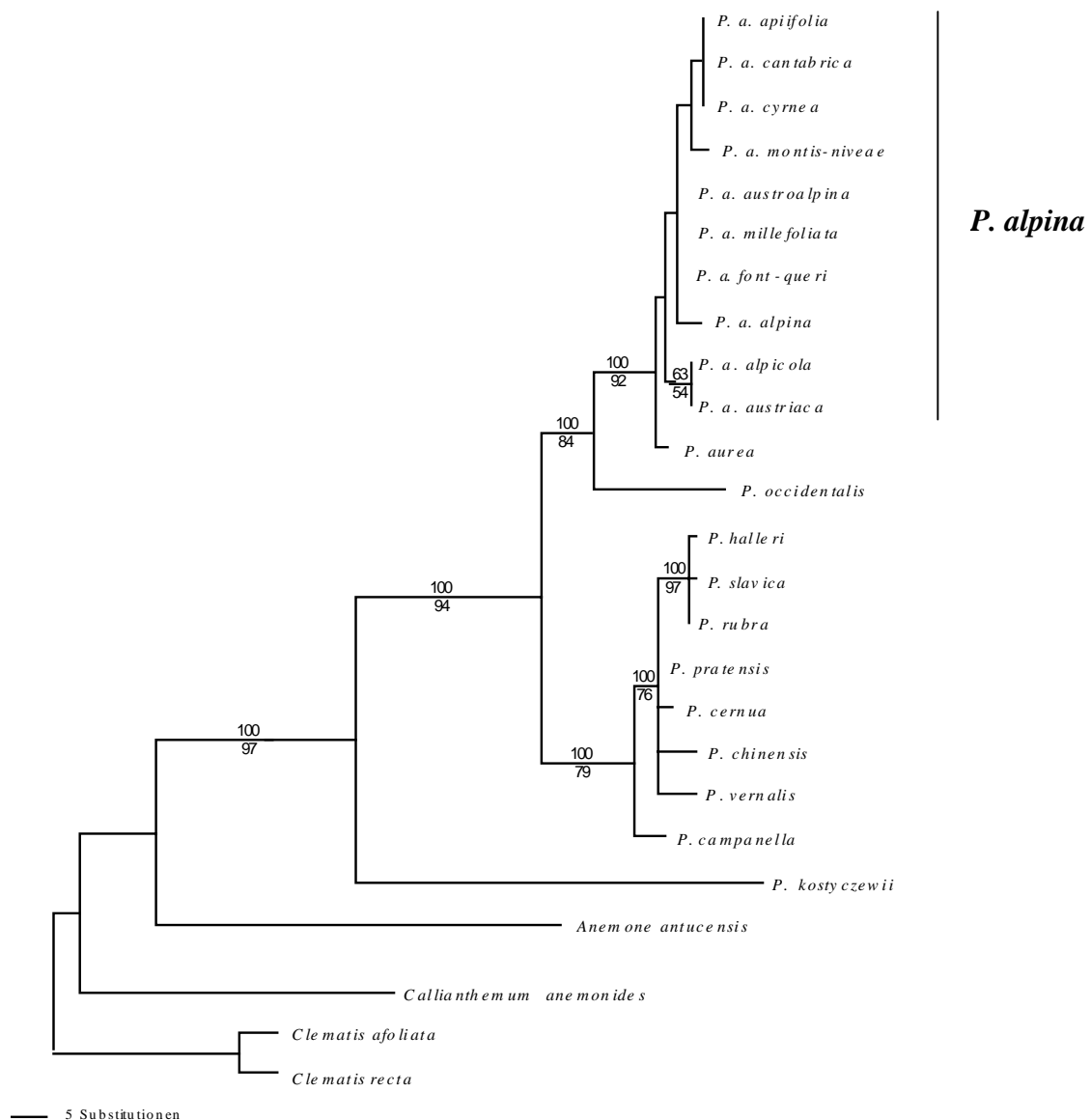


Abb. 12: *Neighbor-joining*-Phylogramm der ITS-Region auf der Basis von *maximum-likelihood*-Distanzen (GTR+G-Modell) von 21 Akzessionen der Gattung *Pulsatilla* incl. jeweils einem Vertreter aller von Moser (1996) differenzierten Morphotypen des *P. alpina*-Komplexes. Die Bootstap-Werte (>50%, 1000 Wiederholungen) sind unterhalb der Äste angegeben. Oberhalb der Äste sind die *Majority-rule-consensus*-Werte aus 1821 Bäumen der Parsimonie-Analyse des identischen Datensatzes verzeichnet (Länge 363, CI 0,812, RI 0,759). Die MP-Analyse unterstützt die gleiche Topologie.

Die *likelihood*-basierte Methode ML ergibt eine alternative Topologie. Der grundsätzliche Unterschied besteht in der Art der Verknüpfung des *P. alpina*-Artkomplexes mit den „echten“ Küchenschellen und in unterschiedlichen Substitutionsraten der beiden *Pulsatilla*-Hauptclades. Die Anbindung der „echten“ Küchenschellen als Schwestergruppe zum *P. alpina*-Morphotyp *montis-niveae* erscheint vollkommen unsinnig. Da diese Topologie statistisch nicht gut abgesichert sind, der maximale

likelihood-Wert unterscheidet sich nicht signifikant von einer sehr großen Anzahl möglicher Alternativen, wird die MP- bzw. die NJ-Topologie bevorzugt.

5.2.3. Analyse der ITS-Region innerhalb des Artkomplexes

Der Datensatz für die Analyse der ITS-Region für die Vertreter aller Akzessionen innerhalb des Artkomplexes enthält ebenfalls ein deutliches phylogenetisches Signal (Skewness $g1 = -0,383$; Grenzwert für 12 variable Merkmale und 84 Akzessionen; $** = -0,15$). Die geringe Anzahl variabler Merkmale, von denen einige homoplastisch sind, beeinträchtigt die Auflösungsqualität deutlich. Einige „problematische“ Individuen (19_1, 19_3, 19_5, 32_1) wurden deshalb von der Baumberechnung zunächst ausgeschlossen. Nach Auffassung von Holder & Lewis (2003) hat der NJ-Ansatz gegenüber den elaborierten Methoden MP, ML and MrBayes besonders bei wenigen variablen Merkmalen deutliche Vorteile. Er wird daher in diesem Fall besonders berücksichtigt.

Die Abb. 13 zeigt die NJ-Topologie auf der Basis von ML-Distanzen (optimales Evolutionsmodell nach MODELTEST ist TrN+G). Neben *P. occidentalis* erweist sich auch *P. aurea* als deutlich von allen anderen Akzessionen getrennte Schwestergruppe. Die Akzessionen der Morphotypen *alpicola* und *austriaca* sind fast alle sequenzidentisch und gruppieren daher zusammen. Sie bilden einen Schwesterclade zu einer Polytomie, die aus den Akzessionen aller anderen Morphotypen gebildet wird. Die Polytomie setzt sich aus einem Nordalpen-ITS-Clade, einem Apiifolia-ITS-Clade, einem Ostalpen-ITS-Clade und zahlreichen basalen Akzessionen zusammen, die jeweils kaum synapomorphe Merkmale aufweisen. Die basalen Akzessionen bilden die phylogenetische Basis des gesamten polytomen Clusters. Der Nordalpen-ITS-Clade umfasst nahezu alle Akzessionen des Morphotyps *alpina*, die Mehrzahl der Akzessionen des Hybriden *ochroleuca* und einige des Morphotyps *cottianaea* zusammen. Der Apiifolia-ITS-Clade enthält vorwiegend Akzessionen des Morphotyps *apiifolia* und der Ostalpen-ITS-Clade alle untersuchten *montis-niveae*-Individuen und einen Vertreter der *austroalpina*-Population 18. Zur Gruppe der Basisakzessionen zählen vorwiegend die Vertreter der der Morphotypen *millefoliata*, *font-queri*, *cantabrica*, *austroalpina* und *cottianaea*.

Die NJ-Topologie ist statistisch nur schwach abgesichert. Die Akzessionen von *P. aurea* ist als eigenständiger Clade durch Bootstrap-Werte von 87 gestützt. Darüber hinaus lassen sich der Nordalpen-ITS-Clade, der Ostalpen-ITS-Clade und ein Clade mit zwei *cantabrica*- und einer *font-queri* Populationen schwach durch erhöhte Bootstrap-Werte stützen. Nach dem Bootstrap-Test ist nicht sicher, ob *alpicola* ursprünglich ist und dass *apiifolia* als abgeleitete Sippe angesehen werden muss.

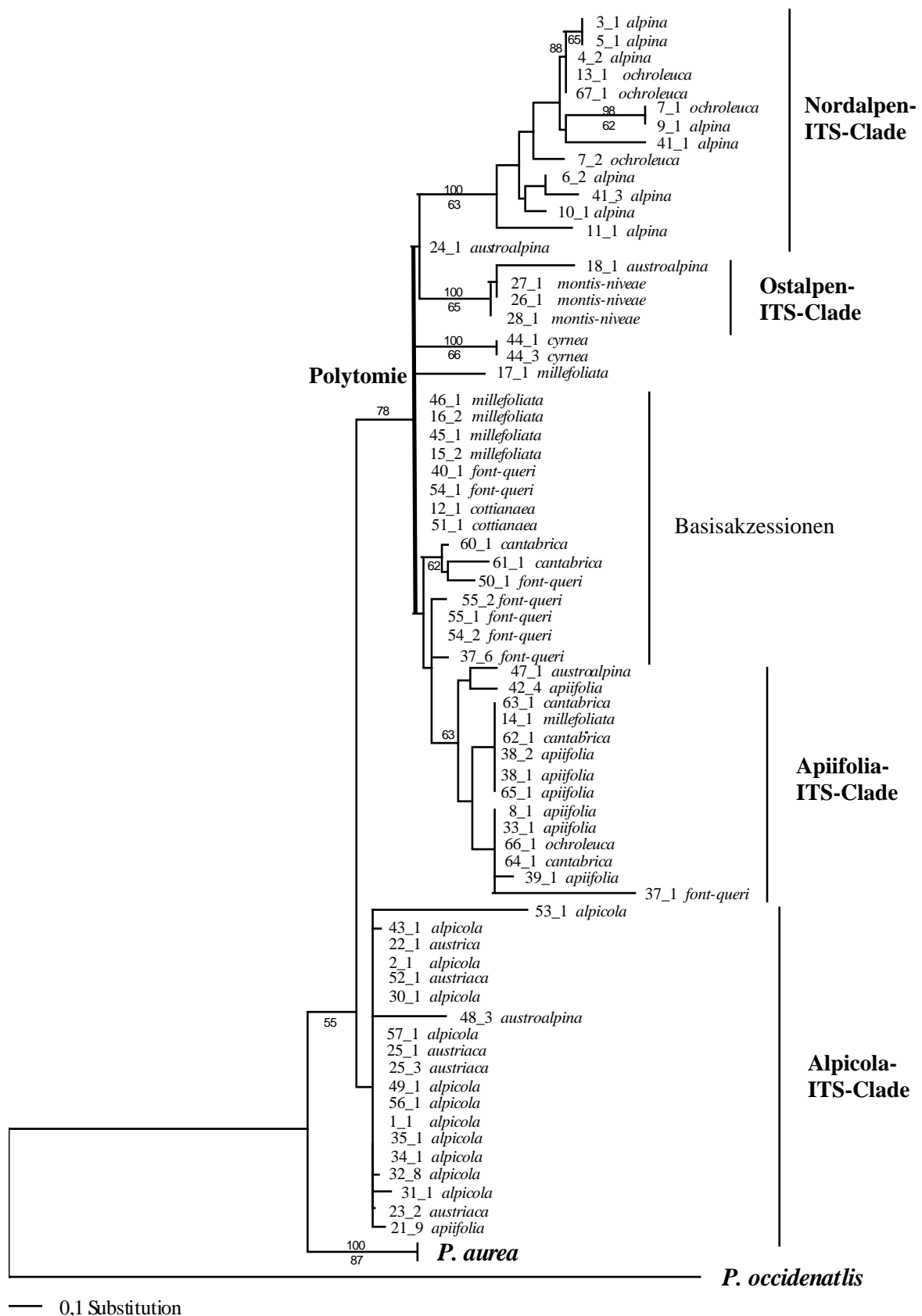


Abb. 13: Neighbor-joining-Phylogramm der ITS-Region auf der Basis von maximum-likelihood-Distanzen (TrN+G-Modell) von 72 Akzessionen des Artkomplex von *P. alpina*. Die Bootstap-Werte (>50%, 1000 Wiederholungen) sind unterhalb der Äste angegeben. Die Bezeichnungen der untersuchten Individuen sind aus der Nummer der Akzession bzw. des Individuums und dem Morphotyp nach Moser (1996) zusammengesetzt. Oberhalb der Äste sind die Majority-rule-consensus-Werte aus 44 sparsamsten Bäumen der Parsimonie-Analyse des identischen Datensatzes verzeichnet (Länge 39, CI 0,923, RI 0,985).

Die 50%-Majority-rule-consensus-Topologie der MP-Analyse teilt die aufgeführten ITS-Clades der NJ-Analyse. Die Trennung von *P. aurea*, der Nordalpen-ITS-Clade und der Ostalpen-ITS-Clade werden mit Werten von 100% signifikant gestützt. Der *Apiifolia*-ITS-Clade erhält mit einem Consensus-Wert von 63% nur eine schwache Absicherung.

Nach der Decay-Analyse ist die Abtrennung die einzelnen Clades nur schwach gesichert (*P. occidentalis* d4, Nordalpen-ITS-Clade und Ostalpen-ITS-Clade d2). Die Abtrennung von *P. aurea* (d1) ist demnach ebenfalls kaum gestützt.

Die ML-Analyse des Datensatzes ergab auch mit dem *heuristic-search*-Verfahren mit der verfügbaren Rechnerleistung keine deutlich zu bevorzugende Topologie.

5.2.4. Analyse einzelner ITS-Polymorphismen

Der Datensatz zur Analyse des Artkomplexes enthält 29 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*). Die SNPs kommen gewöhnlich bei mehreren Individuen vor, lediglich sieben konnten nur einmal detektiert werden. Die überwiegende Mehrzahl der SNPs hat einen deutlichen regionalen Schwerpunkt. Eine Ausnahme bilden die weitverbreiteten SNPs der Nukleotidpositionen 98, 162, 371 und 421 (vgl. Abb. 21). Sie verbinden jeweils die disjunkten Teilareale in den europäischen Gebirgen, im Kaukasus und in den Rocky Mountains.

Die Mehrzahl der Individuen einer Akzession hat eine identische ITS-Sequenz. Charakteristisch ist aber auch das Auftreten von zwei verschiedenen Nukleotiden an einer ITS-Position, also eines echten Polymorphismus bei einem Individuum. Neben Individuen mit polymorphen Merkmalen kommen innerhalb einer Population in der Regel Individuen vor, in denen jeweils nur eines der beiden Nukleotide an der variablen ITS-Position dominiert (vgl. Abb. 14).

Identische Sequenzen verschiedener Populationen konnten zu ITS-Typen zusammengefasst werden. Die Häufigkeit einzelner ITS-Typen variiert sehr stark. Sie ist wegen des Auftretens rekombinanter ITS und von Individuen mit polymorphen Merkmalen meist eins (51 mal). Der *Alpicola*-ITS-Typ tritt in 15 Akzessionen auf und ist damit am häufigsten. Insgesamt konnten nur acht echte in mehr als einer Akzession auftretende ITS-Typen identifiziert werden. Die ITS-Typen dominieren ebenfalls in größeren Gebieten des Gesamtareals. Der *Alpicola*-ITS-Typ kommt im gesamten Areal der Morphotypen *alpicola* und *austriaca* vor. Der *Apiifolia*-Austroalpina-ITS-Typ (sieben Akzessionen) tritt in den Nordwestalpen, den Südalpen, der Auvergne und in Zentralspanien auf. Der Südwestalpen-Font-queri-ITS-Typ (vier Akzessionen) verbindet Vorkommen in den Südwestalpen, den Apenninen und den Pyrenäen. Regional eng begrenzt sind zwei ITS-Typen (fünf und drei Akzessionen) mit Populationen des Morphotyps *alpina*, die jeweils in den Nordwest-Alpen und im Jura verbreitet sind. Ein regional beschränktes Vorkommen haben auch ein ITS-Typ des Morphotyps *montis-niveae* in den

Ost- bzw. Südalpen (drei Akzessionen), ein ITS-Typ innerhalb des Morphotyps *austriaca* (zwei Akzessionen) und ein ITS-Typ innerhalb des Morphotyps *millefoliata* (drei Akzessionen).

Die Angabe der Diversität der ITS-Typen je Population ist wegen der geringen Anzahl untersuchter Individuen pro Akzession und unter Berücksichtigung der beschriebenen Vielfalt der ITS-Sequenzen nicht sinnvoll.

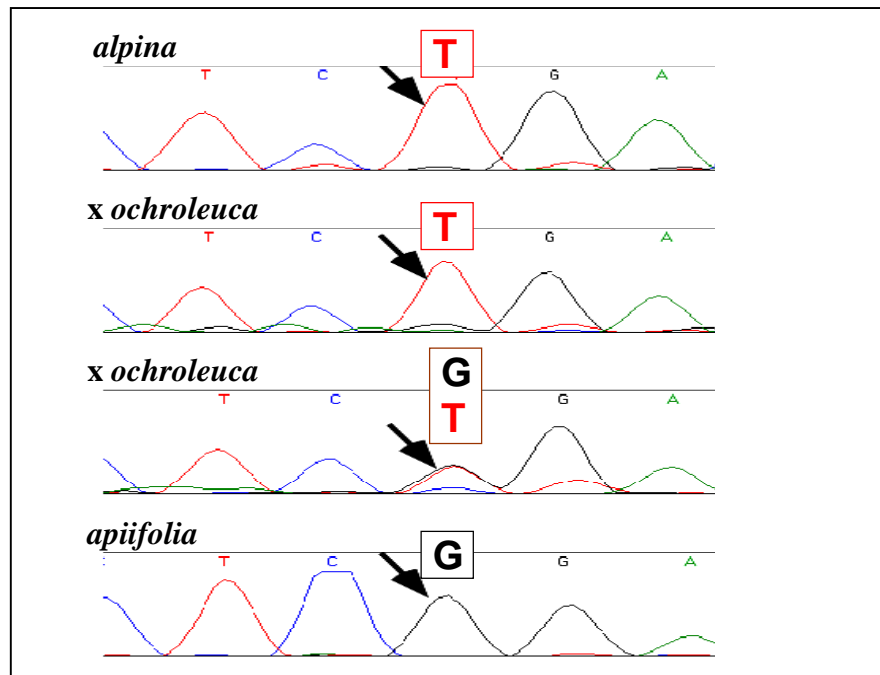


Abb. 14: Polymorphe ITS-Sequenzpositionen am Beispiel der *P. alpina*-Akzessionen 6 (oben, Morphotyp *alpina*), 7 (Mitte, *x ochroleuca*) und 8 (unten, *apiifolia*) vom Standort Pierre Avoi in den NW-Alpen. Polymorphe ITS-Sequenzpositionen sind Indikatoren für Hybridisierung und Introgression.

5.2.5. Die Einordnung problematischer Akzessionen

Die morphologisch als Hybriden aufgefassten Morphotypen *ochroleuca* (Populationen 7, 13, 20, 66, 67) und *cottianaea* (Populationen 11, 12, 51) zeigen Polymorphismen häufiger, als das durchschnittlich zu erwarten wäre. Einige Vertreter dieser Populationen haben eine basale phylogenetische Position innerhalb des Nordalpen-ITS-Clades (vgl. Abb. 13). Das ist ein zusätzliches Argument dafür, dass es sich um Hybridpopulationen handelt .

Die Individuen der Population 19 vom Monte Baldo und 32_1 aus der Auvergne wurden zunächst von der phylogenetischen Analyse ausgeschlossen. Die Population 19 ist mit der *P. occidentalis*-Akzession durch ein Cytosin an der ITS-Position 91 verbunden. Eine Zugehörigkeit der Population 19 zu den Basisakzessionen des polytomen Clusters ergibt sich bei Ausschluss dieses Nukleotids von der

Analyse. Die Akzession 32_1 weist mit einem Cytosin-Thymin-Polymorphismus an der Position 98 ein Merkmal auf, das sie mit dem Thymin von *P. aurea* und *P. occidentalis* verbindet. Bei Ausschluss dieser Base gruppiert die Akzession 32_1 zusammen den übrigen Akzessionen der Population innerhalb des *Alpicola*-ITS-Clades.

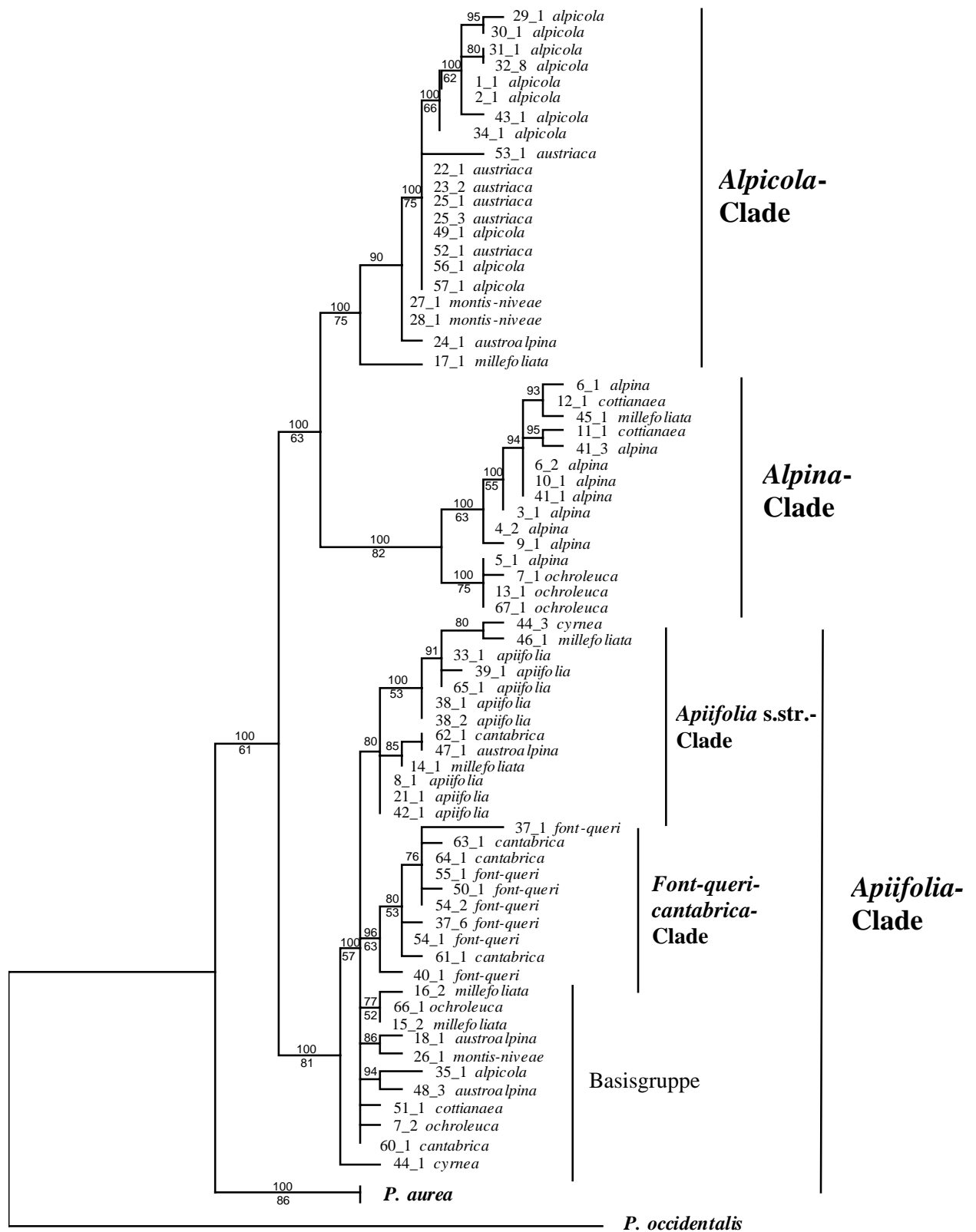
Die Phylogenien der ITS-Teilfragmente ITS1 und ITS2 weisen keine signifikanten Widersprüche auf. Die Ergebnisse werden hier nicht näher vorgestellt, da sich sowohl im Hinblick auf die Stellung der Hybridsippen als auch auf die auftretenden Homoplasien keine neuen Einsichten ergaben.

5.3. Analyse der kombinierten ITS- und *trnL-trnF*-Sequenzen

Ein zusammengesetzter Datensatz aus den ITS-Daten des Kerngenoms und den *trnL-trnF*-Daten des Chloroplastengenoms wurde mit Hilfe der NJ- und MP-Methode analysiert. Die Sequenzen beider Marker wurden wegen der vergleichbaren Länge und den ähnlichen Substitutionsraten ungewichtet kombiniert. Der Datensatz enthält ein deutliches phylogenetisches Signal (g1-Wert = -0,228; Grenzwert -0,12, bei 39 variablen Merkmalen, 84 Akzessionen).

Die Topologie der resultierenden phylogenetischen Bäume ist für die Verzweigungen der Hauptclades mit sehr hohen Majority-Rule-Consensus-Werten (MP-Analyse) und hohen Bootstrapunterstützungen (NJ-Analyse) signifikant gesichert (vgl. Abb. 15). Im Vergleich zu den Einzeldatensätzen werden die Verzweigungen bei NJ und MP mit deutlich höherer Sicherheit unterstützt. Entsprechend der *trnL-trnF*-Phylogenie ist der *Apiifolia*-Clade Schwesterclade zu einem gemeinsamen, gut gestützten *Alpina*- und *Alpicola*-Clade, die jeweils Schwesterclades zueinander bilden. Eine Monophylie der *montisniveae*-Akzessionen (vgl. Abb. 13, ITS-Phylogenie) wird nicht bestätigt. Ein stabiler neuer Clade innerhalb der Polytomie des *Apiifolia*-Clades wird aus zahlreichen *cantabrica*- und *font-queri*-Akzessionen aus den Pyrenäen gebildet (Bootstrap 63%, Majority-Rule-Consensus-Wert 96%).

Einige Individuen bzw. Akzessionen 7_1, 7_2, 12_1, 27_1, 28_1 kombinieren ITS-Sequenzen mit „untypischen“ Chloroplasten-Sequenzen. Das heißt, ihre topologische Position innerhalb der ITS-Phylogenie widerspricht der Stellung nach der Chloroplastenphylogenie. Der Widerspruch zwischen beiden Markern lässt sich dadurch erklären, dass populationsfremde Chloroplasten durch Hybridisierung von einer Population „eingefangen“ wurden (*chloroplast capture*). (Es handelt sich wegen der maternalen Vererbung eher um das Überprägen einer Population durch Genintrogression über den Pollen. Der Chloroplast bleibt dann als Relikt der alten Population erhalten.)



— 1 Substitution

Abb. 15: Einer von 126 sparsamsten Bäumen (Schritte 104, CI 0,779, RI 0,940) der Parsimonie-Analyse der kombinierten Phylogenie (ITS und *trnL-trnF*) des Artkomplexes von *P. alpina*. Die Bezeichnungen der Akzessionen setzten sich aus der Nummer der Population bzw. des Individuums und dem Morphotyps nach Moser (1996) zusammen. *Majority-rule-consensus*-Werte (>50%) sind oberhalb der Äste verzeichnet, Bootstap-Werte (>50%) unterhalb. Populationen mit einer nach den Teilanalysen widersprüchlichen Kombination von Chloroplasten und ITS wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen.

Werden diese Akzessionen nicht in die Analyse einbezogen, wird die Topologie statistisch noch besser unterstützt.

Eine ML-Analyse war nicht möglich, weil die Indels des Datensatzes mit 0 und 1 verschlüsselt wurden. Für die Rekonstruktion von Indelmutationen existiert bislang kein geeignetes Evolutionsmodell. Eine notwendige Vorbedingung für diese Methode ist damit nicht erfüllt.

5.4. Datierung der phylogenetischen Knoten

5.4.1. ITS-Topologie für die Bestimmung der Divergenzzeiten

Die molekulare Datierung basiert auf der NJ-ITS-Topologie mit ML-Distanzen eines ITS-Datensatzes der 21 Akzessionen der verschiedenen Sektionen der Gattung *Pulsatilla*, *P. occidentalis*, *P. aurea* und aller Morphotypen des Artkomplexes von *P. alpina* und der Ranunculaceae-Arten *Thalictrum simplex*, *Ranunculus gramineus*, *Clematis recta* und *Helleborus orientalis*. Die verwendete Topologie entspricht der MP- und der NJ-Rekonstruktion für die Gattung *Pulsatilla* und den *P. alpina*-Komplex. Die *trnL-trnF*-Topologie unterstützt die ITS-Topologie innerhalb der Gattung *Pulsatilla* ebenfalls. Da der kombinierte Sequenzdatensatz eine Länge von 987 bp hat, werden die Forderungen für die Datierungsmethode PL nach einem Mindestdatenumfang als befriedigt angesehen (vgl. Sanderson 2002). Eine Datierung auf der Grundlage der kombinierten Datenmatrix unter Einschluss der Ranunculaceae-Gattungen war mit den analysierten Daten nicht möglich. Die Diversität der *trnL-trnF*-Sequenzen der Ranunculaceae-Vertreter war für ein gemeinsames Alignment zu groß.

5.4.2. Clocklike-Datierung und Penalized-Likelihood-Datierung

Die alternativen Methoden RRT und LRT zur Bewertung der Nullhypothese der Annahme einer Molekularen Uhr, der Homogenität der Substitutionsraten, kommen zu einem unterschiedlichen Ergebnis.

Der auf einem paarweisen Sequenzvergleich von Kimura-2-Parameter-Distanzen (K2P) basierende RRT bestätigt keine signifikanten Unterschiede der Substitutionsraten zwischen den Akzessionen der Gattung *Pulsatilla* und den gewählten Ranunculaceae-Arten im Vergleich mit der entfernten Außengruppe *Helleborus orientalis*. Kein Sequenzpaar zeigt eine signifikante Ratenheterogenität ($P = 0,05$; z-Wert $> |1,96|$).

Der LRT kommt für den selben Datensatz zum gegenteiligen Ergebnis. Der negative natürliche Logarithmus (-ln-Wert) für die Phylogenie beträgt unter dem optimalen Evolutionsmodell HKY85

2276,58. Da der $-\ln$ -Wert bei Annahme einer Molekularen Uhr 2310,38 ist, errechnet sich mit $\Lambda = 67,6$ eine doppelte $-\ln$ -Differenz, die deutlich oberhalb des kritischen Wertes von 37,65 liegt ($P = 0,05$; $n=27$). Die Nullhypothese einer homogenen Evolutionsrate entlang aller Verzweigungen der Phylogenie muss danach verworfen werden. Die Nullhypothese wird auch abgelehnt, wenn man das von MODELTEST als gleichwertig abgeleitete Evolutionsmodell K2P wählt.

Die Substitutionsraten des vorliegenden Datensatzes liegen im Grenzbereich zwischen Ablehnen einer Ratenheterogenität im RRT und dem Verwerfen der Nullhypothese einer Ratenhomogenität mit dem LRT.

Die Berechnung der Substitutionsraten und Divergenzzeiten mit den unterschiedlichen Datierungsmethoden führt zu ähnlichen Ergebnissen für die Abspaltung von *P. kostyczewii*, den „echten“ Küchenschellen und *P. occidentalis* (siehe Tab. 11). Die größten Differenzen bestehen bei der Abschätzung der Trennungszeit von *P. aurea* und der Divergenz zwischen den Sippen in Europa.

Wegen der Gültigkeit des RRT kann die ITS-Phylogenie mit Hilfe der Durchschnittswerte der paarweisen ITS-K2P-Distanzen mit *Helleborus* als Außengruppe (vgl. Tab. A10) von 0,256 (Standardabweichung $\pm 0,022$) in eine ultrametrische Topologie überführt werden. Unter Berücksichtigung aller Fossildaten errechnet sich eine mittlere Mutationsrate (Substitutionen pro Base und Ma) von $2,95 \times 10^{-3}$. In Abhängigkeit von den Extremwerten der Altersangaben für die einzelnen Fossilien ergibt sich eine Minimummutationsrate von $1,85 \times 10^{-3}$ und eine Maximalrate von $5,5 \times 10^{-3}$. Daraus folgt eine Divergenzzeit von 9,9 (5,3-16) Ma für *P. kostyczewii* und von 8,1 (4,4-13) Ma für die Trennung der Vorfahren der Sektion *Preonanthus* von den echten Küchenschellen. Vor 6,1 (3,3-9,7) Ma begann die Abtrennung von *P. occidentalis* und vor 1,1 (0,6-1,8) Ma die reproduktive Isolation von *P. aurea*. Im Pleistozän, vor etwa 0,8 (0,4-1,3) Ma begann die innereuropäische Radiation in die drei Hauptclades des Artkomplexes von *P. alpina*. Der Prozess, der zur Verbreitung der modernen Linien führte sollte etwa in derselben Zeit begonnen haben und hält bis heute an.

Für die PL-Methode wurde bei der Kreuzvalidierung (*cross validation*) ein optimaler Glättungsparameter von 34,85 ermittelt. Die Ausgangstopologie wird hier vor allem im mittleren Bereich geglättet. Die Abb. 16 veranschaulicht die kalkulierten Divergenzzeiten innerhalb der Gattung *Pulsatilla*, der Sektion *Preonanthus* und des Artkomplexes. Die durchschnittliche PL-Mutationsrate von $3,16 \times 10^{-3}$ ($\pm 0,61 \times 10^{-3}$) und die Divergenzzeiten entsprechen etwa den Durchschnittswerten der ultrametrischen Topologie. Die Aufspaltung der Gattung begann mit der Trennung von *P. kostyczewii* vor 8,6 ($\pm 1,7$) Ma. Die Sektion *Preonanthus* ist seit 7,5 ($\pm 1,5$) Ma von den echten Küchenschellen isoliert. Im Gegensatz zur *clocklike*-Datierung begann die Abspaltung von *P. occidentalis* vor 5,6 ($\pm 1,1$) Ma und die Trennung zwischen der Kaukasussippe *P. aurea* und den europäischen Migranten vor 1,9 ($\pm 0,4$) Ma. Der Beginn der Etablierung in Europa und der bald darauffolgenden Radiation wurde auf etwa 1,4 ($\pm 0,3$) Ma datiert. Die ersten modernen Linien sind mindestens 0,4 ($\pm 0,1$) Ma Jahre alt. Das gemeinsame Einbeziehen aller Fossilien bei der PL-Datierung erhöht zwar die

Standardabweichung, macht aber eine Unterscheidung in eine minimale und maximale Mutationsrate nicht nötig. Die PL-Divergenzzeiten können deshalb mit einer höheren Genauigkeit angegeben werden.

Tab. 11: Divergenzalter (Ma) und Substitutionsraten (Substitutionen pro Base und Ma) der Gattung *Pulsatilla* insbesondere des *P. alpina*-Komplexes und der Außengruppen *Anemone antucensis*, *Helleborus orientalis*, *Thalictrum simplex*, *Ranunculus gramineus* und *Clematis recta*, abgeleitet mit Hilfe der *molecular-clock*-Methode *relative-rate*-Test (RRT) und der Methode Penalized Likelihood (PL) der auf der Basis der *Neighbor-joining*-Topologie der ML-Distanzen der ITS-Region. Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe der Fossilalter für die ältesten bekannten Vertreter dieser Gattungen (siehe Kap. 1.1. und 4.3.2). Zur Lage der Knoten A bis G vgl. Abb. 16. Lokale Substitutionsraten sind mit * gekennzeichnet.

Knoten	Methode	RRT	PL
		Divergenzalter \pm sd in Ma	Divergenzalter \pm sd in Ma
Knoten A		23,78 \pm 2,02	19,73 \pm 3,81
Knoten B		9,92 \pm 0,84	8,6 \pm 1,66
Knoten C		8,14 \pm 0,69	7,52 \pm 1,45
Knoten D		6,08 \pm 0,52	5,56 \pm 1,07
Knoten E		1,1 \pm 0,09	1,93 \pm 0,37
Knoten F		0,8 \pm 0,07	1,44 \pm 0,28
Knoten G		0,36 \pm 0,03	0,43 \pm 0,08
Mittlere Substitutionsrate		0,00295 \pm 0,00025	0,00316 \pm 0,00061
Min. Substitutionsrate		0,00185	0,0000482*
Max. Substitutionsrate		0,0055	0,00375*

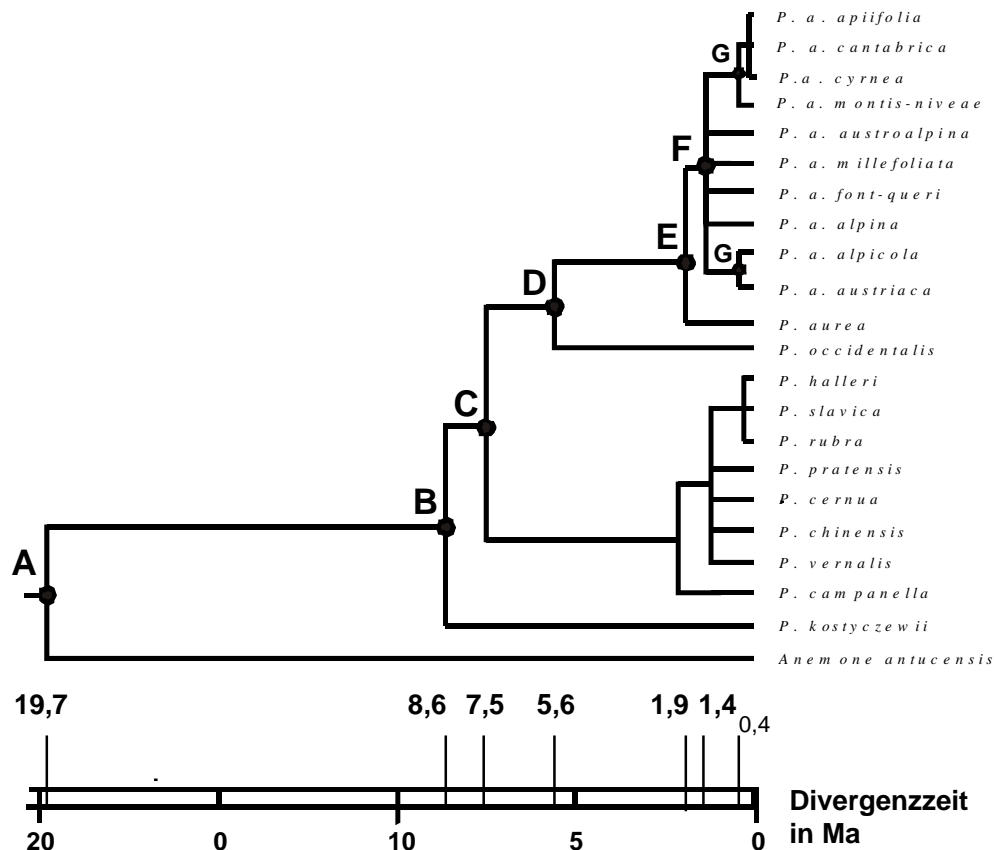


Abb. 16: Chronogramm abgeleitet mit Hilfe der Methode „Penalized Likelihood“ auf der Basis einer *Neighbor-joining*-Analyse der *maximum-likelihood*-Distanzen der ITS-Region der Gattung *Pulsatilla* und des *P. alpina*-Komplexes (vgl. Abb. 12, statistische Absicherung der Topologie und Tab. 11, berechnete Divergenzzeiten). Die Ranunculaceae-Arten *Anemone antucensis*, *Helleborus orientalis*, *Thalictrum simplex*, *Ranunculus gramineus* und *Clematis recta* wurden als Außengruppen verwendet. Sie sind hier nicht abgebildet. Die mit G bezeichneten Knoten und die abgeleitete Divergenzzeit (alle nicht fett gedruckt) sind durch die ITS-Topologie nur schwach unterstützt.

5.5. Korrelationsanalysen

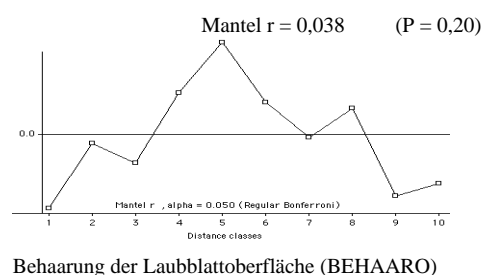
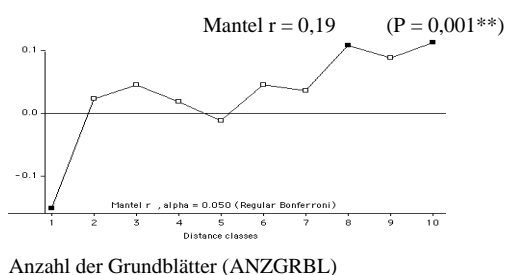
5.5.1. Korrelationsanalyse morphologischer und phylogenetischer Daten

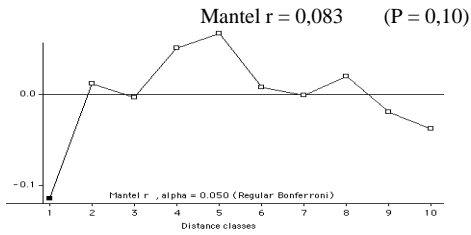
Die phylogenetische Divergenz von *P. occidentalis*, *P. aurea* und den Sippen des Artkomplexes spiegelt die Divergenz ihrer morphologischen Merkmale wider, darauf weisen die Ergebnisse des Manteltests eindeutig hin. Neunzehn der 24 getesteten Merkmale korrelieren signifikant und 10 sogar hoch signifikant mit der genetischen Distanz (siehe Abb. 17).

Das Merkmal „Anzahl der Blattzipfel an den Fiedern 3. Ordnung“ (ZIPFAN3S) zeigt mit 0,25 das höchste Mantel-r, ist also das morphologische Merkmal, welche die phylogenetischen Beziehungen der Sippen am deutlichsten repräsentiert. In der Laubblattmorphologie äußert sich die Verwandtschaft besonders stark. Die Merkmale FIED3B, ZIPFAN2M, BLST2M, BLST10M zeigen eine Häufung hoher Mantel-r-Werte (alle $\geq 0,2$). Die Anzahl der Narbenwindungen (NARWIND, Mantel $r = 0,22$) und die Anzahl der Grundblätter (ANZGRBL, Mantel $r = 0,19$) sind weitere Merkmale anderer Merkmalskomplexe, die eine Diagnose der Phylogenie ermöglichen.

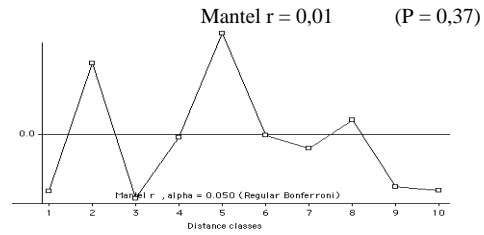
Die Behaarungsmerkmale und zahlreiche Eigenschaften der reproduktiven Organe, wie die Tepalenlänge, -breite und -anzahl, der Blütendurchmesser, die Narbenlänge und die Länge der Narbenhaare, besitzen geringe Mantel-r-Werte bzw. zeigen keine signifikante Korrelation zur Phylogenie.

Die Mantelkorrelogramme (ebenfalls Abb. 17) illustrieren die starke morphologische Ähnlichkeit zwischen nahverwandten Akzessionen für fast alle erhobenen Merkmale. Die Merkmale divergieren mit abnehmender Verwandtschaft (bis Distanzklassen 4 oder 5) fast ausschließlich sehr schnell. Über die Distanzklasse 5 hinaus lässt sich eine Korrelation von abnehmender Verwandtschaft und abnehmender Ähnlichkeit nur für die Merkmale ANZGRBL, NARWIND und sehr schwach für die Merkmale NARBENHL, BLST2M sowie BLST10S bestätigen.

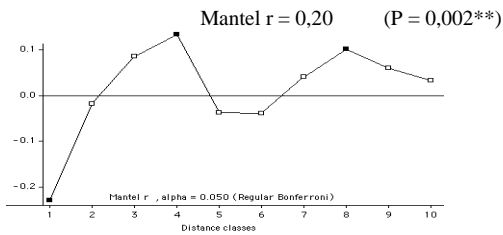




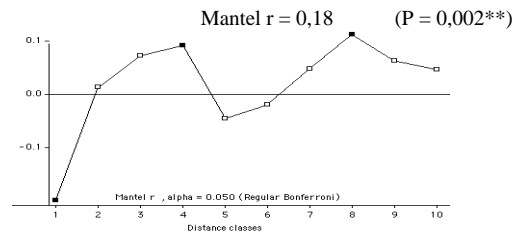
Behaarung des Laubblattes (BEHAARR)



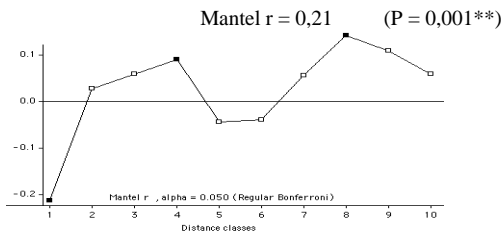
Behaarung der Laubblattunterseite (BEHAARU)



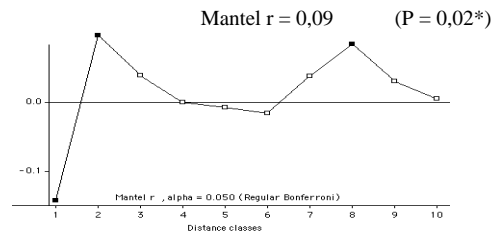
Fiederblattstiel 1. Ordnung Mitte (BLST10M)



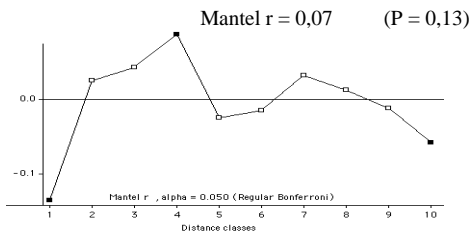
Fiederblattstiel 1. Ordnung seitlich (BLST10S)



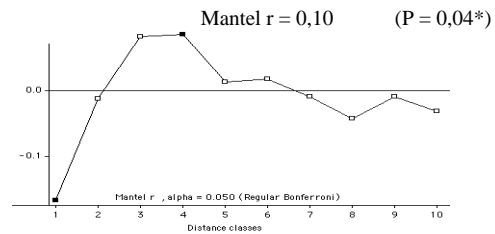
Fiederblattstiel 2. Ordnung Mitte (BLST2M)



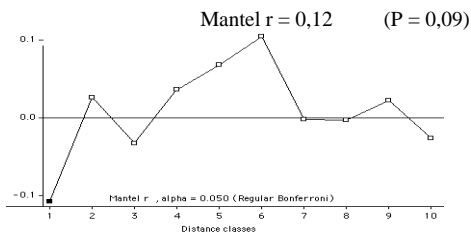
Fiederblattstiel 2. Ordnung seitlich (BLST2S)



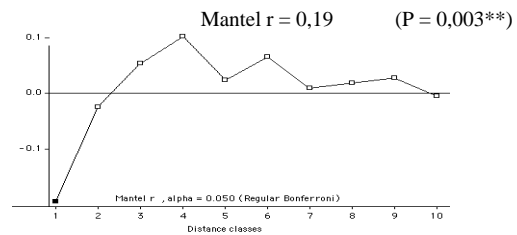
Blütenstiellänge zur Blütezeit (BLSTLBZ)



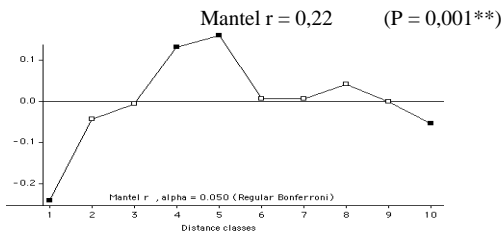
Blütendurchmesser (BLUETEN)



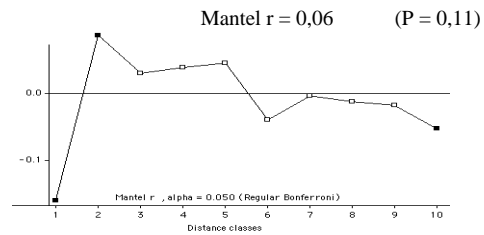
Breite der Blättfiedern 2. Ordnung (FIED2B)



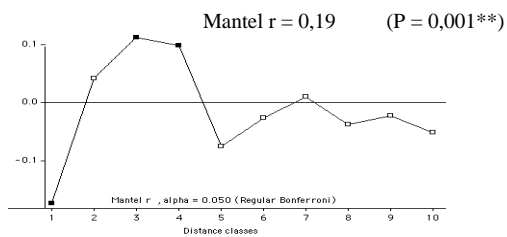
Länge der Blättfiedern 2. Ordnung (FIED2L)



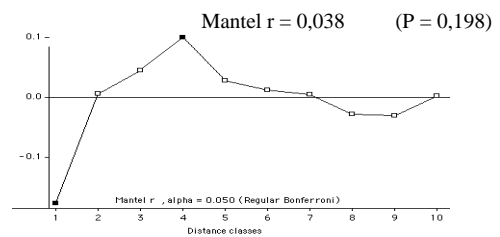
Breite der Blättfiedern 3. Ordnung (FIED3B)



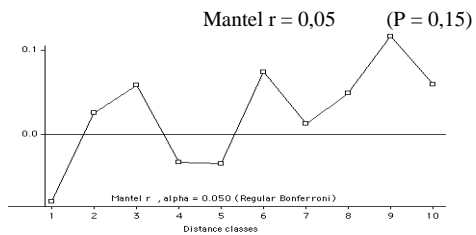
Länge der Blättfiedern 3. Ordnung (FIED3L)



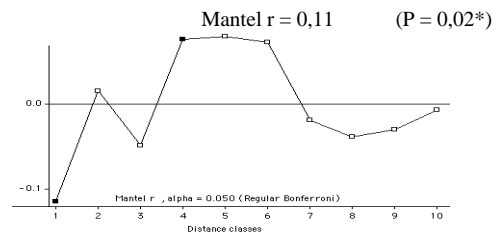
Insertionshöhe der Involukrallblätter (INSINVO)



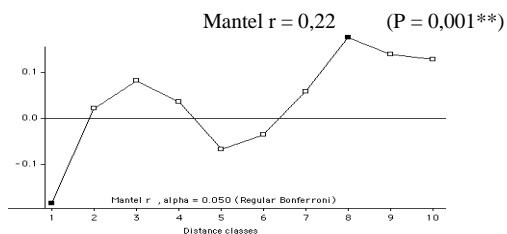
Blattstiellänge (LBLATTST)



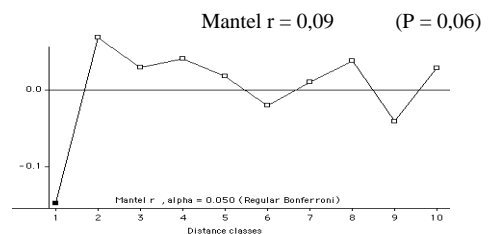
Länge der Narbenhaare (NARBENHL)



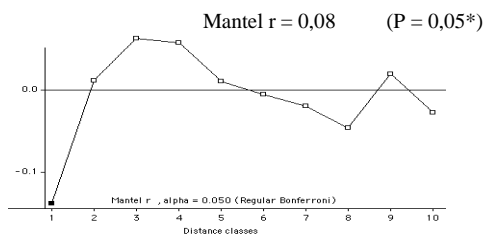
Narbenlänge zur Fruchtzeit (NARBENL)



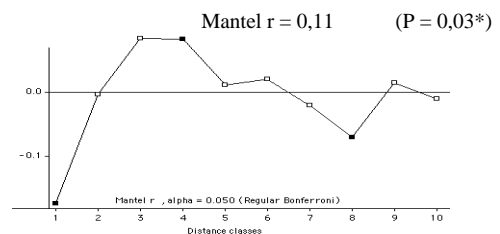
Anzahl der Narbenwindungen (NARWIND)



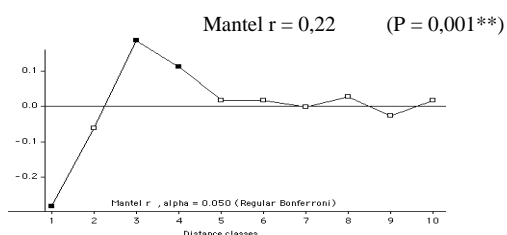
Tepalenzahl (TEPALENA)



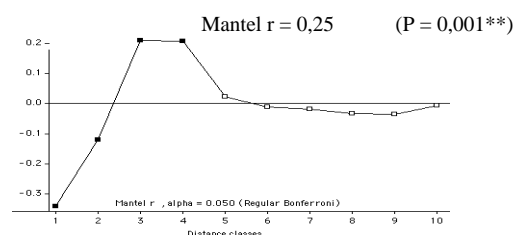
Tepalbreite (TEPALENB)



Tepallänge (TEPALENL)



Anzahl Fiederblattzipfel 2. Ordnung Mitte (ZIPFAN2M)



Anzahl Fiederblattzipfel 3. Ordnung seitl. (ZIPFAN3S)

Abb. 17 (S. 73 - 75): Manteltests und Mantelkorrelogramme der Distanz von 24 morphologischen Merkmalen in Abhängigkeit von der genetischen Distanz (Jukes-Cantor) der kombinierten ITS- und *trnL-trnF*-Sequenzen. In die Analyse wurden die Daten aller 67 Populationen von *Pulsatilla alpina*, *P. aurea* und *P. occidentalis* einbezogen. Oberhalb jedes Diagramms sind die Ergebnisse des Manteltests mit dem Mantel-r-Wert und die Wahrscheinlichkeit (P) angegeben, ob der beobachtete Wert von der Nullhypothese abweicht. Erhoben auf der Basis von 1000 Permutationen des Ausgangsdatensatzes (* signifikant mit $P \leq 0,05$, ** mit $P \leq 0,01$). Ausgefüllte Quadrate in den Mantelkorrelogrammen zeigen von Null abweichende Werte auf dem 0.05-Signifikanzniveau nach der *regular-Bonferroni*-Korrektur an.

5.5.2. Evolution morphologischer und ökologische Merkmale

Die Evolution der charakteristischen qualitativen Merkmale Blütenfarbe, Ausläuferbildung und kolbige Sammelfrucht wird durch ihre Projektion auf die Phylogenie auch ohne statistische Absicherung offensichtlich. Die weiße Blütenfarbe ist für alle *Preonanthus*-Arten ursprünglich und ebenfalls für die gemeinsamen Vorfahren aller Morphotypen des Artkomplexes wahrscheinlich. Die gelbe Blütenfarbe ist synapomorph und zweimal unabhängig mit der Herausbildung von *P. aurea* und des Morphotyps *apiifolia* entstanden. Charakteristisch und ein abgeleitetes Merkmal für den *Alpicola*-Clade ist die Fähigkeit der Bildung von Ausläufern. Eine kugelförmige Sammelfrucht ist unter Berücksichtigung der Außengruppen für die gesamte Sektion *Preonanthus* plesiomorph, die *P. occidentalis*-spezifische kolbige Sammelfrucht ist apomorph.

Die Variabilität der ausgewählten morphologischen Eigenschaften mit kontinuierlicher Merkmalsausprägung und starkem phylogenetischen Signal (ZIPFAN3S, FIED3B, ZIPFAN2M, BLST2M, NARWIND, ANZGRBL) unterscheidet sich zwischen den phylogenetischen Gruppen aller *Preonanthus*-Arten auffällig. Sie ist insgesamt innerhalb des *Alpicola*- und innerhalb des *Alpina*-Clades in allen Merkmalen sehr gering und sowohl innerhalb des *Apiifolia*- als auch innerhalb der höheren Cladeniveaus groß oder sehr groß (vgl. Tab. 12, oben).

Die Merkmalsrekonstruktion für die Vorfahren der einzelnen Clades, des Artkomplexes und der gesamten Sektion, basierend auf den Berechnungen mit der PGLS-Methode, sind in Tab. 12 (unten) zusammengefasst. Die Anzahl der Zipfel der Laubblattfiedern 3. Ordnung (ZIPFAN3S) wies für alle Vorfahren einen Mittelwert von 10 bis 13 auf. Neben einer allgemeinen Tendenz zur Erhöhung ist eine signifikante Absinken des Wertes für den *Alpicola*-Clade auf 3,25 bis 3,6 zu konstatieren. Fast parallel dazu evolvierte die Zipfelanzahl 2. Ordnung (ZIPFAN2M). Auch hier weicht der Wert für den *Alpicola*-Clade deutlich nach unten ab. (Einen vergleichbar niedrigen Wert hat nur *P. occidentalis*.) Die Vorfahren der heutigen Vertreter der Sektion hatten Fiederblättchen 3. Ordnung (FIED3B) mit einer Breite von 0,6 bis 0,7 cm. Eine auffällige Merkmalsveränderung tritt nur in den Akzessionen des *Apiifolia*-Clades (0,88 bis 1,45 cm) auf. Die Blättchenstiele 2. Ordnung (BLST2M) vergrößern sich mit der Radiation der Sektion *Preonanthus* von etwa 1 auf über 4 cm im *australalpina*-Morphotyp. Sie verkleinern sich sekundär im *Alpicola*-Clade wieder auf 1,16 bis 1,83 cm.

Die Anzahl der Narbenwindungen tendiert zu diskreten Werten (0,49; 1; 1,55; 2; 2,95; aber 0,37; 0,75; 1,65). Die Basiszahl eins für innereuropäischen Sippen zeigt eine Tendenz zur Erhöhung. Die Grundblattanzahl zeigt von *P. occidentalis* mit etwa 3, zu *P. aurea* mit 2 bis 3 und *P. alpina* mit meist 1 bis 2 eine Tendenz zur Reduktion.

Die ökologischen Merkmale Anpassung an Urgesteinsböden der subalpinen bis alpinen Vegetationsstufe und hoher Lichtbedarf sind gemäß der Phylogenie ursprünglich für die gesamte Sektion *Preonanthus* und für den gemeinsamen Clade der Arten *P. aurea* und *P. alpina* (vgl. Abb. 18).

Die Fähigkeit, auf kalkbeeinflussten Böden zu wachsen, ist demnach eine Synapomorphie für die Sippen des Artkomplexes. Sie ist sekundär, innerhalb des *Alpicola*-Clades und des *apiifolia*-Morphotyps, wieder verloren gegangen.

Eine erhöhte Schattentoleranz (Ellenbergsche Zeigerwerte 7 bis 8) findet man bei einigen Individuen der Populationen 2, 5, 9, 12, 18, 24, 26, 28, 38, 40 und 65 in unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen.

Eine erhöhte Toleranz gegenüber ruderalen subalpinen Standorten tritt einmalig innerhalb des *cottianaea*-Morphotyps auf (Akzession 11, Morphotyp *cottianaea*).

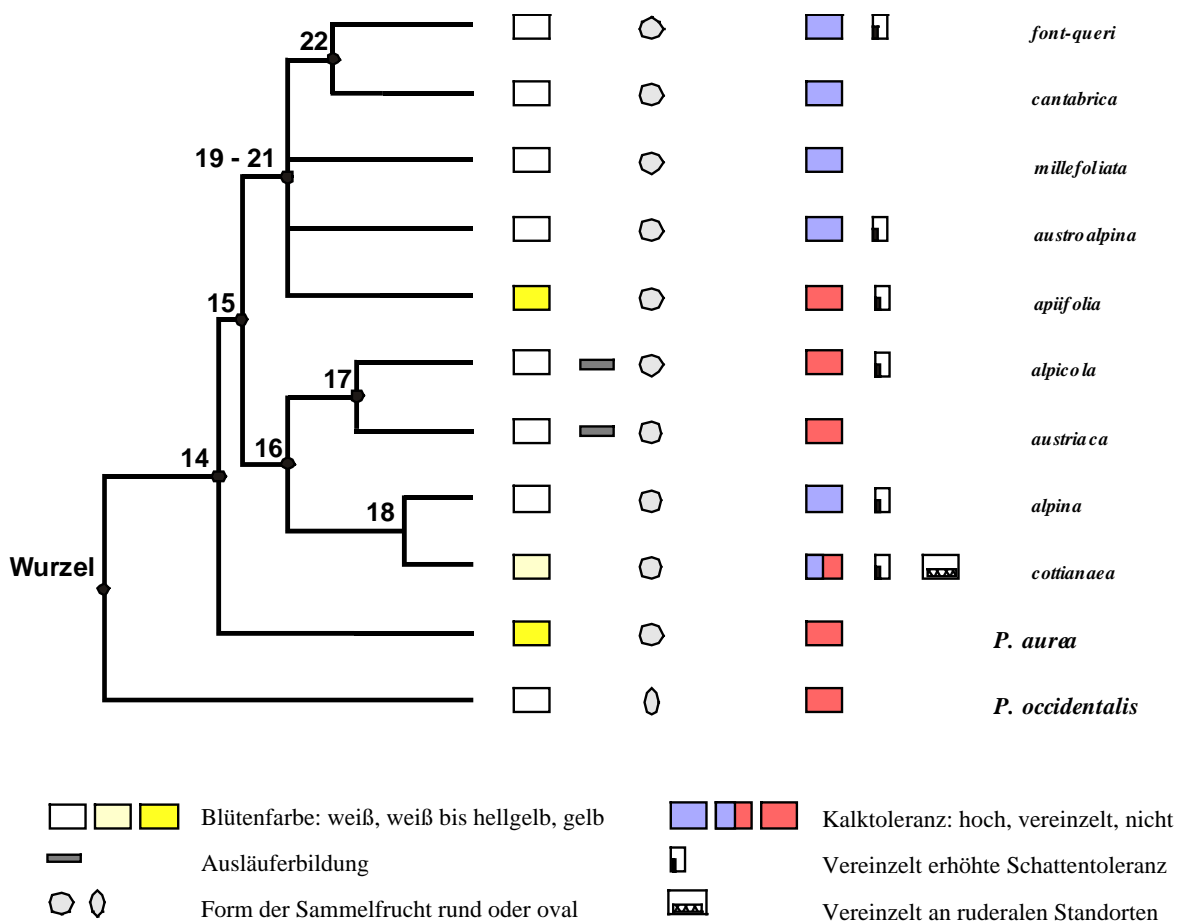


Abb. 18: Projektion qualitativer morphologischer und ökologischer Merkmale auf einen vereinfachten, vom kombinierten Datensatz abgeleiteten Stammbaum von *P. occidentalis*, *P. aurea* und den Morphotypen von *P. alpina* (ohne die Hybridsippen *montis-niveae* und *cyrnea*). Die Zahlen 14 bis 22 benennen die Knoten dieser Phylogenie.

Tab. 12: Ausprägung quantitativer Merkmale mit starkem phylogenetischem Signal (vgl. Kap. 5.5.1.) bei *P. occidentalis*, *P. aurea* und bei den Morphotypen von *P. alpina* (nach Moser 1996) im oberen Teil der Tabelle. Die Merkmalswerte für die hypothetischen Vorfahren der Sektion zum Zeitpunkt der Divergenz (Wurzel und Knoten 14 - 22, vgl. Abb. 18, Topologie) wurden mit Hilfe der PGLS-Methode unter Verwendung der Software Compare 4.5 rekonstruiert. Sie sind mit den Standardabweichungen im unteren Tabellenteil aufgeführt.

		Merkm.	ZIPFAN3S	FIED3B	ZIPFAN2M	BLST2M	BLST10M	NARWIND	ANGRBL
Knoten der Phylogenie	Art/Morphotyp/Clade								
	Clade								
	<i>P. occidentalis</i>	8,68	0,53	11,55	0,44	1,9	2,95	3,14	
	<i>P. aurea</i>	15,4	0,65	42	1,54	3,24	0,4	2,65	
	<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>font-queri</i>	10,75	0,94	33	2,31	4,38	1,55	2,55	
	<i>cantabrica</i>	13,95	1,31	16,15	2,45	5,25	1,65	1,15	
	<i>millefoliata</i>	13,05	0,88	32,2	2,67	4,41	2	2,85	
	<i>austroalpina</i>	9,8	1,01	21,2	4,38	6,89	0,15	1,00	
	<i>apiifolia</i>	8	1,45	17,05	3,43	5,6	0,9	1,00	
	<i>cyrnea</i>	6,3	1,04	23,45	2,86	5,27	0,55	2,30	
	<i>alpicola</i>	3,25	0,49	10,25	1,16	1,82	2	2,15	
	<i>austriaca</i>	3,6	0,59	11,8	1,83	3,69	2	2,05	
	<i>alpina</i>	13,85	0,49	25,8	2,16	4,43	1	1,00	
	<i>cottiana</i>	16,15	0,57	29,5	2,46	4,68	0,75	1,00	
Wurzel	Sektion <i>Preonanthus</i>	10,49 ± 3,84	0,59 ± 0,54	20,33 ± 8,76	1,03 ± 1,14	2,63 ± 0,80	2,11 ± 1,63	2,46 ± 1,06	
14	<i>P. alpina</i> - <i>P. aurea</i> -Clade	12,30 ± 3,05	0,66 ± 0,43	29,11 ± 6,97	1,63 ± 0,90	3,36 ± 0,64	1,27 ± 1,30	2,11 ± 0,94	
15	<i>P. alpina</i> -Clade	11,00 ± 3,57	0,73 ± 0,50	25,01 ± 8,16	2,30 ± 1,06	4,20 ± 0,75	1,21 ± 1,52	1,56 ± 0,85	
16	<i>Alpina</i> - <i>Alpicola</i> -Clade	9,98 ± 3,54	0,62 ± 0,50	21,77 ± 8,07	2,08 ± 1,05	3,89 ± 0,74	1,36 ± 1,50	1,60 ± 0,77	
17	<i>Alpicola</i> -Clade	5,61 ± 3,05	0,57 ± 0,43	14,61 ± 6,96	1,69 ± 0,90	3,13 ± 0,64	1,78 ± 1,30	2,07 ± 0,71	
18	<i>Alpina</i> -Clade	13,33 ± 3,05	0,56 ± 0,43	25,69 ± 6,96	2,23 ± 0,90	4,33 ± 0,64	1,03 ± 1,30	1,18 ± 0,51	
19		10,73 ± 3,30	0,91 ± 0,46	24,15 ± 7,54	3,21 ± 0,98	5,36 ± 0,69	1,00 ± 1,40	1,64 ± 0,92	
20	<i>Apiifolia</i> -Clade	11,38 ± 3,26	1,00 ± 0,46	26,24 ± 7,43	2,96 ± 0,97	4,98 ± 0,68	1,42 ± 1,39	1,95 ± 0,88	
21		10,35 ± 3,22	1,20 ± 0,45	22,38 ± 7,35	2,99 ± 0,95	5,17 ± 0,67	1,27 ± 1,37	1,52 ± 0,82	
22	<i>Font-queri</i> - <i>Cantabrica</i> -Clade	11,68 ± 3,01	1,15 ± 0,42	23,84 ± 6,87	2,58 ± 0,89	4,93 ± 0,63	1,49 ± 1,28	1,88 ± 0,75	

6. Diskussion

6.1. Die Sektion *Preonanthus* in der Gattung *Pulsatilla*

6.1.1. Revision der Sektionsgliederung, Monophylie der Sektion und nächste Verwandte

Die phylogenetische Analyse der Sequenzen der ITS-Region und des *trnL-trnF*-Spacers von einigen Vertretern der monophyletischen Gattung *Pulsatilla* (siehe Kap. 1.1.) zeigen, dass die Gliederung von Aichele & Schwegler (1957) in fünf Sektionen revisionsbedürftig ist. Die Daten rechtfertigen eine Unterteilung in drei Hauptclades: (i) *P. kostyczewii* (Sektion *Iostemon*), (ii) die echten Küchenschellen s.l. mit *P. chinensis* (Sektion *Semicampanaria*) und den Vertretern der Sektion *Pulsatilla*, sowie (iii) die „Alpenanemonen“ der Sektion *Preonanthus*.

Durch beide DNA-Marker wird bestätigt, dass diese drei Hauptclades der Gattung eine phylogenetisch alte Trennung aufweisen. Ob sich die Entfaltung der Gattung als adaptive Radiation ereignete und im Zusammenhang mit der auffällig veränderten Fruchtmorphologie stand, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Die Radiation der Gattung begann mit der Abtrennung der Vorfahren von *P. kostyczewii*. Die Differenzierung in die „Alpenanemonen“ und in deren nächste sichere Verwandte, die „echten Küchenschellen“ erfolgte darauf.

Bei den Arten der Sektion *Preonanthus* handelt es sich zweifellos um eine monophyletische Sippe. Sowohl die ITS- als auch die Chloroplastenphylogenie weisen unabhängig von den statistischen Rekonstruktionsmethoden mit hoher Sicherheit darauf hin. Diese Hypothese von Aichele & Schwegler (1957, vgl. Abb. 1) konnte damit bestätigt werden.

Auf der Basis des morphologischen Alleinstellungsmerkmals tutig verwachsene, grundblattähnliche, tief geteilte Involukralblätter und einiger weiterer primitiver Merkmale, wie ein nahezu radiärer Blattstiel, gelbe Staubblätter (beide zusammen mit der Sektion *Preonanthopsis*) und fehlende Nektarien (zusammen mit Sektion *Iostemon*) war die Annahme von Monophylie nicht zwingend. Auch die ökologischen Ansprüche an subalpine bis alpine Gebirgsstandorte, die die *Preonanthus*-Arten mit den Vertretern der Sektionen *Iostemon* und *Preonanthopsis* teilen, sind nach den phylogenetischen Daten ursprünglich. Damit müssen alle klassischen diagnostischen Merkmale als Plesiomorphien gedeutet werden.

Auf Grund der Chloroplastendaten des *trnL-trnF*-Fragments lf2 ist für *P. taraoi* (Sektion *Preonanthopsis*) eine basale Abspaltung innerhalb der Gattung *Pulsatilla* und eine enge Verwandtschaft mit den echten Küchenschellen (Sektion *Pulsatilla* und *Semicampanaria*) sowie der Sektion *Preonanthus* wahrscheinlich. Da die ITS-Abschnitte und das lf1-Fragment der untersuchten

Herbarproben nicht erfolgreich amplifiziert und sequenziert werden konnten, ist eine sichere Einordnung von *P. taraoi* noch nicht möglich.

Die endemische, auf den Pamir beschränkte Art *P. kostyczewii* zeigt eine sehr hohe Anzahl autapomorpher Merkmale sowohl im ITS als auch im Chloroplasten. Da sich die Art weder in ihrem Reproduktionszyklus noch in ihren ökologischen Ansprüchen von den anderen Arten der Gattung wesentlich unterscheidet, können die Mutationen nur in Folge starker genetischer Drift fixiert worden sein. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Sippe schon seit langer Zeit reproduktiv isoliert ist und über diesen Zeitraum eine vergleichsweise geringe effektive Populationsgröße aufwies. Entgegen der Ausgangshypothese gehört die Art innerhalb der Gattung nicht zu den nächsten, sondern zu den entferntesten Verwandten der Arten der Sektion *Preonanthus*.

6.1.2. Asiatischer Ursprung und Zeitraum der Abspaltung

Von Vertretern der Gattung *Pulsatilla* sind bislang keine Makrofossilien bekannt. Historischer *Pulsatilla*-Pollen, der sicher in zahlreichen Aufsammlungen enthalten ist, konnte bislang nicht eindeutig vom allgemeinen Ranunculaceae-Typ differenziert werden. Für die Eingrenzung des Entstehungsgebietes ist man deshalb auf Indizien angewiesen.

Das Diversitätszentrum der Gattung *Anemone* liegt heute auf der Nordhemisphäre, wobei die zu *Pulsatilla* basalen Clades (Subgenus *Anemonidium*, Sektion *Anemospermos*) ihren Schwerpunkt in Asien haben (Hoot & al. 1994, Ehrendorfer & Samuel 2000). Zum anderen verdeutlicht die Korrelation von ökologischen Merkmalen und der Phylogenie die Ursprünglichkeit der Anpassung an Gebirgsstandorte innerhalb der Gattung (siehe oben).

Sehr aufschlussreich bei der Frage nach dem Ursprung der Gattung ist die Analyse des langsam evolvierenden, homoplasiearmen *trnL-trnF*-Fragments lf2. Sie lässt sich als Tiefenrekonstruktion der Chloroplastenphylogenie auffassen (vgl. Abb. 10 und 11). Im Vergleich zur Außengruppe ist der Haplotyp der Art *P. taraoi* (TAR) am ursprünglichsten. Einen Mutationsschritt entfernt bildet PIC den Basishaplotyp (= BHT) aller weiteren *Pulsatilla*-Chloroplasten. Von ihm sollten sich sowohl der Haplotyp von *P. kostyczewii* (KOS) als auch die Haplotypen PRA, VER und CHI der Vertreter der echten Küchenschellen (Sektionen *Pulsatilla* und *Semicampanaria*) ableiten. Die heutigen Sippen der Gattung *Pulsatilla* haben ihre basalen Haplotypen (TAR, PIC) und damit ihre Vorfahren in den asiatischen Gebirgen und wurden von dort direkt nach Europa ausgebreitet.

Seit dem mittleren Miozän, also seit der Entstehung der Gattung, hat es in den zentralasiatischen Gebirgen ununterbrochen Standorte gegeben, die den heutigen in der alpinen und subalpinen Stufe entsprechen (Stanley 2001). Aus diesem Grund muss keine Abweichung von der Regel der relativen standörtliche Konstanz angenommen werden. Die Vorfahren der Sektion *Preonanthus* sollten ihre ökologischen Präferenzen zwischenzeitlich auch nicht verändert haben.

Die klimatischen und chorologischen Erwartungen, die man an ein potentielles Entstehungsgebiet stellen muss, sind somit ebenfalls erfüllt. Sie hätten das potentielle Entstehungsgebiet „asiatische Gebirge“ sonst stark in Frage gestellt.

Nach den Ergebnissen der molekularen Datierung haben sich die ersten Vorläufer der Gattung *Pulsatilla* im Miozän etwa vor 20 Ma von *Anemone antucensis* getrennt. Auf der Grundlage der Chloroplasten-Daten von Hoot & al. (1994) lässt sich für die heute himalayisch verbreitete *A. vitifolia*- und *A. rivularis*-Gruppe eine Divergenzzeit von 15 bis 20 Ma schätzen. Beide Gruppen sind mit der Gattung *Pulsatilla* noch näher verwandt als *A. antucensis*. Die Trennung vom südhemisphärischen Schwesterclade (*Knowltonia*, *A. caffra*-Gruppe, *A. crassifolia*-Gruppe), und der bislang molekular nicht untersuchten, morphologisch ähnlichsten Gattung *Miyakea*, die auf Sachalin endemisch ist, sollte vor zirka 10 bis 15 Ma erfolgt sein. Die Radiation der letzten gemeinsamen Vorfahren der rezenten Vertreter der Gattung begann vor etwa 9 Ma mit der Abspaltung von *P. kostyczewii*.

Für die letzten gemeinsamen Vorfahren der echten Küchenschellen und der Alpenanemonen wurde der molekularen Datierung zu Folge ein Alter von 7,5 Ma bestimmt. Die Phylogenie zeigt eine zeitlich direkt aufeinander folgende Divergenz der Akzessionen der echten Küchenschellen, die zeitlich sehr gut mit der Abkühlung und größeren Trockenheit im Miozän, also der Ausweitung der temperaten Steppen in Eurasien korreliert. Sie hatte in einer Vielzahl von Verwandtschaftskreisen zum Auftreten neuer Sippen geführt (Babcock 1947). Die echten Küchenschellen besetzten eine für *Pulsatilla*-Arten neue ökologische Nische. Die Daten suggerieren damit eine adaptive Radiation dieser Sippe.

6.2. Phylogenie und Alter der Sektion *Preonanthus*

6.2.1. Phylogenie und Divergenz der Sippen der Sektion *Preonanthus*

Die Analysen der kombinierten Sequenzdaten der ITS-Region und des *trnL-trnF*-Spacers der Arten der Sektion *Preonanthus* zeigen übereinstimmend eine Differenzierung in deutlich voneinander getrennte Gruppen.

Die neuweltlichen *P. occidentalis*-Vorkommen (Rocky Mountains) einerseits und alle übrigen, altweltlichen Sippen andererseits stellen Schwesterngruppen dar. Gemäß der auf der ITS-Divergenz basierenden Datierung lebten die letzten gemeinsamen Vorfahren der Sektion *Preonanthus* im Pliozän vor 5,6 ($\pm 1,1$) Ma. Die *P. aurea*-Vorkommen aus dem Westkaukasus sind genetisch von den europäischen *P. alpina*-Sippen abgegrenzt. Die Aufspaltung zwischen beiden Schwesterarten erfolgte

vor etwa 1,9 (\pm 0,4) Ma und stand zeitlich in engem Zusammenhang mit der Klimaabkühlung an der Pliozän-Pleistozängrenze. Wahrscheinlich war ein schrittweises Überwinden der mediterranen Region (Türkei, Balkan) erst seit dieser Zeit möglich. Die Ausbreitung der gemeinsamen Vorfahren des Artkomplexes *P. alpina* in die zentraleuropäischen Gebirge begann ebenfalls in dieser Zeit.

Innerhalb des monophyletischen Artkomplexes *P. alpina* findet man drei Hauptcluster, die durch beide Marker und die alternativen Rekonstruktionsmethoden MP und NJ gestützt werden und deren phylogenetische Beziehungen gut aufgelöst werden können (vgl. Abb. 15).

Der *Alpicola*-Clade umfasst die Vertreter der Morphotypen *alpicola*, *austriaca* und *montis-niveae* p.p. Die Individuen des Clades tragen fast ausschließlich Chloroplasten der eigenständigen PIC-Haplotypengruppe. Die ITS-Sequenzen sind bis auf wenige Ausnahmen über das gesamte Areal identisch und weisen eine sehr geringe Zahl synapomorpher Merkmale auf. Der Zeitpunkt der Abspaltung der *Alpicola*-Gruppe von allen anderen *P. alpina*-Sippen wurde auf etwa 1,4 (\pm 0,3) Ma datiert. Er markiert auch den Zeitpunkt für den Beginn der europäischen Radiation.

Der monophyletische *Alpina*-Clade umfasst fast ausschließlich die Populationen des Morphotyps *alpina*. Die Akzessionen des Clades zeigen sowohl in ihren Chloroplasten als auch im ITS synapomorphe Merkmale. Vom ersten Auftreten bis zur Herausbildung der ersten modernen Linien des *Alpina*-Clades ist ein Zeitraum von 1,4 bis 0,4 Ma vor heute anzunehmen.

Nach der kombinierten und der *trnL-trnF*-Topologie stammen der *Alpina*-Clade und der *Alpicola*-Clade von gemeinsamen Vorfahren ab. Alternativ, gemäß der ITS-Topologie, ist der heutige *Alpicola*-Clade direkt von den Vorfahren der ersten innereuropäischen Populationen und der *Alpina*-Clade direkt von den rezenten Basisakzessionen der Polytomie (siehe Kap. 5.2.3.) abgeleitet. Wegen der unterschiedlichen Vererbung der Marker bzw. der alternativen Genbäume des Speziesbaumes resultiert daraus aber kein biologischer Widerspruch. Im Gegenteil, dieser Widerspruch lässt sich v.a. unter Berücksichtigung der geringen Zeiträume als *ad hoc*-Argument für ein Radiationsereignis anführen.

Zum morphologisch hochvariablen *Apiifolia*-Clade sind die Vertreter der Morphotypen *apiifolia*, *millefoliata*, *cyrnea*, *font-queri*, *cottiana*, *austroalpina*, *cantabrica* und *montis-niveae* p.p. zu zählen. Auch dieser Clade wird durch die in ihm auftretenden Chloroplasten besonders gut definiert. Er stammt demnach direkt von den Vorfahren der ersten innereuropäischen Populationen ab, auch wenn nach der ITS-Topologie eine Entwicklung aus frühen *Alpicola*-Populationen nicht auszuschließen ist. Ein Alter von 1,4 Ma für das Auftreten der ersten Individuen und von 1,4 bis 0,4 Ma für die Herausbildung der modernen Linien wurde auch für den *Apiifolia*-Clade berechnet.

6.2.2. Sicherheit und Methodenkritik der Datierung

Wie die Ergebnisse des Methodenvergleichs zeigen (Kap. 5.4.2.), wird die Abhängigkeit der Qualität der molekularen Datierung von der Datierungsmethode vermutlich überschätzt.

Die statistische Unsicherheit der Topologie, auf deren Grundlage die Alter der Knoten berechnet werden, wird durch keine der eingesetzten Methoden berücksichtigt. Die Altersberechnung von phylogenetisch jungen Knoten ist, wegen der geringen Anzahl der sie determinierenden Substitutionen, fragwürdig (Britton & al. 2002).

Die Datierungsgüte hängt wesentlich von der Genauigkeit der Bestimmung des Fossilienalters ab. Der Einfluss bislang noch nicht gefundener Fossilien, die das Maximalalter einer Gattung und damit einer Verzweigung verändern könnten, ist moderat. Eine Variation des Maximalalters (siehe Abb. 19) ergibt, dass sich das geschätzte Divergenzalter um nahezu dieselbe Prozentzahl ändert. Die wiederholte PL-Kalkulation unter Erhöhung der Anzahl der eingesetzten Fossilien (siehe Abb. 20) zeigt für den vorliegenden Datensatz, dass (i) die Standardabweichung der Zeitschätzung kaum von der Anzahl der eingesetzten Fossilien abhängig ist, dass aber (ii) die Sicherheit der Datierung mit einer erhöhten Anzahl unabhängiger Fossilien erheblich verbessert werden kann. Da für die vorliegende Datierung vier Fossilien verwendet wurden, sollten die Ergebnisse im Vergleich zu anderen Arbeiten von relativ hoher Qualität sein.

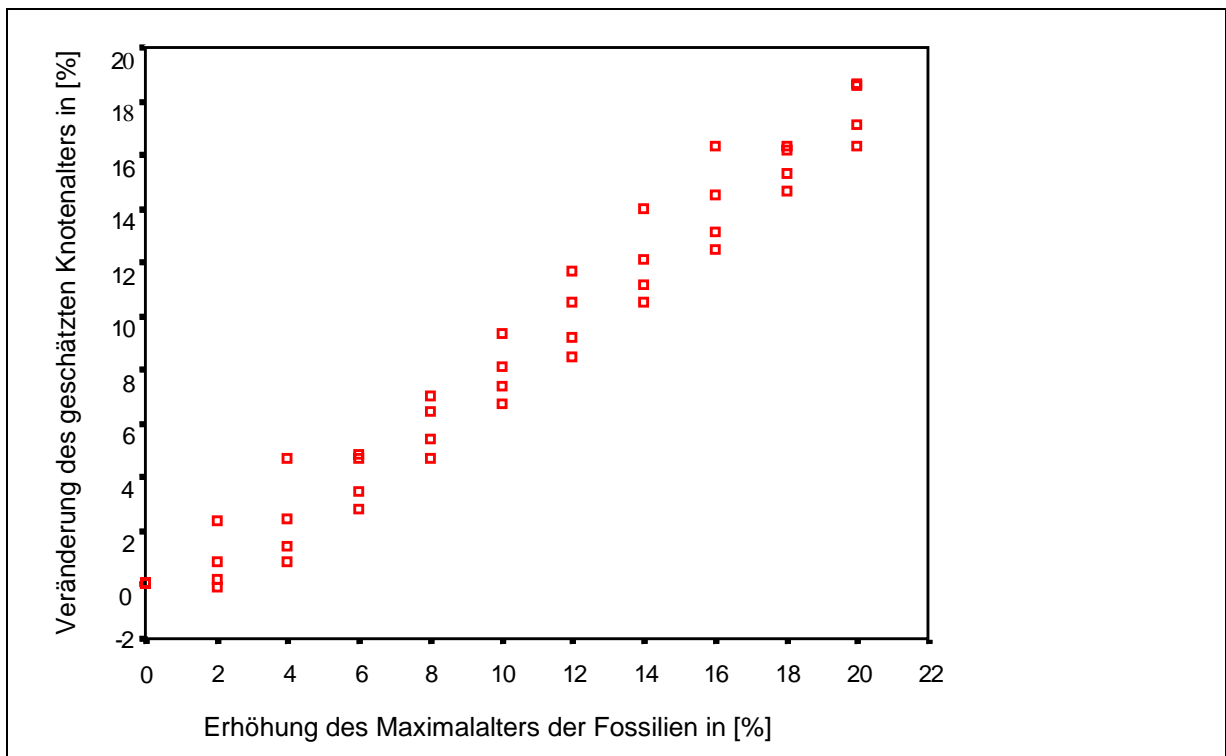


Abb. 19: Abhängigkeit des geschätzten Divergenzalters der Knoten innerhalb der Gattung *Pulsatilla*, insbesondere in der Sektion *Preonanthus*, vom Maximalalter der zur Kalibrierung verwendeten Fossilien bei Verwendung der Glättungsmethode Penalized Likelihood.

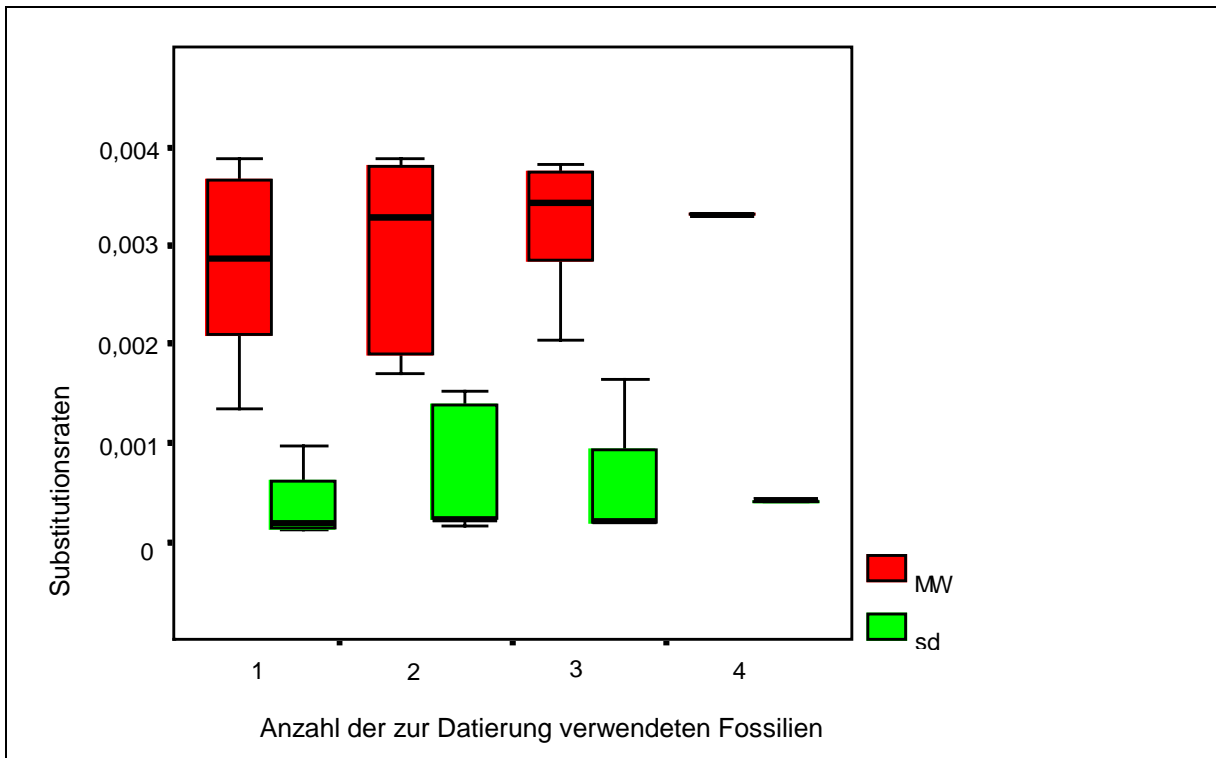


Abb. 20: Variation der mittleren Substitutionsraten (MW, rot) und ihrer Standardabweichungen (sd, grün) in Abhängigkeit der Anzahl der zur Datierung eingesetzten Fossilien. Als Glättungsverfahren wurde die Methode Penalized Likelihood verwendet.

6.3. Die Evolution der molekularen und morphologischen Merkmale des Artkomplexes

6.3.1. Die Evolution des cp-Spacers *trnL-trnF* und des Kern-DNA-Spacers ITS

Der *trnL-trnF*-Spacer des *P. alpina*-Artkomplexes weist ein überraschend hohes Verhältnis von Indels zu SNPs und einen sehr langen, extrem variablen repetitiven DNA-Abschnitt auf. Nach Palmer (1988) sind repetitive Sequenzen von mehr als 50 bp im Chloroplastengenom von Gefäßpflanzen selten. Eine weitere Besonderheit, auf die in der Literatur bislang nicht hingewiesen wurde, ist das nahezu ausschließliche Auftreten von Duplikationen als Duplikation direkt angrenzender Nachbarsequenzen (vgl. Kelchner 2000). Die Analyse des Datensatzes zeigt auch, dass diese Duplikationen in phylogenetisch kurzer Zeit wieder verloren gehen können. Es ist nicht zu erwarten, dass die Evolution des Chloroplasten-Spacers von *P. alpina*, bzw. unter Berücksichtigung des *lf2*-Fragments der Gattung überhaupt, wesentlich anders verläuft als die anderer Gefäßpflanzenarten. Der Artkomplex wurde im Gegensatz zu vergleichbaren Studien vom Populationsniveau an vollständig besammelt, und nahezu alle verbindenden Mutationsschritte zwischen den einzelnen Linien sind vorhanden. Die Ergebnisse deuten deshalb darauf hin, dass Duplikationen und Deletionen dieses Mutationsmusters bislang unterschätzt werden.

Eine Anregung zur Korrektur des *slipped-strand-mispairing*-Modells (Levinson & Gutman 1987, Ellegren 2000) ergibt sich aus der repetitiven Sequenz und den Mikrosatelliten des *trnL-trnF*-Spacers. Ihre Verlängerung ist eine Folge von Duplikationen der Nachbarsequenzen. Das bedeutet, dass eine größere Längenänderung eines Mikrosatelliten nicht schrittweise, durch Verdopplung einer Wiederholungseinheit (*short repeat*) erfolgen muss, sondern auch durch eine Duplikation mehrerer Wiederholungen verursacht werden kann. Analog kann eine starke Verkürzung eines Mikrosatelliten durch eine einzige Deletion bewirkt werden. Weil die Längenveränderungen ungerichtet verlaufen, bedeutet das für die phylogenetische Interpretation von Mikrosatellitendaten, dass nur eine identische Anzahl von Wiederholungen eine verwandtschaftliche Beziehung anzeigt, nicht jedoch eine ähnliche Anzahl (vgl. Tab. A4 und A5, Alignments der *trnL-trnF*-Fragmente).

Zwei zusätzliche Effekte, auf die bereits Ellegren (2000, 2002) hinwies, konnten im If1-Datensatz ebenfalls beobachtet werden. Repetitive Sequenzen können durch Punktmutationen evolutiv stabilisiert werden. Tritt eine Basenänderung auf, die die Wiederholungseinheiten unterbricht, wird eine Fehlpaarung zwischen ihnen erschwert bzw. sehr unwahrscheinlich. Die Evolutionsrate des Mikrosatelliten sinkt dann stark ab. Durch eine „reinigende“ Deletion kann die Punktmutation wieder entfernt werden. Damit wird erneut ein reguläres Mikrosatellitenmuster erzeugt, das sich durch eine auffällig erhöhte Evolutionsrate auszeichnet.

Für die ITS-Region des *P. alpina*-Artkomplexes waren ausschließlich Einzelbasenmutationen detektiert worden. Sie haben in ihrer Mehrzahl eine begrenzte lokale oder regionale Verbreitung. Bei einzelnen Individuen, insgesamt aber regelmäßig, treten die alternativen SNPs an einem Locus polymorph auf. Sie sind grundsätzlich im Überschneidungsbereich der einzelnen SNP-Verbreitungsgebiete zu finden. Die ITS-Evolution des Artkomplexes kann damit als Fallbeispiel für eine lokale Entstehung, Fixierung und regional begrenzte Ausbreitung von Mutationen sowie für die Rekombination von Allelen an den Verbreitungsgrenzen von Metapopulationen angesehen werden. Alternative Szenarien würden z.B. der Rekombination verschiedener Allele, ihrer Ausbreitung über das gesamte Areal oder der räumlichen Isolation von ehemals stark von Rekombination beeinflussten Allelen den Vorrang geben.

Innerhalb des Artkomplexes kommen vier SNPs (ITS-Position 98, 162, 371 und 421) vor, die sowohl geographisch weitverbreitet sind, als auch in phylogenetisch nicht direkt verwandten Sippen auftreten. Es liegt nahe, dass es sich dabei um alte Polymorphismen handelt. Die Unsicherheit der Auflösung der basalen Verzweigung der ITS-Phylogenie geht hauptsächlich auf diese vier Loci zurück, weil sie jeweils verschiedene ITS-Clades miteinander verbinden (siehe Abb. 21). Das außergewöhnliche Auftreten des Cytosins an der ITS-Position 91 verbindet die Baldopopulation 19 mit den untersuchten Individuen von *P. occidentalis*. Eine Parallelmutation erscheint in diesem Fall wahrscheinlicher als eine unvollständige Homogenisierung seltener, im Genom persistierender ITS-Sequenzen. Eine Entscheidung kann auf der Grundlage der vorhandenen Daten aber nicht gefällt werden.

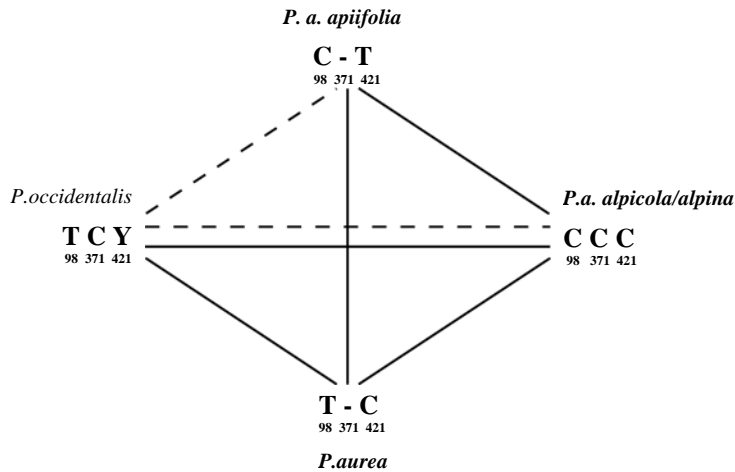


Abb. 21: Das Vorkommen der Nucleotide der ITS-Positionen 98, 371 und 421 in den verschiedenen Clades der Sektion *Preonanthus* zeigt widersprüchliche verwandtschaftliche Beziehungen an und erschwert die Rekonstruktion der basalen Verzweigung dieser Clades. Das ITS-Nucleotid 162 (hier nicht dargestellt) verbindet *P. occidentalis* mit den Populationen 12, 19, 20, 21, und 45 aus den Südalpen. Wegen ihrer phylogeographischen Verteilungsmuster werden die Polymorphismen als alte Polymorphismen interpretiert.

6.3.2. Die Evolution morphologischer und ökologischer Merkmale

Phylogenien auf der Grundlage nichtcodierender DNA bilden eine unabhängige Informationsquelle, die geeignet ist, die Evolution anderer, z. B. morphologischer oder ökologischer Merkmale zu bewerten. Damit werden Zirkelschlüsse verhindert, die z. B. bei der Abbildung morphologischer Merkmale auf Phylogenien entstehen können, die selbst auf morphologischen Merkmalen basieren. Gemäß der Korrelationsanalyse sind die Mehrzahl der kontinuierlichen morphologischen Merkmale, vor allem die des Laubblattes, die Anzahl der Grundblätter und die Anzahl der Narbenwindungen phylogenetisch informativ (vgl. Abb. 17). Einzelne Merkmalsausprägungen sind charakteristisch für bestimmte phylogenetische Sippen unterschiedlicher hierarchischer Stufen, teilweise treten sie aber in gleicher Ausprägung auch in nicht direkt verwandten Gruppen auf. Die früher beschriebenen Morphotypen sind damit zweierlei: (i) phylogenetische Sippen und (ii) Individuengruppen mit zufällig kombinierten Merkmalsausprägungen. Die Divergenz der Merkmale verläuft sehr schnell, wesentlich schneller als die Artbildung. Morphologische Ähnlichkeit über das Hauptcladeniveau hinaus und besonders zwischen den drei Arten der Sektion *Preonanthus* muss nach den Daten mehrheitlich als homoplastisch, d.h. als Konvergenz aufgefasst werden. Die Analyse der Mantelkorrelogramme zeigt damit die Probleme der morphologischen Sippenabgrenzung. Mit einer Kombination von morphologischen Merkmalen können die phylogenetische Sippen sehr gut beschrieben werden. Sehr große, intraspezifische morphologische Ähnlichkeit zwischen verschiedenen Sippen zeigt im großen und Ganzen auch eine phylogenetische Verwandtschaft an. Aber bei einzelnen Merkmalen und mit

abnehmender Verwandtschaft, in der Sektion *Preonanthus* etwas unterhalb des Art-niveaus, wird der Rückschluss vom quantitativen morphologischen Merkmal zur Phylogenie spekulativ.

Die Evolution der einzelnen Morphogene scheint mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und weitgehend ungekoppelt zu erfolgen, wie aus der Abbildung der Merkmale auf die rekonstruierte Phylogenie geschlussfolgert werden kann. Das gilt insgesamt auch für die Gene, die die Laubblattmorphologie steuern. Die hohen Standardabweichungen bei der Berechnung der Merkmalsausprägungen der Vorfahren zeigen, dass die Rekonstruktion nur eine grobe Schätzung der historischen Verhältnisse ist (vgl. Tab. 12).

Einzelne qualitative synapomorphe Merkmale, die jeweils eine Sippe charakterisieren, sind die walzenförmige Sammelfrucht der *P. occidentalis*, die Bildung von Ausläufern im *Alpicola*-Clade und der triporate Pollen des Morphotyps *cottianaea*. Die gelbe Blütenfarbe von *P. aurea* und des *P. alpina* Morphotyps *apiifolia*, die nach der Auffassung von Aichele & Schwegler durch unterschiedliche Farbstoffe verursacht wird, ist zweimal unabhängig voneinander entstanden. Die Färbung entwickelte sich beim *apiifolia*-Morphotyp parallel zur sekundären Einnischung auf silikatischen Böden. An *apiifolia*-Standorten (v.a. subalpinen Bergwiesen und Matten) scheinen Arten mit gelber Blütenfarbe generell häufiger zu sein. Auffällige Unterschiede im Blütenbesucherspektrum, auf die das eventuell zurückzuführen wäre, konnten aber nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zur weißen Blütenfarbe treten gelbe Blüten nur auf Silikatböden auf. Ob es sich dabei um gekoppelte Merkmale oder um eine zufällige Korrelation handelt, kann hier nicht entschieden werden.

Die Laubblattmorphologie ändert sich evolutionsgeschichtlich sehr schnell. Die Merkmale Anzahl der Fiederblättchenzipfel 2. und 3. Ordnung, Breite der Fiederblättchen 3. Ordnung und Blättchenstiel 2. Ordnung (ZIPFAN3S, ZIPFAN2M, FIED3B und BLST2M) eignen sich trotzdem besonders gut als diagnostische Marker für die Phylogenie. Insgesamt lässt sich ein ursprünglicher, feingliederter Laubblatttyp (*P. occidentalis*, *P. aurea*, *Alpina*-Clade und *Apiifolia*-Clade p.p.) von einem abgeleiteten, sehr stark gegliederten (*Alpicola*-Clade) und einem abgeleiteten, wenig gegliederten, großflächigen Laubblatttyp (*Apiifolia*-Clade p.p.) gut abgrenzen.

Die Anzahl der Narbenwindungen ändert sich ebenfalls vergleichsweise schnell und tendiert zur diskreten Merkmalsausprägung (Vielfache von 0,5). Durch welche Mechanismen die sippenspezifischen und damit mutativen Unterschiede über regulatorischen Sequenzen oder über die beteiligten Gene sprunghafte Eigenschaftsänderungen bewirken, könnte hier nur Gegenstand der Spekulation sein.

Die Grundblattzahl ist entwicklungsgeschichtlich konservativer. Sie ist auch innerhalb der Sippen vergleichsweise wenig variabel. Es kann deshalb vermutet werden, dass sie genetisch strenger reguliert wird bzw. dass auftretende Mutationen einem stärkeren selektiven Druck unterliegen. Die Grundblattzahl bildet die intraspezifische Verwandtschaft der gesamten Sektion *Preonanthus* besser ab als alle anderen erhobenen morphologischen Merkmale.

Ein schwaches oder kein phylogenetisches Signal zeigen die Form und die Anzahl der Blütenblätter, die relative Lage der Blütenorgane und erwartungsgemäß die Intensität der Behaarung. Sie sind als diagnostische Merkmale für die Phylogenie ungeeignet. Auf der Grundlage der vorliegenden Daten kann nicht entschieden werden, ob die Ursache dafür in der Variabilität oder Plastizität der Merkmale liegt.

Die Anpassung an Kalkgestein ist mindestens einmal zeitlich parallel oder kurz vor der Radiation der europäischen Sippen entstanden. Da in allen Kalkgesteinssippen auch Populationen vorkommen, die auf silikatischen Böden wachsen, handelt es sich streng genommen nicht um eine feste Bindung an kalkbeeinflusste Böden, sondern um eine Toleranz gegenüber solchen Standorten. Eine Toleranz gegenüber kalkbeeinflussten Böden ist reziprok bei den Silikatsippen nicht zu beobachten. Beides wird auch durch die Kultivierungsexperimente von Moser (1996) bestätigt. Die Fähigkeit, auf Kalkböden zu wachsen, ist wenigstens zweimal, innerhalb des *Apiifolia*- und *Alpicola*-Clades, wieder verloren gegangen.

Charakteristisch für *P. occidentalis*, *P. aurea* und den gesamten Artkomplex sind vollsonnige Standorte der subalpinen bis alpinen Vegetationszone mit einem Wert von 8 bis 9 nach der Ellenberg'schen Zeigerwertskala (vgl. Ellenberg & al. 1992, Ellenberg 1996). Eine erhöhte Schattentoleranz tritt in mehreren phylogenetisch nicht verbundenen Populationen auf und ist wahrscheinlich eher Ausdruck der Plastizität der Sippe als einer mehrfach parallel entstandenen mutativen Veränderung. Abweichend davon wachsen alle Individuen der *montis-niveae*-Population 26 (Zeigerwert 6-7) nur in den Säumen von hochmontanen Buchenwäldern. Sie unterscheiden sich auch durch ihre großen, ledrigen, grob gegliederten Laubblätter, die hier als adaptiv angesehen werden, von allen anderen Sippen.

6.3.3. Merkmale der frühen europäischen Populationen

Die frühe Trennung und phylogenetisch abgeleitete Stellung von *P. occidentalis* und die wesentlich später erfolgte Abspaltung von *P. aurea* sowie des *Alpina*-Clades wurde bereits im Kap. 6.2.1. besprochen. Aus der ITS-Phylogenie und den ITS-Sequenzdaten geht hervor, dass noch heute Individuen mit ursprünglichen Merkmalen vorkommen, die denen der ersten *P. alpina*-Migranten in Europa entsprechen. Deren ITS muss dem ITS von *P. aurea*, des *Alpicola*-ITS-Clades und der Basisakzessionen der *P. alpina*-Polytomie (siehe Kap. 5.2.3.) sehr ähnlich gewesen sein.

Die ersten europäischen *P. alpina*-Individuen hatten zweifellos den lf2-Haplotyp *PIC*, so wie er heute bei *P. aurea*, den Morphotypen *alpicola* und *austriaca* und den Populationen 44, 17, 24, 27 und 28 auftritt.

Die Sequenz des lf1-Fragments zeigt in allen heutigen Akzessionen apomorphe Merkmale. Die frühen Europapopulationen müssen einen Chloroplasten gehabt haben, der dem BHT der *API*-Gruppe 16 nahe stand, weil die lf1-Sequenzen der *API*- und des *AUR*-Chloroplasten die plesiomorphe Sequenz TTAATTAAATTATAAAT enthalten, die den lf1-Sequenzen aller *ALP*- und fast aller *PIC*-Chloroplasten fehlt. Als *missing link* zwischen den lf1-*PIC*-Chloroplasten und den *API*-Chloroplasten kann der Haplotyp *API-cors* aufgefasst werden, der neben einer 16er lf1-Sequenz eine *PIC*-lf2-Sequenz aufweist. Die Individuen mit diesem Chloroplastentyp, die heute nur auf Korsika vorkommen, stehen damit zwischen den frühen Europapopulationen von *P. alpina* und den ersten Individuen des *Apiifolia*-Clades. (Wegen der auf Korsika beschränkten Verbreitung, dem abgeleiteten ITS und der Möglichkeit einer Deletion der *API*-typischen Duplikation AAAGTATTCTTTTTGTTT, wie sie auch vom Haplotyp *API-40fq* zu *API-mitpy* auftritt, bleiben bei dieser Annahme aber gewisse Zweifel.)

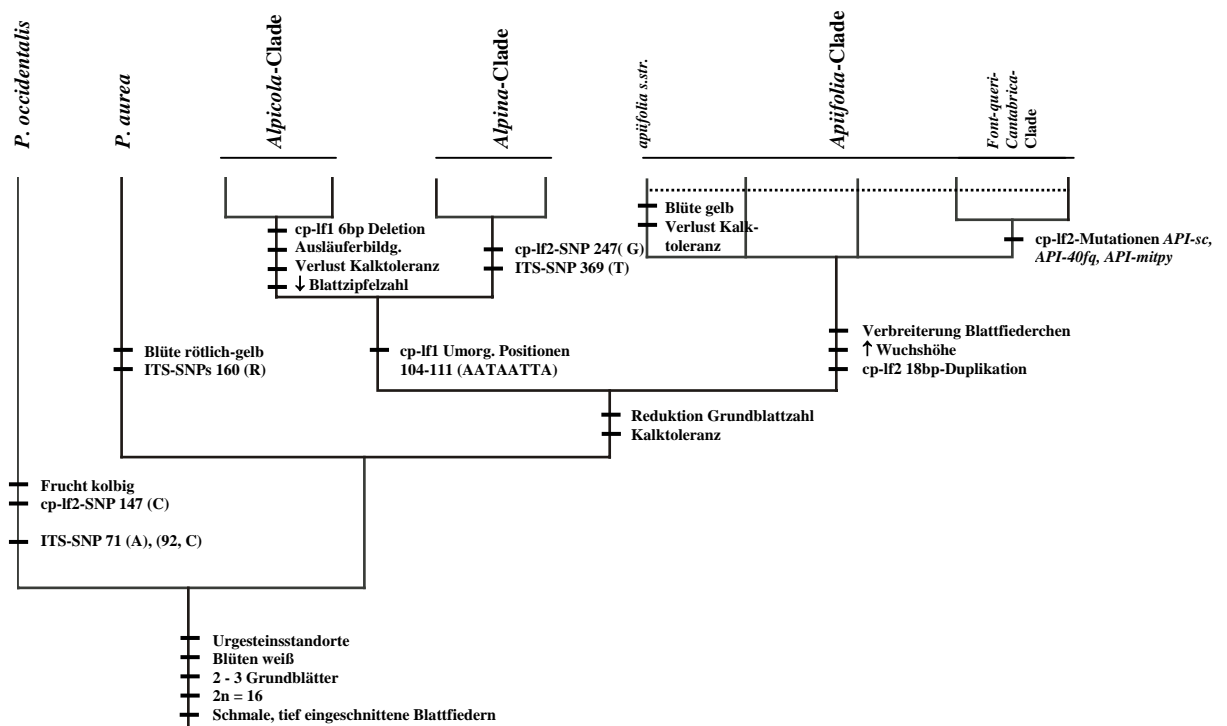


Abb. 22: Evolution molekularer, morphologischer und ökologischer Merkmale im Artkomplex *Pulsatilla alpina* und in der gesamten Sektion *Preonanthus* auf der Grundlage der phylogenetischen Hypothese des kombinierten Datensatzes (siehe Abb. 15). Die gestrichelte Linie symbolisiert den starken Genfluss zwischen den Sippen des *Apiifolia*-Clades.

Die ersten Bestände etablierten sich in Europa zweifellos auf silikatischen Böden. Die *Alpicola*-Populationen gemäß der Hypothese von Moser (1996) als direkte Vorfahren anzunehmen, wäre eine mögliche Interpretation der ITS-Daten. Die Auffassung ist aber schon aus morphologischer Sicht nicht

plausibel. Mehrere Merkmale weichen bei *alpicola*-Individuen extrem ab, bzw. müssen als apomorph gelten (vgl. Abb. 22). Die Ähnlichkeiten zwischen dem *Alpina*- und dem *Apiifolia*-Clade und *P. occidentalis* bzw. *P. aurea* in diesen Merkmalen müssten dann grundsätzlich als Homoplasien aufgefasst werden.

Die ersten europäischen Vorfahren von *P. alpina* waren in jedem Fall weißblütig und hatten nach der rechnerischen Rekonstruktion einen feingliederten Laubblattschnitt (vgl. Tab. 12). Die Merkmalskombination dieser Individuen ist heute so nicht mehr zu finden (vgl. Tab. A12). Sie entspricht einer Mischung aus *millefoliata*-, *alpina*- und *font-queri*-typischen Merkmalen. Die Vorfahren aller *P. alpina*-Individuen waren in der Summe den heutigen apenninischen und westalpischen Individuen sehr ähnlich. Das genetische Diversitätszentrum weist also noch heute auf ein früheres Radiationszentrum hin.

6.4. Die Phylogeographie des Artkomplexes

Die vorliegende phylogeographische Analyse stützt sich fast vollständig auf den Chloroplastenmarker *trnL-trnF*, der, wie in Kap. 3.2. gezeigt wurde, wesentliche Vorteile gegenüber rekombinanten Markern aufweist. Die Aussagen, die aus der geographischen Verteilung und der Phylogenie des Kernmarkers ITS abgeleitet werden können, haben deshalb nur ergänzenden Charakter. Auf sie wird dann deutlicher hingewiesen, wenn sich aus den Daten alternative oder widersprüchliche Hypothesen ergeben.

Die Substitutionsraten der *trnL-trnF*-Fragmente lf1 und lf2 unterscheiden sich fast um das Sechsfache. Die beiden Fragmente wurden deshalb getrennt analysiert, um die Variabilität der Substitutionsraten für Beurteilung der Hypothesen, die sich auf ganz unterschiedliche Zeitebenen beziehen, zu nutzen. So ließ sich die Herkunft und Großgruppengliederung der Sektion *Preonanthus* und die Verwandtschaft zu anderen Sektionen der Gattung *Pulsatilla* besser mit dem lf2 Fragment analysieren. Zur intraspezifischen Rekonstruktion des *P. alpina*-Komplexes eignet sich vor allem das schnell evolvierende lf1-Fragment. Wie die Qualität des Alignments zeigt, ist diese Vorgehensweise plausibel. Die Haplotypen des lf1-Fragments können mit Ausnahme des Haplotypen *API-sc* widerspruchsfrei auf die Haplotypen des lf2-Fragments zurückgeführt werden.

6.4.1. Herkunft des Artkomplexes, Radiation in Europa und alte Ausbreitungswellen

Die Evolution des lf2-Fragments gibt ein weiteres Indiz für die *out-of-Asia*-Hypothese. Der lf2-Urhaplotyp *PIC*, auf den sich alle rezenten lf2-Haplotypen der Sektion *Preonanthus* und des Artkomplexes zurückführen lassen, ist heute noch vorhanden. Sein Areal umfasst Vorkommen im Kaukasus, in den Karpaten, den Ostalpen, den Mittelgebirgen im Westen und Norden der Alpen und einige Vorposten mit wenigen Individuen in Mittelitalien, Korsika und in der Sierra Cantabrica. Abgeleitete lf2-Haplotypen findet man in den Alpen (N-, W-, S- Zentral-), in der Auvergne, den Pyrenäen und der Sierra Cantabrica (Abb. 23). Die Herkunft und die historischen Bewegungen sind also noch in der heutigen Verteilung der Haplotypen als Fußabdruck erkennbar. Auf dem Ausbreitungsweg von Asien nach Europa trennten sich die vormals gemeinsamen Populationen von *P. aurea* und *P. alpina*.

Der lf2-Chloroplastentyp von *P. occidentalis OCC* ist vom Urhaplotyp *PIC* nur einen Mutationsschritt entfernt. Die NCA-Parameter *Dc* und *Dn* für den Haplotypen *OCC* verweisen wegen fehlender Zwischenpopulationen auf Fernausbreitung. Entgegen dieser Indikation wird eine schrittweise Ausbreitung aus dem Entstehungszentrum über Nordasien und die Beringstraße als wahrscheinlich angesehen. Fernausbreitung ist in der gesamten Gattung *Anemone* ungewöhnlich (Hoot & al. 1994), und die Keimfähigkeitsdauer bei *Pulsatilla alpina* ist eigenen Tests zu Folge auf wenige Wochen begrenzt. Der tatsächliche Weg der Ausbreitung nach Amerika kann wegen des Fehlens von Zwischenpopulationen aber nicht rekonstruiert werden. Die geographisch in Frage kommenden Populationen von *P. kostyczewii* sind nicht direkt mit den *Preonanthus*-Arten verwandt bzw. stellen mit den Vorkommen von *P. taraoi* eher noch Abkömmlinge von deren Vorfahren dar.

Die Radiation in Europa korreliert zeitlich mit den klimatischen Veränderungen im frühen Pleistozän (vgl. Kap. 6.2.1.). Für die Ausbreitung in die neuen Siedlungsgebiete sind mindestens zwei historische Ausbreitungswellen zu konstatieren. Die ältere hat, entsprechend der Verbreitung des *PIC*-Chloroplastentyps, Mittelitalien, Korsika, die Karpaten, die Ostalpen bzw. Mitteleuropa, das temperate Westeuropa und mit der Population 34 die Sierra Cantabrica erreicht. Die jüngere verlief parallel mit der Entstehung der Haplotypen *ALP* und *API*. Die *ALP*-Individuen besiedelten die Nord- und Nordwestalpen und die *API*-Populationen sowie deren Abkömmlinge (*API-40fq*, *API-sc*, *API-mitpyr*) breiteten sich über die Alpen, die Auvergne, die Pyrenäen und die Sierra Cantabrica aus. Der Genfluss zwischen den Populationen der *API*-Gruppe ist eingeschränkt. Die Vorposten in der Sierra Cantabrica wurden vermutlich durch Fernausbreitung oder während der quartären Kaltzeiten durch schrittweise Arealausweitung erreicht (NCA: begrenzter Genfluss, vereinzelt mit Fernausbreitung). Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass die heutigen Populationen in der Sierra Cantabrica Relikte eines größeren pleistozänen Verbreitungsgebietes sind.

Die Teilareale der lf2-Clades 1-1 (Haplotypen *PIC*, *ALP*) und der Clades des Gesamtkladogramms (1-1, 1-2) schließen sich räumlich weitgehend aus. Die Ableitung der NCA ist in beiden Fällen allopatrische Fragmentierung. Auf der Grundlage des weitverbreiteten ursprünglichen Typs und eines

räumlich davon getrennten, aber im gleichen geographischen Gebiet vorkommenden abgeleiteten Haplotyps könnte eine Ausbreitungsrichtung mit Hilfe der NCA nur unter Berücksichtigung des *P. taraoi*-Haplotyps TAR abgeleitet werden. Dieser wurde aber nicht in die phylogeographische Analyse des Artkomplexes einbezogen, weil er nach den morphologischen Merkmalen eine andere, eigenständige Sektion der Gattung *Pulsatilla* repräsentiert. (Die ITS-Region und das lf1-Fragment von der vorliegenden *P. taraoi*-Probe konnte nicht erfolgreich sequenziert werden.)

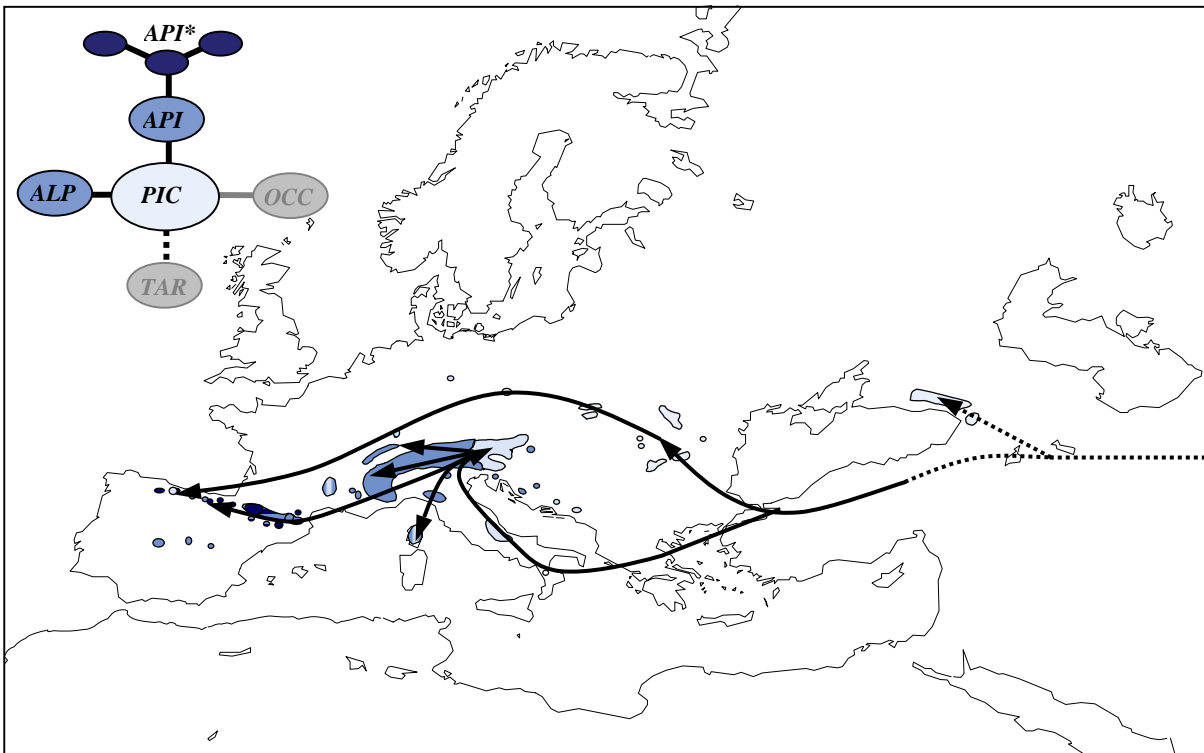


Abb. 23: Mutationsgradient des *trnL-trnF*-Fragments lf2 (hellblaue Flächen = ursprünglicher Haplotyp, blau = Nachkommen, die einen Mutationsschritt und dunkelblau = Nachkommen, die zwei und drei Mutationsschritte entfernt sind) von *Pulsatilla alpina* und *Pulsatilla aurea*. Die Linien zeigen die hypothetischen Migrationswege aus Asien in die europäischen Gebirge an. (Die Vorkommen der Haplotypen *OCC* und *TAR* sind hier nicht abgebildet.)

6.4.2. Jüngere Migrationsbewegungen und aktuelle Verteilungsmuster

Die Aufklärung der aktuellen Verteilungsmuster und der jüngsten Migrationsbewegungen gelang auf der Basis der lf1-Sequenzen mit Hilfe der NCA (vgl. Abb. A1 und Tab. 9), der paarweisen F-Statistik und der Mantelkorrelation von F_{st} -Werten mit der geographischer Distanz.

Die Aufspaltung der Vorfahren des Artkomplexes *P. alpina* in Europa begann vor 1,9 bis 0,4 Ma und ereignete sich deutlich vor den Prozessen, die die Muster der derzeitigen Verteilung bewirkten (vor etwa 0,4 Ma bis heute, vgl. Kap. 6.2.1). Mit der Radiation entstanden zunächst die Basishaplotypen (BHTs) 16, 18, 19, 24, 28 und 31. Sie erreichten im Verlauf ihrer Ausbreitung bereits die Grenzen des heutigen Areals. Von diesen BHTs stammen fast alle „modernen“ Haplotypen direkt ab. Die

modernen Haplotypen breiteten sich meist kontinuierlich (kontinuierliche Arealerweiterung, vier NCA-Nennungen) oder seltener sprunghaft (Fernausbreitung, zwei Nennungen) und insgesamt nur mäßig weiter als die Vorkommen der BHTs aus.

Charakteristisch für die Populationsgeschichte des Artkomplexes sind die allopatrische Fragmentierung (sechs Nennungen) in Teilareale, in denen jeweils einzelne BHTs zur Dominanz gelangten, und der eingeschränkte Genaustausch innerhalb der Teilverbreitungsgebiete (begrenzter Genfluss vs. keine geographische Assoziation, 6:2 Nennungen). Die sehr hohen F_{st} -Werte zeigen, dass der Genfluss zwischen den Populationen trotz der Migrationsbewegungen auch im Vergleich zu anderen Arten stark reduziert ist (vgl. Matos & Schaal 2000, Schmid 2002). Zwischen Vorkommen, die mehr als 500 km entfernt voneinander liegen, ist seit der letzten großen Arealveränderung, d.h. seit etwa 10000 Jahren, kein Genfluss mehr feststellbar (vgl. Abb. 8). Die Populationen im Süden des Verbreitungsgebietes, in den Ostalpen und in der Sierra Cantabrica sind seitdem ebenfalls voneinander und von den Hauptvorkommen isoliert. Die F_{st} -Werte von 0,8 bis 1, die geringe Diversität und die Existenz eigener Haplotypen verweisen deutlich auf genetische Drift ohne Genfluss, die schon seit längerer Zeit wirkt.

Alle lf1-Haplotypen gehören zu einer der drei großen Chloroplastenlinien (NCA, siehe jeweils Abb. A1 und Tab. 9: *API* = Clade 3-1, *ALP* = Clade 3-2, *PIC* = Clade 3-3), die heute jeweils in Teilen des Gesamtareals dominieren und sich räumlich weitgehend ausschließen.

6.4.3. Phylogeographie der *API*-Gruppe

Die Chloroplasten der *API*-Gruppe dominieren im Süden und Westen des Areals von *P. alpina* und sind fast ausschließlich an die Morphotypen *apiifolia*, *millefoliata*, *cyrnea*, *cottiana*, *austroalpina*, *font-queri* und *cantabrica* gebunden. Die Phylogeographie der Gruppe ist auf Abb. 24 veranschaulicht. Der ursprüngliche, dominierende lf1-BHT *16* ist heute noch weit verbreitet. Seine ungewöhnliche Strukturstabilität äußert sich darin, dass er sich selbst innerhalb des konservativen lf2-Fragments in die fünf Subtypen *API-cors*, *API*, *API-mitpyr*, *API-40fq* und *API-sc* differenziert hat. Der BHT *16* vom basalen Subtyp *API* etablierte sich in großen Teilen des Gesamtareals der *API*-Gruppe und ist bis heute der häufigste Haplotyp dieser Chloroplastenlinie. Unter Berücksichtigung der Erwartungen des Koaleszenz-Modells ist eine frühe, schnelle und nachhaltige Ausbreitung nach Korsika, im Alpenraum bis nach Kroatien, in die Pyrenäen, nach Zentralspanien und in die Sierra Cantabrica anzunehmen. Die dominierenden historischen Prozesse für die gesamte *API*-Gruppe sind begrenzter Genfluss (Clades 3-1, 2-2, 1-8?, 2-3?), allopatrische Fragmentierung (Clades 1-4, 1-6) und Arealerweiterung (Clades 2-1, 1-8?, 2-3?).

Einzelne Linien abgeleiteter *API*-Haplotypen zeigen eine Bindung an Korsika, an die Pyrenäen und die Sierra Cantabrica, an die Auvergne und an die Alpen. Die F_{st} -Werte zeigen eine Isolation dieser Teilareale seit der Entstehung der modernen Haplotypen an, sie könnten also schon seit 400000 Jahren

bestehen. Die Spenderpopulationen der isolierten, allopatrisch fragmentierten Bestände aus der Auvergne stammen wahrscheinlich aus den Pyrenäen (Clade 1-4 und 2-2). Da ein Individuum mit dem ursprünglichen Chloroplastentyp 6 in den Westalpen nachgewiesen wurde, kann eine Besiedlung von dort aus nicht ausgeschlossen werden. Allerdings ist die Erstbesiedlung der Pyrenäen mit Sicherheit nicht über die Auvergne erfolgt. (Es sei denn, die Vorkommen wären nach einer frühen Etablierung wieder verloschen.)

Die Vorkommen der Insel Korsika gehen auf mindestens zwei Besiedlungsereignisse unterschiedlichen Alters zurück. Der moderne Haplotyp 8 ist von 9 (Monte Orsaro) abgeleitet (Clade 1-6, allopatrische Fragmentierung). Das *nested-clade*-Signal ist nicht signifikant, weil nur ein Individuum mit dem Haplotyp 8 detektiert wurde. Die anderen korsischen Individuen haben den eigenen, urtümlichen Haplotyp *API-cors*.

In den Alpen hat sich der BHT *16* in mehrere lokale Linien differenziert. Das Gebiet in den Cottischen Alpen wurde neu erobert (Clade 2-1). Die F_{st} -Werte und das Auftreten regionaler Haplotypen in den Cottischen Alpen, den SW-Alpen, am Monte Baldo (Clade 1-8, 2-1) zeigen, dass der Genfluß auch innerhalb der Alpen über große Zeiträume begrenzt war. In den kleinen, wenigstens seit dem letzten Glazial völlig isolierten Populationen am Mte. Orsaro, in der Bärenschutzklamm und im Velebit werden die Wirkungen genetischer Drift in der Haplotypenverteilung besonders deutlich.

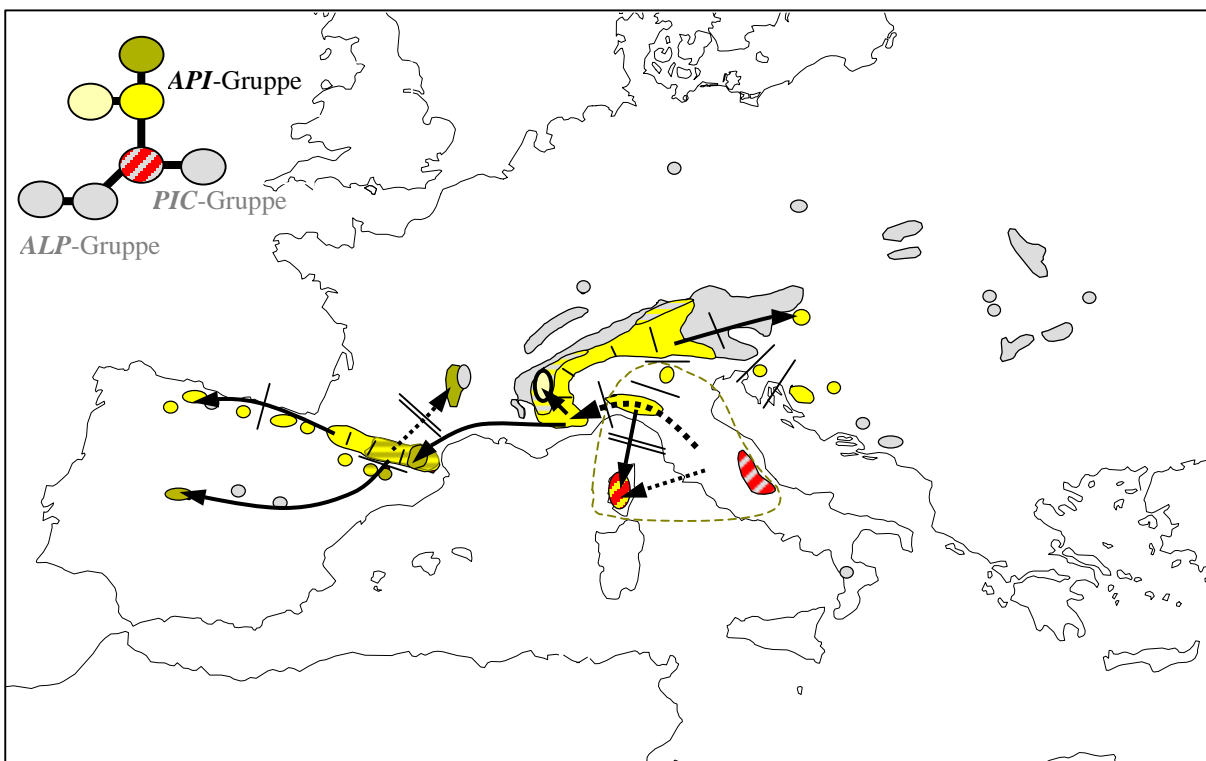


Abb. 24: Rekonstruktion der Ausbreitungsgeschichte der Haplotypen der *API*-Gruppe von *Pulsatilla alpina* im Pleistozän. Die Pfeile zeigen die Migrationsrichtungen an. Einfache Linien verweisen auf unterbrochenen Genfluss, doppelte auf allopatrische Fragmentierung. Die gestrichelt umrandete Fläche veranschaulicht das hypothetische frühe Radiationszentrum von *P. alpina* nach der Einwanderung aus Asien.

6.4.4. Phylogeographie der *PIC*-Gruppe

Die Chloroplastentypen der *PIC*-Gruppe sind charakteristisch für den Norden und den Osten des *P. alpina*-Areal und für die Morphotypen *alpicola*, *austriaca* und *montis-niveae* p.p. Die Phylogeographie der *PIC*-Gruppe ist auf Abb. 25 dargestellt.

Die ursprünglichen Haplotypen der *PIC*-Verwandtschaftslinie haben bei der historischen Bewegung von Ost nach West ebenfalls ihre Spuren hinterlassen. Die *PIC*-Evolutionsgeschichte muss wiederholt von Phasen allopatrischer Arealfragmentierung beeinflusst worden sein, wie aus der NCA (Clade 3-3, allopatrische Fragmentierung) hervorgeht. Eine identische Aussage ergibt sich auch aus der Struktur der Haplotypenstichprobe (= Koaleszent) für die *PIC*-Gruppe, den Häufigkeiten der einzelnen Haplotypen im Vergleich zu ihrer phylogenetischen Position. Der Koaleszent der *PIC*-Gruppe wird von mehreren ähnlich häufigen BHTs dominiert.

Die ursprünglichsten Chloroplasten der *PIC*-Gruppe auf Korsika und in den Abruzzen sind von allen übrigen, mit Sicherheit eine direkte genealogische Linie bildenden *PIC*-Haplotypen allopatrisch und durch mehrere Mutationsschritte getrennt. Die Ausbreitungsbewegung startete wahrscheinlich auf dem mittleren Apennin und führte zunächst nach Norden und dann nach Osten. Dort entstand der direkte Vorfahr aller abgeleiteten *PIC*-Haplotypen (= Clade 2-7), der BHT 28, und dominiert noch heute unverändert in den Teilarealen Ostalpen, Bosnien und Karpaten. Der frühe Ausbreitungserfolg, den der BHT 28 in diesen Regionen hatte, wurde von den von ihm abgeleiteten lokalen Haplotypen 26 und 27 nicht mehr wiederholt. Der Gentransfer zwischen den Populationen innerhalb der Ostalpen ist seit dem Entstehen der Haplotypen 26 und 27 und sicher seit den großen Arealveränderungen während des letzten Glazials sehr stark eingeschränkt (NCA für Clade 1-14: begrenzter Genfluss).

Die historischen Prozesse der *PIC*-Haplotypengruppe in den Karpaten und in Bosnien sind nicht im gleichem Maße auflösbar wie die in anderen Regionen. Ob der Haplotyp 28 besonders strukturstabil oder die Haplotypendiversität der Populationen in den Karpaten, in Bosnien und den Ostalpen wegen eines *bottleneck*-Ereignisses auf den ursprünglichen BHT reduziert ist, kann mit den vorliegenden Daten nicht entschieden werden. Nach der Koaleszenztheorie ist es am wahrscheinlichsten, dass sich bei einem *bottleneck*-Ereignis der häufigste, also der BHT durchsetzt. Innerhalb der *PIC*-Gruppe kam es durch den Einbau von zwei C-G-Basenpaaren (Haplotypen 31 und 33) und durch zwei große Deletionen (29, 34) mehrfach zu einer Stabilisierung der AT-Mikrosatellitenregion. Das relative Alter des *PIC*-Verwandtschaftskreises könnte deshalb insgesamt unterschätzt werden.

Die Ausbreitungsbewegung führte dann von den Ostalpen bis in die Sierra Cantabrica. Die westlichsten Vorposten des heutigen *PIC*-Areal sind wahrscheinlich schon früh und schnell erreicht worden, denn der mit nur einer Mutation vom BHT 28 abgeleitete Zwischenhaplotyp 30 kommt heute mit wenigen Individuen nur an der Arealgrenze in der Sierra Cantabrica vor.

Der „Sierra-Cantabrica“-Haplotyp 30 ist der Urahn der Chloroplastenlinie des Herzynischen Gebirgsbogens. Das Gebiet ist aus westlicher Richtung besiedelt worden. Für eine Besiedlungsrichtung von Westen nach Nordosten nördlich der Alpen spricht auch, dass die genetische

Diversität in der Auvergne-Population sehr hoch (0,81) ist und nach Osten deutlich abnimmt (Vogesen 0,11, Harz und Riesengebirge 0). Eine Besiedlung der West-, Nord- und Zentralalpen war zu dieser Zeit nicht möglich, weil die potentiell geeigneten Standorte sicher bereits mit Individuen mit ALP- und API-Typ-Chloroplasten besetzt waren. Die disjunkten Bestände in der Auvergne, den Vogesen, dem Harz und dem Riesengebirge teilen einen gemeinsamen, jeweils mehr oder weniger verarmten Haplotypenpool (29, 31, 32). Unter Berücksichtigung des Klimas ist ein gemeinsames großes Verbreitungsgebiet im Bereich des herzynischen Mittelgebirgsbogens im Verlauf des jüngeren Pleistozäns wahrscheinlich (vgl. Tab. 9, Clade 1-15).

Die Hohe Tatra wurde zuletzt, ebenfalls aus westlicher Richtung besiedelt. Die abgeleiteten Haplotypen 33 und 34 sind nur in den beiden untersuchten Populationen beobachtet wurden. Die starke Vermischung beider Haplotypen indiziert einen regen Genaustausch zwischen den Beständen im Westen der Hohen Tatra.

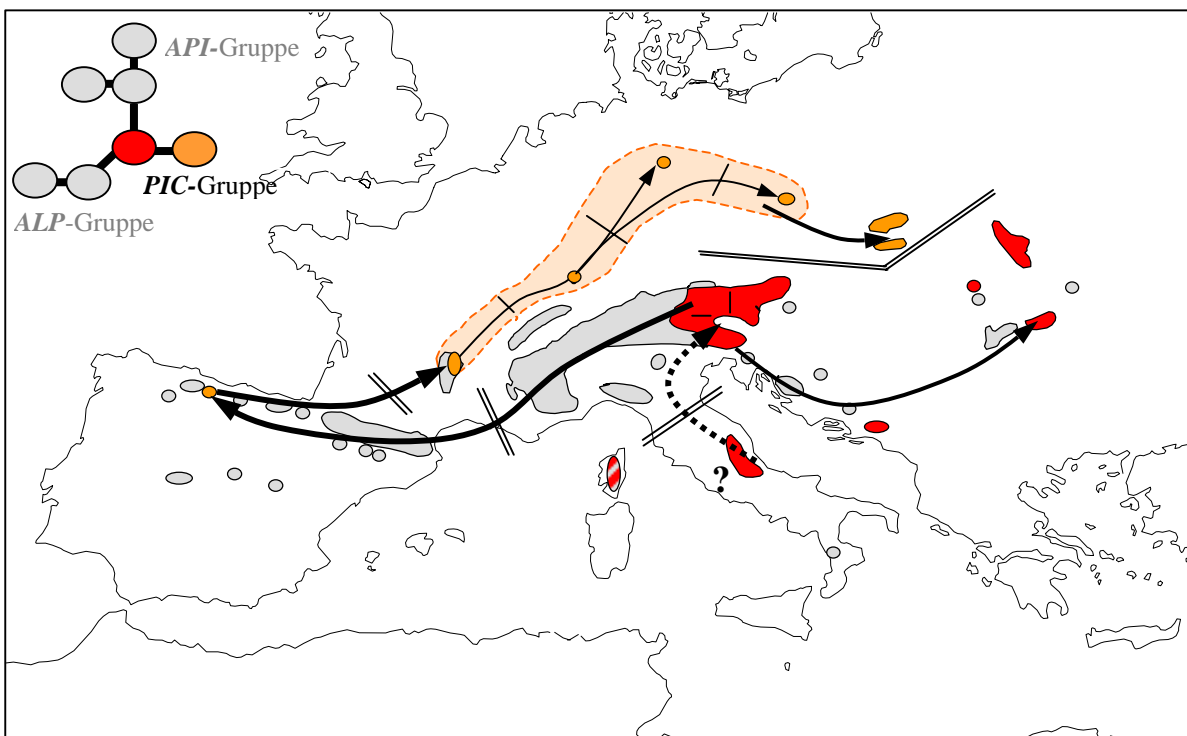


Abb. 25: Rekonstruktion der Ausbreitungsgeschichte der Haplotypen der PIC-Gruppe von *Pulsatilla alpina* im Pleistozän. Die Pfeile zeigen die Migrationsrichtungen an. Die Vorkommen in den Abruzzen sind ursprünglich, sie sind aber nicht die direkten Vorfahren der Populationen in den Ostalpen (unterbrochener Pfeil). Einfache Linien verweisen auf unterbrochenen Genfluss, doppelte auf allopatrische Fragmentierung. Die gestrichelt umrandete Fläche veranschaulicht ein hypothetisches Verbreitungsgebiet im Bereich des herzynischen Gebirgsgürtels.

6.4.5. Phylogeographie der ALP-Gruppe

Die Chloroplasten der ALP-Gruppe kommen nur in den Nord-, den Westalpen und im Jura vor. Sie sind die typischen Chloroplasten des Morphotyps *alpina*. Die Phylogeographie der Gruppe ist auf Abb. 26 gezeigt.

Die *ALP*- und die *PIC*-Haplotypengruppe gehen auf gemeinsame Vorfahren zurück (siehe Abb. 10). Die Abspaltung der *ALP*-Gruppe erfolgte noch vor der Differenzierung der *PIC*-Gruppe und ist wegen des verbindenden Haplotyps 25 räumlich für den Apennin zu vermuten.

Die Radiation der *ALP*-Gruppe begann erst vergleichsweise spät (vgl. Abb. 13 und 15). Die frühe Phase der Etablierung der *ALP*-Linie war von einer starken Fragmentierung geprägt, ohne dass es zwischen den Teilarealen zum Genaustausch gekommen wäre (Clade 2-4: begrenzter Genfluss). Im Koaleszenten der *ALP*-Gruppe treten ebenfalls mehrere BHTs gleichrangig auf (im Gegensatz zu den *PIC*-Haplotypen haben diese sich aber eher simultan als sukzessiv etabliert). Aus der derzeitigen Gesamtverteilung der *ALP*-Haplotypen erschließt sich nicht, ob die modernen Haplotypen sich zuerst in den Nordwest-Alpen etabliert haben und von dort aus der Jura besiedelt wurde oder umgekehrt. Zweifellos erfolgte mindestens ein Migrationsschub aus dem Jura in östliche und in südliche Richtung in die Alpen (Clades 1-11: kontinuierliche Arealerweiterung). Die BHTs der *ALP*-Gruppe umfassen ein kleineres Areal, haben aber das gleiche Arealzentrum wie die von ihnen abgeleiteten Haplotypen. Für die Populationen mit *ALP*-Chloroplasten kann neben einer frühen Zersplitterung eine kontinuierliche Arealerweiterung angenommen werden (Clade 3-2: kontinuierliche Arealerweiterung). In der jüngsten Geschichte der *ALP*-Gruppe war der Genaustausch zwischen den Populationen der zwei Teilareale gegeben. Allerdings ist die Wirkung der räumlichen Isolation, die spätestens seit dem letzten Glazial wieder verstärkt wirkt, mit einem F_{st} -Wert von 0,34 für die Populationen des Morphotyps *alpina* ebenso sicher nachweisbar.

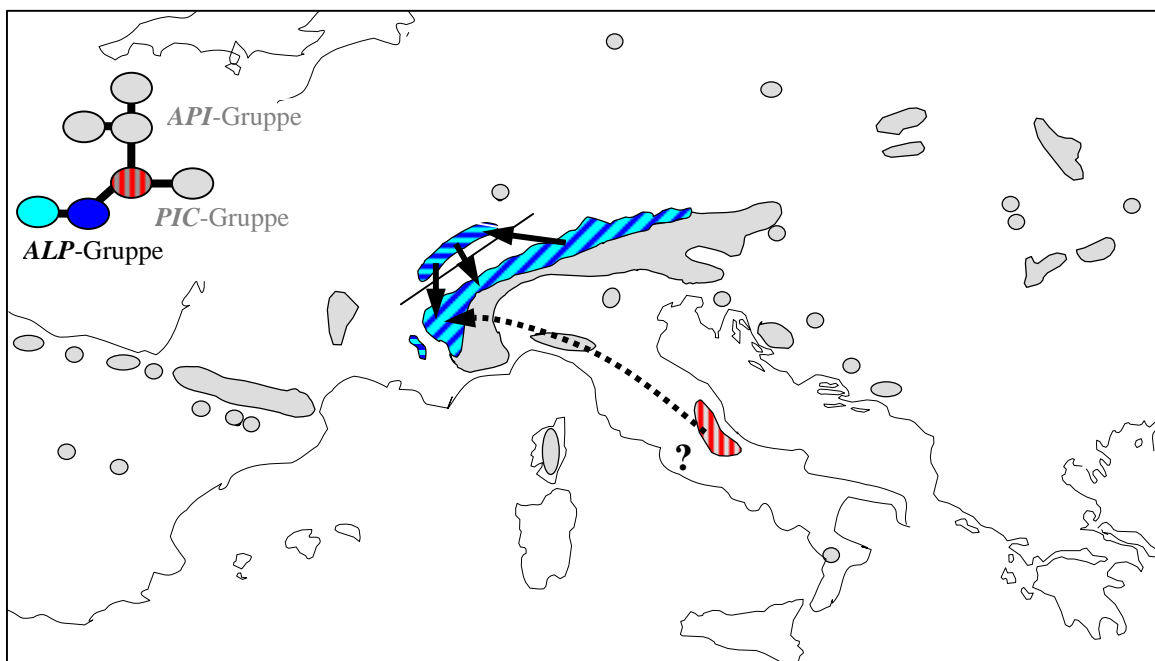


Abb. 26: Rekonstruktion der Ausbreitungsgeschichte der Haplotypen der *ALP*-Gruppe von *Pulsatilla alpina* im Pleistozän. Die Pfeile zeigen die Migrationsrichtungen an. Einfache Linien verweisen auf unterbrochenen Genfluss. Die Herkunft der Gruppe kann nicht sicher bestimmt werden, sie wird für die *ALP*-Gruppe, wie für die gesamte Art, aus den Apenninen vermutet (unterbrochener Pfeil).

6.4.6. Gab es ein frühes Verbreitungszentrum in Italien und Korsika?

Der If1-Haplotyp 15 (Monte Baldo) lässt sich sicher der *API*-Haplotypengruppe zuordnen. Der Haplotyp 25 (Abruzzen) steht phylogenetisch basal zur *ALP*- und zur *PIC*-Gruppe. Eine Interpretation als ursprünglicher Haplotyp ist jeweils möglich, aber nicht zwingend (siehe Abb. 10 und Tab. A6, Alignment). Auf eine solche Einordnung wurde für die *nested-clade*-Analyse jeweils verzichtet, weil sie den Vorhersagen des Koaleszenz-Modells, wonach ursprüngliche BHTs im Zweifelsfall häufiger sein sollten als ihre Abkömmlinge, nicht gerecht wird.

Weiterhin bemerkenswert ist die Gesamtbasensequenz des nur auf Korsika vorkommenden Haplotyps *API-cors*. Eine Zuordnung zu den Haplotypengruppen der Teilfragmente führte anscheinend zu einem Widerspruch (If1 *API* vs. If2 *PIC*). Das Gesamtfragment lässt sich aber als Urahn aller *API* Haplotypen auffassen (siehe Kap. 6.3.3.).

Damit ergibt sich ein auffälliges Häufung von Signalen, die ein ursprüngliches Sippenzentrum in Italien und Korsika und eine Besiedlung der europäischen Gebirge ausgehend vom Balkan aus südlicher Richtung über die Apenninen-Halbinsel andeuten.

Die phylogeographische Analyse unterstützt die aufgeführte Einwanderungsgeschichte. Die Daten können aber auf der Basis der ITS- und der If2-Sequenzen auch alternative interpretiert werden. Danach wären die *alpicola*-Populationen ursprünglich für *P. alpina* und hätten sich vom Balkan über die Karpaten in die Alpen ausgebreitet. Die Radiation in die Hauptclades hätte ebenfalls in den West- und Südalpen und im Apennin stattgefunden. Danach wären die neuen Sippen von dort aus in südliche Richtung bis nach Kalabrien und in westliche Richtung bis in die Pyrenäen und nach Zentralspanien vorgedrungen. Die Kalktoleranz wäre später, mit der Radiation aufgetreten und sekundär nur einmal, mit dem *apiifolia*-Morphotyp verloren gegangen. Diese Auffassung widerspricht jedoch den If1-Daten und der Verteilung der morphologischen Merkmale (siehe Kap. 6.3.3.). Eine Untersuchung weiterer Populationen von Korsika, aus den Abruzzen und vom Monte Pollino in Kalabrien sollte für eine endgültige Klärung sorgen können.

Eine Einwanderung über den südlichen Balkan auf die Apenninen-Halbinsel und eine frühe Adaptation an Kalkböden ist derzeit die einzige Interpretation, die die phylogeographischen Muster der ITS und beider cp-Fragmente sowie die räumliche Verteilung der morphologischen Merkmale ohne Widersprüche integrieren kann.

6.4.7. Klima, Arealodynamik und Spenderpopulationen der heutigen Vorkommen

Die zahlreichen phylogeographische Untersuchungen an subalpinen-alpinen und aktisch-alpinen Gefäßpflanzenarten (Abbott & al. 1995, Brochmann & al. 1996a, Comes & al. 1998, Gugerli & Holderegger 2001, Stehlik & al. 2001b) haben gezeigt, dass die pleistozänen Klimaschwankungen besonders dynamische, kleinräumliche und überregionale Migrationsbewegungen der Arten bewirkten. Unabhängig von seiner geographischen Verbreitung findet man die Populationen des *P. alpina*-Komplexes immer im Bereich des Krummholzes zwischen der subalpinen und alpinen Höhenstufe. Offensichtlich unterliegt der Artkomplex dem Gesetz der relativen Standortskonstanz (vgl. Walter & Straka 1970). Die Hypothese von der relativen Standortskonstanz wird dadurch unterstützt, dass die Standorte südlicher Populationen in den Karpaten, an der Südabdachung der Alpen, in den Abruzzen, den Pyrenäen und der Sierra Cantabrica fast ausschließlich N- oder NW-exponiert sind, während die Populationen im Norden des Areals, im Harz, in den Vogesen, dem Riesengebirge und der Hohen Tatra keine bevorzugte Expositionsrichtung haben.

Man kann wegen dieser engen ökologischen Bandbreite erwarten, dass das Areal während des Pleistozäns stark oszillierte. Die Populationen expandierten während der Kaltzeiten in tiefer liegende Gebiete Europas und in Richtung Süden und wurden während der Warmzeiten unter Arealregression in die höheren Mittelgebirge und Hochgebirge zurückgedrängt. Refugialräume, die bei subalpinen und alpinen Arten in den Warmzeiten auftraten, entsprechen daher eher der heutigen Verbreitung. Die phylogeographische Rekonstruktion zeichnet einen Teil dieser Arealodynamik nach (siehe oben).

Die Frage nach den Glazialrefugien und der eiszeitlichen Überdauerung ist trotzdem wiederholt gestellt worden (Zimmermann 1952, Aichele & Schwegler 1957, Moser 1996). Die rezenten Vorkommen des *Alpicola*-Clades in Mitteleuropa sind die Reste altquartärer Spenderpopulationen mit einem zusammenhängenden Areal im Bereich des herzynischen Mittelgebirgsbogens (siehe oben). Mit Sicherheit davon getrennt war ein Teilareal in (Süd-)Osteuropa, aus dem die heutigen Vorkommen der Karpaten und in Bosnien hervorgingen. Die Existenz von eigenen Haplotypen in den Ostalpen-Populationen verweist darauf, dass die Sippe auch schon während der letzten Eiszeit in den Alpen oder in Alpennähe vorkam und dass es zwischen den Karpaten und den Ostalpen nicht zum Genaustausch kam.

Einige klassische Nunatakker (vgl. Stehlik 2000) haben eigene Haplotypen (Monte Baldo, Mont Cenis) und zeigen damit eine Überdauerung der Kaltzeiten in den Alpen an. Die regionale Bindung und der geringe Durchmischungsgrad der Mehrheit der abgeleiteten Haplotypen weist darauf hin, dass das Artareal auch während der letzten Eiszeit aus disjunkten Teilverbreitungsgebieten bestand (siehe oben). Die Spenderpopulationen der heutigen Vorkommen befanden sich demnach überwiegend in den Vorgebirgsregionen der heutigen Verbreitungsgebiete oder in den Gebirgen selbst.

6.4.8. Vergleich der Nested-clade-Analyse und der F-Statistik

In der phylogeographischen Analyse wurden die NCA und die F-Statistik eingesetzt. Aus beiden Methoden wurden Aussagen zur Stärke des Genflusses, zum Grad der Isolation zwischen den Populationen bzw. zur Fragmentierung von Metapopulationen abgeleitet. Die NCA bestimmt das phylogeographische Verhältnis von verwandten Haplotypen. Die Aussagen sind abhängig von Grad der Verwandtschaft (in Mutationsschritten) und vom Grad der Überlappung der Verbreitungsgebiete. Dagegen vergleicht die F-Statistik den Durchmischungsgrad der verschiedenen Haplotypen aller Populationen. Der F_{st} -Wert ist dann abhängig von der Anzahl der Haplotypen und von der Anzahl derjenigen Haplotypen die zwei Populationen (oder Populationsgruppen) gemeinsam haben. Es werden dabei jeweils unterschiedliche, nicht direkt voneinander abhängige Parameter gemessen. Die Aussagen, die mit Hilfe der NCA abgeleitet werden, sind wegen der maßgeblichen Betrachtung des Grades der Verwandtschaft ausschließlich für die Analyse historischer Verhältnisse geeignet. Die F-Statistik ermöglicht dagegen Aussagen zum Genfluss innerhalb der letzten Generationen. Ihre Stärke liegt in der Beschreibung der aktuellen Situation.

Die Aussagequalität für beide Methoden bleibt gering, wenn nur wenige Haplotypen detektiert werden (z.B. die Populationen in den Ostalpen). Das wirkt sich bei der NCA noch stärker aus als bei der F-Statistik. Kommen in allen untersuchten Populationen z. B. nur zwei Haplotypen vor, ist keine NCA-basierte Aussage erlaubt. Eine gesicherte Analyse ist auch dann nicht zulässig, wenn eine Verknüpfung der Haplotypen durch eine hohe Anzahl an Mutationsschritten gemäß dem *95%-parsimony*-Plausibilitätskriterium statistisch nicht gesichert ist. In beiden Fällen ermöglicht die paarweise F-Statistik noch einen Vergleich aller Populationen. Darüber hinaus gilt für beide Methoden: Die Aussagen zur Stärke des Genflusses und zum Grad von Isolation und Fragmentierung sind abhängig von der Substitutionsgeschwindigkeit der analysierten Region. Ein konservativer Marker betont das Verbindende zwischen Populationen, wogegen schnell evolvierende Marker das Trennende hervorheben. Mit anderen Worten können Marker mit unterschiedlichen Substitutionsraten besonders bei hoher Arealodynamik unterschiedliche Teile der gesamten phylogeographischen Geschichte rekonstruieren. Einzelne Aspekte der Verbreitungsgeschichte können sich dann durchaus widersprechen. Die verwendeten Marker bzw. ihre Substitutionsraten sollten deshalb stärker als bislang üblich hervorgehoben werden. Zu Schwächen in der Interpretation kann es auch kommen, wenn die Substitutionsraten zwischen Haplotypen innerhalb eines Fragments stark voneinander abweichen. Zum Beispiel erscheinen die lf1-BHTs 28 und 16 im Vergleich zur allen Haplotypen der ALP-Gruppe wesentlich langsamer zu evolvieren. Die phylogeographischen Muster der Haplotypen 28 und 16 sind daher trotz wesentlich größerer Areale sehr viel schlechter auflösbar. Das Gleiche gilt für die stabilen lf2-Haplotypen PIC, ALP, API und OCC im Vergleich mit den lokal vorkommenden API-Abkömmlingen API-sc, API-mitpyr und API-40fq (bzw. API-cors).

Phylogeographische Untersuchungen, die nur eine der besprochenen Statistiken verwenden, können zu widersprüchlichen Aussagen führen. Es wird daher empfohlen, beide Methoden ergänzend zu benutzen.

Die wesentliche Schwäche molekularer phylogeographischer Untersuchungen besteht darin, dass die vorwiegend klimatisch bedingten Arealverschiebungen und Arealregressionen früherer Verbreitungsgebiete nicht direkt nachgewiesen werden können. Die dafür benötigten Fossilnachweise stehen aber i.d.R. einerseits nicht zur Verfügung und andererseits ist fossile DNA nicht mehr zur molekularen Analyse geeignet. Die populationsgeschichtlichen Prozesse werden im NCA-Ableitungsschlüssel deshalb auf Ausbreitungsbewegungen und die Stärke des Genflusses zwischen den heutigen Verbreitungsgebieten reduziert. Das kann zu Fehlschlüssen bzw. zur Überinterpretation der Daten führen. Die Tatsache der klimatischen Dynamik der Areale ist für eine plausible Interpretation der Ergebnisse unbedingt zu berücksichtigen.

6.5. Die Sippen des Artkomplexes

6.5.1. *Apiifolia*-Clade

Der *Apiifolia*-Clade (vgl. Abb. 15 und 27) umfasst morphologisch, ökologisch und genetisch sehr unterschiedliche Akzessionen der Unterarten bzw. Morphotypen *apiifolia*, *cyrnea*, *cantabrica*, *font-queri* und die südalpinen Populationen der Unterart *alpina* (L.) Delarbre (Morphotypen *millefoliata*, *australpina*, *montis-niveae*). Innerhalb des Clades dominieren Chloroplasten vom *API*-Typ überlappend zwischen den aufgeführten Unterarten, aber nahezu nicht überlappend mit den *Alpina*- und *Alpicola*-Clades. Der *Apiifolia*-Clade wird deshalb als Verwandtschaftskreis behandelt. Der Status der Unterarten nach Aichele & Schwegler (1957), Tutin (1964), Damboldt & Zimmermann (1974), Jalas & Suominen (1989), Akeroyd (1993) oder Moser (1996) sollte nach dem Vorschlag zur taxonomischen Behandlung von *P. alpina* in Kap. 6.5.4. revidiert werden.

Stark isoliert stehen innerhalb des Clades die Individuen der korsischen Population 44, die den ursprünglichen Haplotyp *API-cors* aufweisen. Die Population 44 enthält aber auch den modernen lf1-Haplotyp 8. Die Population ist aber morphologisch nicht divers oder innerhalb des *Apiifolia*-Clades morphologisch auffällig (vgl. Kap. 6.6.). Intraspezifisch treten drei weitere phylogenetische Cluster auf.

Die Basisgruppe des *Apiifolia*-Clades lässt sich wegen der geringen Anzahl eigener ITS-Merkmale (vgl. Abb. 13, Polytomie der ITS-Phylogenie) nicht sicher untergliedern. Es handelt sich vorwiegend um kalktolerante, weißblühende Pflanzen, die hinsichtlich ihrer Laubblattmorphologie extrem variabel

sind (Morphotypen *australpina*, *millefoliata* p.p., *cantabrica*, *font-queri*, *cottianaea*, *ochroleuca* p.p., *cyrnea* p.p.). Zur Basisgruppe gehören auch die zentral- und westalpinen Populationen 8, 21 und 42 vom morphologisch einheitlichen, gelbblütigen *apiifolia*-Morphotyp.

Alle weiteren *apiifolia*-Populationen, die zusammen ein Areal mit Vorkommen von den Südalpen bis nach Zentralspanien haben, bilden einen Clade. Sie stammen direkt von Pflanzen der Basisgruppe ab, die den Populationen 8, 21, 42 ähnlich gewesen sein müssen. Der geteilte Morphotyp *apiifolia* besetzt mit seinen Vorkommen auf silikatischen Standorten oberhalb der Waldgrenze, auf hochmontanen Wiesen und in Lärchenwäldern eine gut eingrenzbar ökologische Nische. Für vegetationskundliche Untersuchungen erscheint die morphologisch basierte Abgrenzung noch weiterhin sinnvoll.

Ein weiterer Clade vereinigt die Mehrzahl der Populationen der Morphotypen *font-queri* und *cantabrica* aus den Pyrenäen und der Sierra Cantabrica. Sie werden im Gegensatz zu den Einzelmarkern besonders gut durch die kombinierte Phylogenie gruppiert. Auch sie stammen direkt von ihren morphologisch ähnlichen Verwandten (z. B. Population 40 oder 60) der Basisgruppe ab. Eine phylogenetische Trennung der Morphotypen bzw. Unterarten *cantabrica* und *font-queri* gelingt nicht.

Zahlreiche Akzessionen des *Apiifolia*-Clades weisen Merkmale auf, die eher für den *Alpicola*- oder *Alpina*-Clade charakteristisch sind. Die morphologischen Merkmale der Akzessionen 35 (Morphotyp *alpicola*), 7 (Morphotyp *ochroleuca*), 26 (Morphotyp *montis-nivaea*) und 51 (*cottianaea*) sind auffallend abweichend für den Clade. Die Populationen 20, 21 und 48 haben, wie die Populationen 18 und 26 eine „untypische“ ITS. Inwieweit weit diese Merkmale Indikationen für Hybridereignisse sind, ist Gegenstand der Diskussion in Kap. 6.6.1.

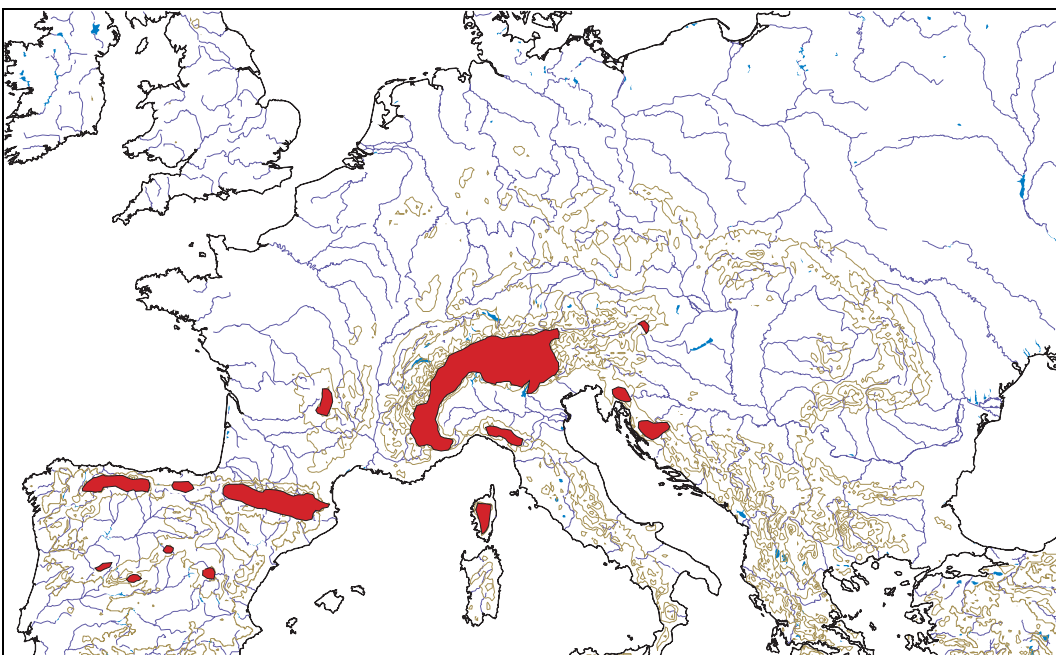


Abb. 27: Verbreitung des *Apiifolia*-Clades von *P. alpina* (rote Flächen), dargestellt auf der Grundlage der Verbreitung der Morphotypen nach Moser (1996) und der Phylogenie des kombinierten Datensatzes.

6.5.2. *Alpicola*-Clade und die *alpicola*-Population vom Brocken

Im *Alpicola*-Clade (siehe Abb. 15 und 28) dominiert eine monophyletische Kerngruppe, die alle Populationen mit einem *alpicola*- oder *austriaca*-Morphotyp enthält und die immer auf silikatischen Untergrund und meist in Zwergstrauchheiden oberhalb der Baumgrenze wächst. Die Individuen des Clades sind durch eine nahezu einheitliche ITS-Sequenz und durch Haplotypen der *PIC*-Linie, die alle auf den BHT 28 zurückgehen, gekennzeichnet. Die aktuelle Fragmentierung der *PIC*-Chloroplastenlinie äußert sich bislang weder ökologisch noch morphologisch. Das gilt ebenso für die Pflanzen, die von verschiedenen Autoren im Morphotyp *austriaca* zusammengefasst wurden. Es ist deshalb anzunehmen, dass die frühe Phase der Entstehung des *Alpicola*-Clades von einem extremen *bottleneck*-Ereignis bestimmt war, das sich bis heute morphologisch auswirkt. Die Ausbreitung und Evolution des *Alpicola*-Clades verlief dann parallel mit der Besiedlung von Urgesteinsgebirgen in Zentral- und Westeuropa, wie sie in der Phylogeographie der *PIC*-Chloroplastengruppe geschildert ist.

Die Kerngruppe besteht aus zwei Custern, die geographisch vollständig voneinander getrennt sind. Das phylogenetisch ursprüngliche Cluster ist auf die Ostalpen und Karpaten beschränkt. Da die ITS- und Chloroplastendiversität in den Ostalpen höher ist, ergibt sich eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Entstehung der Sippe in diesem Gebiet. Die Populationen des aus dem ursprünglichen Cluster abgeleiteten Clades kommen von der Sierra Cantabrica über den herzynischen Gebirgsbogen bis zur Hohen Tatra in heute reproduktiv isolierten Populationen vor (vgl. Kap. 6.4.4.).

Dem *Alpicola*-Clade sind noch vier basale Populationen mit *PIC*-Chloroplasten zuzurechnen, die sich morphologisch stark von der Kerngruppe unterscheiden (17 Morphotyp *millefoliata*, 24 *australpina*, 27 und 28 *montis-niveae*). Berücksichtigt man die ITS-SNP-Muster, könnte es sich bei den Populationen 17 und 24 tatsächlich um ursprüngliche Sippen handeln. Ihre topologische Position in der Phylogenie wäre dann gerechtfertigt. Die Populationen 27 und 28 sind Nachkommen von Hybriden (siehe Kap. 6.6.1.). Die basale phylogenetische Stellung entspricht daher nicht ihrer Evolutionsgeschichte.

Die *alpicola*-Population vom Brocken

Die „Brocken-Anemonen“ unterscheiden sich morphologisch und nach ihrer ITS-Sequenz nicht von den Pflanzen anderer Herkünfte.

Die Analyse der Chloroplasten identifiziert für den Brocken nur den Haplotyp 31 und eine Besiedlung aus westlicher Richtung. Die Brocken-Population weist mit den Populationen aus den Vogesen (1, 2) die höchste Ähnlichkeit auf. Wegen des etwas abweichenden Haplotypenpools folgt die *alpicola*-Population aus der Auvergne (32) verwandtschaftlich an zweiter Stelle. Für eine Nutzung zur Kalibrierung der Phylogenie des Artkomplexes reichen die genetischen Unterschiede entgegen der Hoffnung zu Beginn der Untersuchung nicht aus.

Die heutige Verbreitung der Brockenpopulation ist im Vergleich zur historischen aus klimatischen Gründen wahrscheinlich stark reduziert (Arealregression). Die Population umfasst derzeit nur etwa 1000 Individuen. Die geringe Haplotypendiversität wird deshalb als *lineage-sorting*-Effekt der letzten Jahrtausende interpretiert. Im Hinblick auf den Haplotypenpool des herzynischen Bogens und der ebenfalls verarmten Diversität der Nachbarpopulationen in den Vogesen und im Riesengebirge kann davon ausgegangen werden, dass die Population im Bereich des Brockengipfels seit dem letzten Glazial ununterbrochen Bestand hatte und seitdem biogeographisch isoliert ist. Wegen des allgemeinen Verbreitungsmusters der Haplotypen, der unterschiedlichen Haplotypenausstattung im Vergleich zu den nächsten Nachbarn im Riesengebirge und dem sicheren Nachweis der Sippe und weiterer subalpiner Arten seit 1588 (Thal 1588) kann eine anthropogene Fernausbreitung der Vorkommen ausgeschlossen werden. Die Daten können eine nichtanthropogene Fernausbreitung aus den Vogesen oder der Auvergne nicht ganz ausschließen. Das erscheint aber im Hinblick auf die kurze Fertilitätszeit der Samen, auf die Entfernung zu den nächsten Verwandten und der Möglichkeit einer allmählichen glazialen Arealerweiterung sehr unwahrscheinlich.

Wegen der engen ökologischen Nische in der subalpinen bis alpinen Vegetationsstufe, durch die sich der *alpicola*-Morphotyp auszeichnet, kann deshalb auf andauernd waldfreie Standorte auf dem Brocken seit dem Postglazial geschlossen werden. Die Brockenkuppe muss aber nicht völlig baumfrei gewesen sein, auch in den Vogesen gibt es heute noch *alpicola*-Vorkommen, die mit einem sehr lichten Fichtenbestand vergesellschaftet sind. Vermutlich boten bereits die ausgedehnten Blockschutthalden im Bereich des Brockengipfels ausreichende Standortbedingungen zum Überdauern des Atlantikums.

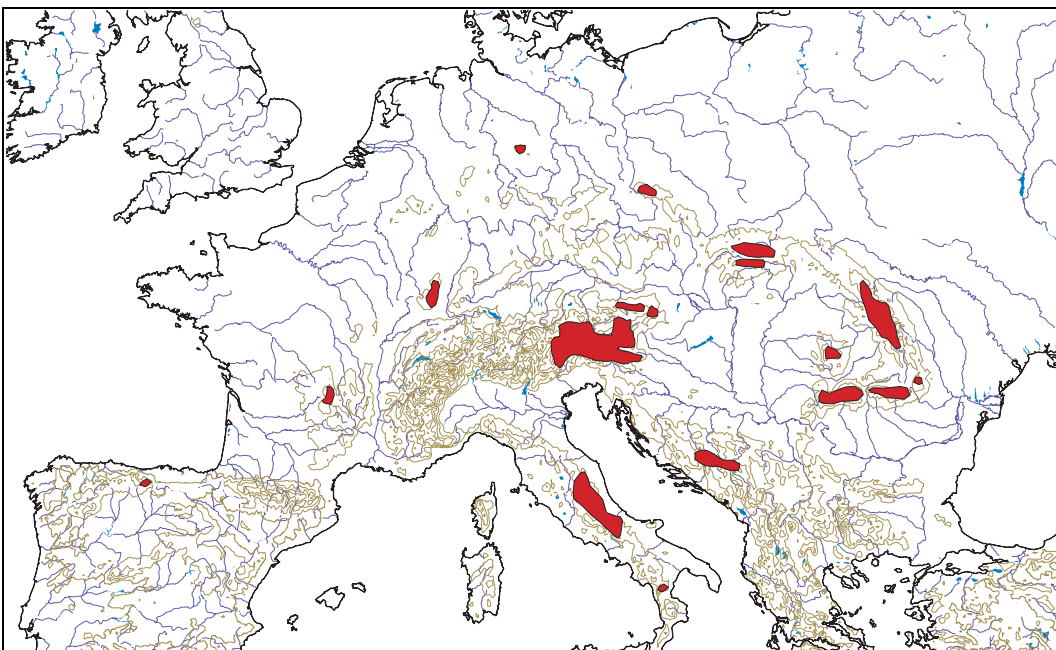


Abb. 28: Verbreitung des *Alpicola*-Clades von *P. alpina* (rote Flächen), dargestellt auf der Grundlage der Verbreitung der Morphotypen nach Moser (1996) und der Phylogenie des kombinierten Datensatzes.

6.5.3. *Alpina*-Clade

Die Unterart *alpina* (L.) Delarbre ist polyphyletisch, sie spiegelt die natürlichen Verhältnisse nicht wider. Die von Moser (1996) als eigenständig erkannte Sippe *P. alpina* (L.) Delarbre s.str. (= subsp. *eualpina* (Hegi) Zamels) bildet den Kern des monophyletischen *Alpina*-Clades.

Der *Alpina*-Clade (siehe Abb. 15 und 29) gruppiert Akzessionen mit Chloroplasten vom *ALP*-Typ und bis auf wenige Ausnahmen (Populationen 7, 11, 12, 45) mit ITS des Nordalpen-Clades. Die zahlreichen synapomorphen Merkmale lassen den Schluss zu, dass die frühen Populationen des *Alpina*-Clades seit der beginnenden Radiation in Zentraleuropa von den Populationen der anderen *P. alpina*-Hauptclades effektiv reproduktiv isoliert und einer starken genetischer Drift unterworfen waren. Der Clade besteht aus zwei phylogenetischen Clustern, die aber weder morphologisch noch chorologisch eigenständig sind. Die einzelnen Populationen standen historisch in intensivem genetischen Austausch, weisen aktuell aber Anzeichen begrenzten Genflusses auf (Kap. 6.4.5.). Als typisches Element der Nordabdachung der Alpen und des Jura kommen die Individuen des *Alpina*-Clades regelmäßig auf Kalkgestein vor, tolerieren aber auch neutrale bis schwach saure Böden.

Der *Alpina*-Clade enthält auch Populationen des Morphotyps *cottianaea* (11, 12), des Morphotyps *millefoliata* (45) und des Morphotyps *ochroleuca* (7), die in unterschiedlichem Maße durch Hybridisierung beeinflusst sind (vgl. Kap. 6.6.1.). Die morphologische (Blattzipfelform, -anordnung und -anzahl, Wüchsigkeit, Behaarung), standörtliche (hochmontan–alpin, Lichtbedarf) und die genetische Variabilität (die Populationen 12 und 45 haben eine für diesen Clade untypische ITS) ist durch Hybridisierung an den Verbreitungsgrenzen des *Alpina*-Clades in den Zentral- und Nordwest-Alpen stark erhöht.

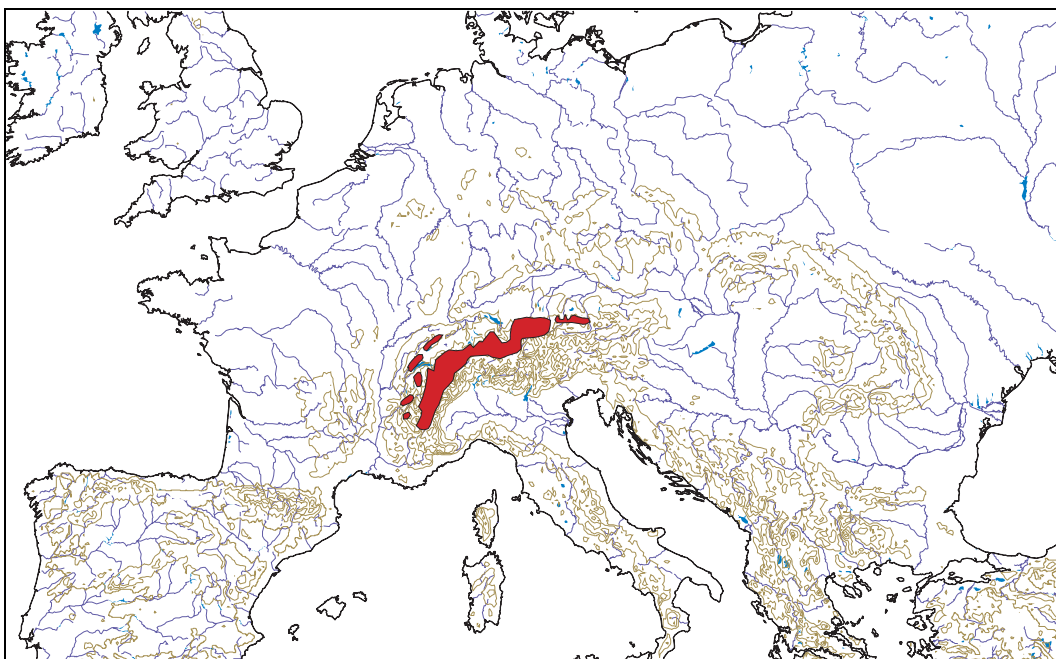


Abb. 29: Verbreitung des *Alpina*-Clades von *P. alpina* (rote Flächen), dargestellt auf der Grundlage der Verbreitung der Morphotypen nach Moser (1996) und der Phylogenie des kombinierten Datensatzes.

6.5.4. Taxonomie des Artkomplexes

Die Sektion *Preonanthus* und besonders der Artkomplex *P. alpina* befinden sich noch mitten im Prozess der Differenzierung und Speziation. Während einige Sippen bereits eigene morphologische und ökologische Merkmale aufweisen, stehen andere phylogenetisch basal. Im vorliegenden Fall sind solche Sippen durch eine fast kontinuierlich verteilte, mosaikartige Kombination plesiomorpher morphologischer und molekularer Merkmale gekennzeichnet und haben noch ursprüngliche ökologische Ansprüche.

Verwendet man die Prinzipien des Phylocodes (Cantino & al. 1999), gelingt mit Ausnahme der Hybriden eine eindeutige Zuordnung der Pflanzen zu den Clades auf Artniveau und den drei intraspezifischen Clades von *P. alpina*. Die Chloroplastentypen eignen sich dabei hervorragend als diagnostische Marker. Allein mit ihnen kann die Zugehörigkeit zu den einzelnen Clades mit gut 95%iger Sicherheit bestimmt werden. Die Schwäche dieses Systems liegt in seiner Nutzung durch den Floristen oder Vegetationskundler. Der morphologisch, ökologisch und pflanzensoziologisch eigenständige Morphotyp *apiifolia* (= subsp. *apiifolia*) konnte z.B. mit den verwendeten molekularen Markern nicht zweifelsfrei als Monophylum bestimmt werden, und wäre demnach zu verwerfen.

Die Benennung der Arten der Sektion *Preonanthus* nach den Regeln des Botanischen Codes (ICBN, Greuter & Hiepko 1995) gelingt ohne Probleme. Eine Untergliederung in die Arten: *Pulsatilla occidentalis* (Watson) Freyn, *Pulsatilla aurea* (Sommier & Levier) Juzepczuk und *Pulsatilla alpina* (L.) Delarbre würde auch die phylogenetischen Daten und die geographische Isolation der Arten repräsentieren. Die drei intraspezifischen Hauptclades von *P. alpina* ersetzen einander innerhalb des Artareals und bilden an ihren Verbreitungsgrenzen fertile Hybriden. Die Fassung als Unterarten wäre damit nach meiner Auffassung insgesamt auch berechtigt. Eine Untergliederung des Artkomplexes in Unterarten mit Hilfe nomenklatorischer Typen, die die Phylogenie der Sippen widerspiegeln, stößt aber auf Schwierigkeiten. Ich schlage deshalb einen Kompromiss vor, der dem Feldbotaniker eine Einordnung ermöglicht und die neuen Erkenntnisse respektiert.

Die im *Alpina*-Clade zusammengefassten Populationen, die das Taxon *P. alpina* subsp. *alpina* bilden, haben ausnahmslos Chloroplasten vom *ALP*-Typ und bis auf die Populationen 6, 12 und 45 eine ITS-Sequenz des Nordalpen-ITS-Clades. Da das Typusexemplar der Art diesem geographisch und morphologisch sehr gut zu fassenden Clade zuzuordnen ist, ist die treffende taxonomische Bezeichnung für die Unterart *P. alpina* (L.) Delarbre subsp. *alpina*.

Der *Alpicola*-Clade fasst die Akzessionen der morphologisch fast identischen Typen *alpicola* und *austriaca* zusammen. Der gültige Name für die Populationen ist *Pulsatilla alpina* subsp. *alpicola*

(Rouy & Fouc.) Neumayer. Die Unterart würde mit Ausnahme von Population 44 alle Individuen mit Chloroplasten vom *PIC*-Typ umfassen. Als häufigste Synonyme der Unterart *alpicola* wären die Bezeichnungen *P. micrantha* Sweet, *P. alba* Rchb., *A. scherfelii* Ullepitsch und *P. alpina* subsp. *austriaca* Aichele & Schwegler gültig.

Problematisch ist der Umgang mit den Populationen 17 (*millefoliata*-Typ, Abruzen) und 24 (*austroalpina*-Typ, Karawanken). Beide Sippen haben zwar relativ schmale Blattzipfel an den Fiederblättern 3. Ordnung, besitzen aber keine typische *alpicola*-Laubblattmorphologie und wachsen zudem auf Kalkböden. Von allen weiteren mittelitalienischen Populationen und der Population vom Monte Pollino liegen keine morphologischen und molekularen Daten vor. Der taxonomische Umgang mit den südlichen *millefoliata*-Individuen muss deshalb offen bleiben.

Der morphologisch variable *Apiifolia*-Clade (vgl. Abb. 15) kann mit Hilfe eines Typus nicht sicher beschrieben werden. Er ist diagnostisch durch Chloroplasten vom *API*-Typ, vergleichsweise breite Blattfiedern 3. Ordnung (8,8 - 14,5 mm) und einem langen ($5,1 \pm 0,7$ mm) Blättchenstiel 1. Ordnung (Mitte). gekennzeichnet. Der älteste gültige Name einer Akzession dieses Clades ist subsp. *apiifolia* Scop. Als Kompromiss ist meiner Auffassung nach die Bildung des Taxons *apiifolia* (Scop.) Nyman s.l. gerechtfertigt, der die Morphotypen *apiifolia* s.str., *cyrnea*, *font-queri*, *cantabrica*, *austroalpina* und die *millefoliata*-Populationen der Alpen (*millefoliata* p.p.) enthält. Die gelbbühende, calcifuge *apiifolia* Scop. (Nyman) s.str. könnte dann als morphologisch und ökologisch sehr gut determinierte Innengruppe erhalten bleiben. Eine Zusammenfassung der weißblütigen, calcicolen Morphotypen *font-queri*, *cantabrica*, *austroalpina* und *millefoliata* p.p. mit dem weiß- bis hellgelbbühenden, calcifugen Morphotyp *cyrnea* würde ein Paraphylum mit vorwiegend ursprünglichen molekularen, morphologischen und ökologischen Merkmalen ergeben.

6.6. Hybridisierung und Introgression

Vor allem auf Grund der intermediären morphologischen Merkmale in den Morphotypen *ochroleuca* und *cottianaea* wurde Hybridisierung und Introgression für den Artkomplex als wichtiger evolutionärer Faktor vermutet (Zimmermann 1952, Aichele & Schwegler 1957, Moser 1996). Es ist aber auch bekannt, dass Hybridsippen neben Merkmalsausprägungen, die der eines Elters entsprechen, extreme Merkmale im Sinne von Heterosis aufweisen können, oder dass sie völlig neue morphologische Merkmale zeigen (Rieseberg & Linder 1999). Nur ein Teil aller Hybriden sollte intermediäre Merkmale haben, weil Rückkreuzung, Selektion und genetische Drift die Genkombination von F1-Hybriden maßgeblich verändern. Grundsätzlich muss zwischen jungen

Hybriden, die in den letzten Generationen entstanden sind, und alten Hybridsippen unterschieden werden. Dabei stellen diese Gruppen die Extreme eines Kontinuums dar.

Die molekularen Eigenschaften, die eine Hybridpopulation des Artkomplexes indizieren, sind polymorphe ITS-Loci (vgl. Abb. 14), Widersprüche zwischen der topologischen Position der Akzessionen bzw. Haplotypen in der ITS- und cp-Phylogenie (siehe Kap. 5.3.) und bzw. oder das gemeinsame Vorkommen von Chloroplasten verschiedener genealogischer Hauptlinien in einer Population (vgl. Tab. A2, lf2-Haplotypen und lf2-Diversität).

6.6.1. Sippen mit hybridogenem Einfluss

Der bislang morphologisch charakterisierte Bastard *P. x ochroleuca* entspricht fast völlig der Vorstellung, die für eine junge, polytope Hybridsippe theoretisch zu erwarten ist. Die Eltersippen für die Population 7 und für die räumlich benachbarten Populationen 66 und 67 sind die Morphotypen *alpina* und *apiifolia*. In der Hybridpopulation 7 kommen die verschiedenen Chloroplastenlinien *API* und *ALP* der sonst getrennten Eltersippen in einer Population vor. Das gilt wahrscheinlich auch für die Populationen 66 (nur *API*-Chloroplasten) und 67 (nur *ALP*-Chloroplasten), von denen jeweils nur zwei Proben untersucht wurden. In beiden Elternpopulationen (6, 8) konnten „untypische“ Chloroplastentypen oder polymorphe ITS-Loci detektiert werden, obwohl die Pflanzen morphologisch unauffällig waren. Damit ist nachgewiesen, dass Genintrogression durch Rückkreuzung mit den Eltern vorkommt und dass die Region am Pierre Avoi eine Hybridisierungszone ist. Die Daten zeigen auch, dass die Hybriden der Population 7 wenigstens eingeschränkt fertil sind.

Fallbeispiele für morphologisch stabilisierte, alte Hybridsippen sind die Morphotypen *cottianaea*, *montis-niveae* und *cyrnea*. Die historische Hybridisierungsereignisse sind hier morphologisch nicht mehr offensichtlich.

In den Populationen der Hybridsippe *cottianaea* hat sich jeweils die ITS-Sequenz eines Elters durchgesetzt (11 Nordalpen-ITS, 12 und 51 *Apiifolia*-ITS der basalen Polytomie). Die ITS-Sequenzen innerhalb der Populationen sind schon homogenisiert, die der gesamten Sippe noch nicht. Die Isolation und Herausbildung des *cottianaea*-Morphotyps in der heutigen Form kann erst nach der genetischen Diversifikation des *alpina*-Morphotyps erfolgt sein, da die Sippe auch abgeleitete Chloroplasten vom *ALP*-Typ enthält. Neben den Chloroplastentypen der Eltern, die noch in den Populationen nachweisbar sind, treten eigene, abgeleitete Haplotypen auf. Die lokalendemische Sippe der Cottischen Alpen ist wahrscheinlich innerhalb der letzten 400000 Jahre entstanden (vgl. Kap. 5.4.2.) und seit etwa dieser Zeit reproduktiv isoliert. *Cottianaea*-Individuen zeigen extreme Merkmale, die als positiver Heterosiseffekt gedeutet werden, wie eine Wuchshöhe bis zu 65 cm, die größten Laubblätter und die meisten Blüten pro Individuum innerhalb des Artkomplexes. Die Sippe zeigt intermediäre Merkmale, mit der cremeweißen bis hellgelben Blütenfarbe, und mit einer verdoppelten

Tepalenanzahl auch ein neues Merkmal. Die Pflanzen etablieren sich u. a. an ruderalen Standorten in der subalpinen und alpinen Vegetationszone. Auch dieses Merkmal ist neu und einzigartig innerhalb des Artkomplexes.

Extreme und neue Merkmale (Blattzipfelgröße, Wuchshöhe, die höchste Schattentoleranz) sind auch für die drei *montis-niveae*-Akzessionen charakteristisch. Die Akzessionen bilden zusammen mit der *austroalpina*-Population 18 einen gut gestützten ITS-Clade (vgl. Abb. 13), der einen hohen Homogenisierungsgrad der ITS-Region widerspiegelt. Die einzelnen Populationen besitzen entweder Chloroplasten vom *API*-Typ (16; 13 und 16) oder vom *PIC*-Typ (immer 28). Nach den Sequenzmerkmalen ist aus den Eltern vom *austroalpina*- und *austriaca*-Typ eine ursprüngliche kleine, ostalpine Hybridpopulation entstanden, hat sich reproduktiv isoliert entwickelt und später ausgebreitet. In den getrennten Populationen hat sich dann jeweils ein Chloroplastentyp (bzw. ein Chloroplastentyp und sein Abkömmling in Population 26) durchgesetzt.

Der korsische Morphotyp *cyrnea* zeichnet sich nicht durch besondere morphologische oder ökologische Merkmale aus. Die heutige Sippe ist dem *austroalpina*- und *millefoliata*-Typ morphologisch ähnlich. *Cyrnea*-Individuen weisen eine homogenisierte, abgeleitete ITS-Sequenz auf und besitzen entweder den urtümlichen Chloroplastentyp *API-cors* oder den stark abgeleiteten Haplotyp 8. Eine frühe Korsikapopulation muss also spätpleistozän noch einmal durch *austroalpina*- oder *apiifolia*-Migranten hybridogen beeinflusst worden sein (vgl. Abb. 24). Es kann aber nicht entschieden werden, ob die heutige Merkmalskombination durch genetische Drift oder durch Genintrogression der *austroalpina* oder durch beides verursacht wurde. Der urtümliche Haplotyp *API-cors* ist in Populationen zu finden, die auf Urgesteinsböden wachsen. Die ökologischen Bedürfnisse und der Chloroplastenhaplotyp entsprechen damit einer Merkmalskombination, die für die frühen Europapopulationen prognostiziert wurden. Die Kombination der morphologischen Merkmale weicht allerdings von der der hypothetischen ersten zentraleuropäischen Alpenanemone ab.

Die molekulare Analyse ergibt Anzeichen für Hybridisierung bzw. Genintrogression, wenn sich einzelne Pflanzen oder Populationen morphologisch und durch ihre ITS-Sequenz nicht von ihrem Verwandtschaftskreis unterscheiden, aber fremde Chloroplasten besitzen (*chloroplast capture*, vgl. Tab. A2 und Kap. 5.3.). In der *alpicola*-Population 32 in der Auvergne treten auch *API*-Haplotypen (5, 7) auf. Da dort einige *apiifolia*-Individuen mit den Chloroplastentypen 5 und 7 in räumlicher Nähe vorkommen, sollte das Hybridisierungsereignis bzw. die Rückkreuzungen noch nicht sehr lange zurückliegen. In der *alpicola*-Population 35 in der Sierra Cantabrica konnte mit dem Haplotyp *API-sc* ein basaler, abgeleiteter Chloroplast einer fremden Linie in einer Empfängersippe detektiert werden. Die Introgressionsvorgänge bzw. *chloroplast capture* liegen offensichtlich schon sehr lange zurück. Die Verteilung der Chloroplastentypen auf die ITS-Clades zeigt, dass *lineage sorting* innerhalb des Artkomplexes sehr effektiv gewesen sein muss. Es ist deshalb nicht anzunehmen, dass die ungewöhnlichen Chloroplasten der Populationen 32 und 35 Reste alter Chloroplastenlinien der *alpicola*-Verwandtschaft sind, obwohl das im zweiten Fall nicht völlig auszuschließen ist.

Unklar ist der Status der Individuen 20_1 und 21_9 und der Population 48. Sie besitzen jeweils *API*-Chloroplasten (14, 16) und eine ITS-Sequenz, die eher *alpicola*-typisch ist. Die Kombination ursprünglicher molekularer Merkmale erinnert an die der *montis-niveae*-Individuen. Die Sequenzkombination könnte molekular als die der *montis-niveae*-Vorfahren aufgefasst werden. Auch in diesem Fall ergeben sich zwei Interpretationsmöglichkeiten. Die Pflanzen sind entweder Nachkommen ursprünglicher Individuen des Artkomplexes in Zentraleuropa oder sie sind durch Hybridisierung von *Apifolia*-Clade- und *Alpicola*-Clade-Eltern entstanden.

Hybridzonen treten derzeit dort auf, wo an den Arealgrenzen und den in Überlappungsgebieten die ökologischen Ansprüche beider Eltern am gleichen Standort erfüllt sind (Puy de Sancy, Auvergne; Pierre Avoi, Oberalppass und Schynige Platte, alle N- und NW-Alpen). Es ist naheliegend, dass diese Bedingungen auch für die historischen Hybridzonen, die Südostalpen bzw. die Bärenschutzklamm, die Sierra Cantabrica und für Korsika erfüllt waren.

7. Thesen zur Dissertation

Die Phylogeographie des Artkomplexes *Pulsatilla alpina* (Ranunculaceae)

In der Sektion *Preonanthus* werden die Arten *Pulsatilla occidentalis*, *P. aurea* und *P. alpina* zusammengefasst. Der stark diverse Artkomplex *P. alpina* wurde weiter in bis zu 11 Morphotypen unterteilt. In der vorliegenden Arbeit werden die phylogenetischen Beziehungen dieser Sippen, die Evolution ihrer Merkmale und ihre Migrationsgeschichte untersucht und die Ursachen, die die heutige Verteilung der Verwandtschaftslinien bewirkt haben, diskutiert. Die einleitenden Studien führten zu den Hypothesen in Kapitel 2.1, die im Verlauf dieser Untersuchungen getestet wurden. Die Ergebnisse werden in Kapitel 6. ausführlich und chronologisch diskutiert.

(1) Sektionengliederung und Stellung der Sektion *Preonanthus* in der Gattung *Pulsatilla*

Die phylogenetische Analyse der ITS-Region und des *trnL-trnF*-Spacers rechtfertigt eine Unterteilung in die drei basal getrennten, monophyletischen *Pulsatilla*-Hauptclades: (i) *P. kostyczewii* (Sektion *Iostemon*), (ii) echte Küchenschellen mit *P. chinensis* (Sektion *Semicampanaria*) und den Vertretern der Sektion *Pulsatilla* sowie (iii) die „Alpenanemonen“ der Sektion *Preonanthus*.

Die Radiation der letzten gemeinsamen Vorfahren der rezenten Vertreter der Gattung begann im Miozän vor 8,6 Ma mit der Abspaltung von *P. kostyczewii* in den Gebirgen Asiens. *Pulsatilla kostyczewii* weist zahlreiche apomorphe molekulare Merkmale auf.

Die letzten gemeinsamen Vorfahren der echten Küchenschellen und der Alpenanemonen haben sich vor 7,5 Ma getrennt. Die adaptive Radiation der echten Küchenschellen korreliert zeitlich sehr gut mit der Abkühlung und größeren Trockenheit im Miozän, bzw. der Ausweitung der temperaten Steppen in Eurasien.

(2) Phylogenie und Alter der Sektion *Preonanthus*

Die Daten bestätigen eine Monophylie der Sektion *Preonanthus* und die Untergliederung des Artkomplexes nach den Hypothesen von Aichele & Schwegler (1957) und Moser (1996).

Die Diversifikation der Sektion *Preonanthus* begann vor 5,6 Ma mit der Abtrennung der heute in den Rocky Mountains vorkommenden *P. occidentalis*. Seit der Plio-Pleistozängrenze entwickeln sich die Populationen von *Pulsatilla alpina* und der kaukasischen *P. aurea* getrennt.

Die Ausgangshypothesen zur intraspezifischen Gliederung von *P. alpina* nach Aichele & Schwegler (1957), Tutin (1964), Damboldt & Zimmermann (1974), Akeroyd (1993) oder Moser (1996) müssen abgelehnt werden. Die Morphotypen nach Moser (1996) repräsentieren zwar mehrheitlich verwandtschaftliche Sippen, sie sind aber hierarchisch untereinander nicht gleichwertig. Keiner der von Moser determinierten Morphotypen bildete sich erst im letzten Glazial heraus.

Die adaptive Radiation von *P. alpina* in Europa begann vor 1,4 Ma und führte bis vor etwa 0,4 Ma zur Herausbildung der Hauptverwandtschaftskreise, dem *Alpicola*-Clade, *Apiifolia*-Clade und *Alpina*-Clade.

(3) Die Phylogeographie des Artkomplexes

Die europäischen Gebirge wurden über den südlichen Balkan und entlang der Apenninen besiedelt. Aus den Daten lässt sich der Beginn der adaptiven Radiation für *P. alpina* und ein frühes Diversifikationszentrum auf den Apenninen, Korsika und den südwestlichen Alpen ableiten. Die Hauptmigrationsrichtung innerhalb von Europa verlief von Südosten nach Westen.

Die drei Hauptverwandtschaftskreise sind genetisch voneinander isoliert und zeigen eine deutliche regionale sowie bodenchemische Bindung. Der überregionale Genfluss (über 500 km) ist deutlich eingeschränkt.

Infolge der engen Bandbreite und der hohen Konstanz der ökologischen Ansprüche von *P. alpina* oszillierte das Areal während des Pleistozäns sehr stark. Die Vorposten-Populationen im Süden der Alpen und die Populationen der Mittelgebirge des herzynischen Bogens sind Reliktpopulationen, die durch Arealregression im Zuge klimatischer Veränderungen isoliert wurden. Die Spenderpopulationen der heutigen Vorkommen befanden sich dennoch überwiegend in den Vorgebirgsregionen der heutigen Verbreitungsgebiete oder in den Gebirgen selbst.

(4) Die Evolution der Merkmale des Artkomplexes

Die ersten europäischen Populationen gehen auf feinblättrige, kalktolerante, tatsächlich weißblühende Vorfahren zurück. Die Anpassung an Kalkgesteinsböden ist nur einmal am Beginn der europäischen Radiation erfolgt und ging im *Alpicola*-Clade und im *apiifolia*-Morphotyp und sekundär wieder verloren. Die gelbe Blütenfarbe innerhalb des Morphotyps *apiifolia* ist ein abgeleitetes Merkmal.

Die ITS-Evolution von *P. alpina* diagnostiziert beispielhaft ein lokales Entstehen und Ausharren von Populationen sowie die Rekombination expansiver Metapopulationen an ihren Verbreitungsgrenzen.

Die Ergebnisse der Evolution des Chloroplastenspacers weisen darauf hin, dass der Anteil von Duplikationen unmittelbarer Nachbarsequenzen unterschätzt wird und dass das *slipped-strand-mispairing*-Modell der Mikrosatelliten evolution korrekturbedürftig ist. Eine größere Längenänderung eines Mikrosatelliten muss nicht schrittweise erfolgen, sondern kann auch durch eine einzige Duplikation oder Deletion verursacht werden.

Kontinuierliche morphologische Merkmale divergieren innerhalb von *P. alpina* sehr schnell, wesentlich schneller als die Artbildung. Eine Kombination dieser Merkmale eignet sich auf intraspezifischen Niveau sehr gut als diagnostischer Marker für die phylogenetische Verwandtschaft.

(5) Die Sippen von *Pulsatilla alpina*

Alpicola-Clade

Der calcifuge *Alpicola*-Clade vereinigt fast alle Populationen der Morphotypen *alpicola* und *austriaca*. Weder die Vertreter des *alpicola*- oder *austriaca*-Morphotyps noch der gesamte *Alpicola*-Clade sind phylogenetisch deutlich ursprünglicher bzw. älter als die anderen Sippen von *P. alpina*.

Die Vorfahren des *Alpicola*-Clades etablierten sich zuerst in den Ostalpen und darauf in den südlichen Karpaten. Nach einer schnellen Expansion nach Westen in die Sierra Cantabrica haben die Populationen in einer zweiten Migrationswelle von Nordspanien ausgehend das herzynische Gebirge erreicht und sich nach Osten bis in die Hohe Tatra ausgedehnt.

Die *alpicola*-Population des Brockens kommt seit dem letzten Glazial ununterbrochen in der Harzregion vor und ist seitdem biogeographisch isoliert.

***Alpina*-Clade**

Der *Alpina*-Clade enthält die Populationen des monophyletischen, calcicolen, morphologisch einheitlichen aber genetisch diversen *alpina*-Morphotyps als Kernsippe.

Der *Alpina*-Clade hat ein auf die Nord- und Nordwestalpen sowie den Jura beschränktes Areal. Der Genfluss ist aktuell zwischen den Teilverbreitungsgebieten und auch innerhalb des nordwestalpischen Areals eingeschränkt.

Die Morphotypen *alpina* s.str., *millefoliata*, *font-queri* und *cyrnea* bilden keine monophyletische Sippe. Die Unterart *alpina* s.l. ist polyphyletisch.

***Apiifolia*-Clade**

Der *Apiifolia*-Clade enthält die Morphotypen *austroalpina*, *cantabrica*, *cyrnea*, *font-queri* und *millefoliata* als phylogenetische Basisgruppen und den Morphotyp *apiifolia* als Innengruppe. Die Individuen des Morphotyps *apiifolia* sind phylogenetisch abgeleitet, relativ jung und im Vergleich zu anderen Sippen genetisch mäßig variabel.

Die Populationen des *Apiifolia*-Clades dominieren im Süden und Westen des Areals von *P. alpina*.

Die korsische Unterart *cyrnea* stammt von Individuen des *millefoliata*- und des *apiifolia*-Morphotyps ab. Die Individuen der Morphotypen *millefoliata* und *font-queri* hatten keinen gemeinsamen und von allen anderen phylogenetischen Clades getrennten Entwicklungsweg. Der Morphotyp *montis-niveae* hat sich nicht allopatrisch vom *austroalpina*-Typ differenziert.

(6) Hybridisierung und Introgression

Hybridisierung und Introgression zwischen Individuen verschiedener Unterarten bzw. verschiedener Hauptclades tritt regelmäßig auf. Bevorzugte Hybridzonen sind Standorte, an denen die ökologischen Erfordernisse mehrerer Morphotypen gewährleistet sind.

Der Morphotyp *ochroleuca* ist ein junger, polytopter Hybrid aus den Eltermorphotypen *alpina* und *apiifolia*. Der Morphotyp *cottianaea* ist eine alte, stabile Hybridsippe, die unter Beteiligung von *Alpina*- und ursprünglichen *Apiifolia*-Clade-Individuen entstanden ist. Die Populationen des *Alpicola*-Clade waren und sind reproduktiv nicht vollkommen isoliert. Eine hybridogene Vergangenheit haben auch die Morphotypen *montis-niveae* und *cyrnea*.

8. Literatur

- Abbott, R.J., Chapman, H.M., Crawford, R.M.M. & Forbes, D.G. (1995): Molecular diversity and derivations of populations of *Silene acaulis* and *Saxifraga oppositifolia* from the high Arctic and more southerly latitudes. In: Mol. Ecol. **4**: 199-207.
- Abbott, R.J., Smith, L.C., Milne, R. I., Crawford, R.M.M., Wolf, K. & Balfour, J. (2000): Molecular analysis of plant migration and refugia in the Arctic. In: Science **289**: 1343-1346.
- Akeroyd, J.R. (1993): *Pulsatilla* Miller. In: Tutin & al. (Eds.): Flora Europaea **1**. Psilotaceae to Platanaceae. 2nd ed. (pp. 264-266). Cambridge: Cambridge University Press.
- Aichele, D. & Schwegler, H.W. (1957): Die Taxonomie der Gattung *Pulsatilla*. In: Feddes Rep. **60**: 1-230.
- Appels, R. & Honeycutt, R.L. (1982): rDNA: Evolution over a billion years. In: Dutta, S.K. (Ed.): DNA systematics, Vol. **2**. Plants. (pp. 81-135). Boca Raton: CRC Press.
- Arnheim, N. (1983): Concerted evolution in multigene families. In: Nei, M. & Koehn, R.(Eds.): Evolution of genes and proteins (pp. 38-61). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Avice, J.C. (1987): Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. In: Ann. Rev. Ecol. Syst. **18**: 489-522.
- Babcock, E.B. (1947): The genus *Crepis*. Berkeley: University of California Press.
- Baum, B.R. (1992): Combining trees as a way of combining data sets for phylogenetic inference, and the desirability of combining gene trees. In: Taxon **41**: 3-10.
- Baumberger, H. (1970): Chromosomenbestimmungen und Karyotypanalysen bei den Gattungen *Anemone*, *Hepatica*, *Pulsatilla*. In: Ber. Schweiz. Bot. Ges. **80**: 42-61.
- Beug, H.-J., Henrion, I. & Schmäuser, A. (1999): Landschaftsgeschichte im Hochharz - Die Entwicklung der Wälder und Moore seit der letzten Eiszeit. Clausthal-Zellerfeld: Papierflieger.
- Blattner, F.R. (1999): Direct amplification of the entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR. In: BioTechniques **27**: 1180-1186.
- Blattner, F.R. (2004): Phylogenetic analysis of *Hordeum* (Poaceae) as inferred by nuclear rDNA ITS sequences. In: Mol. Phylogenet. Evol. **33**: 289-299.
- Blattner, F.R., Weising, K., Baenfer, G., Maschwitz, U., & Fiala, B. (2001): Molecular analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae). In: Mol. Phylogenet. Evol. **19**: 331-344.
- Bledsoe, A.H., & Raikow, R.J. (1990): A quantitative assessment of congruence between molecular and nonmolecular estimates of phylogeny. In: J. Mol. Evol. **30**: 247-259.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. & Davis, R.M. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. In: Am. J. Hum. Genet. **32**: 314-331.
- Bremer, K. (1988): The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. In: Evolution **42**: 795-803.
- Britton, T., Oxelman B., Vinnersten A. & Bremer, K. (2002): Phylogenetic dating with confidence intervals using mean path lengths: In: Mol. Phyl. Evol. **24**: 58-65.
- Brochmann, C., Gabrielsen, T.M., Hagen, A. & Tollefsrud, M.M. (1996a): Seed dispersal and molecular phylogeography: glacial survival, tabula rasa, or does it really matter? In: Det Norske Videnskaps-Akademi. I. Matematisk-Naturvitenskapelig Klasse, Avhandling, Ny Serie **18**: 53-67.
- Brochmann, C., Nilsson, T. & Gabrielsen, T.M. (1996b): A classic example of postglacial allopolyploid speciation re-examined using RAPD markers and nucleotide sequences: *Saxifraga osloensis* (Saxifragaceae). In: Symbolae Botanicae Upsalensis **31**: 75-89.
- Bull, J.J., Huelsenbeck, J.P., Cunningham, C.W., Swofford, D.L. & Waddell, P.J. (1993): Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. In: Syst. Biol. **42**: 384-397.
- Burgman, M.A. & Williams, M.R. (1995): Analysis of the spatial pattern of arthropod fauna of jarrah foliage using a Mantel correlogram. In: Aust. J. Ecol. **20**: 455-457.

- Cantino, P.D., Bryant, H.N., de Queiroz, K., Donoghue, M.J., Eriksson, T., Hillis, D.M. & Lee, M.S.Y. (1999): Species names in phylogenetic nomenclature. In: *Syst. Biol.* **48**: 790-807.
- Casgrain, P. & Legendre, P. (1999): The R PACKAGE for multivariate and spatial analysis. Vers. 4.0. User's Manual. Montreal: Departement of Biological Sciences, University of Montreal.
- Chase, M.W. & Hills, H.H. (1991): Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. In: *Taxon* **40**: 215-220.
- Christ, H. (1882): *Das Pflanzenleben der Schweiz*. Zürich.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000): TCS: a computer program to estimate gene genealogies. In: *Mol. Ecol.* **9**: 1657-1660.
- Clement, M., Derington, J. & Posada, D. (2001): TCS: estimating gene genealogies Vers. 1.13. Brigham Young University: http://InBio.byu.edu/Faculty/kac/crandall_lab/tcs.htm.
- Comes, H.P. & Kadereit, J.W. (1998): The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. In: *Trends Plant Sci.* **3**: 432-438.
- Crandall, K.A. & Templeton, A.R. (1993): Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. In: *Genetics* **134**: 959-969.
- Damboldt, J. & Zimmermann, W. (1974): *Pulsatilla*. In: Hegi, G. (Hrsg.): *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. **3/3** (pp. 206-225).
- Donoghue, M.J., Olmstead, R.G., Smith, J.F., & Palmer, J.D. (1992): Phylogenetic relationships of the Dipsacales based on *rbcL* sequences. In: *Ann. Mo. Bot. Gard.* **79**: 333-345.
- Dover, G.A (1986): Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. In: *Trends Genet.* **2**: 159-165.
- Eckelmann, S. (2002): Biodiversität der Gattung *Ocimum* L., insbesondere der Kultursippen. In: Zentralstelle für Agrardokumentation und -information (ZADI), Informationszentrum Biologische Vielfalt (IBV) (Hrsg.): *Schriften zu Genetischen Ressourcen Bd. 19* (pp. 1-151) Bonn: Druckerei Martin Roesberg.
- Ehrendorfer, F. & Samuel, R. (2000): Comments on S.B. Hoot's interpretation of Southern Hemisphere relationships in *Anemone* (Ranunculaceae) based on molecular data (*Amer. J. Bot.* **87** (6, Suppl.): 154-155). In: *Taxon* **49**: 781-784.
- Efron, B. (1982): The jackknife, the bootstrap and other resampling plans. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, Monograph **38**. Philadelphia: SIAM.
- Ellenberg, H. (1996): *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen*, 5. Aufl. Stuttgart: UTB.
- Ellenberg, H., Weber, H.E., Düll, R., Wirth, V., Werner, W. & Paulißen, D. (1992): Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa. In: *Scr. Geobot.* **18**: 1-258.
- Ellegren, H. (2000): Microsatellite mutations in the germline: Implications for evolutionary inference. In: *Trends Genet.* **16**: 551-558.
- Ellegren, H. (2002): Microsatellite evolution: A battle between replication slippage and point mutation. In: *Trends Genet.* **18**: 70.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. In: *Genetics* **131**: 479-491.
- Farris, J.S. (1970): Methods for computing Wagner trees. In: *Syst. Zool.* **19**: 83-92.
- Farris, J.S. (1989): The retention index and the rescaled consistency index. In: *Cladistics* **5**: 417-419.
- Felsenstein, J. (1978): Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. In: *Syst. Zool.* **27**: 401-410.
- Felsenstein, J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. In: *J. Mol. Evol.* **17**: 368-376.
- Felsenstein, J. (1983): Parsimony in systematics: Biological and statistical issues. In: *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **14**: 313-333.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. In: *Evolution* **39**: 783-791.
- Felsenstein, J. (1988): Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. In: *Annu. Rev. Gen.* **22**: 521-565.
- Felsenstein, J. & Sober, E. (1986): Parsimony and likelihood: An exchange. In: *Syst. Zool.* **35**: 617-626.
- Fitch, W.M. & Margoliash, E. (1967): Construction of phylogenetic trees. In: *Science* **155**: 279-284.

- Gamisans, J. (1985): Catalogue des plantes vasculaires de la Corse. Parc Naturel Regional de la Corse. Ajaccio.
- Greuter, W. & Hiepko, P. (1995): Internationaler Code der Botanischen Nomenklatur. In: Englera **15**: 1-150.
- Gugerli, F. & Holderegger, R. (2001): Nunatak survival, tabula rasa and the influence of the Pleistocene ice-ages on plant evolution in mountain areas. In: Trends Plant Sci. **6**: 397-398.
- Hang, S., McLewin, W. & Fay, M.F. (unpubl.): Molecular phylogeny of *Helleborus* (Ranunculaceae), with an emphasis on the East Asia-Mediterranean disjunction.
- Harris, H. (1966): Enzyme polymorphisms in man. In: Proc. R. Soc. Lond. Ser. B **164**: 298-310.
- Harris, S.A. (1995): Systematic and randomly amplified polymorphic DNA in the genus *Leucaena* Benth. (Mimosoideae, Leguminosae). In: Plant Syst. Evol. **197**: 195-208.
- Haeupler, H. (1970): Vorschläge zur Abgrenzung der Höhenstufen der Vegetation im Rahmen der Mitteleuropakartierung. In: Gött. Flor. Rundbr. **4**: 54-62.
- Heer, O. (1885): Über die nivale Flora der Schweiz. Neue Denkschr. Allg. Schweiz. Ges. Naturwiss. **29**.
- Heynert, H. (1970): Blühende Bergheimat. Leipzig, Jena, Berlin: Urania Verlag.
- Hillis, D.M. (1987): Molecular versus morphological approaches to systematics. In: Ann. Rev. Ecol. Syst. **18**: 23-42.
- Hillis, D.M. (1995): Approaches for assessing phylogenetic accuracy. In: Syst. Biol. **44**: 3-16.
- Hillis, D.M., & J.P. Huelsenbeck. (1992): Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. In: J. Hered. **83**: 189-195.
- Hillis, D.M. & Bull, J.J. (1993): An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. In: Syst. Biol. **42**: 182-192.
- Holder, M.T. & Lewis, P.O. (2003): Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. In: Nat. Rev. Gen. **4**: 275-284.
- Hoot, S.B., Reznicek, A.A. & Palmer, J. (1994): Phylogenetic relationships in *Anemone* (Ranunculaceae) based on morphology and chloroplast DNA. In: Syst. Bot. **19**: 169-200.
- Hoot, S.B. & Crane, P.R. (1995): Interfamilial relationships in the Ranunculidae based on molecular systematics. In: Plant Syst. Evol. (Suppl.) **9**: 119-131.
- Hubby, J.L. & Lewontin, R.C. (1966): A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. In: Genetics **54**: 577-594.
- Huelsenbeck, J.P. (1991): Tree-length distribution skewness: an indicator of phylogenetic information. In: Syst. Zool. **40**: 257-270.
- Huelsenbeck, J.P., Bull, J.J. & Cunningham, C.W. (1996): Combining data in phylogenetic analysis. In: Trends Ecol. Evol. **11**: 152-158.
- Hungerer, B.K. & Kadereit, J. W. (1998): The phylogeny and biogeography of *Gentiana* L. sect. *Ciminalis* (Adans.) Dumort.: A historical interpretation of distribution ranges in the European high mountains. In: Persp. Plant Ecol. Evol. Syst. **1**: 121-135.
- Huson, H. (1998): SplitsTree: Analyzing and visualizing evolutionary data. In: Bioinformatics **14**: 68-73.
- Huynh, K.L. (1970): Le pollen du genre *Anemone* et du genre *Hepatica* et leur taxonomie. In: Pollen et Spores **12**: 329-364.
- Jalas, J. & Suominen, J. (1989): Atlas Florae Europaeae. Distribution of vascular plants in Europe. **8**. Nymphaeaceae to Ranunculaceae. Helsinki: Comm. Mapping Flora of Europe/Soc. Biol. Fenn. Vanamo.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1998): Multiple sequence alignment with Clustal X. In: Trends Biochem. Sci. **23**: 403-405.
- Jensen, U., Hoot, S.B., Johansson, J.T. & Kosuge, K. (1995): Systematics and phylogeny of the Ranunculaceae - a revised family concept on the basis of molecular data. In: Plant Syst. Evol. (Suppl.) **9**: 273-280.
- Jermiin, L.S. (1996): K2WuLi version 1.0. Camberra: Australian National University.
- Jin, L. & Nei, M. (1990): Limitations of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis. In: Mol. Biol. Evol. **7**: 82-102.
- Jukes, T.H. & Cantor, C.R. (1969): Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (Ed.): Mammalian protein metabolism (pp. 21-132). New York: Academic press.

- Kelchner, S.A. (2000): The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. In: *Ann. Mo. Bot. Gard.* **87**: 482-498.
- Kellog, E.A., Mason, R., Appels, R. & Hsiao, C. (1994): When molecules and molecules clash. II. How do we reconcile four incongruent data sets? In: *Amer. J. Bot. (Suppl.)* **81**: 164.
- Kimura, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. In: *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Kingman, J.F.C. (1982): The coalescent. In: *Stoch. Proc. Appl.* **13**: 235-248.
- Kison, H.-U., Karste, G. & Wegener, U. (1994): Die Pflanzenwelt. In: Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt, Abt. Naturschutz (Hrsg.): *Naturschutz im Land Sachsen-Anhalt Sonderheft, 31. Jahrg.* (pp. 14-25). Dessau: Druckhaus Dessau GmbH.
- Kluge, A.G. & Farris, J.S. (1969): Quantitative phyletics and the evolution of anurans. In: *Syst. Zool.* **18**: 1-32.
- Knowles, L.L. & Maddison, W.P. (2002): Statistical phylogeography. In: *Mol. Ecol.* **11**: 2623-2635.
- Kropf, M., Kadereit, J.W. & Comes, H.P. (2002): Late Quaternary distributional stasis in the submediterranean mountain plant *Anthyllis montana* L. (Fabaceae) inferred from ITS sequences and amplified fragment length polymorphism markers. In: *Mol. Ecol.* **11**: 447-463.
- Kuhner, M.K., & Felsenstein, J. (1994): A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. In: *Mol. Biol. Evol.* **11**: 459-468.
- Lainz, M. & Montserrat, P. (1984): Notulae taxinomicae chorologicae, nomenclaturales, bibliographicae aut philologicae in opus "Flora iberica" intendentes: *Pulsatilla alpina* (L.) Delarbre subsp. *font-queri* Lainz et Monts., subsp. nov. In: *Anales Jard. Bot. Madrid* **41**: 219.
- Langley, C.H. & Fitch, W.M. (1974): An examination of the constancy of the rate of molecular evolution. In: *J. Mol. Evol.* **3**: 161-177.
- Laroche, J., Li, P., Maggia, L. & Bousquet, J. (1997): Molecular evolution of angiosperm mitochondrial introns and exons. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5722-5727.
- Levinson, G. & Gutman, G.A. (1987): Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. In: *Mol. Biol. Evol.* **4**: 203-221.
- Li, P. & Bousquet, J. (1992): Relative-rate test for nucleotide substitutions between two lineages. In: *Mol. Biol. Evol.* **9**: 1185-1189.
- Li, W.H., & Wu, C.I. (1985): A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. In: *Mol. Biol. Evol.* **2**: 150-174.
- Mai, D.H. (1995): *Tertiäre Vegetationsgeschichte Europas - Methoden und Ergebnisse*. Jena, Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Martins, E.P. (2003): COMPARE, version 4.5. Computer programs for the statistical analysis of comparative data. Distributed by the author at: <http://compare.bio.indiana.edu/>. Bloomington: Department of Biology, Indiana University.
- Martins, E.P. & Hansen, T.F. (1997): Phylogenies and the comparative method: A general approach to incorporating phylogenetic information into the analysis of interspecific data. In: *Amer. Nat.* **149**: 646-667.
- Martins, E.P., Diniz, J.A.F., & Housworth, E. A. (2002): Adaptive constraints and the phylogenetic comparative method: A computer simulation test. In: *Evolution* **56**: 1-13.
- Matos, J.A. & Schaal, B.A. (2000): Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: A coalescent approach to hybridization. In: *Evolution* **54**: 1218-1233.
- Meusel, H., Jäger, E., Weinert, E. (1965): *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora*. Bd. 1 (Text und Karten). Jena: Fischer-Verlag.
- Miikeda, O., Kita, K., Handa, T. & Yukawa, T. (unpubl.): Phylogenetic relationship of subtribe *Clematidinae* (Ranunculaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences.
- Moser, D.-M. (1996): *Pulsatilla alpina* (L.) Delarbre s.l. Sippendifferenzierung und Chorologie in der Holarktis. Inauguraldiss. Syst.-Geobot. Inst. Univ. Bern.
- Mullis, K.B & Falloona, F. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed reaction. In: *Meth. Enzym.* **155**: 335-350.
- Nei, M. (1987): *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- Nuttall, G.H.F. (1904): *Blood immunity and blood relationship*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Oden, N.L. & Sokal, R.F. (1986): Directional autocorrelation: An extension of spatial correlograms to two dimensions. In: *Syst. Zool.* **35**: 608-617.
- Olmstead, R.G. & Sweere, J.A. (1994): Combining data in phylogenetic systematics: An empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. In: *Syst. Biol.* **43**: 467-481.
- Palmer, J.D. & Zamir, D. (1982): Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 5006-5010.
- Palmer, J.D., Jansen, R.K., Michaels, H.J., Chase, M.W. & Manhart, J.R. (1988): Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. In: *Ann. Mo. Bot. Gard.* **75**: 1180-1206.
- Petersen, G., Seberg, O., Davis, J.I., Stevenson, D.W., Campbell, L.M., Freudenstein, J.V., Goldman, D.H., Hardy, C.R., Michelangeli, F.A., Simmons, M.P. & Specht, C.D. (2003): Mitochondrial DNA in Monocot Phylogeny. In: *Monocots III: Proceedings of the III Monocot meeting*. Rancho Santa Ana Botanical Gardens.
- Posada, D. & Crandall K.A (1998): Modeltest: Testing the model of DNA substitution. In: *Bioinformatics* **14**: 817-818.
- Posada, D., Crandall, K.A. & Templeton, A.R. (2000): GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. In: *Mol. Ecol.* **9**: 487-488.
- Rambaut, A. (2002): Se-Al sequence alignment editor v 2.0 (Software). Oxford: Department of Zoology, University of Oxford.
- Rieseberg, L.H. & Linder, C.R. (1999): Hybrid classification: Insights from genetic map-based studies of experimental hybrids. In: *Ecology* **80**: 361-370.
- Reynolds, J., Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1983): Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. In: *Genetics* **105**: 767-779.
- Jäger, E. J. & Werner, K. (1995): Exkursionsflora von Deutschland. Rothmaler, W. (Begr.): Bd. 3: Gefäßpflanzen: Atlasband. 9. Aufl. Jena: G. Fischer Verlag.
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., & Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. In: *Science* **230**: 1350-1354.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. In: *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sanderson, M.J. (1997): A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. In: *Mol. Biol. Evol.* **14**: 1218-1213.
- Sanderson, M.J. (2002): Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: A penalized likelihood approach. In: *Mol. Biol. Evol.* **19**: 101-109.
- Sanderson, M.J. (2003): r8s version 1.60. Analysis of rates ("r8s") of evolution. Available at: <http://ginger.ucdavis.edu/r8s/>.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sarich, V.M. & Wilson A.C. (1973): Generation time and genomic evolution in primates. In: *Science* **179**: 1144-1147.
- Schmid, K. (2001): Populationsgenetik I. Nichtzufällige Paarung I. Populationsstruktur. Jena: Skript der Vorlesung der Friedrich-Schiller-Universität WS2001/2002.
- Schneider, S., Roessli, D., & Excoffier, L. (2000): Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Geneva: Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Schubert, R. (1960): Die zwergstrauchreichen azidiphilen Pflanzengesellschaften Mitteldeutschlands. Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Schuettpelz, E., Hoot, S.B., Samuel, R. & Ehrendorfer, F. (2002): Multiple origins of Southern Hemisphere *Anemone* (Ranunculaceae) based on plastid and nuclear sequence data. In: *Plant Syst. Evol* **231**: 143-151.
- Slatkin, M. (1995): A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. In: *Genetics* **139**: 457-462.
- Stanley, S.M. (2001): Historische Geologie. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Stehlik, I. (2000): Nunataks and peripheral refugia for alpine plants during quaternary glaciation in the middle part of the Alps. In: *Bot. Helv.* **110**: 25-30.
- Stehlik, I. (2002): Glacial history of the alpine *Rumex nivalis* (Polygonaceae): a comparison of common phylogeographic methods with nested clade analysis. In: *Amer. J. Bot.* **89**: 2007-2016.

- Stehlik I., Schneller, J.J. & Bachmann K. (2001a): Resistance or emigration: response of the high-alpine plant *Eritrichium nanum* (L.) Gaudin to the ice age within the Central Alps. In: *Mol. Ecol.* **10**: 357-370.
- Stehlik, I., Tribsch, A. & Schönswetter, P. (2001b): Erstes gemeinsames Meeting zur Phylogeographie von arktischen und alpinen Pflanzen in Zürich, 1.–3. Juni 2001. In: *Bauhinia* **15**: 69–90.
- Stöcker, G. (1961): Das Brockengebiet. In: Mahn, E.-G., Schubert, R., Stöcker, G. & Weinitschke, H. (Hrsg.): *Botanische Exkursionen im Ostharz und im nördlichen Thüringen.* (pp. 62-71). Halle: Akademischer Verlag.
- Swofford, D.L. (2002): PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods).* Vers. 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J. & Hillis, D.M. (1996): Phylogenetic inference. In: Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. (Eds.): *Molecular Systematics* 2nd ed. (pp. 407-543). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. In: *Plant Mol. Biol.* **17**: 1105-1109.
- Takezaki, N., Rzhetsky, A. & Nei, M. (1995): Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. In: *Mol. Biol. Evol.* **12**: 823-833.
- Takhtajan, A. (Ed.) (1974): *Magnoliophyta fossilia URSS (Fossil flowering plants of the USSR).* Vol. **1**: Magnoliaceae - Eucommiaceae. Leningrad: Izdatel'stvo nauka.
- Templeton, A.R., Boerwinkle, E. & Sing, C.F. (1987): A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. In: *Genetics* **117**: 343-351.
- Templeton, A.R. & Sing, C.F. (1993): A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. In: *Genetics* **134**: 659-669.
- Templeton, A.R., Routman, E. & Phillips, C.A. (1995): Separating population structure from history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. In: *Genetics* **140**: 767-782.
- Templeton A.R. (2004): Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. In: *Mol. Ecol.* **13**: 789-809.
- Thal, J. (1588): *Sylva Hercynia.* Frankfurt am Main. Neu herausgeg. von Stephan Rauschert. (1977). Leipzig: Zentralantiquariat der DDR.
- Tutin, T.G. (1964): *Pulsatilla*. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valentine, D.H., Walters, S.M. & Webb, D.A. (Eds.): *Flora Europaea* **1** (pp. 219-221). Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- van de Zande, L. & Bijlsma, R. (1995): Limitations of the RAPD technique in phylogeny reconstruction in *Drosophila*. In: *J. Evol. Biol.* **8**: 645-656.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M, van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995): AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. In: *Nucl. Acids Res.* **23**: 4407-4414.
- Walter, H. & Straka, H. (1970): *Arealkunde (Floristisch-historische Geobotanik).* 2. Aufl. Stuttgart: E. Ulmer.
- Weigel, W. (1957): Beobachtungen über die Wuchshöhe der gemeinen Fichte im Brockengebiet in ihrer Abhängigkeit von der Meereshöhe und Exposition. In: *Geographische Berichte* **2** (pp. 81-88). Gotha, Leipzig.
- Weir, B.S. & Cockerham C.C. (1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. In: *Evolution* **38**: 1358-1370.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. & Taylor, J.W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: Innis, N., Gelfand, D., Sninsky, J. & White, T. (Eds.): *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual* (pp. 315-322). New York: Academic Press.
- Whittall, J., Liston, A., Gisler, S. & Meinke., R.J. (2000): Detecting nucleotide additivity from direct sequences is a SNAP: An example from *Sidalcea* (Malvaceae). In: *Plant Biol.* **2**: 211-217.
- Wright, S. (1978): *Evolution and the genetics of populations.* Vol. **4**. Variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press.

- Wu, C.I. & Li, W.H. (1985): Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 1741-1745.
- Zimmermann, W. (1952): Unsere Küchenschelle. Veröff. d. Landesstelle f. Naturschutz in Württ.-Hohenz.
- Zuckerlandl, E. & Pauling, L. (1962): Molecular disease, evolution, and genic heterogeneity. In: Kasha, M. & Pullman, B. (Eds.): Horizons in biochemistry (pp. 189-225). New York: Academic Press.
- Zuckerlandl, E. & Pauling, L. (1965): Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson, V. & Vogel, H.J. (Eds.): Evolving genes and proteins (pp. 97-166). New York: Academic Press.

9. Anhang

Tabellen:

- Pflanzenmaterial

- cpDNA

Haplotypen und Haplotypendiversität

Paarweise Fst-Werte

Häufigkeit der Haplotypen in den Arten, Unterarten und Morphotypen

Alignments

- ITS

Alignments

Paarweise Kimura-2-Parameter-Distanzen

- Morphologie

Abkürzungen für die morphologischen Merkmale

Mittelwerte für die quantitativen morphologischen Merkmale

Abbildungen:

- cpDNA

Nested-clade-Design

Selbständigkeitserklärung

Lebenslauf

Population/ Akzession	Aufsammlungs- Datum	Gebirge/Standort/Quelle	Höhe	Geogr. Breite	Geogr. Länge	Art/ Morphotyp	Voucher	DNA-Nummer
1	09.06.2000	Vogesen, Le Rainkopf, Silikat	1200 m	48°02'00"N	06°58'00"E	<i>Pulsatilla alpina</i> (subsp.) <i>alpicola</i>	GAT Zetzsche 00751	Pa1_1-9
2	09.06.2000	Vogesen, Le Schweisel, Silikat	1150 m	47°56'00"N	07°00'00"E	<i>alpicola</i>	GAT Zetzsche 00752	Pa2_1-9
3	15.06.2000	Alpen (N), Toggenburg, Chässerug, Kalk- Blockschutthalde	1810 m	47°10'00"N	09°17'00"E	<i>alpina</i>	GAT Zetzsche 00753	Pa3_1-7
4	17.06.2000	Jura, Chasseral, Kalkschotter, NW-exp.	1590 m	47°08'00"N	07°02'00"E	<i>alpina</i>	GAT Zetzsche 00754	Pa4_1-9
5	18.06.2000	Alpen (NW), Simmental, Stockhorn, N-exp.	ab 1780 m	46°41'00"N	07°31'00"E	<i>alpina</i>	GAT Zetzsche 00755	Pa5_1-7
6	19.06.2000	Alpen (NW), Verbier, Pierre Avoi, Col de la Marlena, NW-exp.	2290 m	46°07'00"N	07°12'00"E	<i>alpina</i>	GAT Zetzsche 00756	Pa6_1-7
7	19.06.2000	Alpen (NW), Verbier, Pierre Avoi, zw. Col de la Marlena und Savoleyres, silikat. Schiefer	ca. 2100 m	46°07'00"N	07°12'05"E	<i>ochroleuca</i>	GAT Zetzsche 00757	Pa7_1-3
8	19.06.2000	Alpen (NW), Verbier, Pierre Avoi, Savoleyres, silikat. Schiefer, W-S-exp.	ab 2000 m	46°07'00"N	07°13'00"E	<i>apiifolia</i>	GAT Zetzsche 00758	Pa8_1-6
9	20.06.2000	Jura, La Dole, Kalk- und Kalkschotter	ab 1530 m	46°26'00"N	06°06'00"E	<i>alpina</i>	GAT Zetzsche 00759	Pa9_1-7
10	21.06.2000	Jura, Grand Chartreuse, Col du Garnier, W-exp. Skihang	ca. 1400 m	45°27'00"N	05°54'00"E	<i>alpina</i>	GAT Zetzsche 00760	Pa10_1-7
11	22.06.2000	Alpen (W), Lac du Mont Cenis, ob Belvedere E.D.F., E-exp. alpine Bergwiese	2140 m	45°14'00"N	06°55'00"E	<i>cottianaea</i>	GAT Zetzsche 00761	Pa11_1-7
12	22.06.2000	Alpen (W), Valle di Susa, Bradoneccia, "Tre Croci", Lärchenwald, W-exp.	1800 m	45°05'00"N	06°39'00"E	<i>cottianaea</i>	GAT Zetzsche 00762	Pa12_1-7
13	02.06.1988	Jura, Chasseral, Kalk	1600 m	47°08'00"N	07°02'00"E	<i>alpina / ochroleuca</i>	GAT Zetzsche 00827	Pa77_1-3
14	23.06.2000	Alpen (SW), Cogne, Vallon de Urtier, W-exp.	2200 m	45°37'00"N	07°25'00"E	<i>millefoliata</i>	GAT Zetzsche 00764	Pa14_1-2
15	24.06.2000	WAlpen (SW), Col de la Cayolle, Kalkschutthalde, E-exp.	1740 m	44°16'00"N	06°44'00"E	<i>millefoliata</i>	GAT Zetzsche 00765	Pa15_1-7
16	26.06.2000	WAlpen (SW), Val du Tenda, Casterino, vor Lac du Angel, Felsspaltengesell., Granit/Gneis	-	44°03'00"N	07°28'00"E	<i>millefoliata?</i>	GAT Zetzsche 00766	Pa16_1-7
17	27.06.2000	Apennin, Abruzzen, Gran Sasso d'Italia, Campo Imperatore, Kalkschotter	-	42°27'00"N	13°37'00"E	<i>millefoliata</i>	GAT Zetzsche 00767	Pa17_1-7
18	29.06.2000	Alpen (S), Resegone, Piana d'Erna, Waldgrenze mont. Buchenwald, Kalkfesspalten, NW-exp.	1280 m	45°52'00"N	09°27'00"E	<i>austroalpina</i>	GAT Zetzsche 00768	Pa18_1-7
19	30.06.2000	Alpen (S), Mt. Baldo, Aufstieg zum Mt. Maggiore ob P. Telegrafico, Kalkschotter, N-exp.	1900 m	45°47'00"N	10°53'00"E	<i>austroalpina</i>	GAT Zetzsche 00769	Pa19_1-7
20	01.07.2000	Alpen (S), ob Alba, ob Rif. Contrin, Kalkschotterrasen	2200 m	46°25'00"N	11°47'00"E	<i>ochroleuca</i>	GAT Zetzsche 00770	Pa20_1
21	01.07.2000	Alpen (S), ob Alba, ob des Rif San Nicolo, NE- exp. Bergwiese	2100 m	46°27'00"N	11°44'00"E	<i>apiifolia</i>	GAT Zetzsche 00771	Pa21_1-9
22	02.07.2000	Alpen (S), Tre Cime di Lavaredo	2230 m	46°37'00"N	12°15'00"E	<i>austriaca</i>	GAT Zetzsche 00772	Pa22_1-7
23	03.07.2000	Alpen (E), Gurktaler Alpen, ob Falkertsee, N-exp. Heide	1940 m	46°51'00"N	13°50'00"E	<i>austriaca</i>	GAT Zetzsche 00773	Pa23_1-7
24	03.07.2000	Alpen (SE), Karawanken, Hochobir, E-exp. Rasen, Kalkgestein	-	46°31'00"N	14°29'00"E	<i>austroalpina</i>	GAT Zetzsche 00774	Pa24_1-7
25	04.07.2000	Alpen (E), Gr. Bösenstein, Rottenmanner Tauern, nahe Edelrautehütte	1700 m	47°27'00"N	14°24'00"E	<i>austriaca</i>	GAT Zetzsche 00775	Pa25_1-7
26	04.07.2000	Alpen (E), Am Bärenschutzhütte, Prügelweg zum Hochlantsch	1400 m	47°21'00"N	15°25'00"E	<i>montis-niveae</i>	GAT Zetzsche 00776	Pa26_1-7
27	05.07.2000	Alpen, (E) Ötscher, ob Ötscherhaus, E-exp. Kammlage	1530 m	47°51'00"N	15°11'00"E	<i>montis-niveae</i>	GAT Zetzsche 00777	Pa27_1-7

Tab. A1: Übersicht über die in den molekularen Analysen verwendeten Akzessionen von *Pulsatilla alpina* und verwandten Taxa. Belegexemplare sind, wenn nicht anders verzeichnet im Herbarium des IPK-Gatersleben hinterlegt (Herbarabkürzungen: BD = Berlin-Dahlem, GAT = Gatersleben, MA=Madrid, W = Wien, ZÜR=Zürich).

Population/ Akzession	Aufsammlungs- Datum	Gebirge/Standort/Quelle	Höhe	Geogr. Breite	Geogr. Länge	Art/ Morphotyp	Voucher	DNA-Nummer
28	06.07.2000	Alpen (E), Niederösterr. Kalkalpen, Wiener Schneeberg, Kalkschotter	1740 m	47°45'00"N	15°48'00"E	<i>montis-niveae</i>	GAT Zetzsche 00778	Pa28_1-7
29	10.07.2000	Hohe Tatra, Lipt. Mikulas, Predne Zelene, Silikat	1700 m	49°12'00"N	19°43'00"E	<i>alpicola</i>	GAT Zetzsche 00779	Pa29_1-7
30	10.07.2000	Hohe Tatra, Zuberec, Smutna dolina, silikat. Blockschutthalde	1850 m	49°13'00"N	19°41'00"E	<i>alpicola</i>	GAT Zetzsche 00780	Pa30_1-12
31	12.07.2000	Riesengebirge, Snezka, Gipfelregion, poln. Seite, NE-exp. Rasen, Silikat	1590 m	50°44'00"N	15°43'00"E	<i>alpicola</i>	GAT Zetzsche 00781	Pa31_1-7
32	23.07.2000	Auvergne, ob Mt. Dore, Puy de Sancy, chemin de Sancy	ab 1650 m	45°31'00"N	02°49'00"E	<i>alpicola</i>	GAT Zetzsche 00782(0)	Pa32_1-9
33	25.07.2000	Auvergne, Plomb du Cantal, Gipfelregion, N-exp silikat. Blockschutthalde	1810 m	45°02'00"N	02°45'00"E	<i>apiifolia</i>	GAT Zetzsche 00783	Pa33_1-8
34	28.07.2000	Sierra Cantab., Pico Tre Mares, Fuente del chivo, N-exp. Zwergstrauchheide, Silikat	2000 m	43°03'00"N	04°22'00"W	<i>alpicola</i>	GAT Zetzsche 00784	Pa34_1-8
35	28.07.2000	Sierra Cantab., Pico Tres Mares, ob Alto Campo, Sierra Cordel, Felsspalten silikat. Konglomerat	2040 m	43°03'00"N	04°19'00"W	<i>alpicola</i>	GAT Zetzsche 00785	Pa35_1-6
36	23.07.2000	Auvergne, Puy de Sancy, unweit des Gipfels	1700 m	45°31'00"N	02°49'00"E	<i>apiifolia</i>	GAT Zetzsche 00782(A,B)	Pa32_10-11
37	03.08.2000	Pyrenäen, Valle di Canfranc, ob Canfranc, Stausee Ibon, W-exp. Felsspaltengesell.		42°45'00"N	00°27'00"W	<i>font-queri</i>	GAT Zetzsche 00787	Pa37_1-5
38	06.08.2000	Pyrenäen, Lac des Bouillouses, im S des Estany del Viver, Blockschutthalde, Silikat, E-exp.	2070 m	42°34'00"N	01°58'00"E	<i>apiifolia</i>	GAT Zetzsche 00788	Pa38_1-8
39	07.08.2000	Pyrenäen, Lac des Bouillouses, E-exp. Silikat. Blockschutthalde im W des Estany de la Pradella	1910 m	42°33'00"N	02°00'00"E	<i>apiifolia</i>	GAT Zetzsche 00789	Pa39_1-8
40	08.08.2000	Pyrenäen, Sierra del Cadi, ob Baga, Mirador de President, Kalkschuttgesell., N-exp.	1780 m	42°18'00"N	01°53'00"E	<i>font-queri</i>	GAT Zetzsche 00790	Pa40_1-7
41	13.08.2000	Alpen (W), Val de Chamoni, Le Prarion, W-exp. Bergwiese	1880 m	45°51'00"N	06°49'00"E	<i>alpiifolia / alpina</i>	GAT Zetzsche 00791	Pa41_1-5
42	08.2000	Alpen, Engadin		46°28'00"N	09°59'00"E	<i>apiifolia</i>	GAT Zetzsche 00792	Pa42_2-6
43	15.05.2000	Harz, Brocken	1130 m	51°47'00"N	10°37'00"E	<i>alpicola</i>	GAT Zetzsche 00794-00797	Pa44_1-3, Pa45_1-3, Pa46_2,4-6,9, Pa47_2,4 Pa57_1-3, Pa64_1
44	06.08.1973	Korsika, Restonica-Tal, ob. Capitello-See, unterh. Punta alle Porte, N-exp. Felswand	2100 m	42°13'00"N	09°09'00"E	<i>cyrnea</i>	ZÜR 15730, 15735, 15739	
45	06.06.1988	Alpen (SW), Val d'Isere, nördl. Col de l'Iseran		45°27'00"N	07°04'00"E	<i>millefoliata</i>	Zetzsche (Moser)	Pa83_3-4
46	06.06.2001	Apennin, Mte Orsaro, Silikat	1730 m	44°24'30"N	09°59'30"E	<i>millefoliata</i>	GAT Zetzsche 00843	Pa93_1-7
47	15.06.2001	Kroatien, Rijeka, Gorski Kotar: Bjelolasica: Planinarsko skloniste "Jakob Mihelcic", Südwesthang des Bjelolasica-Kamms	1170 m - 1480 m	45°26'30"N	14°35'30"E	<i>austroalpina</i>	W, Schoenswetter no. 3	Pa99_1-5
48	22.06.2001	Kroatien, Zadar, Velebit: NP Paklenica: Babin dolac, Babino jezer, Plateau bis zum Sattel	1470 m - 1700 m	44°20'00"N	15°30'00"E	<i>austroalpina</i>	W, Schoenswetter no. 31	Pa100_1-5
49	09.07.2001	Karpaten, Pietra Mare, ob Brasov, entkalktes Konglomerat	1810 m	45°33'00"N	25°39'00"E	<i>alpicola</i>	GAT Zetzsche 00851	Pa101_1-8
50	18.07.2001	Pyrenäen, Huesca: Candanchu-Esper-Puerto de Estanes-Ibon de Estanes	1550 m - 1900 m	42°47'27"N	00°35'02"W	<i>font-queri</i>	W, Schoenswetter & Tribsch no. 6473	Pa104_1-8
51	10.07.2001	Alpen (W), Cottische Alpen: Colle del Viso, Scharte zw Punta Bariaco und Punta Michelis	2600 m - 3000 m	44°40'06"N	07°06'17"E	<i>cottianaea</i>	W, Schoenswetter & Tribsch no. 6354	Pa105_1-8
52	01.08.2001	Kärnten, Saualpe, Südhang, alpine Matte (ob Wolfsberghütte, am Parkplatz)	1736 m	46°50'08"N	14°39'55"E	<i>austriaca</i>	GAT Zetzsche 00856	Pa106_1-2
53	03.08.2001	Karawanken, Petzen, Eingang zum Trepnick-Kar (vom Schleplift aus)	1817 m	46°30'42"N	14°46'12"E	<i>austriaca</i>	GAT Zetzsche 00857	Pa107_1-3

Übersicht über die in den molekularen Analysen verwendeten Akzessionen von *Pulsatilla alpina*: Fortsetzung.

Population/ Akzession	Aufsammlungs- Datum	Gebirge/Standort/Quelle	Höhe	Geogr. Breite	Geogr. Länge	Art/ Morphotyp	Voucher	DNA-Nummer
54	20.07.1985	Pyrenäen, Fanlo de Vio, Pastos entre Cuello Arenas y parte superior del Barranco de la Paradina; el creston carstico	1930 m- 2050 m	42°34'00"N	00°01'00"W	<i>font-queri</i>	MA, Herb. Hort. Reg. Matritensis 317958	Pa112_1-3
55	14.07.1991	Pyrenäen, Pena Ezkaurre, roquedos y laderas pedregosas carstificadas en la umbria, calizas	1750 m	42°52'00"N	00°52'00"W	<i>font-queri</i>	MA, Herb. Hort. Reg. Matritensis 533504	Pa116_1-2
56	01.07.1937	Karpaten, Transsilvania, distr. Nasaud, in cacumine alpis Ineu montium Rodnesium, solo schistoto	2100 m	47°00'00"N	25°00'00"E	<i>alpicola</i>	ZÜR	Pa56
57	02.08.1976	Bosnien-Herz., Vranica Planina, ca. 20km östl. v. Gornji Vakuf, nördl. des Tales; Silikat	1750 m	43°56'00"N	17°44'00"E	<i>alpicola</i>	ZÜR no. 106	Pa55_1
58	07. 1979	Kaukasus, Kluchor Pass		43°15'00"N	41°54'00"E	<i>Pulsatilla aurea</i>	BD	Pa52_1-54_1
59	2000	Rocky Mountains, Mount-Rainier-Nationalpark, nördlich v. Paradise		46°47'00"N	121°43'00"W	<i>Pulsatilla occidentalis</i>	GAT Zetzsche 00801	Pa51_1-2
60	28.07.1981	Sierra Cantabrica, Mte Gorbea (BI): Aldamin. Muy rara en las pequenas repisas del roquedo calizo	1350 m	43°02'00"N	02°48'00"W	<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>cantabrica</i>	MA, Herb. Hort. Reg. Matritensis 317898	Pa119_1
61	13.08.1986	Pyrenäen, Valle de Hecho, Sa Bernera. XN94, Roguedo calizo	1750 m	42°50'00"N	00°40'00"W	<i>cantabrica</i>	MA, Herb. Hort. Reg. Matritensis 454422	Pa120_1
62	16.07.1981	Sierra Cantabrica, Aizgorri, Grietas del lapiaz de Osta-Zurita	1300 m	42°57'00"N	02°20'00"W	<i>cantabrica</i>	MA, Herb. Hort. Reg. Matritensis 349738	Pa121_1
63	11.06.1990	Sierra Cantabrica, Leon: pico Gildar, Posada de Valdeon	1700 m	43°06'00"N	04°57'00"W	<i>cantabrica</i>	MA, Herb. Hort. Reg. Matritensis 612237	Pa124_1
64	11.06.1981	Sierra Cantabrica, Aratz: Rara en fisiras de roquedos de la umbria	1300 m	42°55'00"N	02°18'00"W	<i>cantabrica</i>	MA, Herb. Hort. Reg. Matritensis 349736	Pa125_1
65	17.05.1991	Zentralspanien, Sierra Avila, Hyocassero, Pinar de Hoy, Pinienwald	1350 m	40°23'00"N	05°00'00"W	<i>apiifolia</i>	GAT Zetzsche (Moser)	Pa67_1
66	06.1988	Alpen, Urnerseite, Oberalppass		40°39'00"N	08°40'00"E	<i>ochroleuca</i>	GAT Zetzsche (Moser)	Pa89_1-2
67	12.07.1988	Alpen, Schynige Platte, unterh. der Lüdiwiese		46°39'00"N	07°55'00"E	<i>ochroleuca</i>	GAT Zetzsche (Moser)	Pa90_1
68		Prov. Primorje, distr. Oktober in viciniis pag. Czernjatino, in declivibus siccis				<i>Pulsatilla chinensis</i>	Herb.W, Naturhist. Museum Wien 1997-08879	Pc126
69	16.05.1948	Kyffhäuser, ob des Solgrabens bei der Numburg, auf Gips				<i>Pulsatilla pratensis</i>	GAT no. 1676	Pr97
70	08.2000	Alpen, Engadin	1050 m	46°28'00"N	09°59'00"E	<i>Pulsatilla vernalis</i>	GAT Zetzsche 00792	Pv42
71		Pamir				<i>Pulsatilla kostyczewii</i>	Herb. Taschkent	Pk108_1-4
72	08.07.1967	Japan, Honshu, Chubu Distr. c., Nagano Pref., Suwa-gun, Yokodake in Yoatsugatake Mts	2800 m	36°00'00"N	138°20'00"E	<i>Pulsatilla taraoi</i>	Makino Herbar Tokyo Metrop. Uni, 64-360- 71774	Pn103_1-2
73	05.06.2002	Bot. Garten IPK Gatersleben				<i>Pulsatilla halleri</i>	GAT (Bot. Garten IPK Gatersleben)	Ph109
74	05.06.2002	Bot. Garten IPK Gatersleben				<i>Pulsatilla rubra</i>	GAT (Bot. Garten IPK Gatersleben)	Pr 110
75	05.06.2002	Bot. Garten IPK Gatersleben				<i>Pulsatilla slavica</i>	GAT (Bot. Garten IPK Gatersleben)	Ps 111
76	23.07.1930					<i>Pulsatilla campanella</i>	GAT no. 9/9	Pc94(Pc136)
77	11.10.2003	Bot. Garten IPK Gatersleben				<i>Clematis recta</i>	GAT (Bot. Garten IPK Gatersleben)	Cr148
78	01.07.2000	Alpen (S), ob Alba, ob Rif. Contrin, Kalkschotterrasen	2200 m	46°25'00"N	11°47'00"E	<i>Callianthemum anemonides</i>	GAT Zetzsche 00770(Ca)	Pa(c)20_1-5

Übersicht über die in den molekularen Analysen verwendeten Akzessionen von *Pulsatilla alpina*: Fortsetzung.

Population/ Akzession	Aufsammlungs- Datum	Gebirge/Standort/Quelle	Höhe	Geogr. Breite	Geogr. Länge	Art/ Morphotyp	Voucher	DNA-Nummer
79	11.10.2003	Bot. Garten IPK Gatersleben				<i>Thalictrum simplex</i>	GAT (Bot. Garten IPK Gatersleben)	Ts150
80	09.10.2003	Deutschland, Gatersleben, Wiese vor der Wasserburg	110 m	51°49'00"N	11°16'60"E	<i>Ranunculus repens</i>	GAT Zetzsche 00896	Rr146
81	11.10.2003	Bot. Garten IPK Gatersleben				<i>Ranunculus gramineus</i>	GAT (Bot. Garten IPK Gatersleben)	Rg147
82	11.10.2003	Bot. Garten IPK Gatersleben				<i>Helleborus orientalis</i>	GAT (Bot. Garten IPK Gatersleben)	Ho149
83		Miikeda & al. (unpubl.), GenBank: AB120213				<i>Pulsatilla cernua</i>	db_xref="taxon: 231674	ITS
84		Schuettpelz & al. (2002), GenBank: AY056049				<i>Anemone antucensis</i>	db_xref="taxon: 142243	ITS
85		Hang & al. (unpubl.), GenBank: AJ347913				<i>Myosurus minimus</i>	db_xref="taxon: 59993	ITS
86		Miikeda & al. (unpubl.), GenBank: AB120193				<i>Clematis afoliata</i>	db_xref="taxon: 171906	ITS

Übersicht über die in den molekularen Analysen verwendeten Akzessionen von *Pulsatilla alpina*: Fortsetzung.

Tab. A2: Standorte, Probenumfang und cp-Haplotypen der *trnL-trnF*-Fragmente lf1 und lf2 mit Häufigkeiten sowie die Haplotypendiversität für die Marker lf1 und lf2 der 67 untersuchten Populationen von *P. alpina*, *P. aurea* und *P. occidentalis*

Population/ Akzession	Gebirge	Standort	Proben- umfang	lf1-Haplotypen (Anzahl)	Diversität lf1	lf2-Haplotypen (Anzahl)	Diversität lf2
1	Vogesen	Rainkopf	9	31(9)	0	PIC(9)	0
2	Vogesen	Schweisel	9	29(1), 31(8)	0,2222	PIC(9)	0
3	Alpen (N)	Chaesserug	7	19(5), 24(2)	0,4762	ALP(7)	0
4	Jura	Chasseral	9	21(1), 22(6), 23(1), 24(1)	0,5833	ALP(9)	0
5	Alpen (NW)	Stockhorn	7	17(1), 18(1), 19(2), 24(3)	0,8095	ALP(7)	0
6	Alpen (NW)	Pierre Avoi Col Marlena	7	16(1), 19(4), 20(1), 24(1)	0,7143	ALP(6), API(1)	0,2857
7	Alpen (NW)	Pierre Avoi	3	16(2), 24(1)	0,6667	ALP(1), API(2)	0,6667
8	Alpen (NW)	Pierre Avoi Savoleyres	6	16(5), 24(1)	0,3333	ALP(1), API(5)	0,3333
9	Jura	La Dole	7	22(5), 24(2)	0,4762	ALP(7)	0
10	Jura	Col du Garnier	7	19(7)	0	ALP(7)	0
11	Alpen(W)	Lac du Mont Cenis	7	16(4), 18(3)	0,5714	ALP(3), API(4)	0,5714
12	Alpen (W)	Tre Croci	7	1(1), 18(3), 19(3),	0,7143	ALP(6), API(1)	0,2857
13	Jura	Chasseral	3	24(3)	0	ALP(3)	0
14	Alpen (SW)	Vallon de Urtier	2	6(1), 16(1)	1	API(2)	0
15	Alpen(SW)	Col de la Cayolle	7	12(4), 14(3),	0,5714	API(7)	0
16	Alpen(SW)	Lac du Angel	7	10(1), 12(6)	0,2857	API(7)	0
17	Abruzzen	Campo Imperatore	7	25(7)	0	PIC(7)	0
18	Alpen (S)	Piana d Erna	7	16(7)	0	API(7)	0
19	Alpen (S)	Mt Baldo	7	15(3), 16(4)	0,5714	API(7)	0
20	Alpen (S)	Rif Contrin	1	16(1)	inf	API(1)	inf
21	Alpen (S)	Rif San Nicolo	9	14(1), 16(8)	0,2222	API(9)	0
22	Alpen (S)	Tre Cime di Lavaredo	7	28(7)	0	PIC(7)	0
23	Alpen (E)	Falkertsee	7	28(7)	0	PIC(7)	0
24	Alpen (SE)	Hochobir	7	26(1), 28(6)	0,2857	PIC(7)	0
25	Alpen (E)	Boesenstein	7	27(3), 28(4)	0,5714	PIC(7)	0
26	Alpen (E)	Baerenschutzhklamm	7	13(6), 16(1)	0,2857	API(7)	0
27	Alpen (E)	Oetscher	7	28(7)	0	PIC(7)	0
28	Alpen (E)	Wiener Schneeberg	7	28(7)	0	PIC(7)	0
29	Hohe Tatra	Predne Zelene	7	33(6), 34(1)	0,2857	PIC(7)	0
30	Hohe Tatra	Smutna dolina	12	33(11), 34(1)	0,1667	PIC(12)	0
31	Riesengebirge	Snezka	7	29(7)	0	PIC(7)	0
32	Auvergne	Puy de Sancy	9	5(1), 7(1), 29(2), 31(4), 32(1)	0,8056	API(2), PIC(7)	0,3889
33	Auvergne	Plomb du Cantal	8	5(7), 7(1)	0,25	API(8)	0
34	Sierra Cantabrica	Pico Tre Mares	8	30(8)	0	PIC(8)	0
35	Sierra Cantabrica	Sierra Cordel	6	16(6)	0	API-sc(6)	0
36	Auvergne	Puy de Sancy	2	7(2)	0	API(2)	0
37	Pyrenäen	Valle di Canfranc	5	16(5)	0	API-mpy(5)	0
38	Pyrenäen	Lac B. E. Viver	8	6(8)	0	API(8)	0
39	Pyrenäen	Lac B. E. Pradella	8	6(8)	0	API(8)	0
40	Pyrenäen	Sierra del Cadi	7	11(7)	0	API-40fq(6)	0
41	Alpen (W)	Val de Chamonix	5	18(1), 19(4)	0,4	ALP(5)	0
42	Alpen	Engadin	5	16(5)	0	API(5)	0
43	Harz	Brocken	13	31(13)	0	PIC(13)	0
44	Korsika	Restonica	4	8(1), 16(3)	0,5	API(1), PIC(3)	0,5
45	Alpen (SW)	Col de lIseran	2	18(2)	0	ALP(2)	0
46	Apennin	Mte Orsaro	7	9(7)	0	API(7)	0
47	Gorski Kotar	Gorski Kotar	5	16(5)	0	API(5)	0
48	Velebit	Velebit NP Paklenica	5	14(5)	0	API(5)	0
49	Karpaten	Piatra Mare	8	28(8)	0	PIC(8)	0
50	Pyrenäen	Puerto de Estanes	8	4(1), 16(7)	0,25	API-mpy(8)	0
51	Alpen (W)	Colle del Viso	8	2(3), 3(5)	0,5357	API(8)	0
52	Alpen (E)	Sausalpe	2	28(2)	0	PIC(2)	0
53	Alpen (SE)	Petzen	3	28(3)	0	PIC(3)	0
54	Pyrenäen	Fanlo de Vio	3	16(3)	0	API-mpy(3)	0

Standorte, Probenumfang und cp-Haplotypen der *trnL-trnF*-Fragmente lf1 und lf2: Fortsetzung.

Population/ Akzession	Gebirge	Standort	Proben- umfang	lf1-Haplotypen (Anzahl)	Diversität lf1	lf2-Haplotypen (Anzahl)	Diversität lf2
55	Pyrenäen	Pena Ezkaurre	2	16(2)	0	<i>API-mpy</i> (2)	0
56	Karpaten	distr Nasaud	1	28(1)	inf	<i>PIC</i> (1)	inf
57	Bosnien	Vranica Planina	1	28(1)	inf	<i>PIC</i> (1)	inf
58	Kaukasus	Kluchor Pass	3	-	0	<i>PIC</i> (3)	0
59	Rocky Mountains	Mount-Rainier	2	-	0	<i>OCC</i> (2)	0
60	Sierra Cantabrica	Pena Gorbea	1	16(1)	inf	<i>API</i> (1)	inf
61	Pyrenäen	Sierra Bernera	1	16(1)	inf	<i>API-mpy</i> (1)	inf
62	Sierra Cantabrica	Aitzgorri	1	16(1)	inf	<i>API</i> (1)	inf
63	Sierra Cantabrica	Pico Gildar	1	16(1)	inf	<i>API-mpy</i> (1)	inf
64	Sierra Cantabrica	Aratz	1	16(1)	inf	<i>API-mpy</i> (1)	inf
65	Sierra Avila	Pinar de Hoy	1	6(1)	inf	<i>API</i> (1)	inf
66	Alpen (Zentral)	Oberarlpas	2	12(2)	0	<i>API</i> (2)	0
67	Alpen (Zentral)	Schynigge Platte	1	24(1)	inf	<i>API</i> (1)	inf

	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7	Pop8	Pop9	Pop10	Pop11	Pop12	Pop13	Pop14	Pop15	Pop16	Pop17	Pop18	Pop19	Pop20	Pop21	Pop22	Pop23	Pop24	Pop25	Pop26	Pop27	Pop28	Pop29
Pop50	0.88	0.77	0.64	0.58	0.48	0.46	0.02	0.07	0.64	0.87	0.19	0.53	0.81	0.22	0.60	0.73	0.87	0.02	0.19	1.00	0.06	0.87	0.73	0.60	0.70	0.87	0.87	0.73	
Pop51	0.75	0.63	0.49	0.44	0.33	0.38	0.42	0.55	0.49	0.72	0.45	0.38	0.62	0.36	0.45	0.58	0.72	0.72	0.45	0.46	0.63	0.72	0.72	0.58	0.45	0.58	0.72	0.72	0.58
Pop52	1.00	0.81	0.62	0.53	0.38	0.45	0.57	0.74	0.62	1.00	0.55	0.45	1.00	0.50	0.55	0.77	1.00	1.00	0.55	1.00	0.81	0.00	0.00	0.31	0.05	0.77	0.00	0.00	0.77
Pop53	1.00	0.83	0.67	0.58	0.46	0.51	0.67	0.77	0.67	1.00	0.60	0.51	1.00	0.65	0.60	0.79	1.00	1.00	0.60	1.00	0.83	0.00	0.00	0.17	0.16	0.79	0.00	0.00	0.79
Pop54	1.00	0.83	0.67	0.58	0.46	0.44	0.00	0.15	0.67	1.00	0.16	0.51	1.00	0.25	0.60	0.79	1.00	0.00	0.16	0.00	0.18	1.00	1.00	0.79	0.60	0.76	1.00	1.00	0.79
Pop55	1.00	0.81	0.62	0.53	0.38	0.37	0.20	0.30	0.62	1.00	0.05	0.45	1.00	0.00	0.55	0.77	1.00	0.00	0.05	0.00	0.32	1.00	1.00	0.77	0.55	0.73	1.00	1.00	0.77
Pop56	1.00	0.78	0.52	0.42	0.19	0.29	0.33	0.67	0.52	1.00	0.43	0.29	1.00	0.00	0.43	0.71	1.00	1.00	0.43	1.00	0.78	0.00	0.00	1.00	0.33	0.71	0.00	0.00	0.71
Pop57	1.00	0.78	0.52	0.42	0.19	0.29	0.33	0.67	0.52	1.00	0.43	0.29	1.00	0.00	0.43	0.71	1.00	1.00	0.43	1.00	0.78	0.00	0.00	1.00	0.33	0.71	0.00	0.00	0.71
Pop58	1.00	0.83	0.67	0.58	0.46	0.51	0.67	0.77	0.67	1.00	0.60	0.51	1.00	0.65	0.60	0.79	1.00	1.00	0.60	1.00	0.83	1.00	1.00	0.79	0.60	0.79	1.00	1.00	0.79
Pop59	1.00	0.81	0.62	0.53	0.38	0.45	0.57	0.74	0.62	1.00	0.55	0.45	1.00	0.50	0.55	0.77	1.00	1.00	0.55	1.00	0.81	1.00	1.00	0.77	0.55	0.77	1.00	1.00	0.77
Pop60	1.00	0.78	0.52	0.42	0.19	0.17	1.00	1.00	0.52	1.00	0.33	0.29	1.00	1.00	0.43	0.71	1.00	0.00	0.33	0.00	1.00	1.00	1.00	0.71	0.43	0.67	1.00	1.00	0.71
Pop61	1.00	0.78	0.52	0.42	0.19	0.17	1.00	1.00	0.52	1.00	0.33	0.29	1.00	1.00	0.43	0.71	1.00	0.00	0.33	0.00	1.00	1.00	1.00	0.71	0.43	0.67	1.00	1.00	0.71
Pop62	1.00	0.78	0.52	0.42	0.19	0.17	1.00	1.00	0.52	1.00	0.33	0.29	1.00	1.00	0.43	0.71	1.00	0.00	0.33	0.00	1.00	1.00	1.00	0.71	0.43	0.67	1.00	1.00	0.71
Pop63	1.00	0.78	0.52	0.42	0.19	0.17	1.00	1.00	0.52	1.00	0.33	0.29	1.00	1.00	0.43	0.71	1.00	0.00	0.33	0.00	1.00	1.00	1.00	0.71	0.43	0.67	1.00	1.00	0.71
Pop64	1.00	0.78	0.52	0.42	0.19	0.17	1.00	1.00	0.52	1.00	0.33	0.29	1.00	1.00	0.43	0.71	1.00	0.00	0.33	0.00	1.00	1.00	1.00	0.71	0.43	0.67	1.00	1.00	0.71
Pop65	1.00	0.78	0.52	0.42	0.19	0.17	1.00	1.00	0.52	1.00	0.33	0.29	1.00	1.00	0.43	0.71	1.00	0.00	0.33	0.00	1.00	1.00	1.00	0.71	0.43	0.67	1.00	1.00	0.71
Pop66	1.00	0.81	0.62	0.53	0.38	0.45	0.57	0.74	0.62	1.00	0.55	0.45	1.00	0.50	0.05	0.31	1.00	1.00	0.55	1.00	0.81	1.00	1.00	0.77	0.55	0.77	1.00	1.00	0.77
Pop67	1.00	0.78	0.33	0.34	0.42	0.17	0.00	0.60	0.33	1.00	0.43	0.29	0.00	0.00	0.43	0.71	1.00	1.00	0.43	1.00	0.78	1.00	1.00	0.71	0.43	0.71	1.00	1.00	0.71

Paarweise |f_{st}-Werte der 67 untersuchten Populationen von *Pulsatilla alpina*: Fortsetzung.

	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7	Pop8	Pop9	Pop10	Pop11	Pop12	Pop13	Pop14	Pop15	Pop16	Pop17	Pop18	Pop19	Pop20	Pop21	Pop22	Pop23	Pop24	Pop25	Pop26	Pop27	Pop28	Pop29
Pop50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,87	0,83	0,86	1,00	1,00	0,73	0,87	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Pop51	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,85	0,34	0,05	1,00	1,00	0,36	0,85	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00
Pop52	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,77	0,57	0,74	1,00	1,00	0,55	0,77	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Pop53	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,79	0,67	0,77	1,00	1,00	0,60	0,79	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Pop54	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,79	0,67	0,77	1,00	1,00	0,60	0,79	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Pop55	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,77	0,57	0,74	1,00	1,00	0,55	0,77	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Pop56	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,71	0,33	0,67	1,00	1,00	0,43	0,71	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Pop57	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,71	0,33	0,67	1,00	1,00	0,43	0,71	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Pop58	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,79	0,67	0,77	1,00	1,00	0,60	0,79	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Pop59	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,77	0,57	0,74	1,00	1,00	0,55	0,77	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Pop60	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,67	1,00	1,00	1,00	1,00	0,33	0,67	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00
Pop61	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,71	0,33	0,67	1,00	1,00	0,43	0,71	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Pop62	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,67	1,00	1,00	1,00	1,00	0,33	0,67	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00
Pop63	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,71	0,33	0,67	1,00	1,00	0,43	0,71	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Pop64	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,71	0,33	0,67	1,00	1,00	0,43	0,71	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Pop65	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,67	1,00	1,00	1,00	1,00	0,33	0,67	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00
Pop66	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,73	0,20	0,30	1,00	1,00	0,05	0,73	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00
Pop67	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,67	1,00	1,00	1,00	1,00	0,33	0,67	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00

Paarweise JI₂-Fst-Werte der 67 untersuchten Populationen von *Pulsatilla alpina*: Fortsetzung.

	Pop30	Pop31	Pop32	Pop33	Pop34	Pop35	Pop36	Pop37	Pop38	Pop39	Pop40	Pop41	Pop42	Pop43	Pop44	Pop45	Pop46	Pop47	Pop48	Pop49	Pop50	Pop51	Pop52	Pop53	Pop54	Pop55	Pop56	Pop57	Pop58	
Pop30	0,00																													
Pop31	0,00	0,00																												
Pop32	0,17	0,09	0,00																											
Pop33	1,00	1,00	0,74	0,00																										
Pop34	0,00	0,00	0,11	1,00	0,00																									
Pop35	1,00	1,00	0,77	1,00	1,00	0,00																								
Pop36	1,00	1,00	0,59	0,00	1,00	1,00	0,00																							
Pop37	1,00	1,00	0,75	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00																						
Pop38	1,00	1,00	0,74	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00																					
Pop39	1,00	1,00	0,74	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00																				
Pop40	1,00	1,00	0,78	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00																			
Pop41	1,00	1,00	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00																		
Pop42	1,00	1,00	0,69	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00																	
Pop43	0,00	0,00	0,18	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00																
Pop44	0,29	0,15	0,22	0,78	0,19	0,81	0,53	0,78	0,78	0,78	0,82	0,78	0,71	0,32	0,00															
Pop45	1,00	1,00	0,68	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,64	0,00														
Pop46	1,00	1,00	0,72	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,76	1,00	0,00													
Pop47	1,00	1,00	0,69	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,71	1,00	0,00	0,00												
Pop48	1,00	1,00	0,69	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,71	1,00	0,00	0,00	0,00											
Pop49	0,00	0,00	0,11	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,19	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00										
Pop50	1,00	1,00	0,80	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,84	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00									
Pop51	1,00	1,00	0,74	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,78	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00								
Pop52	0,00	0,00	0,19	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,26	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00							
Pop53	0,00	0,00	0,07	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,09	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00					
Pop54	1,00	1,00	0,71	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,71	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00			
Pop55	1,00	1,00	0,68	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,64	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00		
Pop56	0,00	0,00	0,75	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00			
Pop57	0,00	0,00	0,75	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00		
Pop58	0,00	0,00	0,07	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,09	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Pop59	1,00	1,00	0,68	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,64	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Pop60	1,00	1,00	0,50	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,33	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Pop61	1,00	1,00	0,61	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	
Pop62	1,00	1,00	0,50	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,33	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Pop63	1,00	1,00	0,61	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	
Pop64	1,00	1,00	0,61	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	
Pop65	1,00	1,00	0,50	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,33	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Pop66	1,00	1,00	0,59	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,53	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Pop67	1,00	1,00	0,50	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,33	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	

	Pop59	Pop60	Pop61	Pop62	Pop63	Pop64	Pop65	Pop66	Pop67
Pop59	0,00								
Pop60	1,00	0,00							
Pop61	1,00	1,00	0,00						
Pop62	1,00	0,00	1,00	0,00					
Pop63	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00				
Pop64	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00			
Pop65	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00		
Pop66	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	
Pop67	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00

Tab. A5: Absolute Häufigkeit der Chloroplastentypen in den Arten, Unterarten und Morphotypen von *P. alpina*, *P. aurea* und *P. occidentalis*

Haplotypengruppe	PIC	ALP	API					AUR	OCC
Art en und Unterarten nach Jalas & Suominen (1989)									
<i>P. aurea</i>	0	0	0					2	0
<i>P. occidentalis</i>	0	0	0					0	3
<i>P. alpina</i> subsp. <i>alpicola</i>	108	0	8					0	0
<i>P. alpina</i> subsp. <i>alpina s.l.</i>	28	62	69					0	0
<i>P. alpina</i> subsp. <i>apiifolia</i>	0	1	46					0	0
<i>P. alpina</i> subsp. <i>cyrnea</i>	0	0	4					0	0
<i>P. alpina</i> subsp. <i>font-queri</i>	0	0	24					0	0
<i>P. alpina</i> subsp. <i>cantabrica</i>	0	0	5					0	0
Haplotypengruppe (mit API-Untertypen)	PIC	ALP	API	API-cors	API-sc	API-mitpy	API-40fq	AUR	OCC
Arten und Morphotypen nach Moser (1989)									
<i>P. aurea</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	0
<i>P. occidentalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>alpicola</i>	82	0	2	0	6	0	0	0	0
<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>austriaca</i>	26	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>alpina</i>	0	48	1	0	0	0	0	0	0
<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>apiifolia</i>	0	1	46	0	0	0	0	0	0
<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>cottiana</i>	0	12	13	0	0	0	0	0	0
<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>millefoliata</i>	7	2	23	0	0	0	0	0	0
<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>austroalpina</i>	7	0	25	0	0	0	0	0	0
<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>montis-niveae</i>	14	0	7	0	0	0	0	0	0
<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>font-queri</i>	0	0	0	0	0	18	6	0	0
<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>cantabrica</i>	0	0	2	0	0	3	0	0	0
<i>P. alpina</i> (subsp.) <i>cyrnea</i>	0	0	1	3	0	0	0	0	0
<i>P. alpina</i> x <i>ochroleuca</i>	0	1	5	0	0	0	0	0	0

Tab. A6: Alignment der Sequenzen der Haplotypen des *trnL-trnF*-Fragmentes If1 der Sektion *Preonanthus* und *Callianthemum anemonides*, *Pulsatilla chinensis*, *P. pratensis*, *P. vernalis* und *P. kostyczewii* (Außengruppen). Unsichere Positionen wurden mit N codiert, Alignmentgaps mit -. Der Wert [n] gibt die tatsächliche Anzahl der amplifizierten Basen an. Die Indels der mittelgrau markierten Bereiche wurden als 0/1-Matrix codiert und an das Ende des Alignments gestellt. Die dunkelgrau markierten Bereiche wurden von den phylogenetischen Berechnungen ausgenommen.

						75	
Cal. anemonides	AATAAAAAGTTTG-TTGTACCCCTAACTATTTAGTTTATAGTTAAT					GTT	AAT--TAATTT [57]
P. chinensis-C.....					A [57]
P. pratensis-C.....					A [57]
P. vernalis-C.....					A [57]
P. kostyczewiiGC.....-G.....					GTTAACTATTTAGT....A [71]
OCC-C.....					A [57]
AUR-C.....					GTTGT....A [62]
7-C.....					A [57]
5-C.....					A [57]
6-C.....					A [57]
9-C.....					A [57]
8-C.....					A [57]
10-C.....					A [57]
12-C.....					A [57]
4-C.....					A [57]
11-C.....					A [57]
13-C.....					A [57]
14-C.....					A [57]
16-C.....					A [57]
1-C.....					A [57]
2-C.....					A [57]
3-C.....					A [57]
15-C.....					A [57]
25-C.....					A [57]
24-C.....					A [57]
23-C.....					A [57]
22-C.....					A [57]
18-C.....					A [57]
19-C.....					A [57]
17-C.....					A [57]
20-C.....					A [57]
21-C.....					A [57]
26-C.....					A [57]
28-C.....					A [57]
27-C.....					A [57]
32-C.....					A [51]
31-C.....					A [51]
29-C.....					- [50]
33-C.....					A [51]
34-C.....					A [51]
30-C.....					A [51]

						150	
Cal. anemonides							[57]
P. chinensis							[57]
P. pratensis							[57]
P. vernalis							[57]
P. kostyczewii							[82]
OCC							[66]
AUR							[85]
7							[80]
5							[74]
6							[74]
9							[74]
8							[74]
10							[80]
12							[87]
4							[84]
11							[82]
13							[81]
14							[74]
16							[74]
1							[83]
2							[74]
3							[74]
15							[67]
25							[65]
24							[69]
23							[74]
22							[77]
18							[93]
19							[87]
17							[95]
20							[83]
21							[93]
26							[65]
28							[65]
27							[65]
32							[59]
31							[59]

Alignment der Sequenzen der Haplotypen des *trnL-trnF*-Fragmentes lf1: Fortsetzung.

29	-----	[50]
33	-----TTAATTAAATAATTA-----	[66]
34	-----T-----	[52]
30	-----ATAATTA-----	[59]

		225	
Cal. anemonides	-----TAATT-----	-----AATTC-----	[74]
P. chinensis	-----	AAA GTC.....	[74]
P. pratensis	-----	AAA GTC.....	[74]
P. vernalis	-----	AAA GTC.....	[74]
P. kostyczewii	-----	AAA-----	[97]
OCC	AAAA GAAAGT.....	[92]
AUR	AAAA GG.....	[108]
7	AAAA TAAAAGG.....	[108]
5	AAAA TAAAAGG.....	[102]
6	AAAA TAAAAGG.....	[102]
9	AAAA TAAAAGG.....	[103]
8	AAAA TAAAAGG.....	[103]
10	AAAA GG.....	[103]
12	-----	AAAA GG.....	[110]
4	-----AATTAATT-----	AAAA GG.....	[115]
11	-----	AAAA GG.....	[105]
13	-----	AAAA GG.....	[104]
14	-----	AAAA GG.....	[97]
16	-----	AAAA GG.....	[97]
1	TAATTAAA-----	AAAA GG.....	[114]
2	-----	AAAA GG.....	[97]
3	-----	AAAA GG.....	[97]
15	-----	AAAA GG.....	[90]
25	-----	AAAA GG.....	[88]
24	-----	AAAA GG.....	[92]
23	-----	AAAA GG.....	[97]
22	-----	AAAA GG.....	[100]
18	-----	AAAA GG.....	[116]
19	-----	AAAA GG.....	[110]
17	-----	AAAA GG.....	[118]
20	-----	AAAA GG.....	[106]
21	-----	AAAA GG.....	[116]
26	-----	AAAA GG.....	[88]
28	-----	AAAA GG.....	[88]
27	-----	AAAA GG.....	[88]
32AATTTAGTTAATGTTAATTAATTAATAAATTATAATTAAAA	-----GG.....	[119]
31AATTTAGTTAATGTTAATTAATTAATAAATTATAATTAAAA	-----GG.....	[119]
29	-----	AAAA GG.....	[68]
33AATTTAGTTAATGTTAATTAATTAATAAATTATAATTAAAA	-----GG.....	[126]
34	-----	TAATTAAAA	[75]
30	-----	AAAA GG.....	[82]

		300	
Cal. anemonides	TTT-----CGTTATGTTTCTCAGCCATTTTACTCTTCCACAAATGGATCGTGGGAGAAAAGGCCTCTCTTAT		[141]
P. chinensis	...TT-AGATTA.....C.....T.....CT.....A.....		[148]
P. pratensis	...TT-AGATTA.....C.....T.....C.....		[148]
P. vernalis	...TTTAGATTA.....C.....T.....C.....		[149]
P. kostyczewii	...TTTAGATTA.....T.....C.....T.....C.....G.....		[172]
OCC	...TT-AGATTA.....C.....T.....C.....		[166]
AUR	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[179]
7	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[180]
5	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[173]
6	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[174]
9	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[175]
8	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[175]
10	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[175]
12	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[182]
4	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[187]
11	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[177]
13	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[176]
14	...T-AGATTA.....C.....T.....C.....		[170]
16	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[169]
1	...TT-AGATTA.....C.....T.....C.....		[188]
2	...TTTAGATTA.....C.....T.....C.....		[172]
3	...TT-AGATTA.....C.....T.....C.....		[171]
15	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[162]
25	...T-AGATTA.....C.....T.....C.....		[161]
24	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[164]
23	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[169]
22	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[172]
18	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[188]
19	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[182]
17	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[189]
20	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[178]
21	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[188]
26	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[160]
28	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[160]
27	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[159]
32	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[191]
31	...AGATTA.....C.....T.....C.....		[191]

Alignment der Sequenzen der Haplotypen des *trnL-trnF*-Fragmentes lf1: Fortsetzung.

```

29     ---AGATTA.....C.....T.....C.....                [140]
33     ---AGATTA.....C.....T.....C.....                [198]
34     ---AGATTA.....C.....T.....C.....                [147]
30     ---AGATTA.....C.....T.....C.....                [154]
  
```

368

```

Cal.anemonides  CACAAGACTTGTGATATATTGTGATATATA-----CAAT-----GT-ATATGTGTAGATCAACATC
P.chinensis     .....ATATAT..G.....A.....
P.pratensis     .....ATATAT..G.....A.....
P.vernalis      .....ATATAT..G.....A.....
P.kostyczewii   .....ATATAT..G.....GA..A.....
OCC             .....ATATAT..G.....A.....
AUR             .....ATATAT..G.....A.....
7               .....ATATAT..G.....A.....
5               .....ATATAT..G.....A.....
6               .....ATATAT..G.....A.....
9               .....ATATAT..G.....A.....
8               .....ATATAT..G.....A.....
10              .....ATATAT..G.....A.....
12              .....ATATAT..G.....A.....
4               .....ATATAT..G.....A.....
11              .....ATATAT..G.....A.....
13              .....ATATAT..G.....A.....
14              .....ATATAT..G.....A.....
16              .....ATATAT..G.....A.....
1               .....ATATAT..G.....A.....
2               .....ATATAT..G.....A.....
3               .....ATATAT..G.....A.....
15              .....ATATAT..G.....A.....
25              .....ATATAT..G.....A.....
24              .....TATA---.ATATAT..G.....A.....
23              .....TATA---.ATATAT..G.....A.....
22              .....TATA---.ATATAT..G.....A.....
18              .....TATA---.ATATAT..G.....A.....
19              .....TATA---.ATATAT..G.....A.....
17              .....TATA---.ATATAT..G.....A.....
20              .....TATA---.ATATAT..G.....A.....
21              .....TATA---.ATATAT..G.....A.....
26              .....TATATA..ATATAT..G.....A.....
28              .....TATATA..ATATAT..G.....A.....
27              .....TATATA..ATATAT..G.....A.....
32              .....TATATA..ATATAGA..G.....A.....
31              .....TATATA..ATATAT..G.....A.....
29              .....TATATA..ATATAT..G.....A.....
33              .....TATATA..ATATAT..G.....A.....
34              .....TATATA..ATATAT..G.....A.....
30              .....TATATA..ATATAT..G.....A.....
  
```

```

Cal.anemonides  0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010001 [196]
P.chinensis     000000000000000000000000000000000000000000000000000000001000000000000 [210]
P.pratensis     000000000000000000000000000000000000000000000000000000001000000000000 [210]
P.vernalis      000000000000000000000000000000000000000000000000000000001000000000000 [211]
P.kostyczewii   111110000000000000000111000000000000000000000000000000000100000000001000 [228]
OCC             0000000000000000000000000000000000001111000000001100000000000100000 [228]
AUR             0000010000000000000000000000000000000000000000000000000010000000010110000000000000 [241]
7               00000000110000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000 [242]
5               0000000000000000000000000000000000000000000011000000010000000000011000000 [235]
6               00000000000000000000000000000000000000000000000000000000110000001000000000011000000 [236]
9               00000000000000000000000000000000000000000000011000000010000000000111000000 [237]
8               000000000000000000000000000000000000000000000011000000010000000000111000000 [237]
10              00000000000000000000000001000000011000110100000000000000000 [237]
12              00000000000000000000000000000000000000000000011000010100000000000000000 [244]
4               0000000000000000000000000000000000000000000000000110110011000001000000000000000 [249]
11              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000011000001100000000000000000 [239]
13              00000000000000000000000000000000000000000000100000000110000000100000000000000000 [238]
14              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000 [232]
16              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000 [231]
1               00000000000000000000000000000000000000000000100011100000010100000000000000000 [250]
2               00000000000000000000000000000000000000000000000000000000100011000000010000000000000000 [234]
3               00000000000000000000000000000000000000000000000000000000100011000000010000000000000000 [233]
15              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000 [224]
25              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000 [223]
24              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010 [230]
23              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010 [235]
22              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010 [238]
18              0000000001000000000000000000000000111000001000000000000000000000000000010 [254]
19              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010 [248]
17              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010 [255]
20              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010 [244]
21              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010 [254]
26              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010 [228]
28              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010 [228]
27              0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010 [227]
32              0000001000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010 [259]
31              0000001000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000010 [259]
  
```

Alignment der Sequenzen des *trnL-trnF*-Fragmentes lf1: Fortsetzung.

```
29      0000001000000000000100010000000000100000000000000000110000000010 [208]
33      0000001000000000000100010000000000100000000000000000101000000010 [266]
34      00000010000000000001000100000000001000000000000000001101000000010 [215]
30      0000001000000000000100010000000000100000000000000000000000000010 [222]
```

Tab. A7: Alignment der Sequenzen der Haplotypen des *trnL-trnF*-Fragmentes lf2 der Gattung *Pulsatilla* und *Callianthemum anemonides* (Außengruppe). Unsichere Positionen wurden mit N codiert, Alignmentgaps mit -. Der Wert [n] gibt die tatsächliche Anzahl der amplifizierten Basen an. Die Indels der mittelgrau markierten Bereiche wurden als 0/1-Matrix codiert und an das Ende des Alignments gestellt.

				75	
Cal. anemonides	TAGGAGAAAGGAATTC	CCATTG	AATCATT	CACGTT	TAAT-----ATAATTATTTAAACT [55]
TAR [55]
CHI	..T..... [55]
PRA [55]
VER [55]
KOST.....	TTTAATC	ATTACGTT	TAAT.....A..... [75]
PIC [55]
OCC [55]
ALP [55]
API [55]
API-sc [55]
API-mitpyr [55]
API-40fq [55]
				150	
Cal. anemonides	TACAAACAAA-----	GTATTTTTTTT	GTGTT-----	GAAGATCCAAGACCAATA [98]	
TARG. [98]
CHIG. [98]
PRAG. [98]
VER	AACTTACAAACAAAG. [112]
KOSG. [118]
PICG. [98]
OCCC.G. [98]
ALPG. [98]
API	AAAGTATTC	TTTTTGTGTT.....G. [116]
API-sc	AAAGTATTC	TTTTTGTGTTA.....G. [116]
API-mitpyrG. [98]
API-40fq	AAAGTATTC	TTTTTGTGTT.....G. [116]
				225	
Cal. anemonides	AATTC	CAGGGTTTGGGTA	AGACTTTGTAATGC	TTTTTTTTTAG	TTTTTAGTCTATTATTTAATTGATATACCCAAC [171]
TAR [160]
CHI	..A..... [160]
PRA [160]
VER [174]
KOSA..... [180]
PIC [160]
OCC [160]
ALP [160]
API [178]
API-scA..... [178]
API-mitpyrA..... [160]
API-40fqA..... [178]
				297	
Cal. anemonides	AAGTACTCTAAA-----	TAGAGTGGGGATGCCGCATCGGGAAGAGTCGGGATAGCTCAGTTGGT			000011100 [230]
TAR	000000000 [219]
CHI	GTTTAGAGTACTCTAAA	000000011 [232]
PRACGAGTACTCTAAA	000000001 [232]
VERCGAGTACTCTAAA	010000001 [246]
KOSCAAGTACTCTAAAC.....	100000001 [251]
PICCAAGTACTCTAAA	000000001 [232]
OCCCAAGTACTCTAAA	000000001 [232]
ALPCAAGTACTCGAAA	000000001 [232]
APICAAGTACTCTAAA	001000001 [250]
API-scCAAGTACTCTAAA	001000001 [250]
API-mitpyrCAAGTACTCTAAA	001100001 [232]
API-40fqCAAGTACTCTAAA	001000001 [250]

Tab. A8: Alignment der ITS-Sequenzen (incl. 5.8S rDNA) der Gattung *Pulsatilla* und *Callianthemum anemonides*, *Clematis recta*, *C. afoliata* und *Anemone antucensis* (Außengruppen). Unsichere Positionen wurden mit N codiert, Alignmentgaps mit -. Der Wert [n] gibt die tatsächliche Anzahl der amplifizierten Basen an.

	75	
Cal.anemonides	TGCATACCTGCTCAGCAGAACGACCCGCGAACACGCTGAAAACACTTATCATGCCCGGGGA-----GCGGGC-		[67]
Cle.rectaCAC--C--A....-CCYTA-.....		[67]
Cle.afoliataC.....G.....CAC--C--A....-CGC.CC..C		[66]
Ane.antucensisA.....CAC--A.....A.ACGGGAT...-AC		[70]
P.kostyczewii	C....G....C.....A.....CGCC.T.....ACAGGC..C.TAC		[74]
P.campanellaG.....A.....C.AAC.....-.....ACAGGAT..C..AC		[74]
P.vernalisG.....A.....AAC...C.....AYAGGAC..Y..AC		[74]
P.chinensisG.....Y.....A.....C.AAC...C.....ACAGGAC..C..AC		[74]
P.cernuaG.....A.....C.AAC...C.....ACAGGAC..CA..AC		[74]
P.pratensisG.....A.....C.AAC...C.....ACAGGAC..C..AC		[74]
P.halleriG.....A.....C.AAC...C.....ACAGGAY..C..MC		[74]
P.rubraG.....A.....C.AAC...C.....ACAGGAC..C..AC		[74]
P.slavicaG.....A.....C.AAC...C..Y.....ACAGGAC..C..MC		[74]
P occidentalis	Y....G.....A.....AAC.....ACAGGAT.AAA.AC		[74]
P.aureaG.....A.....AAC...C.....ACAGGAT..C..AC		[74]
P.a.austriacaG.....A.....AAC...C.....ACAGGAT..C..AC		[74]
P.a.alpicolaG.....A.....AAC...C.....ACAGGAT..C..AC		[74]
P.a.alpinaG.....T.....A.....AAC...C.....ACAGGAT..C..AC		[74]
P.a.millefoliataG.....A.....AAC...C.....ACAGGAT..C..AC		[74]
P.a.font-queriG.....A.....AAC...C.....ACAGGAT..C..AC		[74]
P.a.australpinaG.....A.....AAC...C.....ACAGKAT..C..AC		[74]
P.a.montis-niveaeG.....A.....AAC...C.....ACAGGAT..C..AC		[74]
P.a.cyrneaG.....A.....AAC...C.....ACAGGAT..C..AC		[74]
P.a.cantabtricaG.....A.....AAC...C.....ACAGGAT.S.C..AC		[74]
P.a.apiifoliaG.....A.....AAC...C.....ACAGGAT..C..AC		[74]

		150	
Cal.anemonides	-----TCCGGCCAG-CGACCC-GG---T--GCAGCAA--CAAAA--TCCGGCGCAACTGGCGTCAAGGAAA		[122]
Cle.recta	-----T.CC---.TA.T-----G..AA.....		[112]
Cle.afoliata	AACA-----G.....CCC--C--TA--C-----GG.AA.....		[120]
Ane.antucensis	AACCTAACCGTT..TCCAT..G-C.AA-C-G..TA---TT.AA.....		[139]
P.kostyczewii	GGCCTCACCG.C...CCT-TT..TGC.CCCCGGC..A-CCAA.....C.....T		[145]
P.campanella	AGCCTCACCGY.T..TCC...TGC.CCCCA--..CA.CT-T...AA.Y.....C.....T		[145]
P.vernalis	AGCCTCACCG.T...CCC...TGC.ACCC-A..CACCA.....AA.....C.....T		[146]
P.chinensis	AGCCTCACCG.T...CCC...GC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....T.....C.....T		[145]
P.cernua	AGCCTCACCG.T...CCC...TGC.CCCCA--..CA.CAA--..AA.....C.....T		[145]
P.pratensis	AGCCTCACCG.T...CCC...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....M.....C.....T		[145]
P.halleri	AGCCTCACCG.T...CCC...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....C.....T		[145]
P.rubra	AGCCTCACCG.T...CCC...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....C.....T		[145]
P.slavica	AGCCTCACCG.T...CCC...TGC.CCCCA--..CA.BA--..AA.....C.....T		[145]
P.occidentalis	AGCCTCACCGTT..TTC...TGT.CCCC--..CA.CA-M..AA.T.....C.....		[145]
P.aurea	AGCCTCACCGTT..TCT...TGT.CCCCA--..CA.CA--..AAA.....C.....		[145]
P.a.austriaca	AGCCTCACCGTT..TCT...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....C.....		[145]
P.a.alpicola	AGCCTCACCGTT..TCT...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....C.....		[145]
P.a.alpina	AGCCTCACCGTT..TCT...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....C.....		[145]
P.a.millefoliata	AGCCTCACCGTT..TCT...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....C.....		[145]
P.a.font-queri	AGCCTCACCGTT..TCT...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....C.....		[145]
P.a.australpina	AGCCTCACCGTT..TCT...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....C.....		[145]
P.a.montis-niveae	AGCCTCACCGTT..CCT...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....C.....		[145]
P.a.cyrnea	AGCCTCACCGTT..TCT...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....C.....		[145]
P.a.cantabtrica	AGCCTCACCGTT..TCK...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....C.....		[145]
P.a.apiifolia	AGCCTCACCGTT..TCG...TGC.CCCCA--..CA.CA--..AA.....C.....		[145]

		225	
Cal.anemonides	ACTCACCGGAAGCAAGGCGTCGGC----TCG-TCCGGCGCG-CGT--ATCCGAATACT-CAAACGACTCTCG		[186]
Cle.recta	...T.G....A....G.AA...CCGTCA.A-GGGACG-A.CC.AAGA.....C..C-		[183]
Cle.afoliata	...T.....A....G.--A-C--TAATA-----CC.AAGA-----		[177]
Ane.antucensis	...T.....A....G....A.CCGTAA.AAGGAA.GCA.C--AAGA-----		[210]
P.kostyczewii	...T.....AAT.Y.G.C.....A.ACAT--..G..C..AG-----		[208]
P.campanella	...T.....A..GC.G.....A.ACGT--..A..C..GG-----		[208]
P.vernalis	...T.....A..C.G.....A.ATGT--..A..C..GG-----		[209]
P.chinensis	...T.....AT..C.G.....A.AAGT--..AY.CY..GG-----		[208]
P.cernua	...T.....A..C.G.....A.ACGT--..A..C..GG-----		[208]
P.pratensis	...T.....A..C.G.....A.ACGT--..A..C..GG-----		[208]
P.halleri	...T.....A..C.G.....A.ACGT--..A..C..GG-----R.....		[208]
P.rubra	...T..S...A..C.G.....A.ACGT--..A..C..GG-----		[208]
P.slavica	...T.....A..C.G...K-----A.ACGT--..A..C..GG-----RR.....		[208]
P.occidentalis	...T.....AT..C.G.....A.ATGT--..A..C..AC-----		[208]
P.aurea	...T.....A.R.T.G.....A.ATGT--..A..C..AG-----		[208]
P.a.austriaca	...T.....A..T.G.....A.ATGT--..A..C..AG-----		[208]
P.a.alpicola	...T.....A..T.G.....A.ATGT--..A..C..AG-----		[208]
P.a.alpina	...T.....A..T.G.....A.ATGT--..A..C..AG-----		[208]
P.a.millefoliata	...T.....A..T.G.....A.ATGT--..A..C..AG-----		[208]
P.a.font-queri	...T.....A..T.G.....A.ATGT--..A..C..AG-----		[208]
P.a.australpina	...T.....A..T.G.....A.ATGT--..A..C..AG-----		[208]
P.a.montis-niveae	...T.....A..T.G.....A.ATGT--..A..C..AG-----		[208]
P.a.cyrnea	...T.....A..T.G.....A.ATGT--..A..C..AG-----		[208]
P.a.cantabtrica	...T.....A..T.G.....A.ATGT--..A..C..AG-----		[208]
P.a.apiifolia	...T.....A..T.G.....A.ATGT--..A..C..AG-----		[208]

Alignment der ITS-Sequenzen: Fortsetzung.

	300	
Cal.anemonides	GCAACGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC	[261]
Cle.recta	[258]
Cle.afoliata	[252]
Ane.antucensis	[285]
P.kostyczewii	[283]
P.campanella	[283]
P.vernalialia	[284]
P.chinensis	[283]
P.cernua	[283]
P.pratensis	[283]
P.halleri T..... S...A.S.....T...M.....K.....S.	[283]
P.rubraW.....Y.T.....R.S.....K.....K.....S.	[283]
P.slavicaW.....T.....KS...R.C.....TSR..M..M.....K.....	[283]
P.occidentalis	[283]
P.aurea	[283]
P.a.austriaca	[283]
P.a.alpicola	[283]
P.a.alpina	[283]
P.a.millefoliata	[283]
P.a.font-queri	[283]
P.a.austroalpina	[283]
P.a.montis-niveae	[283]
P.a.cyrnea	[283]
P.a.cantabtricaK.....	[283]
P.a.apiifolia	[283]
	375	
Cal.anemonides	GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTCTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGGCTCAC	[336]
Cle.recta T..T..A.A.....T.....	[333]
Cle.afoliata T..T.CA.A.....T.....	[327]
Ane.antucensis -A..AGT..TT.....T.....	[359]
P.kostyczewii T.C..T.....T.....	[358]
P.campanella A..T...T.....T.....	[358]
P.vernalialia A..T.C..T.....T.....	[359]
P.chinensis A..T.C..T.....T.....	[358]
P.cernua A..T.C..T.....T.....	[358]
P.pratensis A..T.C..T.....T.....	[358]
P.halleri K..... A..T.C..T...R.....TY.....	[358]
P.rubra K..... A..T.C..T...M.TY.....M	[358]
P.slavica RR.....K.....M.....R...T.C..T.....M.T.....	[358]
P.occidentalis A..T.C..T.....T.....	[358]
P.aurea A..T.C..T.....T.....	[358]
P.a.austriaca A..T.C..T.....T.....	[358]
P.a.alpicola A..T.C..T.....T.....	[358]
P.a.alpina A..T.C..T.....T.....	[358]
P.a.millefoliata A..T.C..T.....T.....	[358]
P.a.font-queri A..T.C..T.....T.....	[358]
P.a.austroalpina A..T.C..T.....T.....	[358]
P.a.montis-niveae A..T.C..T.....T.....	[358]
P.a.cyrnea A..T.C..T.....T.....	[358]
P.a.cantabtrica K.K.....D.....K...WA...T.C..T.K.....T.....	[358]
P.a.apiifolia A..T.C..T.....T.....	[358]
	450	
Cal.anemonides	AC-ACAGCGTCGCCCCCACCACCAATCCCTTTGGACGGGATGGGGGGCGGAGATTGGCCCCCGAGCCCTCC-GGGG	[409]
Cle.rectaG...CT..GGA-----A.C.....C.AC...	[400]
Cle.afoliataG...CT..GGA-----A.C.....C.AC...	[394]
Ane.antucensisT.....T.A...T..AGGA----A..A.....CT--T..	[425]
P.kostyczewiiAT...CG.G.....GG-----CT-C...	[425]
P.campanellaAG.A...T..GG-----A.....C.-C...	[424]
P.vernalialiaAG.A...T..GG-----A.....C.-C...	[425]
P.chinensisAG.A...T..GG-----A.....C.-T...	[423]
P.cernuaAG.A...T..GG-----A.....C.-C...	[424]
P.pratensisAG.A...T.K.GG-----A.....C.-C...	[424]
P.halleriY.....R..AG.A...T..GG-----A.....C.-C...	[424]
P.rubraY.....M..AG.A...T..GG-----A.....C.-C...	[424]
P.slavicaY.....AG.A...HT..GG-----A.....R...C.-C...	[424]
P.occidentalisG.A...T..GG-----T.....CY-T...	[425]
P.aureaG.A...T..GG-----A.....C.-T...	[424]
P.a.austriacaG.A...T..GG-----A.....C.-T...	[425]
P.a.alpicolaG.A...T..GG-----A.....C.-T...	[425]
P.a.alpinaT.....G.A...T..GG-----A.....CT-T...	[425]
P.a.millefoliataG.A...T..GG-----A.....CT-T...	[425]
P.a.font-queriG.A...T..GG-----A.....CT-T...	[425]
P.a.austroalpinaG.A...T..GG-----A.....CT-T...	[425]
P.a.montis-niveaeG.A...T..GG-----A.....CT-T...	[425]
P.a.cyrneaS...G.A...WT..GG-----A.....CT-T...	[424]
P.a.cantabtricaG.A...T..GG-----A.....CT-T...	[425]
P.a.apiifoliaG.A...T..GG-----A.....CT-T...	[424]

Alignment der ITS-Sequenzen: Fortsetzung.

	525	
Cal. anemonides	T-ACGGTCGGCATAAAATGTTGGTCCCCGTCGGCGAGCGTCGCGGTCAGCGGTGGTTGTATATACTCATCCCC-A	[482]
Cle. recta	-C...C...C...T...G...CC--...C...-	[471]
Cle. afoliata	-C...C...C...T...G...CT--...C...-	[465]
Ane. antucensis	.C...CC...A...T...G...T...T...--...T...GT.	[498]
P. kostyczewii	-T...C...C...C...T...G...G...T--...T...-G	[496]
P. campanella	-C...C...C...C...T...G...CT--...T...-	[495]
P. vernalia	-C...C...C...C...T...G...CT--...T...-	[496]
P. chinensis	-C...C...C...C...T...G...Y...CT--...T...-	[494]
P. cernua	-C...C...C...C...T...G...T...CT--...T...-	[495]
P. pratensis	-C...C...C...C...T...G...CT--...T...-	[495]
P. halleri	-C...C...C...KC...T...G...YSM...CT--...K...-	[495]
P. rubra	-C...C...C...C...T...K...CT--...T...-	[495]
P. slavica	-C...S...C...C...ST...CT--...K...-	[495]
P. occidentalis	-C...T...C...C...T...G...T--...T...-	[496]
P. aurea	-C...C...C...C...T...G...T--...T...-	[495]
P. a. austriaca	-C...C...C...C...T...G...T--...T...-	[496]
P. a. alpicola	-C...C...C...C...T...G...T--...T...-	[496]
P. a. alpina	-C...C...C...C...T...G...T--...T...-	[496]
P. a. millefoliata	-C...C...C...C...T...G...T--...T...-	[496]
P. a. font-queri	-C...C...C...C...T...G...T--...T...-	[496]
P. a. austroalpina	-C...C...C...C...T...G...T--...T...-	[496]
P. a. montis-niveae	-C...C...C...C...T...G...T--...T...-	[496]
P. a. cyrnea	-C...C...C...RC...T...G...T--...T...-	[495]
P. a. cantabtrica	-C...C...C...C...T...G...Y...T--...T...-	[496]
P. a. apiifolia	-C...C...C...C...T...G...T--...T...-	[495]

	539	
Cal. anemonides	AAGACGAAA-TGAC	[495]
Cle. rectaAG..AC...	[485]
Cle. afoliataAG..AC...	[479]
Ane. antucensis	.T...CGTA...	[512]
P. kostyczewii-	[509]
P. campanellaA...-	[508]
P. vernaliaA...-	[509]
P. chinensisA...-	[507]
P. cernuaA...-	[508]
P. pratensisA...-	[508]
P. halleriA...-	[508]
P. rubraA...-	[508]
P. slavicaA...-	[508]
P. occidentalisA...-	[509]
P. aureaA...-	[508]
P. a. austriacaA...-	[509]
P. a. alpicolaA...-	[509]
P. a. alpinaA...-	[509]
P. a. millefoliataA...-	[509]
P. a. font-queriA...-	[509]
P. a. austroalpinaA...-	[509]
P. a. montis-niveaeA...-	[509]
P. a. cyrneaA...-	[508]
P. a. cantabtricaA...-	[509]
P. a. apiifoliaA...-	[508]

Tab. A9: Alignment der ITS-Sequenzen (incl. 5.8S rDNA) der Vertreter der Populationen der Sektion *Preonanthus* (vgl. Tab. A1). Unsichere Positionen wurden mit N codiert, Alignmentgaps mit -. Der Wert [n] gibt die tatsächliche Anzahl der amplifizierten Basen an.

	75	
Pop1_1	TCGATGCCTGCTCAGCAGAACGACMCGCGAACCAAGTGAAAAACAACAACCTCACGCCGGGAACAGGATGCCGGACA	[75]
Pop2_1C.....W.....	[75]
Pop3_1C.....	[75]
Pop4_2C.....	[75]
Pop5_1C.....	[75]
Pop6_1C.....	[75]
Pop6_2C.....	[75]
Pop7_1C.T.....R.....	[75]
Pop7_2C.....	[75]
Pop8_1C.....	[75]
Pop9_1C.T.....	[75]
Pop10_1C.....	[75]
Pop11_1C.A.....	[75]
Pop12_1C.....	[75]
Pop13_1C.....	[75]
Pop14_1C.....	[75]
Pop15_2C.....	[75]
Pop16_2C.....	[75]
Pop17_1C.....	[75]
Pop18_1C.....	[75]
Pop19_1C.....	[75]
Pop19_5C.....	[75]
Pop19_3C.....	[75]
Pop20_6C.....	[75]
Pop21_1C.....	[75]
Pop21_9C.....	[75]
Pop22_1C.....	[75]
Pop23_1Y.C.....	[75]
Pop23_2C.....	[75]
Pop24_1C.....K.....	[75]
Pop25_1C.....	[75]
Pop25_3C.....	[75]
Pop26_1C.....W.....	[75]
Pop27_1C.....	[75]
Pop28_1C.....R.....	[75]
Pop29_1C.A.....	[75]
Pop30_1C.....W.....	[75]
Pop31_1C.....	[75]
Pop32_1C.....	[75]
Pop32_8C.....	[75]
Pop33_1C.....	[75]
Pop34_1C.....	[75]
Pop35_1C.....	[75]
Pop37_1C.K.....	[75]
Pop37_6C.....	[75]
Pop38_1C.....	[75]
Pop38_2C.....	[75]
Pop39_1C.....	[75]
Pop40_1C.....	[75]
Pop41_1C.Y.....	[75]
Pop41_3C.Y.....	[75]
Pop42_4C.....	[75]
Pop43_1C.....	[75]
Pop44_4C.....	[75]
Pop44_1C.....	[75]
Pop45_1C.....	[75]
Pop46_1C.....	[75]
Pop47_1C.....	[75]
Pop48_3C.....	[75]
Pop49_1C.....	[75]
Pop50_1C.....S.....	[75]
Pop51_1C.....	[75]
Pop51_9C.....	[75]
Pop52_1C.....	[75]
Pop53_1C.....	[75]
Pop53_2C.....	[75]
Pop53_3C.....	[75]
Pop54_1C.....	[75]
Pop54_2C.....	[75]
Pop55_1C.....	[75]
Pop55_2C.....	[75]
Pop56_1C.....	[75]
Pop57_1C.....	[75]
Pop59_1	Y.....C.....T.....AAA.....	[75]
Pop58_1C.....	[75]
Pop58_2C.....	[75]
Pop60_1C.....S.....	[75]
Pop61_1C.....C.....	[75]
Pop62_1C.....	[75]
Pop63_1C.....	[75]
Pop64_1C.Y.....	[75]
Pop65_1C.....	[75]
Pop66_1R.....C.....	[75]
Pop67_1C.....	[75]

Alignment der ITS-Sequenzen: Fortsetzung.

	150	
Pop1_1	GCCTCACCGTTGCCTCTGACCTGCGCCCCAGCACAACACAAAAATCCGGC-GCAACTGGCGCCAAGGAAAACCTT	[149]
Pop2_1	[149]
Pop3_1V.....	[149]
Pop4_2	[149]
Pop5_1	[149]
Pop6_1K.....	[149]
Pop6_2	[149]
Pop7_1	[149]
Pop7_2	[149]
Pop8_1G.....	[149]
Pop9_1	[149]
Pop10_1	[149]
Pop11_1	[149]
Pop12_1	[149]
Pop13_1	[149]
Pop14_1G.....	[149]
Pop15_2	[149]
Pop16_2	[149]
Pop17_1	[149]
Pop18_1C.....A.....	[149]
Pop19_1C.....	[149]
Pop19_5C.....	[149]
Pop19_3C.....	[149]
Pop20_6	[149]
Pop21_1	[149]
Pop21_9	[149]
Pop22_1	[149]
Pop23_1R.....	[149]
Pop23_2R.....	[149]
Pop24_1	[149]
Pop25_1	[149]
Pop25_3	[149]
Pop26_1C.....	[149]
Pop27_1C.....	[149]
Pop28_1C.K.....	[149]
Pop29_1	[149]
Pop30_1K.....	[149]
Pop31_1	[149]
Pop32_1K.....Y.....	[149]
Pop32_8	[149]
Pop33_1G.....	[149]
Pop34_1	[149]
Pop35_1	[149]
Pop37_1G.....	[149]
Pop37_6K.....W.....G.....W.....Y.....	[150]
Pop38_1G.....	[149]
Pop38_2G.....	[149]
Pop39_1G.....	[149]
Pop40_1	[149]
Pop41_1	[149]
Pop41_3	[149]
Pop42_4G.....	[149]
Pop43_1	[149]
Pop44_4	[149]
Pop44_1	[149]
Pop45_1	[149]
Pop46_1	[149]
Pop47_1G.....	[149]
Pop48_3	[149]
Pop49_1	[149]
Pop50_1K.....	[149]
Pop51_1	[149]
Pop51_9	[149]
Pop52_1	[149]
Pop53_1T.....	[149]
Pop53_2T.....	[149]
Pop53_3T.....	[149]
Pop54_1	[149]
Pop54_2K.....	[149]
Pop55_1K.....	[149]
Pop55_2K.....	[149]
Pop56_1	[149]
Pop57_1	[149]
Pop59TC.....T.....T.....M.....T.....	[149]
Pop58_1T.....T.....A.....	[149]
Pop58_2T.....A.....	[149]
Pop60_1K.....	[149]
Pop61_1	[149]
Pop62_1G.....	[149]
Pop63_1G.....Y.....	[149]
Pop64_1G.....	[149]
Pop65_1G.....	[149]
Pop66_1G.....Y.....	[149]
Pop67_1	[149]

Alignment der ITS-Sequenzen: Fortsetzung.

225

Pop1_1	ACCGGAAACAATGGGTCGACATGTCGACGCCGTAGATCCGAATACTCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGG	[224]
Pop2_1	[224]
Pop3_1	[224]
Pop4_2	[224]
Pop5_1Y.....	[224]
Pop6_1	[224]
Pop6_2	[224]
Pop7_1	[224]
Pop7_2	[224]
Pop8_1	[224]
Pop9_1	[224]
Pop10_1	[224]
Pop11_1	[224]
Pop12_1Y.....	[224]
Pop13_1	[224]
Pop14_1Y.....	[224]
Pop15_2	[224]
Pop16_2	[224]
Pop17_1	[224]
Pop18_1	[224]
Pop19_1Y.....S.....	[224]
Pop19_5	[224]
Pop19_3	[224]
Pop20_6Y.....	[224]
Pop21_1Y.....	[224]
Pop21_9Y.....N.....	[224]
Pop22_1	[224]
Pop23_1T.....W.....T.....	[224]
Pop23_2	[224]
Pop24_1	[224]
Pop25_1	[224]
Pop25_3	[224]
Pop26_1	[224]
Pop27_1	[224]
Pop28_1	[224]
Pop29_1	[224]
Pop30_1	[224]
Pop31_1	[224]
Pop32_1	[224]
Pop32_8	[224]
Pop33_1	[224]
Pop34_1	[224]
Pop35_1	[224]
Pop37_1	[224]
Pop37_6	[225]
Pop38_1	[224]
Pop38_2	[224]
Pop39_1	[224]
Pop40_1	[224]
Pop41_1	[224]
Pop41_3	[224]
Pop42_4	[224]
Pop43_1	[224]
Pop44_4	[224]
Pop44_1	[224]
Pop45_1Y.....	[224]
Pop46_1	[224]
Pop47_1	[224]
Pop48_3	[224]
Pop49_1Y.....	[224]
Pop50_1	[224]
Pop51_1	[224]
Pop51_9	[224]
Pop52_1	[224]
Pop53_1T.....	[224]
Pop53_2T.....	[224]
Pop53_3T.....	[224]
Pop54_1	[224]
Pop54_2	[224]
Pop55_1	[224]
Pop55_2	[224]
Pop56_1Y.....	[224]
Pop57_1Y.....	[224]
Pop59T.C.....C.....	[224]
Pop58_1R.....	[224]
Pop58_2R.....	[224]
Pop60_1	[224]
Pop61_1	[224]
Pop62_1	[224]
Pop63_1	[224]
Pop64_1	[224]
Pop65_1	[224]
Pop66_1	[224]
Pop67_1	[224]

Alignment der ITS-Sequenzen: Fortsetzung.

	300	
Pop1_1	CTCTTGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCT	[299]
Pop2_1	[299]
Pop3_1	[299]
Pop4_2	[299]
Pop5_1	[299]
Pop6_1	[299]
Pop6_2	[299]
Pop7_1	[299]
Pop7_2	[299]
Pop8_1	[299]
Pop9_1	[299]
Pop10_1	[299]
Pop11_1	[299]
Pop12_1	[299]
Pop13_1	[299]
Pop14_1	[299]
Pop15_2	[299]
Pop16_2	[299]
Pop17_1	[299]
Pop18_1	[299]
Pop19_1	[299]
Pop19_5	[299]
Pop19_3	[299]
Pop20_6	[299]
Pop21_1N.....	[299]
Pop21_9	[299]
Pop22_1	[299]
Pop23_1	[299]
Pop23_2	[299]
Pop24_1	[299]
Pop25_1N.....	[299]
Pop25_3N.....	[299]
Pop26_1	[299]
Pop27_1	[299]
Pop28_1	[299]
Pop29_1	[299]
Pop30_1	[299]
Pop31_1	[299]
Pop32_1	[299]
Pop32_8	[299]
Pop33_1	[299]
Pop34_1	[299]
Pop35_1	[299]
Pop37_1A.....	[299]
Pop37_6R.....	[300]
Pop38_1	[299]
Pop38_2	[299]
Pop39_1	[299]
Pop40_1	[299]
Pop41_1	[299]
Pop41_3	[299]
Pop42_4	[299]
Pop43_1	[299]
Pop44_4	[299]
Pop44_1	[299]
Pop45_1	[299]
Pop46_1	[299]
Pop47_1K.....R.....K.....	[299]
Pop48_3	[299]
Pop49_1	[299]
Pop50_1	[299]
Pop51_1	[299]
Pop51_9	[299]
Pop52_1	[299]
Pop53_1	[299]
Pop53_2	[299]
Pop53_3C.....	[299]
Pop54_1	[299]
Pop54_2	[299]
Pop55_1	[299]
Pop55_2	[299]
Pop56_1	[299]
Pop57_1	[299]
Pop59	[299]
Pop58_1	[299]
Pop58_2	[299]
Pop60_1K.....K.K.....	[299]
Pop61_1	[299]
Pop62_1	[299]
Pop63_1	[299]
Pop64_1	[299]
Pop65_1	[299]
Pop66_1	[299]
Pop67_1	[299]

Alignment der ITS-Sequenzen: Fortsetzung.

	375	
Pop1_1	TTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAACCTTTCTGGTCGAGGGCACGTCCTGCCTGGGCGTCACACACAGCGTCGCCCC	[374]
Pop2_1	[374]
Pop3_1Y.....T.....	[374]
Pop4_2T.....	[374]
Pop5_1T.....	[374]
Pop6_1	[374]
Pop6_2	[374]
Pop7_1T.....	[374]
Pop7_2Y.....	[374]
Pop8_1	[374]
Pop9_1T.....	[374]
Pop10_1N.....	[374]
Pop11_1	[374]
Pop12_1	[374]
Pop13_1T.....	[374]
Pop14_1	[374]
Pop15_2	[374]
Pop16_2	[374]
Pop17_1A.....	[374]
Pop18_1	[374]
Pop19_1	[374]
Pop19_5	[374]
Pop19_3	[374]
Pop20_6	[374]
Pop21_1N.....N.....	[374]
Pop21_9	[374]
Pop22_1R.....	[374]
Pop23_1	[374]
Pop23_2	[374]
Pop24_1	[374]
Pop25_1	[374]
Pop25_3	[374]
Pop26_1	[374]
Pop27_1	[374]
Pop28_1	[374]
Pop29_1	[374]
Pop30_1Y.....	[374]
Pop31_1	[374]
Pop32_1	[374]
Pop32_8	[374]
Pop33_1	[374]
Pop34_1	[374]
Pop35_1	[374]
Pop37_1GC.....Y.....	[373]
Pop37_6	[375]
Pop38_1	[374]
Pop38_2	[374]
Pop39_1C.....	[374]
Pop40_1	[374]
Pop41_1Y.....	[374]
Pop41_3Y.....	[374]
Pop42_4	[374]
Pop43_1	[374]
Pop44_4	[374]
Pop44_1	[374]
Pop45_1	[374]
Pop46_1W.....N.....	[374]
Pop47_1Y.....Y.....Y.....	[374]
Pop48_3	[374]
Pop49_1	[374]
Pop50_1T.....	[374]
Pop51_1	[374]
Pop51_9	[374]
Pop52_1	[374]
Pop53_1	[374]
Pop53_2	[374]
Pop53_3R.....	[374]
Pop54_1	[374]
Pop54_2	[374]
Pop55_1	[374]
Pop55_2	[374]
Pop56_1	[374]
Pop57_1	[374]
Pop59	[374]
Pop58_1	[374]
Pop58_2	[374]
Pop60_1D.....K.....W.....K.....	[374]
Pop61_1	[374]
Pop62_1	[374]
Pop63_1	[374]
Pop64_1	[374]
Pop65_1	[374]
Pop66_1	[374]
Pop67_1T.....	[374]

Alignment der ITS-Sequenzen: Fortsetzung.

	450	
Pop1_1	CACCAATGCATTTGGATGGGGCGGAAATTGGCCCCCGAGCCCCCTGGGGCACGGTCGGCACAAATGTTGGCCC	[449]
Pop2_1	[449]
Pop3_1T.....	[449]
Pop4_2T.....	[449]
Pop5_1T.....N.....	[449]
Pop6_1	-.....T.....	[448]
Pop6_2T..R.....	[449]
Pop7_1T.....	[449]
Pop7_2T.....	[449]
Pop8_1	-.....T.....	[448]
Pop9_1T.....	[449]
Pop10_1T..R.....	[449]
Pop11_1T.....	[449]
Pop12_1T.....	[449]
Pop13_1T.....	[449]
Pop14_1T.....	[449]
Pop15_2T.....	[449]
Pop16_2	-.....T.....	[448]
Pop17_1T.....	[449]
Pop18_1T.....	[449]
Pop19_1R.....	[449]
Pop19_5R.....Y.....	[449]
Pop19_3T.....	[449]
Pop20_6	[449]
Pop21_1T..Y.....	[449]
Pop21_9K.....	[449]
Pop22_1	[449]
Pop23_1	[449]
Pop23_2	[449]
Pop24_1T.....	[449]
Pop25_1	[449]
Pop25_3	[449]
Pop26_1T.....	[449]
Pop27_1T.....W.....	[449]
Pop28_1T.....W.....	[449]
Pop29_1	[449]
Pop30_1	[449]
Pop31_1	[449]
Pop32_1	[449]
Pop32_8	[449]
Pop33_1	-.....T.....	[448]
Pop34_1	[449]
Pop35_1	[449]
Pop37_1T.....	[448]
Pop37_6T.....	[450]
Pop38_1T.....	[449]
Pop38_2T.....	[449]
Pop39_1	-.....T.....	[448]
Pop40_1T.....	[449]
Pop41_1T.....	[449]
Pop41_3T..A.....	[449]
Pop42_4	[449]
Pop43_1	-.....	[448]
Pop44_4	-S.....W.....T.....R.....	[448]
Pop44_1	-S.....W.....T.....R.....	[448]
Pop45_1T.....R.....	[449]
Pop46_1	-.....T.....	[448]
Pop47_1	-M.....R.....Y.....Y.....	[448]
Pop48_3T.....	[449]
Pop49_1	[449]
Pop50_1T.....	[449]
Pop51_1T.....	[449]
Pop51_9T.....	[449]
Pop52_1	[449]
Pop53_1	-.....	[448]
Pop53_2	-.....	[448]
Pop53_3	-.....	[448]
Pop54_1T.....	[449]
Pop54_2T.....	[449]
Pop55_1T.....	[449]
Pop55_2T.....	[449]
Pop56_1	[449]
Pop57_1	[449]
Pop59T.....Y.....T.....	[449]
Pop58_1	-.....	[448]
Pop58_2	-.....	[448]
Pop60_1T.....	[449]
Pop61_1T.....	[449]
Pop62_1T.....	[449]
Pop63_1	-.....T.....	[448]
Pop64_1T.....	[449]
Pop65_1	-.....T.....	[448]
Pop66_1	-.....T.....	[448]
Pop67_1T.....	[449]

Alignment der ITS-Sequenzen: Fortsetzung.

	510	
Pop1_1	TCGGCGGCGAGCGTCGCGGTCAGCGGTGGTTGTATTCTCATCTCCAAAGACAAAATGAC	[509]
Pop2_1	[509]
Pop3_1C.....	[509]
Pop4_2C.....	[509]
Pop5_1C.....	[509]
Pop6_1	[508]
Pop6_2C.....	[509]
Pop7_1C.....	[509]
Pop7_2C.....	[509]
Pop8_1	[508]
Pop9_1C.....	[509]
Pop10_1C.....	[509]
Pop11_1C.....	[509]
Pop12_1	[509]
Pop13_1C.....	[509]
Pop14_1	[509]
Pop15_2	[509]
Pop16_2	[508]
Pop17_1N.....	[509]
Pop18_1	[509]
Pop19_1	[509]
Pop19_5	[509]
Pop19_3	[509]
Pop20_6	[509]
Pop21_1	[509]
Pop21_9	[509]
Pop22_1	[509]
Pop23_1	[509]
Pop23_2	[509]
Pop24_1	[509]
Pop25_1	[509]
Pop25_3	[509]
Pop26_1	[509]
Pop27_1	[509]
Pop28_1	[509]
Pop29_1	[509]
Pop30_1	[509]
Pop31_1	[509]
Pop32_1	[509]
Pop32_8	[509]
Pop33_1	[508]
Pop34_1	[509]
Pop35_1	[509]
Pop37_1	[508]
Pop37_6	[510]
Pop38_1	[509]
Pop38_2	[509]
Pop39_1	[508]
Pop40_1	[509]
Pop41_1C.....	[509]
Pop41_3C.....	[509]
Pop42_4	[509]
Pop43_1	[508]
Pop44_4T.....	[508]
Pop44_1T.....	[508]
Pop45_1	[509]
Pop46_1	[508]
Pop47_1	[508]
Pop48_3	[509]
Pop49_1	[509]
Pop50_1	[509]
Pop51_1	[509]
Pop51_9	[509]
Pop52_1	[509]
Pop53_1	[508]
Pop53_2	[508]
Pop53_3	[508]
Pop54_1Y.....	[509]
Pop54_2	[509]
Pop55_1	[509]
Pop55_2	[509]
Pop56_1	[509]
Pop57_1	[509]
Pop59	[509]
Pop58_1	[508]
Pop58_2Y.....	[508]
Pop60_1	[509]
Pop61_1	[509]
Pop62_1	[509]
Pop63_1	[508]
Pop64_1	[509]
Pop65_1	[508]
Pop66_1	[508]
Pop67_1C.....	[509]

Tab. A10: Paarweise Kimura-2-Parameter-Distanzen der ITS-Sequenzen der Gattung *Pulsatilla* und einiger Vertreter der Ranunculaceae. Diese Distanzen sind die Basis zur Durchführung des *relative-rate*-Tests und der Bestimmung der Divergenzzeiten der Taxa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	
1 <i>Hel.orientalis</i>	-								
2 <i>Ran.repens</i>	0,24988	-							
3 <i>Tha.simplex</i>	0,27375	0,26341	-						
4 <i>Cal.anemonides</i>	0,24873	0,26881	0,23251	-					
5 <i>Cle.recta</i>	0,25377	0,27128	0,23571	0,13218	-				
6 <i>Ane.antucensis</i>	0,28830	0,28460	0,30888	0,17516	0,13188	-			
7 <i>P.kostyiczewii</i>	0,29511	0,29370	0,26359	0,13741	0,16451	0,20331	-		
8 <i>P.campanella</i>	0,27921	0,25610	0,25744	0,12071	0,12837	0,18914	0,09149	-	
9 <i>P.vernalis</i>	0,28155	0,24519	0,24406	0,12068	0,12784	0,18583	0,08211	0,02420	
10 <i>P.chinensis</i>	0,27754	0,24898	0,25463	0,12394	0,13275	0,18721	0,08957	0,02445	
11 <i>P.cernua</i>	0,28759	0,25696	0,24762	0,12564	0,13000	0,18905	0,08667	0,01808	
12 <i>P.pratensis</i>	0,27902	0,25067	0,24206	0,12071	0,12509	0,18406	0,07998	0,01407	
13 <i>P.rubra</i>	0,28785	0,25549	0,24780	0,12227	0,12925	0,18860	0,08286	0,01616	
14 <i>P.slavica</i>	0,28648	0,26805	0,25505	0,12459	0,13019	0,19611	0,08817	0,02232	
15 <i>P.halleri</i>	0,29166	0,26527	0,25674	0,13130	0,13604	0,19660	0,08985	0,02031	
16 <i>P.occidentalis</i>	0,27041	0,24274	0,26390	0,11911	0,14004	0,18361	0,10025	0,04304	
17 <i>P.aurea</i>	0,27635	0,23855	0,24899	0,11358	0,13097	0,18060	0,08923	0,03246	
18 <i>P.a.austriaca</i>	0,27476	0,23741	0,25112	0,11082	0,12796	0,17786	0,08684	0,02831	
19 <i>P.a.alpicola</i>	0,27476	0,23741	0,25112	0,11082	0,12796	0,17786	0,08684	0,02831	
20 <i>P.a.alpina</i>	0,27470	0,23439	0,24839	0,11575	0,13317	0,18303	0,09146	0,03673	
21 <i>P.a.font-queri</i>	0,27156	0,23436	0,25120	0,11328	0,13056	0,17526	0,08458	0,03040	
22 <i>P.a.millefoliata</i>	0,27156	0,23436	0,25120	0,11328	0,13056	0,17526	0,08458	0,03040	
23 <i>P.a.austroalpina</i>	0,27118	0,23409	0,25096	0,11338	0,13033	0,17526	0,08458	0,03040	
24 <i>P.a.montis-niveae</i>	0,27476	0,23741	0,24814	0,11313	0,13016	0,17525	0,08230	0,03250	
25 <i>P.a.cyrnea</i>	0,26740	0,23281	0,24961	0,11377	0,13089	0,17573	0,08268	0,03047	
26 <i>P.a.cantabrica</i>	0,27142	0,23449	0,25079	0,11302	0,13019	0,17525	0,08675	0,03034	
27 <i>P.a.apiiolia</i>	0,26933	0,23238	0,24850	0,11332	0,13055	0,17524	0,08466	0,03036	
	9	10	11	12	13	14	15	16	
9 <i>P.vernalis</i>	-								
10 <i>P.chinensis</i>	0,01811	-							
11 <i>P.cernua</i>	0,01594	0,01610	-						
12 <i>P.pratensis</i>	0,00996	0,01003	0,00593	-					
13 <i>P.rubra</i>	0,01202	0,01218	0,00796	0,00201	-				
14 <i>P.slavica</i>	0,01826	0,01835	0,01419	0,00805	0,00000	-			
15 <i>P.halleri</i>	0,01815	0,01832	0,01408	0,00803	0,00000	0,00399	-		
16 <i>P.occidentalis</i>	0,04271	0,04487	0,04698	0,04484	0,04710	0,05393	0,05170	-	
17 <i>P.aurea</i>	0,03015	0,03239	0,03438	0,02817	0,03031	0,03675	0,03469	0,02823	
18 <i>P.a.austriaca</i>	0,02602	0,02825	0,03020	0,02403	0,02616	0,03252	0,03048	0,02821	
19 <i>P.a.alpicola</i>	0,02602	0,02825	0,03020	0,02403	0,02616	0,03252	0,03048	0,02821	
20 <i>P.a.alpina</i>	0,03431	0,03664	0,03857	0,03231	0,03452	0,04088	0,03889	0,03448	
21 <i>P.a.font-queri</i>	0,02807	0,03032	0,03228	0,02608	0,02822	0,03460	0,03258	0,02817	
22 <i>P.a.millefoliata</i>	0,02807	0,03032	0,03228	0,02608	0,02822	0,03460	0,03258	0,02817	
23 <i>P.a.austroalpina</i>	0,02807	0,03032	0,03228	0,02608	0,02822	0,03460	0,03258	0,02817	
24 <i>P.a.montis-niveae</i>	0,02602	0,02825	0,03020	0,02403	0,02616	0,03252	0,03048	0,03024	
25 <i>P.a.cyrnea</i>	0,02814	0,03040	0,03235	0,02617	0,02829	0,03477	0,03065	0,02823	
26 <i>P.a.cantabrica</i>	0,02805	0,03030	0,03224	0,02605	0,02820	0,03457	0,03255	0,02810	
27 <i>P.a.apiiolia</i>	0,02809	0,03033	0,03228	0,02610	0,02824	0,03463	0,03260	0,02815	
	17	18	19	20	21	22	23	24	
17 <i>P.aurea</i>	-								
18 <i>P.a.austriaca</i>	0,00395	-							
19 <i>P.a.alpicola</i>	0,00395	0,00000	-						
20 <i>P.a.alpina</i>	0,01193	0,00792	0,00792	-					
21 <i>P.a.font-queri</i>	0,00593	0,00197	0,00197	0,00593	-				
22 <i>P.a.millefoliata</i>	0,00593	0,00197	0,00197	0,00593	0,00000	-			
23 <i>P.a.austroalpina</i>	0,00593	0,00197	0,00197	0,00593	0,00000	0,00000	-		
24 <i>P.a.montis-niveae</i>	0,00793	0,00394	0,00394	0,00792	0,00197	0,00197	0,00197	-	
25 <i>P.a.cyrnea</i>	0,00595	0,00198	0,00198	0,00594	0,00000	0,00000	0,00000	0,00198	
26 <i>P.a.cantabrica</i>	0,00791	0,00394	0,00394	0,00791	0,00197	0,00197	0,00198	0,00394	
27 <i>P.a.apiiolia</i>	0,00792	0,00395	0,00395	0,00792	0,00197	0,00197	0,00198	0,00395	
	25	26	27						
25 <i>P.a.cyrnea</i>	-								
26 <i>P.a.cantabrica</i>	0,00197	-							
27 <i>P.a.apiiolia</i>	0,00197	0,00000	-						

Tab. A11: Verwendete Abkürzungen für morphologische Merkmale. Die Erhebung der einzelnen Merkmale ist bei Moser (1996) detailliert beschrieben.

Abkürzung	Merkmal
ANZGRBL	Anzahl der Grundblätter
BEHAARO	Behaarung der Laubblattoberfläche
BEHAARR	Behaarung des Laubblattrandes
BEHAARU	Behaarung der Laubblattunterseite
BLST10M	Fiederblattstiel 1. Ordnung Mitte
BLST10S	Fiederblattstiel 1. Ordnung seitlich
BLST2M	Fiederblattstiel 2. Ordnung Mitte
BLST2S	Fiederblattstiel 2. Ordnung
BLSTLBZ	Blütenstiellänge zur Blütezeit
BLUETEN	Blütendurchmesser
FIED2B	Breite der Blattfiedern 2. Ordnung
FIED2L	Länge der Blattfiedern 2. Ordnung
FIED3B	Breite der Blattfiedern 3. Ordnung
FIED3L	Länge der Blattfiedern 3. Ordnung
INSINVO	Insertionshöhe der Involukralblätter
LBLATTST	Blattstiellänge
NARBENHL	Länge der Narbenhaare
NARBENL	Narbenlänge zur Fruchtzeit
NARWIND	Anzahl der Narbenwindungen
TEPALENA	Tepalenzahl
TEPALENB	Tepalbreite
TEPALENL	Tepalenzahl
ZIPFAN2M	Anzahl Fiederblattzipfel 2. Ordnung Mitte
ZIPFAN3S	Anzahl Fiederblattzipfel 3. Ordnung seitlich

Tab. A12: Mittelwerte für alle verwendeten quantitativen morphologischen Merkmale nach Moser (1996). Die Daten bilden eine Grundlage der Korrelationsanalysen und der phylogenetischen Rekonstruktion historischer Merkmalszustände.

Art/ Morphotyp	<i>P. occi- dentalis</i>	<i>P. aurea</i>	<i>P. a. apiifolia</i>	<i>P. a. alpicola</i>	<i>P. a. alpina</i>	<i>P. a. austriaca</i>	<i>P. a. austroalpina</i>	<i>P. a. cantabrica</i>	<i>P. a. cottianaea</i>	<i>P. a. cyrnea</i>	<i>P. a. font- queri</i>	<i>P. a. millefoliata</i>	<i>P. a. montis- niveae</i>	<i>P. a. x ochro- leuca</i>
Merkmal														
ANZGRBL	3,14	2,65	1	2,15	1	2,05	1	1,15	1	2,3	2,55	2,85	1,2	1
BEHAARO	0	3,35	4,05	0,1	0,05	0,05	1,95	0,45	11,8	0	0,4	0,15	0,95	2
BEHAARU	0	5,6	38,55	0,5	2,95	0,45	5,7	0,45	43,2	0,2	7,55	0,4	3,8	12,5
BEHAARR	0	0	32,85	0,1	2,85	0	11,05	11,8	34,9	0,15	11,4	0,05	10,95	11,6
BLST1OM	1,9	3,24	5,6	1,82	4,43	3,69	6,89	5,25	4,68	5,27	4,38	4,41	6,18	5,1
BLST1OS	0,73	1,4	3,99	1,14	3,52	2,47	5,78	4,47	3,65	4,81	2,5	3,19	4,75	3,7
BLST2M	0,44	1,54	3,43	1,16	2,16	1,83	4,38	2,45	2,46	2,86	2,31	2,67	2,81	2,8
BLST2S	0,17	0,16	2,34	0,63	0,89	1,1	2,42	1,15	1,28	1,98	0,51	1,16	0,39	1,5
BLSTLBZ	4,5	4,65	8,34	3,78	4,33	5,66	16,74	9,48	7,11	13,4	8,48	6,11	14,88	6,35
BLUETEN	5,4	4,65	6,05	3,61	4,88	4,04	6,16	5,93	8,51	5,39	3,5	5,86	4,54	5,45
FIED2B	1,08	2,71	2,31	0,85	1,55	1,65	2,13	2,91	1,99	2,14	5,75	1,86	2,44	1,9
FIED2L	2,22	3,75	4,31	1,71	3,37	2,48	4,21	3,93	3,95	3,14	6,42	2,97	3,98	3,85
FIED3B	0,53	0,65	1,45	0,49	0,49	0,59	1,01	1,31	0,57	1,04	0,94	0,88	0,98	1
FIED3L	1,31	1,38	2,42	0,88	1,17	1,02	1,79	2,05	1,18	1,9	1,06	1,24	2,34	1,8
INSINVO	13,23	11	14,26	4,41	11,8	6,94	24,65	18,03	23,55	17,13	8,49	14,91	23,72	13
LBLATTST	9,32	6,3	13,24	3,08	15,57	7,69	15,66	13,95	9,09	9,89	5,9	7,34	14,5	14,4
NARBENHL	2,64	2,75	2,23	2,17	2,19	2,38	2,13	2,35	1,62	2,31	1,59	2,02	1,35	2,2
NARBENL	4,73	4,39	5,09	4,13	5,37	4,81	4,83	5,37	5,15	4,11	3,6	4,13	4,84	5,2
NARWIND	2,95	0,4	0,9	2	1	2	0,15	1,65	0,75	0,55	1,55	2	1	0,95
TEPALENA	6,14	7,2	6,05	6,1	7,05	6,45	7,2	6,7	7,5	6,1	6,9	8,15	6,75	7,8
TEPALENB	1,48	1,58	1,84	0,79	1,27	0,7	1,41	1,43	2,15	1,02	0,77	0,87	1,02	1,55
TEPALENL	2,98	2,57	3,09	1,77	2,48	2,03	2,97	2,92	4,08	2,65	1,61	2,97	2,05	2,75
ZIPFAN2M	11,55	42	17,05	10,25	25,8	11,8	21,2	16,15	29,5	23,45	33	32,2	7,65	21
ZIPFAN3S	8,68	15,4	8	3,25	13,85	3,6	9,8	13,95	16,15	6,3	10,75	13,05	4,15	10,9

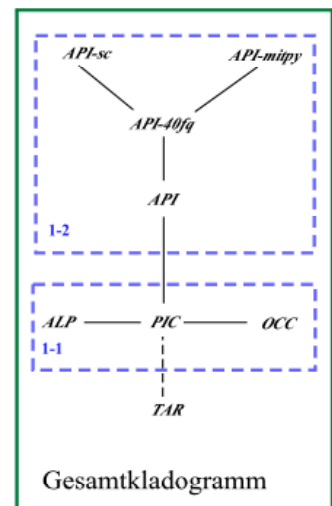
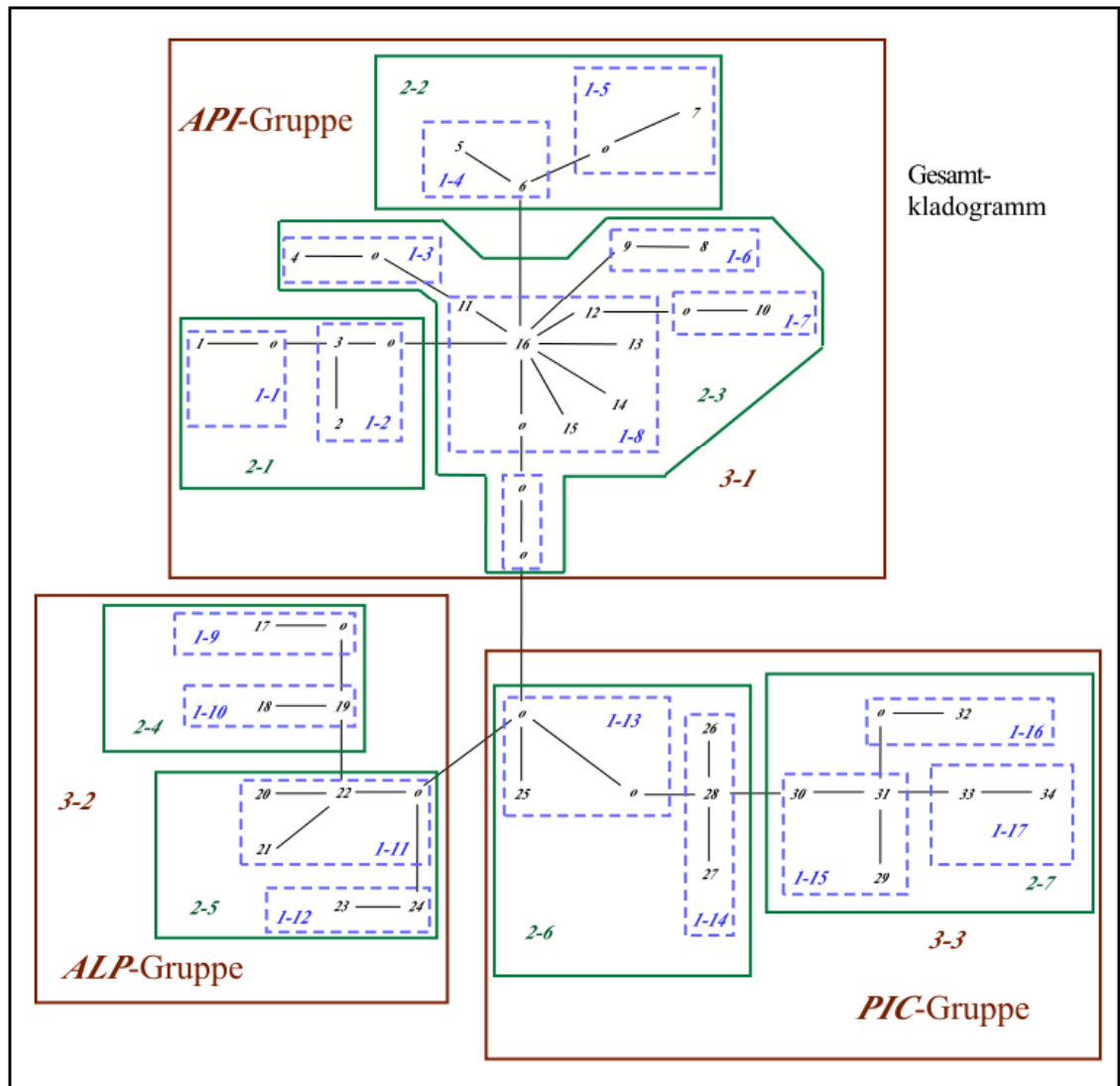


Abb. A1: *Minimum spanning trees* im *nested-clade*-Design für die Haplotypen der *trnL-trnF*-Fragmente lf1 (oben) und lf2 (unten) auf der Grundlage der DNA Sequenzen von 67 Populationen der Sektion *Preonanthus*. Die *minimum spanning trees* wurden aus den *minimum spanning networks* der TCS-Berechnungen manuell konvertiert (vgl. Abb. 10 und 11).

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich aus anderen veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Lebenslauf

Personalien

Name Holger Zetzsche
Anschrift B.-Brecht-Str. 21
04600 Altenburg
Geboren am 14.05.1971 in Altenburg (Thür.)
Familienstand ledig, ein Kind

Schulausbildung

1977-1987 Besuch der POS Lerchenberg, Altenburg
1987-1989 Besuch der EOS Karl Marx, Altenburg

Wehrdienst

1989-1990 Grundwehrdienst, Weißenfels (Sachsen-Anhalt)

Berufsausbildung

1990-1991 Ausbildung zum Gärtner für Gemüse- und Zierpflanzenbau, Altenburg-Poschwitz

Wissenschaftliche Ausbildung

1991-1996 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1994 Untersuchungen zur Verbreitung und pflanzensoziologischen Bindung von *Echinops sphaerocephalus*, Praktikum am UFZ- Halle-Leipzig
1997 Diplomarbeit am Institut für Geobotanik und Botanischer Garten
„Der Efeu, *Hedera helix* L. (Araliaceae), als Teil der naturnahen Vegetation, seine Lebensgeschichte und Verbreitung, Beiträge zur Ökologie und zu Naturschutzproblemen“
1999-2004 Promotion am Institut für Geobotanik und Botanischer Garten an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2000-2003 Forschungsaufenthalt am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)

Beruflicher Werdegang

1997-1998 Wissenschaftl. Mitarbeiter am Umweltforschungszentrum-Halle-Leipzig
1998-1999 EDV-Sachbearbeiter bei MANPOWER und bei Randstad, Stuttgart
2002-2004 Wissenschaftl. Mitarbeiter am IPK-Gatersleben
2004-2005 Postdoc an der Baylor University in Waco, Texas und Adjunct Associate Professor an der Kent State University in Kent, Ohio

Titel der Dissertation Die Phylogeographie des Artkomplexes *Pulsatilla alpina* (Ranunculaceae)

Betreuer Prof. Dr. Eckehart J. Jäger (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
Dr. Frank R. Blattner (IPK-Gatersleben)