

DIPLOMARBEIT

**Vorgelegt zur Erlangung des Grades eines Diplom-Biologen
an der Fakultät für Biologie und Biotechnologie
der Ruhr-Universität Bochum**

Zur Phylogenie der Gattung *Saponaria* L.

von

René Prior

Angefertigt in der Arbeitsgruppe Geobotanik

Bochum, im November 2010

Referent: Prof. Dr. Dominik Begerow

Koreferent: PD Dr. Claudia Distler-Hoffmann

„Wer die Welt nicht von Kind auf gewohnt wäre, müsste über ihr den Verstand verlieren. Das Wunder eines einzigen Baumes würde genügen, ihn zu vernichten.“ (Christian Morgenstern)



S. pumila (Hegi, 1959-1979)

Nicht nur einem einzelnen Baum, jedem Individuum einer unvorstellbaren Anzahl von etwa 250.000 Pflanzenarten (Strassburger, 2002) dient die Erde als Lebensraum. In die weitgehend vor unseren Augen verborgene phylogenetische Systematik der Landpflanzen, die Verwandtschaft der Arten untereinander, soll diese Arbeit einen kleinen Einblick ermöglichen und die Phylogenie der Gattung *Saponaria* etwas näher beleuchten.

Die Disziplin der Kladistik hält für die phylogenetische Analyse der Landpflanzen eine große Palette an Werkzeugen bereit, von denen einige hier vorgestellt und ihre Ergebnisse anhand der untersuchten Gattung interpretiert werden sollen. Vor allem soll die klassische Morphologie den neueren molekulargenetischen Methoden gegenübergestellt, molekulare Marker auf ihre Eignung hin getestet und die Praktikabilität verschiedener Auswertungsmethoden untersucht werden.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Systematik und Phylogenie der Gattung <i>Saponaria</i> L.	1
1.2 Molekulare Marker	6
1.3 Ziele der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Materialien und Bezugsquellen	13
2.1.1 Lösungen und Puffer	13
2.1.2 Verwendete Laborgeräte und Programme	14
2.1.3 Verwendete Primer	15
2.2 Verwendetes Pflanzenmaterial	18
2.3 Molekularbiologische Methoden	19
2.3.1 DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial	19
2.3.2 PCR-Protokolle	19
2.3.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese	24
2.3.4 Gelelution und Aufreinigung von PCR-Produkten	25
2.4 Sequenzanalyse und bioinformatische Auswertung	25
2.4.1 Sequenzierung	25
2.4.2 Bearbeitung der Sequenzen	25
2.4.3 Methoden der phylogenetischen Rekonstruktion	26
3. Ergebnisse	35
3.1 Amplifikation und Aussagekraft der Genregionen	35
3.1.1 Die ITS-Region	35
3.1.2 Die matK / trnKUUU-Region	35
3.1.3 Die trnS^{GCU}-trnG^{UUC}-trnG^{UUC}-Region	41
3.1.4 Die trnT^{UGU}-trnL^{UAA}-trnL^{UAA}-trnF^{GAA}-Region	42
3.1.5 Topologie und unterstützte Gruppen	42
3.2 Qualität verschiedener Rechenmethoden	44

4. Diskussion	51
4.1 Vergleich mit morphologischen Studien	51
4.2 Amplifikation und Aussagekraft der Genregionen	58
4.3 Verschiedene Rekonstruktionsmethoden	63
4.4 Fazit	66
5. Literaturverzeichnis	68
6. Abkürzungen	74
7. Anhang	75
8. Danksagung	92

1. Einleitung

1.1 Systematik und Phylogenie der Gattung *Saponaria* L.

Zur Ordnung der Caryophyllales JUSS. ex BERCHT. & J.PRESL, zur Familie der Caryophyllaceae JUSSIEU und zu einigen darin enthaltenen Gattungen wurden bereits umfangreichere Untersuchungen auf molekular-phylogenetischer Ebene durchgeführt (Bittrich, 1993; Cuénod et al., 2002; Fior et al., 2006), während die hier bearbeitete Gattung *Saponaria* L. zum großen Teil noch unbeachtet geblieben ist. Dabei kann heute nicht einmal die Anzahl der bisher beschriebenen Arten sicher beschrieben werden.

Die Caryophyllales, eine große Ordnung der Kerneudikotyledonen, zeichnen sich vor allem durch die Betalain-Pigmentierung aus, während sonst im gesamten Pflanzenreich Anthocyane verbreitet sind. Eine Ausnahme von dieser Regel machen allerdings die Molluginaceae BARTL. und die für die Ordnung namensgebende Familie selbst, die Caryophyllaceae. Sie weisen ebenfalls Anthocyane als Blütenfarbstoffe auf (Cuénod et al., 2002), was Eckard (1964) noch dazu veranlasst, eine Gruppierung zusammen mit den Molluginaceae in den Kern-Caryophyllales zu favorisieren. Es handelt sich bei den Caryophyllaceae hauptsächlich um annuelle oder perennierende, krautige Pflanzen, nur vereinzelt wird ein strauchförmiger Habitus ausgebildet. Das Hauptverbreitungsgebiet erstreckt sich über den mediterranen und persischen Raum, wo aufgrund der vorherrschenden klimatischen Verhältnisse meist die Ausprägung als strahlen- und trockenheitsresistente Heliophyten gegeben ist. Zudem finden sich einige Taxa vermehrt in Gebirgs- und Hochgebirgsregionen, wo meist kleinwüchsige Vertreter Schutt und Felsspalten besiedeln.

Als Schwesterfamilie werden heute die Amaranthaceae JUSS. den Caryophyllaceae gegenübergestellt (Cuénod et al., 2002; Soltis, 2000; Fior et al., 2006, Abb. 1). Auch innerhalb der Familie wurden umfassende Untersuchungen auf morphologischer, wie auch auf molekularer Ebene durchgeführt (Bittrich, 1993; Fior et al., 2006). Die aktuellste auf morphologischen Merkmalen beruhende Phylogenie ist von Bittrich (1993) erstellt worden. Die Caryophyllaceae erfahren hier eine traditionelle Einteilung in drei Unterfamilien: Paronychioideae MEISN., Alsinoideae FRENZL und Caryophylloideae (JUSS.) RABELER & BITTRICH. Der Gesamtumfang wird hier mit etwa 2200 Arten und 86 Gattungen angegeben (Bittrich, 1993; Smitsen et al., 2002). Es wird angeführt, dass homoplastische und komplexe morphologische Merkmale eine richtige Diagnose und die Unterscheidung von Arten oft

schwierig machen. Geht Bittrich noch von der erwähnten Anzahl von Arten und Gattungen aus, werden bei Rabeler (2005) schon 3000 Arten in 88 Gattungen ausgewiesen, während Harbaugh et al. (2010) auf Quellen mit 82-120 Gattungen verweisen. Die erste molekulare Daten basierte Phylogenie wurde 2002 von Smitsen veröffentlicht, die sich hieraus ergebenden verwandtschaftlichen Verhältnisse decken sich nur selten mit den aus der morphologischen Systematik der Caryophyllaceae geschlossenen. Dafür machen Smitsen et al. (2002) hauptsächlich die oft schwierige Morphologie in der untersuchten Gruppe verantwortlich, in der sich verschiedene Merkmale häufig konvergent entwickelt haben (siehe auch Fior et al, 2006). Die 2006 von Fior et al. veröffentlichte Phylogenie der Caryophyllaceae (Abb. 1) stellt schließlich die aktuellste Untersuchung auf molekular-phylogenetischer Basis dar.

Auch für die Gattung *Saponaria*, von der Hegi (1959-1979) mehrere Arten als beliebte Gartenpflanzen beschreibt, erscheint es daher an der Zeit zu überprüfen, inwieweit molekulare Marker die morphologischen Untersuchungen unterstützen. Auch Hegi bezieht sich hauptsächlich auf die Arbeit von Simmler (1910). Simmler (1910) gibt in ihrer Monographie der Gattung 29 Arten an, auch in späterer Literatur wird der Umfang der Gattung immer wieder mit etwa 25 angegeben (Hegi, 1959-1979). Erst bei Bittrich (1993) wird von etwa 40 Arten ausgegangen, wobei diese aber nicht näher benannt werden. Bei „The International Plant Names Index“ (IPNI, www.ipni.org, 01.09.2010) sind dagegen bereits 61 Artnamen zu finden, die keinem Synonym zugeordnet sind, außerdem 86 weitere Beschreibungen, die einerseits zu Arten aus der Gattung selbst, andererseits zu verschiedenen Arten aus anderen Gattungen und Familien synonym gebraucht werden. (Tabelle A1, Anhang)

Der Gattungsname *Saponaria* wurde von Linné (1753) geprägt und auf den Typusbeleg *Saponaria officinalis* L. bezogen, Linné selbst beschrieb außerdem *S. ocymoides* L., *S. orientalis* L. (beide 1753) und *S. lutea* L. (1762). Die bei Simmler herangezogene Umgrenzung der Gattung nach A. Braun (1843) ist bis heute im Wesentlichen gebräuchlich, auch wenn einige Zwischenformen zu anderen Gattungen schwer zuzuordnen sind. Diese Arbeit soll sich vorwiegend an Simmlers Studien orientieren, obwohl einige Unklarheiten bestehen, wie Simmler selbst teilweise bemerkt und Synonyme manchmal anders gebraucht werden; zudem ist keine weitere umfassende Studie zur Gattung verfügbar. Bei der verwendeten Taxonomie und dem Umgang mit Synonymen soll die Tabelle A1 (Anhang) behilflich sein. Die nachfolgenden Beschreibungen sind daher bis auf die zwei darin nicht beschriebenen Arten *S. subrosularis* RECHINGER und *S. stenopetala* RECHINGER,

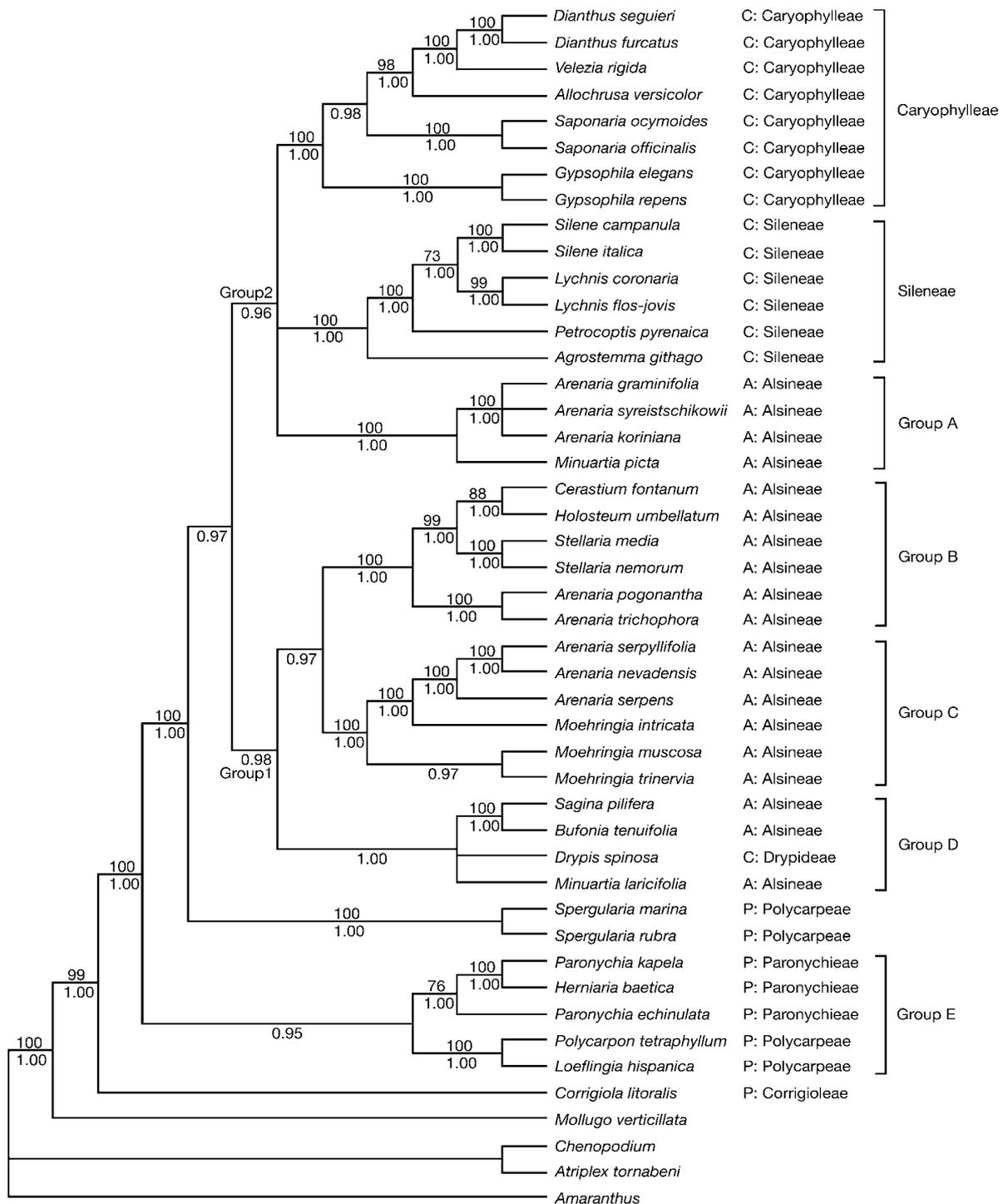


Abbildung 1: Phylogenetische Beziehungen der Familie der Caryophyllaceae auf der Basis von matK- und ITS-Sequenzen aus Fior et al. 2006. Die Topologie ist aus einem Konsensus der *most parsimonious trees* hervorgegangen, *bootstrap*-Werte sind über, Posteriorwahrscheinlichkeiten unter den Ästen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

ebenfalls aus Simmler (1910) entnommen. Sie stellt die Gattung zu den Diantheen in die Nachbarschaft von *Vaccaria* (MILLER) RAUSCHERT und *Gypsophila* L. Für die Abgrenzung zu diesen Gattungen, die als nächstverwandte angesehen werden, zieht sie morphologische und anatomische Merkmale zu Rate. Von *Vaccaria*, die vorher teilweise noch in die Gattung mit eingeschlossen wurde (*Saponaria vaccaria* L.) und von De Candolle als Section in der Gattung *Saponaria* beschrieben wurde, unterscheidet sich *Saponaria sensu* Simmler durch die nierenförmigen Samen, wohingegen *Vaccaria* eher kugelförmige Samen besitzt. Außerdem hat *Vaccaria* insgesamt größere Samen, eine stärkere Dissepimentenbildung am Grund der Kapsel, zudem fünf stark vorspringende Kiele am Kelch, während *Saponaria* keine solchen Kiele besitzt. *Gypsophila* unterscheidet sich ebenfalls hauptsächlich durch die verschiedene Samenform, welche hier als ohrförmig bezeichnet wird. Ferner ist der Kelch bei *Gypsophila* als trichterförmig beschrieben und nicht als lang-zylindrisch wie bei *Saponaria*, die breiten, membranösen Kommissuralnerven als drittes Unterscheidungsmerkmal sind aber schon nicht mehr in der ganzen Gattung *Gypsophila* verbreitet. Darüber hinaus wird eine Unterscheidung zu einer dritten Gattung, *Tunica* LUDWIG, vorgenommen, die sich nach Simmler allerdings nicht mehr im näheren Verwandtschaftskreis von *Saponaria* befindet. Für *Tunica* sind ein gerader Keimling in schildförmigen Samen und membranöse Zwischenstreifen am Kelch zur Unterscheidung angegeben. Schon in ihrer Monographie bemerkt Simmler, dass die verfügbaren Quellen „nur äußerst spärliche Aufschlüsse über die Anatomie der Gattung *Saponaria*“ geben (Simmler, 1910). Und auch durch die äußere Morphologie lassen sich die Beschreibungen nur schwierig distinkten Arten zuordnen, was vor allem daran liegt, dass nur äußerst selten absolute Maße angegeben sind, sondern hauptsächlich Verhältnisse der Organe zueinander.

Zu der Gattung werden Arten mit vielen verschiedenen Bauplänen gezählt: Die Vertreter sind annuell oder perenn, oft am Boden liegend mit aufstrebenden Sprossen; die Blütenstände sind recht variabel; die Pflanzen oft behaart, wobei sich die stärkere Behaarung meist auf den Kelch beschränkt, völlig kahle Arten sind selten. Die Anatomie birgt bei Simmler konstante Merkmale, die bei der Unterscheidung von Arten, zumal aus sehr ähnlichen Formenkreisen, hilfreich sind. Meist ist im Habitat, oft trockenen oder alpinen Hängen, Wasser ein Mangelfaktor, was die dort angesiedelten Pflanzen durch lange, dicke und weit verzweigte Wurzeln ausgleichen, bei *S. bellidifolia* SMITH und *S. cypria* BOISSIER zum Beispiel werden unterirdisch kurze Stammstücke ausgebildet, die bei anderen Arten (*S. ocymoides*) fehlen. Die Wurzeln, welche bei vielen Vertretern der Gattung Kalziumoxalateinschlüsse enthalten (*S. bellidifolia*, *S. cypria*, *S. ocymoides*, *S. kotschyi*

BOISSIEU), bilden bei perennierenden Formen meist dicke Korkschichten aus. Einige, aber nicht alle Arten zeichnen sich durch einen hohen Saponingehalt vor allem in der Wurzel aus. So ist bei Hegi (1959-1979) für die „rote Seifenwurzel“ (*S. officinalis*) ein Saponingehalt bis 5% angegeben, weshalb diese lange in der Medizin und als Waschmittel in der Technik Verwendung fand.

Bei den Blättern kann aufgrund von größeren und breitflächigeren Blättern der nicht blühenden Triebe eine Art Dimorphismus im Bezug auf den vegetativen Spross und den Blütenstengel erkannt werden. Der Blütenstand zeigt in der Regel einen cymösen Aufbau, dessen Partialblütenstände jeweils Dichasien darstellen, wobei einige Arten sich durch die Ausbildung von monochasialen Wickeln von diesem Typ abheben, Einzelblüten sind selten. Merkmale, die sich über eine Art hinweg als wenig konstant erweisen, sind durch Anthocyan eingefärbte Sprossachsen und ältere Laubblätter, so wie die Art der Ausbildung der Kutikula, was meist als Anpassungen der Individuen an intensive Strahlung und Trockenheit gedeutet wird. Die Stellung der Laubblätter ist stets dekussiert, während die Blätter selbst ungeteilt, ganzrandig und ohne besonders abgesetzten Blattstiel sind. Die Blätter der Hochgebirgsformen sind zudem oft sitzend. Bei allen von Simmler untersuchten Arten sind die mehrjährigen Arten immergrün, mit Ausnahme von *S. officinalis*, deren Habitus eher dem eines Geophyten entspricht.

Die bei *Saponaria* ausgebildete Kelchröhre ist stets fünfzählig und langzylindrisch bis etwas bauchig, überdies kann der Kelch unterhalb der Zipfel leicht zusammengezogen sein. Als wichtiges Merkmal für die systematische Stellung der Gattung wird das grundsätzliche Fehlen von Kommissuralnerven am Kelch gedeutet, außerdem findet eine Vervielfachung der Parallelnerven auf 15 bis 25 statt. Hauptsächlich aufgrund der beschriebenen Kelchnervatur sieht Simmler die Gattung auch als von *Gypsophila* abgeleitet an, hinzu kommt eine komplexere Gestaltung der Blütenkrone bei *Saponaria* und die Form der Samen. Bei der Blütenform kommen völlig in den Kelch eingeschlossene, wie auch durch einen Nagel weit herausgehobene Petalen mit sämtlichen Übergangsstadien zwischen diesen Ausprägungen vor. Viele Vertreter der Gattung weisen kleine Ligularzähnen am Übergang zwischen Nagel und Platte auf, die dann regelmäßig aus den am Nagel meist ausgeprägten Flügelleisten hervorgehen. Eine zum Beispiel bestäubungsbiologische Funktion der aus den Ligularzähnen gebildeten Krönchen sieht Simmler allerdings aufgrund der geringen Größe und ihrer Abwesenheit bei einigen Arten nicht. Die Blütenfarbe beschränkt sich bis auf *S. lutea*, *S. bellidifolia* (hellgelb), *S. parvula* BUNGE und *S. syriaca* BOISSIER (weiß) auf verschiedene Abstufungen zwischen rosa und rötlich. Die stets zehn Staubgefäße sind in zwei Kreisen angeordnet und gelb, grün oder blau gefärbt,

während die Anzahl der Karpelle zumindest bei *S. pumila* JANCHEN nicht auf die sonst üblichen zwei festgelegt scheint, hier werden meist drei Karpelle gefunden. Die Zahl der Fruchtklappen richtet sich nach der Anzahl der Karpelle, wobei jedes Karpell zwei Klappen ausbildet, die Gesamtanzahl also meist bei vier liegt. Des Weiteren führt Simmler an, dass *S. pulvinaris* BOISSIEU durch die tief in der Blüte verborgenen Staubgefäße eine selbstbestäubende Art sein sollte. Was die Hybridbildung innerhalb der Gattung betrifft, so haben Versuche in Gärten zwar gezeigt, dass eine diesbezügliche Neigung in der Gattung sehr wohl vorhanden ist, aber aufgrund der weit voneinander entfernten Populationen nur ein natürlicher Hybrid, *S. composita* PAU [sic.], entstanden ist, was Hegi (1959-1979) bestätigt.

Für den Ursprung der Gattung gibt Simmler (1910) zwei Möglichkeiten an: Entweder aus einem gemeinsamen Vorfahren von *Gypsophila* und *Saponaria* oder aus der Section *Macrorhizaea* und der Section *Bolanthus*, zwei Linien der Gattung *Gypsophila*. Damit stellt sie *Gypsophila Saponaria* als ursprünglich voran, *Vaccaria* sieht sie in der Folge als hiervon abgeleitet, eine Sichtweise der Evolution, die nicht mehr mit der heute anerkannten einhergeht. Weitergehend wird eine zweite Entwicklungsreihe ausgehend von *Gypsophila* vorgeschlagen, die über *Tunica* zu *Dianthus* L. führt. Grundlegend für diese Annahmen sind dabei, dass sie zwischen den Kelchblättern vorhandene Zwischenstreifen und eine niedere Organisation der Blütenkrone als ursprünglich, Kommissuralnerven zwischen den Kelchblättern und eine höhere Organisation der Krone als abgeleitet ansieht.

Für die Einteilung innerhalb der Gattung prägt Simmler zwei Untergattungen: *Saponariella* SIMMLER und *Saporhizaea* SIMMLER. *Saponariella* wird in die drei Sectionen *Smegmathamnium* FRENZL, *Kabyliia* SIMMLER und *Bootia* NECKER eingeteilt, wohingegen die beiden Sectionen *Proteinia* SIMMLER und *Sileniodes* BOISS. zur Untergattung *Saporhizaea* zusammengefasst werden. Die weitere auf morphologischen Merkmalen beruhende Untergliederung der Gattung, wie Simmler (1910) sie vornimmt, ist der Tabelle A2 (Anhang) zu entnehmen.

1.2 Molekulare Marker

Zur phylogenetischen Rekonstruktion auf der Basis molekularer Daten ist vorerst, angepasst an die jeweilige Fragestellung, die Auswahl von Gen-Regionen von außerordentlicher Wichtigkeit. In Pflanzenzellen können diese phylogenetischen Marker grundsätzlich aus drei weitgehend unabhängigen Genomen ausgewählt werden, welche außerdem verschiedenen evolutionären Prozessen unterliegen. Das im Zellkern lokalisierte Kerngenom stellt mit oft

10^9 bis 10^{10} bp in jedem Fall das größte Genom mit dem ebenfalls größten Informationsgehalt dar, während das Plastidengenom (cpDNA) etwa 70 bis 217 kb enthält (Borsch & Quandt, 2009), Mitochondriengenome sind bei vielen Pflanzen größer als die der Vertebraten und ähnlich groß wie plastidäre Genome (Strasburger, 2002). Für die Phylogenetik sind vor allem die Vererbungsmuster der Gene von grundlegender Bedeutung, denn nur möglichst eindeutige Merkmale und neutral evolvierende Gene eignen sich für solche Untersuchungen (Houliston & Olson, 2006). Durch vorangegangene Studien (Houliston & Olson, 2006; Erixon & Oxelman, 2008a) konnte festgestellt werden, dass Chloroplastengenome eher neutral evolvieren und auch in ihrer Struktur konservierter sind, während mitochondriale Genabschnitte oft relativ stark von dieser geradlinigen Entwicklung abweichen (Borsch & Quandt, 2009). Auch gegenüber dem Kerngenom verhält sich die Chloroplasten-DNA eher konservativ und zeigt eine niedrigere Substitutionsrate, was auch zu einem niedrigeren Level der Homoplasie bei der cpDNA führt (Ingvarsson et al., 2003; Chung, 2007; Levin et al., 2009; Erixon & Oxelman, 2008a; Fior et al., 2006). Erixon und Oxelman (2008a) geben zur Substitutionsrate außerdem an, dass diese zwar relativ gering und nicht sehr variabel, aber zwischen verschiedenen Entwicklungslinien nicht konstant ist. Zu Schwierigkeiten bei der phylogenetischen Rekonstruktion kann es bei Abschnitten aus dem Kerngenom vor allem dadurch kommen, dass hier bei jeder sexuellen Fortpflanzung Rekombinationsereignisse für eine stete Durchmischung des Erbmaterials sorgen (Erixon & Oxelman, 2008). Plastidäre und mitochondriale DNA wird vorwiegend maternal vererbt (Erixon & Oxelman, 2008), bei ersterer war auch lange unklar, ob überhaupt eine paternale Weitergabe erfolgen kann, Houliston und Olson (2006) konnten dies aber schon für *Pelargonium* L'HÉRITIER ex AITON, *Plantago* L. und *Silene* beschreiben. Auch geben Houliston und Olson (2006) für *Silene vulgaris* (MOENCH) GARCKE an, dass Chloroplasten und Mitochondrien nicht zwingend vom gleichen Elter stammen müssen. Eine phylogenetische Analyse aus cpDNA weist bei einer Hybridbildung daher auf den Zytoplasmadonor, die weibliche Pflanze also, hin, wohingegen eine Analyse der Kern-DNA Hinweise auf den männlichen Pollendonator geben sollte (Popp et al., 2005). McCauley (2007) hat für *Silene vulgaris* gezeigt, dass mit 4,5% eine nicht-maternale Vererbung der Chloroplasten über Pollen zumindest nicht völlig ausbleibt, was Inkongruenzen bei der Phylogenie hervorrufen kann (Muir & Filatov, 2007). Eine aus cpDNA erhaltene Baumtopologie spiegelt teilweise andere Verwandtschaftsverhältnisse wider als eine aus Kern-DNA berechnete (Popp & Oxelman, 2004; Erixon & Oxelman, 2008). Auch Muir und Filatov (2007) bemerken, dass Phylogenien, die nur auf cpDNA beruhen aufgrund nicht neutraler Evolution stark verzerrt sein und biogeographisch falsche Signale geben können.

Dennoch sollte eine Analyse der cpDNA eine Populationsstruktur gut widerspiegeln können, da der Genaustausch der Plastidengenome doch hauptsächlich über sich nur wenig verbreitende Samen stattfindet.

Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Aspekt ist die bloße Anzahl der Kopien des untersuchten Genabschnittes in einer Zelle. Während mehrere Chloroplasten pro Zelle jeweils bis zu 120 Kopien ihres Genoms tragen, liegen die Gene des Kerngenoms bei diploiden Organismen häufig nur in zwei Kopien vor. Die ITS kann als *tandem repeat* allerdings auch in mehreren hundert Kopien vorkommen.

Chloroplasten sind eine voneinander und vom Kerngenom relativ unabhängig evolvierende Einheit, bei der nur sehr wenige Fälle von Rekombination dokumentiert sind, zudem sind keine Beweise für lateralen Gentransfer in Landpflanzen publiziert (Erixon & Oxelman, 2008). Ihr Genom liegt meist in Nucleoiden vor, die von vielen Kopien zirkulärer DNA gebildet werden und ist effektiv haploid, was bei Hybridbildungen dazu führt, dass häufig nur die maternale Linie verfolgt werden kann. Die cpDNA weist eine viergeteilte Organisation auf, bei der zwei *inverted repeats* ($IR_A + IR_B$) mit einer Größe von etwa 5-76 kb zwischen die *large single copy region* (LSC) mit 80-90 kb und die *small single copy region* (SSC) mit 16-27kb eingeschoben sind. Nicht alle Kopien der cpDNA liegen in zirkulärer Form vor und auch ihre Anzahl in den Chloroplasten ist nicht konstant. Von den IR-Bereichen ist bekannt, dass sie Punktmutationen etwa 2,3 mal langsamer akkumulieren als das restliche cp-Genom (Shaw et al., 2005). Das typische Plastidengenom codiert für 3-5 rDNAs, 30 tRNAs und etwa 100 proteinogene Gene. Bei *Nicotiana* L. wurde ein Prozentsatz von 40% nicht-codierender Sequenz festgestellt, von der rund ein Drittel aus Introns besteht. In vielen Linien der Landpflanzen haben große Umstrukturierungen der cpDNA stattgefunden, was in der Folge dazu führt, dass normalerweise coamplifizierte Bereiche nicht mehr in Syntenie vorliegen (Borsch & Quandt, 2009).

Darüber hinaus werden im Wesentlichen zwei Arten von Sequenzen unterschieden: In proteincodierenden Regionen, die erheblich konservativer sind als nicht codierende, sind aufgrund des degenerierten Codes die dritten Codonpositionen am variabelsten und geben die beste phylogenetische Auflösung wieder. Diese Positionen evolvieren außerdem neutraler als die ersten beiden, da sie einem geringeren Selektionsdruck ausgeliefert sind. Codierende Sequenzen lassen sich zudem besser alignieren als nicht-codierende, da kaum Aminosäureaustausche stattfinden (Müller et al., 2006). Im Vergleich zu codierenden Regionen unterliegen Introns und *intergeneric spacers* (IGS), die großteils aus nicht

codierenden Bereichen bestehen nicht der Selektion, so dass die phylogenetische Distanz zwischen verschiedenen Taxa direkt proportional zur Mutationsrate ist (Muir & Fialtov, 2007). Durch hoch konservierte Sekundärstrukturen, die vor allem in Gruppe-I-Introns bei Spleißvorgängen helfen, ist hier allerdings oft ein Mosaik aus variablen und konservierten Anteilen zu finden (Taberlet et al., 2006).

Die in dieser Arbeit verwendeten Genregionen ITS, trnK/matK, trnT-trnL-trnL-trnF und trnS-trnG-trnG stammen bis auf die nucleäre ITS (*internal transcribed spacer*) aus der LSC des Plastidengenoms. Ausschlaggebend für diese Auswahl war zum einen die gute Vergleichbarkeit und die Einbeziehbarkeit weiterer Sequenzen von nahe verwandten Gattungen. Die trnL-trnL-Intronsequenzen und die ITS-Sequenzen sind bereits für etwa 30% der 250.000 beschriebenen Pflanzenarten bereits verfügbar (Borsch et al., 2009). Zum anderen zeigten die Regionen um trnK/matK und trnS-trnG-trnG in verwandtschaftlichen Studien, dass sie sehr variabel sind und trotzdem eine gute phylogenetische Auflösung geben (Shaw et al., 2005; Borsch & Quandt, 2009).

Beruhend viele ältere Phylogeniestudien auf höherer Ebene noch hauptsächlich auf rbcL-Sequenzen, einer ebenfalls im Chloroplasten lokalisierten, für eine Untereinheit der RuBisCO codierenden Region, wurde später festgestellt, dass sich andere Sequenzen wie die von matK weitaus besser für diese Aufgabe eignen (Müller et al., 2006; Shaw et al., 2005). Smitsen et al. (2002) kommen zu dem Ergebnis, dass rbcL und 5'ndhF nicht für die Auflösung der Caryophyllaceae bis auf Gattungsebene ausreichen, was deren Gebrauch für Untersuchungen auf Artebene natürlich enorm fraglich erscheinen lässt. Muir und Fialtov (2007) weisen zudem auf mögliche positive Selektion bei rbcL hin.

Aus matK-Sequenzen erstellte Phylogenien führten in vielen Untersuchungen zu zufriedenstellenden Ergebnissen (Muir & Fialtov, 2007; Albach et al., 2005; Müller et al., 2006; Borsch et al., 2009). Die trnK/matK-Sequenz eignet sich in besonderem Maße für phylogenetische Untersuchungen, da sie zum einen sehr nahe an der Neutralität evolviert (*likelihood ratio test*, Müller et al., 2006) und zum anderen bis auf wenige Ausnahmen bei allen Pflanzen in ähnlicher Ausprägung vorhanden ist. Die Sequenz des trnK-Gens codiert für die tRNA des Lysins und ist auf zwei etwa 2,6kb voneinander entfernte Exons in der *large single copy region* des cp-Genoms aufgeteilt. Das dazwischen lokalisierte Gruppe-II-Intron besitzt einen etwa 1500bp langen ORF (*open reading frame*) der für die einzige funktionelle Maturase im cp-Genom codiert. Dessen Struktur ist der anderer Intron-codierter Proteine (IEP) sehr ähnlich, bei allen anderen IEPs sind die potentiell codierenden Sequenzen aber durch Mutationen unbrauchbar geworden (Borsch & Quandt, 2009). Eine

Domäne 100 bis 150bp vom 3'-trnK aus ist als ebenfalls eher konservierte Region bekannt. Außerdem geben Borsch und Quandt (2009) an, dass sich das Intron besser eignet, als matK selbst.

Eine weitere für phylogenetische Berechnungen vorgeschlagene cpDNA-Region ist zwischen den ebenfalls für tRNAs codierenden trnT^(UGU)-trnL^(UAA)-trnL^(UAA)-trnF^(GAA)-Exons angesiedelt. Die Region ist durch die hoch konservierten Exons dreigeteilt, zwischen trnT und dem 5'trnL befindet sich ein *intergeneric spacer* (IGS) mit 480 bis etwa 1400bp Länge, in das trnL-Exon ist ein Gruppe-I-Intron mit einer Länge von 450 bis 600bp eingeschoben, während das 3'trnL-Exon und die trnF-Sequenz schließlich wieder durch einen 350 bis 430bp langen IGS getrennt sind. Für die Region wurden die ersten universellen Primer für phylogenetische Untersuchungen publiziert (Taberlet et al., 1991), was wohl der Hauptgrund dafür war, dass die Region in der Phylogenie lange so große Präferenz eingeräumt wurde. Schlagen Taberlet et al. (2006) noch das trnL-Intron als Barcode-Region vor, die sich aufgrund von zwei konservierten *loop*-Strukturen gut alignieren lassen, wird durch weitere vergleichende Studien deutlich, dass die ganze Region zu wenig variabel ist und sich daher relativ schlecht für Verwandtschaftsanalysen eignet (Muir & Filatov, 2007; Shaw et al., 2005; Borsch & Quandt, 2009). Zu den anderen beiden hier verwendeten cpDNA-Regionen allerdings geben Shaw et al. (2005) und Borsch und Quandt (2009) ein viel größeres Potential als für trnT-trnL-trnL-trnF an.

Das oft AT-reiche trnT-trnL-Stück findet am wenigsten Verwendung, da bei der Amplifikation mit den Primern von Taberlet et al. (1991) zuweilen Probleme auftreten, weshalb Cronn et al. (2002) einen neuen Primer beschreiben, der ebenfalls im trnT-Exon bindet und bessere Ergebnisse liefern soll. An Variation und Informationsgehalt hat laut Shaw et al. (2005) dieser IGS das dennoch größte phylogenetische Potential und eine bessere Signalqualität pro PIC (*parsimony informative character*; siehe auch Müller et al., 2006; Borsch & Quandt, 2009).

Für eine einfache Amplifikation aufgrund von weniger Sekundärstrukturen als das trnL-Intron eignet sich der trnL-trnF-IGS hervorragend für Verwandtschaftsanalysen, wobei er zudem noch informativer ist als das Intron (Shaw et al., 2005). Allerdings ergeben sich bei nahe verwandten Taxa Probleme durch die geringe Anzahl verwertbarer Merkmale in dieser Sequenz.

Als dritte Region aus dem plastidären Genom wurde die trnS-trnG-trnG-Sequenz ausgewählt, obwohl hierzu nur wenige Studien und Gensequenzen veröffentlicht sind. Die Region mit etwa 1600bp Länge besteht aus dem *intergeneric spacer* zwischen trnS_{GCU} und

trnG_{UUC} (etwa 619-1035bp), außerdem aus einem Gruppe-I-Intron (697-1008bp) zwischen den zwei trnG_{UUC}-Exons. Trotz der bisher nicht untersuchten Vergleiche mit anderen Regionen wurde diese Region für die vorliegende Arbeit herangezogen, da nicht nur die Variabilität der Sequenz teilweise weit über der anderer Genbereiche liegt, sondern auch die Anzahl der PICs die bei matK und trnI-trnF weit übersteigt (Shaw et al., 2005). Auch die Sekundärstruktur und die phylogenetische Brauchbarkeit ist bisher noch kaum untersucht worden, trotzdem wird vorgeschlagen, die Region aufgrund der großen Variabilität zur Identifikation von Arten heranzuziehen (Borsch & Quandt, 2009). Shaw et al. (2005) geben an, dass die Sequenz sich in einigen Fällen, wie bei den dort untersuchten Caricaceae DUMORTIER, nicht alignen lässt. Trotzdem kommen auch diese Autoren zu dem Ergebnis, dass das trnS-G-G-Stück das potentiell informativste von dreizehn in der Studie untersuchten Regionen (atpB-rbcL, rpS11-rpL36, rpS3-rpL16, rpL16, trnL-trnL, trnL-trnF, trnT-trnL, atpB-rbcL, psbB-psbH, 5'rpS12-rpL20, trnH-psbA, matK-Exon) ist. Außerdem hat es mehr variable Merkmale als die ribosomale ITS und eignet sich deshalb besonders gut für Phylogenien, auch weil mit zwei Sequenzierungsreaktionen praktisch die größtmögliche Ausbeute an PICs erzielt werden kann (Shaw et al., 2005).

Zum Vergleich mit den genannten drei cpDNA-Regionen wurde in dieser Arbeit die nucleäre ITS-Sequenz von etwa 670bp Länge herangezogen. Die Sequenz ist für eine große Anzahl der bekannten Organismen bereits vorhanden und wurde in vielen Studien verwandt (Albach et al., 2005; Frajman et al., 2009). Obwohl die ITS in mehreren hundert Kopien im Kerngenom vorliegt, sollte die Sequenz jeweils die gleiche sein, was Popp et al. (2005) auch für Caryophyllaceae mit einer *concerted evolution* erklären. Andere Autoren argumentieren dagegen, dass die Konzertierung der Sequenzen innerhalb einer Art oder schon eines Organismus oft nicht vollständig abgeschlossen ist und sich daher widersprüchliche Signale durchsetzen können (Levin et al., 2009). Haben Levin et al. (2009) zum einen festgestellt, dass die ITS einen höheren Prozentsatz (9,5%) an PICs vorhält als NIA (Nitratreduktase; 8,7%) oder trnD-trnF (1,5%), konnte für die ITS zum anderen eine Korrelation zwischen dem *consistency index* (CI) und der relativen Menge an PICs nachgewiesen werden. Der CI bezeichnet hierbei die Wahrscheinlichkeit für Homoplasien, die durch sich überlagernde oder konvergente Mutationen entstanden sind. Ergibt die ITS in vielen Untersuchungen eine von den plastidären Genen verschiedene phylogenetische Hypothese (Chung, 2007; Levin et al., 2009), beschreiben Fior et al. (2006) die Region als hervorragend geeignet für eine Analyse auf Gattungs- und Artebene innerhalb der Caryophyllaceae.

1.3 Ziele der Arbeit

Die Arbeit soll erste Einblicke in die Phylogenie der Gattung *Saponaria* geben. Morphologisch bereits charakterisierte Arten werden in dieser Arbeit mit molekularen Markern untersucht und die Ergebnisse mit denen aus vorhergehenden, morphologischen Arbeiten verglichen.

Zu diesem Zweck werden Variabilität, Aussagekraft und Handhabbarkeit der phylogenetischen Marker ITS und der drei plastidären Regionen matK/trnK, trnS-trnG-trnG und trnT-trnL-trnL-trnF im Bezug auf die analysierten Arten untersucht um die praktische Bedeutung dieser Regionen für spätere Untersuchungen in dieser Organismengruppe zu erfassen. Auf den Einfluss verschiedener bioinformatischer Auswertungsverfahren auf den effektiven Informationsgehalt der erhaltenen Daten wird ebenfalls ein Augenmerk gerichtet.

Als wichtigste morphologische Untersuchung wird die Monographie der Gattung von Simmler (1910) zum Vergleich herangezogen, obwohl hierin noch eine teilweise andere Betrachtungsweise der Art- und Gattungsentstehung zugrundegelegt wird. Ein weiterer wichtiger Aspekt wird dem Einfluss auf die Phylogenie beigemessen, der aus den verschiedenen Verbreitungsgebieten der Arten resultiert und ob sich darin regelmäßige Muster erkennen lassen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Bezugsquellen

2.1.1 Lösungen und Puffer

0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0

0,5 M Na₂-EDTA*2H₂O

in ddH₂O ansetzen, pH-Wert auf 8,0 einstellen

dNTPs

my-Budget dNTP-Set (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland)

Ladepuffer (6x)

50% Saccharose

0,1% Bromphenolblau

TBE (5x)

440 mM Tris-Base pH 8,0 (SIGMA, Taufkirchen, Deutschland)

440 mM Borsäure (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

10 mM Na₂-EDTA (Merk, Darmstadt, Deutschland)

in ddH₂O ansetzen

1xTE-Puffer pH 8,0

10 mM Tris-Base (SIGMA, Taufkirchen, Deutschland)

1 mM Na₂-EDTA*2H₂O (Merck, Darmstadt, Deutschland)

in H₂O ansetzen, pH-Wert auf 8,0 einstellen, 5 min bei 121°C autoklavieren

Verwendeter DNA-Größenstandard:

1kb Leiter (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland)

Verwendete Kits:

my-Budget Double Pure Kit (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland)

innuPrep Plant DNA Kit (Analytic Jena AG, Jena, Deutschland)

Taq-DNA-Polymerase (Kit beinhaltet 10x PCR-Puffer und 20mM MgCl₂; PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)

2.1.2 Verwendete Laborgeräte und Programme

Thermocycler: DNA Engine Peltier Thermal Cycler (Bio Rad, München, Deutschland)

Geldokumentationsgerät: Vilbert Lourmat Rainbow CCTV RMB 92 (Vilbert, Marne La Vallee, Frankreich)

Netzteil für Gelelektrophorese: Consort EV 243 (SIGMA, Taufkirchen, Deutschland)

Sequenzierer: ABI 3130 XL (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

Thermodrucker: Mitsubishi P93 (Mitsubishi, Ratingen, Deutschland)

Thermomixer: Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Vortex: Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Schwerte, Deutschland)

Zentrifuge: Centrifuge 5424 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Schwingmühle: Retsch MM 2000 (F. Kurt Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Deutschland)

Programme zur bioinformatischen Analyse:

Dendroscope v1.2.1 (Huson et al., 2007)

FigTree v1.2.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

MAFFT v6.502a (2007/07/30, Kazutaka Katoh,
<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>)

Modeltest 3.7macX (Posada & Crandall 1998)

MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001, Ronquist & Huelsenbeck 2003)

MrModeltest 2.2 (<http://www.ebc.uu.se/systzoo/staff/nylander.html>; Posada & Crandall 2001; Nylander, 2002)

PAUP* (Portable version 4.0b10 for Unix; Swofford et al.; 2002)

RAxML (Stamatakis et al., 2005, Stamatakis et al., 2008)

SeAl v2.0a11 (Sequence Alignment Editor v2.0a11, Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford, OX1 3PS, UK)

Sequencher 4.7 (Gene Codes Corporation, 775 Technology Drive, Suite 100A Ann Arbor, Michigan 48108, USA)

SeqState 1.4.1 (Müller, K , 2005)

TextWrangler 2.2.1 (Bare Bones Software, Inc. P. O. Box 1048 Bedford, MA 01730-01048)

2.1.3 Verwendete Primer

Name	Sequenz	Annealing-Temperatur	Referenz
trnK-3914F	GGGGTTGCTAACTCAACGG	53°C	Johnson + Soltis (1995)
trnK-2R	AACTAGTCGGATGGAGTAG	49°C	Johnson + Soltis (1995)
RP 608F	CTGTATCGTACTATGTATC	45°C	diese Arbeit
RP 722R	GTTGCCAAGAACCGTCGAG	53°C	diese Arbeit
RP 969F	CAGTCATTCTGGAAATTCC	47°C	diese Arbeit
RP 1151R	CCAAGATTCCTAGATGGG	46°C	diese Arbeit
RP 1460F	GTTATCTTATGGCTTTTCAAGG	49°C	diese Arbeit
RP 1511R	CTTTATACCTAGCAGAGTG	47°C	diese Arbeit
RP 1810F	GTAACGGATTAGGGCATC	48°C	diese Arbeit
RP 1936R	ATATACTTCAGTCGATACAAAC	47°C	diese Arbeit
trnLaF	CATTACAAATGCGATGCTCT	48°C	Taberlet et al. (1991)
trnLbR	TCTACCGATTCGCCATATC	50°C	Taberlet et al. (1991)
trnLcF	CGAAATCGGTAGACGCTACG	54°C	Taberlet et al. (1991)
trnLdR	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	54°C	Taberlet et al. (1991)
trnLeF	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	54°C	Taberlet et al. (1991)
trnLfR	ATTTGAACTGGTGACACGAG	50°C	Taberlet et al. (1991)
trnT2F	CAAATGCGATGCTCTAACCT	50°C	Shaw et al. (2005)
5'trnG2G	GCGGGTATAGTTTAGTGGTAAAA	52°C	Shaw et al. (2005)
5'trnG2S	TTTACCACTAAACTATAACCCGC	51°C	Shaw et al. (2005)
trnG	GAATCGAACCCGCATCGTTAG	54°C	Shaw et al. (2007)
trnS	AACTCGTACAACGGATTAGCAATC	54°C	Shaw et al. (2007)

Die Primer wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) synthetisiert und mit 1x TE-Puffer pH 8 zu einer Endkonzentration von 100µM resuspendiert. Für die PCR wurden die Primer je auf 10µM, für die Sequenzierung auf 4µM mit ddH₂O verdünnt.

Die nachfolgende Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die Primerpositionen in den verschiedenen Genabschnitten.

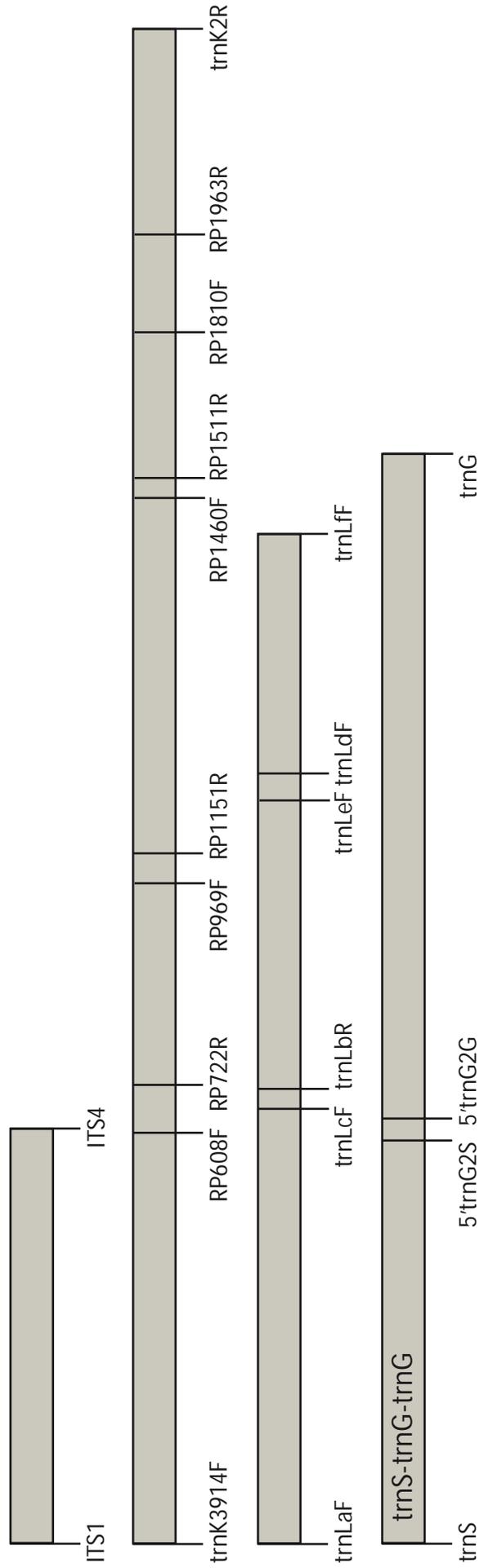


Abbildung 2: Lage der verwendeten Primer

2.2 Verwendetes Pflanzenmaterial

DNA-Isolationen von Herbarbelegen, bei denen sich kein Amplifikat zeigte, wurden unter neuen Isolationsnummern ein zweites mal durchgeführt, ebenso Isolationen bei denen uneindeutige Ergebnisse erhalten wurden. Diese Isolationen sind durch * gekennzeichnet. Von der Firma „B and T World Seeds“ wurden Samen der entsprechenden Arten bestellt und ausgesät, die Isolationen wurden anschließend bis auf *S. chlorifolia* aus den Blättern der Pflanzen hergestellt. Bei *S. chlorifolia* wurde eine DNA-Isolation aus Samen durchgeführt.

Die Isolationen RPS 5 und RPS 8, RPS 25 und RPS 26, RPS 29 und RPS 30, RPS 31 und RPS 32, RPS 33 bis RPS 35, RPS 51 und RPS 63, RPS 58 bis RPS 60, RPS 64 und RPS 65, RPS 66 und RPS 67 stellen jeweils verschiedene Individuen der selben Population dar. Zur Bestimmung der verwendeten Pflanzen und Belege wurden die Originalbeschreibungen (siehe Literaturliste) und jene aus Simmler (1910) herangezogen.

Bezugsquellen der Pflanzen

Universität Bayreuth, Ökologisch-Botanischer Garten, Universitätsstraße 30, 95440
Bayreuth, Deutschland

Georg-August-Universität Göttingen, Experimenteller Botanischer Garten,
Grisenbachstraße 1, 37077 Göttingen, Deutschland

B and T World Seeds sarl, Paguignan, Aigues Vives, Frankreich
(<http://b-and-t-world-seeds.com>)

Århus Universitet, Biologisk Institut Ny Munkegade 114, 8000 Århus C, Dänemark
Jardín Botánico de Córdoba: Herbarium COA, Avenida de Linneo s/n, 14004 Córdoba,
Spanien

Botanical Museum, 22361 Lund, Schweden

Botanical Garden & Museum, Natural History Museum of Denmark, Københavns
Universitet, Øster Farimagsgade 2B, 1353 København, Dänemark

ETH Zürich HG, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz

Stauden Ring GmbH, Im Drielaker Moor 33, 26135 Oldenburg

<http://www.premiumstaude.de>

Die Pflanzen zu den Isolationen RPS 22, RPS 24, RPS 26 und RPS 27 wurden auf einer Pflanzenrärtenbörse im Gruga-Park in Essen von Sammlern als Lebendexemplare erworben.

Tabelle 1 gibt die Zuordnung der verwendeten Arten zu den entsprechenden Isolationsnummern an.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Zur Isolierung der genomischen DNA aus Pflanzenmaterial wurde dieses zunächst an der Luft getrocknet um bei dem nachfolgenden Aufschlussverfahren eine möglichst große Ausbeute an DNA zu erhalten. Herbarbelege wurden ohne Vorbehandlung verwandt.

Zunächst wurden die getrockneten, 0,5-1cm² großen Pflanzenteile in 1,5ml-Reaktionsgefäßen in einer Schwingmühle zu Pulver zermahlen. Hierfür wurden je zwei rostfreie Stahlkugeln mit in das Gefäß gegeben. Die Zellyse und DNA-Fällung, Wasch- und Elutionsschritte wurden nach den Angaben des innuPrep Plant DNA Kit durchgeführt.

2.3.2 PCR-Protokolle

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Innis et al., 1990) wurde wie folgt durchgeführt.

In der Regel enthielt ein PCR-Ansatz:

5µl	Puffer Y (10x mit 20mM MgCl ₂)
40,8µl	ddH ₂ O
1µl	dNTP
1µl	Primer A
1µl	Primer B
0,2µl	Taq-Polymerase (5U/µl)
1µl	genomische DNA

Bei schlecht amplifizierten Produkten wurden bis zu 5µl genomischer DNA eingesetzt, die entsprechende Menge Flüssigkeit wurde beim Wasser abgezogen.

Tabelle 1: Die für die Untersuchung verwendeten Pflanzen lagen in Form von Herbarbelegen, Frischmaterial oder Samen vor. (H = Herbarbeleg, F = Frischmaterial, S = Samen, HMK = Herbar Martin Kemler, T = Typusbeleg, * = Zweitisolat aus dem selben Beleg)

Isolationsnummer	Artname	Herkunft, Aufsammlung
RPS 1	Saponaria atocioides BOISSIER	Kopenhagen, H, 1862
RPS 2	Saponaria holopetala LEDEBOUR	Kopenhagen, H, 1881
RPS 3	Saponaria officinalis LINNÉ	Bayreuth, F, 2009 (621441)
RPS 4	Saponaria officinalis LINNÉ	Bayreuth, F, 2009 (621442)
RPS 5	Saponaria pamphylica BOISSIEU	Bayreuth, F, 2009 (621449)
RPS 6	Saponaria ocymoides LINNÉ	Bayreuth, F, 2009 (621446)
RPS 7	Saponaria cf. bodeana BOISSIER	Bayreuth, F, 2009 (621437)
RPS 8	Saponaria pamphylica BOISSIEU	Bayreuth, F, 2009 (621450)
RPS 9	Saponaria calabrica GUSSONE	Lund, H, 2002 (1244108)
RPS 10	Saponaria sicula RAFINESQUE	Lund, H, 1983 (1246586)
RPS 11	Saponaria x lempergii FRITSCH ‚Max Frei‘	Bayreuth, F, 2009 (621457)
RPS 12	Saponaria prostrata WILLDENOW	Kopenhagen, H, 1971 (3786)
RPS 13	Saponaria prostrata WILLDENOW	Kopenhagen, H, 1957, T (3786)
RPS 14	Saponaria haussknechti SIMMLER	Bayreuth, F, 2009
RPS 15	Saponaria intricata FREYN	Lund, H, T (1045254)
RPS 16	Saponaria glutinosa M. BIEBERSTEIN	Cordoba, H, 1996 (36556)
RPS 17	Saponaria stenopetala RECHINGER	Aarhus, H, 1967, T (35882)

Isolationsnummer	Artname	Herkunft, Aufsammlung
RPS 18	<i>Saponaria prostrata</i> WILLDENOW	Kopenhagen, H, 1969 (3786)
RPS 19	<i>Saponaria intricata</i> FREYN	Zürich, H, 1895, T (Z-2664)
RPS 20	<i>Saponaria subrosularis</i> RECHINGER	Kopenhagen, H, 1965, T (29886)
RPS 21*	<i>Saponaria atocoides</i> BOISSIER	Kopenhagen, H, 1862
RPS 22	<i>Saponaria x wiemanni</i> FRITSCH	Essen – Gruga, F, 2010
RPS 23	<i>Saponaria x olivana</i> “Bressingham“	Premium Staude, F, 2010
RPS 24	<i>Saponaria pulvinaris</i> BOISSIER	Essen – Gruga, F, 2010
RPS 25	<i>Saponaria caespitosa</i> DE CANDOLLE	B+T, F, 2010
RPS 26	<i>Saponaria caespitosa</i> DE CANDOLLE	Essen – Gruga, F, 2010
RPS 27	<i>Saponaria pumila</i> JANCHEN	Essen – Gruga, F, 2010
RPS 28	<i>Saponaria pulvinaris</i> BOISSIER	B+T, F, 2010
RPS 29	<i>Saponaria bellidifolia</i> SMITH	B+T, F, 2010
RPS 30	<i>Saponaria bellidifolia</i> SMITH	B+T, F, 2010
RPS 31	<i>Saponaria ocymoides</i> LINNÉ	B+T, F, 2010
RPS 32	<i>Saponaria ocymoides</i> LINNÉ	B+T, F, 2010
RPS 33	<i>Saponaria officinalis</i> LINNÉ, ‘Rosea Plena’	B+T, F, 2010
RPS 34	<i>Saponaria officinalis</i> LINNÉ, ‘Rosea Plena’	B+T, F, 2010
RPS 35	<i>Saponaria officinalis</i> LINNÉ, ‘Rosea Plena’	B+T, F, 2010
RPS 36	<i>Saponaria lutea</i> LINNÉ	Bochum, H, 1980 (5486)
RPS 37	<i>Silene undulata</i> AITON / MOENCH	Bochum, F, 2010

Isolationsnummer	Artname	Herkunft, Aufsammlung
RPS 38	<i>Gypsophila paniculata</i> LINNÉ, Bristol Fairy'	Stauden Ring, F, 2010
RPS 39	<i>Gypsophila repens</i> LINNÉ, Rosea'	Stauden Ring, F, 2010
RPS 40*	<i>Saponaria stenopetala</i> RECHINGER	Aarhus, H, 1967, T (35882)
RPS 41*	<i>Saponaria glutinosa</i> M. BIEBERSTEIN	Cordoba, H, 1996 (36556)
RPS 42*	<i>Saponaria subrosularis</i> RECHINGER	Kopenhagen, H, 1965, T (29886)
RPS 43*	<i>Saponaria intricata</i> FREYN	Lund, H, T (1045254)
RPS 44*	<i>Saponaria intricata</i> FREYN	Zürich, H, 1895, T (Z-2664)
RPS 45*	<i>Saponaria prostrata</i> WILLDENOW	Kopenhagen, H, 1957, T (3786)
RPS 46*	<i>Saponaria prostrata</i> WILLDENOW	Kopenhagen, H, 1969 (3786)
RPS 47*	<i>Saponaria holopetala</i> LEDEBOUR	Kopenhagen, H, 1881
RPS 48	<i>Saponaria lutea</i> LINNÉ	Marburg, F, 2010
RPS 49	cf. <i>Saponaria sicula</i> RAFINESQUE ssp. intermedia	Marburg, F, 2010
RPS 50	<i>Saponaria cypria</i> BOISSIER	Göttingen, F, 2010, Ursprung: Trodos-Gebirge, Zypern, 1996
RPS 51	<i>Saponaria x lempergii</i> FRITSCH, Max Frei'	Tübingen, F, 2008
RPS 52	<i>Saponaria chlorifolia</i> KUNZE	B+T, S, 2010
RPS 53	<i>Saponaria x wiemanni</i> FRITSCH	Bochum, F, 2010
RPS 54	<i>Saponaria caespitosa</i> DE CANDOLLE	Bochum, F, 2010
RPS 55	<i>Saponaria lutea</i> LINNÉ	Bochum, F, 2010
RPS 56	<i>Saponaria lutea</i> LINNÉ	Bochum, F, 2010
RPS 57	<i>Saponaria officinalis</i> LINNÉ	Bochum, F, 2010

Isolationsnummer	Artname	Herkunft, Aufsammlung
RPS 58	<i>Stellaria holostea</i> LINNÉ	Vogesen, F, 2010
RPS 59	<i>Stellaria holostea</i> LINNÉ	Vogesen, F, 2010
RPS 60	<i>Stellaria holostea</i> LINNÉ	Iserlohn, F, 2010
RPS 61	<i>Gypsophila</i> spec.	Essen – Gruga, F, 2010
RPS 62	<i>Saponaria x lempergii</i> FITSCH	Berlin, HMK, (137)
RPS 63	<i>Saponaria x lempergii</i> FRITSCH ,Max Frei'	Tübingen, HMK, (016040)
RPS 64	<i>Saponaria pumila</i> JANCHEN	Hochalmspitze, HMK, (016035)
RPS 65	<i>Saponaria pumila</i> JANCHEN	Hochalmspitze, HMK, (016033)
RPS 66	<i>Saponaria pumila</i> JANCHEN	Wöllaner Nock, HMK, (016038)
RPS 67	<i>Saponaria pumila</i> JANCHEN	Wöllaner Nock, HMK, (016037)
RPS 68*	<i>Gypsophila repens</i> LINNÉ ,Rosea'	Stauden Ring, F, 2010
RPS 69*	<i>Gypsophila paniculata</i> LINNÉ ,Bristol Fairy'	Stauden Ring, F, 2010
RPS 70	<i>Petrorhagia saxifraga</i> LINK	Premium Staude, F, 2010

Standardmäßig wurde folgendes PCR-Programm angewandt:

Anfangsdenaturierung	96°C	2:00min
Denaturierung	96°C	0:20min
Annealing	52°C	0:40min
Extension	72°C	2:00min
Zyklen		35
Endextension	72°C	7:00min
Lagerung	6°C	∞

Für verschiedene Primerpaare wurden jeweils die Annealing-Temperatur und die Extensionszeit angepasst. Für die Annealing-Temperatur eines bestimmten Primerpaares wurde jeweils die niedrigere der unter 2.1.3 angegebenen Temperaturen eingestellt, um auf jeden Fall beiden Primern die Möglichkeit der Hybridisierung zu geben. Die Extensionszeit richtet sich nach der Länge der erwarteten Amplifikate, da bekannt ist, dass die Taq-Polymerase mit einer Geschwindigkeit von etwa 1000bp pro Minute arbeitet.

2.3.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese trennt DNA-Fragmente im elektrischen Feld ihrer Größe nach auf, die Laufstrecke verhält sich hierbei logarithmisch zur Länge der Fragmente. PCR-Amplifikate können so identifiziert und gegebenenfalls aus dem Gel eluiert werden.

Für die rasche Identifizierung von Amplifikaten wurden 0,8%-Agarosegele verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1x TBE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf etwa 60°C mit Ethidiumbromid auf eine Endkonzentration von 0,5µg/ml versetzt. Anschließend wurde die Lösung in einen Elektrophoreseschlitten gegossen, in dem ein Kamm Taschen für eine Beladung ausspart. Der Schlitten mit dem erstarrten Gel wurde in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt und der Kamm entfernt. In die Taschen wurde je ein Gemisch aus 5µl PCR-Ansatz und 2µl Ladepuffer gefüllt. Anschließend wurden 30-40 Minuten lang konstant 120V durch einen Spannungsgeber an die Kammer angelegt. Im Geldokumentationsgerät konnten später unter UV-Licht (254nm) die durch Ethidiumbromid angefärbten Banden sichtbar gemacht und mit einem Thermodrucker dokumentiert werden. Als Größenstandard diente jeweils eine 1kb-Leiter.

Die bei einigen PCR-Reaktionen auftretenden Doppel- oder Mehrfachbanden wurden der genaueren Auftrennung wegen in einem 2%-Agarosegel mit größeren Taschen aufgetrennt, ausgeschnitten und eluiert. Hierfür wurden 2,5h lang 100V an die Kammer angelegt, der Puffer und die Konzentration an Ethidiumbromid wurden nicht verändert.

2.3.4 Gelelution und Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Gelelution und Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem my-Budget Double Pure Kit nach Angaben des Herstellers.

2.4 Sequenzanalyse und bioinformatische Auswertung

2.4.1 Sequenzierung

Die Sequenzierung der amplifizierten und aufgereinigten DNA-Fragmente erfolgte durch den Sequenzier-Service der Analytischen Chemie der Ruhr-Universität Bochum mit einem ABI 3130xl Sequenziergerät (Applied Biosystems). Die Verdünnung der abgegebenen Proben mit ddH₂O wurde je nach der Stärke der Bandenmuster zwischen unverdünnt und 1:4 gewählt.

2.4.2 Bearbeitung der Sequenzen

Das Programm Sequencher 4.7 ermöglicht es, die Elektropherogramme einzulesen und weiter zu bearbeiten. Die DNA-Fragmente verschiedener Sequenzierungsreaktionen können hier aligniert und untereinander verglichen werden.

Um die Qualität der erhaltenen Sequenzen zu erhöhen war es in jedem Falle nötig, diese manuell nachzueditieren um zum Beispiel Bereiche mit mangelnder Qualität zu überprüfen und gegebenenfalls zu verändern oder auszuschneiden. Zudem musste hier entschieden werden, ob die Länge der Sequenzen ausreichte um eine erwartete Überlappung mit einem folgenden DNA-Fragment zu erreichen und ob die Qualität eine eindeutige Zuordnung genau eines Nucleotids an jeder Stelle des Stranges zuließ. Bei relativ schwierig zu sequenzierenden Genabschnitten war es oft nötig, ein Sequenzierungsergebnis durch mindestens ein weiteres zu unterstützen. Zur Feststellung der Identität einer Sequenz wurde diese durch den BLASTN-Algorithmus (Altschul et al., 1990) mit bereits vorhandenen Sequenzen in GenBank (NCBI) abgeglichen.

2.4.3 Methoden der phylogenetischen Rekonstruktion

Alignierung der Sequenzen

Als Grundlage fast aller phylogenetischen Untersuchungen wird ein Alignment aus den zu untersuchenden DNA-Sequenzen erstellt. Da schon durch das Alignment selbst weitreichende Aussagen über natürliche Homologien und den Informationsgehalt der Daten insgesamt gemacht werden, sollte gerade auf diesen Schritt besonderes Augenmerk gelegt werden.

Jedes Alignment muss explizit die Evolutionsgeschichte reflektieren, sonst sind alle daraus gezogenen Schlüsse falsch (Morrison, 2008). Bei Borsch und Quandt (2009) wird das Alignment als *primary homology assessment = putative synapomorphy hypotheses* beschrieben. Die anfängliche Einschätzung der Homologien aller Nucleotidpositionen untereinander ist also eine Hypothese über Synapomorphien, die somit auch Plesiomorphien gegenübergestellt werden können. Eine ähnliche Einschätzung zum Einfluss von Alignments macht Morrison (2008), wonach phylogenetische Alignments höheren Maximen genügen müssen als andere, da sie Aussagen über Homologien von Merkmalen machen, die spätere Rechenprozesse entscheidend beeinflussen, was aber kein existierender Algorithmus leisten könne. Daher wird oft argumentiert, dass sich natürliche Homologie nur durch manuelle Alignierung oder mindestens manuelle Nacheditierung eines von einem Algorithmus erzeugten Alignments erreichen lässt, auch wenn die Reproduzierbarkeit dabei verloren geht. So führt ein Realignment mit anderen Parametern zu veränderten Homologien, die eine ganz andere Baumtopologie bedingen. Ein weiterer Fehler von den meisten Programmen ist es, jedes einzelne Nucleotid auch als einzelnes Merkmal zu behandeln, obwohl oft *repeats* eingefügt oder ausgeschnitten werden oder eine Sekundärstruktur zum Beispiel eines Introns als Einheit evolviert (Kelchner, 2008).

Alle Analyseverfahren (Distanzverfahren, Parsimonie, Likelihood, Bayes'sche Statistik) benötigen als Datengrundlage ein Alignment. Die Alignierung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm MAFFT (Kato et al, 2005). Die Taxa werden dabei in einer Spalte untereinander geordnet, in einer zweiten Spalte wird eine Datenmatrix aus den zugehörigen Sequenzen berechnet. Die Erstellung des Alignments erfolgt indem eine Sequenz anhand einer anderen so ausgerichtet wird, dass möglichst viele gleiche Basen in Spalten übereinander liegen. Zu diesem Paar wird dann eine dritte Sequenz angeordnet und so fort bis alle Sequenzen schrittweise untereinander aligniert sind. Hierbei wird ein einfacher Baum zugrunde gelegt der sich aus einfachen genetischen Distanzen berechnet.

Für die Suche nach dem besten Alignment, welches möglichst wenige Lücken (*gaps*) und Insertionen und außerdem möglichst wenige Basenaustausche enthält, werden vom Programm mehrere Suchvorgänge durchgeführt.

Das fertige Alignment wurde in „SeAl“ angesehen und kontrolliert. Wichtig ist zu erkennen, ob alle Sequenzen in der richtigen Orientierung in das Alignment eingerechnet wurden und ob Taxa mit zu großer phylogenetischer Distanz enthalten sind, die das Alignment durch das Einfügen großer Lücken in die Länge ziehen.

Auswahl des Evolutionsmodells

Da nicht für jede Base die gleiche Wahrscheinlichkeit besteht durch eine andere ausgetauscht zu werden, gibt es verschiedene Modelle die Korrekturfaktoren für die Distanz zwischen einzelnen Substitutionen einführen. Um das für das eingegebene Alignment geeignetste Substitutionsmodell zu finden, wird zuvor ein Modeltest mit „Modeltest 3.7macX“ durchgeführt. Für Analysen mit MrBayes v3.1.2 wurde die Auswahl des Evolutionsmodells mit Hilfe von MrModeltest 2.2 getroffen.

Phylogenetische Rechenverfahren

Bei der Baumsuche können grundsätzlich vier Verfahren unterschieden werden: Distanzverfahren, Parsimonieanalysen, Maximum-Likelihood-Verfahren und Bayes'sche Statistik, wobei das zuletzt genannte Verfahren im Wesentlichen auf Likelihood-Werte zurückgreift.

Als einfachster und schnellster Ansatz können die Distanzverfahren, hier Neighbour Joining (NJ), gelten. Bei diesem Verfahren werden die einfachen Distanzen zwischen Sequenzen berechnet und so die Taxa zusammengruppiert. Da die Datenmenge hierbei nach jedem Rechenschritt geringer wird, zeichnet sich die Methode durch ihre außerordentliche Schnelligkeit aus, aber aufgrund der Einfachheit können aus den Ergebnissen oft nur grobe Abschätzungen über die natürlichen Verhältnisse gemacht werden.

Ein weiteres Verfahren, welches aber im Unterschied zu den anderen drei besprochenen auf Evolutionsmodelle verzichtet, ist die Parsimonieanalyse (MP). Dieser Methode liegt das einfache Parsimonieprinzip zugrunde, bei dem ohne gewichtende Parameter die Topologie mit den wenigsten Merkmalsübergängen gesucht wird (Knoop & Müller, 2009). Im Unterschied zu konstruktiven Distanzmethoden wird für diese Form der Datenanalyse eine beträchtliche Rechenkapazität und -zeit benötigt.

Die zur Zeit am häufigsten verwendete Baumrekonstruktionsmethode ist das Maximum Likelihood-Verfahren (ML). Das Verfahren beruht im Wesentlichen auf der Abschätzung von Parametern, die bei einer genügend großen Datenmenge die größtmögliche Wahrscheinlichkeit für eine phylogenetische Hypothese wiedergeben. Diese Rechenmethode ist äußerst aufwendig und langwierig, vor allem bei dem in PAUP* implementierten Algorithmus. Das Programm RAxML beschleunigt die Methode wesentlich, so dass eine weitaus größere Anzahl an *bootstrap*-Wiederholungen in viel kürzerer Zeit berechnet werden kann (Knoop & Müller, 2009).

Die Bayes'sche Statistik ist schließlich die neueste Methode zur phylogenetischen Rekonstruktion. Bei diesem Verfahren wird die a-priori-Wahrscheinlichkeit im Bayes-Theorem mit der Likelihood kombiniert und daraus die Posteriorwahrscheinlichkeit ermittelt, ein Unterstützungswert für die Wahrscheinlichkeit einer Topologie also. Vom Rechenaufwand her ist die Bayes'sche Statistik sehr viel weniger aufwendig als ML-Methoden und erfreut sich zudem durch oft viel höhere Unterstützungswerte für die Baumtopologien zunehmender Beliebtheit (Huelsenbeck et al., 2001; Knoop & Müller, 2009). Eben diese im Vergleich zum *bootstrapping* ausnehmend hohen Posteriorwahrscheinlichkeiten sind es aber auch, die bei vielen Autoren Skepsis gegenüber dem Verfahren wecken. So bemerken schon Huelsenbeck et al. (2001), dass ein unterparametrisiertes Evolutionsmodell hier viel größere Fehler hervorrufen kann, als bei nicht parametrischen *bootstrap*-Modellen der ML-Verfahren (siehe auch Huelsenbeck & Rannala, 2004; Yang & Rannala, 2005). Kelchner (2008) argumentiert dagegen, dass ein parameterreiches Evolutionsmodell wie GTR+G+I in einem Datensatz mit sehr marginaler Sequenzvariation oder geringer Größe auch ein hohes Level an Variabilität suggerieren kann und damit zu Fehlern führt.

Die Auswahl und Erläuterung der verschiedenen Rechenverfahren und Parameter basiert im wesentlichen auf Knoop und Müller (2009).

Distanzverfahren (NJ)

Diese Verfahren lassen eine äußerst rasche Analyse der Daten zu, da sie nur wenig Rechenleistung erfordern. Zu Beginn wird eine einfache Distanzmatrix aus den Distanzen aller Sequenzpaare erstellt. Dabei werden Indels bei der Berechnung als fehlende Daten behandelt oder die Sequenzen müssen paarweise gegenübergestellt werden, wobei dann keine der beiden Sequenzen ein *gap* an der Stelle aufweisen darf.

Der in „PAUP*“ eingebundene Neighbour Joining-Algorithmus ist das für Phylogenien am häufigsten verwendete Verfahren zur Berechnung eines Distanzbaumes. Dabei werden zuerst die zwei Sequenzen mit der geringsten Distanz ausgegliedert und als Paar den anderen Sequenzen gegenübergestellt, hierfür wird eine neue Distanzmatrix berechnet. Bei jedem Rechenschritt wird die Matrix so um eine Stelle verkürzt, in der Folge werden kleine Gruppen zu immer größeren Gruppen zusammengefasst bis nur noch zwei Gruppen gegenübergestellt werden können, eine dieser beiden Gruppen sollte im Idealfall die bekannte Außengruppe sein. Die Distanz zwischen dem einer Gruppe neu hinzugefügten Taxon und der Gruppe selbst wird gespeichert und später als Astlänge des phylogenetischen Baumes ausgegeben.

Bei NJ verwendeter Kommandoblock für PAUP*:

```
begin PAUP;
log file=nj_K2P_4gene.log;
set criterion=distance;
dset dist=K2P negbrlen=setzero missdist=ignore;
outgroup RPS_37_Silene_undulata;
nj bionj=yes treefile=nj_K2P_4gene.tre;
bootstrap nrep=2000 search=nj treefile=boot_nj_4gene.tre;
search nreps=1000 start=stepwise addseq=random swap=TBR;
savetree saveboot=nodelabels maxdec=0 from=1 to=1
file=bootval_nj_4gene.tre
log stop;
end;
```

(nach Weiß, 2010)

Parsimonieanalyse (MP)

Die Parsimonieanalyse ist ein Zwei-Schritt-Verfahren, welches nach dem Einfachheitsprinzip funktioniert. Das Ziel dieses Verfahrens ist es, einen phylogenetischen Baum zu finden, bei dem möglichst wenige Merkmalsänderungen im Laufe der Evolution stattgefunden haben und die Äste im Baum damit insgesamt möglichst kurz werden. Die zugrundeliegende Annahme ist hierbei, dass die Evolution immer den einfachsten und kürzesten Weg zu den vorhandenen Merkmalszuständen genommen hat. Dieses Konzept wurde unter „Ockhams Rasiermesser“ bekannt. Ein Merkmal sollte als Autapomorphie also

möglichst nur einmal entstanden oder verloren gegangen sein und ist dann synapomorph für eine monophyletische Gruppe. Merkmale, die allen untersuchten Taxa gemein sind, werden Plesiomorphien genannt und enthalten keine phylogenetisch verwertbare Information.

Zu Beginn wird nach parsimonie-informativen Merkmalen (*parsimony informative characters* = PICs) gesucht, also Spalten im Alignment, die brauchbare Informationen für die Parsimonie-Rekonstruktion enthalten. Hierfür werden zuerst konstante Merkmale, also Spalten bei denen die Merkmalsausprägung für jedes der untersuchten Taxa identisch ist, ausgesondert und gehen nicht weiter in die folgende Analyse ein. Auch Merkmale, die nur bei einem Taxon einen anderen Zustand haben enthalten für diese Untersuchung keine Informationen, es handelt sich hierbei um Autapomorphien des einzelnen Taxons. Bei den Merkmalen, die bei mindestens zwei Taxa eine andere Ausprägung haben als bei einer anderen Gruppe von Taxa, wird die Anzahl der bei der gegebenen Baumtopologie nötigen Merkmalsänderungen addiert. Diese Zahl, also die Anzahl der Merkmalsübergänge in einem Baum insgesamt, sollte möglichst klein sein. Zusätzlich können verschiedene Merkmalsübergänge unterschiedlich gewichtet werden, so dass schließlich nicht mehr die reine Summe der Merkmalsänderungen maßgebend für die Sparsamkeit der Gesamttopologie ist. Hierfür wird zu Beginn ein Zufallsbaum generiert, dessen Gesamtlänge durch die Zahl der Merkmalsübergänge berechnet und diese als vorläufiges Maß für den optimal kürzesten Baum festgelegt.

Für diese Arbeit wurde aufgrund der größeren Anzahl an Taxa eine heuristische Baumsuche vorgenommen. Hierbei wird an einen drei Taxa umfassenden Baum jeweils schrittweise ein neues Taxon an beliebiger Stelle angehängt und die Gesamtlänge mit der des Zufallsbaumes verglichen. Nur wenn der neu erzeugte Baum noch sparsamer ist als der vorherige wird dieser weiter verwendet, andernfalls wird eine neue Topologie ausprobiert (*random stepwise addition*). Diese Suche wird fortgesetzt bis eine annähernd optimale, also kurze, Baumtopologie erreicht worden ist. Da nie alle Bäume berechnet werden können, wird vorher die Anzahl der Rechenschritte angegeben. Um zu vermeiden, dass das absolute Optimum zu Gunsten eines lokalen nicht erreicht werden kann, wird im Programm ein TBR-*branch swapping*-Algorithmus ausgeführt. Hierbei wird ein errechneter Baum an einer Stelle zerschnitten und danach zufällig neu verbunden, alle Möglichkeiten der Restrukturierung werden daraufhin getestet (Weiß, 2010). Dieser Baum erzeugt unabhängig vom Optimalitätskriterium des kürzesten Baumes, aus den vorhandenen Bäumen durch Zerteilung und Neuzusammensetzung neue Topologien und berechnet deren Länge.

Eine weitere Frage stellt sich bei dem Umgang mit Indels, die aus der Alignierung resultieren. Die als Indel zusammengefassten einfachen Sequenzwiederholungen, kurzen *tandemrepeats*, *Homonucleotid-repeats*, Inversionen, *inverted repeats* und Deletionen (Borsch & Quandt, 2009) werden von vielen Baumsuchmethoden als nicht vorhandene Daten für diese Sequenz oder sogar die ganze Merkmalspalte behandelt und aus der Analyse ausgeschlossen (Knoop & Müller, 2009), auch Programme, die solche Bereiche von vornherein ausschneiden, werden verwendet. Abgesehen davon, dass es sich bei Indels sehr wohl um einen Merkmalszustand handelt, steckt hierin ein enormes Potential für phylogenetische Untersuchungen. Denn Indels sind als weitaus weniger homoplastisch als Substitutionen beschrieben und bergen zudem zusätzliche, gut verwertbare Informationen über die Geschichte eines Sequenzabschnittes, die bisher oft wenig beachtet wurden (Müller et al., 2006; Simmons & Ochoterena, 2000; Kelchner, 2008; Borsch & Quandt, 2009; Simmons et al., 2007; Erixon & Oxelman, 2008). Das Hauptargument für die Einbeziehung von Indels als Merkmale, denen auch nicht nur eine geringe Gewichtung zukommen soll, ist, dass die Möglichkeit weitaus kleiner ist, dass ein Indelereignis in zwei Linien unabhängig entstanden ist, als dass eine Substitution zwei mal stattgefunden hat. Dieser Umstand ergibt sich aus der Begrenztheit der Merkmalszustände bei Substitutionen im Vergleich zu denen bei Indels, die in 3'-Position, 5'-Position und der Länge voneinander verschieden sein können. Das durch das Indel im Alignment auftretende *gap* als fünften Merkmalszustand zu werten, steht nun der viel aufwendigeren Methode des *indel coding* gegenüber (Simmons & Ochoterena, 2000; Müller, 2005; Simmons et al., 2007), letztere wird in dieser Arbeit für Parsimonieanalysen verwendet.

Um die Ausbeute an Informationen die aus dem Alignment erhalten werden zu erhöhen, können mit dem Programm SeqState Indels codiert werden. Die entstandene Nexus-Datei kann in unveränderter Weise von PAUP* gelesen und in eine Parsimonieanalyse einbezogen werden. Für alle Datensätze, die in dieser Arbeit mit SeqState bearbeitet werden, wird die Option „IndelCoder - modified complex coding“ (MCIC; Simmons et al. 2007) ausgewählt. Auch eine Analyse der codierten Indels völlig ohne Berücksichtigung des Alignments kann durchgeführt werden.

Bei MP verwendeter Kommandoblock für PAUP*:

```
begin PAUP;
set maxtrees=10000;
log file=MP_4gene_b.log;
set criterion=parsimony;
pset gapmode=missing;
bootstrap          nreps=10          search=heuristic
treefile=MP_4gene_b.tre
/ addseq=random nreps=10 swap=TBR;
savetrees          from=1          to=1          file=4gene_con_b.tre
savebootp=nodelabels brlens=yes;
log stop;
end;
```

(nach Weiß, 2010)

Maximum-Likelihood-Verfahren (ML)

Die Maximum-Likelihood-Methode ist ein parametrisches Schätzverfahren, bei dem ein unbekannter Parameter so geschätzt wird, dass er, eingesetzt in eine Wahrscheinlichkeitsfunktion, möglichst genau die beobachteten Daten widerspiegelt. Die Methode arbeitet nach einem Prinzip, bei dem die Wahrscheinlichkeit berechnet wird, mit der ein generierter Baum zu den eingegebenen Daten, dem Alignment also, passt. Ist ein Baum gefunden, der mit der größten Wahrscheinlichkeit das Alignment wiedergibt, hat er die größt mögliche Likelihood.

Zu Beginn wird aus dem Alignment selbst eine a-priori-Annahme über die Wahrscheinlichkeit von bestimmten Basenaustauschen gemacht. Wie bei der Parsimonieanalyse findet im Folgenden eine heuristische, schrittweise Suche nach dem besten Baum statt, wobei für jeden errechneten Baum die Likelihood ermittelt wird.

Das Programm stellt eine schnelle Methode für heuristische ML-Analysen dar. Es erlaubt ebenfalls die Auswahl eines Evolutionsmodells und funktioniert mit einem *hill climbing*-Algorithmus der mit *SPR branch swapping* arbeitet. Bei der SPR-Methode werden einzelne Äste des Baumes abgetrennt und an anderer Stelle angefügt um eine neue Topologie zu erreichen (Weiß, 2010). Seine hohe Effizienz erhält das Programm durch die Insertion von abgeschnittenen Teilbäumen nur in der Nähe der Schnittstelle. Zudem werden

nach jeder *branch swapping*-Runde nur Likelihood-Werte für eine Liste vielversprechender Rearrangements berechnet, die vorher durch eine erste grobe Beurteilung festgelegt wurden. Bei ML verwendeter Kommandoblock für RAxML:

```
raxmlHPC -f a -x 12345 -# 1000 -s 23.08.10-4gene.phylip -  
n 4gene-raxml-23.08.10 -m GTRGAMMA
```

Bootstrapping

Um Werte für die statistische Unterstützung zu erhalten, die Wahrscheinlichkeit also, dass der errechnete Baum richtig und nicht zufällig ist, werden einzelne Spalten zufällig zu einem neuen Alignment mit gleicher Länge zusammengesetzt. Dabei können solche Spalten auch mehrfach eingesetzt werden, dieses Verfahren wird *bootstrapping* genannt. Das Verfahren wird standardmäßig für NJ-, MP- und ML-Verfahren angewandt.

Bayes'sche Statistik

Die Bayes'sche Statistik ist aus der Statistik schon lange bekannt und ist, angewandt auf die Phylogenie, ein sehr wirkungsvolles Werkzeug. Es werden für die Berechnung der Posteriorwahrscheinlichkeit eines phylogenetischen Baumes als messbarer Größe die gleichen Evolutionsmodelle benutzt, wie bei Maximum-Likelihood-Verfahren. Aufgrund der relativen Schnelligkeit im Vergleich zu Parsimonie-Analysen oder Likelihood-Analysen mit PAUP* eignet sich die Methode vor allem für große Datensätze.

Um die Posteriorwahrscheinlichkeit, die als die Wahrscheinlichkeit interpretiert wird, dass ein errechneter Baum richtig ist, zu erhalten, wird im Bayes-Theorem die A-priori-Wahrscheinlichkeit mit der Likelihood kombiniert (Huelsenbeck et al., 2001). Schlussfolgerungen über die phylogenetische Geschichte einer Gruppe basieren dann auf der Posteriorwahrscheinlichkeit der Bäume, der Baum mit der größten Posteriorwahrscheinlichkeit wird folglich als richtig angesehen. A-priori sind bei diesem Modell alle Bäume gleich wahrscheinlich, die Likelihood wird daraufhin mit Standard-Markov-Modellen der Merkmalsevolution berechnet. Theoretisch beinhaltet die Posteriorwahrscheinlichkeit die Aufsummierung über alle möglichen Kombinationen von Astlängen und Substitutionsmodellparametern. Da dies schon bei einer sehr geringen Datenmenge, der Anzahl an Taxa also, nicht mehr analytisch berechnet werden kann, wird die Posteriorwahrscheinlichkeit numerisch durch möglichst viele Rechengenerationen

angenähert. Die beste Methode hierfür ist der Markov Chain Monte Carlo-Algorithmus (MCMC), es wird dabei eine Markov-Kette konstruiert, die die Parameter des statistischen Modells als „*state space*“ und die Posteriorverteilung als „*stationary distribution*“ behandelt. Die Vorgehensweise des MCMC-Algorithmus ist wie folgt: (1) Vorschlagen eines neuen Baumes durch stochastische Restrukturierung des bestehenden Baumes. (2) Vergleich mit dem vorhergehenden Baum. Mit dem besser auf das Modell passenden Baum von beiden wird anschließend weitergerechnet. Wichtig ist hierbei eine ausreichend lange Kette, viele Generationen von Bäumen also, zu generieren, sonst besteht die Gefahr, dass lokale Maxima als absolut angesehen werden und der beste Baum nicht gefunden wird. Die Methode ist vergleichbar mit dem Maximum-Likelihood-Verfahren mit *bootstrap resampling*, aber bei der gleichen Anzahl an Rechenoperationen sehr viel schneller (siehe auch Huelsenbeck et al., 2001).

Bei Bayes'scher Analyse verwendeter Kommandoblock für MrBayes:

```
begin mrbayes;  
  set autoclose=yes;  
  log start filename=4gene-bayes.log;  
  lset nst=6 rates=invgamma;  
  mcmc nruns=2 nchains=4 ngen=2000000 samplefreq=100  
  printfreq=1000 burninfrac=0.25  
  savebrlens=yes filename=4gene-bayes;  
  showmodel;  
  mcmc;  
  sump burnin=5000;  
  sumt burnin=5000 contype=halfcompat;  
  log stop;  
end;
```

(nach Weiß, 2010)

3. Ergebnisse

3.1 Amplifikation und Aussagekraft der Genregionen

3.1.1 Die ITS-Region

Die etwa 670bp lange Region konnte mit den angegebenen Primern zum großen Teil gut amplifiziert werden. Das mit MAFFT errechnete Alignment ist 699bp lang und enthält 242 PICs, was einen Informationsgehalt von 34,6% ausmacht.

Die ITS gibt eine sehr gute Auflösung zwischen den Arten wieder. Die berechneten Substitutionsraten zwischen den Arten und Gruppen, dargestellt durch die Astlängen, sind im Vergleich vor allem zu trnK / matK eher groß und auch die Unterstützungswerte für viele Gruppen besitzen mit einem *bootstrap* von 80 bis 100 eine hohe Aussagekraft. Es ergeben sich einige Unterschiede im Vergleich zu den plastidären Genregionen. So gruppiert *S. x wiemanni* (RPS 53; *S. caespitosa* x *S. lutea*) in eine Gruppe mit *S. ocymoides* (Abb. 3) und wird nicht wie in den anderen drei Bäumen (Abb. 4, 5, 6) zusammen mit *S. caespitosa* und *S. x wiemanni* (RPS 22) gruppiert. Auch bilden die vier untersuchten Isolationen von *S. x lempergii* (*S. cypria* x *S. haussknechti*) sonst eine relativ gut abgesicherte Gruppe, während in der ITS-Topologie die Isolation RPS 62 zusammen mit *S. sicula*, *S. pamphylica*, *S. haussknechti* und *S. cypria* gruppiert. *S. bellidifolia* bildet die Schwestergruppe zu *S. caespitosa* und *S. calabrica* (Abb. 3), wohingegen die Art bei allen cpDNA-Bäumen mit *S. officinalis* gruppiert (Abb. 4-6). Der Hybrid *S. x olivana* (*S. pumila* x *S. caespitosa*) gruppiert einzig bei der ITS-Topologie in eine Gruppe mit *S. ocymoides*, sonst ist er zwischen den Isolationen von *S. pumila* gruppiert.

3.1.2 Die matK / trnK^{UUU}-Region

Es war in keinem Fall möglich, die gesamte DNA-Region von 2600bp in einer PCR-Reaktion zu amplifizieren und es war nötig, mehrere dazwischen liegende Primer zu verwenden, um damit hauptsächlich Stücke von etwa 1000 oder 1500bp zu amplifizieren. Besonders gute Eigenschaften zeigten sich bei den Primer-Kombinationen RP 969F / RP 1936R und RP 1460F / trnK2R, wobei für eine erfolgreiche Sequenzierung des RP 1460F / trnK2R -Amplifikates regelmäßig der interne Primer RP 1810F eingesetzt werden musste. Eine Sequenzierung mit dem Primer trnK2R war nur in seltenen Fällen möglich. Mit den Primern trnK 3914F und RP 608F war es teilweise schwierig ein Amplifikat zu erhalten, so wie auch für eine ausreichende Qualität der Sequenz oft mehrere Sequenzierungsreaktionen

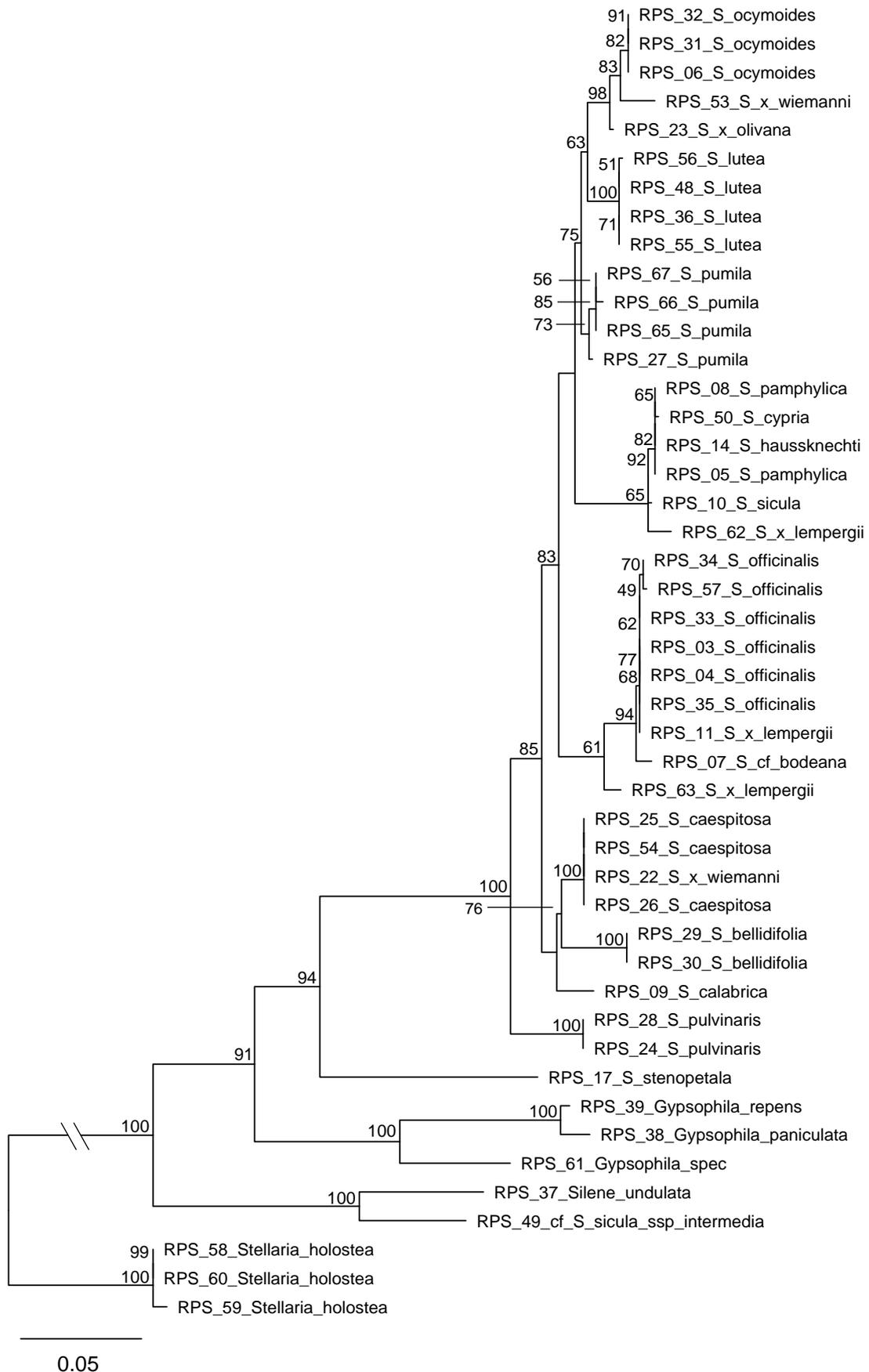


Abbildung 3: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von ITS-Sequenzen nach Maximum Likelihood (RAxML). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

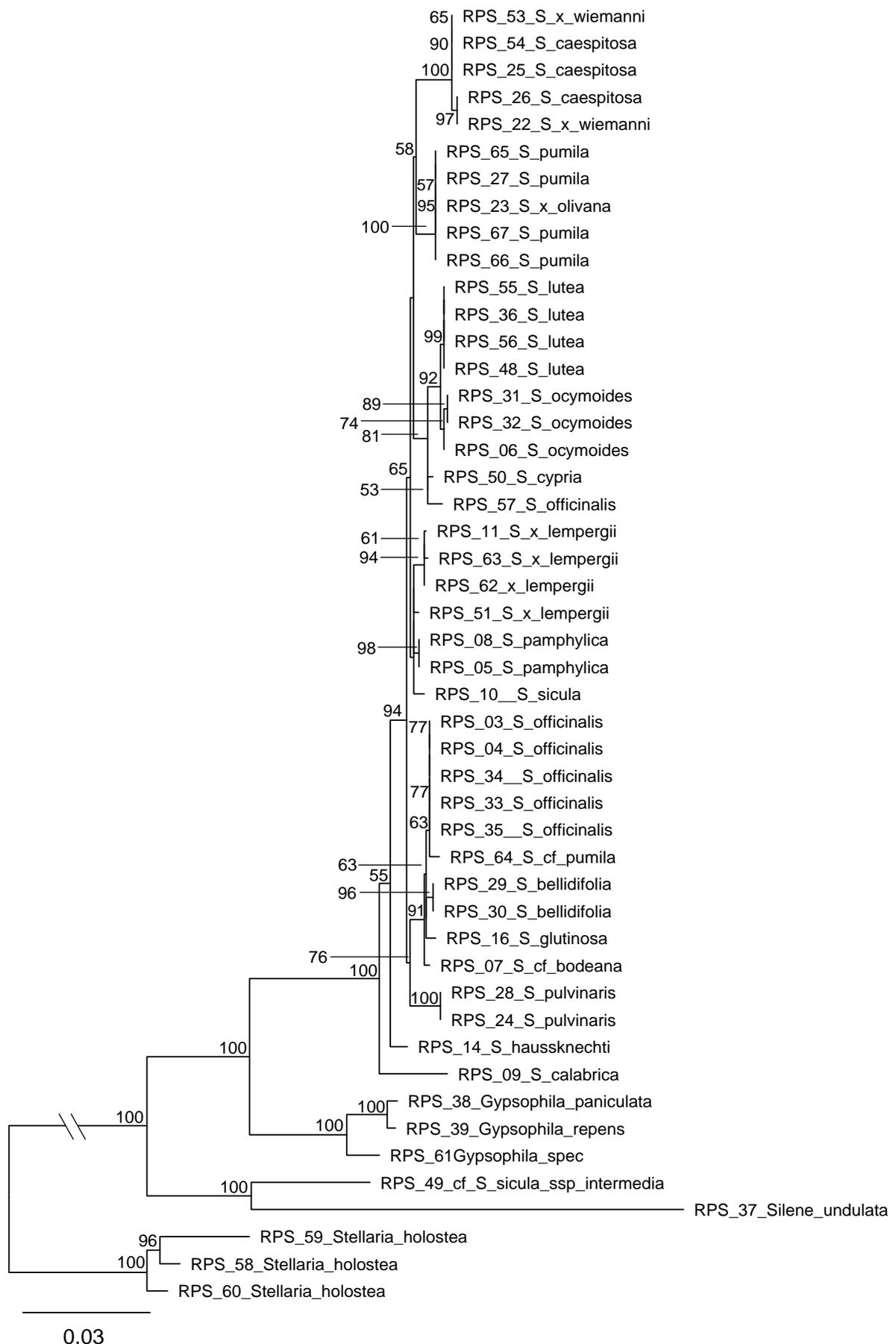


Abbildung 4: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von matK-Sequenzen nach Maximum Likelihood (RAxML). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

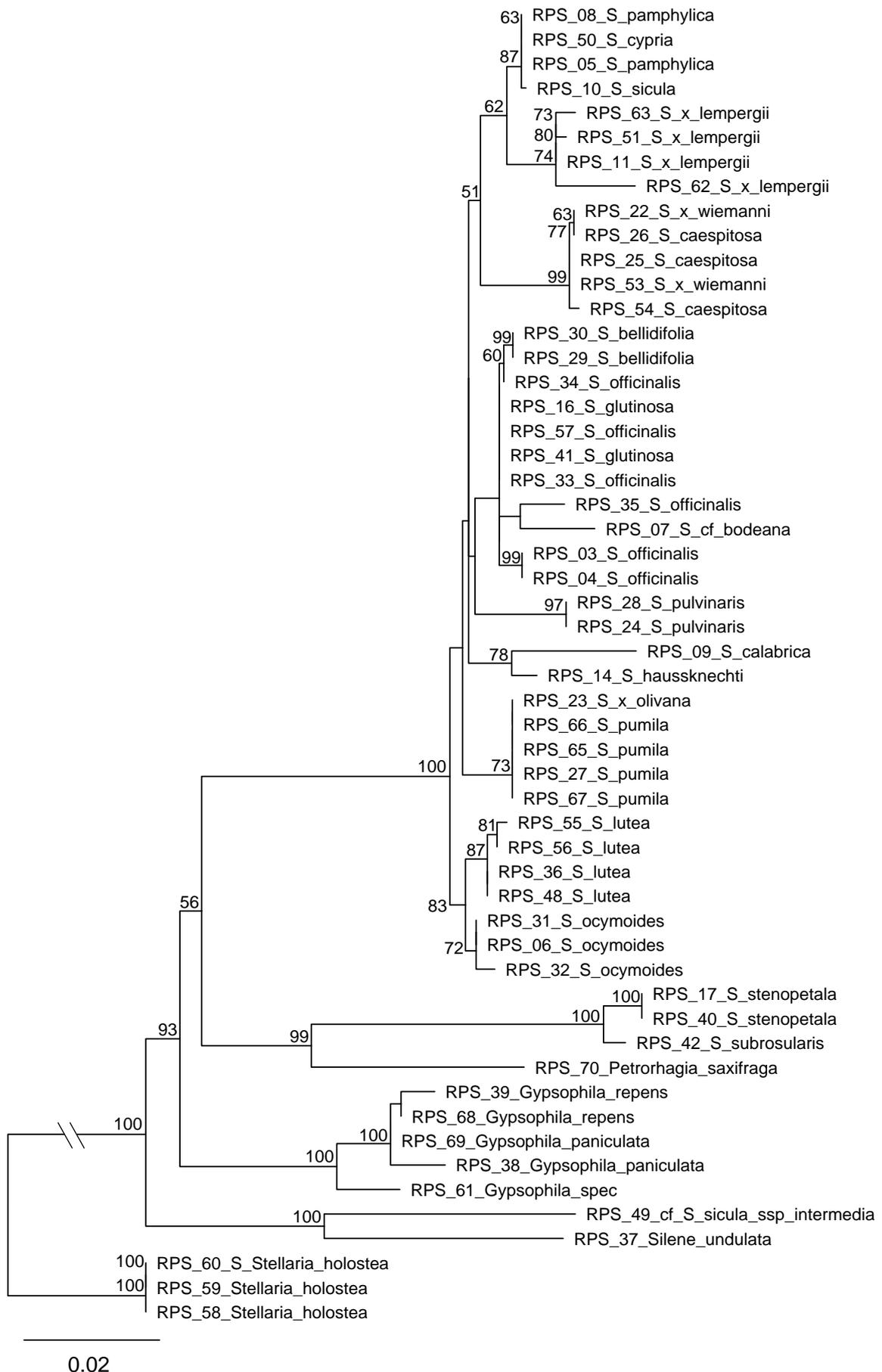


Abbildung 5: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von trnS-G-G-Sequenzen nach Maximum Likelihood (RAxML). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.



Abbildung 6: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von trnL-F Sequenzen nach Maximum Likelihood (RAxML). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

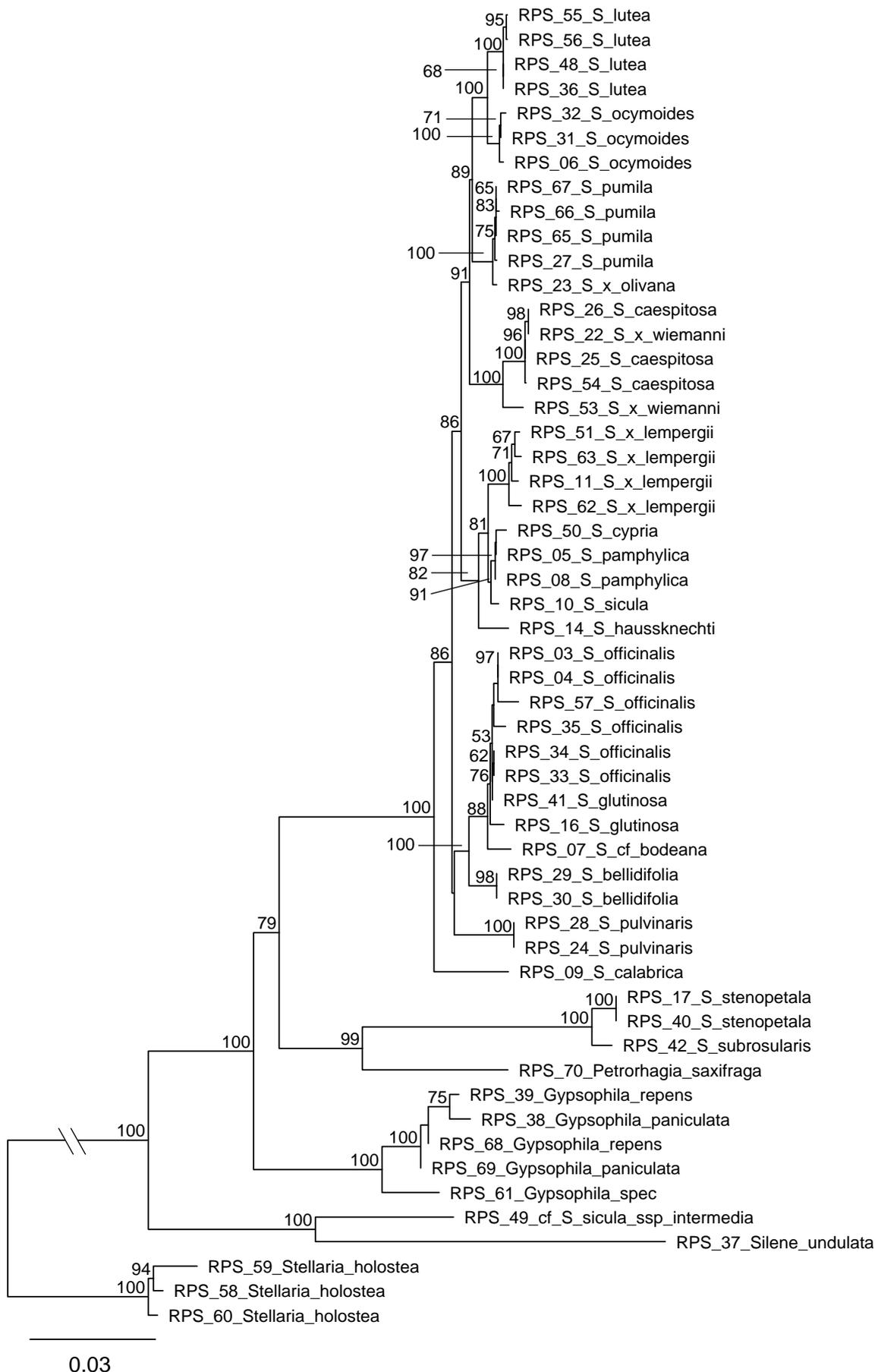


Abbildung 7: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von Sequenzen aller vier Marker nach Maximum Likelihood (RAxML). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

nötig waren. Aus manchen Isolationen und besonders aus älterem Material konnte nicht immer die vollständige Sequenz erhalten werden. Der Tabelle A3 (Anhang) ist zu entnehmen, inwieweit aus den einzelnen Isolationen Sequenzen erhalten werden konnten. Nachdem sich gezeigt hat, dass es sich bei RPS 64 (*S. cf. pumila*) offensichtlich um einen falsch bestimmten Beleg handelt, wurde die Sequenz aus den folgenden Untersuchungen ausgeschlossen. Das mit MAFFT errechnete Alignment ist 2546bp lang und enthält 442 PICs, was einen Informationsgehalt von 17,4% ausmacht.

Das Stück gibt unter den drei untersuchten cpDNA-Regionen für viele Gruppen die höchsten Unterstützungswerte und außerdem eine ausreichend gute Auflösung der Arten wieder (Abb. 3). Im Vergleich zu den anderen drei untersuchten Regionen (Abb. 3, 5, 6) sind die Substitutionsraten und damit die Astlängen zwischen den Sequenzen sehr gering. Zudem finden sich nur wenige strukturelle Mutationen im codierenden Bereich, was ein sehr homogenes Alignment bewirkt. Mit RPS 57 gruppiert eine *S. officinalis*-Aufsammlung hier allerdings nicht zu den übrigen Isolationen der Art, sondern zu *S. cypria*, *S. ocymoides* und *S. lutea*.

3.1.3 Die trnS^{GCU}-trnG^{UUC}-trnG^{UUC}-Region

Die Primer für den trnS-trnG-spacer zeigten unter allen untersuchten Regionen die beste Ausbeute an Amplifikaten. Aus den Isolationen, die aus den Herbarbelegen von *S. stenopetala* und *S. subrosularis* angefertigt wurden, konnte nur durch das Primerpaar trnS / 5'trnG2S ein sequenzierfähiges Amplifikat erhalten werden, bei keiner anderen der untersuchten Regionen zeigte sich eine DNA-Bande auf dem Gel. Die Amplifikation des ganzen Stückes mit trnS und trnG gelang nur in wenigen Fällen, dort wo auf diese Weise kein Amplifikat erhalten werden konnte, zeigten sich auch bei Versuchen das trnG-Intron allein zu amplifizieren keine Ergebnisse. Das Funktionieren der Primer 5'trnG2G und trnG war nicht von der *Saponaria*-Art oder dem Alter des verwendeten Ausgangsmaterials abhängig. Der Tabelle A3 (Anhang) ist zu entnehmen, inwieweit aus den einzelnen Isolationen Sequenzen erhalten werden konnten. Im Gegensatz zu den anderen Isolationen zeigten sich bei solchen von *Gypsophila* größere Probleme bei der Spezifität der Amplifikation, wenn das Primerpaar trnS / trnG eingesetzt wurde. Hier wurden Sequenzen erhalten, die nicht mit dem erwarteten Genabschnitt homolog sind, mit trnS / 5'trnG2S konnte das homologe Gen jedoch ohne Probleme amplifiziert werden. Das mit MAFFT errechnete Alignment ist 1674bp lang und enthält 208 PICs, was einen Informationsgehalt von 12,4% ausmacht.

Der errechnete Baum (Abb. 5) zeigt im Wesentlichen die gleiche Topologie wie der matK-Baum (Abb. 4), gibt allerdings viel größere Distanzen zwischen den einzelnen Isolationen, dafür niedrigere *bootstrap*-Werte zwischen einigen Gruppen an. *Petrorhagia saxifraga* bildet mit *S. subrosularis* und *S. stenopetala* ein Monophylum. Von *Petrorhagia saxifraga* und *S. subrosularis* konnte nur diese Region amplifiziert werden.

3.1.4 Die trnT^{UGU}-trnL^{UAA}-trnL^{UAA}-trnF^{GAA}-Region

Von der ungefähr 1200bp langen Gesamtsequenz für die etablierte Primer angewandt wurden, konnte in dieser Arbeit für *Saponaria*-Arten nur der etwa 430bp lange trnL-trnF-spacer amplifiziert und sequenziert werden. Obwohl die PCR mit zwei verschiedenen Primern, die in der trnT-Sequenz binden, getestet worden ist, konnte nur bei *Silene* und *Gypsophila* ein Amplifikat erhalten werden. Bei dem Versuch die drei Sequenzen einzeln zu amplifizieren, traten bei allen *Saponaria*-Isolationen für die Primer trnLcF / trnLdR Doppelbanden von etwa 600 beziehungsweise etwa 500bp auf dem Agarosegel auf, was bei den ebenfalls untersuchten *Silene*- und *Gypsophila*-Arten nie der Fall war. Von den durch Gelelution getrennten Produkten konnte für keine der untersuchten *Saponaria*-Arten eine Sequenz erhalten werden, obwohl das Amplifikat in ausreichender Menge vorhanden war. Die mengenmäßig größte Ausbeute und auch die am wenigsten problematische Amplifizierung insgesamt wurde bei der trnL-trnF-Sequenz erreicht. Hier zeigten sich für alle untersuchten Arten bis auf *S. stenopetala* und *S. subrosularis* sehr starke Banden auf dem Gel. Der Tabelle A3 (Anhang) ist zu entnehmen, inwieweit aus den einzelnen Isolationen Sequenzen erhalten werden konnten. Das mit MAFFT errechnete Alignment ist 508bp lang und enthält 97 PICs, was einen Informationsgehalt von 19,1% ausmacht.

Obwohl in dem aus diesem Genabschnitt errechneten Baum (Abb. 6) nur wenige Verzweigungen gut unterstützt sind, widerspricht er der Topologie von matK (Abb. 4) und trnS-trnG (Abb. 5) nicht. Auch hier bilden *S. pamphylica*, *S. sicula* und *S. cypria* eine Gruppe, die aber nur wenig Unterstützung erhält.

3.1.5 Topologie und unterstützte Gruppen

Die individuelle Analyse aller vier untersuchten Sequenzabschnitte ergab ähnliche Topologien und Unterstützungswerte. Aufgrund dieser Tatsache wurde ein ML-Baum aus einem kombinierten Datensatz (5427bp) errechnet und dient als Grundlage für die phylogenetische Aussagen dieser Arbeit (Abb. 7). Einige grundsätzliche Unterschiede sind

jedoch in den ITS-Bäumen zu erkennen (Abb. 3), diese betreffen meist bekannte Hybride der Gattung. Der Vier-Gene-Baum bringt eine außerordentlich feine Aufschlüsselung der Isolationen hervor und zudem oft sehr hohe Unterstützungswerte. Alle Isolationen von *S. lutea*, *S. ocymoides*, *S. pumila*, *S. caespitosa*, *S. x lempergii*, und *S. pulvinaris* bilden jeweils gut abgesicherte Monophyla, nur die Hybride werden hier zusammen mit ihren bekannten Elternarten gruppiert (Abb. 7). Außerdem bildet *S. bellidifolia* eine abgesicherte Gruppe, wobei beide Isolationen aus der selben Aufsammlung stammen. Eine sehr nahe Verwandtschaft zeigt sich bei *S. pamphylica*, *S. sicula* und *S. cypria*, die geringere Distanzen zueinander aufweisen als sie beispielsweise bei *S. officinalis* schon innerhalb der Art vorkommen. *S. cypria* wird einzig in den matK-Analysen zusammen mit *S. officinalis* (RPS 57) zu der Gruppe mit *S. lutea* und *S. ocymoides* gruppiert. Während *S. lutea* und *S. ocymoides* immer zusammen gruppiert werden, ist die Stellung von *S. cf. bodeana* und *S. bellidifolia*, die in die unmittelbare Nähe von *S. officinalis* gruppiert nicht klar zu erkennen. *S. glutinosa* gruppiert regelmäßig sogar mitten in *S. officinalis* hinein, wobei es sich bei beiden Isolationen der Art (RPS 16, RPS 41) ursprünglich um den gleichen Beleg handelt, von dem bei RPS 16 und RPS 41 aber unterschiedliche Bereiche amplifiziert werden konnten. *S. haussknechti* und *S. calabrica* können kaum einer Gruppe zugeordnet werden, da sie bei jedem der vier Genabschnitte zu anderen Gruppen gruppieren. RPS 17 und RPS 40 sind identisch, da es sich auch hier um Isolationen aus dem selben Beleg von *S. stenopetala* handelt. Die Art gruppiert zusammen mit *S. subrosularis* in einiger genetischer Distanz zum Rest der Gattung mit *Petrorhagia saxifraga* in eine Gruppe. Als abgesicherte Außengruppe können nach *Gypsophila Silene* und *Stellaria* ausgemacht werden, die Identifikation von *cf. S. sicula ssp. intermedia*, die mit *Silene undulata* AITON / MOENCH zusammen gruppiert, erweist sich als falsch, kann aufgrund am Beleg fehlender morphologischer Merkmale aber nicht berichtigt werden. Bei ML-Analysen der ITS- und matK- Sequenzen mit einer erweiterten Außengruppe (Abb. 11, 12), allerdings ohne *S. subrosularis* und *S. stenopetala*, da hiervon die entsprechenden Sequenzen fehlen, wird *Gypsophila* als direktes Schwestertaxon zu *Saponaria* unterstützt. *Petrorhagia* gruppiert in beiden Analysen zusammen mit *Dianthus*, *Allochrusa* BUNGE und *Velezia* L. in eine weiter entfernte Gruppe.

Zur besseren Übersichtlichkeit und Unterscheidbarkeit abgegrenzter Gruppen wurde ein weiterer phylogenetischer Baum mit nur je einer Sequenz pro Art oder Hybrid berechnet (Abb. 13).

3.2 Qualität verschiedener Rechenmethoden

Die verschiedenen Rechenmethoden ergeben zum Teil unterschiedliche Topologien für die verschiedenen DNA-Regionen, jedoch wurde dies nie statistisch unterstützt. In der Multigen-Analyse kam es jedoch zu leichten Unterschieden zwischen NJ (Abb. A18, Anhang), MP (Abb. 8) und ML (Abb. 7) beziehungsweise Bayes'scher Analyse (Abb. A13, Anhang). Hauptsächlich bei sehr geringen Sequenzunterschieden wurden einzelne Äste anders zueinander gruppiert, außerdem sind die Unterstützungswerte bei NJ (Abb. A18-A22, Anhang) meist niedriger als bei ML (Abb. 3-7) und Bayes'scher Analyse (Abb. A13-A17, Anhang). NJ stellt bei 10.000 *bootstrap*-Wiederholungen die schnellste Methode zur phylogenetischen Baumsuche dar.

Die Likelihood-Methode ist die, unter den verwendeten Parametern (1.000 *bootstrap*-Wiederholungen), zweitschnellste hier verwendete Baumsuchmethode. Es wird eine sehr detaillierte Aufschlüsselung der Arten erreicht (Abb. 3-7), wobei auch die *bootstrap*-Werte durchschnittlich höher sind, als bei NJ und MP.

Da bei Parsimonieanalysen als vierter Analyse-Methode in der Regel ein Konsensusbaum aus den *most parsimonious trees* erstellt wird, können hier im Unterschied zu den drei anderen Methoden keine Astlängen errechnet werden. Für diesen Parameter ist also keine Vergleichsmöglichkeit vorhanden. Die einfache MP-Analyse ergibt bei der Untersuchung des kombinierten Alignments aus allen vier Genen eine Topologie, die in den meisten Verzweigungen mit der ML-Analyse übereinstimmen (Abb. 7, 8). Gruppen, die bei ML-Analysen mit sehr geringen Astlängen oder *bootstrap*-Werten unterstützt werden, können im MP-Verfahren oft nicht aufgelöst werden und führen zu einer Polytomie. Bei den MP-Bäumen die mit *indel coding* gerechnet wurden ergeben sich für die sparsamsten Bäume (Abb. 9) völlig andere Topologien als bei allen anderen Verfahren.

Da die auf Alignments mit *indel coding* basierenden *bootstrap*-Bäume (Abb. 10) hauptsächlich die gleiche Topologie zeigen, wie die Ergebnisse der Analysen ohne diese Codierung (Abb. 8), lassen sich die Unterstützungswerte hier nicht auf die *most parsimonious trees* (Abb. 9) übertragen. Das *indel coding* ist daher unter den gewählten Parametern für die Suche nach dem sparsamsten Baum nicht zielführend, während bei *bootstrap*-Analysen meist die gleiche Topologie unterstützt wird, wie bei anderen Baumsuchmethoden. Die Rechenmethode zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass sie außerordentlich viel Zeit in Anspruch nimmt, so dauert die Analyse der Kombination aus allen vier Regionen bei unter den verwendeten Parametern und 1.000 *bootstrap*-Wiederholungen etwa zwei Wochen.

Eine ebenfalls relativ langwierige Methode stellt die Bayes'sche Statistik dar, bei der jeweils mit 2.000.000 Generationen gerechnet wurde. Während die Unterstützungswerte bei diesem Verfahren regelmäßig nur wenig höher waren als bei ML-Analysen, wurden vor allem bei den kürzeren Alignments wesentlich häufiger Polytomien abgebildet als bei ML-Analysen (Abb. A13-A17, Anhang).

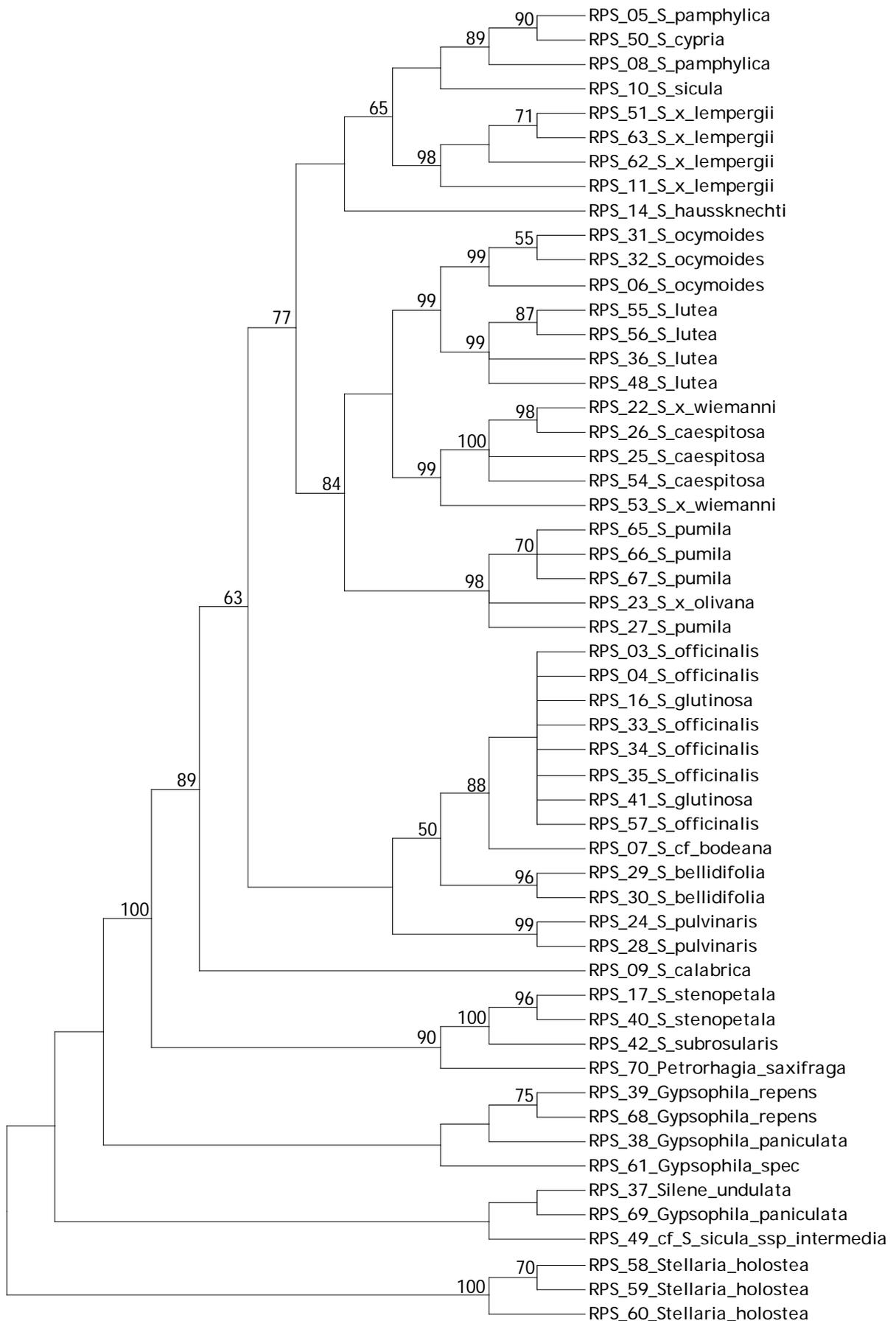


Abbildung 8: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von Sequenzen aller vier Marker nach Maximum Parsimony (PAUP*). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben.

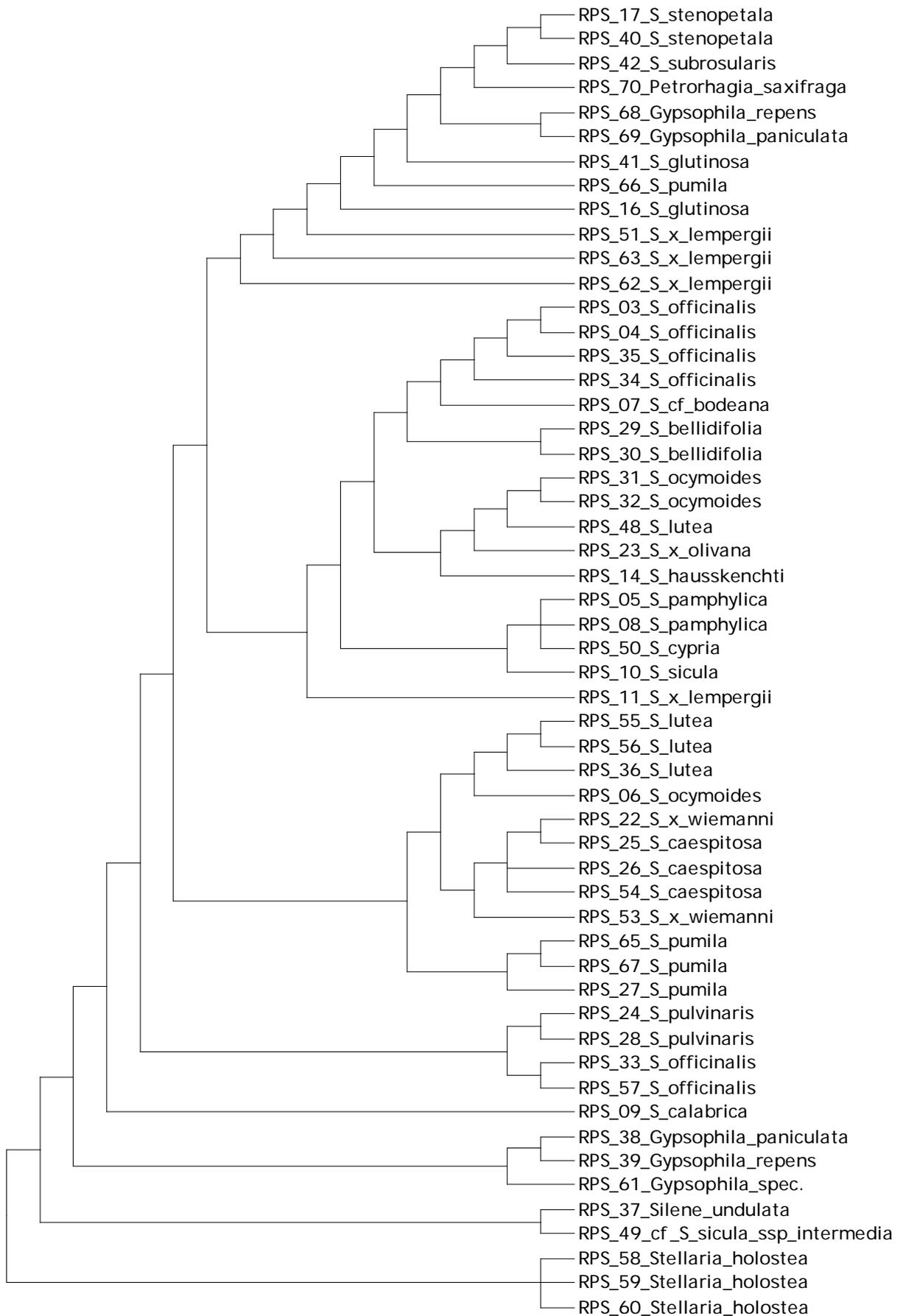


Abbildung 9: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von Sequenzen aller vier Marker. Konsensus aus den *most parsimonious trees* mit *indel coding*.

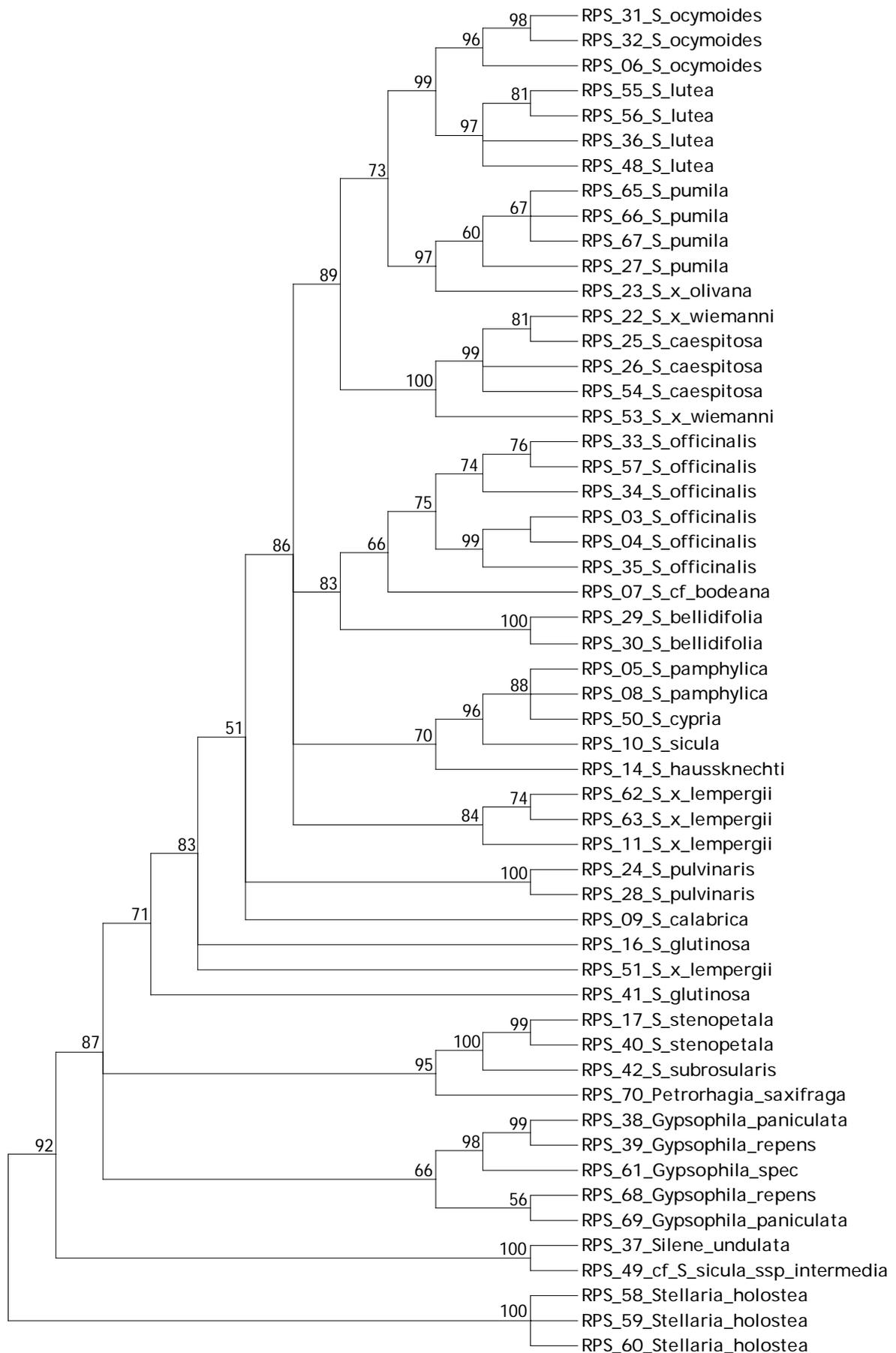


Abbildung 10: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von Sequenzen aller vier Marker. Konsensus aus den *bootstrap*-Bäumen mit Maximum Parsimonie und *indel coding*. Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben.

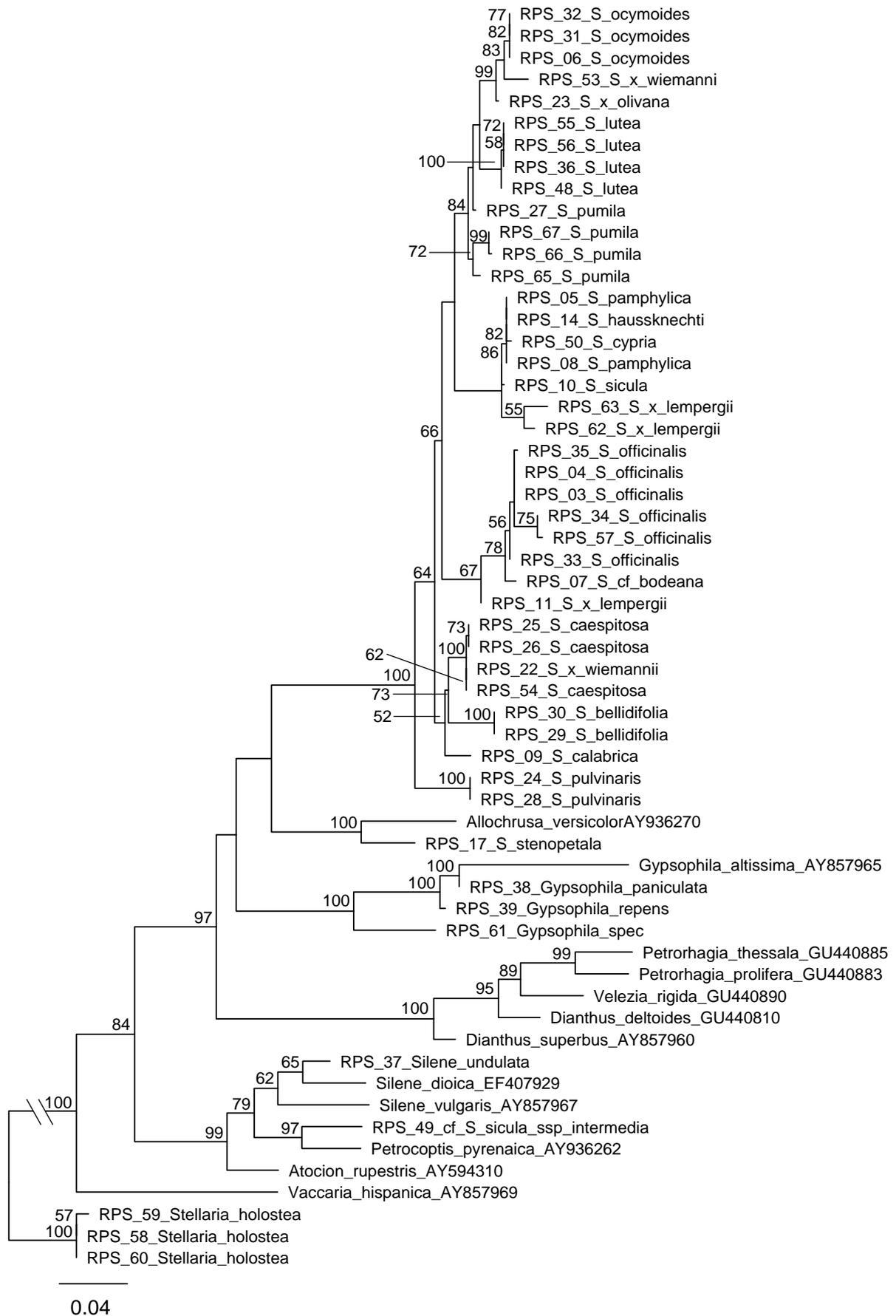


Abbildung 11: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von ITS-Sequenzen mit erweiterter Außengruppe nach Maximum Likelihood (RAxML). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

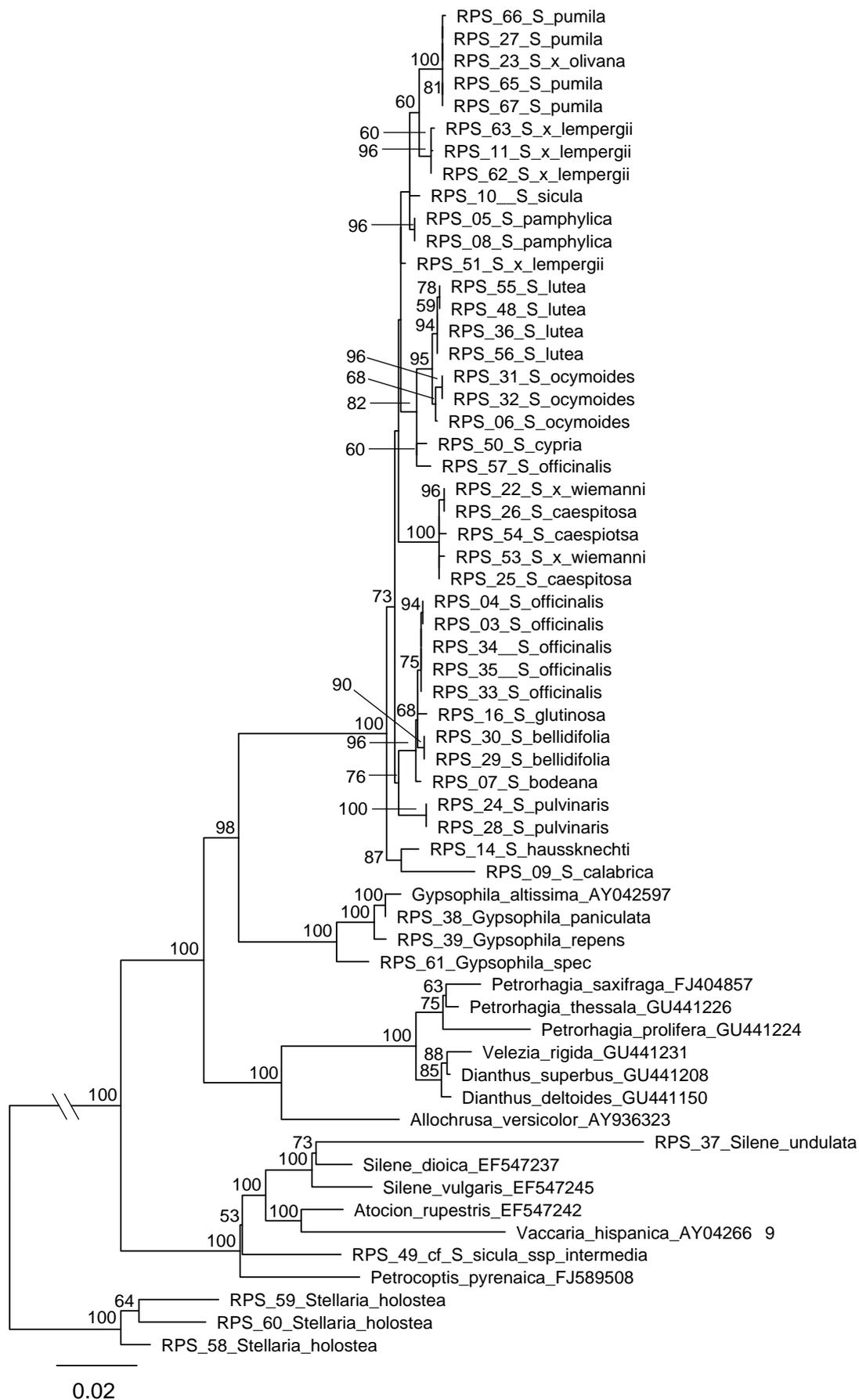


Abbildung 12: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von matK-Sequenzen mit erweiterter Außengruppe nach Maximum Likelihood (RAxML). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

4. Diskussion

4.1 Vergleich mit morphologischen Studien

Zum Vergleich mit den morphologischen Studien, hauptsächlich der von Simmler (1910), wird der guten Auflösung und der höheren Unterstützungswerte wegen in erster Linie der Maximum-Likelihood-Baum aus dem kombinierten Alignment herangezogen (Abb. 7). Die auf der Grundlage der molekularen Marker erstellte Phylogenie deckt sich bis auf einige Übereinstimmungen, die als eher zufällig angesehen werden müssen, nicht mit der von Simmler favorisierten Systematik. Simmler nimmt eine Unterteilung von *Saponaria* in zwei Untergattungen vor, leider konnten keine Sequenzen aus der zweiten Untergattung Saporhizaea erhalten werden, da die Belege der hierher gestellten Arten keine Amplifikate ergaben, beziehungsweise sich aus den ungekeimten Samen von *S. chlorifolia* keine DNA in ausreichender Qualität isolieren ließ. Aber auch innerhalb der Untergattung Saponariella konnte die dort gegebene Aufteilung nach Sectionen und den nachfolgenden Gruppierungen nicht unterstützt werden.

Werden in der Section Smegmathamnium unter Luteiflorae *S. bellidifolia* und *S. lutea* aufgrund der gelben Blütenfarbe zusammengefasst, geben die molekularen Daten eine Gruppierung von *S. bellidifolia* mit *S. officinalis*, *S. glutinosa* und *S. bodeana* wieder (Abb. 7). *S. lutea* als zweite gelbblütige Art ist in der Verwandtschaft von *S. ocymoides*, *S. pumila* und *S. caespitosa* zu finden. Auffallend ist, dass *S. bellidifolia* bei der Topologie des ITS-Baumes (Abb. 2) zusammen mit *S. caespitosa* gruppiert wird und diese beiden Arten außerdem außerhalb der näheren Verwandtschaft zu *S. lutea*, *S. ocymoides* und *S. pumila* gruppiert werden. Eine Erklärung könnte hier die fehlende Unterstützung für beide Gruppen sein. Abgesehen davon, dass zumindest die selbst kultivierten Exemplare von *S. bellidifolia* eine reinweiße Blütenkrone aufweisen (Abb. A5, A6) und auch *S. lutea* in der Färbung ihrer Petalen eher zwischen weiß und leicht beige changiert (Abb. A11, A12), erscheint die taxonomische Gruppierung nach Blütenfarben nicht als gerechtfertigt. Auch wenn, bis auf die zwei bei Simmler als weißblütig angegebenen und die beiden oben genannten gelben Arten, alle Vertreter der Gattung mehr oder weniger rötlich gefärbt sind (Abb. A1-A4, A7-A10), bezeichnet gerade die weiße Blütenfarbe eher den einfachen Verlust eines farbgebenden Pigmentes, als einen näheren verwandtschaftlichen Bezug der Arten. Beobachtungen unter Freiland- oder Gewächshausbedingungen zeigen zudem bei vielen Vertretern der Caryophyllaceae einen bestimmten Prozentsatz weißblühender Individuen, so auch die Sorte *S. ocymoides* ‚Snow Tip‘.

Abgesehen von der Einteilung nach Blütenfarben muss grundsätzlich die Morphologie als phylogenetisch relevante Analysemethode in Frage gestellt werden, vor allem bei den Caryophyllaceae. Hierzu bemerken Fior et al. (2006), dass die morphologischen Merkmale aufgrund häufig konvergenter Entwicklung und Rückentwicklung von Schlüsselmerkmalen in vielen Arten und Gruppen äußerst ungeeignet sind, daraus auf phylogenetische Gruppen zu schließen. Die Untersuchungen von Frajman et al. (2009) und Harbaugh et al. (2010) weisen in die gleiche Richtung. Vor allem die drei beschriebenen Unterfamilien der Paronychioideae, Alsinoideae und Silenoideae, die nach Art und Form von Stipeln, Petalen, Sepalen und Früchten eingeteilt werden, geben die natürlichen Verhältnisse nicht wieder, auch viele große Gattungen sind nicht als monophyletisch anzusehen (Harbaugh et al., 2010).

Die gut unterstützte Gruppe aus *S. officinalis*, *S. bodeana*, *S. bellidifolia* und *S. glutinosa* (Abb. 7) stellt eine Zusammenstellung je einer Art aus den Sectionen Smegmathamnium, Kabylia und zwei Arten aus der Section Bootia dar, was den auffälligsten Unterschied zu Simmlers Systematik ausmacht. Wird *S. bodeana* schon bei Simmler als unsichere Art betrachtet, kann auch die molekulare Analyse der Daten keine eindeutige Antwort auf die Frage geben. Vorausgesetzt, dass es sich bei dem untersuchten Beleg um die von Boissier aus dem Iran beschriebene Art handelt, zeigt sich, dass *S. bodeana* immer direkt zu der Gruppe von *S. officinalis* gruppiert, welche heute annähernd in der ganzen nördlichen Hemisphäre verbreitet ist, von der also kein geographisches Signal zu erwarten ist. Zwischen den verschiedenen Aufsammlungen von *S. officinalis* zeigen sich teilweise größere Distanzen, als zu *S. bodeana* und *S. glutinosa*, was vermuten lässt, dass es sich bei beiden einfach um regional leicht verschieden gestaltete Unterarten oder Varietäten von *S. officinalis* handelt (siehe auch Simmler, 1910).

Die unter Multiflorae in der Section Bootia zusammengefassten Arten *S. ocymoides* und *S. calabrica* zeigen ebenfalls keinen näheren Verwandtschaftsgrad, kann *S. ocymoides* zu der oben genannten Gruppe mit *S. lutea*, *S. pumila* und *S. caespitosa* gezählt werden, ist die Stellung von *S. calabrica* unklar, da sie als Schwestertaxon fast zur gesamten Gattung *Saponaria* gruppiert, nur *S. stenopetala* und *S. subrosularis* liegen noch weiter entfernt (Abb. 6). Ein Bezug zu *S. ocymoides* kann daher nicht festgestellt werden. In der Section Smegmathamnium gibt Simmler unter Pulvinares nur die Art *S. pulvinaris* an, die in molekularen Analysen zwar als gut abgesicherte Art angesehen werden kann, aber keinen Bezug zu den anderen in der Section und Smegmathamnium genannten Arten hat, sondern zu *S. officinalis*, *S. glutinosa* und *S. bellidifolia* gruppiert wird. Die einzige Gruppe, bei der sich die morphologische Systematik einigermaßen in der molekularen widerspiegelt, ist die

aus *S. sicula*, *S. cypria*, *S. pamphylica* und *S. haussknechti* (Abb. 7), die Simmler zusammen mit der hier nicht untersuchten *S. intermedia* als Grandiflorae in der Section Kabylia zusammenschließt. Als gut unterstützt kann hierbei allerdings nur die Gruppe *S. pamphylica* mit *S. sicula* gesehen werden. *S. cypria* gruppiert bei der Analyse von matK zusammen mit *S. officinalis* (RPS 57) zu der Gruppe mit *S. lutea*, *S. ocymoides*, *S. pumila* und *S. caespitosa*, was Hinweise auf einen horizontalen Gentransfer geben könnte. Ein typisches Hybridisierungsereignis sollte dagegen ähnliche Muster wie die drei bekannten Hybriden *S. x olivana* (*S. pumila* x *S. caespitosa*), *S. x wiemanni* (*S. caespitosa* x *S. lutea*) und *S. x lempergii* (*S. cypria* x *S. haussknechti*) liefern und Unterschiede zwischen der nucleären ITS einerseits und den drei plastidären Genregionen andererseits ergeben, denn Rekombinationen unter den Chloroplasten selbst sind äußerst selten (Erixon & Oxelman, 2008). Zudem zeigen vor allem der trnS-trnG- und der ITS-Baum (Abb. 4, 2) eine solch starke Übereinstimmung der Signale aus *S. cypria* und *S. pamphylica*, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich dabei lediglich um Unterarten derselben Art handelt. Auch Simmler (1910) stellt eine sehr nahe Verwandtschaft zwischen *S. cypria*, *S. pamphylica*, *S. sicula* und *S. haussknechti* fest und postuliert einen gemeinsamen Ursprung von *S. cypria* und *S. pamphylica*. Die Tatsache, dass *S. haussknechti* mal näher zu *S. calabrica* (trnS-trnG, Abb. 4; matK, Abb. 3) und mal näher zu *S. pamphylica* und *S. sicula* (ITS, Abb. 2; Hegi, 1959-1979) gruppiert wird, lässt auch hier eine Hybridisierung erahnen. Generell bleibt zu vermuten, dass es sich bei *S. cypria*, *S. pamphylica*, *S. calabrica*, *S. sicula* und *S. x lempergii*, dem aus *S. cypria* und *S. haussknechti* gezüchteten Hybriden um in ihrem Ursprung mehrfach miteinander gekreuzte Taxa handelt, was Rautenberg et al. (2008) ebenso für verschiedene Arten der Section Elisyanthe aus der nahe verwandten Gattung *Silene* vermuten.

Erixon und Oxelman (2008) geben für die Sileneen überhaupt eine komplexe Geschichte mit Allopolyploidisierungen und Hybridisierungen an. In diesem Zusammenhang ist vor allem die Aufspaltung der verschiedenen Isolationen von *S. x lempergii* zu beachten (Abb. 2). Zeigen sonst alle Isolationen des Hybrids eine eigene, abgesicherte Gruppe, die als Schwestertaxon zu *S. pamphylica*, *S. sicula* und *S. cypria* gruppiert wird, befindet sich in der ITS-Topologie nur noch RPS 62 in diese Gruppe, während die zwei anderen Aufsammlungen in einer Gruppe mit *S. officinalis* und *S. bodeana* zu finden sind. Dies impliziert zumindest für diese Aufsammlungen unabhängige Hybridisierungsereignisse unter einer Beteiligung von *S. officinalis*. Für fünf Arten von *Silene* aus der Section Elisyanthe haben Muir und Filatov (2007) eine ähnliche Situation beschrieben und postulieren hierfür ein Verhalten als große Metapopulation. Auch

natürliche Hybridisierungsereignisse sind aus der Gattung *Silene* bekannt (Popp et al., 2005).

Eine Bestätigung der von Simmler postulierten Systematik kann aus den Ergebnissen nicht geschlossen werden, wohl aber ein geographisches Signal, welches von den Habitaten und Verbreitungsgebieten der einzelnen Arten ausgeht (Abb. 13) und auch von Simmler selbst schon als wichtiges phylogenetisches Merkmal gesehen wird. So bilden die hauptsächlich in den Alpen angesiedelten Arten *S. lutea*, *S. ocymoides* und *S. pumila* eine gut abgesicherte Gruppe (Abb. 7). Die von Tribsch et al. (2002) postulierte taxonomisch sehr isolierte Stellung von *S. pumila* ist damit widerlegt. Diese gruppiert regelmäßig als Schwestertaxon zu *S. caespitosa*, die in den nur wenig entfernten Pyrenäen einheimisch ist. Eine auch von Simmler vorgeschlagene Gruppierung von *S. caespitosa* und *S. pumila* als Pauciflorae innerhalb der Section Smegmathamnium aufgrund ihrer Wenigblütigkeit muss wiederum als Zufall gedeutet werden, da *S. pulvinaris* ebenfalls nur sehr wenige Blüten ausbildet und dies eine Anpassung an die ökologische Nische der Arten sein kann. Auch wenn die Zuordnung von *S. pamphylica*, *S. cypria*, *S. sicula* und *S. haussknechti* zu einer Gruppe nicht eindeutig geklärt werden kann, so ist ihre nahe Verwandtschaft zusammen mit dem aus ihnen entstandenen Hybrid *S. x lempergii* doch in dem aus allen vier Genbereichen kombinierten Baum gut zu erkennen (Abb. 7). Hier scheint die phylogenetische Verwandtschaft ebenfalls auf der räumlichen Nähe der Verbreitungsgebiete zu gründen, welche sich sämtlich auf den östlichen Mittelmeerraum beschränken. An das Verbreitungsgebiet von *S. haussknechti* im mittelgriechischen Thessalien schließt jenes von *S. pamphylica* in der Türkei an, südlich davon ist die Art *S. cypria* auf Zypern endemisch. Als weitere hauptsächlich auf einer Mittelmeerinsel beheimatete Art kann die auf Sizilien beschriebene *S. sicula* genannt werden, die außerdem im nördlichen Algerien zu finden ist. Durch die geringe Distanz der Arten untereinander und die oben beschriebenen Unklarheiten in der Phylogenie ist zu vermuten, dass sich durch Anpassungen an die lokalen Gegebenheiten aus einer Stammform diese Taxa herausgebildet haben. Eine Aussage über die von Simmler vorgeschlagene Aufspaltung von *S. depressa* in *S. sicula* und *S. haussknechti* kann daher ebenfalls nicht gemacht werden.

Zwei durch relativ große Distanzen zur restlichen von Simmler untersuchten Gattung gekennzeichnete Arten stellen *S. calabrica* und *S. pulvinaris* dar. Auch wenn letztere in dem kombinierten Baum (Abb. 7) als Schwestertaxon zu der Gruppe mit *S. bellidifolia*, *S. officinalis*, *S. bodeana* und *S. glutinosa* gruppiert, was aber schon durch die trnL-trnF und die ITS-Topologie nicht mehr unterstützt wird (Abb. 5, 3), ist hier eine Zugehörigkeit zu der Gruppe wahrscheinlich nicht gegeben. *S. pulvinaris* würde sich mit ihrem

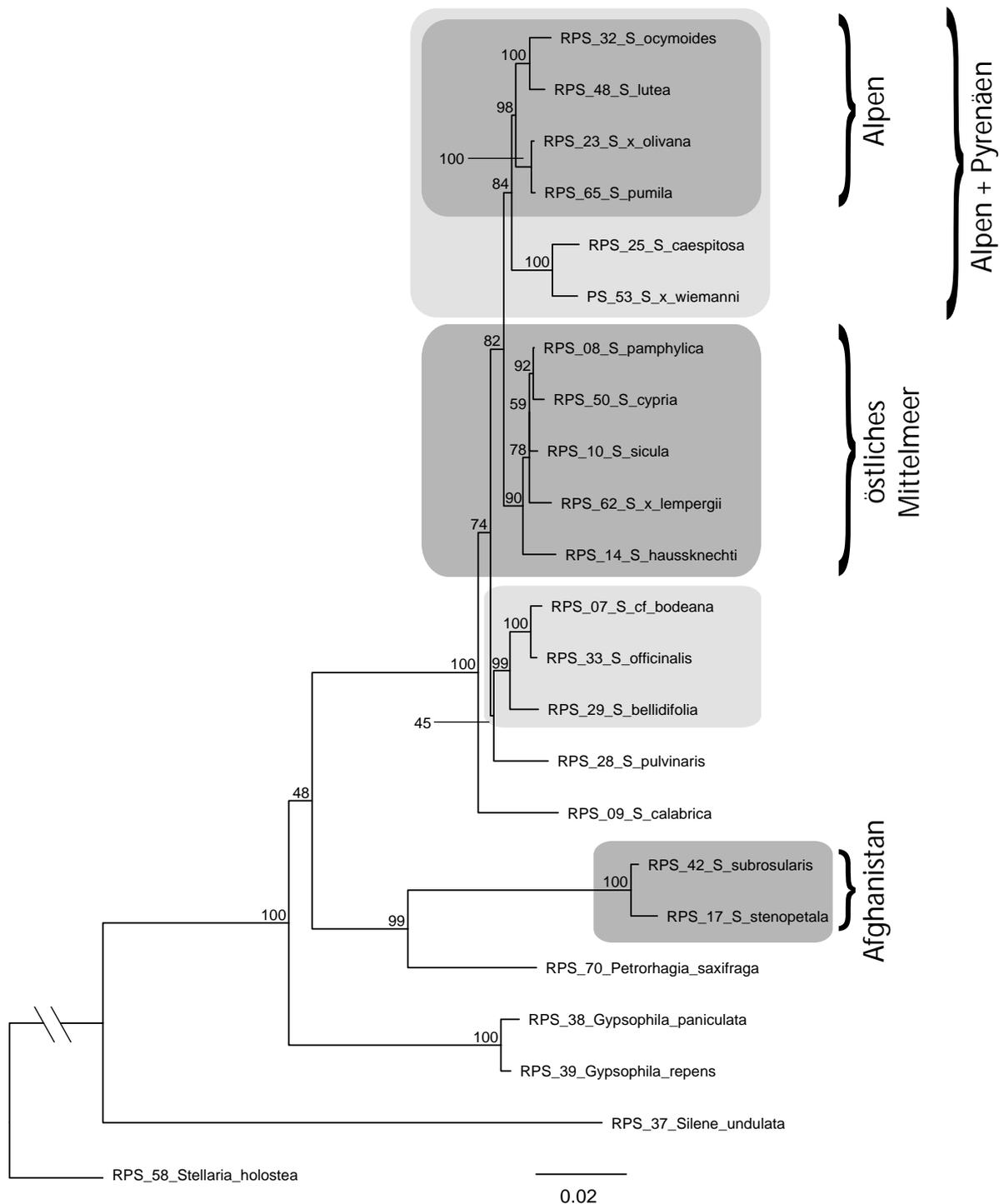


Abbildung 13: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von Sequenzen aller vier Marker nach Maximum Likelihood (RAxML). Pro Art wurde jeweils nur eine Isolation berücksichtigt Die zugehörigen *bootstrap*-Werte sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

Verbreitungsgebiet in der Zentral- und Südtürkei und dem Libanon zwar gut in die Gruppe der Mittelmeerarten einfügen, dadurch dass sie aber über den Antilibanon bis nach Syrien gefunden wird, kann auch ein anderer Ursprung vermutet werden. So findet sich der Schwerpunkt der Biodiversität der Caryophyllaceae, wie wahrscheinlich auch der der Gattung *Saponaria* in dem Gebiet zwischen östlichem Mittelmeer und Afghanistan (Bittrich, 1993). Sollte die Gattung mit ihren verschiedenen Entwicklungslinien von dort aus ihren Ursprung genommen haben, müsste sich in dieser Region die größte Diversität innerhalb der Gattung finden.

S. calabrica scheint durch ihre Stellung im kombinierten Baum (Abb. 7) als Schwestertaxon zur übrigen Gruppe noch außerhalb von *S. pulvinaris*, aus einer separaten Linie der Gattung hervorgegangen zu sein, auch wenn nicht alle Topologien diese Einschätzung unterstützen. Die Hypothese, dass sich *Saponaria* etwa von Persien aus zum einen nach Westen und zum anderen nach Osten hin ausgebreitet hat, unterstützt die phylogenetisch sehr weit entfernte Stellung der beiden in Ost-Afghanistan und West-Pakistan einheimischen Arten *S. stenopetala* und *S. subrosularis*, deren nahe Verwandtschaft in der molekular basierten Topologie schon von Rechinger (1982) auf morphologischer Basis postuliert wurde. Generell scheinen die im östlichen Verbreitungsgebiet vorkommenden Arten der Gattung einen separaten Formenkreis zu bilden (Abb. 7; Rechinger, 1982). Ein eventuell von *S. officinalis* ausgehendes geographisches Signal kann nicht weiter verfolgt werden, da diese Art eine dermaßen weite Verbreitung findet und der ursprüngliche Entstehungsort der Art mit dieser Untersuchung nicht bestimmt werden kann. Es müssten hierfür Populationsstudien für *S. officinalis* durchgeführt werden und so das Gebiet mit der größten genetischen Vielfalt der Art bestimmt werden. Danach wäre auch ein Abgleich dieses Gebietes mit dem Verbreitungsgebiet von *S. bellidifolia* möglich, welches sich von Südwest-Frankreich und Mittelitalien über den Balkan bis Griechenland erstreckt, um hier die nahe molekular-phylogenetische Verwandtschaft zu klären.

Eine unerwartete Stellung nimmt die nur für trnS-trnG (Abb. 5) als Außengruppe ebenfalls analysierte *Petrorhagia saxifraga* ein, die wenn auch in größerer Distanz doch in eine gut unterstützte Gruppe mit den beiden afghanischen Arten gruppiert wird, was die angenommene Monophylie der beiden Gattungen *Saponaria* und *Petrorhagia* in Frage stellen würde, wenn es sich denn um natürliche Taxa handelt. Die zur Aufklärung dieser Frage erstellten Phylogenien mit erweiterten Außengruppen stellt die Sequenzen für alle bei GenBank (NCBI) verfügbaren Arten von *Petrorhagia* allerdings für die matK-Phylogenie (Abb. 12) und die ITS-Phylogenie (Abb. 11) in eine Gruppe mit *Dianthus*, *Velezia* und

Allochrusa. Allerdings konnten für diesen Genabschnitt keine Sequenzen für *S. stenopetala* und *S. subrosularis* erhalten werden, was eine abschließende Klärung vorerst offen lässt. Lediglich von *S. stenopetala* ist eine ITS-Sequenz verfügbar, diese gruppiert nun mit *Allochrusa versicolor* BOISSIER zusammen, während *Petrorhagia* in der Gruppe mit *Dianthus* und *Velezia rigida* L. verbleibt, wie es die matK-Phylogenie ebenfalls angibt. Bei Fior et al. (2006) gruppiert *Allochrusa versicolor* in der ITS-Phylogenie, wie auch in der aus matK-Sequenzen erstellten, in die Gruppe mit *Dianthus* und *Velezia*, während die Art mit der Originalsequenz von Fior et al. (2006) in der eigenen Analyse der ITS mit *S. stenopetala* gruppiert wird. Abschließende Klarheit zu *Allochrusa* kann also auch hier nicht erreicht werden. In der Topologie der erweiterten Außengruppe ergeben sich weitere Inkongruenzen mit der von Fior et al. (2006) publizierten Topologie (Abb. 1). Bleibt die Stellung von *Vaccaria* im Verhältnis zu *Gypsophila* und *Saponaria* bei Fior et al. (2006) durch zwei Polytomien weitgehend ungeklärt, wird *Vaccaria* als Außengruppe zur Gattung *Saponaria* in dieser Untersuchung in eine Gruppe mit *Silene* und *Petrocoptis* A. BRAUN gestellt, welche gemeinsam bei Fior et al. (2006) eine völlig andere Gruppe repräsentieren. Diese Ungenauigkeiten könnten durch starke Signale entstehen, die *Saponaria* im Alignment hervorruft, wodurch bei der Alignierung natürliche Homologien verloren gehen und falsch aligniert wird (Morrison, 2008). Gibt Simmler (1910) eine Differentialdiagnose zu *Gypsophila*, *Tunica* und *Vaccaria* an um die nächst verwandten Arten zu unterscheiden, gruppiert *Vaccaria* hier nicht in diese verwandtschaftliche Umgebung, wobei sie früher sogar in *Saponaria* eingegliedert war, was die Eignung der morphologischen Merkmale auch zwischen den Gattungen weiter in Frage stellt.

Ein weiteres Problem, welches sich während der Untersuchungen zeigte ist, dass bei den oft schlecht charakterisierten Arten und Gattungen der Caryophyllaceae sehr oft Mehrfachbeschreibungen und Umgruppierungen stattgefunden haben, die zu einer Fülle an Synonymen führten. Bei älteren Aufsammlungen sind zudem meist die Typusbelege verloren gegangen oder unzugänglich, was schon einen rein morphologischen Vergleich unmöglich macht. Aus Mangel an eindeutigen Merkmalen sind auch die originalen Beschreibungen der Arten oft so dürftig, dass ein neuer Beleg nur schwer einer bereits vorhandenen Art zugeordnet werden kann. So kommen Sosa et al. (2006) bei der Untersuchung von vier beschriebenen Arten der Gattung *Cerdia* MOC. & SESSÉ EX DC. (Caryophyllaceae) zu dem Ergebnis, dass es sich lediglich um zwei Arten handeln muss, die in der Ausprägung von Merkmalen sehr variabel sind. Sosa et al. (2006) haben durch intensive Besammlung festgestellt, dass sich die Farbe der Blüten und Blätter bei der Entwicklung der Pflanzen ändert, zudem hängt hier die Anzahl der Blüten lediglich von der

Position der Infloreszenz ab. Die gegen- und wechselständige Blattstellung ist vorhanden, während Stipeln vorhanden sein können oder auch nicht. Diese Untersuchung zeigt, dass Merkmale, die für die bloße Unterscheidung von Arten herangezogen werden, schon innerhalb einer Art sehr variabel sein können, für die Erkennung phylogenetischer Muster scheinen sie daher noch weitaus weniger geeignet (Sosa et al., 2006). Auch in der Blattanatomie sieht Simmler (1910) noch einen robusten phylogenetischen Marker, obwohl ihre Untersuchungen schon die Abgrenzung der Gattung, wie sie selbst sie vornimmt, nicht unterstützt. Die Aussagekraft der Anatomie ist daher auch nur in engen Grenzen, zum Beispiel der Unterscheidung zweier Arten, ausreichend. Einzig durch die Gemeinsamkeit eines hohen Saponingehaltes lassen sich *S. officinalis* und *S. bellidifolia* zusammenfassen, wie die molekularen Daten es vermuten lassen (Simmler, 1910).

4.2 Amplifikation und Aussagekraft der Genregionen

Bei der Zusammenschau der Ergebnisse ist eine gute Aufschlüsselung der Arten untereinander gelungen. Bis auf wenige Ausnahmen und die bekannten Hybriden ergeben sich aus allen Genregionen sehr ähnliche Topologien für die jeweils gut durch *bootstrap*-Werte unterstützten Gruppen. Die ITS-Region (Abb. 3, A16, A21) hat sich in der Untersuchung als guter Marker für die phylogenetischen Zusammenhänge erwiesen, obwohl Erixon und Oxelman (2008) biparental vererbte Gene als problematisch für phylogenetische Untersuchungen einstufen. Die Sequenz ist einfach zu amplifizieren und zu sequenzieren, ebenso sind die mit den verschiedenen Methoden daraus errechneten phylogenetischen Bäume sehr aussagekräftig. So geben auch Fior et al. (2006) die ITS-Sequenz auf Gattungs- und Art-Ebene bei den Caryophyllaceae als hervorragend geeignet und variabler als *matK* an, was zum Beispiel mit *rbcL* und *5'ndhF* nicht der Fall ist (Smitsen et al., 2002). Die Ergebnisse von Chung (2007), wonach die ITS auch bei größerer Variabilität viel schlechter auflöst als *cpDNA*, können nicht bestätigt werden. Mit 242 PICs (34,6%) ergibt sich auch eine sehr hohe Dichte an informativen Merkmalen bei hoher Variabilität, die auch Ingvarsson et al. (2003) beschreiben. Zudem konnte durch die Analyse der einzigen hier untersuchten Region aus dem Kerngenom der Pflanzen aufgezeigt werden, dass bei mehreren Arten wahrscheinlich Hybridisierungsereignisse stattgefunden haben, die eine Übertragung von Genmaterial zwischen verschiedenen Entwicklungslinien herbeigeführt haben (Popp & Oxelman, 2004). Erixon und Oxelman (2008) stellen eine teilweise Widersprüchlichkeit zwischen verschiedenen kerncodierten Genen und sogar einzelnen Bereichen innerhalb eines solchen Gens fest, was die Einbeziehung weiterer Kern-Gene

sinnvoll erscheinen ließe. Hierzu sei *S. bellidifolia* als morphologisch gut charakterisierte und geographisch eingrenzbar Art genannt, die bei allen cpDNA-Analysen zu der Gruppe mit *S. officinalis*, in den ITS-Bäumen aber zu *S. caespitosa* gruppiert (Abb 2).

Auch das Verhalten der Hybriden erscheint äußerst bemerkenswert. Während *S. x wiemanni* (RPS 53) und *S. x olivana* zwischen dem nrDNA-Baum (Abb. 3) und den cpDNA-Bäumen (Abb. 4-6) ihre Positionen zwischen ihren beiden Elternarten wechseln, verbleibt *S. x wiemanni* (RPS 22) bei *S. caespitosa*, was die Charakterisierung von RPS 22 als Hybrid obschon der von *S. caespitosa* verschiedenen Morphologie fraglich erscheinen lässt. Auch die verschiedenen Isolationen von *S. x lempergii* zeigen auffällige Ergebnisse. Scheinen die Isolationen bei allen cpDNA-Analysen eine in sich abgeschlossene Art zu bilden, so zeigt die ITS-Analyse ebenfalls eine Aufteilung der Isolationen auf zwei verschiedene Gruppen. Zwei voneinander unabhängige Isolationen gruppieren mit *S. officinalis*, obwohl diese als Elternart nicht erwähnt wird. Die ITS-Region eignet sich damit bei *Saponaria* hervorragend, um phylogenetische Verhältnisse auf der Ebene des Kerngenoms zu untersuchen, was eindeutig gegen die Bestrebungen von Álvarez et al. (2003) spricht, die ITS als phylogenetischen Marker aufzugeben.

Trotzdem sollten sich plastidäre Gene besser für phylogenetische Untersuchungen eignen, da sie unabhängig von Hybridisierungsereignissen evolvieren (Erixon & Oxelman, 2008), fast nicht durch Pollen verbreitet werden und dadurch eine Populationsstruktur am besten abbilden können (McCauley et al., 2007). Bei der von Muir und Filatov (2007) untersuchten *Silene latifolia* POIRET zeigte sich dagegen vor allem bei den paternal vererbten Genen eine starke geographische Struktur.

Neben der oben erwähnten, nicht erwarteten Eingruppierung von *Petrorhagia* in *Saponaria*, spiegelt die Topologie der trnS-trnG-Bäume (Abb. 4, A15, A20), auf der Ebene kleinerer Gruppen, die der anderen cpDNA-Topologien recht gut wider. Die wenig bis gar nicht unterstützte Orientierung der Gruppen zueinander unterscheidet sich allerdings deutlicher von denen der anderen Regionen, so nehmen hier *S. ocymoides* und *S. lutea* eine Stellung viel weiter entfernt ein und die Gruppe mit *S. pamphylica* wird als am stärksten abgeleitet angesehen, was aber nicht unterstützt wird. Hier fehlen in dem Genbereich aufgrund sehr geringer Distanzen wahrscheinlich eindeutige Daten, die eine bessere Auflösung der Gruppen zuließen, was bei der Bayes-Analyse zu einer ausgedehnten Polytomie führt. Vielleicht hätte sich für den ganzen Genabschnitt eine bessere Ausgangsdatenlage als nur 208 PICs erreichen lassen. Aber da der Primer trnG nur selten zu Amplifikaten geführt hat, müsste für diese Position vielleicht eine weniger heterogene Sequenz gesucht werden. Shaw et al. (2005) geben für die Funktionalität von Primern

ebenfalls an, dass sich diese nicht auf große Bereiche der Systematik anwenden lassen und für verschiedene Gruppen regelmäßig neu erstellt werden müssen. Für phylogenetische Untersuchungen auf der Gattungsebene eignet sich diese Sequenz damit bei *Saponaria* nur begrenzt, könnte aber wertvolle Informationen zur Komplettierung anderer Datensätze liefern, die eine bessere Unterstützung zwischen den Gruppen aufweisen. Zumal die Distanzen innerhalb einer Art im Vergleich zu Schwestertaxonen sehr gering sind. Die Einschätzung von Shaw et al. (2005), dass sich die trnS-trnG-Region (12,4% PICs) aufgrund von großer Variabilität und einem viel größeren Informationsgehalt als zum Beispiel die ITS (34,6% PICs), matK (17,4% PICs) oder trnL-trnL-trnF (19,1% PICs für trnL-trnF) besser für phylogenetische Untersuchungen eignet als diese, hat sich damit nicht bestätigt. Auch die von Shaw et al. (2005) postulierte viel größere Anzahl an PICs in trnS-trnG-trnG konnte in dieser Arbeit nicht belegt werden, wozu Levin et al. (2009) bemerken, dass cpDNA generell langsamer evolviert und daher auch weniger PICs pro Basenpaar besitzt als die ITS-Region.

Die sonst oft für Verwandtschaftsanalysen verwandte trnT-trnL-trnL-trnF-Sequenz liefert in der vorliegenden Untersuchung die am wenigsten unterstützte Topologie (Abb. 5, A14, A19), wenn sich diese auch mit der der anderen Regionen weitestgehend deckt, was Harbaugh et al. (2010) ebenfalls feststellen. Ein Hauptgrund scheint hier die nur kurze trnL-trnF-Sequenz zu sein, welche von den drei Teilstücken einzig amplifiziert werden konnte. Damit lagen für die Untersuchung mit 97 PICs zu wenige informative Merkmale vor um eine gute Auflösung zu erreichen. Bei Muir und Filatov (2007) wird ebenfalls auf den geringen Informationsgehalt der Region hingewiesen, wobei Borsch und Quandt (2009) für trnT-trnF vor allem eine höhere Signalqualität pro PIC angeben als für matK, was eine geringe absolute Anzahl an PICs zumindest teilweise ausgleichen müsste. Relativ gut unterstützt wird auch hier die Gruppe mit *S. caespitosa*, *S. pumila*, *S. lutea* und *S. ocymoides*, außerdem die Gruppe mit *S. officinalis*, *S. glutinosa*, *S. bodeana* und *S. bellidifolia*. Weitere Schlüsse können aus der Analyse der Region allein nicht geschlossen werden. Dass durch Veränderungen im Bereich der Bindestelle des Primers im trnT-Exon, weder der ursprüngliche Primer noch der später von Shaw et al. (2007) vorgeschlagene ein Amplifikat zeigt, kann durch eine über die Gruppe der Landpflanzen hinweg weniger starke Konservierung erklärt werden.

Dass sowohl bei *Silene* als auch bei der nächst verwandten Gattung *Gypsophila* Amplifikate erhalten wurden, deutet allerdings auf eine für *Saponaria* spezifische Mutation hin. Ebenso zeigen nur Isolationen von *Saponaria* die Ausbildung der Doppelbanden bei der Amplifikation des mittleren trnL-Introns, was wiederum bei *Gypsophila* und *Silene* nicht auftritt. Da leider weder von dem längeren, etwa 600bp zählenden, noch von dem kürzeren,

etwa 500bp langen, Amplifikat eine vollständige Sequenz erhalten werden konnte, war eine eingehendere Analyse hier nicht möglich. Wohl konnte aber durch die hauptsächlich nach etwa 60bp abbrechende Sequenzierungsreaktion von beiden Enden aus erfasst werden, dass es sich jeweils um homologe Sequenzen am 5'- und am 3'- Ende handeln muss. Dieses Ergebnis gibt Hinweise auf ein größeres Indelereignis in diesem Intron, das aber nur etwa die Hälfte der Genkopien beziehungsweise der Chloroplasten betroffen hat. Aus diesem Verhalten, welches alle untersuchten *Saponaria*-Arten zeigen, lassen sich Rückschlüsse auf den Zeitpunkt dieses Ereignisses relativ rasch nach der Abspaltung der *Saponaria*-Entwicklungslinie ziehen. Die Schwierigkeiten bei der Sequenzierung des trnL-Introns sind wahrscheinlich auf eine Sekundärstruktur zurückzuführen, die das Intron für den Spleißvorgang nutzt. In der Literatur sind hierzu eine P6- und eine P8-Schleifenstruktur beschrieben (Muir & Filatov, 2007). Die Region mit dem Hinweis auf die konservierte Sekundärstruktur in dem trnL-Intron und den hoch konservierten Primersequenzen als Barcode vorzuschlagen (Taberlet et al., 2006) erscheint aufgrund der Probleme bei der Sequenzierung nicht sinnvoll.

Mit 17,4% PICs zeigt die trnK-matK-Region (Abb. 3, A17, A22) zwar nur einen mittleren, absolut gesehen mit 442 PICs aber den größten Informationsgehalt, wobei die hieraus erhaltenen Sequenzen mit etwa 2400bp auch die weitaus längsten der in dieser Arbeit verwandten darstellen. Borsch und Quandt (2009) heben die Länge als positiven Aspekt für die Eignung als phylogenetischen Marker hervor. Die bei Cuénod et al. (2002) erstellte Analyse aus einem 1013 Positionen umfassenden Alignment aus matK-Sequenzen der Caryophyllales ergibt einen Prozentsatz von 45,4% informativer Merkmale bei 65,4% variablen Merkmalen, was ein im Vergleich zu den anderen dort untersuchten Markern 18SrDNA, atpB und rbcL der weitaus höchste Wert ist. Außerdem wird die hohe Rate an nicht synonymen Aminosäureaustauschen des codierenden Abschnittes herausgestellt und mit für diese hohe Variabilität verantwortlich gemacht. Wobei Erixon und Oxelman (2008a) für codierende Sequenzen überhaupt und hier speziell für nicht synonyme Aminosäureaustausche eine sehr geringe Mutationsrate angeben. In der Topologie und den *bootstrap*-Werten der Berechnungen für matK zeigen sich dieser vergleichsweise große Informationsgehalt und eine gewisse Stringenz der Merkmale, wohingegen Shaw et al. (2005) für matK eine oft nicht befriedigende Auflösung auf Gattungsebene angeben.

Die unterschiedlich gute Handhabbarkeit der Primer findet ihre Begründung oft in der verschiedenen Herkunft. So sind die Primer trnK-3914F und trnK-2R für die Untersuchung über viele Gruppen der Landpflanzen hinweg etabliert worden und können, aufgrund der konservierten Exons in denen sie greifen, als universell angesehen werden.

Alle internen Primer dagegen sind zuvor anhand einer 2340bp langen matK-Sequenz von *Dianthus benearnensis* H. LORET, einer relativ nahe verwandten Art, erstellt worden, wodurch sich ihre oft bessern Eigenschaften bei der Amplifizierung erklären lassen. Bei einigen Isolationen, zumal wenn diese aus Herbarmaterial hergestellt worden waren, traten vor allem bei der Verwendung des Primers trnK-3914F Probleme auf, was auch hier mit einer weniger gut konservierten Sequenz im trnK-Exon als Bindestelle erklärt werden kann. Im codierenden Bereich des Introns sind weniger Indels zu beobachten, als außerhalb oder in den anderen drei Regionen, wobei hier mit dem Erhalt der Funktionalität der Maturase argumentiert werden kann. Auffallend in der errechneten Topologie ist hier die Stellung von *S. officinalis* (RPS 57) und *S. cypria*, die zusammen als Außengruppe zu *S. lutea* und *S. ocyroides* gestellt werden. Neben einer hierdurch unsicher erscheinenden Bestimmung zumindest von *S. officinalis* (RPS 57) ist es eigenartig, dass nur dieser eine aus den drei cpDNA-Abschnitten ein anderes phylogenetisches Signal gibt, da dies einem seltenen Rekombinationsereignis unter maternalen und paternalen Plastiden zugeschrieben werden kann, obwohl plastidäre DNA fast ausschließlich uniparental vererbt wird (Erixon & Oxelman, 2008), was Houliston und Olson (2006) aber schon relativierten.

Für die Entscheidung gegen eine standardmäßige Analyse der rbcL-Region waren neben eigenen Beobachtungen bei dem Vergleich zwischen verschiedenen Sequenzen von Nelkengewächsen aus GeneBank (NCBI) auch die oft in der Literatur auftretenden Vergleiche mit besser auflösenden Genregionen verantwortlich (Müller et al., 2006; Muir & Filatov, 2007; Smissen et al., 2002; Borsch & Quandt, 2009). Für matK und trnT-trnF werden häufig bessere Ergebnisse beschrieben, da für diese auch eine neutralere Evolution mit weniger homoplastischen Merkmalen erwiesen ist (Müller et al., 2006). Als Grundlage für die Auswahl der Genregionen muss allerdings auf den vermuteten Grad der Verwandtschaft ein großes Augenmerk gerichtet sein, denn bei zu rasch mutierenden Genregionen kann bei der Alignierung der Grundsatz der Homologie nicht mehr eindeutig nachvollzogen werden, obwohl nicht allein die Mutationsgeschwindigkeit hierfür verantwortlich ist (Müller et al., 2006). Auch Levin et al. (2009) stellen eine Korrelation zwischen PICs und CI für die dort untersuchten Gene fest, dies kann ebenfalls als Grund für die unklare Eingruppierung von *Petrorhagia* in die Außengruppe zu *Saponaria* angeführt werden (Abb. 7).

Die Erstellung einer Phylogenie aus einer Kombination der Alignments aus allen vier Genabschnitten (Abb. 7) erscheint trotz der vor allem bei der nucleären DNA leicht abweichenden Signale sinnvoll, da so fehlende Variabilität einer Region an einer natürlichen Verzweigung durch Variabilität eines anderen Markers ausgeglichen werden kann. So

können in dem kombinierten Baum die einzelnen Arten und Gruppen mit der größtmöglichen Auflösung und den höchsten Unterstützungswerten ausgemacht werden, was auch Frajman et al. (2009) dazu veranlasst für phylogenetische Analysen cpDNA und nrDNA heranzuziehen. Rautenberg et al. (2008) führen dagegen an, dass phylogenetische Rekonstruktionen aus Multigenanalysen in ihrer Bedeutung dadurch geschwächt sind, dass verschiedene DNA-Abschnitte ebenfalls eine verschiedene Topologie zur Folge haben und daher eine kombinierte Analyse einen irreführenden Kompromiss darstellt. Eine Phylogenie spiegelt lediglich die Geschichte eines Genabschnittes wieder, nicht einmal explizit die eines kompletten Gens, zudem können Mosaikgene aus Paralogen *in vivo* entstehen (Rautenberg et al., 2008). Wurden die ersten Phylogenien noch hauptsächlich aus rbcL-Datensätzen erstellt und basieren 77% der Untersuchungen zwischen 1995 und 2002 noch auf trnL-trnF- oder matK-Sequenzen (Shaw et al., 2005), sind heute Analysen die mehrere Gene parallel betrachten von wachsender Bedeutung, da hierbei zufällig entstandene Homoplasien und eventuell lateral stattfindender Gentransfer weniger stark gewichtet werden (Erixon & Oxelman, 2008). Außerdem sind Phylogenien aus nur einem Gen oft irreführend, weil die Möglichkeit besteht, dass keine unabhängige Vererbung gegeben ist oder dass zu wenige Merkmale in die Berechnung einfließen (Smitsen et al., 2002).

Bei der Auswahl der untersuchten Sequenzabschnitte wurde damit ein guter Kompromiss aus der Länge der Sequenzen und Anzahl der untersuchten Taxa gewählt. Dazu geben Hillis et al. (2003) an, dass der Informationsgehalt von einer Sequenzlänge von 500bp auf 1000bp enorm ansteigt und die Fehlerrate stark zurückgeht. Eine Sequenzierung von weit mehr als 1000bp wird daher als nicht sinnvoll angegeben, sondern eher die Einbeziehung weiterer Arten in die Analyse. Diesen Ausführungen kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit in begrenztem Maße zugestimmt werden, da schon die relativ kurze ITS-Sequenz einen guten Überblick über die phylogenetischen Verhältnisse innerhalb der Gattung gibt, erst durch die Einbeziehung weiterer Datensätze aber kann eine wirklich fundierte Aussage über *Saponaria* gemacht werden und die Einbeziehung weiterer Arten in die Analyse war aufgrund der fehlenden Aufsammlungen nicht möglich.

4.3 Verschiedene Rekonstruktionsmethoden

Die für alle vier Genbereiche durchgeführten Rechenmethoden (NJ, ML, Bayes) ergeben vergleichbare Baumtopologien. Lediglich bei der Topologie der MP-Bäume mit *indel coding* ergeben sich größere Unterschiede. Die mit ML (Abb. 2-6) und Bayes'scher Statistik (Abb. A13-A17, Anhang) berechneten Phylogenien sind fast deckungsgleich, die

Unterstützungswerte für einzelne Gruppen sind bei allen Methoden ähnlich hoch. Die Begründung hierfür liegt wahrscheinlich in der Funktionsweise der Bayes'schen Statistik, die in der Phylogenie auf der Berechnung der Likelihood begründet ist und somit die Auswertung von gleich gewichteten Merkmalsübergängen und Evolutionsmodellen darstellt (Huelsenbeck et al., 2001), wobei allerdings eine grundlegend verschiedene Rechenmethode zur Anwendung kommt. Das bei Erixon und Oxelman (2008) beschriebene Problem, dass in Bayes-Analysen Polytomien mit sehr hohen Posteriorwahrscheinlichkeiten versehen werden und sich unberechenbar verhalten, hat sich für die bearbeiteten Daten nicht bestätigt. Auch die allgemein als oft signifikant höher angeführten Posteriorwahrscheinlichkeiten können für die durchgeführten Berechnungen nicht bestätigt werden, was vermutlich an den fast maximalen *bootstrap*-Werten von 95-100 liegt, die viele Gruppen unterstützen, auch wenn beide Maßsysteme nur schwierig zu vergleichen sind und in die Bayes'sche Statistik viel mehr Parameter eingehen, als bei ML-Analysen (Erixon et al., 2003). Wird die von Huelsenbeck et al. (2001) eingeführte Methode der *Bayesian inference* noch vor allem für die Analyse größerer Datensätze vorgeschlagen, sollte dagegen aufgrund der langen Rechenzeit und ähnlich guter Ergebnisse wenn möglich auf die Likelihood-Berechnung mit RAxML zurückgegriffen werden. Außerdem sind hier die Probleme, die durch ein unterparametrisiertes Evolutionsmodell hervorgerufen werden können viel geringer (Huelsenbeck & Rannala, 2004). Dass in der viel einfacheren NJ-Analyse (Abb. A18-A22, Anhang) der gleichen Daten ebenfalls sehr ähnliche Topologien erreicht und mit relativ hohen *bootstrap*-Werten unterstützt werden, weist auf eine hohe Aussagekraft des eingehenden Alignments selbst hin.

Unerwartete Ergebnisse haben sich für die einfache MP-Analyse mit *indel coding* ergeben (Abb. 9, 10), die aufgrund der geringen Aussagekraft dieser Ergebnisse und der benötigten Rechenzeit nur für das kombinierte Alignment durchgeführt wurde. Werden bei der einfachen Rechnung ohne *indel coding* bei der Suche nach dem *most parsimonious tree* noch die gleichen Gruppen unterstützt wie in der angeschlossenen *bootstrap*-Analyse und in den anderen Topologien (siehe auch Fior et al., 2006; Harbaugh et al., 2010), ändert sich das Ergebnis durch die von SeqState erzeugte erweiterte Matrix signifikant. Die durch die Codierung der Indels erweiterte Matrix scheint von PAUP* bei der Suche nach dem einfachsten Baum anders behandelt zu werden als eine einfache DNA-Matrix (Abb. 9), während dies bei der Berechnung der *bootstrap*-Werte nicht der Fall ist (Abb. 10), obwohl Simmons et al. (2007) den hier verwendeten MCIC-Algorithmus als den funktionellsten in ihrer Untersuchung angeben. Für die *bootstrap*-Analyse der erweiterten Matrix werden wieder die Gruppen aus der ML-Analyse unterstützt, zudem können viel mehr und meist

auch höhere Unterstützungswerte für diese Gruppen angegeben werden als bei der einfachen MP-Analyse. Dieses Ergebnis lässt weitere Forschung zur Kompatibilität der von SeqState erzeugten Matrix mit dem in PAUP* implementierten MP-Algorithmus sinnvoll erscheinen.

Ist auch die Rechenmethode nicht ausreichend kompatibel zu dem *indel coding*, erscheint dieses trotzdem als robustes Werkzeug der Phylogenie, zumal aus einer Matrix von nur wenigen Merkmalen pro Taxon eine Phylogenie berechenbar ist, die als nur wenig homoplastisch angesehen werden kann. Angewandt auf ML-Verfahren kann dadurch bei ausreichender Kompatibilität der Rechenaufwand enorm reduziert und außerdem eine Phylogenie mit viel weniger homoplastischen Merkmalen generiert werden (Erixon & Oxelman, 2008; Simmons & Ochoterena, 2000; Kelchner, 2008; Borsch & Quandt, 2009; Müller, 2005). Allerdings ist bisher noch kein Codierungsverfahren für ML verfügbar. Vor allem weil Indels durch viel kompliziertere Mutationsmechanismen hervorgerufen werden als Basensubstitutionen, welche schneller rückmutieren können, werden diese von Simmons und Ochoterena (2000) als verlässlichere Merkmale angesehen. Bei der Inaugenscheinnahme der erstellten Alignments konnte vor allem eine Einteilung in Gruppen und somit natürliche Entwicklungslinien rasch erfolgen, was durch die späteren Berechnungen ohne Indels bestätigt wurde. Ingvarsson et al. (2003) geben für die aus Indels errechneten Phylogenien allerdings an, dass diese ein ähnlich hohes Level an Homoplasie besitzen, zumal weil Ein- oder Zweinucleotidindels schneller evolvieren als andere Indels oder Basensubstitutionen.

Auffällig bei der Betrachtung der Außengruppen ist, dass *Petrorhagia* nur dann in eine Gruppe mit *S. stenopetala* und *S. subrosularis* gruppiert, wenn die Gruppe aus *Dianthus*, *Velezia* und *Allochrusa* in der Berechnung nicht vorhanden ist, wo *Petrorhagia* sonst, in einigem Abstand zu *Saponaria*, eingruppiert wird (Abb. 7, 11, 12). Es ergeben sich hieraus eindeutige Hinweise, dass bei nicht näher verwandten Taxa und einem Datensatz, der stark von einer Gruppe dominiert wird, die Grundlage des Alignments, die Homologie der Merkmale, nicht zwingend erfüllt sein muss (Fior et al., 2006). Dies ist ebenfalls die Erklärung für die fehlende Deckung der Topologie zwischen den Gattungen bei dieser Arbeit und der von Fior et al. (2006). Die von Kelchner (2008) und Morrison (2008) befürwortete Alignierung per Hand sollte trotzdem nicht etabliert werden, da dann nicht nur die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, sondern auch die Nachvollziehbarkeit der Untersuchung insgesamt verloren ginge.

4.4 Fazit

Diese Arbeit gibt einen weitreichenden Einblick in die phylogenetischen Zusammenhänge einiger Vertreter der Gattung *Saponaria*. Im Rahmen dieser Untersuchung konnten größtenteils in Mittel- und Südeuropa und im östlichen Mittelmeer einheimische Arten einbezogen werden. Ein Vergleich der hier aufgedeckten Geschichte der Untergattung *Saponariella* mit der von Simmler (1910) abgetrennten zweiten Untergattung *Saporhizaea* und den nach 1910 beschriebenen Arten in dem Gebiet zwischen Syrien, der Türkei und Afghanistan konnte in dieser Untersuchung aus Mangel an Belegen nicht stattfinden. Es hat sich gezeigt, dass die wenigen morphologischen Merkmale in der Gattung *Saponaria*, die schon bei der Charakterisierung der Arten selbst ein Problem darstellen, für die Erstellung einer natürlichen Phylogenie nur wenig aussagekräftig sind.

Nach der molekular-phylogenetischen Analyse können vier Gruppen als gut abgesichert angesehen werden (Abb. 13): *S. lutea*, *S. ocymoides* und die Hybride *S. x olivana* zusammen mit ihrer Elternart *S. pumila* bilden eine offensichtlich monophyletische Gruppe, die ihr Hauptverbreitungsgebiet in den Alpen hat. Auch *S. caespitosa* mit ihrer Hybride *S. x wiemanni* kann wahrscheinlich in diese Verwandtschaft eingeordnet werden. Eine weitere Gruppe, in der die genauen Artabgrenzungen der dort beschriebenen Taxa noch zu überprüfen sind, bilden *S. sicula*, *S. pamphylica*, *S. cypria*, *S. haussknechti* und die aus letzteren beiden hervorgegangene Hybride *S. x lempergii*, deren Verbreitungsgebiet sich sämtlich über das östliche Mittelmeer erstreckt. Die dritte Gruppe bei der eine Korrelation zu ihrem Verbreitungsgebiet festgestellt werden kann, ist im östlichen Afghanistan und im westlichen Pakistan verbreitet und durch *S. subrosularis* und *S. stenopetala* repräsentiert. Bei diesen Arten kann jedoch die Zugehörigkeit zur Gattung *Saponaria* durch die große genetische Distanz zu den übrigen Vertretern in Frage gestellt werden. Auch morphologisch ist die Diagnose der Formengruppe, zu der Rechinger (1982) noch weitere Arten stellt, nicht eindeutig. *S. officinalis*, *S. bodeana* und *S. bellidifolia* bilden schließlich eine vierte Gruppe mit guter Absicherung, bei der allerdings aufgrund fehlender Daten zur Populationsstruktur von *S. officinalis* und *S. bodeana* kein Bezug zum Verbreitungsgebiet festgestellt werden kann.

Zwar führt Ochoterena (2008) an, dass im Gegensatz zu den meisten phänotypischen Merkmalen die selben Merkmalsausprägungen in der sehr begrenzten Form der vier Nucleotide auftreten und trotzdem nicht das gleiche Merkmal und nicht homolog sind, aber Nucleotide als Merkmale haben eine weitaus größere Bedeutung für die Phylogenetik: Die Möglichkeiten der Kombination der auf vier, beziehungsweise fünf wenn man das Nicht-

Vorhandensein einer Base mitzählt, limitierten Merkmalszustände von Nucleotiden zu verschiedenen Sequenzen eröffnet eine große Palette an Möglichkeiten diese Merkmale zu untersuchen. Die Basensequenz kann relativ einfach als sehr distinkte Abfolge von Merkmalen ausgemacht werden, was auf der morphologischen Ebene oft nur nach äußerst aufwendigen Untersuchungen der Fall ist. Zudem erfordert die Phylogenetik bei morphologischen Merkmalen eine sehr fein austarierte Gewichtung der gefundenen Merkmale, die immer als subjektiv angesehen werden muss. Zwar findet durch die Auswahl verschiedener Alignmentmethoden und Evolutionsmodelle ebenfalls eine Gewichtung der Merkmale statt, diese kann hier aber über vorher festgelegte Algorithmen geschehen und folgt daher weitaus objektiveren Kriterien. Auch bei der Analyse molekularer Merkmale können mehr oder weniger gravierende Fehler auftreten, vor allem wenn von Beginn an von falschen Annahmen ausgegangen wird. Daher ist die Auswahl der Sequenzbereiche, die möglichst neutral mit immer gleicher Geschwindigkeit evolvieren sollten, und die Wahrung der Homologie in einem Alignment von so grundlegender Bedeutung. Es ist daher wichtig, verschiedene Gene für eine Untersuchung zu analysieren, da diese oft auch verschiedene Mutationsraten haben (Houliston & Olson, 2006) und verschiedene Gene oft verschiedene Topologien ergeben (Rautenberg et al., 2008). So geben schon Shaw et al. (2005) nach eingehenden Untersuchungen verschiedener Marker an, dass es keine absolut für die Phylogenetik geeignete Region gibt, sondern nur solche die sich für die eine oder andere Fragestellung besser oder schlechter eignen. Die in dieser Arbeit getroffene Auswahl an Genregionen hat sich deshalb auch erst im Nachhinein für matK und ITS als gut, für die verschiedenen trn-Regionen als weniger gut geeignet erwiesen. Für die Baumsuchmethoden hat sich die Likelihood-Analyse mit RAxML als die praktikabelste und sicherste herausgestellt, zwar werden mit anderen Methoden meist sehr ähnliche Ergebnisse erhalten, aber RAxML stellt den besten Kompromiss aus Schnelligkeit und Genauigkeit dar.

5. Literaturverzeichnis

- Albach, D. C., Meudt, H. M., Oxelman, B. (2005) „Piecing together the „new“ Plantaginaceae“ *American Journal of Botany* 92(2): 297-315.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) „Basic local alignment search tool“ *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410.
- Álvarez, I., Wendel, J. F. (2003) „Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference“ *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434.
- Bittrich, V. (1993) „Caryophyllaceae“. *In* Kubitzki, K., Rohwer, J., Bittrich, V. [eds.] „The families and genera of vascular plants“, vol. 2, Magnoliid, Hamamelid, and Caryophyllid families: 206-236, Springer Verlag, Berlin, Deutschland.
- Borsch, T., Quandt, D. (2009) „Mutational dynamics and phylogenetic utility of noncoding chloroplast DNA“ *Plant Systematics and Evolution* 282: 169-199.
- Borsch, T., Quandt, D., Koch, M. (2009) „Molecular evolution and phylogenetic utility of non-coding DNA: applications from species to deep level questions“ *Plant Systematics and Evolution* 282: 107-108.
- Braun, A. (1864) „Übersicht der natürlichen Systeme nach der Anordnung derselben.“ *In* Ascherson, P. [ed.] *Flora der Provinz Brandenburg, der Altmark und des Herzogthums Magdeburg*“ vol. 1: 22-67. Hirschwald, Berlin, Deutschland.
- Chung, K. F. (2007) „Inclusion of the South Pacific Alpine genus *Oreomyrrhis* (Apiaceae) in *Chaerophyllum* based on nuclear and chloroplast DNA sequences“ *Systematic Botany* 32(3): 671-681.
- Cuénod, P., Savolainen, V., Chatrou, L. W., Powell, M., Grayer, R. J., Chase, M. W. (2002) „Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences“ *American Journal of Botany* 89(1): 132-144.
- Eckard, T. H. (1964) „Caryophyllaceae“. *In* Melchior, H. [ed.], *Syllabus der Pflanzenfamilien*, 12th ed., 93-96. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Deutschland.
- Erixon, P., Sennblad, B., Britton, T., Oxelman, B. (2003) „Reliability of Bayesian posterior probabilities and bootstrap frequencies in phylogenetics“ *Systematic Biology* 52(5): 665-673.
- Erixon, P., Oxelman, B. (2008) „Reticulate or tree-like chloroplast DNA evolution in *Sileneae* (Caryophyllaceae)?“ *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 313-325.
- Erixon, P., Oxelman, B. (2008a) „Whole-gene positive selection, elevated synonymous substitution rates, duplication, and indel evolution of the chloroplast *clpP1* gene“ *PLoS ONE* 3(1): e1386.
- Fior, S., Karis, P. O., Casazza, G., Minuto, L., Sala, F. (2006) „Molecular phylogeny of the Caryophyllaceae (Caryophyllales) inferred from chloroplast *matK* and nuclear rDNA ITS sequences“ *American Journal of Botany* 93(3): 399-411.

- Frajman, B., Heidari, N., Oxelman, B. (2009) „Phylogenetic relationships of *Atocion* and *Viscaria* (Sileneae, Caryophyllaceae) inferred from chloroplast, nuclear ribosomal, and low copy gene DNA sequences“ *Taxon* 58(3): 811-824.
- Harbaugh, D. T., Nepokroeff, M., Rabeler, R. K., McNeill, J., Zimmer, E. A., Wagner, W. L. (2010) „A new lineage-based tribal classification of the family Caryophyllaceae“ *International Journal of Plant Sciences* 171(2): 185-198.
- Hegi, G. H. (1959-1979) „*Illustrierte Flora von Mitteleuropa*“ 968-977, Verlag Paul Parey, Berlin - Hamburg, Deutschland.
- Hillis, D. M., Pollock, D. D., McGuire, J. A., Zwickl, D. J. (2003) „Is sparse taxon sampling a problem for phylogenetic inference?“ *Systematic Biology* 52(1): 124-126.
- Houliston, G. J., Olson, M. S. (2006) „Nonneutral evolution of organelle genes in *Silene vulgaris*“ *Genetics* 174: 1983-1994.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. (2001) „MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny“ *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., Bollback, J. P. (2001) „Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology“ *Science* 294: 2310-2314.
- Huelsenbeck, J. P., Rannala, B. (2004) „Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models“ *Systematic Biology* 53(6): 904-913.
- Huson, D. H., Richter, D. C., Rausch, C., DeZulian, T., Franz, M., Rupp, R. (2007) „Dendroscope- An interactive viewer for large phylogenetic trees“ *BMC Bioinformatics* 8: 460.
- Ingvarsson, P. K., Ribstein, S., Taylor, D. R. (2003) „Molecular Evolution of insertions and deletion in the chloroplast genome of *Silene*“ *Molecular Biology and Evolution* 20(11): 1737-1740.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., (1990) „Optimization of PCRs: In PCR protocols: A guide to methods and applications.“ ed. Innis, M. A. et al. Academic Press, San Diego, CA., USA.
- Johnson, L. A., Soltis, D. E. (1995) „Phylogenetic inference in Saxifragaceae sensu-stricto and *Gilia* (Polemoniaceae) using matK sequences“ *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82(2): 149-175.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T. (2002) „MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform“ *Nucleic Acids Research* 30(14): 3095-3066.
- Katoh, K., Toh, H. (2008) „Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework.“ *BMC Informatics* 9: 212.
- Kelchner S. A. (2008) „Phylogenetic models and model selection for noncoding DNA“ *Plant Systematics and Evolution* 282: 109-126.

- Knoop, V., Müller, K. (2009) „Gene und Stammbäume“ Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland.
- Levin, R. A., Blanton, J., Miller, J. S. (2009) „Phylogenetic utility of nuclear nitrate reductase: A multi-locus comparison of nuclear and chloroplast sequence data for inference of relationships among American Lycieae (Solanaceae)“ *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 608-617.
- McCauley, D. E., Sundby, A. K., Bailey, M. F., Welch, M. E. (2007) „Inheritance of chloroplast DNA is not strictly maternal in *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae): Evidence from experimental crosses and natural populations“ *American Journal of Botany* 94(8): 1333-1337.
- Morrison, D. A. (2008) „A framework for phylogenetic sequence alignment“ *Plant Systematics and Evolution* 282: 127-149.
- Muir, G., Filatov, D. (2007) „A selective sweep in the chloroplast DNA of dioecious *Silene* (Section *Elisanthe*)“ *Genetics* 177: 1239-1247.
- Müller, K., (2005) „SeqState - primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets.“ *Applied Bioinformatics*, 4, 65-69.
- Müller, K. F., Borsch, T., Hilu, K. W. (2006) „Phylogenetic utility of rapidly evolving DNA at high taxonomical levels: Contrasting *matK*, *trnT-F*, and *rbcL* in basal angiosperms“ *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 99-117.
- Nylander, J. A. A. (2002) „MrModeltest, version 1.0b“ Computer program distributed by the author, available at website <http://www.ebc.uu.se/systzoo/staff/nylander.html>. Department of Systematic Zoology, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Ochoterena, H. (2009) „Homology in coding and non-coding DNA sequences: a parsimony perspective“ *Plant Systematics and Evolution* 282: 151-168.
- Popp, M., Oxelman, B. (2004) „Evolution of a RNA polymerase gene family in *Silene* (Caryophyllaceae) - Incomplete concerted evolution and topological congruence among Paralogues“ *Syst. Biol.* 53(6): 914-932.
- Popp, M., Erixon, P., Eggens, F., Oxelman, B. (2005) „Origin and evolution of a circumpolar polyploid species complex in *Silene* (Caryophyllaceae) inferred from low copy nuclear RNA polymerase introns, rDNA, and chloroplast DNA“ *Systematic Botany* 30(2): 302-313.
- Posada, D., Crandall, K. A. (1998) „MODELTEST: testing the model of DNA substitution“ *Bioinformatics* 14(9): 817-818.
- Posada, D., Crandall, K. A. (2001) „Selecting the best-fit model of nucleotide substitution“ *Systematic Biology* 50(4): 580-601.
- Rabeler, R. K. (2005) „Publication of the combination *Spergularia diandra* (Caryophyllaceae): discovery of an earlier indelible autographic label“ *Taxon* 54(1): 147-148.

- Rautenberg, A., Filatov, D., Svennblad, B., Heidari, N., Oxelman, B. (2008) „Conflicting phylogenetic signals in the SIXI/YI gene in *Silene*” *BMC Evolutionary Biology* 8: 299.
- Rechinger, K. H. (1982) „Zwei neue Arten der Gattung *Saponaria* (Caryophyllaceae) aus Afghanistan und Pakistan“ *Plant Systematics and Evolution* 141: 81-84.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. (2003) „MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models“ *Bioinformatics* 19(12): 1572-1574.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K. C., Winder, C. T., Schilling, E. E., Small, R. L. (2005) „The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis“ *American Journal of Botany* 92(1): 142-166.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., Small, R. L. (2007) „Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III“ *American Journal of Botany* 94(3): 275-288.
- Simmler, G. (1910) „Monographie der Gattung *Saponaria*“ *Denkschriften der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse, Wien* 85: 433-509.
- Simmons, M. P., Ochoterena, H. (2000) „Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses“ *Systematic Biology* 49(2): 369-381.
- Simmons M. P., Müller, K., Norton, A. P. (2007) „The relative performance of indel-coding methods in simulations“ *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 724-740.
- Sitte, P., Weiler, E., Bresinsky, A., Kadereit, J. W., Körner, C. (2002) „Strasburger, Lehrbuch der Botanik für Hochschulen” 35. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Deutschland.
- Smitsen, R. D., Clement, J. C., Garnock-Jones, P. J., Chambers, G. K. (2002) „Subfamilial relationships within Caryophyllaceae as inferred from 5'ndhF sequences“ *American Journal of Botany* 89(8): 1336-1341.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Chase, M. W., Mort, M. E., Albach, D. C., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W. H., Hoot, S. B., Fay, M. F., Axtell, M., Swensen, S. M., Prince, L. M., Kress, W. J., Nixon, K. C., Farris, J. S. (2000) „Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences“ *Botanical Journal of the Linnean Society* 133: 381-461.
- Sosa, V., Ochoterena, H., Escamilla, M. (2006) „A revision of *Cerdia* (Caryophyllaceae)“ *Botanical Journal of the Linnean Society* 152: 1-13.
- Stamatakis, A., Ott, M., Ludwig, T. (2005) „RAxML-OMP: An efficient program for phylogenetic inference on SMPs“ *Proceedings of 8th International Conference on Parallel Computing Technologies. Lecture Notes in Computer Science, Berlin, 3506: 288-302.*
- Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J. (2008) „A fast bootstrapping algorithm for the web- servers“ *Systematic Biology* 57: 758-771.
- Swofford, D. L. (2002) „PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony and other methods, v4.0b10. 2d ed.” Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. (1991) „Universal primers for amplification of the non-coding regions of chloroplast DNA“ *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermat, T., Corthier, G., Brochman, C., Willerslev, E. (2006) „Power and limitations of the chloroplast trnL^(UAA) intron for plant DNA barcoding“ *Nucleic Acids Research* 35(3): e14.
- Tribsch, A., Schönswetter, P., Stuessy, T. F. (2002) „*Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the ice age in the European Alps“ *American Journal of Botany* 89(12): 2024-2033.
- Weiß, M. (2010) „Molecular phylogenetic Reconstruction“ Institut für Evolution und Ökologie, Organismische Botanik, Tübingen, Deutschland.
- Yang, Z., Rannala, B. (2005) „Branch-length prior influences Bayesian posterior probability of phylogeny“ *Systematic Biology* 54(3): 455-470.

Literatur der Artbeschreibungen

- Saponaria atocioides* BOISS.
Diagn. Pl. Orient. ser. 1, 1: 16. 1843 [Jan-Feb 1843]
- Saponaria bellidifolia* SM.
Spicil. Bot. 5. Aus Flora Orientalis Band 1
- Saponaria bodeana* BOISS.
Fl. Orient. [Boissier] 1: 527. 1867 [Apr-Jun 1867]
- Saponaria caespitosa* DC.
Rapp (Rapport). Voy. ii. 78; ex ei. Fl. Fr. Suppl. 601.
- Saponaria calabrica* GUSS.
Plantae Rariores 164. t. 31. (1826)
- Saponaria chlorifolia* KUNZE
Ind. Hort. Lips. (1846). Cf. Linnaea, xxiv. (1851) 163.
- Saponaria cypria* BOISS.
Fl. Orient. [Boissier] Suppl. 83. 1888 [Oct 1888]
- Saponaria depressa* BIV.
Stirp. Nov. Kar. Sicil. ii. [15].
- Saponaria glutinosa* M.BIEB.
Fl. Taur.-Caucas. i. 322.
- Saponaria haussknechti* SIMMLER
Denkschr. Kaiserl. Akad. Wiss., Wien. Math.-Naturwiss. Kl. lxxxv. 472 (1910).
- Saponaria holopetala* LEDEB.
Fl. Ross. (Ledeb.) 1(2): 301. 1842 [1-8 Oct 1842]
- Saponaria intricata* FREYN

Bull. Herb. Boissier iii. (1895) 77.

Saponaria kotschyi BOISSIEU

Diagn. Pl. Orient. ser. 1, 1: 16. 1843 [Jan-Feb 1843]

Saponaria lutea L.

Species Plantarum, 2. 1: 585. 1762 [Sep 1762]

Saponaria nana FRITSCH

Exkursionsflora für Österreich (mit Ausschluss von Galizien, Bukowina und Dalmatien)
1909 Wien

Saponaria ocymoides L.

Species Plantarum 1: 409. 1753 [1 May 1753] View page [BHL]

Saponaria officinalis L.

Species Plantarum 2 1753

Saponaria pamphylica BOISS. & HELDR.

Diagn. Pl. Orient. ser. 1, 8: 74. 1849 [Jan-Feb 1849]

Saponaria prostrata WILLD.

Enum. Pl. [Willdenow] 1: 465. 1809 [Apr 1809]

Saponaria pulvinaris BOISS.

Diagn. Pl. Orient. ser. 1, 8: 74. 1849 [Jan-Feb 1849]

Saponaria pumila JANCHEN, HAYEK

Sched. Fl. (schedae ad floram) Stiriac. Exsicc. 1(5): 333. 1908 [14 Nov 1908] : use *S. pumilio* (L.) Fenzl. ex Janch.

Saponaria sicula RAF.

Specchio delle scienze, o, Giornale enciclopedico di Sicilia. ii. 7.

Saponaria stenopetala RECH.f.

Pl. Syst. Evol. 141(1): 82. 1982

Saponaria subrosularis RECH.f.

Anzeiger, Österreichische Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse cv. 10 (1969).

Saponaria wiemanni FRITSCH

Oesterr. Bot. Z. 47: 2. 1897

6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
al.	Allii
bp	Basenpaar(e)
CI	<i>consistency index</i>
cpDNA	Chloroplasten-DNA
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GTR	<i>general time reversible</i>
IEP	<i>intron encoded protein</i>
IGS	<i>intergeneric spacer</i>
IR	<i>inverted repeat</i>
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
kb	Kilobase(n)
LSC	<i>large single copy region</i>
MP	<i>maximum parsimony</i>
ML	<i>maximum likelihood</i>
MCIC	<i>modified complex indel coding</i>
MCMC	<i>Markov Chain Monte Carlo</i>
NJ	<i>neighbour joining</i>
nrDNA	Kern-DNA
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIC	<i>parsimony informative character</i>
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonucleinsäure
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SPR	<i>subtree pruning-regrafting</i>
SSC	<i>small single copy region</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-Na ₂ EDTA
TBR	<i>tree biSektion-reconnection</i>
TE	Tris-EDTA
tRNA	Transport-RNA
UV	Ultraviolettstrahlung

7. Anhang

Tabelle A1: Die in der Arbeit untersuchten Arten aus der Gattung *Saponaria* und ihre Synonyme. Die Einteilung folgt Simmler (1910), die in der Arbeit verwendeten Namen sind fett gedruckt.

(Simmler, 1910)	(Synonyme)
S. bellidifolia Smith -	-
S. bodeana Boiss. -	-
S. caespitosa De Candolle -	<i>Saponaria elegans</i> Lapeyrouse
S. calabrica Gussone -	-
S. chloraefolia Kunze -	Saponaria chlorifolia Kunze / <i>Cucubalus chloraefolius</i> Poir / <i>Silene perfoliata</i> Otth /
S. cypria Boissier -	<i>Saponaria cypria</i> Post
S. depressa Bivona -	<i>Saponaria caespitosa</i> Bivona in Rafinesque / Saponaria sicula Rafinesque / <i>Saponaria aetnensis</i> Rafinesque / <i>Silene armeria</i> Pall.
S. glutinosa M. Bieberstein -	<i>Saponaria depressa</i> Bivona. f. minor
S. haussknechti Simmler -	<i>Saponaria sicula</i> Rafinesque ssp. <i>haussknechti</i> Saponaria intricata Freyn
S. kotschyi Boissieu -	-
S. lutea Linné -	<i>Caryophyllus alpinus</i> Morison / <i>Betonica coronaria</i> J. Bauh. / <i>Cucubalus pumilio</i> Linné / <i>Lychnis pumilio</i> Scopoli / <i>Silene pumilio</i> Wulf in Jacq. / <i>Saponaria pumilio</i> Frenzl, A. Braun /
S. nana Fritsch -	Saponaria pumila Janchen, A. v. Hayek
S. ocymoides Linné -	<i>Saponaria minor</i> quibusdam Bauh. / <i>Lychnis vel Ocymoides repens montanum</i> Bauh. / <i>Bootia ocymoides</i> Neck. / <i>Saponaria repens</i> Lam. / <i>Saponaria alsinoides</i> Viv. <i>Smegmanthe ocymoides</i> Frenzl <i>Saponaria minor</i> quibusdam Bauh. <i>Lychnis vel Ocymoides repens montanum</i> Bauh.
S. officinalis Linné -	<i>Saponaria major laevis</i> Bauh. / <i>Saponaria vulgaris</i> Cam. / <i>Bootia vulgaris</i> Neck. / <i>Lychnis officinalis</i> Scopoli / <i>Saponaria nervosa</i> Gilib. / <i>Silene saponaria</i> Fries in Lindbl. / <i>Saponaria alluvionalis</i> Du Molin in Ö. <i>Saponaria officinarum</i> Ruprecht
S. pamphylica Boissieu -	-

S. prostrata Willdenow -	Saponaria prostrata Willdenow var. viscida Freyn und Sint. / Spanizium ocymoides Griseb. / Spanizium prostratum Saponaria holopetala Ledebour / Saponaria atocioides Boissier / Saponaria atocioides Boissier var. calverti / Saponaria calverti Boissier in Huet Saponaria pumilio Boissier
S. pulvinaris Boissier-	-
S. stenopetala Rechinger -	-
S. subrosularis Rechinger -	-
S. x wiemanni Fritsch -	Hybrid (S. caespitosa x S. lutea)
S. x olivana Wocke -	Hybrid (S. pumila x S. caespitosa)
S. x lempergii Wocke-	Hybrid (S. cypria x S. haussknechti)

Tabelle A2: Einteilung der Gattung *Saponaria* nach Simmler (1910)

Subgenus I: Saponariella SIMMLER

Sectio 1: Smegmathamnium FRENZL

1. Luteiflorae

*S. bellidifolia**S. lutea*

2. Pauciflorae

*S. caespitosa**S. nana* (= *S. pumila*)

3. Pulvinares

S. pulvinaris

Sectio 2: Kabylia SIMMLER

1. Glutinosae

S. glutinosa

2. Grandiflorae

S. depressa (= *S. sicula*)*S. cypria**S. haussknechti**S. intermedia**S. pamphylica*

Sectio 3: Bootia NECK.

1. Multiflorae

*S. calabrica**S. aenesia**S. graeca**S. dalmasi**S. mesogitana**S. ocymoides*

2. Latifoliae

S. officinalis (inclusive *S. bodeana*)

Subgenus II: Saporhizaea SIMMLER

Sectio 1: Proteinia SER.

1. Bifidae

*S. orientalis**S. syriaca**S. viscosa*

2. Tridentatae

S. tridentata

Sectio 2: Silenoides BIOSSIER

Subsectio 1: Cerastaria SIMMLER

1. Parviflorae

*S. chlorifolia**S. cerastoides**S. griffithiana*

2. Coarctatae

*S. parvula**S. sewerzowi*

Subsectio 2: Spanizium GRISEB.

*S. kotschyi**S. prostrata*

Tabelle A3: Ampilfizierte und Sequenzierte Sequenzen.

	ITS	tmK3914F	RP608F	RP969F	RP1460F	RP1810F	tmLaF	tmLcF	tmLeF	trnS	5'tmG2G
RPS 1											
RPS 2											
RPS 3											
RPS 4											
RPS 5											
RPS 6											
RPS 7											
RPS 8											
RPS 9											
RPS 10											
RPS 11											
RPS 12											
RPS 13											
RPS 14											
RPS 15											
RPS 16											
RPS 17											
RPS 18											
RPS 19											
RPS 20											
RPS 21											
RPS 22											
RPS 23											
RPS 24											
RPS 25											
RPS 26											
RPS 27											
RPS 28											
RPS 29											
RPS 30											
RPS 31											
RPS 32											
RPS 33											
RPS 34											
RPS 35											
RPS 36											
RPS 37											
RPS 38											
RPS 39											
RPS 40											
RPS 41											

RPS 42												
RPS 43												
RPS 44												
RPS 45												
RPS 46												
RPS 47												
RPS 48												
RPS 49												
RPS 50												
RPS 51												
RPS 52												
RPS 53												
RPS 54												
RPS 55												
RPS 56												
RPS 57												
RPS 58												
RPS 59												
RPS 60												
RPS 61												
RPS 62												
RPS 63												
RPS 64												
RPS 65												
RPS 66												
RPS 67												
RPS 68												
RPS 69												
RPS 70												



Abbildung A1: *S. pumila*, Habitus



Abbildung A2: *S. pumila*, Blüte



Abbildung A3: *S. ocymoides*, Habitus



Abbildung A4: *S. ocymoides*, Blüte



Abbildung A5: *S. bellidifolia*, Habitus



Abbildung A6: *S. bellidifolia*, Blüte



Abbildung A7: *S. caespitosa*, Habitus



Abbildung A8: *S. caespitosa*, Blüte



Abbildung A9: *S. x olivana*, Habitus



Abbildung A10: *S. x olivana*, Blüte



Abbildung A11: *S. lutea*, Habitus



Abbildung A12: *S. lutea*, Blüte

(11, 12: www.funghiitaliani.it/index.php?showtopic=24682)

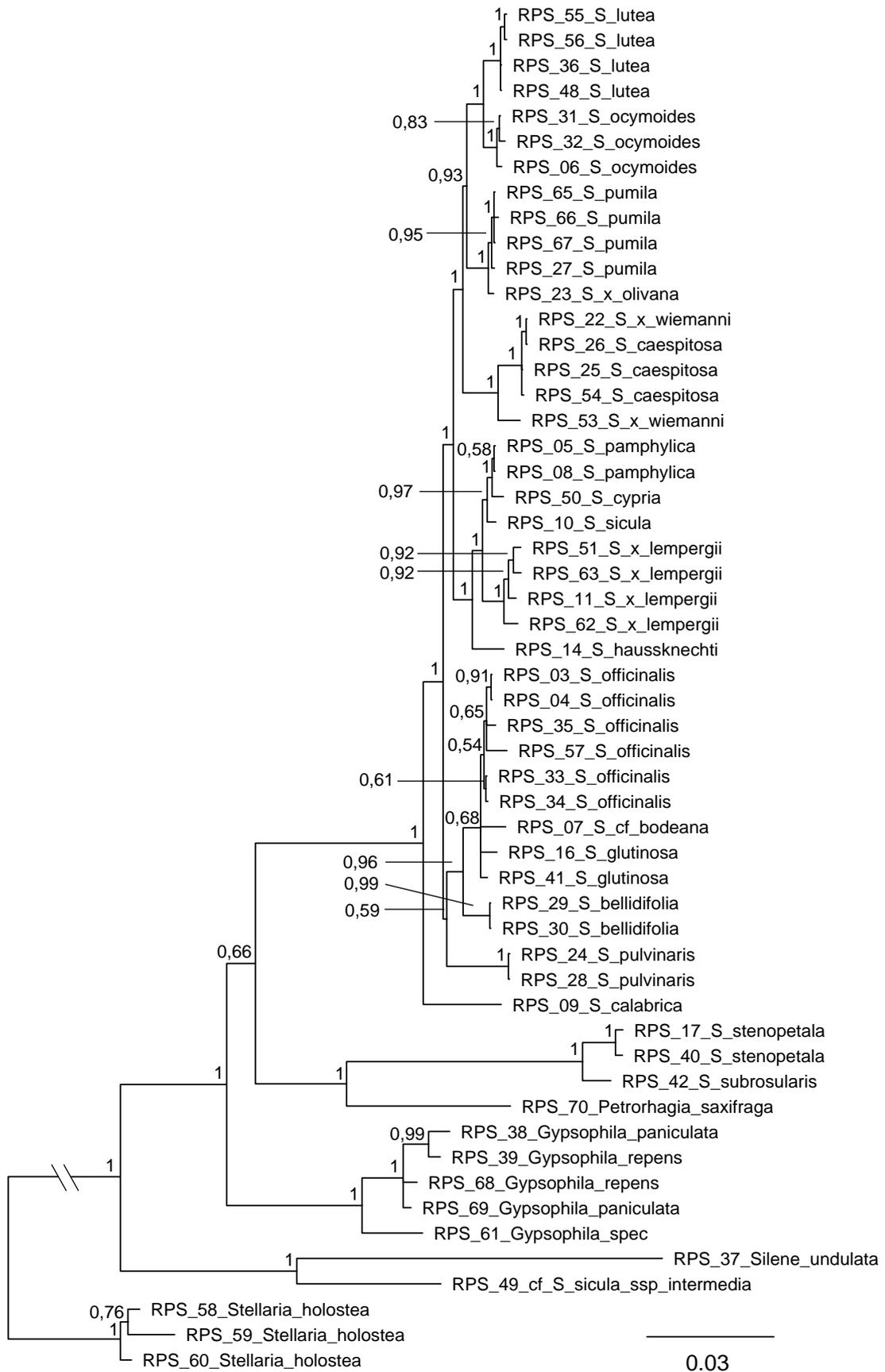


Abbildung A13: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von Sequenzen aller vier Marker nach Bayes (MrBayes). Die zugehörigen Posteriorwahrscheinlichkeiten ($\geq 0,5$) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.



Abbildung A14: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von trnL-F-Sequenzen nach Bayes (MrBayes). Die zugehörigen Posteriorwahrscheinlichkeiten ($\geq 0,5$) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

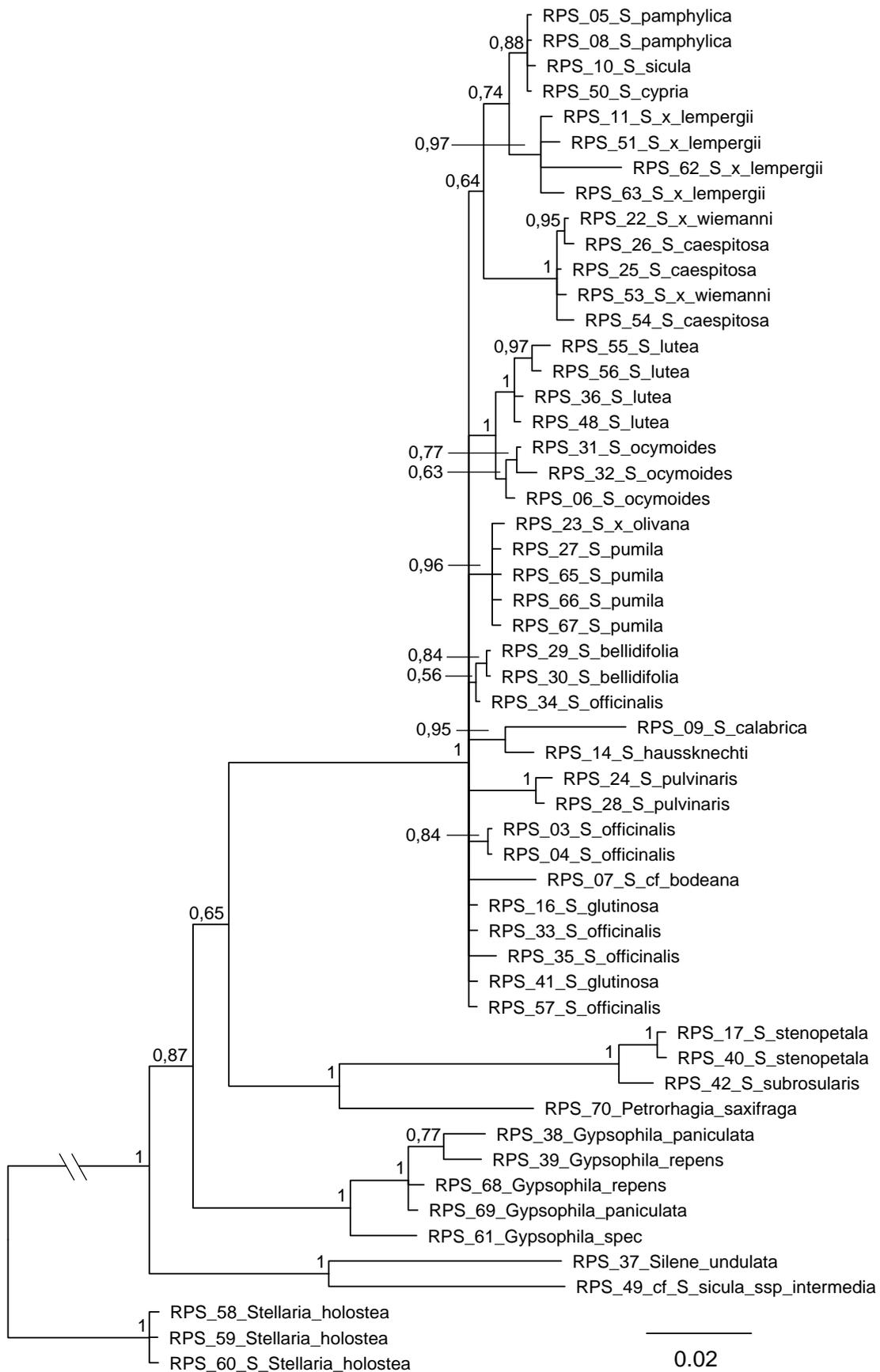


Abbildung A15: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von trnS-G-G-Sequenzen nach Bayes (MrBayes). Die zugehörigen Posteriorwahrscheinlichkeiten ($\geq 0,5$) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

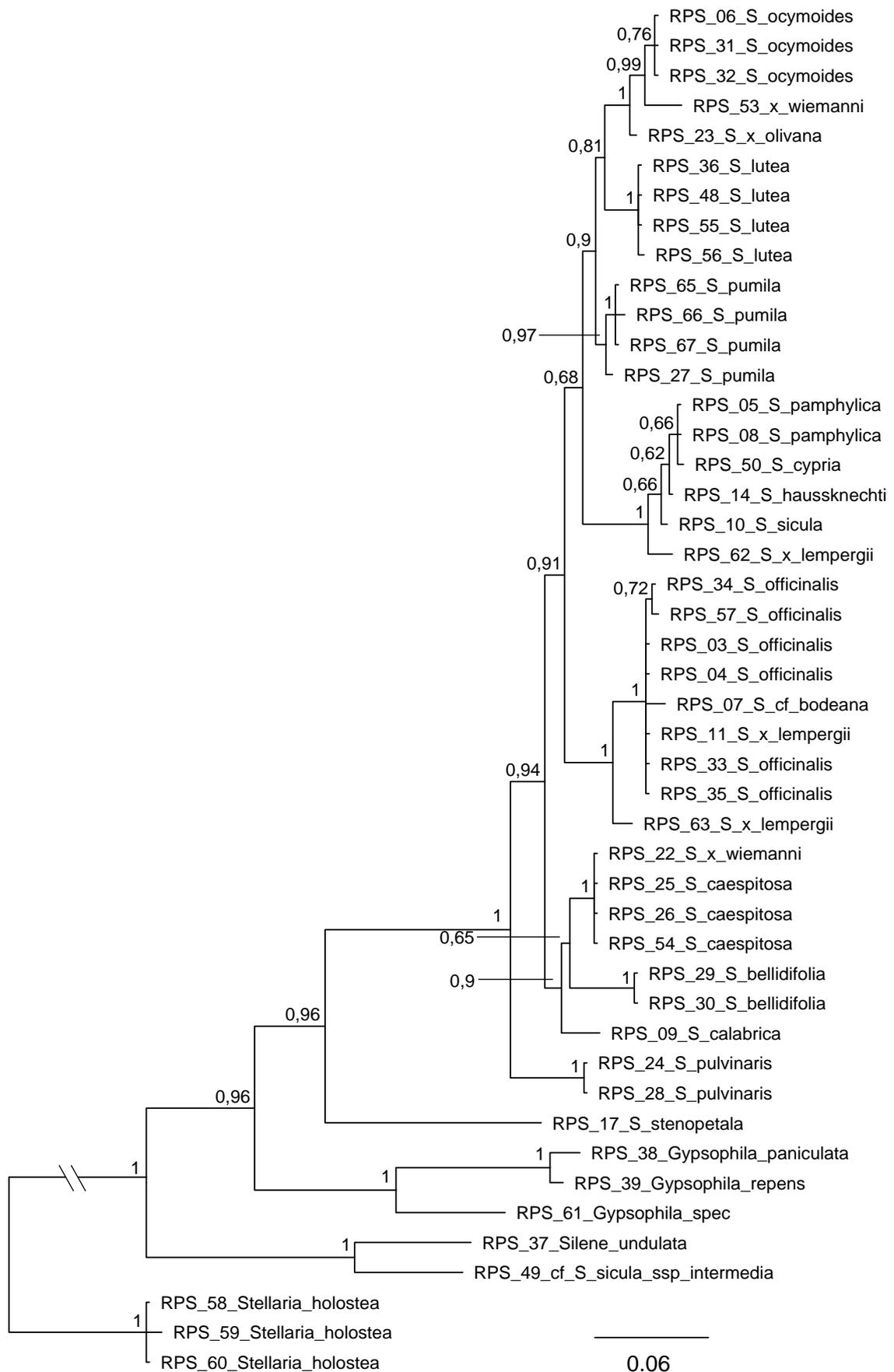


Abbildung A16: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von ITS-Sequenzen nach Bayes (MrBayes). Die zugehörigen Posteriorwahrscheinlichkeiten ($\geq 0,5$) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

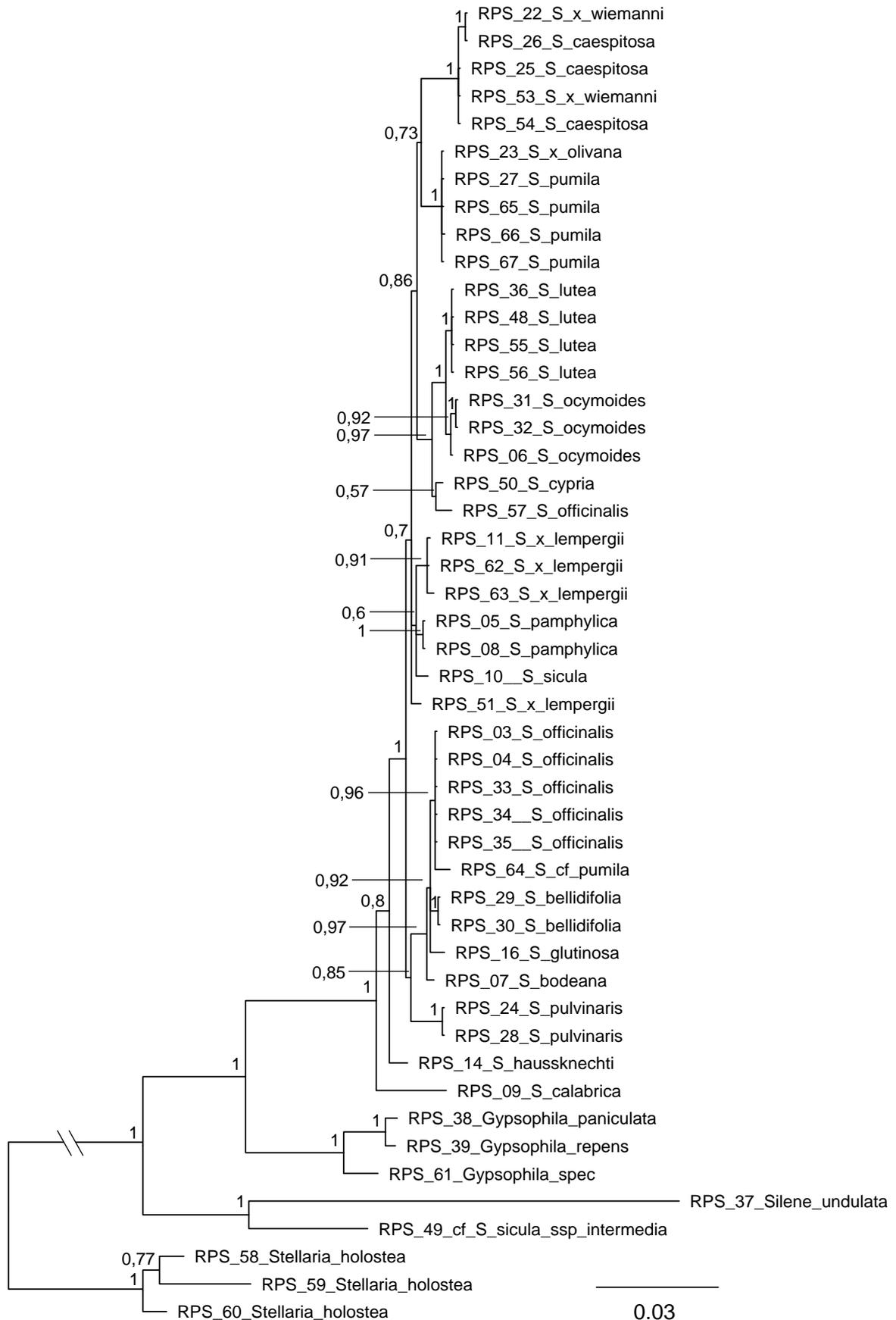


Abbildung A17: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von matK-Sequenzen nach Bayes (MrBayes). Die zugehörigen Posteriorwahrscheinlichkeiten ($\geq 0,5$) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

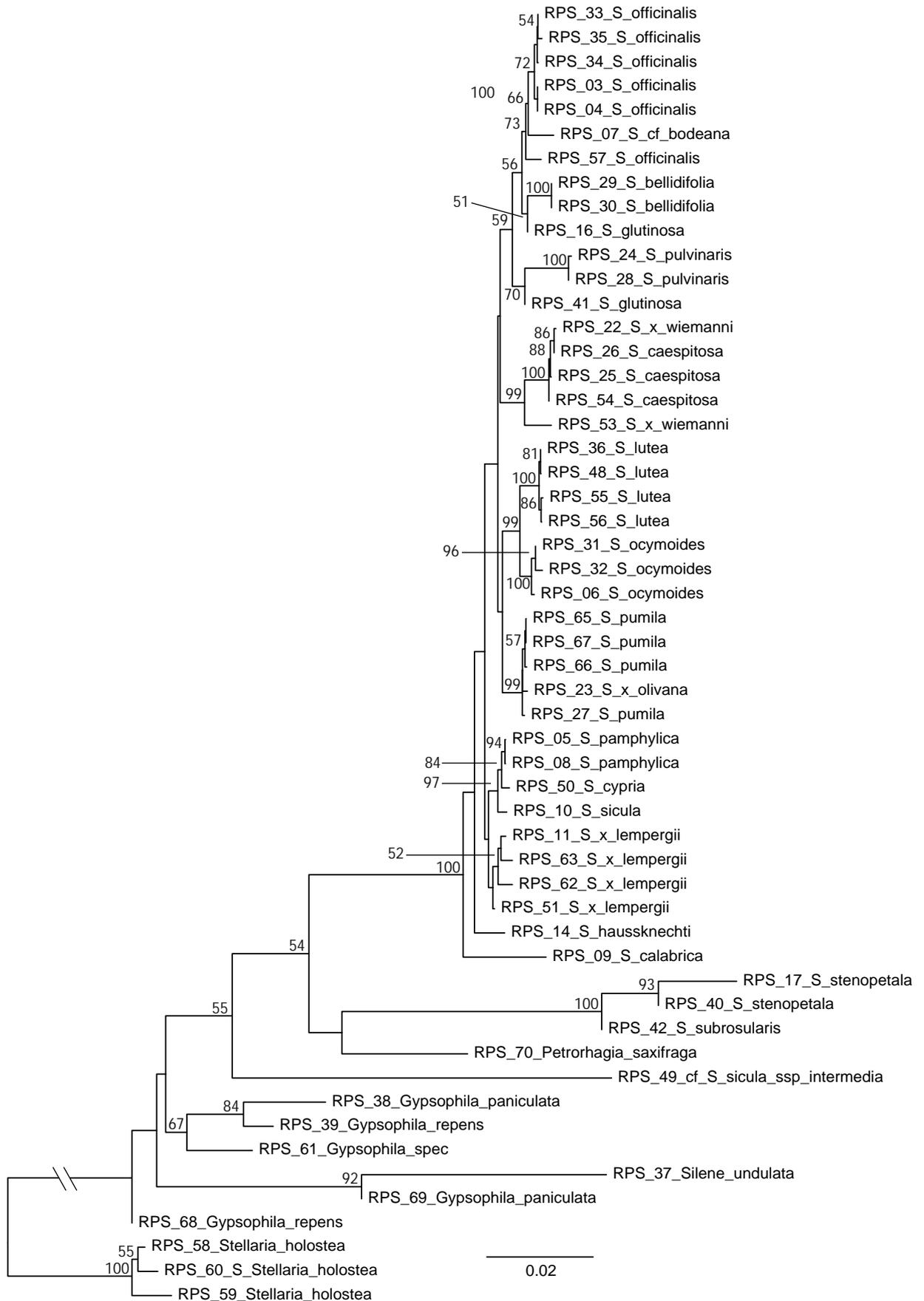


Abbildung A18: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von Sequenzen aller vier Marker nach Neighbour Joining (PAUP). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

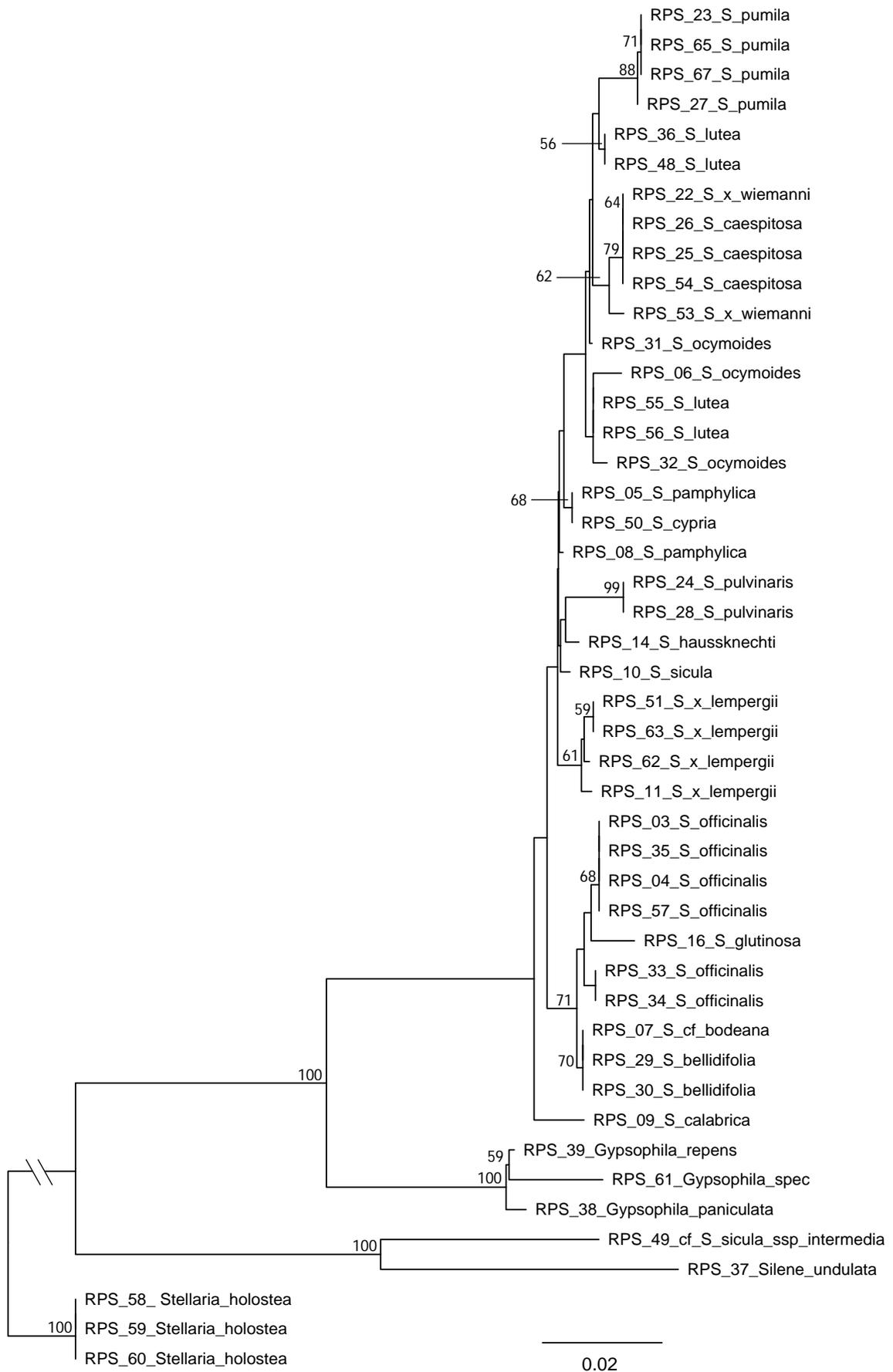


Abbildung A19: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von trnL-F-Sequenzen nach Neighbour Joining (PAUP). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

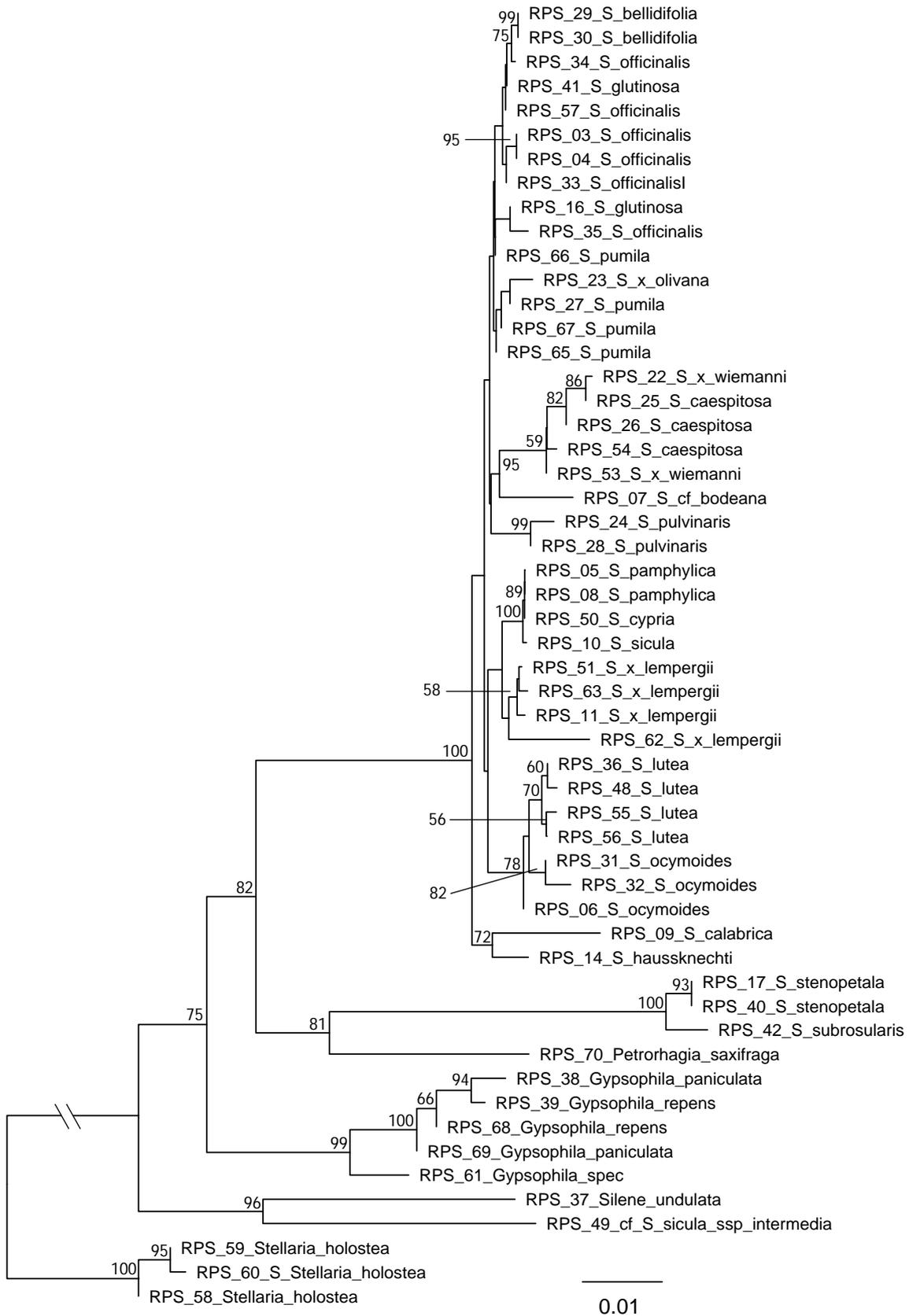


Abbildung A20: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von trnS-G-G-Sequenzen nach Neighbour Joining (PAUP). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

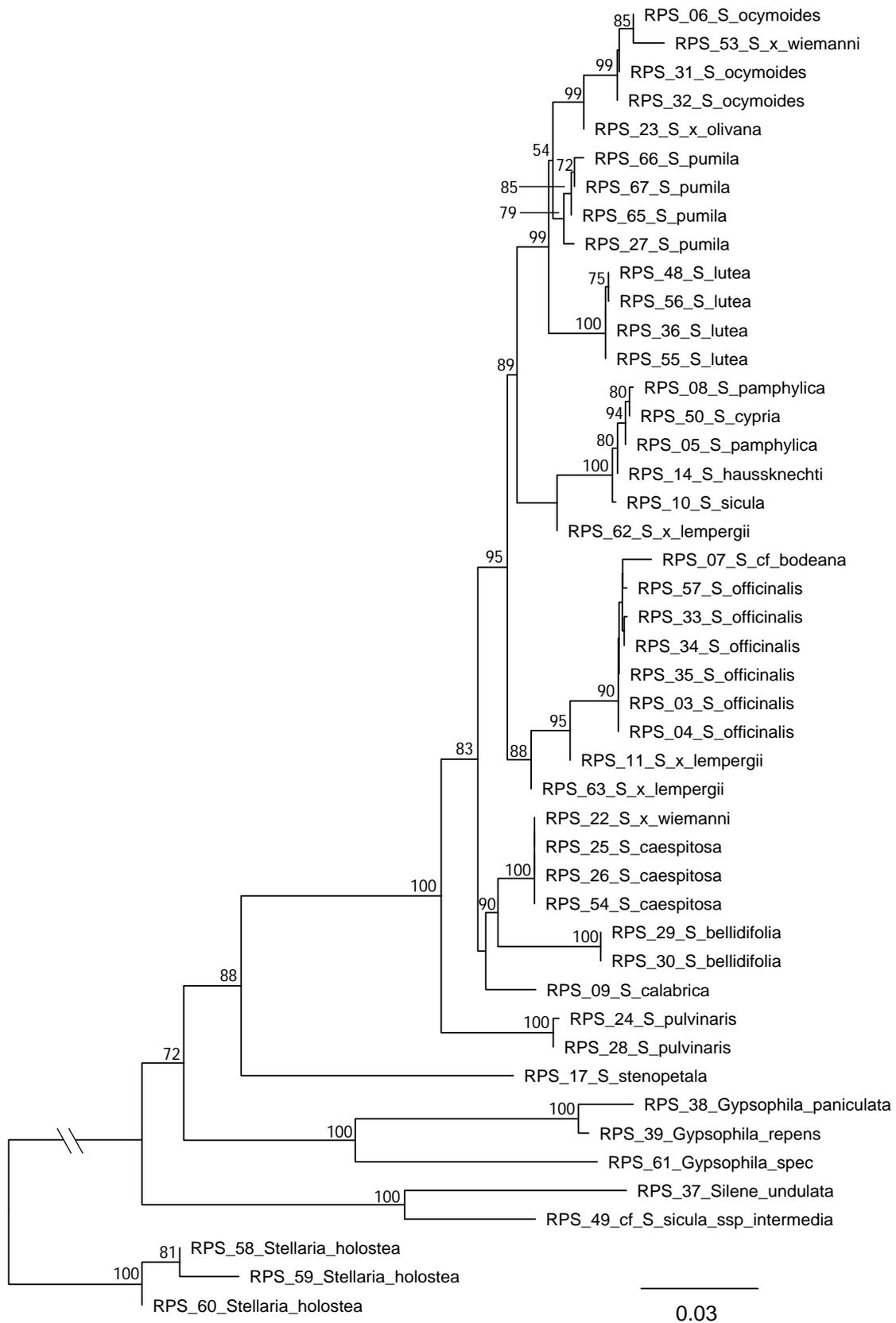


Abbildung A21: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von ITS-Sequenzen nach Neighbour Joining (PAUP). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

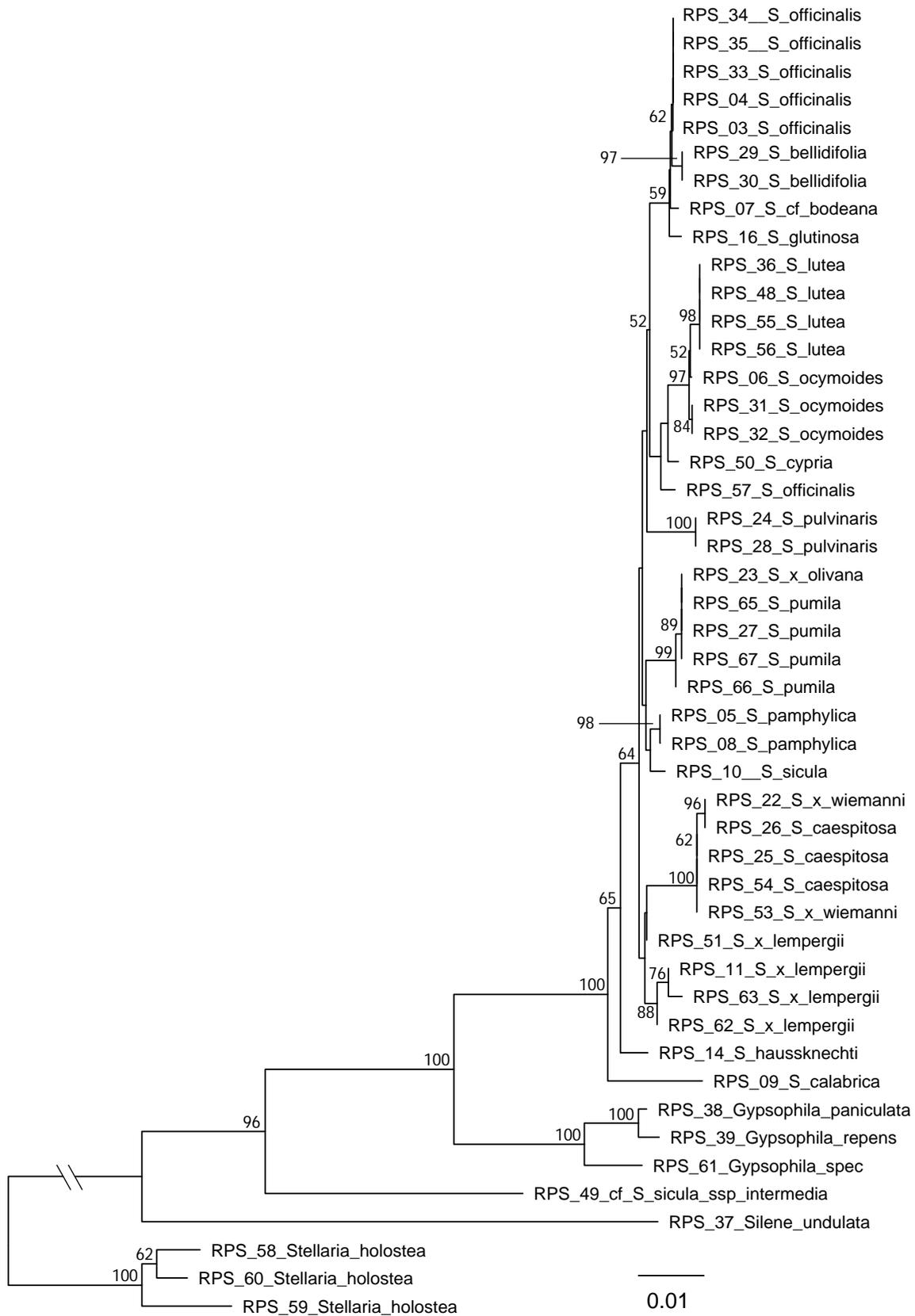


Abbildung A22: Phylogenetische Beziehungen der Gattung *Saponaria* auf der Basis von matK-Sequenzen nach Neighbour Joining (PAUP). Die zugehörigen *bootstrap*-Werte (≥ 50) sind an den Verzweigungen angegeben. Die Astlängen sind nach der Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Merkmal skaliert.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dominik Begerow für die außerordentliche wissenschaftliche und persönliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Vor allem gedankt sei für die Betreuung des „außerirdischen“ Themas, welches meiner Faszination für das Reich der Pflanzen und der marginalen Abneigung gegenüber Pilzen Rechnung trägt.

Meiner Koreferentin Frau PD Dr. Claudia Distler-Hoffmann danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit, obwohl außnahmeweise keine Tiere darin vorkommen.

Für die gute Betreuung vor allem in der Auswertungs- und Schreibphase danke ich Dr. Martin Kemler, der zu diesem Zeitpunkt schon die Sonne Südafrikas genießen darf.

Bedanken möchte ich mich außerdem

bei Dr. Angela Maria Schäfer, die sich zuerst als hervorragende S-Block-Betreuerin, dann als Ideengeberin und schließlich als nie versiegende Quelle guter Laune an dieser Arbeit maßgeblich beteiligt hat;

bei Dr. Andrey Yurkov, der durch Einbringung immer wieder neuer Themen und Aspekte meinen Horizont weit über das Arbeitsthema hinaus erweitert hat;

bei Dr. Wolfgang Maier, der durch sein ausgelassenes (wenn auch manchmal etwas chaotisches) Wesen das Arbeitsklima belebt hat;

bei Ilse Weßel, die mir im Labor oft zur Seite stand;

bei Ronny Kellner, dessen unbeirrbarer Scharfsinn die Wissenschaftlichkeit meiner Überlegungen gewahrt hat;

bei Sabine Kühle, die mir eine Menge Schreibkram, vor allem bei der Beschaffung der Pflanzen, abgenommen hat;

und bei allen studierenden Leidensgenossen in der AG, die zahlreiche Kaffeepausen, Exkursionen, Ausflüge und Meetings zusammen mit mir verbracht haben.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich nicht nur bei dieser Arbeit wesentlich gefördert, sondern während des ganzen Studiums unterstützt haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die heute eingereichte Diplomarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Bei der vorliegenden Diplomarbeit handelt es sich um vier in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Erstgutachter ist:

Prof. Dr. Dominik Begerow

Als Zweitgutachterin schlage ich vor:

PD Dr. Claudia Distler-Hoffmann

Bochum, den 03.11.2010

René Prior