

***Scrophularia neesii* und *Scrophularia umbrosa* in Deutschland – ähnliche Ökologie, aber unterschiedliche Verbreitung zweier Sippen eines Autopolyploidie-Komplexes**

THOMAS GREGOR, MARKUS S. DILLENBERGER, MARCO SCHMIDT, RALF HAND, ANJA ABDANK, REINHARD BÖCKER, PETER CIONGWA, WOLFGANG DIEWALD, FRANZ G. DUNKEL, WOLFGANG EHMKE, PAUL FINUS, DIETER FRANK, STEFFEN HAMMEL, ALEXANDER HOFSTETTER, MICHAEL HOHLA, EGGERT HORST, HEINO JOHN, JÜRGEN KLOTZ, MARION KORSCH, RENÉ MAUSE, LENZ MEIEROTT, FRANK MÜLLER, FRIEDRIKE MÖBIUS, MARKUS PEINTINGER, HANS REICHERT, HEIKE RINGEL, RUDI SCHNEIDER, CHRISTOF NIKOLAUS SCHRÖDER, IRENE TIMMERMANN-TROSIENER & SABINE MUTZ

Zusammenfassung: *Scrophularia neesii* und *S. umbrosa* ließen sich durch relative Messung des DNA-Gewichtes mit Durchflusszytometrie sicher unterscheiden. Hybriden wurden nicht gefunden. *S. neesii* ist die weiter verbreitete Sippe mit einem Vorkommensschwerpunkt in Süddeutschland sowie in Teilen Westdeutschlands, *S. umbrosa* ist dagegen in Norddeutschland die häufigere Sippe. Nach unseren Daten ergibt sich eine leichte ökologische Differenzierung zwischen beiden Sippen: *S. neesii* besiedelt eher Gebiete mit niedrigeren Temperaturen und höheren Niederschlägen. *S. umbrosa* kommt signifikant häufiger an Flüssen vor, wogegen *S. neesii* deutlich häufiger Gräben und Bäche besiedelt. Beide Arten wachsen bevorzugt an Ufern von Fließgewässern, Funde an Stillgewässern sind selten. Die phylogenetische Verwandtschaft von *S. neesii* und *S. umbrosa* sowie der Ursprung von *S. neesii* wurden mit Hilfe von zwei DNA-Markern (Kerngenom: ITS – Genotyp; Plastidengenom: *trnQ-rps16* – Haplotyp) an sechs Pflanzen von *S. neesii*, fünf Pflanzen von *S. umbrosa* und zwei Pflanzen von *S. auriculata* untersucht. Die Frage, ob *S. neesii* autopolyploid aus *S. umbrosa* hervorgegangen ist oder hybridogen aus *S. umbrosa* und *S. auriculata*, lässt sich danach zwar nicht absolut sicher beantworten, jedoch zeigen beide Marker eine nahe Verwandtschaft von *S. neesii* zu allen Proben von *S. umbrosa*. Dies macht eine autopolyploide Entstehung aus *S. umbrosa* wahrscheinlich.

Abstract: *Scrophularia neesii* and *S. umbrosa* in Germany – similar ecology but different distribution of two taxa of an autopolyploidy complex. *Scrophularia neesii* and *S. umbrosa*

could be reliably differentiated by relative measurement of DNA weight using flow cytometry. No hybrids were found. *S. neesii* is more frequent with a distribution focus in southern Germany and parts of western Germany, whereas *S. umbrosa* is more frequent in northern Germany. According to our results, there is a slight ecological differentiation between the two taxa: *S. neesii* is more likely to colonize areas with lower temperatures and higher precipitation. *S. umbrosa* occurs more frequently along rivers, whereas *S. neesii* is more likely to settle ditches and streams. Both species preferentially colonize the banks of running waters, records on lakes or ponds are rare. The phylogenetic relationship of *S. neesii* and *S. umbrosa* as well as the origin of *S. neesii* was investigated using two DNA markers (nuclear genome: ITS – genotype; plastid genome: *trnQ-rps16* – haplotype) on 6 plants of *S. neesii*, 5 plants of *S. umbrosa* and 2 plants of *S. auriculata*. Although the question of whether *S. neesii* is an autopolyploid of *S. umbrosa* or of hybrid origin from *S. umbrosa* and *S. auriculata* cannot be answered with absolute certainty, both markers show a close relationship between *S. neesii* and all samples of *S. umbrosa*. An autopolyploid formation from *S. umbrosa* seems likely.

Thomas Gregor
Senckenberg Forschungsinstitut und
Naturmuseum – Abteilung Botanik
und molekulare Evolutionsforschung,
Senckenberganlage 25,
60325 Frankfurt am Main;
thomas.gregor@senckenberg.de

Markus S. Dillenberger
 Institut für Organismische und Molekulare
 Evolutionsbiologie,
 Johannes-Gutenberg-Universität, 55099 Mainz;
 dillenbe@uni-mainz.de

Marco Schmidt
 Senckenberg Biodiversität und Klima
 Forschungszentrum
 Daten und Modellierungszentrum
 Senckenberganlage 25,
 60325 Frankfurt am Main;
 mschmidt@senckenberg.de

Ralf Hand
 Winterfeldtstraße 25, 10781 Berlin;
 ralfhand@gmx.de

Anja Abdank
 Landesamt für Umwelt, Naturschutz und
 Geologie Mecklenburg-Vorpommern,
 Abteilung Naturschutz und Naturparke,
 Goldberger Straße 12, 18273 Güstrow;
 anja.abdank@lung.mv-regierung.de

Reinhard Böcker
 Osterwiesenstraße 3/3, 70794 Filderstadt;
 reinhard.boecker@uni-hohenheim.de

Peter Ciongwa
 Gesundbrunnen 6, 37154 Northeim;
 peter-cio@arcor.de

Wolfgang Diewald
 Stephanusweg 4, 94315 Straubing;
 diewald-botanik@t-online.de

Franz G. Dunkel
 Am Saupurzel 1, 97753 Karlstadt;
 f.g.dunkel@t-online.de

Wolfgang Ehmke
 Lindenstraße 2, 65232 Taunusstein;
 wolfgangehmke@aol.com

Paul Finus
 Alemannenstraße 1, 79379 Müllheim;
 pt.finus@yahoo.de

Dieter Frank
 Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt
 Reideburger Straße 47, 06116 Halle (Saale);
 dieter.frank@lau.mlu.sachsen-anhalt.de

Steffen Hammel
 Rathausstraße 44, 74391 Erligheim;
 hammel-erligheim@t-online.de

Alexander Hofstetter
 Alte Dorfstraße 6, 17509 Neu Boltenhagen;
 alexander.hofstetter@web.de

Michael Hohla
 Therese-Riggler-Straße 16,
 A-4982 Obernberg am Inn;
 m.hohla@eduhi.at

Eggert Horst
 Brückenstraße 29c, 25524 Itzehoe;
 eggert.horst@gmx.de

Heino John
 Nikolaus-Weins-Straße 10,
 06120 Halle (Saale);
 heino.john@yahoo.de

Jürgen Klotz
 Weinweg 45, 93049 Regensburg;
 jtk27@t-online.de

Marion Korsch
 Hamburger Straße 23, 19309 Lenzen;
 marion.korsch@naturwacht.de

René Mause
 Beginenstraße 7, 52062 Aachen;
 r_mause@gmx.de

Lenz Meierott
 Am Happach 43, 97218 Gerbrunn;
 lenz.jutta.meierott@t-online.de

Frank Müller
 TU Dresden, Institut für Botanik,
 01062 Dresden;
 frank.mueller@tu-dresden.de

Friederike Möbius
 Dorfstraße 11, 17235 Klein Trebbow;
 frimoe@gmx.de

Markus Peintinger
 Eidgenössische Forschungsanstalt WSL
 Zürcherstrasse 111, CH-8903 Birmensdorf;
 markus.peintinger@wsl.ch

Hans Reichert
Kohlweg 16, 66123 Saarbrücken;
reichert-trier@t-online.de

Heike Ringel
Uhlandstraße 1a, 17489 Greifswald;
heike.ringel@curculio.de

Rudi Schneider
Frankenstraße 5, 97900 Kulsheim;
rbschneider@gmx.net

Christof Nikolaus Schröder
Fliederstraße 15, 68535 Edingen-Neckarhausen;
cns@cnsflora.de

Irene Timmermann-Trosiener
Mühlenstraße 40, 23611 Bad Schwartau;
timtros@t-online.de

Sabine Mutz
Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für
Botanik, AG Wissemann
Heinrich-Buff-Ring 38, 35392 Gießen;
sabine.mutz@mikro.bio.uni-giessen.de

1. Einleitung

Auf die geringe Kenntnis der Verbreitung von *Scrophularia neesii* und *S. umbrosa* in Deutschland machte HAND (2019) aufmerksam. Um hier zu einer besseren Kenntnis zu gelangen, gründete sich eine Arbeitsgruppe „*Scrophularia*“ innerhalb der Gesellschaft zur Erforschung der Flora Deutschlands (GEFD). Da sich die beiden Sippen in ihren Chromosomenzahlen deutlich unterscheiden (GRAU 1976; <http://chromosomes.senckenberg.de>; <http://ccdb.tau.ac.il>) – *S. umbrosa* mit $2n = 26$, *S. neesii* mit $2n = 52$ –, lag es nahe, die Sippen mit Hilfe von Durchflusszytometrie zu unterscheiden.

Es ist schwierig in der Gattung *Scrophularia* Basiszahlen anzugeben. GRAU (1976) vermutet, „Das unter anderem aus der weiten Verbreitung zu vermutende relativ hohe Alter der Gattung *Scrophularia* macht es verständlich, wenn primitive diploide Chromosomenzahlen heute weitgehend fehlen und alte Basiszahlen wie $x = 7$ nur in Polyploidien, oft durch Aneuploidie verändert, auftreten. Diese Basis $x = 7$ könnte in Verbindung mit der ebenfalls möglichen $x = 6$

zur Bildung einer ersten sekundären Basis $x = 13$ geführt haben, die heute die Gattung weitgehend beherrscht. Aus dieser Basis eines zweiten Niveaus könnte sich die Gattung dann, wie oben geschildert, weiterentwickelt haben.“ Danach wäre *S. umbrosa* s. str. tetraploid und allopolyploid aus heute ausgestorbenen diploiden Arten mit der Basiszahl $x = 6$ und $x = 7$ entstanden. Zumeist wird aber *S. umbrosa* s. str. als diploid mit einer Basiszahl von $x = 13$ angegeben.

HAND (2019) wies bereits darauf hin, dass es zwei konkurrierende Theorien über den Ursprung der tetraploiden *S. neesii* gibt, die bisher nicht weiter untersucht wurden. Während VAARAMA & HIIRSALMI (1967) durch Kreuzungsexperimente zwischen *S. umbrosa* s. str. und *S. auriculata* ($2n = 78$) Hybriden erzeugen konnten, die morphologisch und zytologisch *S. neesii* stark ähneln, bezweifelt GRAU (1976) deren Ergebnisse und nimmt einen autopolyploiden Ursprung für *S. umbrosa* an.

Der Verbreitung der beiden Sippen in Deutschland wurde durch durchflusszytometrische Untersuchungen von möglichst aus verschiedenen Teilen Deutschlands stammenden Pflanzen nachgegangen. Zur Aufklärung des Ursprungs von *S. neesii* wurden molekular-genetische Methoden eingesetzt. Anhand der ermittelten Arealdaten wurde die Verbreitung in Deutschland modelliert.

2. Methode

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden am 27.5.2019, 17.6.2019, 15.7.2019, 27.8.2019 und 16.9.2019 an der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Arbeitsgruppe Spezielle Botanik, Leitung Volker Wissemann, durchgeführt. Insgesamt beteiligten sich 38 Personen an den Aufsammlungen des Pflanzenmaterials. Bei der Beprobung wurde eine Abdeckung des Bundesgebietes angestrebt; sie war jedoch letztlich abhängig von der Bereitschaft zur Mitwirkung Ehrenamtlicher.

An einer von S. Hammel am 10.8.2019 gesammelten Pflanze (Baden-Württemberg; Landkreis Heilbronn, Beilstein, Birkenweg, am Ufer des Söhlbaches; 6921/42, 49,03864 N/9,31299 E) wurde eine Chromosomenzählung von T. Gregor mit der Standardmethode zur Chromosomenzählung durchgeführt (Wurzelspitzen

4 h in 0,5 % Colchicin-Lösung; 24 h in $\frac{3}{4}$ Alkohol und $\frac{1}{4}$ Essigsäure, 10 min in 1 M HCl, Anfärben mit Orcein-Essigsäure, Quetschpräparate untersucht bei 1000× Vergrößerung mit Ölimmersion mit einem Leica DM1000 LED Mikroskop).

Zur Bestimmung des relativen DNA-Gehaltes wurde frisches Blattmaterial (ca. 20 mg) in einer Petrischale unter Zugabe von Extraktionspuffer (Sysmex, Kobe, Japan) mit einer Rasierklinge zerkleinert. Dabei wurde das Probenmaterial parallel mit dem Material der Referenzpflanze (*Pisum sativum* cv. Ctirad) verarbeitet. Nach der mechanischen Behandlung wurden 500 µl Nuclei Extraction Buffer (sysmex 05-5002) zugegeben, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurden größere Gewebereste mittels Filtration (30 µm Porengröße) entfernt. Um die Beeinflussung störender Faktoren zu reduzieren, wurden die Lösungen gekühlt verwendet.

Die isolierten Zellkerne wurden mit 1 ml Farblösung (4',6-Diamidin-2-phenylindol; Sysmex) gefärbt. Der Farbstoff lagert sich dabei an der doppelsträngigen DNA in den an Adenosin und Thymin reichen Regionen an. Durch Anregung im Bereich von 365 nm Wellenlänge kommt es zur Emission im Bereich von 460 nm. Nach 30–60 s wurde diese im CyFlow® Ploidy Analyzer (Partec) analysiert. Es wurden mindestens 5 000 Messungen durchgeführt. In vier Fällen wurden Messungen aus unterschiedlichen Gründen wiederholt, ohne dass dies zu einer Änderung des Ergebnisses führte.

Das Hauptelement ist eine Durchflussskivette aus Quarzglas mit einem Kapillar-Durchmesser von 200 µm × 350 µm. Durch die Mikrokapillare werden kleinste Partikel, hier die Zellkerne, nacheinander einzeln durch das System transportiert. Dieser geordnete Partikelstrom wird durch den Wirkungsbereich eines Laserstrahls geleitet. Das emittierte Lichtsignal wird erfasst und von einem Photomultiplier verstärkt. Diese Methode ermöglicht eine Aussage über die Partikelgröße. Durch die Verwendung einer Referenzpflanze mit bekannter Genomgröße kann diese für die untersuchte Pflanze berechnet werden. Die Auswertung der Messungen wurde mit Flowing Software 2.5.1 (<http://flowingsoftware.btk.fi>) durchgeführt.

Zur Untersuchung möglicher Unterschiede in Hinblick auf klimatische Ansprüche beider Arten wurden die bekannten Verbreitungspunkte aller Funde (64 für *S. neesii*, 45 für *S. umbrosa*) mit makroklimatischen Daten in

1-km-Auflösung (worldclim.org, FICK & HIJMAN 2017) verschnitten und zu ausgesuchten Klimaparametern Mann-Whitney-U-Tests dieser Werte bei beiden Arten durchgeführt. Außerdem wurden auf der Basis der Verbreitungspunkte und der auf die Untersuchungsregion zugeschnittenen, in Worldclim enthaltenen bioklimatischen Daten Artverbreitungsmodelle mit Maxent v. 3.3.3 (PHILLIPS & al. 2006) erstellt. Dafür wurde der Median aus zehn Modellen errechnet, für die je 25 % der Verbreitungspunkte als Testdaten verwendet wurden.

Die phylogenetische Verwandtschaft und der Ursprung von *S. neesii* wurde mit Hilfe von zwei DNA-Markern an sechs Pflanzen von *S. neesii*, fünf Pflanzen von *S. umbrosa* und zwei Pflanzen von *S. auriculata* untersucht (siehe Tab. 1 im elektronischen Anhang). Zum einen wurde der Marker ITS (internal transcribed spacer) sequenziert, ein nicht-kodierender Teil der DNA, der zwischen ribosomalen Genen im Kerngenom liegt und standardmäßig für Phylogenien in der Botanik verwendet wird. Zum anderen wurde der Marker *trnQ-rps16* aus dem Plastidengenom sequenziert. Dieser Marker ist ein ebenfalls nicht-kodierender Teil der DNA, der zwischen den Genen für eine tRNA (für Glutamin) und für das ribosomale Protein 16S liegt. Die gesamte genomische DNA wurde mithilfe des DNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben mit geringfügigen Modifikationen extrahiert. ITS wurde mit den Primern ITS-17SE und -26SE (SUN & al. 1994) in einer PCR amplifiziert. Die 25-µl-Reaktionsansätze bestanden aus 2,5 µl Polymerase-Puffer, 4 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 80 µg/ml bovinem Serumalbumin, jeweils 1 µM Primer und 0,05 U/µl Taq-Polymerase. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 2 min bei 95 °C, dann 30 Wiederholungen von 30 s bei 95 °C, 30 s bei 59 °C und 2 min bei 72 °C, anschließend einmalig 72 °C für 10 min.

Der Marker *trnQ-rps16* wurde mithilfe der Primer *trnQ*^(UUG) und *rps16x1* (SHAW & al. 2007) entsprechend den Angaben in DILLENBERGER & KADEREIT (2017) amplifiziert. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte enzymatisch mit ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) entsprechend den Herstellerangaben. Die Produkte wurden bei StarSeq (Mainz, Deutschland) sequenziert. Die resultierenden Sequenzen wurden per Hand überprüft, aligniert und verglichen. Die Datensätze wurden

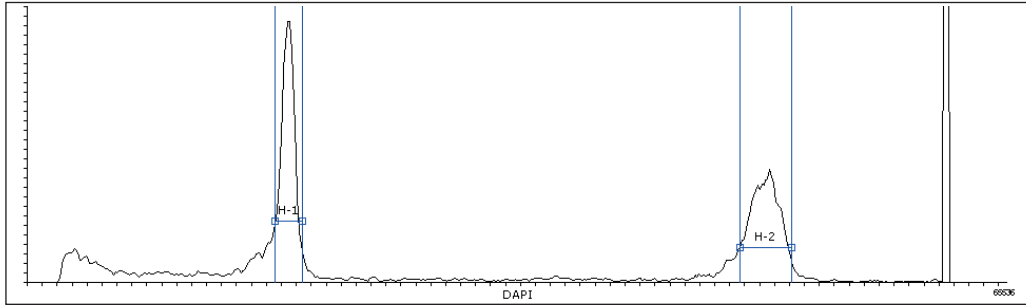


Abb. 1: Durchflusszytometrie für eine von Michaela Berghofer am 22.5.2019 am Rickenbach im Stadtgebiet von Lindau (Bayern) gesammelten *Scrophularia-neesii*-Pflanze. Mittelwert des „H1-Peaks“ von *S. neesii* bei 15712, Mittelwert des „H2-Peaks“ von *Pisum sativum* bei 44360; H1/H2 = 0,35. 1 Strich auf x-Achse = 1 000. – Flow cytometry for a *S. neesii* plant collected by Michaela Berghofer on 22.5.2019 at the Rickenbach in the urban area of Lindau (Bavaria). Mean value of the “H1-peak” of *S. neesii* at 15712, mean value of the “H2-peak” of *Pisum sativum* at 44360; H1/H2 = 0.35. 1 line on x-axis = 1 000.

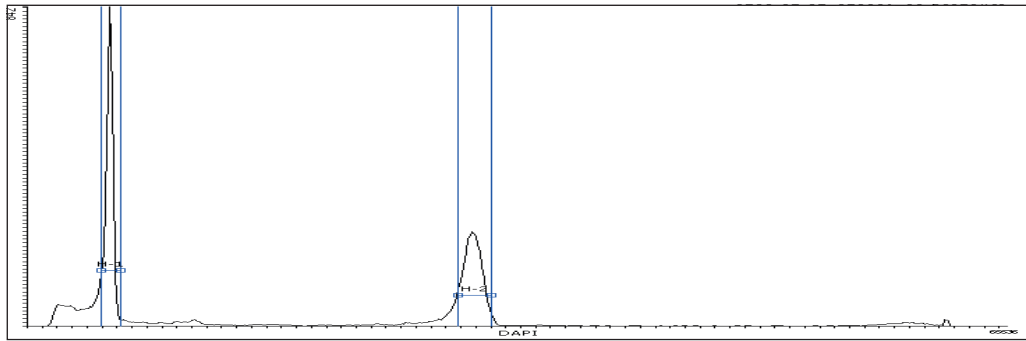


Abb. 2: Durchflusszytometrie für eine von Peter Ciongwa am 11.6.2019 in einem Graben westlich von Northeim (Niedersachsen) gesammelte *Scrophularia-umbrosa*-Pflanze. Mittelwert des „H1-Peaks“ von *S. umbrosa* bei 5499, Mittelwert des „H2-Peaks“ von *Pisum sativum* bei 29823; H1/H2 = 0,18. 1 Strich auf x-Achse = 1 000. – Flow cytometry for a *S. umbrosa* plant collected by Peter Ciongwa on 11.6.2019 in a ditch west of Northeim (Lower Saxony). Mean value of the “H1 peak” of *S. umbrosa* at 5499, mean value of the “H2 peak” of *Pisum sativum* at 29823; H1/H2 = 0.18. 1 line on x-axis = 1 000.

mit bereits publizierten Sequenzen von *Scrophularia* ergänzt, mit MAFFT v7.402 (KATO & STANDLEY 2013) automatisch aligniert, und Maximum-likelihood-Stammbäume für ITS und *trnQ-rps16* wurden mit RAXML v.8.0.26 (STAMATAKIS & al. 2008) unter dem GTR+Γ-Modell berechnet, wobei die Berechnung der Bootstrap-Unterstützungswerte automatisch gestoppt wurde. Als Außengruppe wurde *Antirrhinum majus* verwendet. Außerdem wurde eine Netzwerkanalyse mit Splittree v.4.14.2 (HUSON & BRYANT 2006) mit dem NeighborNet-Algorithmus und 1 000 Bootstrap-Replikaten durchgeführt. Alle generierten Sequenzen wurden bei GenBank¹ (Tab. 1) hinterlegt.

3. Ergebnisse

S. neesii und *S. umbrosa* erwiesen sich als gut geeignet für Durchflusszytometrie. Gegenüber dem Standard *Pisum sativum* betrugen die Probe-Standard-Verhältnisse 0,18 (Standardabweichung 0,1) und 0,36 (Standardabweichung 0,1). 42 Pflanzen wurden *S. umbrosa* und 69 Pflanzen *S. neesii* zugeordnet (Tab. 1 im elektronischen Anhang). Triploide Hybriden wurden selbst bei gemeinsamen oder räumlich eng benachbarten Vorkommen beider Taxa nicht gefunden. Die Chromosomenzählung einer Pflanze von *S. neesii* aus Baden-Württemberg (Landkreis Heilbronn, Beilstein, Birkenweg, am Ufer des Söhlbaches) ergab $2n = 52$ (siehe Kapitel 2).

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

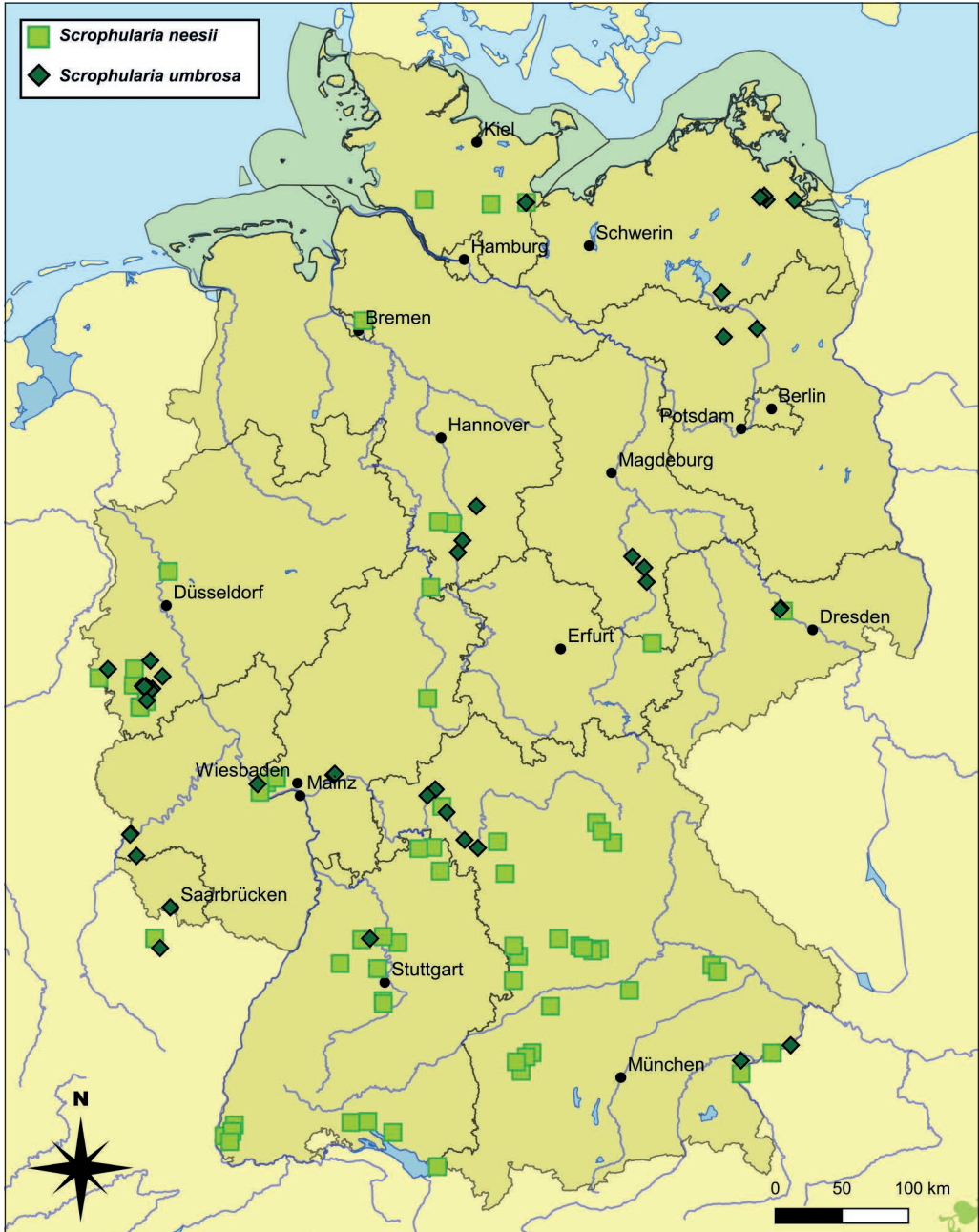


Abb. 3: Zytologisch geprüfte *Scrophularia-neesii*- und *S.umbrosa*-Pflanzen in Deutschland; Kartographie: C. N. Schröder. – Cytologically tested *S. neesii* and *S. umbrosa* in Germany.

Die Abb. 3 zeigt die geographische Verteilung der gemessenen Pflanzen von *S. neesii* und *S. umbrosa* in Deutschland und angrenzenden Gebieten.

Der Vergleich der Klimaparameter an den Fundorten beider Arten zeigt geringe, aber statistisch relevante Unterschiede (Abb. 4). *S. neesii* tritt bei niedrigeren Temperaturen und höheren Niederschlägen als *S. umbrosa* auf. Auch in den Verbreitungsmodellen beider Arten (Abb. 5) zeigen sich Unterschiede. Die Vorkommenswahrscheinlichkeit von *S. neesii*

ist am höchsten in Süddeutschland, bei *S. umbrosa* im Mittelgebirgsraum und im Nordosten.

Die Phylogenie des internal transcribed spacers (ITS) zeigt, dass vier *S.-neesii*-Proben (Sne1, 3, 5, 6) gut gestützt mit einem Bootstrap-Unterstützungswert (BS) von 90 % mit sechs Proben von *S. umbrosa* gruppieren (Abb. 6). Die Probe Sne4 von *S. neesii* bildet eine Klade (BS 95 %) mit vier ITS-Kopien von *S. auriculata*. Alle weiteren *S.-auriculata*-Sequenzen finden sich in einer anderen Klade, die mit einem BS von 81 % gestützt ist (Abb. 6).

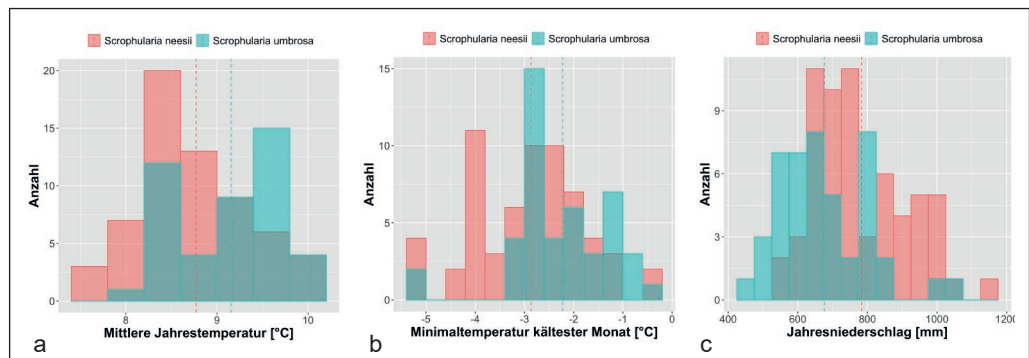


Abb. 4: Histogramme der Klimawerte an den Fundorten beider *Scrophularia*-Arten mit Mittelwerten (gestrichelte Linie). (a) Mittlere Jahrestemperatur, (b) Minimaltemperatur des kältesten Monats, (c) Jahresniederschlag. Für alle drei Klimaparameter sind die Werte der beiden Arten signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,01$). – Histograms of climate values at the sites of both *Scrophularia* species with mean values (dashed line). (a) mean annual temperature, (b) minimum temperature of the coldest month, (c) annual precipitation. For all three climate parameters the values of the two species are significantly different (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,01$).

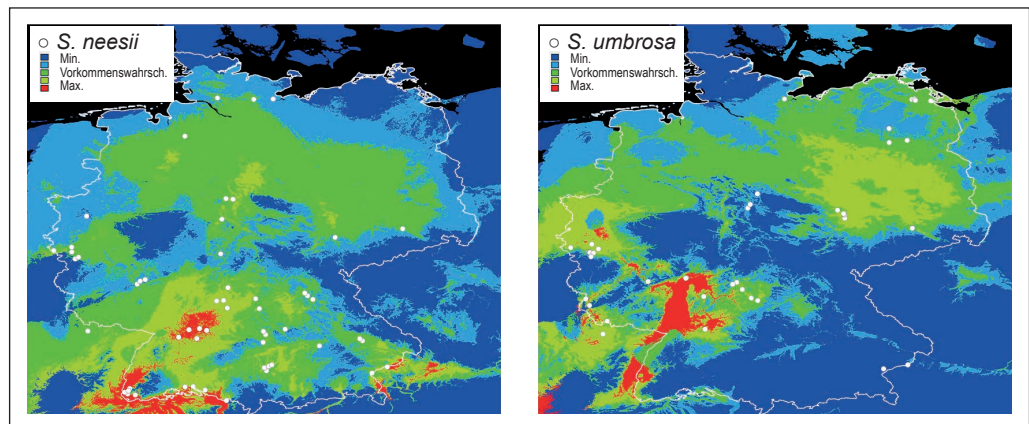


Abb. 5: Verbreitungsmodelle beider *Scrophularia*-Arten. Der AUC-Wert für Testdaten lag für *S. neesii* bei 0,777 und für *S. umbrosa* bei 0,820. – Distribution models of both *Scrophularia* species. The AUC value for test data was 0.777 for *S. neesii* and 0.820 for *S. umbrosa*.

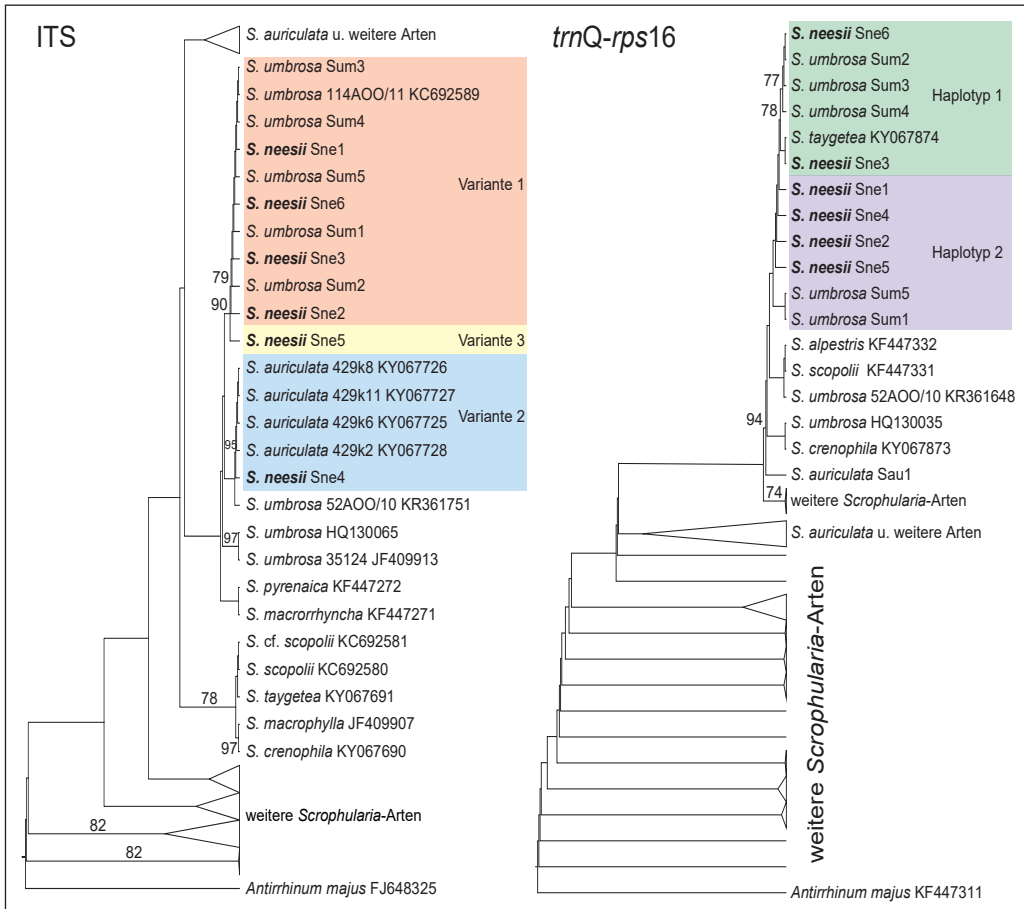


Abb. 6: Maximum-likelihood-Phylogenie von *Scrophularia* des nukleären Markers ITS und des Plastidenmarkers *trnQ-rps16*. Alle nicht relevanten Kladen wurden kollabiert, nur Bootstrap-Unterstützungswerte $\geq 70\%$ werden gezeigt. – Maximum likelihood phylogeny of *Scrophularia* of the nuclear marker ITS and the plastid marker *trnQ-rps16*. All irrelevant clades were collapsed, only bootstrap support values $\geq 70\%$ are shown.

Die Stammbaum-Berechnung mit RAXML zeigt für *trnQ-rps16* (Abb. 6), dass mehrere Arten mit *S. neesii* gruppieren. Eine gut gestützte Gruppe (BS 94 %) enthält alle Proben von *S. neesii*, *S. umbrosa*, *S. alpestris*, *S. crenophila*, *S. scopoli*, *S. taygetea* Boiss. und die Probe *S. auriculata* Sau1. Alle übrigen Proben von *S. auriculata* befinden sich in einer anderen großen Klade mit weiteren *Scrophularia*-Arten.

Der Vergleich der Sequenz-Daten von *S. neesii*, *S. umbrosa*, *S. auriculata* und anderen *Scrophularia*-Arten zeigt ein komplexes Bild. Für den kerngenomischen Marker ITS (Abb. 6 und 7, Tab. 2 im elektronischen Anhang) wurden in *S. neesii* drei verschiedene Varianten gefunden. Die erste Variante ist bei den Proben *S. neesii*

Sne1, 2, 3 und 6 zu finden, die in ihrer Sequenz identisch sind (mit der Ausnahme zweier Stellen in Sne2; Tab. 2). Im Vergleich mit *S. umbrosa* und *S. auriculata* ist diese ITS-Variante auch bei *S. umbrosa* Sum1 und 3 sowie abgesehen von 1–2 heterozygoten Stellen auch bei Sum2, 4 und 5 zu finden, die alle im Netzwerk zusammen gruppieren (Abb. 7). Alle sequenzierten *S.-auriculata*-Proben sowie alle auf GenBank verfügbaren Proben haben vier Stellen gemeinsam, die sie von der ersten ITS-Variante in *S. neesii* unterscheiden. Die ähnlichste *S.-auriculata*-Sequenz (KY067728; Tab. 2 im elektronischen Anhang) unterscheidet sich durch zwölf Punktmutationen und ein Indel von der ersten ITS-Variante von *S.-neesii*.

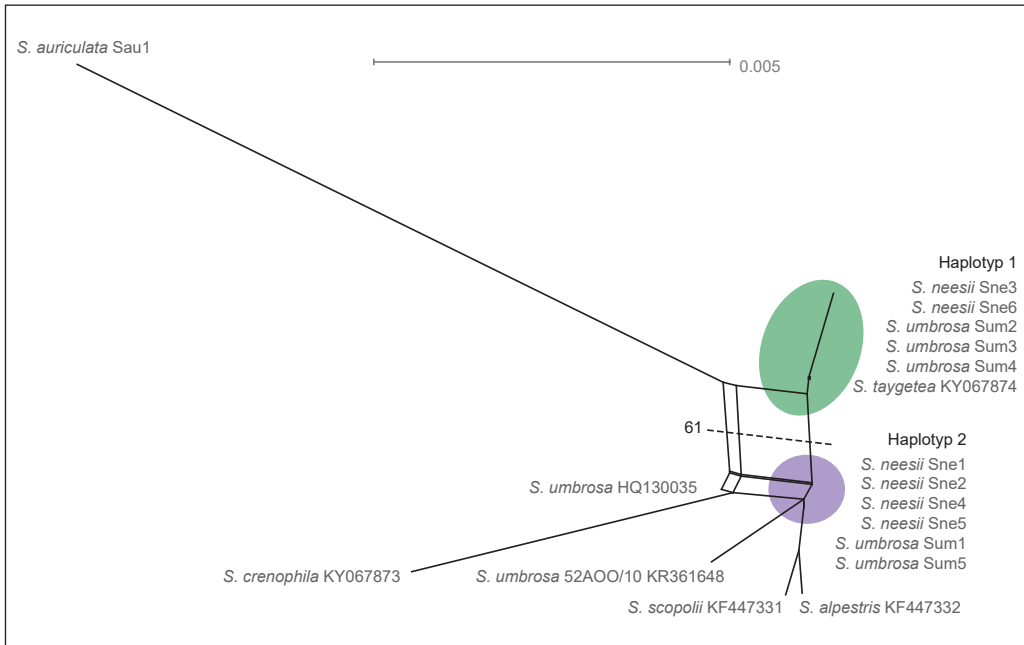


Abb. 8: Netzwerk der NeighborNet-Analyse der relevanten *Scrophularia*-Arten des plastidären Markers *trnQ-rps16*. Nur Bootstrap-Unterstützungswerte $\geq 60\%$ werden an den Hauptästen gezeigt. – Network of the NeighborNet analysis of the relevant *Scrophularia* species of the plastid marker *trnQ-rps16*. Only bootstrap support values $\geq 60\%$ are shown on main branches.

S. neesii Sne3 und 6 zu finden und ist identisch mit den Proben *S. umbrosa* Sum2, 3 und 4, sowie *S. taygetea*, einer Art aus Griechenland. Alle *S.-neesii*- und *S.-umbrosa*-Proben zeigen eine 235 bp-lange Deletion, die sie von allen *S.-auriculata*-Sequenzen unterscheiden, mit Ausnahme von *S. auriculata* Sau1 (Tab. 3). Des Weiteren haben alle *S.-auriculata*-Proben eine Deletion an Position 787–792, die sie vom ersten *trnQ-rps16*-Haplotypen unterscheiden. Die übrigen drei Arten, die im *trnQ-rps16*-Stammbaum mit *S. neesii* gruppieren, zeigen alle mindestens drei Punktmutationen, die sie von diesem Haplotyp unterscheiden (Tab. 3, gelb markiert). Im *trnQ-rps16*-Netzwerk (Abb. 8) gruppieren beide Haplotypen jeweils zusammen. Die relativ geringe Variation des Marker *trnQ-rps16* (Tab. 3) im Vergleich zu ITS (Tab. 2) ist auch an dem schlechter aufgelösten Stammbaum (Abb. 6) und dem wenig gestützten und weniger verzweigten Netzwerk (Abb. 8) zu erkennen.

Die Proben *S. neesii* Sne1, 2, 4 und 5 haben den zweiten Haplotypen gemeinsam. Dieser ist fast identisch mit den Sequenzen von *S. umbrosa* Sum1 und 5, abgesehen von einem Indel

an Position 787–792 (Tab. 3). Die ähnlichste *S.-auriculata*-Sequenz findet sich bei Sau1, welche ebenfalls die 235-bp-Deletion aufweist. Diese Probe unterscheidet sich vom zweiten *trnQ-rps16*-Haplotypen jedoch durch drei kleinere Indels und zehn Punktmutationen (Tab. 3, orange markiert). Die anderen vier Arten, die im Stammbaum mit *S. neesii* gruppieren, haben 1–5 Punktmutationen und zwei Indels als Unterschied zu diesem Haplotypen (Tab. 3, rot markiert).

4. Diskussion

In allen Fällen ließ sich das untersuchte Blattmaterial eindeutig zuordnen. Triploide Hybriden zwischen *S. neesii* und *S. umbrosa* wurden nicht gefunden. HAND (2019) fasste die Kenntnisse zur Verbreitung von *S. neesii* in Deutschland zusammen, diese können ergänzt werden:

Baden-Württemberg

Es konnte fast nur *S. neesii* nachgewiesen werden, 19 untersuchte Herkunft gehörten zu dieser Art. Eine Ausnahme machte ein Fund

von *S. umbrosa* südwestlich von Heilbronn in einem Wassergraben bei Güglingen-Frauenzimmern. Die Messergebnisse entsprechen den Verbreitungsübersichten in den Karten von Baden-Württemberg (WÖRZ & THIV 2020). Danach finden sich von *S. neesii*-Vorkommen im Neckarland, am südlichen Oberrhein, dem Südrand der Schwäbischen Alb mit einem (Kartier-)Schwerpunkt durch Harald Streitz in Oberschwaben. *S. umbrosa* kommt dagegen nur sehr zerstreut vor. Im Schwäbisch-Fränkischen Wald und in Hohenlohe scheinen beide Arten aufzutreten. Messungen aus diesem Gebiet sind bisher keine erfolgt.

Bayern

S. neesii ist deutlich häufiger als *S. umbrosa*. Von 31 Herkunftten gehörten nur 7 zu *S. umbrosa*. Diese stammten aus dem Uferbereich von großen Flüssen (5× Main, 1× Inn) und nur in einem Fall von einem Bachufer ca. 3 km vom Inn entfernt. Die Karten des Botanischen Informationsknotens Bayern² sind zum Teil wenig plausibel. Dort sind für *S. umbrosa* inselartige Areale im mittleren Schwaben, nördlichen Oberbayern (Raum Ingolstadt) und westlichen Niederbayern (Raum Landshut) verzeichnet. Die Karte für *S. neesii* ist dagegen deutlich plausibler und zeigt eine weite Verbreitung außerhalb der Hochlagen. Dies entspricht auch Beobachtungen von Wolfgang Diewald und Jürgen Klotz, wonach alle an der niederbayerischen Donau bzw. um Regensburg nach Blütenmerkmalen bestimmbaren Pflanzen zu *S. neesii* gehörten. Die Flora der Haßberge und des Grabfelds (MEIEROTT 2008) zeigt *S. neesii* als nicht selten mit einem Schwerpunkt in Flussauen.

Brandenburg

Zwei Herkunftten gehörten zu *S. umbrosa*.

Hessen

Von acht Herkunftten erwiesen sich fünf zu *S. neesii* gehörig und drei zu *S. umbrosa*. Letztere stammten von der Nidda, einem mittelgroßen Fluss, sowie von einem Bach. Damit ist

S. neesii für Hessen sicher bestätigt worden. Frühere, offensichtlich korrekte Angaben wurden in den letzten Jahrzehnten durchweg angezweifelt oder ignoriert (z. B. STARKE-OTTICH & al. 2019).

Mecklenburg-Vorpommern

Fünf Herkunftten gehören zu *S. umbrosa*. Bisher wurde nur *S. umbrosa* für dieses Bundesland angegeben (FUKAREK & HENKER 2005). Auch in der floristischen Datenbank des Landes (<https://www2.flora-mv.de>) sind nur Funde für *S. umbrosa* enthalten, die weit verbreitet im Land ist. Funde im angrenzenden Schleswig-Holstein bei Bad Schwartau lassen allerdings vermuten, dass *S. neesii* auch in Mecklenburg-Vorpommern vorkommt.

Niedersachsen

Je vier Herkunftten gehören zu *S. neesii* und *S. umbrosa*. Ein Fund von *S. neesii* erfolgte im Bereich der offenbar bisher einzigen Angabe für dieses Bundesland von BRANDES (1897). Die Sippe wurde in der Floristik des Bundeslandes in den letzten Jahrzehnten nicht beachtet; ihr Vorkommen ist nunmehr sicher bestätigt.

Nordrhein-Westfalen

18 Herkunftten gehören etwa zu gleichen Teilen zu *S. neesii* (8) und *S. umbrosa* (10). Allerdings stammten die Proben überwiegend aus dem Regierungsbezirk Köln, nur eine Probe von *S. neesii* stammt von der Ruhr bei Duisburg.

Rheinland-Pfalz

Drei Herkunftten gehören zu *S. umbrosa*. Allerdings wurden bekannte Vorkommensschwerpunkte der *S. neesii* nicht beprobt.

Saarland (und benachbartes Lothringen/Frankreich)

Eine Herkunftten gehört zu *S. umbrosa*. Grenz nah in Frankreich wurden hingegen beide Sippen nachgewiesen (HAND 2019). Vorkommen der *S. neesii* im Saarland sind also durchaus möglich.

Sachsen

Von drei Herkunftten gehören zwei zu *S. umbrosa* und eine zu *S. neesii*. Für letztere Art stellt der Fund von Frank Müller am Jahnabach bei Keilbusch im Kreis Meißen einen Erstnachweis für dieses Bundesland dar.

² *S. umbrosa*: http://daten.bayernflora.de/de/info_pflanzen.php?taxnr=6511&suchtext=Scrophularia%20um&g=&de=
S. neesii: http://daten.bayernflora.de/de/info_pflanzen.php?taxnr=6512&suchtext=Scrophularia%20um&g=&de=

Sachsen-Anhalt

Von vier Herkunftsnamen gehören drei zu *S. umbrosa* und eine zu *S. neesii*. Für letztere Art stellt der Fund von Dieter Frank am Flussufer der Weißen Elster einen Erstnachweis für dieses Bundesland dar.

Schleswig-Holstein

Von sechs Herkunftsnamen gehören zwei zu *S. umbrosa* und vier zu *S. neesii*. Auf das Vorkommen von *S. neesii* deutete bereits eine mit 2n ca. 52 gezählte Pflanze aus dem Schwentine-Tal bei Kiel (SCHEERER 1940). Ein Vorkommen an der Trave bei Kiel wurde bereits in KNUTH (1888) wahrscheinlich gemacht. Hier gelang Irene Timmermann-Trosiener der Nachweis des gemeinsamen Vorkommens beider Arten.

Österreich

In der „Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol“ (FISCHER & al. 2008) wird *S. u.* subsp. *umbrosa* aus allen österreichischen Bundesländern mit Ausnahme von Kärnten und Nordtirol angegeben; *S. u.* subsp. *neesii* kennt man aus Oberösterreich, Steiermark, Kärnten, Salzburg, Nordtirol und Vorarlberg, außerdem aus dem Fürstentum Liechtenstein. In Südtirol ist bisher keine der beiden Unterarten nachgewiesen (WILHALM & al. 2006).

In der „Flora der Steiermark“ werden von MAURER (1998) beide Unterarten unterschieden und viele Fundorte aufgezählt. In der „Flora von Nordtirol, Osttirol und Vorarlberg“ (POLATSCHEK & NEUNER 2013) wird *S. neesii* als Synonym von *S. umbrosa* verstanden. Im „Verbreitungsatlas der Farn- und Blütenpflanzen Kärntens“ (HARTL & al. 1992) wird lediglich eine Karte von *S. umbrosa* gezeigt. Im Bundesland Salzburg sei *S. u.* subsp. *neesii* nach LEEDER & REITER (1958) im Alpenvorland verbreitet; über rezente Funde in diesem Bundesland berichten STÖHR & al. (2002 & 2004).

S. neesii wurde in Österreich unter verschiedenen Namen bereits von Autoren des 19. Jahrhunderts von *S. umbrosa* unterschieden, so etwa im „Prodromus einer Flora des Kronlandes Salzburg“ von HINTERHUBER & HINTERHUBER (1851) oder in der „Flora von Oberösterreich“ (DUFTSCHMID 1883), ebenso von VIERHAPPER (1887) für den Innkreis in Oberösterreich. Die Autoren nennen eine Reihe von Fundorten, wo *S. neesii* zum Teil auch heute noch wächst. In Oberösterreich ist *S. neesii*

nach den Erfahrungen von Michael Hohla heute häufiger als *S. umbrosa*. Sie wächst dort vor allem an Bächen und Wassergräben im Hügelland des Alpenvorlandes; *S. umbrosa* ist hier eher im Einzugsbereich der Flüsse zu finden. Im „Katalog und Rote Liste der Gefäßpflanzen Oberösterreichs“ (HOHLA & al. 2009) konnten die beiden Unterarten jedoch wegen fehlender Kenntnis der Verbreitung und Entwicklung nicht eingestuft werden, wohl aber *S. umbrosa* s. l. als eine ungefährdete Art Oberösterreichs. *S. neesii* konnte aus Oberösterreich bestätigt werden (siehe Tab. 1).

Nach NETPHYD & BFN (2013) ist die generelle Verbreitung von *S. umbrosa* s. l. in Deutschland gut bekannt. Die Sippe ist im norddeutschen Tiefland von Niedersachsen, Schleswig-Holstein und Hamburg regional selten bis sogar fehlend, in anderen Bereichen ist die Rasterfrequenz höher. Sie fehlt weitgehend in den Hochlagen von Baden-Württemberg, Bayern, Hessen, Rheinland-Pfalz und Sachsen; hier mangelt es offenbar an entsprechenden Habitaten der zumeist an Ufern von Fließgewässern vorkommenden Pflanze. In Sachsen ist die Sippe weitgehend auf das Elbtal und den Nordwesten beschränkt. Im übrigen Teil von Deutschland kommt die Pflanze flächig vor. In der Internetversion des Deutschlandatlases (DEUTSCHLANDFLORA-WEBGIS 2019) wird *S. umbrosa* s. str. für einige Kartiergebiete angegeben, doch erschienen die Angaben teilweise nicht plausibel, so für Südostbayern. Vielfach dürften sich Angaben für *S. umbrosa* s. str. auf *S. umbrosa* s. l. beziehen. Für *S. neesii* zeigt die Karte nur wenige Bereiche, die von Kartierern bearbeitet wurden, denen die Sippe bekannt ist, wie M. Breitfeld, L. Meierott oder C. Weingart.

Nach unseren Ergebnissen ist *S. neesii* in Süddeutschland die deutlich häufigere und gebietsweise wahrscheinlich die einzige vorkommende Sippe der *S.-umbrosa*-Gruppe. Im Zentrum, im Norden, im Osten und im Westen Deutschlands ist mit beiden Sippen zu rechnen. Nur im Nordosten Deutschlands scheint *S. umbrosa* die dominierende und gebietsweise wohl die einzige Sippe zu sein.

Im Zuge der Floristischen Kartierung Nordrhein-Westfalens wurden seit 2013 161 Fundorte im Regierungsbezirk Köln für *S. umbrosa* erfasst, 216 Fundorte gehörten zu *S. neesii* (www.florenkartierung-nrw.de). Es zeigt sich eine Tendenz zu einer ökologischen Differenzierung

der beiden Sippen im Rheinland. *S. neesii* hat eine durchgehende Verbreitung entlang des Rheins und der Rur sowie ihrer Zuläufe. *S. umbrosa* wächst in deutlich basenreicheren Lebensräumen: So werden basenreiche Bruchwälder besiedelt sowie Bäche und Gräben in den Kalkgebieten der Eifel. Die Bäche Neffelbach und Erft entwässern aus diesen Gebieten, so dass *S. umbrosa* entlang der Bachläufe weit ins Tiefland hinabgeht. Dies ist allerdings bereits im angrenzenden Rheinland-Pfalz anders, wo nach Beobachtungen von Ralf Hand in den südlichen Kalkmulden, die kühl und regenreich sind, offenbar nur *S. neesii* vorkommt.

Es ergibt sich eine leichte ökologische Differenzierung der beiden Sippen. *S. neesii* besiedelt im Vergleich zu *S. umbrosa* eher Gebiete mit niedrigeren Temperaturen und höheren Niederschlägen (Abb. 4 und 5). Die Unterschiede sind zwar statistisch signifikant, aber eher gering und mit einem breiten klimatischen Bereich, der von beiden Sippen ausgefüllt werden kann. Da keine systematische Besammlung vorliegt, sind die Ergebnisse zurückhaltend zu interpretieren. Ekkehard Foerster schrieb uns am 27. Juni 2019: „Obwohl ich beide Arten nie zusammen vorkommend gesehen habe, kann ich mich an verschiedenartige Standorteigenschaften nicht erinnern“. Beide Arten besiedeln bevorzugt die Ufer von Fließgewässern, Funde an Stillgewässern sind selten. Allerdings kommt *S. umbrosa* signifikant häufiger an Flüssen vor als *S. neesii*, wohingegen *S. neesii* deutlich häufiger Gräben und Bäche besiedelt.

Bestimmungsmerkmale standen nicht im Fokus der Untersuchung. Doch war der Fall nicht allzu selten, dass die Pflanzen unter einem falschen Namen zur Untersuchung eingesandt wurden. Hier war offenbar vor allem die Blattseerratur für die falsche Ansprache verantwortlich. Auf die geringe Verlässlichkeit dieses Merkmals machte bereits HAND (2019) aufmerksam. Auch von Jürgen Klotz wurde beobachtet, dass die Blattmerkmale bei *S.-neesii*-Pflanzen oft nicht typisch entwickelt waren. Offenbar ist die Blattseerratur vor allem bei Jungpflanzen unzuverlässig. Im Zweifel muss das Staminiodium herangezogen werden. Dass die Kronröhrenfärbung gelegentlich von der beschriebenen Norm abweichen kann, hat HAND (2019) bereits beschrieben.

Ein Vergleich der Habitate ergibt das in Tab. 4 dargestellte Bild.

Tab. 4: Anzahl der untersuchten Vorkommen in verschiedenen Habitaten von *Scrophularia neesii* und *S. umbrosa*. – Number of sites in different habitats of *Scrophularia neesii* and *S. umbrosa*.

	<i>S. neesii</i>	<i>S. umbrosa</i>
Graben	12	5
Bach	35	14
Fluss	15	17
Stillgewässer	3	2
Andere	3	5
Summe	68	43

Danach kommt *S. neesii* signifikant häufiger an Gräben oder Bächen (χ^2 -Test; $p = 0,009$) als *S. umbrosa* vor. *S. umbrosa* ist signifikant häufiger an Flüssen (χ^2 -Test; $p < 0,001$). Andere Biotope wie Stillgewässer oder brachliegende Nasswiesen spielen für das Vorkommen der beiden Arten nur eine geringe Rolle.

Die unterschiedliche Verbreitung der beiden Arten lässt sich kaum durch die geringen ökologischen Unterschiede erklären. In einigen Fällen wurde nachgewiesen, dass polyploide Nachkommen und diploide Eltern ehemals unzugängliche Gebiete zum Beispiel nach der letzten Eiszeit unterschiedlich gut besiedeln konnten, was zu verschiedenen Verbreitungsgebieten führte (z. B. BURNIER & al. 2009, PARISOD & BESNARD 2007). Inwieweit solche Effekte hier eine Rolle gespielt haben, ist jedoch unklar.

Die Sequenzdaten zeigen ein recht eindeutiges Bild. Im ITS-Stammbaum (Abb. 6) gruppieren alle *S.-neesii*-Proben mit *S. umbrosa* und vier Sequenzen von *S. auriculata*, die von einer Probe aus England stammen. Keine weitere Art fällt in diese Gruppen hinein, auch nicht die vier Arten, die im plastidären *trnQ-rps16*-Stammbaum mit *S. neesii* und *S. umbrosa* gruppieren. Da diese Proben nur im plastidären Stammbaum mit *S. neesii* gruppieren, wäre es höchstens denkbar, dass sie als maternaler Elternteil in einer hypothetischen Hybridisierung fungiert haben. Die ersten beiden ITS-Varianten von *S. neesii* zeigen Sequenzdaten ohne auffällige Hinweise auf verschiedene Kopien von ITS im Genom, was auf einen allopolyploiden Ursprung hindeuten kann. Jedoch kann ein entsprechendes Hybrid-Signal in ITS auch durch Sequenzhomogenisierung verloren gehen. Die Frage, ob *S. neesii*

eine autopolyploide Variante von *S. umbrosa* darstellt oder ein Hybrid aus *S. umbrosa* und *S. auriculata* ist, lässt sich nicht absolut sicher sagen, jedoch gibt es eine eindeutige Tendenz. Beide Marker zeigen eine nahe Verwandtschaft von *S. neesii* zu allen Proben von *S. umbrosa* und nur zu einzelnen Proben von *S. auriculata*. Die *S.-auriculata*-Sequenzen im ITS-Baum, die hier mit der zweiten ITS-Variante von *S. neesii* gruppieren, wurden von SCHEUNERT & HEUBL (2017) so interpretiert, dass diese selbst Beweise für den allopolyploiden Hybridursprung von *S. auriculata* aus *S. umbrosa* und *S. hispida* DESF. darstellen, wie bereits von GRAU (1979) vermutet. Damit sind die Sequenzähnlichkeiten dieser vier Akzessionen nicht zwingend als Hinweis für eine Beteiligung von *S. auriculata* an *S. neesii* zu interpretieren, sondern als Hinweis auf eine Beteiligung von *S. umbrosa* an *S. auriculata* (detaillierte Erklärung zu *S. auriculata* bei SCHEUNERT & HEUBL 2017). Des Weiteren spricht für *S. umbrosa* als einzigen Elternteil, dass es in beiden Markern Sequenzen von *S.-neesii*-Proben gibt, die vollkommen identisch sind mit Sequenzen von *S. umbrosa*, jedoch nie mit solchen von *S. auriculata* (Tab. 2 und 3).

Der dritte ITS-Genotyp kann als Hybride verschiedener *S.-neesii*-Linien interpretiert werden. Eine Kreuzung aus *S. neesii* und *S. auriculata* kann aufgrund der klaren Ergebnisse des DNA-Gehalts/Ploidie für diese Probe ausgeschlossen werden. Außerdem ist es unwahrscheinlich, dass fünf *S.-neesii*-Proben einen autopolyploiden Ursprung haben ist, jedoch für eine mitten aus dem Verbreitungsgebiet stammende Pflanze die Alternativhypothese von VAARAMA & HIIRSAIMI (1967) zutrifft.

Die Tatsache, dass es verschiedene Gen- und Haplotypen in *S. neesii* gibt, die verschiedenen *S. umbrosa* Geno- und Haplotypen ähneln, weist darauf hin, dass die Art mehrfach aus *S. umbrosa* entstand. Eine mehrfache Entstehung ist für eine ganze Reihe von polyploiden Sippen nachgewiesen und kann als üblich angesehen werden (SOLTIS & SOLTIS 1999).

Die hier präsentierte Datenlage zeigt in Übereinstimmung mit GRAU (1976) eine wahrscheinlich mehrfach erfolgte autopolyploide Entstehung von *S. neesii* aus *S. umbrosa*. Es scheint plausibel, dass *S. auriculata* nicht an der Artbildung von *S. neesii* beteiligt war, wie es die Versuche von VAARAMA & HIIRSAIMI (1967) scheinbar nahelegten. Die Ähnlichkeit

ihrer Hybriden mit *S. neesii* ist eventuell darauf zurückzuführen, dass *S. auriculata* selbst als Elternteil *S. umbrosa* aufweist und die genetische Zusammensetzung daher nicht sehr verschieden war zur autopolyploiden *S. neesii* (zur Hybridisierung von *S. umbrosa* mit *S. auriculata* siehe auch WILCOX 2013). Weitere Untersuchungen zum Beispiel mit Next-generation-sequencing-Methoden müssen jedoch die Abstammung abschließend klären, sowie Fragen danach, wann, wo und wie oft *S. neesii* entstand und inwieweit *S. neesii* und *S. umbrosa* heutzutage reproduktiv getrennt sind.

Danksagung

Volker Dühring, Siegfried Henkel, Ulrike Ruchte (alle Güglingen), Kurt Volkert (Beilstein) und Harald Streitz (Überlingen) führten uns zu Fundorten. Brigitte und Jürgen Adler (Nördlingen), Michaela Berghofer (Lindau und München), Matthias Breitfeld (Markneukirchen), Christian Dolnik (Kiel), Kristian Gehrken (Itzehoe), Ernst Krach (Zuchering), Ute Hammel (Erligheim) sowie Marvin Thomas stellten uns Material für die Untersuchung zur Verfügung. Für die Vermittlung der genetischen Untersuchungen danken wir Joachim W. Kadereit von der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.

5. Literatur

- BRANDES, W. 1897: Flora der Provinz Hannover. – Hannover & Leipzig: Hahn.
- BURNIER, J., BUEKI, S., ARRIGO, N., KÜPFER, P. & ALVAREZ, N. 2009: Genetic structure and evolution of Alpine polyploid complexes: *Ranunculus kuepferi* (*Ranunculaceae*) as a case study. – Molec. Ecol. 18: 3730–3744.
- DEUTSCHLANDFLORA-WEBGIS 2019: <https://deutschlandflora.de> (aufgerufen am 16. Dez. 2019).
- DILLENBERGER, M. S. & KADEREIT, J. W. 2017: Simultaneous speciation in the European high mountain flowering plant genus *Facchinia* (*Minuartia* s.l., *Caryophyllaceae*) revealed by genotyping-by-sequencing. – Molec. Phylogen. Evol. 112: 23–35.
- DUFTSCHMID, J. 1883: Die Flora von Oberösterreich 3. – Linz: Oberösterr. Museum Francisco-Carolineum.

- FICK, S. E. & HIJMAN, R. J. 2017: Worldclim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. – *Int. J. Climatol.* 37: 4302–4315.
- FISCHER, M. A., OSWALD, K. & ADLER, W. 2008: Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol, ed. 3. – Linz: Land Oberösterreich, Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen.
- FUKAREK, F. & HENKER, H. 2005: Flora von Mecklenburg-Vorpommern – Farn- und Blütenpflanzen. – Jena: Weißdorn.
- GRAU, J. 1976: Die Cytologie südwestmediterraner *Scrophularia*-Arten. – *Mitt. Bot. Staatssamml. München* 12: 609–654.
- 1979: The probable allopolyploid origin of *Scrophularia auriculata* and *S. pseudoauriculata*. – *Webbia* 34: 497–499.
- HAND, R. 2019: Anmerkungen zur Nees-Braunwurz (*Scrophularia neesii* WIRTG.). – *Kochia* 12: 62–89.
- HARTL, H., KNIELY, G., LEUTE, G. H., NIKLFELD, H. & PERKO, M. 1992: Verbreitungsatlas der Farn- und Blütenpflanzen Kärntens. – Klagenfurt: Naturwissenschaftlicher Verein für Kärnten.
- HINTERHUBER, R. & HINTERHUBER, J. 1851: Prodnus einer Flora des Kronlandes Salzburg. – Salzburg: Oberer.
- HOHLA, M., STÖHR, O., BRANDSTÄTTER, G., DANNER, J., DIEWALD, W., ESSL, F., FIEREDER, H., GRIMS, F., HÖGLINGER, F., KLEESADL, G., KRAML, A., LENGELACHER, F., LUGMAIR, A., NADLER, K., NIKLFELD, H., SCHMALZER, A., SCHRATT-EHRENDORFER, L., SCHRÖCK, C., STRAUCH, M. & WITTMANN, H. 2009: Katalog und Rote Liste der Gefäßpflanzen Oberösterreichs. – *Stapfia* 91.
- HUSON, D. H. & BRYANT, D. 2006: Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. – *Molec. Biol. Evol.* 23: 254–267.
- KATO, K. & STANDLEY, D. M. 2013: MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. – *Molec. Biol. Evol.* 30: 772–780.
- KNUTH, P. 1888: Flora der Provinz Schleswig-Holstein. – Leipzig: Otto Lenz.
- LEEDER, F. & REITER, M. 1958: Kleine Flora des Landes Salzburg. – Salzburg: Naturwissenschaftliche Arbeitsgemeinschaft des Hauses der Natur Salzburg.
- MAURER, W. 1998: Flora der Steiermark 2/1. – Eching: IHW.
- MEIEROTT, L. 2008: Flora der Haßberge und des Grabfelds. – Eching: IHW.
- NETPHYD & BfN (ed.) 2013: Verbreitungsatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands. – Münster: Landwirtschaftsverlag.
- PARISOD, C. & BESNARD, G. 2007: Glacial in situ survival in the Western Alps and polyploid autopolyploidy in *Biscutella laevigata* L. (Brassicaceae). – *Molec. Ecol.* 16: 2755–2767.
- PHILLIPS, S. J., ANDERSON, R. P. & SCHAPIRE, R. E. 2006: Maximum entropy modeling of species geographic distributions. – *Ecol. Modelling* 190: 231–259.
- POLATSCHKE, A. & NEUNER, W. 2013: Flora von Nordtirol, Osttirol und Vorarlberg 7. – Innsbruck: Tiroler Landesmuseum Ferdinandeum.
- SCHAEFER, H. 1940: Chromosomenzahlen aus der schleswig-holsteinischen Flora. II. – *Planta* 30: 716–725.
- SCHNEIDER, A. & HEUBL, G. 2017: Against all odds: reconstructing the evolutionary history of *Scrophularia* (*Scrophulariaceae*) despite high levels of incongruence and reticulate evolution. – *Org. Divers. Evol.* 17: 323–349.
- SHAW, J., LICKY, 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. – *Amer. J. Bot.* 94: 275–288.
- SOLTIS, D. E. & SOLTIS, P. S. 1999: Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. – *TREE* 14: 348–352.
- STAMATAKIS, A., HOOVER, P. & ROUGEMONT, J. 2008: A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers. – *Syst. Biol.* 57: 758–771.
- STARKE-OTTICH, I., GREGOR, T., BARTH, U., BÖGER, K., BÖNSEL, D., CEZANNE, R., FREDE, A., HEMM, K., HODVINA, S., KUBOSCH, R., MAHN, D. & UEBELER, M. (2019): Rote Liste der Farn- und Samenpflanzen Hessens. 5. Fassung. – Hessisches Ministerium für Umwelt, Klimaschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (HMUKLV) & Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie (HLNUG), Wiesbaden.
- STÖHR, O., SCHRÖCK, C. & STROBL, W. 2002: Beiträge zur Flora der Bundesländer Salzburg und Oberösterreich. – *Linzer Biol. Beitr.* 34: 1393–1505.

- STÖHR, O., SCHRÖCK, C., PILSL, P., GEWOLF, S., EICHBERGER, C., NOWOTNY, G., KAISER, R., KRISAI, R. & MAYR, A. 2004: Beiträge zur indigenen Flora von Salzburg. – *Sauteria* 13: 15–114.
- SUN, Y., SKINNER, D. Z., LIANG, G. H. & HULBERT, S. H. 1994: Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. – *Theor. Appl. Genet.* 89: 26–32.
- VAARAMA, A. & HIIRSAALMI, H. 1967: Chromosome studies on some Old World species of the genus *Scrophularia*. – *Hereditas* 58: 333–358.
- WILCOX, M. 2013: The identity of *Scrophularia xhurstii* DRUCE. – *BSBI News* 124: 31–33.
- WÖRZ, A. & THIV, M. 2020: Aktuelle Verbreitungskarten der Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs. – <http://www.flora.naturkundemuseum-bw.de>, aufgerufen am 7.2.2020.

Folgende Shapefiles wurden für die Kartendarstellung verwendet:

Bundesamt für Kartographie und Geodäsie (2019): DE-dlm250.utm32s.shape.ebenen.zip heruntergeladen am 5. Oktober 2019, © GeoBasis-DE / BKG 2019, Lizenz dl-de/by-2-0, www.bkg.bund.de. geb01_f.shp (Administrative Gebietsgrenzen)

Natural Earth (2019): [naturalearthdata_10m_physical.zip](https://www.naturalearthdata.com), heruntergeladen am 5. Oktober 2019, Free vector and raster map data, [naturalearthdata.com](https://www.naturalearthdata.com).

ne_10m_land.shp (Landfläche)
ne_10m_ocean.shp (Meeresfläche)

The European Environment Agency (2020): WISE Large rivers and large lakes, Permalink: https://www.eea.europa.eu/ds_resolveuid/D7925F3C-AFF7-4256-8162-513A2C1C69E3 heruntergeladen am 20. Januar 2020, Creative-Commons-Lizenz CC BY 2.5 DK:
wise_large_lakes.zip
wise_other_large_rivers_and_tributaries.zip
wise_large_rivers.zip

Elektronischer Anhang:

Tab. 1: Liste der untersuchten Individuen mit Messergebnisse der Druchflusszytometrie, Fundorten und Sammlern. – List of examined individuals with measurement results of flow cytometry, collection sites and collectors.

Tab. 2: Sequenzvariation aller *S.-neesii*-, *S.-umbrosa*- und *S.-auriculata*-Proben im Marker ITS. Basen sind kodiert als: A: Adenosin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin. Deletionen sind mit „-“ kodiert. Positionen mit mehr als einem Signal sind kodiert mit: K: G oder T; M: A oder C; N: A, C, G oder T; R: A oder G; S: C oder G; Y: C oder T. Alignment-Positionen, an denen nur eine GenBank-Sequenz sich durch mehrere überlagernde Signale von allen anderen Proben unterscheidet wurden nicht berücksichtigt. – Sequence variation of all *S. neesii*, *S. umbrosa* and *S. auriculata* samples in the marker ITS. Bases are encoded as: A: adenosine; C: cytosine; G: guanine; T: thymine. Deletions are coded with “-”. Positions with more than one signal are coded with : K: G or T; M: A or C; N: A, C, G or T; R: A or G; S: C or G; Y: C or T. Alignment positions where only one GenBank sequence differs from all other samples by multiple overlapping signals were not considered.

Tab. 3: Sequenzvariation aller *S.-neesii*-, *S.-umbrosa*- und *S.-auriculata*-Proben und vier weiterer Taxa im Marker *trnQ-rps16*. Basen sind kodiert als: A: Adenosin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin. Deletionen sind mit „-“ kodiert. Positionen mit mehr als einem Signal sind kodiert mit: K: G oder T; M: A oder C; N: A, C, G oder T; R: A oder G; S: C oder G; Y: C oder T. Alignment-Positionen, an denen nur eine GenBank-Sequenz sich durch mehrere überlagernde Signale von allen anderen Proben unterscheidet wurden nicht berücksichtigt. – Sequence variation of all *S. neesii*, *S. umbrosa* and *S. auriculata* samples and four further taxa in the marker *trnQ-rps16*. Bases are encoded as: A: adenosine; C: cytosine; G: guanine; T: thymine. Deletions are coded with “-”. Positions with more than one signal are coded with : K: G or T; M: A or C; N: A, C, G or T; R: A or G; S: C or G; Y: C or T. Alignment positions where only one GenBank sequence differs from all other samples by multiple overlapping signals were not considered.