Die Verwandtschaft von Onosma arenaria vom Mainzer Sand

DOMINIK R. MOHR, MARKUS S. DILLENBERGER & JOACHIM W. KADEREIT

Zusammenfassung: Die Sand-Lotwurz. Onosma arenaria, kommt in Deutschland nur im Gebiet des Mainzer Sandes vor. Es wird allgemein angenommen, dass das Vorkommen der Art hier als Restvorkommen einer nacheiszeitlich weiter ausgedehnten, heute südosteuropäischen Steppe interpretiert werden muss. Jüngere Untersuchungen haben gezeigt, dass O. helvetica aus der südwestlichen Schweiz und dem südöstlichen Frankreich sehr eng mit O. arenaria verwandt ist und als Teil dieser Art betrachtet werden kann. Vor diesem Hintergrund wird der Frage nachgegangen, ob O. arenaria vom Mainzer Sand evtl. mit südwestlichen und nicht mit südöstlichen Populationen der Art verwandt ist. Die Analyse plastidärer rpl32-trnL- und nukleär-ribosomaler ITS-Seguenzen führte zu dem überraschenden Ergebnis, dass O. arenaria vom Mainzer Sand sowohl südöstliche als auch südwestliche ITS-Sequenztypen enthält. Damit zeigt die Population vom Mainzer Sand Beziehungen zu beiden Gebieten und kann nicht mehr als Relikt einer südöstlichen Steppe interpretiert werden. Die erstmalige Bestimmung der Chromosomenzahl und -morphologie von O. arenaria vom Mainzer Sand bestätigt Befunde aus anderen Gebieten.

Abstract: The relationship of Onosma arenaria from the Mainzer Sand. In Germany, Onosma arenaria is known only from the Mainzer Sand region. It is generally assumed that this population is a relic of a postglacially more widely distributed southeast European steppe. Recent studies had shown that O. helvetica, distributed in southwest Switzerland and southeast France, is very closely related to O. arenaria and can be considered conspecific. Against this background we investigated whether the Mainzer Sand population of O. arenaria is more closely related to southwestern rather than to southeastern populations of the species. Analysis of plastid rpl32-trnL and nuclear ribosomal ITS sequences revealed that the Mainzer Sand population contains both southwestern and southeastern ITS sequence types. Accordingly, the Mainzer Sand material shows

relationships to populations in both areas, and its interpretation as a relic with southeastern relationships must be revised. Chromosome number and chromosome morphology of the Mainzer Sand material confirm earlier findings from other areas.

Dominik R. Mohr Institut für Organismische und Molekulare Evolutionsbiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 55099 Mainz; dmohr@students.uni-mainz.de

Markus S. Dillenberger Institut für Biologie, Arbeitsgruppe Systematische Botanik und Pflanzengeographie, Freie Universität Berlin, Königin-Luise-Straße 1–3, 14195 Berlin; m.dillenberger@fu-berlin.de

Joachim W. Kadereit Institut für Organismische und Molekulare Evolutionsbiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 55099 Mainz; kadereit@uni-mainz.de

1. Einleitung

Die Gattung Onosma ist nach KOLARČIK & al. (2014) in Europa mit den drei Sektionen Asterotricha Boiss., Haplotricha Boiss. und Heterotricha Boiss. verbreitet. Die Sand-Lotwurz, Onosma arenaria, eine Art der sect. Heterotricha, kommt in Deutschland nur im Gebiet des Mainzer Sandes vor (HECKER 1987). Ungeachtet der schwierigen Taxonomie dieser Art und ihrer engsten Verwandten (RAUSCHERT 1976), und der damit verbundenen sehr unterschiedlichen Auffassungen ihrer Gesamtverbreitungsgebiete, wird seit JÄNNICKE (1889) angenommen (HECKER 1987), dass das Vorkommen der Art auf dem Mainzer Sand als Restvorkommen einer nacheiszeitlich weiter ausgedehnten, heute südosteuropäischen Steppe interpretiert werden muss. Eine solche Interpretation ist auch mit der Auffassung der Verbreitung der Art durch BALL & RIEDL (1971) vereinbar.

TEPPNER (1971a & b) konnte zeigen, dass O. arenaria mit 2n = 20 Chromosomen einen bimodalen Chromosomensatz mit 12 großen (L) und acht kleinen (K) Chromosomen hat (2n = 12L+8K), und vermutete, dass die Art hvbridogen entstanden ist. Diese Vermutung wurde durch KOLARČIK & al. (2014) bestätigt, die überzeugend zeigen konnten, dass O. fastigiata (BRAUN-BLANQ.) LACAITA mit 2n = 12L und O. pseudoarenaria SCHUR mit 2n = 12L+14K die wahrscheinlichen Elternarten sind. O. arenaria ist damit allotriploid. In der Meiose der Pollenmutterzellen werden die K-Chromosomen vollständig eliminiert, in der Meiose der Embryosackmutterzellen dagegen als Block eingeschlossen (TEPPNER 1971a). Diese ungewöhnlichen Unregelmäßigkeiten in der Meiose führen dazu, dass die Pollenfertilität von O. arenaria deutlich reduziert ist. So berichteten KOLARČIK & al. (2014, 2015) Pollenfertilitäten von 64,1 bzw. 49,3-96,0 %, und für die Population vom Mainzer Sand fand HAUG (2019) Werte zwischen 40 und 75%.

Die Verbreitung der vermutlichen Elternarten von *O. arenaria* ist in KOLARČIK & al. (2014) dargestellt und zeigt ein schmales Überlappungsgebiet der eher südwesteuropäischen *O. fastigiata* mit der eher südosteuropäischen *O. pseudoarenaria* im Grenzgebiet zwischen Italien und Frankreich. Unter der Annahme einer Entstehung von *O. arenaria* im Quartär, die von den Altersschätzungen von CECCHI & al. (2011) mehr oder weniger gut gestützt wird, ist es denkbar, dass *O. arenaria* im heutigen Überlappungsgebiet der beiden Arten im Zuge eines Kontaktes während einer quartären Warmzeit entstanden ist.

Soweit bekannt, hat neben *O. arenaria* wenigstens in Europa nur noch *O. helvetica* (A. DC.) BOISS. eine Chromosomenzahl von 2n = 12L+8S (TEPPNER 1971a). Diese Art, von VOUILLAMOZ (1999) und ROHWER (2019) als eigenständig anerkannt, wurde von KOLARČIK & al. (2014, 2015), aber auch schon von früheren Autoren (RÜBEL & BRAUN-BLANQUET 1918, BRAUN-BLANQUET 1926), als Teil von *O. arenaria* aufgefasst (KOLARČIK & al. 2014: *O. arenaria*

s. l.). VOUILLAMOZ (1999) postulierte für O. helvetica eine hybridogene Entstehung unter Beteiligung von O. fastigiata und O. pseudoarenaria, genauso also wie für O. arenaria. Nach KOLARČIK & al. (2014) ist O. helvetica (als O. arenaria) in der südwestlichsten Schweiz und im südöstlichen Frankreich verbreitet. Genaue Angaben zur Verbreitung in der Schweiz machen VOUILLAMOZ (1999) und INFO FLORA (2021), und die Verbreitung in Frankreich ist in TELA BOTANICA (2021) dargestellt. Mit einer Analyse von DNA-Sequenzen (ITS) und einer DNA Fingerprintanalyse (AFLP) konnten Kolarčik & al. (2014) O. arenaria s. l. deutlich in eine Westgruppe und eine Ostgruppe gliedern und eine klare Grenze zwischen diesen beiden Gruppen erkennen.

Vor diesem Hintergrund, also der Verbreitung von O. arenaria nicht nur im südöstlichen Europa. sondern auch in der südwestlichen Schweiz und im südöstlichen Frankreich (als O. arenaria s. l. oder als O. helvetica als mit O. arenaria sicher sehr eng verwandtem Taxon), stellt sich die Frage nach der Herkunft von O. arenaria vom Mainzer Sand neu, denn die Ergebnisse von KOLARČIK & al. (2014) eröffnen die Möglichkeit, dass O. arenaria vom Mainzer Sand nicht mit südöstlichem, sondern vielmehr mit südwestlichem Material verwandt ist. Um das zu prüfen. haben wir für die Population vom Mainzer Sand den nukleär-ribosomalen Internal Transcribed Spacer (ITS) kloniert und seguenziert und die erhaltenen Sequenzen in den Datensatz von KOLARČIK & al. (2014) integriert. Darüber hinaus haben wir den plastidären Marker rpl32-trnL sequenziert und auch die Chromosomenzahl und -morphologie dieses Materials bestimmt, um auch so die Zugehörigkeit der Mainzer Population zu O. arenaria s. l. zu untersuchen.

2. Material und Methoden

Zur Untersuchung der Verwandtschaft der Mainzer Population von *O. arenaria* wurden 20 Individuen von *O. arenaria*, *O. fastigiata*, *O. pseudoarenaria* sowie *O. echioides* (L.) L. verwendet (Tab. 1). Dabei wurden bei *O. arenaria* sowohl die Mainzer Population als auch Individuen der Ost- und West-Gruppe des Hauptverbreitungsgebietes (KOLARČIK & al. 2014) berücksichtigt. Es wurden sowohl Silicagel-getrocknete Proben als auch Herbarmaterial verwendet. Die DNA-Extraktion aller Proben erfolgte mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben unter Berücksichtigung der Empfehlungen für gesteigerte DNA-Ausbeute. Zur Vervielfältigung der plastidären DNA-Region rpl32-trnL wurden die Primer rpl32 und trnL-UAG (SHAW & al. 2007) verwendet. Die PCR erfolgte in 25 µL-Reaktionen, jede Reaktion bestehend aus 1× Reaktions-Puffer, 1,2 mM MgCl_a, 0,2 mM dNTPs, 80 µg/µL bovines Serumalbumin, je 0,8 µM Primer, 0,04 U/µL Tag-Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) und 1 µL DNA-Extrakt. PCRs wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94 °C für 60 s, gefolgt von 35 Zyklen aus 94 °C für 20 s, 52 °C für 30 s und 68 °C für 60 s; einmalig gefolgt von 94 °C für 20 s, 52 °C für 80 s und 68 °C für 8 min. Danach wurden die Proben bei 10 °C gelagert. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte nach den Herstellerangaben mit ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die PCR-Produkte wurden von StarSeq (Mainz, Deutschland) sequenziert.

ITS wurde mit den Primern ITS 5 und ITS 4 (WHITE & al. 1990) unter den oben für rpl32-trnL beschriebenen Bedingungen amplifiziert. Die Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben. Da ITS besonders in hybridogenen Taxa in unterschiedlichen Kopien vorliegen kann, wurden die ITS-PCR-Produkte kloniert. Von den 20 in dieser Studie bearbeiteten Onosma-Proben wurden 14 zur Klonierung ausgewählt. Es wurde jeweils ein PCR-Produkt aller außer drei Proben von O. arenaria sowie je einer bis zwei Proben aller anderen verwendeten Arten kloniert (Tab. 1). Als Vektor diente der pGEM T-easy Vektor (Promega, Madison, USA) und die Ligation und Transformation wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Insgesamt zehn positive Klone pro kloniertem PCR-Produkt wurden direkt in eine weitere PCR mit den vektorinternen Primern M13F und M13R (pGEM T-Easy Vector System; Promega, Madison, USA) überführt und die PCR entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit dem NucleoSpin-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt und von StarSeq (Mainz, Deutschland) sequenziert. Alle erhaltenen Sequenzen wurden manuell kontrolliert, editiert und aliniert,

Das rpl32-trnL-Alignment wurde durch Sequenzen aus KOLARČIK & al. (2014) ergänzt und ein Haplotypennetzwerk wurde mit TCS v.1.21 (CLEMENT & al. 2000) erstellt. Dabei wurden alle Lücken im Alignment (gaps) als fehlende Daten (missing data) behandelt.

Für den ITS-Datensatz wurden identische klonierte Sequenzen innerhalb einer Probe manuell entfernt, und die verbleibenden 118 Sequenzen wurden mit dem ITS-Datensatz von KoLARčIK & al. (2014) kombiniert. Das ITS-Alignment wurde verwendet, um eine NeighborNet-Analyse mit Ordinary-Least-Squares-Distanzen (Methode der kleinsten Quadrate) in SplitsTree v.4.16.2 (HUSON & BRYANT 2006) durchzuführen.

Zur Bestimmung der Chromosomenzahl und -morphologie der Mainzer Population von O. arenaria wurden zwei Individuen aus einer Kultur im Botanischen Garten der Johannes Gutenberg-Universität Mainz entnommen und umgetopft. Die Abnahme der Wurzelspitzen erfolgte kurz nach Sonnenaufgang. Circa 2-3 cm lange Wurzelspitzen mit durchsichtiger Spitze und deutlicher Wurzelhaarzone wurden in eine 0,002 M 8-Hydroxychinolin-Lösung überführt und 4 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Wurzelspitzen mit destilliertem Wasser gespült und überschüssige Flüssigkeit wurde mit Filterpapier entfernt. Zur Fixierung wurden die Wurzelspitzen in ein 70% Ethanol-Eisessig-Gemisch (1:3) überführt. Nach mindestens 24 h wurde dieses Gemisch durch 70 % Ethanol ersetzt. Zur Mazerierung der Wurzelspitzen wurden diese erneut mit destilliertem Wasser gründlich gespült und dann bei Zimmertemperatur für 50 min in frisch angesetzte 5N Salzsäure gelegt. Die Färbung erfolgte direkt im Anschluss mit Schiffschem Reagenz (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), bis die Wurzelspitzen deutlich rotviolett gefärbt waren. Die Wurzelspitzen wurden unter einem Deckglas geguetscht und mit einem Lichtmikroskop (Leitz WILD, Biomed, Typ 020-507.010; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) betrachtet.

3. Ergebnisse

Der Gesamtdatensatz von rpl32-trnL enthielt 72 Sequenzen mit einer Maximallänge von 760 bp. Dabei handelte es sich um 20 Sequenzen aus dieser Studie und 52 Sequenzen von KoLARČIK & al. (2014). Das Haplotypennetzwerk ist in Abb. 1 zu sehen und zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse der Haplotypen zueinander. Das Netzwerk zeigt eine Zweiteilung in die Sektionen Asterotricha und Haplotricha. Innerhalb der Haplotypengruppe der Asterotricha sind auch die Proben der Sektion Heterotricha und Hybriden aus O. arenaria und O. echioides zu finden. Die Sektion Heterotricha ist durch 21 O.-arenaria-Haplotypen (inklusive der Mainzer Population) und zehn *O.-pseudoarenaria*-Haplotypen repräsentiert. Alle hier sequenzierten Proben weisen den bereits bekannten *Heterotricha*-Haplotypen von *O. arenaria* und *O. pseudoarenaria* auf. Die Ergebnisse für die Proben von KOLARČIK & al. (2014) sind mit den Ergebnissen von KOLARČIK & al. (2014) vergleichbar. Unterschiede gehen darauf zurück, dass in dieser Studie alle Lücken im Alignment als fehlende Daten behandelt wurden.



 Abb. 1: Haplotypennetzwerk des plastidären Markers rpl32-trnL. Farben repräsentieren Taxa und sind in der Legende erklärt, die Kreisflächen sind proportional zur Anzahl der Proben. Die kleinsten farbigen Kreise entsprechen einer Probe und schwarze Punkte entsprechen hypothetischen Haplotypen. – Haplotype network of rpl32-trnL. Different colours represent different taxa (see colour code). Size of haplotypes is proportional to sample number and the smallest haplotypes represent one sample. Black dots correspond to hypothetical haplotypes.

Die Klonierung lieferte zehn Klone pro Probe und somit insgesamt 140 Sequenzen. Sieben ITS-Sequenzen waren pilzlichen Ursprungs. Durch das Entfernen dieser Sequenzen sowie identischer klonierter Sequenzen innerhalb einer Probe reduzierte sich die Zahl auf 118, welche durch die 134 Sequenzen von KOLARČIK & al. (2014) ergänzt wurden.

Das mit SplitsTree erstellte NeighborNet hat die gleiche Grundstruktur wie in KOLARČIK & al. (2014). Die neue Gruppe ITS III (Abb. 2) wurde in vergleichbarer Position im AFLP-Netzwerk von KOLARČIK & al. (2014) gefunden und enthält Ribotypen der rumänischen O.-arenaria-Proben CHIT13 (auch in ITS Ost) und CHIT14 (auch in ITS Ost und ITS I; Abb. 2). Das Netzwerk zeigt weiterhin die Gruppen ITS I, ITS II, ITS Ost und ITS West. Diese Gruppen sind in ihrer Zusammensetzung mit den von KOLARČIK & al. (2014) gefundenen Gruppen identisch. Ausnahmen davon sind zwei O.-arenaria-Klone (CHIT14, OH2) in ITS I und ein O.-pseudoarenaria-Klon (OP1) in ITS II (Abb. 2). Ergänzend zu KOLARČIK & al. (2014) enthält ITS West alle O.-arenaria-Ribotypen aus Ol-Ion/Schweiz (OLO1+2) und Ceillac/Frankreich (CEI3). Zudem enthält ITS West alle Ribotypen von O. fastigiata aus Uvernet-Fours/Frankreich (OF1) und mehrere O.-pseudoarenaria-Ribotypen von OP1 und 2. ITS Ost enthält alle O.arenaria-Ribotypen aus Epöl/Ungarn (EPOL1), alle übrigen Schweizer Proben von O. arenaria (OH1+2, mit Ausnahme der oben genannten Ribotypen in ITS I), verschiedene O.-pseudoarenaria-Ribotypen sowie die übrigen Seguenzen aus Constanta/Rumänien (CHIT13+14), die nicht in ITS I oder III zu finden sind. O. echioides (OE1) ist mit anderen Proben der Art in ITS II zu finden. Ein Individuum von O. arenaria vom Mainzer Sand (OA2) ist polymorph und fällt mit einem Ribotyp in ITS West und mit den übrigen Ribotypen in ITS Ost (Abb. 2). Die übrigen Ribotypen der Mainzer Population (Individuum OA1) fallen alle in die ITS Ost-Gruppe. Dieses Individuum OA1 enthielt außerdem eine ITS-Sequenz (1 von 10 Klonen eines PCR-Produkts), die sich



Abb. 2: Netzwerk der NeighborNet-Analyse von ITS. Nur in dieser Studie sequenzierte Ribotypen sind farblich entsprechend der Legende hervorgehoben. Einteilung der Hauptgruppen entspricht Kolarčik & al. (2014). – Network from the NeighborNet-analysis of ITS. Only newly sequenced ribotypes are indicated by colour (see colour code). Major groups recognized based on Kolarčik & al. (2014).

an 10 Positionen von allen anderen klonierten ITS-Ost-Sequenzen der Mainzer Population unterschied und im Vergleich zu den anderen ITS-Ost-Ribotypen eine größere Ähnlichkeit mit dem ITS-West-Ribotyp von OA2 hatte.

Individuen, deren Klone in mehr als einer Gruppe gruppieren, sind CHIT13 (ITS Ost/III), CHIT14 (ITS Ost/I/III), OA2 (ITS Ost/West) und OH2 (ITS Ost/I) von O. arenaria, und OP1 (ITS Ost/West/II) und OP2 (ITS Ost/West) von O. pseudoarenaria. Die Klone der übrigen Individuen kommen nur in einer Gruppe vor: O. arenaria CEI3, OLO1 und 2 (ITS West), EPOL1, OA1, OH1 (ITS Ost), O. echioides OE1 (ITS II) und O. fastigiata OF1 (ITS West).

O. arenaria aus der Kultur des Botanischen Gartens Mainz hat 2n = 20 Chromosomen (Abb. 3) mit 12 langen (L) und 8 kurzen (K) Chromosomen, d. h. 2n = 12L+8K.



Abb. 3: Mitotische Wurzelspitzenzelle mit 2n = 12L+ 8K Chromosomen. A+B: Verschiedene Schärfeebenen derselben Zelle. C: Zur Verdeutlichung sind die Chromosomen zeichnerisch hervorgehoben; L-Chromosomen schwarz, K-Chromosomen weiß. – Mitotic root tip cell with 2n = 12L+8K chromosomes. A+B: Different focus levels of the same cell. C: Chromosomes highlighted by outline drawings; Lchromosomes black, K-chromosomes white.

4. Diskussion

Angesichts der Identität des plastidären Haplotyps (rpl32-trnL) von O. arenaria vom Mainzer Sand mit bisher von O. arenaria s. l. bekannten Haplotypen sowie der Bestätigung der Chromosomenzahl von 2n = 12L+8S steht die Zugehörigkeit der Mainzer Population zu dieser Art außer Frage und ist nicht überraschend. Sehr überraschend dagegen ist, dass das Mainzer Material von O. arenaria unterschiedliche ITS-Sequenzen enthält, die entweder mit den Sequenzen der von KOLARČIK & al. (2014) identifizierten Westgruppe oder denen der Ostgruppe zusammenfallen. Dabei wurden diese zwei unterschiedlichen Sequenzen in einem der zwei klonierten und sequenzierten Individuen vom Mainzer Sand gefunden, das andere Individuum enthielt nur Sequenzen, die in die Ostgruppe fielen (inklusive einer abweichenden Sequenz, siehe Ergebnisse). Alle ITS-Klone aller übrigen O. arenaria s. I.-Individuen fielen entweder in die West- oder die Ostgruppe. Dieser Befund erlaubt zwei Interpretationen.

1. Der in *O. arenaria* gefundene ITS-Polymorphismus, der die Zuordnung der ITS-Sequenzen in eine West- und eine Ostgruppe erlaubt, geht auf die hybridogene Entstehung der Art aus *O. fastigiata* und *O. pseudoarenaria* zurück. Die ITS-Sequenzen dieser beiden Arten fallen ebenfalls in die Westgruppe (*O. fastigiata*) oder in die Ost- und Westgruppe (*O. fastigiata*) oder *ria*). Während in den Hauptverbreitungsgebieten von *O. arenaria* s. I. eine Homogenisierung der ITS-Sequenzen durch "concerted evolution" (ÁLVAREZ & WENDEL 2003) stattgefunden hat, ist der Polymorphismus in der Population vom Mainzer Sand erhalten geblieben.

2. Nach der hybridogenen Entstehung von O. arenaria s. I. hat in den westlichen bzw. östlichen Teilarealen "concerted evolution" unterschiedlicher Ribotypen stattgefunden, was in der Differenzierung der West- und Ostgruppe resultierte. Durch Ausdehnung des Areals dieser beiden Gruppen nach Norden in einer geeigneten Klimaperiode ist es zu Kontakt und Hybridisierung gekommen, wodurch die Population vom Mainzer Sand entstanden ist.

Auch wenn wir keine Möglichkeit sehen, eine dieser beiden Interpretationen zu bevorzugen,

implizieren beide, dass die Annahme einer südöstlichen Beziehung von *O. arenaria* vom Mainzer Sand nicht gerechtfertigt ist. Die erste Interpretation impliziert, dass die Population vom Mainzer Sand Relikt der ehemals weit verbreiteten hybridogenen *O. arenaria* ist, und erlaubt nicht, eine engere Beziehung zum Ostoder Westareal zu erkennen. Bei der zweiten Interpretation hat die Mainzer Population durch ihre hybridogene Entstehung enge Beziehungen sowohl zur West- als auch zur Ostgruppe.

5. Danksagung

Wir möchten Dr. Sébastian Lavergne (Grenoble/ Frankreich), Dr. Robert Wagensommer (Bari/ Italien), Dr. Alessia Guggisberg und Dr. Reto Nyffeler (Zürich/Schweiz) sowie Dr. Vladislav Kolarčik (Košice/Slowakische Republik) für die Überlassung von Blattmaterial danken.

6. Literatur

- ÁLVAREZ, I. & WENDEL, J. F. 2003: Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. – Mol. Phylogenet. Evol. 29: 417–434.
- BALL, P. W. & RIEDL, H. 1971: Onosma L. p. 89– 94. In: TUTIN. T. G., HEYWOOD, V. H., BUR-GES, N.A., MOORE, D. M., VALENTINE, D. H., WALTERS, S. M. & WEBB, D.A. (ed.), Flora Europaea 3. – Cambridge: Cambridge University.
- BRAUN-BLANQUET, J. 1926: Onosma L. Lotwurz. – p. 2177–2186. In: HEGI, G. (ed.), Gustav Hegi, Illustrierte Flora von Mitteleuropa I/3, ed. 1. – München: J. F. Lehmann.
- CECCHI, L., COPPI, A. & SELVI, F. 2011: Evolutionary dynamics of serpentine adaptation in *Onosma (Boraginaceae)* as revealed by ITS sequence data. – Pl. Syst. Evol. 297: 185–199.
- CLEMENT, M., POSADA, D. & CRANDALL, K.A. 2000: TCS: A computer program to estimate gene genealogies. – Molec. Ecol. 9: 1657–1659.
- HAUG, M. 2019: Fitnessuntersuchung der Erhaltungskultur von *Onosma arenaria* des Botanischen Garten der Johannes Gutenberg-Universität Mainz im Vergleich mit der natürlichen Population im Mainzer Sand. – Bachelorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

- HECKER, U. 1987: Die Farn- und Blütenpflanzen des Mainzer Sandes. – Mainzer Naturwiss. Archiv 25: 85–133.
- HUSON, D. H. & BRYANT, D. 2006: Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. – Molec. Biol. Evol. 23: 254–267.
- INFO FLORA 2021: Das nationale Daten- und Informationszentrum der Schweizer Flora. – https://www.infoflora.ch; aufgerufen am 17.7.2021.
- JÄNNICKE, W. 1889: Die Sandflora von Mainz. Flora 47: 93–113.
- KOLARČIK, V., ZOZOMOVÁ-LIHOVÁ, J., DUCÁR, E. & MÁRTONFI, P. 2014: Evolutionary significance of hybridization in *Onosma (Boraginaceae)*: analyses of stabilized hemisexual odd polyploids and recent sterile hybrids. – Biol. J. Linn. Soc. 112: 89–107.
- DUCÁR, E. & KAČMÁROVÁ, T. 2015: Patterns of pollen stainability in polyploids of the genus *Onosma* (*Boraginaceae*). – PI. Ecol. Evol. 148: 76–89.
- RAUSCHERT, S. 1976: Zur Nomenklatur und Chorologie des Formenkreises von *Onosma pseudoarenaria* SCHUR s. lat. – Folia Geobot. Phytotax. 11: 269–279.
- ROHWER, J. G. 2019: *Onosma* L. Lotwurz. p. 706. In: PAROLLY, G. & ROHWER, J. G. (ed.), Schmeil-Fitschen. Die Flora Deutschlands und angrenzender Länder, ed. 97. – Wiebelsheim: Quelle & Meyer.
- RÜBEL, E. & BRAUN-BLANQUET, J. 1918: Kritisch-systematische Notizen über einige Arten aus den Gattungen Onosma, Gnaphalium und Cerastium. – Vierteljahrsschr. Naturforsch. Gesell. Zürich 62: 599–628.
- 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. – Amer. J. Bot. 94: 275–288.
- TELA BOTANICA 2021: Onosma helvetica (A. DC.) BOISS. https://www.tela-botanica.org; aufgerufen am 17.7.2021
- TEPPNER, H. 1971a: Cytosystematik, bimodale Chromosomensätze und permanente Anorthoploidie bei *Onosma* (*Boraginaceae*). – Oesterr. Bot. Z. 119: 196–233.
- 1971b: Cytosystematische Studien an Onosma (Boraginaceae). Die Formenkreise von O. echioides, O. helveticum und O. arenarium. – Ber. Deutsch. Bot. Ges. 84: 691–696.

- THIERS, B. 2021: Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. http://sweetgum.nybg.org/science/ ih; aufgerufen am 2.8.2021.
- VOUILLAMOZ, P. J. 1999: Inventaire critique, nombre chromosomique et chorologie d'Onosma helvetica (A. DC.) BOISSIER et Onosma pseudoarenaria SCHUR s. I. (Boraginaceae) en Suisse. – Bull. Murith. 117: 45–59.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – pp. 315–322. In: INNIS, M.A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J. & WHITE, T. J. (eds.), PCR Protocols. – San Diego: Academic.
- Tab. 1: Übersicht aller neu untersuchten Proben mit Abkürzung, der jeweiligen Herkunft und GenBank-Nummern. Abkürzungen für Herbarien nach THIERS (2021); n. v. nicht verwendet/not used. – Newly sequenced samples are given with sample abbreviation, geographical origin and GenBank number. Herbarium acronyms according to THIERS (2021).

Abk.	Herkunft	Referenz	GenBank	
Onosma arenaria			rpl32-trnL	ITS
OA1	Deutschland, Rheinland-Pfalz, Mainzer Sand	MS33, Bot. Garten Mainz	OK085509	OK067508– OK067515
OA2	Deutschland, Rheinland-Pfalz, Mainzer Sand	MS13, Bot. Garten Mainz	OK085510	OK067516– OK067525
OA3	Deutschland, Botanischer Garten Mainz	MS34, Bot. Garten Mainz	OK085511	n. v.
OH1	Schweiz, Wallis, Visp	ZT 172968	OK085515	OK067554- OK067562
OH2	Schweiz, Wallis, Gampel-Bratsch	ZT 172966	OK085516	OK067563– OK067571
OLO1	Schweiz, Waadt, Ollon	V. Kolarčik OLO 14-1	OK085517	OK067526- OK067532
OLO2	Schweiz, Waadt, Ollon	V. Kolarčik OLO 14-2	OK085518	OK067533– OK067538
CEI3	Frankreich, Hautes-Alpes, Ceillac	V. Kolarčik CEI 12-3	OK085503	OK067472– OK067481
CEI5	Frankreich, Hautes-Alpes, Ceillac	V. Kolarčik CEI 12-5	OK085504	n. v.
EPOL1	Ungarn, Komarom-Esztergom, Epöl	V. Kolarčik EPOL 1	OK085507	OK067501– OK067507
EPOL2	Ungarn, Komarom-Esztergom, Epöl	V. Kolarčik EPOL 2	OK085508	n. v.
CHIT13	Rumänien, Constanta, Constanta	V. Kolarčik CHIT 14-13	OK085505	OK067482– OK067490
CHIT14	Rumänien, Constanta, Constanta	V. Kolarčik CHIT 14-14	OK085506	OK067491– OK067500
Onosma echioides (inkl. subsp. angustifolia [Lенм.] Peruzzı & N. G. PassaL.)				
OE1	Italien, Apulien, San Nicandro	MJG 8500	OK085512	OK067539– OK067545
OE2	Italien, Apulien, Gargano	R. Wagensommer 2020-10-03	OK085513	n. v.
ON1	Italien, Abruzzen, Celano	MJG 8444	OK085519	n. v.
ON2	Italien, Apulien, Manfredonia	MJG 8442	OK085520	n. v.
Onosma fastigiata				
OF1	Frankreich, Alpes-Côte d'Azur, Uvernet-Fours	S. Lavergne CB_03586_FR1	OK085514	OK067546– OK067553
Onosma pseudoarenaria				
OP1	Schweiz, Wallis, Sitten	ZT 173031	OK085521	OK067572– OK067580
OP2	Schweiz, Wallis, Saillon	ZT 173032	OK085522	OK067581– OK067589