

# Phylogenie und Phylogeographie antarktischer und bipolarer Flechten der Gattung *Usnea*, *Neuropogon*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
des Fachbereichs  
Biologie und Geographie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Nora Wirtz  
aus Finnentrop

Tag der mündlichen Prüfung  
11. Juli 2006

Prüfer  
Prof. Dr. Martin Heil  
PD. Dr. H. Thorsten Lumbsch  
Prof. Dr. Hardy Pfanz

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung Botanik der Universität Duisburg-Essen in Essen, in der Abteilung Botanik und Molekulare Evolutionsforschung am Forschungsinstitut Senckenberg in Frankfurt sowie in der Abteilung Botanik und dem Pritzker Labor des Field Museums in Chicago durchgeführt.

### ZUSAMMENFASSUNG

Flechten sind symbiontische Organismen, die aus einem Pilz und einem oder mehreren photosynthetisch aktiven Partnern, eukaryotischen Algen oder Cyanobakterien, bestehen. Diese Organismen haben eine Reihe von morphologischen Merkmalen entwickelt, die in nicht-lichenisierten Pilzen fehlen. Die taxonomische Bedeutung und Interpretation der Variabilität dieser Merkmale sind unklar. Zudem zeigen Flechten oftmals weltumspannende Verbreitungsmuster, aber historische Populationsprozesse sind weitgehend unverstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals phylogenetische und phylogeographische Ansätze kombiniert, um Artgrenzen, die Bedeutung morphologischer und chemischer Variabilität innerhalb und zwischen Arten sowie die zugrunde liegenden vegetationshistorischen Prozesse zu untersuchen. Als Modellorganismus diente eine hauptsächlich in der Antarktis und in angrenzenden Gebieten verbreitete Pioniergruppe aus der Flechtengattung *Usnea*, die Untergattung *Neuropogon*. Zurzeit werden 15 strauchige, steinbewohnende Flechtenarten mit schwarzer Pigmentierung, dunklen Fruchtkörpern und südhemisphärischer oder zirkumpolar arktisch und antarktischer (bipolarer) Verbreitung zu *Neuropogon* gezählt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche Ursachen für diese ungewöhnliche Verbreitung untersucht, insbesondere die Frage, ob genetischer Austausch zwischen den beiden Polarregionen bzw. zwischen Südamerika und der Antarktis stattfindet oder ob die Populationen effektiv isoliert sind. Die Arbeit umfasst drei Hauptthemen: (1) die phylogenetische Stellung der Untergattung *Neuropogon* innerhalb *Usneas*, (2) die Abgrenzung von Arten innerhalb der *Neuropogon*-Gruppe und (3) der phylogeographische Kontext für die Artabgrenzungen und die rezente Verbreitung der Arten.

Im ersten Teil konnte auf Basis von 50 ribosomalen ITS-Sequenzen von zwölf *Neuropogon*-Arten gezeigt werden, dass *Neuropogon* paraphyletisch ist. Die Gruppe spaltet sich in eine Kerngruppe nah verwandter Arten mit unklaren verwandtschaftlichen Beziehungen und in drei weitere Arten auf, die in eine andere Sektion innerhalb *Usneas* fallen. Die Pigmentierung des Thallus und die dunklen Fruchtkörper scheinen keine *Neuropogon*-spezifischen Merkmale zu sein und sind eher auf raue klimatische Bedingungen zurückzuführen. Folglich wurde *Neuropogon* mit *Usnea* synonymisiert.

Im zweiten Teil wurde der Datensatz auf 308 Individuen und drei Genfragmente, die ribosomale ITS und IGS und das proteincodierende Gen RPB1, erweitert. Die phylogenetische Analyse dieser Daten zeigt eine Trennung zwischen einer Kerngruppe und einer Außengruppe,

bestehend aus drei monophyletischen Arten sowie einem Artkomplex aus neuseeländischen Proben. Die Kerngruppe besteht aus drei verwandten Gruppen, in denen sich jeweils vegetativ reproduzierende Individuen um eine der drei fertilen Arten *U. trachycarpa*, *U. perpusilla* und *U. aurantiaco-atra* gruppieren. Mit Hilfe der phylogenetischen Arterkennungsmethode nach WIENS & PENKROT (2000) konnten Artgrenzen innerhalb dieser Gruppen aufgedeckt werden. Neben kryptischen Arten wurde dabei jeweils eine bipolare Abstammungslinie innerhalb des *U. trachycarpa*- und des *U. perpusilla*-Komplexes entdeckt, die bisher als eine zusammenhängende Art, *U. sphacelata*, betrachtet wurden.

Zuletzt wurden die Datensätze der drei Gruppen separat, mit Hilfe der Nested Clade Analyse (NCA, TEMPLETON et al. 1987), in einem phylogeographischen Kontext an der intra-interspezifischen Schnittstelle untersucht, um Artgrenzen und populationshistorische Prozesse abzuleiten. Bei großen geographischen Distanzen traten allerdings Probleme in der NCA auf. Die Übereinstimmung von genetischer Abweichung und geographischer Distanz ist insgesamt gering. Alle nordhemisphärischen Populationen sind im Vergleich zu den südhemisphärischen Populationen genetisch sehr homogen, woraus auf rezente Fernverbreitung geschlossen wird. Es gibt deutliche Hinweise auf kryptische Artbildung sowie auf eine postglaziale Wiederbesiedlung der Antarktis und periodischen Genfluss von Südamerika in die Antarktis. Zur Unterstützung der Artabtrennungen, wurde die Verbindung morphologischer und chemischer Merkmale mit der Position der Haplotypen in den hierarchisch geschachtelten Haplotyp-Netzwerken anhand von Kontingenztafeltests und ANOVAs überprüft. In fast allen Fällen konnten die phylogenetischen und phylogeographischen Schlussfolgerungen durch diese Daten signifikant unterstützt werden.

Aus den Untersuchungen ergeben sich folgende taxonomische Schlussfolgerungen: (1) drei neue Arten wurden entdeckt; (2) *U. sphacelata* und *U. perpusilla* sind Artkomplexe, die insgesamt aus mindestens sechs Arten bestehen; (3) *U. antarctica* ist synonym mit *U. aurantiaco-atra*; (4) fünf Arten, *U. acromelana*, *U. ciliata*, *U. perpusilla*, *U. subcapillaris* und *U. trachycarpa*, werden als vorläufige Arten akzeptiert, bedürfen aber weiterer Untersuchungen und (5) vier der zurzeit akzeptierten Arten, *U. acanthella*, *U. durietzii*, *U. patagonica* und *U. subantarctica*, werden in ihrer derzeitigen Abgrenzung bestätigt.

## ABSTRACT

Lichens are symbiotic organisms that consist of a fungus and one or more photosynthetically active partners, eucaryotic algae or cyanobacteria. These organisms have developed a set of morphological characters that are absent in non-lichenized fungi. The taxonomic importance and interpretation of the variability of these characters are unclear. In addition lichens often reveal worldwide distribution patterns but their population history is still poorly known.

The present thesis is the first to combine phylogenetic and phylogeographic approaches for the investigation of species boundaries, the importance of morphological and chemical variability within and between species as well as the basic vegetation historical processes. The model organism is a subgenus of the lichen genus *Usnea*, named *Neuropogon* that is mainly distributed in Antarctica and adjacent areas. Currently 15 fruticose and saxicolous lichen species with a black pigmentation, dark apothecia and Southern hemispherical or circumpolar arctic and Antarctic (bipolar) distribution are known. This study examines potential causes of this unusual distribution, in particular the question if there is genetic exchange, respectively, between the two polar regions and between South America and Antarctica or if the populations are effectively isolated. The study comprises three main issues: (1) the phylogenetic position of the subgenus *Neuropogon* within *Usnea*, (2) the circumscription of species within *Neuropogon* and (3) the phylogeographic context for species delimitation and the recent distribution of species.

In the first part 50 ribosomal ITS sequences from 12 *Neuropogon* species were used to demonstrate that *Neuropogon* is paraphyletic. The group is separated into a core group of closely related species with uncertain relationships among each other and three further species clustering close to a different section within *Usnea*. Thallus pigmentation and the colour of apothecial disks appear to be non-specific characters of *Neuropogon* and rather a response to harsh climatic conditions. Consequently, *Neuropogon* is reduced to synonymy with *Usnea*.

In the second part the molecular dataset was extended to 308 studied specimens and three gene fragments, the ribosomal ITS and IGS and the protein coding gene RPB1. The phylogenetic analyses of these data reveal a distinction between a core group and an out-group consisting of three monophyletic species and a species complex of New Zealand specimens. The core group comprises three related groups of mainly vegetatively reproducing lineages that are arranged around the fertile species *Usnea trachycarpa*, *U. perpusilla* and *U.*

*aurantiaco-atra*. The phylogenetic species recognition method of WIENS & PENKROT (2000) is used to detect species boundaries within these groups. Besides cryptic species a bipolar lineage was detected in both the *U. trachycarpa* and *U. perpusilla* complexes, which were formerly described as a single species, *U. sphacelata*.

Subsequently, the dataset of each group is used separately in a phylogeographic context performing nested clade analysis (NCA, TEMPLETON et al. 1987) to infer species boundaries and population history on an intra-interspecific interface. However, NCA turns out to perform poorly over large geographical distances. The concordance of genetic deviation and geographical distance is over-all small. All Northern Hemisphere populations are genetically very homogeneous compared to their Southern Hemisphere counterparts, which points to recent long-distance dispersal. There is broad evidence for cryptic speciation and post-glacial recolonisation of Antarctica as well as periodic gene flow from South America into Antarctica. To support species delimitations the association of morphological and chemical characters with the position of haplotypes on hierarchically nested haplotype networks was reviewed using contingency tests and ANOVAs. In almost all cases phylogenetic and phylogeographical conclusions are significantly corroborated by these data.

The study yields the following taxonomic conclusions: (1) three new species are recognized; (2) *U. sphacelata* and *U. perpusilla* are species complexes comprising at least six species in total; (3) *U. antarctica* and *U. aurantiaco-atra* are reduced to synonymy; (4) five species, *U. acromelana*, *U. ciliata*, *U. perpusilla*, *U. subcapillaris* and *U. trachycarpa*, are provisionally accepted as species, but need further study and (5) the four species *U. acanthella*, *U. durietzii*, *U. patagonica* and *U. subantarctica* are confirmed in their current circumscription.

## DANKSAGUNG

Ich danke Prof. Martin Heil für die offizielle Betreuung meiner Arbeit, die Einarbeitung in mein Flechtenthema und die hilfreichen Kommentare zur Verbesserung der Arbeit. Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe in Essen, vor allem Dr. Manfred Jensen, für ihre Unterstützung und die stets offenen Türen auch nach längerer Abwesenheit.

Dr. Christian Printzen und der gesamten Flechten- und Laborgruppe am Senckenberg Museum in Frankfurt sei für die herzliche Aufnahme in ihre Abteilung gedankt. Christian danke ich insbesondere für seine fachliche Unterstützung und sein großes Engagement zahlreiche bürokratische Hürden für unser Projekt und für mich zu überwinden.

Mein größter Dank allerdings gilt meinem SUPERVISOR Dr. Thorsten Lumbsch, für seine einzigartige Betreuung, seine Ideen und sein fachliches Know-how, sein großes Vertrauen in meine Fähigkeiten und seine Freundschaft. *Vielen Dank für alles, Thorsten!*

Allen privaten Sammlern und Herbarien danke ich für ihr Engagement und ihre Kooperation. Besonders hervorheben möchte ich hier: Allan Green (Neuseeland), Alexei Zavarzin (Russland), Bruce McCune (Oregon), Burkhard Schroeter (Kiel), Christian Printzen (Frankfurt), Eric Steen Hansen (Dänemark), Fabian Seymour (Nottingham), Jack Elix (Canberra), Leo Sancho (Madrid), Matthew Nelsen (Madison), Peter Crittenden (Nottingham), Peter Neitlich (Washington), Sieglinde Ott (Düsseldorf), Starri Heidmarsson (Island), Tor Tønsberg (Bergen) und Zdenek Palice (Prag). Herbarien: BM, C, CHR, F, FM, OTA, WIS.

Dominic Batre und Dr. David Angulo (DePaul University, Chicago) sowie Dr. Rick Ree (Field Museum, Chicago) sei für die kompetente computertechnische Unterstützung gedankt. Sehr herzliche danke ich Prof. Jack A. Elix (Australien National University, Canberra) für seine Unterstützung bei der Analyse der chemischen Inhaltsstoffe. Ein herzlicher Dank geht an Dr. Betty Strack (Field Museum) für die Erklärungen am Elektronenmikroskop und ihr Vertrauen in mich. Dr. Kevin Feldheim (Field Museum) danke ich für seine exzellente Betreuung im Pritzker Labor und Iyabo Osifeso, Steffi Kautz und Birthe Bongartz für ihren großen Einsatz an der Laborbank!

Für meine beeindruckendsten Erlebnisse während der Doktorarbeitszeit danke ich von ganzem Herzen meinen Exkursionsbegleitern und –organisatoren: Dr. Maria Ines Messuti, Andrés Dielh und Prof. Gernot Vobis in Bariloche, Patagonien, und Angel Ramirez und Prof. Asuncion Cano in Lima, Peru.

Und nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Kollegen und Freunden am Field Museum bedanken, die meine Zeit in den USA so unvergesslich gemacht haben! Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Mitstreitern Imke und Armin, die mit mir durch Dick und Dünn gegangen sind. Auch meinen Mitbewohnerinnen Amy und Ute sowie Isabella und Dirk danke ich für ihre Freundschaft.

*Fühlt euch alle fest gedrückt!*

Ich möchte meinen lieben Eltern für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht danken, dafür, dass sie eine zweite „Ausbildung“ nach dem Studium und einen langen Verzicht auf ihre Tochter wie selbstverständlich mitgetragen und ertragen haben und immer für mich da waren. Meinen Geschwistern Daniel, Nikola und Alice und meinen Omas sei hierfür ebenfalls herzlich gedankt.

Meinem lieben Freund Peter möchte ich hier von Herzen für seine uneingeschränkte Solidarität und Liebe danken. Was wäre aus mir nur ohne deine zahllosen Aufmunterungen, deine Hilfe und auch deine Standpauken geworden?

Diese Arbeit wurde durch ein DFG-Stipendium für H. T. Lumbsch und C. Printzen, ein DAAD-Auslandsstipendium, den Kurator-Start-up-Fonds von H. T. Lumbsch sowie das Women's Board des Field Museums in Chicago finanziert und unterstützt

## INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	IV
TABELLENVERZEICHNIS .....	V
VERWENDETE ABKÜRZUNGEN .....	VI
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Flechtengattung <i>Usnea</i> .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Historischer Überblick über die <i>Neuropogon</i>-Gruppe .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Phylogeographie und das bipolare Verbreitungsmuster .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Ziele und Aufbau der Arbeit .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Benutzte molekulare Marker in dieser Arbeit .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Phylogenetische Stellung Untergattung <i>Neuropogon</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Taxonomie und Klassifikation der Gattung <i>Usnea</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Molekulare Analysemethoden .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Alignment .....	17
2.2.2 Phylogenetische Analyse .....	18
<b>2.3 Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.3.1 Untersuchte Proben .....	26
2.3.2 Morphologische Analyse .....	26
2.3.3 Molekulare Marker .....	27
2.3.4 Labormethoden .....	28
2.3.5 Analytische Methoden .....	32
2.3.5.1 Bearbeitung der Sequenzen und Erstellung der Alignments .....	32
2.3.5.2 Wahl der Außengruppe .....	33
2.3.5.3 Phylogenetische Methoden .....	33
<b>2.4 Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
2.4.1 Datensatz .....	36
2.4.2 Phylogenetische Analyse .....	38
2.4.3 Ergebnisse der Hypothesentests .....	44
2.4.4 Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie .....	45
<b>2.5 Diskussion .....</b>	<b>50</b>
2.5.1 Revision der <i>Neuropogon</i> -Gruppe: Merkmale und phylogenetische Stellung .....	50
2.5.2 Phylogenie der Gattung <i>Usnea</i> .....	54

<b>3. Artabgrenzung und Phylogeographie innerhalb der <i>Neuropogon</i>-Gruppe .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1 Artkonzepte in der Systematik .....</b>	<b>57</b>
<b>3.2 Morphologische Merkmale in <i>Usnea</i> und <i>Neuropogon</i> .....</b>	<b>61</b>
<b>3.3 Sekundärstoffe als taxonomische Merkmale .....</b>	<b>66</b>
<b>3-A Phylogenie gestützte Artabgrenzung .....</b>	<b>69</b>
<b>A-1 Einleitung .....</b>	<b>69</b>
A-1.1 Vom phänotypischen zum phylogenetischen Artkonzept bei Flechten .....	69
A-1.2 Phylogenetische Artabgrenzung auf der Grundlage molekularer Daten .....	70
<b>A-2 Material und Methoden .....</b>	<b>71</b>
A-2.1 Untersuchte Proben .....	71
A-2.2 Molekulare Marker .....	71
A-2.3 Phylogenetische Analyse .....	73
A-2.3.1 Bearbeitung der Sequenzen und Alignments .....	73
A-2.3.2 Wahl der Außengruppe .....	73
A-2.3.3 Phylogenetische Methoden .....	73
A-2.4 Kongruenz- und Rekombinationstest .....	74
A-2.5 Phylogenetische Artabgrenzung nach WIENS & PENKROT (2002) .....	75
<b>A-3 Ergebnisse .....</b>	<b>77</b>
A-3.1 Einzelgen-Analysen .....	77
A-3.1.1 Sequenzdaten .....	77
A-3.1.2 Phylogenetische Analyse .....	78
A-3.1.3 Kongruenz der Datensätze .....	92
A-3.1.4 Rekombinationstest .....	92
A-3.2 Phylogenie aufgrund des kombinierten Datensatzes .....	93
A-3.2.1 Sequenzdaten .....	93
A-3.2.2 Phylogenetische Analyse .....	93
<b>A-4 Diskussion .....</b>	<b>103</b>
A-4.1 Kongruenz der Datensätze .....	103
A-4.2 Einzelgen-Analysen: Nutzung molekularer Marker auf Populationsebene .....	105
A-4.3 Kombinierte Phylogenie - Artabgrenzungen und phylogenetische Gruppierungen .....	107

<b>3-B Nutzung von DNA-Haplotyp-Netzwerken zur Artabgrenzung und zur phylogeographischen Analyse .....</b>	<b>117</b>
<b>B-1 Einleitung .....</b>	<b>117</b>
B-1.1 Netzwerkmethoden und Haplotypverteilung .....	117
B-1.2 Nested Clade Analyse (NCA) .....	119
<b>B-2 Material und Methoden .....</b>	<b>123</b>
B-2.1 Untersuchte Proben und Gruppierungen .....	123
B-2.2 Genetische Beschreibung der Populationen .....	123
B-2.3 Morphologische Analyse .....	124
B-2.4 Chemische Analyse .....	125
B-2.5 Median-joining-, statistische Parsimony-Netzwerke und Nested Clade Analyse .....	127
B-2.6 Kontingenztafeltests und ANOVA (Analysis of variance) .....	128
<b>B-3 Ergebnisse .....</b>	<b>129</b>
B-3.1 Datensätze und genetische Diversität .....	129
B-3.2 Morphologische und chemische Daten .....	141
B-3.3 Phylogenetische Analyse (Netzwerke) .....	142
B-3.4 Nested Clade Analyse .....	152
B-3.5 Kontingenztafeltests und ANOVAs .....	172
<b>B-4 Diskussion .....</b>	<b>176</b>
B-4.1 Genetische Diversität der untersuchten <i>Neuropogon</i> -Gruppen .....	176
B-4.2 Artabgrenzung und phylogeographische Interpretation der Gruppen .....	178
B-4.2.1 <i>U. trachycarpa</i> -Gruppe .....	178
B-4.2.2 <i>U. perpusilla</i> -Gruppe .....	185
B-4.2.3 <i>U. aurantiaco-atra</i> -Gruppe .....	192
<b>4. Schlussfolgerungen .....</b>	<b>198</b>
<b>4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>198</b>
<b>4.2 Artabgrenzung aufgrund der WP-Methode, NCA und phänotypischer Merkmale .....</b>	<b>202</b>
<b>4.3 Taxonomische Konsequenzen .....</b>	<b>208</b>
<b>5. Literatur .....</b>	<b>215</b>
ANHANG.....	230

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: <i>Usnea perpusilla</i> : Habitusaufnahme und Thallusquerschnitt .....	2
Abb. 1.2: Schematische Darstellung einer nukleären ribosomalen DNA Einheit .....	9
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der konservierten Aminosäuredomänen im RPB1-Gen ...	11
Abb. 2.1: Klassifikation der <i>Neuropogon</i> -Gruppe nach ERIKSSON 2004 .....	13
Abb. 2.2: Kortextypen der Gattung <i>Usnea</i> .....	15
Abb. 2.3: Nukleäre ribosomale DNA und benutzte ITS-Primer .....	28
Abb. 2.4: 50%-majority-rule Konsensusbaum des nu ITS rDNA-Datensatzes .....	39
Abb. 2.5: NJ-Baum des nu ITS rDNA-Datensatzes (GTR+I-Substitutionsmodell) .....	40
Abb. 2.6: NJ-Baum des nu ITS rDNA-Datensatzes (LogDet-Substitutionsmodell) .....	41
Abb. 2.7: Strikter Konsensusbaum der MP-Analyse des nu ITS rDNA-Datensatzes .....	42
Abb. 2.8/I-III: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen .....	46-48
Abb. 2.9: Apothecien von vier <i>Neuropogon</i> -Arten .....	52
Abb. 2.10: Habitus von <i>Usnea</i> sp. nov. 2 aus Peru .....	52
Abb. 3.1: Morphologische Merkmale in <i>Neuropogon</i> I .....	64
Abb. 3.2: Morphologische Merkmale in <i>Neuropogon</i> II .....	65
Abb. 3.3: Nukleäre ribosomale DNA und benutzte IGS-Primer .....	72
Abb. 3.4: Schematische Darstellung des proteincodierenden Gens RPB1 und Primer .....	72
Abb. 3.5-1 bis 3: 50%-majority-rule Konsensusbaum der nu ITS rDNA (371 Taxa) .....	79-81
Abb. 3.6-1 bis 3: 50%-majority-rule Konsensusbaum der nu IGS rDNA (399 Taxa) .....	84-86
Abb. 3.7-1 bis 3: 50%-majority-rule Konsensusbaum des RPB1 Gens (350 Taxa) .....	89-91
Abb. 3.8: Übersicht über den 50%-majority-rule Konsensusbaum (kombinierter Datensatz) ...	94
Abb. 3.9-1 bis 4: 50%-majority-rule Konsensusbaum des kombinierten Datensatzes .....	95-98
Abb. 3.10: Schematische Darstellung des ‚Lineage Sorting‘ .....	106
Abb. 3.11: Sammelorte der Individuen der <i>U. trachycarpa</i> -Gruppe .....	132
Abb. 3.12: Sammelorte der Individuen der <i>U. perpusilla</i> -Gruppe .....	136
Abb. 3.13: Sammelorte der Individuen der <i>U. aurantiaco-atra</i> -Gruppe .....	140
Abb. 3.14: Statistisches Parsimony-Netzwerk der <i>U. trachycarpa</i> -Gruppe .....	143
Abb. 3.15: Median-joining Netzwerk der <i>U. trachycarpa</i> -Gruppe .....	144
Abb. 3.16: Statistisches Parsimony-Netzwerk der <i>U. perpusilla</i> -Gruppe .....	147
Abb. 3.17: Median-joining Netzwerk der <i>U. perpusilla</i> -Gruppe .....	148
Abb. 3.18: Statistisches Parsimony-Netzwerk der <i>U. aurantiaco-atra</i> - Gruppe .....	150
Abb. 3.19: Median-joining Netzwerk der <i>U. aurantiaco-atra</i> -Gruppe .....	151
Abb. 3.20: ‚Nesting-Design‘ des Parsimony-Netzwerkes der <i>U. trachycarpa</i> -Gruppe .....	153
Abb. 3.21: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der NCA, <i>U. trachycarpa</i> .....	156
Abb. 3.22: ‚Nesting-Design‘ des Parsimony-Netzwerkes der <i>U. perpusilla</i> -Gruppe .....	159
Abb. 3.23: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der NCA, <i>U. perpusilla</i> .....	162
Abb. 3.24: ‚Nesting-Design‘ des Parsimony-Netzwerkes der <i>U. aurantiaco-atra</i> -Gruppe .....	166
Abb. 3.25: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der NCA, <i>U. aurantiaco-atra</i> .....	169
Abb. 4.1: Plot der wichtigsten NCA-Clades auf den kombinierten Baum der WP-Analyse .....	203
Abb. 4.2: Morphologische Merkmale in <i>Neuropogon</i> III .....	214

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1: Vorschläge verschiedener Autoren zur Klassifikation von <i>Neuropogon</i> .....	5
Tab. 2.1: Auflistung der zur phylogenetischen Untersuchung benutzten Proben .....	22-25
Tab. 2.2: Übersicht über Bootstrap-Werte und Posterior Probabilities phylogenetischer Gruppierungen in den Phylogrammen .....	43
Tab. 2.3: Ergebnis der zwei getesteten phylogenetischen Nullhypothesen .....	44
Tab. 3.1: Reproduktionsmodi der <i>Neuropogon</i> -Gruppe .....	66
Tab. 3.2: Chemische Inhaltsstoffe der <i>Neuropogon</i> -Gruppe .....	68
Tab. 3.3: Ergebnis des Rekombinationstests .....	93
Tab. 3.4: Posterior Probabilities und Bootstrap-Unterstützungswerte der Einzelgen- und kombinierten Analysen für relevante phylogenetische Gruppen .....	107
Tab. 3.5: Untersuchte morphologische Merkmale und ihre Ausprägungen in <i>Neuropogon</i> .....	124
Tab. 3.6: Variable Alignmentpositionen der <i>U. trachycarpa</i> -Gruppe .....	130
Tab. 3.7: Genetische Beschreibung der Populationen der <i>U. trachycarpa</i> -Gruppe .....	131
Tab. 3.8: Variable Alignmentpositionen der <i>U. perpusilla</i> -Gruppe .....	133
Tab. 3.9: Genetische Beschreibung der Populationen der <i>U. perpusilla</i> -Gruppe .....	135
Tab. 3.10: Variable Alignmentpositionen der <i>U. aurantiaco-atra</i> -Gruppe .....	138
Tab. 3.11: Genetische Beschreibung der Populationen der <i>U. aurantiaco-atra</i> -Gruppe .....	139
Tab. 3.12: Chemische Inhaltsstoffe in <i>Neuropogon</i> .....	141
Tab. 3.13: <i>U. trachycarpa</i> -Haplotyp-Nesting Zusammenfassung .....	154
Tab. 3.14: Statistische Ergebnisse der Nested Clade Analyse der <i>U. trachycarpa</i> -Gruppe .....	157
Tab. 3.15: <i>U. perpusilla</i> -Haplotyp-Nesting Zusammenfassung .....	160
Tab. 3.16: Statistische Ergebnisse der Nested Clade Analyse der <i>U. perpusilla</i> -Gruppe .....	164
Tab. 3.17: <i>U. aurantiaco-atra</i> -Haplotyp-Nesting Zusammenfassung .....	166
Tab. 3.18: Statistische Ergebnisse der Nested Clade Analyse der <i>U. aurantiaco-atra</i> -Gruppe ..	171
Tab. 3.19: Ergebnisse der Kontingenztafeltests für die <i>U. trachycarpa</i> -Gruppe .....	172
Tab. 3.20: Ergebnisse der Kontingenztafeltests für die <i>U. perpusilla</i> -Gruppe .....	173
Tab. 3.21: Ergebnisse der Kontingenztafeltests für die <i>U. aurantiaco-atra</i> -Gruppe .....	174
Tab. 3.22: ANOVA-Testergebnisse für alle drei Gruppen .....	175
Tab. 4.1: Übersicht über morphologische und chemische Merkmale der bipolaren Arten <i>U. sphacelata</i> und <i>U. lambii</i> .....	206
Tab. 4.2: Zusammenfassung der taxonomischen Konsequenzen .....	207

## VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

aff.	affinis = ähnlich
B/MCMC	Bayes'sche Analyse nach der Markov Chain Monte Carlo Methode
bp	Basenpaare
BS	Bootstrap-Wert (Prozentangabe, mit welcher Häufigkeit Verzweigungen in einem Phylogramm unterstützt werden)
cf.	confer = vergleiche
IGS	Intergenic spacer; Abschnitt der ribosomalen DNA
ITS	Internal transcribed spacer; Abschnitt der ribosomalen DNA
LS	Lineage Sorting = Auftrennung von Abstammungslinien in Arten
LSU	large subunit = große Untereinheit der Ribosome (auch 28S)
MJ	Median-joining (Netzwerk)
ML	Maximum Likelihood
MP	Maximum Parsimony
mt DNA	mitochondriale DNA
NCA	Nested Clade Analyse
NJ	Neighbor-joining
nu	nukleär
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PP	posterior probability (Wahrscheinlichkeitswert, mit dem Verzweigungen in einem B/MCMC Phylogramm unterstützt werden)
rDNA	ribosomale DNA
RPB1	große Untereinheit der nukleären RNA-Polymerase II
s. lat.	sensu lato = im weiteren Sinne
sp. nov.	species nova = neue Art
SP	statistisches ‚parsimony‘ (Netzwerk)
s. str.	sensu stricto = im engeren Sinne
SSU	small subunit = kleine Untereinheit der Ribosome (auch 18S)
subg.	subgenus = Untergattung

## 1. Einleitung

Flechten besiedeln als Pioniere der Vegetation selbst sehr kalte oder nährstoffarme Lebensräume wie Polar-, Hochgebirgs- oder Wüstenregionen. Ihre autotrophe Lebensweise, die durch die symbiontische Beziehung zwischen Pilz und photosynthetisch aktiven Algen bzw. Cyanobakterien gewährleistet ist, ermöglicht z. B. auch die Besiedlung von nacktem Fels. In ausgetrocknetem Zustand können Flechten Hitze, Kälte und andere widrige Bedingungen überdauern und somit auch in Wüsten überleben. Systematisch zählt man die Flechten zu den Pilzen, da der Mykobiont (Pilzpartner) den artbestimmenden Symbiosepartner darstellt und dieselbe Algenart von verschiedenen Pilzen genutzt werden kann. Da Flechten neben ihren Fruchtkörpern häufig wenige charakteristische Merkmale aufweisen, viele Arten aber keine sexuelle Fortpflanzung zeigen, ist die Bestimmung und systematische Eingliederung oft schwierig. Viele Flechten bilden zusätzlich oder sogar ausschließlich vegetative Verbreitungseinheiten aus, mit denen sich die Symbiosepartner gemeinsam ausbreiten können. Aufgrund fehlender Merkmale werden zur Identifizierung von Arten häufig flechtenspezifische, chemische Sekundärstoffe untersucht die z. T. auch medizinisch interessant sind. Erstaunlicherweise weiß man nach wie vor wenig über die Fortpflanzungs- und Populationsbiologie von Flechten, sowie über die Ausbreitungseffizienz von Sporen und vegetativen Verbreitungseinheiten. Zum Beispiel ist völlig unklar, ob Flechtenarten, die in beiden Polarregionen vorkommen und daher als bipolar bezeichnet werden, in Kontakt stehen und genetisches Material austauschen oder nicht.

In der vorliegenden Arbeit wird modellhaft eine Untergruppe der Flechtengattung *Usnea* untersucht, die hauptsächlich in antarktisch-subantarktischen Regionen und Höhenlagen Südamerikas vorkommt, aber auch bipolare Elemente enthält. Die zugehörigen Arten haben regional unterschiedliche Verbreitungszentren und nutzen verschiedene Verbreitungsmechanismen. Ihre Verwandtschaft ist in den meisten Fällen unklar. Zwei zentrale Fragestellungen werden untersucht: 1) Wie lässt sich die untersuchte Gruppe als Ganzes in die bestehende Klassifikation eingliedern und 2) Welche genetischen und geographischen Muster ergeben sich innerhalb der Gruppe auf Populationsebene und welche Aufschlüsse können diese im Hinblick auf historische Besiedlungsprozesse und rezente Artabgrenzungen geben? Methodisch werden DNA-Sequenzdaten von drei Genen und über 300 Individuen mit geographischen, morphologischen und chemischen Daten verknüpft und anhand verschiedener phylogenetischer und phylogeographischer Auswertungsverfahren analysiert. Abschließend werden daraus taxonomische Konsequenzen für die Gruppe gezogen.

Diese Arbeit stellt eine der ersten groß angelegten phylogeographischen Arbeiten an Flechten dar und trägt in vielen Belangen bedeutend zum besseren Verständnis dieser Organismen bei.

### 1.1 Die Flechtengattung *Usnea*

Die Flechtengattung *Usnea*, mit heute mehr als 600 beschriebenen Arten, ist eine der artenreichsten Gattungen innerhalb der größten Flechtenfamilie, den Parmeliaceae (HAWKSWORTH et al. 1995). Bartflechten, wie die Vertreter dieser Gattung auch genannt werden, haben eine aufrecht strauchige bis hängende Wuchsform und kommen vorwiegend auf festen Substraten wie Rinde und Stein vor. Die Gattung ist kosmopolitisch und von polaren über boreale und temperierte Gebiete bis in die Tropen häufig und weit verbreitet. In polaren Gebieten bedecken Usneen z. T. weite Küstenbereiche und tragen dadurch erheblich zur Substratanreicherung bei. Außerdem produzieren alle Vertreter der Gattung das medizinisch genutzte Antibiotikum Usninsäure, das der Gattung auch ihren Namen gab. Das Hauptmerkmal der Gattung ist der radialsymmetrische Thallusaufbau (Abb. 1.1), gegliedert in einen Usninsäure enthaltenden Kortex, eine Markschicht mit Algen der Gattung *Trebouxia* und einen stabilen, knorpelartigen Zentralstrang, den man im Allgemeinen durch Dehnung der Äste vom Mark trennen kann (CLERC 1998, OHMURA 2001).

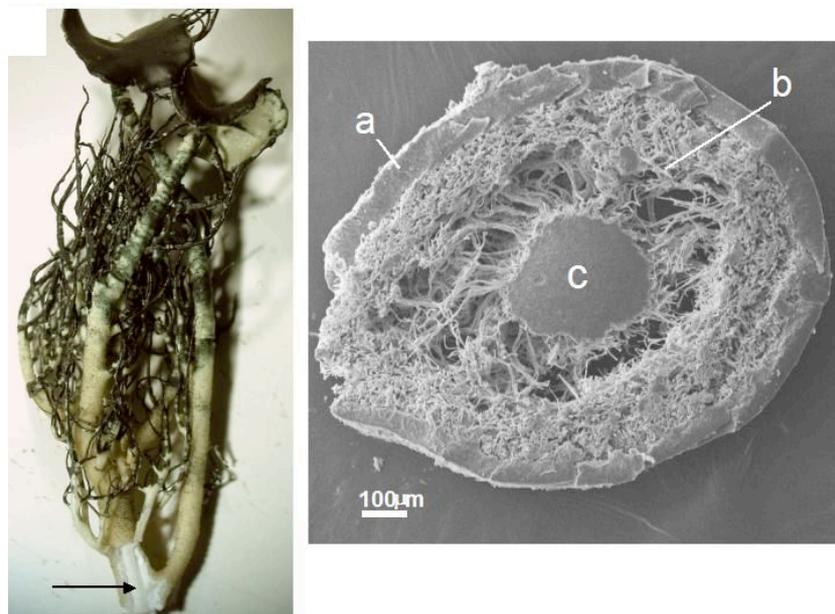


Abb. 1.1: *Usnea perpusilla*: Habitusaufnahme (links) und Thallusquerschnitt (rechts): (a) Kortex, (b) Markschicht, (c) Zentralstrang (siehe auch Pfeil links).

Die taxonomische Gliederung der Gattung *Usnea* beruht zumeist auf morphologischen und chemischen Merkmalen, wobei Arten sehr variabel sein können und verschiedene Ökotypen stark voneinander abweichen. Dies führte in der Vergangenheit häufig zur Beschreibung von

Morphotypen als eigenständige Arten und damit zu Verwirrungen bei der Bestimmung von *Usnea*-Arten (CLERC 1998, ARTICUS 2004a). Die Situation wird erheblich dadurch erschwert, dass ca. 52% der weltweit beschriebenen Arten asexuelle Arten sind (CLERC 1998), die sich häufig durch vegetative Fortpflanzungseinheiten wie Sorale, Isidiomorphe und Konidien vermehren. Sie werden dann aufgrund einer Kombination morphologischer und chemischer Merkmale, sowie Habitatpräferenzen und geographischer Verbreitung voneinander unterschieden. In einigen Fällen jedoch unterscheiden sich asexuell reproduzierende Arten nur durch ihren Reproduktionsmodus von anderen asexuellen oder Apothecien ausbildenden Arten. Durch molekulare Analysen konnte bereits mehrfach, auch in anderen Flechtengruppen, gezeigt werden, dass in diesen Fällen eine Aufspaltung in zwei oder mehrere Arten nicht immer gerechtfertigt ist (z. B. MYLLYS et al. 2001, ARTICUS et al. 2002, OTT et al. 2004). Durch neuere taxonomische Arbeiten wurden in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte im Umgang mit Artabgrenzungen in der Gattung *Usnea* erzielt. Taxonomen sind dazu übergegangen polymorphe Arten durch eine Kombination von Merkmalen mit größerer Variationsbreite zu charakterisieren (WALKER 1985, STEVENS 1992, HERRERA-CAMPOS et al. 1998, CLERC 1998, OHMURA 2001).

Auch auf höheren taxonomischen Ebenen wie Untergattungs- und Gattungsniveau gab und gibt es viele Unklarheiten. Seit MOTYKA (1936-38), der die erste weltweite *Usnea* Monographie erstellt hat, sind zahlreiche Untergattungen und Sektionen in *Usnea* beschrieben und diskutiert worden, unter anderem die Stellung der Untergattungen bzw. Sektionen *Neuropogon*, *Usnea*, *Dolichousnea* und *Eumitria* (KROG 1976, 1982, WALKER 1985, OHMURA 2001, 2002, OHMURA & KANDA 2004, ARTICUS 2004b) (siehe hierzu auch Kapitel 1.2 und 2.1). Weiterhin ist bis heute die Stellung der gesamten ‚usneoiden‘ Gattungen (*Usnea*, *Protousnea*, *Evernia*, *Letharia*, *Lethariella*) innerhalb der Parmeliaceae (ESCHWEILER 1824) unklar und weithin diskutiert (z. B. KROG 1976, 1982, KÄRNEFELT et al. 1998, THELL et al. 2002, 2004, MATTSSON et al. 2004).

Nachdem der Familienname Usneaceae (ESCHWEILER 1824) lange Zeit Bestand hatte und neben *Usnea* eine wechselnde Zusammenstellung von Gattungen mit zumeist strauchigen Thalli umfasste (ZAHLBRUCKNER 1926, KEISSLER 1960, POELT 1974, HALE 1983), wurde er von HENSSEN & JAHNS (1973) durch ein weiter gefasstes Familienkonzept, beruhend auf der Fruchtkörperontogenie und -anatomie, abgelöst und betroffene Gattungen den Parmeliaceae zugeordnet. Diese Ansicht wurde von ERIKSSON (1982) aufgegriffen und wird in Fachkreisen bis heute weitgehend anerkannt (ERIKSSON & HAWKSWORTH 1998). KÄRNEFELT et al. (1998) überprüften die mögliche Abgrenzung usneoider Gattungen anhand morphologischer

Untersuchungen und lehnten eine separate Familie Usneaceae ab. Seit der Verfügbarkeit molekularer Daten ist die Phylogenie der Parmeliaceae ein intensiv untersuchtes Thema (z. B. MATTSSON & WEDIN 1998, 1999, THELL et al. 2002, 2004, MATTSSON et al. 2004). Heute setzt sich die Familie aus ca. 90 Gattungen zusammen und ist in mehreren Studien als monophyletische Gruppe bestätigt worden (z. B. MATTSSON & WEDIN 1999, THELL et al. 2004). Verschiedene Bestrebungen, die Parmeliaceae zu untergliedern und eigenständige Familien auszukoppeln, konnten meist durch molekulare Daten revidiert werden. So gliederte HALE (1983) die „alectorioiden“ Gattungen *Alectoria*, *Bryoria*, *Coelocaulon*, *Cornicularia*, *Pseudephebe* und *Sulcaria* in die Familie Alectoriaceae, die dann aber durch molekulare Daten nicht bestätigt werden konnte (MATTSSON & WEDIN 1999). Eine Auflistung weiterer vorgeschlagener Familien findet sich in THELL et al. (2004).

Die Aufklärung der Verwandtschaft der Gattungen und Arten innerhalb der Parmeliaceae stellt sich jedoch auch nach der molekularen Revolution als schwierig dar. Neueste Untersuchungen kombinierter und größerer Datensätze liefern keine oder nur schwache Unterstützungen für größere verwandtschaftliche Zusammenhänge innerhalb der Parmeliaceae (MATTSSON et al. 2004, THELL et al. 2004), wobei jüngst innerhalb der Gruppe der parmelioiden Arten, den Blattflechten *Parmelia* s. lat., große Fortschritte bezüglich der Phylogenie dieser Gruppe erzielt wurden (BLANCO et al. 2004).

Die Gattung *Usnea* konnte in keiner der oben erwähnten Studien in einen konkreten und begründeten Zusammenhang mit anderen Gattungen gebracht werden. In MATTSSON et al. (2004) erscheint *Protousnea* als Schwestergruppe zu *Usnea*, dies ist aber nicht unterstützt.

## 1.2 Historischer Überblick über die *Neuropogon*-Gruppe

*Neuropogon*-Arten können traditionell wie folgt zusammengefasst werden: Sie haben einen gelb bis grünlichen, strauchigen Thallus mit variierender schwarzer Pigmentierung, zeigen eine polar-alpine Verbreitung mit südhemisphärischem Schwerpunkt und kommen fast ausschließlich auf Stein vor. Die ersten Funde dieser auffälligen Gruppe von Strauchflechten wurden im späten 18. und frühen 19. Jahrhundert während arktischer Expeditionen gemacht. Forscher entdeckten die erste *Neuropogon*-Art in Island: *Lichen sulphureus* (KÖNIG 1772) (= *Usnea sphacelata*), eine bipolare Art, die in beiden Hemisphären vorkommt. Auch aus der Südhemisphäre wurden nur wenig später ähnliche Arten beschrieben: *Lichen aurantiaco-ater* (JACQUIN 1781) (= *Usnea aurantiaco-atra*) von der Magellan Straße und *Usnea fasciata* (TORREY 1823) (= *U. aurantiaco-atra*) als erste *Neuropogon*-Art aus subantarktischem Gebiet. Die erste australasische *Neuropogon*-Art beschrieb NYLANDER (1866) von

Neuseeland: *N. melaxanthus* var. *ciliatus* (= *Usnea ciliata*). Weitere Artbeschreibungen folgten auf zahlreiche weitere Expeditionen in die arktischen und antarktischen Gebiete. Allerdings wurden häufig neue Arten beschrieben, die sich später als Synonyme bereits beschriebener Arten herausstellten. Genauere Angaben zu den Expeditionen und daraus resultierenden Sammlungen finden sich bei DODGE (1948), LAMB (1964) und LYNGE (1932, 1941) (Informationen aus: WALKER 1985).

NEES & FLOTOW (1835) führten den Gattungsnamen *Neuropogon* ein, zu diesem Zeitpunkt aber noch für einen Vertreter der Gattung *Protousnea* (*N. poeppigii* = *Protousnea poeppigii*) und *N. antennarius* (= *Usnea aurantiaco-atra*). Seitdem haben verschiedene Autoren *Neuropogon*

- zum einen als eigenständige Gattung anerkannt (LAMB 1939, 1948, KROG 1976, 1982, ROGERS 1981, GALLOWAY 1983, ARTICUS 2004b),
- zum anderen als Untergattung innerhalb *Usneas* betrachtet (JATTA 1900, DU RIETZ 1926, MOTYKA 1936-38, LAMB 1964, HENSSEN & JAHNS 1973, WALKER 1985)
- oder als Sektion (OHMURA & KANDA 2004) oder Untersektion (MONTAGNE 1852) der Gattung *Usnea* beschrieben (siehe Tab. 1.1).

Die Stellung *Neuropogons* innerhalb der Gattung *Usnea* ist seit jeher stark umstritten.

Tab. 1.1: Vorschläge verschiedener Autoren zur Klassifikation von *Neuropogon* (verändert nach WALKER 1985).

Autoren	Klassifikation
NEES & FLOTOW (1835)	Gattung <i>Neuropogon</i>
MONTAGNE (1852)	Gattung <i>Usnea</i> , Untergattung <i>Neuropogon</i>
JATTA (1900)	Gattung <i>Usnea</i> , Untergattung <i>Neuropogon</i>
DU RIETZ (1926)	Gattung <i>Usnea</i> , Untergattung <i>Neuropogon</i>
MOTYKA (1936-38)	Gattung <i>Usnea</i> , Untergattung <i>Neuropogon</i> , Sektionen <i>Sulphureae</i> , <i>Melaxanthae</i> , <i>Trachycarpae</i>
LAMB (1939, 1948)	Gattung <i>Neuropogon</i>
LAMB (1964)	Gattung <i>Usnea</i> , Untergattung <i>Neuropogon</i>
DODGE (1948, 1973)	Gattung <i>Usnea</i> , Untergattung <i>Neuropogon</i>
HENSSEN & JAHNS (1973)	Gattung <i>Usnea</i> , Untergattung <i>Neuropogon</i>
KROG (1976, 1982)	Gattung <i>Neuropogon</i>
ROGERS (1981)	Gattung <i>Neuropogon</i>
GALLOWAY (1983)	Gattung <i>Neuropogon</i>
WALKER (1985)	Gattung <i>Usnea</i> , Untergattung <i>Neuropogon</i>
OHMURA & KANDA (2004)	Gattung <i>Usnea</i> , Untergattung <i>Usnea</i> , Sektion <i>Neuropogon</i>
ARTICUS (2004b)	Gattung <i>Neuropogon</i>

DU RIETZ (1926) veröffentlichte die erste Zusammenstellung der südhemisphärischen *Neuropogon*-Arten beruhend auf morphologischen Daten, benutzte aber noch keine chemischen Merkmale. Detailliertere monographische Studien wurden anschließend vor allem von MOTYKA (1936-38) und LAMB (1939) durchgeführt, wobei MOTYKA erstmals die

chemische Reaktion von Flechtenstoffen mit Kaliumhydroxid zur Analyse benutzte und LAMB zusätzlich die sich bildenden Kristalle untersuchte und diese Informationen in die taxonomische Revision einfließen ließ. Später nutzte er auch dünnschichtchromatographische (TLC) Daten (LAMB 1964), erkannte erstmals die Existenz chemischer Rassen innerhalb von Arten und stufte *Neuropogon* von Gattungsebene (LAMB 1939, 1948) auf Untergattungsebene mit 15 Arten herunter. Auf die Arbeiten DODGES zwischen 1938 und 1973 soll hier nicht weiter eingegangen werden, da keine seiner zahlreichen Neubeschreibungen kritischen Nachprüfungen standhalten konnte. WALKER (1985) veröffentlichte eine überarbeitete Monographie der Untergattung *Neuropogon*, wobei sie sich vor allem auf die früheren Arbeiten LAMBS stützte. Sie hat in dieser Arbeit sowohl eine morphologische als auch chemische Analyse vereint. Dabei legte sie besonderen Wert auf die große infraspezifische Variabilität und zählte 15 Arten, davon eine bipolare Art, zur Gattung *Usnea* Untergattung *Neuropogon* (NEES & FLOTOW) JATTA. Unter der Berücksichtigung infraspezifischer Variabilität werden Artgrenzen allerdings unklar und sichere Bestimmungen schwieriger. Dies trifft vor allem auf die sorediösen *Neuropogon*-Arten zu, die sich nicht sexuell fortpflanzen. Die Bestimmung mit WALKERS Bestimmungsschlüssel (1985) kann in diesen Fällen z. T. zu uneindeutigen Ergebnissen führen. Sie selbst gibt in ihrer Arbeit Hinweise auf nah verwandte Artenpaare, denen heute mit Hilfe molekularer Methoden nachgegangen werden kann.

### 1.3 Phylogeographie und das bipolare Verbreitungsmuster

Unter Phylogeographie (AVISE et al. 1987) versteht man die Verbindung von Populationsgenetik und Stammesgeschichte, d. h. die Konzentration auf die geographische Verteilung von Abstammungslinien innerhalb und zwischen nah verwandten Arten (AVISE 2000, RIDDLE & HAFNER 2004). In den letzten Jahren ist die Phylogeographie zu einer eigenständigen Disziplin herangewachsen und nimmt die Rolle einer geographischen und zeitlichen Erweiterung der Populationsgenetik ein (RIDDLE & HAFNER 2004). Zur Bestimmung von Abstammungslinien und Verwandtschaften innerhalb und zwischen Arten, auf denen die phylogeographischen Untersuchungen aufbauen, wurden traditionell mitochondriale DNA-Daten verwendet (siehe AVISE et al. 1987), die im Regelfall durch ihre mütterliche Vererbung frei von Rekombination sind und sich durch hohe Evolutionsraten auszeichnen. Da hohe Evolutionsraten in besonderem Maße auf tierische mt DNA, nicht aber auf pflanzliche oder die mt DNA von Pilzen zutreffen, wurden Untersuchungen in diesen

Organismen schnell in Richtung nukleäre Daten erweitert. Gewonnene molekulare Daten werden mit den geographischen Daten der rezenten Verbreitung von Individuen verknüpft. Vor populationsgenetischem Hintergrund können daraus historische Prozesse wie z. B. Populationsfragmentierungen, Gebietserweiterungen oder Vikarianzereignisse abgeleitet werden. In vielen Studien wurde so z. B. auf den Einfluss der letzten Eiszeit auf Arten und Artkomplexe geschlossen (SEDDON et al. 2001, PFENNINGER & POSADA 2002, PAULS 2005 u. v. a.). Eine populäre Methode zur Verknüpfung molekularer und geographischer Daten und zum Ableiten statistisch getesteter, historischer bzw. rezenter Populationsprozesse ist die Nested Clade Analyse (NCA, TEMPLETON et al. 1987, 1995) (siehe hierzu auch Kapitel 3 B-1.2 dieser Arbeit).

Bipolarität ist ein weit verbreitetes Phänomen, das in vielen, sehr unterschiedlichen Organismengruppen vorkommt, so z. B. bei Käfern, höheren Pflanzen, Foraminiferen, Moosen und Flechten (GALLOWAY & APTROOT 1995, DARLING et al. 2000). Die Bipolarität bezeichnet eine antitropische Verbreitung von Taxa, mit Vorkommen vor allem in den hohen Breitengraden beider Hemisphären und Aussparung der tropischen Gebiete der Erde. Dieser Verbreitungstyp kann sich auf einzelne Arten, aber auch auf Gattungen und ganze Familien beziehen. Bei Flechten gibt es verschiedene Muster bipolarer Verbreitung, die z. B. nur die Nordhemisphäre (NH) und Südamerika, die NH und Australasien oder die NH und Neuseeland oder Australien betreffen, aber auch zirkumboreale–zirkumantarktische Verbreitungen (GALLOWAY & APTROOT 1995). Eine besondere Form der Bipolarität stellt das letztgenannte Muster mit zusätzlichen Vorkommen in tropischen Hochgebirgsregionen dar. Dieses Verbreitungsmuster zeigt sich bei einer Art der *Neuropogon*-Gruppe, *Usnea sphacelata*, mit weitem Vorkommen in arktischen und antarktischen Gebieten, sowie begrenzteren Vorkommen in den hohen tropischen Bergregionen Ecuadors, Kolumbiens, Perus und Venezuelas.

Über die Erklärung bipolarer Phänomene ist bereits früh spekuliert worden (z. B. bei DARWIN 1859, BERG 1933, DU RIETZ 1940, HUBBS 1952, RAVEN 1963, MOORE et al. 1972, ROTONDO et al. 1981 und BRIGGS 1987), worauf hier im Einzelnen nicht eingegangen werden soll (siehe hierzu auch GALLOWAY & APTROOT 1995). Prinzipiell kreisen aber die Diskussionen beständig um die Möglichkeit (1) einer historisch großflächigen Ausdehnung, die durch klimatische oder tektonische Veränderungen fragmentiert wurde, (2) einer zurückliegenden Migration entlang von Migrationsrouten, z. B. Gebirgszügen während den Eiszeiten, oder aber (3) rezenter Phänomene wie Fernverbreitung. Es ist wichtig hierbei auf das

taxonomische Niveau der Organismen zu achten. Eine gesamte Gattung oder Familie ist mit großer Wahrscheinlichkeit durch historische Prozesse bipolar verbreitet. Auf Artniveau allerdings können historische sowie rezente Phänomene greifen. Wenige molekulare Studien konnten bisher eine Fernverbreitung bipolarer Organismen belegen: VAN OPPEN et al. (1994) bei Seetang, DARLING et al. (2000) bei Foraminiferen, MYLLYS et al. (2003) bei zwei nah verwandten Flechtenarten. Andere Studien weisen auf nah verwandte aber nicht konspezifische Arten hin: SCHREIBER et al. (1996) bei Priapswürmern (Allozym-Studie), MURTAGH et al. (2002) bei einem Flechtenpilz. Die Bipolarität von Arten muss in jedem Einzelfall neu untersucht werden.

#### **1.4 Ziele und Aufbau der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit ist in ein Einleitungskapitel (1) und zwei weitere Kapitel (2 + 3), die in sich jeweils abgeschlossene Untersuchungen enthalten, sowie ein Schlussfolgerungskapitel (4) mit taxonomischen Konsequenzen gegliedert.

Kapitel 2 dieser Arbeit hat zum Ziel, die Stellung der *Neuropogon*-Gruppe innerhalb der Gattung *Usnea* unter Einbeziehung einer möglichst großen Anzahl von Arten zu untersuchen und vorgeschlagene Gattungskonzepte zu überprüfen.

Das Kapitel 3 ist in die Teile A und B aufgliedert. In beiden Teilen steht die Abgrenzung von nah verwandten *Neuropogon*-Arten durch die Analyse eines kombinierten Datensatzes aus drei Genen im Vordergrund. In Kapitel 3-A werden zu diesem Zwecke verschiedene phylogenetische Methoden genutzt und eine Artabgrenzung vor dem Hintergrund des phylogenetischen Artkonzeptes diskutiert. Hierzu wird die Methode nach WIENS & PENKROT (2002) angewandt. In Kapitel 3-B wird das Problem der Definition von Artgrenzen populationsbiologisch betrachtet und vor dem Hintergrund des kohäsiven Artkonzeptes gesehen. Netzwerkmethoden und Nested Clade Analysen werden dazu genutzt, Arten abzugrenzen und morphologische und chemische Daten in die Diskussion einzubeziehen. Zudem werden wichtige phylogeographische Prozesse diskutiert. Durch die Nutzung vielfältiger Datensätze und Methoden sollen die verwandtschaftlichen Beziehungen und grundlegenden historischen Populationsprozesse innerhalb der *Neuropogon*-Gruppe aufgedeckt und interpretiert werden.

In Kapitel 4 werden die Ergebnisse aus 3-A und 3-B zusammengefasst und daraus Vorschläge zur taxonomischen Neuordnung abgeleitet.

## 1.5 Benutzte molekulare Marker in dieser Arbeit

Um die aufgeworfenen Fragen zu beantworten, wurde in dieser Arbeit neben der Analyse morphologischer und chemischer Merkmale der Schwerpunkt auf molekulare Daten gelegt. Hierzu wurden vier verschiedene molekulare Marker, d.h. spezifische Genabschnitte des Pilzgenoms, verwendet, die im Folgenden charakterisiert werden.

### *ITS-Region*

Die Internal transcribed spacer (ITS) sind Abschnitte nicht-codierender DNA innerhalb der ribosomalen DNA (rDNA) im Zellkern. Die codierenden Abschnitte der rDNA liefern die Vorlage für die ribosomale RNA, welche neben Proteinen als Nukleotidmoleküle in die große und kleine Untereinheit der Ribosome eingebaut wird. Als so genannte Spacer oder Distanzstücke sitzen ITS1 und ITS2 zwischen den codierenden Abschnitten 18S (SSU), 5.8S und 28S (LSU) der rDNA (Abb. 1.2). Diese Genabfolge bildet Einheiten (ca. 8-12 kb), die in jeder Zelle als aneinander gereihete multiple Kopien vorliegen, wobei die einzelnen Geneinheiten durch die nicht-codierende Intergenic spacer Region (IGS) voneinander getrennt werden. Im Allgemeinen unterliegt der iterative Gesamtkomplex, der bis zu mehrere hundert Kopien der einzelnen Einheiten beinhalten kann, einer schnellen evolutionären Entwicklung (BUCKLER et al. 1997, RAZAFIMANDIMBISON et al. 2004), was in einer hohen Variabilität auf Gattungsebene und Polymorphismen auch innerhalb von Arten resultiert.

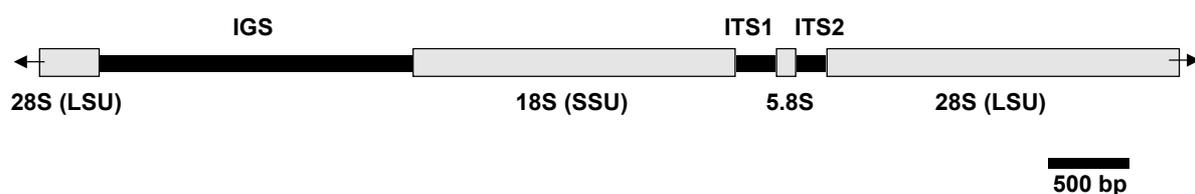


Abb. 1.2: Nukleäre rDNA Einheit: 18S= kleine Untereinheit, ITS1 und ITS2= Internal transcribed spacer Regionen, 28S= große Untereinheit; getrennt durch IGS= Intergenic spacer Region.

Mutationen (Änderungen der Basensequenz der DNA) treten prinzipiell zufällig an einzelnen Genabschnitten auf. Daher sollte man erwarten, dass sich die verschiedenen Kopien auch innerhalb eines Organismus oder gar einer Zelle voneinander unterscheiden, was zu Problemen bei der Amplifikation und Sequenzierung führen würde. Bei der rDNA ist aber zu bemerken, dass die einzelnen Geneinheiten nicht unabhängig voneinander evolvieren (DOVER

1986). Ein bis heute nicht ganz geklärtes Phänomen, das als „concerted evolution“ beschrieben wird, sorgt dafür, dass der gesamte rDNA Genkomplex eines Individuums gleichförmig gehalten und auch innerhalb von Populationen fixiert wird (DOVER 1986).

Die ITS Region (ITS1, 5.8S, ITS2) wurde schon in zahlreichen Studien an höheren Pflanzen und Pilzen meist nah verwandter Taxa verwendet und konnte wertvolle phylogenetische Informationen liefern (z. B. BALDWIN et al. 1995, LUMBSCH et al. 2001, MARTIN et al. 2003, MICHELANGELI et al. 2004). Es ist aber anzumerken, dass die Zusammenstellung von Sequenzen weit entfernter Taxa, z. B. auf Familien- oder Gattungsebene, durch die hohe Variabilität erheblich erschwert sein kann und somit zu Uneindeutigkeiten im Datensatz führt (MYLLYS et al. 1999a, WEDIN et al. 1999, LUMBSCH et al. 2001). Als aussagestarker Marker zur Widerspiegelung der genetischen Variabilität innerhalb Arten hat sich die ITS besonders in intraspezifischen Untersuchungen, häufig mit phylogeographischem Hintergrund (z. B. ZOLLER et al. 1999, PRINTZEN & EKMAN 2002, DICK et al. 2003, VARGAS 2003, MURAT et al. 2004), und Studien an sehr nah verwandten Arten erwiesen (z. B. MYLLYS et al. 1999b).

### *IGS-Region*

Auch die IGS (Intergenic spacer)-Region ist, wie oben erwähnt und in Abbildung 1.2 dargestellt, ein Teil der rDNA. Sie liegt als ca. 2-3 kb großes Distanzstück zwischen 28S und 18S und trennt somit die sich wiederholenden, codierenden Geneinheiten der rDNA. Die IGS-Region gilt als variabelster Abschnitt der rDNA, der auch Unterschiede innerhalb Arten auf Populationsebene zeigt (HILLIS & DAVIS 1988, DIAZ et al. 2000). Vielfach wurden Teile oder die gesamte IGS-Region als direkte Sequenzanalyse oder RFLP- bzw. AFLP-Analyse in mykologischen Studien eingesetzt (siehe APPEL & GORDON 1996). Zum Teil zeigten diese Studien keine infraspezifische Variabilität innerhalb der IGS, aber eine große Auflösung bei der Unterscheidung von Arten [KOHN et al. 1988 (*Sclerotinia* spp.), MOLINA et al. 1993 (*Saccharomyces*), ERLAND et al. 1994 (*Tylospora*)]. In anderen Studien hingegen konnte eine hohe infraspezifische Variabilität der IGS in den verschiedensten Organismengruppen festgestellt werden (APPEL & GORDON 1996), so auch in den Ascomycetes-Arten *Aspergillus fumigatus* (SPREADBURY et al. 1990), *Rhynchosporium secalis* (MCDERMOTT et al. 1989), *Fusarium oxysporum* (APPEL & GORDON 1996) und *Sclerotinia sclerotiorum* (CARBONE et al. 1999). Erst in den letzten Jahren wurden Primer zur Nutzung von Teilen der IGS-Region auch für Flechten entwickelt und ihre hohe Variabilität aufgrund schneller Entwicklung konnte bestätigt werden. PRINTZEN & EKMAN (2002) nutzten einen Teil der IGS in Kombination mit der ITS-Region zur Überprüfung der genetischen Variabilität und

geographischen Verbreitung von *Cavernularia hultenii* und fanden in dieser Flechte eine mehr als doppelt so hohe Variabilität in dem untersuchten IGS-Fragment. Die Brauchbarkeit der IGS für infraspezifische und vor allem phylogeographische Analysen wurde in weiteren Studien unter Beweis gestellt (PRINTZEN et al. 2003, LINDBLOM & EKMAN 2005).

### *Das proteincodierende Gen RPB1*

In phylogenetischen Analysen werden ribosomale Gene häufig vor proteincodierenden Genen bevorzugt, da die Amplifizierung durch eine hohe Anzahl von Kopien im Genom begünstigt und eine Reihe universeller Primersequenzen verfügbar ist. Im letzten Jahrzehnt wurden aber verstärkt Alternativen zur eingeschränkten Auswahl an ribosomalen und mitochondrialen DNA-Fragmenten auch bei Pilzen gesucht, um Datensätze zu vergrößern und unabhängige molekulare Marker zu vergleichen. Somit wurden mehr und mehr auch proteincodierende Gene untersucht und Primer entwickelt [z. B. CARBONE et al. 1999 (EF-1 $\alpha$  und Calmodulin), HIRT et al. 1999 (RPB1), KRETZER & BRUNS 1999 (atp6), LIU et al. 1999 (RPB2), THON & ROYSE 1999 ( $\beta$ -Tubulin), O'DONNELL et al. 2001 (EF-1 $\alpha$ )]. Eines dieser „neuen“ Gene ist das proteincodierende Gen RPB1. Dieses nukleäre Gen codiert für die größte Untereinheit der RNA-Polymerase II, ein wichtiges Enzym, welches in nahezu allen Zellen eukaryotischer Organismen für die Umsetzung proteincodierender Gene in Prä-mRNA-Transkripte zuständig ist. Der Enzymkomplex ist aus 12 Untereinheiten aufgebaut, wobei die RPB1-Region für die größte dieser Proteineinheiten codiert und selbst aus acht konservierten Exonmotiven und Intronabschnitten besteht. In Abbildung 1.3 ist eine Schemazeichnung des RPB1-Gens dargestellt. Die schwarzen Abschnitte stellen die konservierten Aminosäuremotive dar, die in allen eukaryotischen Organismen nahezu gleich sind. Die hellen Abschnitte sind weniger konservierte Bereiche, die zum Teil auch große Introns (>500 bp) enthalten können (siehe hierzu MATHENEY et al. 2002).

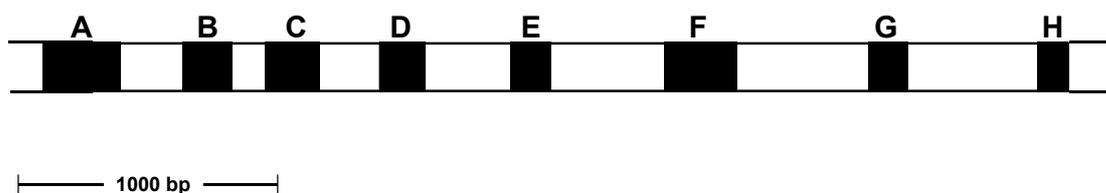


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der konservierten Aminosäuredomänen (A-H) im RPB1-Gen eukaryotischer Organismen (nach MATHENEY et al. 2002).

Die Notwendigkeit des reibungslosen Ablaufs der Transkription in einer jeden Zelle ist dafür verantwortlich, dass die codierenden Abschnitte des Gens eine niedrige Evolutionsrate aufweisen und hoch konservativ sind. Diese Tatsache und das homologe Vorkommen der RNA-Polymerase II in allen Eukaryoten sind eine gute Basis für phylogenetische Studien auf taxonomisch höherem Level (HIRT et al. 1999, LIU et al. 1999, TANABE et al. 2004). In den letzten Jahren ist das RPB1-Gen bei Pilzen und nah verwandten Organismen sehr erfolgreich auch zur Aufklärung von Gattungs- und Artverwandtschaften eingesetzt worden (CHENEY et al. 2001, MATHENY et al. 2002, MATHENY & AMMIRATI 2003, MATHENY 2005). Diese Studien nutzen neben den Exonbereichen auch das phylogenetische Signal aus den z. T. ausgeprägten Intronbereichen, welches bis zu viermal größer als das konservierter rDNA-Abschnitte sein kann (CHENEY et al. 2001). In den oben genannten Studien ist das RPB1-Gen im Vergleich zu anderen Genen (RPB2, rDNA-Gene) besser auflösend und bringt höhere Unterstützungswerte für die einzelnen Äste innerhalb der Phylogenien. Zudem ist im Regelfall nur eine Kopie des Gens im Genom vorhanden, was die Häufigkeit von paralogen Sequenzen stark herabsetzt (CHENEY et al. 2001). In der vorliegenden Studie an sehr nah verwandten *Neuropogon*-Arten wird von Teilen des RPB1-Gens vor allem Unterstützung bei der Artabgrenzung erwartet und weniger auf das Vorhandensein großer innerartlicher Variabilität gesetzt.

## 2. Phylogenetische Stellung der Untergattung *Neuropogon*

### 2.1 Taxonomie und Klassifikation der Gattung *Usnea*

Abteilung: Ascomycota  
 Unterabteilung: Pezizomycotina  
 Klasse: Lecanoromycetes  
 Unterklasse: Lecanoromycetidae  
 Ordnung: Lecanorales (31 Familien)  
 Familie: Parmeliaceae, ca. 90 Gattungen  
 Gattung: ***Usnea***, ca. 600 Arten  
 Untergattung: ***Dolichousnea***  
***Eumitria***  
***Usnea***  
 Sektion *Usnea*  
 Sektion *Ceratinae*  
 (Sektion) ***Neuropogon***

***Neuropogon***, 15 Arten:

*Usnea acanthella*  
*U. acromelana*  
*U. antarctica*  
*U. aurantiaco-atra*  
*U. ciliata*  
*U. durietzii*  
*U. neuropogonoides*  
*U. patagonica*  
*U. perpusilla*  
*U. pseudocapillaris*  
*U. sphacelata*  
*U. subantarctica*  
*U. subcapillaris*  
*U. tayloryi*  
*U. trachycarpa*

Abb. 2.1: Klassifikation der *Neuropogon*-Gruppe nach ERIKSSON 2004 - Myconet (<http://www.umu.se/myconet/curr/current.html>), Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>), HAWKSWORTH et al. 1995, OHMURA & KANDA 2004 und WALKER 1985.

In einer ersten weltweiten Monographie gliederte MOTYKA (1936-38) die Gattung *Usnea* DILLENIUS (1742), mit damals 451 Arten, in sechs Untergattungen: *Usnea*, *Eumitria*, *Neuropogon*, *Protousnea*, *Lethariella* und *Chlorea*. Die Einteilung beruhte hauptsächlich auf morphologischen Merkmalen wie Zentralstrangstruktur, Thallus- und Apothecienfarbe und geographischen Verbreitungsmustern. ASAHINA (1956) verfasste eine Übersicht über *Usnea* in Japan und führte weitere wichtige Merkmale zur taxonomischen Gliederung von *Usnea*, wie Thallus-Verzweigungsmuster, Verhältnis von Kortex, Mark und Zentralstrang und die Verteilung sekundärer Flechtenstoffe ein (ASAHINA 1937, 1954). LAMB (1939, 1948) behandelte *Neuropogon* in seiner Revision als eigenständige Gattung, stimmte aber in

späteren Arbeiten MOTYKAS Gattungskonzept zu (LAMB 1964). Erst KROG (1976) revidierte MOTYKAS Konzept, erhob *Protousnea* und *Lethariella* (kombiniert mit *Chlorea*) auf Gattungsebene und erwähnte auch, dass *Neuropogon* aufgrund der morphologischen Homogenität und geographischen Begrenzung, sowie der Präferenz für steinigtes Habitat als eigenständige Gattung zu betrachten sei. WALKER (1985) behandelte *Neuropogon* als Untergattung von *Usnea*. Sie betonte in ihrer Monographie *Neuropogons* die nahe Verwandtschaft zwischen den Untergattungen *Neuropogon* und *Usnea* und benannte auch mögliche Zwischenformen, die sie als *Neuropogon* s. lat. bezeichnete. Ihrer Meinung nach reichen die Habitatpräferenz und Pigmentierung des Thallus nicht aus, um *Neuropogon* eindeutig als Gattung abzutrennen.

In den letzten Jahren wurden Vertreter der Gattung *Usnea* verstärkt mit molekularen Markern analysiert, bestehende Untergattungen überprüft und neue Untergliederungen geschaffen. OHMURA (2002) nutzte nukleäre ITS-Sequenzdaten, um die bereits von MOTYKA (1936-38) morphologisch abgegrenzten Untergattungen *Eumitria* und *Usnea* und eine weitere Untergattung *Dolichousnea* zu bestätigen, die er zuvor mit Hilfe chemischer und morphologischer Daten beschrieben hatte (OHMURA 2001). Die Untergattung *Usnea* gliederte er auf dieser Datengrundlage in zwei Sektionen, *Usnea* und *Ceratinae*, konnte diese Aufspaltung in einer molekularen Analyse aber nicht eindeutig unterstützen (OHMURA 2002). Ein Hauptmerkmal seiner anatomischen Untersuchungen ist die Kortexstruktur. Er unterscheidet verschiedene Kortextypen je nach Hyphenart, Verhältnis von Kortex- und Markhyphendicke, Hyphenlumen, Grad der Verklebung und Ausrichtung (Abb. 2.2) (OHMURA 2001, 2002).

Der *Florida*-Typ hat im Vergleich dünnwandige Hyphen. Die Kortexhyphen haben nur leicht verdickte Wände und stark erweiterte Lumina und sind bei radialer Anordnung locker miteinander verklebt. Alle anderen Kortextypen haben grundsätzlich dickere Hyphenwände. Beim *Merrillii*-Typ sind nur die Kortexhyphenwände verdickt. Die Hyphen haben ein kleines Lumen, sind zumindest zum Teil locker miteinander verklebt und dabei strahlenförmig angeordnet. Der *Ceratina*-Typ ist ähnlich dem *Merrillii*-Typ, zeigt aber leicht erweiterte Zellumen, die an Umfang die Dicke der Zellwand nicht übertreffen. Die Hyphen im Kortex sind radial angeordnet und stark verklebt. Der *Baileyi*-Typ zeigt keinen Unterschied zwischen Mark- und Kortexhyphen. Alle Hyphen sind dickwandig mit kleineren oder zellwanddicken Lumina und locker verklebten Kortexhyphen. Hier ist die Ausrichtung der Hyphen im Thallus uneinheitlich.

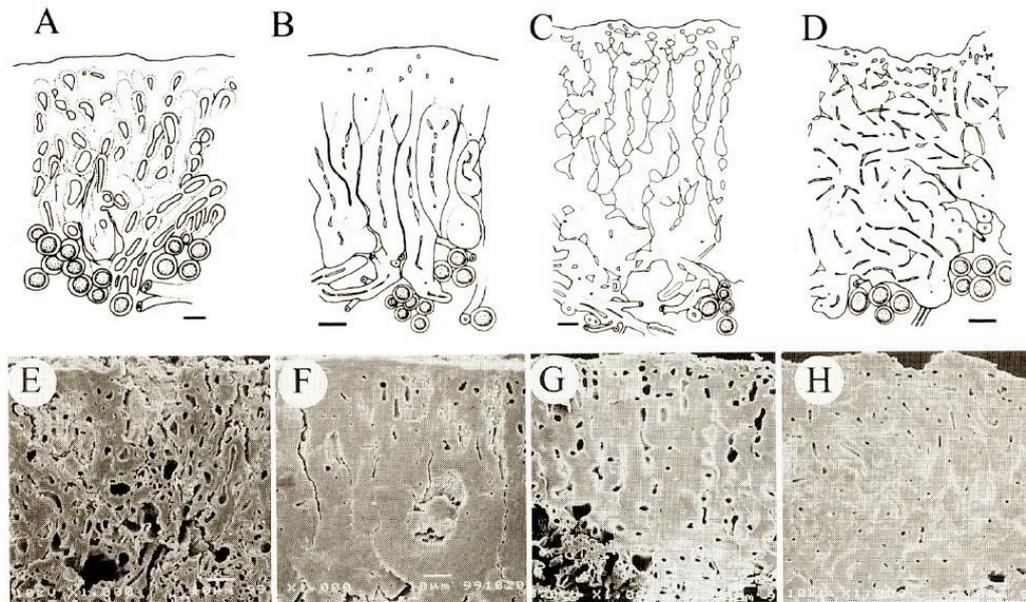


Abb. 2.2: Kortextypen der Gattung *Usnea* (aus OHMURA 2001). A–H: kortikales Hyphengewebe. A, E = *Florida*-Typ. B, F = *Merrillii*-Typ. C, G = *Ceratina*-Typ. D, H = *Baileyi*-Typ.

In späteren Studien untersuchten OHMURA & KANDA (2004) und ARTICUS (2004b) Vertreter der *Neuropogon*-Gruppe und kamen zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen bezüglich der Stellung dieser Gruppe zur Gattung *Usnea*. OHMURA & KANDA (2004) entdeckten eine Kombination von morphologischen Merkmalen, die geringfügig von denen der Sektionen *Usnea* und *Ceratinae* (Untergattung *Usnea*) abwichen, und einen neuen Kortextyp, den sie *Sphacelata*-Typ nannten. Ihre molekularen Ergebnisse, beruhend auf ITS-Daten, unterstützten eine nahe Verwandtschaft der monophyletischen Gruppen *Neuropogon* und Sektion *Usnea* (PP=0.99), wobei nur zwei *Neuropogon*-Arten (*U. sphacelata* (3 Indiv.) und *U. antarctica*) molekular untersucht wurden. In einer ML- und B/MCMC-Analyse fielen beide Gruppen zusammen mit der Sektion *Ceratinae* in eine gut unterstützte Untergattung *Usnea* (PP=1.0), wobei die Sektion *Ceratinae* keine Unterstützung fand. Sowohl die Untergattung *Eumitria* als auch *Dolichousnea* wurden als monophyletische Gruppen gut unterstützt. Die Autoren zogen aus der Kombination morphologischer und molekularer Daten den Schluss, dass der angemessene taxonomische Rang für die *Neuropogon*-Gruppe die Sektion ist und stuften sie als Sektion *Neuropogon* (NEES & FLOT.) MONT. innerhalb der Untergattung *Usnea* herab (siehe auch Abb. 2.1).

ARTICUS (2004b) untersuchte die Kortexstruktur einiger *Neuropogon*-Arten und kam zu einem ähnlichen Ergebnis wie OHMURA & KANDA (2004), allerdings verglich sie die Kortexstruktur mit dem *Merrillii*-Typ OHMURAS (siehe Abb. 2.2: B, F), der in allen Untergattungen *Usneas* auftritt. Ihre molekularen Analysen beruhen auf Bayes'schen

Berechnungen zweier Datensätze, einem kleineren kombinierten ITS/LSU/ $\beta$ -Tubulin-Datensatz und einem größeren ITS-Datensatz, der Individuen aller Untergattungen *Usneas* enthielt. Die beiden Untergattungen *Dolichousnea* und *Eumitria* waren jeweils monophyletisch (PP=1.0) und bildeten eine Schwestergruppe zur Untergattung *Usnea*, die sehr gut unterstützt war (PP=1.0). Innerhalb der Untergattung zeigte keiner der Bäume eine signifikante Auflösung der Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen monophyletischen Gruppen zueinander (*Neuropogon*, Sektion *Usnea*, Sektion *Ceratinae* und eine weitere unbenannte Gruppe). Die untersuchte *Neuropogon*-Gruppe bestand aus drei Arten: *U. antarctica* (3 Individuen), *U. sphacelata* und *U. trachycarpa*. Die Typusart der Gattung *Neuropogon*, *U. aurantiaco-atra*, war wie bei OHMURA & KANDA (2004) nicht in der Analyse vertreten. ARTICUS (2004b) nutzte dieses Ergebnis dazu, die monophyletischen Untergattungen der Gattung *Usnea* zu eigenständigen Gattungen aufzuwerten. Sie erhob *Dolichousnea* und *Eumitria*, aufgrund ihrer morphologischen Unterschiede und entfernteren Verwandtschaft zur Untergattung *Usnea*, zu Gattungen. Auch die in dieser Analyse monophyletisch erscheinende *Neuropogon*-Gruppe wurde wieder zur Gattung *Neuropogon* erhoben, wobei *Usnea* s. str. dadurch automatisch zu einer paraphyletischen Gattung wurde. Die Gattung *Neuropogon* NEES & FLOT. (1835) wurde charakterisiert durch einen soliden Zentralstrang, braune bis schwarze Apothecienscheiben, einen aufrechten Thallus mit anisotomisch-dichotomer Verzweigung und fleckig schwarzer Pigmentierung, dickwandige, stark verklebte Kortexhyphen mit antikliner Orientierung und Vorkommen auf Stein in arktischen und antarktischen Gebieten sowie in großen Höhen in Südamerika und Australasien. Die von WALKER (1985) als *Neuropogon* s. lat. bezeichneten Arten *U. acanthella*, *U. durietzii*, *U. neuropogonoides* und *U. patagonica*, die möglicherweise Zwischenformen zwischen *Neuropogon* und *Usnea* darstellen und deren systematische Position nicht mit Bestimmtheit festgelegt werden kann, wurden von beiden molekularen Analysen (OHMURA & KANDA 2004, ARTICUS 2004b) nicht erfasst.

## 2.2 Molekulare Analysemethoden

### 2.2.1 Alignment

Als Alignment bezeichnet man die Homologisierung der Sequenzen, die notwendig zur weiteren Analyse der Daten ist. Jede Position in einem Alignment stellt ein Merkmal mit vier verschiedenen Merkmalsausprägungen dar (A, T, C und G), die homologisiert werden. Insertionen oder Deletionen können dabei nicht voneinander unterschieden werden und bilden ein „Gap“ (Lücke) im Alignment. Ziel eines Alignments ist es, sich möglichst an das günstigste und somit evolutiv wahrscheinlichste Alignment anzunähern (PAGE & HOLMES 1998). Es gibt hierzu verschiedene, auf unterschiedlichen Algorithmen basierende Methoden und Programme. Das Programm Clustal W (THOMPSON et al. 1994) errechnet Alignments nach einem Algorithmus, der in drei Schritten verläuft: Zuerst werden alle Sequenzen paarweise miteinander verglichen. Aus dieser Distanzmatrix wird dann ein Baum konstruiert, der die vorläufigen Gruppierungen der Sequenzen nach Ähnlichkeiten zeigt. Im letzten Schritt wird ausgehend von den Verzweigungen des Baumes ein aufeinander aufbauendes Alignment produziert. Es werden automatisch „Gaps“ (Lücken) in das Alignment eingefügt, wenn Sequenzlängenunterschiede auftreten, wobei ein Parameter, der diese Gaps begünstigt oder verhindert, variiert werden kann. Clustal-Alignments können zweifelhaft alignte Sequenzbereiche aufweisen, die sich entweder durch viele Gaps oder durch saturierte und damit möglicherweise nicht-homologe Regionen ausweisen. Dies gilt besonders für Alignments variabler Sequenzen entfernt verwandter Taxa, wie z. B. der ITS auf Gattungsebene (z. B. MYLLYS et al. 1999a, WEDIN et al. 1999).

Das Programm SAM (Sequence Alignment and Modelling system) (KARPLUS et al. 1998) ist eine Zusammenstellung flexibler Softwareteile zur Nutzung statistischer, linearer „Hidden Markov“ Modelle“ (HMMs) zur Sequenzenanalyse. HMMs sind statistische Modelle, die sich durch den Vergleich homologer Sequenzen oder Teilen von Sequenzen formen, um ein Modell der vorliegenden Sequenzfamilie darzustellen. Dabei werden die einzelnen Nukleotide oder Sequenzteile in ihrer Wahrscheinlichkeit bewertet (expectation-maximisation algorithm). Dies gilt als Grundlage zur Angleichung der einzelnen Sequenzen an das Sequenzfamilien-Modell, wobei es dem Programm erlaubt ist, Deletionen und Insertionen vorzunehmen. Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen ist die Fähigkeit ganze Sequenzfamilien zu charakterisieren (HUGHEY et al. 2003; siehe hierzu auch <http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/sam.html>). Benutzen kann man diese Form der

Alignmenterstellung über den Internetzugang: <http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/HMM-apps/T99-tuneup.html>.

In dieser Arbeit wurde zum einen Clustal W benutzt, welches im Programm BioEdit (HALL 1999) implementiert ist, und zum anderen das Online-Alignmentprogramm SAM. Das Programm SAM eignet sich besonders gut für sehr variable Datensätze mit Längenunterschieden und zweifelhaft homologen Sequenzabschnitten, da jede einzelne Sequenz unmittelbar mit dem Sequenzfamilien-Modell verglichen wird, dieses sozusagen mitgestaltet und nicht-alignbare Bereiche entfernt werden können. Das Programm geht flexibler mit Sequenzunterschieden um. Clustal W hingegen benutzt den vorläufigen Baum als Grundlage für ein fortschreitendes Alignen der Sequenzen. Einmal alignte Sequenzen werden nicht mehr verändert, auch wenn nachfolgende Schritte dies korrekterweise erfordern würden.

### 2.2.2 Phylogenetische Analyse

Es gibt verschiedene Methoden um Phylogenien von Datensätzen zu errechnen. Keine der Methoden liefert in allen Fällen zuverlässige Ergebnisse und jede einzelne Methode ist Gegenstand zahlreicher kontroverser Diskussionen (LI 1997). In den meisten Studien werden daher auf verschiedenen Algorithmen beruhende Methoden auf ein und denselben Datensatz angewandt, um die Ergebnisse durch eine Übereinstimmung der Stammbäume abzusichern bzw. Abweichungen zu diskutieren. Die gängigsten phylogenetischen Ansätze sind Distanzmatrixverfahren, Maximum Parsimony-Verfahren, Maximum Likelihood-Verfahren und Bayes'sche Ansätze. In diesem Kapitel der Arbeit wird ein Distanzmatrixverfahren, Maximum Parsimony (MP) und eine Bayes'sche Analyse nach der Markov Chain Monte Carlo Methode angewandt (B/MCMC). Die Methoden werden im Folgenden kurz erklärt.

#### *Neighbor-joining (NJ) Analyse*

Die Neighbor-joining Methode (SAITOU & NEI 1987) ist das am häufigsten benutzte Baumrekonstruktionsverfahren in Verbindung mit einer Distanzmatrix (HALL 2001). Statt auf den rohen Sequenzdaten selbst, basieren NJ-Phylogenien auf einer indirekten Distanzmatrix, die durch den Vergleich von Sequenzpaaren gebildet wird. Ausgehend vom Datensatz wird für jede Sequenz die Distanz zu jeder anderen Sequenz berechnet und daraus eine Distanzmatrix erstellt. Dabei basieren alle Berechnungen auf einem Evolutionsmodell, welches vor Beginn der Analyse ausgewählt wird. Das NJ-Cluster-Verfahren ersetzt dann schrittweise zwei vorherige Distanzwerte durch eine jeweils neue Distanz, ausgehend von

den geringsten Distanzwerten, bis die Matrix aus nur noch einem Wert besteht (HALL 2001). Aus dieser Matrix wird dann ein Baum erstellt. Das zugrunde liegende Prinzip der Methode ist es, den phylogenetischen Baum mit den kürzesten evolutiven Distanzen zu finden, ohne gleiche evolutionäre Raten für jeden Ast anzunehmen (HALLIBURTON 2004). Vorteile der NJ-Methode sind erstens die Möglichkeit Substitutionsmodelle in die Berechnungen einzubeziehen und zweitens die Schnelligkeit der Berechnung, die es auch erlaubt in kurzer Zeit Stammbäume sehr großer Datensätze zu gewinnen.

#### *Maximum parsimony (MP) Analyse*

Die Maximum parsimony-Methode basiert auf der Grundannahme, dass der evolutiv wahrscheinlichste Baum der kürzeste Baum, d.h. der Baum mit der geringsten Anzahl von Änderungen zur Erklärung der Sequenzdaten, ist. Ausgangsdaten für eine Stammbaumberechnung unter dem Parsimony-Kriterium sind die einzelnen Merkmalsausprägungen (A, T, C, G) an jeder Alignmentposition. Jede Merkmalsausprägungen einer Alignmentposition, die von mindestens zwei Taxa geteilt wird, wird in die Berechnungen einbezogen (,parsimony' informative Merkmale), jede konservierte Position oder Autapomorphie jedoch ignoriert (HALL 2001). Dabei wird jede Art von Substitution gleichwertig behandelt. Es liegt kein Substitutionsmodell zugrunde. Häufig, besonders bei großen Datensätzen, werden mehr als ein kürzester Baum gefunden, so dass ein strikter Konsensusbaum aus allen gefundenen Bäumen ermittelt wird. Alle Äste innerhalb der Bäume, die widersprüchliche Aussagen machen, werden in solch einem Fall als unaufgelöste Polytomie dargestellt.

Die Aussagewahrscheinlichkeit der einzelnen Äste eines NJ- und MP-Phylogramms wird für gewöhnlich mit nicht-parametrischen Bootstrap-Analysen (FELSENSTEIN 1985) überprüft. Nicht-parametrisches Bootstrapping gründet sich auf den wiederholten Entwurf und die Analyse von Pseudoalignments, die durch zufälliges Vertauschen, Verdoppeln, Löschen und Ersetzen von homologen Alignmentpositionen des Ausgangsalignments entstehen (HALL 2001, HALLIBURTON 2004). Dabei haben die Pseudoalignments immer die gleiche Länge wie das Ausgangsalignment, aber eine zufällige Auswahl an Merkmalen. Ausgehend von diesen Alignments werden mit den gleichen Parametereinstellungen neue Bäume errechnet und mit dem Originalbaum verglichen. Jeder übereinstimmende Ast wird mit 1 bewertet, jede Abweichung mit 0 und das Ergebnis gespeichert. Üblicherweise werden 1000 bis 2000 solcher Vergleiche durchgeführt, um die Aussagewahrscheinlichkeit oder Zuverlässigkeit der Äste eines Baumes einzuschätzen. Man nennt diese Unterstützungswerte ,Bootstrap'-Werte (HALL 2001).

*Bayes'sche Analyse*

Die Bayes'sche Analyse ist wie die MP-Analyse eine direkte Methode, die von den einzelnen Merkmalszustände an den Alignmentpositionen ausgeht. Anders als der MP-Methode wird einer Bayes'schen Stammbaumberechnung ein Substitutionsmodell zugrunde gelegt. Diese Modelle können einfach sein und z. B. nur Transitionen der Basen zulassen, wie das TrN-Modell (TAMURA & NEI 1993), oder sie sind komplexer, wie z. B. das General Time Reversible (GTR) Modell (RODRIGUEZ et al. 1990). Die Anlehnung an ein Substitutionsmodell stimmt mit der Vorgehensweise der Maximum Likelihood (ML)-Methode überein. Wie bei einer ML-Analyse ist auch bei einer Bayes'schen Analyse das Hauptkriterium der Stammbaumberechnung, die wahrscheinlichste Topologie für einen Datensatz unter den Parametern eines Substitutionsmodells zu finden (SWOFFORD et al. 1996). Allerdings beruht die Bayes'sche Analyse auf der a priori Annahme, dass eine hypothetische Baumtopologie wahr ist und berechnet ihre Wahrscheinlichkeit. Hierzu kann man einen spezifischen, bereits existierenden oder aber einen zufällig ausgewählten Baum als Ausgangsbaum nutzen. Dieser Baum wird dann in seiner Topologie leicht verändert (Veränderung der Astlängen oder Verschiebung der Äste) und die Wahrscheinlichkeit für die neue, zufällige Topologie berechnet (HUELSENBECK et al. 2001). Die Wahrscheinlichkeitswerte berechnen sich durch einen Metropolis-Hastings Algorithmus und liegen zwischen 0 und 1. Hat das Ergebnis eine niedrigere Wahrscheinlichkeit, wird der neue Baum abgelehnt, eine weitere zufällige Veränderung im Ausgangsbaum vorgenommen und wiederum die Wahrscheinlichkeit berechnet. Ist die Wahrscheinlichkeit des neuen Baumes höher, wird dieser als Ausgangsbaum für weitere Berechnungen angenommen (HUELSENBECK et al. 2001). Einen solchen Schritt innerhalb der Suche nach den besten Topologien bezeichnet man als Generation (HALL 2001). Die Simulation von Bäumen durch zufällige topologische Veränderungen beruht auf einem Monte Carlo (MC) Verfahren. Den zugrunde liegenden stochastischen Kettenprozess, der sich ausgehend von einem bekannten gegenwärtigen Zustand im Zeitverlauf zufällig entwickelt und unabhängig von der Vergangenheit ist, nennt man Markov Kette (MC). Und den gesamten Prozess fasst man folglich als Markov Kette Monte Carlo (MCMC) Methode zusammen. Im Verlauf der MCMC Simulation werden fortlaufend Bäume mit steigenden Wahrscheinlichkeitswerten produziert und gespeichert und bestimmte Gruppierungen von Taxa finden sich immer wieder. Die Häufigkeit mit der diese Äste in der Menge der Bäume auftreten ist proportional zu den mit Beendigung der Berechnungen angegebenen Wahrscheinlichkeitswerten [posterior probabilities (PP)] für die jeweiligen Äste (RANNALA & YANG 1996). Die PPs eines Baumes können als die

Wahrscheinlichkeit interpretiert werden, mit der die Äste des Baumes „korrekt“ sind (HUELSENBECK et al. 2001).

Eine B/MCMC Analyse besteht immer aus mehreren unabhängigen, simultanen MCMC Simulationen, die auch als Ketten (chains) bezeichnet werden. Die führende chain mit den besten Werten wird als „cold chain“ bezeichnet und ist die Quelle für die abzuspeichernden Bäume. Alle anderen Chains werden als „heated chains“ bezeichnet. Sie sind ständig auf der Suche nach Bäumen mit besseren Wahrscheinlichkeitswerten und können dabei zwischen Optimalbereichen hin und her springen. Falls eine heated chain einen besseren Wahrscheinlichkeitswert für einen Baum findet oder sich die cold chain in einem lokalen Optimum verfängt und keine besseren Wahrscheinlichkeitswerte mehr produziert, können die heated chains die cold chain ablösen (HILL 2001). Somit wird eine weiträumige Suche nach den wahrscheinlichsten Bäumen gewährleistet.

Die Bayes'sche Analyse erhebt nicht den Anspruch alle möglichen Baumtopologien durchzuspielen. Stattdessen werden während der Suche nach den wahrscheinlichsten Bäumen zahlreiche Bäume mit hohem Wahrscheinlichkeitswert abgespeichert und am Ende in einem Majority-rule-Konsensusbaum zusammengefasst. Da neben der Suche nach den besten Baumtopologien unter den Vorgaben eines Substitutionsmodells die statistischen Unterstützungen für die Äste in Form von PPs direkt mitberechnet werden, geht die B/MCMC Methode mit einem weitaus geringeren rechnerischen Aufwand einher als die ML Analyse (HUELSENBECK et al. 2001). Zudem werden die PPs unter dem vorausgesetzten Substitutionsmodell berechnet und sind daher parametrische Werte, die ab 95% als signifikante Unterstützung betrachtet werden können.

Tab. 2.1: Auflistung der zur phylogenetischen Untersuchung benutzten Proben aus der Familie Parmeliaceae. Sequenzen, die aus Genbank übernommen wurden, sind nur mit Genbank Registriernummer angegeben. Für alle neugewonnenen Sequenzen sind Standort, Sammler, Sammelnummer, Herbarnachweis mit Herbarakronym bzw. Privatsammler, die individuelle Probennummer und fettdruckte Genbank Registriernummern gelistet.

Art	Standortangaben	Sammler und Sammelnummer	Herbar-nachweis	Proben-nummer	Genbank-Nummer
<i>Asahinea chrysantha</i> (TUCK.) W.L. CULB. & C.F. CULB.					AF451767
<i>Alectoria ochroleuca</i> 1 (HOFFM.) A. MASSAL.					AF451734
<i>A. ochroleuca</i> 2					AF451735
<i>Bryoria fuscescens</i> (GYELN.) BRODO & D. HAWKSW.					AF451736
<i>B. tortuosa</i> (G. MERR.) BRODO & D. HAWKSW.					AF297740
<i>Coelopogon abraxas</i> BRUSSE					AY251414
<i>C. epiphorellus</i> (NYL.) BRUSSE & KÄRNEFELT					AF254633
<i>Evernia esorediosa</i> (MÜLL. ARG.) DU RIETZ					AB051677
<i>Letharia columbiana</i> (NUTT.) J.W. THOMSON					AF115762
<i>L. vulpina</i> (L.) HUE					AF450286
<i>Platismatia stenophylla</i> (TUCK.) W.L. CULB. & C.F. CULB.					AF097901
<i>P. erosa</i> W.L. CULB. & C.F. CULB.					AF451751
<i>P. norvegica</i> (LYNGE) W.L. CULB. & C.F. CULB.					AF117113
<i>P. glauca</i> 1 (L.) W.L. CULB. & C.F. CULB.					AF451757
<i>P. glauca</i> 2					AF058035
<i>P. glauca</i> 3					AF451758
<i>Usnea acanthella</i> 1 (I.M. LAMB) F.J. WALKER	Ecuador, Carchi, Volc. Chiles, 4135m	Z. Palice 06/03/03		169-2	<b>DQ235483</b>
<i>U. acanthella</i> 2	Ecuador, Carchi, Volc. Chiles, 4250-4300m	Z. Palice 06/03/03		171-4	<b>DQ235481</b>
<i>U. acanthella</i> 3	Peru, Cusco, Challabamba, PN Manu, 3600m	A. Ramirez (1770) 04/09/04	F	268-1	<b>DQ235480</b>
<i>U. acanthella</i> 4	Peru, Ancash, PNH, Quebrada Ulta, 4800m	Wirtz, Lumbsch (19320e) & Ramirez 06/11/2004	F	289-1	<b>DQ235482</b>
<i>U. aciculifera</i> VAIN.					AB051049
<i>U. acromelana</i> 1 STIRT.	Argentinien, T. del Fuego, Glacier Martial	Lumbsch (19003a) 2002	F	175-2	<b>DQ235515</b>
<i>U. acromelana</i> 2	Argentinien, T. del Fuego, Glacier Martial, 710m	Wirtz (PA-20) & Messuti 12/03	F	184-3	<b>DQ235514</b>
<i>U. acromelana</i> 3	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	Wirtz (PA-1) & Messuti 12/03	F	188-1	<b>DQ235516</b>
<i>U. antarctica</i> 1 DU RIETZ					AB103541
<i>U. antarctica</i> 2	Antarktische Halbinsel, Terra Firma	S. Ott 01/01	F	72	<b>DQ235523</b>
<i>U. antarctica</i> 3	Livingston Isl., South Bay, Johnsons Dock	Lumbsch (19039a) 2002	F	138-6	<b>DQ235517</b>
<i>U. antarctica</i> 4	Livingston Isl., Sallies Rocks	Lumbsch (19015b) 2002	F	142-3	<b>DQ235518</b>
<i>U. antarctica</i> 5	Argentinien, T. del Fuego, Lapataia Bay 55m	Wirtz (PA-12) & Messuti 12/03	F	236-1	<b>DQ235524</b>
<i>U. arizonica</i> MOTYKA					AF297732
<i>U. articulata</i> 1 (L.) HOFFM.					AJ457139
<i>U. articulata</i> 2					AJ457140
<i>U. aurantiaco-atra</i> 1 (JACO.) BORY	Livingston Isl., South Bay, Reina Sofia, 200m	Lumbsch (19012b) 2002	F	124-4	<b>DQ235521</b>
<i>U. aurantiaco-atra</i> 2	Argentinien, T. del Fuego, Paso Garibaldi, 342m	Wirtz (PA-11a) & Messuti 12/03	F	199-11	<b>DQ235520</b>
<i>U. aurantiaco-atra</i> 3	Argentinien, T. del Fuego, Lapataia Bay, 55m	Wirtz (PA-12) & Messuti 12/03	F	240-2	<b>DQ235522</b>
<i>U. aurantiaco-atra</i> 4	Argentinien, T. del Fuego, Glacier Martial, 690m	Wirtz (PA-19a) & Messuti 12/03	F	256-14	<b>DQ235519</b>
<i>U. baileyi</i> 1 (STIRT.) ZAHLBR.					AB051050
<i>U. baileyi</i> 2					AB051051
<i>U. barbata</i> (L.) WEBER EX F.H. WIGG.					AJ457138

Art	Standortangaben	Sammler und Sammelnummer	Herbar-nachweis	Proben-nummer	Genbank-Nummer
<i>U. ceratina</i> 1 ACH.					AB051053
<i>U. ceratina</i> 2					AB051054
<i>U. ceratina</i> 3					AJ457141
<i>U. ceratina</i> 4					AJ457142
<i>U. ciliata</i> 1 (NYL.) DU RIETZ	Neuseeland, Otago, Remarkables	A. Marky 01/04/99	OTA 49924	276-1	<b>DQ235475</b>
<i>U. ciliata</i> 2	Neuseeland, Otago, Old Man Range	K. Spencer 20/11/04	OTA 58829	285-2	<b>DQ235479</b>
<i>U. ciliata</i> 3	Neuseeland, Otago, Old Man Range	K. Spencer 20/11/04	OTA 58829	287-1	<b>DQ235476</b>
<i>U. dasaea</i> STIRT.					AB051056
<i>U. diffracta</i> 1 VAIN.					AB051057
<i>U. diffracta</i> 2					AB051059
<i>U. diffracta</i> 3					AB051060
<i>U. diffracta</i> 4					AB051062
<i>U. durietzii</i> 1 MOTYKA					<b>DQ235503</b>
<i>U. durietzii</i> 2	Peru, Ancash, PNH, Huarapasca, 4820m	Wirtz, Lumbsch (19364j) & Ramirez 13/11/04	F	290-1	<b>DQ235504</b>
<i>U. filipendula</i> 1 STIRT.	Peru, Ancash, PNH, Huarapasca, 4820m	Wirtz, Lumbsch (19364j) & Ramirez 13/11/04	F	290-2	<b>DQ235504</b>
<i>U. filipendula</i> 2					AJ457149
<i>U. florida</i> 1 (L.) WEBER EX F.H. WIGG.					AJ457150
<i>U. florida</i> 2					AJ457143
<i>U. florida</i> 3					AJ457144
<i>U. fulvoreaegens</i> (RÄSÄNEN) RÄSÄNEN					AJ457148
<i>U. glabrescens</i> (NYL. EX VAIN.) VAIN.					AB051638
<i>U. himalayana</i> C. BAB.					AB051639
<i>U. hirta</i> (L.) WEBER EX F.H. WIGG.					AB051640
<i>U. intumescens</i> ASAHINA					AJ457151
<i>U. longissima</i> 1 ACH.					AB051641
<i>U. longissima</i> 2					AB051643
<i>U. longissima</i> 3					AB051645
<i>U. longissima</i> 4					AB051647
<i>U. merrillii</i> MOTYKA					AB051648
<i>U. mutabilis</i> 1 STIRT.					AB051649
<i>U. mutabilis</i> 2					AB051651
<i>U. nipparensis</i> ASAHINA					AB051652
<i>U. pangiana</i> 1 STIRT.					AB051653
<i>U. pangiana</i> 2					AB051654
<i>U. patagonica</i> 1 F.J. WALKER	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4600m	Z. Palice (2614) 1999	ZP	63	<b>DQ235487</b>
<i>U. patagonica</i> 2	Argentinien, Santa Cruz, P.N. d.l. Glaciares, 215m	Wirtz (PA-2) & Messuti 12/03	F	191-3	<b>DQ235485</b>
<i>U. patagonica</i> 3	Peru, Ancash, PNH, Huarapasca, 4820m	Wirtz, Lumbsch (19364i) & Ramirez 13/11/04	F	266-2	<b>DQ235486</b>
<i>U. patagonica</i> 4	Peru, Ancash, PNH, Huarapasca, 4820m	Wirtz, Lumbsch (19364i) & Ramirez 13/11/04	F	290-11	<b>DQ235484</b>
<i>U. pectinata</i> 1 STIRT.					AB051655

Art	Standortangaben	Sammler und Sammelnummer	Herbar-nachweis	Proben-nummer	Genbank-Nummer
<i>U. pectinata</i> 2					AB051656
<i>U. perpusilla</i> 1 (I.M. LAMB) F. J. WALKER	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1850m	Wirtz (PA-24) & Messuti 12/03	F	208-19	<b>DQ235490</b>
<i>U. perpusilla</i> 2	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	Wirtz (PA-26a) & Messuti 12/03	F	218-2	<b>DQ235488</b>
<i>U. perpusilla</i> 3	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	Wirtz (PA-26) & Messuti 12/03	F	221-1	<b>DQ235489</b>
<i>U. perpusilla</i> 4	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	Wirtz (PA-26) & Messuti 12/03	F	227-4	<b>DQ235491</b>
<i>U. pygmoidea</i> 1 (ASAHINA) Y. OHMURA					AB051657
<i>U. pygmoidea</i> 2					AB051658
<i>U. rigida</i> (ACH.) MOTYKA					AJ457152
<i>U. rubicunda</i> STIRT.					AB051659
<i>U. rubrotincta</i> 1 STIRT.					AB051660
<i>U. rubrotincta</i> 2					AB051661
<i>U. sphacelata</i> 1 R. BR.	Spitsbergen, Svalbard	C. Printzen 2002	CP-6982	117-1	<b>DQ235492</b>
<i>U. sphacelata</i> 2	Island, INo, Skagafjardarsysla, 600m	S. Heidmarsson 2002	L-28914	152-4	<b>DQ235493</b>
<i>U. sphacelata</i> 3	Greenland, Disko, Skarvefjeld, 840m	A.V. Larsen 27/07/96	C 53/2004	243-2	<b>DQ235494</b>
<i>U. sphacelata</i> 4			1		
<i>Usnea</i> sp. nov. 1, 1	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	Wirtz (PA-26) & Messuti 12/03	F	225-1	<b>DQ235495</b>
<i>Usnea</i> sp. nov. 1, 2	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1900m	Wirtz (PA-25b) & Messuti 12/03	F	193-2	<b>DQ235512</b>
<i>Usnea</i> sp. nov. 1, 3	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1900m	Wirtz (PA-25b) & Messuti 12/03	F	193-12	<b>DQ235510</b>
<i>Usnea</i> sp. nov. 1, 4	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1850m	Wirtz (PA-24) & Messuti 12/03	F	210-1	<b>DQ235511</b>
<i>Usnea</i> sp. nov. 2, 1	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1850m	Wirtz (PA-24) & Messuti 12/03	F	213-1	<b>DQ235513</b>
	Peru, Ancash, PNH, Quebrada Ulta, 4800m	Wirtz, Lumsch (19320f) & Ramirez 06/11/04	F	267-2	<b>DQ235499</b>
<i>Usnea</i> sp. nov. 2, 2	Peru, Ancash, PNH, Quebrada Ulta, 4800m	Wirtz, Lumsch (19320f) & Ramirez 06/11/04	F	267-3	<b>DQ235500</b>
<i>Usnea</i> sp. nov. 2, 3	Peru, Ancash, PNH, Quebrada Ulta, 4800m	Wirtz, Lumsch (19320b) & Ramirez 06/11/04	F	288-1	<b>DQ235502</b>
<i>Usnea</i> sp. nov. 2, 4	Peru, Ancash, PNH, Quebrada Ulta, 4800m	Wirtz, Lumsch (19320b) & Ramirez 06/11/04	F	288-3	<b>DQ235501</b>
<i>U. strigosa</i> (ACH.) EATON					AF112990
<i>U. subantarctica</i> 1 F. J. WALKER	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	Wirtz (PA-1) & Messuti 12/03	F	205-1	<b>DQ235505</b>
<i>U. subantarctica</i> 2	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	Wirtz (PA-1) & Messuti 12/03	F	203-3	<b>DQ235507</b>
<i>U. subantarctica</i> 3	Antarktis, Lagoon Island	S. Ott 1999	F	165-2	<b>DQ235508</b>
<i>U. subantarctica</i> 4	Alexander Isl., Mars Oasis, Upper Terrace	S. Ott 07/01	F	78	<b>DQ235506</b>
<i>U. subcapillaris</i> 1 (D. J. GALLOWAY) F. J. WALKER	Neuseeland, Otago, Old Man Range, 1570m	D. J. Galloway 07/02/99	OTA 53656	283-1	<b>DQ235477</b>
<i>U. subcapillaris</i> 2	Neuseeland, Otago, Old Man Range	K. Spencer 20/11/04	OTA 58829	286-1	<b>DQ235478</b>
<i>U. subfloridana</i> 1 STIRT.					AB051662
<i>U. subfloridana</i> 2					AB051663
<i>U. subfloridana</i> 3					AJ457155
<i>U. subfloridana</i> 4					AJ457157
<i>U. trachycarpa</i> 1 (STIRT.) MÜLL. ARG.	Argentinien, Tierra del Fuego, Parque National	Lumsch (19001a) 2002	F	173-1	<b>DQ235496</b>
<i>U. trachycarpa</i> 2	Argentinien, T. del Fuego, Glacier Martial, 710m	Wirtz (PA-20) & Messuti 12/03	F	182-3	<b>DQ235497</b>
<i>U. trachycarpa</i> 3	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	Wirtz (PA-7) & Messuti 12/03	F	186-3	<b>DQ235509</b>
<i>U. trachycarpa</i> 4	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	Wirtz (PA-21a) & Messuti 12/03	F	197-3	<b>DQ235498</b>
<i>U. trichodeoides</i> 1 MOTYKA					AB051665

Art	Standortangaben	Sammler und Sammelnummer	Herbar-nachweis	Proben-nummer	Genbank-Nummer
<i>U. trichodeoides</i> 2					AB051666
<i>U. trichodeoides</i> 3					AB051668
<i>U. trichodeoides</i> 4					AB051672
<i>U. wasmuthii</i> 1 RÄSÄNEN					AB051673
<i>U. wasmuthii</i> 2					AB051674
<i>U. wasmuthii</i> 3					AB051676
<i>U. wasmuthii</i> 4					AJ457158
			Gesamt N	50	74

## 2.3 Material und Methoden

### 2.3.1 Untersuchte Proben

Die untersuchten *Usnea* Proben in dieser Arbeit wurden entweder während Exkursionen nach Patagonien, Feuerland und Peru von mir gesammelt, von Kollegen gesammelt und zur Verfügung gestellt oder aus verschiedenen Herbarien ausgeliehen. In Tabelle 2.1 findet sich eine Auflistung des in Kapitel 2 benutzten Materials mit Angabe des Standorts, der Sammler, und Sammelnummer, des Herbarnachweises mit Herbarakronym, der individuellen Probennummer und der Genbank Registriernummern. Für die Untersuchung der phylogenetischen Stellung der *Neuropogon*-Gruppe wurden in diesem Kapitel zudem bereits veröffentlichte ITS-Sequenzen anderer *Usnea*-Arten sowie von Arten nah verwandter Gattungen innerhalb der Parmeliaceae verwendet. Diese Daten stammen aus der Internet-Datenbank Genbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) und werden in Tabelle 2.1 ohne Standortangaben nur mit entsprechender Genbank-Registriernummer angegeben.

Die eigenen Aufsammlungen wurden im Feld vom Stein abgenommen, zum Teil mit Hilfe eines Taschenmessers, und in gekennzeichnete Papiertüten verpackt. Fragmentierte Individuen wurden individuell in Papiertaschentücher gewickelt, um eine Vermischung des Materials zu verhindern. Anschließend konnten die Proben bei geöffneten Tüten und Zimmertemperatur über mehrere Tage austrocknen. Zurück am Arbeitsplatz wurden die einzelnen Individuen separiert und mit Hilfe eines Binokulars bestimmt, mit individuellen Nummern gekennzeichnet, in Plastiktütchen verpackt und tiefgekühlt. Die Probennummern setzen sich aus einer fortlaufenden Standort- und Individuennummer zusammen (z. B. 199-3).

### 2.3.2 Morphologische Analyse

#### *Rasterelektronenmikroskopie*

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem EVO<sup>®</sup>60 Hochvakuum-Rasterelektronenmikroskop von Zeiss aufgenommen. 0,5-1mm dicke Thallusquerschnitte wurden vor dem eigentlichen Mikroskopieren luftgetrocknet. Obwohl das benutzte Elektronenmikroskop die Untersuchung von Proben ohne vorherige Goldbesprühung erlaubt, wurde das Material in einem Vakuum mit 40 mA für 180 Sekunden mit Gold überzogen. Dadurch werden feine Strukturen besser sichtbar, der Kontrast bei der Mikroskopie erhöht und die Proben insgesamt haltbarer gegen die Bestrahlung mit Elektronen gemacht.

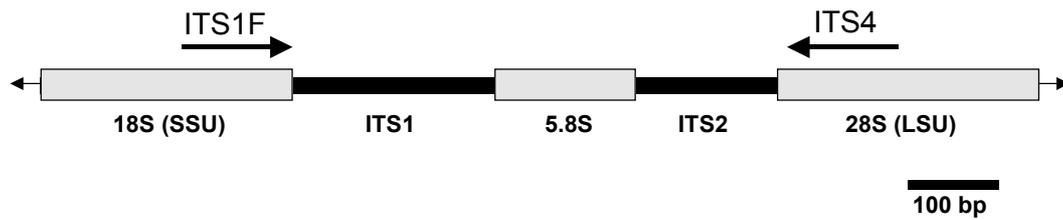
Von jeder *Neuropogon*-Art wurde mindestens eine Makroaufnahme des Kortex gemacht, um die Strukturen besser erkennen und einem Kortextypus nach OHMURA (2001) bzw. OHMURA & KANDA (2004) zuordnen zu können (siehe Abb. 2.2). Referenzaufnahmen wurden außerdem vom Kortex der Arten *U. baileyi*, *U. ceratina*, *U. florida*, *U. longissima* und *U. strigosa* gemacht. Die untersuchten Proben stammen aus dem Herbarium des Field Museums (F) in Chicago und werden im Folgenden aufgelistet:

*Usnea baileyi*, USA, Florida, Marion Ca., Juniper Springs, P. Schalbert (F); *Usnea ceratina*, USA, Kalifornien, Santa Cruz Mts., Stengel Ranch, 1500ft, A.C. Herre, 08/1906 (F); *Usnea florida*, Schweden, Småland, Växjö, Biscopsnäset, B. Hedvall, 10/1937 (F); *Usnea longissima*, USA, Washington, Skayit Co, Conway, H. Christensen, 1899 (F); *Usnea strigosa*, USA, Louisiana, M. Hale (F 1101650).

### 2.3.3 Molekulare Marker

Als molekularer Marker zur phylogenetischen Untersuchung wurde die ITS-Region ausgewählt. Die ITS ist die wahrscheinlich am häufigsten sequenzierte DNA Region bei Pilzen, und daher liegen auch für die Gattung *Usnea* viele ITS-Sequenzen in Genbank vor. Mir selbst stand kein Frischmaterial diverser Arten dieser Gattung zur Verfügung und gleichzeitig wurden bereits mehrere Studien zur Phylogenie von *Usnea* beruhend auf ITS-Daten durchgeführt (OHMURA 2002, ARTICUS 2004b, OHMURA & KANDA 2004). Somit bot sich die Verwendung dieses Genabschnittes und der bereits im Rahmen anderer Studien gewonnenen Sequenzen an. 74 der 124 benutzten Proben wurden für diese Studie der Internet-Datenbank entnommen (Tab. 2.1). Da die ITS-Region aufgrund ihrer hohen Variabilität auch für die Untersuchung der inter- und infraspezifischen Fragestellungen innerhalb *Neuropogons* (siehe Kapitel 3 und 4) verwendet wurde, konnten aus einem großen Sequenzpool Sequenzen für die einzelnen *Neuropogon*-Arten ausgewählt werden.

Alle ITS-Sequenzen wurden mit denselben Primern amplifiziert und sequenziert. Hierbei handelte es sich um den Primer ITS1F in 5'-3'-Richtung (GARDES & BRUNS 1993) und den Primer ITS4 in 3'-5'-Richtung (WHITE et al. 1990), die je nach Vorhandensein eines nu SSU-Introns ein ca. 600-1200 bp langes PCR-Fragment amplifizierten (Abb. 2.3).



Primer	Primersequenz	Anlagerungstemp.	Referenz
ITS1F*	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	50°C	GARDES & BRUNS (1993)
ITS4**	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	50°C	WHITE et al. (1990)

\* setzt am 3'-Ende der 18S an

\*\* setzt am 5'-Ende der 28S an

Abb. 2.3: Nukleäre ribosomale DNA und benutzte ITS-Primer.

### 2.3.4 Labormethoden

#### *DNA-Extraktion*

Vor der eigentlichen Extraktion der DNA wurde das Flechtenmaterial wie folgt präpariert: Unter einem Binokular habe ich sorgfältig einen ca. 1cm langen Teil bzw. mehrere kürzere Abschnitte des Zentralstrangs mit einer Rasierklinge von jeglichem Algenmaterial befreit, um das Risiko einer Verunreinigung der Pilz- durch Algen-DNA zu verhindern. Weiterhin habe ich dabei auf mögliche Verunreinigungen durch parasitische Pilze geachtet, die Flechten häufig befallen und im Falle von *Neuropogon* durch dunkle Verfärbungen des meist weißen Zentralstrangs auffallen. Diese Abschnitte wurden sorgfältig entfernt. Das ausgewählte Material wurde abpräpariert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Um sekundäre Flechtenstoffe auszuwaschen, wurden die Proben für ca. eine halbe bis eine Stunde mit Aceton bedeckt, welches danach abpipettiert wurde. Das restliche Aceton konnte im Verlaufe einer weiteren halben Stunde aus dem geöffneten Eppendorfgefäß evaporieren.

Die gesamte genomische DNA der einzelnen Proben wurde entweder mit Hilfe des NucleoSpin Plant Kit von Macherey-Nagel oder des DNeasy Mini Plant Kit von Qiagen extrahiert. Dabei wurden in beiden Fällen die Protokolle zur Extraktion genomischer Pflanzen-DNA in den Benutzerhandbüchern weitgehend befolgt. Zum Teil musste ich bei der Zerkleinerung des im Eppendorfgefäß durch flüssigen Stickstoff heruntergekühlten Materials sterilen Quarzsand zugeben, um das oftmals sehr harte Zentralstrangmaterial pulverisieren zu können. Die Inkubationszeiten zur Auflösung der Zellstrukturen wurden gegebenenfalls auf mehrere Tage ausgedehnt, besonders wenn das Ausgangsmaterial älteres Herbariummaterial war. Bei Frischmaterial war eine halbe bis einstündige Inkubation ausreichend. Meist wurde zur

Auswaschung der DNA im letzten Schritt der Protokolle auf 70°C erhitztes gereinigtes PCR-Wasser, statt des im Protokoll angegebenen Puffers benutzt. Die extrahierten DNA-Proben wurden dann während der Bearbeitungszeit bei 4°C aufbewahrt und später bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

#### *DNA-Amplifizierung und Aufreinigung der PCR-Produkte*

Die DNA-Amplifizierungen wurden mit variierenden Reagenzien und in zwei unterschiedlichen PCR-Maschinen durchgeführt. Anfänglich habe ich für die PCR-Reaktionen Ready-to-go PCR beads (AMERSHAM BIOSCIENCES) benutzt. Diese gefriergetrockneten Reaktionskügelchen enthalten standardisierte Mengen an Nukleotiden (dNTPs), Puffer, MgCl und Taq Polymerase und werden mit gereinigtem PCR-Wasser, DNA und Primern auf ein Reaktionsvolumen von 25µl gebracht. Aufgeschlüsselt bedeutet dies: 2,5µl je Primer (5-10 µM), 2-4µl DNA (je nach Konzentration und Alter der Ausgangsprobe) und 16-18µl PCR-Wasser. Abgelöst wurde die PCR-beads-Methode durch einen *Taq* PCR Master Mix (QIAGEN). Diese Reaktionen setzten sich wie folgt zusammen: 2,5µl je Primer (5-10 µM), 2-4µl DNA, 12,5µl Master Mix und 3,5-5,5µl PCR-Wasser. Auch für diese Reaktionen betrug das Endvolumen 25µl. Nach dem Hinzufügen eines Tropfens PCR-Öl je Reaktionsgefäß, wurde die Amplifizierung in einem Stratagene Robocycler durchgeführt. Folgendes PCR-Programm wurde benutzt:

Denaturierung der DNA:	5:00 min bei 95°C	1 Zyklus
(nur bei <i>Taq</i> PCR Master Mix)	15:00 min bei 95°C	1 Zyklus
Amplifizierung:	0:45 min bei 95°C	} 30 Zyklen
	1:50 min bei 50°C	
	2:00 min bei 72°C	
Finale Verlängerung:	7:00 min bei 72°C	1 Zyklus

Der Großteil der Proben wurde mit selbst angesetztem Master-Mix und in einem MJ Research MultiCycler PTC 220 Dyad PCR-Gerät amplifiziert. Für den Master-Mix galt folgendes Protokoll: 2µl je Primer (10 µM), 2,5µl 10x-PCR-Puffer (ROCHE), 2,5µl dNTPs (EPICENTRE), 5µl 100x-Bovine Serum Albumin (BSA) (NEW ENGLAND BIOLABS), 1,5µl Taq Polymerase und gereinigtes PCR-Wasser zum Auffüllen jeder Reaktion auf ein Endvolumen von 25µl. Jede Reaktion enthielt 2-5µl genomische DNA, je nach DNA-Gehalt der Probe.

Das PCR-Programm für diesen Reaktionsansatz war:

Denaturierung der DNA:	3:00 min bei 94°C	1 Zyklus
Amplifizierung:	0:45 min bei 94°C	} 30 Zyklen
	1:00 min bei 50°C	
	1:30 min bei 72°C	
Finale Verlängerung:	7:00 min bei 72°C	1 Zyklus

Nach der DNA-Amplifikation wurden die PCR-Produkte entweder mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), dem NucleoSpin Extract Kit (MACHEREY-NAGEL) oder nach dem Ausschneiden aus einem Agarosegel mit einem Gel-Verdauungsenzym (GELase Enzyme (EPICENTRE)) gereinigt. Bei allen PCR-Reinigungsverfahren wurden jeweils die Anweisungen der Hersteller beachtet. Im Falle der Extraktions-Kits wurden Öl, überschüssige Salze sowie Primer- und Nukleotidreste über ein Filtersystem von der gewünschten DNA getrennt und diese im letzten Schritt aus einem Mikrofilter ausgewaschen. Zum Auswaschen des DNA-Fragments wurde bei beiden Kits auf den Originalpuffer verzichtet und alternativ 33µl angewärmtes PCR-Wasser benutzt.

#### *Gel-Elektrophorese*

Die Gel-Elektrophorese wurde entweder vor oder nach der Kit-Reinigung zur Kontrolle der PCR-Produkte verwendet (3µl DNA plus 2µl Ladepuffer) oder im Falle der Nutzung des Gel-Verdauungsenzyms zum Ausschneiden der DNA-Banden benötigt. Dazu wurde das Volumen des gesamten PCR-Produkts in einer Speed Vac auf ca. 5-8µl reduziert und mit 2µl Ladepuffer ergänzt. Das DNA-Gemisch wurde anschließend auf ein mit Ethidiumbromid versetztes, 1%iges Agarosegel aufgetragen, um in einer Elektrophoresekammer in DNA-Banden unterschiedlicher Länge aufgetrennt zu werden. Die Elektrophoresekammer wurde dazu mit TALE-Puffer gefüllt und unter Spannung gesetzt (180V). Um die PCR-Banden nach der Elektrophorese zu visualisieren und auszuschneiden, wurde das Gel auf eine UV-Lampe übertragen und die Banden vorsichtig mit Rasierklingen bearbeitet. Die ausgeschnittenen Banden wurden in einem 0,5ml Eppendorfgefäß bei 70°C geschmolzen, auf 45°C abgekühlt und mit 1-1,5µl GELase-Enzym vermischt. Dieses Gemisch wurde für einige Stunden bei 45°C inkubiert, so dass das Enzym die Agarose vollständig verdauen konnte.

*Sequenzierung*

Ungefähr  $\frac{1}{4}$  der Sequenzen wurden in einem kommerziellen Labor (GATC Biothec AG, Konstanz) gewonnen. GATC führten die Sequenzierung nach einer weiterentwickelten Dideoxy-Kettenterminationsmethode (SANGER et al. 1977) durch. Für die Sequenzierreaktion wurden ein Applied Biosystems-Kit (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) und ein Mastercycler (EPPENDORF) mit folgenden Einstellungen benutzt:

Denaturierung der DNA:	90 sec bei 95°C	1 Zyklus
Amplifizierung:	30 sec bei 50°C	} 25 Zyklen
	4 min bei 60°C	
	20 sec bei 95°C	
Finale Verlängerung:	30 sec bei 50°C	1 Zyklus
	4 min bei 60°C	

Als Sequenzierprimer wurden ausschließlich die angegebenen PCR-Primer verwendet. Nach der zyklischen Sequenzierreaktion wurden die Sequenzierprodukte gefällt, gereinigt und auf einem ABI Prism 3700 DNA-Analyser Kapillar-Sequenziergerät analysiert.

Ein Kapillar-Sequenzierer ist ein automatisches Elektrophoresesystem, in welchem die fluoreszenzmarkierten Proben automatisch in dünne, mit Polymer gefüllte Kapillare injiziert werden. Mit einsetzender elektrischer Spannung wandern die negativ geladenen, markierten DNA-Fragmente je nach Länge schneller oder langsamer durch die Kapillare in Richtung einer Glasküvette. In dieser Küvette aktiviert ein Laserstrahl die Fluoreszenzmoleküle, deren Strahlung von einem Detektor registriert wird. Die Strahlung wird in ein elektronisches Signal umgewandelt, an eine Computerstation weitergeleitet und dort mit entsprechender Software als Elektropherogramm visualisiert. Jeder Scheitelwert innerhalb eines Elektropherogramms stellt ein einzelnes Nukleotid dar. Die Chromatogramme der einzelnen Sequenzierreaktionen werden als ABI-Trace-Dateien gespeichert.

Für den Großteil der Sequenzen wurden die Sequenzierreaktionen und Sequenzierungen selbständig durchgeführt. Dazu standen mir ein ABI 3100 und ABI 3730 DNA Kapillar-Sequenzierer zur Verfügung. Die Sequenzierreaktionen wurden in einem MJ Research MultiCycler PTC 220 Dyad PCR-Gerät mit 1,5µl BigDye Terminator Version 3.1 (Standard Kit von Applied Biosystems) und 2,5µl entsprechendem Sequenzierpuffer, 0,4µl Primer (10µM) und 0,5-3µl PCR-Produkt pro Reaktion ausgeführt. Das Endvolumen von 10µl je

Reaktionsansatz wurde durch entsprechendes Auffüllen mit gereinigtem PCR-Wasser erreicht. Folgendes Standardprotokoll galt für die Sequenzierreaktionen:

Denaturierung der DNA:	60 sec bei 96°C	1 Zyklus
Amplifizierung:	15 sec bei 96°C	} 32 Zyklen
	10 sec bei 50°C	
	4 min bei 60°C	

Erhitzt und abgekühlt wurden die Reaktionen zwischen den einzelnen Schritten der Zyklen jeweils um 1°C pro Sekunde.

Nach der Sequenzierreaktion in der PCR-Maschine wurde zum Reinigen der Proben eine Alkoholfällung gemacht. Hierzu wurden jeweils 1µl NaOAc und EDTA sowie 25µl EtOH (100%) vermischt und zu jeder Probe pipettiert. Dieses Gemisch wurde nach 10-minütiger Inkubation bei 4°C 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, die verbleibende DNA mit 70%-igem Alkohol gewaschen und danach getrocknet. Erst kurz vor dem Einbringen in den Sequenzierer wurde die getrocknete DNA mit 10µl HiDi wieder in Lösung gebracht. Die Einstellungen und Wartungen des Sequenzierers erfolgten entsprechend den Empfehlungen von ABI. Der Vorgang der Sequenzierung entsprach dem oben beschriebenen Ablauf.

### 2.3.5 Analytische Methoden

#### 2.3.5.1 Bearbeitung der Sequenzen und Erstellung der Alignments

Die ABI-Dateien der Hin- und Rückprimer einer Probe wurden mit dem Computerprogramm SeqMan 4.03 (DNA Star software package, LASERGENE) zusammengesetzt und manuell mindestens zweimal auf Unstimmigkeiten hin überprüft. Alle uneindeutigen Scheitelpunkte und Konflikte zwischen den Vorwärts- und Rückwärtssträngen wurden über die gesamte Arbeit hinweg einheitlich behandelt. Halbe Überlagerungen in nur einem Strang wurden zugunsten des eindeutigen Stranges entschieden. Häufiger traten auch hohe, sich über mehrere Basen ausbreitende Überlagerungen bzw. zusammengerutschte Kurven auf, die immer nach dem Prinzip der gleichmäßigen Basenabfolge entschieden wurden. Einzelne, vollständig überlagerte Nukleotide in beiden DNA-Strängen wurden entweder mit einem „N“ gekennzeichnet, bzw. bei Häufung innerhalb einer Sequenz wurde diese als mögliches Pseudogen von den Analysen ausgeschlossen. In jedem Fall wurden Sequenzen mit Uneindeutigkeiten explizit in der Zusammenschau mit anderen Sequenzen betrachtet, sowohl

im Alignment als auch in ihrer Stellung in den Analysen. Mit dem wachsenden Alignment für die Gesamtanalyse (Kapitel 3) wurde jede neu auftretende Substitution gesondert auf ihre Stimmigkeit überprüft.

Die in Genbank implementierte BLASTsearch Funktion (ALTSCHUL et al. 1997) wurde zur Verifizierung der ersten gewonnenen Sequenzen und bei Unklarheiten benutzt.

### *Alignment*

Im Phylogenetieil der Arbeit habe ich das Alignmentprogramm SAM (Sequence Alignment and Modelling system) (KARPLUS et al. 1998) in Verbindung mit dem Programm BioEdit (HALL 1999) benutzt. SAM war in diesem Falle gut geeignet, weil in dem zugrunde liegenden ITS-Alignment einige Abschnitte mit Gaps und Längenunterschieden auftraten, die nicht eindeutig alignbar waren und durch das Programm SAM entfernt wurden.

#### 2.3.5.2 Wahl der Außengruppe

Außengruppen für phylogenetische Rechnungen werden im Allgemeinen unter der Annahme ausgewählt, dass die zu untersuchende Innengruppe monophyletisch ist und sich die Außengruppe aus nah verwandten Taxa zusammensetzt (SWOFFORD et al. 1996) bzw. möglichst die Schwestergruppe zur Innengruppe darstellt. Als Außengruppe für die phylogenetische Untersuchung zur Stellung von *Neuropogon* innerhalb *Usnea* wurden ITS-Sequenzen aus sieben nah verwandten Gattungen innerhalb der Familie der Parmeliaceae ausgewählt, da eine Schwestergruppe zu *Usnea* nicht feststeht (siehe z. B. Analyse in THELL et al. 2002, MATTSSON et al. 2004). Zur Auswahl der Außengruppe habe ich zum einen bereits veröffentlichte Studien zur Phylogenie der Parmeliaceae herangezogen (THELL et al. 2002, OHMURA & KANDA 2004, MATSSON et al. 2004, ARTICUS 2004a, b). Zum anderen habe ich eine BLASTsearch-Analyse mit *Usnea*-Sequenzen durchgeführt, die ersten Treffer heruntergeladen und zusammen mit diesen Sequenzen einen einfachen ungewurzelten Baum errechnet. Die in diesem Baum nächsten Taxa zur Innengruppe, wurden in den weiteren Analysen als Außengruppe verwendet.

#### 2.3.5.3 Phylogenetische Methoden

Der Datensatz in diesem Teil der Arbeit wurde sowohl mit der NJ- und MP- als auch mit der Bayes'schen Methode analysiert und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die MP- und NJ- Analyse, sowie die Bootstrap-Berechnungen wurden mit dem Programm PAUP\* 4.0b10

(SWOFFORD 2001) durchgeführt. Das NJ wurde zum einen mit dem LogDet-Verfahren (LOCKHART et al. 1994) durchgeführt, wofür alle konstanten Alignmentpositionen von der Berechnung ausgeschlossen wurden (HUSON 1998). Die LogDet-Distanzberechnung ist die einzige phylogenetische Methode, die einen nicht-stationären Substitutionsprozess erfassen kann und damit eine Nukleotid-Frequenzverschiebung im Datensatz berücksichtigt (XIA et al. 2003). In einer zweiten Rechnung wurde das General Time Reversible Modell (GTR+I) (RODRIGUEZ et al. 1990) zugrundegelegt, wobei die Frequenzen der spezifischen Mutationsratenvariation von der  $\Gamma$ -Verteilung abgeleitet wurden („rates=gamma“). In beiden Fällen wurde die NJ Bootstrap-Berechnung mit 2.000 Wiederholungen (replicates) angesetzt. Die MP Phylogenie wurde mit der heuristischen Suchoption und 300 zufälligen Sequenz-Additionen berechnet. Die nicht-parametrischen Bootstrap-Werte (FELSENSTEIN 1985) beruhen auf 1.000 Wiederholungen, wobei das Suchkriterium heuristisch mit 10 einfachen Sequenz-Additionen war. Diese Berechnung wurde nach 110 Stunden und 41 Wiederholungen abgebrochen und das Ergebnis gespeichert. Daraufhin wurde eine weitere Bootstrap-Berechnung mit dem fast-step Suchkriterium und 1.000.000 Wiederholungen durchgeführt. Alle Bäume wurden durch das Programm Treeview (PAGE 1996) visualisiert.

Für die Bayes'schen Analysen wurde das Computerprogramm MrBayes (HUELSENBECK & RONQUIST 2001, RONQUIST & HUELSENBECK 2003) verwendet und nach HUELSENBECK & RANNALA (2004) das komplexeste verfügbare Substitutionsmodell gewählt. Dementsprechend haben wir das Covarion Modell (FITCH & MARKOWITZ 1970, TUFFLEY & STEEL 1998) verwendet, welches berücksichtigt, dass die Substitutionsrate innerhalb eines Gens in verschiedenen Taxa oder Gruppen unterschiedlich sein kann. Die meisten anderen Substitutionsmodelle setzen zwar voraus, dass die Substitutionsrate an den verschiedenen Positionen eines Gens unterschiedlich sein kann, jedoch über die gesamte phylogenetische Geschichte einer Gruppe hinweg homogen ist (HUELSENBECK 2002). Empirische Studien zeigen aber immer wieder, dass Genabschnitte in verschiedenen Gruppen unterschiedlich schnell evolvieren können. Das komplexe Covarion Modell trägt diesem SSRV (site specific rate variation) Prozess Rechnung.

Die Rechnung wurde mit 12 ‚chains‘ durchgeführt, die simultan 2.000.000 Generationen durchliefen. Alle hundert Generationen wurde ein Baum gespeichert. Die ersten 2000 Bäume wurden als ‚burn-in‘, d. h. vor Erreichen des Wahrscheinlichkeitsplateaus gesammelt, verworfen. Ein 50% Majority-rule-Konsensusbaum wurde mit Hilfe der ‚sumt‘ Option in MrBayes errechnet und in Treeview als Phylogramm dargestellt.

*Hypothesentest*

Um die Klassifizierung von Taxa innerhalb einer B/MCMC Topologie zu überprüfen, kann man einer Bayes'schen Analyse einen Hypothesentest anschließen. Hypothesentests eignen sich dazu, phylogenetische Beziehungen zu überprüfen, die in dem Konsensusbaum einer MrBayes Analyse nicht gezeigt werden, aber möglicherweise durch die zugrunde liegenden Daten nicht signifikant abgelehnt werden können. Solche phylogenetischen Hypothesen können als Null-Hypothesen formuliert und im Programm PAUP\* (SWOFFORD 2001) an einem Teil der B/MCMC Bäume getestet werden. In der vorliegenden Analyse wurden 18.001 Bäume in MrBayes gespeichert und in PAUP\* geöffnet. Alle Bäume in diesem Pool, die mit der Null-Hypothese übereinstimmen, tragen dazu bei, dass diese nicht abgelehnt werden kann. Der prozentuale Anteil solcher Bäume kann nach der Methode von IHLEN & EKMAN (2002) bestimmt werden. Durch die grobe Festlegung der Baumtopologie können entsprechende Bäume herausgefiltert und die Summe berechnet werden. Diese kann dann in ins Verhältnis zu der Gesamtanzahl der Bäume gesetzt werden. Bei p-Werten  $< 0.05$  kann die Null-Hypothese abgelehnt, bei  $p < 0.01$  signifikant abgelehnt werden.

## 2.4 Ergebnisse

### 2.4.1 Datensatz

Für die phylogenetische Studie wurde ein Datensatz mit insgesamt 124 ITS-Sequenzen zusammengestellt, die jeweils die vollständige ITS-Region, ITS1, 5.8 S und ITS2, umfassen. Von diesen 124 rDNA-Sequenzen wurden 74 der Internetdatenbank Genbank entnommen (siehe Genbank-Nummern in Tab. 2.1). Dabei wurde versucht, von möglichst vielen *Usnea*-Arten bis zu vier Individuen im Datensatz zu vereinen. Dies war in einigen Fällen nicht möglich und somit sind viele Arten mit nur einem oder zwei Individuen vertreten (Tab. 2.1). Insgesamt konnten 29 *Usnea*-Arten aus Genbank in den Analysen berücksichtigt werden. 50 Sequenzen von Arten der Untergattung *Neuropogon* wurden für diese Studie neu gewonnen. Zusätzlich zu den *Usnea*-Arten konnten insgesamt 12 *Neuropogon*-Arten analysiert werden. Leider stand mir kein Frischmaterial der sehr seltenen Arten *Usnea neuropogonoides* aus Patagonien und *U. pseudocapillaris* aus Neuseeland, sowie der schwer zugänglichen endemischen Art *U. taylorii* von den Kerguelen zur Verfügung. Bis auf diese drei Arten konnten alle zur Untergattung zählenden Arten (WALKER 1985, siehe Abb. 2.1) mit mindestens zwei Individuen in die Analysen aufgenommen werden. Zusätzlich wurden zwei neue *Neuropogon*-Arten aus Patagonien und Peru berücksichtigt, die mit *Usnea* sp. nov. 1 und 2 bezeichnet wurden. Als Außengruppe wurden 16 Sequenzen von 13 Arten aus sieben nah verwandten Gattungen der Parmeliaceae ausgewählt: *Alectoria* (*A. ochroleuca*), *Asahinea* (*A. chrysantha*), *Bryoria* (*B. fuscescens*, *B. tortuosa*), *Coelopogon* (*C. abraxas*, *C. epiphorellus*), *Evernia* (*E. esorediosa*), *Letharia* (*L. columbiana*, *L. vulpina*) und *Platismatia* (*P. erosa*, *P. glauca*, *P. norvegica*, *P. stenophylla*).

Die ersten Treffer bei der Überprüfung der neuen Daten in BLASTsearch (ALTSCHUL et al. 1997) waren ausnahmslos ITS-Sequenzen nah verwandter *Usnea*-Arten. Die gewonnenen Sequenzen variierten in der Länge zwischen 562 bp bei *U. trachycarpa* (186-3) und 1255 bp bei *U. acromelana* (188-1). Längenunterschiede in der rDNA sind typischerweise auf Introns zurückzuführen. Es gibt zwei Intronotypen, die häufig innerhalb der rDNA von lichenisierten Pilzen vorkommen: group I-Introns und spliceosomal-Introns (z. B. DEPRIEST & BEEN 1992, GARGAS et al. 1995, BHATTACHARYA et al. 2002, HAUGEN et al. 2004; BHATTACHARYA et al. 2000). Group I-Introns zeichnen sich durch eine spezifische Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur und damit einhergehende konservierte Sequenzabschnitte aus, die für die selbstinitiierte Entfernung (Splicing) der Introns aus den codierenden Abschnitten der RNA wichtig sind. Durch die Auffaltung des RNA-Stranges wird ein aktives Zentrum geschaffen,

von dem aus das Splicing erfolgen kann (BURKE 1988, CECH 1988, BHATTACHARYA et al. 1996). Große Längenunterschiede der Introns außerhalb der konservierten Sequenzbereiche sind möglich (CECH 1988). Spliceosomal-Introns dagegen haben häufig eine einfache Sekundärstruktur und eingeschränkte konservierte Sequenzabschnitte, können aber ebenfalls eine beachtliche Länge erreichen (BHATTACHARYA et al. 2000). In den vorliegenden Fällen handelt es sich um group I-Introns, die sich in der Endregion der kleinen Untereinheit (SSU) unmittelbar vor der angrenzenden ITS-Region befinden. OHMURA (2002) und ARTICUS (2004a, b) konnten group I-Introns an dieser Position der SSU mit einer Länge von ca. 300-450 bp bei *Usnea* feststellen, ebenso BLANCO (2004) bei verschiedenen anderen Vertretern der Parmeliaceae und z. B. SHINOHARA et al. (1996) in weiteren Ascomycetes. Da sich die Anlagerungssequenz für den benutzten Vorwärts-Primer ITS1F (GARDES & BRUNS 1993) in diesem Abschnitt der SSU befindet, wurden vorhandene Introns amplifiziert und sequenziert.

Anhand der Intronlänge und -ähnlichkeit konnten in diesem Datensatz verschiedene Gruppierungen ausgemacht werden. Alle Sequenzen der Arten *Usnea* sp. nov. 2, *U. durietzii*, *U. subantarctica* und des Individuums *U. trachycarpa* 3 wiesen kein Intron auf. Alle Sequenzen der restlichen Arten beinhalteten ein bis zu 350 bp großes, homologes Intron, welches im Falle von *U. acromelana* um weitere 335 bp erweitert wurde. *Usnea* sp. nov. 1 stimmte in Anfang- und Endfragmenten dieses Zusatzintrons über insgesamt 45 bp mit den *U. acromelana*-Sequenzen überein. Weiterhin zeigte die Endregion des Hauptintrons Längenunterschiede in verschiedenen Gruppen. Das Intron in den Sequenzen von *U. patagonica* und *U. acanthella* war 36 bzw. 38 bp kürzer und die Sequenzen von *Usnea* sp. nov. 1, *U. acromelana*, *U. antarctica* und *U. aurantiaco-atra* zeigten gegenüber den neuseeländischen Arten sowie *U. perpusilla*, *U. sphacelata* und den restlichen *U. trachycarpa*-Sequenzen eine Deletion von 10 bp. Alle Introns wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen und nur der ITS-Bereich berücksichtigt.

Das mit SAM (KARPLUS et al. 1998) erstellte Alignment war 476 Alignmentpositionen lang, von denen 280 Positionen konstant und 196 variabel waren. Dieses Alignment wurde als Grundlage aller phylogenetischen Rechnungen benutzt.

Tests mit variablen Außengruppen von Vertretern der Parmeliaceae hatten keine Auswirkungen auf die *Usnea*-Topologie. Die vier Arten der Gattung *Platismatia*, die in einem ungewurzelten Baum am weitesten von der Gattung *Usnea* entfernt waren, wurden testweise von der Analyse ausgeschlossen. Damit sollte verhindert werden, dass unnötig viele variable Positionen aufgrund von schlecht alignbaren Sequenzabschnitten aus dem Alignment

herausgeschnitten werden müssen. Der Ausschluss dieser Sequenzen hatte keine Auswirkungen auf die Topologie, Auflösung oder Unterstützungen innerhalb *Usneas*.

#### 2.4.2 Phylogenetische Analyse

Die phylogenetische Analyse besteht aus zwei NJ-Bäumen, berechnet unter dem LogDet- und GTR+I-Substitutionsmodell, zwei MP-Analysen und einer Bayes'schen Analyse unter dem Covarion-Modell. Die Phylogramme mit entsprechenden Bootstrap-Werten bzw. Posterior Probabilities finden sich in den Abbildungen 2.4 – 2.7.

Anfänglich soll hier das Ergebnis der B/MCMC Analyse dargestellt werden und in den wichtigsten Punkten mit den NJ- und MP-Bäumen verglichen werden. Abbildung 2.4 zeigt den 50%-Majority-rule- Konsensusbaum aus 18.001 gesammelten Bäumen. Die als Außengruppe benutzten Sequenzen finden sich allesamt an der Basis des Baumes. Drei Arten der Gattung *Platismatia* bilden eine monophyletische Gruppe (PP=0.96), aus der *P. stenophylla* abweicht. Die anderen Arten der Außengruppe gruppieren sich mit wenigen Ausnahmen ohne Unterstützung zusammen. Die Gattung *Bryoria* ist polyphyletisch, da *B. tortuosa* mit *Alectoria ochroleuca* zusammenfällt (PP=1.00) und *B. fuscescens* nahe der Basis erscheint. Die gesamte Gattung *Usnea* ist als monophyletische Gruppe signifikant unterstützt (PP=1.00). Die beiden Untergattungen *Eumitria* (E) und *Dolichousnea* (D) bilden jeweils monophyletische Gruppen (PP=1.00) und ihr Verhältnis zu den Untergattungen *Usnea* und *Neuropogon* bleibt unaufgelöst. Innerhalb des *Eumitria*-Astes sind die beiden untersuchten Arten *U. pectinata* und *U. baileyi* jeweils gut unterstützt (PP=1.00). In der *Dolichousnea*-Gruppe hat *U. diffracta* ein Schwestergruppenverhältnis zu *U. longissima* und *U. trichodeoides*. Alle bislang bekannten Arten dieser Untergattung sind in der Analyse vertreten.

Die *Usnea* + *Neuropogon*-Gruppe ist monophyletisch (PP=1.00), das Rückgrat der Phylogenie innerhalb der Gruppe aber weitgehend unaufgelöst. *Neuropogon* ist polyphyletisch (siehe Sterne im Baum). Eine nicht unterstützte *Neuropogon*-Kerngruppe (PP=0.93) mit den Arten *U. antarctica*, *U. acromelana*, *U. subantarctica*, *U. trachycarpa*, *U. sphacelata*, *U. perpusilla*, *U. patagonica*, *U. subcapillaris*, *U. ciliata*, der neuen Art aus Patagonien, *Usnea* sp. nov. 1, und der Typusart *U. aurantiaco-atra* hat ein unaufgelöstes Verhältnis zu drei weiteren *Neuropogon*-Arten und der gut unterstützten Sektion *Usnea* (PP=1.00). Die neue Art *Usnea* sp. nov. 2 aus Peru (PP=1.00) erscheint verwandt zur Sektion

*Usnea*. Allerdings bleibt dieses Verhältnis ohne Unterstützung, während *U. acanthella* (PP=1.00) und *U. durietzi* (PP=1.00) unklare verwandtschaftliche Verhältnisse haben.

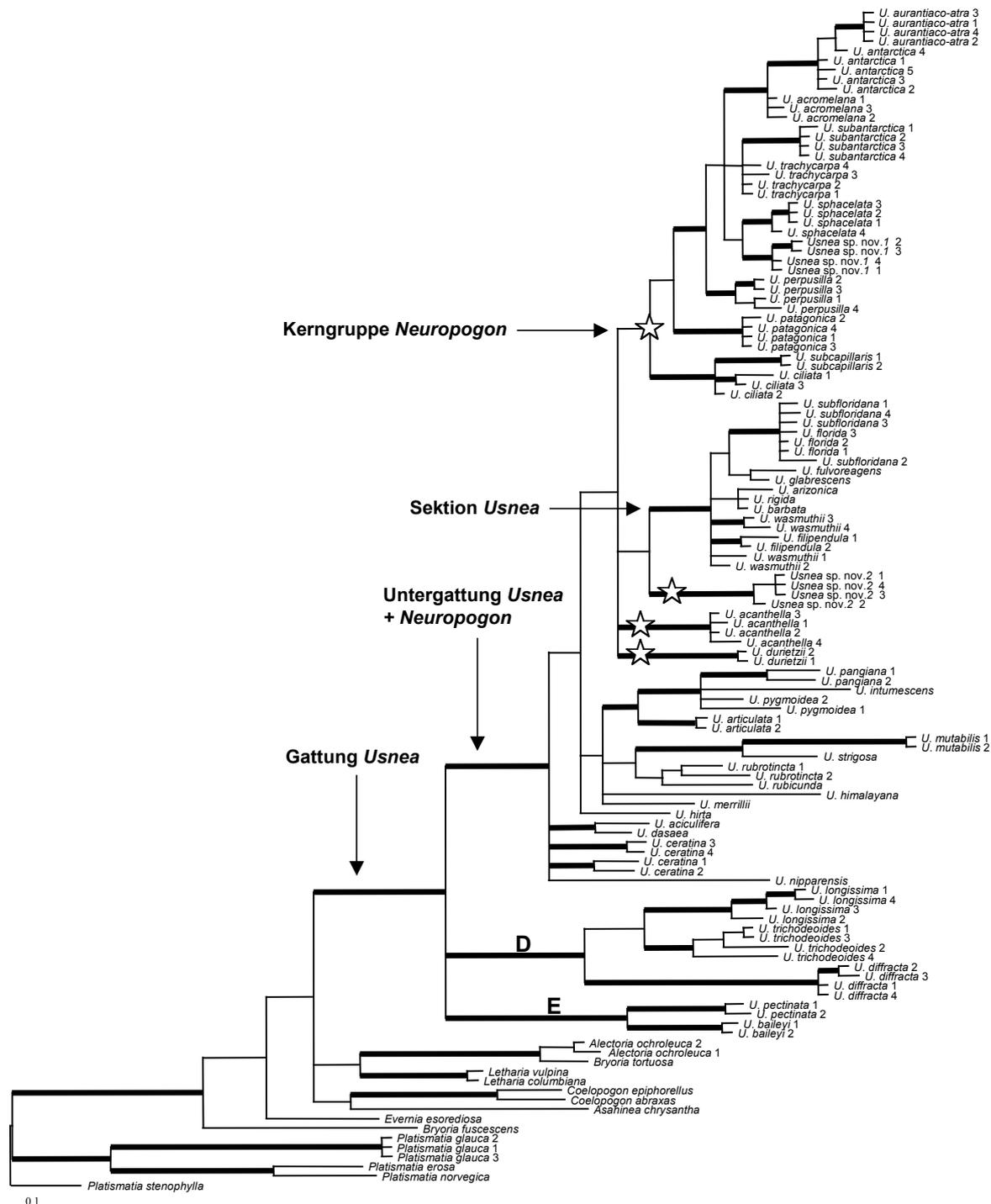


Abb. 2.4: 50%-majority-rule Konsensusbaum, beruhend auf den 18.000 Bäumen einer B/MCMC Analyse des nu ITS rDNA-Datensatzes von 124 Taxa. Posterior probabilities  $\geq 0.95$  ( $\hat{=}$  95%) sind durch fett gedruckte Äste verdeutlicht. Sterne finden sich an Ästen in denen *Neuropogon*-Arten vorkommen. D und E stehen für *Dolichousnea* und *Eumitria*.

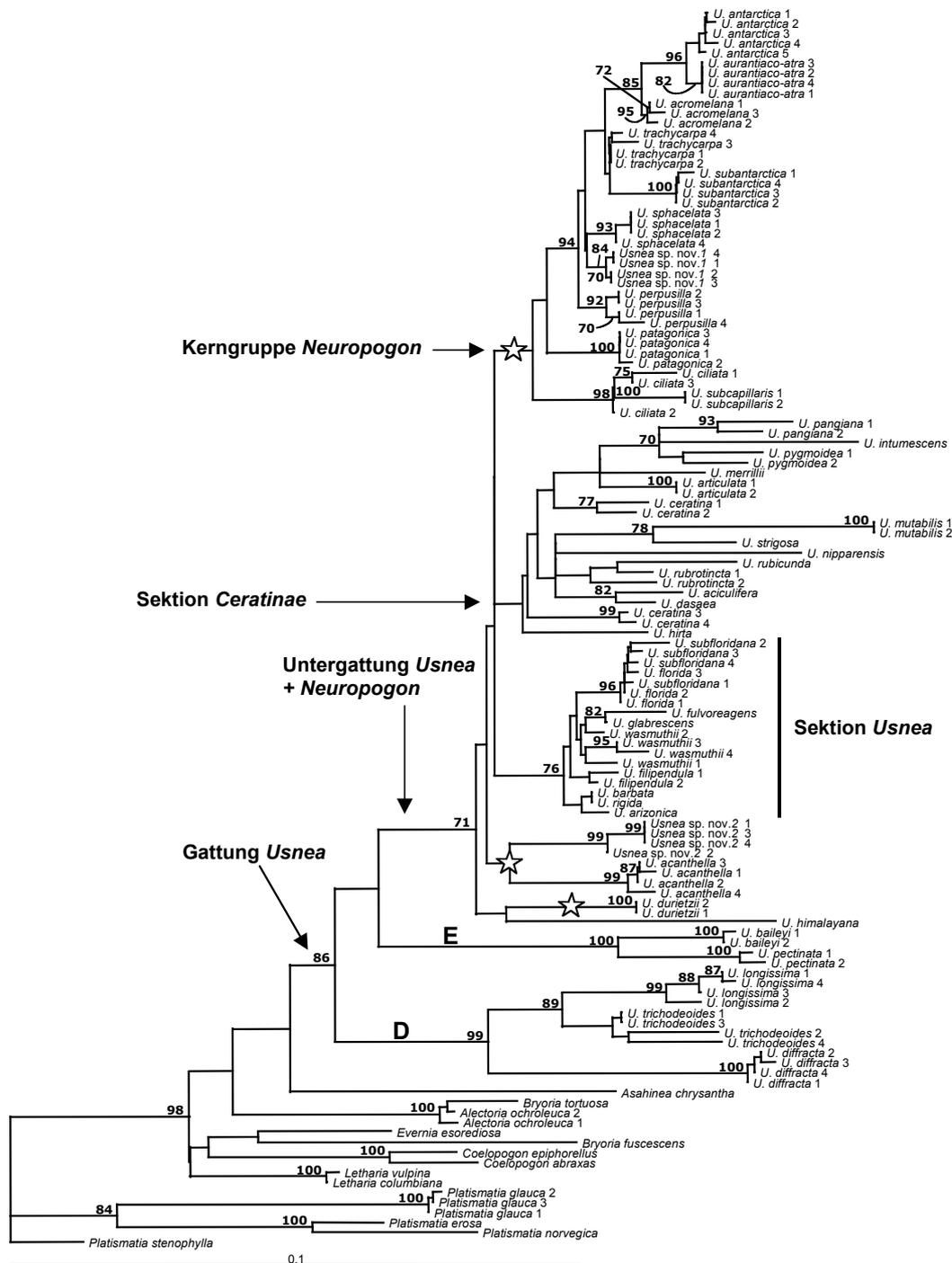


Abb. 2.5: NJ-Baum unter dem GTR+I-Substitutionsmodell beruhend auf dem nu ITS rDNA-Datensatzes von 124 Taxa. Bootstrap-Werte  $\geq 70\%$  sind für die einzelnen Äste angegeben. Sterne finden sich an Ästen in denen *Neuropogon*-Arten vorkommen. D und E stehen für *Dolichousnea* und *Eumitria*.

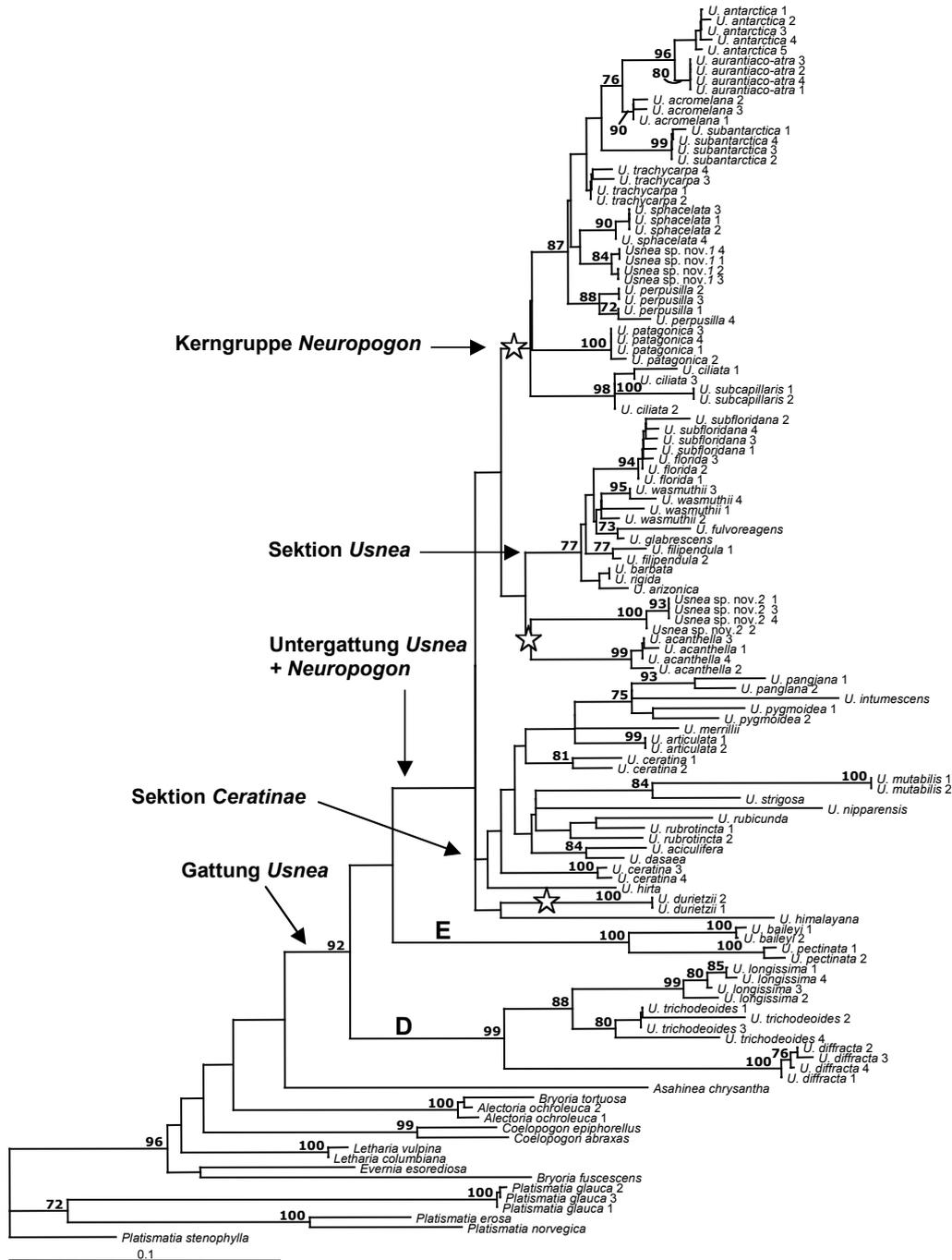


Abb. 2.6: NJ-Baum unter dem LogDet-Substitutionsmodell beruhend auf dem nu ITS rDNA-Datensatzes von 124 Taxa. Bootstrap-Werte  $\geq 70\%$  sind für die einzelnen Äste angegeben. Sterne finden sich an Ästen in denen *Neuropogon*-Arten vorkommen. D und E stehen für *Dolichousnea* und *Eumitria*.

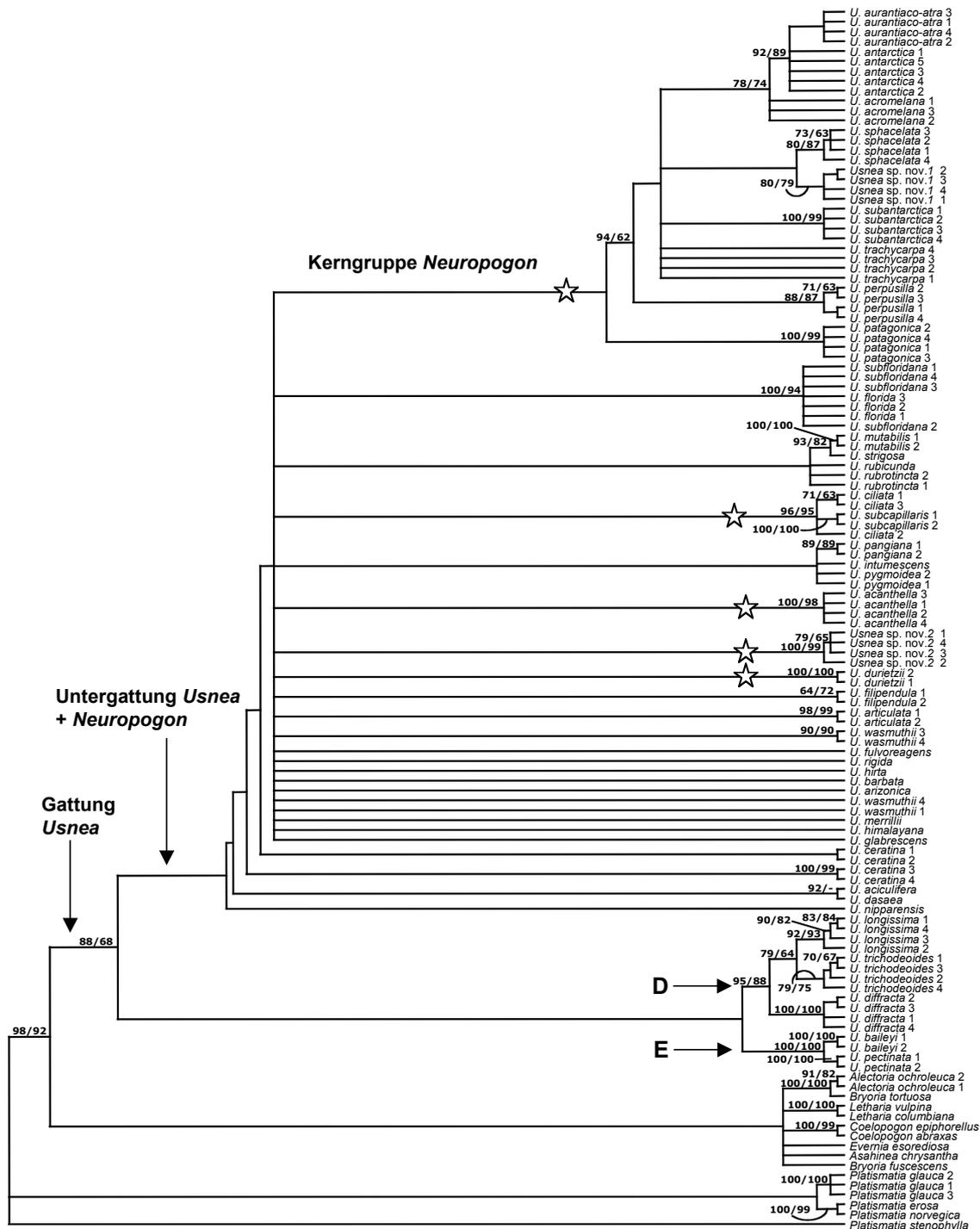


Abb. 2.7: Strikter Konsensusbaum aus 702 Bäumen einer MP-Analyse beruhend auf dem nu ITS rDNA-Datensatzes von 124 Taxa. Bootstrap-Werte (Suchkriterium: addseq/fast-step)  $\geq 70\%$  sind für die einzelnen Äste angegeben. Sterne finden sich an Ästen in denen *Neuropogon*-Arten vorkommen. D und E stehen für *Dolichousnea* und *Eumitria*.

In der *Neuropogon*-Kerngruppe sind eine Reihe von Arten paraphyletisch, z. B. steht *U. antarctica* basal zu *U. aurantiaco-atra*, *U. trachycarpa* basal zu *U. subantarctica* und *U. ciliata* basal zu *U. subcapillaris*. *U. acromelana* ist basal zu *U. antarctica*/*U. aurantiaco-atra* und bildet zusammen mit diesen eine monophyletische Gruppe (PP=1.00). Zu dieser Gruppe stehen basal die Artenpaare *U. subantarctica*/*U. trachycarpa* und *U. sphacelata*/*Usnea* sp. nov. 1. Wiederum dazu basal steht *U. perpusilla* und diese acht Arten bilden eine gut unterstützte monophyletische Gruppe (P=1.00). Die Arten *U. patagonica* und die neuseeländischen Arten *U. ciliata* und *U. subcapillaris* hängen basal an dieser Gruppe.

Die Sektion *Ceratinae* (OHMURA 2001) ist paraphyletisch und basal zur *Usnea* + *Neuropogon*-Gruppe. Die Typusart *U. ceratina* ist nicht monophyletisch und steht basal zu anderen Arten der Sektion. *U. articulata*, die bisher nicht der Sektion *Ceratinae* zugeordnet wurde, befindet sich innerhalb der Sektion, ebenfalls *U. strigosa*, die morphologisch der Sektion *Usnea* angehört. Möglicherweise handelt es sich hier um eine Fehlbestimmung des Ausgangsmaterials (Sequenz aus Genbank).

Vergleicht man den Bayes'schen Baum mit den NJ- und MP-Bäumen wird deutlich, dass die Topologien sehr ähnlich sind. Tabelle 2.2 fasst die Bootstrap-Werte und Posterior Probabilities relevanter Gruppen vergleichend zusammen.

Tab. 2.2: Übersicht über die Bootstrap-Werte ( $\geq 70\%$ ) und Posterior Probabilities ( $\geq 0.95$ ) phylogenetischer Gruppierungen innerhalb der Gattung *Usnea* in den unterschiedlich berechneten Phylogrammen.

Gruppierungen	NJ-Logdet	NJ-GTR+I	MP-heursitic	MP-faststep	MrBayes
Gattung <i>Usnea</i>	92%	86%	88%	–	1.00
Untergattung <i>Eumitria</i>	100%	100%	100%	100%	1.00
Untergattung <i>Dolichousnea</i>	99%	99%	95%	88%	1.00
Untergattungen <i>Usnea</i> + <i>Neuropogon</i>	–	71%	–	–	1.00
Untergattung <i>Neuropogon</i>	–	–	–	–	–
Sektion <i>Usnea</i>	77%	76%	–	–	1.00
Sektion <i>Ceratinae</i>	–	–	–	–	–
Kerngruppe <i>Neuropogon</i>	–	–	–	–	–

In den beiden NJ-Bäumen (Abb. 2.5 und 2.6) findet man die gleichen Großgruppen wie im MrBayes-Baum: die Gattung *Usnea*, die Untergattungen *Eumitria* und *Dolichousnea* und die Sektion *Usnea*. Eine enge Verwandtschaft der Untergattungen *Usnea* und *Neuropogon* wird neben dem MrBayes-Baum nur im NJ-GTR+I-Baum unterstützt (siehe Tab. 2.2). Wie im MrBayes-Baum ist die *Neuropogon*-Kerngruppe in beiden Fällen als solche nicht unterstützt.

Aber auch in den NJ-Bäumen zeigt sich eine Untergliederung der Gruppe, mit *U. patagonica* und den neuseeländischen Arten als basal zu einer Gruppe von acht Arten (BS=87%/94%). In beiden Bäumen erscheinen *Usnea* sp. nov. 2 und *U. acanthella* als nicht-unterstützte Schwestergruppen basal zur Sektion *Usnea*, wobei *U. durietzii* jeweils weiter entfernt mit *U. himalayana* zusammenfällt. In beiden Bäumen bildet die Sektion *Ceratinae*, mit Ausnahme von *U. himalayana*, eine monophyletische Gruppe, allerdings ohne Bootstrap-Unterstützung.

Der MP-Konsensusbaum (Abb. 2.7) zeigt eine schlechter aufgelöste Topologie, da alle schwach- oder nicht-unterstützten Verzweigungen in Polytomien zerfallen. *U. patagonica* steht basal zur restlichen *Neuropogon*-Kerngruppe (BS=94%/62%), wobei die beiden neuseeländischen Arten an einem unterstützten Ast in der Mitte der polytomen Verzweigung hängen (BS=96%/95%). Sowohl die restlichen *Neuropogon*-Arten (siehe Sterne), als auch die Arten der Sektionen *Usnea* und *Ceratinae* finden sich z. T. mit Bootstrap-Unterstützungen in dieser kammartigen, unaufgelösten Verzweigung wieder. Die Untergattungen *Eumitria* und *Dolichousnea* sind jeweils gut unterstützt. Die Bootstrap-Werte für die Gattung *Usnea* sind mäßig hoch (88%/68%) und die Untergattungen *Usnea* und *Neuropogon* haben keine gemeinsame Unterstützung.

### 2.4.3 Ergebnisse der Hypothesentests

Ausgehend von den Ergebnissen der B/MCMC-Analyse wurden zwei Nullhypothesen formuliert und in einem Ansatz nach IHLEN & EKMAN (2002) getestet. Beide Hypothesen beziehen sich auf die Klassifikation, die in einer vorhergehenden Studie von ARTICUS (2004b) vorgeschlagen wurde. Folgende Hypothesen wurden getestet:

1. Die Untergattung *Neuropogon* ist monophyletisch.
2. Die Untergattung *Usnea* ist monophyletisch.

Den Hypothesentests lagen jeweils 18.001 Bäume der B/MCMC-Analyse zugrunde. Die Ergebnisse finden sich in der nachfolgenden Tabelle.

Tab. 2.3: Ergebnis der zwei getesteten phylogenetischen Nullhypothesen.

Nullhypothese	Anzahl der unterstützten Bäume	Wahrscheinlichkeit
1. Monophylie der Untergattung <i>Neuropogon</i>	771	0,04*
2. Monophylie der Untergattung <i>Usnea</i>	2347	0,13 <sup>NS</sup>

Beide Tests basieren auf den 18.001 Bäumen einer B/MCMC-Analyse. Wahrscheinlichkeitswerte < 0,05 sind mit \* gekennzeichnet und lehnen die Nullhypothese signifikant ab; <sup>NS</sup> = nicht signifikant.

Eine Monophylie der Untergattung *Neuropogon*, so wie von ARTICUS (2004b) vorgeschlagen, kann signifikant abgelehnt werden. Nur in 771 der während der B/MCMC-Analyse gesammelten 18.001 Bäume wird eine monophyletische Stellung der Gruppe unterstützt. Eine Monophylie der Untergattung *Usnea* kann nicht abgelehnt werden.

#### 2.4.4 Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie

Abbildung 2.8/I-III A-R zeigt elektronenmikroskopische Bilder von Querschnitten durch den Kortextbereich der Thalli untersuchter *Usnea*-Arten. In Abbildung 2.8/I und II wurden zum Teil zwei Kortextaufnahmen der gleichen Art zur Illustration der Variabilität des Merkmals nebeneinander gestellt. Deutlich ist zum Beispiel bei *U. antarctica* (A+B) und *U. patagonica* (C+D) zu sehen, dass die Kortexthyphen in den jeweils linken Fotos zum Teil weitlumiger erscheinen als die Markhyphen und in den rechten Fotos stark verklebt sind. Die linken Abbildungen erinnern an den *Ceratina*- oder *Florida*-Typ mit verdickten Zellwänden und mäßig bis stark erweiterten Lumina im Kortext, während die rechten Abbildungen dem *Sphacelata*-Typ entsprechen. *Usnea* sp. nov. 2 (E+F) hat verdickte Zellwände im Kortextbereich und einförmig enge Lumina in Kortext und Mark. Die Lumina im Kortext sind verglichen mit der Zellwanddicke kleiner und die Hyphen verlaufen radial und sind deutlich verklebt. Diese Merkmale sind typisch für den *Sphacelata*-Typ. *U. acanthella* zeigt ein ähnliches Bild (G+H): die Zellwände der Kortexthyphen sind stark verdickt und verklebt und die Lumina klein. *U. durietzii* (I) zeigt eine starke Konglutinierung der Kortexthyphen. *U. perpusilla* (J), eine Art aus der *Neuropogon*-Kerngruppe, hat leicht erweiterte Zelllumina im Kortext mit verdickten Wänden, was dem *Ceratina*-Typ nahe kommt. *Usnea* sp. nov. 1 (K) ist vom Aufbau her sehr ähnlich zu *U. perpusilla*. Die Kortexthyphen haben leicht erweiterte Zelllumina und stark verdickte und verklebte Zellwände. Ähnliches trifft auf die neuseeländische Art *U. ciliata* (L) zu. *U. subcapillaris* (M) hat verdickte Zellwände und kleine Zelllumina, aber voneinander separierte Hyphen, die nicht so stark verklebt zu sein scheinen, ähnlich dem *Merrillii*-Typ.

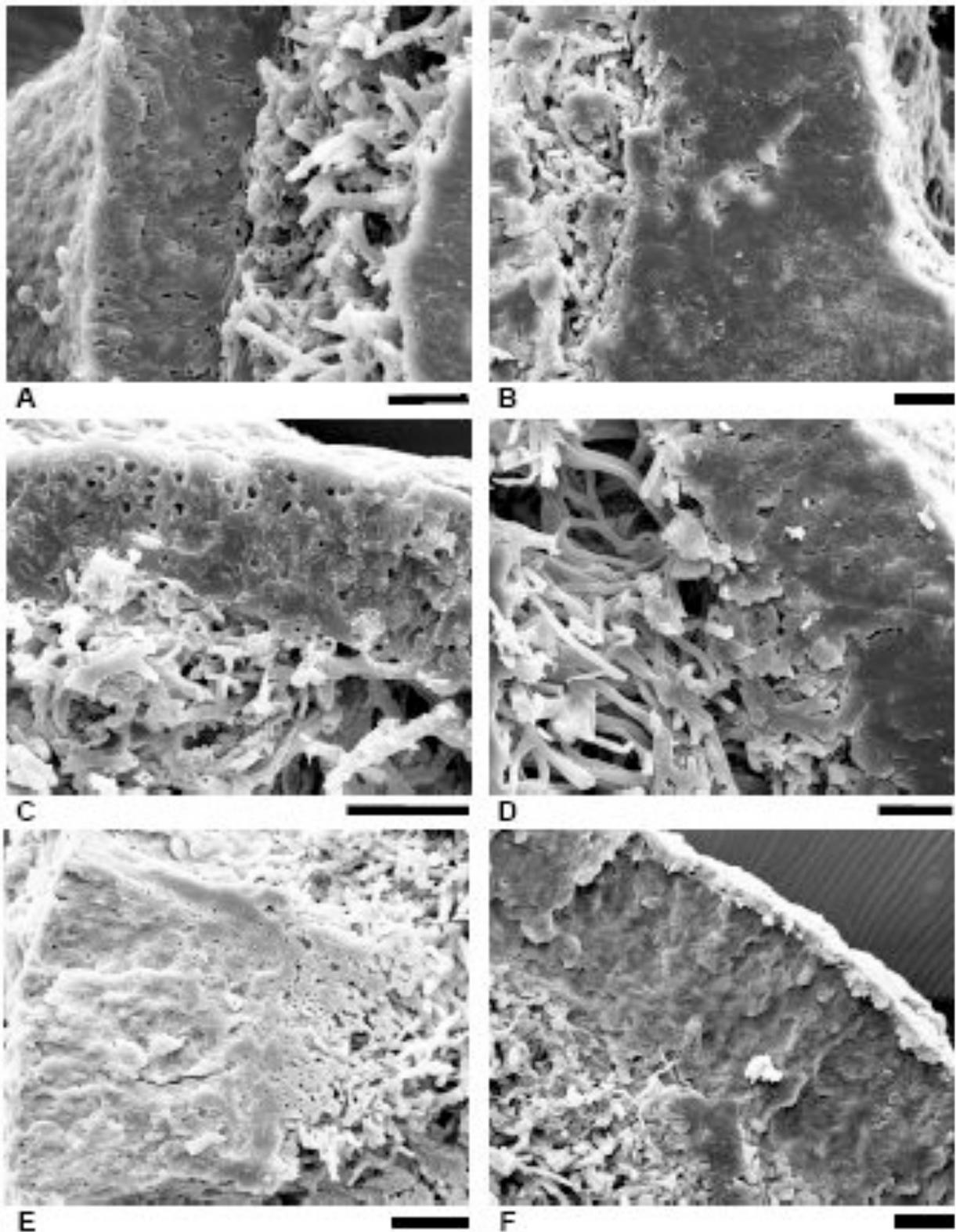


Abb. 2.8/I: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Thallusquerschnitten durch Kortex und Mark zur Untersuchung der Kortexstruktur. A+B, *U. antarctica*; C+D, *U. patagonica*; E+F, *Usnea* sp. nov. 2. Skalierung = 20 $\mu$ m.

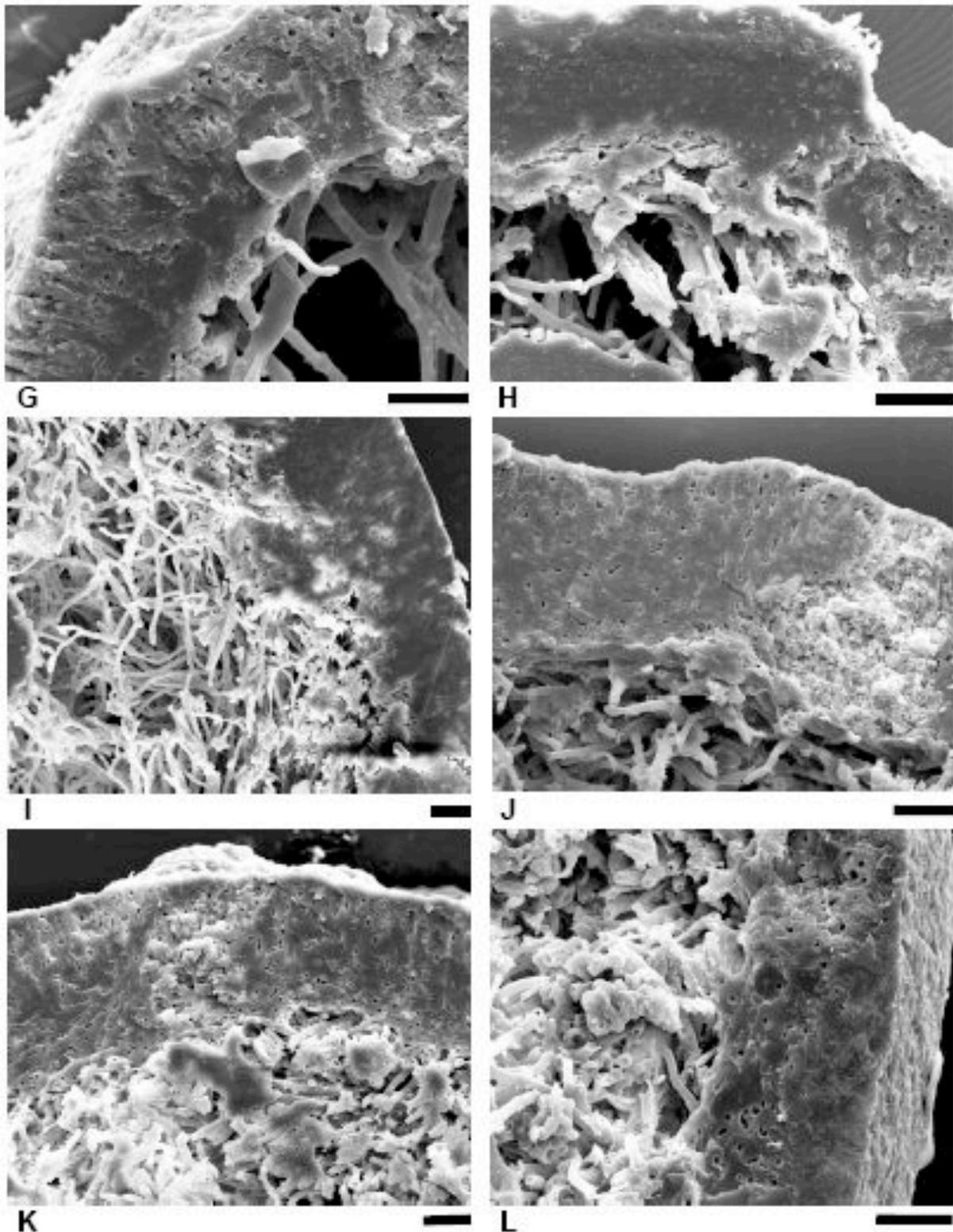


Abb. 2.8/II: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Thallusquerschnitten durch Kortex und Mark zur Untersuchung der Kortexstruktur. G+H, *U. acanthella*; I, *U. durietzii*; J, *U. perpusilla*; K, *Usnea* sp. nov. 1; L, *U. ciliata*. Skalierung = 20 $\mu$ m.

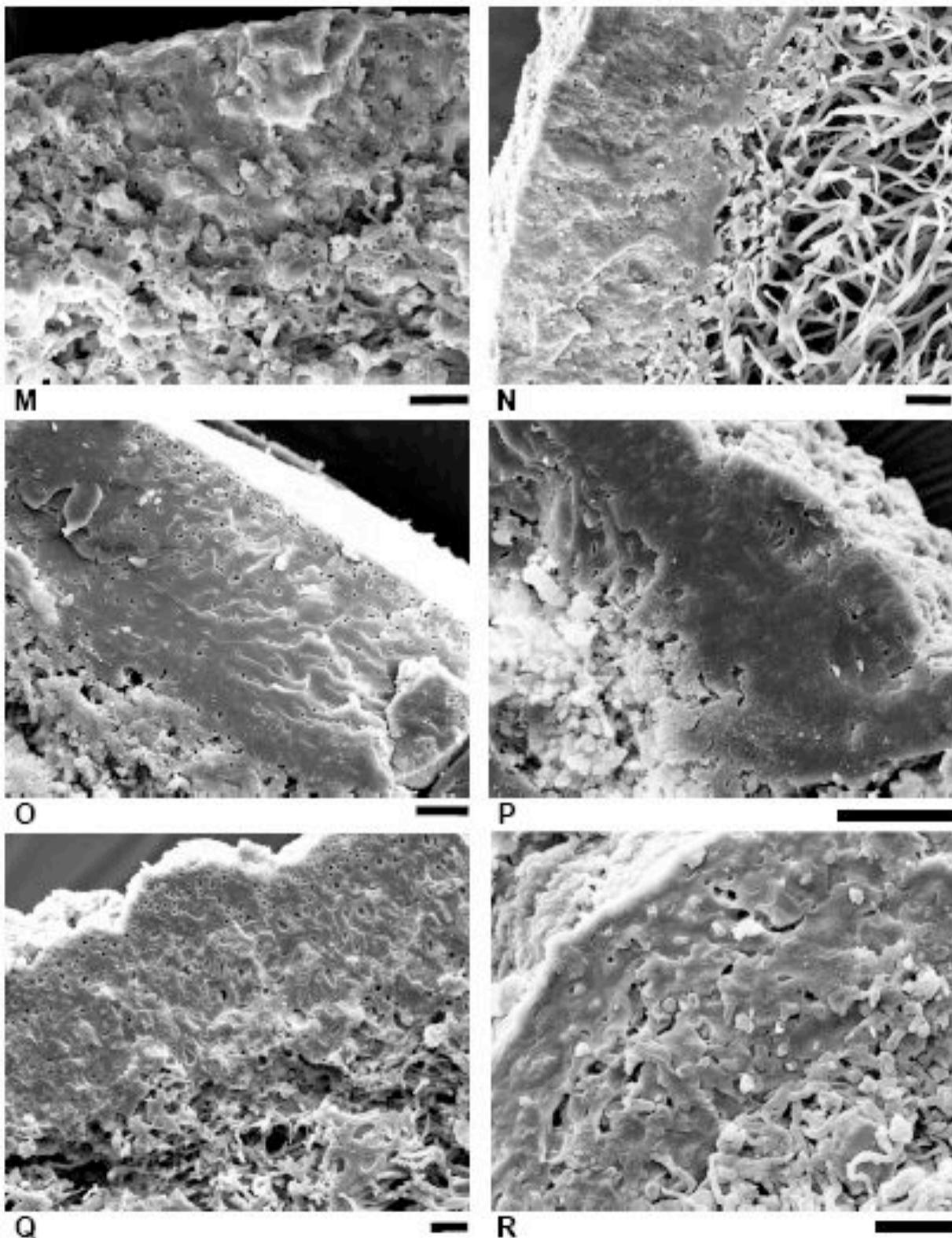


Abb. 2.8/III: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Thallusquerschnitten durch Kortex und Mark zur Untersuchung der Kortexstruktur. M, *U. subcapillaris*; N, *U. longissima* (Merrillii-Typ); O, *U. ceratina* (Ceratina-Typ); P, *U. baileyi* (Baileyi-Typ); Q, *U. florida* und R, *U. strigosa* (Florida-Typ). Skalierung = 20 $\mu$ m.

Zum Vergleich sind Aufnahmen von den jeweiligen Kortextypen-Vertretern aus anderen *Usnea*-Gruppen angefügt (Abb. 2.8/III: N-R). *U. longissima* (N) (*Merrillii*-Typ) hat keine offensichtlich locker-verklebten Kortexhyphen. *U. ceratina* (O) (*Ceratina*-Typ) hat verdickte Zellwände und vergrößerte Lumina, wie von OHMURA (2001) beschrieben (Abb. 2.2: G), allerdings scheinen die Zelllumina nicht so stark vergrößert, aber die Hyphenwände sehr stark verdickt und verklebt. Die *Baileyi*-Typ-Beschreibung von OHMURA (2001) (Abb. 2.2: H) weicht von der mir untersuchten *U. baileyi*-Probe (P) ab. Die Kortexhyphen sind dickwandiger als die Markhyphen und zudem stark konglutiniert. Die kortikalen Zellwände von *U. florida* (Q) erscheinen dünnwandiger als bei anderen Arten, allerdings ist unklar, ob die Lumina größer als der Durchmesser der Zellwanddicke sind. Die Hyphen sind weniger stark verklebt. Im Falle von *U. strigosa* (R) (*Florida*-Typ) sind die Kortexhyphen dicker als die Markhyphen und haben größere Lumen. Die Verklebung der Hyphen ist weniger stark ausgeprägt.

Es wird deutlich, dass sowohl eine Variabilität der Kortexstruktur innerhalb von Arten auftritt, als auch in den beschriebenen Kortextypen und ihren zugeschriebenen Vertretern. Zum Teil ist das Erkennen und die Deutung der Strukturen schwierig, weil die Kortexhyphen stark verklebt erscheinen.

## 2.5 Diskussion

Die durchgeführte phylogenetische Untersuchung hatte zum Ziel, die Stellung der *Neuropogon*-Gruppe innerhalb der Gattung *Usnea* und damit das bestehende Gattungskonzept zu überprüfen. Dabei wurde eine möglichst große Anzahl von Arten berücksichtigt. Zum ersten Mal wurden Arten, die von WALKER (1985) als *Neuropogon* s. lat. bezeichnet wurden, molekular analysiert und die Datensätze vorangegangener Studien (ARTICUS 2004b, OHMURA & KANDA 2004) erheblich erweitert, unter anderem durch die Typusart von *Neuropogon*, *U. aurantiaco-atra*. Die Analysen konnten zeigen, dass *Neuropogon* keine monophyletische Gruppe ist, sondern in vier separierte Gruppen zerfällt. Diese Tatsache legt eine genaue Untersuchung und Reinterpretation der Gruppencharakteristika nahe.

### 2.5.1 Revision der *Neuropogon*-Gruppe: Merkmale und phylogenetische Stellung

WALKER (1985) und auch ARTICUS (2004b) weisen in ihren Studien die dunkle Pigmentierung des Thallus sowie dunkle Apothecienscheiben der *Neuropogon*-Taxa als Hauptunterscheidungsmerkmal zu den anderen *Usnea*-Arten aus. OHMURA & KANDA (2004) halten die schwarze Pigmentierung des oberen Thallus für ein eher vages Merkmal, da sie in begrenztem Maße auch bei *U. longissima* (*Dolichousnea*) und *U. pectinata* (*Eumitria*) auftreten kann, allerdings nicht in der *Usnea* subg. *Usnea*-Gruppe. KROG (1976) weist auf dunkelbraun pigmentierte Apothecienscheiben auch bei Vertretern der Untergattung *Dolichousnea* hin, z. B. bei *U. diffracta* und *U. trichodeoides*. Außerdem deutet WALKER (1985) in ihrer Monographie an, dass dunkle Thalluspigmentierungen möglicherweise auf eine standortbedingte Anpassung an raues Klima schließen lassen und eine mehrfach unabhängige Entwicklung nicht ausgeschlossen sei. Tatsächlich ist die schwarze Pigmentierung des Thallus ein häufiges Merkmal bei Flechten in großen Höhenlagen, unter starker Sonneneinstrahlung und in Polarregionen. Sie wird als Schutzmechanismus für den Photobionten vor zu großer Strahlung und Abschilferung des Thallus durch Wind gedeutet und trägt zur Erhöhung der Wärmeabsorption und somit zur schnelleren Schneeschmelze bei (KAPPEN 1993, MARSHALL 1996a). Eine direkte Abhängigkeit von dunkler Pigmentierung und exponiertem Standort konnte in antarktischen und patagonischen Populationen häufig beobachtet werden (ØVSTEDAL & LEWIS SMITH 2001, eigene Beobachtungen).

Eine neue Art (siehe Abb. 2.4 – 2.7: *Usnea* sp. nov. 1), die bei Aufsammlungen in Patagonien gefunden wurde, und der *Neuropogon*-Gruppe zugeordnet werden kann, da sie starke

Affinitäten zu *U. perpusilla* aufweist, hat zudem blass-gelbliche Apothecien (siehe Abb. 2.9). Die Apothecienfarbe dieser Art in Verbindung mit der Stellung in den phylogenetischen Bäumen zeigt, dass nicht ausschließlich dunkel pigmentierte Apothecienscheiben bei *Neuropogon* vorkommen. Die schwarze Pigmentierung von Thallus und Apothecien, die traditionell als Merkmal zur Abgrenzung der *Neuropogon*-Gruppe von *Usnea* benutzt wurde, sollte daher eher als Anpassungserscheinung an raue Umweltbedingungen in antarktischen, arktischen und Andenregionen denn als Gruppenmerkmal bewertet werden. Die phylogenetische Analyse legt nahe, dass sich diese Umweltanpassung an sonnen- und windexponierte Standorte mehrmals unabhängig in der Gattung *Usnea* subg. *Usnea* entwickelt hat.

WALKER (1985) selbst geht auf die Schwierigkeit einer Abgrenzung *Neuropogons* von *Usnea* subg. *Usnea* ein. Sie weist darauf hin, dass Thalluspigmentierung und steiniges Substrat als Hauptkriterien einer Abtrennung *Neuropogons* von *Usnea* nicht ausreichen, besonders wenn südamerikanische Arten miteinbezogen werden, und benennt einige dieser Arten, die eine Zwischenstellung zwischen den beiden Gruppen einnehmen: *U. acanthella*, *U. durietzii* und *U. patagonica* (*Neuropogon* s. lat.). Alle drei Arten zeigen eine variable bis sehr geringe Pigmentierung und *U. acanthella* ist weniger substratspezifisch. Zudem verändern *U. acanthella* und *U. durietzii* nach mehrjähriger Herbariumlagerung ihre Thallusfarbe nicht, was im Gegensatz zu den *Neuropogon* s. str.-Arten steht, die eine strohfarbene Färbung annehmen. *U. patagonica* kann trotz geringer Pigmentierung aufgrund der molekularen Bäume zur Kerngruppe *Neuropogon* gezählt werden. Die beiden erstgenannten Arten werden jedoch in ihrer Zwischenstellung bestätigt, da sie innerhalb der *Usnea* subg. *Usnea*-Gruppe stehen. Hinzu kommt eine neue Art aus Peru (*Usnea* sp. nov. 2, Abb. 2.4 – 2.7), die auf Stein vorkommt und eine dunkle Pigmentierung des Thallus aufweist (Abb. 2.10), aber in den phylogenetischen Bäumen auch innerhalb *Usnea* subg. *Usnea* fällt.

Im Folgenden werden weitere morphologische Merkmale erwähnt und beurteilt, die jüngst zur Charakterisierung der *Neuropogon*-Gruppe herangezogen wurden (ARTICUS 2004b), diese jedoch unter Berücksichtigung der molekularen Bäume (Abb. 2.4 – 2.7) nicht von der Untergattung *Usnea* abtrennen. Eine solider Zentralstrang und aufrechte Thalli mit anisotom-dichotomer Verzweigung, wie von ARTICUS (2004b) als eindeutige *Neuropogon*-Merkmale gewertet, finden sich auch häufig bei *Usnea* Sektion *Usnea*-Arten.

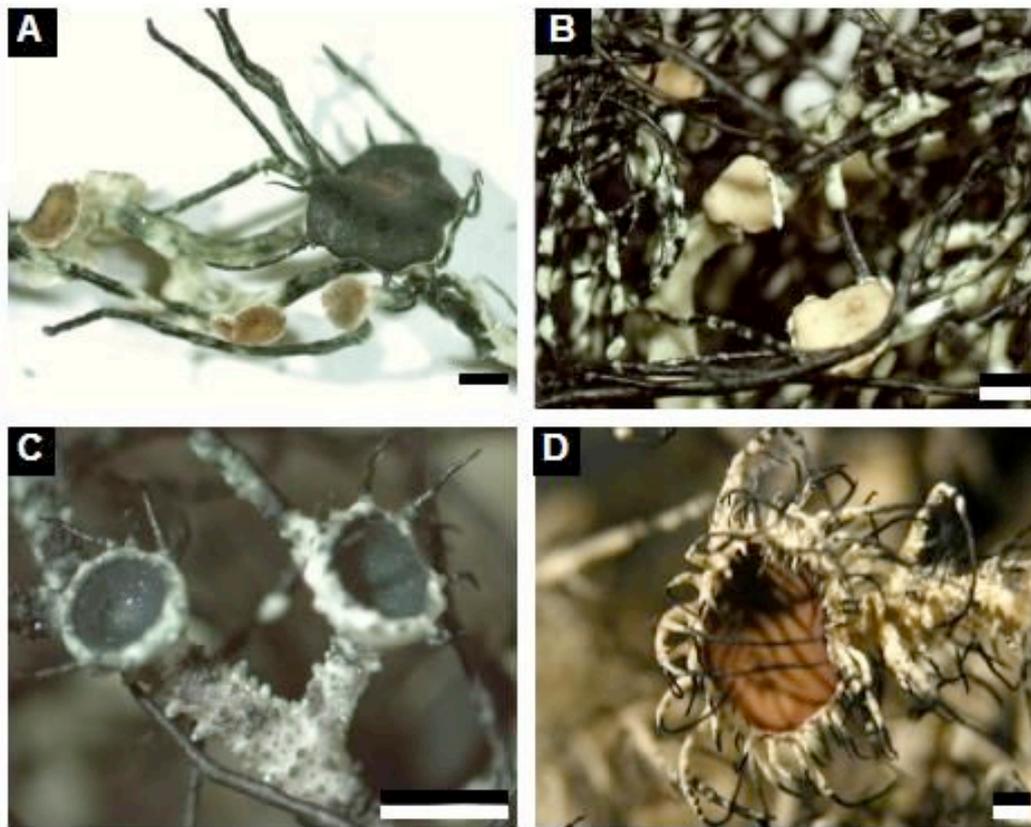


Abb. 2.9: Apothecien von vier *Neuropogon*-Arten: A, *U. perpusilla*; B, *Usnea* sp. nov 1; C, *U. aurantiaco-atra*; D, *U. trachycarpa*.



Abb. 2.10: Habitus von *Usnea* sp. nov. 2 aus Peru.

Wie schon erwähnt, ist die schwarze Thalluspigmentierung in der *Neuropogon*-Kerngruppe nicht durchgängig stark ausgeprägt (*U. patagonica*) und auch in drei Arten vorhanden, die molekular in die Sektion *Usnea* fallen: *U. acanthella*, *U. durietzii* und *Usnea* sp. nov. 2. Neben hauptsächlich braunen bis schwarzen Apothecienscheiben in der *Neuropogon*-Kerngruppe (Abb. 2.9: A, C, D) hat *Usnea* sp. nov. 1 hellgelbe Apothecienscheiben (Abb. 2.9: B), so dass auch hier Variabilität innerhalb der *Neuropogon*-Gruppe zu finden ist.

Der Kortextyp bei *Neuropogon* wurde von OHMURA & KANDA (2004) als *Sphacelata*-Typ, mit pachydermatösen, stark verklebten Hyphen und verdickten Kortext-Zellwänden beschrieben. Sie finden in ihrer Studie diesen Typus bei allen untersuchten *Neuropogon*-Arten, unter anderem bei *U. durietzii*, die aus der *Neuropogon*-Kerngruppe herausfällt. In der vorliegenden Studie kann die gleiche Art von Kortextyp auch für *U. acanthella* und die unbeschriebene Art aus Peru (*Usnea* sp. nov. 2) bestätigt werden (Abb. 2.8/I: E, F). Fasst man diese Ergebnisse zusammen, zeigt sich, dass es keine durchgängigen morphologischen Kriterien gibt, die eine Abgrenzung der *Neuropogon*-Gruppe unterstützen. Auch eine alternative Klassifikation, das Beschränken von *Neuropogon* auf die Kerngruppe, welche in den molekularen Bäumen allerdings nicht sehr hoch unterstützt ist, ist aus oben genanntem Grunde abzulehnen. Ein Taxon *Neuropogon* hätte keine synapomorphen Merkmale. Daher wird hier vorgeschlagen diesen Namen, der auf Untergattungsniveau (Walker 1985), Gattungsebene (ARTICUS 2004b) oder Sektionsniveau (OHMURA & KANDA 2004) verwendet wurde, als Synonym von *Usnea* aufzufassen. Der Begriff *Neuropogon* sollte im taxonomischen Sinne nicht benutzt werden, da er weder eine monophyletische Gruppe, noch eine morphologisch zu charakterisierende Gruppe von Arten beschreibt. Zudem lehnt der Hypothesentest die Nullhypothese einer Monophylie *Neuropogons* signifikant ab.

Wie die phylogenetischen Analysen zeigen konnten, sind einige der Arten innerhalb der Kerngruppe *Neuropogon* nicht unterstützt und stehen in unaufgelösten, paraphyletischen Beziehungen zu nah verwandten Arten. Besonders die Verwandtschaft zwischen *U. aurantiaco-atra*, *U. antarctica* und *U. acromelana* und auch die Stellung und Artabgrenzung im Falle von *U. trachycarpa* sind unklar. Weiterhin lassen sich mit dem vorhandenen ITS-Datensatz die neuseeländischen Arten, *U. ciliata* und *U. subcapillaris*, nicht eindeutig voneinander trennen. Es wird deutlich, dass zusätzliche Individuen untersucht werden müssen und möglichst auch weitere Genfragmente analysiert werden sollten, um Schlussfolgerungen

auf Artebene treffen zu können. Dieser Ansatz wird in Kapitel 3 vertieft und daher hier nicht weiter ausgeführt.

### 2.5.2 Phylogenie der Gattung *Usnea*

Die Monophylie der gesamten Gattung *Usnea* wird in der molekularen Analyse signifikant unterstützt und durch synapomorphe Merkmale, wie Fruchtkörperanatomie, Zentralstrang und Vorhandensein von Usninsäure im Kortex bestätigt. Die Stellung der Untergattungen *Dolichousnea*, *Eumitria* und *Usnea* zueinander kann nicht aufgelöst werden. Die *Neuropogon*-Gruppe ist polyphyletisch und fällt innerhalb die Untergattung *Usnea*. Folglich werden hier alle *Neuropogon*-Arten zur Untergattung *Usnea* gezählt. Die Einteilung der Untergattung *Usnea* in Sektionen ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Vor allem in den MP-Analysen zerfällt die Untergattung fast vollständig in kleine Splittergruppen und einzelne Arten. Eine Abgrenzung der Sektion *Ceratinae* (OHMURA 2001) kann wie in vorherigen molekularen Studien (OHMURA 2002, OHMURA & KANDA 2004, ARTICUS 2004b) nicht bestätigt werden. Aufgrund der fehlenden Unterstützung in tieferen Ästen innerhalb der Untergattung *Usnea*, vielen Splittergruppen in allen phylogenetischen Analysen, morphologischer Variabilität aber Überschneidungen in den Hauptmerkmalen, wie Fruchtkörperanatomie, Achsenaufbau und Jodreaktion, Kortextyp, Pigmentierung der Thallusbasis, des Thallus und der Apothecienscheiben (siehe OHMURA & KANDA 2004) wird davon abgeraten zum jetzigen Zeitpunkt Untergliederungen innerhalb der Untergattung *Usnea* vorzunehmen. Die mangelnde Unterstützung der tieferen Verzweigungen in den Phylogrammen lässt darauf schließen, dass die ITS-Region allein nicht ausreicht, um eindeutige Aussagen über die Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen *Usnea*-Gruppen zueinander zu machen. Weitere molekulare und morphologische Daten müssen erhoben werden und vor allem weitere Arten dieser großen Gattung sollten untersucht werden, um die taxonomische Untergliederung näher zu überprüfen.

*Dolichousnea* und *Eumitria* sind in allen Analysen gut unterstützte monophyletische Gruppen (siehe Tab. 2.2). Im Folgenden werden kurz die Charakteristika der drei Untergattungen genannt (nach OHMURA & KANDA 2004). Die charakteristischen Merkmale von *Dolichousnea* sind ringförmige Pseudocyphellen, ein im Vergleich dickes Hypothecium ( $\varnothing$  132  $\mu$ m), eine Jodreaktion des soliden Zentralstranges und ein Kortex vom *Merrillii*-Typ (siehe Abb. 2.2: B, F). *Eumitria* dagegen zeichnet sich durch ein dünneres Hypothecium ( $\varnothing$  65  $\mu$ m), einen hohlen Zentralstrang mit variabler Jodreaktion und einen *Baileyi*- oder

*Merrillii*-Kortextyp aus (siehe Abb. 2.2: D, H, B, F). Vertreter der Untergattung *Usnea* haben das dünnste Hypothecium ( $\varnothing$  42-53  $\mu\text{m}$ ), einen soliden Zentralstrang ohne Jodfärbung, oft eine dunkel pigmentierte Thallusbasis und einen variierenden Kortexaufbau [*Sphacelata*-, *Florida*-, *Ceratina*- oder *Merrillii*-Typ (siehe Abb. 2.2)], wobei Arten der Sektion *Usnea* einen besonders dünnen Kortex mit weiten Zelllumen haben. Die Unterscheidung der Untergattungen *Eumitria*, *Dolichousnea* und *Usnea* beruht hauptsächlich auf vegetativen Merkmalen, mit Ausnahme der Hypotheciumhöhe, die allerdings innerhalb der Untergattungen überlappt (siehe OHMURA 2001, 2002, OHMURA & KANDA 2004). Auch die meisten der vegetativen Merkmale sind variabel innerhalb der Gruppen, so findet sich z. B. das charakteristische Merkmal der Untergattung *Eumitria* „hohler Zentralstrang“ nicht bei allen Arten dieser Gruppe (z. B. nicht bei der molekular untersuchten Art *U. pectinata*) (OHMURA 2001, 2002).

Die Variabilität vegetativer Merkmale, besonders des Kortextyp innerhalb der Untergattung *Usnea* ist relativ groß. Für die vorliegende Arbeit wurden die Kortextypen aller *Neuropogon*-Arten und jeweils auch von Vertretern der anderen Untergattungen untersucht und variable Ausprägungen des Kortex festgestellt. Je nach Alter des Individuums einer Art und untersuchtem Astumfang, konnten deutliche Unterschiede in Lumenweite und Grad der Verklebung der Hyphen bzw. im Verhältnis von Kortex- und Markhyphen festgestellt werden (Abb. 2.8 I–III). Die Zuweisung eines Kortextyps zu ein und demselben Individuum war in diesen Fällen keineswegs einheitlich. Vor allem aber waren die von OHMURA (2001) und OHMURA & KANDA (2004) beschriebenen Unterscheidungskriterien oft schlecht erkennbar und erschienen daher z. T. etwas willkürlich. Die Qualität dieses vegetativen Merkmals ist schwer zu beurteilen und bedarf möglicherweise weiterer Untersuchungen an weiteren Individuen. Bei ARTICUS (2004b) spielen die Kortextypen eine eher untergeordnete Rolle und dienen als zusätzliche Information aber nicht als Hauptmerkmal.

Eine Abspaltung von *Dolichousnea*, *Eumitria* und *Neuropogon* (ARTICUS 2004b) wird hier nicht unterstützt. Allgemein sollten schlecht unterstützte Gruppen nicht neu benannt werden, insbesondere, wenn dadurch allgemein anerkannte Taxa automatisch paraphyletisch werden, das Sampling klein ist und Typenmaterial nicht untersucht werden konnte. Auch wenn es zur taxonomischen Praxis gehört paraphyletische Gruppen als basale Gruppen bis auf weiteres zu akzeptieren und weitere Untersuchungen an diesen Gruppen abzuwarten, ist es ein unnötiger Nachteil für alle Interessierten, besonders Sammler und Kuratoren, paraphyletische Gruppen

in monophyletischen, gut unterstützten und einfach zu erkennenden Taxa zu produzieren. Ergebnisse phylogenetischer Analysen sollten mit großer Vorsicht und unter genauer Abwägung der Auswirkungen in Klassifikationen eingearbeitet werden (WEDIN & WIKLUND 2004). Die Erhebung monophyletischer Gruppen auf Gattungsebene sollte in erster Linie zum Ziel haben eine zunehmend „natürliche“ Klassifikation von Organismen zu erreichen, und der Informationsgehalt neuer Gattungstrennungen sollte dabei beachtet werden (NIMIS 1998). NIMIS (1998) stellt 5 Kriterien zur kritischen Überprüfung von Gattungsbenennungen auf und weist deutlich darauf hin, den Rang der Untergattung zu wählen, wenn eine enge Verwandtschaft zwischen den zu trennenden Taxa vorliegt und die Taxonomie einer Gruppe noch nicht feststeht. Systematiker sollten vor einer Namensänderung sicher sein dass: 1) die meisten Arten der alten Gattung berücksichtigt wurden, 2) die neuen Gattungen durch wirklich deutliche Merkmale voneinander unterschieden sind, 3) die neuen Gattungen monophyletisch sind, 4) die phylogenetische Distanz zwischen den neuen Gattungen groß genug ist und 5) der Informationsgehalt der neu geschaffenen Aufspaltung hoch ist. Mit Rücksicht auf diese Regeln werden ein Verlust an Gattungsinformation und unnötige meist provisorische Namensänderungen verhindert (NIMIS 1998).

### 3. Artabgrenzung und Phylogeographie innerhalb der *Neuropogon*-Gruppe

#### 3.1 Artkonzepte in der Systematik

Die Frage „Was ist eine Art?“ ist eine der entscheidendsten Fragen in der systematischen Biologie (CRACRAFT 2002). Es gibt eine unüberschaubare Anzahl von Ansichten, Meinungen und Literatur zum Thema Artkonzepte, Artbildungstheorien und Methoden phylogenetischer Analyse, da Arten die elementaren Einheiten in vielen biologischen Wissensgebieten sind. Die meisten Artkonzepte sind sich ähnlich und Streitpunkte ergeben sich häufig aus unterschiedlichen Terminologien (CRACRAFT 2000). Arten werden in allen Konzepten als Abstammungslinien angesehen deren Diversifikation Systematiker auf unterschiedliche Weise zu erläutern suchen (CRACRAFT 2000). DE QUEIROZ (1998) vertritt die Meinung, dass alle modernen Artkonzepte Arten mehr oder weniger offensichtlich als Teile evolutionärer Abstammungslinien auf Populationsebene begreifen und in einem einzigen, allgemeinen Artkonzept zusammengefasst werden können. Er nennt dieses Konzept „Konzept der allgemeingültigen Abstammungslinien“ (general lineage concept, GLC). Auch wenn der Artbildungsprozess im Regelfall schwer einschätzbar bleibt, erlaubt das GLC unabhängig davon Artgrenzen von unterschiedlichen philosophischen Perspektiven aus zu überprüfen. Hierzu benötigen Wissenschaftler klar definierte Kriterien und Regeln, mit denen Individuen auf ihre Artzugehörigkeit hin überprüft werden können (SITES & MARSHALL 2004). Die anwendungsbezogene phylogenetische Artabgrenzung anhand molekularer Daten wird ausführlicher in Kapitel 3A-1.2 diskutiert. Im Folgenden sollen die gängigsten Artkonzepte und die maßgebliche Kritik an ihnen kurz vorgestellt werden.

#### *Das Typologische, Phänotypische oder Morphologische Artkonzept:*

Zusammengefasst zu einem historischen Artkonzept werden hier drei Konzepte, die alle auf phänotypischen Merkmalen aufbauen. Sie dienten vor allem in vor-darwinistischer Zeit, vornehmlich zur taxonomischen Erfassung und Eingliederung der reichen Form- und Artenfülle. Z. T. gründeten sie auf kreationistischen Vorstellungen. Die wichtigsten Kriterien zur Artbeschreibung waren phänotypische, meist morphologische Merkmale. Dabei wurde das Phänomen der morphologischen Variabilität innerhalb von Arten nur unzureichend oder gar nicht berücksichtigt. Häufig wurden Morphotypen ein und derselben Art als neue Arten beschrieben, z. B. bei geschlechts-dimorphen Tieren, wodurch viele Synonyme entstanden. Eine Art galt demnach als unveränderliche monomorphe Einheit, die auf einem

morphologischen Plan beruhte und sich durch konstante diagnostische Unterschiede von anderen Arten abgrenzte. Die diagnostischen Unterschiede waren subjektiv (MAYR 2000).

*Das Biologische Artkonzept (BSC) nach MAYR (1942, 1963, 2000):*

MAYR (1963) versteht unter einer Art eine Gruppe von sich tatsächlich oder potenziell miteinander fortpflanzenden natürlichen Populationen, die von anderen solchen Gruppen fortpflanzungstechnisch isoliert ist. Er erweitert dieses Konzept durch folgende Punkte: Eine biologische Art ist demnach eine geschlossene Fortpflanzungsgemeinschaft von Populationen. Die Betonung liegt hierbei auf der genetischen Verwandtschaft dieser Gruppe und nicht so sehr auf dem Grad der morphologischen Unterscheidung von anderen Gruppen. Es geht um Populationen und nicht um einzelne Individuen, was beinhaltet, dass Hybridisierung einzelner Individuen möglich ist und den Artstatus nicht gefährdet. Auch werden Populationen in die Artbeschreibung eingeschlossen, die möglicherweise räumlich oder zeitlich isoliert sind, aber den Drang und die Möglichkeit zur Fortpflanzung mit anderen Populationen der gleichen Gruppe haben, falls die äußeren Isolationsschranken aufgehoben werden (MAYR 2000). Die Erweiterungen sind auf empirische Erkenntnisse zurückzuführen, die Individuen einer Population z. T. mit stärkeren phänotypischen Differenzen zeigen als „guten Arten“ zugeschrieben werden und im Gegensatz dazu immer mehr phänotypisch gleiche kryptische Arten gefunden werden (MAYR 2000).

Kritik an dem BSC wird von vielen Autoren geäußert. TEMPLETON (1989) kritisiert, dass die Abgrenzung asexueller Arten nicht testbar und der Prozess der Artbildung irreführend ist. Ebenso werden Hybriden nicht beachtet (WHITTEMORE 1993), zumindest in der ursprünglichen Version. Und die Perspektive auf die Arten ist nicht geschichtlich (DONOGHUE 1985), d.h. nur der Istzustand wird in Betracht gezogen. VOGLER & DESALLE (1994) merken kritisch an, dass die Unterscheidung von Arten tatsächlich zumeist nicht auf der Feststellung von Fortpflanzungsschranken, sondern auf morphologischen Unterschieden beruht, was inkonsistent mit den Grundlagen des Konzepts ist, da die angewandten Kriterien nicht mit der Theorie übereinstimmen.

*Das Evolutionäre Artkonzept nach WILEY (1978):*

Nach WILEY (1978) ist eine evolutionäre Art eine Abstammungslinie oder Einheit, die aus Organismen besteht, die ihre Identität (= biologisch abgetrennte Einheit) durch andere Einheiten von Organismen in Zeit und Raum erhält. Eine evolutionäre Art hat ihr eigenes, unabhängiges Schicksal und ihre eigenen historischen Tendenzen (= historische Einheit

bestehend aus Entstehung – Entwicklung – Aussterben) (WILEY & MAYDEN 2000). In diesem Konzept wird die Ausdehnung einer Art in einem größeren Zeitraum hervorgehoben. Sowohl rezente als auch ausgestorbene Arten und sexuelle sowie asexuelle Organismen werden eingeschlossen, wodurch das Konzept bei Paläontologen sehr beliebt ist. Das Konzept lässt Freiraum in Bezug auf den Zusammenhalt einer Art, welcher nicht nur durch Genfluss, sondern auch durch entwicklungsbedingte, genetische und ökologische Bedingungen bestimmt wird. Außerdem ist es nah an der methodischen Definition einer Art, wie sie von den meisten Taxonomen benutzt wird (TEMPLETON 1989). Kritiker des Evolutionären Artkonzepts, z. B. MEIER & WILLMANN (2000) bezeichnen das Konzept als sehr subjektiv, da „Identität“, „unabhängiges Schicksal“ und „historische Tendenzen“ einer „Abstammungslinie“ nicht objektiv definiert werden können. Außerdem ist es theoretisch möglich, dass die Stammart nach der Entstehung neuer Arten überlebt, was dazu führt, dass monophyletische Gruppen nicht als Arten definiert werden können, weil es keine alleinigen Stammarten für diese Gruppen gibt. TEMPLETON (1989) merkt die fehlende Definition der Mechanismen an, die für den Zusammenhalt einer Art verantwortlich sind.

*Die Phylogenetischen Artkonzepte (PSC) nach CRACRAFT (1983), DONOGHUE (1985), BAUM & DONOGHUE 1995, MISHLER & THERIOT (2000) u.a.:*

Vor allem Evolutionsbiologen und Systematiker erachteten das lange Zeit weithin akzeptierte BSC für ihre Belange als nicht anwendbar (z. B. ROSEN 1978, CRACRAFT 1983, DONOGHUE 1985). Phylogenetische Artkonzepte wurden daraufhin von verschiedenen Autoren entwickelt (z. B. ROSEN 1978, NELSON & PLATNICK 1981, CRACRAFT 1983, DONOGHUE 1985), um die zwei grundlegenden Funktionen von Arten zu verbinden: 1. Grundeinheit der Evolution und 2. Grundlage zur Beschreibung taxonomischer Diversität und zur Widerspiegelung biologischer Klassifikationen zu sein (CRACRAFT 1989). Gemeinsam ist verschiedenen Konzepten, dass eine phylogenetische Art eine nicht weiter reduzierbare, monophyletische Gruppe von Organismen oder Populationen (sexuell oder asexuell) ist, die von anderen solchen Gruppen durch Merkmale unterschieden wird. Die Entscheidung zur Registrierung als Art hängt von den Unterstützungswerten der Monophylie und/oder ihrer Wichtigkeit in biologischen Prozessen ab (MISHLER & THERIOT 2000). Arten sind dadurch weithin vergleichbar, auch wenn ihnen verschiedene evolutionäre Prozesse zugrundeliegen.

Der entscheidende Unterschied zwischen alternativen Phylogenetischen Artkonzepten ist die Definition einer Art auf der Grundlage von Merkmalen oder von historischen Verwandtschaften (BAUM & DONOGHUE 1995). In beiden Konzeptrichtungen sind Merkmale

die Grundlage für Artabgrenzungen. In merkmalsbezogenen Artkonzepten (z. B. CRACRAFT 1983, 1989, NIXON & WHEELER 1990, DAVIS & NIXON 1992) sind Arten als Organismen mit gemeinsamen erkennbaren Attributen definiert, aber deren Herkunft wird ignoriert. In geschichtsbezogenen Artkonzepten (DONOGHUE 1985, BAUM & SHAW 1995, MISHLER & THERIOT 2000) ist die historische Verwandtschaft von Organismen eine Grundvoraussetzung für Arten und gemeinsame Merkmale werden als Hinweis darauf gesehen (BAUM & DONOGHUE 1995).

Probleme der PSCs sind zum einen die fehlenden Unterscheidungskriterien zur Klassifizierung einer monophyletischen Gruppe als Art oder eines höheren Levels, z. B. als Gattung, da sich die Kriterien zur Erkennung dieser Einheiten qualitativ nicht unterscheiden (DE QUEIROZ & DONOGHUE 1988, LEE 2003). Zum anderen ist die Struktur innerhalb von Populationen einer Art vernetzt und kann oftmals nicht in hierarchisch organisierte, geschachtelte Äste gegliedert werden. Nicht-monophyletische Populationen können somit nicht als Art gewertet werden, auch wenn sie Artstatus besitzen (DE QUEIROZ & DONOGHUE 1988, LEE 2003). Dies kann nach verschiedenen Artbildungsprozessen der Fall sein, z. B. wenn die Ausgangsart neben der neuen Art weiterexistiert oder nach Artbildung durch Hybridisierung.

*Das Kohäsive Artkonzept nach TEMPLETON (1989):*

Das Kohäsive Artkonzept ist ein weiteres anwendungsbezogenes, auf Abstammungslinien basierendes Artkonzept. Eine kohäsive (zusammenhängende) Art ist die größtmögliche Population von Individuen mit Potential zu innewohnenden Bindungsmechanismen, welche in zwei Hauptkategorien unterteilt werden: 1. genetische Austauschbarkeit: Faktoren, die die Grenzen der Ausbreitung neuer genetischer Varianten durch Genfluss definieren; 2. demographische Austauschbarkeit: Faktoren, die die Grenzen der Ausbreitung neuer genetischer Varianten durch genetische Drift und natürliche Selektion definieren (TEMPLETON 1989). Der Ansatz sucht im phylogenetischen Rahmen nach der Übereinstimmung von Genen, geographischer Verteilung und morphologischen und ökologischen Informationen, um das Ausmaß genetischer und demographischer Austauschbarkeit zu ermitteln (SITES & CRANDALL 1997). Durch das statistische Testen einer Reihe von Nullhypothesen wird die kohäsive Art überprüft (zur Methode siehe auch TEMPLETON & SING 1993). Der Ansatz verlangt im Gegensatz zu anderen Ansätzen nicht zwingend, dass Arten im phylogenetischen Gefüge monophyletische Gruppen bilden oder sich sexuell fortpflanzen (TEMPLETON 1994).

MAYR (2000) kritisiert das Kohäsive Artkonzept als Konzept, das versucht die besten Komponenten verschiedener anderer Artkonzepte zu kombinieren, dann aber verpasst sich daraus ergebende Konflikte zu lösen. Z. B. scheitert es an der Unterscheidung interner (Isolationsmechanismen) und externer (geographische Isolation) Genflussschranken. Es hebt den innerartlichen Zusammenhalt durch Genfluss hervor, aber beansprucht auch bei asexuellen Arten anwendbar zu sein, die streng genommen keinen Genfluss aufweisen. Templeton erläutert nicht, wie mit geographischer Variabilität von demographisch-ökologischen Merkmalen in weit verbreiteten polymorphen Arten umgegangen werden soll.

### 3.2 Morphologische Merkmale in *Usnea* und *Neuropogon*

Die Gattung *Usnea* ist einerseits leicht als Gattung an ihrem Zentralstrang zu erkennen, andererseits gehört sie auf Artebene aber zu einer der schwierigsten taxonomischen Flechtengruppen. Der Grund hierfür sind morphologische und chemische Übergangsformen zwischen beschriebenen Arten, die eine genaue Bestimmung sehr schwierig machen. Weiterhin sind viele Merkmale durch Umweltfaktoren stark veränderlich und eine Unterscheidung zwischen „taxonomisch wertvollen“ und „umweltbedingten“ Merkmalszuständen ist nicht immer leicht zu treffen (CLERC 1998). Noch in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts herrschte eine typologische Sichtweise vor und *Usnea*-Arten wurden schematisch, meist nach morphologischen Merkmalen getrennt (z. B. bei MOTYKA 1936-1938). Beginnend mit SWINSCOW & KROG (1978) und anderen setzte sich aber durch, dass erst durch eine Kombination von morphologischen und chemischen Merkmalen Arten sinnvoll beschrieben werden können. Es gibt sehr selten wirklich eindeutige einzelne Charakteristika.

Eine genaue Beschreibung der morphologischen Merkmale in *Usnea* ist z. B. in CLERC & HERRERA-CAMPOS (1997), CLERC (1998) und OHMURA (2001) gegeben, speziell für *Neuropogon* in WALKER (1985). An dieser Stelle werden zum besseren Verständnis der Diskussion die wichtigsten morphologischen Merkmale angesprochen, die in vier Kategorien eingeteilt werden können: Habitus, Kortexornamentierung, innere Strukturen und Reproduktionsstrukturen. Nicht alle Merkmale sind qualitativ gleichwertig und es wird versucht in Bezug auf *Neuropogon* eine Einschätzung zu geben.

*Habitus:*

Die Wuchsform bei *Neuropogon* ist in der Regel strauchig, kann aber je nach ökologischen Bedingungen oder Art auch kriechend oder halbhängend sein (Abb. 3.1: d). Die Thalluspigmentierung ist ein sehr variables Merkmal und spiegelt oft Umweltbedingungen wider: je exponierter der Standort, desto ausgeprägter die Pigmentierung. Z. T. ist die Pigmentierung auf die Thallusspitzen, Aufbrüche im Thallus oder Isidiomorphe beschränkt und kann dann in Kombination ein sinnvolles Merkmal sein, z. B. bei *U. acromelana* (Abb. 3.1: f, h).

Die Art und Häufigkeit der Thallusverzweigung ist variabel, kann aber für manche Arten charakteristisch sein (vergl. z. B. Abb. 3.1: a, b). Der Ansatz der Sekundäräste ist besonders charakteristisch, wenn er verschmälert ist, wie z. B. in *U. patagonica* (Abb. 3.1: c). Auch der basale Teil des Thallus mit der Haftscheibe kann als Merkmal in *Neuropogon* genutzt werden. Er kann sich wuchernd in viele Äste auffächern, so dass die Flechte dem Substrat breit aufsitzt (Abb. 3.1: f, g, h), oder verlängert sein. In diesem Fall sitzt die Haftscheibe an einem kurzen Stielchen, das sich erst oberhalb verzweigt (Abb. 3.1: a, b). Die Thallusbasis kann hell, bräunlich oder schwarz pigmentiert und ein konstantes Merkmal in Arten sein.

*Kortexornamentierung:*

Kortexornamentierungen können sowohl einheitlich, als auch variabel innerhalb von Arten sein. Ein häufig auftretendes Merkmal sind Kortexgrübchen, rundliche Vertiefungen oder Furchen im Kortex (Abb. 3.2: a, e). Diese sind nach CLERC (1998) abhängig von der Kortexdicke: je dünner der Kortex, desto wahrscheinlicher treten Grübchen auf. Das Merkmal sollte daher in Kombination mit den inneren Thallusstrukturen genutzt werden.

Papillen sind kleine Warzen auf der Kortexoberfläche, die unpigmentiert oder schwarz gefärbt sein können (Abb. 3.2: b, f, i). Ihr Größe kann variieren und sie können in sehr unterschiedlicher Menge auftreten. CLERC (1998) und OHMURA (2001) stellen daher das Potential zur Bildung von Papillen als wichtiges Merkmal heraus. Es gibt wenige Arten, bei denen niemals Papillen auftreten und z. T. sind Papillen nur schwer von den Anfangsstadien der Fibrillen oder Sekundäräste zu unterscheiden.

Fibrillen sind astähnliche Thallusauswüchse mit Mark und Zentralstrang und nach OHMURA (2001) als potenzielle junge Seitenäste zu betrachten (Abb. 3.2: g, i). Menge, Thallusabschnitt des Auftretens und ihre Länge können Bestimmungsmerkmale sein. Wahrscheinlich dienen sowohl Papillen als auch Fibrillen der vegetativen Verbreitung durch Abbruch.

Annulationen des Thallus durch Aufbrüche treten bei einigen Arten als konstantes Merkmal auf, z. B. bei *U. ciliata* und *U. acromelana* (Abb. 3.1: e, f, h). Bei anderen Arten kann es sich auch um einfache Wachstumsrisse oder Pseudocyphellen handeln. Letztere sind Oberflächenöffnungen, die wahrscheinlich dem Gasaustausch dienen.

#### *Innere Thallusstrukturen:*

Die Bestimmung des Verhältnisses von Kortex, Mark und Zentralstrang, gemessen an einem Thalluslängsschnitt, wurde von CLERC (1984) entwickelt. Die Ergebnisse können statistisch ausgewertet werden und sehr hilfreich zur Abgrenzung von Arten in *Usnea* sein. WALKER (1985) stuft die Nützlichkeit in *Neuropogon* aufgrund infraspezifischer Variabilität als eher gering ein. Sie untersucht zusätzlich die Beschaffenheit des Marks (locker bis kompakt). Als konstantes Merkmal in Arten beschreibt CLERC (1998) den Glanz der Kortexschnittfläche (Abb. 3.2: g).

#### *Reproduktionsstrukturen:*

Die Apothecien in *Neuropogon* sind mit wenigen Ausnahmen dunkel (siehe Abb. 2.9). WALKER (1985) beschreibt sowohl ihre Position am Thallus, als auch die Form als variierende Merkmale. Sie können seitlich, in Reihung, halbendständig oder endständig auftreten, wobei sie artunabhängig häufig einen unterseitigen Sporn haben (Abb. 3.2: a, b). Auch strahlenförmige Fibrillen am Apothecienrand sind ein häufiges, allerdings variables Merkmal (Abb. 3.2: a, b, h). Anatomische Unterschiede der Apothecien und ihrer Strukturen, z. B. Sporengröße oder Hymenium- und Hypotheciumdicke sind bei *Neuropogon* vernachlässigbar gering (WALKER 1985).

Es gibt drei vegetative Fortpflanzungseinheiten bei *Neuropogon*, die wichtige taxonomische Merkmale darstellen: Sorale, Pseudoisidien und Isidien. Sorale kommen in unterschiedlicher Anzahl und Position am Thallus vor und entwickeln sich aus unterschiedlichen Thallusstrukturen: aus Papillen, abgebrochenen Fibrillen, Narben von Isidiomorphen, Kortexrissen oder ad hoc aus dem Kortex. Daher können sie unterschiedliche Formen haben [Abb. 3.2: konkav (e, h) oder konvex (f) bis gewölbt rund (c), gerandet, gestielt (f, d), irregulär, wuchernd (j) und mit zurückgebogenem Rand (siehe hierzu auch OHMURA 2001)]. Die eigentlichen Verbreitungseinheiten, die Soredien in den Soralen, können unpigmentiert oder pigmentiert sein, wobei sie in letzterem Fall häufig zu Pseudoisidien auswachsen (Abb. 3.2: j). Innerhalb von Arten können Soralursprung und -form variabel sein und z. T. können Sorale auch an den Apothecienrändern fertiler Individuen auftreten (Abb. 3.2: h).



Abb. 3.1: Morphologische Merkmale in *Neuropogon*: (a) *U. acanthella*, (b) *Usnea* sp. nov. 2, (c) *U. patagonica*, (d) *U. subcapillaris*, (e) *U. ciliata*, (f) *U. acromelana* aus NZ, (g) und (i) *Usnea* sp. nov. 1, (h) und (j) *U. acromelana* aus Patagonien.

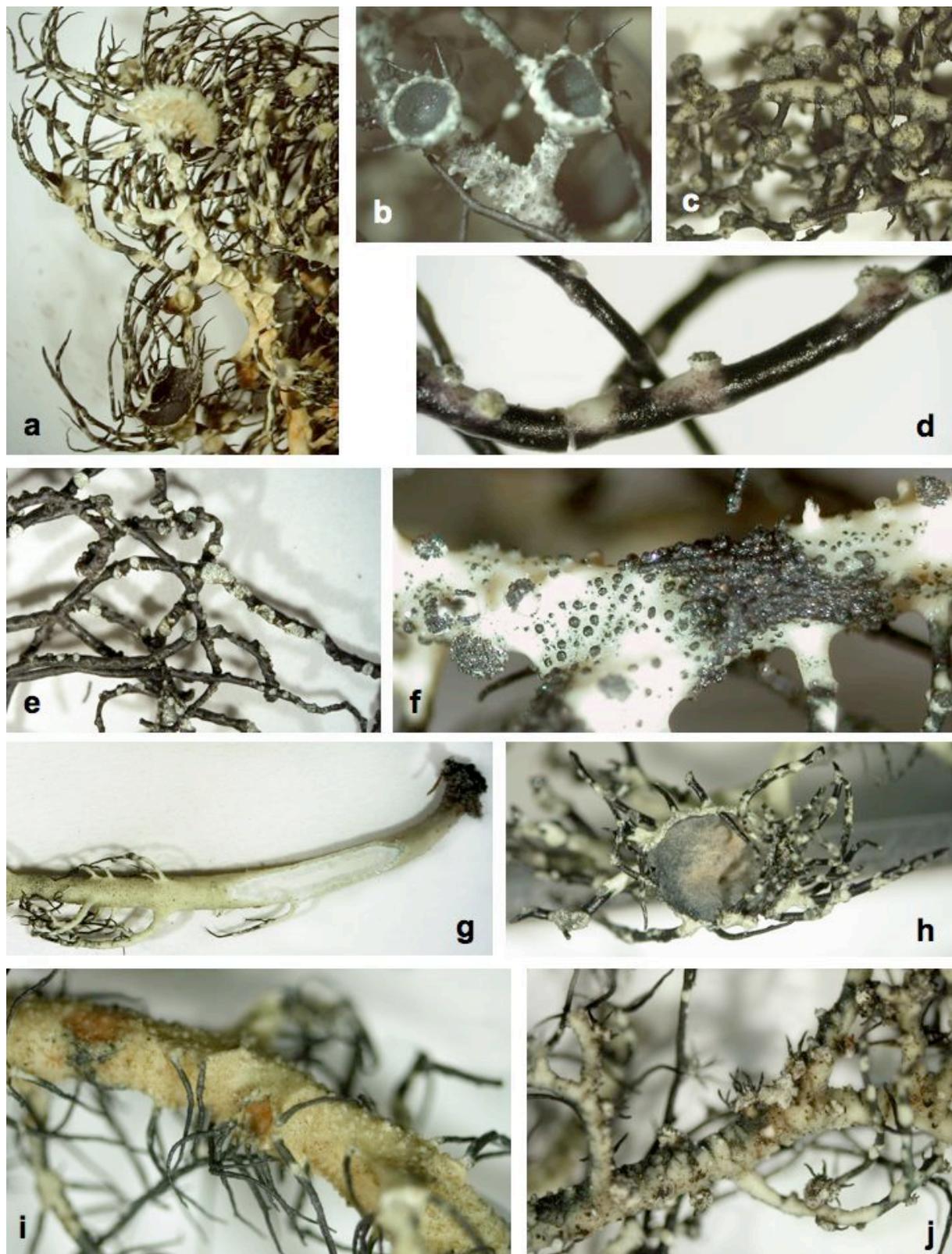


Abb. 3.2: Morphologische Merkmale in *Neuropogon*: (a) *U. perpusilla*, (b) *U. aurantiacotra*, (c) *U. sphacelata* 2, (d) *U. antarctica*, (e) *U. acromelana* (NZ), (f) *U. sphacelata* 1, (g) *U. subantarctica*, (h) *U. perpusilla*, (i) *U. trachycarpa*, (j) *U. antarctica*.

Pseudoisidien und Isidien werden von CLERC & HERRERA-CAMPOS (1997) zu „Isidiomorphen“ zusammengefasst. WALKER (1985) unterscheidet die Entwicklung aus soralähnlichen Strukturen (Pseudoisidien) und aus dem Kortex (echte Isidien). „Isidien“ sind bei *Neuropogon* selten und immer unpigmentiert (Abb. 3.1: a), wobei „Pseudoisidien“ dunkel pigmentiert sind und bei vielen Arten mit Soralen vorkommen können (Abb. 3.1: j). Zur Orientierung sind in Tabelle 3.1 die Reproduktionsmodi der verschiedenen *Neuropogon*-Arten nach WALKER (1985) aufgelistet.

Tab. 3.1: Reproduktionsmodi der *Neuropogon*-Gruppe (nach WALKER 1985). Der Vollständigkeit halber sind alle Arten genannt; in dieser Arbeit nicht untersuchte Arten stehen in Klammern.

Art	fertil	sorediös	Isidiomorphe/ Thallusbruchstücke
<i>U. acanthella</i>	n	n	x – unpigmentierte Isidien
<i>U. acromelana</i>	s – schwarz	k	s – pigmentierte Pseudoisidien
<i>U. antarctica</i>	s – schwarz	k	s – pigmentierte Pseudoisidien
<i>U. aurantiaco-atra</i>	x – schwarz	n	n
<i>U. ciliata</i>	x – schwarz	n	n
<i>U. durietzii</i>	n	n	k – pigmentierte Pseudoisidien
( <i>U. neuropogonoides</i> )	n	n	x – brüchiger Thallus
<i>U. patagonica</i>	n	k	x – pigmentierte Pseudoisidien
<i>U. perpusilla</i>	x - schwarz	n	n
( <i>U. pseudocapillaris</i> )	s - schwarz	x	k – brüchiger Thallus
<i>U. sphacelata</i>	n	k	s – pigmentierte Pseudoisidien
<i>U. subantarctica</i>	s - zimtbraun	k	s – pigmentierte Pseudoisidien
<i>U. subcapillaris</i>	s – schwarz	n	k – brüchiger Thallus
( <i>U. taylorii</i> )	x – schwarz	n	n
<i>U. trachycarpa</i>	x - zimtbraun	n	n

(k = konstant, x = häufig, s = selten, n = nie).

Alle in diesem Kapitel erwähnten Merkmale sind mehr oder weniger innerartlich variabel und nur in Kombination und mit anderen Merkmalen, wie Chemie und molekularen Daten zur Artbeschreibung nutzbar. CLERC (1998) schlägt vor, dass zur Artbeschreibung mindestens zwei deutliche, unabhängige Merkmalsunterschiede vorliegen müssen (z. B. Sorale und Chemie), und, dass Übergangsindividuen („Hybridindividuen“) möglichst fehlen oder zumindest in sehr geringer Anzahl existieren sollten.

### 3.3 Sekundärstoffe als taxonomische Merkmale

Sekundäre Stoffwechselprodukte sind im gesamten Reich der Pilze, vor allem aber bei lichenisierten Pilzen, weit verbreitet und zeigen häufig taxonspezifische Muster. In ihrem Auftreten oder Ausbleiben können daher wertvolle Informationen über phylogenetische Verwandtschaften liegen und die Identifizierung von Flechtenstoffen ist oft eine Notwendigkeit zur korrekten Bestimmung von Flechtentaxa (LUMBSCH 2002, SCHMITT &

LUMBSCH 2004). Vor allem in der prä-molekularen Zeit war die vergleichende Studie chemischer Merkmale in Verbindung mit morphologischen und anatomischen Merkmalen eine der wichtigsten taxonomischen Methoden in der Lichenologie (z. B. CULBERSON 1969, CULBERSON & CULBERSON 1970, HAWKSWORTH 1976) und auch heute noch liefert die Flechtenchemie wichtige systematische Merkmale auf allen taxonomischen Ebenen (z. B. FRISVAD et al. 1998, LUMBSCH 1998b, SCHMITT & LUMBSCH 2004).

Ihr Ursprünge hat die Chemotaxonomie der Flechten bei NYLANDER (1855, 1867). Er war der erste, der eine charakteristische Thallusverfärbung mit Kaliumhydroxid und Calciumhypochlorit bei Flechten feststellte und diese Farbreaktion („spot test“) aus praktischen Gründen als Bestimmungshilfe und zur Artbeschreibung nutzte. In späteren Jahren erstellte ZOPF (1907) die erste Übersicht über Flechteninhaltsstoffe, die von ASAHINA (1934b, 1937) erheblich verbessert wurde. Er war es auch, der die flechteneigene Stoffklasse der Depsidone benannte und beschrieb (ASAHINA 1934a, 1934b). Seitdem hat die Chemotaxonomie sehr an Bedeutung gewonnen und wird heute routinemäßig eingesetzt (FRISVAD et al. 1998, LUMBSCH 2002). Informationen zu den Stoffklassen bei Flechten und eine Auflistung und Beschreibung der ca. 1000 beschriebenen Substanzen in Flechten, die häufig flechtenspezifisch sind, finden sich bei HUNECK & YOSHIMURA (1996). Die gängigsten Methoden zur Identifizierung der Stoffe, TLC (Thin-Layer Chromatography) und HPLC (High Performance Liquid Chromatography) werden im Methodenteil des Kapitels 3-B beschrieben.

WALKER (1985) liefert mit ihrer Monographie eine detaillierte Sekundärstoffanalyse *Neuropogons*. Das Vorkommen bestimmter Substanzen oder Kombinationen dieser ist eine wichtige Grundlage für ihre Artbeschreibungen, wobei häufig mehrere Chemorassen einer Art benannt werden. *Neuropogon* ist chemisch betrachtet keine sehr abwechslungsreiche Gruppe. Es sind einige wenige  $\beta$ -Orcinol-Depside beschrieben (Con-(Norstictinsäure), Fumar-(Protocetrarsäure), Psorom- und Salazinsäure), nur zwei  $\beta$ -Orcinol-Depsidone (Squamat- und Hypothamnolsäure) und Fettsäuren. Bei den Fettsäuren handelt es sich um Säuren aus dem Murolinsäure-Komplex. Weiterhin kommen in vielen Arten drei bis vier unbestimmte, unter langwelligem UV-Licht fluoreszierende Substanzen vor, die auch schon bei *Usnea* s. str. beobachtet wurden. WALKER (1985) beschreibt diese Substanzen als inkonsistent und zufällig und daher ohne taxonomische Bedeutung. In der folgenden Tabelle 3.2 werden alle bisher festgestellten chemischen Inhaltsstoffe in den hier untersuchten *Neuropogon*-Arten aufgelistet. Nicht genannt werden Begleitsubstanzen wie z. B.

Connorstictinsäure, die in Verbindung mit Norstictinsäure auftritt. Die Tabelle folgt den Angaben WALKERS (1985).

Tab. 3.2: Chemische Inhaltsstoffe der *Neuropogon*-Gruppe (nach WALKER 1985). Der Vollständigkeit halber sind alle Arten genannt; in dieser Arbeit nicht untersuchte Arten stehen in Klammern.

Art	US	NOR	SAL	PC	FPC	PSO	SQ	HTH	FAT
<i>U. acanthella</i>	k								
<i>U. acromelana</i>	k	x	x	x			s		
<i>U. antarctica</i>	k	s	s	x	x				
<i>U. aurantiaco-atra</i>	k	x	x	x	x				
<i>U. ciliata</i>	k	k	k	x					
<i>U. durietzii</i>	k	x	x						
( <i>U. neuropogonoides</i> )	k						x		x
<i>U. patagonica</i>	k								k
<i>U. perpusilla</i>	k						s		
( <i>U. pseudocapillaris</i> )	k	k	k	x					
<i>U. sphacelata</i>	k						s		
<i>U. subantarctica</i>	k	x	x						
<i>U. subcapillaris</i>	k	x	x	x			s	s	s
( <i>U. taylorii</i> )	k					s			
<i>U. trachycarpa</i>	k	x	x	x			s		k

US= Usninsäure, NOR= Norstictinsäure, SAL= Salazinsäure, PC= Protocetrarsäure, FPC= Fumarprotocetrarsäure, PSO= Psoromsäure, SQ= Squamatsäure, HTH= Hypothamnolsäure und FAT= Fettsäuren (k = konstant, x = häufig, s = selten).

Die angegebenen Stoffe kommen z. T. in unterschiedlichen Chemorassen und nicht in Kombination vor oder sie sind nur sehr selten und in wenigen Individuen vorhanden. In den meisten Arten kommen zudem chemische Rassen mit keinerlei Inhaltsstoffen vor, was eine rein chemische Unterscheidung der *Neuropogon*-Arten unmöglich macht (WALKER 1985). In allen *Usnea*-Arten findet man, wie der Name schon sagt, Usninsäure in unterschiedlichen Konzentrationen.

### 3-A Phylogenie gestützte Artabgrenzung

#### A-1 Einleitung

##### A-1.1 Vom phänotypischen zum phylogenetischen Artkonzept bei Flechten

Traditionell herrschte in der Lichenologie das Phänotypische Artkonzept vor. Arten wurden als monomorph angesehen und Unterschiede in geographischer Ausbreitung und Morphologie wurden als Hinweise für neue Arten gesehen. Somit wurden über Jahrzehnte viele synonyme Arten beschrieben. Die Erkenntnis, dass chemische Sekundärstoffe eine bedeutende Rolle bei Flechten spielen (NYLANDER 1855), führte zu einer Überbewertung chemischer Merkmale (Chemisches Artkonzept). CULBERSON (1986) führte den Begriff der ‚sibling species‘ (Schwesterarten) für ökologisch und biologisch charakteristische Chemotypen in Flechtenarten ein, die nicht morphologisch unterschieden sind. Andere Autoren sind konservativer und stellen Regeln auf, wie mit chemischer Variabilität in Artkomplexen umgegangen werden sollte (HAWKSWORTH 1976, LUMBSCH 1998b). Beide sind sich einig, dass chemische Unterschiede mit weiteren Merkmalen (z. B. Morphologie, Ökologie) korrelieren müssen, um Änderungen im nomenklatorischen System zu bewirken. Ohne weitere Merkmale, können unterschiedliche Chemotypen je nach chemischer Ausprägung höchstens als Unterart oder aber als infraspezifische Variabilität bewertet werden. Ein (chemisches) Merkmal allein betrachtet hat noch keine taxonomische Relevanz. Erst *a posteriori*, durch die Übereinstimmung mit anderen unabhängigen Merkmalen, z. B. auch molekularen Daten, kann es als wichtig eingestuft werden (LUMBSCH 1998b). Chemische Daten sollten also wie andere Merkmale auch mit Vorsicht bewertet und von Gruppe zu Gruppe neu evaluiert werden.

Seit der ausgeprägten Nutzung molekularer Daten in der Systematik sind Phylogenetische Artkonzepte besonders bei Flechten und Pilzen sehr beliebt, da es sich häufig um asexuelle Organismen mit wenigen signifikanten Merkmalen handelt. Die anwendungsbezogene ‚Phylogenetische Arterkennung‘ nach TAYLOR et al. (2000), wird häufig genutzt. Bei dieser Methode werden möglichst mehrere Gene von mehreren Individuen untersucht und *a posteriori* phänotypische Merkmale für gut unterstützte, monophyletische Gruppen gesucht (siehe z. B. GRUBE & KROKEN 2000, KROKEN & TAYLOR 2001, MILLER & HUHDORF 2004, SCHMITT & LUMBSCH 2004). Ein Problem können jedoch phänotypische Merkmale darstellen, die innerartlich und zwischen Arten polymorph sind. Es können auch kryptische Arten auftreten, die sich genetisch eindeutig abgrenzen, aber phänotypisch keine oder fast

keine Unterschiede zeigen (siehe KROKEN & TAYLOR 2001). Außerdem stellt sich die Frage, wie viele Gene zur Auflösung nah verwandter Arten benötigt werden (CUMMINGS et al. 1995), da sich die Abstammungslinien in den untersuchten Genen vielleicht noch nicht vollständig getrennt haben (,incomplete lineage sorting’).

### **A-1.2 Phylogenetische Artabgrenzung auf der Grundlage molekularer Daten**

SITES & CRANDALL (1997) weisen in ihren Ausführungen zum Testen von Artgrenzen ausdrücklich darauf hin, dass es wissenschaftlich unumgänglich ist, bei der Ermittlung von Artgrenzen a priori eine explizite anwendungsbezogene Methode zugrunde zu legen, deren Hypothesen rigoros getestet und dadurch Arten diagnostiziert werden können. Anleitungen für Wissenschaftler, die mit der empirischen Trennung von Arten und auftretenden Problemen konfrontiert sind, sind erst in den letzten Jahren mehr und mehr in den Blickpunkt gerückt (z. B. TAYLOR et al. 2000, WIENS & PENKROT 2002, MORANDO et al. 2003, SITES & MARSHALL 2003, 2004, HENDRIXSON & BOND 2005). In den oben zitierten Studien wurden Methoden entwickelt und Regeln aufgestellt bzw. bewertet, die aufzeigen, wie bei der Abgrenzung von Arten und der Beurteilung von Artgrenzen vorgegangen werden kann. Vorhandene Arterkennungs-Methoden können in phylogrammgestützte und nicht-phylogrammgestützte Methoden unterteilt werden. Erstere trennen Arten aufgrund ihrer historischen Abstammung voneinander (z. B. BROOKS & MCLENNAN 1999, BROWER 1999, TEMPLETON 1989, 2001, TAYLOR et al. 2000, WIENS & PENKROT 2002) und basieren damit zumeist auf phylogenetischen Artkonzepten. Letztere basieren auf der indirekten Einschätzung von Genfluss zwischen hypothetischen Arten (z. B. PORTER 1990, DAVIS & NIXON 1992, PUERTO et al. 2001) und gehen auf das biologische Artkonzept mit der Hervorhebung der Fortpflanzungskompatibilität zurück (siehe hierzu auch die Zusammenfassung und Bewertung der Methoden von SITES & MARSHALL 2003, 2004).

Sie können daher nur auf sexuell reproduzierende Organismen angewendet werden. Fast alle phylogrammgestützten Vorgehensweisen schließen auch asexuelle Artkomplexe ein (SITES & MARSHALL 2004).

Die phylogrammgestützte Artabgrenzung wird in dieser Arbeit nach der Methode von WIENS & PENKROT (2002) (WP-Methode) durchgeführt, die auf DNA-Haplotypen-Phylogenien beruht und dem Benutzer einen eindeutigen, dichotomen Schlüssel zur Abgrenzung basaler, monophyletischer Abstammungslinien vorgibt. Diese Methode wird mit einer Nested Clade Analyse (NCA) nach Templeton (2001) ergänzt (siehe Kapitel 3-B), um maximale historische Signale auf den verschiedenen Ebenen der *Neuropogon*-Gruppe zu erhalten.

## A-2 Material und Methoden

### A-2.1 Untersuchte Proben

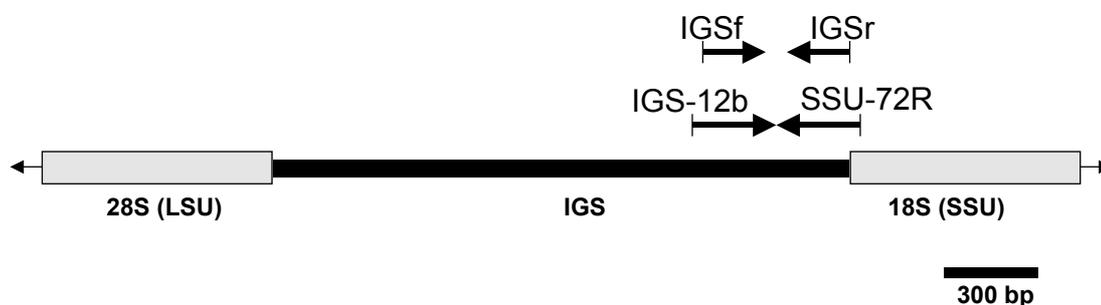
Für diesen Teil der Arbeit wurden insgesamt 421 *Neuropogon*-Individuen der bereits in Kapitel 2 vorgestellten Arten untersucht, die entweder persönlich gesammelt oder aus Herbarien und von Privatsammlern ausgeliehen wurden. Die einzelnen Individuen sind mit der jeweiligen Probennummer, den Standortangaben, Sammler und Sammelnummer, sowie den jeweils gewonnenen Genfragmenten in Anhang 1 aufgelistet. Viele Individuen, die mit dem auf chemischen und morphologischen Merkmalen beruhenden Bestimmungsschlüssel von WALKER (1985) nicht sicher bestimmt werden konnten, sind entweder als unbestimmte *Usnea* angegeben (*Usnea* sp.), vorläufig einer bestimmten Art zugeordnet worden (z. B. *U.* cf. *sphacelata*) oder, wenn es sich um offenbar unbeschriebene Arten handelte, als ähnlich zu einer bestehenden Art eingestuft worden (z. B. *U.* aff. *perpusilla*). Wichtig ist darauf hinzuweisen, dass zwischen der morphologisch-chemischen Bestimmung der Proben und den phylogenetischen Ergebnissen zum Teil Unstimmigkeiten auftreten. Es wird sich im Laufe dieses Kapitels herausstellen, dass das bisherige Artkonzept in der Gruppe unzureichend ist.

Alle Proben wurden vor der molekularen Analyse wie in Kapitel 2.3 beschrieben behandelt und anschließend molekular untersucht. Mit besonderer Vorsicht wurden die einzelnen Individuen voneinander getrennt und separat aufbewahrt, damit keine Vermischung auftreten konnte. Jeder Thallus mit eigener Haftscheibe wurde als einzelnes Individuum bezeichnet. Proben mit wuchernden Haftscheiben, die leicht auseinander brechen, wurden sorgfältig für die Analysen ausgewählt und im Zweifelsfall nicht als eigenständiges Individuum gewertet.

### A-2.2 Molekulare Marker

Es wurden drei molekulare Marker zur Abgrenzung der Arten und Populationsanalyse benutzt: die ITS-Region, mit den Primern wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, ein IGS (intergenic spacer)-Fragment und ein Teil des RPB1-Gens. Das ca. 450 bp lange IGS-Fragment wurde aufgrund der hohen Variabilität dieser rDNA-Region und dem bereits erfolgreichen Einsatz in infraspezifischen Untersuchungen ausgewählt (PRINTZEN & EKMAN 2002, PRINTZEN et al. 2003). Die Sequenzen und Anlagerungsstellen der benutzten Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung der IGS sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Ausgehend von bereits gewonnenen IGS-Sequenzen wurde zur Verbesserung der PCR- und

Sequenzierergebnisse ein neues Primerpaar für die *Usnea*-Gruppe entwickelt: IGSf in 5'-3'-Richtung und IGSr in 3'-5'-Richtung. Alle Primer wurden auch als Sequenzierprimer benutzt.

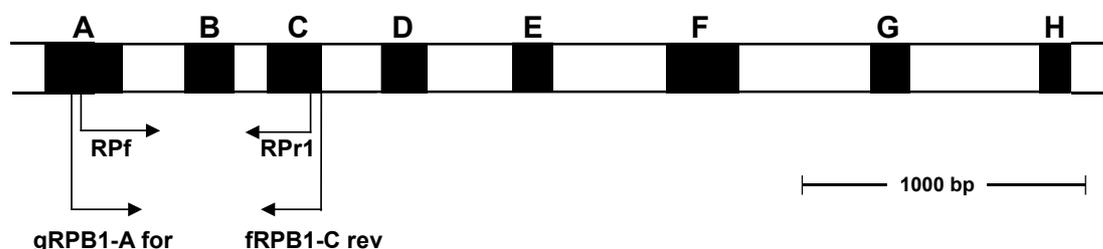


Primer	Primersequenz	Anlagerungstemp.	Referenz
IGS-12b*	5'-AGTCTGTGGATTAGTGGCCG-3'	52°C	PRINTZEN & EKMAN 2002
SSU-72R**	5'-TTGCTTAAACTTAGACATG-3'	52°C	WHITE et al. 1990
IGSf*	5'-TAGTGGCCGWTRGCTATCATT-3'	51°C	neu entwickelt
IGSr**	5'-TGCATGGCTTAATCTTTGAG-3'	51°C	neu entwickelt

\* setzt am 3'-Ende innerhalb der IGS an

\*\* setzt am 5'-Ende der 18S an

Abb. 3.3: Nukleäre ribosomale DNA und benutzte IGS-Primer.



Primer	Primersequenz	Anlagerungstemp.	Referenz
gRPB1-A for*	5'-GADTGTCDDGGDCATTTTGG-3'	54°C	STILLER & HALL 1997
fRPB1-C rev**	5'-CNGCDATNTCRTRTCCATRTA-3'	54°C	MATHENY et al. 2002
RPF*	5'-GTMTGTGGTAKCGARTAG-3'	57°C	neu entwickelt
RPr1**	5'-AATTGCAGCAATTGCTCG-3'	57°C	neu entwickelt

\* setzt am 3'-Ende innerhalb der IGS an

\*\* setzt am 5'-Ende der 18S an

Abb. 3.4: Schematische Darstellung des proteincodierenden Gens RPB1 und benutzte Primer.

Ein ca. 750 bp langes RPB1-Fragment wurde als drittes Gen zur besseren Unterscheidung der *Neuropogon*-Arten sequenziert. Es handelt sich hierbei um einen von der rDNA

unabhängigen, proteincodierenden Marker. In Abbildung 3.4 werden die benutzten Primer mit ihren Sequenzen und Anlagerungstemperaturen aufgelistet und ihre Positionen am Gen dargestellt. fRPB1-C rev ist ein pilzspezifischer Primer, der für die Basidiomyceten-Ordnung Agaricales entwickelt wurde (MATHENY et al. 2002), wobei gRPB1-A für ein allgemeinerer Primer auch für andere Organismengruppen ist. Die Primer RPF und RPr1 (Abb. 3.4) wurden speziell für *Usnea*-Arten entwickelt.

Alle weiteren Labormethoden entsprechen den Ausführungen in Kapitel 2 Abschnitt 2.3.4.

## A-2.3 Phylogenetische Analyse

### A-2.3.1 Bearbeitung der Sequenzen und Alignments

Die neu gewonnenen Sequenzen wurden wie in Abschnitt 2.3.5.1 in Kapitel 2 beschrieben editiert (SeqMan 4.03), doppelt kontrolliert und mit der BLASTsearch Funktion (ALTSCHUL et al. 1997) in Genbank überprüft. Wie in Kapitel 2 wurde auch in diesem Teil der Studie das Alignmentprogramm SAM (KARPLUS et al. 1998) zur Erstellung der einzelnen Alignments benutzt. Wenn nicht explizit erwähnt, wurden vorhandene Introns entfernt.

### A-2.3.2 Wahl der Außengruppe

Für jedes Gen und auch für den kombinierten Datensatz wurde ein ungewurzelter NJ-Baum berechnet und in Form eines radialen Phylogrammes dargestellt. Die am stärksten abweichende Gruppe von Individuen wurde dann als Außengruppe festgelegt (*U. acanthella* oder *U. durietzi*).

### A-2.3.3 Phylogenetische Methoden

Alle Datensätze wurden mit NJ, MP und Bayes'schen Methoden analysiert, um die Ergebnisse miteinander vergleichen und sicherere Aussagen über Äste und Aufzweigungen in den Bäumen machen zu können. Alle Einzelgen-Bäume wurden in MrBayes (HUELSENBECK & RONQUIST 2001, RONQUIST & HUELSENBECK 2003) unter dem General Time Reversible Modell (GTR+I) (RODRIGUEZ et al. 1990) berechnet. 3.000.000 Generationen wurden in 12 simultanen ‚chains‘ durchlaufen, wobei alle hundert Generationen ein Baum gespeichert und ein ‚burn-in‘ von 5.000 Bäumen verworfen wurde. Die 50% Majority-rule-Konsensusbäume wurden damit aus einer Menge von 25.001 Bäumen gebildet und in Treeview (PAGE 1996) als Phylogramme dargestellt. NJ- und MP-Berechnungen erfolgten wie in Kapitel 2.3.5.3

beschrieben in PAUP\* 4.0b10 (SWOFFORD 2001). Die NJ-Bootstrap-Berechnung wurde mit 1.000 Wiederholungen (replicates) angesetzt. Die nicht-parametrischen MP-Bootstrap-Werte beruhen auf 100.000 Wiederholungen mit dem fast-step Suchkriterium. Die Ergebnisse beider Bootstrap-Berechnungen wurden auf den Bayes'schen Baum aufgetragen.

Aus dem kombinierten Datensatz aller drei Gene wurde ein B/MCMC Baum unter dem Covarion-Modell in MrBayes berechnet. Diese Rechnung wurde mit 12 ‚chains‘ und 4.000.000 Generationen durchgeführt, wobei ein ‚burn-in‘ von 4.000 Bäumen verworfen und somit ein 50% Majority-rule-Konsensusbaum aus 36.001 Bäumen erstellt wurde. Die Ergebnisse einer NJ-Analyse unter dem GTR+I-Modell mit einer Bootstrap-Berechnung von 2.000 Wiederholungen und einer MP-Bootstrap-Berechnung beruhend auf 500.000 Wiederholungen mit dem fast-step Suchkriterium (PAUP\* 4.0b10) wurden in einer Abbildung mit dem B/MCMC Phylogramm zusammengefasst.

#### A-2.4 Kongruenz- und Rekombinationstest

Ziel dieser Studie war es, möglichst viele Individuen der einzelnen *Neuropogon*-Arten aus möglichst vielen Populationen zu untersuchen, um Arten eindeutig voneinander abtrennen zu können. Hierzu wurden drei verschiedene Gene miteinander kombiniert und analysiert. Nicht vollständige Trennungen von Abstammungslinien („incomplete lineage sorting“), Rekombination und Sequenzierfehler bzw. Verwechslungen im Labor sind mögliche Faktoren für widersprüchliche Informationen in Phylogrammen (BONIN et al. 2004). Vor einer Kombination von Datensätzen müssen widersprüchliche Sequenzen aus dem Sequenzpool entfernt werden, da sie ansonsten irreführende Ergebnisse liefern können. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Netzwerkmethoden in Kapitel 3-B erforderlich. Für das Verständnis und die Deutung von Baumtopologien und Netzwerken ist es wichtig, Rekombination von DNA-Fragmenten zu erkennen. Rekombination zwischen Allelen sollte für jeden Datensatz in Erwägung gezogen werden, auch für mitochondriale DNA (IBRAHIM et al. 2002). Das Problem, welches mit rekombinatorischen Neuordnungen in Allelen einhergeht, sind uneindeutige phylogenetische Signale in molekularen Analysen. Diese entstehen durch das Zusammenfügen von Fragmenten mit unterschiedlicher Herkunft und evolutionärer Geschichte. Damit wird es sehr schwierig die grundlegenden evolutionären Beziehungen zwischen Haplotypen (= Allele eines Gens mit eindeutiger Nukleotidabfolge) und ihren zugehörigen Populationen zu erkennen (IBRAHIM et al. 2002). In Netzwerken können sich Rekombinationsereignisse ähnlich wie Homoplasien in Form von unaufgelösten

‘loops’ oder Schleifen verschiedener möglicher Verbindungen zwischen Haplotypen darstellen, in Phylogrammen durch Zwischenstellungen von einzelnen Individuen und geringen Unterstützungswerten.

Um die Kompatibilität der drei Datensätze zu überprüfen, wurde ein Bayes’scher Ansatz gewählt (BUCKLEY et al. 2002). Für alle drei Gene wurden die Ergebnisse der Bayes’schen Analyse benutzt um je einen 95%-Konsensusbaum zu berechnen (alle Äste mit PPs über 0.95) und deren Topologien anschließend auf inkongruente Aussagen hin verglichen. Wenn keine Konflikte auftreten ist anzunehmen, dass die Datensätze kongruent sind und miteinander kombiniert werden können. Bei auftretenden Konflikten müssen Datensätze als inkongruent bezeichnet werden. Eine unveränderte kombinierte Analyse könnte dann möglicherweise falsche Ergebnisse liefern (BULL et al. 1993). Daher wurden einzelne Individuen, für die eine Inkongruenz zutrif, in den Einzelgen-Bäumen markiert und aus dem kombinierten Datensatz entfernt.

Weiterhin wurde der Datensatz auf mögliche Rekombinationsereignisse mit dem Programm GENECONV (SAWYER 1999) überprüft, wie von POSADA (2002) empfohlen. GENECONV überprüft mittels Permutationen die Nullhypothese zufälliger Verteilung variabler Positionen im Alignment. Das Programm sucht in dem zugrundegelegten Alignment nach den wahrscheinlichsten Sequenzfragmenten für Rekombinationsereignisse zwischen vorhandenen Sequenzpaaren. Bei signifikanten P-Werten, werden mögliche Fragmente aufgelistet und durch korrigierte P-Werte geordnet (BLAST-ähnlich). Bei Standardeinstellung des Programms werden 10.000 Permutationen durchlaufen und neben der paarweisen Aufschlüsselung von P-Werten unter Angabe der betroffenen Sequenzen und Genfragmente globale, korrigierte P-Werte ermittelt. Ein signifikanter globaler P-Wert dient als erster Hinweis für Rekombinationsereignisse (SAWYER 1999, POSADA 2002), woraufhin näher auf die einzelnen P-Werte der Sequenzpaare eingegangen werden kann, um die betroffenen Fragmente ausfindig zu machen. Bei den Berechnungen für diese Studie wurden, wie bei POSADA (2002), die Standardeinstellungen benutzt.

### **A-2.5 Phylogenetische Artabgrenzung nach WIENS & PENKROT (2002)**

Die WP-Methode unterteilt sich formal in drei Ansätze: 1. ein auf molekularen Daten beruhender Phylogramm gestützter Teil, 2. ein auf morphologischen Daten beruhender Phylogramm gestützter Teil und 3. ein auf morphologischen Daten beruhender merkmalsgestützter Teil. In dieser Arbeit wird der erste Teil der WP-Methode, die

molekulare Phylogramm gestützte Artabgrenzung (angelehnt an BAUM & DONOGHUE 1995) benutzt. Eine gesonderte phylogenetische Analyse morphologischer Daten wie in der WP-Methode ist im Falle der *Neuropogon*-Gruppen nicht sinnvoll, da ein großes Maß an gruppeninterner Variabilität und vor allem Homoplasien zwischen den großen Gruppen bestehen. Morphologische Daten werden in die NCA in Kapitel 3-B eingebunden.

Grundlage der WP-Methode sind nicht-rekombinierende Sequenzdaten, die eine Gruppe mehrerer nah verwandter Arten darstellen. Dabei ist es nötig, möglichst alle nah verwandten Arten einzubeziehen und mehrere Standorte mit jeweils mehreren Individuen zu betrachten. Eine Grundannahme der WP-Methode ist bestehender Genfluss zwischen Individuen eines Standortes, was dazu führt, dass Haplotypen, die nicht standortspezifisch sind, ein potenzielles Anzeichen für Genfluss sind. Der erste Schritt der Methode ist die Feststellung, ob die Hauptart, die Art auf die sich das Augenmerk richtet, im Phylogramm monophyletisch unterstützt ist. Trifft dies zu, wird nach unterstützten, basalen Linien innerhalb dieser monophyletischen Gruppe gesucht, die sich auch geographisch vom Rest der Gruppe abgrenzen. Im positiven Fall deutet dies auf unterbrochenen Genfluss zwischen den Linien und damit auf voneinander abgegrenzte Arten hin. Im negativen Fall liegt nur eine einzige Art vor. Ist die Hauptart para- oder polyphyletisch, kommen die nah verwandten Arten ins Spiel. Bilden diese eindeutige monophyletische Gruppen und es besteht kein Hinweis auf Genfluss zwischen den verschiedenen Linien der Hauptart, deutet das auf mehrere Arten innerhalb der Hauptart hin. Liegt potenzieller Genfluss zwischen den einzelnen Linien der Hauptart vor, handelt es sich um eine nicht-monophyletische Art, die man auch als „plesiospecies“ (OLMSTEAD 1995) bezeichnen kann. Sind die nah verwandten Arten auch para- oder polyphyletisch, und Haplotypen der Hauptart und verwandter Arten vermischen sich, bilden aber jeweils getrennte Abstammungslinien, die keinen Genfluss untereinander zeigen, handelt es sich sowohl in der Hauptart als auch in den verwandten Arten um mehrere Arten. Ist zwischen den einzelnen Linien Genfluss zu erkennen, sind die Hauptart und die verwandte(n) Art(en) konspezifisch.

## A-3 Ergebnisse

### A-3.1 Einzelgen-Analysen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Einzelgen-Datensätze jeweils getrennt voneinander beschrieben. Für alle drei Datensätze gilt, dass möglichst alle *Neuropogon*-Arten mit möglichst vielen Individuen berücksichtigt wurden, wobei von Arten mit offensichtlich unklaren Artgrenzen und von nicht bestimmbar Individuen verstärkt Sequenzen gewonnen wurden. Von den Arten, die als phylogeographisch interessant erschienen wie *U. antarctica*, *U. aurantiaco-atra* und *U. sphacelata*, wurden gezielt mehr Individuen und Populationen untersucht (siehe Anhang 1). Grundsätzlich wurde darauf geachtet alle drei Genfragmente der Individuen zu gewinnen, um eine Kombination der Daten zu ermöglichen, was nicht immer erfolgreich war.

#### A-3.1.1 Sequenzdaten

##### *ITS-Sequenzen*

Insgesamt wurden für diese Studie, eingeschlossen der *Neuropogon*-Sequenzen aus dem Phylogenie-Teil (Kapitel 2), 371 ITS-Sequenzen gewonnen und in einem Datensatz miteinander vereint. Die kürzeste Sequenz im Datensatz war eine *U. trachycarpa*-Sequenz (164-3) mit 426 bp ohne Intron, die längste Sequenz mit 1259 bp eine *U. acromelana*-Sequenz (184-2) mit einem ca. 400 bp langen group-I-Intron in der nu SSU. Alle Introns wurden nach der Erstellung des Alignments mit SAM (KARPLUS et al. 1998) entfernt. Das Alignment hatte eine Länge von 525 bp mit 143 variablen Positionen. Von den 143 variablen Positionen waren 37 Autapomorphien und damit ‚parsimony uninformative‘. Als Außengruppe wurde *U. durietzii* (290-1/-2) benutzt.

##### *IGS-Sequenzen*

Die Länge der IGS-Sequenzen unterschied sich weit weniger als die der ITS-Sequenzen, weil kein Intron involviert war. Insgesamt konnten Sequenzen von 399 Taxa in die Analyse einfließen, wobei die kürzeste Sequenz 393 bp lang war (*U. cf. antarctica*, 97-5) und die längste Sequenz 492 bp (*U. acromelana*, 169-2). Aufgrund der wenigen verfügbaren IGS-Sequenzen von Pilzen und Flechten in Genbank, waren die ersten Treffer in BLASTsearch Flechten aus der Gattung *Cavernularia* (Parmeliaceae) aus einer Studie von PRINTZEN et al. (2003). Das mit SAM erstellte Alignment war 382 bp lang und enthielt 140 variable

Positionen, wovon 114 'parsimony informative' waren. Da im Fall der IGS alle *U. acanthella*-Sequenzen im ungewurzelten NJ-Baum am weitesten entfernt von der Kerngruppe waren, wurde eine dieser Sequenzen (169-1) als Außengruppe gewählt.

#### *RPB1-Sequenzen*

Die 350 gewonnenen RPB1-Sequenzen wurden als Aminosäuren umgewandelt in den BLASTsearch gegeben. Die nächsten Treffer waren zwei RPB1-Sequenzen von Ascomyceten (*Aspergillus* und *Yarrowia*) und Basidiomyceten aus bereits erwähnten Studien (z. B. MATHENY 2005). Die Länge der RPB1-Sequenzen reichte von 546 bp (227-3) bis 823 bp (179-1) in zwei *U. perpusilla*-Individuen. Das erstellte Alignment war 665 bp lang und enthielt 98 variable Positionen, davon 19 Autapomorphien. Zur Außengruppe wurden *U. acromelana*-Individuen (169-1) verwendet.

#### A-3.1.2 Phylogenetische Analyse

Die Ergebnisse der drei phylogenetischen Analysemethoden waren in allen drei Datensätzen weitestgehend übereinstimmend und konnten daher ohne Probleme in den MrBayes-Phylogrammen zusammengefasst werden (Abb. 3.5–3.7). Aufgrund der Größe der Phylogramme erstrecken sich die 50%-majority-rule-Konsensusbäume der Bayes'schen Analysen der Einzelgen-Datensätze jeweils über drei Seiten. Die Unterstützungswerte aus den NJ- und MP-Analysen sind als Bootstrap-Werte auf die jeweiligen Äste übertragen worden und werden bei der Beschreibung der Bäume in folgender Reihenfolge angegeben: PP=xx/ NJ-BS=xx/ MP-BS=xx. Alle Individuen, die auch in der kombinierten Analyse benutzt werden, sind fett gedruckt. Von den restlichen Individuen fehlen die jeweiligen ITS-, IGS- und/oder RPB1-Sequenzen in ausreichender Qualität. Alle umrandeten Individuen sind zwischen den Einzelgen-Datensätzen inkongruent und wurden daher aus der Gesamtanalyse gestrichen. Die Beschriftung der einzelnen Äste soll die Unstimmigkeiten zwischen morphologischer Zuordnung der Individuen zu bestimmten Arten (Anhang 1) und der Bildung phylogenetischer Gruppen verdeutlichen. Die fettgedruckten Artnamen bezeichnen die phylogenetischen Gruppen, die z. T. erst durch Nachbestimmung benannt werden konnten. Die kleiner gedruckten Artnamen in den dann folgenden Aufzählungen weisen jeweils auf die morphologische Zuordnung hin. Individuenzahlen sind jeweils in Klammern angegeben. Die Gruppen setzen sich z. T. aus Individuen unterschiedlicher Arten zusammen, was eine Nachbestimmung der Proben und Überprüfung der morphologischen Merkmale erforderlich macht.

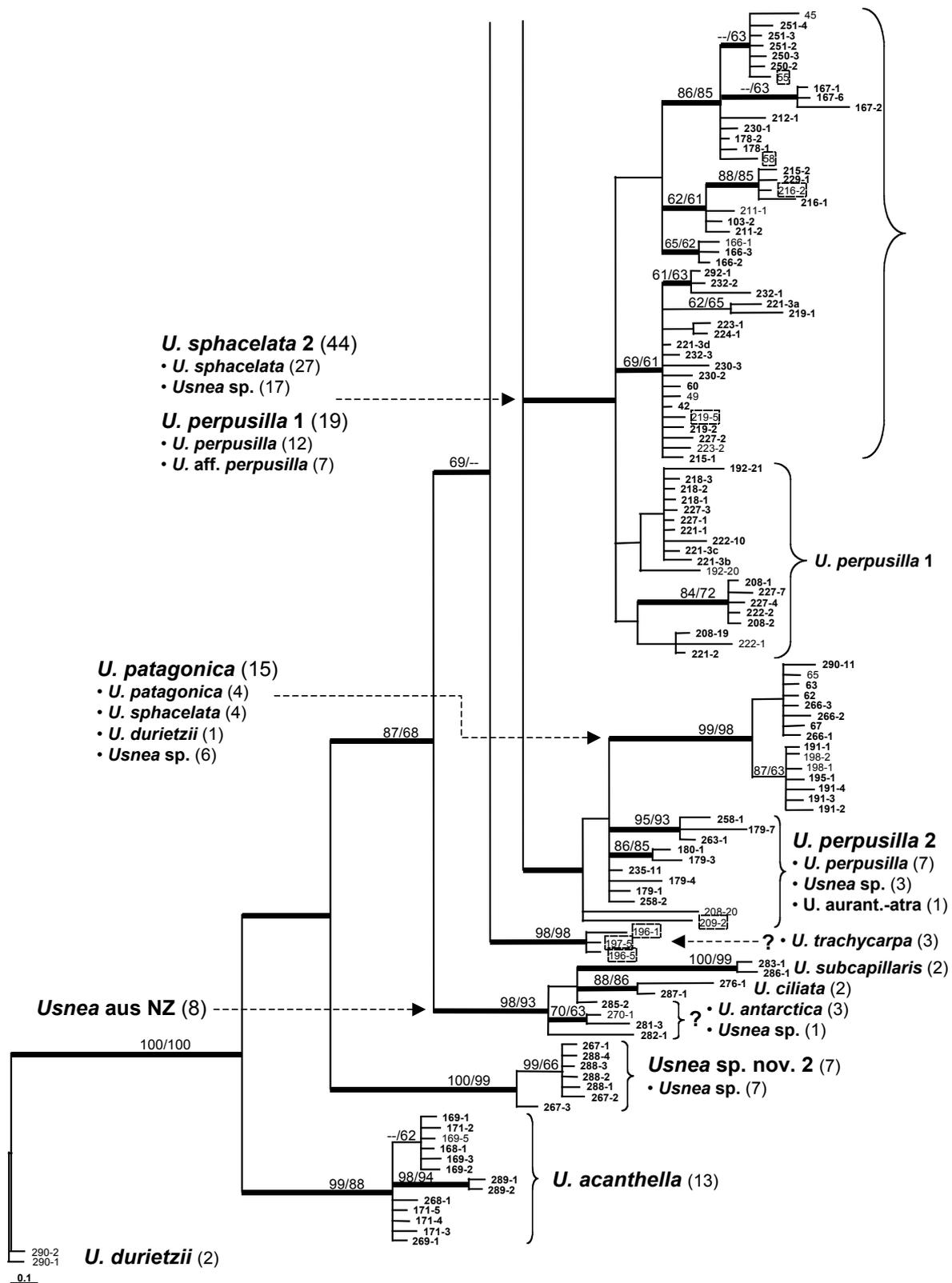


Abb. 3.5-1: 50%-majority-rule Konsensusbaum, beruhend auf den 25.001 Bäumen einer B/MCMC Analyse des nu ITS rDNA-Datensatzes von 371 Taxa. Posterior probabilities  $\geq 0.95$  sind durch fett gedruckte Äste dargestellt. Alle Bootstrap-Werte der NJ- und MP-Analysen  $\geq 60\%$  sind auf die jeweiligen Äste des Bayes'schen Baums geplottet (NJ/MP).

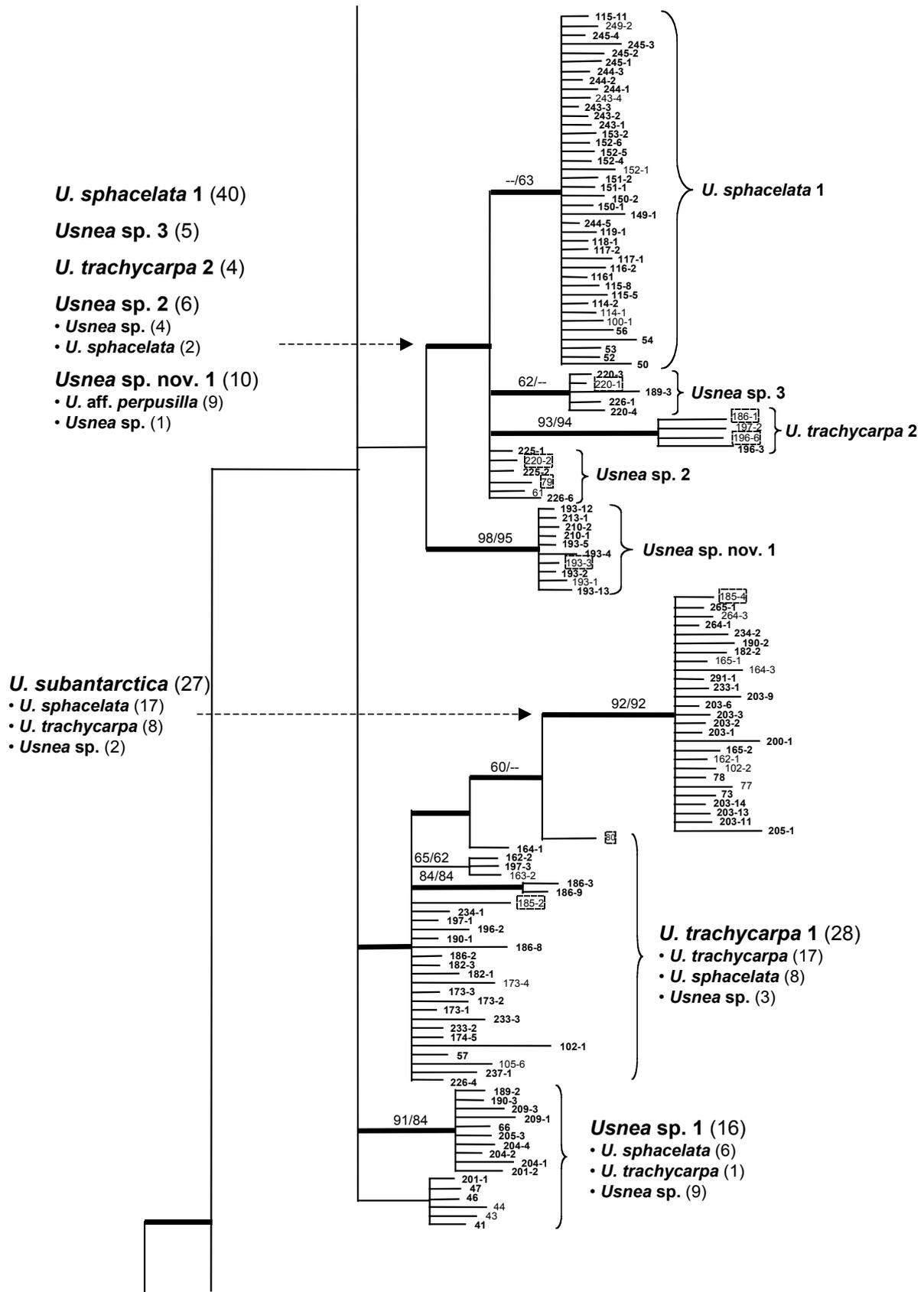


Abb. 3.5-2: 50%-majority-rule Konsensusbaum des nu ITS rDNA-Datensatzes (Fortsetzung).

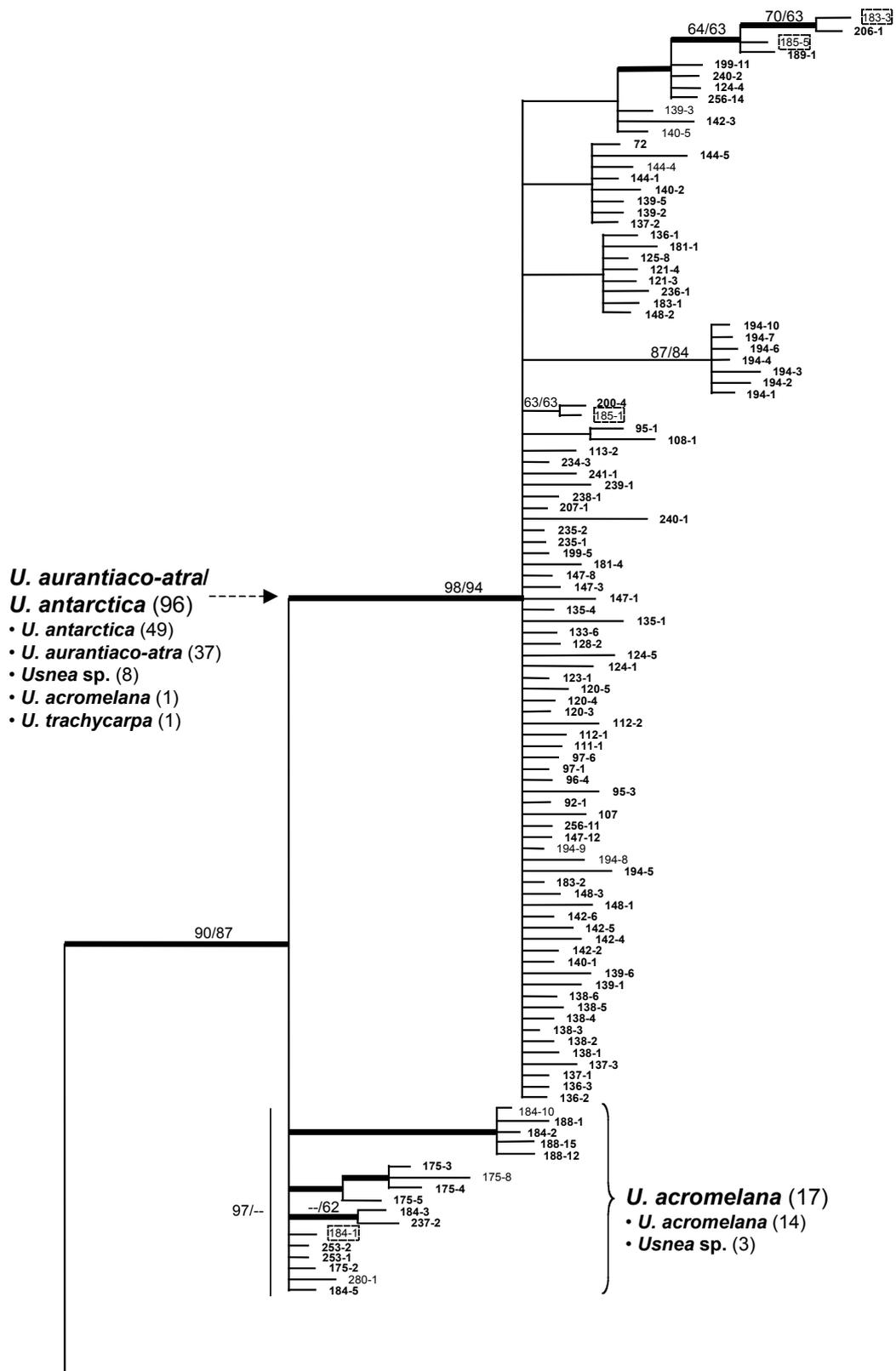


Abb. 3.5-3: 50%-majority-rule Konsensusbaum des nu ITS rDNA-Datensatzes (Fortsetzung).

*ITS-Phylogenie*

In Abbildung 3.5 ist der 50%-majority-rule-Konsensusbaum des ITS-Datensatzes abgebildet. Er untergliedert sich grob in neun größere Gruppen und die Außengruppe, hier *U. durietzii*, die gut unterstützt ist (PP=1.00/ NJ-BS=100%/ MP-BS=100%). Die beiden anderen *Neuropogon* s. lat.-Arten bilden gut unterstützte monophyletische Gruppen, *U. acanthella* (1.00/ 99%/ 88%) und *Usnea* sp. nov. 2 (1.00/ 100%/ 99%). *U. acanthella* steht basal zu *Usnea* sp. nov. 2 (PP=1.00), welche wiederum basal zu den restlichen *Neuropogon*-Arten steht; dies mit einer Unterstützung von PP=1.00, NJ-BS=87% und MP-BS=68%. Die neuseeländischen Individuen bilden wie auch in der phylogenetischen Analyse in Kapitel 2 einen hoch unterstützten monophyletischen Ast basal zu den restlichen *Neuropogon* s. str. (1.00/ 98%/ 93%). Die Artabgrenzung innerhalb dieser Gruppe ist unklar.

Zwar grenzen sich die als *U. subcapillaris* bezeichneten Individuen an einem gut unterstützten Ast ab (1.00/ 100%/ 99%), aber *U. ciliata* (276-1, 287-1, 285-2) ist paraphyletisch und weitere Individuen, die morphologisch hauptsächlich *U. antarctica* zugeordnet wurden, gliedern sich basal dazu. Dem Baum nach oben folgend stehen basal zu den eigentlichen Hauptgruppen drei Individuen, die als *U. trachycarpa* bestimmt wurden (196-1, 197-5 und 196-5), als unterstützte Gruppe zusammen (1.00/ 98%/ 98%). Sie weichen stark von den restlichen *U. trachycarpa*-Sequenzen ab.

Im ITS-Baum ist die Art *U. perpusilla* polyphyletisch. Sieben als *U. perpusilla* bestimmte Individuen (*U. perpusilla* 2) gruppieren sich mit Unterstützung (PP=1.0) basal zu *U. patagonica*, der Großteil der Sequenzen (19) aber fällt in eine große darüber liegende, monophyletische Gruppe (PP=1.00) zusammen mit vielen sorediösen Individuen (*U. sphacelata* 2/ *U. perpusilla* 1). In dieser Gruppe stehen die fertilen Individuen an zwei monophyletischen aber nicht unterstützten Ästen. Alle zumeist sorediösen Individuen fallen in vier mehr oder weniger gut unterstützten Ästen zusammen. Diese Gruppen setzen sich aus nordhemisphärischen und antarktischen *U. sphacelata*-Proben zusammen. Die gut unterstützte, monophyletische Art *U. patagonica* (1.00/ 99%/ 98%) spaltet sich in zwei Schwestergruppen, wobei der untere Ast (87%/63%) ausschließlich patagonische und der obere Ast peruanische und ecuadorianische Individuen enthält.

Im zweiten Teil der Abbildung kann man drei oder vier größere Gruppen erkennen, die an einem gemeinsamen Ast hängen. Im unteren Teil befinden sich zwei sorediöse, als *Usnea* sp. 1 zusammengefasste Gruppen von denen eine gut unterstützt ist (1.00/ 91%/ 84%).

Die Gruppen enthalten einige Individuen, die morphologisch als *U. sphacelata* oder *U. trachycarpa* bestimmt wurden. Der Ast mit den meisten *U. trachycarpa*-Sequenzen (17) befindet sich oberhalb dieser Gruppen (*U. trachycarpa* 1, PP=1.00). Fertile und sorediöse Individuen vermischen sich und stehen aufgefächert an diesem Ast. Eine monophyletische, sehr gut unterstützte Gruppe von 27 Individuen grenzt sich an einem längeren Ast von den restlichen Individuen ab (1.00/ 92%/ 92%). Es handelt sich bei genauerer Untersuchung der Proben um *U. subantarctica*, wobei viele der Proben Affinitäten zu *U. sphacelata* (17) und *U. trachycarpa* (8) zeigen. Innerhalb dieser Gruppe finden sich auch zwei fertile Individuen (264-1, 165-2).

Als dritte große Gruppe des Hauptastes stehen zwei weitere Arten als Schwestergruppen ohne Unterstützung nebeneinander: *Usnea* sp. nov. 1, mit gelben Apothecien und Affinitäten zu *U. perpusilla*, und *U. sphacelata* 1 mit drei basal stehenden Splittergruppen. Basal zu den meist nordhemisphärischen *U. sphacelata*-Proben (PP=1.00/ MP-BS=63) gliedern sich weitgehend unbestimmte *Usnea*-Sequenzen aus Patagonien und Ecuador (*Usnea* sp. 2 und 3), sowie an einem längeren, gut unterstützten Ast vier als *U. trachycarpa* bestimmte Individuen (*U. trachycarpa* 2, 1.00/ 93%/ 94%). Die Schwestergruppe *Usnea* sp. nov. 1 ist eine sehr gut unterstützte, monophyletische Art (1.00/ 98%/ 95%).

Die letzte große monophyletische und gut unterstützte Gruppe fasst die Arten *U. acromelana*, *U. aurantiaco-atra* und *U. antarctica* im oberen Bereich des Phylogrammes zusammen (1.00/ 90%/ 87%). *U. acromelana* ist paraphyletisch, obwohl hoch unterstützt im NJ-Baum (BS=97%), und in drei unterstützte Gruppen gegliedert, die z. T. mit verschiedenen Sammelregionen korrelieren. Die 96 untersuchten Individuen der Arten *U. aurantiaco-atra* und *U. antarctica* bilden einen monophyletischen, sehr gut unterstützten Ast (1.00/ 98%/ 94%) und sind konspezifisch, d.h. nicht in zwei Arten aufzutrennen. Innerhalb der Gruppe gibt es mehrere kleinere, unterstützte Abspaltungen, die nur z. T. mit verschiedenen Standorten übereinstimmen.

### *IGS-Phylogenie*

Die Abbildung 3.6 zeigt den 50%-majority-rule-Konsensusbaum des IGS-Datensatzes. Neben der Außengruppe *U. acanthella* und den beiden weiteren *Neuropogon* s. lat.-Arten, *Usnea* sp. nov. 2 und *U. durietzii*, gruppieren sich die 399 Sequenzen zu acht Gruppen. Dieser monophyletische Cluster von Gruppierungen umfasst alle *Neuropogon* s.str.-Arten und ist stärker als im ITS-Baum unterstützt (1.00/ 98%/ 94%).

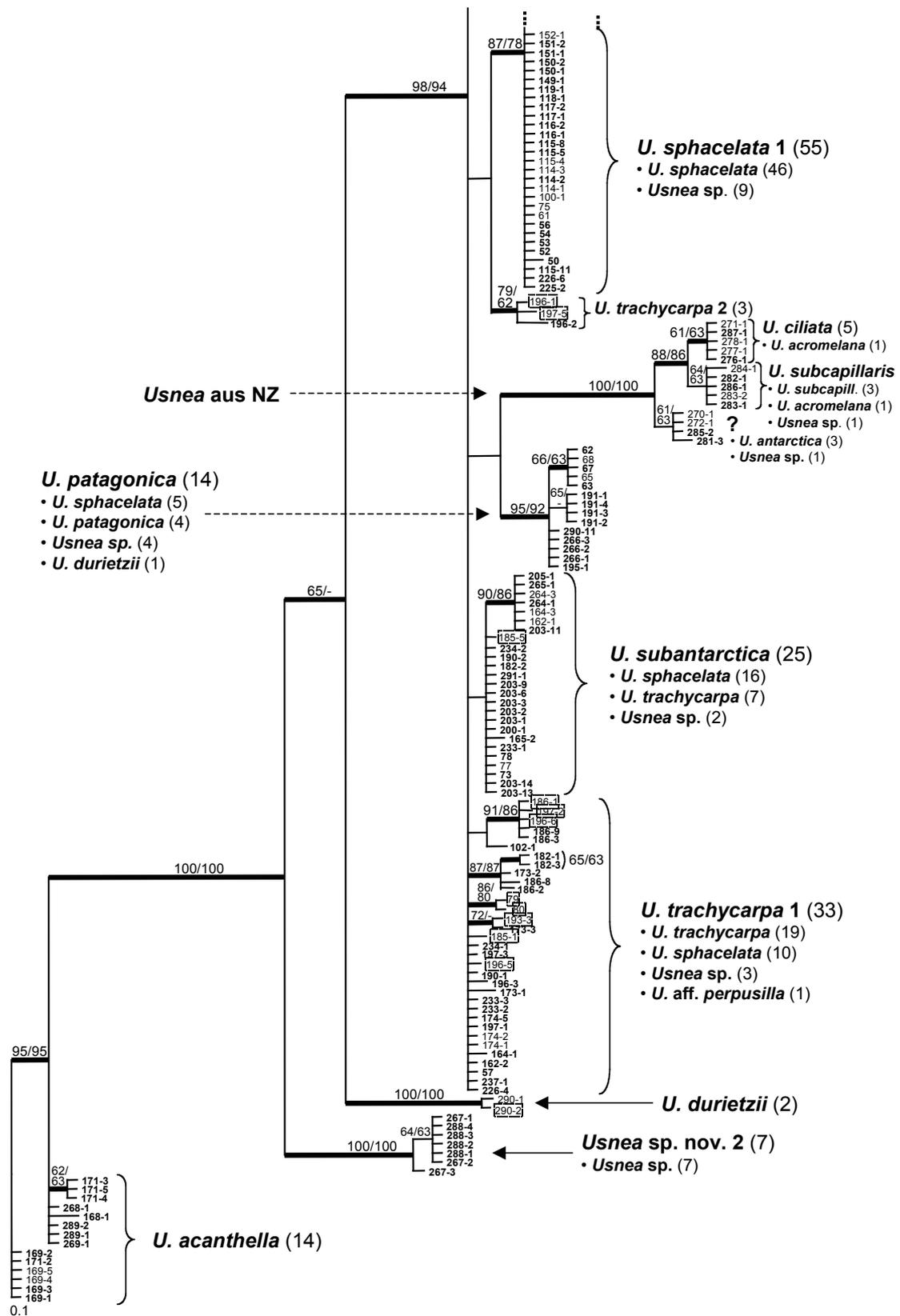


Abb. 3.6-1: 50%-majority-rule Konsensusbaum, beruhend auf den 25.001 Bäumen einer B/MCMC Analyse des nu IGS rDNA-Datensatzes von 399 Taxa. Posterior probabilities  $\geq 0.95$  sind durch fett gedruckte Äste dargestellt. Alle Bootstrap-Werte der NJ- und MP-Analysen  $\geq 60\%$  sind auf die jeweiligen Äste des Bayes'schen Baums geplottet (NJ/MP).

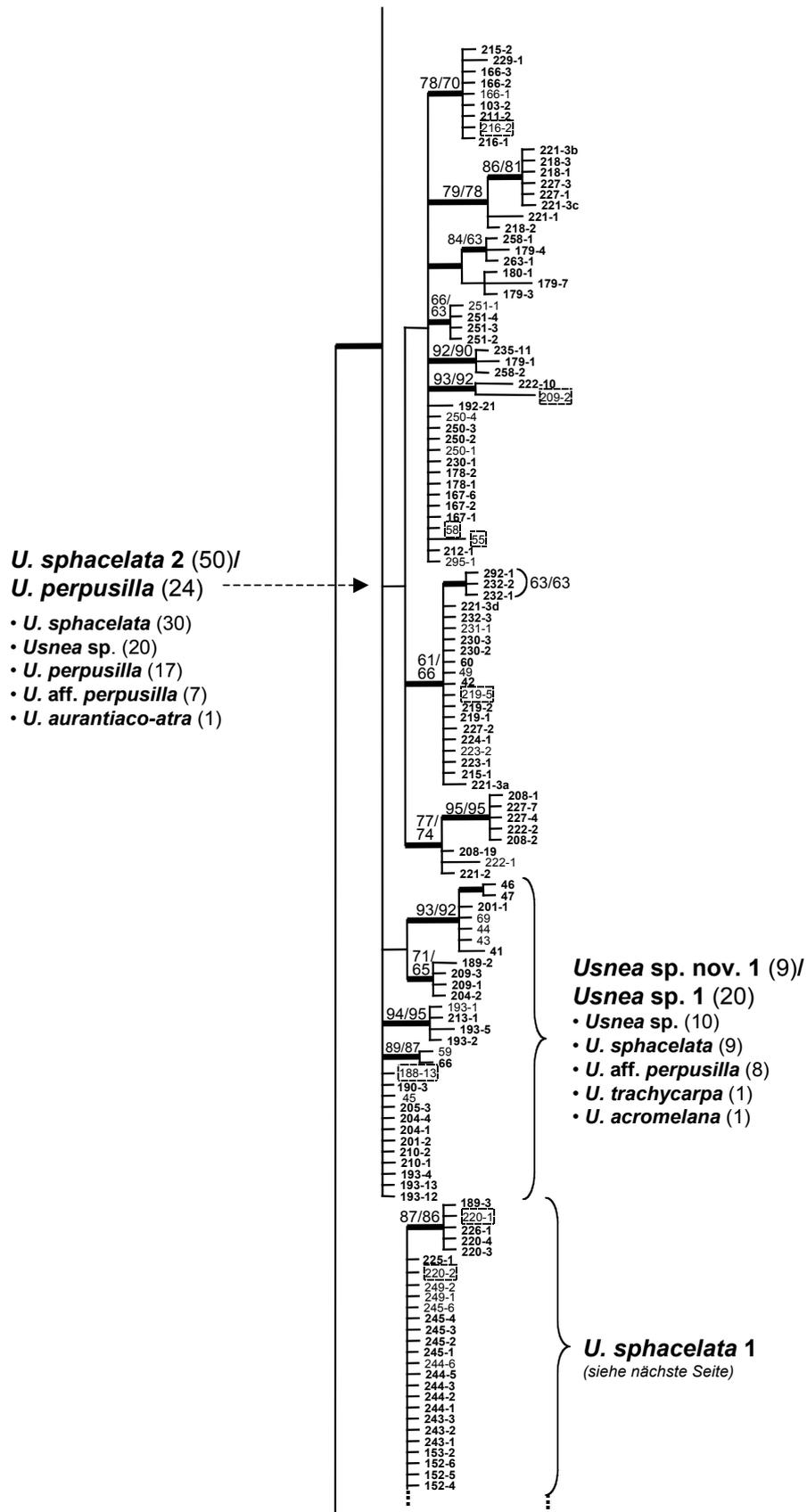


Abb. 3.6-2: 50%-majority-rule Konsensusbaum des nu IGS rDNA-Datensatzes (Fortsetzung).

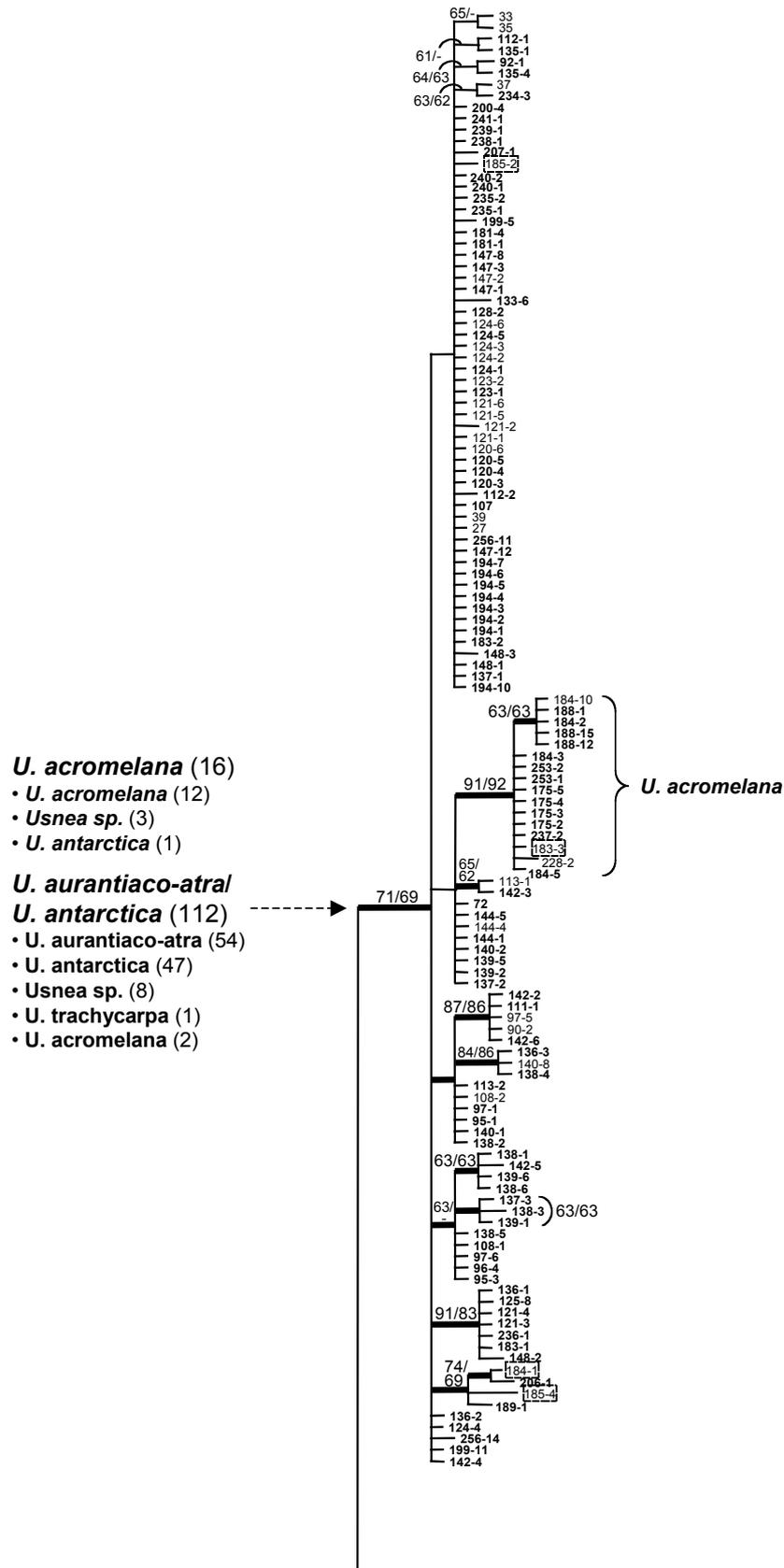


Abb. 3.6-3: 50%-majority-rule Konsensusbaum des nu IGS rDNA-Datensatzes (Fortsetzung).

Alle *Neuropogon* s. lat.-Arten sind sehr gut unterstützte Gruppen: *U. acanthella* (PP=1.00/ NJ-BS=100%/ MP-BS=100%), *Usnea* sp. nov. 2 (1.00/ 100%/ 100%), *U. durietzii* (1.00/ 100%/ 100%), wobei sich die *U. acanthella*-Individuen in zwei unterstützte Gruppen aufspalten, was auf verschiedene Populationen zurückzuführen ist. Die monophyletische neue Art *Usnea* sp. nov. 2 steht basal zur monophyletischen *U. durietzii*. Dieses Verhältnis ist unterstützt (PP=0.99/ NJ-BS=65%). *U. durietzii* ist basal zu dem *Neuropogon* s. str.-Ast.

Innerhalb der *Neuropogon* s. str.-Gruppe gibt es zwei große Gruppen, die auch durch Posterior Probabilities und z. T. durch Bootstrap-Werte abgesichert werden. Basal, mit PP=1.00, NJ-BS=71% und MP-BS=69% unterstützt sind eine polyphyletische *U. trachycarpa*-Gruppe (*U. trachycarpa* 1), *U. subantarctica*, *U. patagonica* (1.00/ 95%/ 92%), die neuseeländischen Individuen (1.00/ 100%/ 100%) und *U. sphacelata* 1 (1.00/ 87%/ 78%), sowie drei *U. trachycarpa*-Individuen (*U. trachycarpa* 2) (0.96/ 79%/ 62%). Die als *U. trachycarpa* 1 bezeichnete Gruppe ist wie im ITS-Datensatz nicht monophyletisch sondern stark aufgefüchert und setzt sich z. T. aus nicht bestimmbaren und auch sorediösen Individuen zusammen. *U. subantarctica* ist zwar monophyletisch, findet in diesem Baum aber keine Unterstützung. Die *U. patagonica*-Individuen bilden eine unterstützte, monophyletische Gruppe, in der die Individuen aus Ecuador an einem eigenen, unterstützten Ast stehen (0.99/ 66%/ 63%). Auch die restlichen Individuen gruppieren sich nach ihren Standorten. *U. patagonica* stellt die Schwestergruppe zu den neuseeländischen Individuen dar, die an einem langen Ast stehen (1.00/ 100%/ 100%). Das Schwestergruppenverhältnis ist nicht unterstützt. Innerhalb der Neuseeland-Gruppe findet sich eine Aufspaltung von *U. ciliata* und *U. subcapillaris*-Individuen, die als Schwestergruppen von einem gemeinsamen, unterstützten Ast ausgehen (1.00/ 88%/ 86%). *U. sphacelata* 1 erstreckt sich über den ersten und zweiten Teil der Abbildung 3.6. Die Sequenzen aller nordhemisphärischen Proben und auch mancher patagonischen Individuen sind identisch und stehen an einem gut unterstützten Ast zusammen (1.00/ 87%/ 78%). Eine Gruppe von drei *U. trachycarpa*-Sequenzen (*U. trachycarpa* 2) steht basal zu *U. sphacelata* 1 (0.96/ 79%/ 62%).

Der zweite große Ast (PP=1.00), besteht aus polyphyletischen *Usnea* sp. nov. 1 und *Usnea* sp. 1-Sequenzen, die basal zu einer monophyletischen Gruppe bestehend aus *U. sphacelata* 2 und *U. perpusilla* stehen. In dieser Gruppe finden sich mehrere unterstützten Gruppierungen fertiler *U. perpusilla*-Individuen und Gruppierungen sorediöser Formen, die zum Großteil als *U. sphacelata* bestimmt wurden.

Abbildung 3.6-3 zeigt den oberen Teil des Baumes mit einer monophyletischen und unterstützten Gruppe bestehend aus *U. aurantiaco-atra*, *U. antarctica* und *U. acromelana* (1.00/ 71%/ 69%). Diese Gruppe setzt sich aus einigen kleineren z. T. unterstützten Splittergruppen zusammen, wobei sich auch im IGS-Datensatz *U. aurantiaco-atra* und *U. antarctica* nicht trennen lassen. *U. acromelana* grenzt sich als signifikant unterstützte, monophyletische Gruppe ab (1.00/ 91%/ 92%), entspringt aber in der Mitte des *U. aurantiaco-atra/ U. antarctica*-Astes mit basal dazu stehenden *U. antarctica*-Sequenzen.

### RPB1-Phylogenie

Das Ergebnis der Bayes'schen Analyse des RPB1-Datensatzes kombiniert mit den Bootstrap-Werten der NJ- und MP-Analyse ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Die Auflösung und Unterstützung der einzelnen Äste ist geringer als bei den beiden anderen Analysen. Die Außengruppe *U. acanthella* ist monophyletisch (NJ-BS=100%/ MP-BS=100%). Die singuläre Sequenz von *U. durietzii* (290-2) fällt mit den Sequenzen der neuseeländischen Individuen zusammen. Basal zu der *Neuropogon* s. str.-Gruppe steht gut unterstützt und monophyletisch *Usnea* sp. nov. 2 (1.00/ 100%/ 100%). Die *Neuropogon* s. str.- sind von den *Neuropogon* s. lat.-Arten getrennt. Der PP-Wert ist nicht signifikant und die NJ- und MP-BS-Werte liegen bei je 100%. *U. acromelana*-Sequenzen sind basal innerhalb von *Neuropogon* s. str.. Alle *U. aurantiaco-atra/ U. antarctica*-Individuen bilden im RPB1-Datensatz eine monophyletische Gruppe. In einer weiteren gleichförmigen Gruppe fallen sehr viele Arten zusammen, die in den anderen beiden Datensätzen aufgelöst wurden. Hier finden sich alle nordhemisphärischen *U. sphacelata* aus den *U. sphacelata* 1-Gruppen der anderen Bäume, weiterhin alle *U. trachycarpa*- und *U. subantarctica*-Proben, ein Teil der *U. perpusilla*-Sequenzen (*U. perpusilla* 2) und *Usnea* sp. nov. 1. Die neuseeländischen Individuen formen eine gut unterstützte und monophyletische Gruppe (1.00/ 90%/ 61%). *U. ciliata* und *U. subcapillaris* haben ein unterstütztes Schwestergruppenverhältnis (1.00/ 91%/ 94%) und sind jeweils hoch unterstützt: *U. ciliata* (0.99/ 99%/ 87%), *U. subcapillaris* (0.99/ 80%/ 95%).

Es gibt *U. antarctica*-ähnliche Individuen, die basal zu den beiden neuseeländischen Arten stehen. In diesem Datensatz steht das einzige *U. durietzii*-Individuum 290-2 basal zu den neuseeländischen Individuen.

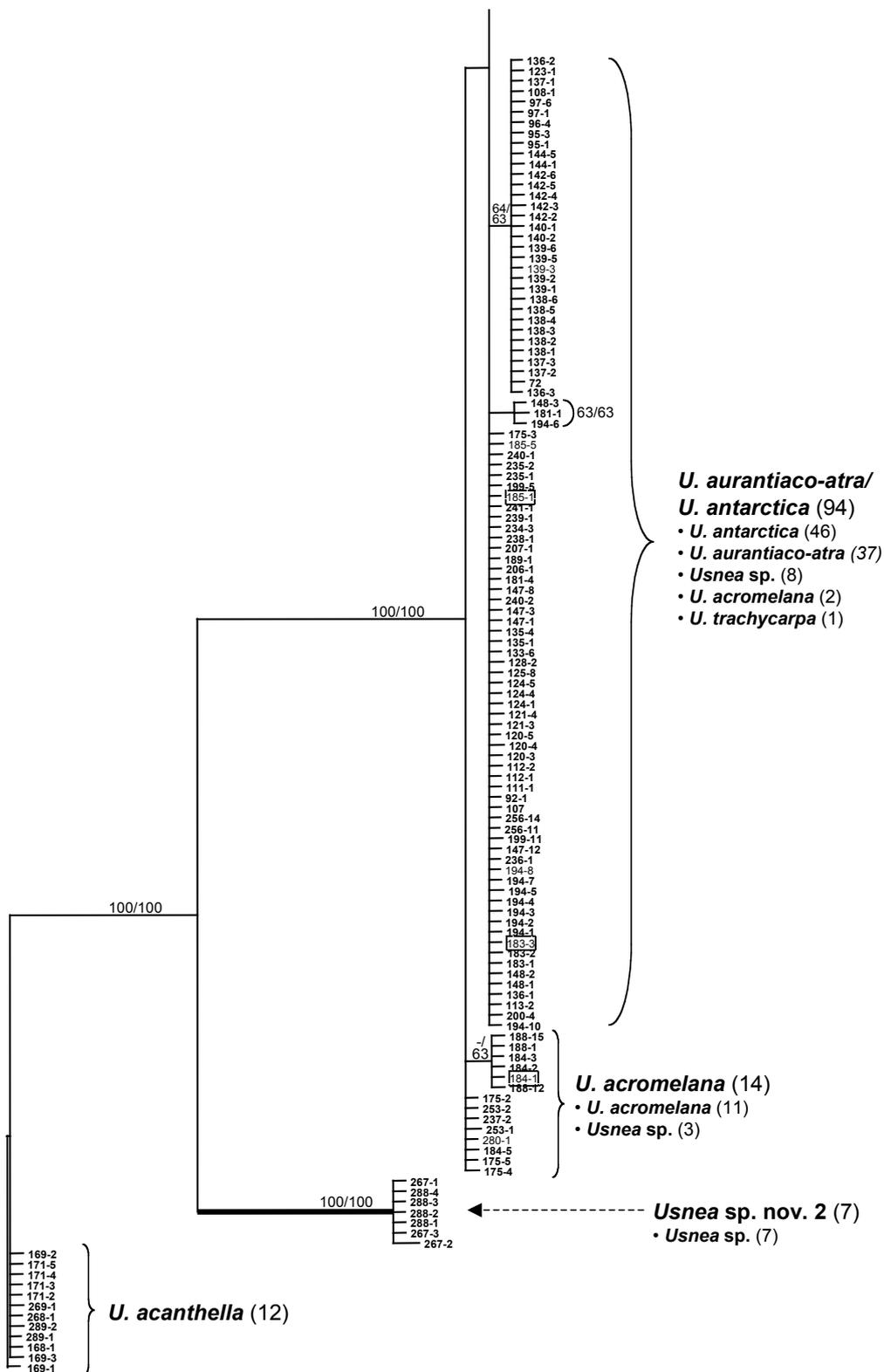


Abb. 3.7-1: 50%-majority-rule Konsensusbaum, beruhend auf den 25.001 Bäumen einer B/MCMC Analyse eines Sequenzabschnitts des proteincodierenden Gens RPB1. Der Datensatz umfasst 350 Taxa. Posterior probabilities  $\geq 0.95$  sind durch fett gedruckte Äste dargestellt. Alle Bootstrap-Werte der NJ- und MP-Analysen  $\geq 60\%$  sind auf die jeweiligen Äste des Bayes'schen Baums geplottet (NJ/MP).

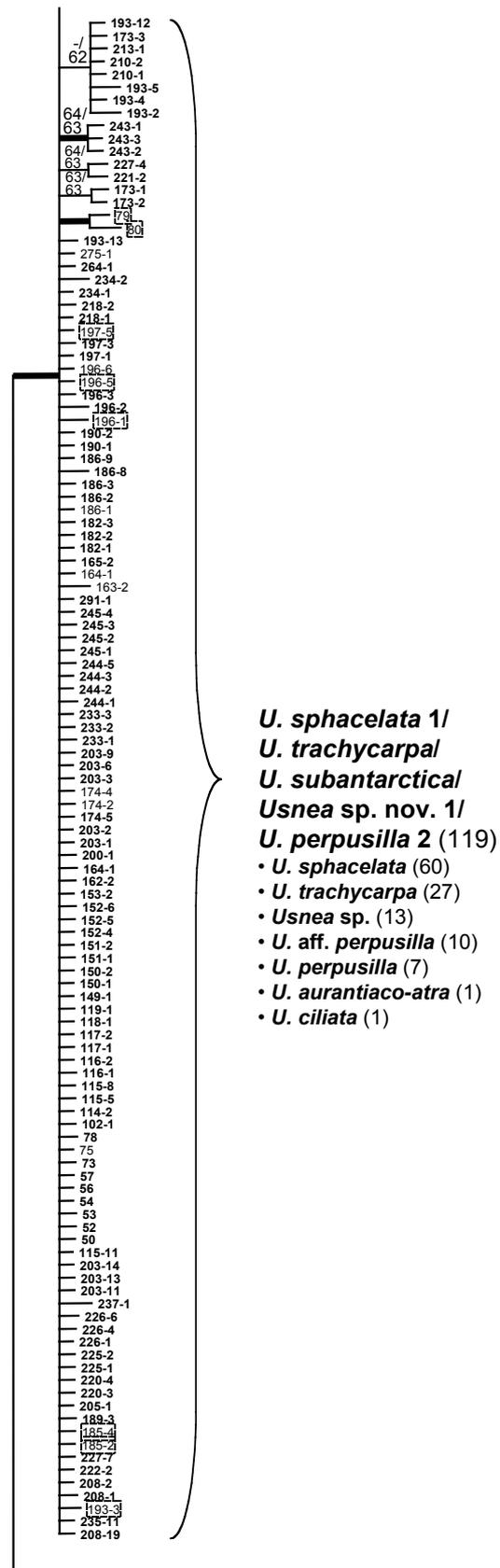


Abb. 3.7-2: 50%-majority-rule Konsensusbaum des proteincodierenden Gens RPB1 (Fortsetzung).

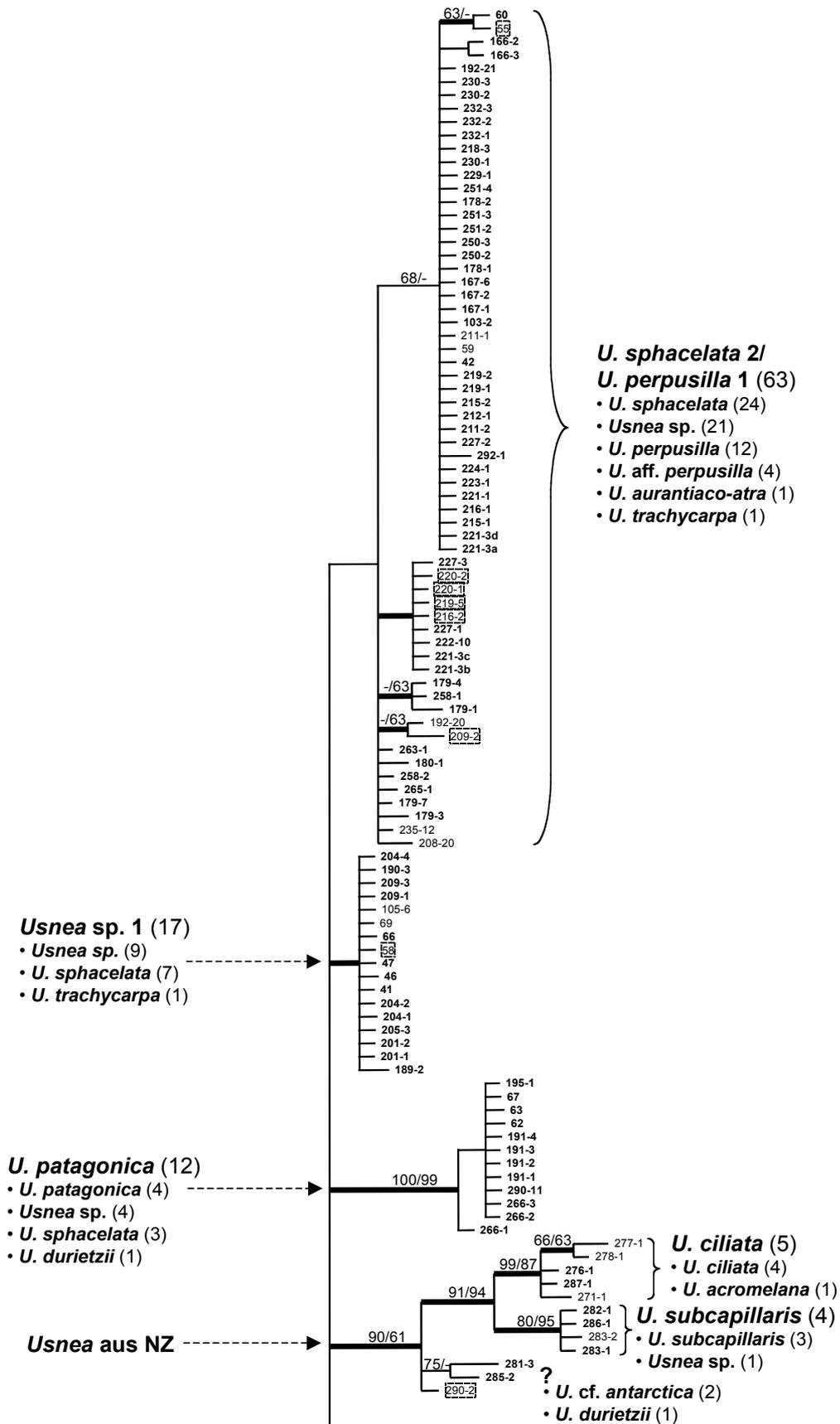


Abb. 3.7-3: 50%-majority-rule Konsensusbaum des proteincodierenden Gens RPB1 (Fortsetzung).

Eine weitere gut umgrenzte monophyletische Gruppe wird von den *U. patagonica*-Sequenzen gebildet (1.00/ 100%/ 99%). Am gleichen Ast befindet sich eine monophyletische Gruppe sorediöser Proben, die wie im ITS-Datensatz mit *Usnea* sp. 1 bezeichnet wird (PP=0.99). Im oberen Teil der Abbildung 3.7-3 findet sich eine monophyletische, gemischte Gruppe (*U. sphacelata* 2/*U. perpusilla* 1). Sie besteht aus *U. perpusilla*-Individuen (16) sowie antarktischen und nordhemisphärischen *U. sphacelata*-Individuen (24). Eine homogene Gruppierung innerhalb dieses Astes besteht hauptsächlich aus sorediösen Individuen (*U. sphacelata* und *Usnea* sp.) und ist monophyletisch (NJ-BS=68%). Dazu basal stehen hauptsächlich fertile Individuen (*U. perpusilla*, *U. aff. perpusilla*). Eine weitere monophyletische und unterstützte Gruppe (PP=0.97) mit sorediösen (4) und sexuell reproduzierenden Individuen (5) hebt sich von den basal stehenden Individuen ab.

#### A-3.1.3 Kongruenz der Datensätze

Vor der Kombination der Datensätze wurde ihre Kongruenz überprüft. Nach dem Test von BUCKLEY et al. (2002) wurden 95%-Konsensusbäume der Einzelgen-Datensätze miteinander verglichen. Vorkommen eines Individuums in unterschiedlichen signifikant unterstützten Gruppierungen führte normalerweise zum Ausschluss aus dem kombinierten Datensatz, mit Ausnahme der Außengruppen *U. acanthella* und *Usnea* sp. nov. 2. In den Einzelgen-Phylogrammen Abb. 3.5-3.7 wurden alle Individuen mit inkongruenter Stellung umrandet dargestellt.

Alle weiteren Individuen, die in dem kombinierten Baum fehlen, haben entweder zu kurze Sequenzen oder nur ein oder zwei der drei Gene konnten generiert werden. Der vollständige kombinierte Datensatz beinhaltet 308 Individuen.

#### A-3.1.4 Rekombinationstest

Der Rekombinationstest GENECONV (SAWYER 1999), der mit dem bereits kombinierten Datensatz von 308 Individuen durchgeführt wurde, lieferte keine signifikanten globalen P-Werte und fand im Alignment keine signifikanten internen oder externen Fragmente, welche auf Rekombinationsereignisse hinweisen würden (SAWYER 1999). In Tabelle 3.3 ist das Ergebnis dieses Tests zusammengefasst.

Tab. 3.3: Ergebnis des Rekombinationstests mit der Nullhypothese: „Keine Rekombinationsevents im Datensatz“ bzw. „zufällige Verteilung der variablen Positionen im Alignment“.

	Alignment-interne Fragmente	Alignment-externe Fragmente
maximale BLAST-ähnliche Treffer	10.493	4.209
globaler P-Wert	0,237 <sup>NS</sup>	0,192 <sup>NS</sup>

Die globalen P-Werte basieren auf 10.000 Permutationen (NS= nicht signifikant).

### A-3.2 Phylogenie aufgrund des kombinierten Datensatzes

#### A-3.2.1 Sequenzdaten

Eine Auflistung der 308 für die kombinierte Analyse verwendeten Individuen mit Standortangaben geordnet nach Populationen, geographischen Koordinaten und Sammlern findet sich in Anhang 2. Die Einzelgen-Alignments wurden wie in Kapitel 2.3.5.1 beschrieben erstellt und zu einem Gesamtdatensatz mit einer Länge von 1574 bp zusammengefügt (383 bp IGS, 526 bp ITS und 665 bp RPB1). 336 Alignment-Positionen waren variabel, davon 276 ‚parsimony-informativ‘. Das spliceosomal Intron des RPB1-Gens wurde nicht entfernt, da es in allen Sequenzen vorlag.

Als Außengruppe der phylogenetischen Analysen wurde ein Individuum von *U. acanthella* (168-1) genutzt, da *U. durietzii* nicht im Datensatz vorhanden war und *U. acanthella* im ungewurzelten Baum am weitesten von den restlichen Arten entfernt stand.

#### A-3.2.2 Phylogenetische Analyse

Wie in den Einzelgen-Analysen wird der 50%-majority-rule-Konsensusbaum der Bayes'schen Analyse abgebildet, auf den die NJ- und MP-Bootstrap-Werte aufgetragen sind. Es gab keine signifikanten Inkongruenzen zwischen den Topologien der drei Analysemethoden. In Abb. 3.8 ist eine Übersicht über den Baum gegeben. Man kann deutlich erkennen, dass sich das Phylogramm in drei große Gruppen und vier basal dazu stehende, kleinere Gruppen aufteilt. Bei den basalen Gruppen handelt es sich um die Außengruppe *U. acanthella*, *Usnea* sp. nov. 2 aus Peru, die neuseeländischen Individuen und *U. patagonica*. Die drei Großgruppen, werden hier nach den fertilen Arten als *U. trachycarpa*-, *U. perpusilla*- und *U. aurantiaco-atra*-Gruppe bezeichnet. Bis auf die *U. aurantiaco-atra*-Gruppe sind diese nicht signifikant unterstützt. In Abbildung 3.9-1-4 werden die drei Gruppen und die Außengruppen ausführlich dargestellt.

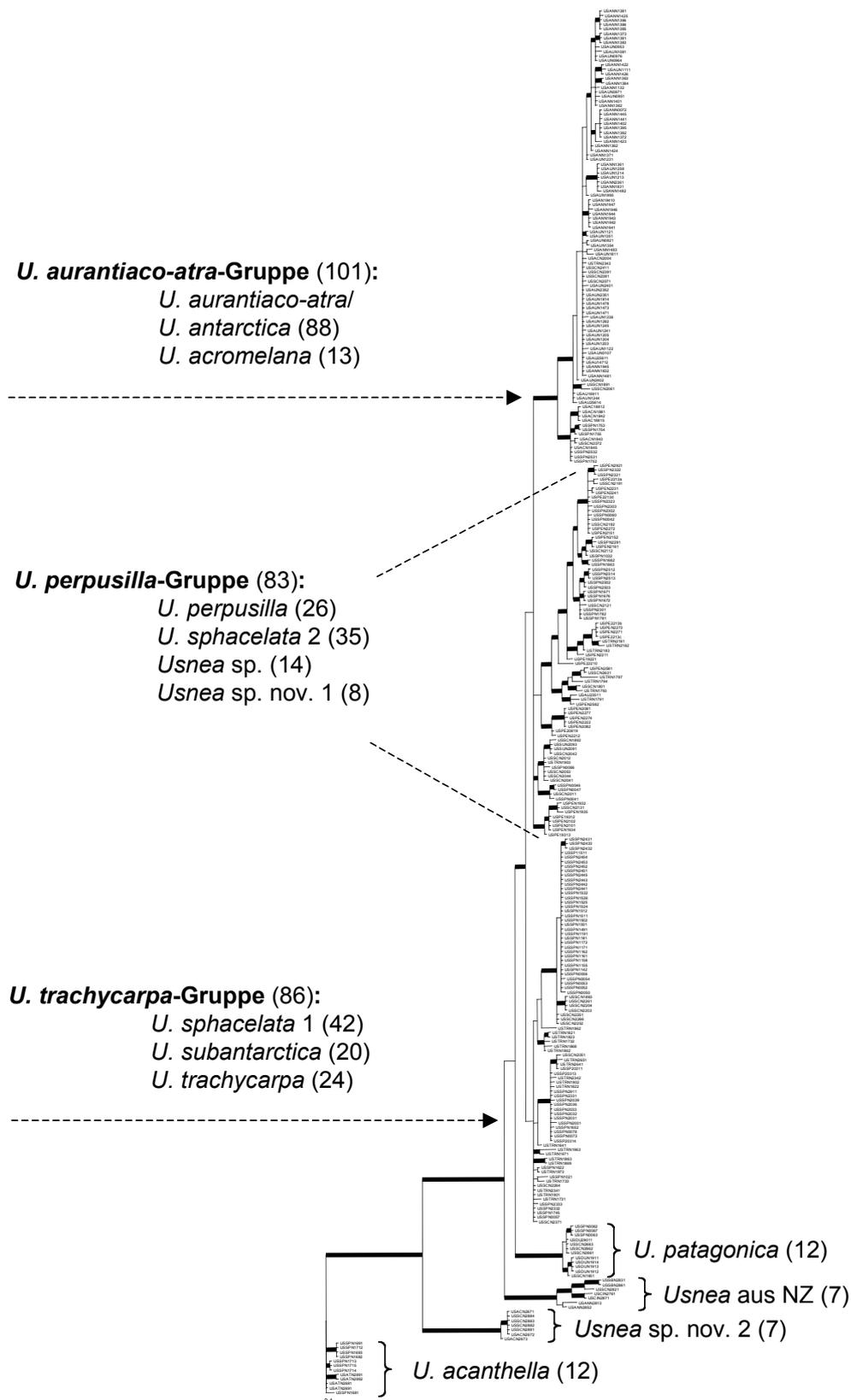


Abb. 3.8: Übersicht über den 50%-majority-rule Konsensusbaum, beruhend auf den 36.001 Bäumen einer B/MCMC Analyse des kombinierten Datensatzes aus IGS, ITS und RPB1. Der Datensatz umfasst 308 Taxa. Posterior probabilities  $\geq 0.95$  sind durch fett gedruckte Äste dargestellt.

Bei den vier basal stehenden Gruppen im ersten Teil der Abb. 3.9 handelt es sich jeweils um sehr gut unterstützte (PP=1.00/ NJ-BS=100%/ MP-BS=100%), monophyletische Arten, bzw. einen Artkomplex im Falle der neuseeländischen Individuen. Die Außengruppe *U. acanthella* untergliedert sich intern in zwei unterstützte Äste mit ecuadorianischen Individuen (169-1 bis 171-5), einen gut unterstützten Ast mit Individuen aus der Region Ancash (Peru) (289-1/-2) und basal in zwei peruanische Individuen (268-1, 269-1) aus der Region Cusco und ein weiteres Individuum aus Ecuador (168-1). Alle Individuen haben helle Isidiomorphe und unpigmentierte, schwach ausgebildete Sorale.

Die Individuen von *Usnea* sp. nov. 2, sind alle in den hohen Anden in Ancash (Peru) gesammelt und homogen. Die Proben haben keine Sorale aber pigmentierte isidiomorphe Auswüchse.

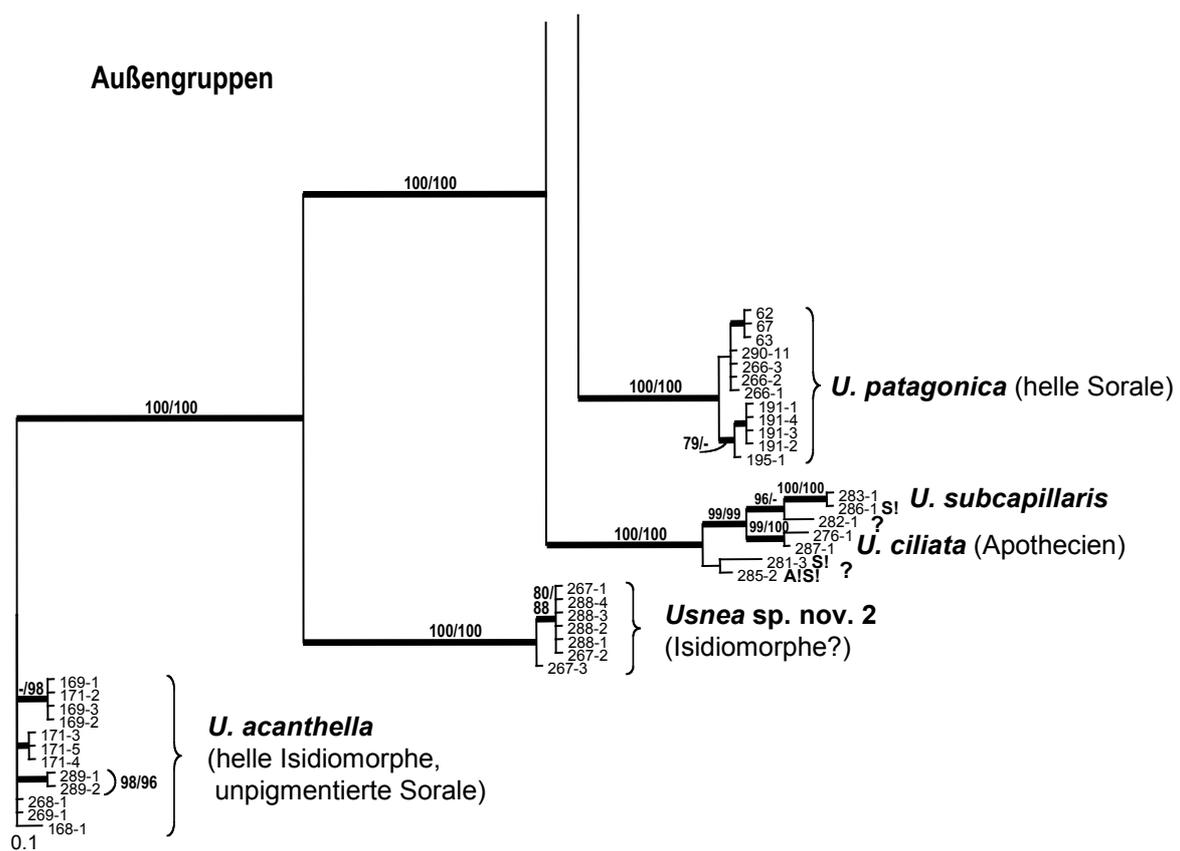


Abb. 3.9-1: 50%-majority-rule Konsensusbaum, beruhend auf den 36.001 Bäumen einer B/MCMC Analyse des kombinierten Datensatzes aus IGS, ITS und RPB1. Der Datensatz umfasst 308 Taxa. Posterior probabilities  $\geq 0.95$  sind durch fett gedruckte Äste verdeutlicht. Alle Bootstrap-Werte der NJ- und MP-Analysen  $\geq 70\%$  sind auf die jeweiligen Äste des Bayes'schen Baums geplottet (NJ/MP). Abkürzungen: Apothecien = A!, Sorale = S!, A1\*/S!\*= trifft für den ganzen Ast zu.

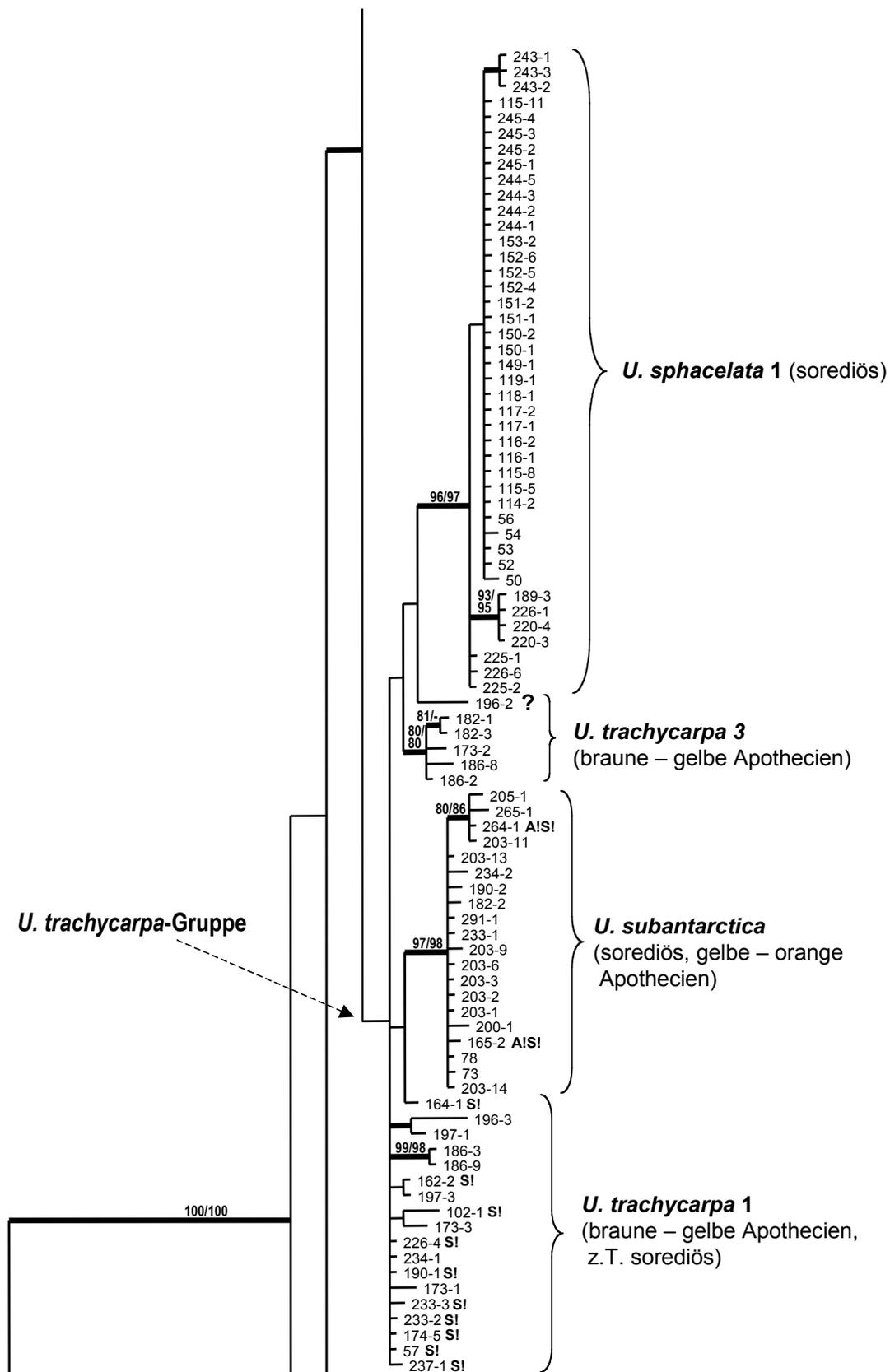


Abb. 3.9-2: 50%-majority-rule Konsensusbaum, beruhend auf den 36.001 Bäumen einer B/MCMC Analyse des kombinierten Datensatzes aus IGS, ITS und RPB1 (Fortsetzung).

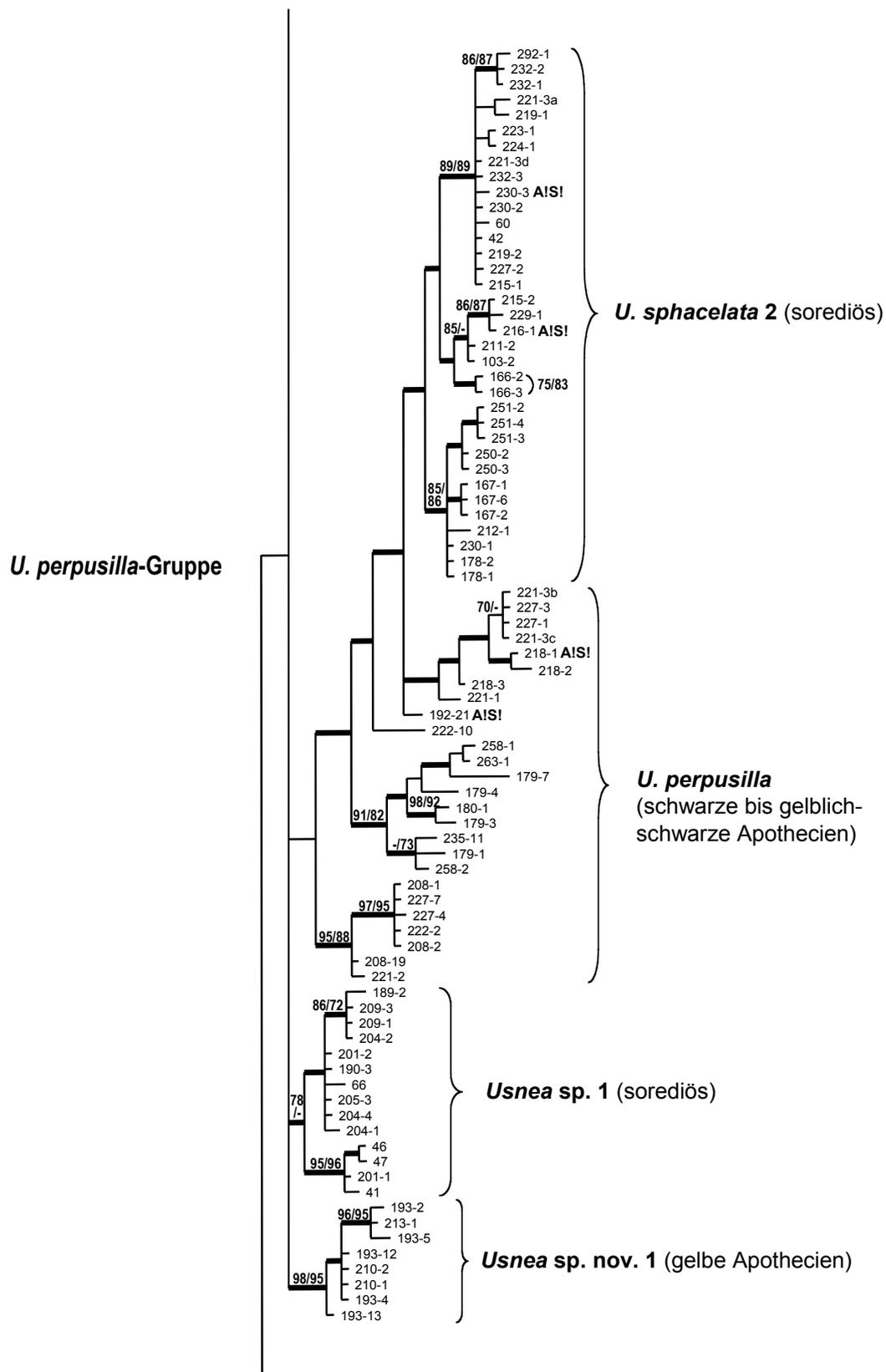


Abb. 3.9-3: 50%-majority-rule Konsensusbaum, beruhend auf den 36.001 Bäumen einer B/MCMC Analyse des kombinierten Datensatzes aus IGS, ITS und RPB1 (Fortsetzung).

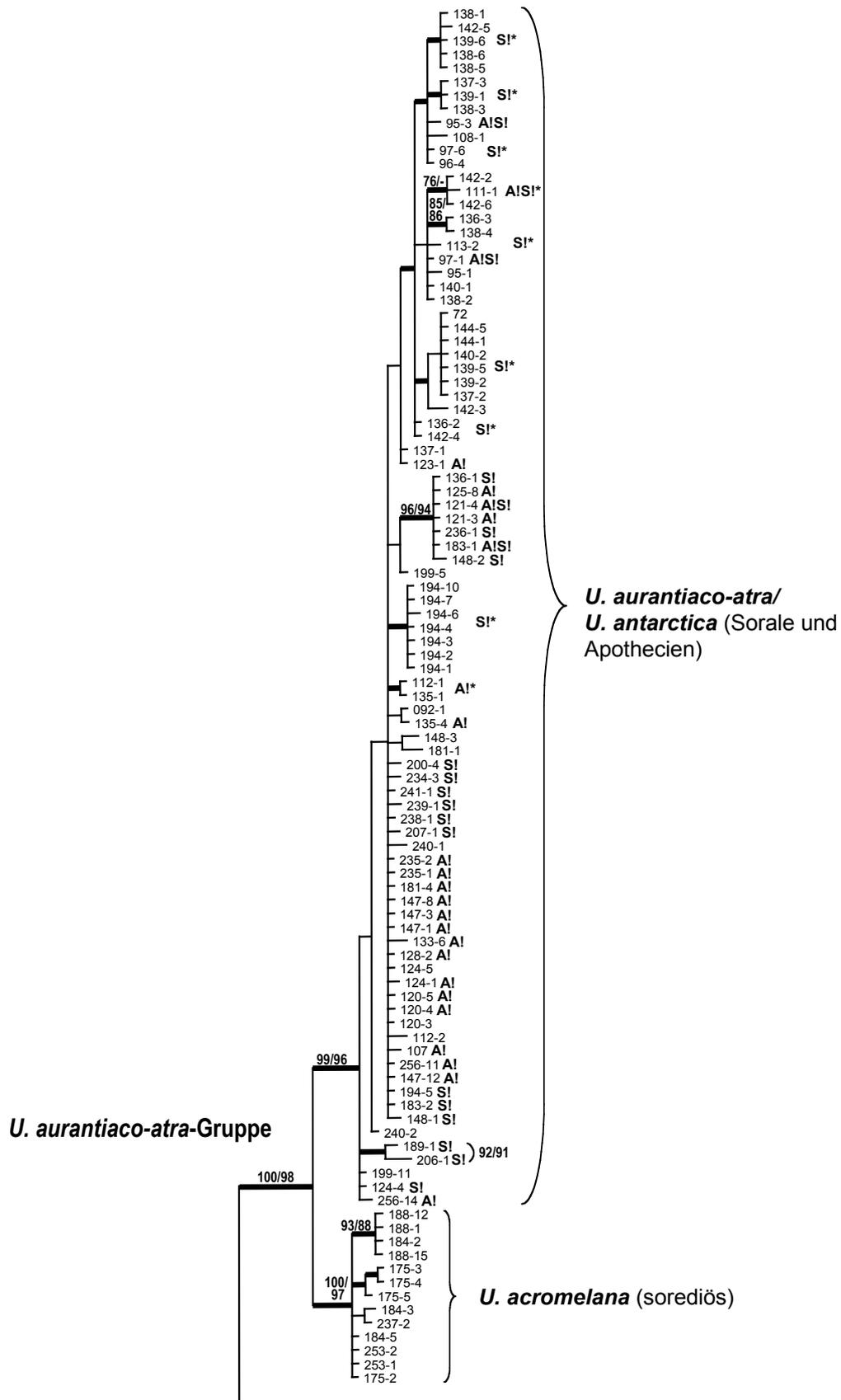


Abb. 3.9-4: 50%-majority-rule Konsensusbaum, beruhend auf den 36.001 Bäumen einer B/MCMC Analyse des kombinierten Datensatzes aus IGS, ITS und RPB1 (Fortsetzung).

*Neuropogon* s. str. ist eine hoch unterstützte monophyletische Gruppe (1.00/ 100%/ 100%). In der *Neuropogon* s. str.-Gruppe stehen basal zu den drei Großgruppen der neuseeländische Artkomplex und *U. patagonica*. Die neuseeländischen Individuen gruppieren sich zu drei z. T. unterstützten Gruppen zusammen. Die Artgrenzen sind hier unklar. *U. subcapillaris* ist hoch unterstützt (1.00/ 100%/ 100%), aber basal zu diesem Ast steht ein einzelnes Individuum (282-1), welches nicht bestimmt werden konnte. *U. ciliata* ist die hoch unterstützte (1.00/ 99%/ 100%) Schwestergruppe zu *U. subcapillaris* (1.00/ 99%/ 99%). Basal zu diesem Schwestergruppenverhältnis kommen weitere Individuen sowohl mit Soralen (281-3) als auch Apothecien und Soralen (285-2) vor.

Die hell-sorediöse *U. patagonica* gliedert sich intern in zwei Schwestergruppen. Zum einen gruppieren sich Individuen zweier Standorte aus Santa Cruz, Patagonien (191-n, 195-1) zusammen (0.99/ 79%/ -), zum anderen ecuadorianische (62-67) (PP=1.00) und peruanische (266-n, 290-11) Proben. Die basale Stellung zu den Großgruppen ist unterstützt (PP=1.00).

Im zweiten Teil der Abbildung (Abb. 3.9-2) ist die *U. trachycarpa*-Gruppe abgebildet. Diese Gruppe ist monophyletisch, aber nicht unterstützt. In dieser Gruppe stehen *U. trachycarpa* 1 und 3, *U. subantarctica* und *U. sphacelata* 1 ohne geklärte verwandtschaftliche Beziehungen nebeneinander. Die einzelnen Arten sind z. T. unterstützt. *U. trachycarpa* ist eine polyphyletische Gruppe mit einem Großteil der Individuen unaufgelöst und basal zu *U. subantarctica* und einer kleinen Gruppe von sechs Individuen basal zu *U. sphacelata* 1. Nicht alle Individuen der *U. trachycarpa* 1-Gruppe haben bräunliche Apothecien, sondern sie vermischen sich mit sorediösen Formen (S!). Alle antarktischen Individuen sind stets sorediös. Bis auf drei sorediöse Proben (190-1, 226-4, 237-1) sind alle patagonischen Individuen stets fertil und das ecuadorianische Individuum (57) ist sorediös. Bei *U. subantarctica* bilden sorediöse Individuen mit zwei Proben, die zusätzlich auch gelborange Apothecien haben (A!S!), eine gut unterstützte, monophyletische Gruppe (1.00/ 97%/ 98%). Die fertilen Proben stammen von einer antarktischen Insel (Lagoon Isl.) (165-2), und aus Feuerland (264-1). Die restlichen Proben sind aus Patagonien, Feuerland oder aus der Antarktis. Vier Individuen aus Feuerland und Patagonien schließen sich zu einer kleinen unterstützten Gruppe zusammen (1.00/ 80%/ 86%). Die Probe 164-1 nimmt eine Zwischenstellung zwischen *U. trachycarpa* 1 und *U. subantarctica* ein.

Die Gruppe *U. trachycarpa* 3 setzt sich aus Individuen mit braunen bis gelben Apothecien zusammen und ist bis auf ein Individuum (196-2) gut unterstützt (1.00/ 80%/ 80%). 196-2

steht basal zur *U. sphacelata* 1-Gruppe, ist nicht fertil und trägt keine amphigenen Diasporen (Sorale). Alle Proben stammen aus Feuerland und Patagonien.

Gut unterstützt als monophyletische Gruppe (1.00/ 96%/ 97%) ist die rein sorediöse *U. sphacelata* 1-Gruppe. Es gibt innerhalb dieses Astes einige Untergruppen, die z. T. mit der geographischen Herkunft der Proben korrelieren. Die größte, sehr homogene Gruppe an dem nicht unterstützten Ast, setzt sich aus arktischen und ecuadorianischen Proben zusammen. Davon grenzen sich drei grönländische Proben ab (243-1, -2, -3) (PP=0.98). Basal zu dieser großen Gruppe stehen alle patagonischen Proben, vier davon an einem gut unterstützten Ast (1.00/ 93%/ 95%).

Die *U. perpusilla*-Gruppe mit vier Untergruppen ist im nächsten Teil des Baumes (Abb. 3.9-3) abgebildet. Basal zu einem großen Ast, in dem sorediöse Individuen von *U. sphacelata* 2 und fertile Individuen von *U. perpusilla* zusammenstehen, finden sich zwei kleinere, jeweils monophyletische und unterstützte Gruppen. Es handelt sich zum einen um *Usnea* sp. nov. 1 aus Patagonien, mit zumeist fertilen Individuen mit blassgelben Apothecien (1.00/ 98%/ 95%) und zum andern um eine unbestimmte Gruppe sorediöser Individuen (0.98/ 78%/ -). Alle Individuen der *Usnea* sp. nov. 1-Gruppe wurden an einem Standort in Patagonien gesammelt. Die nah verwandte, ausnahmslos sorediöse Gruppe, *Usnea* sp. 1, setzt sich aus patagonischen und ecuadorianischen Individuen zusammen, die sich aber nicht vollständig in den beiden Äste des unterstützten Schwestergruppenverhältnisses separieren. Im unteren Ast (1.00/ 95%/ 96%) kommen drei ecuadorianische (41-47) und eine patagonische Probe vor und im oberen Ast (PP=1.00) hauptsächlich Proben aus Patagonien und nur eine Probe aus Ecuador (66).

Die fertilen *U. perpusilla*-Individuen stehen basal zu sorediösen *U. sphacelata* 2-Individuen und spalten sich in drei unterstützte Gruppen und zwei weitere Individuen auf. Die erste Gruppe (1.00/ 95%/ 88%) besteht aus sieben fertilen Proben mit z. T. gelblich-schwarzen Apothecien, von denen zwei basal zu den restlichen stehen (1.00/ 97%/ 95%). Alle wurden in Patagonien am gleichen Standort gesammelt. Die zweite Gruppe (1.00/ 91%/ 82%) besteht aus sieben fertilen Proben mit rein schwarzen Apothecien und zwei Proben ohne erkennbare Reproduktionsorgane (180-1, 263-1). Alle Proben sind aus Feuerland. Sie sind untergliedert in mehrere unterstützte Äste. Diese Gruppe bildet die Schwestergruppe (PP=1.00) zur dritten *U. perpusilla*-Gruppe und *U. sphacelata* 2. Basal zu dieser Schwestergruppe steht ein fertiles Individuum mit gelblichen bis schwarzen Apothecien (222-10). Die dritte *U. perpusilla*-Gruppe ist unterstützt (PP=1.00) und besteht aus fertilen Individuen mit meist schwarzen aber

z. T. auch gelblichen Apothecien und einem Individuum mit zusätzlichen Soralen (218-1). Aus dieser *U. perpusilla*-Gruppe fällt ein weiteres Individuum sowohl mit Apothecien als auch Soralen heraus und hängt basal an (192-21). Alle Proben wurden in Patagonien gesammelt.

*U. sphacelata* 2 steht innerhalb der fertilen *U. perpusilla* und ist eine mäßig unterstützte Gruppe (PP=0.99). Innerhalb der Gruppe gibt es mehrere gut unterstützte Äste. Alle nordhemisphärischen Individuen aus den USA und eine Gruppe kontinental-antarktischer Proben (167-n) stehen hoch unterstützt zusammen (1.00/ 85%/ 86%). Die Proben aus Washington (251-n) und Oregon (250-2,-3) grenzen sich ab (PP=0.99). Die Gruppe kontinental-antarktischer Proben steht zusammen (PP=0.97) und basal stehen vier Individuen, aus Patagonien (212-1), der australischen Antarktis (178-1,-2) und der antarktischen Halbinsel (230-1). Ein unterstütztes Schwestergruppenverhältnis (PP=0.95) bilden zwei weitere, jeweils unterstützte Gruppen. Die kontinental-antarktischen Individuen (166-2, -3) bilden eine Einheit (1.00/ 75%/ 83%) und bilden eine Schwestergruppe zu patagonischen und antarktische Proben (0.98/ 85%/ -). Das patagonische Individuum 216-1, mit Soralen und schwarz-gelblichen Apothecien steht in einer gut unterstützten Gruppe mit sorediösen Proben (1.00/ 86%/ 87%).

Die Schwestergruppe dazu ist gut unterstützt (1.00/ 89%/ 89%), homogen und enthält Individuen aus Patagonien, der Antarktis und Ecuador. Auch hier findet sich eine Probe mit Soralen und schwarz-gelblichen Apothecien (230-3) aus der Antarktis. Eine rein antarktische Gruppe ist abgeleitet innerhalb des Astes (1.00/ 86%/ 87%).

Die *U. aurantiaco-atra*-Gruppe (Abb. 3.9-4) enthält die Arten *U. aurantiaco-atra*, *U. antarctica* und *U. acromelana* und ist die einzige gut unterstützte Großgruppe dieses Phylogramms (1.00/ 100%/ 98%). *U. aurantiaco-atra*/ *U. antarctica* und *U. acromelana* sind Schwestergruppen. Die sorediöse Art *U. acromelana* ist hoch unterstützt (1.00/ 100%/ 97%). Ein gut unterstützter Ast umfasst alle *U. acromelana*-Proben aus der Region Santa Cruz, Patagonien (188-n) und eine Probe aus Feuerland 184-2 (1.00/ 93%/ 88%). Alle anderen Individuen, die basal dazu stehen, wurden in Feuerland gesammelt.

*U. aurantiaco-atra* und *U. antarctica* sind auch im kombinierten Datensatz nicht getrennt und erscheinen in einer sehr gut unterstützten monophyletischen Gruppe (1.00/ 99%/ 96%). Sorediöse und fertile Proben bilden keine getrennten Gruppen, obwohl einige Äste nur sorediöse (S!) oder nur sexuell reproduzierende (A!) Individuen beinhalten (bei komplett sorediösen oder fertilen Ästen mit \* bezeichnet). Sorediöse Individuen aus der Antarktis und

angrenzender Inseln finden sich eher im oberen Teil der Abbildung 3.9-4, fertile Individuen aus Patagonien oder Feuerland in der unteren Hälfte. Einige kleinere, unterstützte Gruppierungen sollen hier erwähnt werden. Eine gleichförmige Gruppe von sieben sorediösen Individuen eines Standortes in Patagonien steht in der Mitte der Abbildung (194-n) (PP=1.00). Darüber findet sich eine gut unterstützte und molekular homogene Gruppe von Individuen aus der Antarktis und Feuerland, die zum Teil Sorale (3), Apothecien (2) oder beide Reproduktionsorgane (2) aufweisen (1.00/ 96%/ 94%). Alle Individuen, die in der monophyletischen Gruppe oberhalb dieser vorkommen, stammen von Aufsammlungen aus der Antarktis oder von antarktischen Inseln. Der überwiegende Teil ist sorediös oder hat neben Soralen auch Apothecien. Die meisten Individuen stehen an einem gemeinsamen endständigen, unterstützten Ast (PP=0.95). Innerhalb dieses Astes gibt es eine Abspaltung von drei Individuen, die gleichzeitig sorediös sind und Apothecien haben (1.00/ 76%/ -), sowie einige rein-sorediöse und unterstützte Äste.

## A-4 Diskussion

### A-4.1 Kongruenz der Datensätze

In den Einzelgen-Analysen ging es primär darum, die Nutzbarkeit der drei verschiedenen Gene für die Abgrenzung von Arten zu überprüfen, aber auch die infraspezifische Variabilität der jeweiligen Gene darzustellen. Zudem war dieser Schritt notwendig, um die einzelnen Datensätze auf ihre Kongruenz und Kombinierbarkeit hin zu überprüfen, um sie zu einem großen Datensatz zusammenfügen zu können.

Die Ursachen für die Inkongruenzen der Einzelgen-Datensätze können hier im Einzelnen nicht ergründet werden. Z. T. wird der Grund in Laborverwechslungen und möglicherweise auch Verunreinigungen von Isolaten zu suchen sein, z. B. im Falle von Individuum *U. durietzii* 290-2, dessen Stellung im RPB1-Phylogramm sehr deutlich von der in den beiden anderen Bäumen abweicht. In diesem Fall ist es denkbar, dass die Primer sich aufgrund abweichender Sequenzen nicht perfekt anlagern konnten und eine Verunreinigung von Isolat oder Pipette durch artfremde DNA zu einem falschen PCR-Ergebnis und somit zu einer falschen Sequenz geführt hat. Es gibt allerdings auch ganze Sequenzgruppen, wie 185-1 bis 185-6, in denen ein Laborfehler eher unglaubwürdig erscheint. Das genspezifische Auftreten zum einen in der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe und zum anderen in der *U. trachycarpa*-Gruppe wie bei den Individuen 185-1 bis -6, ist nicht eindeutig erklärbar und führte zum Ausschluss der Sequenzen.

Inkongruenz zwischen Genbäumen und Nicht-Monophylie von Gruppen, kann auch durch Introgression, der Einführung von Genen einer Population in den Genbestand einer anderen (Hybridisierung von Arten), verursacht sein. Hybridtaxa sind morphologisch und genetisch zumeist intermediär und kommen vor allem bei sympatrischen Arten vor. Da Arten der *Neuropogon*-Gruppe in vielen Regionen unmittelbar nebeneinander existieren (z. B. *U. perpusilla*, *U. trachycarpa*, *U. acromelana*, *U. antarctica* in Feuerland), ist Hybridisierung bei *Neuropogon* möglich. Zusätzlich gibt es bei Flechten die Möglichkeit des Zusammenwachsens von Soralen verschiedener Arten (OTT 1987a, b, OTT et al. 2000) oder zumindest kann dies nicht ausgeschlossen werden. Beide Phänomene sind in phylogenetischen Analysen nur schwer nachvollziehbar oder beweisbar, könnten aber durchaus für Inkongruenzen verantwortlich sein.

Pseudogene bzw. paraloge Sequenzen sind ein weiterer Grund für abweichende Sequenzen. Wie schon in Kapitel 1.4 erwähnt, wurde bisher angenommen, dass im Pilzgenom eines Individuums hunderte Kopien identischer rDNA Genkomplexe vorliegen, die einer

kollektiven evolutionären Entwicklung unterliegen (BROWN et al. 1972). Dies wurde vor kurzem durch eine Studie an verschiedenen Vertretern der Pezizomycotina in Frage gestellt (ROONEY & WARD 2005). Schon seit einigen Jahren ist die Existenz von paralogen Sequenzen und Pseudogenen innerhalb der nukleären rDNA vieler höherer Pflanzen- und auch Pilzgruppen, vor allem im Bereich der ITS, bekannt (BUCKLER et al. 1997, O'DONNELL & CIGELNIK 1997, O'DONNELL et al. 1998, RAZAFIMANDIMBISON et al. 2004, SIMON et al. 2005). Paraloge Sequenzen sind in ihrer Nukleotidabfolge abweichende aber funktionstüchtige Allele innerhalb eines Genoms, wobei Pseudogene funktionslose paraloge Allele darstellen. ROONEY & WARD (2005) konnten kürzlich zeigen, dass innerhalb vier verschiedener Pilzgenome eine Vielzahl unterschiedlicher Kopien der 5S, einem unabhängigen Teil der rDNA, vorliegen können. Im Fall der 5S kann man weniger von paralogen Sequenzen, als von einer Multigen-Familie sprechen. In den vier verschiedenen Arten, die sie genauer untersuchten, kamen zahlreiche identische Gentyphen auch interspezifisch vor, die in phylogenetischen Analysen gemeinsame Gruppen bildeten. Diese Art von Evolution betrifft zwar die anderen Gene innerhalb der rDNA nicht in gleichem Maße, aber die Studie zeigt doch, dass Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden müssen.

Es ist möglich und nötig Pseudogene in Datensätzen zu erkennen und entsprechende Sequenzen von der Analyse auszuschließen, da es besonders in phylogeographischen Studien zu erheblichen Fehlinterpretationen kommen kann. Hinweise auf Pseudogene können neben einer abweichenden Sequenzlänge ein signifikant geringerer GC-Gehalt und eine Instabilität der Sekundärstruktur sein. Zum anderen kann in Pseudogen-Sequenzen innerhalb einer Art eine erhöhte Anzahl von Substitutionen und Deletionen in eigentlich konservativen Genabschnitten auftreten, z. B. in der 5.8S der ITS-Region (MAYOL & ROSSELLÓ 2001, RAZAFIMANDIMBISON et al 2004). Paraloge Sequenzen können vereinzelte Überlagerungen unterschiedlicher Nukleotide an der gleichen Position im Sequenzchromatogramm aufweisen. Derartige Sequenzen wurden systematisch von den Analysen ausgeschlossen. Durch Klonieren der PCR-Produkte können paraloge Sequenzen oder Pseudogene bestätigt werden (MAYOL & ROSSELLÓ 2001, SIMON et al. 2005). Es ist nie auszuschließen, dass Pseudogene nicht erkannt und im Datensatz erhalten bleiben. Aber die Nutzung mehrerer Marker und das Testen auf Inkongruenzen zwischen Datensätzen sind weitere effektive Wege zum Ausfiltern von Pseudogenen.

#### A-4.2 Einzelgen-Analysen: Nutzung molekularer Marker auf Populationsebene

Vergleicht man den ITS-Baum (Abb. 3.5) mit der phylogenetischen Analyse aus Kapitel 2, die auch auf ITS-Daten beruht, wird deutlich, dass durch Hinzunahme weiterer Individuen in allen Großgruppen Ungenauigkeiten in der Artabgrenzung auftreten. Insgesamt ist das Rückgrat des Baumes weitgehend nicht unterstützt und unaufgelöst. Lediglich die Trennung von *Neuropogon* s. lat. und *Neuropogon* s. str. ist unterstützt (1.00/ 87%/ 68%), sowie das verwandtschaftliche Verhältnis von *U. acromelana* und *U. aurantiaco-atra*/*U. antarctica* (1.00/ 90%/ 87%). Die einzelnen Gruppen der Einzelgenbäume sollen an dieser Stelle nicht näher diskutiert werden und werden wenn nötig bei der Diskussion des Gesamtdatensatzes angeführt.

Der IGS-Datensatz ist dem ITS-Datensatz in seinen Aussagen sehr ähnlich. Das Rückgrat des Baumes ist allerdings stärker unterstützt als im ITS-Baum. Einzelne Gruppierungen stehen topologisch anders zueinander, aber die Zusammensetzung der unterstützten Gruppen stimmt überein. Es wird deutlich, dass die Artabgrenzung nicht eindeutig ist und wie auch im ITS-Datensatz viele Individuen auf morphologischer Grundlage a priori falschen Arten zugeordnet wurden. Dies ist besonders deutlich bei *U. aurantiaco-atra* und *U. antarctica*, die konspezifisch erscheinen, *U. perpusilla*, *U. sphacelata* und *U. trachycarpa*.

Die Auflösung mit dem proteinkodierenden Gen RPB1 ist bedeutend schlechter als mit den ribosomalen Genen. Auflösung im Bereich des Rückgrates des Phylogramms gibt es bis auf die Trennung von *Neuropogon* s. lat und *Neuropogon* s. str. fast gar nicht. Die PP-Werte sind über den ganzen Baum hinweg schlechter als in den anderen Analysen und vor allem die Außengruppen werden eindeutig unterstützt, z. B. *U. patagonica*, *U. acanthella* und *Usnea* sp. nov. 2. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich um ältere Arten handelt, deren Abstammungslinien schon lange von anderen getrennt sind. Die Großgruppen scheinen sich hauptsächlich aus relativ jungen Arten zusammzusetzen, bei denen das ‚Lineage Sorting‘ (LS), also die Auftrennung der Allele verschiedener Gene nach der genetischen Isolation von Abstammungslinien, noch nicht abgeschlossen ist.

Abbildung 3.10 macht deutlich, dass verschiedene Marker unterschiedliche Koaleszenz-Stadien widerspiegeln können. Im besten Fall ist vollständige Koaleszenz erreicht und es liegen eindeutig getrennte Arten vor. Es kann aber auch passieren, dass das LS für den gewählten Marker nicht vollständig abgeschlossen ist und molekulare Polymorphien, die von zurückliegender Abstammung herrühren, auftreten. Unter Umständen ist dieses Ergebnis schwer von Genfluss zu unterscheiden, weil es in beiden Fällen Überschneidungen von

Haplotypen und Geographie, also unaufgelöste Gruppen in Phylogrammen gibt (WIENS & PENKROT 2002).

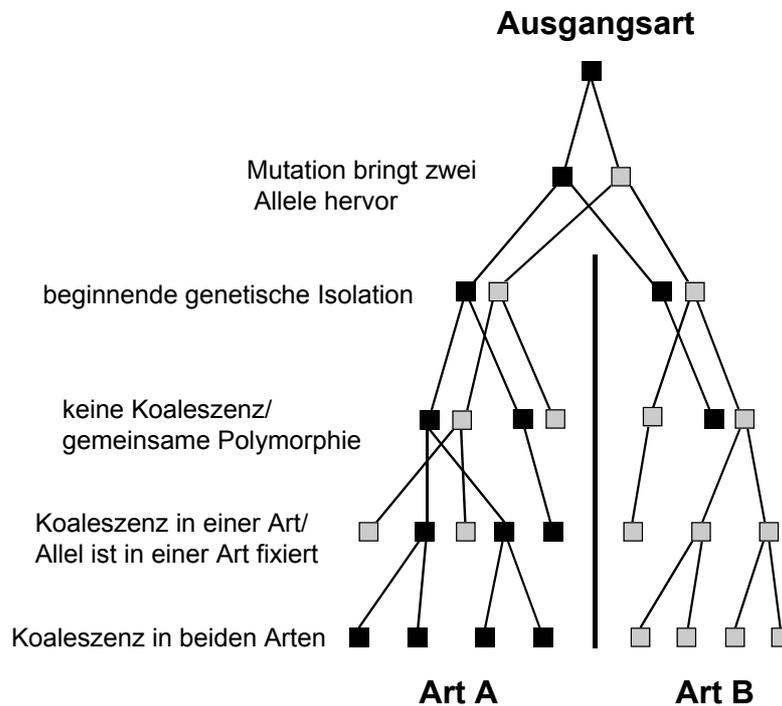


Abb. 3.10: Schematische Darstellung des ‚Lineage Sorting‘ (LS) nach genetischer Isolation anhand eines polymorphen Allels (verändert nach TAYLOR et al. 2000).

Bei der Untersuchung junger Arten ist unvollständiges LS wahrscheinlich nicht unerheblich verantwortlich für Polyphylien, aber junge Arten sind bei Flechten schwer feststellbar, da es praktisch keine Fossilfunde gibt, die dies belegen könnten. Da mit den IGS- und ITS-Markern eine differenzierte Topologie erreicht wird und im RPB1-Datensatz, dem konservativsten untersuchten Gen, eine erheblich geringere Struktur erkennbar ist, kann von relativ rezenten *Neuropogon*-Arten ausgegangen werden. „Ältere Arten“ sind schon deutlich voneinander getrennt, während für die jungen, z. T. noch in der Auftrennung begriffenen Arten, das LS noch nicht abgeschlossen ist. Die zeitlich unweit zurückliegende Artbildung resultiert in gemeinsamen Stamm-Haplotypen im RPB1-Gen, die von verschiedenen Arten geteilt werden. In der kombinierten Phylogenie sollte durch die genetische Information mehrerer Gene unvollständiges LS daher eine weniger große Rolle spielen als in den Einzelgenbäumen.

In Tabelle 3.4 sind die Unterstützungswerte aus den Einzelbäumen und dem kombinierten Baum für verschiedene phylogenetische Gruppen aufgelistet. Betrachtet man die Unterstützungswerte insgesamt, ist die ITS-Region der bestauflösendste molekulare Marker,

mit den meisten Unterstützungswerten für vermeintliche Arten und RPB1 der am wenigsten auflösende. Der kombinierte Datensatz hat die beste Auflösung und zeigt Unterstützungswerte für alle Gruppen außer den polyphyletischen Arten *U. perpusilla* und *U. trachycarpa*.

Tab. 3.4: Zusammenfassung der Posterior Probabilities (PP) und Bootstrap (BS)-Unterstützungswerte aus den Einzelgen- und der kombinierten Analyse für relevante phylogenetische Gruppen. (PP/BS-NJ/BS-MP)

phylogenetische Gruppen	PP- und BS-Unterstützungen in den Datensätze			
	ITS	IGS	RPB1	kombiniert
<i>U. acanthella</i>	1.00/99%/88%	1.00/100%/100%	1.00/100%/100%	1.00/100%/100%
<i>U. durietzii</i>	1.00/100%/100%	1.00/100%/100%	---	n.v.
<i>Usnea</i> sp. nov. 2	1.00/100%/99%	1.00/100%/100%	1.00/100%/100%	1.00/100%/100%
<i>Usnea</i> aus NZ	1.00/98%/93%	1.00/100%/100%	1.00/90%/61%	1.00/100%/100%
<i>U. patagonica</i>	1.00/99%/98%	1.00/100%/100%	1.00/100%/99%	1.00/100%/100%
<i>U. trachycarpa</i>	---	---	---	---
<i>U. subantarctica</i>	1.00/92%/92%	---	---	1.00/97%/98%
<i>U. sphacelata</i> 1	---	1.00/87%/78%	---	1.00/96%/97%
<i>Usnea</i> sp. nov. 1	1.00/98%/95%	---	---	1.00/98%/95%
<i>Usnea</i> sp. 1	---	---	0.99/---/---	0.98/78%/---
<i>U. perpusilla</i>	---	---	---	---
<i>U. sphacelata</i> 2	---	---	---	0.99/---/---
<i>U. acromelana</i>	---/97%/---	1.00/91%/92%	---	1.00/100%/97%
<i>U. aurantiaco-atral</i> <i>U. antarctica</i>	1.00/98%/94%	---	---	1.00/99%/96%
<i>Neuropogon</i> s. str.	1.00/87%/68%	1.00/98%/94%	1.00/100%/100%	1.00/100%/100%
<i>U. aurantiaco-atral</i> <i>U. antarctica</i> <i>U. acromelana</i>	1.00/90%/87%	1.00/71%/69%	---	1.00/100%/98%

Auch KROKEN & TAYLOR (2001) konnten in einem kombinierten Datensatz mit sechs verschiedenen Markern die größtmögliche Abgrenzung von Abstammungslinien verzeichnen. Sie erklären dieses Ergebnis mit unterschiedlich schnellem ‚Lineage Sorting‘ der Einzelmarker (siehe Abb. 3.10). Die Information aus verschiedenen Markern kann die auftretenden Unterschiede kompensieren und die Artgrenzen nah verwandter Arten schärfen. Auch jüngste Artbildungsprozesse können so aufgedeckt werden (KROKEN & TAYLOR 2001).

#### A-4.3 Kombinierte Phylogenie - Artabgrenzungen und phylogenetische Gruppierungen

Zur Bewertung der einzelnen Gruppierungen der kombinierten *Neuropogon*-Phylogenie wird die WP-Methode nach WIENS & PENKROT (2002) genutzt. Die Tatsache, dass die Erkennung von Genfluss zwischen Abstammungslinien eine Grundlage des Schlüssels ist, stellt trotz asexueller Formen bei *Neuropogon* kein großes Problem dar. Bis auf zwei Ausnahmen sind

in allen Gruppen, in denen Artgrenzen unklar sind, immer auch sexuell reproduzierende Individuen beteiligt, so dass man nicht von asexuellen Gruppen sprechen kann. Die Ausnahmefälle werden diskutiert. Fast alle rein sorediösen Gruppen grenzen sich ohnehin eindeutig als monophyletische Abstammungslinien ab. Nacheinander werden nun die einzelnen Gruppierungen als potenzielle Hauptarten nach WIENS & PENKROT (2002) betrachtet und bewertet.

### *Die Außengruppen*

Wie die Unterstützungswerte aus Einzelgen- und kombinierter Phylogenie (Tab. 3.4) zeigen, handelt es sich bei den Außengruppen jeweils um monophyletische, gut unterstützte Arten.

*U. acanthella* ist in mehrere unterstützte Äste aufgegliedert (Abb. 3.9-1). Da keine fertilen Formen dieser Art bekannt sind, kann die WP-Methode streng genommen nicht angewandt werden. Die sich abgrenzenden Individuen aus Ancash, Peru deuten auf eine isolierte Population hin. Allerdings wurden für eine eindeutige Aussage zu wenige Individuen des Standortes untersucht. WIENS & PENKROT (2002) machen in ihrer Studie auf die Ungenauigkeit der Methode bei zu geringem Sampling aufmerksam. Die Wahrscheinlichkeit, bei zwei untersuchten Individuen eines Standortes Genfluss zu anderen Standorten aufzudecken, ist signifikant geringer als bei mehreren untersuchten Individuen.

*U. acanthella* und *Usnea* sp. nov. 2 sind in den peruanischen Anden sympatrisch, aber eindeutig durch die hellen Isidiomorphe und dunklen Papillen bei *U. acanthella* voneinander zu unterscheiden (Abb. 3.1: a, b). *Usnea* sp. nov. 2 ist eine unbeschriebene Art mit eindeutigen morphologischen und chemischen Merkmalen, die in Kapitel 4 beschrieben wird. Sexuelle Morphotypen sind nicht bekannt. Die Art ist bisher nur an einem einzigen Standort in Ancash, Peru in einem sehr abgelegenen Hochgebirgstal umgeben von Gletschern in 4800 m Höhe gesammelt worden. Es ist möglich, dass es sich um eine lokale Art handelt, die sich aufgrund des isolierten Standortes unabhängig entwickelt hat und in ihrer Ausbreitung beschränkt ist. Die Uniformität der Sequenzen könnte dafür ein Anzeichen sein. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sie an anderen Standorten übersehen, bzw. weitere Standorte nicht besammelt wurden.

Aufgrund der geringen Anzahl von untersuchten Proben in dem neuseeländischen Artkomplex, kann die WP-Methode nicht zuverlässig angewandt werden. Die Monophylie der Gruppe weist auf eine isolierte Entwicklung der neuseeländischen *Neuropogon*-Flora hin. *U. ciliata* und *U. subcapillaris* stellen zwar monophyletische, gut unterstützte Gruppen dar, diese stimmen aber z. T. chemisch und morphologisch nicht mit den Beschreibungen von

WALKER (1985) überein. Nach WALKER (1985) hat *U. ciliata* niemals Sorale und immer Norstictin-, Salazin- und Protocetrarsäure. Die hier untersuchten Individuen, 276-1 und 287-1, haben zwar Salazinsäure und 287-1 hat Norstictinsäure, aber auch Quaesitin- und Strepstilinsäure kommen vor, zwei neue Substanzen im *Neuropogon*-Komplex. *U. subcapillaris* hat nach WALKER (1985) auch keine Sorale, selten Apothecien und entweder wie *U. ciliata* Norstictin-, Salazin- und Protocetrarsäure oder Squamat- und Hypothamnolsäure oder Psoromsäure. Das Individuum 286-1 in der *U. subcapillaris*-Gruppe hat Sorale und Squamatsäure. Das Auftreten von Soralen widerspricht der von WALKER (1985) vorgenommenen Abspaltung der Art *U. pseudocapillaris* von *U. subcapillaris* hauptsächlich aufgrund von Soralen. WALKER (1985) selbst bezeichnet *U. pseudocapillaris* als mögliches sorediöses Gegenstück zu *U. subcapillaris*. Vielleicht liegt hier eine Konspezifität der Arten vor. Squamatsäure ist allerdings nur als Inhaltsstoff von *U. subcapillaris* nicht aber von *U. pseudocapillaris* beschrieben. Um eindeutige Aussagen treffen zu können, müssen weitere Proben untersucht werden.

Bemerkenswert ist, dass Proben mit Soralen, die z. T. als *U. antarctica* bestimmt wurden, an der Basis des Neuseeland-Komplexes stehen. *U. antarctica*-Vorkommen sind von Neuseeland beschrieben, aber es könnte sein, dass es sich möglicherweise nicht um diese Art, sondern um eine andere sorediöse Art handelt. Das Individuum 285-2 hat Sorale und *U. ciliata*-ähnliche Apothecien und ist auch chemisch nicht von *U. ciliata* unterschieden. Diese Übereinstimmungen und sympatrisches Vorkommen auf der Südinsel Neuseelands weisen darauf hin, dass *U. ciliata* auch als sorediöse Form vorkommt. Weitere Hinweise liefert der RPB1-Baum, in dem einige zusätzliche *U. ciliata*-Proben untersucht wurden (Abb. 3.7-3). Innerhalb der gut unterstützten, fertilen *U. ciliata* findet sich ein sorediöses Individuum (271-1). Sollte *U. ciliata*, wie von WALKER (1985) vorgeschlagen, in einem engen Artkomplex mit *U. acromelana* stehen, deren Typusart von Neuseeland stammt, handelt es sich hier möglicherweise um diese sorediöse Art. Daraus folgt, dass es sich bei *U. acromelana* in Südamerika um eine weitere unbeschriebene Art handelt. WALKER (1985) beschreibt *U. acromelana* als sehr formenreiche Art, die durchaus auch in mehrere Arten aufgetrennt werden könnte.

Aufgrund der wenigen untersuchten Proben insgesamt können gesicherte Aussagen über den neuseeländischen Artkomplex erst nach weiterführenden Studien getroffen werden. Molekulare, chemische und morphologische Studien an neuseeländischen Proben sind als Folgeprojekt in London im Rahmen des von der EU finanzierten Synthesys Programms nach dem Abschluss dieser Arbeit geplant.

Bei der letzten Außengruppe handelt es sich um *U. patagonica*. Obwohl die Individuen der beiden unterstützten Schwestergruppen räumlich voneinander getrennt sind, ist eine Artaufspaltung nicht sinnvoll. Es wurden nur 12 Individuen mit insgesamt fünf Haplotypen berücksichtigt und große, zwischen den Sammelorten liegende Teile der Anden nicht besammelt. Zudem handelt es sich hier um eine rein sorediöse Art, auf die die WP-Methode streng genommen nicht anwendbar ist. Chemisch und morphologisch sind die Individuen sehr homogen. Neben Proben ohne Inhaltsstoffe kommen nur Neotricon, Neuropologin- und Norperstictinsäure in Kombination vor. Ihre Verteilung in den Proben folgt keinem Standortmuster. Beide Inhaltsstoffe sind neu für die Gattung *Usnea*. *U. patagonica* ist eine weit verbreitete, morphologisch und chemisch eindeutig charakterisierte Art (siehe Abb. 3.1: c) mit standortspezifischen Haplotypen, die höchstwahrscheinlich über nichtbesammelte Zwischenformen in Kontakt stehen.

#### *Die U. trachycarpa-Gruppe*

Die *U. trachycarpa*-Gruppe setzt sich aus mehreren Gruppierungen zusammen (Abb. 3.9-2). Fokussiert man die polyphyletische Art *U. trachycarpa* als Hauptart und setzt sie in Beziehung zu den umgebenden monophyletischen Gruppen, *U. subantarctica* und *U. sphacelata* 1, handelt es sich um eine plesiomorphe Art. In den Gruppen *U. trachycarpa* 1 und *U. trachycarpa* 3 kommen mehrere fertile Individuen von denselben Standorten in Tierra del Fuego und Santa Cruz, Argentinien vor, so dass genetischer Austausch prinzipiell möglich ist. Demnach ist eine Aufteilung in zwei Arten nach WIENS & PENKROT (2002) nicht gerechtfertigt. Morphologisch sind zwischen den fertilen Individuen beider Gruppen keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Polyphyletische Arten sind sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich nicht unüblich (FUNK & OMLAND 2003). Sie können durch Artbildungsprozesse mit Fortbestand der Stammart oder durch Artbildung nach Hybridisierung entstehen. HENDRIXSON et al. (2005) machen darauf aufmerksam, dass es neben einer ungenauen taxonomischen Grundlage auch andere Gründe für Poly- und Paraphylie geben kann: inadäquate phylogenetische Informationen, Hybridisierung, unvollständige Auftrennung der Abstammungslinien oder unerkannte paraloge Sequenzen (FUNK & OMLAND 2003). Inadäquate phylogenetische Information liegt hier nicht vor, da der *U. trachycarpa* 3-Ast in allen drei phylogenetischen Berechnungen unterstützt und monophyletisch ist. Es erscheint sinnvoll die molekularen Marker einzeln und genauer zu betrachten. Der ITS- sowie RPB1-Einzeldatensatz trennen *U. trachycarpa* 1 und 3 nicht auf.

Die gesamte Information hierzu stammt aus dem IGS-Datensatz (3 Substitutionen an verschiedenen Stellen des Datensatzes). Da die IGS das variabelste Gen ist, könnte dies ein Hinweis auf unvollständiges ‚lineage sorting‘ im ITS- und RPB1-Gen sein, was auf zwei getrennte Arten schließen lassen würde. In weiteren Untersuchungen in Kapitel 3-B, unter Einbeziehung morphologischer und chemischer Daten in die NCA, wird dieses Problem nochmals aufgegriffen.

Das Vorkommen vieler sympatrischer Arten in *Neuropogon*, besonders in Südamerika, macht eine Artaufspaltung nach der WP-Methode z. T. schwierig, weil damit das Kriterium „Genfluss zwischen Haplotypen vom gleichen Standort“ nicht mehr anwendbar ist. Dadurch ist auch die Möglichkeit zur Hybridisierung signifikant erhöht. Im Falle der *U. subantarctica*-Gruppe tritt das Problem sympatrischer Verbreitung erneut auf. Individuen einiger Standorte aus der Antarktis und Patagoniens überschneiden sich sowohl mit *U. trachycarpa* 1 und 3 als auch *U. sphacelata* 1. Die meisten Individuen sind aus der Nähe von El Chalten in Patagonien und kommen dort gemeinsam mit mindestens drei weiteren *Neuropogon*-Gruppen vor (*U. acromelana*, *U. antarctica* und *Usnea* sp. 1). Streng genommen handelt es sich nach der WP-Methode bei *U. subantarctica* trotz guter Unterstützungswerte dieser monophyletischen Gruppe nicht um eine Art, da sie in der Mitte einer polyphyletischen *U. trachycarpa* steht, morphologisch und chemisch nicht immer sicher von dieser abgrenzbar ist und durch gemeinsame Standortbesiedlung Genfluss mit *U. trachycarpa*-Individuen nicht ausgeschlossen werden kann. Bezieht man allerdings die Häufigkeit von sympatrischem Vorkommen bei *Usnea* mit in die Überlegungen ein und bewertet auch morphologische Eigenheiten sowie die einheitliche Chemie und sehr gute Unterstützungswerte, dann könnte man diese Gruppe auch als eigene Art abgrenzen. Weitere Untersuchungen auf Populationsebene mit statistischer Einbeziehung der Verteilung von Merkmalen sind in diesem Falle sinnvoll und werden im nächsten Kapitel durchgeführt. Das Individuum 164-1 von Marguerite Bay, Antarktis, könnte möglicherweise ein hybrides Individuum sein.

*U. sphacelata* 1 wird als eigene Art abgegrenzt und ist deutlich von *U. sphacelata* 2 getrennt, sodass Artgleichheit ausgeschlossen werden kann. In weiten Teilen der Nordhemisphäre kommt nur ein einziger Haplotyp dieser rein sorediösen Art vor. Alle Individuen aus Patagonien grenzen sich von diesem Haplotypen ab, aber ecuadorianische Proben fallen in die nordhemisphärische Gruppe. Es ist fraglich, ob genetischer Austausch zwischen den Hemisphären stattfindet, oder ein einzelnes, unweit zurückliegendes Ausbreitungsereignis zu der Besiedlung des arktischen Lebensraumes führte. Letzteres würde zwangsläufig zur Isolation und allopatrischer Artbildung führen. Nur ein Individuum, 189-3, kommt

sympatrisch mit *U. subantarctica*- und *U. trachycarpa*-Individuen vor, hat allerdings ganz im Gegensatz zu den Individuen der beiden Gruppen keine chemischen Inhaltsstoffe und ist dadurch eher *U. sphacelata* 1 zugehörig. Da das Typusmaterial von *U. sphacelata* von Melville Island, arktisches Kanada, stammt, wird der Artname für diese Gruppe beibehalten.

Die Stellung des Individuums 196-2 ist schwer erklärbar. Ein Hybridorganismus zwischen *U. sphacelata* 1 und *U. trachycarpa* ist aufgrund des Standortes ausgeschlossen. Möglicherweise handelt es sich um einen abweichenden Haplotypen von *U. trachycarpa*, der in Sequenzteilen konvergent zu *U. sphacelata* 1 ist. Im ITS- und RPB1-Datensatz steht das Individuum zusammen mit den übrigen *U. trachycarpa*-Proben. Der IGS-Datensatz bewirkt die Abweichung.

#### *Die U. perpusilla-Gruppe*

In der *U. perpusilla*-Gruppe (Abb. 3.9-3) tritt erneut das Problem sympatrischer Artverbreitung auf. Jede einzelne der vier Untergruppen enthält Proben vom Standort Cerro Catedral in Bariloche, Patagonien. Die Gruppen zeigen morphologische Unterschiede: *Usnea* sp. nov. 1 ist am gleichen Standort wie die meisten *U. perpusilla*-Individuen gesammelt, aber trennt sich molekular eindeutig von diesen ab. Die auffälligen hellgelben Apothecien (siehe Abb. 3.1: g, i) und weitere morphologische Merkmale unterstützen die Interpretation als eigene Art. Der ITS-Datensatz unterstützt eine Artabtrennung deutlich. Im IGS-Datensatz ist die Art zwar nicht monophyletisch, aber vermischt sich nicht mit fertilen *U. perpusilla*-Individuen der anderen Gruppen. Weitere morphologische Daten werden in Kapitel 3-B einbezogen.

Individuen von *Usnea* sp. 1 wurden hauptsächlich am Standort El Chalten in Santa Cruz gesammelt. In diese monophyletische Gruppe mischen sich aber auch Proben aus Bariloche und zusätzlich Individuen aus Ecuador. Die Individuenzusammensetzung der Schwestergruppen deutet Materialaustausch innerhalb der Anden an. Haplotypen aus Ecuador sind nah mit Haplotypen aus El Chalten verwandt. Es handelt sich ausnahmslos um sorediöse Proben, die auch im RPB1-Datensatz eine monophyletische Gruppe bilden, was eine Abtrennung als eigene Art unterstützt. Morphologisch und chemisch ist die Gruppe sehr einheitlich und es bestehen einige unscheinbare Unterschiede zu anderen sorediösen Proben innerhalb der *U. perpusilla*-Gruppe, die in Kapitel 3-B genauer beleuchtet werden sollen. *Usnea* sp. 1 wird als eigene Art behandelt.

Innerhalb von *U. perpusilla* gibt es drei monophyletische Gruppen mit dunklen Apothecien, von denen sich die Individuen aus Feuerland am eindeutigsten aufgrund des Standortes abgrenzen. Sie zeigen in keinem der Datensätze Genfluss mit den patagonischen Individuen der anderen Gruppen. Nach der WP-Methode handelt es sich folglich um eine eigene Art. Es gibt morphologische Unterschiede zu den restlichen *U. perpusilla*-Individuen, weshalb LAMB (1948) Individuen aus Feuerland als eigene Forma beschreibt, *Neuropogon rohmederi* f. *ushuaiensis*. WALKER (1985) wertet die morphologischen Abweichungen in ihrer Revision als Variabilität und synonymisiert *N. rohmederi* mit *U. perpusilla*. Die Tatsache, dass die Gruppe aus Feuerland in der Mitte der anderen *U. perpusilla*-Gruppen entspringt, also sehr nah verwandt zu sein scheint, könnte auf eine peripatrische Artbildung in Feuerland hinweisen. Möglicherweise hat sich durch ein Besiedlungsereignis und anschließende räumliche Isolation der Populationen, sowie schnelle genetische Drift in der kleinen Population eine lokale Art entwickelt. Betrachtet man diese Art, ist es fraglich, wie die beiden weiteren fertilen Gruppen gedeutet werden sollen, in deren Mitte sie steht. Handelt es sich hier um eine polyphyletische Art oder kann man die beiden Gruppen voneinander trennen? Beide Gruppen setzen sich ausschließlich aus Proben desselben Standortes zusammen und müssen nach WIENS & PENKROT (2002) als eine plesiomorphe Art betrachtet werden. Es gibt kleine morphologische Unterschiede zwischen den Gruppen, die in Verbindung mit einer Netzwerkanalyse und statistischen Verfahren im nächsten Kapitel näher überprüft werden sollen. Bei den Individuen 192-21 und 222-10 könnte es sich um hybride Organismen zwischen den beiden fertilen Gruppen handeln. Nach CLERC (1998) sind Hybriden durch intermediäre Merkmale gekennzeichnet, die chemisch morphologisch oder anatomisch sein können und in dieser Kombination normalerweise nicht vorkommen, z. B. morphologisch zur einen und chemisch zur anderen Art gehören.

Die letzte Gruppierung in der Großgruppe *U. perpusilla* ist die fast ausschließlich sorediöse *U. sphacelata* 2. Morphologische Unterschiede der Sorale und der Thallus-oberfläche machen die Trennung von *U. sphacelata* 1 möglich. Viele Individuen aus dieser Gruppe wurden am selben Standort wie die fertilen *U. perpusilla* gesammelt. Die Individuen wuchsen zum Teil dicht nebeneinander. Es ist nicht klar, in welchem Verhältnis die sorediösen Individuen zu den fertilen *U. perpusilla* stehen, da sie morphologisch und chemisch sehr ähnlich sind. Zwei Individuen mit Soralen und gelb-schwarzen Apothecien (230-3 und 216-1) innerhalb der sorediösen Gruppe und zwei Proben mit zusätzlichen Soralen (218-1 und 192-21) in der dazu basal stehenden, fertilen *U. perpusilla*-Gruppe, deuten eine enge verwandtschaftliche Beziehung an, die von allen Einzelgenbäumen bestätigt wird. Trotzdem

scheinen die Gruppen nicht in einem regen genetischen Austausch zu stehen, da sich die Individuen nicht vermischen und gut abgegrenzte Äste bilden. Auffällig ist in diesem Zusammenhang die große geographische Distanz zwischen sehr nah verwandten Haplotypen aus der kontinentalen Antarktis (z. B. 167-n) und Nordamerika (z. B. 250-n) in *U. sphacelata* 2 im Vergleich zur beachtlichen genetischen Distanz zwischen Individuen beider Gruppen, die in Patagonien am gleichen Standort wachsen. Unter diesem Gesichtspunkt sollte man von einer eigenständigen sorediösen Art sprechen, die sich evtl. aus der fertilen *U. perpusilla* entwickelt hat und daher z. T. noch fruchtend vorkommt. Möglicherweise kann somit noch ein geringer genetischer Austausch zwischen den ansonsten getrennten Arten stattfinden. Die sorediöse Verbreitung scheint in diesem Fall die weitaus effizientere Ausbreitungsmethode zu sein. IMSHAUG (1954) beschreibt *Usnea*-Individuen aus dem Westen der USA (Mt. Rainier) als neue Art, *Neuropogon lambii*. WALKER (1985) synonymisiert diese Art zu einer einzigen polytypischen, bipolaren Art *Usnea sphacelata*. Die molekularen Untersuchungen unterstützen die Auffassung von IMSHAUG (1954), dass *U. sphacelata* 1 und 2 zwei Arten sind, die in unterschiedlichen Gebieten der Nordhemisphäre vorkommen.

Innerhalb der sorediösen *U. sphacelata* 2 trennen sich viele Individuen in ihre Herkunftsregionen auf, was ein weitgehend isoliertes Vorkommen an einzelnen Standorten andeutet. Dieses Muster wird aber immer wieder von einzelnen Individuen aufgebrochen, z. B. 212-1 aus Patagonien zwischen kontinental antarktischen Proben (167-n). Proben aus Patagonien und von der antarktischen Halbinsel haben z. T. dieselben Haplotypen. Zwischen ihnen scheint Austausch stattzufinden. Ob dies durch gelegentliche fertile Individuen, wie 230-3 (Antarktis) und 216-1 (Patagonien) passiert, bleibt unbeantwortet.

#### *Die U. aurantiaco-atra-Gruppe*

Die dritte Großgruppe im Baum ist klar in zwei monophyletische Schwestergruppen unterteilt (Abb. 3.9-4). Obwohl alle drei Arten an einigen Standorten sympatrisch vorkommen, ist *U. acromelana* durch Soral- und Thallusmerkmale morphologisch und auch chemisch gut von der Schwestergruppe zu unterscheiden. Es handelt sich daher nach der WP-Methode um eine eindeutige, gut unterstützte Art, die sich auch in allen drei Einzelgenbäumen von *U. aurantiaco-atra*/*U. antarctica* abhebt. Es wurden drei Standorte in Patagonien und Feuerland besammelt, die nicht vollständig voneinander isoliert sind; z. T. überschneiden sich die Haplotypen dieser Standorte. Wie bereits erwähnt, wurde *U. acromelana* aus Neuseeland beschrieben (STIRTON 1898) und es ist unklar, ob es sich bei neuseeländischen und patagonischen Individuen um die gleiche Art handelt. Erste molekulare Hinweise legen eine

Trennung in zwei Arten nahe. Weitere Untersuchungen müssen an neuseeländischen Proben durchgeführt werden. WALKER (1985) beschreibt morphologische Abweichungen bei südamerikanischen Proben, wie z. B. stark pigmentierte Sorale, ein dunkel marmorierter Thallus und abweichende Verzweigung (vgl. Abb. 3.1: f, h, j und 3.2: e), die auch hier festgestellt werden konnten und möglicherweise eine Aufspaltung der beiden geographischen Gruppen unterstützen.

*U. aurantiaco-atra* und *U. antarctica* bilden eine typische konspezifische Art nach WIENS & PENKROT (2002). Es gibt keine deutlichen basalen Abstammungslinien, die eine Aufspaltung der Gruppe notwendig machen würden und es vermischen sich sowohl sorediöse mit fertilen Individuen, als auch Individuen verschiedener Standorte untereinander. Die Proben der monophyletischen Gruppe im oberen Teil des Baumes (Abb. 3.9-4) grenzen sich jedoch vom Rest der Individuen durch das Fehlen reiner fertiler Individuen ab. Zudem handelt es sich um Proben, die allesamt aus der Antarktis stammen und nicht aus Südamerika. Fertile Proben, in unmittelbarer Nähe einiger dieser sorediösen Proben gesammelt (z. B. 128-2 (fertil) und 139-n (sorediös) von Livingston Island), erscheinen an völlig anderer Stelle des Baumes und sind genetisch identisch mit Individuen aus Feuerland und Patagonien. Viele der fertilen Individuen antarktischer Inseln stehen also in engerem Kontakt zu Individuen aus Südamerika als zu ihren sorediösen Nachbarindividuen, während sorediöse antarktische Individuen genetisch variabler sind und sich abgrenzen. Auffällig ist die Aufteilung in die zwei angesprochenen Gruppen im RPB1-Baum. Hier findet sich eine strikte Trennung durch unterschiedliche Allele.

Da es im kombinierten Baum nicht möglich ist die beiden Gruppen eindeutig voneinander zu trennen, muss Hybridisierung zwischen den Linien angenommen werden. Die Individuen 137-1 und 123-1, sowie eine unterstützte monophyletische Gruppierung, zusammengesetzt aus fertilen und sorediösen feuerländischen und antarktischen Individuen, sind mögliche Hybridorganismen, da sie zwischen den beiden Gruppen stehen. 124-4 ist das einzige antarktische Individuum mit Soralen, welches im Baum zwischen südamerikanischen Proben steht. Diese Probe hat aber keine typischen, aus Papillen entwickelten Sorale und muss daher ausgeklammert werden.

Eine Überprüfung der molekularen Daten unter Hinzunahme morphologischer und chemischer Daten, sowie einer angemesseneren netzwerkartigen Darstellung der innerartlichen Verwandtschaften wird im nächsten Kapitel angestrebt.

Es bleibt am Ende dieses Kapitels zu bemerken, dass die Methode nach WIENS & PENKROT (2002) aufgrund der vielen sympatrisch vorkommenden Arten im *Neuropogon*-Artkomplex

Entscheidungen zur Abtrennung von Arten nicht immer problemlos anwendbar ist. Obwohl eine Methode mit strikten objektiven Kriterien ausgewählt wurde, mussten aufgrund dieser Tatsache einige subjektive Entscheidungen getroffen werden. Zudem ist die Feststellung von Genfluss als Grundlage der Methode nicht einleuchtend für asexuell reproduzierende Arten. Es wäre sinnvoller, in Anlehnung an das Evolutionäre oder Kohäsive Artkonzept, Genfluss als nur eine der wichtigen kohäsiven Kräfte, neben Selektion und historischen, ökologischen, entwicklungsbedingten und populationsgenetischen Einflüssen zu sehen (TEMPLETON 1989, CLERC 1998). Die Ergebnisse der Analysen zeigen keinerlei Hinweise darauf, dass sorediöse Arten grundsätzlich weniger genetisch variabel sind als offensichtlich sexuell reproduzierende Arten. Da im Verlaufe der Arbeit die Erfahrung gemacht wurde, dass die Studienobjekte wegen der Unzugänglichkeit der Standorte relativ ungenau untersucht sind, ist es durchaus möglich, dass auch „rein sorediöse“ Arten hin und wieder sexuelle Fortpflanzung betreiben, aber fertil noch nie gesammelt wurden. Ganz davon abgesehen ist der sexuelle Reproduktionszyklus von Flechten bis heute erstaunlich wenig untersucht und verstanden. Es ist z. B. nicht wirklich geklärt ob Konidien als Spermastien fungieren und auf welchem Wege die sexuelle Befruchtung bei Flechten hauptsächlich erfolgt. Möglicherweise werden Apothecien z. T. auch nach Selbstbefruchtung ausgebildet.

### **3-B Nutzung von DNA-Haplotyp-Netzwerken zur Artabgrenzung und zur phylogeographischen Analyse**

#### **B-1 Einleitung**

##### **B-1.1 Netzwerkmethoden und Haplotypverteilung**

Intraspezifische Phylogenien und die Beziehungen zwischen Haplotypen einer Art oder nah verwandter Arten können besser in Netzwerken als in hierarchischen Bäumen visualisiert werden (POSADA & CRANDALL 2001, CASSENS et al. 2003). In hierarchischen Bäumen wird angenommen, dass alle untersuchten Individuen die Spitze von Abstammungslinien mit nicht überlappenden Genpools darstellen, was eine falsche Grundannahme innerhalb von Populationen ist (POSADA & CRANDALL 2001). Tatsächlich sind die Beziehungen in Populationen nicht hierarchisch, weil sie das Ergebnis von Reproduktion, Rekombination und neueren Mutationen sind. Besonders wenn es sich um Organismen handelt, die sehr alt werden können, wie bei Flechten üblich, existieren zahlreiche Generationen nebeneinander, die ein hierarchisch aufgebautes System außer Kraft setzen. Nachkommen mit neuen Allelausprägungen (neue Haplotypen) können entstehen, die häufig neben den Vorfahren existieren. Ein fortpflanzungsaktiver Vorfahr kann somit theoretisch mehrere mutierte Nachkommen, also unterschiedliche Haplotypen hervorbringen und so eine echte multiple Verzweigung produzieren (POSADA & CRANDALL 2001). Diese Tatsache führt zu Phylogenien mit geringer Auflösung und geringer statistischer Aussagekraft bei der Anwendung traditioneller phylogenetischer Methoden.

Haplotyp-Netzwerke berücksichtigen Prozesse auf Populations- und Artebene und können die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Gruppen von Haplotypen, die aus multiplen Verzweigungen, langlebigen Haplotypen, Rekombination und Hybridisierung hervorgehen, viel besser veranschaulichen. Genetische Strukturen können identifiziert werden, wenn sie mit geographischen Daten assoziiert werden. Gleichwertige, unaufgelöste Verwandtschaftsverhältnisse werden in Netzwerken nicht zu Polytomien verschmolzen, sondern als Optionen nebeneinander aufgeführt und als ‚loops‘, Schleifen, innerhalb eines Netzwerkes sichtbar gemacht (CASSENS et al. 2003).

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten Netzwerke aus Datensätzen abzuleiten, die in Übersichtsartikeln dargestellt (POSADA & CRANDALL 2001) und anhand empirischer Daten überprüft wurden (CASSENS et al. 2003). Beide genannten Studien zeigen, dass jede Netzwerkmethodologie ihre Grenzen hat. Die Split decomposition-Methode (BANDELT & DRESS 1992) ist eine Netzwerkmethodologie, die Datensätze aufgrund ihrer molekularen Merkmale in

Teildatensätze aufspaltet und diese Aufspaltungen („splits“) dazu nutzt ein Netzwerk abzuleiten, wobei jede Aufspaltung einen Ast definiert, der zwei Teildatensätze miteinander verbindet (POSADA & CRANDALL 2001). Konflikte bzw. alternative „Splits“ werden graphisch durch eingefügte Schleifen oder Kästen verdeutlicht, was bei homoplastischen Datensätzen zu erheblichen graphischen Einbußen führen kann. Auch berechnungstechnisch sind der Methode Grenzen gesetzt (CASSENS et al. 2003), die unter anderem dazu geführt haben, dass diese Methode hier nicht angewendet wurde.

Der statistische phylogeographische Ansatz nach TEMPLETON et al. (1992) mit seiner technischen Umsetzung im Programm TCS 1.21 (CLEMENT et al. 2000), berechnet statistische Parsimony-Netzwerke. Diese Netzwerke haben den Vorteil einer quantitativen Beurteilung der Zuverlässigkeit der jeweiligen Verbindungen zwischen den Haplotypen. Ausgehend von einer absoluten Distanzmatrix, bestehend aus den Distanzwerten der paarweisen Vergleiche zwischen Haplotypen, wird jeweils ihre Wahrscheinlichkeit nach dem „parsimony“-Kriterium, dem Kriterium der sparsamsten Erklärung, berechnet, bis diese Wahrscheinlichkeit 0.95 überschreitet. Aus diesen Werten wird das „Parsimony-Limit“ abgeleitet, was die Anzahl an zulässigen Mutationen zwischen den Haplotypen im Netzwerk angibt (CLEMENT et al. 2000). Angefangen mit den kleinsten Distanzen zwischen Haplotypen, werden nach und nach alle Haplotypen miteinander verbunden, bis ein vollständiges Netzwerk entsteht, bzw. bis das „Parsimony-Limit“ erreicht wird (CASSENS et al. 2003). Alle Verbindungen von Haplotypen mit weniger als 95% statistischer Unterstützung bzw. oberhalb der zulässigen Anzahl von Mutationen, werden im Netzwerk nicht angezeigt. Es besteht somit die Möglichkeit, dass mehrere unabhängige Netzwerke aus einem Datensatz hervorgehen. CASSENS et al. (2003) zeigen in ihrer Studie, dass ein statistisches TCS-Netzwerk nicht immer die bestmögliche sparsamste Verbindung der Haplotypen lieferte. Andererseits ist diese Methode Basis für die Nested Clade Analyse (NCA) (CASSENS et al. 2003).

Median-joining (MJ) Netzwerke (BANDELT et al. 1999) nutzen denselben Algorithmus wie Minimum spanning Netzwerke (EXCOFFIER & SMOUSE 1994). Sobald alle Haplotypen in Minimum spanning Bäumen (MSTs) verbunden sind und diese anschließend in einem Minimum spanning Netzwerk (MSN) zusammengefasst sind, wird das Parsimony-Kriterium genutzt um fehlende, dazwischen liegende Haplotypen, die so genannten „Median Vectors“ einzufügen. Diese Vektoren repräsentieren entweder bestehende oder bereits ausgestorbene Haplotypen. Der Vorteil von MJ-Netzwerken ist, dass große Datenmengen in sehr kurzer Zeit bearbeitet werden können. Allerdings müssen die Daten frei von Rekombination sein

(POSADA & CRANDALL 2001). Die MJ-Methode erzeugte bei CASSENS et al. (2003) die „sparsamste“ Netzwerktopologie.

Aufgrund der Ergebnisse der oben erwähnten Studien und Übersichtsartikel werden in dieser Studie Median-joining und statistische Parsimony-Netzwerke erstellt und miteinander verglichen.

### **B-1.2 Nested Clade Analyse (NCA)**

Die Nested Clade Analyse (NCA; TEMPLETON et al. 1987, 1992, 1995) wird als eine statistische Methode angesehen, die durch die Untersuchung des Istzustandes einer Art oder eines Artkomplexes Rückschlüsse auf die Populationsgeschichte und Artbildungsprozesse ziehen, bzw. auch Grenzflächen zwischen nah verwandten Arten aufzeigen kann (TEMPLETON 2001). Dazu werden Zeit und Raum in einer gemeinsamen Analyse integriert, indem die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen Haplotypen und Gruppen von Haplotypen (phylogenetische Bäume) in Form von Netzwerken mit ihrer tatsächlichen räumlichen Verbreitung (Geographie) verknüpft werden (TEMPLETON 2002). Die NCA erfolgt in drei aufeinander folgenden Schritten, die im Methodenteil dieses Kapitels näher erläutert werden. Zuerst werden die Haplotypen im Netzwerk zu ineinander geschachtelten Gruppen („clades“) verschiedener Ebenen zusammengefasst. Dieses hierarchische Muster wird anschließend mit der geographischen Information eines jeden Haplotypen verknüpft. Der Zusammenhang von geographischer Verbreitung und Haplotypen wird durch die Überprüfung der Nullhypothese „keine Verbindung zwischen Geographie und Haplotyp-Verteilung im Netzwerk“ berechnet. Dabei werden für jeden relevanten Clade vier verschiedene Distanzwerte in Kilometern bemessen und deren Signifikanz im Hinblick auf die Nullhypothese durch Permutation ermittelt und angegeben.

**$D_c$**  – bemisst anhand des geographischen Zentrums eines Clades die durchschnittliche Entfernung der Individuen und somit der Haplotypen des Clades zu dessen Zentrum. Damit wird bemessen wie geographisch weit verbreitet die Individuen/ Haplotypen des Clades sind.

**$D_n$**  – bemisst anhand des geographischen Zentrums des nächst höheren Clades in dem der relevante Clade liegt, wie weit Individuen/ Haplotypen dieses Clades durchschnittlich vom geographischen Zentrum der nächst höheren Clade-Ebene entfernt sind. Damit wird ausgesagt, wie weit entfernt diese Individuen/ Haplotypen durchschnittlich zu allen anderen Individuen der nächsthöheren Clade-Ebene sind.

**I-T  $D_n$**  und **I-T  $D_c$**  – berechnen sich durch die Subtraktion der durchschnittlichen Distanzen der äußeren Clades oder Haplotypen („tip clades“) von den durchschnittlichen Distanzen der

inneren Clades oder Haplotypen („interior clades“) innerhalb eines gemeinsamen Clades. Außenliegende Clades sind durch nur eine Verbindung zum Netzwerk charakterisiert und innenliegende Clades durch zwei oder mehr Verbindungen. Die Distanzwerte zeigen an, wie weit verbreitet jüngere „tip clades“ verglichen mit den älteren „interior clades“ innerhalb eines Clades (I-T  $D_c$ ) oder zur nächst höheren Clade-Ebene (I-T  $D_n$ ) sind.

Die Muster aller berechneten Distanzwerte zwischen äußeren und internen Clades sind wichtig, um bei der biologischen Interpretation mögliche Gründe für geographische Strukturierungen der genetischen Variation zu unterscheiden (TEMPLETON et al. 1995).

Im dritten und letzten Schritt werden signifikant große und signifikant kleine Clade-Distanzwerte der einzelnen Clades, die einer Ablehnung der Nullhypothese entsprechen, anhand eines Schlüssels interpretiert, um die Prozesse, die hinter den gegebenen Mustern liegen, abzuleiten. Clades der höheren Ebenen gelten dabei als älter gegenüber niedrigeren Clade-Levels und äußere Clades werden im Allgemeinen jünger eingestuft als interne Clades (TEMPLETON et al. 1995). Drei Hauptpopulationsprozesse können durch die Interpretation der Muster signifikanter Clade-Distanzwerte abgeleitet werden, wobei Vorhersagen aus der Koaleszenz-Theorie zugrunde liegen: 1) eingeschränkter Genfluss zwischen Populationen, 2) Gebietsausweitung und 3) allopatrische Fragmentierung. „Eingeschränkter Genfluss“ ist ein wiederkehrendes Populationsereignis, das von historischen, zurückliegenden Prozessen zu unterscheiden ist. Liegt eingeschränkter Genfluss vor, ist die geographische Verbreitung eines Haplotypen stark von dessen Alter abhängig (siehe auch TEMPLETON et al. 1995). Jüngere, äußere Clades weisen typischerweise signifikant kleine Clade-Distanzen auf, wobei interne Clades in weiten Gebieten vorkommen und daher signifikant große Clade-Distanzen zeigen. I-T  $D_c$  ist in diesem Fall signifikant groß (TEMPLETON 2004, siehe für weitere Erläuterungen TEMPLETON et al. 1995).

Im Falle von Gebietserweiterungen sind ältere, interne Haplotypen typischerweise eher auf die Ausgangsgebiete beschränkt, während jüngere, äußere Haplotypen, die im Verlauf der Ausbreitung neu entstanden sind, weit verbreitet sind. Bei einer zusammenhängenden Ausbreitung in benachbarte Gebiete, wären die  $D_c$ - und  $D_n$ -Distanzen für äußere Clades signifikant groß und bei Fernverbreitung als Ursache für die Gebietserweiterung müssten  $D_c$ 's zum Teil signifikant klein sein, während die  $D_n$ -Werte signifikant groß bleiben (CANN et al. 1987, TEMPLETON et al. 1995).

Liegt eine Fragmentierung der Populationen vor sind die geographischen Räume der Clades strikt begrenzt. Diese Tatsache wird typischerweise durch signifikant kleine Clade-Distanzen ( $D_c$ ) für äußere und interne Clades angezeigt. Die  $D_n$ -Distanzwerte allerdings können mit

zunehmendem Clade-Level signifikant ansteigen, wenn die geographischen Zentren der fragmentierten Regionen nicht eng zusammen liegen, da in den  $D_n$ -Werten alle fragmentierten Populationen wieder vereinigt werden (TEMPLETON et al. 1995). Auftretende Mutationen in den isolierten Populationen können zu überdurchschnittlich hohen genetischen Distanzen zwischen diesen führen (HUDSON 1990, HEY 1991).

Kritiker der NCA (z. B. KNOWLES & MADDISON 2002) konnten in Simulationsstudien zeigen, dass die Methode nicht in jedem Fall die richtigen demographischen und evolutionären Prozesse aufdeckt, die der räumlichen Verteilung der Haplotypen zugrunde liegen. BOWIE et al. (2004) zeigten, dass mit der Analyse sekundärer Kontakt zwischen vormals getrennten Populationen nicht identifiziert werden konnte. Die Ergebnisse einer NCA-Analyse müssen also kritisch interpretiert werden.

In dieser Arbeit wurde die NCA gewählt, um über den Weg testbarer Nullhypothesen mit anschließender Ableitung historischer Populationsprozesse, das Kohäsive Artkonzept (TEMPLETON 1989) auf die vorliegenden *Neuropogon*-Artkomplexe anzuwenden und Artgrenzen zu testen. Da das Kohäsive Artkonzept auf der Grundlage evolutionärer Abstammungslinien beruht, die durch genetische aber auch ökologische Kräfte zusammengehalten werden, bezieht es auch asexuelle Taxa ein und betrachtet z. B. Hybridisierung als weit verbreitetes Phänomen und möglichen Artbildungsprozess (TEMPLETON 2001). Die verwirrenden Signale, die durch das Auftreten von Hybridisierung oder ‚Lineage Sorting‘ entstehen, werden indirekt von der NCA bewertet, mit der Stärke des Signals für getrennte Abstammungslinien verglichen und anhand objektiver und quantifizierbarer, statistischer Kriterien ausgewertet. Abstammungslinien müssen daher keine monophyletisch reinen Gruppen bilden. Haplotypen-Netzwerke stellen eine ideale Möglichkeit dar, Variabilität innerhalb und zwischen Arten aufzuzeigen und zeigen eine sichtbare Schnittstelle zwischen infra- und interspezifischer Evolution auf (TEMPLETON 2001). Zusätzlich können morphologische, ökologische und andere Merkmale mit den geschachtelten Netzwerken verknüpft und überprüft werden, was in dieser Arbeit durch die Anwendung von Kontingenztafeltests für qualitative und ANOVAs (Analysis of variance) für quantitative Merkmale erreicht wurde (siehe auch TEMPLETON et al. 1987, TEMPLETON 1994). Nach TEMPLETON (2001) sind erst durch die Ablehnung von zwei Nullhypothesen die Voraussetzungen für kohäsive Arten gegeben. Zum einen muss in einer NCA die Nullhypothese „alle untersuchten Organismen stammen von einer einzigen evolutionären Abstammungslinie ab“ durch die Schlussfolgerung „Fragmentierung von Populationen“ signifikant abgelehnt werden. Zum anderen dürfen die so identifizierten Abstammungslinien

genetisch und/oder ökologisch nicht austauschbar sein. Die zweite Nullhypothese der Austauschbarkeit kann durch verschiedene Merkmalssets, wie morphologische, genetische, physiologische oder Verhaltens-Merkmale überprüft werden (TEMPLETON 2001). TEMPLETON (1998) gibt an, dass mindestens ein Merkmal die Nullhypothese von „genetischer oder ökologischer Austauschbarkeit“ signifikant ablehnen muss, damit eine Abstammungslinie als kohäsive Art bezeichnet werden kann. Kann die Nullhypothese mit den untersuchten Merkmalen nicht abgelehnt werden, muss deren Variabilität als intraspezifische Polymorphie bezeichnet werden und sie können nicht als artdefinierende Merkmale benutzt werden.

Beim anwendungsbezogenen Kohäsiven Artkonzept wird eine Fülle von Daten benötigt, um signifikante Rückschlüsse ziehen zu können.

Neben der Abgrenzung von Abstammungslinien werden durch die NCA Einblicke in phylogeographische Prozesse der Arten oder Artkomplexe gewährt und dadurch evtl. Hinweise auf den Artbildungsprozess selbst gegeben. Populationshistorische Prozesse wie Gebietserweiterungen, Fernverbreitung, Fragmentierung und Sekundärkontakte können durch die verschiedenen Merkmalssets hervorgehoben werden (TEMPLETON 2001).

## B-2 Material und Methoden

### B-2.1 Untersuchte Proben und Gruppierungen

In diesem Kapitel der Arbeit wurden dieselben Daten wie in Kapitel 3-A genutzt. Sie sind in Anhang 2 aufgelistet und in die hier untersuchten Großgruppen gegliedert. In der Haplotyp-Netzwerk-Analyse dieses Kapitels wurden die Außengruppen nicht beachtet und die *U. aurantiaco-atra*-, *U. trachycarpa*- und *U. perpusilla*-Gruppe unabhängig voneinander untersucht. Außerdem wurden acht Individuen der Gruppen aus den Analysen ausgeschlossen, deren Sequenzen z. T. zu kurz waren oder undefinierte Basen enthielten („?“ oder „N“). Diese Individuen sind in Anhang 2 durch das fehlende Sternchen neben der Probennummer gekennzeichnet. Netzwerkprogramme akzeptieren als Zeichen in den meisten Fällen nur Nukleotide oder fehlende Basen („Gaps“). Kombinierte Datensätze aus IGS-, ITS- und RPB1-Sequenzen wurden mit dem Programm BioEdit (HALL 1999) erstellt und in dem Programm DnaSP 4.00 (ROZAS et al. 2003) in Haplotypen-Dateien umgewandelt, die dann als Ausgangsdatsätze für die Netzwerkprogramme dienen.

### B-2.2 Genetische Beschreibung der Populationen

Um die Differenzierung zwischen Gruppen von Individuen auf verschiedenen geographischen Ebenen zu beleuchten, wurde die genetische Diversität innerhalb und zwischen den einzelnen Populationen und Regionen ermittelt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Populationen, die weiter voneinander entfernt liegen, auch genetisch stärker voneinander unterschieden sind als Individuen die geographisch in nächster Nähe liegen. Signifikante Abweichungen von dieser Regel können Hinweise auf unterschiedliche *Neuropogon*-Arten geben. Der Grad an genetischer Diversität innerhalb der besammelten Populationen wurde anhand der Haplotyp- oder Gendiversität ( $H_d$ ) und Nukleotiddiversität ( $\pi$ ) (NEI 1987) bemessen. Die Haplotypdiversität wird als die Wahrscheinlichkeit definiert, mit der zwei zufällig ausgewählte Haplotypen unterschiedlich sind. Je näher der Wert an 1 rückt, desto höher ist die genetische Diversität der Gruppe. Die Nukleotiddiversität drückt die Wahrscheinlichkeit aus, mit der zwei zufällig ausgewählte homologe Nukleotide unterschiedlich sind (NEI 1987). Beide Werte wurden sowohl für jede einzelne Population, als auch für größere Regionen, die mehrere Populationen umfassen berechnet, um auch die Großregionen miteinander vergleichen zu können (z. B. Antarktis und Südamerika). Alle Berechnungen wurden im Programm DnaSP 4.00 (ROZAS et al. 2003) durchgeführt und die

Ergebnisse werden in den Tabellen 3.7, 3.9 und 3.11 zusammen mit den Haplotypfrequenzen der einzelnen Populationen bzw. Regionen präsentiert.

### B-2.3 Morphologische Analyse

Zur morphologischen Analyse der Proben wurden ein Binokular mit Messokular, eine Pinzette und eine Rasierklinge benutzt. Von jeder einzelnen molekular untersuchten Probe wurden unter dem Binokular die Merkmalszustände der einzelnen morphologischen Merkmale aufgenommen. In Tabelle 3.5 sind alle 19 untersuchten Merkmale und ihre möglichen Ausprägungen aufgelistet. Die Auswahl mehr oder weniger konstanter Merkmale innerhalb Arten erfolgte angelehnt an CLERC (1998) und OHMURA (2001). Der Methode nach CLERC (1984) folgend, wurde die Dicke des Zentralstranges jeweils an einem möglichst dicken, älteren Ast gemessen. Dafür wurde der Thallus auf einer Länge von ca. 0,5 – 1 cm mit einer Rasierklinge bis in die Mitte des Zentralstranges aufgeschnitten, so dass der Zentralstrang an seiner weitesten Stelle gemessen werden konnte. Die Messwerte wurden als ungefähre Richtwert (siehe # 19 in Tab. 3.5), aber auch als genaue Prozentangabe festgehalten, die statistisch ausgewertet werden konnte (siehe Anhang 3).

Tab. 3.5: Untersuchte morphologische Merkmale und ihre Ausprägungen in *Neuropogon*. Auflistung der Merkmalszustände der untersuchten Proben siehe Anhang 3.

#	Morphologische Merkmale	Ausprägung
1	Apothecien	0 nicht vorhanden
		1 schwarz
		2 braun
		3 blassgelb/ gelb
		4 gelb-schwarz
2	Apothecienform	5 variabel
		0 napfförmig
		1 flach ausgebreitet
		2 flach gewellt
3	Sorale	3 variabel
		0 nicht vorhanden
		1 gewölbter, artikulierter Rand, meist konkav
		2 punktförmig, meist konvex
		3 ineinander fließend ausgehend von Rissbildung
4	Soralhäufigkeit	4 variabel
		5 nicht aufgebrochen aber angelegt
5	Soralposition	0 punktuell bis häufig
		1 ineinander übergehend
6	Isidiomorphe	0 beschränkt auf Seitenäste und Spitzen
		1 auch an Hauptästen
		0 nicht vorhanden
7	Thallusoberfläche	1 pigmentiert
		2 unpigmentiert
		0 glatt
8	Papillen	1 strukturiert
		0 nicht vorhanden
		1 hauptsächlich pigmentierte Papillen
		2 hauptsächlich unpigmentierte Papillen
		3 beides

		4	nur vereinzelt
9	Papillenform	0	hauptsächlich grob bis gestielt
		1	hauptsächlich fein (pigmentiert evtl. gröber!)
10	Fibrillen	0	nicht vorhanden
		1	vorhanden
		2	sehr häufig
11	Fibrillenposition	0	gleichmäßig verteilt
		1	verstärkt an Hauptästen
		2	verstärkt an Seitenästen
12	Kortexgrübchen	0	nicht vorhanden
		1	vorhanden
		2	sehr häufig
13	Annulationen/ Risse	0	nicht vorhanden
		1	an Hauptästen
		2	überall häufig
14	Sekundärastansatz	0	zylindrisch
		1	verbreitert
		2	verschmälert
15	Thallusbasis (Form)	0	wuchernd
		1	abgesetzter Stamm bzw. zusammenlaufend
		2	deutlich verlängerter Stamm
16	Thallusbasis (Farbe)	0	hell
		1	schwarz
		2	orange-braun
17	Kortexschnittfläche	0	glänzend
		1	matt
18	Mark	0	locker
		1	dicht
		2	kompakt
19	Zentralstrang	0	$\leq \frac{1}{3}$ des $\emptyset$
		1	$\leq \frac{1}{2}$ des $\emptyset$
		2	$> \frac{1}{2}$ des $\emptyset$
		3	$\geq \frac{3}{4}$ des $\emptyset$

### B-2.4 Chemische Analyse

Die chemische Analyse erfolgte über zwei verschiedene chromatographische Methoden. Jede molekular untersuchte Probe wurde zuerst mit dem TLC (Thin-Layer Chromatography)-Verfahren auf chemische Inhaltsstoffe hin überprüft. In einigen Fällen konnten die Sekundärstoffe nicht identifiziert werden und das sensitivere HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)-Verfahren wurde zur Identifizierung eingesetzt. Vor Beginn beider Verfahren wurden ca. 5-10mg Flechtenmaterial möglichst von jungen und älteren Ästen abpräpariert und in einem Eppendorfgefäß ca. 1 Stunde in Aceton eingeweicht, um die Flechtenstoffe zu extrahieren. Das Acetongemisch wurde dann zur Chromatographie verwendet. Im Folgenden werden die beiden Verfahren kurz erläutert.

#### TLC

Das TLC-Verfahren wurde in den 70er Jahren von CULBERSON & KRISTINSSON (1970) für Flechten standardisiert und weiterentwickelt (CULBERSON 1972, WHITE & JAMES 1985). Ein ausführliches Protokoll findet sich in LUMBSCH (2002). Mit Hilfe kleiner Kapillarröhrchen (ca. 10 Füllungen) wurde eine ausreichende Menge Acetongemisch von je 13 Proben, sowie

vier Standardsubstanzen auf Silica beschichtete TLC-Platten aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen, um die  $R_f$ -Werte (Laufzeit-Werte) der chemischen Stoffe zu ermitteln, wurden Norstictin-, Salazin- und Psoromsäure und ein Gemisch aus Fumarprotocetrar- und Protocetrarsäure genutzt. Drei Hauptlösungsmittel A, B und C wurden für das TLC-Verfahren entwickelt, von welchen B am besten geeignet zur Trennung der Inhaltsstoffe der *Neuropogon*-Proben war (siehe z. B. LUMBSCH 1998a). Die Platte wurde für ca. 45 min in die Chromatographiekammer in Lösungsmittel B gestellt, anschließend getrocknet, unter lang- und kurzweiligem UV-Licht betrachtet und Flecken chemischer Substanzen markiert. Zur Visualisierung der Flecken und ihrer Farben wurde die Platte mit Schwefelsäure besprüht und im Ofen bei 110°C für ca. 30 min erhitzt.

### HPLC

Die HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) nutzt ein chromatographisches, im Regelfall computergesteuertes System mit UV-Detektor in Verbindung mit einem Photometer. Der Computer dient zudem zur Speicherung und Auswertung der Chromatogramme. Das System ist sensitiver als die TLC und kann auch sehr geringe Mengen chemischer Substanzen ermitteln. Zudem ist es leichter Stoffe zu identifizieren, da die Chromatogramme sehr genaue Aussagen über die Laufzeit aller Substanzen machen und diese im Computer mit den Laufzeiten bekannter Substanzen verglichen werden können. FEIGE et al. (1993) haben das Verfahren für viele Flechtenstoffe standardisiert. Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden an HPLC-Systemen am Field Museum in Chicago, USA (LC-9A Liquid Chromatograph und Software von SHIMADZU), und am chemischen Institut der Australian National University in Canberra, Australien, von Professor J. A. Elix durchgeführt. Da jedes System seine eigene Bedienung erfordert, soll darauf nicht näher eingegangen werden. Eine detaillierte Beschreibung eines Standardprotokolls findet sich bei LUMBSCH (2002). Als Laufmittel zur Bestimmung von Flechtenstoffen wurden zwei Lösungsmittel in unterschiedlichen Mengen verwendet: Methanol und 1%ige Phosphorsäure in destilliertem Wasser. Ca. 20 µl des gut gefilterten Acetongemischs wurden in das System injiziert und durchliefen in ca. 45 min eine Chromatographiesäule bis hin zum Photometer. Die Daten wurden dort durch den UV-Detektor aufgenommen und in ein Computerchromatogramm übertragen. Die Scheitelpunkte der Chromatogramme verschiedener Proben konnten dann in Laufzeit-Werte ( $RI$ ) umgewandelt und anschließend untereinander und mit den  $RI$ s von Reinsubstanzen verglichen werden (Listen mit Chromatographiedaten finden sich z. B. in HUNECK & YOSHIMURA 1996) (LUMBSCH 2002).

### **B-2.5 Median-joining-, statistische Parsimony-Netzwerke und Nested Clade Analyse**

Die Median-joining Netzwerke für die drei Großgruppen wurden im Computerprogramm NETWORK 4.1.1.1 (FLUXUS TECHNOLOGY 2004) mit den Standardeinstellungen berechnet. Voraussetzung zur Nutzung der meisten Netzwerkprogramme ist ein Datensatz, der frei von Rekombination ist. Diese Voraussetzung wurde schon in Kapitel 3-A durch den GENECONV-Test (SAWYER 1999) überprüft.

Für die einzelnen Großgruppen wurden zudem jeweils statistische Parsimony-Netzwerke mit dem Computerprogramm TCS 1.21 (CLEMENT et al. 2000) erstellt. Haplotypen wurden proportional zur Anzahl der Individuen als unterschiedlich große Blasen dargestellt und jede dazwischen liegende Mutation als Punkt deutlich gemacht. Zur besseren Visualisierung und Kolorierung nach Standorten wurden die Netzwerk-Graphen im Programm yEd 2.2.1.3 (yWorks GmbH) bearbeitet.

Die Netzwerke wurden für die NCA mit Hilfe der Regeln in TEMPLETON et al. (1987), TEMPLETON & SING (1993) und TEMPLETON et al. (1995) manuell in eine Serie von hierarchischen Gruppen („nested clades“) geschachtelt. Die Zusammenballung von Haplotypen und Gruppen von Haplotypen erfolgte sukzessiv und paarweise, beginnend an den äußeren Enden der Netzwerke („tips“). Haplotypen, die nur durch eine einzige Mutation getrennt waren, wurden so zu 1-Schritt-Clades (Gruppen von Haplotypen) gruppiert. Diese 1-Schritt-Clades wurden anschließend denselben Regeln folgend in 2-Schritt-Clades zusammengefasst usw., bis das Netzwerk als Ganzes zusammengefasst werden konnte. So genannte „loops“, unklare Verbindungen innerhalb der Netzwerke, die durch das Vorhandensein mehrerer wahrscheinlicher Verbindungsmöglichkeiten zwischen Haplotypen auftreten, wurden angelehnt an Vorhersagen der Koaleszenz-Theorie aufgelöst. Anleitungen hierzu sind in POSADA & CRANDALL (2001) und PFENNINGER & POSADA (2002) zusammengefasst. Dieses geschachtelte Netzwerk wurde dann manuell in eine Textdatei übertragen und dabei mit den vorhandenen geographischen Daten der Aufsammlungen verknüpft. Das Computerprogramm GEODIS 2.4 (POSADA et al. 2000) wurde zur Berechnung der Clade-Distanzen ( $D_c$  und  $D_n$ ) benutzt. Ein implementierter Permutationstest nach ROFF & BENTZEN (1989) berechnete die statistischen Signifikanzwerte der Clade-Distanzen. Jeweils 10,000 Permutationen wurden zur Gewinnung der Signifikanzwerte durchgeführt.

Abschließend wurde der neuste Schlüssel nach TEMPLETON (2004) zur Interpretation der signifikanten Distanzwerte genutzt (neuste Online-Version vom 11. November 2005: <http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>).

### **B-2.6 Kontingenztafeltests und ANOVA (Analysis of variance)**

Die Durchführung von Kontingenzanalysen als Tests für qualitative Merkmale, die auf ein Netzwerk bezogen sind, wird in TEMPLETON (1998) erwähnt. Kontingenztafeltests sind Hypothesentests beruhend auf Häufigkeitstabellen, die Aussagen darüber treffen, ob durch eine bestimmte Verteilung von Häufigkeiten innerhalb von Gruppen signifikante Effekte vorliegen oder nicht. Kontingenztafeln werden durch die Auflistung aller Werte einer Variablen in Reihen und aller Werte der anderen Variablen in Spalten einer Tabelle erstellt. Effekte in diesen Häufigkeitstabellen werden als Beziehungen zwischen den Variablen in den Reihen und Spalten definiert. Die beobachteten Häufigkeiten werden mit den erwarteten Häufigkeiten bei Annahme einer gleichmäßigen Verteilung verglichen. Signifikanz wird basierend auf einem  $\chi^2$ -Test getestet.

Die ANOVA (Analysis of Variance) ist ein statistisches Verfahren, das quantitative Daten nutzt. Diese Daten, z. B. Messwerte, werden gruppenweise aufgelistet, der Gruppendurchschnitt bestimmt, mit dem erwarteten Gruppendurchschnitt verglichen und in einer F-Statistik berechnet. Je höher  $F$  ist, umso stärker ist ein Effekt zwischen den Gruppen zu verzeichnen. Ist  $F=1$ , trifft die Nullhypothese der gleichmäßigen Verteilung zu.  $P$  gibt den Signifikanzlevel an. TEMPLETON et al. (1987) bezeichnet die Verknüpfung von ANOVA und geschachtelten Netzwerken als NANOVA (Nested analysis of variance). Der Begriff NANOVA soll deutlich machen, dass Auskunft darüber gegeben wird, in welchem Level des geschachtelten Netzwerkes die phänotypisch wichtigen Merkmale lokalisiert sind.

In der vorliegenden Studie wurden die 3-, 4- und 5-Schritt-Ebenen der geschachtelten Netzwerke der NCA für die Kontingenztafeltests und die 3- und 4-Schritt-Ebenen für die NANOVA genutzt. Da das Netzwerkdesign für die NCA unabhängig von jeglicher Assoziation zwischen Haplotypen und Phänotypen erstellt wird, wird einer Überprüfung subjektiv gruppierter Clades und der Gefahr des Versäumnisses phänotypischer Assoziationen vorgebeugt.

Die benutzten Programme für ANOVA und Kontingenztafeltests stehen als online-Programme auf der Internetseite „Tools for Science“: <http://www.physics.csbsju.edu/stats/> zur Verfügung.

## B-3 Ergebnisse

### B-3.1 Datensätze und genetische Diversität

Die Alignments der drei kombinierten Datensätze der Gruppen wurden an Anfang und Ende der Einzelgene beschnitten, damit sie keine unklaren Alignmentpositionen mehr enthielten. Fehlende Basen („gaps“) verblieben an 6 Positionen des Alignments der *U. perpusilla*-Gruppe und 4 Positionen der *U. trachycarpa*-Gruppe. Die „gaps“ wurden bei der Erstellung der Haplotyp-Dateien berücksichtigt. Insgesamt wurden 262 Individuen untersucht, die auf 125 Haplotypen aufgeteilt waren und von 29 Populationen stammten. Die Verteilung auf die drei Gruppen war wie folgt:

*U. trachycarpa*-Gruppe: 1515 bp, 83 Individuen mit 32 Haplotypen aus 14 Populationen,

*U. perpusilla*-Gruppe: 1515 bp, 80 Individuen mit 48 Haplotypen aus 12 Populationen,

*U. aurantiaco-atra*-Gruppe: 1513 bp, 99 Individuen mit 45 Haplotypen aus 15 Populationen.

Im Folgenden werden drei Sätze von Tabellen und Kartenmaterial für jede einzelne Großgruppe zusammengefasst. Jeder Datensatz besteht aus einer Auflistung der Haplotypen der einzelnen Gruppen mit ihren variablen Positionen (Tab. 3.6, 3.8, 3.10), einer Tabelle, die die genetische Diversität einer jeden Gruppe zusammenfasst (Tab. 3.7, 3.9, 3.11) und geographischen Karten, die die einzelnen Sammelregionen zeigen (Abb. 3.11, 3.12, 3.13). Das Kartenmaterial mit den eingezeichneten Populationen korrespondiert jeweils mit den Standortnummern in den Diversitätstabellen. In diesen Tabellen (Tab. 3.7, 3.9, 3.11) sind weiterhin die Längen- und Breitengrade der Aufsammlungsorte, die Anzahl der Individuen aus den einzelnen Populationen mit den Haplotypen und ihren Frequenzen und die Haplotyp- und Nukleotiddiversität innerhalb der einzelnen Populationen sowie Großregionen angegeben.

#### *Die U. trachycarpa-Gruppe*

Die *U. trachycarpa*-Gruppe hat relativ zur Individuenanzahl die geringste Haplotypenanzahl der drei Datensätze (Tab. 3.6). Die Gesamthaplotypendiversität  $H_d$  beträgt  $0.87 \pm 0.03$  (siehe Tab. 3.7). Innerhalb dieses Datensatzes zeigen die Populationen der Nordhemisphäre mit 29 untersuchten Individuen und nur 2 Haplotypen eine extrem geringe Haplotyp- und Nukleotiddiversität ( $H_d$ :  $0.19 \pm 0.09$  und  $\pi$ :  $0.0001 \pm 0.0001$ ) verglichen mit den südhemisphärischen Populationen, z. B. südliches Südamerika mit 38 untersuchten Individuen und 23 Haplotypen ( $H_d$ :  $0.96 \pm 0.02$  und  $\pi$ :  $0.006 \pm 0.0005$ ). Die südliche maritime Antarktis hat eine sehr hohe Gendiversität ( $1 \pm 0.27$ ), ist allerdings mit drei



Tab. 3.7: Genetische Beschreibung der Populationen (normal), Sammelregionen (*kursiv*) und Grossregionen (**fett**) der *U. trachycarpa*-Gruppe. Die Standortnummern # korrespondieren mit dem Kartenmaterial. *N* gibt die Anzahl untersuchter Individuen an. Ihre jeweilige Anzahl in den Haplotypen steht in Klammern. Hd und  $\pi$  (Nei 1987) sind fuer jede Gruppe mit der Standardabweichung angegeben.

Region	#	Standort	Kürzel	Breitengrad	Längengrad	N	Haplotypen H	Haplotyp/ Gen Diversität Hd	Nukleotid Diversität $\pi$
<b>Kontinentale Antarktis</b>									
<i>Alexander Island</i>									
	1	Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	7	4	<b>0.810 +/- 0.130</b>	<b>0.0034 +/- 0.0008</b>
						7	4	0.810 +/- 0.130	0.0034 +/- 0.0008
						7	H: 1(3), 7(2), 11, 16	0.810 +/- 0.130	0.0034 +/- 0.0008
<b>Südliche Maritime Antarktis</b>									
<i>Marguerite Bay</i>									
	2	Leonie Island	MLEO	67°36'S	68°21'W	3	3	<b>1.000 +/- 0.272</b>	<b>0.004 +/- 0.0013</b>
	3	Lagoon Island	MLAG	67°36'S	68°16'W	3	3	1.000 +/- 0.272	0.004 +/- 0.0013
						1	H12	1 +/- 0.000	n.d
						2	H: 13, 18	1.000 +/- 0.500	0.0046 +/- 0.0023
<b>Südliches Südamerika</b>									
<i>Tierra del Fuego</i>									
	4	Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	38	23	<b>0.957 +/- 0.018</b>	<b>0.006 +/- 0.0005</b>
						11	9	0.964 +/- 0.051	0.005 +/- 0.0006
	5	Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	6	H: 1(2), 19, 20, 21, 31	0.933 +/- 0.122	0.0041 +/- 0.0011
						5	H: 6, 23, 22(2), 32	0.900 +/- 0.161	0.0053 +/- 0.0012
		<i>Santa Cruz</i>				8	7	0.964 +/- 0.077	0.0059 +/- 0.0009
	6	Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	8	H: 12, 24, 25(2), 26, 28, 29, 30	0.964 +/- 0.077	0.0059 +/- 0.0009
		<i>Patagonische Anden</i>				12	7	0.773 +/- 0.128	0.0016 +/- 0.0006
	7	N von El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	12	H: 1, 2, 6, 7(6), 14, 15, 27	0.773 +/- 0.128	0.0016 +/- 0.0006
		<i>Rio Negro, Bariloche</i>				7	3	0.714 +/- 0.127	0.0026 +/- 0.001
	8	Cerro Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	7	H: 1, 3(3), 4(3)	0.714 +/- 0.127	0.0026 +/- 0.001
<b>Nördliches Südamerika</b>									
<i>Ecuador</i>									
	9	Vulkan Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	6	H: 5(2), 8, 9(2), 10	0.867 +/- 0.129	0.0026 +/- 0.0013
						6	4	0.867 +/- 0.129	0.0026 +/- 0.0013
						6	4	0.867 +/- 0.129	0.0026 +/- 0.0013
<b>Nordhemisphäre</b>									
<i>Island</i>									
	10	Zentrales Hochland	ISLA	64°45'N	18°15'W	29	2	<b>0.192 +/- 0.090</b>	<b>0.0001 +/- 0.0001</b>
						9	1	0	0
						9	H5(9)	0	0
<i>Grönland</i>									
	11	Disko	GRDK	69°16'N	53°35'W	7	2	0.571 +/- 0.119	0.0004 +/- 0.0001
	12	Thule	GRTH	76°31'N	68°24'W	3	H17(3)	0	0
						4	H5(4)	0	0
<i>Kanada</i>									
	13	Melville Island	KAMV	75°19'N	114°43'W	4	1	0	0
						4	H5(4)	0	0
<i>Svalbard</i>									
	14	Spitzbergen	SPIZ	79°17'N	16°04'E	9	1	0	0
						9	H5(9)	0	0
<b>gesamt</b>						<b>83</b>	<b>32</b>	<b>0.870 +/- 0.032</b>	<b>0.0058 +/- 0.0003</b>

Individuen nicht ausreichend besammelt worden, was sich auch in einer hohen Standardabweichung ausdrückt. Individuen aus Ecuador liegen im Mittel der Haplotypdiversität ( $0.867 \pm 0.129$ ), aber die Nukleotiddiversität ( $\pi: 0.0026 \pm 0.0013$ ) ist im Gegensatz zu anderen Populationen mit einer ähnlichen Haplotypquote relativ gering, was auf nah verwandte Haplotypen hinweist. Die Auflistung der Breiten- und Längengrade in Tabelle 3.7 und in Abbildung 3.11 machen noch einmal die bipolare Verbreitung dieses Artkomplexes neben den extremen Unterschieden in der genetischen Diversität zwischen Populationen der beiden Polregionen deutlich.

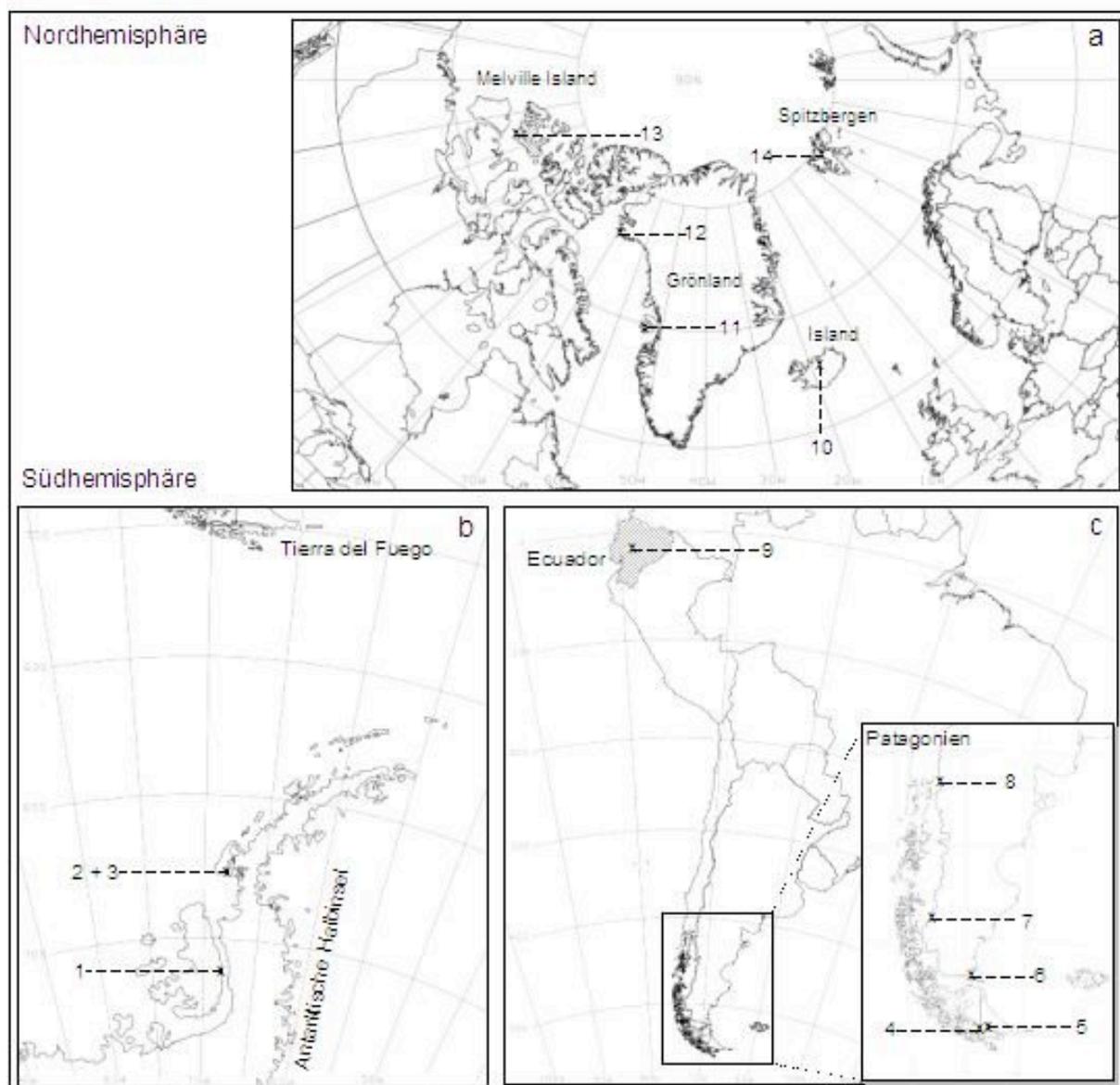


Abb. 3.11: Sammelorte der Individuen der *U. trachycarpa*-Gruppe. Die Populationsnummern stimmen mit den Standortnummern in Tab. 3.7 überein.





Tab. 3.9: Genetische Beschreibung der Populationen (normal), Sammelregionen (*kursiv*) und Grossregionen (**fett**) der *U. perpusilla*-Gruppe. Die Standortnummern # korrespondieren mit dem Kartenmaterial. N gibt die Anzahl untersuchter Individuen an, ihre jeweilige Anzahl in den Haplotypen steht in Klammern. Hd und  $\pi$  (Nei 1987) sind für jede Gruppe mit der Standardabweichung angegeben.

Region	#	Standort	Kürzel	Breitengrad	Längengrad	N	Haplotypen H	Haplotyp/ Gen Diversität Hd	Nukleotid Diversität $\pi$
<b>Antarktis (gesamt)</b>						<b>16</b>	<b>9</b>	<b>0.925 +/- 0.004</b>	<b>0.0039 +/- 0.0004</b>
<b>Kontinentale Antarktis</b>						<b>12</b>	<b>7</b>	<b>0.909 +/- 0.056</b>	<b>0.0038 +/- 0.0004</b>
<i>Östliche Antarktis</i>						7	3	0.762 +/- 0.115	0.002 +/- 0.0006
1	Victoria Land, Nunatak	AROS	80°01'S	166°46'E	5	H: 34(2), 35(3)	0.600 +/- 0.175	0.0024 +/- 0.0007	
2	Casey Station, austral. AN Alexander Island	ACSY	66°17'S	110°32'E	2	H36	0	0	
3	Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	5	4	0.900 +/- 0.161	0.0026 +/- 0.001	
					5	H: 8, 18, 25, 39(2)	0.900 +/- 0.161	0.0026 +/- 0.001	
<b>Südliche Maritime Antarktis</b>						<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1.000 +/- 0.177</b>	<b>0.0047 +/- 0.0012</b>
<i>Marguerite Bay</i>					4	4	1.000 +/- 0.177	0.0047 +/- 0.0012	
4	Adelaide Isl., Reptile Ridge	MARR	67°36'S	68°20'W	1	H37	1	n.d.	
5	Adelaide Isl., Rothera	MARO	67°34'S	68°08'W	3	H: 8, 36, 38	1.000 +/- 0.272	0.0035 +/- 0.0015	
<b>Südliches Südamerika</b>						<b>53</b>	<b>35</b>	<b>0.978 +/- 0.009</b>	<b>0.0094 +/- 0.0003</b>
<i>Tierra del Fuego</i>					9	9	1.000 +/- 0.052	0.0056 +/- 0.00052	
6	Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	1	H1	1	n.d.	
7	Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	8	H: 16, 17, 19, 29, 42, 43, 44, 45	1.000 +/- 0.063	0.0057 +/- 0.0006	
<i>Patagonische Anden</i>					8	5	0.786 +/- 0.151	0.002 +/- 0.0007	
8	N von El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	8	H: 20, 21, 22(4), 23, 24	0.786 +/- 0.151	0.002 +/- 0.0007	
<i>Rio Negro, Bariloche</i>					36	22	0.963 +/- 0.016	0.009 +/- 0.0004	
9	Cerro Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	36	H: 2, 3(3), 4, 5(2), 6, 7(3), 8(3), 9, 10, 11, 12(5), 13(2), 14, 15(2), 24(2), 25, 26, 27, 28, 46, 47, 48	0.963 +/- 0.016	0.009 +/- 0.0004	
<b>Nördliches Südamerika</b>						<b>6</b>	<b>5</b>	<b>0.933 +/- 0.122</b>	<b>0.008 +/- 0.0017</b>
<i>Ecuador</i>					6	5	0.933 +/- 0.122	0.008 +/- 0.0017	
10	Vulkan Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	6	H: 8, 30, 31(2), 32, 33	0.933 +/- 0.122	0.008 +/- 0.0017	
<b>Nordhemisphäre</b>						<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0.600 +/- 0.175</b>	<b>0.0004 +/- 0.0001</b>
<i>Nordamerika, USA</i>					5	2	0.600 +/- 0.175	0.0004 +/- 0.0001	
11	Oregon, Mount Hood	NORG	45°22'N	121°41'W	2	H40	0	0	
12	Washington, Mount Adams	NWAS	46°12'N	121°29'W	3	H41	0	0	
<b>gesamt</b>						<b>80</b>	<b>48</b>	<b>0.982 +/- 0.005</b>	<b>0.0092 +/- 0.0003</b>

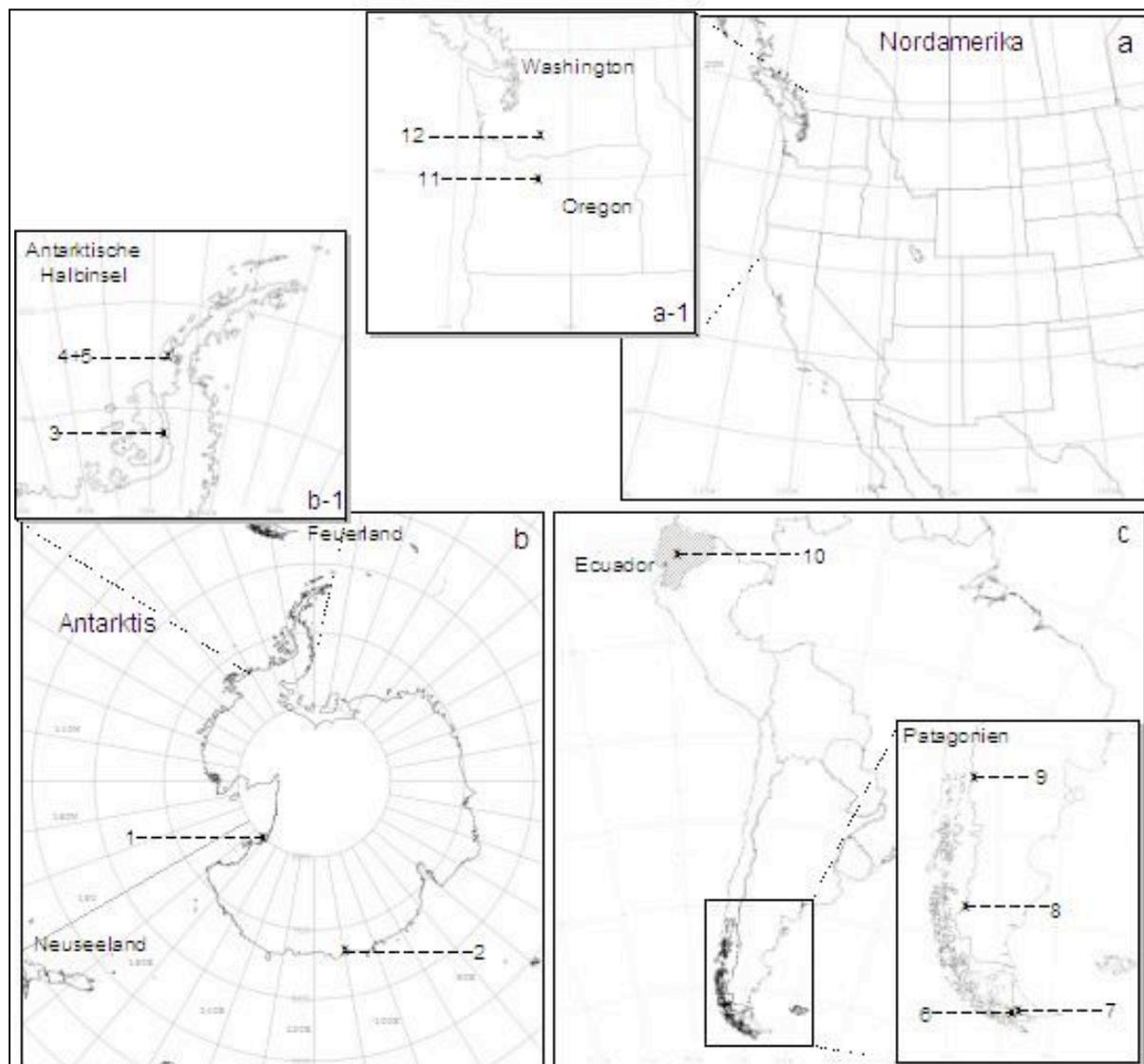


Abb. 3.12: Sammelorte der Individuen der *U. perpusilla*-Gruppe. Die Populationsnummern stimmen mit den Standortnummern in Tab. 3.9 überein.

### Die *U. perpusilla*-Gruppe

In der *U. perpusilla*-Gruppe ist das Verhältnis zwischen Individuenzahl und Haplotypenanzahl deutlich höher als in den anderen beiden Gruppen (siehe Tab. 3.8 und 3.9). Die Gesamthaplotypendiversität beträgt  $0.98 \pm 0.005$ . Es gibt mehrere Populationen mit sehr hoher Haplotyp- und Nukleotiddiversität, so z. B. in Tierra del Fuego, TFGM (Hd:  $1 \pm 0.06$  und  $\pi$ :  $0.009 \pm 0.0003$ ), wo jedes gesammelte Individuum (8) einen eigenen Haplotypen darstellt. Das südliche Südamerika ist eine genetisch sehr diverse Zone (Hd:  $0.978 \pm 0.009$ ,  $\pi$ :  $0.0094 \pm 0.0003$ ). Auch die antarktischen Gebiete erscheinen generell divers (Hd:  $0.925 \pm 0.004$ ,  $\pi$ :  $0.0039 \pm 0.0004$ ), wobei die östliche Antarktis, mit Proben aus abgelegenen Nunatakgebieten, insgesamt weniger divers ist (Hd:  $0.762 \pm 0.115$ ,  $\Pi$ :  $0.002 \pm 0.0006$ ) als maritime antarktische Gebiete, die eine geringere Individuenzahlen

haben. Die nordhemisphärischen Populationen haben geringe Diversitätswerte (Hd: 0.6 +/- 0.175,  $\Pi$ : 0.0004 +/- 0.0001). Zwar ist die Probengröße in diesen Gebieten mit insgesamt 5 klein, aber verglichen mit ähnlichen Probengrößen anderer Gebiete, ist vor allem die Nukleotiddiversität ( $\pi$ ) ca. 6 mal geringer, was auf nah verwandte Haplotypen mit wenigen Substitutionen hinweist.

#### *Die U. aurantiaco-atra-Gruppe*

In der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe fällt auf (Tab. 3.11), dass die genetische Diversität in den besammelten Regionen relativ ausgeglichen ist, übersieht man Populationen mit kleinen Probengrößen, wie z. B. MLEO, MARO oder SLPH. Das Verbreitungsgebiet beschränkt sich auf die Antarktis und Südamerika (Abb. 3.13). Auffällig ist die relativ geringe genetische Diversität der SCMA-Population in Südamerika. Sowohl die Haplotypdiversität (Hd: 0.464 +/- 0.2) und besonders die Nukleotiddiversität ( $\pi$ : 0.0003 +/- 0.0002) sind trotz einer Probengröße von acht Individuen verhältnismäßig klein. Es muss sich hier um sehr nah verwandte Haplotypen handeln. Weitere relativ geringe Werte haben die antarktischen Populationen SDEC (Hd: 0.75 +/- 0.139,  $\pi$ : 0.002 +/- 0.0004) und SLPH (Hd: 0.5 +/- 0.265,  $\pi$ : 0.0007 +/- 0.0004), aber die Nukleotiddiversität ist weniger niedrig als bei SCMA. Die höchste Haplotypdiversität findet sich in der meist besammelten Population, South Bay auf Livingston Island (Hd: 0.967 +/- 0.024,  $\pi$ : 0.0027 +/- 0.0003). Allerdings ist auffällig, dass die Nukleotiddiversität nur 0.5- oder 0.3-mal so groß ist wie in einigen südamerikanischen, gut besammelten Populationen, besonders in TFGM ( $\pi$ : 0.0055 +/- 0.0007) und SCEL ( $\pi$ : 0.0079 +/- 0.0012).



Tab. 3.11: Genetische Beschreibung der Populationen (normal), Sammelregionen (*kursiv*) und Grossregionen (**fett**) der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe. Die Standortnummern # korrespondieren mit dem Kartenmaterial. *N* gibt die Anzahl untersuchter Individuen an. Ihre jeweilige Anzahl in den Haplotypen steht in Klammern. Hd und  $\pi$  (Nei 1987) sind fuer jede Gruppe mit der Standardabweichung angegeben.

Region	#	Standort	Kürzel	Breitengrad	Längengrad	N	Haplotypen H	Haplotyp/ Gen Diversität Hd	Nukleotid Diversität $\pi$
<b>Südliche Maritime Antarktis</b>									
<i>Marguerite Bay</i>									
	1	Terra Firma Island	MTEF	68°42'S	67°32'W	6	5	<b>0.933 +/- 0.122</b>	<b>0.0022 +/- 0.0005</b>
	2	Leonie Island	MLEO	67°36'S	68°21'W	1	H6	0.933 +/- 0.122	0.0022 +/- 0.0005
	3	Rothera Point	MARO	67°34'S	68°08'W	2	H: 31, 32	1 +/- 0.000	n.d.
						3	H: 14, 30(2)	1.000 +/- 0.500	0.0046 +/- 0.0023
								0.667 +/- 0.314	0.0008 +/- 0.0004
<b>Nördliche Maritime Antarktis</b>									
<i>Süd Shetland Inseln</i>									
	4	Deception Island	SDEC	62°59'S	60°41'W	49	21	<b>0.938 +/- 0.018</b>	<b>0.0026 +/- 0.0002</b>
	5	Livingston Island, Byers Halbinsel	SLBP	62°40'S	61°05'W	48	21	0.936 +/- 0.019	0.0026 +/- 0.0002
	6	Livingston Island, Punta Hannah	SLPH	62°39'S	60°32'W	8	H: 6(2), 21(4), 28, 27	0.750 +/- 0.139	0.002 +/- 0.0004
	7	Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	12	H: 6(3), 8(3), 11(2), 12(2), 13, 21	0.879 +/- 0.060	0.0028 +/- 0.0003
	8	King George Island	SSKG	62°14'S	58°38'W	4	H: 21(3), 41	0.500 +/- 0.265	0.0007 +/- 0.0004
	9	Signy Island, Poal Harbour	SIGY	60°43'S	45°38'W	21	H: 6, 8, 9(2), 10(2), 12, 13(3), 14(2), 15(2), 16, 17, 21, 23, 26, 33, 40	0.967 +/- 0.024	0.0027 +/- 0.0003
<b>Südamerika</b>									
<i>Falkland Inseln</i>									
	10	Ost-Falkland, Port Stanley	FALK	51°45'S	57°56'W	3	H: 7, 33, 34	1.000 +/- 0.272	0.0022 +/- 0.0006
						1	1	1 +/- 0.000	n.d.
						1	H26	1 +/- 0.000	n.d.
<i>Tierra del Fuego</i>									
	11	Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	44	24	<b>0.937 +/- 0.021</b>	<b>0.005 +/- 0.0005</b>
	12	Glacier Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	1	1	1 +/- 0.000	n.d.
	13	Paso Garibaldi	TFPG	54°41'S	67°50'W	1	H25	1 +/- 0.000	n.d.
						28	18	0.915 +/- 0.038	0.005 +/- 0.0006
						13	H: 8, 18, 19, 20, 21(4), 29, 35, 36, 44, 45	0.923 +/- 0.069	0.0032 +/- 0.0010
	14	Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	13	H: 1, 2, 3(5), 8, 21(3), 24, 42	0.833 +/- 0.086	0.0055 +/- 0.0007
						2	H: 23, 43	1.000 +/- 0.500	0.0026 +/- 0.0013
						8	3	0.464 +/- 0.200	0.0003 +/- 0.0002
						8	H: 5(6), 21, 22	0.464 +/- 0.200	0.0003 +/- 0.0002
<i>Patagonische Anden</i>									
	15	N von El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	7	5	0.857 +/- 0.137	0.0079 +/- 0.0012
						7	H: 1(3), 4, 37, 38, 39	0.857 +/- 0.137	0.0079 +/- 0.0012
<b>gesamt</b>						<b>99</b>	<b>45</b>	<b>0.954 +/- 0.012</b>	<b>0.004 +/- 0.0004</b>

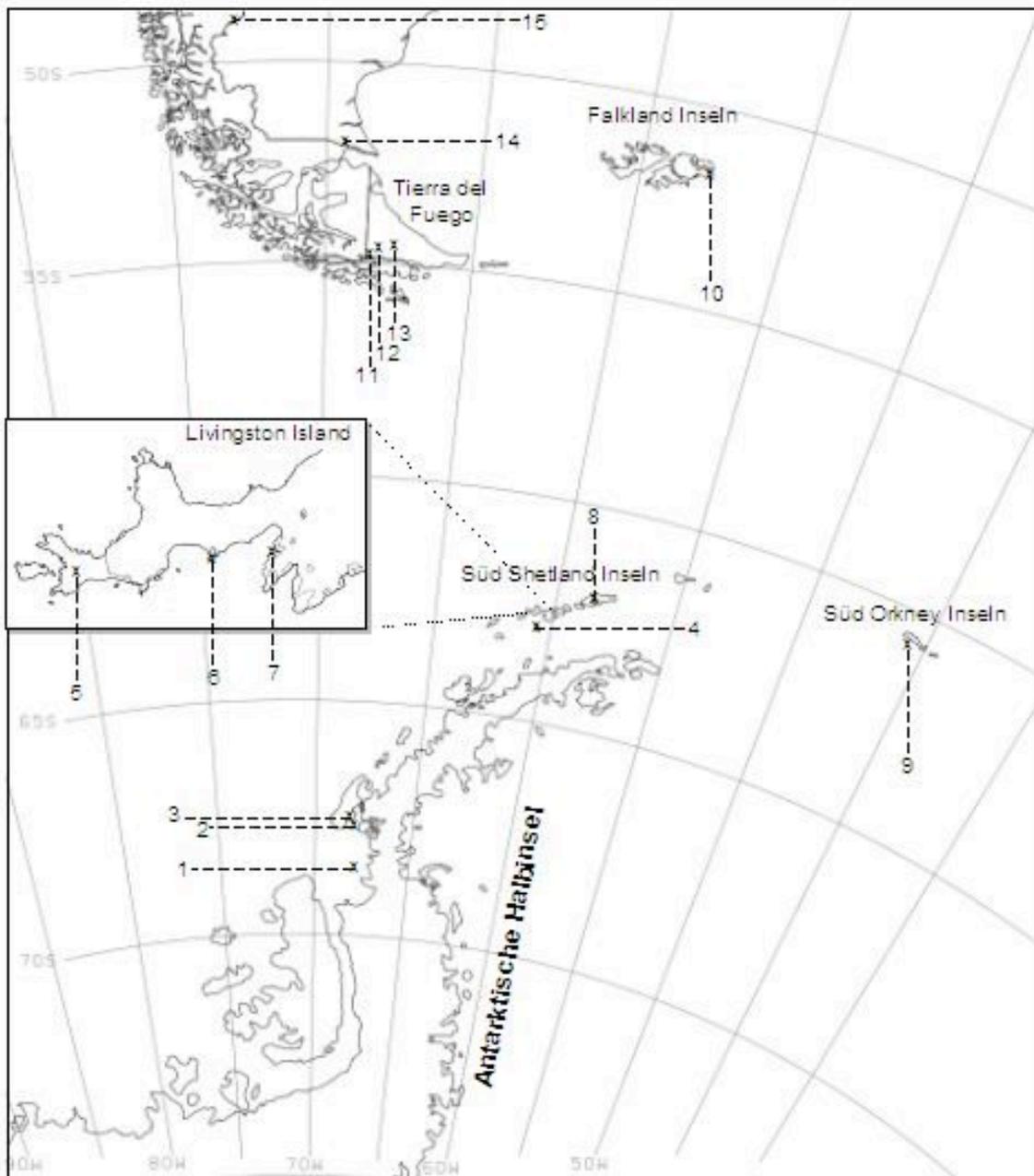


Abb. 3.13: Sammelorte der Individuen der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe. Die Populationsnummern stimmen mit den Standortnummern in Tab. 3.11 überein.

### B-3.2 Morphologische und chemische Daten

Die bei den morphologischen und chemischen Untersuchungen gewonnenen Daten sind im Anhang 3 in Form einer Tabelle kodiert aufgelistet. Die Entschlüsselung erfolgt über Tabelle 3.5 (Morphologie) und nachfolgende Tabelle 3.12 mit einer Auflistung der vorkommenden Sekundärstoffe. In dieser Form sind die Ergebnisse zum einen darstellbar und zum anderen gut nutzbar für die nachfolgenden Kontingenztafeltests und ANOVAs. Nach den codierten morphologischen Daten in Anhang 3 (#1-19) folgt eine Spalte mit den in Prozentangaben umgewandelten morphometrischen Daten der Achsendicke. #20-39 bezeichnen die in *Neuropogon* vorkommenden chemischen Substanzen, ausgenommen Usninsäure, die nicht aufgeführt wurde, da sie in jeder Probe vorkam. Sechs chemische Substanzen mit entsprechenden Begleitstoffen sind neu für die *Neuropogon*-Gruppe:

**$\beta$ -Orcinol-Depside:** Quaesitinsäure, Norperisticinsäure, Neotricon (Conneotricon), Neuropologinsäure (Protoneuropologinsäure).

**Dibenzofurane** als neue Stoffklasse für die Gruppe, mit den Substanzen: Strepsilin (= Norascomatinsäure) und ihren Derivaten (Iso- und Hypostrepsilinsäure)

**Benzylester:** Echinocarpinsäure (Subechinocarpinsäure)

Des Weiteren wurden drei bisher unidentifizierte Substanzen entdeckt, die z. T. charakteristisch für bestimmte Gruppierungen waren.

Tab. 3.12: Chemische Inhaltsstoffe in *Neuropogon* als binär codierte Merkmale. Die Merkmalszustände der untersuchten Proben sind in Anhang 3 aufgelistet.

#	Chemische Inhaltsstoffe	Ausprägung
<b>20</b>	<b><math>\beta</math>-Orcinol-Depside</b>	<b>0 nicht vorhanden</b> <b>1 vorhanden</b>
21	Norstictinsäure	0 nicht vorhanden 1 vorhanden
22	Salazinsäure	0 nicht vorhanden 1 vorhanden
23	Quaesitinsäure	0 nicht vorhanden 1 vorhanden
24	Protocetrarsäure	0 nicht vorhanden 1 vorhanden
25	Fumarprotocetrarsäure	0 nicht vorhanden 1 vorhanden
26	Psoromsäure	0 nicht vorhanden 1 vorhanden
27	Norperisticinsäure	0 nicht vorhanden 1 vorhanden
28	Neotricon (Con~)	0 nicht vorhanden 1 vorhanden
29	Neuropologinsäure (Proto~)	0 nicht vorhanden 1 vorhanden
<b>30</b>	<b><math>\beta</math>-Orcinol-Depside</b>	<b>0 nicht vorhanden</b> <b>1 vorhanden</b>
31	Squamatsäure	0 nicht vorhanden 1 vorhanden

32	Atranorin	0	nicht vorhanden
		1	vorhanden
<b>33</b>	<b>Dibenzofurane</b>	<b>0</b>	<b>nicht vorhanden</b>
		<b>1</b>	<b>vorhanden</b>
34	Strepsilin und Derivate (Iso~, Hypo~ = Norascomatinsäure)	0	nicht vorhanden
		1	vorhanden
<b>35</b>	<b>Benzylester</b>	<b>0</b>	<b>nicht vorhanden</b>
		<b>1</b>	<b>vorhanden</b>
36	Echinocarpinsäure (Sub~)	0	nicht vorhanden
		1	vorhanden
37	Unidentifizierte Substanz 1	0	nicht vorhanden
		1	vorhanden
38	Unidentifizierte Substanz 2	0	nicht vorhanden
		1	vorhanden
39	Unidentifizierte Substanz 3	0	nicht vorhanden
		1	vorhanden

### B-3.3 Phylogenetische Analyse (Netzwerke)

Im Folgenden werden das statistische Parsimony (SP)-Netzwerk und das Median-joining (MJ)-Netzwerk für jede einzelne Gruppe beschrieben und verglichen.

#### *U. trachycarpa*-Gruppe:

Im statistischen Parsimony-Netzwerk (Abb. 3.14) wurden alle 32 Haplotypen der *U. trachycarpa*-Gruppe in ein zusammenhängendes Netzwerk gruppiert. Das Netzwerk lässt sich in vier Untergruppen (I-IV) gliedern, die mehr oder weniger mit den Gruppierungen der phylogenetischen Analyse (Abb. 3.9-2) übereinstimmen. Es sind keine unklaren Beziehungen zwischen Haplotypen vorhanden, die sich in ‚loops‘ äußern würden. An der Farbverteilung innerhalb des Netzwerkes ist erkennbar, dass die Verteilung der Haplotypen keiner strengen geographischen Struktur folgt. Vielmehr finden sich Haplotypen aus den verschiedensten Populationen in den vier Untergruppen wieder. In Gruppe I sind 11 Haplotypen aus fünf Populationen der Antarktis und Patagoniens durch insgesamt 13 Mutationsschritte miteinander verbunden, wobei Haplotyp H7 das Zentrum darstellt. Der geographische Schwerpunkt dieser Gruppe liegt auf Individuen aus El Chalten (11 von 19), einer Andenregion in Santa Cruz (Argentinien) (Tab. 3.7, Abb. 3.11). Diese Gruppe entspricht dem *U. subantarctica*-Clade der kombinierten phylogenetischen Analyse in Kapitel 3-A (Abb. 3.9-2). Gruppe I wird durch sechs Mutationsschritte von Gruppe II getrennt. Diese besteht aus einem zentralen Haplotypen H1 mit sieben Individuen aus der Antarktis und Patagonien, von dem sich mehrere kleine Gruppen und einzelne Haplotypen abspalten. Die zehn Haplotypen der Gruppe II setzen sich aus Individuen neun verschiedener Populationen (Antarktis bis Ecuador) zusammen. Die Gruppe ist genetisch divers und wird insgesamt durch 31 Mutationen miteinander verbunden. Besonders stark weichen Haplotypen aus einer

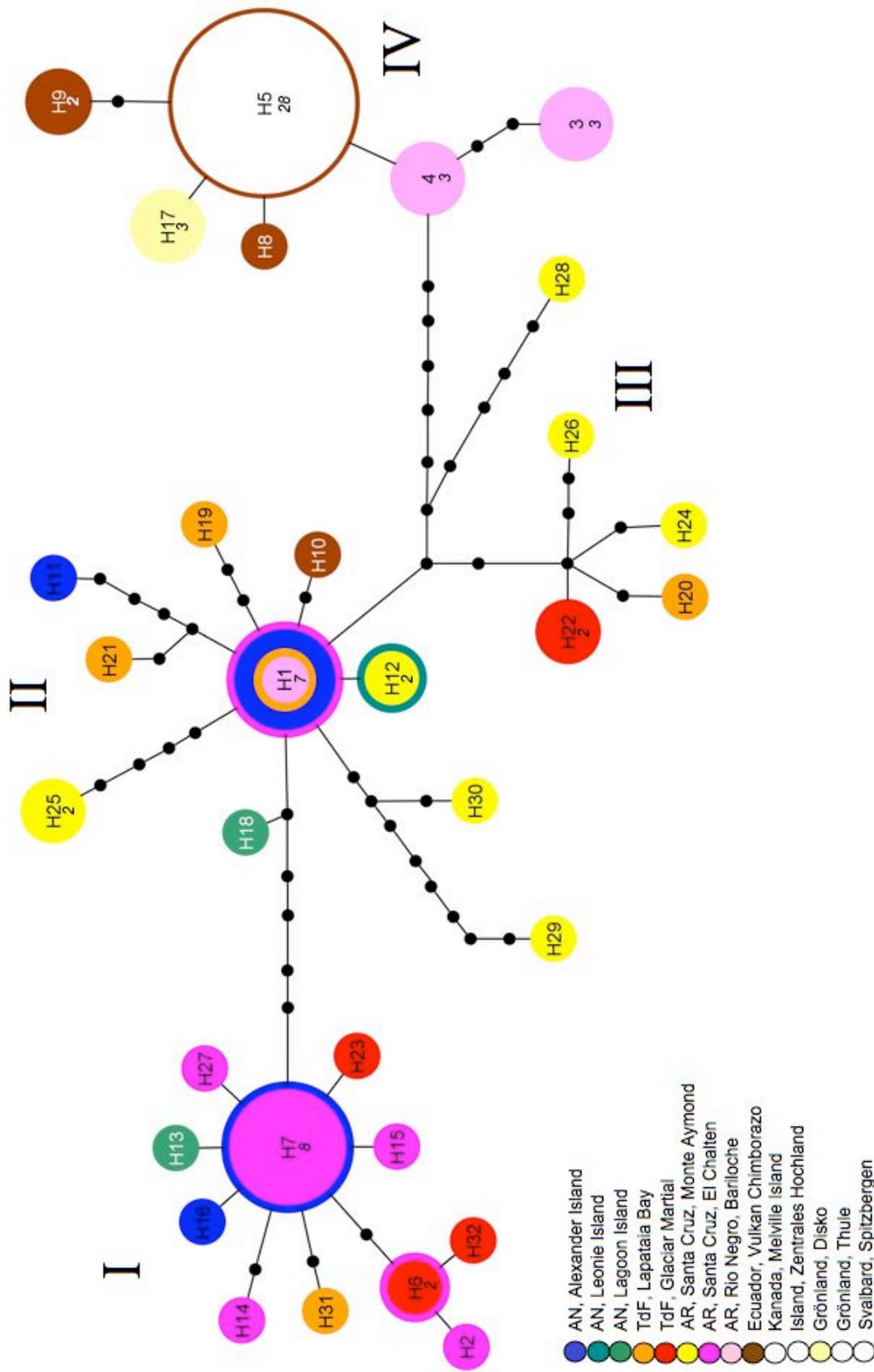


Abb. 3.14: Statistisches Parsimony-Netzwerk aus 32 Haplotypen (Tab. 3.6) der *U. trachycarpa*-Gruppe. Jede Blase spiegelt einen Haplotypen wieder, wobei die Größe der Blase und die kursiv gedruckten Zahlen darin mit der Anzahl der Individuen korrespondieren. Jede Verbindungslinie zwischen Haplotypen steht für einen Mutationsschritt. Fehlende Haplotypen (nicht gesammelt oder ausgestorben) sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet. Grob lässt sich das Netzwerk in 4 Gruppen gliedern (I-IV).

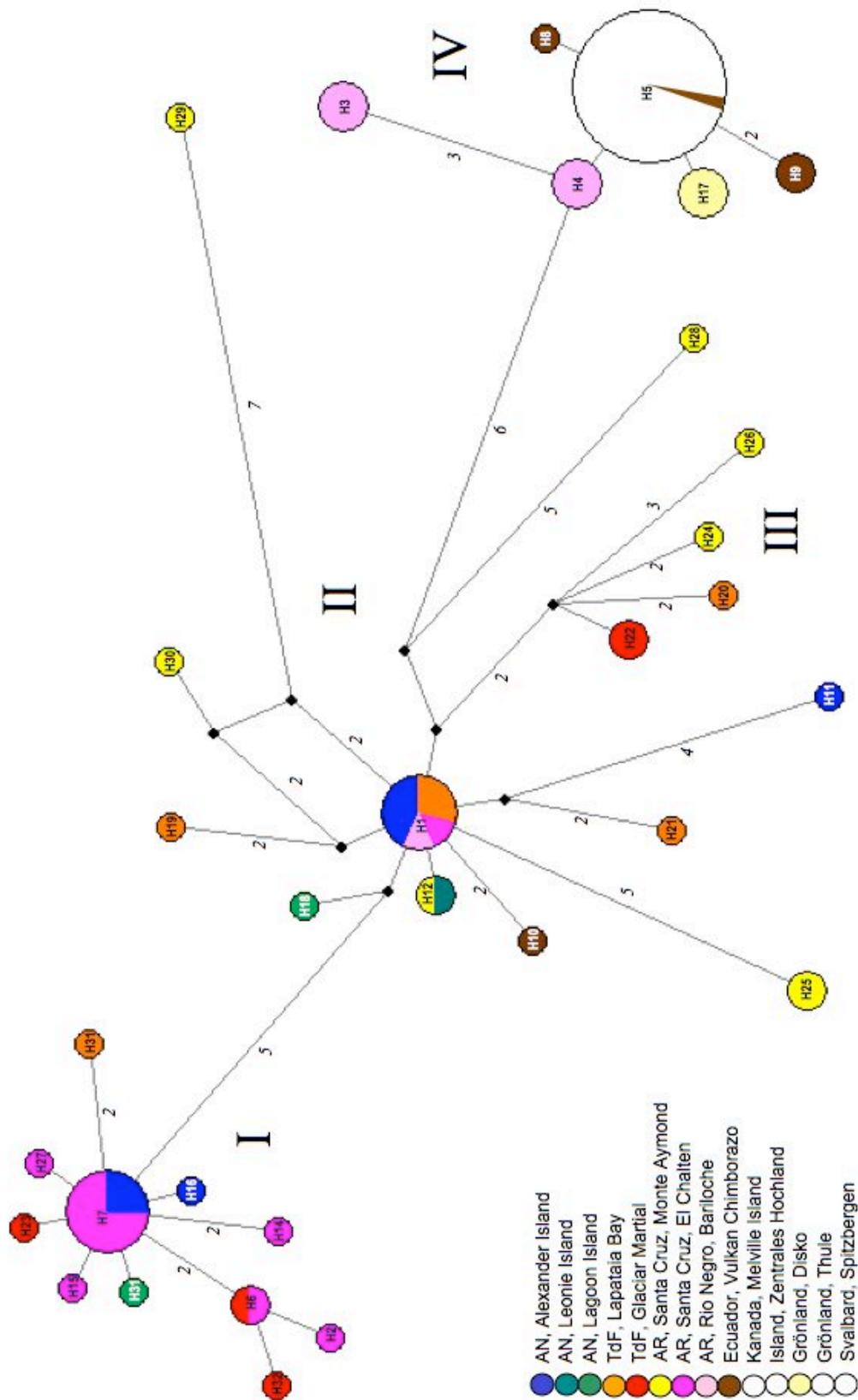


Abb. 3.15: Median-joining Netzwerk der 83 Individuen der *U. trachycarpa*-Gruppe. Haplotypen sind als Blasen dargestellt, deren Größe proportional zur Anzahl der Individuen ist. Die Länge der Verbindungslinien zwischen Haplotypen entspricht der Anzahl der Mutationsschritte (kursive Zahlen). Schwarze Punkte stellen Median-Vektoren dar. Die relative Anzahl der Individuen einer Population, die einen größeren Haplotypen teilen, sind durch kolorierte Tortenstücke verdeutlicht. Die Nummern der Haplotypen korrespondieren mit denen des statistischen Parsimony-Netzwerks (Abb. 3.14). Es sind 4 Gruppen auszumachen (I-IV).

Tiefebene in Santa Cruz, Monte Aymond ab (H29, H30, H25). Untergruppe II entspricht der *U. trachycarpa* 1-Gruppe in Abbildung 3.9-2.

Gruppe III ist durch nur vier Mutationsschritte von Gruppe II entfernt und setzt sich aus vier Haplotypen aus drei patagonischen Populationen zusammen, die über acht Mutationen miteinander in Verbindung stehen. Diese Gruppe entspricht der *U. trachycarpa* 2-Gruppe in Abbildung 3.9-2. Haplotyp H28 (Individuum 196-2) steht zwischen den Gruppen II und III (7 bzw. 9 Mutationen) und kann keiner der Gruppen eindeutig zugeordnet werden. Acht Mutationsschritte führen von Gruppe II zu Gruppe IV, die eine deutlich andere Individuenzusammensetzung als die anderen Gruppen hat. In Gruppe IV finden sich ausschließlich Haplotypen aus Bariloche (nördliches Patagonien, siehe Abb. 3.11), Ecuador und der Nordhemisphäre. Alle sechs Haplotypen sind durch nur acht Mutationsschritte miteinander verbunden und schließen insgesamt 40 Individuen ein. Haplotypen aus Ecuador, H8 und H9, grenzen unmittelbar an den zentralen Haplotypen H5 mit fast allen nordhemisphärischen plus zwei ecuadorianischen Individuen (insgesamt 28) an. Nur drei Individuen aus Grönland (H17) separieren sich vom Rest. Alle Proben aus Bariloche finden sich in den Haplotypen H3 und H4, durch eine bzw. vier Mutationsschritte von H5 entfernt. Gruppe IV entspricht *U. sphacelata* 1 in Abbildung 3.9-2.

Die Median-joining-Topologie (Abb. 3.15) entspricht weitestgehend der eben beschriebenen. Auch hier grenzen sich die Gruppen I und IV deutlich als eng zusammenhängende Haplotypen-Gruppen von den mittig stehenden Haplotypen der eher splittrigen Gruppen II und III ab. Das MJ-Netzwerk verbindet die Haplotypen H5, H19, H30 und H29 über drei Median-Vektoren und insgesamt 16 Mutationsschritte miteinander und erzeugt so einen ‚loop‘ im Netzwerk.

#### *U. perpusilla*-Gruppe:

Im SP-Netzwerk der *U. perpusilla*-Gruppe werden die 48 vorkommenden Haplotypen ebenfalls in ein zusammenhängendes Netzwerk gruppiert (Abb. 3.16). Das SP-Netzwerk ist divers, mit vielen Mutationsschritten zwischen den acht grob voneinander trennbaren Untergruppen (I-VIII). Zwei unaufgelöste ‚loops‘ befinden sich im Netzwerk, ein großer ‚loop‘ ohne Haplotypen mit insgesamt 12 Mutationsschritten zwischen den Gruppen V, VI, VII und VIII und ein kleiner loop aus drei Mutationsschritten innerhalb der Gruppe VIII. Die Farbverteilung der Haplotypen über das Netzwerk zeigt eine geographische Gliederung, jedoch sind Individuen des Standortes Bariloche, Cerro Catedral (rosa), fast über das ganze Netzwerk verteilt.

In Gruppe I finden sich ausschließlich Haplotypen (9) aus Tierra del Fuego, die in keiner anderen Gruppe auftauchen. Es existiert kein zentraler Haplotyp und die Gruppe ist genetisch sehr divers (siehe auch Tab. 3.9). Insgesamt wird sie durch 33 Mutationsschritte zusammengehalten. Untergruppe I korrespondiert mit einem der *U. perpusilla*-Clades in Abbildung 3.9-3. 11 Mutationsschritte trennt diese Gruppe von Untergruppe II, acht patagonischen und ecuadorianischen Haplotypen, die relativ nah aneinander gereiht stehen (14 interne Mutationsschritte). Individuen aus El Chalten in den patagonischen Anden finden sich in fünf Haplotypen ausschließlich in dieser Untergruppe. Diese Gruppe entspricht dem *Usnea* sp. 1-Clade in Abbildung 3.9-3. Gruppe III enthält fünf aufgereichte Haplotypen aus Bariloche, Cerro Catedral. Sie sind sechs Mutationsschritte von Gruppe II entfernt und zeigen sieben interne Mutationen. Gruppe III entspricht der *Usnea* sp. nov 1-Gruppe mit gelben Apothecien aus der phylogenetischen Analyse (Abb. 3.9-3). Untergruppe IV ist jeweils durch 9 Mutationsschritte von Untergruppe II und V entfernt und besteht aus zwei weit auseinander liegenden Haplotypen aus Bariloche. Es handelt sich um die Individuen des basalen *U. perpusilla*-Clades in Abbildung 3.9-3. Die Untergruppe V, mit 7 Haplotypen, besteht auch ausschließlich aus Individuen vom Standort Bariloche, Cerro Catedral. Diese Haplotypen bilden keine zusammenhängende definierte Gruppe, sondern liegen aneinander gereiht zwischen den bereits erwähnten und noch folgenden Untergruppen. Zwischen den einzelnen Haplotypen liegen z. T. viele Mutationsschritte (insgesamt 26). Die Individuen dieser Gruppe stimmen mit dem paraphyletischen und basal zu *U. sphacelata* 2 stehenden Teil des *U. perpusilla*-Clades in Abb. 3.9-3 überein. Die Untergruppen VI, VII und VIII sind geographisch vielfältiger und enthalten alle in diesem Netzwerk vorkommenden Individuen aus der Antarktis und der Nordhemisphäre. Sie korrelieren mit den drei monophyletischen Untergruppen des *U. sphacelata* 2-Clades in Abb. 3.9-3. Die Untergruppe VI besteht aus sieben Individuen vereint in vier Haplotypen, aus drei weit auseinander liegenden antarktischen Populationen und Bariloche. Zwischen den Haplotypen liegen nur fünf Mutationsschritte. Untergruppe VII ist durch sechs Substitutionen von VI getrennt und besteht aus einer eng zusammen liegenden Gruppe von fünf Haplotypen mit insgesamt 12 Individuen, zwischen denen fünf Mutationsschritte liegen. Haplotyp H36 setzt sich als zentraler Haplotyp aus Individuen zweier antarktischer Populationen zusammen. Direkt mit diesem verbunden sind die beiden nordhemisphärischen Haplotypen aus den USA sowie ein kontinental antarktischer Haplotyp und über zwei Substitutionen ein Individuum aus Bariloche. In Untergruppe VIII gruppieren sich um einen zentralen Haplotypen H8, der sowohl antarktische als auch patagonische und ecuadorianische Individuen enthält, weitere

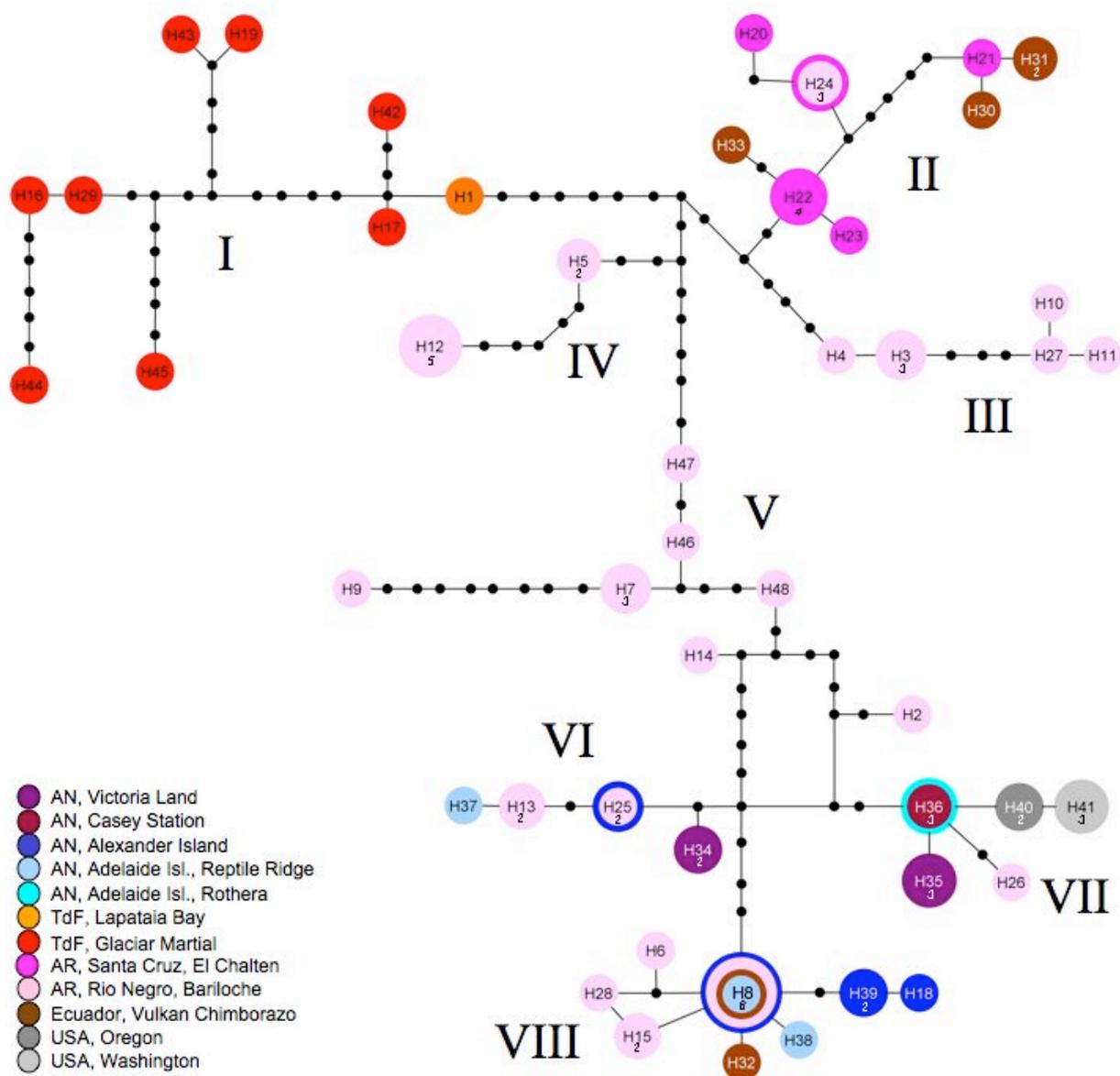
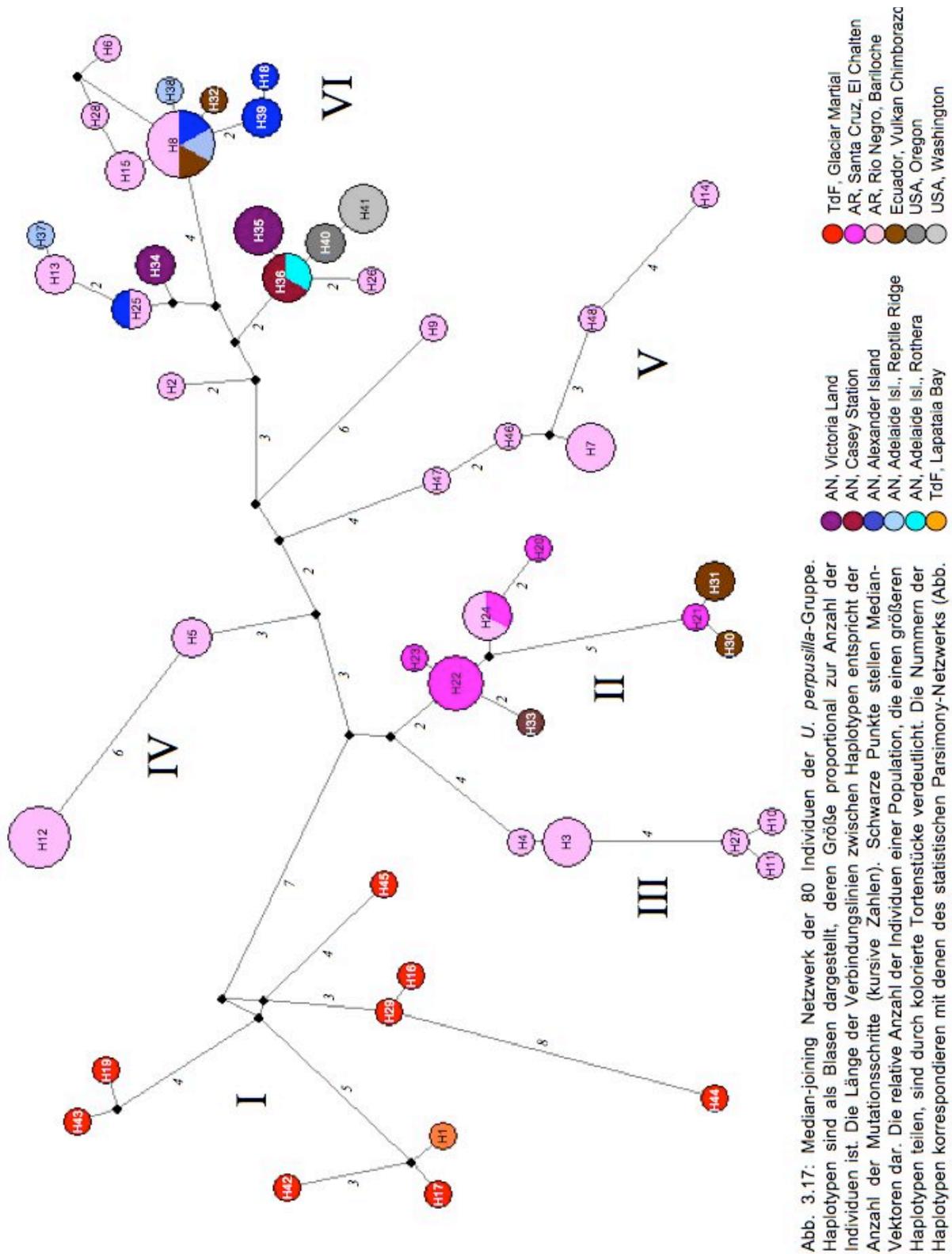


Abb. 3.16: Statistisches Parsimony-Netzwerk aus 48 Haplotypen (Tab. 3.8) der *U. perpusilla*-Gruppe. Jede Blase spiegelt einen Haplotypen wieder, wobei die Größe der Blase und die kursiv gedruckten Zahlen darin mit der Anzahl der Individuen korrespondieren. Jede Verbindungslinie zwischen Haplotypen steht für einen Mutationsschritt. Fehlende Haplotypen (nicht gesammelt oder ausgestorben) sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet. Grob lässt sich das Netzwerk in 8 Gruppen gliedern (I-VIII).



Haplotypen aus Bariloche, Ecuador und zwei Standorten in der Antarktis. Insgesamt sind 15 Individuen über neun Mutationsschritte miteinander verbunden. Die Haplotypen aus Bariloche H6, H28, H15 und der zentrale Haplotyp H8 bilden einen ‚loop‘ aus.

Auch hier ist die MJ-Topologie grundsätzlich ähnlich zur SP-Topologie, es gibt aber zwei Unterschiede. Der große ‚loop‘ wird im MJ-Netzwerk aufgelöst. Die an der ‚loop‘-Bildung beteiligten Haplotypen H14 und H2 im SP-Netzwerk, werden zum einen der Gruppe V und zum anderen der Gruppe VII zugeordnet. Die Untergruppen VI, VII und VIII sind im MJ-Netzwerk relativ zum Rest des Netzwerkes nicht so offensichtlich getrennt und werden in einer Untergruppe VI zusammengefasst. Die Haplotypen der Gruppe I gruppieren sich im MJ-Netzwerk um eine Mitte aus drei Median-Vektoren, die einen kleinen ‚loop‘ ausbilden.

#### *U. aurantiaco-atra-Gruppe:*

Die 45 Haplotypen der 99 Individuen der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe werden in einem zusammenhängenden statistischen Parsimony-Netzwerk in Abbildung 3.18 dargestellt. Im Gegensatz zum *U. perpusilla*-Netzwerk liegen die einzelnen Haplotypen relativ eng zusammen und können in fünf Untergruppen gegliedert werden (I-V). Anhand der Farbverteilung im Netzwerk kann man eine deutliche Abstufung von rein antarktischen Haplotypen in Untergruppe I hin zu rein patagonischen Haplotypen in Untergruppe V erkennen. Es bestehen zwei ‚loops‘ in Gruppe I und III, durch die jeweils ein zentraler Haplotyp und drei weitere Haplotypen miteinander verbunden sind. Untergruppe I besteht aus 16 Haplotypen sieben verschiedener Populationen der südlichen und nördlichen maritimen Antarktis, wobei die Populationen zum Teil relativ dicht beieinander liegen (siehe Tab. 3.11). Die Haplotypen sind durch 22 Mutationsschritte miteinander verbunden und werden durch nur eine Substitution vom zentralen Haplotypen des Gesamtnetzwerkes, H21 (Gruppe II), getrennt. H11 stellt das Bindeglied zwischen Gruppe I und II dar. Der ‚loop‘ in Untergruppe I wird von den Haplotypen H14, H7, H32 und H15 gebildet. Gruppe I korrespondiert mit dem monophyletischen rein antarktischen Clade der kombinierten phylogenetischen Analyse in Abbildung 3.9-4. Untergruppe II ist eine geographisch vielfältigere Gruppe, deren 17 Haplotypen sich um den zentralen Haplotypen H21 gruppieren. 21 Mutationsschritte verbinden die 17 Haplotypen miteinander. H21 vereinigt Individuen aus sieben Populationen der nördlichen maritimen Antarktis und Patagoniens. In Gruppe II kommen keine Individuen aus der südlichen maritimen Antarktis vor.

Der ‚loop‘ in Gruppe II wird ausgehend von H21 von H5, H22 und H20 gebildet.

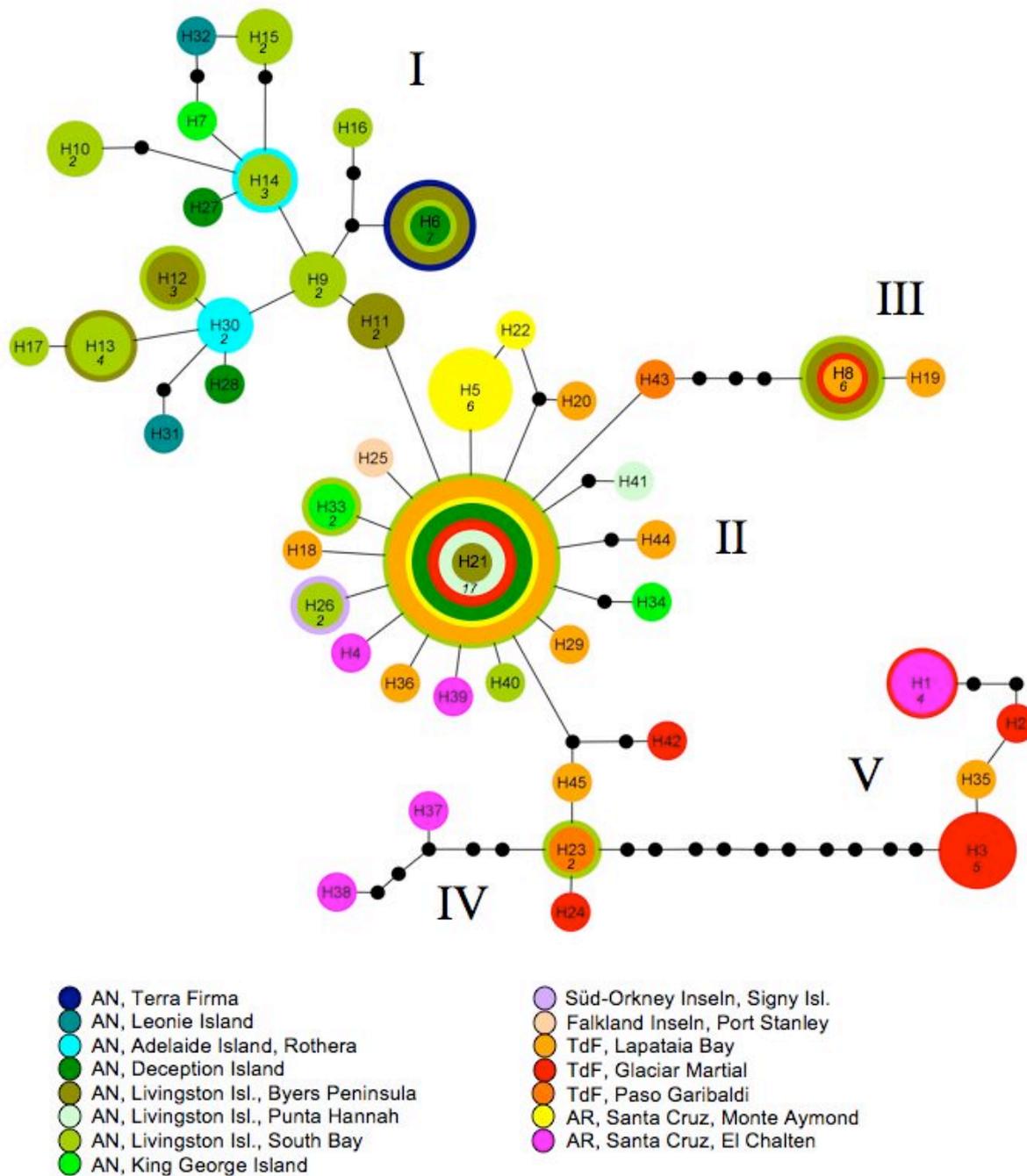


Abb. 3.18: Statistisches Parsimony-Netzwerk aus 45 Haplotypen (Tab. 3.10) der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe. Jede Blase spiegelt einen Haplotypen wieder, wobei die Größe der Blase und die kursiv gedruckten Zahlen darin mit der Anzahl der Individuen korrespondieren. Jede Verbindungslinie zwischen Haplotypen steht für einen Mutationsschritt. Fehlende Haplotypen (nicht gesammelt oder ausgestorben) sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet. Grob lässt sich das Netzwerk in 5 Gruppen gliedern (I-V).

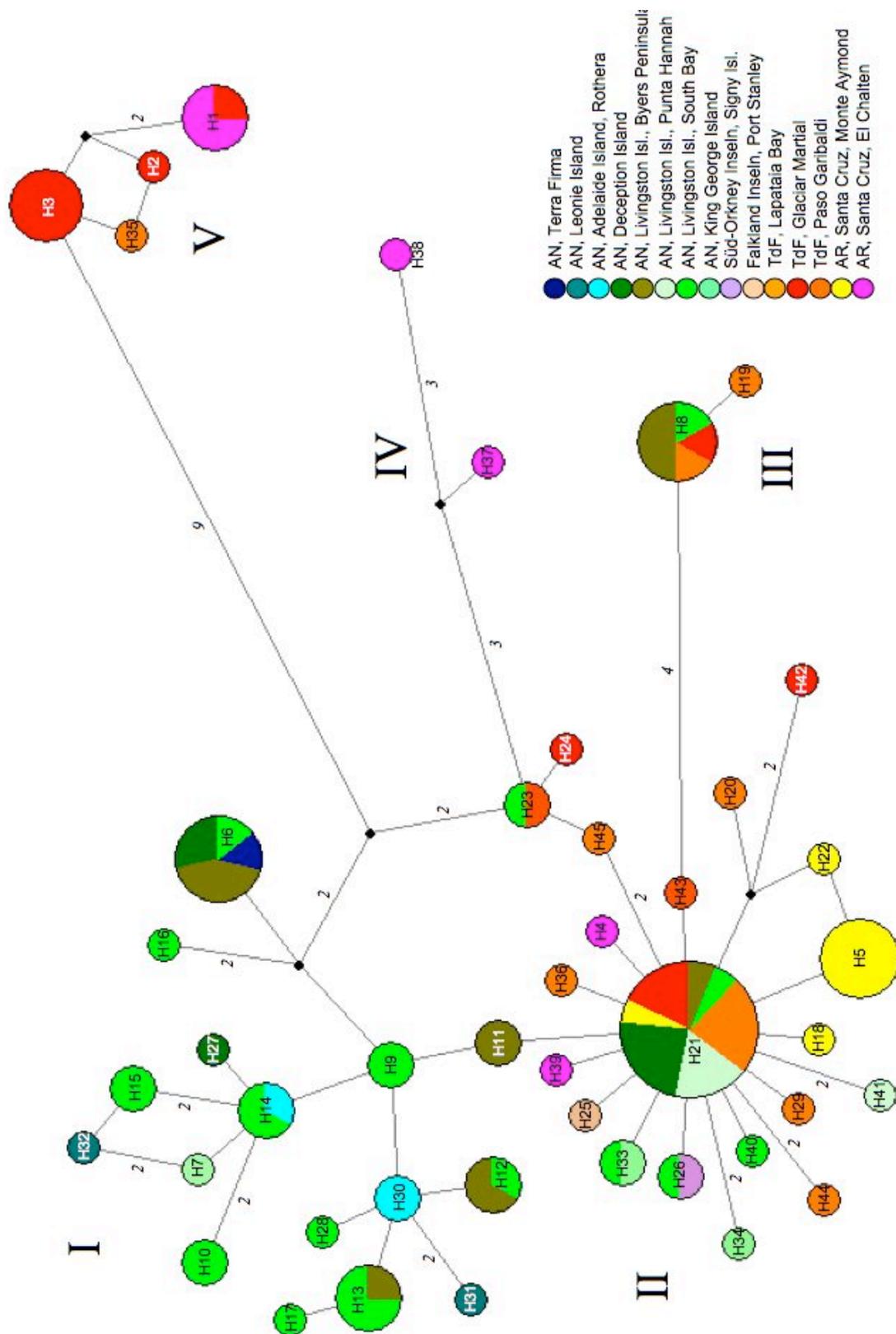


Abb. 3.19: Median-joining Netzwerk der 99 Individuen der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe. Haplotypen sind als Blasen dargestellt, proportional zur Anzahl der Individuen. Die Länge der Verbindungslinien zwischen Haplotypen entspricht der Anzahl der Mutationsschritte (kursive Zahlen). Schwarze Punkte stellen Median-Vektoren dar. Die relative Anzahl der Individuen einer Population, die einen größeren Haplotypen teilen, sind durch kolorierte Tortenstücke verdeutlicht. Die Nummern der Haplotypen korrespondieren mit denen des statistischen Parsimony-Netzwerkes (Abb. 3.18). Es sind 5 Gruppen auszumachen (I-V).

Abzweigend von Haplotyp H43 der Untergruppe II und über vier weitere Mutationsschritte findet sich Untergruppe III: zwei Haplotypen aus sieben antarktischen und feuerländischen Individuen. Diese Gruppe entspricht einer gut unterstützten monophyletischen Gruppe im *U. aurantiaco-atral antarctica*-Clade (Abb. 3.9-4.) Untergruppe IV setzt sich mit einer Ausnahme aus feuerländischen und patagonischen Individuen zusammen (6 Haplotypen). Zwei Mutationsschritte trennt diese Gruppe von Gruppe II. H37 und H38 sind Haplotypen aus den patagonischen Anden. Sie grenzen sich durch vier bzw. sechs Substitutionen von den restlichen Haplotypen aus Feuerland bzw. Antarktis ab. Zum Großteil handelt es sich bei Gruppe IV um die Individuen, die basal im *U. aurantiaco-atral antarctica*-Clade in Abbildung 3.9-4 stehen. 11 Mutationsschritte vom zentralen Haplotypen der Gruppe IV, H23, entfernt gliedert sich die Untergruppe V an. Diese Gruppe entspricht *U. acromelana* in Abbildung 3.9-4. Es handelt sich um vier aneinander gereihte Haplotypen aus den patagonischen Anden und Tierra del Fuego, die durch fünf Mutationsschritte getrennt werden. Gruppe V steht in deutlichem Abstand zu den ansonsten sehr nah verwandten restlichen Gruppen.

Im MJ-Netzwerk zeigt sich eine andere Topologie. Es sind zwei weitere unaufgelöste Verbindungen im Netzwerk zu erkennen. Einer dieser ‚loops‘ verändert die Sichtweise auf die Gruppe erheblich. Untergruppe V (*U. acromelana*) ist gleichwahrscheinlich mit I und II verbunden. Es entsteht dadurch ein großer ‚loop‘, der die Gruppen I und II an einer weiteren Verbindung zusammenschließt und Untergruppe V als Wurzel erscheinen lässt. Die Untergruppen III und IV (hier nur aus den Haplotypen H37 und H38 bestehend) grenzen sich von dieser Zusammenballung ab. Zudem ist Haplotyp H42 aus der Untergruppe IV des SP-Netzwerkes in die Untergruppe II des MJ-Netzwerkes gegliedert worden. In Untergruppe V schließen sich H3, H35 und H2 zu einem weiteren ‚loop‘ zusammen. Die beiden ‚loops‘ aus dem SP-Netzwerk werden zudem bestätigt.

### **B-3.4 Nested Clade Analyse**

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Nested Clade Analysen unabhängig voneinander für jede der drei Gruppen, *U. trachycarpa*, *U. perpusilla* und *U. aurantiaco-atra*, beschrieben. Die Ausgangsbasis für die NCA-Analyse waren jeweils die in Kapitel B-3.4 besprochenen SP-Netzwerke. Nicht aufgelöste Regionen (‚loops‘) wurden in der Regel nach den Regeln in POSADA & CRANDALL (2001) und PFENNIGER & POSADA (2001) aufgelöst. Jedes einzelne der drei Netzwerke wurde nach den beschriebenen Regeln (TEMPLETON et al. 1995, TEMPLETON & SING 1993) in Clades mit bis zu fünf Ebenen untergliedert.

*U. trachycarpa*-Gruppe:

Die 32 Haplotypen des Netzwerkes in Abbildung 3.14 wurden in 22 1-Schritt-Clades, 11 2-Schritt-Clades, 5 3-Schritt-Clades und 2 4-Schritt-Clades innerhalb des finalen 5-Schritt-Clades geschachtelt. Abbildung 3.20 zeigt das ‚Nesting-Design‘ für die *U. trachycarpa*-Gruppe.

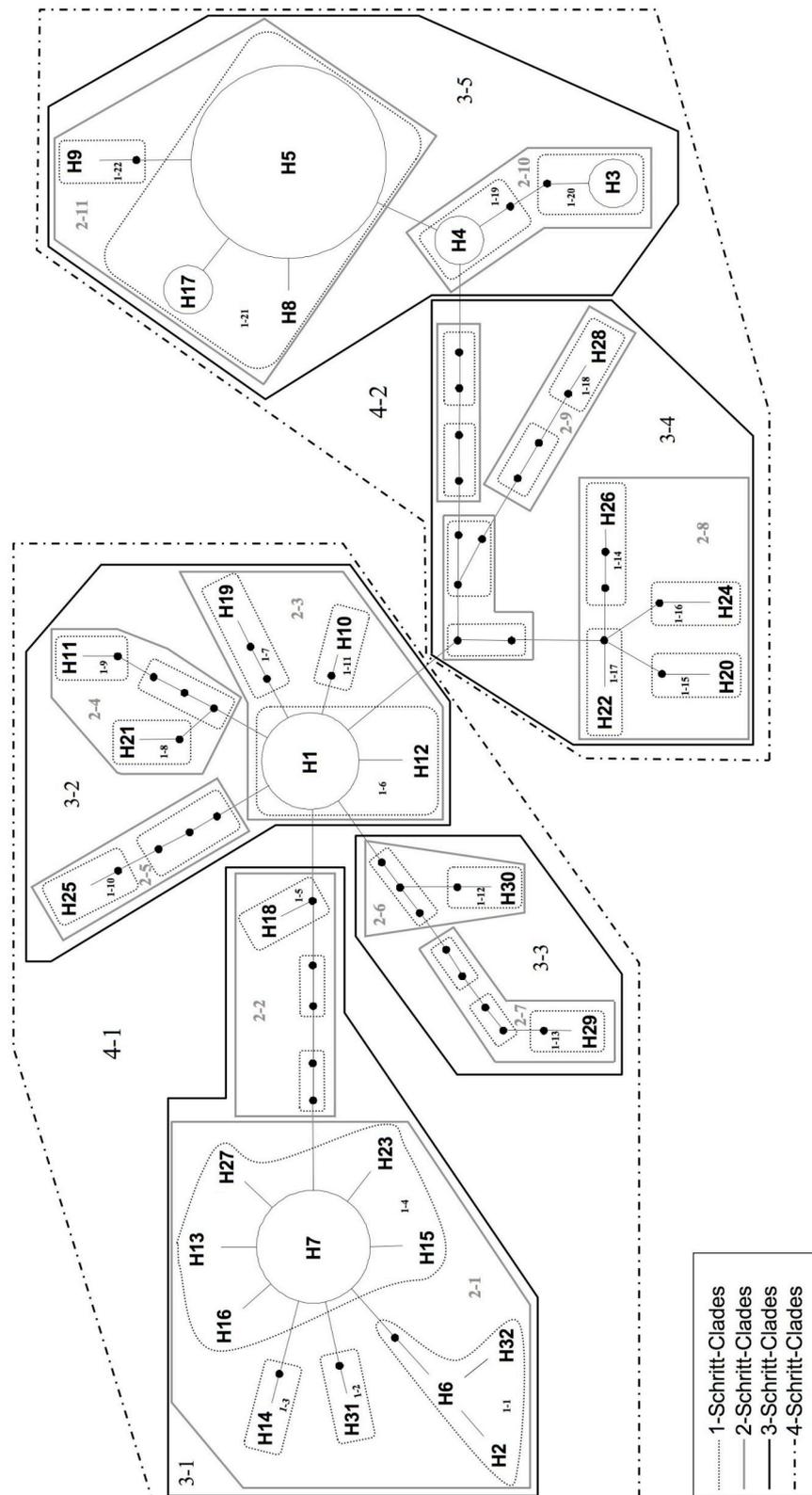


Abb. 3.20: ‚Nesting-Design‘ des statistischen Parsimony-Netzwerkes (Abb. 3.14) der *U. trachycarpa*-Gruppe. Die einzelnen Clade-Ebenen sind durch entsprechende Linien gekennzeichnet. Haplotypen ab drei Individuen sind proportional zur Anzahl der Individuen als Blasen gekennzeichnet. Schwarze Punkte repräsentieren nicht gesammelte oder bereits ausgestorbene Haplotypen, die zur Verbindung der gesammelten Haplotypen notwendig sind.

Es gibt kein alternatives ‚Nesting-Design‘ für dieses Netzwerk. Die vier Clade-Ebenen sind durch unterschiedliche Linien gekennzeichnet, die auch in den anderen Gruppen beibehalten werden. Eine Zusammenfassung des ‚Nesting-Designs‘ mit den assoziierten Individuen und Populationen liefert Tabelle 3.13. Statistisch signifikante geographische Verbindungen von Haplotypen konnten auf allen Clade-Ebenen gefunden werden. Abbildung 3.21 gibt eine Übersicht über die ermittelten signifikanten Distanzwerte, die mit <sup>L</sup> für signifikant große und <sup>S</sup> für signifikant kleine Distanzen markiert sind. Unterstrichene Werte sind in die Analyse eingegangen. Insgesamt sechs Clades konnten auf populationshistorische Prozesse hin überprüft werden, wobei für vier Clades phylogeographische Rückschlüsse gezogen werden konnten (siehe Tab. 3.14).

Tab. 3.13: *U. trachycarpa*-Haplotyp-Nesting Zusammenfassung und Zusammenhang von Individuen und Standorten. Es sind die zu den Haplotypen gehörenden Individuen, Standorte und Nesting-Clades angegeben.

Individuum	Haplotyp	Population	1-Schritt-Clades	2-Schritt-Clades	3-Schritt-Clades	4-Schritt-Clades
52						
54	H9	ECUA	1-22			
53						
56						
114-2						
115-5						
115-8						
115-11						
116-1						
116-2						
117-1						
117-2						
118-1						
149-1						
150-1						
150-2						
151-1						
151-2						
152-4						
152-5						
152-6						
153-2						
244-1						
244-2						
244-3						
244-5						
245-1						
245-2		ECUA,				
245-3		SPIZ, ISLA,				
245-4	H5	KAMV, GRTH				
50	H8	ECUA				
243-1						
243-2						
243-3	H17	GRDK	1-21	2-11		

220-3						
220-4						
226-1	H3	RNBA	1-20			
225-1						
225-2						
226-6	H4	RNBA	1-19	2-10	3-5	
196-2	H28	SCMA	1-18	2-9		
182-1						
182-3	H22	TFGM	1-17			
186-2	H24	SCMA	1-16			
173-2	H20	TFLP	1-15			
186-8	H26	SCMA	1-14	2-8	3-4	4-2
196-3	H29	SCMA	1-13	2-7		
197-1	H30	SCMA	1-12	2-6	3-3	
186-3						
186-9	H25	SCMA	1-10	2-5		
102-1	H11	ALEX	1-9			
173-3	H21	TFLP	1-8	2-4		
57	H10	ECUA	1-11			
173-1	H19	TFLP	1-7			
174-5						
190-1						
226-4						
233-2						
233-3						
234-1		ALEX, SCEL,				
237-1	H1	RNBA, TFLP				
162-2						
197-3	H12	MLEO, SCMA	1-6	2-3	3-2	
164-1	H18	MLAG	1-5	2-2		
73						
203-1						
203-2						
203-3						
203-6						
203-13						
203-14						
291-1	H7	ALEX, SCEL				
165-2	H13	MLAG				
203-9	H15	SCEL				
233-1	H16	ALEX				
182-2	H23	TFGM				
190-2	H27	SCEL	1-4			
200-1	H14	SCEL	1-3			
234-2	H31	TFLP	1-2			
205-1	H2	SCEL				
203-11						
264-1	H6	TFGM, SCEL				
265-1	H32	TFGM	1-1	2-1	3-1	4-1

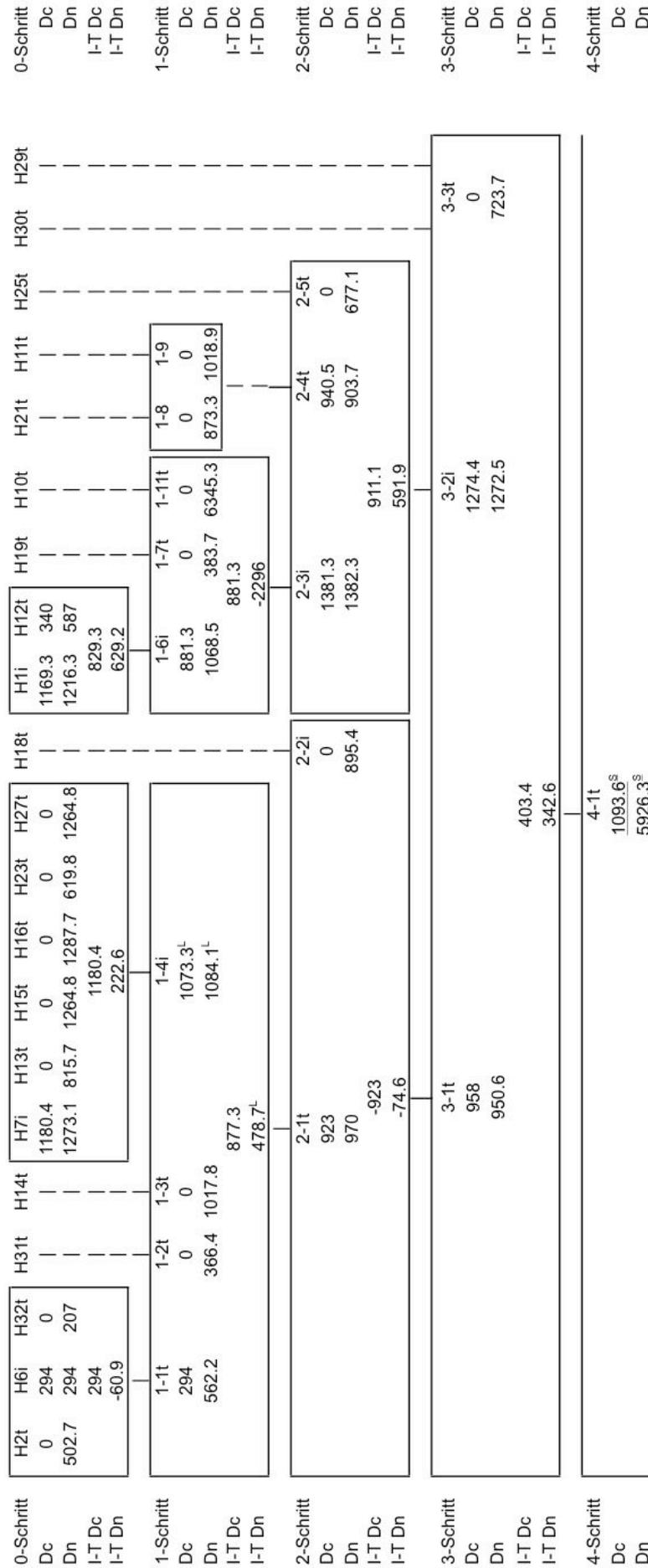


Abb. 3.21: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der Nested Clade Analyse der *U. trachycarpa*-Gruppe. "i" und "t" stehen für interne und 'tip' Clades. Haplotypen stehen in der ersten Zeile (0-Schritt-Clades). Das 'Nesting' erhöht sich von der ersten zur letzten Zeile. Signifikant kleine Distanzwerte sind mit "<sup>S</sup>", signifikant große mit "<sup>L</sup>" gekennzeichnet. Die unterstrichenen Werte haben signifikante  $\chi^2$ -Werte und können interpretiert werden (siehe Tab. 3.16).

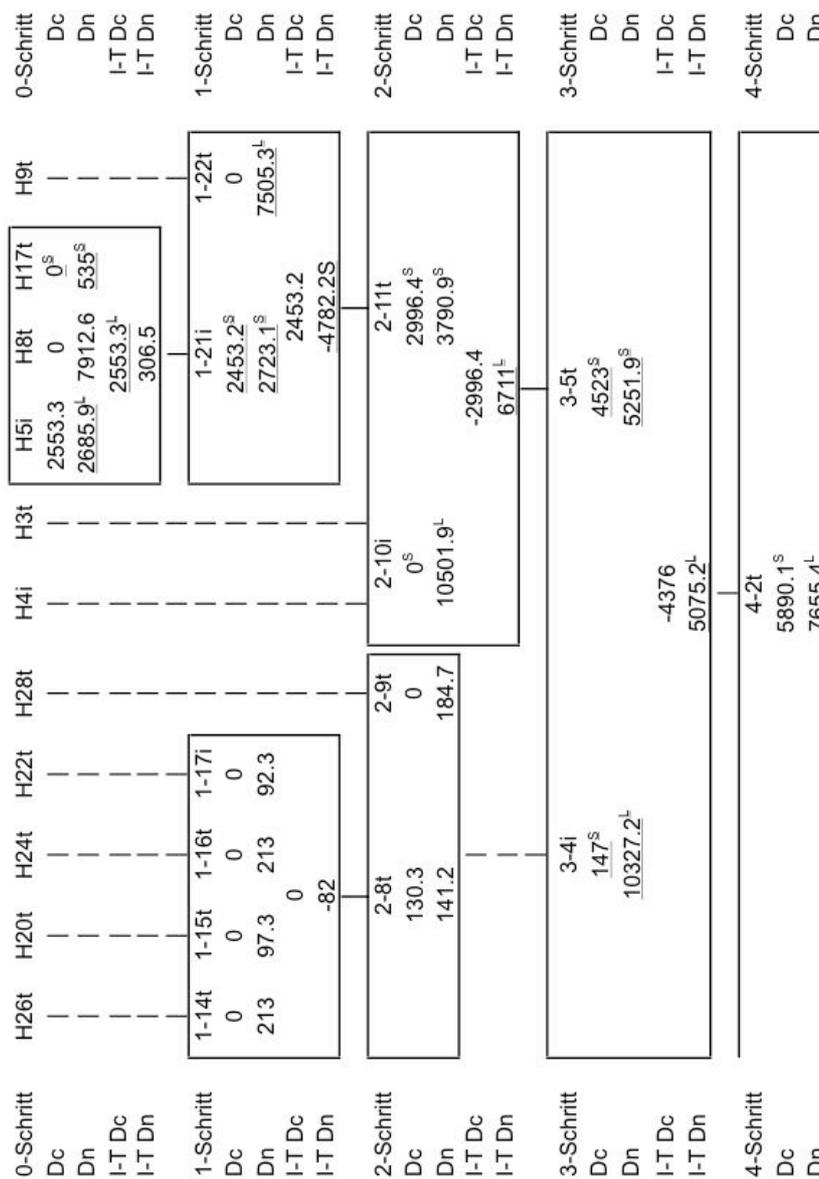


Abb. 3.21 (Fortsetzung): Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der Nested Clade Analyse der *U. trachycarpa*-Gruppe.

Tab. 3.14: Statistische Ergebnisse der Nested Clade Analyse der *U. trachycarpa*-Gruppe. Es wurden nur Clades getestet, die genetische und geographische Unterschiede aufwiesen. p-Werte basieren auf 10.000 Permutationen. Signifikante p-Werte  $\leq 0.05$  sind fettgedruckt. Die Folgerungskette beruht auf dem neusten Online-Schlüssel nach TEMPLETON (<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>).

Clade	$\chi^2$	p	Folgerungen aus der geographischen Distanz Analyse (NCA)
1-1	2	1.0	
1-4	30.0625	0.0852	
1-6	9	0.1946	
1-21	41.9048	<b>0.0001</b>	1-2-3-4-9-10-Nein: Fragmentierung <i>oder</i> Isolation durch Entfernung (Sammelschema unzureichend um Unterscheidung zu treffen)
2-1	24.6247	0.1352	
2-3	13.8519	0.7311	
2-4	2	1	
2-8	10	0.2074	
2-11	12.3250	<b>0.048</b>	1-2-11-Ja: Gebietsausweitung –12-Nein: Zusammenhängende Ausdehnung
3-1	9.4737	0.1513	
3-2	10.7955	0.6967	

3-4	1.2	1	
3-5	38.0000	<b>0.0000</b>	1-19-20-Nein: unzureichende geographische Aufsammlungen
4-1	34.0297	<b>0.0184</b>	keine signifikanten Distanzwerte vorhanden
4-2	45.0000	<b>0.0000</b>	1-19-20-2-11-Ja: Gebietsausweitung – 12-Nein: Zusammenhängende Ausdehnung
gesamt	59.4857	<b>0.0000</b>	1-2: ergebnislos, da keine äußeren und internen Clades bestimmt sind * 1-2-3-5-6-7-Ja: eingeschränkter Genfluss/ eingeschränkte Verbreitung aber mit Fernverbreitung ** 1-2-11-Ja: Gebietsausweitung – 12- Nein: Zusammenhängende Ausdehnung

\* Modifizierung 1: angenommen 4-1 ist äußerer Clade und 4-2 interner Clade  
\*\* Modifizierung 2: angenommen 4-1 ist interner Clade und 4-2 äußerer Clade

Fragmentierung bzw. Isolation durch Entfernung wurde für Clade 1-21 in Untergruppe IV angenommen. Das zugrunde liegende Sammelschema war unzureichend, um eine Unterscheidung zwischen den beiden Prozessen herbeizuführen. In diesem Clade werden Individuen (H17) einer grönländischen Population von der Diskoinsel vom Rest des weit verbreiteten nordhemisphärischen Haplotypen H5 abgetrennt. Ein weiteres Populationsereignis lässt sich in der gleichen Untergruppe aus der höheren Clade-Ebene (2-11) ableiten: Zusammenhängende Gebietsausweitung. Dieser Clade umfasst alle nordhemisphärischen und ecuadorianischen Individuen. Das höhere Clade Level deutet auf einen zeitlich weiter zurückliegenden Populationsprozess hin. Clade 3-5, die nächsthöhere Clade-Ebene in Untergruppe IV, zeigte zwar signifikante Distanzwerte, Populationsprozesse konnten aber aufgrund unzureichenden geographischen Samplings nicht abgeleitet werden. Die 4-Schritt-Ebene betrachtend konnte für Clade 4-2 mit den Untergruppen III und IV auf eine zusammenhängende Ausbreitung und Gebietserweiterung rückgeschlossen werden. Clade 4-1 enthielt trotz signifikantem  $\chi^2$ -Wert keine signifikanten Distanzwerte und konnte daher nicht analysiert werden. Das Netzwerk als Ganzes betrachtet zeigte keine Aufteilung in äußere und innere Clades (4-1 und 4-2 wurden beide als äußere Clades gewertet) und führte daher zu keinem Ergebnis (1-2-Inconclusive Outcome). Um Aussagen auf dieser höchsten Clade-Ebene zu treffen, wurden die Vorgaben modifiziert und zum einen mit 4-1 als äußerem (,tip') Clade und 4-2 als internem Clade bzw. vice versa berechnet (Tab. 3.14). Das Ergebnis war im ersten Falle eingeschränkter Genfluss bzw. eingeschränkte Verbreitung mit Fernverbreitung zwischen den beiden Clades, was sich auf den Clade 4-2 mit seiner nordhemisphärischen Verbreitung bezog. Im entgegengesetzten Fall (4-1 als interner und 4-2 als ,tip' Clade) konnte auf eine zurückliegende zusammenhängende Gebietsausdehnung aus antarktischen und patagonischen Gebieten bis in die Arktis geschlossen werden.

*U. perpusilla*-Gruppe:

Die 48 Haplotypen des SP-Netzwerkes der *U. perpusilla*-Gruppe (Abb. 3.16) wurden wie im ‚Nesting-Design‘ und der tabellarischen Zusammenfassung (Abb. 3.22 und Tab. 3.15) deutlich wird, in 34 1-Schritt-Clades, 24 2-Schritt-Clades, 13 3-Schritt-Clade, 5 4-Schritt-Clades und 2 5-Schritt-Clades gegliedert.

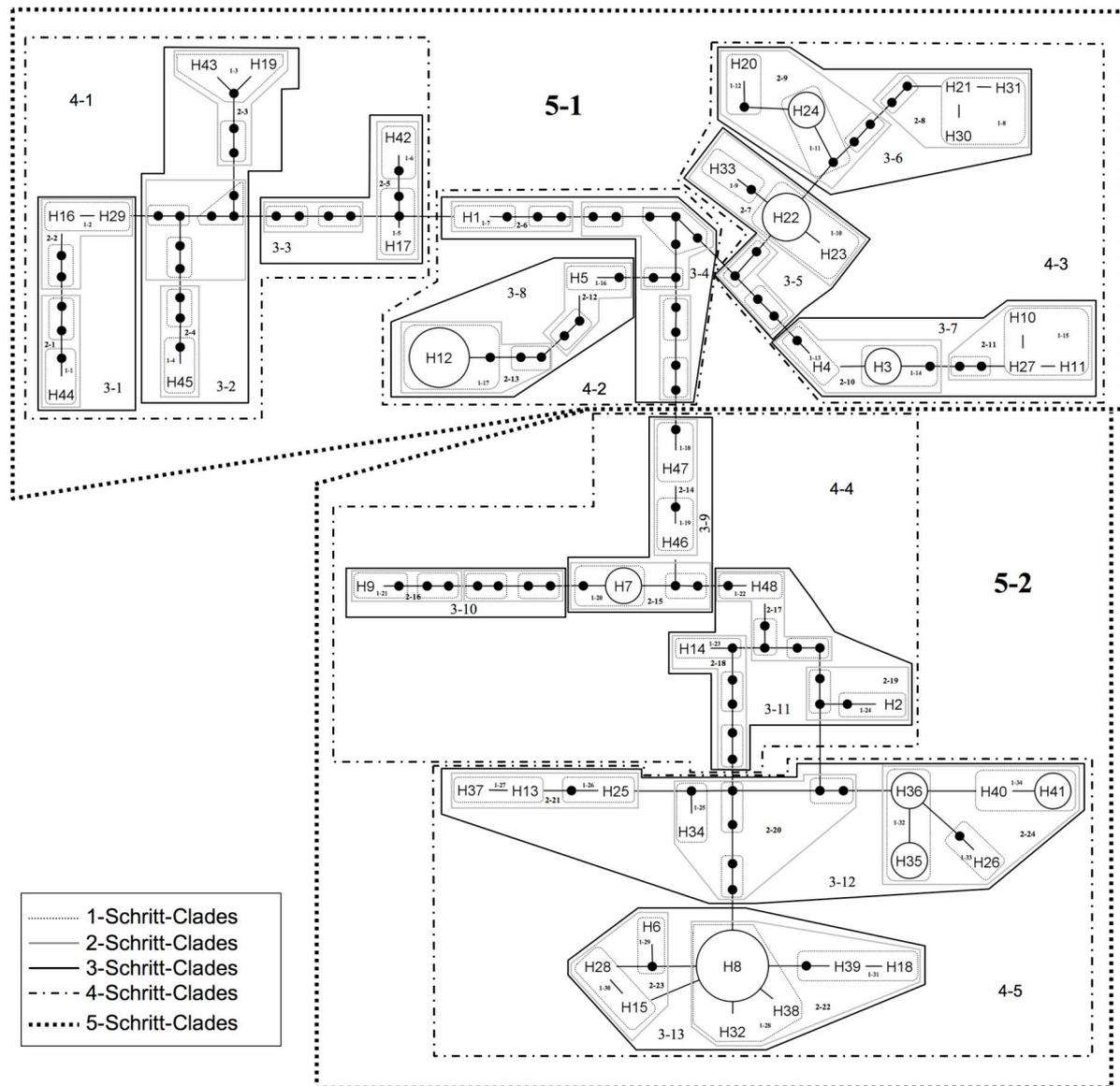


Abb. 3.22: ‚Nesting-Design‘ des statistischen Parsimony-Netzwerkes (Abb. 3.16) der *U. perpusilla*-Gruppe. Die einzelnen Clade-Ebenen sind durch entsprechende Linien gekennzeichnet. Haplotypen ab drei Individuen sind proportional zur Anzahl der Individuen als Blasen gekennzeichnet. Schwarze Punkte repräsentieren nicht gesammelte oder bereits ausgestorbene Haplotypen, die zur Verbindung der gesammelten Haplotypen notwendig sind.

Alle ‚loops‘ dieses Netzwerkes wurden nach Abwägung der Möglichkeiten nicht aufgelöst, sondern in das ‚Nesting-Design‘ übernommen. Diese Entscheidung hatte Auswirkungen auf die 3- und 4-Schritt-Clades innerhalb des Clades 5-2. Geographisch übereinstimmende

Gruppen auf diesen Clade-Ebenen wurden dadurch nicht auseinandergerissen. Clade 4-5 umfasst somit statt Clade 3-11, 3-12 und 3-13 nur Clade 3-12 und 3-13 und Clade 3-11 wird mit 3-9 und 3-10 zu Clade 4-4 verbunden. Clade 4-4 umfasst damit nur fertile Individuen aus Bariloche und stimmt mit einem der *U. perpusilla*-Clades in der phylogenetischen Analyse (Abb. 3.9-3) überein. Dafür werden im Clade 3-12 die beiden Untergruppen VI und VII vereint und stehen gleichwertig neben Clade 3-13. In beiden Untergruppen finden sich Individuen von einem entlegenen Standort (2, Victoria Land) der kontinentalen Antarktis, H34 und H35, was eine Zusammenlegung des Clades rechtfertigt. Auch der zweite ‚loop‘ blieb erhalten und bewirkte eine Untergliederung des Clades 3-13 auf der 2-Schritt-Ebene (2-22 und 2-23), die keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der NCA hatte. Durch das ‚Nesting-Design‘ wird der Haplotyp H1 in Clade 4-2 von den anderen Haplotypen aus Tierra del Fuego (4-1) abgespalten. Die Untergruppen aus Abbildung 3.16 stimmen nicht in allen Fällen mit dem ‚Nesting Design‘ überein.

Statistisch signifikante geographische Verbindungen von Haplotypen konnten auf der 2-, 4- und 5-Schritt-Ebene gefunden werden. Abbildung 3.23 gibt eine Übersicht über die ermittelten signifikanten Distanzwerte. Insgesamt sechs Clades konnten auf populationshistorische Prozesse hin überprüft und phylogeographische Rückschlüsse gezogen bzw. Populationsprozesse aufgedeckt werden (siehe Tab. 3.16).

Tab. 3.15: *U. perpusilla*-Haplotyp-Nesting Zusammenfassung und Zusammenhang von Individuen und Standorten. Es sind die zu den Haplotypen gehörenden Individuen, Standorte und Nesting-Clades angegeben.

Individuum	Haplotyp	Population	1-Schritt-CI.	2-Schritt-CI.	3-Schritt-CI.	4-Schritt-CI.	5-Schritt-CI.
179-4	H44	TFGM	1-1	2-1			
258-1	H16	TFGM					
263-1	H29	TFGM	1-2	2-2	3-1		
179-3	H43	TFGM					
180-1	H19	TFGM	1-3	2-3			
179-7	H45	TFGM	1-4	2-4	3-2		
258-2	H17	TFGM	1-5				
179-1	H42	TFGM	1-6	2-5	3-3	4-1	
235-11	H1	TFLP	1-7	2-6	3-4		
66	H33	ECUA	1-9				
190-3							
201-2							
204-4							
205-3	H22	SCEL					
204-1	H23	SCEL	1-10	2-7	3-5		
201-1	H21	SCEL					
41	H30	ECUA					
46							
47	H31	ECUA	1-8	2-8			
204-2							
209-1							



232-2	H39	ALEX	1-31	2-22
221-3a	H6	RNBA	1-29	
-----				
223-1				
224-1	H15	RNBA		
219-1	H28	RNBA	1-30	2-23
				3-13
				4-5
				5-2
				-----

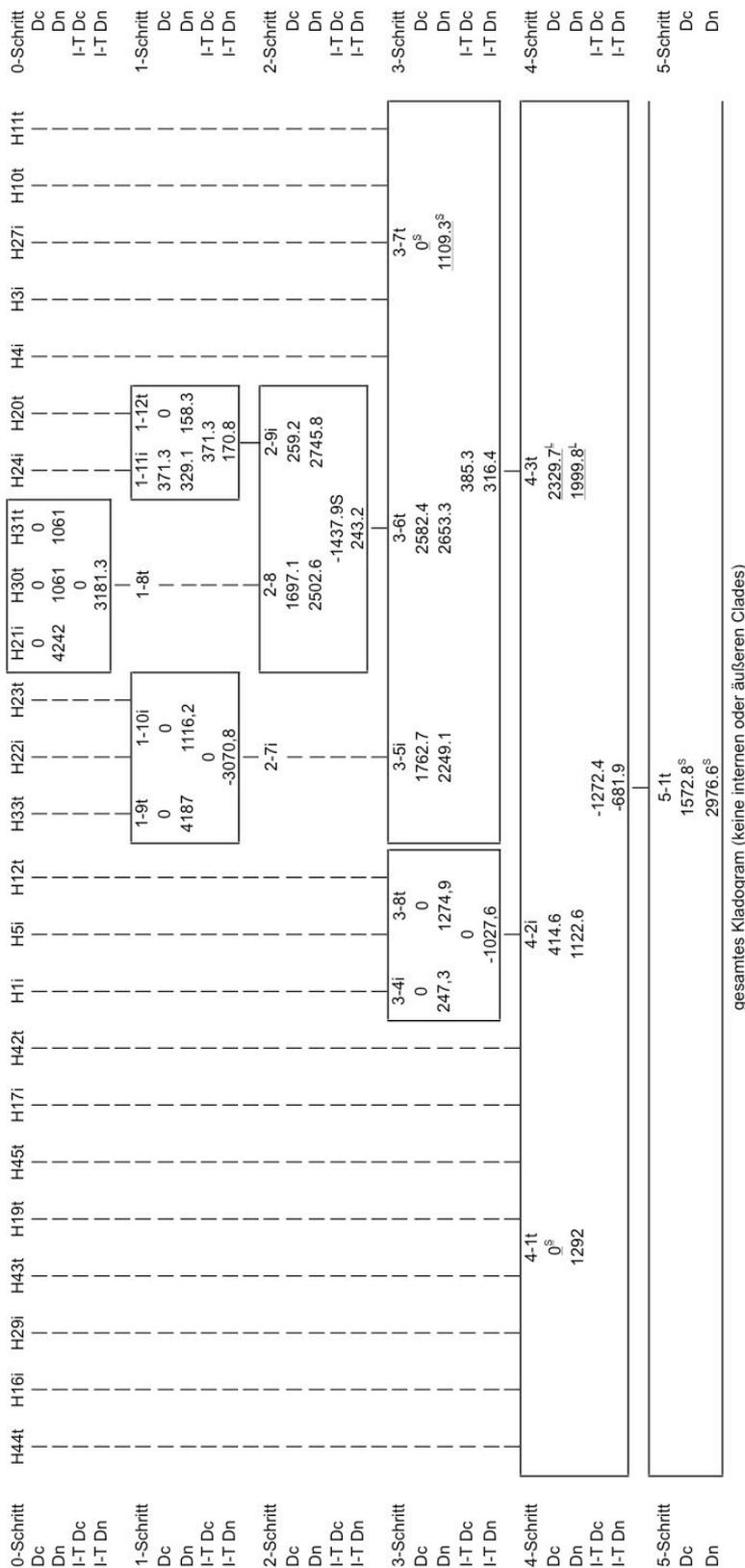


Abb. 3.23: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der Nested Clade Analyse der *U. persusilla*-Gruppe. "i" und "t" stehen für interne und 'tip' Clades. Haplotypen stehen in der ersten Zeile (0-Schritt-Clades). Das 'Nesting' erhöht sich von der ersten zur letzten Zeile. Signifikante kleine Distanzwerte sind mit <sup>ns</sup> gekennzeichnet. Die unterstrichenen Werte haben signifikante X<sup>2</sup>-Werte und können interpretiert werden (siehe Tab. 3.16).

0-Schritt	H47i	H46i	H7i	H9t	H48i	H14t	H2t	H34t	H25i	H13i	H37i	H35t	H36i	H26t	H40i	H41t	H8i	H32t	H38t	H39i	H18t	H6i	H15i	H28i	0-Schritt
Dc										0	0	0	2622.4		0	0	2639.2	0	0						Dc
Dn										2777	154.1	2025.2	1697.8		46.9	46.9	2737.9	5352	2029.6						Dn
I-T Dc										0	0	2622.4			0	0	2639.2								I-T Dc
I-T Dn										2622.9	-327.4	-327.4			0	0	-952.9								I-T Dn
1-Schritt																									1-Schritt
Dc									1-26i	1-27t	1-32i	1-33t	1-34t	1-28i	1-31t	1-28i	1-28i	1-28i	1-28i	1-31t	1-31t	1-31t	1-31t	1-31t	Dc
Dn									728.7	292.2	1799.4 <sup>s</sup>	0	46.9 <sup>s</sup>	2893.4	0 <sup>s</sup>	2893.4	2893.4	2893.4	2893.4	1707.4	1707.4	1707.4	1707.4	1707.4	Dn
I-T Dc									861.4	258.4	9607.7 <sup>s</sup>	6396.9	12250.8 <sup>L</sup>	2612.9	1707.4	2612.9	2612.9	2893.4	2893.4	1707.4	1707.4	1707.4	1707.4	1707.4	I-T Dc
I-T Dn									603.1	436.6	1760.3	-1667.5		905.4	905.4	905.4	905.4	905.4	905.4	905.4	905.4	905.4	905.4	905.4	I-T Dn
2-Schritt																									2-Schritt
Dc									2-20i	2-21t	2-24t	2-24t	2-24t	2-22i	2-23t	2-23t	2-22i	2-22i	2-22i	2-22i	2-23t	2-23t	2-23t	2-23t	Dc
Dn									0	365.4 <sup>s</sup>	10919.7	10678.2	10678.2	2324.4	0 <sup>s</sup>	2324.4	2324.4	2324.4	2324.4	2324.4	1603.4	1603.4	1603.4	1603.4	Dn
I-T Dc									7883	5569.6 <sup>s</sup>	-7815.7	-1292.7	-1292.7	2377.1	2324.4	2377.1	2377.1	2377.1	2377.1	2324.4	2324.4	2324.4	2324.4	2324.4	I-T Dc
I-T Dn																				773.7	773.7	773.7	773.7	773.7	I-T Dn
3-Schritt																									3-Schritt
Dc																									Dc
Dn																									Dn
I-T Dc																									I-T Dc
I-T Dn																									I-T Dn
4-Schritt																									4-Schritt
Dc																									Dc
Dn																									Dn
I-T Dc																									I-T Dc
I-T Dn																									I-T Dn
5-Schritt																									5-Schritt
Dc																									Dc
Dn																									Dn

Abb. 3.23 (Fortsetzung): Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der Nested Clade Analyse der *U. perpusilla*-Gruppe.

Tab. 3.16: Statistische Ergebnisse der Nested Clade Analyse der *U. perpusilla*-Gruppe. Es wurden nur Clades getestet, die genetische und geographische Unterschiede aufweisen. p-Werte basieren auf 10.000 Permutationen. Signifikante p-Werte  $\leq 0.05$  sind fettgedruckt. Die Folgerungskette beruht auf dem neusten Online-Schlüssel nach TEMPLETON (<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>).

Clade	$\chi^2$	p	Folgerungen aus der geographischen Distanz Analyse (NCA)
1-8	4	0.4979	
1-27	3	0.3341	
1-28	6.6667	0.4609	
1-32	6	0.1032	
1-34	5	0.0968	
2-7	6	0.1644	
2-9	1.3333	1	
2-21	2.2222	1	
2-22	7.2188	0.138	
2-24	24	<b>0.0012</b>	1-19-20-2-11-Ja: Gebietsausweitung-12-Nein: Zusammenhängende Ausdehnung
3-6	5.3333	0.232	
3-12	20.6625	0.1047	
3-13	6.2338	0.1702	
4-2	8	0.1277	
4-3	17.1719	<b>0.0008</b>	1-2-3-4-9-10-Nein: Fragmentierung <i>oder</i> Isolation durch Entfernung (Sammelschema unzureichend um Unterscheidung zu treffen)
4-5	17.7263	<b>0.005</b>	1-2-3-4-Nein: eingeschränkter Genfluss mit Isolation durch Distanz, bzw. eingeschränkte Verbreitung durch Distanz bei asexuellen Organismen
5-1	48.8516	<b>0.0000</b>	1-2-3-5-15-16-18-Ja: Fragmentierung <i>oder</i> Isolation durch Entfernung (Sammelschema unzureichend um Unterscheidung zu treffen)
5-2	13.0897	0.1052	1-2-11- Ja: Gebietsausweitung-12-Nein: Zusammenhängende Ausdehnung (4 von 6 Distanzwerten sind signifikant!)
gesamt	38.8798	<b>0.0000</b>	1-2: ergebnislos, da keine äußeren und internen Clades bestimmt sind * 1-2-3-4-Nein: eingeschränkter Genfluss mit Isolation durch Distanz, bzw. eingeschränkte Verbreitung durch Distanz bei asexuellen Organismen ** 1-2-11- Ja: Gebietsausweitung-12-Nein: Zusammenhängende Ausdehnung

\* Modifizierung 1: angenommen 5-1 ist äußerer Clade und 5-2 interner Clade

\*\* Modifizierung 2: angenommen 5-1 ist interner Clade und 5-2 äußerer Clade

Innerhalb des Clades 2-24 deutet die NCA-Analyse auf eine zurückliegende zusammenhängende Gebietsausweitung hin. Dieser Clade umfasst Haplotypen aus sehr weit entfernten Gebieten: der kontinentalen und maritimen Antarktis, Patagonien und Nordamerika. Die signifikanten Distanzwerte des Clades 4-3 lassen auf zurückliegende Fragmentierung oder rezente Isolation durch große Entfernung schließen. Das Sampling gibt keinen genaueren Aufschluss. Betroffen ist Clade 3-7 innerhalb des Clades 4-3, da er als einziger Clade signifikante Distanzwerte zeigt. Er enthält nur Individuen aus Bariloche (Patagonien) wobei die beiden anderen Clades in 4-3 hauptsächlich Individuen aus El Chalten und Ecuador beinhalten. Ein weiterer Fall von zurückliegender Fragmentierung oder rezenter Isolation durch große Entfernung liegt im nächsthöheren Clade-Level vor: 5-1. Der betroffene Clade innerhalb von 5-1 ist Clade 4-1. Es handelt sich um die in Tierra del Fuego vorkommende mit *U. perpusilla* synonymisierte *Neuropogon rohmederi* f. *ushuaiensis* (siehe Diskussion in Kapitel 3-A und Abb. 3.9-3). Innerhalb des Clades 4.5 weisen die signifikanten Distanzwerte des Clades 3-13 auf eingeschränkten Genfluss mit Isolation durch Distanz bzw. eingeschränkte Verbreitung durch Distanz bei asexuellen Organismen hin. Dieser Clade setzt

sich aus Haplotypen vier verschiedener Populationen zusammen: Mars Oasis und Rothera in der Antarktis, sowie Bariloche und Ecuador, wobei Individuen von drei dieser Populationen auch in Clade 3-12 vorkommen. Clade 5-2 zeigt zwar keinen signifikanten  $\chi^2$ -Wert, vier von sechs Distanzwerten waren aber signifikant und er wurde daher getestet. Dem Clade liegt eine weit zurückliegende Gebietsausdehnung zugrunde. Er enthält Individuen von neun verschiedenen Populationen, unter anderem aus der kontinentalen Antarktis und Nordamerika. Das gesamte Kladogramm wurde wie in der *U. trachycarpa*-Gruppe in modifizierter Weise auf Populationsereignisse getestet (siehe Tab. 3.16). Wird 5-1 als äußerer Clade und 5-2 als interner Clade gewertet, liegt innerhalb des Clades eingeschränkter Genfluss mit Isolation durch Distanz bzw. eingeschränkte Verbreitung durch Distanz (bei asexuellen Organismen) vor, im umgekehrten Fall wird das Muster durch eine zusammenhängende Gebietsausdehnung innerhalb der Clades erklärt.

#### *U. aurantiaco-atra*-Gruppe:

Die 45 Haplotypen des SP-Netzwerks der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe wurden nach den ‚Nesting-Regeln‘ in 25 1-Schritt-Clades, 10 2-Schritt-Clades, 4 3-Schritt-Clades und 2 4-Schritt-Clades gegliedert. Abbildung 3.24 zeigt das ‚Nesting-Design‘ welches in Tabelle 3.17 mit Individuen und Populationen assoziiert wird. ‚Loops‘ in diesem Netzwerk wurden anhand zweier ‚Nesting-Regeln‘ aufgelöst: Haplotypen bestehend aus nur einem Individuum (‚singletons‘) sind wahrscheinlicher mit mehrelementigen Haplotypen verbunden und Haplotypen mit mehreren Individuen neigen dazu mehr Verbindungen zu anderen Haplotypen zu haben als ‚singletons‘ (POSADA & CRANDALL 2001, PFENNIGER & POSADA 2002). Folglich wurde Haplotyp H32 in Untergruppe I mit H15 verbunden und H22 in Untergruppe II mit H5. Diese Entscheidungen werden durch geographische Aspekte unterstützt. Das ‚Nesting‘ der höheren Clades wird dadurch nicht beeinflusst. Es konnten nur drei statistisch signifikante geographische Verbindungen von Haplotypen gefunden werden (Clade 3-2, 4-1 und das gesamte Netzwerk). Abbildung 3.25 gibt eine Übersicht über die ermittelten signifikanten Distanzwerte innerhalb des Netzwerkes. Tabelle 3.18 listet die Ergebnisse und Schlussfolgerungen der NCA auf.

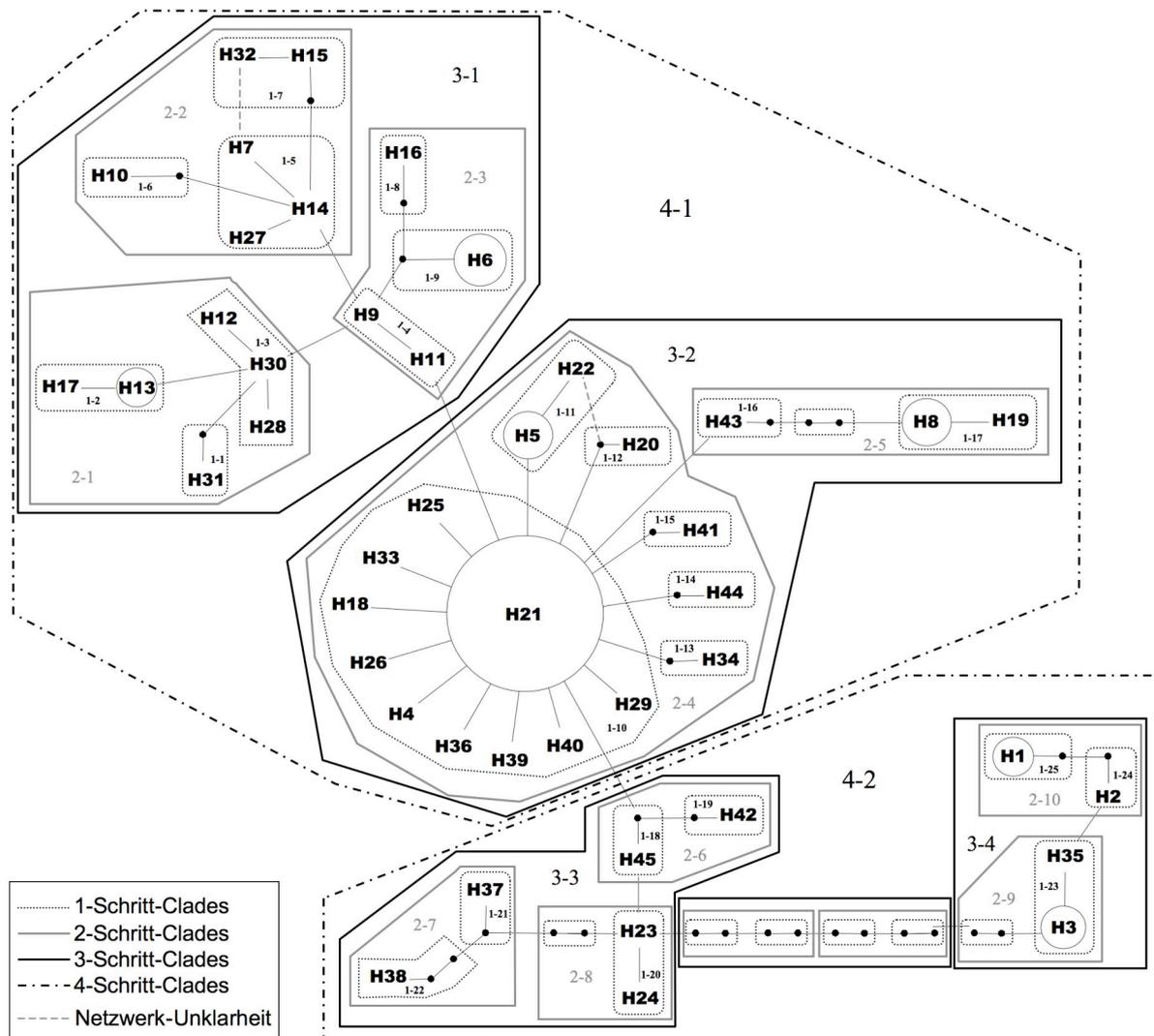


Abb. 3.24: ‘Nesting-Design’ des statistischen Parsimony-Netzwerkes (Abb. 3.18) der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe. Die einzelnen Clade-Ebenen sind durch entsprechende Linien gekennzeichnet. Haplotypen ab vier Individuen sind proportional zur Anzahl der Individuen als Blasen gekennzeichnet. Schwarze Punkte repräsentieren nicht gesammelte oder bereits ausgestorbene Haplotypen, die zur Verbindung der gesammelten Haplotypen notwendig sind. Gestrichelte graue Linien deuten auf alternative Netzwerkverbindungen hin.

Tab. 3.17: *U. aurantiaco-atra*-Haplotyp-Nesting Zusammenfassung und Zusammenhang von Individuen und Standorten. Es sind die zu den Haplotypen gehörenden Individuen, ihre Sammelorte und die Nesting-Clades angegeben.

Individuum	Haplotyp	Population	1-Schritt-Clades	2-Schritt-Clades	3-Schritt-Clades	4-Schritt-Clades
184-2						
188-1						
188-12						
18815	H1	TFGM, SCEL	1-25			
184-3	H2	TFGM	1-24	2-10		
237-2	H35	TFLP				
175-2						
175-5						
184-5						

253-1						
253-2	H3	TFGM	1-23	2-9	3-4	
199-11						
124-4	H23	TFPG, SLSB				
256-14	H24	TFGM	1-20	2-8		
206-1	H38	SCEL	1-22			
189-1	H37	SCEL	1-21	2-7		
181-1	H42	TFGM	1-19			
240-2	H45	TFLP	1-18	2-6	3-3	4-2
121-3						
121-4						
125-8						
136-1						
183-1		SLBP,SLSB,				
236-1	H8	TFGM, TFLP				
148-2	H19	TFLP	1-17			
199-5	H43	TFPG	1-16	2-5		
133-6	H41	SLPH	1-15			
240-1	H44	TFLP	1-14			
112-2	H34	SSKG	1-13			
148-3	H20	TFLP	1-12			
194-1						
194-2						
194-3						
194-4						
194-7						
194-10	H5	SCMA				
194-6	H22	SCMA	1-11			
120-3						
120-4						
120-5						
124-5						
128-2						
147-1						
147-3						
147-8						
147-12						
181-4						
183-2						
194-5						
235-1						
235-2						
238-1		SLPH, SLSB,				
241-1		SLBP, SDEC,				
256-11	H21	TFGM, SCMA, TFLP				
107	H25	FALK				
112-1						
135-1	H33	SSKG, SLSB				
148-1	H18	TFLP				

92-1					
135-4	H26	SIGY, SLSB			
200-4	H4	SCEL			
239-1	H36	TFLP			
207-1	H39	SCEL			
124-1	H40	SLSB			
234-3	H29	TFLP	1-10	2-4	3-2
72					
137-2					
139-2					
139-5					
140-2					
144-1		MTEF, SLBP,			
144-5	H6	SLSB, SDEC	1-9		
142-3	H16	SLSB	1-8		
137-1					
123-1	H11	SLBP			
136-2					
142-4	H9	SLSB	1-4	2-3	
111-1	H32	MLEO			
142-2					
142-6	H15	SLSB	1-7		
136-3					
138-4	H10	SLSB	1-6		
97-1					
138-2					
140-1	H14	MARO, SLSB			
95-1	H27	SDEC			
113-2	H7	SSKG	1-5	2-2	
137-3					
138-3					
139-1	H12	SLBP, SLSB			
96-4					
97-6	H30	MARO			
95-3	H28	SDEC	1-3		
138-1					
138-5					
138-6					
139-6	H13	SLSB, SLBP			
142-5	H17	SLSB	1-2		
108-1	H31	MLEO	1-1	2-1	3-1 4-1

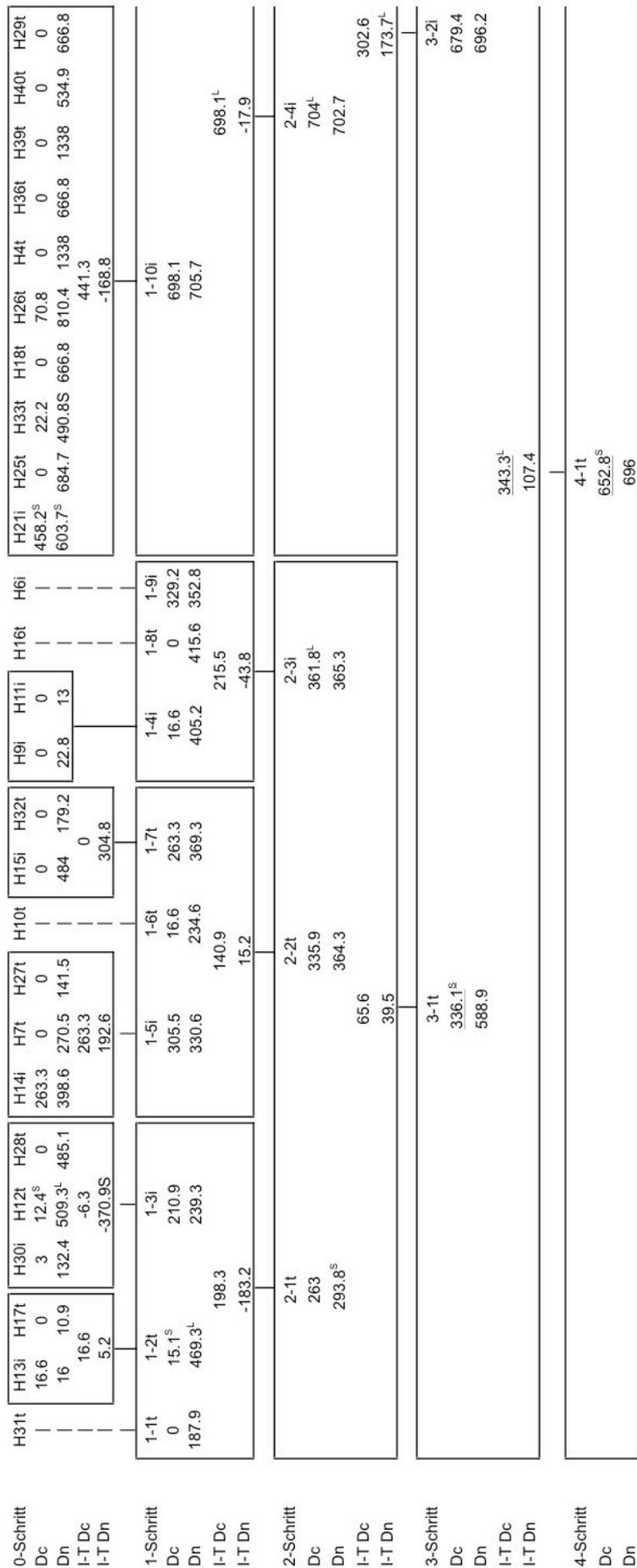


Abb. 3.25: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der Nested Clade Analyse der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe. "i" und "t" stehen für interne und 'tip' Clades. Haplotypen stehen in der ersten Zeile (0-Schritt-Clades). Das 'Nesting' erhöht sich von der ersten zur letzten Zeile. Signifikant kleine Distanzwerte sind mit "<sup>s</sup>", signifikant große mit "<sup>l</sup>" gekennzeichnet. Die unterstrichenen Werte haben signifikante X<sup>2</sup>-Werte und können interpretiert werden (siehe Tab. 3.18).

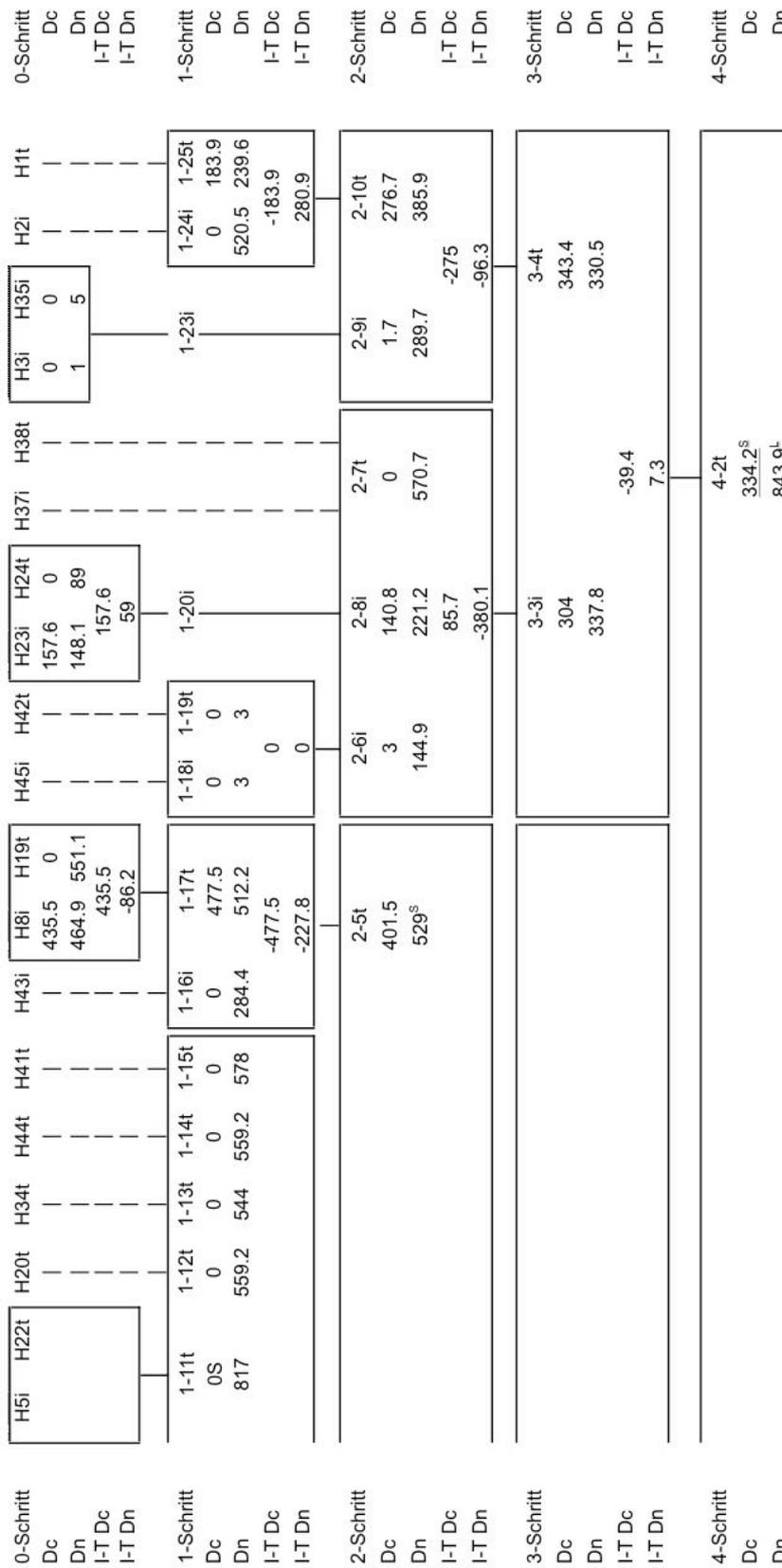


Abb. 3.25 (Fortsetzung): Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der Nested Clade Analyse der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe.

Tab. 3.18: Statistische Ergebnisse der Nested Clade Analyse der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe. Es wurden nur Clades getestet, die genetische und geographische Unterschiede aufweisen. p-Werte basieren auf 10.000 Permutationen. Signifikante p-Werte  $\leq 0.05$  sind fettgedruckt. Die Folgerungskette beruht auf dem neusten Schlüssel (<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>).

Clade	$\chi^2$	p	Folgerungen aus der geographischen Distanz Analyse (NCA)
1-2	0.3125	1	
1-3	12	0.2686	
1-4	4	0.3282	
1-5	10	0.2933	
1-7	3	0.3308	
1-10	105.9412	0.2564	
1-17	2.9167	0.5772	
1-20	3	1	
1-23	6	0.1667	
2-1	10.5467	0.2354	
2-2	6.9333	0.7456	
2-3	5.0571	0.6642	
2-4	66.9152	0.2155	
2-5	8	0.3854	
2-6	2	1	
2-10	1.875	0.4107	
3-1	13.6378	0.2965	
3-2	19.13	0.0579	1-2-3-4-Nein: eingeschränkter Genfluss mit Isolation durch Distanz, bzw. eingeschränkte Verbreitung durch Distanz bei asexuellen Organismen (3 Distanzwerte sind signifikant)
3-3	11.0833	0.2963	
3-4	5.2381	0.1072	
4-1	43.7060	<b>0.0000</b>	1-2-3-4-Nein: eingeschränkter Genfluss mit Isolation durch Distanz, bzw. eingeschränkte Verbreitung durch Distanz bei asexuellen Organismen
4-2	4.3013	0.4646	
gesamt	49.6421	<b>0.0000</b>	1-2: ergebnislos, da keine äußeren und internen Clades bestimmt sind * 1-2-11- Ja: Gebietsausweitung-12-Nein: Zusammenhängende Ausdehnung ** 1-2-3-5-6-13-Ja: Fernbesiedlung, möglicherweise mit anschließender Fragmentierung <i>oder</i> vergangene Fragmentierung mit anschließender Gebietsausweitung

\* Modifizierung 1: angenommen 4-1 ist äußerer Clade und 4-2 interner Clade

\*\* Modifizierung 2: angenommen 4-1 ist interner Clade und 4-2 äußerer Clade

Clade 3-2 wies keinen signifikanten  $\chi^2$ -Wert auf, hatte aber drei signifikante Distanzwerte und wurde daher analysiert. Das Signifikanzmuster konnte als eingeschränkter Genfluss mit Isolation durch Distanz bzw. eingeschränkte Verbreitung durch Distanz innerhalb des Clades identifiziert werden. Die relevante Information innerhalb des Clades steckt in den Distanzwerten des Clades 2-5, dessen Individuen allerdings aus denselben Populationen stammen wie die des zentralen Haplotyps H21 (Clade 2-4), mit dem Clade 2-5 in direktem Kontakt steht. Dieselbe nicht-historische Populationsstruktur traf auf Clade 4-1 zu, wobei in diesem Fall eine eingeschränkte Verbreitung durch Distanz zwischen dem rein antarktischen Clade 3-1 und dem gemischt antarktisch-patagonischen Clade 3-2 besteht. Wieder lieferte die Analyse des gesamten Netzwerkes kein Ergebnis und wurde modifiziert (4-1 als ‚tip‘-Clade, 4-2 als interner Clade und vice versa). Für die erste Modifizierung wurde eine zusammenhängende Ausdehnung des Besiedlungsgebietes gefolgert. Für die zweite Modifizierung konnte nicht zwischen den beiden Populationsprozessen „Fernbesiedlung mit

möglicher anschließender Fragmentierung *oder* vergangene Fragmentierung mit anschließender Gebietsausweitung“ unterschieden werden. In jedem Fall betrifft ein solcher Prozess Clade 3-4, mit signifikant großen  $D_n$ -Werten innerhalb des Clades 4-2 (*U. acromelana*).

### B-3.5 Kontingenztafeltests und ANOVAs

Die Ergebnisse der Kontingenztafeltests, die anhand der geschachtelten statistischen Parsimony-Netzwerke der NCA durchgeführt wurden, finden sich für die jeweiligen Gruppen in den Tabellen 3.19, 3.20 und 3.21. Kontingenztafeltests sind statistisch unsicher und nicht zulässig, wenn die *erwarteten* Werte in den einzelnen Zellen der Reihen und Spalten der Tabelle kleiner als 5 sind. Lagen Erwartungswerte in der Tabelle unter 5, wurde das Ergebnis anhand einer einfachen statistischen Regel überprüft: Ein Erwartungswert darf so klein sein wie das Ergebnis aus  $5r/s$ , wobei  $r$  die Anzahl der Erwartungswerte unter 5 und  $s$  die Anzahl der Zellen der Tabelle angibt (YARNOLD 1970). Lagen Erwartungswerte unterhalb des errechneten akzeptablen minimalen Erwartungswertes vor, wurde versucht, Merkmale zusammenzulegen bzw. Clades zu vereinen, um auf statistisch ausreichende Individuenzahlen zu kommen (siehe Tab. 3.19-3.21). Diese Einschränkung hatte zur Folge, dass nicht alle Merkmale in jeder Abstufung überprüft werden konnten (z. B. Isidiomorphe: nicht vorhanden – vorhanden, statt: nicht vorhanden – pigmentiert – unpigmentiert) und z. T. Ergebnisse nicht für jeden einzelnen Clade, sondern für Gruppen von Clades gewonnen wurden. Die fettgedruckten signifikanten Ergebnisse in den Tabellen 3.19 – 3.21 erlauben eine Interpretation und werden im Diskussionsteil B-4 besprochen. Um die Unverteilungen von Merkmalen zwischen Clades interpretieren zu können, wurden die tatsächlich beobachteten mit den erwarteten Tabellen verglichen und Abweichungen registriert.

#### *U. trachycarpa*-Gruppe:

Tab. 3.19: Ergebnisse der Kontingenztafeltests für die *U. trachycarpa*-Gruppe, basierend auf dem ‚Nesting-Design‘ in Abb. 3.20. Clade 3-3 umfasst nur zwei Individuen und ist daher für die statistische Auswertung zu klein. Er wurde zu 3-2 zugerechnet. 3-4 musste aus statistischen Gründen in vielen Fällen ebenfalls mit diesen Clades vereinigt werden (Auflistung siehe unter „Beteiligte Clades“).

Clade-Level	Getestete Merkmale	Beteiligte Clades	Wahrscheinlichkeit $p$
3-Schritt Clades	Reproduktionsmodi (Apothecien – Sorale) <sup>1</sup>	3-1/ 3-2 (+3-3,+3-4)/ 3-5	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	Reproduktionsmodi (Apothecien – Sorale)	4-1/ 4-2	0.171 <sup>NS</sup>
3-Schritt Clades	Soralhäufigkeit (punktuell – ineinander wachsend)	3-1/ 3-2 (+3-4)/ 3-5 <sup>2</sup>	<b>0.007**</b>
4-Schritt Clades	Soralhäufigkeit	4-1/ 4-2	<b>0.002**</b>
3-Schritt Clades	Soralposition (an Seitenästen – auch an Hauptästen)	3-1/ 3-2 (+3-4)/ 3-5 <sup>2</sup>	<b>0.000**</b>

4-Schritt Clades	Soralposition	4-1/ 4-2	<b>0.000**</b>
3-Schritt Clades	Isidiomorphe (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2 (+3-3,+3-4)/ 3-5	0.098 <sup>NS</sup>
4-Schritt Clades	Isidiomorphe	4-1/ 4-2	0.722 <sup>NS</sup>
3-Schritt Clades	Papillen (keine – pigmentiert – unpigm. – beides)	3-1/ 3-2 (+3-3,+3-4)/ 3-5	<b>0.005**</b>
4-Schritt Clades	Papillen	4-1/ 4-2	<b>0.021*</b>
3-Schritt Clades	Papillenform (grob – fein)	3-1/ 3-2 (+3-3)/ 3-4/ 3-5	<b>0.003**</b>
4-Schritt Clades	Papillenform	4-1/ 4-2	0.253 <sup>NS</sup>
3-Schritt Clades	Fibrillen (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2 (+3-3,+3-4)/ 3-5	<b>0.004**</b>
4-Schritt Clades	Fibrillen	4-1/ 4-2	<b>0.013*</b>
4-Schritt Clades	Fibrillen (nicht vorhanden – vorhanden – häufig)	4-1/ 4-2	<b>0.004**</b>
3-Schritt Clades	Fibrillenposition (gleichmäßig – nur an Hauptästen)	3-1/ 3-2 (+3-3,+3-4)/ 3-5	<b>0.048*</b>
4-Schritt Clades	Fibrillenposition	4-1/ 4-2	<b>0.016*</b>
3-Schritt Clades	ringförmige Kortextrisse (nicht vorhanden – vorh.)	3-1/ 3-2 (+3-3,+3-4)/ 3-5	0.254 <sup>NS</sup>
4-Schritt Clades	ringförmige Kortextrisse	4-1/ 4-2	0.061 <sup>NS</sup>
3-Schritt Clades	Sekundärastansatz (zylindrisch oder verbreitert)	3-1/ 3-2 (+3-3,+3-4)/ 3-5	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	Sekundärastansatz	4-1/ 4-2	<b>0.007**</b>
3-Schritt Clades	Farbe der Basalteile (hell – schwarz – braun)	3-1/ 3-2 (+3-3,+3-4)/ 3-5	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	Farbe der Basalteile	4-1/ 4-2	<b>0.000**</b>
3-Schritt Clades	Kortexschnittfläche (glänzend – sehr glänzend – matt)	3-1/ 3-2 (+3-3,+3-4)/ 3-5	<b>0.000**<sup>3</sup></b>
4-Schritt Clades	Kortexschnittfläche	4-1/ 4-2	<b>0.000**</b>
3-Schritt Clades	β-Orcinol-Depsidone (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2 (+3-3)/ 3-4/ 3-5	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	β-Orcinol-Depsidone	4-1/ 4-2	<b>0.000**</b>
3-Schritt Clades	Norstictinsäure (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2 (+3-3)/ 3-4/ 3-5	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	Norstictinsäure	4-1/ 4-2	<b>0.000**</b>
3-Schritt Clades	Salazinsäure (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2 (+3-3,+3-4)/ 3-5	<b>0.003**<sup>3</sup></b>
4-Schritt Clades	Salazinsäure	4-1/ 4-2	0.637 <sup>NS</sup>
3-Schritt Clades	Dibenzofurane (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2 (+3-3,+3-4)/ 3-5	0.453 <sup>NS</sup>
4-Schritt Clades	Dibenzofurane	4-1/ 4-2	0.601 <sup>NS</sup>

\*: signifikant auf dem 5%-Niveau; \*\*: signifikant auf dem 1%-Niveau; <sup>NS</sup>: nicht signifikant; <sup>1</sup>: Individuen mit Apothecien *und* Soralen wurden aus statistischen Gründen zur Gruppe mit Soralen gerechnet; <sup>2</sup>: Clade 3-4 wurde aus statistischen Gründen zu 3-2 gerechnet, obwohl die Verhältnisse leicht abweichen; <sup>3</sup>: ein oder zwei Werte der Kontingenztafel liegen geringfügig unter dem akzeptablen minimalen Erwartungswert für die einzelnen Zellen.

### *U. perpusilla*-Gruppe:

Tab. 3.20: Ergebnisse der Kontingenztafeltests für die *U. perpusilla*-Gruppe, basierend auf dem ‚Nesting-Design‘ in Abb. 3.22. Zum Teil mussten aus statistischen Gründen Clades miteinander vereinigt werden, was unter „Beteiligte Clades“ aufgelistet ist.

Clade-Level	Getestete Merkmale	Beteiligte Clades	Wahrscheinlichkeit p
4-Schritt Clades	Reproduktionsmodi (Apothecien – Sorale) <sup>1</sup>	4-1/ 4-2/ 4-3/ 4-4/ 4-5	<b>0.000**<sup>3</sup></b>
4-Schritt Clades	Reproduktionsmodi	4-1/ 4-2 (+4-4)/ 4-3/ 4-5	<b>0.000**</b>
5-Schritt Clades	Reproduktionsmodi	5-1/ 5-2	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	Apothecienfarbe (schwarz – gelb – schwarz/gelb)	Berechnung nicht möglich <sup>2</sup>	
5-Schritt Clades	Apothecienfarbe	5-1/ 5-2	<b>0.011*<sup>3</sup></b>
4-Schritt Clades	Soralform (artikulierter Rand – konvex – variabel)	Berechnung nicht möglich <sup>2</sup>	
5-Schritt Clades	Soralform	5-1/ 5-2	<b>0.000**</b>

4-Schritt Clades	Soralhäufigkeit (punktuell – ineinander wachsend)	Berechnung nicht möglich <sup>2</sup>	
5-Schritt Clades	Soralhäufigkeit	5-1/ 5-2	0.606 <sup>NS</sup>
4-Schritt Clades	Isidiomorphe (nicht vorhanden – vorhanden)	4-1/ 4-2/ 4-3/ 4-4/ 4-5	<b>0.000**<sup>3</sup></b>
5-Schritt Clades	Isidiomorphe	5-1/ 5-2	0.600 <sup>NS</sup>
4-Schritt Clades	Thallusoberfläche (glatt – strukturiert)	4-1/ 4-2/ 4-3/ 4-4/ 4-5	0.070 <sup>NS</sup>
5-Schritt Clades	Thallusoberfläche	5-1/ 5-2	<b>0.014*</b>
4-Schritt Clades	Papillen (nicht vorhanden – vorhanden)	Berechnung nicht möglich <sup>2</sup>	
5-Schritt Clades	Papillen	5-1/ 5-2	<b>0.001**</b>
4-Schritt Clades	Fibrillen (nicht vorhanden – vorhanden – häufig)	4-1 (+4-2)/ 4-3/ 4-4 (+4-5)	<b>0.000**<sup>3</sup></b>
5-Schritt Clades	Fibrillen	5-1/ 5-2	<b>0.002**</b>
4-Schritt Clades	Kortexgrübchen (nicht vorhanden – vorhanden)	4-1/ 4-2/ 4-3/ 4-4/ 4-5	<b>0.003**</b>
5-Schritt Clades	Kortexgrübchen	5-1/ 5-2	0.835 <sup>NS</sup>
4-Schritt Clades	ringförmige Kortextrisse (nicht vorhanden – vorh.)	4-1/ 4-2/ 4-3/ 4-4/ 4-5	<b>0.018*</b>
5-Schritt Clades	ringförmige Kortextrisse (nicht vorhanden – an Hauptästen – überall)	5-1/ 5-2	<b>0.002**</b>
4-Schritt Clades	Form der Basalteile (wuchernd – abgesetzter Stamm)	4-1/ 4-2/ 4-3/ 4-4/ 4-5	0.100 <sup>NS</sup>
5-Schritt Clades	Form der Basalteile	5-1/ 5-2	0.082 <sup>NS</sup>
4-Schritt Clades	Farbe der Basalteile (hell – braun)	4-1 (+4-2)/ 4-3/ 4-4/ 4-5	<b>0.003**<sup>3</sup></b>
5-Schritt Clades	Farbe der Basalteile (hell – schwarz – braun)	5-1/ 5-2	0.413 <sup>NS</sup>
4-Schritt Clades	Mark (locker – dicht)	4-1/ 4-2/ 4-3/ 4-4/ 4-5	<b>0.000**</b>
5-Schritt Clades	Mark	5-1/ 5-2	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	Dibenzofurane (nicht vorhanden – vorhanden)	4-1/ 4-2/ 4-3/ 4-4/ 4-5	0.399 <sup>NS</sup>
5-Schritt Clades	Dibenzofurane	5-1/ 5-2	0.487 <sup>NS</sup>
4-Schritt Clades	Unidentifizierte Substanz 2 (nicht vorhanden – vorh.)	Berechnung nicht möglich <sup>2</sup>	
5-Schritt Clades	Unidentifizierte Substanz 2	5-1/ 5-2	<b>0.011*<sup>3</sup></b>

\*: signifikant auf dem 5%-Niveau; \*\*: signifikant auf dem 1%-Niveau; <sup>NS</sup>: nicht signifikant; <sup>1</sup>: Individuen mit Apothecien *und* Soralen wurden aus statistischen Gründen zur Gruppe mit Soralen gerechnet; <sup>2</sup>: Eine Berechnung der 4-Schritt-Clades ist wegen zu geringer Individuenanzahl nicht möglich. <sup>3</sup>: ein oder zwei Werte der Kontingenztafel liegen geringfügig unter dem akzeptablen minimalen Erwartungswert für die einzelnen Zellen.

### *U. aurantiaco-atra*-Gruppe:

Tab. 3.21: Ergebnisse der Kontingenztafeltests für die *U. aurantiaco-atra*-Gruppe, basierend auf dem ‚Nesting-Design‘ in Abb. 3.24. Zum Teil mussten aus statistischen Gründen Clades miteinander vereinigt werden, was unter „Beteiligte Clades“ aufgelistet ist.

Clade-Level	Getestete Merkmale	Beteiligte Clades	Wahrscheinlichkeit <i>p</i>
3-Schritt Clades	Reproduktionsmodi (Apothecien – Sorale) <sup>1</sup>	3-1/ 3-2 (+3-3)/ 3-4	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	Reproduktionsmodi (Apothecien – Sorale)	4-1/ 4-2	0.100 <sup>NS</sup>
3-Schritt Clades	Soralhäufigkeit (punktuell – ineinander wachsend)	3-1/ 3-2 (+3-3)/ 3-4	0.646 <sup>NS</sup>
4-Schritt Clades	Soralhäufigkeit	4-1/ 4-2	0.954 <sup>NS</sup>
3-Schritt Clades	Soralposition (an Seitenästen – auch an Hauptästen)	3-1/ 3-2/ 3-3 / 3-4	<b>0.032*</b>
4-Schritt Clades	Soralposition	4-1/ 4-2	<b>0.004**</b>
3-Schritt Clades	Isidiomorphe (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2/ 3-3 / 3-4	<b>0.002**</b>
4-Schritt Clades	Isidiomorphe	4-1/ 4-2	0.263 <sup>NS</sup>
3-Schritt Clades	Papillen (keine bis undeutlich wenige – häufig)	3-1/ 3-2 (+3-3)/ 3-4	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	Papillen	4-1/ 4-2	<b>0.000**</b>

3-Schritt Clades	Fibrillen (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2/ 3-3 / 3-4	<b>0.005**</b>
4-Schritt Clades	Fibrillen	4-1/ 4-2	0.717 <sup>NS</sup>
3-Schritt Clades	Kortexgrübchen (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2 (+3-3)/ 3-4 <sup>2</sup>	<b>0.028**<sup>3</sup></b>
4-Schritt Clades	Kortexgrübchen	4-1/ 4-2	0.462 <sup>NS</sup>
3-Schritt Clades	ringförmige Kortextrisse (keine – an Hauptästen – überall)	3-1/ 3-2 (+3-3)/ 3-4	<b>0.000**<sup>3</sup></b>
4-Schritt Clades	ringförmige Kortextrisse	4-1/ 4-2	<b>0.000**</b>
3-Schritt Clades	Sekundärastansatz (+/- zylindrisch – verschmälert)	3-1/ 3-2 (+3-3)/ 3-4	<b>0.000**<sup>3</sup></b>
4-Schritt Clades	Sekundärastansatz	4-1/ 4-2	<b>0.000**<sup>3</sup></b>
3-Schritt Clades	β-Orcinol-Depsidone (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2/ 3-3 / 3-4	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	β-Orcinol-Depsidone	4-1/ 4-2	<b>0.001**</b>
3-Schritt Clades	Norstictinsäure (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2/ 3-3 / 3-4	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	Norstictinsäure	4-1/ 4-2	<b>0.000**</b>
3-Schritt Clades	Salazinsäure (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2/ 3-3 / 3-4	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	Salazinsäure	4-1/ 4-2	<b>0.000**</b>
3-Schritt Clades	Quaesitinsäure (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2/ 3-3 / 3-4	<b>0.048*</b>
4-Schritt Clades	Quaesitinsäure	4-1/ 4-2	0.392 <sup>NS</sup>
3-Schritt Clades	(Fumar-) Protocetrarsäure (nicht vorhanden – vorh.)	3-1/ 3-2/ 3-3 / 3-4	<b>0.000**</b>
4-Schritt Clades	(Fumar-) Protocetrarsäure	4-1/ 4-2	0.195 <sup>NS</sup>
3-Schritt Clades	Dibenzofurane (nicht vorhanden – vorhanden)	3-1/ 3-2/ 3-3 / 3-4	<b>0.018*</b>
4-Schritt Clades	Dibenzofurane	4-1/ 4-2	<b>0.021*</b>

\*: signifikant auf dem 5%-Niveau; \*\*: signifikant auf dem 1%-Niveau; <sup>NS</sup>: nicht signifikant; <sup>1</sup>: Individuen mit Apothecien *und* Soralen wurden aus statistischen Gründen zur Gruppe mit Soralen gerechnet; <sup>2</sup>: Clade 3-3 wurde aus statistischen Gründen zu 3-2 gerechnet, obwohl die Verhältnisse leicht abwichen; <sup>3</sup>: ein Wert der Kontingenztafel liegt geringfügig unter dem akzeptablen minimalen Erwartungswert für die einzelnen Zellen.

Die Testergebnisse der ANOVA (Analysis of Variance) wurden ebenfalls anhand der geschachtelten statistischen Parsimony-Netzwerke der NCA durchgeführt und sind in Tabelle 3.22 aufgelistet. Eine Liste mit den ausführlichen Ergebnissen findet sich in Anhang 4. Clade 3-3 der *U. trachycarpa*-Gruppe hatte nur zwei und damit zu wenige Individuen um eine eigenständige Gruppe in der ANOVA zu sein und wurde somit von der Analyse ausgeschlossen.

Tab. 3.22: ANOVA-Testergebnisse für alle drei Gruppen. Merkmal: Zentralstrangdicke in % anteilig am Thallusdurchmesser.

Gruppe	Clade-Ebene	F	Chi-square
<i>U. trachycarpa</i>	3-Schritt-Clades (ohne 3-3)	14.25	0.000**
<i>U. perpusilla</i>	4-Schritt-Clades	7.927	0.000**
<i>U. aurantiaco-atra</i>	3-Schritt-Clades	7.79	0.000**

## B-4 Diskussion

### B-4.1 Genetische Diversität der untersuchten *Neuropogon*-Gruppen

Bei weit verbreiteten, vor allem bipolaren Arten, sind unterschiedlich große Entfernungen zwischen Populationen, die z. T. wenige bis tausende von Kilometern betragen können, nicht zu verhindern, da nicht alle Gebiete gleichmäßig intensiv besammelt werden können. Vor allem ist die Zugänglichkeit von Standorten bei arktisch-alpinen Arten in den meisten Fällen beschränkt (hohe Bergregionen, Inseln, Antarktis, Arktis). Zwischen den Populationen können sich daher z. T. große, nicht besammelte Gebiete erstrecken, was auch an der weiten Ausdehnung der Arten liegt. Diese Tatsachen können ein Risiko der Verfälschung bergen, welches bei der Diskussion der Ergebnisse beachtet werden sollte. In den Tabellen 3.7, 3.9 und 3.11 wurden die einzelnen Populationen daher größeren Regionen zugeordnet, um verlässlichere Aussagen zur Diversität in diesen Regionen treffen zu können. Mit großer Sicherheit kann eine sehr geringe Diversität für die Nordhemisphäre im Vergleich zur Südhemisphäre verzeichnet werden (sowohl für die *U. trachycarpa*- als auch für die *U. perpusilla*-Gruppe), da weit auseinander liegende Populationen zumeist denselben oder aber sehr nah verwandte Haplotypen haben (Tab. 3.7, 3.9). Dies wirkt sich auf die Gesamthaplotypdiversität der *U. trachycarpa*-Gruppe (87%) aus, die niedriger als bei den anderen Gruppen ist (*U. perpusilla*: 98%/ *U. aurantiaco-atra*: 95%). Das Diversitätszentrum der *Neuropogon*-Gruppe und ihrer einzelnen Arten liegt eindeutig in der südlichen Südhemisphäre, je nach Gruppe in Feuerland, benachbarten Regionen (Santa Cruz) oder der maritimen Antarktis (vorgelagerte Inseln der antarktischen Halbinsel). Die kontinental antarktischen Standorte wurden nicht stark besammelt, aber sowohl in der *U. trachycarpa*-, als auch in der *U. perpusilla*-Gruppe ist die Haplotyp-Diversität (81% und 91%) zumindest geringer als in der maritimen Antarktis und im südlichen Südamerika. Die kontinentale Antarktis ist auch als geobotanische Region sehr viel artenärmer als die maritime Antarktis. ØVSTEDAL & LEWIS SMITH (2001) geben eine dreimal geringere Flechtendiversität an. Dies liegt an den dort herrschenden, extremen klimatischen Bedingungen, die bedeutend schlechter sind als in der maritimen Antarktis (kaum Regen, nur 10-15 Wochen schneefreie Sommerperiode in den Küstenregionen bzw. 1-3 Monate Tageslicht in Nunatakregionen). Somit sind die Flechten über weite Teile des Jahres inaktiv und möglicherweise ist auch die Mutationsrate herabgesetzt. Kontinental antarktische Flechten sind allerdings sehr gut an die extremen Bedingungen angepasst und können schon bei Minustemperaturen Photosynthese betreiben (KAPPEN et al. 1996).

*U. trachycarpa*, von WALKER (1985) als charakteristisch im Tiefland vorkommende *Neuropogon*-Art beschrieben, zeigt am tiefsten besammelten Standort in Patagonien, Monte Aymond in Santa Cruz (siehe Abb. 3.11), ca. 200 m alt., die höchste Haplotypen- und Nukleotiddiversität. Es handelt sich hier ausnahmslos um üppige, fertile Individuen.

Das Diversitätszentrum der fertilen Individuen der *U. perpusilla*-Gruppe liegt nach den Angaben WALKERS (1985) in den Höhenlagen der Anden des südlichen Südamerikas. Diese Aussage wird durch die molekulare Untersuchung unterstützt. Es sind verschiedene sehr diverse Populationen zu verzeichnen, bis hin zur einer Haplotypdiversität von 100% in Tierra del Fuego. Auch am Cerro Catedral in Bariloche ist die Diversität sehr hoch (96%). In beiden Populationen handelt es sich vornehmlich um fertile Individuen.

Die *U. aurantiaco-atra*-Gruppe hat einen südlicheren Schwerpunkt und zeigt die größte Haplotypdiversität in der maritimen Antarktis. Sorediöse Individuen sind in diesem Fall diverser als fertile Individuen.

Einige der untersuchten Gebiete sind nicht persönlich und wenig intensiv besammelt worden. Flechtenmaterial aus der kontinentalen und südlichen maritimen Antarktis, sowie aus Ecuador und Teilen der Nordhemisphäre wurde von Kollegen für diese Studie gesammelt oder aber aus Herbarien entnommen. Die meisten Kollegen kannten den Zweck dieser Studie und haben Standorte dementsprechend intensiv besammelt. Für einige der Populationen können aber keine Aussagen zu den Standortbedingungen und zur Art und Weise der Aufsammlung getroffen werden. Möglicherweise wurden z. T. dicht nebeneinander wachsende Individuen untersucht, was die Diversitätswerte von Standorten im Vergleich zu selbstbesammelten Standorten vergleichsweise niedrig erscheinen lassen kann. Andererseits wurden Individuen von nah gelegenen Standorten, vor allem in der kontinentalen und südlichen maritimen Antarktis, Ecuador und der Nordhemisphäre zu Populationen zusammengefasst. Dies war notwendig, da keine zusammenhängenden großflächigen Aufsammlungen zur Verfügung standen. Durch diese Vorgehensweise können Verzerrungen ausgeglichen oder aber auch entstanden sein. Die Diversität südhemisphärischer Gebiete könnte höher erscheinen, als sie tatsächlich ist. Weiterhin muss die Diversität an einzelnen Standorten kritisch im Hinblick auf sympatrisch vorkommende Arten betrachtet werden. Zwei Arten an einem Standort können diesen sehr divers erscheinen lassen. Der letzte Punkt sollte aber durch die Nested Clade Analyse aufgeklärt werden können.

#### B-4.2 Artabgrenzung und phylogeographische Interpretation der Gruppen

Die Interpretation der phylogeographischen Folgerungen aus der Haplotypverteilung und geographischen Ausbreitung der Haplotypen erfolgt in den drei bereits bekannten Gruppen.

##### B-4.2.1 Die *U. trachycarpa*-Gruppe

Die NCA der *U. trachycarpa*-Gruppe unterstützt keine Artabgrenzung innerhalb der Gruppe, da keine eindeutigen Fragmentationsereignisse aus den Mustern der Distanzwerte geschlossen wurden (Tab. 3.14). Für Rückschlüsse auf phylogeographische Prozesse sind Clade 4-2 und die intern geschachtelten Clades 3-5, 2-10 und 2-11 besonders interessant, da sich in diesem Teil des Netzwerkes die klonartigen *U. sphacelata* 1-Individuen der Nordhemisphäre befinden (siehe Abb. 3.14, 3.20). Um Rückschlüsse auf die geographische Verbreitung in Clade 3-5 (*U. sphacelata* 1) ziehen zu können, mangelt es an ausreichenden geographisch verteilten Aufsammlungen. In Clade 4-2 (3-4 und 3-5) handelt es sich möglicherweise um zwei Arten (fertil und sorediös), aber die Schlussfolgerung der NCA für diesen Clade ist eine „zurückliegende zusammenhängende Gebietserweiterung“ von Feuerland bis in die Nordhemisphäre. Eine zusammenhängende Ausbreitung muss sich über die klimatisch nur schwer passierbaren Tropen vollzogen haben. Die beste Möglichkeit für eine solche Ausbreitung war während des ca. 18.000 Jahre zurückliegenden letzten glazialen Maximums (LGM) bzw. während des Rückzugs der Gletscher in der darauf folgenden Zeit (DARLING et al. 2000). Das LGM ging mit einer signifikanten Abkühlung der Tropen einher (GUILDERSON et al. 1994, STUTE et al. 1995), so dass sich kälteliebende Organismen möglicherweise den (zurückweichenden) Gletschern folgend über die Hochgebirgsketten Süd-, Mittel- und Nordamerikas ausbreiten und postglazial bis in den arktischen Polarkreis vordringen konnten. STENROOS (1993) folgert diesen Ausbreitungsweg aus der heutigen Verbreitung von *Cladonia* und ähnlichen Taxa in der Südhemisphäre. Im Falle von *U. sphacelata* stehen der Glaubwürdigkeit einer solchen Theorie allerdings sehr große Verbreitungslücken entgegen. Zwar ist *U. sphacelata* 1 in den Hochgebirgen tropischer Länder zu finden und auch im zentralen mexikanischen Hochgebirge (Pico de Orizaba) ist eine *U. sphacelata* 1-ähnliche Art gefunden worden, aber in den Rocky Mountains und ihren Ausläufern ist man trotz intensivem Suchens bisher nicht fündig geworden (IMSHAUG 1954). Geht man von einer (post-)glazialen Ausbreitung aus und argumentiert mit einem Rückzug der Art in den arktischen Polarkreis, erscheinen die genetischen Diversitätswerte für die Nordhemisphäre (Tab. 3.7) unglaublich niedrig, da fast keine Mutationen aufgetreten sind.

Sie lehnen eine historisch begründete, langwierige und zusammenhängende Ausbreitung und damit zwangsläufig einhergehende Rückzugs-, Fragmentations- und Isolationsereignisse ab. Entsprechend der vorliegenden Daten erscheint nur eine relativ rezente Fernverbreitung als Erklärung möglich zu sein, wobei das NCA-Ergebnis dieser Interpretation widersprechen würde. Verschiedene Theorien zur Verbreitung von *U. sphacelata* existieren, wobei schon immer von einem Verbreitungszentrum *Neuropogons* in Südamerika ausgegangen wurde (VAN ZINDEREN BAKKER 1970). LYNGE (1941) und DURJETZ (1940) gehen von einer sehr weit zurückliegenden Verbreitung in die Nordhemisphäre aus, ohne sich genau festzulegen. WALKER (1985) spekuliert anhand von Theorien nach RAVEN & AXELROD (1974) über eine Migration entlang vulkanischer Inseln, bevor sich die Landverbindung zwischen Nord- und Südamerika ausprägte. Sie registriert allerdings auch die Gleichförmigkeit der nordhemisphärischen Populationen im Vergleich zur Südhemisphäre, die ihrer Meinung nach eher für eine rezente Migration sprechen. Fernverbreitung wird aber nicht explizit als Möglichkeit genannt. THOMSON (1972) geht zumindest in der arktischen Nordhemisphäre von einer schnellen post-glazialen Verbreitung von Thallusfragmenten und Sporen durch Wind aus. MYLLYS et al. (2003) legen Fernverbreitung für die bipolare Verbreitung zweier *Cladonia*-Arten nahe, obwohl die süd- und nordhemisphärischen Proben deutlich mehr genetische Variabilität als im vorliegenden Fall zeigen. Allerdings handelte es sich um sporenbildende Arten, die für eine Fernverbreitung prädestinierter erscheinen (GALLOWAY & APTROOT 1995). Fernverbreitung ist ein sehr umstrittenes Phänomen, vor allem wenn es um die Überquerung des tropischen Gürtels geht. VAN ZANTEN & PÓCS (1981) halten eine Moossporenverbreitung über den Äquator für ausgeschlossen. GALLOWAY & APTROOT (1995) hingegen sehen Fernverbreitung für Pilze mit kleinen Sporen als eine mögliche Erklärung für die bipolare Verbreitung von Flechten (MYLLYS et al. 2003). Die Tatsache, dass die kosmopolitisch verbreitete Pilzart *Serpula himantioides* offensichtlich weltweit panmiktisch ist (KAUDERUD et al. 2006), was anhand verschiedener molekularer Methoden belegt werden konnte, macht eine Fernverbreitung auch für Flechtenarten sehr wahrscheinlich.

Man muss bei der Auswertung der NCA berücksichtigen, dass es sich auch bei Fernverbreitung um eine Form von Gebietserweiterung handelt. Bei genauerer Betrachtung der Distanzwerte in Clade 4-2, erkennt man, dass Bedingungen für eine Fernverbreitung z. T. gegeben sind. Die Voraussetzungen für Rückschlüsse auf historische Gebietserweiterungen nach CANN (1987) und TEMPLETON et al. (1995) sind Haplotypen, die auf eine Ausgangsregion begrenzt sind und von diesen abstammende Haplotypen, die weit verbreitet

sind. Diese Bedingungen sind in Clade 4-2 gegeben. Bei Fernverbreitung können die  $D_c$ -Distanzwerte signifikant klein sein, wie in Clade 3-5, aber die  $D_n$ 's sollten entsprechend der Verbindung zu den Haplotypen im Ausgangsgebiet groß sein (siehe Abb. 3.21). Das Problem liegt also in dem signifikant kleinen  $D_n$ -Wert für den ‚tip‘-Clade 3-5. Dieser Wert kommt durch die extrem weite Ausdehnung ein und desselben Haplotyps H5 in der Nordhemisphäre, verbunden mit einer hohen Besammlung (28 Individuen), zustande. Das geographische Zentrum des Clades 4-2 wird damit weit in die Nordhemisphäre gelegt und die  $D_n$ 's für den internen Clade 3-4 werden signifikant groß bzw. für Clade 3-5 signifikant klein. Das Signifikanzmuster ist dadurch verzerrt und führt schließlich zu einer falschen Schlussfolgerung. Auch PRINTZEN et al. (2003), die die Phylogeographie einer disjunkt verbreiteten Flechte, *Cavernularia hultenii*, untersucht haben, hatten Probleme mit Hilfe der NCA realistische Rückschlüsse auf die Verbreitungsgeschichte dieser Flechte zu ziehen. MORANDO et al. (2003), die Eidechsen in den hohen Anden und Steppengebieten Patagoniens untersucht haben und die NCA zur Artabgrenzung einsetzen, bemerken, dass einige der Ergebnisse der NCA Artefakte des übermäßig zerstreuten geographischen Samplings sind, auch wenn der Schlüssel eine ausreichende Beprobung anzeigt. Wenn bereits bei Entfernungen innerhalb eines begrenzten Gebietes in Patagonien und relativ dichtem Sampling auf Artefakte geschlossen werden kann, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese auch bei viel größeren Entfernungen und lückenhaftem Sampling bei Flechten auftreten können. Eine ausführlichere Besammlung der Südhemisphäre und Reduzierung der Individuen in der Nordhemisphäre würde die Distanzwerte möglicherweise ändern. Die NCA ist auf Extremereignisse wie diese nicht ausgelegt und mir ist nicht bekannt, dass sie an Organismen mit annähernd weiter Verbreitung bereits durchgeführt wurde. Die meisten Organismen sind auf viel kleinere Verbreitungsgebiete beschränkt, Fernverbreitungen liegen zeitlich meist weiter zurück und führen im Regelfall nicht zu einer so erfolgreichen Besiedlung der gesamten Nordhemisphäre.

Wie diese Besiedlung verlaufen ist, ist nur zu vermuten. Die größte Wahrscheinlichkeit einer Fernverbreitung über diese Distanz liegt im Vogelzug. BAILEY & JAMES (1979) fanden beachtliche Mengen von Soredien, Sporen und Flechtenfragmenten an den Füßen verschiedener Vögel. Die Autoren spekulierten, dass die Verbreitungsmöglichkeit auch auf längeren Zugstrecken der Vögel bestehen und eine Ursache für Fernverbreitung sein könnte. Auch bei höheren Pflanzen und Moosen wird dieser Verbreitungsweg als plausible Möglichkeit gesehen (z. B. MILBERG 1992). Es gibt mindestens zwei Vogelarten, die prinzipiell für eine Fernverbreitung in Frage kommen: Küstenseeschwalben (*Sterna*

*paridisaea*) brüten im gesamten arktischen Polarkreis und fliegen zum Überwintern bis an die antarktischen Küsten. Ihr Vogelzug führt sie zumeist entlang der afrikanischen Westküste oder südamerikanischen Ostküste bis in das antarktische Polargebiet. In Ostsibirien und Alaska brütende Küstenseeschwalben wandern auch entlang der Westküste des amerikanischen Doppelkontinents bis zur südlichen Packeisregion, überwintern aber z. T. auch schon an den Küsten Chiles und Argentinens. Auch Buntfuß-Sturmschwalben (*Oceanites oceanicus*) unternehmen weite Migrationen von ihrem Brutgebiet, der Antarktis, in arktische Gebiete. Diese Vögel stellen mögliche Überträger von Flechtenmaterial aus der Andenregion bzw. Antarktis in die Nordhemisphäre dar. Für eine schnelle Ausbreitung innerhalb der Arktis können Wind und Vögel gleichermaßen verantwortlich sein (THOMSON 1972). Sind die Soredien klein genug, können sie theoretisch mit starkem Wind transportiert werden. Möglicherweise werden auch nur Teile von Soredien aufgegriffen und verweht. Bei einer Größe von ca. 10µm, was ungefähr zwei umspinnenen Algenzellen entspricht, die im trockenen Zustand entsprechend leicht sind, ist ein Transport über hunderte von Kilometern möglich (DUCE 1995).

Ein seltener *Neuropogon*-Fund im Hochgebirge der Mongolei am Otgontenger in 3500m Höhe, konnte leider nicht molekular untersucht werden, weil das Material zu alt war. Morphologisch und chemisch wurde das gut entwickelte Exemplar jedoch eindeutig *U. sphacelata* 1 zugeschrieben. Wie weit die Art in Nordasien verbreitet ist, ist unklar. In vielen Publikationen, sehr ausführlich bei LYNGE (1941), wird sie von den Inseln des nördlichen Polarkreises, aber niemals vom Festland beschrieben. So fehlt die Art in ganz Skandinavien, wo intensiv nach ihr gesucht wurde. Die sibirische Küstenregion ist weniger gut untersucht und *U. sphacelata* 1 könnte von dort das mongolische Hochland besiedelt haben.

Das Rätsel um die weit verbreitete *U. sphacelata* 1 kann mit den vorhandenen Mitteln nicht vollständig aufgelöst werden.

Für Clade 2-11 innerhalb 3-5 lässt sich wiederum eine „zusammenhängende Gebietsausweitung“ ableiten. Betroffen sind alle nordhemisphärischen und ecuadorianischen Individuen und hier besonders Haplotyp H9 („tip“-Clade 1-22) mit zwei Proben aus Ecuador, die sich durch eine Deletion und eine Mutation an den Positionen 882 und 883 von H5 unterscheiden. Die Argumentation geht in eine andere Richtung als in Clade 4-2, da Clade 1-21 mit dem zentralen Haplotyp H5, ein interner Clade ist, von dem aus die zusammenhängende Ausbreitung ausgeht. Dies erscheint fraglich. Man muss davon ausgehen, dass es sich bei den Haplotypen H9, H8 und H5 um eine Auswahl an Allelen des

Genpools der ecuadorianischen Populationen handelt, von denen H5 durch ein bzw. wenige Fernverbreitungsereignisse in die Nordhemisphäre verbreitet wurde. „Zusammenhängende Gebietsausweitung“ als historischer Prozess ist demnach eine falsche Interpretation.

Für Clade 1-21 innerhalb des Clades 2-11 wurde ein möglicher Fragmentations- bzw. Isolationsprozess durch Entfernung gefolgert. Dies betrifft drei Individuen von der Diskoinsel in Grönland, H17, die sich durch eine Mutation an Position 1266 (Tab. 3.6) von Haplotyp H5 abgrenzen. Das Sampling dieser Population ist zu klein, um relevante Aussagen zu treffen. Die große genetische Nähe der beiden Haplotypen spricht nicht für eine Fragmentation (siehe auch HUDSON 1990, HEY 1991). Auf der Diskoinsel kann zufällig eine Population besammelt worden sein, in der eine einzelne Mutation aufgetreten ist, die sich durch Soredien an der Sammelstelle ausgebreitet hat. Es ist aufgrund der kontinuierlichen Verbreitung in der Nordhemisphäre wahrscheinlich, dass auf der Diskoinsel auch Individuen mit der weit verbreiteten Haplotypensequenz (H5) vorkommen. LYNGE (1941) berichtet von einer starken Besiedlung der Diskoinsel und dem nördlich angrenzenden Festland und spekuliert über eine durchgängige *U. sphacelata*-Verbreitung von der Diskoinsel in Richtung Nordpol. Es handelt sich daher wohl um ein rezentes Mutationsereignis, was vielleicht einen Hinweis auf zukünftige Differenzierung in der Arktis gibt.

Das *U. trachycarpa*-Netzwerk als Ganzes betrachtet zeigte keine Aufteilung in äußere und innere Clades. Um trotzdem eine signifikante Verbindung von Haplotypen und Geographie, die für das gesamte *U. trachycarpa*-Netzwerk vorliegt, auszunutzen, wurde die zweite Modifizierung (\*\*) (Tab. 3.14) favorisiert: 4-1 als interner und 4-2 als äußerer Clade. Die Festlegung auf eine der Möglichkeiten folgte aus der Berechnung eines MJ-Gesamtnetzwerkes aller Gruppen, das Clade 3-2 (und damit 4-1) als internen Clade zu den anderen 3-Schritt-Clades zeigt.

Ausgehend von Clade 4-1, mit einem geographischen Zentrum in der Region Feuerlands, soll hier eine zusammenhängende Ausdehnung des Verbreitungsgebietes hin zu Clade 4-2, mit einem errechneten geographischen Zentrum in der Nordhemisphäre, erfolgt sein, wobei alle Individuen der *U. trachycarpa*-Gruppe als zusammenhängende Art betrachtet werden. Mit dieser Verbreitungstheorie verbundene Schwierigkeiten wurden in aller Ausführlichkeit oben diskutiert.

Die Möglichkeit relativ junger und z. T. sympatrisch vorkommender Arten, wird von der NCA nicht registriert, was den Ausführungen in TEMPLETON (2001) widerspricht. Die großen Sammellücken in dieser Gruppe könnten ein Problem darstellen und wirken möglicherweise verfälschend, sind aber bei der Ausdehnung von Arten über sehr weite Entfernungen fast

nicht zu beheben. Eine Kombination aus den aufgeführten Problemen scheint die Auflösung historischer Populationsprozesse erheblich zu erschweren. Sympatrische Artbildung ist ein theoretisch lange verkannter (biologisches Artkonzept) und praktisch schwer identifizierbarer Prozess und stellt offensichtlich auch für die NCA eine Herausforderung dar.

Bei der Verbindung morphologischer und chemischer Daten der *U. trachycarpa*-Gruppe mit dem Netzwerk tritt das Problem kleiner Individuenzahlen in Clades sehr deutlich auf (siehe Tab. 3.19). Clade 3-3 enthält nur 2 Individuen und wurde daher in jedem Kontingenztest zu dem ihm ähnlichsten Clade, 3-2, hinzugerechnet. Auch Clade 3-4 musste zum Großteil dieser Gruppe zugerechnet werden, so dass alle fertilen Individuen häufig als gemeinsame Gruppe betrachtet wurden. Dies geschah unter genauer Inspektion der Daten für die jeweiligen Clades, die in den meisten Fällen nicht signifikant voneinander abwichen. Insgesamt erscheint die Gruppe morphologisch und chemisch sehr variabel und es gibt trotz vieler signifikanter  $\chi^2$ -Werte in den Tests wenige Merkmale, die einzelne Clades eindeutig abgrenzen. Clade 3-5 (*U. sphacelata* 1) und 3-1 (*U. subantarctica*) haben im Gegensatz zu 3-4, 3-3 und 3-2 (*U. trachycarpa*) immer Sorale. Auch wenn in Clade 3-1 zum Teil Individuen mit Apothecien vorkommen, weisen diese zusätzlich Sorale auf. In den Clades 3-2 und 3-3 kommen ca. in der Hälfte der Fälle Sorale, ansonsten Apothecien vor, was darauf hinweist, dass die als fertile Art beschriebene *U. trachycarpa* (STIRTON 1881) auch sorediöse Formen aufweist. In Clade 3-4 allerdings kommen nur Individuen mit Apothecien vor. In Clade 3-5 sind Sorale in den meisten Fällen sehr häufig, gehen ineinander über und erscheinen in ca.  $\frac{2}{3}$  der Individuen auch an den Hauptästen. In den anderen Clades schwankt die Häufigkeit der Sorale zwischen punktuell vorkommend und häufig und sie befinden sich fast ausschließlich an Seitenästen und Spitzen.

Das Merkmal „Papillen“ ist im Test zwar signifikant, aber innerhalb der Gruppen sehr variabel und muss differenziert werden. In Clade 3-1 (*U. subantarctica*) kommen zumeist Individuen mit feinen, pigmentierten Papillen vor. In Clade 3-5 hingegen sind pigmentierte Papillen eher selten und die vorhandenen unpigmentierten Papillen nur zu  $\frac{2}{3}$  fein.  $\frac{1}{4}$  der Individuen hat gar keine Papillen. Die *U. trachycarpa*-Clades haben hauptsächlich unpigmentierte Papillen oder beides. Fibrillen kommen in den Clades 3-1 bis 3-4 durchgängig vor und auch in Clade 3-5 häufig. Stark ausgeprägte Fibrillen finden sich vor allem in den Clades 3-4, 3-3 und 3-2, wobei sie in 3-1 und 3-5 immer moderat sind.

Der Sekundärastansatz ist in *U. subantarctica* (3-1) bei weniger als der Hälfte der Organismen verbreitert und die Thallusbasis ist im Gegensatz zur sorediösen *U. sphacelata* 1 meist hell oder z. T. schwarz pigmentiert. Fast  $\frac{3}{4}$  der *U. sphacelata* 1 Individuen haben eine

braun gefärbte Thallusbasis. Die anderen Clades unterscheiden sich in diesem Punkt nicht von *U. subantarctica*. Die Kortexschnittfläche, die sich bei einem Längsschnitt durch den Thallus zeigt, ist zwar in der gesamten *Neuropogon*-Gruppe glänzend, aber nicht so deutlich glänzend wie bei der Hälfte aller *U. subantarctica* Individuen. Bei *U. sphacelata* 1 kann dieses Merkmal sich manchmal matt ausprägen.

Die ANOVA ergibt mit den Mittelwerten der Zentralachsendicke (in %) relativ eindeutige Ergebnisse: Clade 3-1 (*U. subantarctica*) hat mit 30.1% den niedrigsten Mittelwert, Clade 3-2 (+ 3-3) und 3-4 (*U. trachycarpa*) haben ähnliche Achsendicken mit 34.9 und 36.8% und Clade 3-5 (*U. sphacelata* 1) weicht mit 43.7% deutlich davon ab.

Die sekundären Inhaltsstoffe zeigen deutliche Muster: Clade 3-5 hat außer Dibenzofuranen in zwei von drei Proben keinerlei Inhaltsstoffe. Clade 3-4 hingegen hat durchgängig Depsidone in Form von Norstictin- und zum Teil Salazin-, sowie Quaesitinsäure. Clade 3-2 (+3-3) zeigt nur in  $\frac{2}{3}$  der Proben Depsidone in Form von Norstictin-, Salazin- und Quaesitinsäure, allerdings finden sich in diesem Clade auch einige antarktische Individuen, die nach eigenen Beobachtungen generell eher selten Sekundärstoffe ausbilden. Außerdem kommt in diesen Gruppen sporadisch Neotricon vor und Dibenzofurane zeigen sich nur bei ca.  $\frac{1}{3}$  der Proben. Clade 3-1 (*U. subantarctica*) schließlich hat charakteristischerweise Depsidone in Form von Norstictinsäure, wobei Salazinsäure fast nicht vorkommt. Auch hier neigen antarktische Individuen dazu keine Inhaltsstoffe zu bilden. Dibenzofurane sind selten.

Es wird klar, dass es bei allen Merkmalen mehr oder weniger deutliche Tendenzen hin zu den einzelnen Gruppen gibt, aber meist keine eindeutige Zuweisung getroffen werden kann. Dies kann als Zeichen für eine zusammenhängende Art gedeutet werden.

WALKER (1985) bezeichnet *U. trachycarpa* als Primärart, also fertile Ausgangsart, der sorediösen *U. subantarctica* und als leicht bestimmbar durch die braunen Apothecien. *U. trachycarpa* kommt aber offensichtlich auch als sorediöse Form vor und ist dann deutlich schwerer von *U. subantarctica* zu unterscheiden. Das ist vor allem in der Antarktis der Fall, wo beide Gruppen meist sorediös vorkommen und auch chemische Unterscheidungen vielfach nicht eindeutig sind. Die Tatsache, dass die Gruppen I, II und III der Netzwerke (Abb. 3.14 und 3.15) an den antarktischen und einigen patagonischen Standorten (Lapataia Bay, Glaciar Martial und El Chalten) nebeneinander vorkommen, aber trotzdem abgegrenzte Gruppen mit zentralen Haplotypen darstellen und das Zentrum der Gruppe I deutlich abgetrennt in den hohen Anden (El Chalten) liegt, sowie die Tatsache, dass die Haplotypen der Gruppe I im Gegensatz zur Verteilung der Gruppen II + III alle eng zusammen liegen, können auf eine abgegrenzte Art schließen lassen. Morphologisch unterscheiden sich die

Gruppen in der Farbe der Papillen, der Häufigkeit von Fibrillen, dem Sekundärastansatz, der Kortexschnittfläche sowie dem Durchmesser der Zentralachse und der chemischen Variabilität, allerdings in keinem Merkmal eindeutig. Jedoch wird die zweite Nullhypothese (TEMPLETON 2001) in vielen Merkmalen signifikant abgelehnt, was auf getrennte Arten hinweist. Peripatrische Artbildung von *U. subantarctica*, durch ein Besiedlungs- und Isolationsereignis in den hohen Anden ausgehend von *U. trachycarpa*, deutet sich an, kann aber nicht vertieft werden. Sieht man Gruppe I und auch Gruppe IV als eigenständige Arten, ist es möglich, dass innerhalb der sehr diversen, weit verbreiteten *U. trachycarpa* weitere isolierte Abstammungslinien vorhanden sind (z. B. H28, H29), die aber aufgrund unzureichendem Samplings hier nicht weiter verfolgt werden können. *U. trachycarpa* wird bis auf Weiteres als polyphyletische Art angesehen. HENDRIXON & BOND (2005) leiten aus einer ähnlichen polyphyletischen Art, die auch geographisch sehr nah zusammenliegt, einen kryptischen Artkomplex ab. Sie weisen auf die große Anzahl para- und polyphyletischer Arten hin, die in den letzten Jahren bei Pflanzen und Tieren gefunden wurden (CRISP & CHANDLER 1996, FUNK & OHMLAND 2003). Aufgrund unzureichender Daten wird in diesem Fall darauf verzichtet. Die *U. trachycarpa*-Gruppe ist im Hinblick auf Artbildung eine höchst interessante Gruppe, die durch zusätzliche Proben und weitere Standorte intensiver untersucht werden sollte.

#### B-4.2.2 Die *U. perpusilla*-Gruppe

In der *U. perpusilla*-Gruppe tritt das Problem auf, dass sehr viele Haplotypen aus nur einem Individuum bestehen (,sigletons'). Dies zeigt zum einen, dass diese Gruppe sehr divers ist, aber auch, dass das Sampling für die Gruppe zu klein ist. Es gibt wenige sternförmig und viele linear angeordnete Gruppen. Dies alles kann sich problematisch auf die Anwendung und die Ergebnisse der NCA auswirken. Eine Ausnahme bilden die Untergruppen VII und VIII (Abb. 3.16), die relativ viele Individuen umfassen, dafür aber große geographische Sammellücken aufweisen.

Die NCA-Ergebnisse deuten auf zwei mögliche Fragmentationsereignisse in der Gruppe hin. Beide historischen Populationsevents liegen innerhalb des Clades 5-1 (siehe Abb. 3.22). In beiden Fällen kann aufgrund des geographischen Samplings nicht zwischen Fragmentation oder Isolation durch Distanz unterschieden werden. Das Fragmentations- oder Isolationsereignis in Clade 4-3 betrifft die auf Bariloche beschränkte Gruppe *Usnea* sp. nov. 1 mit gelben Apothecien (Clade 3-7), die als einziger Clade signifikant kleine Distanzwerte zeigt (Abb. 3.23). Nach TEMPLETON et al. (1995) müsste bei einem Fragmentationsereignis

typischerweise auch der  $D_c$ -Distanzwert für den intern liegenden Clade 3-5 signifikant klein sein, da interne und äußere Clades bei Fragmentation gleichwertig sind. Dieser Clade enthält allerdings Individuen aus El Chalten (H22, H23) und dem weit entfernten Ecuador (H33) und ist daher nicht signifikant klein. In Clade 3-6, H24, kommen zwei weitere Individuen aus Bariloche vor, was ein Fragmentationsereignis fragwürdig erscheinen lässt. Ob es sich in diesem Fall um Fragmentation handelt, sollte auch mit Blick auf das höhere Clade-Level beantwortet werden.

Das Fragmentations- bzw. Isolationsereignis innerhalb von Clade 5-1 betrifft den gesamten Clade 4-1, der nur Individuen von Glaciar Martial (Feuerland) enthält. Ein weiteres Individuum aus Feuerland H1 steht aufgrund der ‚Nesting‘-Regeln im Nachbarclade 4-2, gehört aber geographisch zu Clade 4-1. Clade 4-1 hat einen signifikant kleinen  $D_c$ -Wert und 4-2 hätte ohne H1 auch einen signifikant kleinen  $D_c$ -Wert, da er ansonsten nur aus Individuen aus Bariloche besteht. Diese Veränderung des ‚Nestings‘ würde ein Fragmentationsereignis wahrscheinlicher machen. Für eine Fragmentation sprechen zudem die vielen Mutationsschritte, die zwischen den Untergruppen I und IV (12 Schritte), bzw. auch zwischen I und III (13 Schritte) und IV und III (11 Schritte) liegen (Abb. 3.16) (HUDSON 1990, HEY 1991). Allerdings liegen die Haplotypen innerhalb der Untergruppe I z. T. auch 13 Mutationsschritte auseinander.

Eine Unterscheidung zwischen Fragmentation oder Isolation durch Distanz ist nicht zu treffen. Die Tatsache, dass alle fertilen *U. perpusilla*-Individuen in Bariloche oder Feuerland gesammelt wurden, zusammen mit der Tatsache, dass am Standort El Chalten, auf halbem Weg zwischen Bariloche und Feuerland (siehe Abb. 3.12), keine fertilen *U. perpusilla* auftraten, macht eine Isolation und unabhängige Entwicklung durch Entfernung im 2000 km weiter südlich liegenden Feuerland gleichwohl wahrscheinlich. WALKER (1985) allerdings erwähnt fertile *U. perpusilla*-Proben aus Santa Cruz, aus der Nähe El Chaltens. Es wäre sehr interessant diese Proben zu untersuchen, um festzustellen, welchem Clade sie zugeordnet werden können. Sollten es intermediäre Proben sein, wäre von einer kontinuierlichen Ausbreitung in den Anden auszugehen und sowohl Fragmentations- als auch Isolationsereignisse, wären aufgrund des unzureichenden geographischen Samplings abzulehnen. Leider gibt es zu viele Sammellücken, um Aussagen mit großer Bestimmtheit zu treffen.

Morphologische und chemische Merkmale wurden mittels Kontingenztafeltests auf ihre Kongruenz mit den in der molekularen Analyse gefundenen Gruppen untersucht. Die Kontingenztafeltests zeigen einige signifikante Werte, die Anlass geben, die Verteilung der

einzelnen Merkmalsausprägungen in Clade 5-2 genauer zu untersuchen. Dabei ist es sinnvoll Clade 3-7 (Untergruppe III) gesondert von den Clades 3-5 und 3-6 (Untergruppe II) zu betrachten. Die Individuen in Clade 3-7 haben alle gelbe bis bräunliche Apothecien, z. T. mit schwärzlicher Einfärbung, wobei die Untergruppe II rein sorediös ist. In 4-1 kommen nur schwarze Apothecien vor, die sich von z. T. schwarz-gelblichen Apothecien in 4-2 und 4-4 abgrenzen. Clade 3-7 hat im Gegensatz zu Untergruppe II nur in einem Fall Isidiomorphe, die in Gruppe II durchweg vorkommen. Die anderen Clades zeigen keine Isidiomorphe.

Die Thallusoberflächen ist bei Individuen des Clades 3-7 sehr glatt, wodurch sich diese von den meisten nächstverwandten Individuen innerhalb des Clades 4-3 abgrenzen. Ansonsten ist das Merkmal eher variabel. Eine der Oberflächenstrukturen sind Papillen. Leider war die Kontingenzberechnung auf der 4-Schritt-Ebene nicht möglich, da die Verteilung des Merkmals es nicht zuließ. In der gesamten *U. perpusilla*-Gruppe kommen Papillen nur in Clade 4-1 vor. Hier sind sie ein beständiges Merkmal: winzig, pigmentiert oder unpigmentiert. Dies ist einer der Gründe, weshalb LAMB (1948) Proben aus Feuerland als eigenständige Forma (f. *ushuaiensis*) von *Neuropogon rohmederi* (synonym mit *U. perpusilla*) abtrennte.

Fibrillen sind in 3-5 und 3-6 des Clades 4-3 zum größten Teil sehr üppig vorhanden, wobei sie in 3-7 zwar bei der Hälfte der Individuen auftreten, aber nicht auffällig sind. Die anderen Gruppen 4-1, -2 und -4, haben beständig Fibrillen, wobei diese in Clade 4-1 häufig verstärkt an den Seitenästen auftreten. Kortexgrübchen sind nur für Clade 4-1 ein deutliches Merkmal. Sie kommen hier nur in Individuum 235-11 vor und fehlen ansonsten. In den anderen fertilen Gruppen sind Kortexgrübchen häufig (je  $\frac{2}{3}$  in Clade 4-2 und 4-4) und z. T. sehr stark ausgeprägt (in Clade 4-4). Kortexrisse kommen selten in den Clades 4-4 und 4-1 vor, aber häufig in den übrigen Clades. Interessant ist, dass sich die fertilen Clades 4-4 und 4-2, die sich eigentlich sehr ähnlich sind, durch die Form ihrer Basalteile unterscheiden. Dies konnte durch Tests leider nicht untersucht werden. 4-2 hat immer eine wuchernde, breit aufsitzende Basis, wobei 4-4 in 6 von 4 Fällen gestielte, abgesetzte Basalteile zeigt. Zudem ist die Marksicht im Thallus sehr locker strukturiert und in allen anderen Clades, außer manchen sorediösen Individuen in Clade 5-2, dicht. Zu diesem Ergebnis passt die z. T. extrem grubige Thallusoberfläche in Clade 4-4. Die Thallusbasisfarbe ist in sehr vielen Clades variable, tendiert aber immer zu braun. In Clade 3-7 ist die Ausprägung durchgängig braun und in Clade 4-4 bis auf ein Individuum durchgängig hell.

Auch die ANOVA-Ergebnisse sind in der *U. perpusilla*-Gruppe eindeutig. Die durchschnittliche Zentralachsenedicke für den gesamten Clade 4-3 liegt bei 49.3%. Teilt man

den Clade in die Untergruppen II und III (3-7) auf, erhält man einen deutlichen Unterschied von 53% für II und 47% für III. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eigenständige Gruppen. Clade 4-2 und 4-1 unterscheiden sich nicht bedeutend: 4-2 mit 36.8% und 4-1 mit 39.5%. Die Individuen in Clade 4-4 allerdings haben sehr dünne Zentralachsen mit durchschnittlich 30.5%.

Chemisch gibt es für die *U. perpusilla*-Gruppe kaum Analysemöglichkeiten, da so gut wie keine Sekundärstoffe vorkommen. Allein in den Clades 3-5 und 3-6 kommt in fünf Individuen eine unidentifizierte Substanz vor, die sich in *Neuropogon* nur in dieser Gruppe findet und nachträglich identifiziert werden muss. Zudem enthalten drei Individuen des Clades 4-1 Psoromsäure, ein Depsidon, das sich in der gesamten *Neuropogon*-Gruppe nur bei einem Individuum in Clade 4-5 (221-3a) und einer *U. trachycarpa*-Probe findet.

WALKER (1985) bewertet die Merkmale von *Neuropogon rohmederi* f. *ushuaiensis* LAMB (Clade 4-1) als morphologische Variation in *U. perpusilla* (kleine, schwarze Papillen, fast glattes Excipulum mit Strahlen, kleine Unterschiede in der Sporengroße und Hypotheciumhöhe). Obwohl die anatomischen Strukturen nicht untersucht wurden, gibt es zusätzliche morphologische Merkmale, die *Neuropogon rohmederi* f. *ushuaiensis* als eigenständige Art rechtfertigen: Die Apothecien sind niemals gelblich, Fibrillen sind häufig an den Seitenästen vorhanden, es kommen so gut wie keine Kortexgrübchen vor, die Zentralachsendicke weicht deutlich von den nächstverwandten Gruppen ab und manche Individuen enthalten Psorom als einziges Depsidon in der *U. perpusilla*-Gruppe. Zusammen mit dem Ergebnis der NCA, was zwar nicht eindeutig bewertbar ist, aber die Gruppe zumindest deutlich vom Rest der Individuen abgrenzt, kann Clade 4-1 als Art betrachtet werden.

Das gleiche gilt für den Clade 3-7. Die gelbe Apothecienfarbe ist sehr charakteristisch und Merkmale wie ein sehr glatter Thallus, mäßig viele Fibrillen und keine Isidiomorphe im Gegensatz zum Nachbarclade 3-5, ein immer bräunlicher Basalteil, eine deutlich dickere Zentralachse und das Nichtvorhandensein der unidentifizierten Substanz, sowie die geographisch abgegrenzte Region, machen es wahrscheinlich, dass eine neue Art vorliegt, die nicht im Austausch mit der sorediösen Gruppe der Clades 3-5/3-6 steht. In beiden Fällen (4-1/ 3-7) kann auch die zweite Nullhypothese (TEMPLETON 2001) aufgrund signifikanter Merkmalsverteilung abgelehnt werden, was eine Artabgrenzung unterstützt.

Clade 3-5/3-6 müsste dann auch als eigenständige sorediöse Art gesehen werden, denn die Entfernung zu Clade 4-5, der zweiten sorediösen Gruppe ist zu weit und es liegen weder

Übergangsindividuen mit Soralen und Apothecien zu den fertilen Nachbararten vor, noch legen die morphologischen und chemischen Merkmale, wie Achsendicke und Depsidon, eine konspezifische Beziehung nahe.

Die *U. perpusilla*-Gruppe in Clade 4-2 liegt zwischen den beiden abgegrenzten Arten. In wenigen Merkmalen, wie dichter Markstruktur, häufigen Annulationen, ungestielter Thallusbasis und durchschnittlich dickerer Zentralachse, hebt sie sich von Clade 4-4, der morphologisch ähnlichsten Gruppe ab. Die Gruppen kommen sympatrisch vor, bilden aber abgegrenzte Clades aus. KAUSERUD et al. (2006) entdeckten ein ähnliches Phänomen bei der weltweit verbreiteten Basidiomyceten-Art *Serpula himantoides*, in der sie drei z. T. sympatrisch vorkommende und morphologisch gleiche, aber genetisch deutlich ausgeprägte Abstammungslinien feststellen konnten. Mit Hinweisen auf weitere Studien folgern sie, dass kryptische Arten ein verbreitetes Phänomen bei Pilzen sind. In ihrer Untersuchung waren ribosomale DNA-Sequenzdaten, unter anderem ITS-Daten, kongruent mit AFLP-Daten des gesamten Genoms. FERNANDEZ et al. (2006) beschreiben zwei kryptische Moosarten, die in Kalifornien sympatrisch nebeneinander existieren, morphologisch gleich sind, aber genetisch getrennt. Die Ausweitung molekularer Studien auf Populationen und geographisch größere Flächen hat zur Folge, dass immer häufiger kryptische Arten entdeckt werden und eine ungeahnte verborgene Biodiversität deutlich wird (z. B. KROKEN & TAYLOR 2001, BOND & SIERWALD 2002, HEBERT et al. 2004). Clade 4-4 kann als kryptische Art gesehen werden.

Weitere signifikante Beziehungen zwischen Geographie und Haplotypen aus der NCA liegen in Clade 5-2 vor. Die biologische Interpretation für Clade 2-24 „Zusammenhängende Gebietsausweitung“ kann nicht zutreffen. Es handelt sich um ein ähnliches Problem, wie bei *U. sphacelata* 1. Die kontinuierliche Ausbreitung hätte sich in diesem Fall von antarktischen Standorten (Victoria Land H35, Casey Station/ Rothera H36) bis in die Cascade Mountains an der Westküste der USA (H40, H41) erstrecken müssen (siehe Abb. 3.12). Wenn man beachtet, dass die Diversität des Clades gering ist und insgesamt drei Mutationsschritte zwischen den oben genannten Haplotypen liegen, erscheint eine zusammenhängende Ausbreitung entlang der Gebirgszüge Süd-, Mittel- und Nordamerikas unwahrscheinlich. Neben H26 aus Bariloche, wurden aus dieser Gruppe keine Individuen in den hohen Anden Südamerikas gefunden, was die Interpretation weiter abschwächt. Auch wurden in den zentralen Rocky Mountains nie *Neuropogon*-Arten gefunden (IMSHAUG 1954). Die Cascade Mountains sind klimatisch von den Rocky Mountains unterschieden, da sie nah an der Küste liegen und bedeutend mehr Niederschlag aufweisen. Dies könnte ein Grund für die eingeschränkte Verbreitung sein.

Beantwortet man den NCA-Schlüssel (TEMPLETON) in der ungenau gestellten Frage 12 (Are the  $D_n$  and/or I-T  $D_n$  values significantly reversed from the  $D_c$  values?) mit „ja“, weil man die Frage auf nur einen der drei vorhandenen Clades (1-34) bezieht, kommt man zum Schluss der Fernbesiedlung mit möglicher Fragmentierung bzw. Fragmentierung mit anschließender Gebietserweiterung. Diese Interpretation der Distanzwerte macht bedeutend mehr Sinn. Fernbesiedlung, evtl. durch Vogelzug, ist die wahrscheinlichste Alternative. Die Art ist möglicherweise relativ rezent aus der kontinentalen Antarktis oder einem Standort in Südamerika in die Nordhemisphäre verschleppt worden und konnte sich in den Cascade Mountains ansiedeln. Eine anschließende Fragmentierung ist auszuschließen, da die betroffenen Haplotypen H40 und H41 nur durch einen Mutationsschritt an Position 265 voneinander getrennt sind. Ob durch die isolierte Geographie der Cascade Mountains im Laufe der Zeit eine größere genetische Isolation eintreten kann, kann nicht erörtert werden.

Die nächsthöheren signifikanten Distanzwerte liegen in Clade 4-5, der die Clades 3-12 und 3-13 (Untergruppen VI, VII und VIII in Abbildung 3.16) miteinander vereint. Es wird ein rezenter Prozess, eingeschränkter Genfluss mit Isolation durch Distanz, vom internen Clade 3-12 Richtung ‚tip‘-Clade 3-13 gefolgert (Abb. 3.20). Beide Clades überschneiden sich an drei Standorten (Alexander Island, Adelaide Island und Bariloche). Clade 3-13 hat zusätzlich zwei Individuen aus Ecuador (H8, H32). Isolationseffekte können sich zum einen auf den ecuadorianische Standort beziehen und zum anderen auf eingeschränkten Genfluss zwischen Clade 3-13 und den kontinental antarktischen und nordhemisphärischen Individuen in Clade 3-12 hinweisen. Vor allem eingeschränkter Genfluss zwischen den kontinental antarktischen und maritim antarktischen Standorten erscheint plausibel, da die Populationen in gegenüberliegenden Teilen der Antarktis mindestens 4000 km voneinander entfernt liegen. Genetischer Austausch zwischen Patagonien und der Antarktis scheint bedingt stattzufinden, da sich zwei Haplotypen dieser Regionen überschneiden. Ob die Clades 3-12 und 3-13 im Begriff sind sich voneinander zu isolieren ist unklar.

Im Clade 5-2 wird erneut von einer zusammenhängenden Gebietsausweitung, diesmal von Clade 4-4 (fertil) in Richtung 4-5 (sorediös), ausgegangen. Dies würde eine weit zurückliegende historische Verbreitung der zumeist fertilen Gruppe in Patagonien mit Ausweitung in die Antarktis andeuten. Dieser Prozess widerspricht der rezenteren Fernverbreitung in die Nordhemisphäre nicht (Clade 2-24; siehe oben). Abgesehen von dem Problem der kontinuierlichen Gebietserweiterung über mehr als 1000 km südliches Polarmeer, welches in der nächsten Gruppe (B-4.2.3) ausführlich diskutiert wird, ist eine weitreichende (Wieder)-Besiedlung der Antarktis durch Kryptogamen nach der letzten

Eiszeit mittlerweile wissenschaftlicher Konsens (siehe z. B. GALLOWAY 1991, ØVSTEDAL & LEWIS SMITH 2001, KAPPEN 2004). Diese Annahme ist weitgehend durch die große Anzahl bipolarer und kosmopolitischer Flechtenarten und -gattungen in der Antarktis, sowie durch Untersuchungen von Windverbindungen der Südhemisphäre (MUÑOZ et al. 2004) und aerobiologische Beprobungen (MARSHALL 1996b) begründet. Die Frage ist nun, ob die Vorfahren des Clades 4-4 antarktische Gebiete besiedelt und dort eine hauptsächlich sorediöse Verbreitungsstrategie entwickelt haben könnten? WALKER (1985) gibt bei der Diskussion der fertilen „Ausgangsart“ für *U. sphacelata* *U. perpusilla* als wahrscheinlichste Art an. In beiden Clades kommen je zwei Individuen mit Soralen und Apothecien vor (Clade 4-4: H2 und H46, Clade 4-5: H13 und H38), was einen Hinweis auf eine derartige Entwicklung geben könnte. Die Apothecien dieser Individuen sind sehr ähnlich, zumeist schwarz-gelblich und mit Strahlen am Apothecienrand (siehe Abb. 3.2: h). Sorediöse und fertile Formen der beiden Gruppen kommen am selben Standort in Bariloche vor, scheinen sich aber dort nicht zu vermischen. Dies kann an den weitgehend unterschiedlichen Reproduktionsformen liegen. Ob dies ein realistisches Szenario ist, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht weiter belegen. Folgende morphologische Übereinstimmungen lassen sich finden: In Clade 4-5 haben fast 50% der Individuen eine lockere Markstruktur, wie sie ansonsten nur in Clade 4-4 vorkommt, es kommen in beiden Clades selten Kortextrisse und zumeist braune Basalteile, sowie keine Papillen vor. 6 Individuen aus Clade 4-5 haben, wie 50% des Clades 4-4, eine gestielte Basis. Die durchschnittliche Zentralachsendicke liegt im Clade 4-4 bei 30.5% und in Clade 4-5 bei 37.5%. Chemisch gesehen gibt es kaum Unterschiede: Dibenzofurane kommen jeweils zu ca. 50% vor.

Die Verteilung der Merkmale reicht nicht aus die Theorie zu bekräftigen oder abzuschwächen. Zur Aufklärung des Problems müssen Untersuchungen an weiteren Standorten und von weiteren Individuen gemacht werden. Die Interpretation der NCA-Ergebnisse legt eine Auftrennung der beiden Gruppen nicht nahe, da genetischer Austausch zwischen den beiden Clades nicht ausgeschlossen werden kann.

Da es sich in der *U. perpusilla*-Gruppe ganz offensichtlich um mehrere Arten handelt, die z. T. sympatrisch nebeneinander existieren, wird davon abgesehen die NCA-Ergebnisse für das gesamte Kladogramm zu diskutieren, da keine Fragmentierungsereignisse angezeigt werden.

Wie bei *U. trachycarpa* zeigen auch in der *U. perpusilla*-Gruppe die fertilen Individuen eine höhere genetische Variabilität, z. B. in den Untergruppen I, IV und V. Die Haplotypen aller sorediösen Gruppen erscheinen näher verwandt und stärker sternförmig um häufig sehr weit

verbreitete, interne Haplotypen zentriert. Es wird deutlich, dass die vegetative Verbreitung selbst über sehr weite Strecken effizienter zu sein scheint. Sorediöse „Arten“ sind über tausende Kilometer hinweg verbreitet und genetisch sehr ähnlich, wobei die fertilen Individuen begrenzte Verbreitungsgebiete, gekoppelt mit einer großen Variabilität aufweisen. Dieses Muster trifft nicht auf die *U. aurantiaco-atra*-Gruppe zu, die im Folgenden besprochen wird. Fertile Individuen sind hier zwar auch auf kleinere Gebiete begrenzt, aber insgesamt eher weniger variabel als die Gruppe sorediöser Individuen.

#### B-4.2.3 Die *U. aurantiaco-atra*-Gruppe

In der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe treten bei der regulären statistischen Analyse der Verknüpfung von Haplotypenverbreitung und Geographie keine historischen Fragmentationsereignisse auf, so dass eine Aufspaltung des Artkomplexes in mehrere Arten nicht unterstützt ist. Erst bei der Modifizierung der höchsten Clade-Ebene (siehe Tab. 3.18) kann man auf Fragmentationsprozesse rückschließen. Eine Unterscheidung zwischen internen und ‚tip‘ Clades auf dem höchsten Clade-Level der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe zu treffen und damit Modifizierung 1 (\*) oder 2 (\*\*) zu favorisieren ist nicht trivial, da die erstellten Netzwerke (Abb. 3.18 und 3.19) unterschiedliche Topologien aufzeigen. Im SP-Netzwerk ist Clade 3-2 der zentrale Clade, von dem auch Clade 3-3 und damit 3-4 abzweigen. Im MJ-Netzwerk dagegen erscheint die *U. acromelana*-Gruppe (Clade 3-4) gleichweit entfernt von Clade 3-1 und Clade 3-2. Die Untergruppe IV (Clade 3-3) hat hier keine enge Verbindung zur *U. acromelana*-Gruppe. *U. acromelana* kann dadurch aber auch nicht automatisch als Wurzel des *U. aurantiaco-atra*/*U. antarctica*-Komplexes und damit als interner Clade gesehen werden. Im Gegenteil, erscheinen die beiden Gruppen in einem gemeinsamen MJ-Netzwerk aller Großgruppen als gleichwertig von einem individuenfreien Zentrum auszugehen und auch im kombinierten phylogenetischen Baum handelt es sich um gleichwertige, unterstützte Schwestergruppen. Somit müssen beide Clades als ‚tip‘-Clades angesehen werden. Spielt man beide NCA-Modifizierungen durch, kommt man aber zu demselben Ergebnis. Dies wird im Folgenden ausgeführt.

Aus der zweiten Modifizierung (\*\*; 4-1 als interner und 4-2 als äußerer Clade) der NCA wird der Rückschluss auf „Fernbesiedlung mit möglicher anschließender Fragmentierung *oder* vergangener Fragmentierung mit anschließender Gebietsausweitung gezogen“. Bezieht man bei der ersten Modifizierung (\*) TEMPLETONS Schlüssel in Frage 12 auf nur einen der beiden Clades (4-2), wie auch schon in der *U. perpusilla*-Gruppe erfolgreich durchgeführt, kommt man zum gleichen Schluss „Fernbesiedlung *oder* Fragmentierung“. Dies würde bei beiden

Modifizierungen bedeuten, dass Clade 4-2, bzw. seine Unterclades 3-3 und 3-4 möglicherweise aus Fernbesiedlung mit Fragmentierung *oder* durch Fragmentierung und Gebietsausweitung hervorgegangen sind, da für 4-2 jeweils signifikant kleine  $D_c$ - und signifikant große  $D_n$ -Distanzen auftreten (Koaleszenz-Theorie nach TEMPLETON et al. 1995). Bei Clade 3-4 handelt es sich um *U. acromelana*, die bisher als eigenständige Art gesehen wurde.

Morphologische und chemische Merkmale unterstützen die Gruppe (Tab. 3.21). Es gibt einige signifikante Merkmale, die den Clade 3-4 innerhalb der 3-Schritt-Clades (eingeschlossen Clade 3-3) der *U. aurantiaco-atra*-Gruppe charakterisieren. Es kommen niemals Apothecien aber immer Sorale vor und diese sind fast ausschließlich an Seitenästen und Spitzen zu finden. *U. acromelana* zeigt niemals deutliche Papillen, konträr zu den Individuen in den restlichen Clades. Alle *U. acromelana*-Individuen haben überall häufige ringförmige Kortextrisse, im Gegensatz zu den anderen Individuen, die nur z. T. Wachstumsrisse an Hauptästen aufweisen. Sekundäräste können bei *U. acromelana* zur Basis hin verschmälert sein, was auf die restliche *U. aurantiaco-atra*-Gruppe niemals zutrifft. Das Wachstum von *U. acromelana* ist zudem mehr oder weniger monopodial, im Gegensatz zu den reich und dichotom verzweigten *U. aurantiaco-atra* und *U. antarctica*. Die ANOVA zeigt, dass sich die Achsendicken im Clade 3-4 (Mittelwert 53.7%) signifikant vom Rest der Gruppe (Mittelwerte zwischen 66.3 und 68.9%) unterscheiden (Tab. 3.22 und Anhang 4). Die Sekundärstoffe in *U. acromelana* sind auf Depsidone in der Paarung Salazin- und Norstictinsäure beschränkt, die immer vorhanden sind. Norstictinsäure kommt in den anderen Clades niemals vor, wogegen Quaesitin- und (Fumar)-Protocetrarsäure sowie Dibenzofurane häufige Inhaltsstoffe sind. Die chemische Beschaffenheit ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal bei dieser Artabgrenzung, weil die meisten morphologischen Merkmale deutliche Tendenzen zeigen aber nicht 100%ig einer der Gruppen zuzuschreiben sind. Trotz der uneindeutigen NCA-Ergebnisse werden diese Fakten als deutliche Hinweise auf eine unabhängige Abstammungslinie gesehen und der Clade 3-4 damit als eigenständige Art, *U. acromelana* gewertet.

Auf den niedrigeren Clade-Ebenen gibt es zwei weitere Clades mit signifikanten Distanzwerten, die Rückschlüsse auf rezente Populationsprozesse zulassen. Beide Clades, 4-1 und 3-2, betreffen den *U. aurantiaco-atra*/*U. antarctica*-Komplex. Die Distanzwerte weisen in beiden Fällen auf eingeschränkten Genfluss bzw. eingeschränkte Verbreitung mit Isolation durch Distanz hin. Im Falle von Clade 4-1 erscheint eingeschränkter Genfluss bzw. eingeschränkte Verbreitung zwischen Clade 3-2, mit patagonischen, maritim antarktischen

und auch zwei Individuen der Falkland und Süd-Orkney-Inseln, und dem rein antarktischen Clade 3-1 sehr realistisch. Das geographische Zentrum des Clades 3-2 liegt bei 57°S und damit etwas südlich von Feuerland, wobei das Zentrum des Clades 3-1 bei 65°S, zwischen nördlicher und südlicher maritimer Antarktis liegt. Zwischen diesen beiden Daten liegen ca. 1200 km südliches Polarmeer, was ein deutliches Verbreitungshindernis darstellt. Einige Haplotypen, z. B. H21, H23 und H8 vereinen Individuen aus Feuerland und der maritimen Antarktis. Verbreitung über große Distanzen und über den Ozean muss also bei *Usnea* möglich sein und wird durch die Ergebnisse der NCA nahegelegt. MUÑOZ et al. (2004) untersuchten Windsysteme in der Südhemisphäre und kamen zu dem Ergebnis, dass floristische Ähnlichkeiten der südhemisphärischen Kontinente und Inseln stark mit bestehenden Windverbindungen korrelieren. Durch eine aerobiologische Untersuchung in der maritimen Antarktis belegte MARSHALL (1996b), dass bei bestimmten Wetterlagen eine große Menge biologischen Materials bestehend aus Pollen und Sporen die 1500 km-Strecke zwischen Kap Horn und den maritim antarktischen Inseln durch Wind überwinden kann. Diese Wetterlagen treten mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,5x/Jahr auf und bieten somit ausreichend Gelegenheit zum periodischen Auffrischen der maritim antarktischen Genpools mit südamerikanischen Sporen. Soredien sind größere Verbreitungseinheiten als Sporen (bei *Neuropogon* zumeist ca. 35-45µm ↔ 6-10µm) und werden daher weniger weit getragen (MARSHALL 1996a). Ob Soredien über diese Distanzen via Wind transportiert werden können ist nicht nachgewiesen. Starke Winde, die in umgekehrter Richtung von der antarktischen Halbinsel in Richtung Südamerika verlaufen und Material transportieren könnten, sind im Vergleich zu den oben genannten Wetterlagen selten oder fast nicht vorhanden (Dr. P. KNIPPERTZ, Univ. Mainz, pers. Mitteilung). Dies könnte ein Grund für die abweichenden Haplotypen in Clade 3-1 sein.

Es ist zu vermuten, dass die Individuen in der Antarktis durch die große Distanz unidirektional isoliert sind und sich dort neu entstehende Mutationen ansammeln und ausbreiten können. Die Haplotypen in Clade 3-1 werden ausschließlich aus sorediösen Individuen, in wenigen Fällen mit zusätzlichen Apothecien, zusammengesetzt. MARSHALL (1996a) konnte zeigen, dass Soredien in der maritimen Antarktis die weitaus effektiveren und von Temperatur, Feuchtigkeit und Windstärke unabhängigeren Fortpflanzungseinheiten darstellen. Ausbreitungsdistanzen von bis zu 50 m durch Wind sind keine Seltenheit. Zudem ist eine Verbreitung via Ascosporen unter klimatisch schwierigen Bedingungen nachteilig, da sie von der Verfügbarkeit und dem unabhängigen Überleben beider Symbionten abhängt. Höherer Umweltstress begünstigt daher vegetative Fortpflanzungsformen vor sexuellen

(SMITH 1984). Es ist möglich, dass sich der *U. aurantiaco-atra*/*U. antarctica*-Komplex in der Antarktis hin zu sorediösen Formen entwickelt hat, die sich effektiver ausbreiten können und vor allem auch in klimatisch extreme Gebiete wie die kontinentale Antarktis vordringen konnten. Eine mögliche Ausbreitungshilfe innerhalb der Antarktis sind Vögel, die an den Küsten in Massen auftreten und selbst abgelegene, eisfreie Gebiete im Inland besiedeln. So brütet der Schneesturmvogel (*Pagodroma nivea*) nicht nur an den antarktischen Küsten, sondern ist z. T. mehrere hundert Kilometer landeinwärts an freiliegenden Bergrücken zu finden. BAILEY & JAMES (1979) liefern die Grundlage für diese Theorie durch ihre Funde von Flechtenmaterial an Albatrosfüßen.

Dass die Wiederbesiedlung des antarktischen Kontinents nach der Eiszeit durch oben erwähnte Prozesse stattgefunden hat, kann hier nur vermutet werden. Der große Anteil endemischer Arten in kontinental antarktischen Gebieten (44% der vorkommenden Arten) (ØVSTEDAL & LEWIS SMITH 2001) legt allerdings ein zusätzliches Überdauern der Eiszeit in abgelegenen, eisfreien Regionen nahe.

Der letzte Clade, den es zu interpretieren gilt, ist der Clade 3-2, der in der NCA keinen signifikanten  $\chi^2$ -Wert aufwies, aber drei signifikante Distanzwerte zeigte und daher analysiert wurde. Das Signifikanzmuster konnte als eingeschränkter Genfluss mit Isolation durch Distanz bzw. eingeschränkter Verbreitung durch Distanz innerhalb des Clades identifiziert werden. Dies betrifft Clade 2-5, dessen Individuen allerdings aus den gleichen Populationen stammen wie die des zentralen Haplotyps H21 (Clade 2-4), mit dem Clade 2-5 in direktem Kontakt steht. Hier handelt es sich demnach offensichtlich nicht um einen Fall von geographischer, sondern genetischer Isolation. Die Gründe für diese Isolation können nicht rekonstruiert werden, und da es sich um kein signifikantes Ergebnis handelt, wird von einer weiteren Diskussion abgesehen.

Die biologische Interpretation der NCA im Falle der Clades 3-1 und 3-2 ist eine konspezifische Art: *U. aurantiaco-atra*/*U. antarctica*. Die Topologie des MJ-Netzwerkes legt nahe, dass Clade 3-3 zu dieser konspezifischen Art gehört oder zumindest nicht begründet abgegrenzt werden kann. Das Ergebnis wird auch durch morphologische und chemische Daten widerspiegelt, die zwischen den beiden Clades und auch Clade 3-3 z. T. signifikant variieren, aber niemals ausschließlich sind. Verschiedene Merkmalsausprägungen werden in diesem Fall als infraspezifische Variabilität und ökologische Anpassung an (klimatisch) unterschiedliche Habitate gewertet. Schon WALKER (1985) hat eine Konspezifität der beiden Arten aus morphologischen und chemischen Merkmalen gefolgert. Apothecien und Sorale kommen in allen drei Gruppen in unterschiedlicher Anzahl vor, wobei

die meisten fertilen Individuen in Clade 3-2 zu finden sind. Isidiomorphe sind in Clade 3-1 selten, in 3-2 relativ häufig und 3-3 wieder selten. Papillen und ein zylindrischer bis verbreiteter Sekundärastansatz kommen in allen drei Gruppen durchgängig vor. Fibrillen kommen ca. bei der Hälfte der Individuen im antarktischen Clade vor, sind aber in Clade 3-2 und 3-3 sehr ausgeprägt. Kortexgrübchen kommen nur in Clade 3-3 selten vor, stellen aber aufgrund statistischer Mängel kein gutes Merkmal dar. Kortexrisse sind insgesamt selten und zumeist wachstumsbedingt. Die ANOVA zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Zentralachsendicke. Bei den chemischen Inhaltsstoffen gibt es eine charakteristische Verteilung: im antarktischen Clade sind alle Depsidone eher selten und Dibenzofurane bei der Hälfte der Individuen vorhanden, im gemischten Clade 3-2 sind Depsidone bei ca.  $\frac{3}{4}$  der Individuen vorhanden und Dibenzofurane bei nur  $\frac{1}{3}$ . Und in Clade 3-3 kommen bei 100% der Individuen Depsidone vor. Die Verteilung der Merkmale, vor allem der chemischen Inhaltsstoffe kann als Umweltanpassung an die jeweiligen Bedingungen gedeutet werden. Allgemein konnte bei der *Neuropogon*-Gruppe eine Konzentration sekundärstoffbildender Individuen/ Arten in Patagonien und eine geringe chemische Variabilität in der Antarktis festgestellt werden. Möglicherweise wirken die extremen Umweltbedingungen hemmend auf die Ausbildung von Sekundärstoffen.

Allgemein fällt bei der Berechnung der Signifikanzwerte für die Distanzen der NCA auf, dass die Relationen zwischen den Distanzwerten, nicht aber ihre absoluten Größen entscheidend sind, wodurch Distanzangaben von z. B. 5000 km und mehr signifikant klein erscheinen können. Ein großes Defizit der NCA ist die daraufhin auftretende Missachtung der Geographie der Erde. Aus diesem Grund wird z. B. der eher unwahrscheinliche Materialaustausch über den tropischen Gürtel der Erde hinweg oder auch die Überquerung von weiten Ozeanstrecken nicht in Frage gestellt und unreflektiert als möglicher Ausbreitungsweg angenommen.

Es wird deutlich, dass die Nested Clade Analyse bei gut besammelten Populationen, wie der *U aurantiaco-atra*-Gruppe, durchaus in der Lage ist Populationsprozesse zu erkennen. Besonders bei lückenhaften Aufsammlungen, mit wenigen, aber genetisch diversen Individuen, wie in den beiden anderen Gruppen, führt die Interpretation des Schlüssels zu offensichtlich falschen biologischen Rückschlüssen. Eine Mischung aus großen geographischen Distanzen und nicht-flächendeckender Besammlung ist daher keine gute Voraussetzung für eine NCA. Zudem sind die Fragen z. T. nicht eindeutig gestellt und es können bei unterschiedlicher Beantwortung, wie bei Frage 12, völlig andere Ergebnisse

erzielt werden. Man muss auch in Betracht ziehen, dass die NCA in den letzten Jahren mehr und mehr Kritik auf sich gezogen hat (z. B. KNOWLES & MADDISON 2002, KNOWLES 2003, PRINTZEN et al. 2003, BOWIE et al. 2004) und der zur Verfügung stehende Schlüssel immer wieder neu diskutiert und überarbeitet wurde (TEMPLETON et al. 1995, TEMPLETON 1998, TEMPLETON 2004, und die neuste Version). Zukünftige Versionen werden vielleicht sensibler mit sehr weit verbreiteten und lückenhaft besammelten Populationen umgehen, z. B. auch durch rigoroseres Anzeigen von Sammellücken, und möglicherweise auch Artgrenzen besser erfassen. Die Ergebnisse können allerdings immer als Grundlage für Diskussionen über realistischere Populationsereignisse herangezogen werden. Wichtig ist, wie bei jeder Methode, dass die Ergebnisse kritisch wahrgenommen und hinterfragt werden. In zukünftigen Studien könnten die NCA-Ergebnisse durch Vergleichsprüfungen und statistische populationsgenetische Untersuchungen, wie ‚Mismatch Distributions‘ und ‚Neutrality Tests‘ zur Berechnung demographischer Prozesse in Populationen, überprüft werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit zeitlich leider nicht möglich.

## 4. Schlussfolgerungen

Diese Arbeit stellt die erste kombinierte phylogenetische und phylogeographische Untersuchung einer nah verwandten Flechtengruppe unter Berücksichtigung molekularer, morphologischer und chemischer Daten dar. Im Verlaufe von drei Kapiteln wurde die 15 Arten umfassende *Neuropogon*-Gruppe analysiert. In Kapitel 2 wurde die phylogenetische Stellung und Abgrenzung der Gruppe innerhalb der Gattung *Usnea* untersucht. Anschließend folgte eine phylogenetische Artabtrennung unter Berücksichtigung monophyletischer Abstammungslinien innerhalb der *Neuropogon*-Gruppe (Kapitel 3-A). Und zuletzt wurden historische Populationsprozesse und die daraus resultierende Ableitung von Artgrenzen unter Zuhilfenahme morphologischer und chemischer Merkmale diskutiert (Kapitel 3-B). Kapitel 4 umfasst eine Zusammenfassung der Ergebnisse, eine Zusammenführung der beiden Argumentationslinien zur Artabgrenzung und die daraus resultierenden taxonomischen Konsequenzen für die *Neuropogon*-Gruppe.

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Flechtengattung *Usnea* ist eine weltweit verbreitete, artenreiche Gruppe mit morphologisch z. T. sehr variablen Arten, die anhand morphologischer und chemischer Daten über Jahrzehnte hinweg in variierende Untergruppen eingegliedert oder aber in separate Gattungen abgespalten wurden. Mit dem Einsatz molekularer Daten konnte in den letzten Jahren eine Monophylie der gesamten Gattung *Usnea* und die Gliederung in drei Untergruppen festgestellt werden, die als Untergattungen klassifiziert wurden: *Usnea*, *Dolichousnea* und *Eumitria*. Die Untergattung *Usnea* wurde weiterhin in die Sektionen *Neuropogon* und *Usnea* untergliedert (OHMURA 2002, OHMURA & KANDA 2004). ARTICUS (2004b) zog aus ihren molekularen Untersuchungen der Gattung taxonomische Konsequenzen und erhob die drei Untergattungen sowie *Neuropogon* in den Gattungsstatus. Dabei wurde die neu umgrenzte Gattung *Usnea* paraphyletisch, da die Gattung *Neuropogon* in ihr clusterte. *Neuropogon* grenzt sich morphologisch vorrangig durch das Vorhandensein einer schwarzen Thalluspigmentierung und dunkler Apothecienscheiben und zudem durch die polar-alpine, südhemisphärische Verbreitung von der Gattung *Usnea* ab. WALKER (1985) stellte anhand morphologischer und chemischer Analysen Vermutungen zur systematischen Gliederung der *Neuropogon*-Gruppe an und zog daraus taxonomische Schlüsse. Seitdem werden 15 Arten innerhalb der Gruppe akzeptiert, die sich z. T. nur aufgrund ihrer Reproduktionsmechanismen und der Verbreitung voneinander unterscheiden. Andere Arten

sind sympatrisch, aber morphologisch und chemisch deutlich voneinander getrennt. Unter den beschriebenen Arten ist eine bipolare Art, *Usnea sphacelata*, die in beiden Polarregionen zirkumpolar vorkommt und zusätzliche Vorkommen in den hohen Anden zeigt. Molekular wurde die *Neuropogon*-Gruppe bisher noch nicht sehr intensiv untersucht.

In Kapitel 2 dieser Arbeit wurde die Stellung der *Neuropogon*-Gruppe innerhalb der Gattung *Usnea* und das bestehende Gattungskonzept überarbeitet. 50 ITS-DNA-Sequenzen von 12 *Neuropogon*-Arten wurden neu gewonnen und zusammen mit 74 ITS-Sequenzen von 29 weiteren *Usnea*-Arten anhand mehrerer phylogenetischer Methoden analysiert. Es konnten erstmals Arten berücksichtigt werden, die von WALKER (1985) als *Neuropogon* s. lat.-Arten bezeichnet wurden, *U. acanthella*, *U. durietzii* und *U. patagonica*. Diese vegetativ reproduzierenden Arten zeichnen sich durch eine weniger starke Thalluspigmentierung aus. *Neuropogon* erschien in allen phylogenetischen Bäumen als paraphyletisch, gegliedert in 1) eine Kerngruppe, die innerhalb der Untergattung *Usnea* als Schwestergruppe zur Sektion *Usnea* stand, 2) eine neue *Neuropogon*-Art aus Peru, *Usnea* sp. nov. 2, die basal zur Sektion *Usnea* war und 3) die Arten *U. acanthella* und *U. durietzii* mit unaufgelöster Verwandtschaft innerhalb der Untergattung *Usnea*. Die *Neuropogon* s. lat.-Art *U. patagonica* und auch eine Gruppe von geographisch abweichenden *Neuropogon*-Individuen aus Neuseeland waren basaler Teil der Kerngruppe. Eine Monophylie *Neuropogons* konnte durch einen Hypothesentest abgelehnt werden. Die Thalluspigmentierung stellte sich als ungeeignetes Merkmal zur Charakterisierung einer monophyletischen *Neuropogon*-Gruppe heraus. Es handelt sich hier wahrscheinlich um eine Umweltsanpassung an extreme klimatische Bedingungen. Auch das Merkmal „dunkle Apothecienscheiben“ war innerhalb der Gruppe nicht konstant, wie durch den Fund einer *Neuropogon*-Art mit gelben Apothecien, *Usnea* sp. nov. 1, gezeigt werden konnte, die in die Kerngruppe fiel. Dementsprechend wurde eine Synonymisierung *Neuropogons* mit *Usnea* vorgeschlagen und die Gattung *Usnea* (inkl. der Untergattungen *Usnea*, *Dolichousnea* und *Eumitria*) wieder in ihrem traditionellen Rahmen anerkannt. In diesem, auf die Umgrenzung der *Neuropogon*-Gruppe zielenden Teil der Arbeit, konnte trotz des eingeschränkten Taxonsamplings bereits gezeigt werden, dass die *Neuropogon*-Kerngruppe aus sehr nah verwandten Arten besteht, die z. T. nicht voneinander abgegrenzt werden konnten. So bildeten z. B. vier *U. aurantiaco-atra* und fünf *U. antarctica*-Individuen einen unterstützten Clade, aber die Verwandtschaft untereinander war unklar. Weitere Arten waren paraphyletisch und standen basal zu anderen Arten.

In Kapitel 3-A dieser Arbeit wurde die molekulare Untersuchung daher innerhalb der *Neuropogon*-Gruppe ausgeweitet und die Anzahl der Proben und der untersuchten Gene

deutlich erhöht. Phylogenetische Analysen von drei Genen (ITS, IGS und RPB1), mit bis zu 400 Individuen pro Gen, wurden unabhängig voneinander durchgeführt, um das Auflösungsvermögen eines jeden Gens zu untersuchen und die Datensätze, mit dem Ziel der Kombinierbarkeit, auf ihre Kongruenz zu überprüfen. Die Analysen der Datensätze zeigten weitgehend kongruente Topologien. In allen Topologien konnte ähnlich wie in Kapitel 2 eine Untergliederung in eine nah verwandte Kerngruppe und davon abgetrennte, meist eindeutig monophyletische Arten, die als Außengruppe zusammengefasst wurden, festgestellt werden. Zu dieser Außengruppe gehörten die Arten *U. acanthella*, *U. durietzii*, *Usnea* sp. nov. 2, *U. patagonica* und eine neuseeländische Gruppe, bestehend aus den Arten *U. ciliata* und *U. subcapillaris*. Sowohl im ITS- als auch im IGS-Phylogramm wurde deutlich, dass die morphologische Zuordnung von Proben zu bestimmten Arten, besonders auffällig bei *U. sphacelata*, häufig nicht mit den Aussagen der molekularen Analysen übereinstimmten. Vermeintliche Arten bildeten mehrere, unabhängige, z. T. monophyletische und weit voneinander entfernte Gruppen aus. Die Analyse des proteincodierenden Gens RPB1 zeigte eine geringere Auflösung und neben den Außengruppen-Arten wurde nur eine zusätzliche Gruppe unterstützt. Der Unterschied in der Auflösung wurde durch eine nicht abgeschlossene Auftrennung der Abstammungslinien („lineage sorting“) der nah verwandten Arten im RPB1-Gen erklärt. In proteincodierenden Genen ist die Evolutionsrate im Allgemeinen niedriger als in nicht-codierenden Spacerbereichen wie der IGS und ITS.

Vor der Kombination der drei Genfragmente wurden alle inkongruenten und unvollständig sequenzierten Individuen aus den Datensätzen entfernt. Schließlich konnten je drei Genfragmente von 308 Individuen miteinander kombiniert werden. Dieser Datensatz war die Grundlage für alle weiteren Untersuchungen (auch für Kapitel 3-B). In Kapitel 3-A wurde er einer Bayes'schen, Neighbor-joining (NJ) und Maximum-Parsimony (MP) Analyse unterzogen. Die kombinierten Analysen brachten die bestaufgelösten Topologien hervor, die sich weitgehend entsprachen. Eine Aufteilung in die bereits erwähnte Außengruppe und drei weitere nah verwandte, größere Gruppen konnte erneut gezeigt werden. Innerhalb dieser drei Gruppen bildeten verschiedene sorediöse Taxa mit je einer der drei in Südamerika vorkommenden, fertilen Arten, *U. trachycarpa*, *U. perpusilla* und *U. aurantiaco-atra*, nah verwandte Artkomplexe. Die *U. trachycarpa*-Gruppe umfasste neben der fertilen Art, die sich in zwei unabhängige Clades aufspaltete, auch einen *U. subantarctica*-Clade und eine *U. sphacelata*-Gruppe mit allen arktischen Proben, Proben aus Ecuador und Patagonien. Die *U. perpusilla*-Gruppe gliederte sich in fünf monophyletische und einen paraphyletischen Clade: auch hier kam eine sorediöse bipolare *U. sphacelata*-Gruppe, mit allen antarktischen, nord-

amerikanischen und weiteren ecuadorianischen und patagonischen Proben vor, weiterhin drei fertile *U. perpusilla*-Clades, basal dazu ein Clade mit Individuen mit gelben Apothecien und eine weitere sorediöse Gruppe. Die *U. aurantiaco-atra*-Gruppe enthielt neben gemischt auftretenden *U. aurantiaco-atra*- und *U. antarctica*-Proben auch *U. acromelana*-Individuen, beide Gruppen in gut unterstützten, monophyletischen Clades. Mit Hilfe der WP-Methode (WIENS & PENKROT 2002) wurden die einzelnen phylogenetischen Gruppen in einem kombinierten Bayes'schen Baum, unter Berücksichtigung der Unterstützungswerte der MP- und NJ-Analysen, bewertet. Diese Ergebnisse werden in Verbindung mit den Ergebnissen der phylogeographischen Untersuchung im nächsten Unterkapitel (4.2) zusammengefasst.

In Kapitel 3-B wurde der Gesamtdatensatz in die drei nah verwandten Gruppen *U. trachycarpa*, *U. perpusilla* und *U. aurantiaco-atra* unterteilt und diese jeweils unabhängig voneinander in statistischen ‚Parsimony‘- sowie Median-joining Netzwerken dargestellt und analysiert. Netzwerke berücksichtigen die, innerhalb von Arten und zwischen nah verwandten Arten vorkommenden, retikulären Populationsstrukturen und liefern eine angemessenere Form der Darstellung. Jedes vorkommende Allel eines Datensatzes wurde in Form eines Haplotypen-Kreises mit seinen Verbindungen zu anderen Haplotypen dargestellt. Die genetische Haplotyp- und Nukleotiddiversität zeigte zwischen den nordhemisphärischen und südhemisphärischen Populationen in der *U. trachycarpa*- und *U. perpusilla*-Gruppe deutliche Unterschiede. Während die Diversitätswerte in der Nordhemisphäre extrem gering waren, was auf sehr einheitliche, fast klonartige Populationen und Proben hinweist, waren diese in Patagonien und den maritim antarktischen Inseln sehr hoch.

Für jede der Gruppen wurde eine Nested Clade Analyse (NCA, TEMPLETON et al. 1987, 1995) durchgeführt, um historische und demographische, also rezente, Populationsprozesse auf der intra-interspezifischen Schnittstelle innerhalb und zwischen Arten aufzudecken. Die NCA machte jeweils relativ deutlich, wie nah verwandt die *Neuropogon*-Arten miteinander sind und wie relativ rezent demnach die Aufspaltungen in isolierte Arten sein müssen. Da viele Arten bzw. Abstammungslinien im gesamten Verbreitungsgebiet, vor allem in Südamerika und der maritimen Antarktis, sympatrisch nebeneinander vorkommen, konnten aus den berechneten Distanzwerten der NCA nur wenige zurückliegende Fragmentationsereignisse von Populationen abgeleitet werden. Diese sind für eine sichere Artabgrenzung nach TEMPLETON (2001) allerdings notwendig. Kritisch wurde die relative Bewertung von geographischen Distanzen bei der NCA-Analyse diskutiert. Im Falle der bipolaren Arten waren die Distanzen absolut gesehen sehr groß, aber erschienen trotzdem signifikant klein.

Mögliche historische oder rezente Populationsprozesse, die der heutigen Verbreitung von Arten zugrunde liegen, werden in Abschnitt 4.2 angesprochen.

Als weitere Datensätze in diesem mehrdimensionalen Ansatz wurden morphologische und chemische Merkmalszustände der Individuen erhoben und ihre Verteilung in den Netzwerken durch Kontingenztafeltests und ANOVAs überprüft. Signifikante Verteilungen auf den verschiedenen Clade-Ebenen konnten entschlüsselt werden und dienten in den meisten Fällen erfolgreich zur Unterstützung der Artabgrenzungen und phylogeographischen Aussagen (siehe Abschnitt 4.2).

#### **4.2 Artabgrenzung aufgrund der WP-Methode, NCA und phänotypischer Merkmale**

Die WP-Methode (WIENS & PENKROT 2002) basiert auf dem phylogenetischen Artkonzept und berücksichtigt bei der Abgrenzung von Arten monophyletische, gut unterstützte Abstammungslinien, sowie z. T. auch paraphyletische Gruppierungen, zwischen denen Genfluss zu verzeichnen ist. Die Nested Clade Analyse (NCA) deutet nach TEMPLETON (2001) nur bei Fragmentationsereignissen auf eigenständige Arten hin. Morphologische und chemische Merkmale können durch Nutzung von Kontingenztafeltests bzw. ANOVAs zur Ablehnung der Nullhypothese der Austauschbarkeit von Merkmalen nach TEMPLETON (1994, 2001) und damit zur Unterstützung von Artgrenzen dienen.

Eindeutig grenzten sich durch die WP-Methode die sehr gut unterstützten, monophyletischen Arten der Außengruppe, *U. acanthella*, *Usnea* sp. nov. 2, *U. patagonica* sowie die Gruppe neuseeländischer Individuen ab. *U. durietzii*, eine weitere Art der Außengruppe, konnte in der kombinierten Analyse nicht berücksichtigt werden, wird aber anhand der Einzelgen-Analysen als eigenständige und abgegrenzte Art gesehen. Alle genannten Arten wurden sowohl durch die morphologischen als auch chemischen Untersuchungen unterstützt. Der neuseeländische Artkomplex setzt sich aus den zwei nah verwandten, gut unterstützten, monophyletischen Arten *U. ciliata* und *U. subcapillaris* zusammen, enthält allerdings auch Individuen, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Bis auf Weiteres werden die beiden genannten Arten akzeptiert, es besteht aber weiterer Untersuchungsbedarf.

Die nun folgenden Arten wurden anhand der WP-Methode und NCA-Analyse bzw. morphologisch und chemisch untersucht. Eine Zusammenführung der grundlegenden Strukturen der beiden Analysen, phylogenetischer Baum und Netzwerk, liefert Abbildung 4.1. Hierauf beziehen sich auch die Clade-Angaben im folgenden Text.

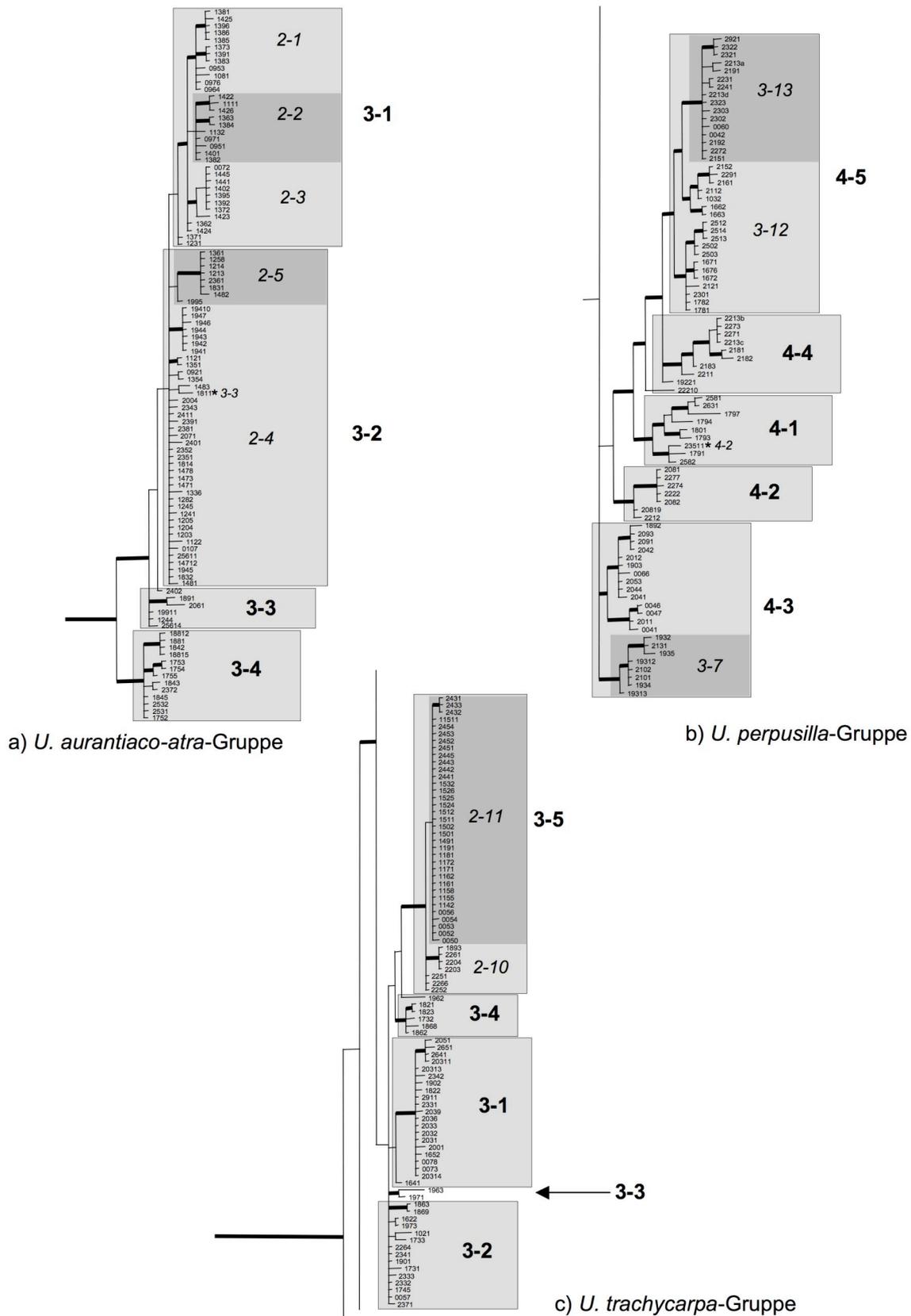


Abb. 4.1: Plot der wichtigsten NCA-Clades auf den kombinierten B/MCMC-Baum der WP-Analyse. Der Baum ist entsprechend der Abbildung 3.9 (Kapitel 3-A) in die einzelnen Gruppen unterteilt. Zwei markierte Individuen (\*) finden sich im SP-Netzwerk in anderen, nachfolgend angegebenen Clades.

*U. trachycarpa* (Abb. 4.1: c, 3-2, 3-3, 3-4) stellt in der phylogenetischen Untersuchung (WP) eine in mehrere Gruppen unterteilte, paraphyletische Art dar, die neben fertilen auch sorediöse Morphotypen enthält. Die NCA lieferte keinen Hinweis auf Fragmentierungsereignisse und Morphologie sowie chemische Inhaltsstoffe konnten aufgrund statistischer Probleme (zu geringe Individuenzahlen) in den Kontingenztafeltests nicht berücksichtigt werden. Möglicherweise liegen hier kryptische Arten vor, die nur durch weitere Untersuchungen bestätigt werden können.

*U. subantarctica* (c, 3-1) ist in der phylogenetischen Untersuchung eine gut unterstützte, monophyletische Art, steht allerdings innerhalb der polyphyletischen *U. trachycarpa*. Eine derartige Topologie würde man bei peripatrischer Artbildung erwarten (KLIMAN et al. 2000). Die NCA gibt Hinweise auf eine zusammenhängende Art *U. trachycarpa*, die *U. subantarctica* einschließt. Da es sich um eine sehr junge und z. T. sympatrisch mit *U. trachycarpa* vorkommende Art handelt, ist sie von der NCA nicht als Art erkannt worden. Morphologie und Chemie allerdings konnten *U. subantarctica* als eigenständige Art abtrennen. Hier wird *U. subantarctica* aufgrund der morphologischen und chemischen Homogenität und der wahrscheinlichen peripatrischen Artbildung als Art anerkannt.

*U. sphacelata* 1-Individuen innerhalb der *U. trachycarpa*-Gruppe (c, 3-5) bilden im zugrunde liegenden Baum der WP-Analyse einen deutlich abgegrenzten, gut unterstützten Ast. Die NCA-Analyse war aufgrund von Problemen mit den großen geographischen Distanzen, der hohen Individuenzahl und der Homogenität dieser bipolaren Art nicht eindeutig. Morphologie und Chemie dieser Art waren charakteristisch. Als Erklärung der bipolaren Verbreitung wird rezente Fernverbreitung, möglicherweise durch Vögel, angenommen, da die Proben der arktischen Regionen molekular fast klonartig übereinstimmen. In der Gesamtanalyse wurden keine antarktischen Proben aus dieser Abstammungslinie untersucht. In den Einzelgen-Analysen (IGS und ITS) wiesen aber drei Proben auf ein begrenztes Vorkommen auch auf Alexander Island hin. Die meisten antarktischen Proben sind den Arten *U. lambii* (*U. sphacelata* 2), *U. trachycarpa* oder *U. subantarctica* zuzuschreiben. Der Name *U. sphacelata* wird für diese bipolare Gruppe in Anspruch genommen

*Usnea* sp. nov. 1 (b, 3-7) ist trotz sympatrischen Vorkommens mit weiteren fertilen *U. perpusilla*-Arten eine monophyletische, gut unterstützte Art innerhalb dieser Gruppe. Ein Fragmentationsereignis zur Entstehung dieser Gruppe wurde von der NCA als mögliche Option angegeben, war aber nicht signifikant. Morphologisch ist die Art durch gelbe Apothecien charakterisiert und wird hier als neue Art anerkannt und beschrieben.

*Usnea* sp. nov. 3 (b, 4-3 ohne 3-7; in der Arbeit bisher als *Usnea* sp. 1 bezeichnet) war in der WP-Methode eine eindeutig abgetrennte, basale Abstammungslinie innerhalb der *U. perpusilla*-Gruppe. Die Abgrenzung der Schwestergruppe *Usnea* sp. nov. 1 (b, 3-7) durch ein Fragmentationsereignis in der NCA legt eine isolierte Entwicklung auch für *Usnea* sp. nov. 3 nahe, die fast vollständig an anderen Standorten vorkommt (El Chalten und Ecuador). Die Art grenzt sich morphologisch auch von der anderen sorediösen Gruppe (b, 4-5) ab und Individuen enthalten bisweilen eine unidentifizierte chemische Substanz, in einer ansonsten inhaltsstoffarmen *U. perpusilla*-Gruppe. *Usnea* sp. nov. 3 wird daher in Abschnitt 4.3 als neue Art beschrieben.

Die fertile Art *U. perpusilla* wurde in der WP-Analyse in zwei monophyletische, gut unterstützte Äste (b, 4-1, 4-2) und eine paraphyletische Gruppe (4-4) aufgespalten. Clade 4-1 wurde eindeutig als monophyletische, basale Abstammungslinie unterstützt, da die Individuen an einem unabhängigen Standort (Feuerland) vorkommen und Genfluss mit den anderen fertilen Gruppen somit ausgeschlossen werden konnte. Die NCA legte ein Fragmentationsereignis für diese Gruppe nahe und Morphologie und Chemie unterstützten diese signifikant als eigenständige Art. Es handelt sich um die von LAMB (1948) beschriebene Unterart *Neuropogon rohmederi* f. *ushuaiensis*, die hier zu *Usnea ushuaiensis* umkombiniert wird (siehe Abschnitt 4.3). Die Individuen der beiden anderen Clades (4-2, 4-4) kommen sympatrisch in Bariloche vor und zeigen geringe morphologische, aber keine chemischen Unterschiede. Es handelt sich wahrscheinlich um kryptische Arten. Die NCA legte als historisches Populationsereignis für Clade 4-4 und den sorediösen Clade 4-5 (siehe Abb. 4.1) eine zusammenhängende Gebietsausweitung zugrunde, die von Patagonien in Richtung Antarktis stattgefunden haben soll. Diese Gebietsausweitung deutet auf eine Wiederbesiedlung des antarktischen Kontinents nach der letzten Eiszeit hin. Es gibt fertile Individuen mit Soralen nur in den Clades 4-4 und 4-5, wodurch eine enge Verwandtschaft unterstrichen wird. Eine Weiterentwicklung in getrennte Linien (fertil – sorediös) muss anschließend erfolgt sein. Mögliche Hybridindividuen mit Apothecien und Soralen, wie Individuum 192-21, kommen vor.

LAMB (1939, 1948) beschrieb aus dem *U. perpusilla*-Artkomplex zwei sehr ähnliche Arten *Neuropogon perpusillus* und *N. rohmederi*, die von WALKER (1985) synonymisiert wurden. Ob es sich bei den getrennten Clades (4-2 und 4-4) um diese beiden Arten handelt, muss anhand des Typusmaterials nachträglich entschieden werden. *U. perpusilla* wird daher bis auf weiteres als polyphyletische Art behandelt und nur *Usnea ushuaiensis* als umkombinierte Art angegeben.

*U. sphacelata* 2, der sorediöse Clade 4-5 in der *U. perpusilla*-Gruppe, war in der WP-Analyse monophyletisch und mäßig unterstützt. Aufgrund der gleichen chemischen Konstitution wertete WALKER (1985) „*U. sphacelata*“ und *U. perpusilla* vorsichtig als Artenpaar, also als sorediöse und fertile Art mit sehr enger Verwandtschaft. Sie verwies auf fehlende „Übergangsindividuen“ mit Soralen und Apothecien, die hier gefunden wurden. Rückschlüsse aus der NCA geben einen Hinweis auf Fernverbreitung in die Nordhemisphäre (USA), die am wahrscheinlichsten durch Vogelzug zu erklären ist. Morphologisch trennt sich *U. sphacelata* 2 eindeutig von der weiteren sorediösen Abstammungslinie innerhalb der Gruppe (Clade 4-3) ab. *U. sphacelata* 2 wurde als *Neuropogon lambii* von IMSHAUG (1954) aus den USA beschrieben. Der Name wird hier umkombiniert (Abschnitt 4.3). Einige morphologische Merkmale trennen diese Art von der ebenfalls bipolaren *U. sphacelata*, mit der sie Jahrzehnte für artgleich gehalten wurde (siehe hierzu Tab. 4.1)

Tab. 4.1: Übersicht über die wichtigsten morphologischen und chemischen Merkmale der beiden bipolar verbreiteten Arten *U. sphacelata* und *U. lambii*.

Merkmal	<i>Usnea sphacelata</i>	<i>Usnea lambii</i>
Verbreitung	zirkumpolar arktisch, Südamerika, Neuseeland, maritime antarktische Inseln (?) (Mongolei?)	USA, Südamerika, zirkumpolar antarktisch
Apothecien	nicht bekannt	sehr selten, dann wie bei <i>U. perpusilla</i> : schwarz bis schwarz-gelblich
Sorale	punktförmig, meist konvex, ineinander übergehen; sehr häufig auch an Hauptästen	variabler; häufig mit deutlichem Rand und konkav, den Ast umgreifend; an Seitenästen
Isidiomorphe	z. T. schwarze, selten helle Isidiomorphe in Soralen	z. T. schwarze Isidiomorphe in Soralen
Thallusoberfläche	immer strukturiert	häufig glatt
Papillen	fast immer vorhanden; hell oder pigmentiert; fein bis grob	sehr vereinzelt, niemals den Thallus bedeckend
Fibrillen	meist vorhanden, unauffällig	z. T. vorhanden, unauffällig
Kortexgrübchen	Vertiefungen meist vorhanden, unauffällig	Vertiefungen nur z. T. vorhanden, unauffällig
Kortexrisse	sehr selten an Hauptästen	z. T. an Haupt- und Seitenästen
Sekundärastansatz	zylindrisch	zylindrisch, selten verbreitert
Pigmentierung	zumeist schwarz geringelt, niemals durchgängig schwarz	je nach Standort an Spitzen häufig durchgängig schwarz
Thallusbasis	wuchernd; braun, seltener hell	wuchernd, selten gestielt; orange-braun, selten schwarz
Mark	dicht, sehr selten locker	locker bis dicht
Zentralstrang	36% - 44% - 60%	25% - 37% - 53%
Chemie	z. T. Dibenzofurane (Strepsilinsäure)	z. T. Dibenzofurane (Strepsilinsäure)

*U. acromelana* (a, 3-4) ist nach der WP-Analyse eine gut unterstützte, monophyletische Art, die als Schwestergruppe zu *U. aurantiaco-atra*/ *U. antarctica* steht. Laut NCA-Analyse ist

ein Fragmentationsereignis eine wahrscheinliche Erklärung für die Entstehung dieser Art. Die morphologischen und chemischen Daten unterstützen eine Artabtrennung signifikant. *U. acromelana* aus Südamerika wird daher als eigenständige Art angesehen. Erste Hinweise deuten an, dass neuseeländische Individuen dieser Art nicht mit den südamerikanischen Individuen verwandt sind. Das Typusmaterial stammt aber aus Neuseeland. Die Untersuchung neuseeländischer Proben muss daher ausgeweitet werden.

*U. aurantiaco-atra* und *U. antarctica* (a, 3-1, 3-2 und 3-3) bilden nach der WP-Methode eine typische konspezifische Art mit sorediösem und sexuellem Reproduktionsweg, die hier als *U. aurantiaco-atra* bezeichnet wird (siehe Abschnitt 4.3). Aus den signifikanten Distanzwerten der NCA konnte auf eingeschränkten Genfluss mit Isolation durch Distanz zwischen Patagonien und der Antarktis geschlossen werden. Auch morphologische und chemische Daten unterstützen eine z. T. isolierte Entwicklung in der Antarktis. Die Merkmale könnten allerdings auch standortbedingt ausgeprägt sein. Clade 3-3 konnte morphologisch und chemisch nicht signifikant von den anderen Clades unterschieden werden und wird als patagonischer Morphotyp zur Art *U. aurantiaco-atra* gezählt.

In Tabelle 4.2 werden die taxonomischen Veränderungen in der *Neuropogon*-Gruppe und die Aufspaltungen in neue Arten bzw. die unveränderten Namen zusammengefasst. Die entsprechenden Kriterien, die zur Entscheidung beigetragen haben, werden genannt.

Tab. 4.2: Zusammenfassung der von WALKER (1985) anerkannten Arten und der neuen bzw. unveränderten Arten, sowie der Kriterien (Methoden), durch die sie unterstützt werden. Provisorische Arten sind durch ein Fragezeichen gekennzeichnet. Fettgedruckt sind alle neuen bzw. neu kombinierten Arten. In Klammern stehen hinter den neuen Arten z. T. die während der Analyse genutzten Artnamen.

<b>Neuropogon-Art (nach WALKER 1985)</b>	<b>Neue bzw. unveränderte Arten</b>	<b>Kriterien</b>
<i>U. acanthella</i>	<i>U. acanthella</i>	WP, Morphologie, Chemie
<i>U. acromelana</i>	<i>U. acromelana</i> ? (Hinweis auf zwei unterschiedliche Arten in NZ und S-Amerika)	WP, NCA, Morphologie, Chemie
<i>U. antarctica</i> und <i>U. aurantiaco-atra</i>	<b><i>U. aurantiaco-atra</i></b> (artgleich)	WP, NCA, Morphologie, Chemie
<i>U. ciliata</i>	<i>U. ciliata</i> ?	WP, Morphologie, Chemie
( <i>U. durietzii</i> )	<i>U. durietzii</i>	MP-, NJ-, Bayes'sche Analyse, Morphologie
<i>U. patagonica</i>	<i>U. patagonica</i>	WP, Morphologie, Chemie
<i>U. perpusilla</i>	<b><i>U. ushuaiensis</i></b>	WP, NCA, Morphologie, Chemie
	<b><i>Usnea</i> sp. nov. 1</b> <i>U. perpusilla</i> ? (kryptische Arten?)	WP, NCA, Morphologie (WP), Morphologie, Chemie
<i>U. sphacelata</i>	<b><i>U. sphacelata</i></b> ( <i>U. sphacelata</i> 1)	WP, (NCA), Morphologie
	<b><i>U. lambii</i></b> ( <i>U. sphacelata</i> 2) <b><i>Usnea</i> sp. nov. 3</b> (= <i>Usnea</i> sp. 1)	WP, (NCA), Morphologie WP, Morphologie, Chemie
<i>U. subantarctica</i>	<i>U. subantarctica</i>	(WP), Morphologie, Chemie
<i>U. subcapillaris</i>	<i>U. subcapillaris</i> ? (artgleich mit <i>U. pseudocapillaris</i> ? Zu wenig Daten)	WP, Chemie
<i>U. trachycarpa</i>	<i>U. trachycarpa</i> ? (kryptische Arten ?)	NCA, Morphologie
--	<b><i>Usnea</i> sp. nov 2</b>	WP, Morphologie, Chemie

Drei Arten sind neu für *Usnea*. Sie wurden durch die WP-Methode, Morphologie und z. T. durch die NCA und Chemie unterstützt. Vier Arten, *U. acanthella*, *U. durietzii*, *U. patagonica* und *U. subantarctica* wurden unverändert als Arten anerkannt. Zwei der traditionellen Arten, *U. perpusilla* und *U. sphacelata* wurden hier als Artkomplexe interpretiert und konnten anhand der WP-Kriterien und/oder NCA-Schlussfolgerungen und mit der Unterstützung morphologischer Daten in mindestens sechs Arten aufgetrennt werden. Zwei Arten, *U. aurantiaco-atra* und *U. antarctica* sind konspezifisch aufgrund der WP-Methode, NCA, Morphologie und Chemie. Und fünf Arten, *U. acromelana*, *U. ciliata*, *U. perpusilla*, *U. subcapillaris* und *U. trachycarpa* sind provisorische Arten, die entweder mit Typusmaterial verglichen oder anhand weiterer Proben und geographischer Aufsammlungen untersucht werden müssen.

### 4.3 Taxonomische Konsequenzen

Im Folgenden werden die anerkannten Arten aufgelistet und nomenklatorische Änderungen vorgeschlagen. Zudem werden chemische, morphologische oder die Verbreitung betreffende Zusatzinformationen bzw. Änderungen der Beschreibungen nach WALKER (1985) geliefert.

#### 1. *Usnea acanthella* (LAMB) F.J. WALKER

*Bull. Br. Mus. nat. Hist. (Bot.)* 13: 47 (1985).

*Chemie*: z. T. Echinocarpinsäure (TLC)

#### 2. *Usnea acromelana* STIRTON

*Trans. Proc. N.Z. Inst.* 30: 388 (1898). Typus: Neuseeland, Selwyn Gorge, Mai 1894, T. W. N. Beckett L11 (BM!).

*Hinweis*: Molekulare Untersuchungen geben einen ersten Hinweis auf zwei verschiedene Arten in Neuseeland und Südamerika. Weitere Untersuchungen sind notwendig. Morphologisch und chemisch wurden nur südamerikanische Proben untersucht. Die folgenden Angaben beziehen sich auf diese Proben.

*Morphologie*: Sorale bzw. Soredien zumeist sehr stark dunkel pigmentiert; nur an Seitenästen und Spitzen. Pigmentierte Isidiomorphe fast immer vorhanden (siehe Abb. 3.1: j). Keine Apothecien!

*Chemie*: immer Norstictin- und Salazinsäure (TLC).

### 3. *Usnea aurantiaco-atra* (JACQ.) BORY

*Mém. Soc. Linn. Paris* 4: 596 (1826). Typus: Chile, Magellan Straße, 1767, *Commerçon* (PC!).

*Synonym: Usnea antarctica* DU RIETZ, *Sv. bot. Tidskr.* 20: 93 (1926).

*Morphologie:* Sorediöse Formen meist mit vielen, aus Papillen entwickelten, variablen Soralen: ausgegraben flach mit Rand bis konvex und wuchernd; unpigmentierte oder pigmentierte Soredien. Pigmentierte Isidiomorphe in südamerikanischen Proben häufig (siehe Abb. 3.2: j). Apothecien selten mit gelblich-bräunlichen Scheiben; häufig mit Apothecienstrahlen (siehe Abb. 3.2: b).

*Chemie:* häufige Chemotypen: (1) Salazin-, (Quaesitin-), (Fumar-)Protocetrarsäure; (2) (Fumar-)Protocetrarsäure; (3) Strepsilinsäure und Derivate (begleitend oder ausschließlich); (4) (Proto-)Neuropologinsäure (TLC).

*Verbreitung:* Antarktis und südliches Südamerika, vgl. *U. antarctica* und *U. aurantiaco-atra*-Verbreitung bei WALKER (1985).

### 4. *Usnea ciliata* (NYL.) DU RIETZ

*Sv. bot. Tidskr.* 20: 91 (1926).

*Hinweis:* Es gibt Hinweise aus molekularen Untersuchungen auf sorediöse Formen in Neuseeland. Nähere Untersuchungen sind notwendig.

### 5. *Usnea durietzii* MOTYKA

*Lich. Gen. Usn. Stud. Monogr.* 2: 503 (1937).

### 6. *Usnea lambii* (IMSHAUG) **comb.nov.** ined.

*Neuropogon lambii* IMSHAUG, *Rhodora* 56: 154 (1954). Typus: USA, Washington, Mt. Rainier National Park, Yakima Park, 1830m, 19. August 1942, *P. F. Scholander* (FH!)

*Morphologie:* Thallusbasis wuchernd oder abgesetzt, meist bräunlich oberhalb der Haftscheibe. Grad der Pigmentierung variabel und standortabhängig; Hauptäste meist hell, aber in Richtung Spitzen immer mehr oder weniger schwarz gestreift bis tief schwarz pigmentiert. Thallusoberfläche glatt, häufig mit dezenten Kortexgrübchen (siehe Abb. 4.2: b, d). Kortextrisse z. T. vorhanden, nicht pigmentiert. Soralfornen variabel: konkav, astumgreifend, mit deutlichem Rand bis konvex-kugelig; Sorale oft pigmentiert (siehe Abb. 4.2: b). Marksicht z. T. dicht, nicht immer locker. Apothecien *U. perpusilla*-ähnlich, schwarz-gelblich, nur sehr selten vorhanden.

*Chemie:* Strepsilinsäure und Derivate häufig vorhanden, eine Probe mit Psoromsäure (TLC).

*Verbreitung:* Bipolar; Cascade Mountains, USA (verschiedene Lokalitäten); hohe Anden in Ecuador, Vulkan Chimborazo; hohe Anden in Patagonien: Rio Negro (Bariloche), Santa Cruz (El Chalten) nahe Lago Viedma; Tierra del Fuego (Glaciar Matrial); Antarktische Halbinsel: Adelaide und Alexander Island; Casey Station (Australische Antarktis); Victoria Land (Nunatak, 80° Süd).

7. *Usnea patagonica* F.J. WALKER

*Bull. Br. Mus. nat. Hist. (Bot.)* 13: 47 (1985). Typus: Argentinien, Santa Cruz, Lago Argentino, Cordillera Cristales, 2000 m, 26. Dezember 1958, *P. W. James* 31 (BM!).

*Morphologie:* Sekundäräste zur Basis hin immer verschmälert. Thallusoberfläche an Primär- und Sekundärästen häufig ringförmig aufgebrochen (siehe Abb. 3.1: c)

*Chemie:* sehr häufig Neotricon, Neuropologinsäure und Norperstictinsäure in Kombination (HPLC).

*Verbreitung:* Südamerika; häufige Art in der Cordillera Blanca, Huascarán Nationalpark, 4800 m Peru; weitere Aufsammlung aus Ecuador, Vulkan Chimborazo, 4600 m.

8. *Usnea perpusilla* (LAMB) F.J. WALKER

*Bull. Br. Mus. nat. Hist. (Bot.)* 13: 47 (1985). – *Neuropogon perpusillus* LAMB, *J. Linn. Soc. (Bot.)* 52: 234 (1939). Typus: Chile, Pico de Plique, Antuco, *Poeppig* Pl. Chil. III, 278(56) (BM!). - *Neuropogon rohmederi* Lamb, *Lilloa* 14: 158 (1948). Typus: Argentinien, Chubut, Lago Futalaufquen, 1800-2000m, 1945, *G. Rohmeder* (LIL 2275) (BM!).

*Hinweis:* *U. perpusilla* spaltet sich molekular in drei verschiedene Gruppen auf, von der eine als *Neuropogon* f. *ushuaiensis* LAMB identifiziert werden konnte. Ob die beiden anderen Gruppen den von LAMB (1939, 1948) beschriebenen *Neuropogon perpusillus* und *Neuropogon rohmederi* zugeordnet werden können, muss anhand des Typusmaterials nachträglich überprüft werden. Bis dahin müssen die beiden Gruppen unter der von WALKER (1985) als variabler definierten *U. perpusilla* gefasst werden (siehe Abb. 3.2: a, h)

9. *Usnea sphaclata* R. BR.

*Chloris melvilliana* : 49 (1823 [1821]). Typus: Kanada, Melville Island, *Mr James Ross* 114 (BM!).

*Morphologie:* Thallusbasis immer wuchernd, mehr oder weniger bräunlich pigmentiert. Fibrillen sind sehr häufig vorhanden. Äste sind immer mehr oder weniger geringelt, aber niemals vollständig schwarz pigmentiert (siehe Abb. 4.2: f). Thallusoberfläche niemals glatt, fast immer unpigmentierte oder pigmentierte, meist feine Papillen aufweisend. Markschrift meist dicht. Zentralachse meist zwischen 40% und 55% des Thallusdurchmessers. Sorale

häufig auch an Hauptästen, punktförmig, meist konvex, ineinander übergehen. Pigmentierte Isidiomorphe z. T. vorhanden.

*Chemie*: z. T. Dibenzofurane in Form von Strepsilinsäure und ihren Derivaten (HPLC).

*Verbreitung*: Bipolar: zirkumpolar arktisch, Südamerika; wahrscheinlich selten in Patagonien, Neuseeland und den maritim antarktischen Inseln; Vorkommen in der Mongolei sind wahrscheinlich.

#### 10. *Usnea subantarctica* F.J. WALKER

*Bull. Br. Mus. nat. Hist. (Bot.)* 13: 47 (1985). Typus: Antarktische Halbinsel, Marguerite Bay, Horseshoe Island, Fallières Coast, 7,5 m, 23 Februar 1965, R. E. Longton 1275 (AAS!).

*Morphologie*: z. T. sehr heller Thallus mit wenig Pigmentierung. Kortex ungewöhnlich hart und krustig und die Kortexschnittfläche ungewöhnlich glänzend (siehe Abb. 3.2: g). Papillen nicht immer pigmentiert. Soredien häufig dunkel pigmentiert mit auffällig hellem Rand. Isidiomorphe bei 50% der Individuen vorhanden. Farbe der Apothecien, wenn vorhanden, gelb bis orange.

*Chemie*: fast immer Norstictinsäure oder keine Inhaltsstoffe; selten zusätzlich Salazinsäure bzw. Dibenzofurane (Strepsilinsäure) (TLC).

#### 11. *Usnea subcapillaris* (D. GALLOWAY) F.J. WALKER

*Bull. Br. Mus. nat. Hist. (Bot.)* 13: 47 (1985).

*Hinweis*: Es gibt Hinweise aus molekularen Untersuchungen auf eng verwandte sorediöse Formen in Neuseeland, die möglicherweise *U. pseudocapillaris* zuzuordnen sind. Nähere Untersuchungen der beiden Arten sind notwendig. (siehe Abb. 3.1: d)

*Chemie*: Dibenzofurane in Form von Strepsilinsäure können auftreten (TLC).

#### 12. *Usnea trachycarpa* (STIRTON) MÜLL. ARG.

*Nuovo G. bot. ital.* 21: 37 (1889). Typus: Kerguelen's Land, (January 1875), *Challenger Exped.* 6 (BM!).

*Hinweis*: *U. trachycarpa* ist wahrscheinlich in zwei oder mehrere kryptische Arten untergliedert. Nähere Untersuchungen sind erforderlich, um dies zu bestätigen.

*Morphologie*: Der gesamte Thallus antarktischer Individuen kann sehr stark pigmentiert und matt sein (Abb. 4.2: a). Ansonsten häufig auch unpigmentierte oder gemischte Papillen, die grob sein können. Individuen mit punktförmig bis stark konvexen, auf die Seitenäste beschränkten Soralen, (dann aber ohne Apothecien) kommen in der Antarktis, aber auch in Patagonien vor (siehe Abb. 4.2: a). Die Apothecienscheibe ist z. T. gelblich anstatt braun.

*Chemie*: z. T. Quaesitinsäure gemeinsam mit Norstictinsäure; Protocetrarsäure kommt nicht vor; Neotricon und Neuropologinsäure alleinig oder mit Salazinsäure; z. T. Dibenzofuran (Strepsilinsäure) als zusätzliche Substanz (TLC und HPLC).

*Verbreitung*: Vorkommen auch in Ecuador und der Antarktis: Marguerite Bay und Alexander Island.

13. *Usnea ushuaiensis* (LAMB) **comb. et stat. nov.** ined.

*Neuropogon rohmederi* f. *ushuaiensis* LAMB, *Lilloa* 14: 160 (1948). Typus: Argentinien, Tierra del Fuego, Sierra Alvear, Südhang, oberhalb Las Cotorras, ca. 20 km ONO von Ushuaia, 900-1000m, 7. Februar 1940, R. Santesson 640c (S!)

*Morphologie*: Thallusbasis leicht gestielt oder wuchernd; zumeist mit orange-brauner Färbung der Basalteile. Markschrift dicht. Zentralachsendurchmesser 30-45% des Thallusdurchmessers. Sehr feine, pigmentierte, aber auch unpigmentierte Papillen (siehe Abb. 4.2: e). Fibrillen durchgängig vorhanden, häufig an Seitenästen.

*Chemie*: z. T. Psoromsäure und/oder Dibenzofurane (Strepsilinsäure) vorhanden (TLC).

14. *Usnea* sp. nov. 1 **sp. nov.** ined.

Typus: Argentinien, Rio Negro, Bariloche, Cerro Catedral, Skigebiet, ca. 2000 m alt., exponierter Fels, 19. Dezember 2003, N. Wirtz und M. I. Messuti, PA-25b (F!).

*Morphologie*: Thallus ca. 5-7 cm, von einer wuchernden, zumeist bräunlichen Haftscheibe entspringend; aufrecht strauchig wachsend, subdichotom bis reich verzweigt (Abb. 3.1: g). „Gestauchte“ Morphotypen mit dicken, gekrümmten, pigmentierten Seitenästen vorhanden (wie in *U. perpusilla*). Thallusoberfläche grünlich, ungewöhnlich glatt und glänzend mit wenig auffälligen Kortexgrübchen; Hauptäste hell, Seitenäste zu den Spitzen hin deutlich schwarz gebändert (Abb. 3.1: i). Kortexrisse z. T. auch an Nebenästen vorhanden. Keine Papillen. Selten Fibrillen. Markschrift dicht. Zentralachse dick, durchschnittlich 53% (34%-71%). Sorale nicht bekannt. Pigmentierte Isidiomorphe bei einem Individuum ohne Apothecien. Apothecien häufig, untergipfelständig, selten endständig, z. T. in Reihen; napfartig bis flach ausgebreitet, z. T. mit Rand und wenigen Strahlen; hellgelb bis bräunlich bzw. schwarz gefleckt oder schattiert (siehe Abb. 2.9: C und 3.1: g, i).

*Chemie*: selten Dibenzofurane in Form von Strepsilinsäure (TLC).

*Verbreitung*: nur an einem Standort gesammelt: Argentinien, Bariloche, Cerro Catedral.

15. *Usnea* sp. nov. 2 **sp. nov.** ined..

Typus: Peru, Ancash, Nationalpark Huascarán, Quebrada Ulta, an N exponiertem Hang der Nevado Ulta, 4800m alt., 6. November 2004, N. Wirtz, H.T. Lumbsch und A. Ramírez, HTL 19320b (F!).

*Morphologie:* Thallus ca. 2-4 cm hoch, von einer abgesetzten bis verlängerten oder wuchernden, schwarzen bis schwarz-bräunlichen Haftscheibe und Thallusbasis entspringend (siehe Abb. 2.10). Monopodial wachsend mit wenigen Verzweigungen; Hauptäste sich zu den Spitzen hin zunehmend verjüngend und zunehmend pigmentiert, aber nicht gebändert, z. T. fleckig (siehe Abb. 2.10). Kortex dick und hart. Thallusoberfläche glatt oder leicht strukturiert, eher matt, mit deutlichen Kortextrissen an Haupt- und Seitenästen, die den Blick auf die weiße Markschrift freigeben (siehe Abb. 4.2: c). Sekundärastansatz undeutlich verschmälert. Kaum Papillen vorhanden. Z. T. Fibrillen und Kortexgrübchen vorhanden. Markschrift dicht bis kompakt. Zentralachse dünn, ca. 30-40% des Thallusdurchmessers einnehmend. Unpigmentierte, lange Isidiomorphe vorhanden, die z. T. nach oben hin leicht pigmentiert sind und nach Abbruch an Hauptästen helle Narben bilden (Ab. 4.2: c). Sorale mit Soredien nicht vorhanden. Apothecien nicht bekannt.

*Chemie:* immer Protocetrar- und Fumarprotocetrarsäure vorhanden, seltener zusammen mit dem Depsid Atranorin (TLC)

*Verbreitung:* nur an einem Standort gesammelt: Peru, Huascarán Nationalpark (s. o.).

#### 16. *Usnea* sp. nov. 3 **sp. nov.** ined.

Typus: Argentinien, Santa Cruz, ca. 30km N von El Chalten, N des Nationalparks „los Glaciares“, Cerro Creston, oberhalb der Laguna del Desierto, unterhalb des Glaciar Huemul, auf Seitenmoräne, ca. 800 m alt, 9. Dezember 2003, N. Wirtz und M. I. Messuti, PA-1 (F!).

*Morphologie:* Thallus ca. 4-5 cm hoch, von einer wuchernden, zumeist hellen bis bräunlich gefärbten Thallusbasis ausgehend. Aufrecht wachsend, mehr oder weniger dichotom verzweigt mit vielen abstehenden Fibrillen. Sekundäräste mit schwarzer Bänderung bis hin zu den Spitzen. Thallusoberfläche strukturiert, seltener glatt; vereinzelt durch Papillen, meist durch Kortexgrübchen (z. T. ausgeprägt) und durch Fibrillen. Kortextrisse an den Hauptästen vorhanden. Markschrift dicht; Zentralachse durchschnittlich 47% des Thallusdurchmessers einnehmend (35-60%). Punktförmige, meist gewölbte, ineinander übergehende Sorale; zumeist an den Nebenästen und aus abgebrochenen Fibrillen entspringend. Schwarz pigmentierte Isidiomorphe immer in Soralen vorhanden. Apothecien nicht bekannt.

*Chemie:* Dibenzofurane (Strepsilinsäure) in manchen Proben und ein unidentifizierter Inhaltsstoff (nur in dieser Art vorkommend) z. T. vorhanden (TLC).

*Verbreitung:* Südamerika: Ecuador, Chimborazo; Rio Negro, Bariloche; Santa Cruz, El Chalten. Wahrscheinlich in den südamerikanischen Anden verbreitet.

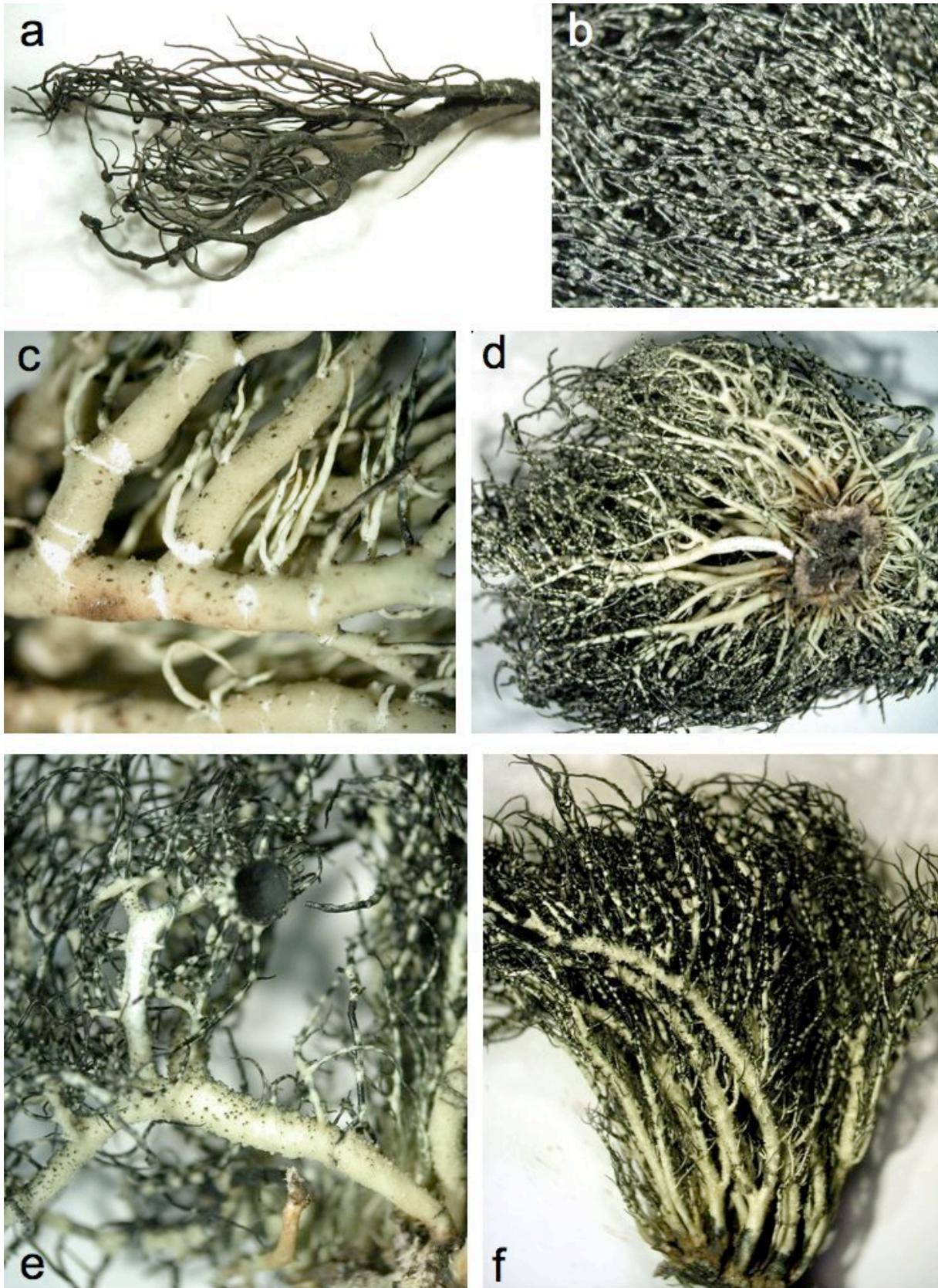


Abb. 4.2: (a) *U. trachycarpa*, (b) *U. lambii*, (c) *Usnea* sp. nov. 2, (d) *U. lambii*, (e) *U. ushuaiensis*, (f) *U. sphacelata*.

## 5. Literatur

- ALTSCHUL, S.F., T.L. MADDEN & A.A. SCHÄFFER (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- APPEL, D.J. & T.R. GORDON (1996) Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 125-138.
- ARTICUS, K. (2004a) Phylogenetic studies in *Usnea* (Parmeliaceae) and allied genera. *Dissertation 931*. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- ARTICUS, K. (2004b) *Neuropogon* and the phylogeny of *Usnea* s.l. (Parmeliaceae, lichenized Ascomycetes). *Taxon* 53: 925-934.
- ARTICUS, K., J.-E. MATTSSON, L. TIBELL, M. GRUBE & M. WEDIN (2002) Ribosomal DNA and  $\beta$ -tubulin data do not support the separation of the lichens *Usnea florida* and *U. subfloridana* as distinct species. *Mycol. Res.* 106: 412-418.
- ASAHINA, Y. (1934a) Zur Systematik der Flechtenstoffe. *Acta Phytochim.* 8: 33-45.
- ASAHINA, Y. (1934b) Die Fortschritte in der Chemie der Flechtensäuren seit Zopf und Hesse. *J. Chem. Soc. Jap.* 55: 13-51.
- ASAHINA, Y. (1937) Über den taxonomischen Wert der Flechtenstoffe. *Bot. Mag. Tokyo* 51: 759.
- ASAHINA, Y. (1954) Lichenologische Notizen § 99. A new method in describing the relation between cortex, medulla and axis of *Usnea*. *J. Jpn. Bot.* 29: 11-17.
- ASAHINA, Y. (1956) *Lichens of Japan*, vol. 3, genus *Usnea*. Research Institute for Natural Resources, Shinjuku, Tokyo.
- AVISE, J.C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- AVISE, J.C., J. ARNOLD, R.M. BALL, E. BIRMINGHAM, T. LAMB, J.E. NEIGEL, C.A. REEB & N.C. SAUNDERS (1987) Intraspecific phylogeography – the mitochondrial-DNA bridge between population-genetics and systematics. *An. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- BAILEY, R.H. & P.W. JAMES (1979) Birds and the dispersal of lichen propagules. *Lichenologist* 11: 105-106.
- BALDWIN, B.G., M.J. SANDERSON, J.M. PORTER, M.F. WOJCIECHOWSKI, C.S. CAMPBELL & M.J. DONOGHUE (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247-277.
- BANDELT, H.J. & A.W.M. DRESS (1992) Split decomposition: a new and useful approach to phylogenetic analysis of distance data. *Mol. Phyl. Evol.* 1: 242-252.
- BANDELT, H.J., P. FORSTER & A. RÖHL (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- BAUM, D.A. & M.J. DONOGHUE (1995) Choosing among alternative „phylogenetic“ species concepts. *Syst. Bot.* 20: 560-573.
- BAUM, D.A. & K.L. SHAW (1995) Genealogical perspectives on the species problem. In: *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics* (P.C. HOCH & A.G. STEPHENSON eds.) 289-303. St. Louis, Missouri: Botanical Garden, USA.
- BERG, L.S. (1933) Die bipolare Verbreitung der Organismen und die Eiszeit. *Zoogeograph.* 1: 449-484.

- BHATTACHARYA, D., T. FRIEDL & S. DAMBERGER (1996) Nuclear-encoded rDNA group I introns: Origin and phylogenetic relationships of insertion site lineages in the green algae. *Mol. Biol. Evol.* 13: 978-989.
- BHATTACHARYA, D., T. FRIEDL & G. HELMS (2002) Vertical evolution and intragenic spread of lichen-fungal group I introns. *J. Mol. Evol.* 55: 74-84.
- BHATTACHARYA, D., F. LUTZONI, V. REEB, D. SIMON, J. NASON & F. FERNANDEZ (2000) Widespread occurrence of spliceosomal introns in the rDNA genes of ascomycetes. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1971-1984.
- BLANCO, O., A. CRESPO, J.A. ELIX, D.L. HAWKSWORTH & H.T. LUMBSCH (2004) A molecular phylogeny and new classification of parmelioid lichens containing *Xanthoparmelia*-type lichenan (Ascomycota: Lecanorales). *Taxon* 53: 959-975.
- BOND, J.E. & P. SIERWALD (2002) Cryptic speciation in the *Anadenobolus excisus* millipede species complex on the island of Jamaica. *Evolution*: 56: 1123-1135.
- BONIN, A., E. BELLEMAIN, P. BRONKEN EIDASEN, F. POMPANON, C. BROCHMANN & P. TABERLET (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol. Ecol.* 13: 3261-3273.
- BROOKS, D.R. & D.A. MCLENNAN (1999) Species: turning a conundrum into a research program. *J. Nematol.* 31: 117-133.
- BROWER, A.V.Z. (1999) Delimitation of phylogenetic species with DNA sequences: a critique of Davis and Nixon's population aggregation analysis. *Syst. Biol.* 48: 199-213.
- BOWIE, R.C.K., J. FIELDSA, S.J. HACKETT & T.M. CROWE (2004) Molecular evolution in space and through time: mtDNA phylogeography of the Olive Sunbird (*Nectarinia olivacea/obscura*) throughout continental Africa. *Mol. Phyl. Evol.* 33: 56-74.
- BRIGGS, J.C. (1987) Antitropical distribution and evolution in the Indo-West Pacific Ocean. *Syst. Zool.* 36: 237-247.
- BROWN, D.D., P.C. WENSINK & E. JORDAN (1972) A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *J. Mol. Biol.* 63: 57-73.
- BUCKLER IV, E.S., A. IPPOLITO & T.P. HOLTSFORD (1997) The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics* 145: 821-832.
- BUCKLEY, T., P. ARENSBURGER, C. SIMON & G. CHAMBERS (2002) Combined data, Bayesian phylogenetics, and the origin of the New Zealand cicada genera. *Syst. Biol.* 51: 4-18.
- BURKE, J.M. (1988) Molecular genetics of group-I introns: RNA structures and protein factors required for splicing – a review. *Gene* 73: 273-294.
- BULL, J.J., J.P. HUELSENBECK, C.W. CUNNINGHAM, D.L. SWOFFORD & P.J. WADDELL (1993) Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42: 384-397.
- CANN, R.L., M. STONEKING & A.C. WILSON (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31-36.
- CARBONE, I., J.B. ANDERSON & L.M. KOHN (1999) Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. *Evolution* 53: 11-21.
- CASSENS, I., I. v. WAEREBEEK, P.B. BEST, E.A. CRESPO, J. REYES & M.C. MILINKOVITCH (2003) The phylogeography of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*): a critical examination of network methods and rooting procedures. *Mol. Ecol.* 12: 1781-1792.
- CECH, T.R. (1988) Conserved sequences and structures of group-I introns: building an active site for RNA catalysis – a review. *Gene* 73: 259-271.

- CHENEY, S.A., N.J. LAFRANCHI-TRISTEM, D. BOURGES & E.U. CANNING (2001) Relationships of microsporidian genera, with emphasis on the polysporous genera, revealed by sequences of the largest subunit of RNA polymerase II (RPB1). *J. Eukaryot. Microbiol.* 48: 111-117.
- CLEMENT, M., D. POSADA & K.A. CRANDALL (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657-1660.
- CLERC, P. & M.A. HERRERA-CAMPOS (1997) Saxicolous species of *Usnea* subgenus *Usnea* (lichenized ascomycetes) in North America. *Bryologist* 100: 281-301.
- CLERC, P. (1984) Contribution à la revision de la systématique des usneés (Ascomycotina, *Usnea*) d'Europe. I.-*Usnea florida* (L.) Wigg. emend. Clerc. *Cryp., Bryol. Lichénol.* 5: 333-360.
- CLERC, P. (1998) Species concepts in the genus *Usnea* (lichenized ascomycetes). *Lichenologist* 30: 321-340.
- CRACRAFT, J. (1983) Species concepts and speciation analysis. *Curr. Ornithol.* 1: 159-187.
- CRACRAFT, J. (1989) Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In: *Speciation & its Consequences* (D. OTTE & J.A. ENDLER eds.) 28-59. Sinauer Assoc., Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- CRACRAFT, J. (2000) Species concepts in theoretical and applied biology: a systematic debate with consequences. In: *Species Concepts and Phylogenetic Theory* (Q.D. WHEELER & R. MEIER eds) 3-14. Columbia University Press, New York, USA.
- CRACRAFT, J. (2002) The seven great questions of systematic biology: an essential foundation for conservation and the sustainable use of biodiversity. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 89: 127-144.
- CRISP, M.D. & G.T. CHANDLER (1996) Paraphyletic species. *Telopea* 6: 813-844.
- CULBERSON, C.F. (1969) *Chemical and botanical guide to lichen products*. University of North Carolina Press, Chapel Hill, USA.
- CULBERSON, C.F. (1972) Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *J. Chromatogr.* 72: 113-125.
- CULBERSON, C.F. & H.-D. KRISTINSSON (1970) A standardized method for the identification of lichen products. *J. Chromatogr.* 46: 85-93.
- CULBERSON, W.L. & C.F. CULBERSON (1970) A phylogenetic view of chemical evolution in the lichens. *Bryologist* 73: 1-31.
- CULBERSON, W.L. (1986) Chemistry and sibling speciation in the lichen-forming fungi: ecological and biological considerations. *Bryologist* 89: 123-131.
- CUMMINGS, M.P., S.P. OTTO & J. WAKELEY (1995) Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 12: 814-822.
- DARLING, K.F., C.M. WADE, I.A. STEWART, D. KROON, R. DINGLE & A.J. LEIGH BROWN (2000) Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers. *Nature* 405: 43-47.
- DARWIN, C. (1859) *On the origin of species by means of natural selection*. John Murray, London, UK.
- DAVIS, J.I. & K.C. NIXON (1992) Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Syst. Biol.* 41: 421-435.
- DEPRIEST, P.T. & M.D. BEEN (1992) Numerous group I introns with variable distributions in the ribosomal DNA of a lichen fungus. *J. Mol. Biol.* 228: 315-321.

- DE QUEIROZ, K. & M.J. DONOGHUE (1988) Phylogenetic systematics and the species problem. *Cladistics* 4: 317-338.
- DE QUEIROZ, K. (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. In: *Endless Forms* (D.J. HOWARD & S.H. BERLOCHER eds) 57-75. Oxford University Press, New York, USA.
- DIAZ, M.R., T. BOEKHOUT, B. THEELEN & J.W. FELL (2000) Molecular Sequence Analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. *System. Appl. Microbiol.* 23: 535-545.
- DICK, C.W., K. ABDUL-SALIM & E. BERMINGHAM (2003) Molecular systematic analysis reveals cryptic tertiary diversification of a widespread tropical rain forest tree. *Am. Nat.* 162: 691-703.
- DILLENIUS, J.J. (1742) *Historia muscorum*. Oxford.
- DODGE, C.W. (1948) Lichens and lichen parasites. *Rep. B.A.N.Z. Antarctic Res. Exp.* B 7:1-126.
- DODGE, C.W. (1973) *Lichen flora of the Antarctic continent and adjacent islands*. Canaan, New Hampshire.
- DONOGHUE, M.J. (1985) A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist* 88: 172-181.
- DOVER, G.A. (1986) Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet.* 2: 159-165.
- DUCE, R.A. (1995) Sources, distributions, and fluxes of mineral aerosols and their relationship to climate. In: *Dahlem Workshop on Aerosol Forcing of Climate* (R.J. CHARLSON & J. HEINTZENBERG eds.) 43-72. John Wiley, New York, USA.
- DU RIETZ, G.E. (1926) Om släktena *Evernia* Ach., *Letharia* (Th. Fr.) Zahlbr. emend DR. och *Usnea* Ach. subgenus *Neuropogon* (Nees et Flot.) Jatta. *Svensk bot. Tidskr.* 20:89-93.
- DU RIETZ, G.E. (1940) Problems of bipolar plant distribution. *Acta Phytogeogr. Suec.* 13: 215-282.
- ERIKSSON, O. (1982) Outline of the ascomycetes – 1982. *Mycotaxon* 15: 203-248.
- ERIKSSON, O. & D.L. HAWKSWORTH (1998) Outline of the ascomycetes – 1998. *Systema Ascomycetum* 16: 83-296.
- ERLAND, S., B. HENRION, F. MARTIN, L.A. GLOVER & I.J. ALEXANDER (1994) Identification of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tylospora fibrillosa* Donk by RFLP analysis of the PCR-amplified ITS and IGS region of ribosomal DNA. *New. Phytol.* 126: 525-532.
- ESCHWEILER, F.G. (1824) *Systema lichenum*. Nürnberg.
- EXCOFFIER, L. & P.E. SMOUSE (1994) Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. *Genetics* 136: 343-359.
- FEIGE, G.B., H.T. LUMBSCH, S. HUNECK & J.A. ELIX (1993) Identification of lichen substances by a standardized high-performance liquid chromatographic method. *J. Chromatogr.* 646: 417-427.
- FELSENSTEIN, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FERNANDEZ, C.C., J.R. SHEVOCK, A.N. GLAZER & J.N. THOMPSON (2006) Cryptic species within the cosmopolitan desiccation-tolerant moss *Grimmia laevigata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 637-642.

- FITCH, W.M. & E. MARKOWITZ (1970) An improved method for determining codon variability in a gene and its application to the rate of fixation of mutations in evolution. *Biochem. Genet.* 4: 579-593.
- FRISVAD, J.C., P.D. BRIDGE & D.K. ARORA (1998) *Chemical Fungal Taxonomy*. Marcel Dekker, New York, USA.
- FUNK, D.J. & K.E. OMLAND (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34: 397-423.
- GALLOWAY, D.J. (1983) New taxa in the New Zealand lichen flora. *N.Z. J. Bot.* 6: 191-200.
- GALLOWAY, D.J. (1991) Phytogeography of southern hemisphere lichens. In: *Quantitative Approaches to Phytogeography* (P.L. NIMIS & T.J. CROVELLO eds.) 233-262. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- GALLOWAY, D.J. & A. APTROOT (1995) Bipolar lichens: A review. *Crypt. Bot.* 5: 184-191.
- GALTIER, N. & A. JEAN-MARIE (2004) Markov-modulated Markov chains and the covarion process of molecular evolution. *J. Comp. Biol.* 11: 727-733.
- GARDES, M. & T.D. BRUNS (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- GARGAS, A., P.T. DEPRIEST & J.W. TAYLOR (1995) Positions of multiple insertions in SSU rDNA of lichen-forming fungi. *Mol. Biol. Evol.* 12: 208-218.
- GRUBE, M. & S. KROKEN (2000) Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. *Mycol. Res.* 104: 1284-1294.
- GUILDERTSON, T.P., R.G. FAIRBANKS & J.L. RUBENSTONE (1994) Tropical temperature variations since 20,000 years ago: modulating interhemispheric climate change. *Science* 263: 663-665.
- HALE, M.E. JR. (1983) *The biology of lichens*. Edward Arnold, London, UK.
- HALL, B.G. (2001) *Phylogenetic trees made easy*. Sinauer Associates, Sunderland MA, USA.
- HALL, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- HALLIBURTON, R. (2004) *Introduction to Population Genetics*. Upper Saddle River, Pearson Prentice Hall, USA.
- HAUGEN, P., V. REEB, F. LUTZONI & D. BHATTACHARYA (2004) The evolution of homing endonuclease genes and group I introns in nuclear rDNA. *Mol. Biol. Evol.* 21: 129-140.
- HAWKSWORTH, D.L. (1976) Lichen chemotaxonomy. In: *Lichenology: progress and problems* (D.H. BROWN, D.L. HAWKSWORTH & R.H. BAILEY eds.) 139-184. Academic Press, London, UK.
- HAWKSWORTH, D.L., P.M. KIRK, B.C. SUTTON & D.N. PEGLER (1995) *Dictionary of the fungi*, 8th edition. CAB International, Wallingford, UK.
- HENDRIXSON, B.E. & J.E. BOND (2005) Testing species boundaries in the *Antrodiaetus unicolor* complex (Araneae: Mygalomorphae: Antrodiaetidae): „Paraphyly“ and cryptic diversity. *Mol. Phyl. Evol.* 36: 405-416.
- HENSSEN, A. & H.M. JAHNS (1973) *Lichenes. Eine Einführung in die Flechtenkunde*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- HEBERT, P.D.N., E.H. PENTON, J.M. BURNS, D.H. JANZEN & W. HALLWACHS (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14812-14817.
- HERRERA-CAMPOS, M.A., P. CLERC & T.H. NASH III (1998) Pendulous species of *Usnea* from the temperate forests in Mexico. *Bryologist* 101: 303-329.

- HEY, J. (1991) The structure of genealogies and the distribution of fixed differences between DNA-sequence samples from natural populations. *Genetics* 128: 831-840.
- HILLIS, D.M. & S.K. DAVIS (1988) Ribosomal DNA: Intraspecific polymorphism, concerted evolution, and phylogeny reconstruction. *Syst. Zool.* 37: 63-66.
- HIRT, R.P., J.M. LOGSDON, JR., B. HEALY, M.W. DOREY, W.F. DOOLITTLE & T.M. EMBLEY (1999) Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc. Nat. A. Sciences, USA* 96: 580-585.
- HUBBS, C.L. (1952) Antitropical distributions of fishes and other organisms. *Proc. 7<sup>th</sup> Pacific Sci. Congr.* 3: 324-329
- HUDSON, R.R. (1990) Gene genealogies and the coalescent process. In: *Evolutionary Biology* (D.J. FUTUYAMA & J. ANTONOVICS eds.) 1-44. Oxford University Press, New York, USA.
- HUELSENBECK, J.P. (2002) Testing a covariotide model of DNA substitution. *Mol. Biol. Evol.* 19: 698-707.
- HUELSENBECK, J.P. & F. RONQUIST (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- HUELSENBECK, J.P. & B. RANNALA (2004) Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Syst. Biol.* 53: 904-913.
- HUELSENBECK, J.P., F. RONQUIST, R. NIELSEN & J.P. BOLLBACK (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.
- HUGHEY, R., K. KARPLUS & A. KROGH (2003) *SAM sequence alignment and modeling software system*. Technical Report UCSC-CRL-99-11 for SAM Version 3.4, University of California, Santa Cruz, California, USA.
- HUNECK, S. & I. YOSHIMURA (1996) *Identification of Lichen Substances*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- HUSON, D.H. (1998) SplitsTree: analyzing and visualising evolutionary data. *Bioinformatics* 14: 68-73.
- IBRAHIM, K.M., S.J.B. COOPER & G.M. HEWITT (2002) Testing for recombination in a short nuclear DNA sequence of the European grasshopper, *Chorthippus parallelus*. *Mol. Ecol.* 11: 583-590.
- IHLEN, P.G. & S. EKMAN (2002) Outline of phylogeny and character evolution in *Rhizocarpon* (Rhizocarpaceae, lichenized Ascomycota) based on nuclear ITS and mitochondrial SSU ribosomal DNA sequences. *Biol. J. Linn. Soc.* 77: 535-546.
- IMSHAUG, H.A. (1954) A new species of *Neuropogon* from the United States. *Rhodora* 56: 154-157.
- JACQUIN, N.J. (1781) *Miscellanea austriaca ad botanicam, chemiam et historiam naturalem spectantia* 2. Vindobonae [Wien].
- JATTA, A. (1900) *Sylloge Lichenum Italicorum*. Trani
- KÄRNEFELT, I., K. EMANUELSSON & A. THELL (1998) Anatomy and systematics of usneoid genera in the Parmeliaceae. *Nova Hedwigia* 67: 71-92.
- KAPPEN, L. (1993) Lichens in the Antarctic region. In: *Antarctic Microbiology* (E.I. FRIEDMAN, ed.) 433-490. Wiley-Liss, New York, USA.
- KAPPEN, L. (2004) The diversity of lichens in Antarctica, a review and comments. In: *Contributions to Lichenology. Festschrift in Honour of Hannes Hertel*. Bibliotheca Lichenologica 88 (P. DÖBBELER & G. RAMBOLD eds.) 331-343. J. Cramer, Berlin.

- KAPPEN, L., B. SCHROETER, C. SCHEIDEGGER, M. SOMMERKORN & G. HESTMARK (1996) Cold resistant and metabolic activity of lichens below 0°C. *Advanc. Space Res.* 18: 119-128.
- KARPLUS, K., C. BARRETT & R. HUGHEY (1998) Hidden Markov Models for detecting remote protein homologies. *Bioinformatics* 14: 846-856.
- KAUSERUD, H., Ø. STENSRUD, C. DECOCK, K. SHALCHIAN-TABRIZI & T. SCHUMACHER (2006) Multiple gene genealogies and AFLPs suggest cryptic speciation and long-distance dispersal in the basidiomycete *Serpula himantioides* (Boletales). *Mol. Ecol.* 15: 421-431.
- KEISSLER, K. v. (1960) Die Flechten 5(4), Usneaceae. In: *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, Band 9 (L. RABENHORST, ed.). Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- KLIMAN, R.M., P. ANDOLFATTO, J.A. COYNE, F. DEPAULIS, M. KREITMAN, A.J. BERRY, J. MCCARTER, J. WAKELEY & J. HEY (2000) The population genetics of the origin and divergence of the *Drosophila simulans* complex species. *Genetics* 156:1913-1931.
- KNOWLES, L.L. & W.P. MADDISON (2002) Statistical phylogeography. *Mol. Ecol.* 11: 2623-2635
- KOHN, L.M., D.M. PETSCHKE, S.R. BAILEY, L.A. NOVAK & J.B. ANDERSON (1988) Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 78: 1047-1051.
- KÖNIG, J.G. (1772) Flora Islandica. In: *Reise igiennem Island 2* (E. OLAFSEN & B. POVELSEN, eds) 3-20. Gorøe.
- KRETZER, A.M. & T.D. BRUNS (1999) Use of atp6 in fungal phylogenetics: an example from the Boletales. *Mol. Phyl. Evol.* 13: 483-492.
- KROG, H. (1976) *Lethariella* and *Protousnea*, two new lichen genera in Parmeliaceae. *Norw. J. Bot.* 23:83-106.
- KROG, H. (1982) Evolutionary trends in foliose and fruticose lichens of the Parmeliaceae. *J. Hattori Bot. Lab.* 52: 303-311.
- KROKEN, S. & J.W. TAYLOR (2001) A gene genealogical approach to recognize phylogenetic species boundaries in the lichenized fungus *Letharia*. *Mycologia* 93: 38-53.
- LAMB, I.M. (1939) A review of the genus *Neuropogon* (Nees & Flot.) Nyl., with special reference to the antarctic species. *J. Linn. Soc. (Bot.)* 52: 199-237.
- LAMB, I.M. (1948) Further data on the genus *Neuropogon*. *Lilloa* 14: 139-168.
- LAMB, I.M. (1964) Antarctic lichens 1. The genera *Usnea*, *Ramalina*, *Himantormia*, *Alectoria*, *Cornicularia*. *Scient. Rep. Br. Antarct. Surv.* 38: 1-34.
- LEE, M.S.Y. (2003) Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean rank. *J. Evol. Biol.* 16: 179-188.
- LI, W.H. (1997) *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland MA, USA.
- LINDBLOM, L. & S. EKMAN (2005) Molecular evidence supports the distinction between *Xanthoria parietina* and *X. aureola* (Teloschistaceae, lichenized Ascomycota). *Mycol. Res.* 109: 187-199.
- LIU, Y.J., WHELEN, S. & B.D. HALL (1999) Phylogenetic relationships among Ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1799-1808.
- LOCKHART, P.J., M.A. STEEL, M.D. HENDY & D. PENNY (1994) Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 11: 605-612.

- LUMBSCH, H.T. (1998a) Taxonomic use of metabolic data in lichen-forming fungi. In: *Chemical Fungal Taxonomy* (J.C. FRISVAD, P.D. BRIDGE & D.K. ARORA eds.) 345-387. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- LUMBSCH, H.T. (1998b) The use of metabolic data in lichenology at the species and subspecific levels. *Lichenologist* 30: 357-367.
- LUMBSCH, H.T. (2002) Analysis of phenolic products in lichens for identification and taxonomy. In: *Protocols in Lichenology* (J. KRAMER, R.P. BECKETT & A.K. VARMA eds.) 281-295. Springer Verlag, Berlin.
- LUMBSCH H.T., I. SCHMITT, H. DÖRING & M. WEDIN (2001) ITS sequence data suggest variability of ascus types and support ontogenetic characters as phylogenetic discriminators in the *Agyriales* (Ascomycota). *Mycol. Res.* 105: 265-274.
- LYNGE, B. (1932) Om utbredelsen av endel arktiske laver. *Svensk bot. Tidskr.* 26: 401-430.
- LYNGE, B. (1941) On *Neuropogon sulphureus* (König) Elenk., a bipolar lichen. *Skr. norske Vidensk-Akad. mat.-nat. Kl.* 1940: 1-35.
- MARSHALL, W.A. (1996a) Aerial dispersal of lichen soredia in the maritime Antarctic. *New Phytol.* 134: 523-530.
- MARSHALL, W.A. (1996b) Biological particles over Antarctica. *Nature* 383: 680.
- MARTÍN, M.P., S. LAGRECA & H.T. LUMBSCH (2003) Molecular phylogeny of *Diploschistes* inferred from ITS sequence data. *Lichenologist* 35: 27-32.
- MATHENY, P.B. (2005) Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (*Inocybe*; Agaricales). *Mol. Phyl. Evol.* 35: 1-20.
- MATHENY, P.B., Y.J. LIU, J.F. AMMIRATI & B.D. HALL (2002) Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (*Inocybe*, Agaricales). *Am. J. Bot.* 89: 688-698.
- MATHENY, P.B. & J.F. AMMIRATI (2003) *Inocybe angustispora*, *I. taedophila*, and *Cortinarius aureifolius*: an unusual inocyboid *Cortinarius*. *Mycotaxon* 88: 401-407.
- MATTSSON, J.-E. & M. WEDIN (1998) Phylogeny of the Parmeliaceae – DNA data versus morphological data. *Lichenologist* 30: 463-472.
- MATTSSON, J.-E. & M. WEDIN (1999) A re-assessment of the family Alectoriaceae. *Lichenologist* 31: 431-440.
- MATTSSON, J.-E., K. ARTICUS, E. WIKLUND & M. WEDIN (2004) The monophyletic groups within the Parmeliaceae. In: *Phylogenetic studies in Usnea (Parmeliaceae) and allied genera* (K. ARTICUS ed.) sine pagin. *Dissertation* 931. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala, Sweden.
- MAYOL, M. & J.A. ROSSELLÓ (2001) Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus*. *Mol. Phyl. Evol.* 19: 167-176.
- MAYR, E. (1942) *Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist*. Columbia University Press, New York, USA.
- MAYR, E. (1963) *Animal Species and Evolution*. Belknap Press, Cambridge, USA.
- MAYR, E. (2000) The biological species concept. In: *Species Concepts and Phylogenetic Theory* (Q.D. WHEELER & R. MEIER eds.) 17-29. Columbia University Press, New York, USA.
- MCDERMOTT, J.M., B.A. McDONALD, R.W. ALLARD & R.K. WEBSTER (1989) Genetic variability for pathogenicity, isozyme, ribosomal DNA and colony color variants in populations of *Rhynchosporium secalis*. *Genetics* 122: 561-565.

- MEIER, R. & R. WILLMANN (2000) The Hennigian species concept. In: *Species Concepts and Phylogenetic Theory* (Q.D. WHEELER & R. MEIER eds.) 30-43. Columbia University Press, New York, USA.
- MICHELANGELI, F.A., D.S. PENNEYS, J. GIZA, D. SOLTIS, M.H. HILS & J.D. SKEAN (2004) A preliminary phylogeny of the tribe Misconieae (Melastomataceae) based on nrITS sequence data and its implications on inflorescence position. *Taxon* 53: 279-290.
- MILBERG, P. (1992) Nordhemisfäriska kärlväxter på Eldlandet (Northern hemisphere vascular plants in Tierra del Fuego). *Svensk Bot. Tidskr.* 86: 15-21.
- MILLER, A.N. & S.M. HUHDORF (2004) Using phylogenetic species recognition to delimit species boundaries within *Lasiosphaeria*. *Mycologia* 96: 1106-1127.
- MISHLER, B.D. & E.C. THERIOT (2000) The phylogenetic species concept (*sensu* Mishler and Theriot): monophyly, apomorphy, and phylogenetic species concepts. In: *Species Concepts and Phylogenetic Theory* (Q.D. WHEELER & R. MEIER eds.) 44-69. Columbia University Press, New York, USA.
- MOLINA, F.I., S. JONG & J.L. HUFFMAN (1993) PCR amplification of the 3' external transcribed and intergenic spacer of the ribosomal DNA repeat unit in three species of *Saccharomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* 108: 259-264.
- MONTAGNE, C. (1852) Plantas cellulares. Lichenes. In: *Historia física et política de Chile* (C. GAY, ed.) *Botánica* 8 (1), Paris.
- MOORE, D.M. C.A. WILLIAMS & B. YATES (1972) Studies on bipolar disjunct species II, *Plantago maritima* L.. *Bot. Notiser.* 125: 261-272.
- MORANDO, M., L.J. AVILA & J.W. SITES JR. (2003) Sampling strategies for delimiting species: genes, individuals, and populations in the *Liolaemus elongatus-kriegi* complex (Squamata: Liolaemidae) in Andean-Patagonian South America. *Syst. Biol.* 52: 159-185.
- MOTYKA, J. (1936-38) *Lichenum generis Usnea studium monographicum Pars systematica*. 2 vols. Leopoli, privat gedruckt.
- MUÑOZ, J., Á.M. FELICÍSIMO, F. CABEZAS, A.R. BURGAS & I. MARTÍNEZ (2004) Wind as a long-distance dispersal vehicle in the Southern Hemisphere. *Science* 304: 1144-1147.
- MURAT, C., J. DÍEZ, P. LUIS, C. DELARUELLE, C. DUPRÉ, G. CHEVALIER, P. BONFANTE & F. MARTIN (2004) Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* 164: 401-411.
- MURTAGH, G.J., P.S. DYER, P.A. FURNEAUX & P.D. CRITTENDEN (2002) Molecular and physiological diversity in the bipolar lichen-forming fungus *Xanthoria elegans*. *Mycol Res.* 106: 1277-1286.
- MYLLYS, L., K. LOHTANDER, M. KÄLLERSJÖ & A. TEHLER (1999a) Applicability of ITS data in Roccellaceae (Arthoniales, Euscomycetes) phylogeny. *Lichenologist* 31: 461-476.
- MYLLYS, L., K. LOHTANDER, M. KÄLLERSJÖ & A. TEHLER (1999b) Sequence insertions and ITS data provide congruent information on *Roccella canariensis* and *R. tuberculata* (Arthoniales, Euscomycetes) phylogeny. *Mol. Phyl. Evol.* 12: 295-309.
- MYLLYS, L. K. LOHTANDER & A. TEHLER (2001)  $\beta$ -tubulin, ITS and group I intron sequences challenge the species pair concept in *Physcia aipola* and *P. caesia*. *Mycologia* 93: 335-343.
- MYLLYS, L., S. STENROOS, A. THELL & T. AHTI (2003) Phylogeny of bipolar *Cladonia arbuscula* and *Cladonia mitis* (Lecanorales, Euscomycetes). *Mol. Phyl. Evol.* 27: 58-69.

- NEES VON ESENBECK, C.G. & V. FLOTOW (1835) Einige neue Flechtenarten. *Linnaea* 9: 495-502.
- NEI, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- NELSON, G.J. & N.I. PLATNICK (1981) *Systematics and Biogeography: Cladistics and Vicariance*. Columbia University Press, New York, USA.
- NETER, J., W. WASSERMAN & M.H. KUTNER (1985) *Applied Linear Statistical Models*, Ed. 2. R. D. Irwin, Inc., Homewood, Illinois, USA.
- NIMIS, P.L. (1998) A critical appraisal of modern generic concepts in lichenology. *Lichenologist* 30: 427-438.
- NIXON, K.C. & Q.D. WHEELER (1990) An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6: 211-223.
- NYLANDER, W. (1855) Essai d'une nouvelle classification des lichens I.-II.. *Méme. Soc. Sci. Nat. Cherbourg* 3: 161-202.
- NYLANDER, W. (1866) Lichenes Novae Zelandiae, quos ibi legit anno 1861 Dr. Lauder Lindsay. *J. Linn. Soc. Bot.* 9: 244-259.
- NYLANDER, W. (1867) Hypochlorite of lime and hydrate of potash, two new criteria in the study of lichens. *J. Linn. Soc. (Bot.)* 9: 358.
- O'DONNELL, K. & E. CIGELNIK (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phyl. Evol.* 7: 103-116.
- O'DONNELL, K., E. CIGELNIK & H.I. NIRENBERG (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465-493.
- O'DONNELL, K., F.M. LUTZONI, T.J. WARD & G.L. BENNY (2001) Evolutionary relationships among mucoralean fungi (Zygomycota): evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia* 93: 286-296.
- OHMURA, Y. (2001) Taxonomic study of the genus *Usnea* (lichenized Ascomycetes) in Japan and Taiwan. *J. Hattori Bot. Lab.* 90: 1-96.
- OHMURA, Y. (2002) Phylogenetic evaluation of infrageneric groups of the genus *Usnea* based on ITS regions in rDNA. *J. Hattori Bot. Lab.* 92: 231-243.
- OHMURA, Y. & H. KANDA (2004) Taxonomic status of section *Neuropogon* in the genus *Usnea* elucidated by morphological comparisons and ITS rDNA sequences. *Lichenologist* 36: 217-225.
- OLMSTEAD, R.G. (1995) Species concepts and plesiomorphic species. *Syst. Bot.* 20: 623-630.
- OTT, S. (1987a) The juvenile development of lichen thalli from vegetative diaspores. *Symbiosis* 3: 57-74.
- OTT, S. (1987b) Reproductive strategies in lichens. In: *Progress and Problems in Lichenology in the Eighties* (E. PEVELING ed.) 81-93. *Bibliotheca Lichenologica*, J. Cramer, Berlin-Stuttgart.
- OTT, S., T. SCHRÖDER & H.M. JAHNS (2000) Colonization strategies and interactions of lichens on twigs. In: *New Aspects in Cryptogamic Research. Contributions in Honour of Ludger Kappen* (B. SCHROETER, M. SCHLENSOG & T.G.A. GREEN eds.) 445-455. *Bibliotheca Lichenologica*, J. Cramer, Berlin-Stuttgart.
- OTT, S., M. BRINKMANN, N. WIRTZ, H. T. LUMBSCH (2004) Mitochondrial and nuclear ribosomal DNA data do not support the separation of the Antarctic lichens *Umbilicaria kappenii* and *Umbilicaria antarctica* as distinct species. *Lichenologist* 36: 227-234.

- ØVSTEDAL, D.O. & R.I. LEWIS SMITH (2001) Lichens of Antarctica and South Georgia. Cambridge University Press, Cambridge.
- PAGE, R.D.M. (1996) Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Appl. Biosci.* 12: 357-358.
- PAGE, R.D.M. & E.C. HOLMES (1998) *Molecular evolution: a phylogenetic approach*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- PAULS, S. (2005) Phylogeny and phylogeography of the montane caddis fly *Drusus discolor* (RAMBUR, 1842) (Trichoptera: Limnephilidae, Drusinae). *Dissertation*. Universität Duisburg-Essen.
- PFENNINGER, M. & D. POSADA (2002) Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): Fragmentation, corridor migration and secondary contact. *Evolution* 56: 1776-1788
- POELT, J. (1974) Classification. Appendix A. In: *The Lichens*. (V. AHMADJAN & M.E. HALE, eds.) 599-632. London und New York.
- PORTER, A.H. (1990) Testing nominal species boundaries using gene flow statistics: taxonomy of two hybridizing admiral butterflies (*Limenitis*: Nymphalidae). *Syst. Zool.* 39: 131-147.
- POSADA, D. (2002) Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: empirical data. *Mol. Biol. Evol.* 19: 708-717.
- POSADA, D., K.A. CRANDALL & A.R. TEMPLETON (2000) GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Mol. Ecol.* 9: 487-488.
- POSADA, D. & K.A. CRANDALL (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.* 16: 37-45.
- PRINTZEN, C. & S. EKMAN (2002) Genetic variability and its geographical distribution in the widely disjunct *Cavernularia hulthenii*. *Lichenologist* 34: 101-111.
- PRINTZEN, C., S. EKMAN & T. TØNSBERG (2003) Phylogeography of *Cavernularia hulthenii*: evidence of slow genetic drift in a widely disjunct lichen. *Mol. Ecol.* 12: 1473-1486.
- PUERTO, G., M. DA GRAÇA SALOMÃO, R.D.G. THEAKSTON, R.S. THORPE, D.A. WARRELL & W. WÜSTER (2001) Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *J. Evol. Biol.* 14: 527-538.
- RANNALA, B. & Z.H. YANG (1996) Probability Distribution of Molecular Evolutionary Trees: A New Method of Phylogenetic Inference. *J. Mol. Evol.* 43: 304-311.
- RAVEN, P.H. (1963) Amphitropical relationships in the floras of the North and South America. *Quart. Rev. Biol.* 38: 151-177.
- RAVEN, P.H. & AXELROD, D. (1974) Angiosperm biogeography and past continental movements. *Ann. Mo. bot. Gdn.* 61: 539-673.
- RAZAFIMANDIMBISON, S.G., E.A. KELLOGG & B. BREMER (2004) Recent origin and phylogenetic utility of divergent ITS putative pseudogenes: a case study from Naucleaeae (Rubiaceae). *Syst. Biol.* 53:177-192.
- RIDDLE, B.R. & D.J. HAFNER (2004) The past and future roles of phylogeography in historical biogeography. In: *Frontiers of Biogeography: New Directions in the Geography of Nature* (M.V. LOMOLINO & L.R. HEANEY eds.). Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.

- RODRÍGUEZ, F., J.L. OLIVER, A. MARÍN & J.R. MEDINA (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theo. Biol.* 142: 485-501.
- ROFF, D.A. & P. BENTZEN (1989) The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: chi-squared and the problem of small sample sizes. *Mol. Biol. Evol.* 6: 539-545.
- ROGERS, R.W. (1981) *The genera of Australian lichens*. St. Lucia, Queensland, Australien.
- RONQUIST, F. & J.P. HUELSENBECK (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- ROONEY, A.P. & T.J. WARD (2005) Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: Birth and death of a concerted evolution paradigm. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102: 5084-5089.
- ROSEN, D.E. (1978) Vicariant patterns and historical explanation in biogeography. *Syst. Zool.* 27: 159-188.
- ROTONDO, G.M., V.S. SPRINGER, G.A.J. SCOTT & S.O. SCHLANGER (1981) Plate movement and island integration- possible mechanism in the formation of endemic biotas, with special reference to the Hawaiian island. *Syst. Zool.* 30: 12-21.
- ROZAS, J., J.C. SÁNCHEZ-DELBARRIO, X. MESSEGUER & R. ROZAS (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- SAITOU, N. & M. NEI (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- SANGER, F., S. NICKLEN & A.R. COULSON (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SAWYER, S. A. (1999) GENECONV: a computer package for the statistical detection of gene conversion. Zu beziehen über den Autor: Department of Mathematics, Washington University in St Louis, <http://www.math.wustl.edu/~sawyer>.
- SCHMITT, I. & H.T. LUMBSCH (2004) Molecular phylogeny of the Pertusariaceae supports secondary chemistry as an important systematic character set in lichen-forming ascomycetes. *Mol. Phylo. Evol.* 33: 43-55.
- SCHREIBER, A., M. EISINGER & V. STORCH (1996) Allozymes characterize sibling species of bipolar Priapulida (*Priapulula*, *Priapulopsis*). *Polar Biol.* 16: 521-526.
- SEDDON, J.M., F. SANTUCCI, N.J. REEVE & G.M. HEWITT (2001) DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus eurioaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Mol. Ecol.* 10: 2187-2198.
- SHINOHARA, M.L., K.F. LOBUGLIO & S.O. ROGERS (1996) Group-I intron family in the nuclear ribosomal RNA small subunit genes of *Cenococcum geophilum* isolates. *Curr. Genet.* 29: 377-387.
- SIMON, D.M., C.L. HUMMEL, S.L. SHEELEY & D. BHATTACHARYA (2005) Heterogeneity of intron presence or absence in rDNA genes of the lichen species *Physcia aipolia* and *P. stellaris*. *Curr. Genet.* 47: 389-399.
- SITES, J.W. JR. & K.A. CRANDALL (1997) Testing species boundaries in biodiversity studies. *Conserv. Biol.* 11: 1289-1297.
- SITES, J.W. JR. & J.C. MARSHALL (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol.* 18: 462-470.
- SITES, J.W. JR. & J.C. MARSHALL (2004) Operational criteria for delimiting species. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35: 199-227.

- SMITH, R.I.L. (1984) Terrestrial plant biology of the sub-Antarctic and Antarctic. In: *Antarctic Ecology*, vol. 1 (R.M. LAWS ed.) 61-162. Academic Press, London, UK.
- SPREADBURY, C.L., B.W. BAINBRIDGE & J. COHEN (1990) Restriction fragment length polymorphisms in isolates of *Aspergillus fumigatus* probed with part of the intergenic spacer region from the ribosomal RNA gene complex of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1991-1994.
- STENROOS, S. (1993) Taxonomy and distribution of the lichen family Cladoniaceae in the Antarctic and peri-Antarctic regions. *Crypt. Bot.* 3: 310-344.
- STEVENS, G.N. (1992) Variation in thallus morphology in response to climatic and geographical distribution in an *Usnea* complex. *Lichenologist* 24: 229-248.
- STILLER, J.W. & B.D. HALL (1997) The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94: 4520-4525.
- STIRTON, J. (1898) On new Australian and New Zealand lichens. *Trans. Proc. N. Z. Inst.* 30: 382-393.
- STUTE, M., M. FORSTER, H. FRISCHKORN, A. SEREJO, J.F. CLARK, P. SCHLOSSER, W.S. BROECKER & G. BONANI (1995) Cooling of tropical Brazil (5°C) during the last glacial maximum. *Science* 269: 379-383.
- SWINSCOW, T.D.V. & H. KROG (1978) Pendulous species of *Usnea* in East Africa. *Nor. J. Bot.* 25: 221-241.
- SWOFFORD, D.L. (2001) *PAUP\**. *Phylogenetic analysis using parsimony* (\*and other methods). Ver. 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- SWOFFORD, D.L., G.J. OLSEN, P.J. WADDELL & D.M. HILLIS (1996) Phylogenetic Inference. In: *Molecular Systematics*. (D.M. HILLIS, C. MORITZ & B.K. MABLE eds.) 407-514. Sinauer Associates, Massachusetts, USA.
- TAMURA, K. & M. NEI (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.
- TANABE, Y., M. SAIKAWA, M.M. WATANABE & J. SUGIYAMA (2004) Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 $\alpha$  and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Mol. Phyl. Evol.* 30: 438-449.
- TAYLOR, J.W., D.J. JACOBSEN, S. KROKEN, T. KASUGA, D.M. GEISER, D.S. HIBBETT & M.C. FISCHER (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Gen. Biol.* 31: 21-32.
- TEMPLETON, A.R. (1989) The meaning of species and speciation: a genetic perspective. In: *Speciation & its consequences* (D. OTTE & J.A. ENDLER eds.) 3-27. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- TEMPLETON, A.R. (1994) The role of molecular genetics in speciation studies. In: *Molecular ecology and evolution: approaches and applications* (B. SCHIERWATER, B. STREIT, G.P. WAGNER & R. DESALLE eds.) 455-477. Birkhauser Verlag, Basel, Schweiz.
- TEMPLETON, A.R. (2001) Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Mol. Ecol.* 10: 779-791.
- TEMPLETON, A.R. (2002) Out of Africa again and again. *Nature* 416: 45-51.
- TEMPLETON, A.R. (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference events. *Mol. Ecol.* 13: 789-809.
- TEMPLETON, A.R., E. BOERWINKLE & C.F. SING (1987) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA

- sequence data. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* 117: 343-351.
- TEMPLETON, A.R., K.A. CRANDALL & C.F. SING (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.
- TEMPLETON, A.R. & C.F. SING (1993) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134: 659-669.
- TEMPLETON, A.R., E. ROUTMAN & C.A. PHILLIPS (1995) Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767-782.
- THELL, A., S. STENROOS, T. FEUERER, I. KÄRNEFELT, L. MYLLYS & J. HYVÖNEN (2002) Phylogeny of cetrarioid lichens (Parmeliaceae) inferred from ITS and  $\beta$ -tubulin sequences, morphology, anatomy and secondary chemistry. *Mycol. Prog.* 1: 335-354.
- THELL, A., T. FEUERER, I. KÄRNEFELT, L. MYLLYS & S. STENROOS (2004) Monophyletic groups within the Parmeliaceae identified by ITS rDNA,  $\beta$ -tubulin and GAPDH sequences. *Mycol. Prog.* 3: 297-314.
- THOMPSON, J.D., D.G. HIGGINS & T.J. GIBSON (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22:4673-4680.
- THOMSON, J.W. (1972) Distribution patterns of American arctic lichens. *Can. J. Bot.* 50: 1135-1156.
- THON, M.R. & D.J. ROYSE (1999) Partial  $\beta$ -tubulin gene sequences for evolutionary studies in the Basidiomycotina. *Mycologia* 91: 468-474.
- TORREY, J. (1823) Art. V. Description of a new species of *Usnea*, from New South Shetland. *Am. J. Sci.* 6: 104-106.
- TUFFLEY, C. & M. STEEL (1998) Modeling the covarion hypothesis of nucleotide substitution. *Math. Biosci.* 147: 63-91.
- VAN OPPEN, M.J.H., O.E. DIEKMANN, C. WIENCKE, W.T. STAM & J.L. OLSEN (1994) Tracking dispersal routes: Phylogeography of the Arctic-Antarctic disjunct seaweed *Acrosiphonia arcta* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 30: 67-80.
- VAN ZANTEN, B.O. & T. PÓCS (1981) Distribution and dispersal of bryophytes. *Adv. Bryol.* 1: 479-562.
- VAN ZINDEREN BAKKER, E.M. (1970) Quaternary climates and antarctic biogeography. In: *Antarctic ecology I* (M.W. HOLDGATE ed.) 31-40. London, UK.
- VARGAS, P. (2003) Molecular evidence for multiple diversification patterns of alpine plants in Mediterranean Europe. *Taxon* 52: 463-476.
- VOGLER, A.P. & R. DESALLE (1994) Diagnosing units of conservation management. *Conserv. Biol.* 8: 354-363.
- WALKER, F.J. (1985) The lichen genus *Usnea* subgenus *Neuropogon*. *Bull. Br. Mus. nat. Hist., (Bot.)* 13: 1-130.
- WEDIN, M., H. DÖRING & J.-E. MATTSSON (1999) A multi-gene study of the phylogenetic relationships of the Parmeliaceae. *Mycol. Res.* 103: 1185-1192.
- WEDIN, M. & E. WIKLUND (2004) The phylogenetic relationships of Lecanorales suborder Peltigerineae revisited. *Sym. Bot. Ups.* 34: 469-475.

- WHITE, F.J. & P.W. JAMES (1985) A new guide to microchemical techniques for the identification of lichen substances. *Brit. Lich. Soc. Bull.* 57: 1-41.
- WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE & J. TAYLOR (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (M.A. INNIS, D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY & T.J. WHITE eds.) 315-322. Academic Press, San Diego, USA.
- WHITTEMORE, A.T. (1993) Species concepts: a reply to Ernst Mayr. *Taxon* 42: 573-583.
- WIENS, J.J. & T.A. PENKROT (2002) Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Syst. Biol.* 51: 69-91.
- WILEY, E.O. (1978) The evolutionary species concept reconsidered. *Syst. Zool.* 72: 17-26.
- WILEY, E.O. & R.L. MAYDEN (2000) The evolutionary species concept. In: *Species Concepts and Phylogenetic Theory* (Q.D. WHEELER & R. MEIER eds.) 70-89. Columbia University Press, New York, USA.
- XIA, X., Z. XIE & K.M. KJER (2003) 18S ribosomal RNA and tetrapod phylogeny. *Syst. Biol.* 52: 283-295.
- YARNOLD, J.K. (1970) The minimum expectation in  $\chi^2$  goodness of fit tests and the accuracy of approximations for the null distribution. *J. A. Stat. Assoc.* 65: 864-886.
- ZAHLBRUCKNER, A. (1926) Lichenes. B. Spezieller Teil. In: *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, 2. Aufl., 8. (A. ENGLER ed.) 61-270. W. Engelmann, Leipzig.
- ZOLLER, S., F. LUTZONI & C. SCHEIDEGGER (1999) Genetic variation within and among populations of the threatened lichen *Lobaria pulmonaria* in Switzerland and implications for its conservation. *Mol. Ecol.* 8: 2049-2059.
- ZOPF, W. (1907) *Die Flechtenstoffe in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung*. G. Fischer Verlag, Jena.

## ANHANG

**Anhang 1:** Auflistung aller untersuchten Proben, die in die Eingen-Analysen der Phylogenie gestützten Artabgrenzung eingeflossen sind. Die Proben sind nach den ihnen zugeschriebenen Artnamen, bzw. aufgrund von Affinitäten bestimmten Arten zugeordnet. Für alle Proben sind Probennummer, Standort, Sammler, Herbarakronym, Sammelnummer und die jeweils gewonnenen DNA-Sequenzen aufgeführt. AAS= British Antarctic Survey, BG= University Bergen, C= University of Copenhagen, F= The Field Museum, FH= Harvard University, OTA= University of Otago, WIS= University of Wisconsin.

Art/ Probennummer	Standortangaben	Sammler	Herbar, Sammelnummer	DNA-Sequenzen		
				IGS	ITS	RPB1
<b><i>U. acanthella</i></b>						
168-1	Ecuador, P.N. Llanganates, 3200m	Z. Palice 20/03/2003		x	x	x
169-1	Ecuador, Carchi, Volc. Chiles, 4135m	Z. Palice 06/03/2003		x	x	x
169-2	Ecuador, Carchi, Volc. Chiles, 4135m	Z. Palice 06/03/2003		x	x	x
169-3	Ecuador, Carchi, Volc. Chiles, 4135m	Z. Palice 06/03/2003		x	x	x
169-4	Ecuador, Carchi, Volc. Chiles, 4135m	Z. Palice 06/03/2003		x	x	
169-5	Ecuador, Carchi, Volc. Chiles, 4135m	Z. Palice 06/03/2003		x	x	
171-1	Ecuador, Carchi, Volc. Chiles, 4250-4300m	Z. Palice 06/03/2003			x	
171-2	Ecuador, Carchi, Volc. Chiles, 4250-4300m	Z. Palice 06/03/2003		x	x	x
171-3	Ecuador, Carchi, Volc. Chiles, 4250-4300m	Z. Palice 06/03/2003		x	x	x
171-4	Ecuador, Carchi, Volc. Chiles, 4250-4300m	Z. Palice 06/03/2003		x	x	x
171-5	Ecuador, Carchi, Volc. Chiles, 4250-4300m	Z. Palice 06/03/2003		x	x	x
268-1	Peru, Cusco, Challabamba, PN Manu, 3500m	A. Ramírez 04/09/2004	F, Ramírez 1770	x	x	x
269-1	Peru, Cusco, Challabamba, PN Manu, 3600m	A. Ramírez 03/09/2004	F, Ramírez 1757	x	x	x
289-1	Peru, Ancash, PNH, Quebrada Ulta, 4800m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	F, HTL 19320e	x	x	x
289-2	Peru, Ancash, PNH, Quebrada Ulta, 4800m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	F, HTL 19320e	x	x	x
<b><i>U. acromelana</i></b>						
175-2	Tierra del Fuego, Glacier Martial	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19003a	x	x	x
175-3	Tierra del Fuego, Glacier Martial	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19003a	x	x	x
175-4	Tierra del Fuego, Glacier Martial	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19003a	x	x	x
175-5	Tierra del Fuego, Glacier Martial	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19003a	x	x	x
175-8	Tierra del Fuego, Glacier Martial	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19003a		x	
184-1	Tierra del Fuego, Glaciär Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
184-2	Tierra del Fuego, Glaciär Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
184-3	Tierra del Fuego, Glaciär Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
184-5	Tierra del Fuego, Glaciär Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
184-10	Tierra del Fuego, Glaciär Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	
188-1	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x
188-12	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x
188-13	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x		
188-15	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x
228-2	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12d	x		
280-1	Neuseeland, Otago, Pisa Range, 1700m	A. Knight 04/2003	OTA 57994		x	x
<b><i>U. cf. acromelana</i></b>						
200-4	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x
271-1	Neuseeland, MTierra Bengel, Black Treks' Creek, 1125m	D.J. Galloway 02/1997	OTA 57501	x		x
284-1	Neuseeland, Otago, Lammerlaw Range	D.J. Galloway 02/1998	OTA 57499	x		

**U. antarctica**

72	Antarktis, Marguerite Bay, Terra Firma	S. Ott 01/2001	F	x	x	x
113-1	Antarktis, King George Island, Admiralty Bay, 70m	J. Gloser 1/2001	F, Exsic. Vezda 461	x		
113-2	Antarktis, King George Island, Admiralty Bay, 70m	J. Gloser 1/2001	F, Exsic. Vezda 461	x		x
136-1	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Reinia Sofia, 100m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19013b	x	x	x
136-2	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Reinia Sofia, 100m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19013b	x	x	x
136-3	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Reinia Sofia, 100m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19013b	x	x	x
137-2	Antarktis, Livingston Island, Lago Escondido, 100m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19026j	x	x	x
137-3	Antarktis, Livingston Island, Lago Escondido, 100m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19026j	x	x	x
138-1	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Johnsons Dock	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19039a	x	x	x
138-2	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Johnsons Dock	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19039a	x	x	x
138-3	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Johnsons Dock	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19039a	x	x	x
138-4	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Johnsons Dock	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19039a	x	x	x
138-5	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Johnsons Dock	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19039a	x	x	x
138-6	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Johnsons Dock	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19039a	x	x	x
139-1	Antarktis, Livingston Island, nahe Sealer Hill, 10m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19029c	x	x	x
139-2	Antarktis, Livingston Island, nahe Sealer Hill, 10m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19029c	x	x	x
139-3	Antarktis, Livingston Island, nahe Sealer Hill, 10m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19029c		x	x
139-5	Antarktis, Livingston Island, nahe Sealer Hill, 10m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19029c	x	x	x
139-6	Antarktis, Livingston Island, nahe Sealer Hill, 10m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19029c	x	x	x
140-1	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Caleta Argentina	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19038a	x	x	x
140-2	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Caleta Argentina	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19038a	x	x	x
140-5	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Caleta Argentina	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19038a		x	
140-8	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Caleta Argentina	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19038a	x		
142-2	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Sallies Rocks	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19015b	x	x	x
142-3	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Sallies Rocks	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19015b	x	x	x
142-4	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Sallies Rocks	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19015b	x	x	x
142-5	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Sallies Rocks	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19015b	x	x	x
142-6	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Sallies Rocks	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19015b	x	x	x
144-1	Antarktis, Deception Island	B. Schroeter 02/2002	F	x	x	x
144-4	Antarktis, Deception Island	B. Schroeter 02/2002	F	x	x	
144-5	Antarktis, Deception Island	B. Schroeter 02/2002	F	x	x	x
148-1	Tierra del Fuego, Lapataia Bay	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19001b	x	x	x
148-2	Tierra del Fuego, Lapataia Bay	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19001b	x	x	x
148-3	Tierra del Fuego, Lapataia Bay	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19001b	x	x	x
194-1	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21b	x	x	x
194-2	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21b	x	x	x
194-3	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21b	x	x	x
194-4	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21b	x	x	x
194-5	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21b	x	x	x
194-6	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21b	x	x	x
194-7	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21b	x	x	x
194-8	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21b		x	x
194-9	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21b		x	
194-10	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21b	x	x	x

**U. cf. antarctica**

96-4	Antarktis, Marguerite Bay, Adelaide Isl., Rothera Point, 25m	R.I.L. Smith 1998	AAS 11482	x	x	x
97-5	Antarktis, Marguerite Bay, Adelaide Isl., Rothera beach, 5m	R.I.L. Smith 1998	AAS 98-261	x		

97-6	Antarktis, Marguerite Bay, Adelaide Isl., Rothera beach, 5m	R.I.L. Smith 1998	AAS 98-261	x	x	x
137-1	Antarktis, Livingston Island, Lago Escondido, 100m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19026j	x	x	x
183-1	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
183-2	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
183-3	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
236-1	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12	x	x	x
270-1	Neuseeland, Pisa Range, Locharburn Reserve, 920m	A. Knight 02/2003	OTA 58822	x	x	
281-3	Neuseeland, Otago, Pisa Range, 1700m	A. Knight 04/2003	OTA 57994	x	x	x
285-2	Neuseeland, Otago, Old Man Range	K. Spencer 11/2004	OTA 58829	x	x	x
<b><i>U. aurantiaco-atra</i></b>						
27	Antarktis, Livingston Island	B. Schroeter 2000	F	x		
33	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Caleta Argentina	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19038b	x		
35	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Caleta Argentina	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19038b	x		
37	Antarktis, King George Island	2002	F	x		
39	Antarktis, Livingston Island, Byers Peninsula, Cerro Negro	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19032a	x		
90-2	Antarktis, Marguerite Bay, Leonie Island, 15-30m	R.I.L. Smith 1995	AAS 9077	x		
112-1	Antarktis, King George Island, Admiralty Bay, 70m	K. Láska 1/2000	AAS	x	x	x
120-4	Antarktis, Livingston Island, Punta Hannah, 150m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19045b	x	x	x
120-5	Antarktis, Livingston Island, Punta Hannah, 150m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19045b	x	x	x
120-6	Antarktis, Livingston Island, Punta Hannah, 150m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19045b	x		
121-1	Antarktis, Livingston Island, Lago Escondido, 100m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19026a	x		
121-2	Antarktis, Livingston Island, Lago Escondido, 100m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19026a	x		
121-3	Antarktis, Livingston Island, Lago Escondido, 100m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19026a	x	x	x
121-5	Antarktis, Livingston Island, Lago Escondido, 100m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19026a	x		
121-6	Antarktis, Livingston Island, Lago Escondido, 100m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19026a	x		
123-1	Antarktis, Livingston Island, Sealer Hill, 10m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19030b	x	x	x
123-2	Antarktis, Livingston Island, Sealer Hill, 10m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19030b	x		
124-1	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Reina Sofia, 200m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19012b	x	x	x
124-2	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Reina Sofia, 200m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19012b	x		
124-3	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Reina Sofia, 200m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19012b	x		
124-6	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Reina Sofia, 200m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19012b	x		
125-8	Antarktis, Livingston Island, Smellie Point	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19018a	x	x	x
128-2	Antarktis, Livingston Island, Sealer Hill	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19029a	x	x	x
133-6	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Punta Hannah	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19045b	x	x	x
135-1	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Sallies Rocks	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19015a	x	x	x
135-4	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Sallies Rocks	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19015a	x	x	x
147-1	Antarktis, Deception Island	B. Schroeter 02/2002	F	x	x	x
147-2	Antarktis, Deception Island	B. Schroeter 02/2002	F	x		
147-3	Antarktis, Deception Island	B. Schroeter 02/2002	F	x	x	x
147-8	Antarktis, Deception Island	B. Schroeter 02/2002	F	x	x	x
147-12	Antarktis, Deception Island	B. Schroeter 02/2002	F	x	x	x
181-4	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
256-11	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 690m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-19a	x	x	x
256-14	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 690m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-19a	x	x	x
<b><i>U. cf. aurantiaco-atra</i></b>						
92-1	Antarktis, Signy Island, Poal Harbour, 120m	R.I.L. Smith 2000	AAS 10883	x	x	x
95-1	Antarktis, Deception Island, Entrance Point, 200m	R.I.L. Smith 2002	AAS 11482	x	x	x
95-3	Antarktis, Deception Island, Entrance Point, 200m	R.I.L. Smith 2002	AAS 11482	x	x	x

97-1	Antarktis, Marguerite Bay, Adelaide Island, Rothera beach, 5m	R.I.L. Smith 1998	AAS 98-261	x	x	x
107	Falkland Inseln, Port Stanley	P. Crittenden 2001	AAS	x	x	x
108-1	Antarktis, Marguerite Bay, Leonie Island, below Skua Highway	Mairi 14/02/2001	AAS	x	x	x
108-2	Antarktis, Marguerite Bay, Leonie Island, below Skua Highway	Mairi 14/02/2001	AAS	x		
111-1	Antarktis, Marguerite Bay, Leonie Island, South of Apple Hut	Mairi 14/02/2001	AAS	x	x	x
112-2	Antarktis, King George Island, Admiralty Bay, 70m	K. Láska 1/2000	AAS	x	x	x
120-3	Antarktis, Livingston Island, Punta Hannah, 150m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19045b	x	x	x
121-4	Antarktis, Livingston Island, Lago Escondido, 100m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19026a	x	x	x
124-4	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Reina Sofia, 200m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19012b	x	x	x
124-5	Antarktis, Livingston Island, South Bay, Reina Sofia, 200m	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19012b	x	x	x
181-1	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
199-5	Tierra del Fuego, Paso Garibaldi, 342m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-11a	x	x	x
199-11	Tierra del Fuego, Paso Garibaldi, 342m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-11a	x	x	x
235-1	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12a	x	x	x
235-2	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12a	x	x	x
235-11	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12a	x	x	x
235-12	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12a			x
240-1	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12	x	x	x
240-2	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12	x	x	x
<b><i>U. ciliata</i></b>						
275-1	Neuseeland, Otago, Mt. Bengier, 700-1000m	S. Hammer 01/2000	OTA 58543			x
276-1	Neuseeland, Otago, Remarkables	A. Marky 04/1999	OTA 49924	x	x	x
278-1	Neuseeland, Cone Peak, Otekaieke River, 800-1200m	A. Knight 10/1996	OTA 53657	x		x
287-1	Neuseeland, Otago, Old Man Range	K.Spencer 11/2004	OTA 58829	x	x	x
<b><i>U. cf. ciliata</i></b>						
277-1	Neuseeland, Otago, Lammerlaw, Deep Stream, 600m	D.J. Galloway 02/1998	OTA 53138	x		x
<b><i>U. durietzii</i></b>						
290-1	Peru, Ancash, PNH, Huarapasca, 4820m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	F, HTL 19364j	x	x	
290-2	Peru, Ancash, PNH, Huarapasca, 4820m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	F, HTL 19364j	x	x	x
290-11	Peru, Ancash, PNH, Huarapasca, 4820m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	F, HTL 19364j	x	x	x
<b><i>U. patagonica</i></b>						
191-1	Argentinien, Santa Cruz, El Calafate, 215m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-2	x	x	x
191-2	Argentinien, Santa Cruz, El Calafate, 215m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-2	x	x	x
191-3	Argentinien, Santa Cruz, El Calafate, 215m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-2	x	x	x
191-4	Argentinien, Santa Cruz, El Calafate, 215m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-2	x	x	x
<b><i>U. perpusilla</i></b>						
179-1	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
179-3	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
179-4	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
179-7	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
192-20	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1900m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-25a		x	x
192-21	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1900m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-25a	x	x	x
208-1	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1850m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-24	x	x	x
208-2	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1850m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-24	x	x	x

208-19	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1850m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-24	x	x	x
208-20	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1850m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-24		x	x
218-1	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26a	x	x	x
218-2	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26a	x	x	x
218-3	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26a	x	x	x
227-1	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
227-3	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
227-4	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
227-7	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
258-1	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 690m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-19	x	x	x
258-2	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 690m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-19	x	x	x
<b><i>U. aff. perpusilla</i></b>						
193-1	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1900m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-25b	x	x	
193-2	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1900m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-25b	x	x	x
193-3	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1900m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-25b	x	x	x
193-4	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1900m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-25b	x	x	x
193-5	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1900m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-25b	x	x	x
193-12	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1900m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-25b	x	x	x
193-13	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1900m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-25b	x	x	x
210-1	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1850m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-24	x	x	x
210-2	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 1850m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-24	x	x	x
221-1	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
221-2	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
221-3b	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
221-3c	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
222-1	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	
222-2	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
222-10	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
<b><i>U. sphacelata</i></b>						
41	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4900m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4291	x	x	x
42	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4900m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4291	x	x	x
43	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4900m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4291	x	x	
44	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4900m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4291	x	x	
45	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4900m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4291	x	x	
46	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4900m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4291	x	x	x
47	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4900m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4291	x	x	x
49	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4900m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4291	x	x	
50	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 5220m	Kulisek & Stancik 2000	Herb. Palice 4299	x	x	x
52	Ecuador, Chimborazo, NP Sangay, 4450m	Z. Palice 1999	Herb. Palice 3438	x	x	x
53	Ecuador, Chimborazo, NP Sangay, 4450m	Z. Palice 1999	Herb. Palice 3438	x	x	x
54	Ecuador, Chimborazo, NP Sangay, 4450m	Z. Palice 1999	Herb. Palice 3438	x	x	x
55	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 5050m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4501	x	x	x
56	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 5050m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4501	x	x	x
57	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 5050m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4501	x	x	x
58	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 5050m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4501	x	x	x
59	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 5050m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4501	x	x	x
60	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 5050m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4501	x	x	x
61	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 5050m	Z. Palice & Soldán 2000	Herb. Palice 4501	x	x	

62	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4600m	Z. Palice 1999	Herb. Palice 2614	x	x	x
63	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4600m	Z. Palice 1999	Herb. Palice 2614	x	x	x
65	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4600m	Z. Palice 1999	Herb. Palice 2614	x	x	
66	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4600m	Z. Palice 1999	Herb. Palice 2614	x	x	x
67	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4600m	Z. Palice 1999	Herb. Palice 2614	x	x	x
68	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4600m	Z. Palice 1999	Herb. Palice 2614	x		
69	Ecuador, Chimborazo, Vulkan, 4600m	Z. Palice 1999	Herb. Palice 2614	x		x
73	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis, Upper Terrace	S.Ott 01/2001	F	x	x	x
75	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis, Upper Terrace	S.Ott 01/2001	F	x		x
77	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis, Upper Terrace	S.Ott 01/2001	F	x	x	
78	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis, Upper Terrace	S.Ott 01/2001	F	x	x	x
79	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis, Upper Terrace	S.Ott 01/2001	F	x	x	x
80	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis, Upper Terrace	S.Ott 01/2001	F	x	x	x
100-1	Antarktis, Alexander Island, Mariner Hill, 635m	R.I.L. Smith 1997	AAS 10409	x	x	
102-1	Antarktis, Alexander Island, Coal Nunatak, 100m	R.I.L. Smith 1997	AAS 10445	x	x	x
102-2	Antarktis, Alexander Island, Coal Nunatak, 100m	R.I.L. Smith 1997	AAS 10445		x	
103-2	Antarktis, Alexander Island, Mount Wasilewski, 1616m	R.I.L. Smith 1997	AAS 10567	x	x	x
105-6	Antarktis, Marguerite Bay, Adelaide Isl., Reptile Ridge, 175m	R.I.L. Smith 1998	AAS 10637		x	x
114-1	Spitsbergen, Svalbard, Mt Heimdalkampen, 240 m	T. Tønberg 07/2002	BG 31236	x	x	
114-2	Spitsbergen, Svalbard, Mt Heimdalkampen, 240 m	T. Tønberg 07/2002	BG 31236	x	x	x
114-3	Spitsbergen, Svalbard, Mt Heimdalkampen, 240 m	T. Tønberg 07/2002	BG 31236	x		
115-4	Spitsbergen, Svalbard, Mt Heimdalkampen, 320 m	T. Tønberg 07/2002	BG 31237a	x		
115-5	Spitsbergen, Svalbard, Mt Heimdalkampen, 320 m	T. Tønberg 07/2002	BG 31237a	x	x	x
115-8	Spitsbergen, Svalbard, Mt Heimdalkampen, 320 m	T. Tønberg 07/2002	BG 31237a	x	x	x
115-11	Spitsbergen, Svalbard, Mt Heimdalkampen, 320 m	T. Tønberg 07/2002	BG 31237a	x	x	x
116-1	Spitsbergen, Svalbard, Ringhorndalen, 330-340 m	T. Tønberg 07/2002	BG 31279	x	x	x
116-2	Spitsbergen, Svalbard, Ringhorndalen, 330-340 m	T. Tønberg 07/2002	BG 31279	x	x	x
117-1	Spitsbergen, Svalbard	Printzen 2002	Herb. Printzen 6982	x	x	x
117-2	Spitsbergen, Svalbard	Printzen 2002	Herb. Printzen 6982	x	x	x
118-1	Spitsbergen, Svalbard	Printzen 2002	Herb. Printzen 7002	x	x	x
119-1	Spitsbergen, Svalbard	Printzen 2002	Herb. Printzen 7120	x	x	x
149-1	Island, Central Highlands, Neðribotnar, 740m	S. Heiðmarsson 08/2002	F, Heiðmarsson 29380	x	x	x
150-1	Island, Eyjafjarðarsýla, Kerling Mts., 800m	H. Arinbjarnarson 09/2002	F	x	x	x
150-2	Island, Eyjafjarðarsýla, Kerling Mts., 800m	H. Arinbjarnarson 09/2002	F	x	x	x
151-1	Island, Skagafjarðarsýla, Pverdrag pass, 680m	S. Heiðmarsson 2002	F, Heiðmarsson 28913	x	x	x
151-2	Island, Skagafjarðarsýla, Pverdrag pass, 680m	S. Heiðmarsson 2002	F, Heiðmarsson 28913	x	x	x
152-1	Island, INo, Skagafjarðarsýsla, ca. 600m	S. Heiðmarsson 2002	F, Heiðmarsson 28914	x	x	
152-4	Island, INo, Skagafjarðarsýsla, ca. 600m	S. Heiðmarsson 2002	F, Heiðmarsson 28914	x	x	x
152-5	Island, INo, Skagafjarðarsýsla, ca. 600m	S. Heiðmarsson 2002	F, Heiðmarsson 28914	x	x	x
152-6	Island, INo, Skagafjarðarsýsla, ca. 600m	S. Heiðmarsson 2002	F, Heiðmarsson 28914	x	x	x
153-2	Island, Eyjafjarðarsýsla, Öxnadalur Tal, 460m	S. Heiðmarsson 2002	F, Heiðmarsson 28916	x	x	x
162-1	Antarktis, Marguerite Bay, Leonie Island	S. Ott 2001	F	x	x	
162-2	Antarktis, Marguerite Bay, Leonie Island	S. Ott 2001	F	x	x	x
165-2	Antarktis, Marguerite Bay, Lagoon Island	S. Ott 1999	F	x	x	x
166-1	Antarktis, Victoria Land, Nunatak, 80°S	L. Sancho & A. Green 01/2003	F	x	x	
166-2	Antarktis, Victoria Land, Nunatak, 80°S	L. Sancho & A. Green 01/2003	F	x	x	x
166-3	Antarktis, Victoria Land, Nunatak, 80°S	L. Sancho & A. Green 01/2003	F	x	x	x
167-1	Antarktis, Victoria Land, Nunatak, 80°S	L. Sancho & A. Green 01/2003	F	x	x	x
167-2	Antarktis, Victoria Land, Nunatak, 80°S	L. Sancho & A. Green 01/2003	F	x	x	x
167-6	Antarktis, Victoria Land, Nunatak, 80°S	L. Sancho & A. Green 01/2003	F	x	x	x

174-1	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis, 120m	S. Ott 12/1998	F	x		
174-2	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis, 120m	S. Ott 12/1998	F	x		x
174-4	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis, 120m	S. Ott 12/1998	F			x
174-5	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis, 120m	S. Ott 12/1998	F	x	x	x
178-1	Antarktis, Wilkes Land, Casey Station, 300m	P. Crittenden 1995	F	x	x	x
178-2	Antarktis, Wilkes Land, Casey Station, 300m	P. Crittenden 1995	F	x	x	x
229-1	Antarktis, Marguerite Bay, Adelaide Island, Reptile Ridge	F. Seymour	F, Seymour 217	x	x	x
230-1	Antarktis, Marguerite Bay, Adelaide Island, Rothera Point	F. Seymour	F, Seymour 234	x	x	x
230-2	Antarktis, Marguerite Bay, Adelaide Island, Rothera Point	F. Seymour	F, Seymour 235	x	x	x
230-3	Antarktis, Marguerite Bay, Adelaide Island, Rothera Point	F. Seymour	F, Seymour 237	x	x	x
231-1	Antarktis, Marguerite Bay, Lagoon Island Hills	F. Seymour	F, Seymour 242	x		
232-1	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis Ridge	F. Seymour	F, Seymour 243	x	x	x
232-2	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis Ridge	F. Seymour	F, Seymour 244	x	x	x
232-3	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis Ridge	F. Seymour	F, Seymour 245	x	x	x
233-1	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis Terrace	F. Seymour	F, Seymour 270	x	x	x
233-2	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis Terrace	F. Seymour	F, Seymour 271	x	x	x
233-3	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis Terrace	F. Seymour	F, Seymour 272	x	x	x
243-1	Grönland, Disko, Skarvefjeld, 840m	A.V. Larsen 07/1996	C 53/2004 1	x	x	x
243-2	Grönland, Disko, Skarvefjeld, 840m	A.V. Larsen 07/1996	C 53/2004 1	x	x	x
243-3	Grönland, Disko, Skarvefjeld, 840m	A.V. Larsen 07/1996	C 53/2004 1	x	x	x
243-4	Grönland, Disko, Skarvefjeld, 840m	A.V. Larsen 07/1996	C 53/2004 1		x	
244-1	Kanada, Melville Island, 20m	G.W. Scotter 07/1992	WIS 99109	x	x	x
244-2	Kanada, Melville Island, 20m	G.W. Scotter 07/1992	WIS 99109	x	x	x
244-3	Kanada, Melville Island, 20m	G.W. Scotter 07/1992	WIS 99109	x	x	x
244-5	Kanada, Melville Island, 20m	G.W. Scotter 07/1992	WIS 99109	x	x	x
244-6	Kanada, Melville Island, 20m	G.W. Scotter 07/1992	WIS 99109	x		
245-1	Grönland, NW, Thule, Air Base	V. Alstrup 08/1992	WIS Ex. Groenlandi. 466	x	x	x
245-2	Grönland, NW, Thule, Air Base	V. Alstrup 08/1992	WIS Ex. Groenlandi. 466	x	x	x
245-3	Grönland, NW, Thule, Air Base	V. Alstrup 08/1992	WIS Ex. Groenlandi. 466	x	x	x
245-4	Grönland, NW, Thule, Air Base	V. Alstrup 08/1992	WIS Ex. Groenlandi. 466	x	x	x
245-6	Grönland, NW, Thule, Air Base	V. Alstrup 08/1992	WIS Ex. Groenlandi. 466	x		
249-1	Mexiko, Mt. Orizaba, Citlaltepétl, 14800 ft.	I.M. Lamb 08/1966	FH	x		
249-2	Mexiko, Mt. Orizaba, Citlaltepétl, 14800 ft.	I.M. Lamb 08/1966	FH	x	x	
250-1	USA, Oregon, Mt. Hood NF, 2075m	B. McCune 07/1994	Coll. B. McCune 21656	x		
250-2	USA, Oregon, Mt. Hood NF, 2075m	B. McCune 07/1994	Coll. B. McCune 21656	x	x	x
250-3	USA, Oregon, Mt. Hood NF, 2075m	B. McCune 07/1994	Coll. B. McCune 21656	x	x	x
250-4	USA, Oregon, Mt. Hood NF, 2075m	B. McCune 07/1994	Coll. B. McCune 21656	x		
251-1	USA, Washington, Mt. Adams, 2105m	B. McCune 08/1999	Coll. B. McCune 24722	x		
251-2	USA, Washington, Mt. Adams, 2105m	B. McCune 08/1999	Coll. B. McCune 24722	x	x	x
251-3	USA, Washington, Mt. Adams, 2105m	B. McCune 08/1999	Coll. B. McCune 24722	x	x	x
251-4	USA, Washington, Mt. Adams, 2105m	B. McCune 08/1999	Coll. B. McCune 24722	x	x	x
291-1	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis, Upper Terrace	S.Ott 01/2001	F	x	x	x
<b><i>U. cf. sphaelata</i></b>						
200-1	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x
203-1	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x
203-2	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x
203-3	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x
203-6	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x
203-9	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x



226-1	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
226-4	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
226-6	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
227-2	Argentinien, Rio Negro, Cerro Catedral, 2200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-26	x	x	x
237-1	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12	x	x	x
237-2	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12	x	x	x
238-1	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12	x	x	x
239-1	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12	x	x	x
241-1	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12	x	x	x
253-1	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 578m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-17	x	x	x
253-2	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 578m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-17	x	x	x
263-1	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 690m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-19	x	x	x
266-1	Peru, Ancash, Nevado Pastoruri, 4820m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	F, HTL 19364i	x	x	x
266-2	Peru, Ancash, Nevado Pastoruri, 4820m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	F, HTL 19364i	x	x	x
266-3	Peru, Ancash, Nevado Pastoruri, 4820m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	F, HTL 19364i	x	x	x
267-1	Peru, Ancash, PNH, Quebrada Ulta, 4800m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	F, HTL 19320f	x	x	x
267-2	Peru, Ancash, PNH, Quebrada Ulta, 4800m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	F, HTL 19320f	x	x	x
267-3	Peru, Ancash, PNH, Quebrada Ulta, 4800m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	F, HTL 19320f	x	x	x
272-1	Neuseeland, Mt. Benger, Black Treks' Creek, 1125m	D.J. Galloway 02/1997	OTA 57502	x		
282-1	Neuseeland, Otago, Pisa Range, 1700m	A. Knight 04/2003	OTA 57994	x	x	x
288-1	Peru, Ancash, Quebrada Ulta, 4800m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	HTL 19320b	x	x	x
288-2	Peru, Ancash, Quebrada Ulta, 4800m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	HTL 19320b	x	x	x
288-3	Peru, Ancash, Quebrada Ulta, 4800m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	HTL 19320b	x	x	x
288-4	Peru, Ancash, Quebrada Ulta, 4800m	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004	HTL 19320b	x	x	x
292-1	Antarktis, Alexander Island, Mars Oasis, Upper Terrace	S.Ott 01/2001	F	x	x	x
295-1	USA, Mt. Adams, Gifford Pinchot N.F., 7700ft	J. Riley 08/1995	Randle Ranger Herb. 03C 93285	x		
<b><i>U. subcapillaris</i></b>						
283-1	Neuseeland, Otago, Old Man Range, 1570m	D.J. Galloway 02/1999	OTA 53656	x	x	x
283-2	Neuseeland, Otago, Old Man Range, 1570m	D.J. Galloway 02/1999	OTA 53656	x		x
286-1	Neuseeland, Old Man Range	K. Spencer 11/2004	OTA 58829	x	x	x
<b><i>U. trachycarpa</i></b>						
163-2	Marguerite Bay, Adelaide Island, Reptile Ridge	S. Ott 1999	F		x	x
165-1	Antarktis, Marguerite Bay, Lagoon Island	S. Ott 1999	F		x	
173-1	Tierra del Fuego, P.N., Lapataia Bay	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19001a	x	x	x
173-2	Tierra del Fuego, P.N., Lapataia Bay	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19001a	x	x	x
173-3	Tierra del Fuego, P.N., Lapataia Bay	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19001a	x	x	x
173-4	Tierra del Fuego, P.N., Lapataia Bay	H.T. Lumbsch 2002	F, HTL 19001a		x	
182-1	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
182-2	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
182-3	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 710m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-20	x	x	x
186-1	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-7	x	x	x
186-2	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-7	x	x	x
186-3	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-7	x	x	x
186-8	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-7	x	x	x
186-9	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-7	x	x	x
190-1	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x
190-2	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x

190-3	Argentinien, Santa Cruz, El Chalten, 800m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-1	x	x	x
196-1	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21a	x	x	x
196-2	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21a	x	x	x
196-3	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21a	x	x	x
196-5	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21a	x	x	x
196-6	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21a	x	x	x
197-1	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21a	x	x	x
197-2	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21a	x	x	x
197-3	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21a	x	x	x
197-5	Argentinien, Santa Cruz, Monte Aymond, 200m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-21a	x	x	x
234-1	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12b	x	x	x
234-2	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12b	x	x	x
264-1	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 690m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-19	x	x	x
264-3	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 690m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-19	x	x	
<b><i>U. cf. trachycarpa</i></b>						
164-1	Antarktis, Marguerite Bay, Lagoon Island, Strand	S. Ott 2001	F	x	x	x
164-3	Antarktis, Marguerite Bay, Lagoon Island, Strand	S. Ott 2001	F	x	x	
234-3	Tierra del Fuego, Lapataia Bay, 55m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-12b	x	x	x
265-1	Tierra del Fuego, Glaciar Martial, 690m	N. Wirtz & M.I. Messuti 12/2003	F, PA-19	x	x	x
<b><u>N 421</u></b>				<b><u>399</u></b>	<b><u>371</u></b>	<b><u>350</u></b>

**Anhang 2:** Auflistung der 308 untersuchten Proben des kombinierten Datensatz. Mit \* sind die Individuen gekennzeichnet, die in die drei Gruppen *U. trachycarpa*, *U. perpusilla* und *U. aurantiaco-atra* fallen und in die Netzwerkanalysen eingegangen sind. Die Proben sind nach diesen Gruppen und den Arten innerhalb der Gruppen geordnet bzw. als Außengruppe gekennzeichnet. Für alle Proben sind die Probennummern, Populationen mit Abkürzung, geographischen Koordinaten, Sammler und Datum angegeben. AR= Argentinien, AN= Antarktis, NZ= Neuseeland, TdF= Tierra del Fuego.

Art/Probennummer	Standortangaben der Populationen	Kürzel	Breitengrad	Längengrad	Sammler/ Datum
<b><i>U. aurantiaco-atra</i>-Gruppe</b>					
<b><i>U. acromelana</i></b>					
237-2*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
175-2*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	H.T. Lumbsch 2002
175-3	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	H.T. Lumbsch 2002
175-4	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	H.T. Lumbsch 2002
175-5*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	H.T. Lumbsch 2002
184-2*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
184-3*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
184-5*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
253-1*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
253-2*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
188-1*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
188-12*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
188-15*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
<b><i>U. aurantiaco-atra/ U. antarctica</i></b>					
72*	AN, Terra Firma	MTEF	68°42'S	67°32'W	S. Ott 01/2001
108-1*	AN, Leonie Island	MLEO	67°36'S	68°21'W	Mairi 02/2001
111-1*	AN, Leonie Island	MLEO	67°36'S	68°21'W	Mairi 02/2001
96-4*	AN, Adelaide Island, Rothera	MARO	67°34'S	68°08'W	R.I.L. Smith 1998
97-6*	AN, Adelaide Island, Rothera	MARO	67°34'S	68°08'W	R.I.L. Smith 1998
97-1*	AN, Adelaide Island, Rothera	MARO	67°34'S	68°08'W	R.I.L. Smith 1998
144-1*	AN, Deception Island	SDEC	62°59'S	60°41'W	B. Schroeter 02/2002
144-5*	AN, Deception Island	SDEC	62°59'S	60°41'W	B. Schroeter 02/2002
147-1*	AN, Deception Island	SDEC	62°59'S	60°41'W	B. Schroeter 02/2002
147-3*	AN, Deception Island	SDEC	62°59'S	60°41'W	B. Schroeter 02/2002
147-8*	AN, Deception Island	SDEC	62°59'S	60°41'W	B. Schroeter 02/2002
147-12*	AN, Deception Island	SDEC	62°59'S	60°41'W	B. Schroeter 02/2002
95-1*	AN, Deception Island	SDEC	62°59'S	60°41'W	R.I.L. Smith 2002
95-3*	AN, Deception Island	SDEC	62°59'S	60°41'W	R.I.L. Smith 2002
121-3*	AN, Livingston Island, Byers Peninsula	SLBP	62°40'S	61°05'W	H.T. Lumbsch 2002
121-4*	AN, Livingston Island, Byers Peninsula	SLBP	62°40'S	61°05'W	H.T. Lumbsch 2002
123-1*	AN, Livingston Island, Byers Peninsula	SLBP	62°40'S	61°05'W	H.T. Lumbsch 2002
125-8*	AN, Livingston Island, Byers Peninsula	SLBP	62°40'S	61°05'W	H.T. Lumbsch 2002
128-2*	AN, Livingston Island, Byers Peninsula	SLBP	62°40'S	61°05'W	H.T. Lumbsch 2002
137-1*	AN, Livingston Island, Byers Peninsula	SLBP	62°40'S	61°05'W	H.T. Lumbsch 2002
137-2*	AN, Livingston Island, Byers Peninsula	SLBP	62°40'S	61°05'W	H.T. Lumbsch 2002
137-3*	AN, Livingston Island, Byers Peninsula	SLBP	62°40'S	61°05'W	H.T. Lumbsch 2002
139-1*	AN, Livingston Island, Byers Peninsula	SLBP	62°40'S	61°05'W	H.T. Lumbsch 2002
139-2*	AN, Livingston Island, Byers Peninsula	SLBP	62°40'S	61°05'W	H.T. Lumbsch 2002
139-5*	AN, Livingston Island, Byers Peninsula	SLBP	62°40'S	61°05'W	H.T. Lumbsch 2002
139-6*	AN, Livingston Island, Byers Peninsula	SLBP	62°40'S	61°05'W	H.T. Lumbsch 2002
120-3*	AN, Livingston Island, Punta Hannah	SLPH	62°39'S	60°32'W	H.T. Lumbsch 2002
120-4*	AN, Livingston Island, Punta Hannah	SLPH	62°39'S	60°32'W	H.T. Lumbsch 2002
120-5*	AN, Livingston Island, Punta Hannah	SLPH	62°39'S	60°32'W	H.T. Lumbsch 2002
133-6*	AN, Livingston Island, Punta Hannah	SLPH	62°39'S	60°32'W	H.T. Lumbsch 2002
124-1*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
124-4*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
124-5*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
135-1*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
135-4*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
136-1*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
136-2*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
136-3*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
138-1*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
138-2*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002

Art/Probennummer	Standortangaben der Populationen	Kürzel	Breitengrad	Längengrad	Sammler/ Datum
138-3*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
138-4*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
138-5*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
138-6*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
140-1*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
140-2*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
142-2*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
142-3*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
142-4*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
142-5*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
142-6*	AN, Livingston Island, South Bay	SLSB	62°39'S	60°23'W	H.T. Lumbsch 2002
112-1*	AN, King George Island	SSKG	62°14'S	58°38'W	K. Láska 01/2000
112-2*	AN, King George Island	SSKG	62°14'S	58°38'W	K. Láska 01/2000
113-2*	AN, King George Island	SSKG	62°14'S	58°38'W	J. Gloser 01/2001
92-1*	Süd-Orkney Inseln, Signy Island	SIGY	60°43'S	45°38'W	R.I.L. Smith 2000
107*	Falkland Inseln, Port Stanley	FALK	51°45'S	57°56'W	P. Crittenden 2001
148-1*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	H.T. Lumbsch 2002
148-2*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	H.T. Lumbsch 2002
148-3*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	H.T. Lumbsch 2002
234-3*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
235-1*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
235-2*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
236-1*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
238-1*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
239-1*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
240-1*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
240-2*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
241-1*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
181-1*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
181-4*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
183-1*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
183-2*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
256-11*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
256-14*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
199-11*	TdF, Paso Garibaldi	TFPG	54°41'S	67°50'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
199-5*	TdF, Paso Garibaldi	TFPG	54°41'S	67°50'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
194-1*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
194-2*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
194-3*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
194-4*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
194-5*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
194-6*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
194-7*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
194-10*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
189-1*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
200-4*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
206-1*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
207-1*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
<b><i>U. perpusilla</i>-Gruppe</b>					
<b><i>U. perpusilla</i></b>					
235-11*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
179-1*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
179-3*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
179-4*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
179-7*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
180-1*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
258-1*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
258-2*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
263-1*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
192-21*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
208-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
208-2*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003

Art/Probennummer	Standortangaben der Populationen	Kürzel	Breitengrad	Längengrad	Sammler/ Datum
208-19*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
218-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
218-2*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
218-3*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
221-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
221-2*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
221-3b*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
221-3c*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
222-10*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
222-2*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
227-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
227-3	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
227-4*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
227-7*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
<b>Usnea sp. 1</b>					
189-2*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
190-3*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
201-1*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
201-2*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
204-1*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
204-2*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
204-4*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
205-3*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
209-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
209-3*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
41*	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice, Soldán 2000
46*	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice, Soldán 2000
47*	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice, Soldán 2000
66*	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice 1999
<b>U. sphacelata 2</b>					
166-2*	AN, Victoria Land, Nunatak	AROS	80°01'S	166°46'E	L. Sancho, A. Green 01/2003
166-3*	AN, Victoria Land, Nunatak	AROS	80°01'S	166°46'E	L. Sancho, A. Green 01/2003
167-1*	AN, Victoria Land, Nunatak	AROS	80°01'S	166°46'E	L. Sancho, A. Green 01/2003
167-2*	AN, Victoria Land, Nunatak	AROS	80°01'S	166°46'E	L. Sancho, A. Green 01/2003
167-6*	AN, Victoria Land, Nunatak	AROS	80°01'S	166°46'E	L. Sancho, A. Green 01/2003
178-1*	AN, Casey Station	ACSY	66°17'S	110°32'E	P. Crittenden 1995
178-2*	AN, Casey Station	ACSY	66°17'S	110°32'E	P. Crittenden 1995
103-2*	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	R.I.L. Smith 1997
232-1*	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	F. Seymour
232-2*	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	F. Seymour
232-3*	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	F. Seymour
292-1*	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	S.Ott 01/2001
229-1*	AN, Adelaide Island, Reptile Ridge	MARR	67°36'S	68°20'W	F. Seymour
230-1*	AN, Adelaide Island, Rothera	MARO	67°34'S	68°08'W	F. Seymour
230-2*	AN, Adelaide Island, Rothera	MARO	67°34'S	68°08'W	F. Seymour
230-3*	AN, Adelaide Island, Rothera	MARO	67°34'S	68°08'W	F. Seymour
211-2*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
212-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
215-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
215-2*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
216-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
219-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
219-2*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
221-3a*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
221-3d*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
223-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
224-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
227-2	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
42*	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice, Soldán 2000
60*	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice, Soldán 2000
250-2*	USA, Oregon, Mt. Hood	NORG	45°22'N	121°41'W	B. McCune 07/1994
250-3*	USA, Oregon, Mt. Hood	NORG	45°22'N	121°41'W	B. McCune 07/1994

Art/Probennummer	Standortangaben der Populationen	Kürzel	Breitengrad	Längengrad	Sammler/ Datum
251-2*	USA, Washington, Mt. Adams	NWAS	46°12'N	121°29'W	B. McCune 08/1999
251-3*	USA, Washington, Mt. Adams	NWAS	46°12'N	121°29'W	B. McCune 08/1999
251-4*	USA, Washington, Mt. Adams	NWAS	46°12'N	121°29'W	B. McCune 08/1999
<b>Usnea sp. nov. 1</b>					
193-2*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
193-4	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
193-5*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
193-12*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
193-13*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
210-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
210-2*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
213-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
<b>U. trachycarpa-Gruppe</b>					
<b>U. sphacelata 1</b>					
189-3	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
220-3*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
220-4*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
225-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
225-2*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
226-1*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
226-6*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
52*	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice 1999
53*	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice 1999
54*	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice 1999
56*	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice, Soldán 2000
50*	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Kulíšek, Stancík 2000
244-1*	Kanada, Melville Island	KAMV	75°19'N	114°43'W	G.W. Scotter 07/1992
244-2*	Kanada, Melville Island	KAMV	75°19'N	114°43'W	G.W. Scotter 07/1992
244-3*	Kanada, Melville Island	KAMV	75°19'N	114°43'W	G.W. Scotter 07/1992
244-5*	Kanada, Melville Island	KAMV	75°19'N	114°43'W	G.W. Scotter 07/1992
149-1*	Island, Zentrales Hochland	ISLA	64°45'N	18°15'W	S. Heiðmarsson 08/2002
150-1*	Island, Zentrales Hochland	ISLA	64°45'N	18°15'W	H. Arinbjarnarson 9/2002
150-2*	Island, Zentrales Hochland	ISLA	64°45'N	18°15'W	H. Arinbjarnarson 9/2002
153-2*	Island, Zentrales Hochland	ISLA	64°45'N	18°15'W	S. Heiðmarsson 2002
152-4*	Island, Zentrales Hochland	ISLA	64°45'N	18°15'W	S. Heiðmarsson 2002
152-5*	Island, Zentrales Hochland	ISLA	64°45'N	18°15'W	S. Heiðmarsson 2002
152-6*	Island, Zentrales Hochland	ISLA	64°45'N	18°15'W	S. Heiðmarsson 2002
151-1*	Island, Zentrales Hochland	ISLA	64°45'N	18°15'W	S. Heiðmarsson 2002
151-2*	Island, Zentrales Hochland	ISLA	64°45'N	18°15'W	S. Heiðmarsson 2002
243-1*	Grönland, Disko	GRDK	69°16'N	53°35'W	A.V. Larsen 07/1996
243-2*	Grönland, Disko	GRDK	69°16'N	53°35'W	A.V. Larsen 07/1996
243-3*	Grönland, Disko	GRDK	69°16'N	53°35'W	A.V. Larsen 07/1996
245-1*	Grönland, Thule	GRTH	76°31'N	68°24'W	V. Alstrup 08/1992
245-2*	Grönland, Thule	GRTH	76°31'N	68°24'W	V. Alstrup 08/1992
245-3*	Grönland, Thule	GRTH	76°31'N	68°24'W	V. Alstrup 08/1992
245-4*	Grönland, Thule	GRTH	76°31'N	68°24'W	V. Alstrup 08/1992
114-2*	Spitzbergen, Svalbard	SPIZ	79°17'N	16°04'E	T. Tønberg 07/2002
115-5*	Spitzbergen, Svalbard	SPIZ	79°17'N	16°04'E	T. Tønberg 07/2002
115-8*	Spitzbergen, Svalbard	SPIZ	79°17'N	16°04'E	T. Tønberg 07/2002
115-11*	Spitzbergen, Svalbard	SPIZ	79°17'N	16°04'E	T. Tønberg 07/2002
116-1*	Spitzbergen, Svalbard	SPIZ	79°17'N	16°04'E	T. Tønberg 07/2002
116-2*	Spitzbergen, Svalbard	SPIZ	79°17'N	16°04'E	T. Tønberg 07/2002
117-1*	Spitzbergen, Svalbard	SPIZ	79°17'N	16°04'E	C. Printzen 2002
117-2*	Spitzbergen, Svalbard	SPIZ	79°17'N	16°04'E	C. Printzen 2002
118-1*	Spitzbergen, Svalbard	SPIZ	79°17'N	16°04'E	C. Printzen 2002
119-1	Spitzbergen, Svalbard	SPIZ	79°17'N	16°04'E	C. Printzen 2002
<b>U. subantarctica</b>					
73*	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	S.Ott 01/2001
78	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	S.Ott 01/2001
233-1*	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	F. Seymour
291-1*	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	S.Ott 01/2001
165-2*	AN, Lagoon Island	MLAG	67°36'S	68°16'W	S. Ott 1999

Art/Probennummer	Standortangaben der Populationen	Kürzel	Breitengrad	Längengrad	Sammler/ Datum
234-2*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
264-1*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
265-1*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
182-2*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
190-2*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz/ M.I. Messuti 12/2003
200-1*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz/ M.I. Messuti 12/2003
203-1*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz/ M.I. Messuti 12/2003
203-11*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz/ M.I. Messuti 12/2003
203-13*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz/ M.I. Messuti 12/2003
203-14*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz/ M.I. Messuti 12/2003
203-2*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz/ M.I. Messuti 12/2003
203-3*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz/ M.I. Messuti 12/2003
203-6*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz/ M.I. Messuti 12/2003
203-9*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz/ M.I. Messuti 12/2003
205-1*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz/ M.I. Messuti 12/2003
<b><i>U. trachycarpa 1</i></b>					
102-1*	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	R.I.L. Smith 1997
233-2*	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	F. Seymour
233-3*	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	F. Seymour
174-5*	AN, Alexander Island, Mars Oasis	ALEX	71°52'S	68°15'W	S. Ott 12/1998
162-2*	AN, Leonie Island	MLEO	67°36'S	68°21'W	S. Ott 2001
164-1*	AN, Lagoon Island	MLAG	67°36'S	68°16'W	S. Ott 2001
234-1*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
237-1*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
173-1*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	H.T. Lumbsch 2002
173-3*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	H.T. Lumbsch 2002
186-3*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
186-9*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
196-3*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
197-1*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
197-3*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
190-1*	AR, Santa Cruz, El Chalten	SCEL	49°02'S	72°55'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
226-4*	AR, Rio Negro, Bariloche, C. Catedral	RNBA	41°16'S	71°20'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
57*	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice, Soldán 2000
<b><i>U. trachycarpa 2</i></b>					
173-2*	TdF, Lapataia Bay	TFLP	54°50'S	68°26'W	H.T. Lumbsch 2002
182-1*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
182-3*	TdF, Glaciar Martial	TFGM	54°47'S	68°24'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
186-2*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
186-8*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
196-2*	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
<b>Außengruppen</b>					
<b><i>U. acanthella</i></b>					
268-1	Peru, Cusco, Challabamba	PCUS	13°11'S	71°37'W	A. Ramírez 09/04
269-1	Peru, Cusco, Challabamba	PCUS	13°11'S	71°37'W	A. Ramírez 09/04
289-1	Peru, Ancash, P. N. Huascarán	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
289-2	Peru, Ancash, P. N. Huascarán	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
168-1	Ecuador, Tungurahua, Llangamates	ECTU	01°15'S	78°30'W	Z. Palice 03/2003
169-1	Ecuador, Carchi, Volcano Chiles	ECCA	00°48'N	77°56'W	Z. Palice 03/2003
169-2	Ecuador, Carchi, Volcano Chiles	ECCA	00°48'N	77°56'W	Z. Palice 03/2003
169-3	Ecuador, Carchi, Volcano Chiles	ECCA	00°48'N	77°56'W	Z. Palice 03/2003
171-2	Ecuador, Carchi, Volcano Chiles	ECCA	00°48'N	77°56'W	Z. Palice 03/2003
171-3	Ecuador, Carchi, Volcano Chiles	ECCA	00°48'N	77°56'W	Z. Palice 03/2003

Art/Probennummer	Standortangaben der Populationen	Kürzel	Breitengrad	Längengrad	Sammler/ Datum
171-4	Ecuador, Carchi, Volcano Chiles	ECCA	00°48'N	77°56'W	Z. Palice 03/2003
171-5	Ecuador, Carchi, Volcano Chiles	ECCA	00°48'N	77°56'W	Z. Palice 03/2003
<b><i>U. patagonica</i></b>					
191-1	AR, Santa Cruz, El Calafate	SCCF	50°28'S	72°47'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
191-2	AR, Santa Cruz, El Calafate	SCCF	50°28'S	72°47'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
191-3	AR, Santa Cruz, El Calafate	SCCF	50°28'S	72°47'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
191-4	AR, Santa Cruz, El Calafate	SCCF	50°28'S	72°47'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
195-1	AR, Santa Cruz, Monte Aymond	SCMA	52°07'S	69°31'W	N. Wirtz, M.I. Messuti 12/2003
266-1	Peru, Ancash, P. N. Huascaran	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
266-2	Peru, Ancash, P. N. Huascaran	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
266-3	Peru, Ancash, P. N. Huascaran	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
290-11	Peru, Ancash, P. N. Huascaran	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
62	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice 1999
63	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice 1999
67	Ecuador, Chimborazo	ECUA	01°20'S	75°05'W	Z. Palice 1999
<b><i>Usnea sp. nov 2</i></b>					
267-1	Peru, Ancash, P. N. Huascaran	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
267-2	Peru, Ancash, P. N. Huascaran	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
267-3	Peru, Ancash, P. N. Huascaran	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
288-1	Peru, Ancash, P. N. Huascaran	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
288-2	Peru, Ancash, P. N. Huascaran	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
288-3	Peru, Ancash, P. N. Huascaran	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
288-4	Peru, Ancash, P. N. Huascaran	PAHU	09°20'S	77°20'W	N. Wirtz, H.T. Lumbsch & A. Ramírez 11/2004
<b><i>Usnea aus NZ</i></b>					
276-1	NZ, Otago, Remarkables	NZ			A. Marky 04/1999
281-3	NZ, Otago, Pisa Range	NZ			A. Knight 04/2003
282-1	NZ, Otago, Pisa Range	NZ			A. Knight 04/2003
283-1	NZ, Otago, Old Man Range	NZ			D.J. Galloway 02/1999
285-2	NZ, Otago, Old Man Range	NZ			K. Spencer 11/2004
286-1	NZ, Otago, Old Man Range	NZ			K. Spencer 11/2004
287-1	NZ, Otago, Old Man Range	NZ			K. Spencer 11/2004



#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	%	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39		
139-2	0	?	2	1	1	0	0	2	0	0	?	0	0	0	1	1	0	2	2	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0			
139-5	0	?	2	1	1	1	1	2	0	0	?	0	0	0	1	1	0	2	2	63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0			
139-6	0	?	2	1	1	0	1	2	0	?	?	0	0	0	1	?	0	2	3	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0			
140-1	0	?	2	1	1	0	1	2	0	0	?	0	0	0	1	?	0	2	2	71	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?			
140-2	0	?	2	1	1	0	1	2	0	0	?	0	0	0	1	1	0	2	2	63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
142-2	1	0	2	1	0	0	1	2	0	0	?	0	0	0	1	?	0	2	3	75	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
142-3	0	?	2	0	0	0	1	2	0	0	?	0	0	0	1	?	0	2	3	76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0			
142-4	0	?	2	1	1	0	1	2	0	1	0	0	0	0	1	1	0	2	3	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
142-5	0	?	2	1	1	1	1	2	0	0	1	0	0	0	1	1	0	2	2	69	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0		
142-6	1	0	2	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0	1	?	0	2	2	73	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0		
144-4	0	?	2	0	0	0	1	2	0	0	?	0	0	0	1	1	0	2	3	82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0		
144-5	0	?	2	0	0	0	1	2	0	0	?	0	0	0	?	?	0	2	2	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
148-1	0	?	2	1	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	1	?	0	2	2	66	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
148-2	0	?	2	0	0	1	1	2	0	1	1	0	0	0	1	1	0	2	2	58	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
148-3	0	?	0	?	?	0	0	2	0	2	1	0	0	0	1	?	0	2	3	59	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?			
183-1	4	1	2	1	0	0	1	3	0	1	0	1	1	0	1	1	0	2	2	62	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0		
183-2	0	?	2	0	0	1	1	3	0	0	2	0	0	0	0	1	0	2	2	69	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
206-1	0	?	3	0	0	?	0	2	0	1	0	0	1	0	1	1	0	2	2	70	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
189-1	0	?	4	0	0	1	1	3	0	1	?	0	2	0	1	1	0	2	3	77	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
199-11	0	?	0	?	?	0	1	3	0	1	0	0	0	0	1	1	0	2	2	69	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
256-14	1	0	5	?	0	0	1	2	0	1	0	0	2	0	1	1	0	2	3	78	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
124-4	0	?	2	0	1	0	1	2	0	1	0	0	0	0	1	?	0	2	2	56	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
240-2	0	?	0	?	?	0	1	2	0	2	0	0	1	0	1	0	0	2	2	65	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
123-1	1	0	0	?	?	0	1	2	0	1	0	0	0	0	2	1	0	2	3	82	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
111-1	4	3	2	1	?	1	1	1	0	?	?	0	0	0	1	1	0	2	2	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
95-1	?	?	2	?	?	?	1	?	?	?	?	?	1	?	1	?	0	2	2	62	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
97-1	1	1	1	1	0	0	1	3	0	1	?	0	0	0	1	?	0	2	2	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
108-1	0	?	2	1	0	0	1	2	0	0	?	0	0	1	1	?	0	2	2	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
97-6	0	?	2	1	0	0	1	2	0	0	?	0	1	1	1	?	0	2	2	71	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
96-4	0	?	4	1	1	0	1	1	0	?	?	0	0	0	?	?	0	2	2	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
95-3	1	2	4	1	?	0	1	2	0	0	?	0	0	1	?	?	0	2	2	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
199-5	0	?	0	?	?	0	1	3	0	2	0	0	0	0	1	0	0	2	3	86	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
125-8	1	0	0	?	?	0	1	2	0	?	?	0	0	0	1	?	0	2	2	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
121-4	1	0	2	0	1	?	1	3	0	1	2	0	0	0	1	?	0	2	2	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
121-3	1	0	0	?	?	0	1	2	0	1	0	1	0	0	1	1	0	2	2	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
236-1	0	?	2	1	1	1	1	2	0	1	0	0	1	0	1	1	0	2	2	82	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
147-3	1	0	0	?	?	0	1	2	0	1	0	0	0	0	1	?	0	2	2	73	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	











#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	%	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
116-2	0	?	2	1	1	0	1	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
115-8	0	?	2	1	1	0	1	2	1	0	?	1	0	0	0	2	0	1	1	36	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
115-5	0	?	2	1	1	1	1	2	1	1	0	1	0	0	?	2	0	1	1	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
114-2	0	?	2	1	1	1	1	3	1	0	?	1	0	0	?	?	0	1	1	38	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
56	0	?	2	1	0	0	0	0	?	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
54	0	?	0	?	?	0	1	4	1	1	0	1	0	0	?	?	0	0	1	50	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?		
115-11	0	?	2	1	1	2	1	2	1	1	0	1	0	0	?	?	0	1	1	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
118-1	0	?	2	1	1	1	1	3	1	1	1	1	0	0	?	?	1	1	2	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
243-3	0	?	2	1	0	0	1	1	1	0	?	1	0	0	?	1	0	0	1	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
243-2	0	?	2	1	0	0	1	1	1	0	?	0	1	0	?	1	0	1	1	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
243-1	0	?	2	1	0	0	1	1	0	0	?	1	0	0	?	?	0	0	1	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
53	0	?	0	?	?	0	1	4	0	1	1	1	0	0	?	?	0	1	2	52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
50	0	?	2	0	0	0	1	4	1	1	0	1	0	0	?	?	1	1	1	46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
244-1	0	?	2	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	0	1	1	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
149-1	0	?	2	1	1	0	1	3	1	0	?	1	0	0	0	2	0	0	1	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
119-1	0	?	2	1	1	1	1	3	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
245-4	0	?	2	1	1	0	1	3	1	1	1	1	1	0	?	0	0	0	1	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
152-6	0	?	2	1	1	1	1	4	0	1	0	1	0	0	0	2	0	0	1	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
195-1	0	?	4	1	1	1	1	2	1	1	0	0	2	2	1	1	0	1	1	45	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
191-3	0	?	4	1	1	1	1	4	1	1	0	1	2	2	1	1	0	0	1	48	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
191-2	0	?	4	1	1	1	1	4	0	1	0	1	2	2	2	1	0	1	1	50	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
191-4	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
191-1	0	?	4	1	0	1	1	4	1	1	0	1	2	2	1	1	0	1	1	49	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
266-1	0	?	4	1	1	1	0	0	?	1	0	1	2	2	1	1	0	0	1	45	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
266-2	0	?	4	1	0	1	0	0	?	1	1	1	2	2	1	1	0	0	1	50	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
290-11	0	?	4	1	1	1	1	4	0	1	0	1	2	2	2	1	0	0	1	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
266-3	0	?	4	1	1	1	0	0	?	1	0	1	2	2	2	1	0	0	1	35	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
67	0	?	2	1	1	1	0	4	0	1	1	1	1	2	1	1	0	0	2	67	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
63	0	?	2	1	1	1	0	0	?	1	0	1	0	2	2	1	0	0	2	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
62	0	?	2	1	1	?	0	0	?	1	0	1	1	2	2	1	0	0	2	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
285-2	3	0	4	1	0	2	0	0	?	0	?	0	2	0	0	1	1	2	1	42	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
281-3	0	?	3	1	0	0	1	0	?	1	?	0	1	0	0	1	0	2	2	57	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
276-1	1	2	0	?	?	0	1	0	?	1	1	1	2	0	?	1	0	2	1	42	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
287-1	1	2	0	?	?	0	1	0	?	1	1	1	2	0	?	?	0	2	2	60	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
282-1	0	?	?	?	?	1	0	0	?	1	0	0	2	0	?	1	0	2	1	37	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
283-1	0	?	0	?	?	?	0	0	?	1	0	0	2	0	?	?	0	1	1	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
286-1	0	?	2	0	0	1	0	0	?	?	?	0	2	0	?	0	0	1	1	44	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	



## ANHANG 4

### ANOVA-Ergebnisse

#### *U. trachycarpa*-Gruppe (3-Schritt-Clades)

(Clade 3-3 wurde wegen zu geringer Individuenzahl ausgelassen)

The results of a ANOVA statistical test

Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean Squares	F
between	2697.	3	899.1	14.25
error	4795.	76	63.10	
total	7493.	79		

**The probability of this result, assuming the null hypothesis, is 0.000\*\***

---

Group 3-1: Number of items= 20

18.0 24.0 25.0 25.0 25.0 27.0 27.0 27.0 28.0 29.0 30.0 30.0 30.0 31.0 32.0 32.0 36.0 39.0  
41.0 45.0

Mean = 30.1

95% confidence interval for Mean: 26.51 thru 33.59

Standard Deviation = 6.32

Hi = 45.0 Low = 18.0

Median = 29.5

Average Absolute Deviation from Median = 4.55

---

Group 3-2: Number of items= 15

17.0 20.0 24.0 32.0 32.0 34.0 34.0 36.0 37.0 38.0 39.0 41.0 41.0 49.0 50.0

Mean = 34.9

95% confidence interval for Mean: 30.85 thru 39.02

Standard Deviation = 9.31

Hi = 50.0 Low = 17.0

Median = 36.0

Average Absolute Deviation from Median = 6.80

---

Group 3-4: Number of items= 5

28.0 32.0 37.0 41.0 46.0

Mean = 36.8

95% confidence interval for Mean: 29.72 thru 43.88

Standard Deviation = 7.12

Hi = 46.0 Low = 28.0

Median = 37.0

Average Absolute Deviation from Median = 5.40

---

Group 3-5: Number of items= 40

27.0 31.0 35.0 35.0 36.0 36.0 36.0 37.0 38.0 38.0 38.0 39.0 39.0 39.0 39.0 40.0 40.0 40.0  
40.0 41.0 42.0 42.0 43.0 43.0 44.0 45.0 46.0 49.0 50.0 50.0 50.0 51.0 52.0 52.0 52.0 54.0  
55.0 60.0 60.0 63.0

Mean = 43.7  
 95% confidence interval for Mean: 41.17 thru 46.18  
 Standard Deviation = 8.20  
 Hi = 63.0 Low = 27.0  
 Median = 41.5  
 Average Absolute Deviation from Median = 6.47

***U. perpusilla-Gruppe (4-Schritt-Clades)***

The results of a ANOVA statistical test

Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean Squares	F
between	2456.	4	613.9	7.927
error	5576.	72	77.44	
total	8031.	76		

**The probability of this result, assuming the null hypothesis, is 0.000**

Group 4-1: Number of items= 8  
 30.0 32.0 33.0 38.0 41.0 42.0 47.0 53.0  
 Mean = 39.5  
 95% confidence interval for Mean: 33.30 thru 45.70  
 Standard Deviation = 7.91  
 Hi = 53.0 Low = 30.0  
 Median = 39.5  
 Average Absolute Deviation from Median = 6.25

Group 4-2: Number of items= 8  
 26.0 31.0 33.0 36.0 37.0 38.0 46.0 47.0  
 Mean = 36.8  
 95% confidence interval for Mean: 30.55 thru 42.95  
 Standard Deviation = 7.13  
 Hi = 47.0 Low = 26.0  
 Median = 36.5  
 Average Absolute Deviation from Median = 5.25

Group 4-3: Number of items= 20  
 32.0 33.0 34.0 43.0 44.0 44.0 45.0 46.0 48.0 51.0 51.0 52.0 53.0 53.0 54.0 55.0 55.0 60.0  
 62.0 71.0  
 Mean = 49.3  
 95% confidence interval for Mean: 45.38 thru 53.22  
 Standard Deviation = 9.73  
 Hi = 71.0 Low = 32.0  
 Median = 51.0  
 Average Absolute Deviation from Median = 7.30

Group 4-4: Number of items= 6  
 24.0 26.0 30.0 31.0 34.0 45.0

Mean = 31.7  
 95% confidence interval for Mean: 24.50 thru 38.83  
 Standard Deviation = 7.45  
 Hi = 45.0 Low = 24.0  
 Median = 30.5  
 Average Absolute Deviation from Median = 5.00

---

Group 4-5: Number of items= 35  
 21.0 25.0 25.0 26.0 28.0 29.0 29.0 30.0 32.0 32.0 33.0 33.0 33.0 33.0 35.0 35.0 36.0 37.0  
 38.0 38.0 39.0 39.0 39.0 40.0 41.0 41.0 43.0 45.0 45.0 46.0 47.0 50.0 53.0 57.0 58.0  
 Mean = 37.5  
 95% confidence interval for Mean: 34.49 thru 40.42  
 Standard Deviation = 8.92  
 Hi = 58.0 Low = 21.0  
 Median = 37.0  
 Average Absolute Deviation from Median = 6.97

***U. aurantiaco-atra-Gruppe (3-Schritt-Clades)***

The results of a ANOVA statistical test

Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean Squares	F
between	1916.	3	638.8	7.790
error	7626.	93	82.00	
total	9542.	96		

**The probability of this result, assuming the null hypothesis, is 0.000\*\***

Group 3-1: Number of items= 33  
 53.0 53.0 55.0 57.0 58.0 60.0 62.0 63.0 63.0 63.0 63.0 64.0 66.0 66.0 69.0 69.0 70.0 71.0  
 71.0 71.0 71.0 73.0 73.0 74.0 75.0 75.0 75.0 76.0 77.0 78.0 79.0 82.0 85.0  
 Mean = 68.5  
 95% confidence interval for Mean: 65.35 thru 71.62  
 Standard Deviation = 8.26  
 Hi = 85.0 Low = 53.0  
 Median = 70.0  
 Average Absolute Deviation from Median = 6.73

---

Group 3-2: Number of items= 46  
 41.0 44.0 49.0 51.0 51.0 52.0 56.0 56.0 56.0 58.0 59.0 59.0 60.0 62.0 62.0 62.0 62.0 63.0  
 65.0 66.0 66.0 67.0 67.0 68.0 69.0 70.0 70.0 70.0 70.0 71.0 72.0 72.0 72.0 72.0 73.0 73.0  
 73.0 76.0 77.0 78.0 78.0 80.0 82.0 82.0 82.0 84.0  
 Mean = 66.3  
 95% confidence interval for Mean: 63.61 thru 68.91  
 Standard Deviation = 10.3  
 Hi = 84.0 Low = 41.0  
 Median = 67.5  
 Average Absolute Deviation from Median = 8.26

---

Group 3-3: Number of items= 7  
56.0 65.0 67.0 69.0 70.0 77.0 78.0  
Mean = 68.9  
95% confidence interval for Mean: 62.06 thru 75.65  
Standard Deviation = 7.47  
Hi = 78.0 Low = 56.0  
Median = 69.0  
Average Absolute Deviation from Median = 5.29

---

Group 3-4: Number of items= 11  
46.0 48.0 49.0 51.0 51.0 52.0 55.0 56.0 60.0 60.0 63.0  
Mean = 53.7  
95% confidence interval for Mean: 48.31 thru 59.15  
Standard Deviation = 5.52  
Hi = 63.0 Low = 46.0  
Median = 52.0  
Average Absolute Deviation from Median = 4.45