

**Einfluss von gebietsfremdem Saatgut auf heimische Pflanzenpopulationen – vergleichende
Untersuchung an drei insektenbestäubten mehrjährigen Kräutern:**

Daucus carota L.

Leucanthemum vulgare LAM.

Pimpinella saxifraga L.

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich 08: Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Botanik

AG Spezielle Botanik

vorgelegt von

Jutta Reiker

Münzenberg, den 12. Mai 2022

Dekan: Prof. Dr. Thomas Wilke

I. Gutachter: Prof. Dr. Volker Wissemann

II. Gutachter: apl. Prof. Dr. Christian Albrecht

Inhalt

Zusammenfassung	3
Abstract	4
Einleitung.....	5
Naturschutzrechtliche Rahmenbedingungen	5
Studien über lokales versus nicht-lokales Saatgut.....	7
Die untersuchten Arten.....	11
Die Untersuchungsflächen	14
Forschungsprojekt.....	17
Ziel des Forschungsprojektes	17
Hypothesen	17
Angewendete Methoden	17
Ergebnisse	20
Einführung in die Kapitel	23
Kapitel 1: Does origin always matter? Evaluating the influence of non-local seed provenances for ecological restoration purposes in a widespread and outcrossing plant species.	23
Kapitel 2: Intraspecific phenotypic variability of the herbaceous species <i>Daucus carota</i> L. (<i>Apiaceae</i>) used for restoration purposes.	24
Kapitel 3: The use of non-local <i>Leucanthemum vulgare</i> seeds in the course of restoration measures can no longer be detected several years after their application.	25
Kapitel 4: Genotypic and phenotypic distinctness of restored and indigenous populations of <i>Pimpinella saxifraga</i> L. eight or more years after restoration.	26
Kleinprojekte: Vielfalt bewahren? – Der Einfluss gebietsfremden Saatguts auf heimische Pflanzenpopulationen am Beispiel von <i>Daucus carota</i> L.	27
Zusammenfassende Diskussion.....	28
Divergiert die innerartliche genetische Vielfalt von krautigen Wiesenarten nach der Einfuhr von nicht-lokalem Saatgut vor einem bis fast zwei Jahrzehnten?	28
Zeigen eventuell vorhandene andere Genotypen der verschiedenen Herkünfte eine andere generative und vegative Fitness?.....	34
Ausblick	37
Literaturverzeichnis.....	39
Kapitel 1: Does origin always matter? Evaluating the influence of non-local seed provenances for ecological restoration purposes in a widespread and outcrossing plant species	49
Kapitel 2: Intraspecific phenotypic variability of the herbaceous species <i>Daucus carota</i> L. (<i>Apiaceae</i>) used for restoration purposes	72
Kapitel 3: The use of non-local <i>Leucanthemum vulgare</i> seeds in the course of restoration measures can no longer be detected several years after their application	86
Kapitel 4: Genotypic and phenotypic distinctness of restored and indigenous populations of <i>Pimpinella saxifraga</i> L. eight or more years after restoration	109
Kleinprojekte: Vielfalt bewahren!	139

Danksagung	145
Versicherung.....	146

Zusammenfassung

Im Rahmen der Forschungsarbeit mit dem Titel: *Einfluss von gebietsfremdem Saatgut auf heimische Pflanzenpopulationen – vergleichende Untersuchung an drei insektenbestäubten mehrjährigen Kräutern*, wurde an drei verschiedenen Wiesenarten *Daucus carota*, *Leucanthemum vulgare* und *Pimpinella saxifraga* untersucht, ob konventionelles Saatgut den umliegenden indigenen Wildpopulationen schadet oder eventuell auch deren genetisches Material aufwerten könne. Konventionelles Saatgut, welches meistens bei Renaturierungsmaßnahmen genutzt wird, enthält häufig Samen von gebietsfremden Pflanzenpopulationen, welche ein anderes populationsgenetisches Muster aufweisen können, als das der heimischen Pflanzenpopulationen. In Deutschland werden Renaturierungsmaßnahmen überwiegend mit gebietsfremdem Saatgut natürlich vorkommender krautiger Arten durchgeführt, da dieses mehrheitlich kostengünstiger für die Wiederherstellung der geschädigten Ökosysteme genutzt werden kann. Renaturierungen sind dabei ein wichtiger Faktor für den Naturschutz. In den letzten Jahrzehnten wurde jedoch vielfach diskutiert, ob für Renaturierungen nur gebietsheimisches Saatgut verwendet werden darf. Dies beruht auf der Grundlage des *Local is Best* (LIB) Ansatzes. Fast gleichzeitig kamen jedoch auch Gegenargumente auf, denn die Verwendung von gebietsfremdem Saatgut kann auch potenzielle Vorteile beherbergen. Ein Vorteil wäre, dass eine mögliche Erhöhung der genetischen Variation, besonders in Zeiten des globalen Wandels, förderlich sein könne. In dieser Studie wurde nun getestet, ob insbesondere häufige, weit verbreitete krautige Wiesenarten möglicherweise nicht nur aus lokalen Saatgutquellen stammen müssen. Es wurden hierfür die populationsgenetischen Muster mit AFLP- und Mikrosatellitenanalysen untersucht. Dabei wurden die drei oben genannten Arten von Standorten, welche mit konventionellen Saatgut begrünt wurden, mit heimischen Populationen verglichen. Zudem wurde in einem Gartenexperiment untersucht, ob die Populationen mit ihren vermutlich verschiedenen genetischen Mustern phänotypische und/oder genotypische Unterschiede in ihren Fitnessparametern aufweisen würden.

Bei der Mikrosatellitenanalyse an der Wilden Möhre wurden keine signifikanten genetischen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gefunden. Eine hierarchische AMOVA sowie eine PCA zeigten eine sehr hohe genetische Populationsdurchmischung und eine vernachlässigbare Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Herkünften. Die Untersuchung der morphologischen Unterschiede zeigte bei dieser Art nur wenige Variabilitäten. In der AFLP-Analyse bei der Wiesen Margerite wurde ebenfalls keine messbaren genetischen Unterschiede zwischen den Gruppen entdeckt. Bei der Untersuchung der Kleinen Bibernelle konnte jedoch bis zu mehr als 8 Jahre nach der Etablierung der Populationen nachgewiesen werden, dass die beiden Gruppen ein unterschiedliches populationsgenetisches Muster aufwiesen. Eine PCoA zeigte zwei große und sehr unterschiedliche molekulare Cluster, die die indigene und renaturierten Populationen entlang der ersten Achsen trennten. Keiner der vegetativen, aber zwei der generativen Fitnessparameter unterschieden sich zudem signifikant zwischen den Individuen der beiden Gruppen.

Abstract

As part of the research work entitled: *Influence of non-native seeds on native plant populations - comparative study of three insect-pollinated perennial herbs*, three different meadow species *Daucus carota*, *Leucanthemum vulgare* and *Pimpinella saxifraga* were examined to determine whether conventional seeds will harm the surrounding indigenous wild populations or possibly also whose genetic material could be upgraded. Conventional seeds, which are mostly used in renaturation measures, often contain seeds from non-native plant populations with different population genetic patterns. In Germany, renaturation measures are mainly carried out with non-native seeds from naturally occurring herbaceous species, since these can be used inexpensively to renature the damaged ecosystems. Renaturation is an important factor in nature conservation. For this renaturation purposes the use of local seeds sources based on *Local is Best* (LIB) approach. But counter-arguments against this usage are potential benefits by increased genetic variation which could be beneficial especially in times of global change. In this studies were test if common, widespread herbaceous meadow species may be candidate species for the absence of LIB during renaturation purposes. We analyzed the population genetic pattern with an AFLP- and microsatellites analysis of three common species on sites formerly renatured with non-local seed sources and compared these to the ones of indigenous populations. Moreover we conducted a common garden experiment to test for possible morphological and genetic differences.

In microsatellite analysis by *Daucus carota* no significant genetic differences were found between the two groups. Hierarchical AMOVA and PCA revealed very high genetic population admixture and negligible differentiation between indigenous and renatured sites. The study of morphological differences in this species also showed only slight measurable variability between the two groups. In AFLP analysis of the ox-eye daisy on this two differences sites all populations of *Leucanthemum vulgare* agg. were genetically diverse and did not clearly distinguish between the two groups. However, in the study of the burnet saxifrage we can detected different genetic structures up to more than 8 years after the establishment of the populations. A PCoA depicted two large and quite distinct molecular clusters separating indigenous and renatured individuals along the first axes. None of the vegetative, but two of the generative fitness parameters differed between individuals of the two groups respectively.

Einleitung

Naturschutzrechtliche Rahmenbedingungen

Der Erhalt der biologischen und genetischen Vielfalt ist seit Jahrzehnten eines der wichtigsten Ziele des Naturschutzes (Nationale Strategie zur biologischen Vielfalt in Deutscher Bundestag 2007), denn weltweit nimmt diese, insbesondere in den letzten 50 Jahren, rapide ab (Aavik et al., 2012; Durka et al., 2016; Rachael, 2020; Raven und Wackernagel, 2020). Im Hinblick auf Gefährdungsraten der sogenannten *Roten Listen* für heimische Blütenpflanzen, Tierarten und Lebensräumen erreicht Deutschland mit die höchsten Werte in Europa (Nationale Strategie zur biologischen Vielfalt in Deutscher Bundestag 2007).

Aus naturschutzfachlicher Sicht ist der Erhalt der Vielfalt dafür wichtig, die Leistung und Funktionsfähigkeit des Naturhaushaltes zu bewahren (Ortner, 2005; Hughes et al., 2008; Durka et al., 2016). Um dem Erhalt der pflanzlichen Vielfalt und der Funktionsfähigkeit des Ökosystems *Wiese* gerecht zu werden, wurden Renaturierungsmaßnahmen von geschädigten Ökosystemen bereits Ende der 1990er Jahre durchgeführt, um zum Beispiel Randstreifen nach Straßenneubauten durch ausgebrachtes Saatgut schnell wieder zu begrünen. Auch mussten nach großen Eingriffen in die Landschaft gesetzlich geforderte Ausgleichsflächen angelegt werden. Ökologische Renaturierungsmaßnahmen in Form von großflächigen Wiedereinführen von Pflanzen als Samen oder Sämlingen zielen darauf ab, die biologische Vielfalt von veränderten oder in Mitleidenschaft gezogene Ökosysteme wiederherzustellen (Reiker et al., 2015; Nevill et al., 2016; Mainz und Wieden, 2019; Elzenga et al., 2019). Bei den oben genannten Straßenrandbegrünungen, sowie den geforderten Ausgleichsflächen, wurde dafür zwar häufig Saatgut von heimischen Arten aber aus gebietsfremden Herkünften verwendet. Gründe dafür waren, dass dieses Saatgut aus gebietsfremden Herkünften oft bis zu 10-fach günstiger als lokales bzw. heimisches Saatgut war. Zudem wurde lokales Saatgut für Wildpflanzen in vielen Regionen, besonders in den geforderten Mengen, gar nicht erst vermarktet (Burton und Burton, 2002; Broadhurst et al., 2008; Kettenring et al., 2014a; Durka et al., 2016). Der Saatgutbezug Deutschlands für konventionelles Saatgut erfolgte dabei aus großen überregionalen Firmen in Süd- und Osteuropa. Im Zuge von diesen Kompensations- und anderen Begrünungsmaßnahmen werden jährlich mehrere tausend Tonnen Saatgut in der freien Landschaft ausgebracht (Ortner, 2005). Die hierbei verwendeten Saatgutmischungen enthalten Arten und Sorten, die u.a. im Ausland gezüchtet und produziert wurden. Insgesamt werden ca. 17.500 t Grassamen und 3.500 t Samen von Leguminosen bzw. Kräutern pro Jahr nach Deutschland importiert (Ortner, 2005). Ein Großteil der Importware stammt aus Haupteinfuhr-Drittländern, wie beispielsweise Kanada und Neuseeland. Im Jahre 2005 war dies eine Menge von über 21.000 Tonnen von krautigen Pflanzen und Gräsern (Ortner, 2005). Weltweit gesehen sind diese Zahlen noch wesentlich beeindruckender. In einer

Bonner Studie wurde errechnet, dass bis zum Jahr 2030 über 350 Millionen Hektar renaturiert werden müssten, wofür ca. 1 Million Tonnen Saatgut benötigt würde (Elzenga et al., 2019). Die Verwendung des Pflanzenmaterials gebietsfremder Herkünfte ist auch heute noch naturschutzfachlich und wissenschaftlich stark umstritten, denn diese Wiedereinführung kann zu einer möglichen Veränderung der genetischen Vielfalt sowie aber auch zu einer Veränderung der morphologischen Fitness von den im Ökosystem vorkommenden Pflanzenarten führen.

Studien über Renaturierungsmaßnahmen haben in den letzten Jahren stark zugenommen (Bell und Hobbs, 2007; Stingemore und Krauss, 2013; Durka et al., 2016; Bucharova et al., 2017; Bucharova et al., 2019), denn die Folgen der durch den Menschen beeinflusste Veränderung der innerartlichen genetischen Vielfalt, und insbesondere auch der damit verknüpften Langzeitwirkungen, sind bis heute für krautige Pflanzen nicht ausreichend erforscht (Ortner, 2005; Durka et al., 2016).

Mit der Auseinandersetzung über die möglichen negativen Einflüsse nahm das Bewusstsein über die Bedeutung der genetischen Herkunft des Pflanzensaatgutes zu. Durch die Einführung und die daraus resultierende Diskussion des sogenannten *Local is Best* (LIB) Ansatzes (Jones, 2013) wurde gefordert, dass bei Renaturierungsmaßnahmen ausschließlich lokales Saatgut verwendet werden sollte, um damit eine größtmögliche innerartliche genetische Vielfalt von Arten zu erhalten (Nationale Strategie zur biologischen Vielfalt in Deutscher Bundestag 2007; Stingemore und Krauss, 2013). Grundlage für die Verwendung von lokalen Genotypen für die LIB Theorie ist dabei, den lokalen Genotypen und den damit verbunden vielfältigen Allelreichtum (verschiedene Varianten mit verschiedenen Merkmalsausprägungen eines Gens) zu erhalten. Die Verwendung von ausschließlich lokalem Saatgut begründete sich durch die Erkenntnis, dass durch fortwährende evolutive Anpassungen an regionale Bedingungen unterschiedliche Genotypen entstehen (Rice und Emery, 2003; Johnson et al., 2010; Jones, 2013). Diese Erkenntnis zielte darauf ab, dass die Aufrechterhaltung der genetischen Variation für die Pflanzenfitness kurzfristig und für deren Anpassungspotential langfristig essentiell sei (Leimu und Fischer, 2008; Aavik und Helm, 2018). Auch das Bundesnaturschutzgesetz (BNatSchG) in seiner Neuauflage von 2010 reagierte auf den LIB Ansatz und verankerte diesen in § 40 Abs. 4: „Das Ausbringen von Pflanzen gebietsfremder Arten in der freien Natur [...] bedarf der Genehmigung [...]. Künstlich vermehrte Pflanzen sind nicht gebietsfremd, wenn sie ihren genetischen Ursprung in dem betreffenden Gebiet haben. [...]“. Dies bedeutet, dass ab März 2020 ausschließlich die Einsaat mit gebietseigenem Saatgut erfolgen darf. Diese grundsätzliche Überlegung wurde auch in weltweiten Vereinbarungen wie *biodiversity conservations` main strategy* ratifiziert (Reed und Frankham, 2001; Sackville Hamilton, 2001; Jones, 2013).

Studien über lokales versus nicht-lokales Saatgut

Hintergründe der LIB Forschung

Die Forschung zum LIB Ansatz begann Anfang der 2000er Jahre mit den Studien über die Erkenntnis der evolutionären Anpassungen von Pflanzen an sich verändernde ökologische Bedingungen von Rice und Emery (2003). Viele weitere Autoren gehen dabei davon aus, dass Pflanzen aus heimischen Herkünften besser an die lokalen ökologischen Bedingungen adaptiert sind und somit besser in das ökosystemare Gefüge passen. Dieser Zusammenhang wurde in vielen Studien durch den Vergleich von vegetativen und generativen Fitnessvorteilen von Saatgut krautiger Pflanzen verschiedener Herkunft untersucht (McKay et al., 2001; Harris et al., 2006; Bell und Hobbs, 2007; Stingemore und Krauss, 2013; Durka et al., 2016; Bucharova et al., 2017; Breed et al., 2018; Bucharova et al., 2019). In diesen Studien wurde die erhöhte Fitness durch die Korrelation einer lokalen Adaptation der Pflanzen an die umgebende Umwelt erklärt (Kawecki und Ebert, 2004; Hereford, 2009; Johnson et al., 2010). Mit der LIB Theorie entstand jedoch fast zeitgleich die Frage, wie geographisch nahe oder wie ähnlich sich die Umweltbedingungen des Standortes des Ursprungssaatgutes und die des Ausbringungsortes sein sollten (Lesica und Allendorf, 1999; McKay et al., 2005). Des Weiteren kam die Frage auf, wie die LIB Theorie in der Praxis bei der Produktion von lokalen Saatgut-Herstellern umgesetzt werden kann (Prasse et al., 2010; ErMiV 2011; Durka et al., 2016; Elzenga et al., 2019). In weiteren Studien wurde neben dem Faktor Lokalität untersucht, wie die Ansätze der LIB Theorie in die Saatgutproduktion für lokales Saatgut implementiert werden sollten. Es folgte die ‚*mix or match*‘ Debatte (Lesica und Allendorf, 1999). Die Autoren analysierten in ihrer Studie wie ähnlich oder unähnlich die Umweltbedingungen der sogenannten Quellpopulationen für den Saatgutbezug und zur Saatgutherstellung sein durften. Auch wurde viel über den Begriff „lokales“ Saatgut diskutiert, denn es kam immer wieder die Frage auf, ob „lokal“ wirklich immer nur geographische Nähe oder vielmehr die Ähnlichkeit von abiotischen und biotischen Faktoren unabhängig der geographischen Nähe bedeuten sollte. In diesen Studien wurde festgestellt, dass die sogenannten Quellpopulationen mit ähnlichen Umweltbedingungen am besten geeignet sind für die Wiederherstellung eines vergleichbaren renaturierten Gebietes (McKay et al., 2005). Diese Studien führten zu der Etablierung von sogenannten Saatgutzone mit übereinstimmenden geographischen, klimatischen und weiteren biophysikalischen Kriterien (ErMiV 2011; Prasse et al., 2010; Durka et al., 2016). In Deutschland existieren zurzeit 22 Quellpopulationszonen für krautige Wiesenarten, in diesen liegen sowohl räumlich nahe, als auch Umweltbedingungen ähnliche Quellpopulationen, die gemischt werden dürfen und auch sollen, um eine genetische Variation zu ermöglichen (Durka et al., 2016). Saatgut darf dabei nur innerhalb einer Zone gemischt werden, da man in dieser Zone mit vergleichbaren Umweltbedingungen und geographischer Nähe davon ausgehen kann, dass hier lokale Anpassungen existieren. Das Saatgut innerhalb einer Zone sollte allerdings auch gemischt werden, denn ein solches Verfahren erhöht

einerseits die genetische Variation und verbessert andererseits dadurch auch den Renaturierungserfolg (Durka et al., 2016). Neuste Studien über die Herstellung von Saatgut aus Wildpflanzen zeigten jedoch, dass auch hier mit einer Veränderung der Genotypen der Wildpflanzen zu rechnen sei, denn auch hier kann durch die Aufzuchtbedingungen der Wildpflanzen eine Selektion erfolgen, da diese Aufzuchtbedingungen (biotische und abiotische Faktoren) in der Regel nie ganz den natürlichen Bedingungen nachempfunden werden können (Elzenga et al., 2019).

Fakten, die für den LIB Ansatz sprechen:

Der LIB Ansatz ist gerechtfertigt, um das genetische Erbe der Pflanzen von ihrem ursprünglichen Standort zu bewahren, dass sich aus einer natürlichen Selektionsgeschichte des Standortes mit seinen abiotischen und biotischen Faktoren ergibt (Johnson et al., 2010; Jones, 2013). Genetische Unterschiede zwischen Populationen verschiedener Standorte können somit Selektionsprozesse und Kreuzungsereignisse der Vergangenheit reflektieren. Die genetische Variation innerhalb und besonders zwischen den Populationen könne damit das Potential für eine verbesserte Anpassungsfähigkeit an neue noch kommende Selektionsprozesse haben (Rice und Emery, 2003). Ein Ziel evolutionsbiologischer Forschung ist es daher, ein Verständnis über innerartliche genetische Variationen auf unterschiedlicher räumlicher und Abundanz-Skalen zu erhalten (Rice und Emery, 2003). Ein Verlust der genetischen Vielfalt innerhalb einzelner lokaler Populationen kann zu Inzuchteffekten und damit langfristig zu ihrem Aussterben führen, da die Möglichkeiten auf wechselnde Selektionsbedingungen zu reagieren eingeschränkt sind bzw. werden (Stearns und Hoektra, 2000; Hellebroich und Frenz, 2008). Die Veränderung des gebietsheimischen Genpools kann dabei je nach Art und Habitatsbedingungen ein sehr schneller bzw. auch zeitlich verzögerter Prozess sein. Mit einer höheren genetischen Variation innerhalb von Populationen ist die Anpassung an lokale Bedingungen jedoch wahrscheinlicher (Stearns und Hoektra, 2000), da es prozentual mehr Genotypen geben könnte, die über die Plastizität ihres Phänotyps möglicherweise besser an die sich verändernden Lebensbedingungen angepasst sein könnten. Ohne genetische Diversität ist die Wahrscheinlichkeit somit geringer, dass die natürliche Auslese oder Selektion über den Phänotypen der einzelnen Populationen quasi „auswählen kann“. Genetische Variation innerhalb von Populationen ist der Grundbaustein der Evolution und damit der Anpassungsfähigkeit. Anpassungsfähigkeit beruht von daher auf genetischer Variation und auf dem Prozess der natürlichen Auslese. Vielfältiges Genmaterial steht somit im direkten Zusammenhang mit der Artenvielfalt (Weber, 2018).

Um nun genetische Vielfalt besser erhalten und damit schützen zu können, wurden in den letzten Jahrzehnten viele Untersuchungen im Bezug zu ökologischen Renaturierungsmaßnahmen getätigt. In Untersuchungen an krautigen Wildpflanzen und aber auch an deren Kulturformen wie *Daucus carota* (Shim und Jørgensen, 2000; Bradeen et al., 2002) sowie an *Beta vulgaris* (Bartsch und Ellstrand, 1999) konnte nachgewiesen werden, dass jene Kulturformen eine deutlich geringere genetische Variabilität

aufweisen als Wildformen der gleichen Art. Kulturformen sind dabei Formen, aus denen viele für den Menschen landwirtschaftlich nutzbare Ackerarten entstanden sind. Ein Beispiel dafür sind die Zuckerrübe sowie die Futterrübe und die Rote Bete. Sie sind eine Kulturform der Gemeinen Rübe (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*). Sie stammt von der Wilden Rübe oder Wild-Bete (*Beta vulgaris* subsp. *maritima*) ab und wurde züchterisch auf einen stark erhöhten Gehalt an Zucker (Saccharose) hin verändert. Ebenso kann aber auch bei Saatgut aus selektiven Wildsippen mit einer Reduzierung der genetischen Vielfalt gerechnet werden, da Gärtnereibetriebe in der Regel, meist aus Gründen der Automatisierung, aktiv bestimmte Phänotypen bevorzugen und selektieren (z.B. Saatguternte zu dem Zeitpunkt, an dem die meisten Samen reif sind – früher bzw. später reifende Genotypen werden vernachlässigt (Elzenga et al., 2019).

In den Studien von Stingemore und Krauss (2013) wurden mehrere Hauptpunkte zusammengefasst, die insbesondere die genetischen Strukturen und damit auch die Fitness von Populationen beeinflussen können:

(1) **Homogenisierung:** Bei Renaturierungsmaßnahmen könnten die Pflanzen der gebietsfremden Herkünfte negative Einflüsse auf die inner- und zwischenartliche Diversität von heimischen Pflanzenarten haben (Seitz und Kowarik, 2007). Sogenannte Hybridisierungsereignisse zwischen nicht-lokalen und lokalen Genotypen könnten die genetische Struktur der lokalen Herkünfte aufgrund von Homogenisierung durch Einkreuzungen stark verändern (Hughes et al., 2008).

(2) **Genetic swamping:** Eine sogenannte genetische Überschwemmung durch Masseneinbringung von nicht-lokalen Genotypen kann zum Aussterben des lokalen Genotypen führen (Montalvo et al., 1997). Einige Forschungen zeigen, dass die lokale genetische Diversität durch Massenanpflanzungen von gebietsfremden Herkünften stark eingeschränkt, verdrängt oder verändert werden kann (Seitz und Kowarik, 2007; Hellebroich und Frenz, 2008). Auch starke genetische Vermischung durch Kreuzung von nicht-lokalen mit lokalen Herkünften kann zu einer Veränderung bzw. zu einem Verlust der lokalen Herkünfte führen und damit zu einer Veränderung der innerartlichen genetischen Vielfalt.

(3) **Fehlanpassungen:** Fehlanpassungen können entstehen, wenn nicht-lokale Genotypen nicht an lokale Umweltbedingungen angepasst sind. Ein fehlangepasstes Merkmal ist dabei ein Merkmal in der Population das für dessen Fortpflanzungserfolg (generative Fitness) weniger vorteilhaft ist als ein angepasstes Merkmal. Dies kann zu einer höheren Sterblichkeit und/oder Leistungsminderung führen (McKay et al., 2005).

(4) **Auskreuzdepression:** Auskreuzdepressionen entstehen dann, wenn die Nachkommen zwischen lokalen und nicht-lokalen Genotypen eine reduzierte generative oder vegetative Fitness aufweisen (Hu und Li, 2003; Hufford und Mazer, 2003; McKay et al., 2005; Frankham et al., 2011; Goto et al., 2011; Jones, 2013). Verschiedene Transplantationsexperimente bestätigen eine verbesserte Fitness und Leistungsfähigkeit der lokalen Herkünfte, welche als Indikatoren für eine lokale Anpassung stehen

können (Johnson et al., 2010). Prozesse, wie z. B. einen genetischen Drift, können allerdings lokale Anpassungen durch divergente Selektion beeinflussen. Untersuchungen an Ackerwildkräutern *Agrostemma githago*, *Papaver rhoeas* und *Silene alba* in (Keller und Taylor, 2010), sowie bei *Medicago sativa* (Muller et al., 2003) zeigten Auskreuzungsdepressionen mit einer verminderten generativen Fitness und damit einen Verlust der regionalen Anpassungsfähigkeit. Bei Populationen bzw. Arten, die nur eine geringe innerartliche genetische Variation aufweisen, kann dies zum Teil dazu führen, dass diese Arten nur langsam oder gar nicht auf Umweltveränderungen reagieren können (Hufford und Mazer, 2003; McKay et al., 2005). Sich verändernde Umweltbedingungen können dabei Habitat- und Klimaveränderung, neue Krankheiten oder Parasiten sein.

(5) **Heterosis-Effekt:** Der Auskreuzdepression entgegen, steht das Phänomen des sogenannten Heterosis-Effekts. Beim Heterosis-Effekt kommt es zu einer ausgeprägten Leistungs-fähigkeitssteigerung von Hybriden (Mischlingen), beispielsweise von Nachkommen zweier verschiedener Pflanzenarten oder zwischen Unterarten derselben Pflanzenart. Von einem Heterosis-Effekt wird gesprochen, wenn die beobachtete Leistung der ersten Filialgeneration (F_1) höher ist als die durchschnittliche Leistung bei den Ausgangssorten (Parentalgeneration siehe in Amarjit, 1999).

Fakten, die gegen den LIB Ansatz sprechen:

In einer parallel aufkommenden Forschungsrichtung zum LIB Ansatz von Jones (2013) entstand jedoch auch die Idee, dass die ausschliessliche Verwendung von lokalem Saatgut nicht bei allen Renaturierungsmaßnahmen angewandt werden kann bzw. darf. Die wichtigsten und offensichtlichsten Gründe dafür waren, dass wenn bereits eine große Abweichung der biotischen und abiotischen Faktoren der zu renaturierenden Flächen von dem ursprünglichen Zustand (Choi, 2004; Jackson und Hobbs, 2009; Kettenring et al., 2014a) besteht, und so auch die lokal angepassten Genotypen auf diesem Standort keine Fitness-Vorteile mehr haben könnten. Auch beschreibt Jones in seiner Veröffentlichung, dass lokales Saatgut nicht verwendet werden muss, wenn die anliegenden wild vorkommenden Populationen bereits eine genetische Verarmung (Vander Mijnsbrugge et al., 2010) vorweisen, so dass die Anpflanzung mit anderen Genotypen erfolgen könnte, um einer genetischen Erosion entgegenzuwirken (Broadhurst et al., 2008; Kramer und Havens, 2009). Ein weiteres Beispiel gegen die strikte Anwendung von lokalem Saatgut wäre, dass die oben genannte lokale Adaptation gar nicht so häufig ist wie angenommen (Hereford, 2009; Kettenring et al., 2014a; Reiker et al., 2015). Dies wird in den jüngsten Studien als Argument gegen die strikte Einhaltung des LIB Ansatzes diskutiert. In der Studie von Jones (2013) werden zusammenfassend drei Hauptpunkte genannt, die erklären, weshalb lokales Saatgut nicht immer zwangsläufig die beste Wahl sein muss:

(1) **Veränderte Umweltbedingungen:** Die zu renaturierende Fläche kann sich nach menschlichen Eingriffen sehr stark von dem umgebenden Ökosystem unterscheiden (Kettenring et al., 2014a) und

dabei können die neuen Umweltbedingungen auf der renaturierten Fläche weit außerhalb der dort früher vorkommenden Gegebenheiten liegen (Choi, 2004; Jackson und Hobbs, 2009).

(2) **Genetisch verarmte Quellpopulationen:** Wenn die lokale Quellpopulation, von der man das Saatgut entnehmen möchte, bereits vorher durch starke Selektion oder menschliche Eingriffe genetisch sehr verarmt ist (Broadhurst et al., 2008; Vander Mijnsbrugge et al., 2010).

(3) **Neue genetische Variationen:** Durch Hybridisierung zwischen den lokalen und renaturierten Genotypen könnte ein Anstieg der lokalen genetischen Diversität zu erwarten sein und damit eine verbesserte Anpassungsfähigkeit für noch kommende umweltbedingte Veränderungen angenommen werden (Broadhurst et al., 2008; Kramer und Havens, 2009; Sgrò et al., 2011; Verhoeven et al., 2011; Breed et al. 2013).

Die untersuchten Arten

Um nun diese mögliche genetische und morphologische Veränderung bei Pflanzen zu erforschen, wurde in diesem Projekt der Einfluss von gebietsfremdem Saatgut auf die heimische Vegetation aus Renaturierungsmaßnahmen an Straßenrändern und deren Ausgleichflächen analysiert. Es wurden dabei Populationen von *Daucus carota*, *Pimpinella saxifraga* und *Leucanthemum vulgare* agg. gewählt, da nach eingehender Recherche diese Arten häufig indigen auf Wiesen anzufinden sind und sie allesamt in den konventionellen Saatgutmischungen der sogenannten Regelsaatgutmischungen des FLL (Forschungsgesellschaft Landschaftsentwicklung und Landschaftsbau) anzufinden sind. Die Saatgutmischung RSM 7.1 enthalten mehrere krautige Arten (siehe auch Beschreibung des Untersuchungsgebietes), welche ebenso gut für die Analysen in diesem Projekt möglich gewesen wären.

Daucus carota L. (Wilde oder Gewöhnliche Möhre) ist eine krautige Pflanze aus der Familie der Doldenblütler (Apiaceae). Diese Art wird in eine ganze Reihe von Unterarten unterschieden (Hegi, 1964, Wagenitz et al., 1987). *D. carota* wächst als zweijährige krautige Pflanze und erreicht eine Wuchshöhe von 50 cm bis zu 120 cm. Der aufrechte Haupttrieb ist reichlich behaart. Im ersten Jahr bildet *D. carota* oberirdisch eine Laubblattrosette und unterirdisch wird eine dicke Pfahlwurzel gebildet. Die länglichen Laubblätter der Rosette sind zwei- bis dreifach fiederteilig. Die obersten Segmente der Fiedern sind lineal- bis lanzettförmig, 2 bis 15 × 0,5 bis 4 mm (Düll und Kutzelnigg, 1992). Meistens blüht *D. carota* im zweiten Jahr von Juni bis September (Düll und Kutzelnigg, 1992, Oberdorfer, 2001). Der Infloreszenzschachtel wird dabei von 10 bis 55 cm lang. Der Blütenstand ist eine flache kreisförmige Doppeldolde. Die laubblattähnlichen Tragblätter der Dolde sind fiederteilig oder selten auch einfach, sowie 3 bis 30 mm lang. Die ungleichen Strahlen sind 2 bis 7,5 cm lang. Die fünf bis sieben Tragblätter der Döldchen sind einfach oder zwei- bis dreilappig und können die Blüten in der Höhe überragen. Häufig wird in der Mitte der Infloreszenz eine schwarze Blüte gebildet, diese

sogenannte Scheinblüte soll dabei eine Fliege imitieren. Fliegen landen häufig dort, wo schon weitere Fliegen sitzen, die Scheinblüte hilft damit bei der Bestäubung (Oberdorfer, 2001). Die Kronblätter sind weiß, manchmal gelblich bis hin zu rosafarben. Zur Samenreife hin wölbt sich die Doppeldolde vogelnestartig ein und bildet stachelige, eiförmige, trockene, zweiteilige Spaltfrüchte (Doppelachänen). Die Samen sind ca. 3 bis 4 × etwa 2 mm groß. Die Chromosomenzahl beträgt bei den meisten Unterarten $2n = 18$ (Oberdorfer, 2001; Oberprieler et al., 2011).

Typische Lebensräume von *D. carota* sind extensiv bewirtschaftete Wiesen, aber sie kommt auch in ruderalen Pioniergesellschaften an Wegen, Dämmen und Steinbrüchen oder als Ackerwildkraut vor (Oberdorfer, 2001). Die Art kommt dabei in weiten Teilen Europas, Ost- und Zentralasien und dem Mittelmeerraum vor (Hegi, 1964; Wagenitz et al., 1987). *D. carota* ist obligat fremdbestäubend, mit einer begrenzten Anpassung an artspezifische Bestäuber (Hegi, 1964; Wagenitz et al., 1987). Bestäuber sind Fliegen, Bienen oder Käfer (Düll und Kutzelnigg, 1992). Vor allem Solitärbienen der Gattung *Andrena* spp. (Sandbienen) sind häufige Besucher der Blütenstände der Wilden Möhre (Düll und Kutzelnigg, 1992). Einige dieser Bestäuber können lange Flugdistanzen von 200 bis 3000 m fliegen. Auch die westliche Honigbiene (*Apis mellifera*) gehört zu dem Bestäuberspektrum von *D. carota*. Ein Auskreuzen wird durch einen vormännlichen Blütenstand (Protandrie) gefördert. Auskreuzen bedeutet, dass nur der Pollen von einer weiteren Pflanze der gleichen Art zu einer Befruchtung führen kann. Die daraus entstehenden Früchte können mit den borstigen Widerhaken an Tieren festhaken, so dass es häufig zur Tierverbreitung kommt (epizoochor) (Hegi, 1964; Wagenitz et al., 1987; Rong et al., 2010). Die Wilde Möhre ist eine verwandte Art von unserer heutigen Kulturmöhre (Rong et al., 2010) und beide Formen können hybridisieren (Rong et al., 2010).

Die zweite Modellart ist *Leucanthemum vulgare* agg. (Magerwiesen-Margerite). In Mitteleuropa umfasst die Art *Leucanthemum* drei Unterarten mit drei verschiedenen Ploidie-Stufen: Die diploiden *L. vulgare* (Vaill.) LAM., die tetraploiden *L. ircutianum* DC. und die hexaploiden *L. adustum* (KOCH) GREMLI (Wagenitz et al., 1987; Oberprieler et al., 2011). Alle drei Unterarten können nicht, oder nur unzureichend, getrennt werden, da sie morphologisch sehr variable Merkmale aufweisen. Die drei Unterarten werden daher als Spezies-Aggregat behandelt, das sogenannte *Leucanthemum vulgare* agg. (Heywood, 1976; Marchi, 1982; Oberprieler et al., 2011; Konowalik et al., 2015). In den Studien von Oberprieler (2011) wurde das mitteleuropäische *L. vulgare*-Aggregat mit Hilfe molekularer, morphologischer und zytologischer Methoden untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die intragenerische Taxonomie nur unzureichend gelöst werden kann, vermutlich als Folge von retikulater Entwicklung. Retikulate Evolution bedeutet, dass es im Laufe der Evolution zu einer netzartigen Beziehung zwischen verschiedenen Arten/Unterarten kam, anstelle von dichotomen Verzweigungen in den entsprechenden Stammbäumen. Es existieren damit mehrere Hinweise auf Hybridisierungsereignisse und Introgression, horizontalen Gentransfer und virale Transduktion oder

Endosymbiose. Damit besteht keine genetische Geschlossenheit innerhalb der Art. Es können dabei vielmehr die Äste des Stammbaumes nicht nur verzweigen, sondern auch wieder zusammenwachsen (Veron, 1995).

L. vulgare agg. ist eine krautige Pflanze aus der Familie der Korbblütler (Asteraceae). Das Verbreitungsgebiet von *L. vulgare* agg. liegt in ganz Mitteleuropa und ist dort auch sehr häufig (Berger et al., 1975; Düll und Kutzelnigg, 1992). *L. vulgare* agg. sind mehrjährige Kräuter mit aufrechten, einfachen oder verzweigten Sprossachsen mit einfachen gezackten Blättern, der Blattgrund ist dabei öhrchenförmig. Die Sprossachse erreicht eine Höhe von bis zu 60 cm. Die Blütezeit ist von Mai bis Oktober (Georgia, 1942; Howarth und Williams, 1968) und es wird dabei die typische körbchenförmige Infloreszenz der Asteraceae ausgebildet. *L. vulgare* agg. wächst hauptsächlich auf stickstoffarmen, halbtrockenen Wiesen, Weiden und Ruderalgebieten (Georgia, 1942; Leimu und Fischer, 2008). *L. vulgare* agg. ist ebenfalls wie die Wilde Möhre eine auskreuzende Art, aber auch Selbstbestäubung ist möglich (Knuth, 1908; Grime et al., 1996). Die Auskreuzung wird gefördert durch die unterschiedliche Aufblühzeit der verschiedenen Blütentypen (Zungen- und Röhrenblüten). Hinsichtlich ihrer Zungenblüten zeigt *L. vulgare* agg., wie viele Arten der Asteraceae, Protogynie, dies bedeutet, dass sich zuerst die weiblichen Zungenblüten öffnen, welche auch nach dem Öffnen der zwittrigen Röhrenblüten weiterhin geöffnet bleiben. Betrachtet man hingegen das Aufblühen einer Röhrenblüte, so ist diese protandrisch. Auch bei dieser Art sind die einzelnen Blütenarten ohne offensichtliche Anzeichen für coevolutionäre artspezifische Bestäuber-Anpassungen und sie werden von mehr als 100 verschiedenen Blütenbesuchsarten aus mehreren Ordnungen der Coleoptera, Hymenoptera, Diptera und Lepidoptera besucht (Georgia, 1942; Clements et al., 2004). Diese blütenbesuchenden Insekten können Flugstrecken von 100 bis 3000 m (Boecking, 2013) zurücklegen. Zu den Bestäubern gehört auch bei dieser Modellart die westliche Honigbiene (*Apis mellifera*), die mitunter die längsten Strecken zurücklegen kann (Boecking, 2013).

Die Früchte von *Leucanthemum vulgare* agg. sind Achänen. Die Ausbreitung dieser erfolgt überwiegend epi- und endozoochor (Georgia, 1942; Salisbury, 1961), da die Samen beim Abfressen des reifen Blütenstandes überlebensfähig bleiben, nachdem sie den Verdauungstrakt von Tieren passiert haben (Olson et al., 1997). Weiterhin kann die Ausbreitung auch anemochor oder autochor erfolgen. Anemochor ist dabei die Ausbreitung der Samen durch den Wind und autochor ist eine Ausbreitung mit der bloßen Schwerkraft der Samen. Eine beträchtliche Ausbreitung ist dabei auch anthropogener Natur, z.B. durch Heu-Transporte (Mitich, 2000). *Leucanthemum* wurde ebenfalls wie die Wilde Möhre durch den Menschen schon lange züchterisch verändert. Diese Pflanze wird urkundlich bereits in den Kräutern der botanischen Renaissance des 16. und 17. Jahrhunderts, entweder als Zierpflanze oder als Pflanze für den Gartenbau, erwähnt (Besler, 2003 in Hortus Eystettensis 1613). Auch im Mittelalter war *Leucanthemum* bereits eine weit verbreitete wilde

Pflanzenart und wird beispielsweise in den Werken von Bauhin in *Pinax Theatri Botanici* (1623) erwähnt. Krausch (2003) berichtet, dass mehrere Taxa aus dem *L. vulgare* agg. im 16. und 19. Jahrhundert in der Flora von Europa beschrieben und abgebildet oder im frühen 19. Jahrhundert im Botanischen Gärten (Berlin, Leipzig) angebaut wurden. Krausch (2003) erwähnte zudem auch Züchtungsexperimente in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts bis zum frühen 20. Jahrhundert durch englische, französische und deutsche Züchter, um Blütenmerkmale für den Gartenbau zu verbessern. Dieses Taxon könnte damit schon lange, als sogenannte Gartenflüchtlinge, auf umliegende Flächen entwichen sein und damit zur Heterogenität der Spezies und damit zur Schwierigkeit der taxonomischen Einordnung beigetragen haben.

Die dritte Modellart *Pimpinella saxifraga* L. (Kleine Pimpinelle) gehört ebenfalls wie die Wilde Möhre zu der Familie der Doldenblütler (Apiaceae). Auch *P. saxifraga* ist morphologisch höchst variabel und taxonomisch schwer zu erfassen. Das native Verbreitungsgebiet dieser Art ist in Europa, Zentralasien und im Tiefland des Kaukasus. Es werden bis zu zehn verschiedene Unterarten definiert (Berger, 1975). Vor allem in Deutschlands Mittelgebirgsregion (Hessen, Thüringen und Bayern) ist bislang nur das Vorkommen von *P. saxifraga* ssp. *saxifraga* s.str. dokumentiert. *P. saxifraga* wächst vor allem auf offenen, mäßig trockenen, nährstoffarmen und kalkhaltigen Böden, im Grünland und Zwergstrauchheide-Vegetationen (Hänsel et al., 1994). *P. saxifraga* ist eine häufig vorkommende Pflanzenart, aber diese Einteilung ist derzeit rückläufig, aufgrund intensivierter Landnutzung. Dennoch gilt diese Art bisher nicht als bedroht (Sebald et al., 1992). In Deutschland hat *P. saxifraga* eine einheitliche Chromosomenzahl mit $2n = 18$ (Kumar et al., 2012).

P. saxifraga bildet im ersten Jahr eine vegetative Rosette und entwickelt im zweiten Jahr eine bis mehrere Infloreszenzen, bis zu 60 cm Höhe. Der Blütenstand ist auch hier eine Doppeldolde mit weißen Blüten (Knuth, 1898-1905). Die Blütezeit ist erst zum Spätsommer hin, im Juli bis Oktober. Auch hier ist die Blüte proterandrisch und die Reifung erfolgt dabei in der Dolde von außen nach innen (Knuth, 1898-1905). *P. saxifraga* ist eine überwiegend auskreuzende Art, bei der aber ebenfalls wie bei *L. vulgare* Selbstbestäubung möglich ist (Knuth, 1898-1905; East, 1940). Zum Bestäuberspektrum gehören auch bei dieser Art viele verschiedene Insekten, wie z.B. Coleoptera, verschiedenen Ordnungen der Brachycera und Hymenoptera mit mittlerer Rüssellänge (Willemstein, 1987). Die glatten Früchte werden in erster Linie autochor und damit in unmittelbarer Nähe zur Mutterpflanze verteilt. Selten werden die Samen auch endozoochor verbreitet (Knuth, 1898-1905).

Die Untersuchungsflächen

Die in diesem Forschungsprojekt untersuchten renaturierten Ausgleichsflächen wurden alle mit konventionellen Saatgutmischungen der Regelsaatgutmischungen (RSM) der FLL (Forschungsgesellschaft Landschaftsentwicklung und Landschaftsbau) eingesät. Die Saatgutmischung RSM 7.1

wurde dabei als Standardmischung verwendet. RSM 7.1 (Landschaftsrassen - Standard mit Kräutern) enthielt seit den 1980ern eine ähnliche Arten-Zusammensetzung. Seit Jahren wiederkehrend waren folgende Kräuter Bestandteil der Saatgutmischung RSM 7.1: *Achillea millefolium*, *Centaurea jacea*, *Daucus carota*, *Galium verum*, *Leontodon spec.*, *Leucanthemum vulgare*, *Pimpinella saxifraga*, *Sanguisorba minor*, *Lotus corniculatus* und *Medicago lupulina*.

In den RSM der FLL waren Wildsippnen, aber auch züchterisch veränderte Kultursippen einheimischer Arten vertreten (Ortner, 2005). Diese Mischungen, von der FLL vorgegeben, wurden in vielen Ausschreibungen als Standard benannt, obwohl die Aussaatstärken und die Artenzusammensetzung in der freien Landschaft oft nicht zweckmäßig waren, da einige Vertreter nicht oder nur selten an den jeweilig ausgesäten Standorten der Renaturierungsflächen natürlich vorkommen würden (Durka et al., 2016). Die Standorte der Ausgleichflächen betrugten eine Fläche zwischen 0,5 und 2 ha und wurden zwischen den Jahren 1996 und 2004 renaturiert. Alle Ausgleichflächen sind von Ackerland umgeben und befinden sich in der Nähe von Wäldern, Wiesen oder landwirtschaftlichen Feldern, wobei Mais, Raps und Getreide die häufigsten Nutzpflanzen in der Region sind. Das Ackerland wird in der Regel mindestens einmal im Jahr gepflügt. Zweijährige Arten, die im zweiten Jahr zu blühen beginnen und Früchte setzen, überleben das Pflügen normalerweise nicht und haben daher nur begrenzte Chancen, einen Beitrag zur Bodensaatgutbank zu leisten. In diesem Forschungsprojekt konnte jedoch die Ausbreitung indigener *D. carota*, *L. vulgare* oder *P. saxifraga* von angrenzenden Feldern nicht vollständig ausgeschlossen werden. Da die Hauptmotivation für die Standortauswahl eine gute Dokumentation der Standorthistorie war, sind die Populationen im gesamten Untersuchungsgebiet nicht regelmäßig verteilt. Für jeden Standort liegen jedoch Informationen über das Jahr der Renaturierung sowie das Vorhandensein und den Prozentsatz von *D. carota*, *P. saxifraga* und *L. vulgare* in der Samenmischung vor (0,1 bis 0,2 % seit 1988 FLL Bonn).

Die gebietsheimischen Populationen der drei Modellarten kommen in dem untersuchten Gebiet allesamt sehr häufig vor und sind fast auf jeder Heuwiese zu finden, trotzdem wurden die heimischen Standorte erst nach eingehender Recherche des Abschlussberichtes „Entwicklung und praktische Umsetzung naturschutzfachlicher Mindestanforderungen an einen Herkunftsnachweis für gebietseigenes Wildpflanzensaatgut krautiger Pflanzen“ (Prasse et al., 2010) gemeinsam mit dem Geschäftsführer Markus Wieden des Verbandes Deutscher Wildsamen- und Wildpflanzenproduzenten e. V. ausgewählt. Die indigenen Standorte unterlagen dabei größtenteils der Habitatrictlinie von Natura 2000 oder waren Naturschutzgebiete. Bei der Auswahl der Flächen wurde darauf geachtet, dass auf den heimischen Flächen in den letzten 60 Jahren keine erneute Einsaat oder Eingriffe im Erdreich erfolgten (Prasse et al., 2010). Die heimischen Flächen wurden in möglichst regionaler Nähe zu den renaturierten Flächen gewählt. Zudem wurde ein Mindestabstand von ca. 5 km zwischen indigenen und möglichen renaturierten Flächen (wie Straßenränder) eingehalten. Auch wurde für die

Auswahl der indigenen Flächen überprüft, dass sich keine Flächen von Kulturformen, insbesondere von *D. carota*, in einer geografischer Nähe befinden, um eine mögliche Hybridisierung zu vermeiden (Posselt, 2000; Prasse et al., 2010). Hybridisierung zwischen Wild- und Kulturpflanze bzw. zwischen den renaturierten und indigenen Herkünften kann natürlich auch auf diesen Standorten nicht ausgeschlossen werden. Jedoch in einer stark anthropogen beeinflussten, fragmentierten Landschaft mit vorwiegend kleinen, isolierten Naturschutzgebieten war dies der beste Kompromiss für unseren gewählten "regionalen Genpool". Die Herkunftsbreite der indigenen Populationen betrug im Untersuchungsgebiet ca. 200 x 200 km². Die nördlichsten Standorte lagen im Nationalpark Hainich und in der Nähe von Mühlhausen (Thüringen), der Südlichste in der Nähe von Darmstadt, der Westlichste bei Wetzlar und der Östlichste nahe Bad Kissingen (Bayern) (siehe hierfür auch Kapitel 1).

Eine genetische Differenzierung von Pflanzenpopulationen wird über geographische Distanzen von ein bis mehrere 100 km bei Grünlandarten erwartet (Seitz et al., 2007; Durka et al., 2016). Die Distanz ist hierbei kritisch zu betrachten, da sie stark von der Art, insbesondere deren Häufigkeit, sowie Bestäuber- und Ausbreitungsmechanismen abhängig ist.

Forschungsprojekt

Ziel des Forschungsprojektes

Ziel dieser Doktorarbeit war es, zu analysieren, ob durch den Gebrauch von nicht indigenem Saatgut der oben genannten krautigen Arten, ein negativer Effekt auf die genetische Vielfalt zu erwarten sei.

Es wurden mehrere Untersuchungen durchgeführt, um folgende Forschungsfragen zu überprüfen:

- (1) Wird die innerartliche genetische Diversität der Pflanzen der indigenen und der renaturierten Flächen nach bekannten Zeiträumen (Anpflanzung vor 8 bis 18 Jahren) divergieren?
- (2) Werden eventuell vorhandene unterschiedliche Genotypen der verschiedenen Herkünfte eine andere generative und vegetative Fitness aufzeigen?

Der Vergleich der drei krautigen Modellarten soll dazu beitragen, Empfehlungen zur Ausbringung von Saatgut gebietsfremder Herkünfte im Sinne des Bundesnaturschutzgesetzes § 7 Abs. 2 Nr. 8 BNatSchG geben zu können.

Hypothesen

In dieser Doktorarbeit wurden folgende Hypothesen überprüft:

Hypothese 1: Wenn die innerartliche genetische Diversität der verschiedenen Herkünfte nach bekannten Zeiträumen der Etablierung der gebietsfremden Provenienzen divergiert, dann müssten diese genetische Unterschiede quantitativ erfassbar sein.

Hypothese 2: Wenn verschiedene Genotypen auf den jeweiligen Standorten entdeckt werden, dann können sich die Anpassungsfähigkeiten (gemessen durch vegetative und generative Fitness) des etablierten Genotyps von der des anderen Genotyps unterscheiden.

Angewendete Methoden

Molekulare Methoden:

Die innerartliche genetische Diversität, die Populationsstruktur sowie der vermutete Genfluss innerhalb und zwischen den Populationen wurde in diesem Projekt mit etablierten molekularen Methoden der Populationsanalyse bearbeitet. Die molekularen Methoden waren SSR-Analysen (*simple sequence repeats*, auch Mikrosatellitenanalyse genannt, Tautz und Renz, 1984; Weising, 2005) sowie AFLP-Analysen (*amplified fragment-length polymorphism*, Vos et al. 1995, siehe auch den molekularer Methodenteil).

Grundsätzlich können, auch im Hinblick auf die Forschungsfragen / Hypothesen, sehr viele genetische Methoden angewendet werden. Die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden wurden schon in vielen Studien wiederholt gezeigt (Nybom, 2004; Weising, 2005; Deschamps et al., 2012; Grover und Sharma, 2016). Ziel ist es dabei Veränderungen in der DNS festzustellen. Häufig werden dabei Sequenzdaten von einzelnen Genabschnitten für taxonomische Fragen (Analyse der Verwandtschaftsebene mehrerer eventuell näher verwandter Arten) verwendet oder eher unspezifischere DNS-Abschnitte verglichen, wie z. B. in der AFLP- und SSR-Methode, diese Methoden werden für nähere Verwandtschaftsanalysen herangezogen (Analyse auf Populationsebene). Für die in dieser Studie vorkommenden Fragen der Populationsgenetik, wurde die gut erforschte und vielfach verwendete AFLP-Methode verwendet (Weising, 2005; Lauterbach et al., 2011; Frey et al., 2012; Gemeinholzer et al., 2012), da es sich dabei um eine robuste und kostengünstige Methode handelt (Vos et al., 1995). Auf Populationsebene genauer auflösend können die Methoden des Vergleichs der einfachen Sequenzwiederholungen (SSR oder Mikrosatelliten-Analyse) sein. SSR ist jedoch zeitaufwendiger, da die Primer meistens erst an die Sequenzen der zu erforschenden Arten angepasst werden müssen, dadurch ist diese Methode zudem kostenintensiver als AFLP (Grover und Sharma, 2016, Cavagnaro et al., 2011). SSR wurde bei der Art *Daucus carota* angewandt, da in einer mengenmäßig kleineren Analyse mittels der AFLP-Methode (Masterarbeit Stefanie Eschenbrenner, 2013) keine genetischen Unterschiede zwischen den Herkünften festgestellt werden konnten. Wie nachfolgend beschrieben, ist auch bei SSR ein ähnliches Ergebnis ersichtlich, somit sind die Ergebnisse nicht Resultat einer eventuell ungeeigneten Methode.

SSR Datenanalyse:

Für die molekulare SSR Methode an *D. carota* wurden 10 Mikrosatelliten Primer Kombinationen, entwickelt von Cavagnaro et al. (2011), für den Einsatz an einer großen Gruppe von Apiaceae, optimiert und angepasst. Die Mikrosatellitendaten wurden mit GeneMarker® V1.90 (Software SoftGenetica, LLC. PA, USA) bearbeitet. Die genetische Diversität wurde mit GenAlEx 6.5 (Peakall und Smouse, 2012) analysiert. Die genetische Variation zwischen und innerhalb der Populationen wurde mit ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier und Lischer, 2010), mithilfe einer hierarchischen Analyse der molekularen Varianz (AMOVA, *Analysis of Molecular Variance*), untersucht.

AFLP Datenanalyse:

Die AFLP Methode wurde für *P. saxifraga* (und für *D. carota* in der o. g. Masterarbeit) mit den standardisierten Primern und Verfahren nach Vos et al. (1995) durchgeführt. Die Analyse des Datensatzes von *L. vulgare* erfolgte mit etablierten Primerkombinationen für den Einsatz in Leucanthemumarten nach Oberprieler et al. (2011). Zudem wurde für den Datensatz von *P. saxifraga* und *L. vulgare* für jede indigene und renaturierte Population die Genomgrößen von drei zufällig ausgewählten Individuen pro Population analysiert.

Die von der Firma LGC Genomics analysierten AFLP Fragmente für alle drei Arten wurden in Genographer 2.1.4 eingespeist und bearbeitet. Für die 0/1-Matrix wurde die statistischen Untersuchungen mit den Programmen GenAIEX 6.4 (Peakall und Smouse, 2012) und SplitsTree 4 (Huson und Bryant, 2006) genutzt (siehe im Detail Kapitel Kleinprojekte).

Für den Datensatz von *P. saxifraga* und *L. vulgare* wurden noch zusätzliche Analysen zur Schätzungen der genetischen Diversität mit AFLPsurv 1.0 (Vekemans, 2002) durchgeführt. In diesen Analysen wurde der Prozentsatz der polymorphen Loci (PLP) und der genetischen Diversität (H_e) nach Lynch und Milligan (1994) berechnet, sowie eine Schätzung der Allelhäufigkeiten mit den Standardoptionen der Bayes'schen Methode verwendet (Vekemans, 2002). Die genetische Variation innerhalb und zwischen Populationen wurde unter Verwendung der Analyse der molekularen Variation (AMOVA) in ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier und Lischer, 2010) berechnet. Die genetische Populationsstruktur wurde mit einer Hauptkoordinatenanalyse (PCoA), unter Verwendung des R-Pakets "adegenet" v1.4-2 (Jombart, 2008), analysiert und visualisiert. Der sogenannte pairwise F_{ST} -Wert wurde mit GenAIEX berechnet. Die genetische Zugehörigkeit der einzelnen Individuen zu genetischen Clustern wurde mit STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al., 2000) berechnet. Um die wahrscheinlichste modale K-Verteilung zu identifizieren, wurde ΔK (Evanno et al., 2005) unter Verwendung von STRUCTURE HARVESTER (Earl und von Holdt, 2012) bestimmt. Um den wahrscheinlichsten Cluster-Zugehörigkeitskoeffizienten unter den zehn Läufen von STRUCTURE und STRUCTURE HARVESTER zu überprüfen, wurde CLUMPP vs. 1.1.2 verwendet (Jakobsson und Rosenberg, 2007). Entsprechende Grafiken wurden mit DISTRUCT erstellt (Rosenberg, 2004).

Morphologische Methoden:

Ähnlich wie bei den molekulargenetischen Untersuchungen können auch für morphologische Analysen eine Vielzahl von generativen und vegetativen Merkmalen untersucht werden. Im Bezug auf die Fragestellung, ob sich die Fitness der Pflanzen der verschiedenen Herkünfte unterscheidet, wurde sich in dieser Studie für die unten angegebene Merkmale entschieden, da diese Merkmale quantitativ gut erfassbar waren. Die morphologischen Untersuchungen erfolgten für vergleichbare Bedingungen unter standardisierten Kulturbedingungen. Einem Teil der Pflanzen wurden dabei die Haupttriebe abgeschnitten, um das Weiden oder Mähen als eine natürliche Bedingung des Ökosystems Wiese zu simulieren. Es wurden zwei Modelle zur Beeinflussung der morphologischen Variation getestet: (1) die Auswirkung der Herkunft (I= indigen, R= renaturiert) und (2) die Behandlung (gemäht, nicht gemäht) in den Herkünften (I, R). Untersuchte Parameter der vegetativen morphologischen Variation waren (1) Anzahl und (2) Größe der Blätter, (3) Länge und (4) Durchmesser der Wurzel, das Gewicht der Blätter als (5) frische und (6) trockene Substanz und das der Wurzeln (7 & 8). Diese Daten wurden einmal quantifiziert, als ein hierfür angepflanzert Teil der Pflanzen geerntet wurde.

Die Parameter der generativen morphologischen Variation waren: (9) Tag der ersten Blüte, (10) Tag der maximalen Anzahl von Blütendolden, (11) Tag der maximalen Anzahl von Fruchtdolden, (12) Anzahl von Blütendolden, (13) Anzahl von Fruchtdolden, (14) Anzahl der Dolden mit reifen Früchten und (15) Gewicht der reifen Dolden sowie (16) Absterbezeitraum des oberirdischen Haupttriebes. Zusätzlich wurden einige generativen Parameter aus dem obigen Daten berechnet: (17) Dauer von der ersten Blüte bis zur höchsten Menge von Fruchtdolden, (18) Anzahl von gleichzeitig blühenden und Fruchtdolden, (19) und deren Datum, (20) Dauer von der ersten Blüte bis zur ersten reifen Dolde und (21) Dauer von der ersten Blüte bis zum Ende der Vegetationsperiode. Mit den daraus resultierten Rohdaten wurden mittels des Programm STATISTICA (v. 10.0, Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) die Daten berechnet. Es erfolgte eine multifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA = Analysis of Variance) sowie ein Tukey-Test.

Ergebnisse

Molekulare Studien:

Mikrosatelliten-Analyse

In der ersten Studie (siehe Kapitel 1) konnte eine starke genetische Durchmischung mittels der Marker SSR zwischen den Herkünften und Standorten von *D. carota* nachgewiesen werden. Die Mikrosatelliten Analyse ergab dabei, dass es in keiner Population oder Herkunft zu einer Fixierung von bestimmten Allelen gekommen ist. Die Heterozygotie lag in einem durchschnittlichen Wert, somit sind mit einer hohen Wahrscheinlichkeit alle untersuchten Pflanzen von *D. carota* heterozygot. Insgesamt zeigten die t-Tests keine signifikanten Unterschiede in den Diversitätsschätzungen zwischen indigenen und renaturierten Populationen. Die hierarchische AMOVA zeigte, dass die meisten genetischen Variationen innerhalb der Populationen vorlagen (95,6%), während nur 4,1% der Unterschiede zwischen Populationen innerhalb einer Gruppen lag und nur 0,2% zwischen indigenen und renaturierten Populationen. Auch die PCA-Analyse bestätigte das Ergebnis der AMOVA für den Datensatz von *D. carota*. Somit können die indigenen und renaturierten Populationen mehr oder weniger als Teil einer einzelnen, zufälligen Population mit willkürlichen Gruppierungen von Subpopulationen betrachtet werden. Diese Ergebnisse wurden auch in der AFLP Analyse mit einem kleineren Datensatz von *D. carota* bestätigt.

AFLP-Analyse

Auch in der Studie an *L. vulgare* (Kapitel 3) konnte in allen analysierten Populationen eine sehr geringe genetische Differenzierung zwischen den indigenen und renaturierten Standorten analysiert werden. Nur 1,6% der genetischen Variation wurde durch die Herkunft erklärt, während 9% der genetischen Variation zwischen den Populationen innerhalb einer Herkunft liegen. Der Prozentsatz der Variationen innerhalb einer Population betrug 89,3% mit einem moderaten F_{ST} -Wert von 0,107 (p-Wert <0,001).

Die AMOVA-Ergebnisse wurden durch die PCoA-Analyse bestätigt, die eine undifferenzierte Wolke für alle analysierten *L. vulgare* Proben ohne offensichtliche Herkunft oder populationsspezifische genotypische Unterscheidung darstellte. Der Gesamtprozentsatz an polymorphen Loci (PLP) zeigte einen Mittelwert von 84,0%. Der durchschnittliche PLP Wert der indigenen Populationen lag bei 84,6% und unterschied sich nicht signifikant von den renaturierten Populationen mit einem Wert von 83,4%. Bei der Art *P. saxifraga* (Kapitel 4) konnte hingegen eine große genetische Differenzierung zwischen den Pflanzen der indigenen und renaturierten Standorte festgestellt werden. 14,2% der genetischen Variation wurde hierbei durch die Herkunft erklärt, während 3,9% der genetischen Variation zwischen den Populationen innerhalb einer Herkunft liegen. Der Prozentsatz der Variationen innerhalb einer Population betrug 81,7%. Die Analyse der molekularen Varianz (AMOVA) ergab eine globale F_{ST} von 0,182, was auf eine große genetische Differenzierung zwischen den Herkünften hinweist. Unabhängig davon war die Variation innerhalb der jeweiligen indigenen und renaturierten Standorte vernachlässigbar (F_{ST} der indigenen Standorte von 0,040 und F_{ST} der renaturierten Standorte von 0,038, beide p -Wert $<0,001$). Auch hier wurde die AMOVA von der PCoA-Analyse bestätigt und zeigte zwei große unterschiedliche Cluster, die entlang der ersten Achse getrennt wurden. Der Gesamtprozentsatz an polymorphen Loci (PLP) zeigte einen Mittelwert von 92,5%. Der durchschnittliche PLP Wert der indigenen Populationen lag bei 91,5% und unterschied sich nicht signifikant von den renaturierten Populationen mit einem Wert von 93,5%.

Morphologische Studie an *D. carota* und *P. saxifraga*:

Die vegetativen Merkmale zeigten in diesen Studien (Kapitel 2 und 4), sowohl bei *D. carota* als auch bei *P. saxifraga*, keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den indigenen und renaturierten Populationen. Bei der Analyse der generativen Fitnessparameter zeigten sich für beide Arten bei zwei von insgesamt 13 analysierten Parametern signifikante Unterschiede.

Bei der Art *D. carota* zeigte sich, dass sich die Gesamtzahl der Blüten der Pflanzen von verschiedenen Herkünften unterschied. So ergab sich aus dem Datensatz, dass die indigenen Pflanzen früher im Sommer ihre maximale Anzahl an blühenden Dolden erreicht hatten, als die der renaturierten Populationen. Die indigenen Populationen hatten dabei eine Woche früher ihre größtmögliche Anzahl an blühenden Dolden erreicht. Gleichzeitig hatten die Pflanzen der indigenen Standorte aber weniger Dolden (durchschnittlich 7,2 pro Individuum), als die der renaturierten Populationen (durchschnittlich 8 pro Individuum). Am Ende der Vegetationsperiode wiesen beide Herkünfte jedoch überraschender Weise eine ähnliche Anzahl an reifen Dolden auf. Die ANOVA zeigte, dass das Schneiden des Haupttriebes immer einen signifikanten Einfluss auf alle analysierten generativen Fitnessparameter hatte, unabhängig von der Herkunft der Proben. Mäheffekte maskieren also die herkunftsspezifischen Eigenschaften, die dann verschwinden.

Bei der Art *P. saxifraga* erreichten die Pflanzen der renaturierten Standorte signifikant früher im Sommer, durchschnittlich nach 22,9 Tagen, ihr Maximum an blühenden Dolden, während die Pflanzen der indigenen Standorte dieses Maximum nach durchschnittlich 26,5 Tagen erreichten. Gleichzeitig hatten die Pflanzen der renaturierten Standorte weniger blühende und fruchttragende Dolden, durchschnittlich 12,5 Dolden pro Individuum, als die der indigenen Standorte mit durchschnittlich 16,6 Dolden pro Individuum. Auch hier zeigte die ANOVA, dass das Mähen unabhängig von der Herkunft immer einen signifikanten Einfluss auf die spezifischen Fitnessparameter der Pflanzen der verschiedenen Herkünfte hatte.

Einführung in die Kapitel

Kapitel 1: *Does origin always matter? Evaluating the influence of non-local seed provenances for ecological restoration purposes in a widespread and outcrossing plant species.*

Ecology and Evolution (2015) 5 (23): 5642–5651; doi: 10.1002/ece3.1817.

In dieser Studie wurde überprüft, ob die strikte Anwendung des *Local is Best* Ansatzes für Saatgut von gewöhnlichen weitverbreiteten Arten, ohne offensichtliche Anpassung an gegebene Standort-eigenschaften, überhaupt notwendig ist. Es wurde dabei 10 Mikrosatelliten-Marker verwendet, um die genetischen Muster von zehn indigenen und neun renaturierten (aus nicht-lokalen Saatgutherkünften) Populationen der weitverbreiteten generalistischen Art *Daucus carota* zu vergleichen. Die genetische Vielfalt der einzelnen Datensätze von indigenen und renaturierte Standorten lag zwischen $H_e = 0,67$ und $0,86$. Der H_e Wert zeigte dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden verschiedenen Herkünften. Auch die hier angewandte hierarische AMOVA- und PCA-Analyse ergaben sehr hohe genetische Durchmischungen und damit vernachlässigbare Unterschiede mit einem F_{CT} von $0,002$ zwischen beiden Herkünften. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Verwendung von nicht-lokalem Saatgut keine negativen genetischen Veränderungen auf indigene Populationen von *D. carota* erwartet werden können, da sich beide Herkünfte genetisch nicht unterscheiden. Aufgrund der hier durchgeführten populationsgenetischen Analyse gibt es keine offensichtlichen Einwände gegen die derzeitige Praxis, dass zehnfach günstigere nicht-lokale Saatgut von *D. carota* zu verwenden. Dies könnte eventuell auch für andere verbreitete, generalistische und auskreuzende Pflanzenarten der Fall sein.

Eigenleistung: Hauptautorenschaft, Probensammlung, molekulare Laborarbeit, Teile der Berechnungen und Datenauswertung, inhaltliche Analyse.

Kapitel 2: Intraspecific phenotypic variability of the herbaceous species *Daucus carota* L. (*Apiaceae*) used for restoration purposes.

Acta-Botanica-Hungarica (2020) 62(1-2): 137-150; doi.org/10.1556/034.62.2020.1-2.8

In dieser Studie wurde analysiert, ob die Nicht-Einhaltung des *Local is Best* Ansatzes für Saatgut von der gewöhnlichen weitverbreiteten Art *D. carota* auch aus morphologischer Sicht zu vertreten wäre. In einem Kultivierungsexperiment im Botanischen Garten im Jahr 2011-2012 wurde analysiert, ob sich die intraspezifische morphologische Variabilität von renaturierten (aus nicht-lokalen Saatgut-herkünften) und indigenen Populationen in ihrer generativen und vegetativen Fitness unterschieden. Unsere Ergebnisse zeigten, dass *D. carota* zwar keine Unterschiede in den vegetativen Fitnessparametern aufwies, sich aber zwei generative Merkmale zunächst signifikant unterschieden. Die Populationen aus den indigenen Herkünften brachten in dieser Studie weniger blühende Dolden hervor als die Pflanzen von den renaturierten Standorten. Aber am Ende der Vegetationsperiode hatten die indigenen Populationen dennoch ebenso viele Dolden mit reifen Samen wie die Pflanzen aus den renaturierten Populationen. Die Pflanzen der Populationen der renaturierten Standorte konnten also ihre blühenden Dolden insbesondere in jenem feuchten kühlen Herbst nicht alle zur Fruchtreife bringen. Wir konnten zudem zeigen, dass Mäheffekte diese herkunftsspezifischen Merkmale überdecken. Diese sich widersprechenden Aussagen in der genetischen und morphologischen Studie zeigen damit auf, dass ohne solide Grundlagenforschung innerhalb der Genetik und Morphologie von Arten generelle Aussagen kaum möglich sind und nur mit Vorsicht über die Verwendung von lokalem oder nicht-lokalem Saatgut spekuliert werden darf.

Eigenleistung: Hauptautorenschaft, Probensammlung, Bearbeitung und Auswertung der Proben aus dem Botanischen Garten Gießen, Teile der Berechnungen und Datenauswertung, inhaltliche Analyse.

Kapitel 3: *The use of non-local *Leucanthemum vulgare* seeds in the course of restoration measures can no longer be detected several years after their application.*

Eingereicht bei Plant Biology Manuskript ID PlaBio-2020-05-0293-RP.

In dieser Studie wurde getestet, (i) ob die Einführung von nicht-lokalen Genotypen bei der ökologischen Renaturierung negative Auswirkungen auf die einheimischen Populationen von *Leucanthemum vulgare* agg. hat bzw. hatte, und (ii) ob die Verwendung von nicht-lokalem Saatgut für häufig vorkommende krautige Arten generell empfohlen werden kann. Es wurden dafür die populationsgenetischen Muster (AFLP) von *Leucanthemum vulgare* Lam in Mitteldeutschland an Standorten, die zuvor mit nicht lokalen Saatgut renaturiert wurden, mit indigenen Populationen in Naturschutzgebieten verglichen. Die untersuchten Populationen zeigten ebenfalls eine starke genetische Vermischung zwischen indigenen und renaturierten Populationen, ohne offensichtliche Hinweise auf unterschiedliche lokale genetische Muster. Daher gibt es auch bei dieser generalistischen Art aus genetischer Sicht keinen Einwand gegen die immer noch gängige Praxis der Verwendung von nicht-lokalem Saatgut. Auch im Hinblick auf dessen Kostenersparnisse, da nicht-lokales Saatgut weiterhin um das 10-fach günstiger ist. Nichtsdestotrotz sollten jedoch für eine genauere Aussage über mögliche populationsgenetische Einflüsse auf die Diversität von Ökosystemen generell mehr empirische Daten über das gesamte Saatgutssystem erhoben werden.

Eigenleistung: Mitautorenschaft, Probensammlung, Teile der molekularen Laborarbeit, Teile der Berechnungen und Datenauswertung, inhaltliche Analyse.

Kapitel 4: Genotypic and phenotypic distinctness of restored and indigenous populations of *Pimpinella saxifraga* L. eight or more years after restoration.

Plant Biology (2020) 22: 1092–110; doi.org/10.1111/plb.13174

Auch in dieser Studie wurden überprüft, ob die Einführung von nicht-indigenen Genotypen bei ökologischen Renaturierungsmaßnahmen negative Auswirkungen auf die einheimischen Populationen von der gewöhnlichen weit verbreiteten Art *Pimpinella saxifraga* haben könnte. In dieser Studie wurden sieben indigene Populationen mit sieben Populationen, entstanden aus konventionellen nicht-indigenen Saatgut, molekulargenetisch und morphologisch miteinander verglichen. In der molekularen Analyse mittels AFLP Markern konnten zwei stark voneinander abgegrenzte Cluster von indigenen und nicht-indigenen Individuen nachgewiesen werden. In der morphologischen Analyse von *P. saxifraga* zeigten sich zwar keine Unterschiede in den acht erhobenen vegetativen Fitnessparametern, aber auch in dieser Studie konnte festgestellt werden, dass sich zwei der insgesamt 13 generativen Merkmale signifikant unterschieden. Beim Vergleich der Dauer von der ersten Blüte bis zur Ausbildung der maximalsten Blütenanzahl erreichten die Individuen der renaturierten Standorte nach durchschnittlich 22,9 Tagen ihre größte Anzahl an Blüten, während die Individuen der indigenen Standorte nach 26,5 Tagen ihr Blüten-Maximum erreicht hatten. Gleichzeitig hatten die Pflanzen der renaturierten Standorte im Durchschnitt 12,5 Dolden, während die Individuen der indigenen Standorte 16,5 Dolden hatten. Eine ANOVA zeigte, dass Mähen unabhängig von der Herkunft immer einen signifikanten Einfluss auf die sich unterscheidenden generativen Fitnessparameter hatte. So maskieren Mäheffekte immer die herkunftsspezifischen Eigenschaften.

Da die Herkünfte sich nach knapp einem Jahrzehnt immer noch nicht mischen können (Ergebnis der molekularen Analyse) kann man eventuell von einer genotypischen Koexistenz der Pflanzen der verschiedenen Herkünfte ausgehen. Diese genotypische Koexistenz verringert jedoch die Verfügbarkeit von Nischen für den lokalen Genotyp und kann schließlich zu einer genotypischen Konkurrenz oder eventuell nach einiger Zeit dennoch zu einer Introgression führen. Wir empfehlen daher von der Art *P. saxifraga* ausschliesslich die lokalen Genotypen für Renaturierungszwecke zu verwenden.

Eigenleistung: Mitautorenschaft, Probensammlung, Bearbeitung der Proben aus dem Botanischen Garten Gießen, Datenauswertung, inhaltliche Analyse.

Kleinprojekte: Vielfalt bewahren? – Der Einfluss gebietsfremden Saatguts auf heimische Pflanzenpopulationen am Beispiel von *Daucus carota* L.

BfN Skripte (2014) 370: Treffpunkt Biologische Vielfalt XIII.

In dieser Veröffentlichung wurde die Aussage, dass durch die Verwendung von nicht-lokalem Saatgut zumindest keine negativen genetischen Veränderungen auf heimischen Populationen von *D. carota* erwartet werden können, zu Beginn des Forschungsprojektes aufgestellt. Bei dieser Studie war der Datensatz wesentlich kleiner und es wurde verstärkt auf die Zeit der Etablierung der Populationen von renaturierten Flächen geachtet. Es wurden je sechs heimische und renaturierten Flächen mittels drei technisch sehr gut anwendbarer und damit vertrauenswürdiger Mikrosatelliten-Marker analysiert. Die renaturierten Populationen wurden unterteilt in drei alte Flächen (renaturiert in den Jahren 1996 bis 1998) mit ca. 6-7 Generationen und drei jungen Flächen (renaturiert in den Jahren 2003 bis 2007) mit nur ca. 2-4 Generationen von *D. carota*. Auch hier zeigte der Vergleich der populationsgenetischen Werte, der H_j -Werte, eine starke genetische Durchmischung beider Herkünfte und es entsprachen damit einer großen Gesamtpopulation ($H_j = 0,061$). In dieser Studie war bei Vergleich der genetischen Verwandtschaft (Stammbaumanalyse) ersichtlich, dass die jüngeren Populationen sich genetisch weniger von den heimischen Populationen unterscheiden als die älteren Populationen im Vergleich mit den heimischen Populationen.

Eigenleistung: Hauptautorenschaft, Probensammlung, molekulare Laborarbeit, Berechnungen und Datenauswertung, inhaltliche Analyse.

Zusammenfassende Diskussion

Bei der Renaturierung von z. B. Straßenrändern ist die Verwendung von lokalem Saatgut ein allgemeines Ziel geworden (Broadhurst et al., 2008; Erickson, 2008; Miller et al., 2011), da bei Renaturierung mit nicht-lokalem Saatgut proklamiert wird, dass es zu Auszuchtsdepression oder weiteren genetisch und morphologisch fehlerhaften Anpassungen an den Standort von Pflanzen kommen könnte (u. a. in Kaye et al., 2001; Mijangos et al., 2015). Die Verwendung lokaler Genotypen wird durch das Hauptargument des Biodiversitätsschutzes gerechtfertigt das genetische Erbe einer Region zu bewahren, welches aus einer natürlichen Selektionsgeschichte in einer lokalen Umgebung resultiert (Sackville Hamilton, 2001; Reed und Frankham, 2003; Jones, 2013). Studien an krautigen Wiesenarten haben in den letzten Jahrzehnten verstärkt zugenommen, da naturnahe, extensiv genutzte Wiesen in Europa stark durch die Landnutzungsintensivierung, Klimawandel und Zerstörung des Lebensraums bedroht sind (siehe auch Millennium Ecosystem Assessment 2005). Häufig beziehen sich diese Untersuchungen auf populationsgenetische Analysen. Von Ackerwildkräutern und Wiesenarten sind Fitnessanalysen jedoch immer noch relativ selten, obwohl davon ausgegangen wird, dass Pflanzen mit lokalen Genotypen im Allgemeinen eine bessere Fitness aufweisen (Linhart und Grant, 1996; Keller und Kollmann, 1999; Kawecki und Ebert, 2004; Leimu und Fischer, 2008; Jones, 2013a; Durka et al., 2016).

Die Forschungsarbeit über verbreitete krautige Arten wie *Daucus carota*, *Pimpinella saxifraga* und *Leucanthemum vulgare* sollte daher mit beiden Analysen, also mit den populationsgenetischen Aspekten, als auch mit den Fitness-Analysen, überprüfen, ob im Hinblick auf die Strategie zur Erhaltung der biologischen Vielfalt, bzw. zur Erhaltung des genetischen und morphologischen Erbes der Region gerechtfertigt ist, ausschließlich Saatgut mit lokalen Genotypen zu verwenden. Diese Proklamation führte dabei zu der übergeordneten Fragestellung des Forschungsprojekts, ob durch den Gebrauch von nicht-indigenem Saatgut mit einem negativen Effekt auf die genetische Vielfalt der zu untersuchenden Arten gerechnet werden kann.

Divergiert die innerartliche genetische Vielfalt von krautigen Wiesenarten nach der Einfuhr von nicht-lokalem Saatgut vor einem bis fast zwei Jahrzehnten?

Für die Beantwortung dieser Frage wurde im Jahr 2012 in der ersten Studie die populationsgenetischen Muster von indigenen Populationen mit renaturierten Populationen der drei genannten Arten von Flächen, die in den Jahren zwischen 1994 und 2004 mit nicht-lokalem Saatgut eingesät wurden, verglichen. Sowohl mit der Mikrosatellitenmarker Analyse an *D. carota*, als auch mit der AFLP-Analyse an *D. carota* und *L. vulgare*, wurde für beide Arten eine sehr geringe genetische Differenzierung von indigenen und renaturierten Populationen gefunden. Aus diesem Ergebnis kann

abgeleitet werden, dass sowohl für die Art *D. carota* als auch für *L. vulgare* vermutlich keine lokale Fixation von Genen an einem Standort existierten, bzw. sie durch die Methode eventuell auch nicht entdeckt werden konnte. In der Studie von Bradeen et al. (2002) wurde bereits postuliert, dass für Wildkarotten sowie auch deren Kulturform keine genetischen Fixierungen an lokale Gegebenheiten existieren. Der Autor verglich in seiner Studie mehrere Kulturmöhren mit der Wildmöhre von verschiedenen Standorten in fast gesamt Europa, sowie einigen Standorten in der USA. Diese Aussage über die nicht vorliegenden genetischen Strukturen wird jedoch in der Studie von Rong et al. (2010) teilweise widerlegt. In dieser Studie wurden schwache genetische Strukturen in Wildkarotten in den Niederlanden entdeckt. Im Gegensatz dazu fanden Shim und Jørgensen (2000) ausgeprägte genetische Strukturen in dänischen Wildkarottenpopulationen. Dänemark liegt jedoch am nördlichen Arealrand von *D. carota* und deren genetische Fixierungen kann daher mit parapatischen lokalen Anpassungserscheinungen an den Rändern des Ausbreitungsgebietes erklärt werden (Brown et al., 1999; Sagrin und Gaines, 2002; Eckert et al., 2008; Sexton et al., 2009). Bei der parapatischen Speziation können sich gerade an den Rändern der Areale von Arten Fixierungen ausbilden. Obwohl noch Genfluss mit dem Hauptverbreitungsgebiet vorliegt, ist hier der Austausch von Genmaterial wesentlich geringer als in der Mitte des Hauptareals. Die in dieser Studie vorkommende genetische Vielfalt bei der Art *D. carota* innerhalb, zwischen und im gesamten Untersuchungsgebiet der Populationen deckt sich mit den Werten der Studie von (Rong et al., 2010). Die Wildpopulationen am Arealrand in Dänemark (Shim und Jørgensen, 2000) wiesen jedoch eine wesentlich geringere genetische Vielfalt auf. Die höchste allelische Vielfalt wurde in diesem Forschungsprojekt in drei von zehn renaturierten Populationen gefunden, aber auch diese Vielfalt war nur marginal größer als in den anderen Populationen. Es liegen zudem keine Informationen über die anfängliche Diversität der renaturierten Population vor, von daher kann man nicht genau sagen, ob diese höhere Diversität durch die genotypischen Unterschiede der Saatgutmischungen oder auf Grund von Selektionsprozessen im neuen Lebensraum begründet wurde. Auf der anderen Seite gibt es jedoch auch keine offensichtlichen Anzeichen dafür, dass die Einführung von nicht-lokalem Saatgut zur regionalen genetischen Gesamtvielfalt von *D. carota* beitrug.

Auch im Datensatz von *L. vulgare* wurde nur eine geringe genetische Differenzierung gefunden. Die in diesem Datensatz gefundene genetische Strukturierung im Untersuchungsgebiet ist jedoch noch deutlich geringer als in vergleichbaren Studien mit mehrjährigen auskreuzenden Pflanzenarten ($F_{ST} = 0,22$ in Nybom et al., 2004; $F_{ST} = 0,20 - 0,17$ in Reisch und Bernhardt-Römermann, 2014; $F_{ST} = 0,27$, in Listl et al., 2017). Die in dieser Studie identifizierte geringere Strukturierung von *L. vulgare* kann eventuell durch die Wahl der Standorte in Mittelhessen und damit in der Mitte von Deutschland zurückgeführt werden. Hier ist bedingt durch eine Dichte an renaturierbaren Flächen (viele Straßen mit vielen renaturierten Flächen etc.) und Gärten ein sehr hoher Genfluss möglich, der dem

genetischen Drift entgegenwirkt (Reisch und Bernhardt-Römermann, 2014). Die gefundenen Werte sind jedoch vergleichbar zu den von Oberprieler et al. (2011) untersuchten Gebieten von mitteleuropäischen Leukanthemarten aus den Nordwestalpen und dem Fränkischen Jura ($\Phi_{ST} = 0,223$). Die in der Studie von Oberprieler et al. (2011) gefundenen geringen Werte genetischer Strukturierung könnte möglicherweise auf das vergleichbar große Untersuchungsgebiet zurückgeführt werden und auf die Tatsache, dass die alpinen *L. adustum* eine hexaploide Art ist. In unserer Analyse wiesen die beiden nordwestlichsten indigenen *L. vulgare*-Populationen aus der thüringischen Region Hainich (LI04, LI05) 1C-Werte auf, die für die diploide *L. vulgare* (Vaill.) Lam bezeichnend sind, mit einem Chromosomensatz von $2n = 18$. Die 1C-Werte aller anderen untersuchten Populationen, unabhängig von der Herkunft indigener Standorte oder aber auch der renaturierten Standorte, wiesen auf die tetraploide Art *L. irtutianum* DC hin, mit einem Chromosomensatz von $2n = 36$. Es ist bekannt, dass beide Arten in Mitteldeutschland häufig zusammen vorkommen (Oberprieler et al., 2011; Scholz und Uhlemann, 2001a, 2001b). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit stützen damit die Ergebnisse von Oberprieler et al. (2011). In der Studie von Oberprieler wurde proklamiert, dass die meisten der untersuchten AFLP-Marker im Genom aller Unterarten innerhalb des Artenkreises von *L. vulgare* agg. vorhanden sind und nur wenige Marker für die Unterteilung der Arten mit unterschiedlichen Ploidiegraden geeignet sind. Die hohe genetische Diversität in diesem Forschungsprojekt ist vermutlich entweder ein Hinweis auf einen hohen Genfluss zwischen indigenen und renaturierten Standorten über mehrere Generationen oder auf ein nicht-strukturiertes populationsgenetisches Muster über den gesamten Verbreitungsbereich von *L. vulgare* als Ergebnis einer langen Geschichte, der immer wieder vorkommenden Einführung von neuen Genotypen.

Der größte Teil der genetischen Vielfalt lag in diesem Forschungsprojekt sowohl bei *D. carota* als auch bei *L. vulgare* innerhalb von den Populationen, egal von welcher Herkunft. Dies ist nach Aavik et al. (2012) typisch für stark auskrenzende Arten. In der Studie von Rong et al. (2010) wurde die hohe genetische Vielfalt innerhalb von *D. carota* Populationen damit erklärt, dass diese Art eine geschätzte Auskreuzrate von 96% zeigt. Auch die Art *L. vulgare* ist eine auskrenzende Art, denn in der Studie von Wagenitz (1987) wurde gezeigt, dass fremdbestäubte Blüten einen viel höheren Fruchtansatz aufwiesen (\emptyset 57%) als selbstbestäubte Blüten (\emptyset 2,5%). Ein Teil der genetischen Vielfalt kann für beide Arten auch durch die Bodensaatzgutbank begründet werden (Gross und Werner, 1982; Thompson et al., 1993; Rawnsley et al., 2003). Die geringe genetische Differenzierung von nur 0,2% bei *Daucus carota* und nur 1,56% bei *Leucanthem vulgare* zwischen den Herkünften kann möglicherweise auf neuartige Genotypen hinweisen, die jedoch für beide Arten aus einer Umgebung mit sehr ähnlichen abiotischen und biotischen Faktoren stammen könnten (Umehara, 2005).

Aufgrund dieser Studien konnte daher die Aussage getätigt werden, dass bei stark auskrenzenden Arten vermutlich nicht die gegenwärtige Annahme von Falk et al. (2001) gilt. Der Autor dieser Studie

postulierte, dass „die Diversität der ursprünglichen Herkunftspopulation für Renaturierungszwecke eine entscheidende Rolle spielt und der Ausgangspool der genetischen Diversität das Überleben und Vermehren einer wieder eingeführten Population für lange Zeit bestimmt“ (Falk et al., 2001). Es wurden in der genetischen Studie dieser Forschungsarbeit keine negativen Auswirkungen auf den Allelreichtum, selektive *swamping* oder eine verringerte genetische Vielfalt innerhalb der Populationen beobachtet.

Beide Arten dieser Studie sind jedoch nicht nur Wiesenarten, sondern vielmehr Arten, die auch auf Ruderalflächen vorkommen, also auf Flächen, die eine starke Störung durch menschliche Aktivitäten aufweisen. Beide Arten zeigen, neben ihrer starken Auskreuzrate, große und gut sichtbare Infloreszenzen, so dass sie sehr stark durch Insekten in ihrem genetischen Material durchmischt werden. Von daher würde auch die Verwendung von nur indigenem Saatgut das in dieser Studie festgestellte populationsgenetische Muster eventuell nicht wesentlich verändert. Unter der Voraussetzung, dass die beiden Arten selbst und nicht die genotypischen Unterschiede innerhalb dieser Arten für die meisten Ökosystemfunktionen wichtig sind, wird aus genetischer Sicht proklamiert, dass eine Renaturierung mit nicht-lokalem Saatgut keine Auswirkung auf die genetische Strukturierung von indigenen Populationen bei *L. vulgare* und *D. carota* haben könnte. Dies könnte auch für weitere generalistische weitverbreitete Arten gelten, die ebenfalls ein häufiges Vorkommen als Ruderalarten haben. Wir plädieren daher für die Verwendung der nicht-lokalen Genotypeinführung, wenn die Zielspezies häufig, weit verbreitet und ohne (i) offensichtliche Anzeichen einer lokalen Anpassung ist, (ii) vernachlässigbare Differenzierung der Population zwischen einheimischen und renaturierten Populationen und (iii) keine offensichtlichen negativen Auswirkungen auf den Allelreichtum oder eine verringerte genetische Vielfalt der Population zu erwarten ist. Potenzielle genetische Vorteile im Zusammenhang mit der Vermischung von Genotypen von Populationen sind eine erhöhte genetische Variation und die Bildung neuer Merkmalskombinationen, aufgrund von Segregation und Rekombination. Gerade der Faktor der Rekombination kann dabei zu einer erhöhten individuellen Fitness und Wachstumsraten der Population führen (siehe auch z. B. Hybridkraft und Heterosis bei Hufford und Mazer, 2003 und Verhoeven et al., 2004). Bedenkt man noch weitere Ziele von Renaturierungsprojekten wie z. B. effiziente Ressourcennutzung von Staatsgeldern in Bezug auf Kosten und auch die Verfügbarkeit von Saatgut (Ehrenfeld, 2000; Kaye et al., 2001; Wilkinson, 2001; Doede, 2005; Miller et al., 2011) gibt es zumindest aus genetischer Sicht keine offensichtlichen Einwände gegen die Verwendung, des kostengünstigeren nicht-lokalen Saatguts für *L. vulgare* und *D. carota*.

Im Hinblick auf die molekulargenetischen Ergebnisse an *Pimpinella saxifraga* sieht die eben erwähnte Aussage jedoch anders aus. In dieser Studie konnten auch bis fast zwei Jahrzehnten nach der Aussaat des nicht-indigenen Saatgutes noch immer spezifische genetische Muster der Populationen aus den

verschiedenen Herkünften aufgezeigt werden. Beide genetischen Muster waren vergleichsweise unterschiedlich ($\emptyset H_e = 0,365$) mit einer jedoch höheren genetischen Vielfalt, wie sie für Stauden ($H_e = 0,16 \pm 0,10$), weitere häufige Pflanzenarten ($H_e = 0,20 - 0,10$) oder Dicotyledoneae ($H_e = 0,16 \pm 0,08$, (Reisch und Bernhardt-Römermann, 2014) zu erwarten waren. Die Populationen auf den renaturierten Standorten wiesen im Durchschnitt eine höhere genetische Diversität ($\emptyset H_{eR} = 0,373$) auf, als die der indigenen Populationen ($\emptyset H_{eI} = 0,356$). Dies kann auf den Effekt zurückzuführen sein, dass für die Samenproduktion häufig Samen aus verschiedenen Populationen gemischt werden, um die genetische Variation zu erhöhen (Bucharova et al., 2019). Dieses Ergebnis der stark getrennten genetischen Cluster der Pflanzen der verschiedenen Herkünfte zeigt, dass vermutlich eine genotypische Koexistenz der beiden Herkünfte existiert, die entweder durch eine reproduktive Isolation oder durch eine mangelnde Ausbreitungskapazität der Samen bedingt ist.

Die prozentuale Variation zwischen den verschiedenen Herkünften war in dieser Studie wesentlich stärker ausgeprägt (F_{ST} -Wert = 0,182, $P < 0,001$) als im Vergleich zur populationsgenetischen Differenzierung innerhalb der verschiedenen Population der beiden verschiedenen Herkünften (F_{ST} -Wert aller indigenen Populationen 0,040, $P < 0,001$, F_{ST} -Wert aller renaturierter Populationen 0,038, $P < 0,001$). Beim paarweisen Vergleich der F_{ST} -Werte von geographisch näher zusammenliegender Populationen mit unterschiedlicher Herkunft zeigte sich, dass die Auswirkungen des vorliegenden zufälligen genetischen Drifts der verschiedenen Herkünfte nicht durch den Genfluss ausgeglichen werden kann und damit zu einer unvorhersehbaren und starken genetischen Isolierung zwischen den Provenienzen führt. Die Samen von *P. saxifraga* haben eine sehr glatte Oberfläche. Es fehlt den Samen also eine mögliche Ausbreitungsstruktur, von daher wird es zu einer hauptsächlich barochore Ausbreitung in der Nähe der Mutterpflanze kommen (Knuth, 1908). In den Studien von Tóth (2014), wird zudem beschrieben, dass die Art *P. saxifraga* nur selten lebensfähige Samenbanken produziert, so dass die Pflanzen von *P. saxifraga* der renaturierten Standorte im Vergleich zu den anderen beiden Arten dieser Studien, vermutlich ausschließlich aus dem verwendeten konventionellen Saatgut stammt. Bestäuber, die möglicherweise für Rekombinationsereignisse sorgen könnten, sind Käfer, Fliegen, Syrphidfliegen, Wespen und Bienen mit mittellangem Rüssel (Willemstein, 1987; Rader et al., 2011). Jedoch haben diese Arten nur selten einen größeren Flugradius als 1 km (Kwak et al., 1998; Peterson et al., 2008), so dass dies ebenfalls die genetische Isolation der beiden Herkünfte erklärt.

Die widersprüchlichen Ergebnisse der genetischen Studien an *D. carota* und *L. vulgare* im Vergleich zu *P. saxifraga* lassen sich in erster Linie vermutlich durch die unterschiedlichen Ausbreitungssysteme der jeweiligen Art erklären. *D. carota* und *L. vulgare* habe ein obligates Auskreuzungssystem, hingegen ist die Art *P. saxifraga* selbstkompatibel (East, 1940), was theoretisch niedrige Auskreuzungsraten fördert (Nybom und Bartish, 2000; Duminil et al., 2009). Die Kleine Bibernelle ist zwar ebenfalls eine generalistische weitverbreitete Wiesenart, ihr Vorkommen liegt aber vielmehr auf Wiesen und Feldern

mit gleichbleibenden biotischen und abiotische Faktoren. Hingegen kommen die anderen beiden Modellarten auch auf Ruderalgebieten vor. Die Infloreszenz von *P. saxifraga* ist wesentlich zierlicher und fragiler, als die der oben genannten Arten. Auch die Ausbreitung der Samen, wie oben bereits erwähnt, unterscheidet sich von den anderen beiden Arten. Während die Samen von *D. carota* kleine Widerhaken besitzen und die Samen von *L. vulgare* kleine flugfähige Ansätze aufweisen, ist der Samen von *P. saxifraga* glatt und relativ klein. Die Tatsache, dass nun die nicht-lokalen Genotypen von *P. saxifraga* fast 20 Jahre nach der Etablierung der Population an den renaturierten Standorten gedeihen, zeigt, dass die Genotypen der nicht-lokalen Herkunft Persistenzkapazität haben. Die Genotypen der Pflanzen auf den renaturierten Standorten verringert jedoch die Verfügbarkeit von Nischen für den lokalen Genotyp und kann schließlich zu einer genotypischen Konkurrenz oder Introgression führen. Ein nachfolgender Verlust genetischer Inkompatibilitäten zwischen beiden Genotypen kann das Gleichgewicht zwischen Genfluss und Drift im Laufe der Zeit beeinflussen, was zu einer nachteiligen intrinsischen genetischen Vielfalt führen kann, die zu Phänomenen wie Heterois führen könnten. Dies wurde auch in Studien an F1-Populationen von *Mimulus guttatus* DC (Van Kleunen et al., 2015), *Silene vulgaris* (Moench) Garcke (Keller und Kollmann, 1999) und *Alliaria petiolata* M. Bieb, Cavara & Grande (Mullarkey et al., 2013) gezeigt. Neben negativen Aspekten können jedoch auch immer Vorteile bei Saatgutmischungen vorliegen, wie z. B. eine erhöhte genetische Variation und die Bildung neuer Merkmalskombinationen aufgrund von Segregation und Rekombination, was zu einer erhöhten individuellen Fitness und einem erhöhten Populationswachstum führt (z. B. in den Studien von Hufford und Mazer, 2003; Verhoeven et al., 2004; Bucharova et al., 2019). Jedoch unter Berücksichtigung der Renaturierungsziele, sowie des effizienten Einsatzes von Ressourcen in Bezug auf Kosten und Verfügbarkeit von Saatgut (Ehrenfeld, 2000; Wilkinson, 2001; Doede, 2005; Miller et al., 2011), empfehlen wir für die Art *P. saxifraga*, die indigenen Genotypen der Arten in der Region auch bei Renaturierungen anzusiedeln, um eine genotypische Konkurrenz zu vermeiden. Die genetische innerartliche Diversität unterscheidet sich also nicht bei Art *D. carota* und auch nicht bei der Art *L. vulgare*. Hier ist die Diversität beider Herkunft innerhalb und zwischen den Populationen ähnlich. Bei der Art *P. saxifraga* unterscheidet sich hingegen das genetische Material zwischen den Herkunft sehr deutlich und man kann auch nach Jahrzehnten noch im genetischen Material erkennen, ob die Genotypen der Pflanzen indigen oder nicht indigen sind.

Zeigen eventuell vorhandene andere Genotypen der verschiedenen Herkünfte eine andere generative und vegetative Fitness?

Das Saatgut von *D. carota* und *P. saxifraga* von den indigenen und renaturierten Flächen (bzw. die aus diesem Saatgut resultierenden Pflanzen) wurde in einer morphologischen Studie, mittels des Vergleichs von verschiedenen vegetativen und generativen Fitnessparametern, analysiert.

In der Forschung geht man davon aus, dass sich eventuell vorhandene genetische Unterschiede innerhalb von Pflanzenarten erst genetisch und dann auch durch eine intraspezifische morphologische Variabilität manifestieren.

In dieser morphologischen Analyse an *D. carota* und *P. saxifraga* unterschieden sich in beiden Fällen jeweils zwei von den insgesamt 21 getesteten generativen und vegetativen Fitnessparametern zwischen den Individuen der indigenen und renaturierten Populationen. Auch in den Studien von Bucharova et al. (2017) wurden bei den reziproken Transplantationsexperimenten von *D. carota* an vier verschiedenen Standorten in Deutschland nur unbedeutende vegetative Fitnessunterschiede in Form von Biomassenunterschiede entdeckt. In den Studien von Durka et al. (2016) wurde festgestellt, dass sich fitnessbezogene Merkmale, wie jene Biomassenunterschiede, ohnehin weniger differenzieren als phänologische Merkmale. Blütezeiten, als Beispiel für ein phänologisches Merkmal, können sich bei mehrjährigen Pflanzenarten sehr stark nach dem geografischen Gefälle unterscheiden (Montague et al., 2008; Kawakami et al., 2011). Unterschiede in den phänologischen Merkmalen spiegeln wahrscheinlich die Anpassung der Pflanzen an unterschiedliche Breiten und Klimabedingungen wider und zeigen damit unterschiedliche Strategien der Pflanzen in den unterschiedlichen Umgebungen auf (Durka et al., 2016). In diesem Forschungsprojekt unterschieden sich bei beiden Arten der durchschnittliche Zeitpunkt des Blühens, sowie die Anzahl an Dolden. Der Zeitpunkt der späteren Blüte und die größere Anzahl an Dolden bei den Individuen der renaturierten Standorte könnten möglicherweise ein Anzeichen für nicht-lokale Anpassungsprozesse sein. Eine z. B. frühere Blüte bei gewöhnlichen krautigen Arten kann die Aktivität von Bestäubern und von daher die Konkurrenz zwischen den Blütenpflanzen beeinflussen. Darüber hinaus unterstützen damit frühblühende Pflanzen die Ökosystemleistungen in Form von Nährstoffen für die bestäubenden Insekten. Dies wurde in früheren Studien von Ladizinsky (1985) und Ellstrand und Elam (1993) bestätigt.

In dieser Studie an *D. carota* hatten die Pflanzen der indigenen Herkünfte zwar weniger Blüten (7,2 Dolden) gleichzeitig zum Blühen gebracht, für deren Blütenmaximum brauchten sie aber im Durchschnitt eine Woche weniger, als jene Pflanzen der renaturierten Standorte (8 Dolden). Am Ende der Vegetationsperiode hatten beide Herkünfte in dieser Studie überraschender Weise eine gleiche Anzahl an reifen Dolden, obwohl die indigene Herkünfte weniger Blüten aufwiesen. Die Pflanzen der renaturierten Herkünfte hingegen produzierten insgesamt mehr Blüten und waren dabei im Durchschnitt etwas langsamer. Am Ende der Vegetationsperiode kamen jedoch nicht alle Dolden der

Pflanzen der renaturierten Flächen zur Fruchtreife, da der Herbst 2012 relativ früh kalt und feucht war. Sollte es im Hinblick des Klimawandels weiterhin zu den heißen und trockenen Sommern kommen, könnte die längere Samenreife der renaturierten Populationen jedoch in Zukunft vom Vorteil sein. Die Produktion von Samen kann in der Natur nicht gleichgesetzt werden mit der Etablierung von Keimlingen. Ob und wie viele von den Samen gekeimt wären, wurde in dieser Studie nicht überprüft. Die Keimung von Samen kann in einigen Gebieten, bedingt durch abiotische und biotische Faktoren, sehr stark unterschiedlich sein. Dies wurde in Studien von *Pulsatilla patens*, *Silene otites* und *Silene chlorantha* (Lauterbach et al., 2011; Lauterbach et al., 2012) bewiesen.

Bei der Art *P. saxifraga* unterschieden sich ebenfalls zwei der generativen Merkmale signifikant zwischen den Individuen unterschiedlicher Herkunft. Eines der signifikanten Merkmale war dabei ebenfalls ein Merkmal der Phänologie. Die Pflanzen von renaturierten Flächen erreichten im Durchschnitt nach 22,9 Tagen ihre maximale Anzahl an blühenden Infloreszenzen, hingegen die Pflanzen der indigenen Standorte im Durchschnitt nach 26,5 Tagen. Die frühere maximale Blüte von Pflanzen der renaturierten Flächen könnte noch eine Anpassung an ihre frühere Umgebung wie Klima, Breitengrad etc. widerspiegeln (Durka et al., 2016). Es ist bekannt, dass sich die Blütezeit entlang geografischer Gradienten stark unterscheidet (z. B. in Montague et al., 2008). Ein weiteres Merkmal war, dass die Pflanzen der indigenen Standorte im Durchschnitt ca. eine 1,3-mal höhere Anzahl von blühenden oder fruchttragenden Dolden hatten, im Vergleich mit den Pflanzen der renaturierten Flächen. Das Ergebnis dieser Studie stimmt mit dem Ergebnis des Transplantationsexperiments von (Bucharova et al., 2017) überein. Die Autorin entdeckte in ihrer Studie, dass indigene Pflanzen von *Centaurea cyanus* L.- und *Lychnis flos-cuculi* L. eine durchschnittliche Fortpflanzungsleistung aufwiesen, die 1,3-mal bzw. 1,4-mal höher war als die der nicht-heimischen Pflanzen.

Bei beiden Arten in diesem Forschungsprojekt unterschieden sich also Merkmale aus dem Bereich der Phänologie. Bei der Art *D. carota* blühten die indigenen Pflanzen eine Woche früher, bei *P. saxifraga* blühten die indigenen Pflanzen knapp vier Tage später. In beiden Fällen bedeutet dies eine Umstellung für jene Insekten, die sich über lange Zeiträume an die Verfügbarkeit von den Blüten der Pflanzen angepasst haben und beides könnte also eine Veränderung des Bestäuberspektrums nach sich ziehen. Auch die Anzahl der gebildeten Dolden unterschieden sich bei beiden Pflanzenarten innerhalb der Herkünfte, was auch hier eine Verschiebung der Verfügbarkeit an Samen für das Ökosystem nach sich ziehen könnte. Von daher muss bei beiden Arten *D. carota* und *P. saxifraga* im Hinblick auf die morphologische Datenlage von der Verwendung von nicht indigen Saatgut abgesehen werden.

Obwohl sich die innerartliche genetische Diversität bei *D. carota* nicht unterschied, so wurden doch Unterschiede bei den Pflanzen der verschiedenen Herkünfte gefunden. Im genetischen Teil konnten diese Unterschiede nicht aufgedeckt werden, aber im morphologischen Teil von *D. carota* wurden sehr wohl im Hinblick auf die verschiedenen Herkünfte eine veränderte generative Fitness aufgedeckt. Bei

der Art *P. saxifraga* konnte die Unterschiedlichkeit der Pflanzen der verschiedenen Herkunft sowohl im molekularen Teil als auch im morphologischen Teil bestätigt werden. Die zu Beginn dieses Abschnitts gestellte Frage, ob die Genotypen der verschiedenen Herkünfte eine veränderte Fitness zeigen, muss in diesem Untersuchungsteil also beide Male mit *Ja* beantwortet werden.

Arten, die trotz ihres gemeinsamen Vorkommens an bestimmten Standorten in den jeweiligen Ökosystemen existieren, können also dennoch ihre eigene Geschichte mitbringen und es bedarf daher immer einer ausführlicheren Untersuchung jeder einzelnen Art, bevor generelle Aussagen getroffen werden können.

Ausblick

Durch die Datenlage der genetischen Studie dieser Forschungsarbeit wurde vermutet, dass die Verwendung von nicht-lokalen Saatgut-Herkünften keine negativen populationsgenetischen Auswirkungen auf die einheimischen Populationen von *Daucus carota* und *Leucanthemum vulgare* haben könnte. Bei beiden obligat auskreuzenden Pflanzenarten bestand offenbar eine vernachlässigbare Populationsdifferenzierung zwischen indigenen und renaturierten Populationen.

Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung stellten nun allerdings dieses Ergebnis in Frage, da sich bei der Art *D. carota* Unterschiede in der Phänologie zeigten und die indigenen Pflanzen eine Woche früher ihr Blütenmaximum hatten. Zudem hatten die Pflanzen der indigenen Standorte im Durchschnitt weniger Dolden, als jene der renaturierten Standorte. Am Ende der Vegetationsperiode hatten beide Herkunft jedoch eine gleiche Anzahl an reifen Dolden. Es wurde postuliert, dass im Zuge des Klimawandels eventuell die Pflanzen von den renaturierten Standorten durch die Ausbildung einer größeren Anzahl an Dolden einen generativen Vorteil haben könnten. Da die Pflanzen aus den renaturierten Herkünften allerdings erst später im Jahr blühen, könnte dies Veränderungen des Bestäuberspektrums nach sich ziehen.

Bei der Art *P. saxifraga* wurden Unterschiede innerhalb der molekularen und auch auf morphologischer Datenebene gefunden. Auch innerhalb von ein bis zwei Jahrzehnten unterschieden sich immer noch die genetischen Strukturen der einzelnen Herkünfte und die Pflanzen aus den renaturierten Standorte blühten früher, hatten aber im Endeffekt weniger reife Dolden.

Diese widersprüchlichen Aussagen, insbesondere zwischen der genetischen Studie und der morphologischen Studie von *Daucus carota* und *Pimpinella saxifraga*, zeigen, dass ohne eine solide Grundlagenforschung über zumindest die im konventionellen Saatgut vorkommenden Wiesenarten, keine generelle Aussage über die Verwendung von lokalem oder nicht-lokalem Saatgut getroffen werden kann. Es sollten zumindest alle im konventionellen Saatgut vorkommenden Arten (siehe Einleitung) hinsichtlich folgender Aspekte analysiert werden: Sind die Arten nur auf biotisch und abiotisch gleichbleibenden Habitaten, wie ausschließlich auf Wiesen ansässig, oder gibt es bei diesen Arten ebenfalls welche, die häufig auf Ruderalflächen anzufinden sind. Vermutlich werden die Ruderalarten eine andere genetische Struktur aufzeigen und sich in ihren Genotypen weniger stark voneinander unterscheiden, egal welcher Herkunft. Diese Arten werden vermutlich wenig genetische Strukturen in Form von Anpassungen an biotische und abiotische Standortfaktoren aufzeigen, da sich ihre Standortfaktoren häufig ändern. Zudem sollte bei den Arten der Saatgutmischungen ebenfalls analysiert werden, wie ihre Ausbreitungsmechanismen im Hinblick auf ihre Fortpflanzungsmechanismen sind. Unterscheiden sie sich im Hinblick auf fakultative oder oblikate Auskreuzungsmechanismen. Oblikat auskreuzende Arten werden vermutlich immer eine höhere

genetische Diversität innerhalb ihrer Populationen oder Herkünfte aufweisen, als Arten, die sich auch selbstbestäuben können. Auch müsste die Frage beantwortet werden, ob es durch den Menschen eine große Ausbreitung gibt oder nicht. In dieser Studie gab es zwei Arten, die durch den Menschen in Form von Kulturpflanzen oder als beliebte Gartenpflanzen, häufig angepflanzt wurden. Auch solche Arten dürften eine andere genetische Strukturierung aufweisen, als Arten, die noch nie durch den Menschen züchterisch verändert wurden. Die in dieser Studie analysierten Arten *D. carota* und *L. vulgare* haben neben ihren obligat auskreuzenden Mechanismen, beide eine große relativ insekten-unspezifische Infloreszenzen, so dass auch hier eine starke genetische Vermischung durch Insekten verschiedener Arten vorliegen kann. Beide Arten bilden Samen, die besondere Ausbreitungsmechanismen haben wie z. B. Widerhaken bei *Daucus carota* und kleine Häutchen zum Gleiten bei *Leucanthemum vulgare*. Zudem kommen beide Arten auf Ruderalflächen vor und an diesen speziellen Habitatvorkommen gibt und gab es schon immer häufige Wechsel an biotischen und abiotischen Faktoren.

Die Art *P. saxifraga* hingegen ist nur fakultativ auskreuzend und kann sich daher auch selbstbestäuben, sie hat eine kleine unscheinbarere Infloreszenz und ihre Samen haben keinerlei Ausbreitungsmechanismen. Diese Art hat ihr Vorkommen auf Wiesen mit gleichbleibenden abiotischen und biotischen Faktoren.

Obwohl die im konventionellen Saatgutmischungen vorkommenden Arten einen gemeinsamen Standort *Wiese* haben, so unterscheiden sie sich doch in ihrer individuellen Evolutionsgeschichte und es bedarf daher einer eingehenden Forschung im Hinblick auf molekularer Ebene sowie auch auf morphologischer Ebene, bevor eine generelle Aussage über deren unbedenkliches Verwenden von nicht-lokalem Saatgut diskutiert werden kann.

Literaturverzeichnis

- Aavik, T., Edwards, P. J., Holderegger, R., Graf, R., & Billeter, R. (2012). Genetic consequences of using seed mixtures in restoration: A case study of a wetland plant *Lychnis flos-cuculi*. *Biological Conservation*, 145 (1), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.11.004>.
- Aavik, T., Helm, A. (2018). Restoration of plant species and genetic diversity depends on landscape-scale dispersal. *Restoration Ecology* 26 (S2), 92–102.
- Amarjit, S. B. (1999). Heterosis and hybrid seed production in agronomic crops. *The Haworth Press*, ISBN 1-56022-876-8.
- Andersson, S. (2008). Pollinator and nonpollinator selection on ray morphology in *Leucanthemum vulgare* (oxeye daisy, Asteraceae). *American Journal of Botany*, 95 (9), 1072–1078. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800087>
- Bartsch, D. & Ellstrand, N. C. (1999). Genetic evidence for the origin of Californian Wild Beets (genus *Beta*). *Theoretical and Applied Genetics* 99, 1120-1130.
- Bauhin, K. (1671). Pinax Theatri Bontanici von 1671 mit Basel. *Liber quartus*, S. 77 im Rara-Bestand der Konstanzer Universitätsbibliothek
- Bell, D. T., & Hobbs, R. J. (2007). Jarrah Forest Ecosystem Restoration: A Foreword. *Restoration Ecology*, 15, S1-S2. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2007.00286.x>
- Benham, J., Jeung, J. U., Jasieniuk, M., Kanazin, V., & Blake, T. (1999). Genographer: a graphical tool for automated fluorescent AFLP and microsatellite analysis. *Journal of Agricultural Genomics*, 4, 399.
- Bennett, M. D., & Smith, J. B. (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274 (933), 227–274. <https://doi.org/10.1098/rstb.1976-0044>
- Berger, H., Conert, H. J., & Hegi, G. (Eds.) (1975). *Illustrierte Flora von Mitteleuropa* (2. Aufl. [unveränd. Text-Nachdr.]). Berlin: Parey.
- Besler, B. (2003). Hortus Eystettensis von 1613. In H.-D. Krausch (Ed.), *Kaiserkron und Päonien rot ...: Entdeckung und Einführung unserer Gartenblumen* (pp. 103–113). München und Hamburg: *Dölling und Galitz Verlag*.
- Bischoff, A., Steinger, T., & Müller-Schärer, H. (2010). The importance of plant provenance and genotypic diversity of seed material used for ecological restoration. *Restoration Ecology*, 18 (3), 338–348. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2008.00454.x>
- Boecking, O. (2013). Konkurrenz zwischen Honig- und Wildbienen. *LAVES - Institut Für Bienenkunde Celle*, 1–4.
- Bradeen, J. M., Bach, I. C., Briard, M., Le Clerc, V., Grzebelus, D., Senalik, D. A., & Simon W. (2002). Molecular diversity analysis of cultivated carrot (*Daucus carota* L.) and wild *Daucus* Populations reveals a genetically nonstructured composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127 (3), 383–391.
- Breed, M. F., Harrison, P. A., Bischoff, A., Durruty, P., Gellie, N. J. C., Gonzales, E. K., Bucharova, A. (2018). Priority actions to improve provenance decision-making. *BioScience*, 68 (7), 510–516. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy050>
- Broadhurst, L. M., Lowe, A., Coates, D. J., Cunningham, S. A., McDonald, M., Vesk, P. A., & Yates, C. (2008). Seed supply for broadscale restoration: Maximizing evolutionary potential. *Evolutionary Applications*, 1 (4), 587–597. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2008.00045.x>
- Brown, R. W., & Amacher, M. C. (1999). Selecting plant species for ecological restoration: a perspective for land managers. In L. K. Holzworth, and R. W. Brown, compilers. *Revegetation with Native*

- Species. Society for Ecological Restoration Annual Meeting*, pp. 1–16. USDA-Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Ogden
- Bucharova, A. (2017). Assisted migration within species range ignores biotic interactions and lacks evidence. *Restoration Ecology*, 25 (1), 14–18. <https://doi.org/10.1111/rec.12457>
- Bucharova, A., Bossdorf, O., Hölzel, N., Kollmann, J., Prasse, R., & Durka, W. (2019). Mix and match: regional admixture provenancing strikes a balance among different seed-sourcing strategies for ecological restoration. *Conservation Genetics*, 20 (1), 7–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1067-6>
- Bucharova, A., Michalski, S., Hermann, J.-M., Heveling, K., Durka, W., Hölzel, N., & Bossdorf, O. (2017). Genetic differentiation and regional adaptation among seed origins used for grassland restoration: lessons from a multispecies transplant experiment. *Journal of Applied Ecology*, 54 (1), 127–136. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12645>
- Burton, P. J., & Burton, C. M. (2002). Promoting genetic diversity in the production of large quantities of native plant seed. *Ecological Restoration*, 20 (2), 117–123. <https://doi.org/10.3368/er.20.2.117>
- Cavagnaro, P. F., Chung, S.-M., Manin, S., Yildiz, M., Ali, A., Alessandro, M. S., Iorizzo, M., Senalik D. A., & Simon, P. W. (2011). Microsatellite isolation and marker development in carrot - genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across Apiaceae. *BMC genomics* 12:386.
- Choi, Y. D. (2004). Theories for ecological restoration in changing environment: Toward ‘futuristic’ restoration. *Ecological Research*, 19(1), 75–81. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1703.2003.00594-19-1.x>
- Clark, D. L., & Wilson, M. V. (2003). Post-dispersal seed fates of four prairie species. *American Journal of Botany*, 90 (5), 730–735. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.5.730>
- Clements, D. R., Cole, D. E., King, J., & McClay, A. (2004). The biology of Canadian weeds. 128. *Leucanthemum vulgare* Lam. *Canadian Journal of Plant Science*, 84(1), 343–363. <https://doi.org/10.4141/P02-112>
- Deschamps, S., Llacá V., & May, G. D. (2012). Genotyping-by-Sequencing in Plants. *Biology* 1:460–483. doi: 10.3390/biology1030460
- Deutscher Bundestag (2007): Unterrichtung durch die Bundesregierung; Nationale Strategie zur Biologischen Vielfalt.– *Drucksache des Deutschen Bundestages und Bundesrates* 16. Wahlperiode Nr. 7082.
- Doede, D. L. (2005). Genetic variation in Broadleaf Lupine (*Lupinus latifolius*) on the Mt Hood National Forest and implications for seed collection and deployment. *Native Plants Journal*, 6 (1), 36–48. <https://doi.org/10.1353/npj.2005.0018>
- Dolan, R. W., Marr, D. L., & Schnabel, A. (2008). Capturing genetic variation during ecological restorations: An example from Kankakee Sands in Indiana. *Restoration Ecology*, 16 (3), 386–396. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2007.00318.x>
- Düll, R., & Kutzelnigg, H. (1992). *Botanisch-ökologisches Exkursionstaschenbuch: Das Wichtigste zur Biologie bekannter heimischer Pflanzen* (4., überarb. und erw. Aufl.). Heidelberg: Quelle & Meyer.
- Duminil, J., Hardy, O. J., & Petit, R. J. (2009). Plant traits correlated with generation time directly affect inbreeding depression and mating system and indirectly genetic structure. *BMC evolutionary biology* 9:177. doi: 10.1186/1471-2148-9-177
- Durka, W., Michalski, S. G., Berendzen, K. W., Bossdorf, O., Bucharova, A., Hermann, J.-M., Kollmann, J. (2016). Genetic differentiation within multiple common grassland plants supports seed transfer zones for ecological restoration. *Journal of Applied Ecology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12636>

- Earl, D. A., & von Holdt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4 (2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Eckert, C. G., Samis, K. E., & Loughheed, S. C. (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology* 17 (5):1170–1188.
- Edmands, S. (2007). Between a rock and a hard place: Evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology*, 16 (3), 463–475. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03148.x>
- Ehrenfeld, J. G. (2000). Defining the limits of restoration: the need for realistic goals. *Society for Ecological Restoration*, 8(1), 2–9. <https://doi.org/10.1046/j.1526-100x.2000.80002.x>
- Ellstrand, N. C., & Elam, D. R. (1993). Population genetic consequence of small population size: Implication for Plant Conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 217–242.
- Elzenga, J. T. M., Bekker, R. M., & Pritchard, H. W. (2019). Maximising the use of native seeds in restoration projects. *Plant Biology* (Stuttgart, Germany), 21 (3), 377–379. <https://doi.org/10-1111/plb.12984>
- Erickson, V. J. (2008). Developing native plant germplasm for national forests and grasslands in the Pacific Northwest. *Native Plants Journal*, 9 (3), 255–266. <https://doi.org/10.2979/NPJ.2008.9.3.255>
- ErMiV (2011). Regulation about the placing on the market of seed of conservation mixtures. *Bundesgesetzblatt I S.* 2641.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14 (8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10 (3), 564–67. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Falk, D., Knapp, E., & Guerrant, E. O. (2001). An introduction to restoration genetics. *Society for Ecological Restoration*.
- Fischer, M., & Matthies, D. (1998). RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany*, 85 (6), 811–819. <https://doi.org/10.2307/2446416>
- Frankham, R., Ballou, J. D., Eldridge, M. D. B., Lacy, R. C., Ralls, K., Dudash, M. R. & Fenster, C. B. (2011) Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology* 25:465–475. doi: 10.1111/j.1523-1739.2011.01662.x
- Frey, D. J., Haag, C. R., Kozłowski, G., Tison, J.-M., & Mráz, P. (2012). High genetic and morphological diversity despite range contraction in the diploid *Hieracium eriophorum* (Asteraceae) endemic to the coastal sand dunes of south-west France. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169:365–377. doi: 10.1111/j.1095-8339.2012.01215.x
- Gemeinholzer, B., May, F., Ristow, M., Batsch, C., & Lauterbach, D. (2012). Strong genetic differentiation on a fragmentation gradient among populations of the heterocarpic annual *Catananche lutea* L. (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 298:1585–1596. doi: 10.1007/s00606-012-0661-1
- Georgia, A. E. (1942). *A manual of weeds*. Macmillan, New York.
- Greenleaf, S. S., Williams, N. M., Winfree, R., & Kremen, C. (2007). Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia*, 153(3), 589–596. <https://doi.org/10.1007/s00442-007-0752-9>
- Grime, J. P., Hodgson, J. G., & Hunt, R. (1996). *Comparative plant ecology: A functional approach to common British species* (Repr). London: Chapman & Hall.

- Gross, K. L., & Werner, P. A. (1982). Colonizing abilities of 'biennial' plant species in relation to ground cover: implications for their distributions in a successional Sere. *Ecology*, 63 (4), 921. <https://doi.org/10.2307/1937232>
- Grover A., & Sharma, P.C. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology* 36:290–302. doi: 10.3109/07388551.2014.959891
- Goto, S., Iijima, H., Ogawa, H., Ohya, K. (2011). Outbreeding depression caused by intraspecific hybridization between local and nonlocal genotypes in *Abies sachalinensis*. *Restoration Ecology* 19:243–250. doi: 10.1111/j.1526-100X.2009.00568.x
- Haldimann, P., Steinger, T., & Muller-Scharer, H. (2003). Low genetic differentiation among seasonal cohorts in *Senecio vulgaris* as revealed by amplified fragment length polymorphism analysis. *Molecular Ecology*, 12 (10), 2541–2551. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01915.x>
- Hänsel, R., Greiner, S., & Abel, G. (Eds.) (1994). *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis: / Hrsg. F. von Bruchhausen; 6. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis: Drogen: P - Z*. Berlin: Springer.
- Harris, J. A., Hobbs, R. J., Higgs, E., & Aronson, J. (2006). Ecological restoration and global climate change. *Restoration Ecology*, 14 (2), 170–176. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2006.00136.x>
- Hegi, G. (1964). *Illustrierte Flora von Mittel-Europa V/4*. Verlag C. Hanser, München
- Hellenbroich, T. & Frenz, W. (2008). Naturschutzrechtliche Vorgaben zur Verwendung gebietseigener Gehölze. NuR doi: 10.1007/s10357-008-1495-z 30: 449–456
- Hereford, J. (2009). A quantitative survey of local adaptation and fitness trade-offs. *The American Naturalist*, 173 (5), 579–588. <https://doi.org/10.1086/597611>
- Heywood, V. H. (1976). *Leucanthemum* Mill. In: Tutin, T. G. (Eds) *Flora Europae 4*, Cambridge University Press, 174–177.
- Howarth, S. E., & Williams, J. T. (1968). *Chrysanthemum Leucanthemum* L. *The Journal of Ecology*, 56 (2), 585. <https://doi.org/10.2307/2258252>
- Hu, X.-S., & Li, B. (2003). On migration load of seeds and pollen grains in a local population. *Heredity*, 90 (2), 162–168. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800212>
- Hufford, K. M., & Mazer, S. J. (2003). Plant ecotypes: Genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology & Evolution*, 18 (3), 147–155. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00002-8)
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11(6), 609–623. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>
- Huson, D. H. & Bryant, D. (2006). Application for phylogenetic networks in evolutionary studies, *Molecular Biology Evolution*, 23 (2):254-267. (Splits-Trew4.0)
- Jackson, S. T., & Hobbs, R. J. (2009). Ecological restoration in the light of ecological history. *Science* (New York, N.Y.), 325 (5940), 567–569. <https://doi.org/10.1126/science.1172977>
- Jakobsson, A., & Eriksson, O. (2000). A comparative study of seed number, seed size, seedling size and recruitment in grassland plants. *Oikos*, 88 (3), 494–502. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.880304.x>
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). Clump: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23 (14), 1801–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>
- Johnson, R., Stritch, L., Olwell, P., Lambert, S., Horning, M. E., & Cronn, R. (2010). What are the best seed sources for ecosystem restoration on BLM and USFS lands? *Native Plants Journal*, 11 (2), 117–131. <https://doi.org/10.2979/NPJ.2010.11.2.117>

- Jombart, T. (2008). Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 24(11), 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jones, T. A. (2013). When local isn't best. *Evolutionary Applications*, 6(7), 1109–1118. <https://doi.org/10.1111/eva.12090>
- Kawakami, T., Morgan, T. J., Nippert, J. B., Ocheltree, T. W., Keith, R., Dhakal, P., & Ungerer, M. C. (2011). Natural selection drives clinal life history patterns in the perennial sunflower species, *Helianthus maximiliani*. *Molecular Ecology*, 20(11), 2318–2328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05105.x>
- Kawecki, T. J., & Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, 7(12), 1225–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x>
- Kaye, T. N. (2001). Common ground and controversy in native plant restoration: the SOMS debate, source distance, plant selections, and a restoration-oriented definition of native, 5–12.
- Kaye, T. N., Pendergrass, K. L., Finley, K., & Kauffman, J. B. (2001). The effect of fire on the populations viability of an endangered prairie plant. *Ecological Applications*, 11 (5), 1366–1380. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2001\)011\[1366:TEOFOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2001)011[1366:TEOFOT]2.0.CO;2)
- Keller, M., & Kollmann, J. (1999). Effects of seed provenance on germination of herbs for agricultural compensation sites. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 72(1), 87–99. [https://doi.org/10-1016/S0167-8809\(98\)00167-4](https://doi.org/10-1016/S0167-8809(98)00167-4)
- Keller, S. R., & Taylor, D. R. (2010). Genomic admixture increases fitness during a biological invasion. *Journal of Evolutionary Biology*, 23 (8), 1720–1731. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02037.x>
- Kettenring, K. M., Mercer, K. L., Reinhardt Adams, C., Hines, J., & Wilsey, B. (2014a). Application of genetic diversity-ecosystem function research to ecological restoration. *Journal of Applied Ecology*, 51(2), 339–348. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12202>
- Kettenring, K. M., Mercer, K. L., Reinhardt Adams, C., Hines, J., & Wilsey, B. (2014b). EDITOR'S CHOICE: Application of genetic diversity-ecosystem function research to ecological restoration. *Journal of Applied Ecology*, 51 (2), 339–348. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12202>
- Knuth, R. G. P. (1898-1905). *Handbuch der Blütenbiologie*. Leipzig: W. Engelmann.
- Knuth, R. G. P. (1908). *Handbook of flower pollination, Volume II*.
- Konowalik, K., Wagner, F., Tomasello, S., RobertVogt, R., Oberprieler, C. (2015). Detecting reticulate relationships among diploid *Leucanthemum* Mill. (Compositae, Anthemideae) taxa using multilocus species tree reconstruction methods and AFLP fingerprinting. <https://doi.org/10.1016/j.ympcv.2015.06.003>
- Kramer, A. T., & Havens, K. (2009). Plant conservation genetics in a changing world. *Trends in Plant Science*, 14 (11), 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.005>
- Krausch, H.-D. (Ed.) (2003). Kaiserkron und Päonien rot ...: Entdeckung und Einführung unserer Gartenblumen. München und Hamburg: *Dölling und Galitz Verlag*.
- Kumar, S., Kumari, S., Gupta, R. C. (2012). Cytological investigations of some polypetalous plants from District Sirmaur of Himachal Pradesh in the Western Himalayas, India. *Chromosome Botany* 7, 87–96. doi: 10.3199/iscb.7.87.
- Kwak, M. M., Velterop, O., & van Andel, J. (1998). Pollen and gene flow in fragmented habitats. *Applied Vegetation Science*, 1 (1), 37–54. <https://doi.org/10.2307/1479084>
- Ladizinsky, G. (1985). The genetics of hard seed coat in the genus *Lens*. *Euphytica*, 34 (2), 539–543. <https://doi.org/10.1007/BF00022952>

- Lammi, A., Siikamäki, P., & Mustajärvi, K. (1999). Genetic diversity, population size, and fitness in central and peripheral populations of a rare plant *Lychnis viscaria*. *Conservation Biology*, 13(5), 1069–1078. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1999.98278.x>
- Lauterbach, D., Ristow, M., & Gemeinholzer, B. (2011). Genetic population structure, fitness variation and the importance of population history in remnant populations of the endangered plant *Silene chlorantha* (Willd.) Ehrh. (Caryophyllaceae). *Plant Biology* (Stuttgart, Germany), 13 (4), 667–777. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00418.x>
- Lauterbach, D., Burkart, M., & Gemeinholzer, B. (2012). Rapid genetic differentiation between ex situ and their in situ source populations: an example of the endangered *Silene otites* (Caryophyllaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 168, 64–75.
- Lebeda, A., Kitner, M., Dzięchciarková, M., Doležalová, I., Křístková, E., & Lindhout, P. (2009). An insight into the genetic polymorphism among European populations of *Lactuca serriola* assessed by AFLP. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(5), 597–608. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.10.010>
- Leimu, R., & Fischer, M. (2008). A meta-analysis of local adaptation in plants. *PloS One*, 3 (12), e4010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004010>
- Lesica, P. & Allendorf, F. W. (1999). Ecological genetics and the restoration of plant communities: Mix or Match? <https://doi.org/10.1046/j.1526-100X.1999.07105.x>. *Restoration Ecology* Vol. 7 No. 1, pp. 42–50 (1999).
- Linhart, Y. B., & Grant, M. C. (1996). Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27 (1), 237–277. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.237>
- Listl, D., Poschlod, P., & Reisch, C. (2017). Genetic variation of liverleaf (*Hepatica nobilis* Schreb.) in Bavaria against the background of seed transfer guidelines in forestry and restoration. *Biochemical Systematics and Ecology*, 71, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2017.01.007>
- Lynch, M., & Milligan, B. G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3 (2), 91–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00109.x>
- Mainz, A.K., Wieden, M. (2019). Ten years of native seed certification in Germany – a summary. *Plant Biology*, 21(3), 383-388. doi.org/10.1111/plb.12866.
- Mandel, J. R., Ramsey, A. J., Iorizzo, M., & Simon, P. W. (2016). Patterns of gene flow between crop and wild carrot, *Daucus carota* (Apiaceae) in the United States. *PloS One*, 11(9), e0161971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161971>
- Marchi, P. (1982). *Leucanthemum* Mill. - Margerita (9341). *Pignatti, S. (Ed) Flora D'italia, Edagricola Bologna*. (Vol. 3), 89–98.
- McKay, J. K., Bishop, J. G., Lin, J. Z., Richards, J. H., Sala, A., & Mitchell-Olds, T. (2001). Local adaptation across a climatic gradient despite small effective population size in the rare sapphire rockcress. *Proceedings. Biological Sciences*, 268 (1477), 1715–1721. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1715>
- McKay, J. K., Christian, C. E., Harrison, S., & Rice, K. J. (2005). “How Local Is Local?”—A Review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restoration Ecology*, 13 (3), 432–440. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2005.00058.x>
- Meynen, E., Schmithuesen, J., & Gellert, J. (1962). *Handbuch der naturraeumlichen Gliederung Deutschlands*. Remagen [etc.]: Bundesanstalt fuer Landeskunde.
- Mijangos, J. L., Pacioni, C., Spencer, P. B. S., & Craig, M. D. (2015). Contribution of genetics to ecological restoration. *Molecular Ecology*, 24(1), 22–37. <https://doi.org/10.1111/mec.12995>
- Miller, S. A., Bartow, A., Gisler, M., Ward, K., Young, A. S., & Kaye, T. N. (2011). Can an ecoregion serve as a seed transfer zone? Evidence from a common garden study with five native species. *Restoration Ecology*, 19 (201), 268–276. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2010.00702.x>

- Mitich, L. W. (2000). Oxeye daisy (*Chrysanthemum leucanthemum* L.), the white-flowered gold flower 1. *Weed Technology*, 14 (3), 659–662. [https://doi.org/10.1614/0890-037X\(2000\)014\[0659-ODCLLT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0890-037X(2000)014[0659-ODCLLT]2.0.CO;2)
- Montague, J. L., Barrett, S. C. H., & Eckert, C. G. (2008). Re-establishment of clinal variation in flowering time among introduced populations of purple loosestrife (*Lythrum salicaria*, Lythraceae). *Journal of Evolutionary Biology*, 21(1), 234–245. <https://doi.org/10.1111/j.1420.9101.2007-01456.x>
- Montalvo, A. M., Williams, S. L., Rice, K. J., Buchmann, S. L., Cory, C., Handel, S. N., & Robichaux, R. H. (1997). Restoration biology: A population biology perspective. *Restoration Ecology*, 5 (4), 277–290. <https://doi.org/10.1046/j.1526-100X.1997.00542.x>
- Mullarkey, A. A., Byers, D. L., & Anderson, R. C. (2013). Inbreeding depression and partitioning of genetic load in the invasive biennial *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 100 (3), 509–518. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200403>
- Muller, M. H., Prosperi, J. M., Santoni, S. & Ronfort, J. (2003). Inferences from mitochondrial DNA patterns on the domestication history of alfalfa (*Medicago sativa*). *Molecular Ecology* 12: 2187-2199.
- Nevill, P. G., Tomlinson, S., Elliott, C. P., Espeland, E. K., Dixon, K. W., & Merritt, D. J. (2016). Seed production areas for the global restoration challenge. *Ecology and Evolution*, 6 (20), 7490–7497. <https://doi.org/10.1002/ece3.2455>
- Nybom, H., & Bartish, I. V. (2000). Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3 (2), 93–114. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00006>
- Nybom, H., Esselink, G. D., Werlemark, G., & Vosman, B. (2004). Microsatellite DNA marker inheritance indicates preferential pairing between two highly homologous genomes in polyploid and hemisexual dog-roses, *Rosa* L. Sect. *Caninae* DC. *Heredity*, 92(3), 139–150. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800332>
- Nybom, H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13:1143–1155. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x
- Oberdorfer, E. (2001). Pflanzensoziologische Exkursionsflora für Deutschland und angrenzende Gebiete. 8. Auflage. Stuttgart, *Verlag Eugen Ulmer*, Seite 724. ISBN 3-8001-3131-5
- Oberprieler, C., Eder, C., Meister, J., & Vogt, R. (2011). AFLP fingerprinting suggests an allopolyploid origin of two members of the *Leucanthemum vulgare* aggregate (Compositae, Anthemideae) in central Europe. *Nordic Journal of Botany*, 29 (3), 370–377. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2011.01025.x>
- Olson, B. E., Wallander, R. T., & Fay, P. K. (1997). Intensive Cattle Grazing of Oxeye Daisy (*Chrysanthemum leucanthemum*). *Weed Technology*, 11 (1), 176–181.
- Ortner, D. (2005). Zur naturschutzrechtliche Verpflichtung der Verwendung autochthonen Saat- und Pflanzguts bei der Straßenbegleitbegrünung. *Natur und Recht* 27: 91- 99. <https://doi.org/10-1007/s10357-004-0534-7>
- Paschke, M., Abs, C., & Schmid, B. (2002). Effects of population size and pollen diversity on reproductive success and offspring size in the narrow endemic *Cochlearia bavarica* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 89 (8), 1250–1259. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.8.1250>
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). Genalex 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* (Oxford, England), 28 (19), 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>

- Peterson, A., Bartish, I. V., & Peterson, J. (2008). Effects of population size on genetic diversity, fitness and pollinator community composition in fragmented populations of *Anthericum liliago* L. *Plant Ecology*, 198(1), 101–110. <https://doi.org/10.1007/s11258-007-9388-4>
- Posselt, U. K. (2000). Genetische Diversität bei Wildformen und Zuchtsorten von *Lolium perenne* L. *Schriftreihe Für Vegetationskunde*, 32, 79–85.
- Prasse, R., Kunzmann, D., & Schröder R. (2010). Entwicklung und praktische Umsetzung naturschutzfachlicher Mindestanforderungen an einen Herkunftsnachweis für gebietseigenes Wildpflanzensaatgut krautiger Pflanzen. unpublished Manuskript DBU-project.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2), 945–959.
- Rachael, W. (2020). How does biodiversity relate to ecosystem functioning in natural ecosystems? *Unsolved Problems in Ecology*, 338.
- Rader, R., Edwards, W., Westcott, D. A., Cunningham, S. A., & Howlett, B. G. (2011). Pollen transport differs among bees and flies in a human-modified landscape. *Diversity and Distributions* 17:519–529. doi: 10.1111/j.1472-4642.2011.00757.x
- Raven, P., & Wackernagel, M. (2020). Maintaining biodiversity will define our long-term success. *Plant Diversity*.
- Rawnsley, R. P., Lane, P. A., Brown, P. H., & Groom, T. (2003). An examination of the seedbank distribution, seedling emergence and seed survival of Apiaceae weeds in pyrethrum. *Regional Institute*.
- Reed, D. H., & Frankham, R. (2001). How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A Meta-Analysis. *Evolution*, 55 (6), 1095–1103. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00629.x>
- Reed, D. H., & Frankham, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17 (1), 230–237. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01236.x>
- Reid, W. v. (2005). Ecosystems and human well-being: Synthesis ; a report of the Millennium Ecosystem Assessment. Washington, DC: *Island Press*. Retrieved from <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0666/2005010265-d.html>
- Reiker, J., Schulz, B., Wissemann, V., & Gemeinholzer, B. (2015). Does origin always matter? Evaluating the influence of nonlocal seed provenances for ecological restoration purposes in a widespread and outcrossing plant species. *Ecology and Evolution*, 5 (23), 5642–5651. <https://doi.org/10.1002/ece3.1817>
- Reisch, C., & Bernhardt-Römermann, M. (2014). The impact of study design and life history traits on genetic variation of plants determined with AFLPs. *Plant Ecology*, 215 (12), 1493–1511. <https://doi.org/10.1007/s11258-014-0409-9>
- Rice, K. J., & Emery, N. C. (2003). Managing microevolution: restoration in the face of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1 (9), 469–478.
- Ritchie, A. L., & Krauss, S. L. (2012). A genetic assessment of ecological restoration success in *Banksia attenuata*. *Restoration Ecology*, 20 (4), 441–449. <https://doi.org/10.1111/j.1526.100X-2011.00791.x>
- Röder, D., & Kiehl, K. (2006). Population structure and population dynamic of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. in relation to vegetation characteristics. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 201 (6), 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2005.11.001>
- Rong, J., Janson, S., Umehara, M., Ono, M., & Vrieling, K. (2010). Historical and contemporary gene dispersal in wild carrot (*Daucus carota* ssp. *Carota*) populations. *Annals of Botany*, 106 (2), 285–296. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq108>

- Rosenberg, N. A. (2004). Distruct: A program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4 (1), 137–138. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x>
- Ryser, P. (1993). Influences of neighbouring plants on seedling establishment in limestone grassland. *Journal of Vegetation Science*, 4 (2), 195–202. <https://doi.org/10.2307/3236105>
- Sackville Hamilton, N. R. (2001). Is local provenance important in habitat creation?: A reply. *Journal of Applied Ecology*, 38 (6), 1374–1376. <https://doi.org/10.1046/j.0021-8901.2001.00670.x>
- Sagarin, R. D., & Gaines, S. D. (2002) The 'abundant centre' distribution: to what extent is it a biogeographical rule? *Ecology Letters* 5(1):137–147.
- Salisbury, E. J. (1961). Weeds and aliens. Collins, London.
- Scholz, C., & Uhlemann, I. (2001a). *Leucanthemum ircutianum* DC. in Brandenburg und Sachsen. *Berichte Der Arbeitsgemeinschaft Sächsischer Botaniker, neue Folge* (18), 79–84.
- Scholz, C., & Uhlemann Ingo (2001b). *Leucanthemum ircutianum* DC. und *Leucanthemum vulgare* LAM. in Sachsen-Anhalt. *Mitteilungen Zur Floristischen Kartierung in Sachsen-Anhalt*, 6, 43–48.
- Schröder, R., & Prasse, R. (2013). Cultivation and hybridization alter the germination behavior of native plants used in revegetation and restoration. *Restoration Ecology*, 21 (6), 793–800. <https://doi.org/10.1111/rec.12018>
- Schumacher, A., & Werk, K. (2010). Die Ausbringung gebietsfremder Pflanzen nach § 40 Abs. 4 BNatSchG. *Natur und Recht*, 32 (12), 848–853. <https://doi.org/10.1007/s10357-010-1985-7>
- Sebald, O., Nebel, M., Philippi, G., Demuth, S., Kleinsteuber, A., Gottschlich, G., & Baumann, H. (Eds.) (1992). Die Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs: Im Rahmen des Artenschutzprogrammes Baden-Württemberg. Stuttgart: Ulmer.
- Seitz, B., Jürgens, A. und Kowarik, I. (2007). Erhaltung genetischer Vielfalt: Kriterien für die Zertifizierung regionalen Saat- und Pflanzguts. Literatur-Studie; *BfN-Skripten* 208.
- Sexton, J. P., McIntyre, P. J., Angert, A. L., & Rice, K. J. (2009). Evolution and ecology of species range Limits. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40 (1):415–436.
- Sgrò, C. M., Lowe, A. J., & Hoffmann, A. A. (2011). Building evolutionary resilience for conserving biodiversity under climate change. *Evolutionary applications* 4 (2):326–337.
- Shim, S. I., & Jørgensen, R. B. (2000). Genetic structure in cultivated and wild carrots (*Daucus carota* L.) revealed by AFLP analysis. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 101 (1-2), 227–233. <https://doi.org/10.1007/s001220051473>
- Stearns, S. C., & Hoekstra, R. F. (2000). Evolution: An Introduction. New York: Oxford University Press.
- Stingemore, J. A., & Krauss, S. L. (2013). Genetic delineation of local provenance in *Persoonia longifolia*: Implications for seed sourcing for Ecological Restoration. *Restoration Ecology*, 21 (1), 49–57. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2011.00861.x>
- Thompson, K., Band, S. R., & Hodgson, J. G. (1993). Seed size and shape predict persistence in soil. *Functional Ecology*, 7 (2), 236. <https://doi.org/10.2307/2389893>
- Tóth, K. (2014). Soil seed bank in loess grasslands and their role in grassland recovery. *Applied Ecology and Environmental Research*, 12 (2), 537–547. https://doi.org/10.15666/aeer/1202_537547
- Umehara, M., Eguchi, I., Kaneko, D., Ono, M., & Kamada, H. (2005). Evaluation of gene flow and its environmental effects in the field. *Plant Biotechnology* 22(5):497–504.
- Van Kleunen, M., Rockle, M., & Stift, M. (2015). Admixture between native and invasive populations may increase invasiveness of *Mimulus guttatus*. *Proceedings. Biological Sciences*, 282 (1815). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1487>
- Vander Mijnsbrugge, K., Bischoff, A., & Smith, B. (2010). A question of origin: Where and how to collect seed for ecological restoration. *Basic and Applied Ecology*, 11 (4), 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2009.09.002>

- Vekemans, X. (2002). AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the Author. *Laboratoire De Génétique Et Ecologie Végétale*, Université Libre De Bruxelles, Belgium.
- Vergeer, P., Rengelink, R., Copal, A., & Ouborg, N. J. (2003). The interacting effects of genetic variation, habitat quality and population size on performance of *Succisa pratensis*. *Journal of Ecology*, 91 (1), 18–26. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00736.x>
- Verhoeven, K. J. F., Vanhala, T. K., Biere, A., Nevo, E., & van Damme, J. M. M. (2004). The genetic basis of adaptive population differentiation: A quantitative trait locus analysis of fitness traits in two wild barley populations from contrasting habitats. *Evolution*, 58 (2), 270–283. <https://doi.org/10-1111/j.0014-3820.2004.tb01644.x>
- Verhoeven, K. J. F., Macel, M., Wolfe, L. M., & Biere, A. (2011). Population admixture, biological invasions and the balance between local adaptation and inbreeding depression. *Proceedings Biological Sciences*, 278 (1702), 2–8. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1272>
- Veron, J. E. N. (1995). Corals in space and time - The biogeography and evolution of the Scleractinia. *UNSW Press*, Sydney, ISBN 0-80148-263-1
- Villard, M. (1971). Contribution a l'etude cytotoxonomique et cytogenetique du genre *Leucanthemum* Adans. en Briq. et Cav.: Systematics: Angiospermae, Compositae: *Leucanthemum*. *Berner Schweizer Botanische Gesellschaft*. (80), 96–188.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21), 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Wagenitz, G., Conert, H. J., & Hegi, G. (Eds.) (1987). *Illustrierte Flora von Mitteleuropa* (2., überarb. und erw. Aufl.). Berlin: Parey.
- Weber, E. (2018). Biodiversität - Warum wir ohne Vielfalt nicht leben können. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-55624-5>.
- Weising, K. (2005). DNA fingerprinting in plants: Principles, methods, and applications, 2nd edn. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL
- Wilkinson, D. M. (2001). Is local provenance important in habitat creation? *Journal of Applied Ecology*, 38 (6), 1371–1373. <https://doi.org/10.1046/j.0021-8901.2001.00669.x>
- Wilkinson, K. M., Riley, S. A., Steinfeld, D. E., & Landis, T. D. (2008). Native plants on disturbed roadsides: introduction to a new integrated approach. *Native Plants Journal*, 9 (3), 267–277. <https://doi.org/10.2979/NPJ.2008.9.3.267>
- Willemstein, S. C. (1987). An evolutionary basis for pollination ecolog. Leiden University Press.

Kapitel 1: Does origin always matter? Evaluating the influence of non-local seed provenances for ecological restoration purposes in a widespread and outcrossing plant species

Jutta Reiker¹, Benjamin Schulz², Volker Wissemann¹ and Birgit Gemeinholzer¹

¹ Institute of Botany, Justus-Liebig-University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 38, D-35392 Giessen, Germany

² Institute of Landscape Ecology and Resource Management, Interdisciplinary Research Centre (IFZ), Justus Liebig University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35393 Giessen, Germany

Key words: restoration, population genetics, non-local genotypes; microsatellite markers, Local-is-Best theory, *Daucus carota*

Corresponding author:

Jutta Reiker

Phone +49 (0)641 9935176, Fax +49 (0)641 9935179

Email: Jutta.Reiker@bot1.bio.uni-giessen.de

Running title: Does origin always matter?

Article type: Research Article

Abstract

For restoration purposes, nature conservation generally enforces the use of local seed material based on the “local-is-best” (LIB) approach. However in some cases recommendations to refrain from this approach have been made. Here we test if a common, widespread species with no obvious signs of local adaptation may be a candidate species for abandoning LIB

during restoration. Using 10 microsatellite markers we compared population genetic patterns of the generalist species *Daucus carota* in indigenous and formerly restored sites (non-local seed provenances). Gene diversity overall ranged between $H_e = 0.67$ and 0.86 and showed no significant differences between the two groups. Hierarchical AMOVA and PCA revealed very high genetic population admixture and negligible differentiation between indigenous and restored sites ($F_{CT} = 0.002$). Moreover, differentiation between groups was caused by only one outlier population, where inbreeding effects are presumed. We therefore conclude that the introduction of non-local seed provenances in the course of landscape restoration did not jeopardize regional species persistence by contributing to inbreeding or outbreeding depressions, or any measurable adverse population genetic effect. Based on these results, we see no obvious objections to the current practice to use the tenfold cheaper, non-local seed material of *D. carota* for restoration projects.

Introduction

In landscape and roadside verge restoration projects the use of non-local seeds has been - and often still is - common practice, as prices for non-local seed mixtures can be up to ten-fold lower than for local provenances, and often large quantities of indigenous genotypes are unavailable (Burton and Burton 2002; Kettenring et al. 2014). However, introgression and hybridization between non-local and indigenous provenances can alter population genetic compositions as non-local genotypes might function as effective drivers for invasions below the species level (Jones 2013). This can lead to the homogenization, co-existence, or extinction of the regional and/or non-local gene pools with effects on the genotypic or allelic richness (Hughes et al. 2008). As the effects of non-local genotypes on the indigenous flora are still not well understood, nature conservation strategies proclaim the preservation and maintenance of local genotypic identities (Jones 2013). In some regions the use of indigenous genotypes for restoration purposes even becomes mandatory, e.g. throughout Germany from 2020 onwards as part of the nature protection and landscape conservation act (BNatSchG §40-1, 2010).

The use of local genotypes is justified by the biodiversity conservations' main strategy to preserve a region's genetic legacy resulting from a history of natural selection in local environments (Reed and Frankham 2001; Sackville Hamilton 2001; Jones 2013), hence to preserve indigenous provenances, based on the "local-is-best" (LIB) assumptions. By adhering to the LIB approach it is assumed that indigenous provenances are superior to non-local material with regard to fitness estimations or trait analyses (e.g., in relation to size and biomass, Leimu and Fischer 2008; Hereford 2009) as a result of local adaptation processes (Linhart and Grant 1996; Kawecki and Ebert 2004; Hereford 2009; Johnson et al. 2010). Theory predicts local adaptation to be positively correlated to increased genetic variation within populations and divergence between populations (Hereford 2009). Generally, larger populations have higher chances to be well adapted to their native environment as allelic divergence might support the presence of advantageous alleles (Whitlock 2003) and prevent the fixation of deleterious alleles (Lande 1994; Lynch and Milligan 1994; Whitlock 2000). Gene flow can hamper local adaptation by homogenizing allele frequencies and limiting the response to selection within environments (Stanton et al. 1997; Hendry and Taylor 2004; Kettenring et al. 2014), whereas environmental heterogeneity fosters local adaptation (Becker et al. 2006; Hereford and Winn 2008).

Even if local adaptation is ubiquitous (McKay et al. 2001; Angert and Schemske 2005; Kettenring et al. 2014) the relative strength and scale of adaptation varies across species and sites, and several authors predict local adaptation to be even less common than presumed (Leimu and Fischer 2008; Hereford 2009; Kettenring et al. 2014). Thus, strict adherence to the LIB approach for restoration may not evidently be the best choice for biodiversity conservation (Kettenring et al. 2014). And indeed, recommendations to refrain from the LIB approach were made, if (i) highly altered restoration environments radically differ from surrounding ecosystems (Kettenring et al. 2014), (ii) locally adapted source populations as result of strong directional selections are genetically depleted, (Rice and Emery 2003; Broadhurst et al. 2008), and (iii) an increase in local diversity by genetic reticulation between indigenous and non-local

genotypes via hybridization could be beneficial for populations to adapt to future environmental changes (Rice and Emery 2003; Verhoeven et al. 2010; Sgrò et al. 2011; Breed et al. 2013).

Here we test an additional argument to refrain from the LIB approach that is in contrast to current nature conservation practice, namely the case of widely distributed, common, generalist species that do not feature obvious indications of local adaptation. Therefore, populations of the widespread and outcrossing plant species *Daucus carota* were analyzed to compare genetic patterns of indigenous populations to those from sites formerly restored with non-local seed provenances.

Road construction and maintenance departments provided information about dates of restoration and applied seed-mixtures of formerly restored sites in Central Germany. However, except that seed-mixtures comprised non-local and non-German genotypes, nothing is known about their exact origin.

Daucus carota (Apiaceae) was chosen for this study due to (i) its wide use in seed-mixtures for herbal reintroductions, (ii) its native abundance in a broad range of habitats, and (iii) its common presence in the investigation area. Typical habitats of *D. carota* are meadows, thickets, and areas along railroads and roadsides with some kind of disturbance, while the species is also common in extensively managed grasslands. The species' native distribution covers large parts of Europe, Eastern and Central Asia, and the Mediterranean region with up to ten poorly defined subspecies (Hegi 1964). *Daucus carota* is a biennial species, which is obligate cross-pollinated with limited adaptations to species-specific pollinators (Hegi 1964). The seeds are adapted to epizoochoric dispersal by featuring bristly hairs that protrude from the ribbed seed surface (Hegi 1964; Rong et al. 2010).

Molecular population analyses in *D. carota* have been applied previously, e.g., by using random amplified polymorphic markers (RAPD), inter simple sequence repeats (ISSR), microsatellite markers, and amplified fragment length polymorphisms (AFLP) – mainly focusing on cultivars or germplasm variability (Vivek and Simon 1999; Yan et al. 2009; Maksylewicz and Baranski 2013). However, some investigations also incorporated or screened wild taxa (Shim S. I. and Jørgensen 2000; Bradeen et al. 2002; Rong et al. 2010; Cavagnaro et al. 2011).

Cavagnaro et al. (2011) designed polymorphic and robust PCR-based microsatellite markers for *D. carota*, mainly to facilitate their inclusion in different maps as anchoring points for SSR-tagging of phenotypic traits. We here use some of their developed microsatellite markers to investigate genetic diversity, population structure, and gene flow within and among populations.

Materials and Methods

Study sites

Road side authorities provided information about sites formerly restored with non-local seed material that comprised roadside verge restoration projects and compensatory sites. As roadside verges are chronically disturbed environments we decided to investigate compensatory sites only. Overall, we chose ten restored sites (R) situated in Central Germany (Central and South Hesse, W-Thuringia, NW Bavaria) within an investigation area of approximately 200 x 200 km² in a comparatively sparsely populated hilly region. R-sites cover an area between 0.5 and 2 ha and were restored between 1996 and 2004 (Table 1, Fig. 1). All sites were converted from arable land to compensatory sites and are adjacent either to woodlands, meadows, or agricultural fields, with corn, rapeseeds, and cereals being the most common crops in the region. Arable land in this region is commonly being ploughed at least once a year. Biennial species which start flowering and fruit set in the second year normally do not survive ploughing and thus have limited chances to substantially contribute to the soil seed bank. However, we cannot totally exclude indigenous *D. carota* seed dispersal from adjacent fields that may have contributed to the seed bank and recolonized once restored.

As the main motivation for site selection was good documentation of site history, populations are not regularly spaced throughout the investigation area. For each site, information about the year of restoration as well as the presence and percentage of *D. carota* in the seed-mixture are available (0.1% since 1988 FLL Bonn).

During data analysis the restored site R04 turned out to markedly differ from all others site. Hence, some calculations were additionally executed for a subset of R-populations excluding the outlier R04.

For comparison, we investigated nine indigenous sites (I), as representatives of the local genotypic diversity: four meadows which are mostly maintained under the Habitats Directive of Natura 2000, and five protected nature reserve areas (Table 1). All I-sites have not been modified or re-sown during the last 60 years (Prasse et al. 2010). They were chosen due to their regional vicinity to the restored sites. Notwithstanding, a distance of at least 9 km between indigenous and restored sites was kept. In addition, a minimum distance of 200 m to any other adjacent population of cultivated relatives was taken into account to minimize potential effects of hybridization (Posselt 2000; Prasse et al. 2010). We are aware that potential hybridization between wild and cultivated carrots in the study region cannot be excluded. However, in a highly anthropogenic influenced, patch-work structured landscape with mainly small isolated nature conservation areas, our approached seemed to be the best trade-off to define “regional species diversity”.

On each site, leaf material of 20 individuals was sampled along transects and immediately dried in silica gel. Distances between sampled individuals within populations were at least two meters to optimize coverage of site specific populations’ genetic diversity.

Molecular methods

Approximately 10 mg silica dried leaf material per individual was used for DNA extraction. The DNeasy plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) was applied according to the manufacturer’s instructions. DNA was diluted to 3 - 10 ng/ul. Ten microsatellite primer combinations, developed by Cavagnaro et al. (2011) for its use on *D. carota*, were optimized to suite for this investigation (Table 2). The PCR mixture with a total volume of 20 µl contained: 7.7 µl dd H₂O, 1 µl HEX or FAM fluorescence labeled forward primer (5 pmol/µl), 1 µl reverse primer (5 pmol/µl), 0.4 µl BSA (10 ng/µl), 4 µl Betain Monohydrat (5 M), 2.4 µl dNTPs (2 mM), 0.5 µl (5 U/µl) DreamTaq polymerase (Fermentas, Germany), 2 µl 10× DreamTaq PCR buffer

(Fermentas, Germany) and 1 μ l of the diluted genomic DNA. PCR was conducted with an Eppendorf-Gradient-Mastercycler. The PCR program was 2 min at 95°C for initial denaturation, followed by 35 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at the annealing temperature of each primer pair (54 - 57°C, Table 2), and 45 sec at 72°C; followed by a final extension at 72°C for 15 min. PCR products were sent to LGC Forensics (Cologne, Germany) for fragment visualization.

Data analysis

Microsatellite data were processed with GeneMarker® V1.90 (software SoftGenetica, LLC. PA, USA). The lengths of the DNA fragments were standardized using ROX 500. For evaluation, fragments were recorded in a co-dominant data matrix. Genetic diversity within populations was estimated as number of different alleles (N_a), number of effective alleles (N_e), Shannon's Information Index (H'), and observed (H_o) and unbiased expected heterozygosity (uH_e) using GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse 2012). Significance of differences between diversity estimates with small sample sizes was tested with two-tailed T-tests. Single sample T-tests were applied and the non-parametric Mann-Whitney U-test was used to analyze differences among groups (all <http://www.socscistatistics.com/Default.aspx>). Genetic variation among groups of indigenous and restored populations (F_{CT}), among populations within groups (F_{SC}) and within populations (F_{ST}) was partitioned with hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) using ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer 2010). Significance levels were determined after 9999 permutations. Furthermore, clustering of samples was visualized with principal component analysis (PCA) using the R package ADEGENET v1.4-2 (Jombart 2008).

Results

Data of 333 individuals from 19 different sites with ten microsatellite markers each were analyzed. In total 20 individuals per site were sampled; however, for some sites data retrieval could only be achieved for fewer specimens (Table 1, Figure 1).

Microsatellite statistics

Microsatellite statistics (Table 2) for allele size ranges of markers, number of alleles, and H_e values partly differed from earlier publications (Cavagnaro et al. 2011). However, most likely this is due to different surveyed wild genotypes as well as differences in the genotyping facility (i.e., equipment and software). A total of 257 alleles were generated from the ten microsatellite markers (mean 24.0 ± 6.78 alleles per locus). Allele ranges had a mean of $67.0 \text{ bp} \pm 21.9 \text{ bp}$ (SD). Total number of samples producing null alleles was 59 out of 257 alleles (22.96%). Seven markers were null at more than one sample. The mean number of null alleles per locus was 5.9 ± 5.8 SD. Rare alleles made up 30 of the 257 total alleles (mean 3.0 ± 3.1 SD). Locus GSSR 6 and GSSR 9 deviated significantly from Hardy Weinberg expectations. None of the applied microsatellite markers revealed fixation for different alleles in any of the screened populations.

Population statistics

Overall, H_e -values ranged from 0.67 to 0.86 (Table 3) with an average expected heterozygosity of $H_e = 0.81$. Thus, all sampled individuals revealed a high chance of being heterozygous. When only indigenous populations were considered, average expected heterozygosity increased slightly to $H_e = 0.82$, while for restored sites it was $H_e = 0.80$. Overall, t-tests revealed no significant differences in diversity estimates between indigenous and restored populations ($p < 0.05$). Highest number of effective alleles (N_e) and highest H_e values were found in an indigenous population (I03: $H_e = 0.89$; $N_e = 8.3$). In contrast, highest number of different alleles (N_a) was found in a restored population (R05; $N_a = 12.4$). Lowest N_e , I , H_o and H_e were found in population R04. Single sample T-tests revealed R04 to diverge significantly from all other populations (N_a , N_e , H' , H_o , and uH_e ; $p \leq 0.01$). However, the equality of variances between all indigenous and restored populations with or without R04 was not affected ($p < 0.05$).

Hierarchical AMOVA revealed that most genetic variation resided within populations (95.6%), whereas only 4.1% explained differences among populations within groups and only

0.2% among indigenous and restored populations (Table 3). Interestingly, when R04 was excluded from the data set differences between indigenous and restored sites diminished (data not shown). Thus, indigenous and restored sites can more or less be considered as part of one single, random mating population with arbitrary groupings of subpopulations. At the individual group level differentiation among indigenous populations ($F_{ST} = 0.030$, $p < 0.01$) was lower than among restored populations ($F_{ST} = 0.055$, $p < 0.001$). However, again excluding R04 from the dataset led to comparable values for restored sites ($F_{ST} = 0.034$, $p < 0.01$), substantiating the different population genetic pattern of R04.

AMOVA results were strongly corroborated by PCA analysis (Figure 2). There was no distinct clustering of populations, and only centroids of indigenous and restored populations tended to be separated along the second component. One exception was again population R04. The first three components accounted for 4.8%, 3.7% and 3.4% of genetic variation.

Genotypic population affiliation in general could not be explained by the year of restoration (see Table 1) or genetic diversity, with the exception of population R04

Discussion

Our study was intended to test if the biodiversity conservation strategy to preserve the region's genetic legacy by using local genotypes is justified for widely distributed, common and generalist plant species, like *D. carota*. We therefore compared population genetic patterns of indigenous populations with populations that were restored with non-local seed provenances between 1994 and 2004, hence after several years of establishment.

Throughout our whole investigation area we found very low population differentiation among the sampled groups of *D. carota* populations. Overall, population genetic patterns are indicative for high genetic admixture between indigenous as well as formerly restored sites with no clear evidences of local genetic adaptation. Bradeen et al. (2002) already postulated the population genetic pattern of wild carrot to be genetically non-structured. This is partly supported by Rong et al. (2010) who detected weak but significant genetic structures in Dutch wild carrot populations. In contrast Shim and Jørgensen (2000) found pronounced genetic

structures; however, this is an investigation in Denmark towards the species' northernmost distribution range where species-specific parapatric local adaptations are more likely to occur (Brown et al. 1999; Sagarin and Gaines 2002; Eckert et al. 2008; Sexton et al. 2009).

Most of the molecular variation in our analysis occurs within populations, which is common for outcrossing species (Aavik et al. 2012). This is supported by Rong et al. (2010), who revealed distinctive long-distance pollen dispersal of at least 4 km in *D. carota* and claimed that most offspring from a maternal plant resulted from different paternal individuals. They estimated outcrossing rates of 96% for wild carrot populations and explained this high outcrossing rate by the strongly proterandrous inflorescence with stigmas only becoming receptive when anthers of all stamens in the umbel have completed dehiscence (Koul et al. 1989). Thus, the specialized pollination mechanism triggers pollen-mediated gene flow among distant individuals and weakens spatial genetic structures (Umehara et al. 2005; Rong et al. 2010).

Assumptions that the observed genetic patterns partly derived from local genotypes from the soil seed bank without successful propagation of foreign genotypes cannot totally be rejected, as *D. carota* seeds have the potential to survive several years under field conditions (Gross & Werner, 1982; Thompson, Band, & Hodgson, 1993; Clark & Wilson, 2003; Rawnsley et al. 2003). Widely practiced yearly ploughing prior to restoration must have hampered *D. carota* persistence on the sites, but we cannot totally exclude indigenous seed dispersal from adjacent fields that may have contributed to the seed bank and recolonized prior or once restored.

The detected slight differences in diversity estimates between indigenous and restored populations could potentially pinpoint to novel genotype introductions in the region, however, from very similar population genetic origin. Umehara et al. (2005) already stated that carrots, even cultivated varieties and wild carrots, have extremely wide gene diversity (Rong et al. 2010). This is supported by our analysis which revealed substantial levels of genetic diversities on different scales: (i) within populations, (ii) between individuals of the indigenous sites but also on the restored sites, and (iii) throughout the investigation area. The overall detected genetic diversity in our analysis is in accordance to other investigations in wild carrot, e.g. by

Rong et al. (2010), and confirms earlier hypotheses. Markedly lower overall values were reported by Shim and Jørgensen (2000) and Bradeen et al. (2002), however, with quantitative molecular markers (AFLP, ISSR).

The highest allelic diversities were found in indigenous populations (I03, I05, I08) and in one restored site (R05), which was established in 1998. As no information about the initial genotypic diversities of the non-local seed mixtures at the restored sites are available, it remains rather speculative if the current findings are the results of slightly lower initial genotypic diversities in the seed mixtures or are due to selection processes in the new habitats.

The lowest allelic diversities were found in one restored population R04, which diverged substantially in its population genetic pattern from all other investigated sites. Restoration of R04 took place in 1996 together with population R03, which is in close vicinity. The executing authority was in both cases the same. Thus, the detected difference in population genetic diversity is rather unlikely to originate from differences in the initial seed mixtures. The comparatively low values of within-population diversity with the extremely low values of different alleles and effective alleles in R04 could be indicative for high inbreeding. R04, with its approx. 1 ha, is nowadays predominantly covered in scrub vegetation (approx. 80%) and *D. carota* only remained as a remnant within grassland on the margins of the site, where other dicots are scarce, too. Due to intensively used agricultural fields in close vicinity, there are no other potential habitats for *D. carota* within a radius of 1 km. Even if we consider that pollinators do have longer flight ranges, site visitation for pollination might be comparatively rare.

We found no obvious signs that the introduction of non-local seed material in the course of restoration purposes contributed to the regional overall genetic diversity of the species. This finding is in contrast to current assumptions that “the diversity of the original source population is a critical consideration for restoration purposes, and that the starting pool of genetic diversity governs the performance of a reintroduced population for a long time” (Falk et al. 2001). However, it still remains unclear, if the initial genetic diversity in the non-local seed mixtures was indeed that different from indigenous populations. Gemeinholzer and Bachmann (2005) also conducted population genetic analyses in the comparable abundant, widespread and

generalist *Cichorium intybus* L., and discovered high genetic similarity in populations from Germany, Italy, Croatia and Uzbekistan, even with increasing geographic distances. Thus, as population genetic diversity is the result of the accumulations of neutral substitutions or diversifying or frequency-dependent selection, one might have to refer to “non-local” as a sweeping term, dependent on the degree of adaptation and selection in the respective target species, without narrowing it down to geographic vicinity, which currently is the common approach in many nature conservation strategies.

Conclusion

For restoration practitioners the use of local seeds has become a common objective (e.g. Broadhurst et al. 2008; Erickson, 2008; Miller et al., 2011) due to the often proclaimed potential risks associated with non-local genotypic material, namely outbreeding depression and adaptation (e.g. Kaye, 2001; Mijangos, Pacioni, Spencer, & Craig, 2015). However, recent plant research, suggests outbreeding depression and adaptation to be less common than formerly assumed (Edmands, 2007; Leimu and Fischer 2008; Mijangos et al., 2015).

By using molecular tools to evaluate landscape restoration projects on compensatory sites several years after establishment we could demonstrate that the use of non-local seed proveniences did not result in adverse population genetic effects on indigenous populations of *D. carota*. In the obligate outcrossing plant species we could detect negligible population differentiation between indigenous populations and populations restored with non-local seed material. No negative effects on allelic richness, selective sweeps or reduced population genetic diversity could be observed, with one exception, where inbreeding effects are presumed. Even though no information about the geographic origin of the “non-local” seed material is available, we assume that for the common, outcrossing and generalist species the term “non-local” is a sweeping term which should not be narrowed down to geographic vicinity, as presently common in biodiversity conservation.

Decisive criteria for restoration projects are restoration objectives and goals, as well as the efficient use of resources considering costs and seed availability (Ehrenfeld, 2000; Kaye,

2001; Doede, 2005; Wilkinson, Riley, Steinfeld, & Landis, 2008; Miller et al., 2011). On the basis of the here conducted population genetic analysis, there are no obvious objections against the current nature conservation practice to use the tenfold cheaper non-local seed material of *D. carota*. Moreover, this might also be the case for other common, generalist and outcrossing plant species.

Acknowledgement

We are grateful for the financial support from the Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU), and the Heidehofstiftung. Sampling was conducted with support from the Association of German Wild Seeds and Wild Plants Producer Association (Markus Wieden), as well as the road authorities Frankfurt (Gerd Ledergerber), Schotten (Alexander Greb), and Herleshausen (Helmut Byczysko). For permits to collect plants in nature conservation areas we thank Jürgen Busse and Manfred Grossman. For support in the molecular laboratory, we thank the biotechnical assistants (Sabine Mutz and Helene Krufczik). Thank you to Prof. Allen Moore and the reviewers who helped in linguistic corrections, which is greatly acknowledged here.

Data Archiving Statement

Data for this study is available at: *to be completed after manuscript is accepted for publication.*

Literature cited

- Aavik, T., P. J. Edwards, R. Holderegger, R. Graf, and R. Billeter 2012. Genetic consequences of using seed mixtures in restoration: A case study of a wetland plant *Lychnis flos-cuculi*. *Biological Conservation* **145**(1):195–204.
- Angert, A. L., and D. W. Schemske 2005. The evolution of species' distributions: reciprocal transplants across the elevation ranges of *Mimulus cardinalis* and *M. lewisii*. *Evolution; international journal of organic evolution* **59**(8):1671–1684.

- Becker, U., G. Colling, P. Dostal, A. Jakobsson, and D. Matthies 2006. Local adaptation in the monocarpic perennial *Carlina vulgaris* at different spatial scales across Europe. *Oecologia* **150**(3):506–518.
- Bradeen, J. M., I. C. Bach, M. Briard, V. Le Clerc, D. Grezebelus, D. A. Senalik, and P. W. Simon 2002. Molecular Diversity Analysis of Cultivated Carrot and Wild *Daucus* Populations. *Journal of America Society Horticultural Science* **127** (3):383–391.
- Breed, M. F., M. G. Stead, K. M. Ottewell, M. G. Gardner, and A. J. Lowe 2013. Which provenance and where? Seed sourcing strategies for revegetation in a changing environment. *Conservation Genetics* **14**(1):1–10.
- Broadhurst, L. M., A. Lowe, D. J. Coates, S. A. Cunningham, M. McDonald, P. A. Vesk, and C. Yates 2008. Seed supply for broadscale restoration: maximizing evolutionary potential. *Evolutionary Applications*, Blackwell Publishing Ltd 1:587–597.
- Brown, R. W., and M. C. Amacher. 1999. Selecting plant species for ecological restoration: a perspective for land managers. In L. K. Holzworth, and R. W. Brown, compilers. *Revegetation with Native Species*. Society for Ecological Restoration Annual Meeting, pp. 1–16. USDA-Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Ogden
- Bundesnaturschutzgesetz, nature protection and landscape conservation act, Germany (BNatSchG) from 29.07.2009 (BGBl. I S. 2542), In force since 01.03.2010.
- Burton, P. J., and C. M. Burton 2002. Promoting genetic diversity in the production of large quantities of native plant seed. *Ecological Restoration* **20**(2):117–123.
- Cavagnaro, P. F., S.-M. Chung, S. Manin, M. Yildiz, A. Ali, M. S. Alessandro, M. Iorizzo, D. A. Senalik, and P. W. Simon 2011. Microsatellite isolation and marker development in carrot - genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across Apiaceae. *BMC genomics* **12**:386.
- Clark, D. L., and M. V. Wilson 2003. Post-dispersal seed fates of four prairie species. *American journal of botany* **90**(5):730–735.

- Doede, D. L. 2005. Genetic variation in *Broadleaf Lupine* (*Lupinus latifolius*) on the Mt Hood National Forest and implications for seed collection and deployment. *Native Plants Journal* **6**(1):36–48.
- Eckert, C. G., K. E. Samis, and S. C. Loughheed 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology* **17**(5):1170–1188.
- Edmands, S. 2007. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology* **16**(3):463–475.
- Ehrenfeld, J. G. 2000. Defining the limits of restoration: the need for realistic goals. *Society for Ecological Restoration* **8**(1):2–9.
- Erickson, V. J. 2008. Developing native plant germplasm for national forests and grasslands in the Pacific Northwest. *Native Plants Journal* **9**(3):255–266.
- Falk, D., E. Knapp, and E. O. Guerrant 2001. An introduction to restoration genetics. Society for Ecological Restoration.
- Gemeinholzer, B. and K. Bachmann 2005: Examining morphological and molecular diagnostic character states in *Cichorium intybus* L. (Asteraceae) and *Cichorium spinosum* L., *Plant Systematics and Evolution*, **253** (1-4): 105-123.
- Gross, K. L., and P. A. Werner 1982. Colonizing abilities of 'biennial' plant species in relation to ground cover: implications for their distributions in a successional Sere. *Ecology* **63**(4):921.
- Hegi, G. 1964. *Illustrierte Flora von Mittel-Europa* V/4. Verlag C Hanser, München.
- Hendry, A. P., and E. B. Taylor 2004. How much of variation in adaptive divergence can be explained by gene flow? An evaluation using lake-strain stickleback pairs. *Evolution* **58**(10):2319–2331.
- Hereford, J., and A. A. Winn 2008. Limits to local adaptation in six populations of the annual plant *Diodia teres*. *The New Phytologist* **178**(4):888–896.
- Hereford, J. 2009. A quantitative survey of local adaptation and fitness trade-offs. *The American Naturalist* **173**(5):579–588.

- Hughes, A. R., B. D. Inouye, M. T. J. Johnson, N. Underwood, and M. Vellend 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters* **11**(6):609–623.
- Johnson, R., L. Stritch, P. Olwell, S. Lambert, M. E. Horning, and R. Cronn 2010. What are the best seed sources for ecosystem restoration on BLM and USFS lands? *Native Plants Journal* **11**:117–131.
- Jones, T. A. 2013. When local isn't best. *Evolutionary applications* **6**(7):1109–1118.
- Kawecki, T. J., and D. Ebert 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* **7**(12):1225–1241.
- Kaye, T. N. 2001. Common ground and controversy in native plant restoration: the SOMS debate, source distance, plant selections, and a restoration-oriented definition of native: Pages 5–12 in R. Rose and D. Haase, editors. *Native plant propagation and restoration strategies*. Nursery Technology Cooperative and Western Forestry and Conservation Association, Corvallis, Oregon.
- Kettenring, K. M., K. L. Mercer, C. Reinhardt Adams, J. Hines, and B. Wilsey 2014. Application of genetic diversity-ecosystem function research to ecological restoration. *Journal of Applied Ecology* **51**(2):339–348.
- Koul, P., A. K. Koul, and I. A. Hamal 1989. Reproductive biology of wild and cultivated carrot (*Daucus carota* L.). *New Phytologist* **112**(3):437–443.
- Lande, R. 1994. Risk of population extinction from fixation of new deleterious mutations. *Evolution* **48**(5):1460–1469.
- Leimu, R., and M. Fischer 2008. A meta-analysis of local adaptation in plants. *PloS one* **3**(12):e4010.
- Linhart, Y. B., and M. C. Grant 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**:237–277.
- Lynch, M., and B. G. Milligan 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**(2):91–99.

- Maksylewicz, A., and R. Baranski 2013. Intra-population genetic diversity of cultivated carrots (*Daucus carota* L.) assessed by analysis of microsatellite markers. *Acta Biochimica Polonica* **60** (4):753–760.
- McKay, J. K., J. G. Bishop, J. Z. Lin, J. H. Richards, A. Sala, and T. Mitchell-Olds 2001. Local adaptation across a climatic gradient despite small effective population size in the rare sapphire rockcress. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **268**(1477):1715–1721.
- Mijangos, J. L., C. Pacioni, Spencer, Peter B S, and M. D. Craig 2015. Contribution of genetics to ecological restoration. *Molecular Ecology* **24**(1):22–37.
- Miller, S. A., A. Bartow, M. Gisler, K. Ward, A. S. Young, and T. N. Kaye 2011. Can an ecoregion serve as a seed transfer zone? Evidence from a common garden study with five native species. *Restoration Ecology* **19**(201):268–276.
- Posselt, U. K. 2000. Genetische Diversität bei Wildformen und Zuchtsorten von *Lolium perenne* L. *Schriftenreihe für Vegetationskunde* 32:79-85.
- Rawnsley, R. P., P. A. Lane, P. H. Brown, and T. Groom 2003. An examination of the seedbank distribution, seed emergence and seed survival of Apiaceae weeds pyrethrum. The Regional Institute. *Solutions for a better environment* (p. EJ). - An examination of the seedbank distribution, seedling emergence and seed.
- Reed, D. H., and R. Frankham 2001. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* **55**(6):1095–1103.
- Rice, K. J., and N. C. Emery 2003. Managing microevolution: restoration in the face of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment* **1** (9):469–478.
- Rong, J., S. Janson, M. Umehara, M. Ono, and K. Vrieling 2010. Historical and contemporary gene dispersal in wild carrot (*Daucus carota* ssp. *carota*) populations. *Annals of botany* **106**(2):285–296.
- Sackville Hamilton, N. R. 2001. Is local provenance important in habitat creation? A reply. *Journal of Applied Ecology* **38**(6):1374–1376.

- Sagarin, R. D., and S. D. Gaines 2002. The 'abundant centre' distribution: to what extent is it a biogeographical rule? *Ecology Letters* **5**(1):137–147.
- Sexton, J. P., P. J. McIntyre, A. L. Angert, and K. J. Rice 2009. Evolution and Ecology of Species Range Limits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **40**(1):415–436.
- Sgrò, C. M., A. J. Lowe, and A. A. Hoffmann 2011. Building evolutionary resilience for conserving biodiversity under climate change. *Evolutionary applications* **4**(2):326–337.
- Shim S. I., and R. B. Jørgensen 2000. Genetic structure in cultivated and wild carrots (*Daucus carota* L.) revealed by AFLP analysis. *Theoretical Applied Genetics* **101**:227–233.
- Stanton, M. L., C. Galen, and J. Shore 1997. Population structure along a steep environmental gradient: Consequences of flowering time and habitat variation in the snow buttercup, *Ranunculus adoneus*. *Evolution* **51**(1):79.
- Thompson, K., S. R. Band, and J. G. Hodgson 1993. Seed size and shape predict persistence in soil. *Functional Ecology* **7**(2):236.
- Umehara, M., I. Eguchi, D. Kaneko, M. Ono, and H. Kamada 2005. Evaluation of gene flow and its environmental effects in the field. *Plant Biotechnology* **22**(5):497–504.
- Verhoeven, Koen J F, J. J. Jansen, van Dijk, Peter J, and A. Biere 2010. Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *The New Phytologist* **185**(4):1108–1118.
- Vivek, B. S., and P. W. Simon 1999. Linkage relationships among molecular markers and storage root traits of carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*). *Theoretical Applied Genetics* **99**:58–64.
- Whitlock, M. C. 2000. Fixation of new alleles and the extinction of small populations; drift load, beneficial alleles, and sexual selection. *Evolution* **54**(6):1855–1861.
- Whitlock, M. C. 2003. Fixation probability and time in subdivided populations. *Genetics* **164**(2):767–779.
- Wilkinson, K. M., S. A. Riley, D. E. Steinfeld, and T. D. Landis 2008. Native plants on disturbed roadsides: introduction to a new integrated approach. *Native Plants Journal* **9**(3):267–277.

Yan, J., Yang Xiaohong, Shah Trusha, H. Sanchez-Villeda, J. Li, M. Warburton, Y. Zhou, J. H.

Crouch, and Y. Xu 2009. High-throughput SNP genotyping with the GoldenGate assay in maize. <http://link.springer.com/article/10.1007/s11032-009-9343-2> (accessed on 3 December 2014).

Tables:

Table 1 Overview of surveyed *Daucus carota* populations

Population Code	Location	Latitude	Longitude	Sample number	Date of restoration
I01	Daubringen	50.640255	8.739055	19	-
I02	Reiskirchen	50.581666	8.829360	18	-
I03	Eichsfeld	51.220721	10.358348	18	-
I04	Hainich	51.036522	10.415168	13	-
I05	Niederkleen	50.480773	8.616436	18	-
I06	Hungen	50.467687	8.877661	17	-
I07	Geroda	50.292924	9.920461	17	-
I08	Kirchvers	50.690361	8.579271	17	-
I09	Lauterbach	50.696151	9.359601	15	-
R01	Steinau	50.323347	9.446011	16	1994
R02	Griedel	50.447305	8.745246	17	1996
R03	Bad Nauheim	50.392279	8.726213	19	1996
R04	Bad Nauheim	50.402702	8.720849	18	1996
R05	Egelsbach	49.962194	8.655639	20	1998
R06	Fernwald	50.560872	8.755674	20	2003
R07	Herleshausen	51.002248	10.130403	17	2003
R08	Eschbach	50.218377	8.682396	16	2004
R09	Eschbach	50.226271	8.701537	18	2004
R10	Herleshausen	50.995496	10.153041	20	2004

R - restored populations; I - indigenous populations

Table 2 Microsatellite marker comparison of this investigation (JR) and Cavagnaro et al. (2011) (C), with locus name, microsatellite motifs (SSR-motifs), annealing temperature, size range in base pairs (bp), number of alleles, Neis unbiased gene diversity (H_e), and the number of null alleles and rare alleles found in this investigation in one sample (in 1), or only in two samples (in 2). Loci that significantly deviated from the Hardy–Weinberg (HDW) expectations are shown in bold.

locus	SSR Motifs	anneal temp.	size range (bp)		number of alleles		H_e		rare alleles			HDW			
			C	JR	C	JR	C	JR	null alleles	in 1	in 2	Chi-Square	DF	Prob	
gssr3	(AG)6tgga(GGAG)3	54°C	285 - 335	266 - 322	20	25	0.86	0.66	16	6	1	5.004	10	0.891	ns
gssr4	(TCTA)21	55°C	253 - 320	230 - 322	29	22	0.91	0.91	1	3	1	56.050	55	0.435	ns
gssr6	(TC)9a(CT)11 (CAGTAG)4	50°C	283 - 331	262 - 312	19	21	0.89	0.80	13	1	0	68.056	36	0.001	***
gssr9	(TG)13ata(TATG)10gatgg(ATGT)3	54°C	281 - 337	259 - 327	22	31	0.77	0.91	3	1	3	137.333	91	0.001	***
gssr16	(TG)9tacgc(ATGT)3	57°C	229 - 346	207 - 285	16	34	0.82	0.85	4	3	3	51.477	66	0.905	ns
gssr35	(GA)13	55°C	144 - 219	148 - 230	21	27	0.87	0.88	13	2	3	60.878	45	0.057	ns
gssr65	(TG)8	57°C	404 - 433	372 - 419	10	12	0.79	0.74	6	1	0	20.969	21	0.461	ns
gssr85	(TCTA)4tttatca(ATCT)4gtctgtcta(TCTG) ₃	54°C	219 - 294	196 - 316	14	25	0.84	0.90	1	1	0	40.500	45	0.663	ns
gssr107	(ATAC)8(ACAT)4	54°C	Δ 265	219 - 299	no data	15	no data	0.53	0	0	1	16.650	10	0.082	ns
gssr111	(ATAC)3atccatc(CATA)9tat(CA)20	55°C	284 - 390	316 - 380	21	28	0.79	0.92	2	0	0	98.500	91	0.277	ns

Table 3 Measures of *Daucus carota* within-population diversity. Abbreviations: N_a = Number of different Alleles; N_e = Number of effective alleles; H' = Shannon's information index; H_o = observed heterozygosity; uH_e = unbiased expected heterozygosity; R - restored populations; I - indigenous populations

Population Code	N_a	N_e	H'	H_o	uH_e
I01	10.2	5.7	1.9	0.77	0.83
I02	11.1	7.0	2.1	0.75	0.86
I03	11.9	8.3	2.2	0.75	0.89
I04	10.5	6.5	2.0	0.81	0.86
I05	11.2	7.7	2.2	0.77	0.88
I06	10.5	5.8	1.9	0.74	0.81
I07	8.1	5.4	1.8	0.79	0.81
I08	11.7	7.7	2.2	0.78	0.87
I09	9.7	5.9	1.9	0.79	0.81
R01	10.5	5.6	2.0	0.77	0.82
R02	9.2	5.1	1.8	0.74	0.80
R03	9.7	5.2	1.9	0.72	0.80
R04	6.6	3.5	1.4	0.61	0.69
R05	12.4	8.1	2.2	0.83	0.87
R06	11.0	6.8	2.0	0.74	0.85
R07	11.6	6.5	2.1	0.76	0.85
R08	11.1	6.5	2.0	0.76	0.84
R09	11.4	6.9	2.1	0.79	0.87
R10	11.4	5.6	2.0	0.74	0.81
<i>Average all</i>	<i>10.5</i>	<i>6.3</i>	<i>1.99</i>	<i>0.76</i>	<i>0.83</i>
<i>Average I</i>	<i>10.5</i>	<i>6.7</i>	<i>2.02</i>	<i>0.77</i>	<i>0.85</i>
<i>Average R</i>	<i>10.5</i>	<i>6.0</i>	<i>1.95</i>	<i>0.75</i>	<i>0.82</i>
<i>Average R – Pop R04</i>	<i>10.9</i>	<i>6.2</i>	<i>2.01</i>	<i>0.76</i>	<i>0.84</i>

Table 4 Summary of hierarchical AMOVA results for 19 *Daucus carota* populations grouped for indigenous (n=9) and restored populations (n=10)

Source	V	% total	P	F_{ST} statistics
Among groups	0.010	0.2	0.049	$F_{CT} = 0.002$
Among populations within groups	0.174	4.1	<0.001	$F_{SC} = 0.041$
Within populations	4.023	95.6	<0.001	$F_{ST} = 0.044$

Figures:

Figure 1 Map of sampled *D. carota* (Fig. 1 A) populations in the investigation area in Central Germany (Hesse, Thuringia and Bavaria). Indigenous sites (I) are depicted in blue and restored sites (R) in red (see also Table 1). Source: Google Earth.

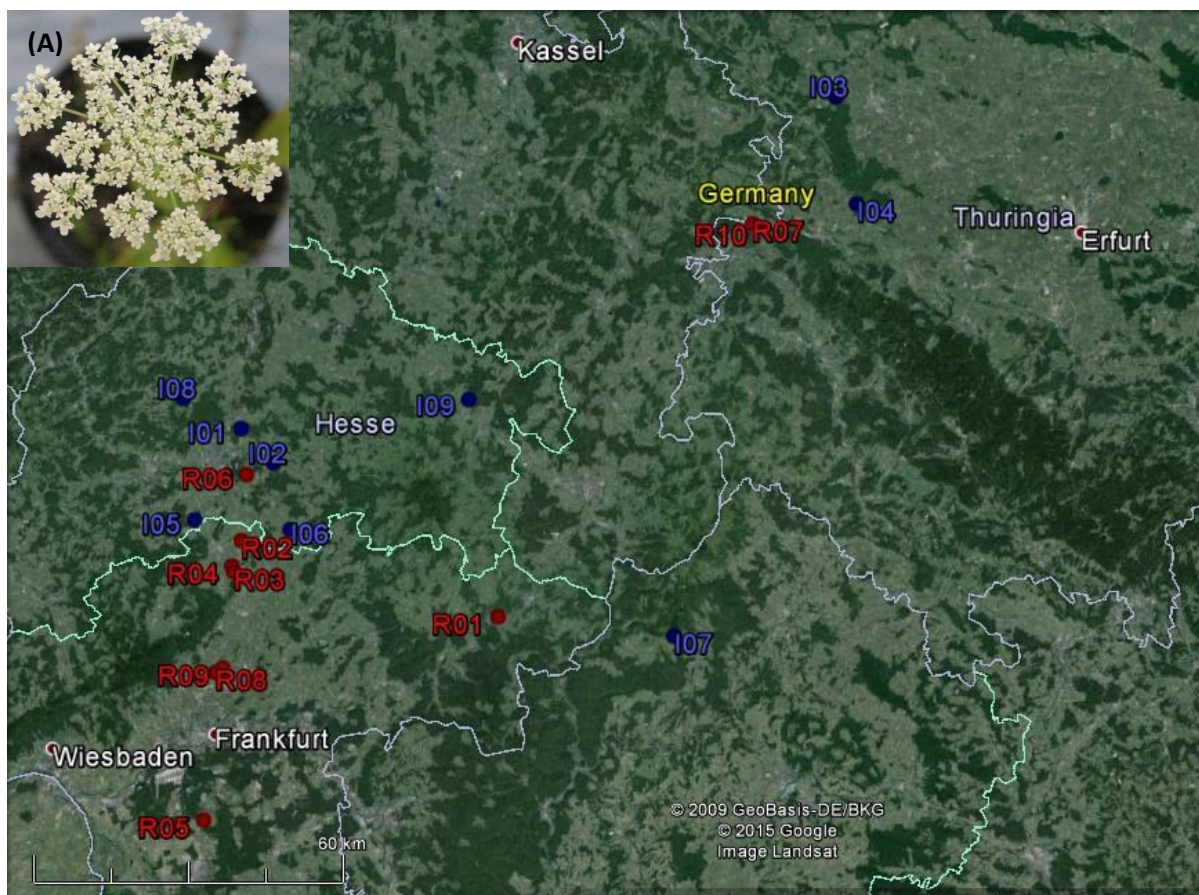
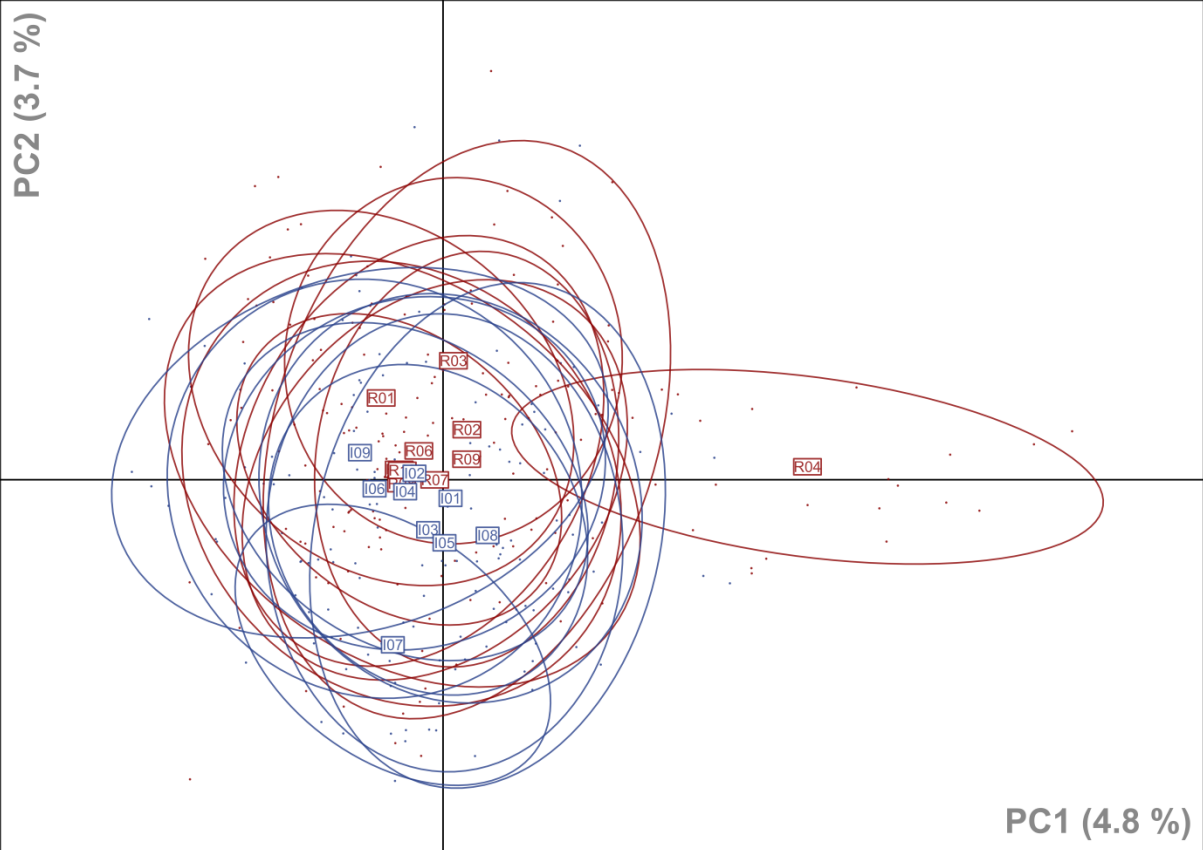


Figure 2 Principal component analysis (PCA) depicting the genetic structure in populations of *Daucus carota*. Indigenous populations (I) are indicated in blue and restored populations (R) in red. Label positions represent the centroids of the respective population. Inertia ellipses indicate dispersion of samples in relation to mean coordinates and include approximately three-fourths (76%) of all individuals for each population.



Kapitel 2: Intraspecific phenotypic variability of the herbaceous species *Daucus carota* L. (Apiaceae) used for restoration purposes

Jutta Reiker¹, A. Theresa Rühl², Volker Wissemann¹, Birgit Gemeinholzer¹

¹Institute of Botany, Justus-Liebig-University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 38, D-35392 Giessen, Germany

²Institute of Landscape Ecology and Resource Management, Interdisciplinary Research Centre (IFZ), Justus Liebig University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35393 Giessen, Germany

Corresponding author

Birgit Gemeinholzer

Phone +49 (0)641 9935173

Fax +49 (0)641 9935179

Email: Birgit.Gemeinholzer@bot1.bio.uni-giessen.de

Abstract

For restoration purposes nature conservation preferably requests the use of local seed sources based on the “local-is-best” (LIB) approach. However, counter-arguments against this usage are potential benefits by increased variation which could be beneficial especially in times of global change. We here investigate intraspecific morphological variability of one of the most common herbaceous, insect pollinated and zoochorous plants from seed mixtures used for landscape restoration processes in Central Europe, the wild carrot, *Daucus carota* L. (Apiaceae). Our results show that *D. carota* features no vegetative but two generative characters that significantly differed among plants originating from seeds of natural (I) and restored (R) sites. We could show that effects of mowing always overlay origin-specific characteristics. The earlier genetic analysis did not support a regional provenance concept for restoration purposes, while slight differences in phenological parameters related to fitness pinpoint to ‘mix and match-admixture provenancing’ as a compromise strategy.

Key words: Restoration, vegetative and generative fitness parameter, non-local genotypes, local-is-best approach, *Daucus carota*

Introduction

An ever changing landscape due to building activities evokes the management of restoration processes. Particularly frequent restoration projects in Germany are the greening of edges after road construction. For these projects the use of mostly undefined or non-local seed sources of herbaceous species was and is common practice. Reasons for the common practice of using non local seed provenances are significantly lower prices compared to local provenances and easy availability of large amounts of non-local seed compared to regional seed (Burton & Burton, 2002; Kettenring, Mercer, Reinhardt Adams, Hines, & Wilsey, 2014b). However, from 2020 onwards seed from regional provenances has to be used as part of the nature protection and landscape conservation act (BNatSchG §40-1, 2010) to preserve the local genotypic diversity, hence, the local allelic richness (Hughes et al., 2008). This local-is-

best approach (LIB) is justified to preserve the genetic legacy resulting from a history of natural selection in local environments (Johnson et al., 2010; Jones, 2013; Montalvo et al., 1997; Sackville Hamilton, 2001). From a genetic point of view there are four major arguments for the LIB approach: (1) Interbreeding between non-local and local provenances can lead to the homogenization of the genetic structure of populations (Hughes et al., 2008). (2) Genetic swamping can alter the genetic memory for this location, especially the genetic legacy resulting from a history of natural selection (Montalvo et al., 1997). (3) Maladaptation resulting from artificial selection and the new introduced provenances could rather poorly perform in the new environmental conditions (Bischoff, Steinger, & Müller-Schärer, 2010; Hufford & Mazer, 2003). (4) Outbreeding depression as a result from crossings among genetic distinct populations from different environments featuring reduced fitness (McKay et al. 2001). Adherence to the LIB theory resulted mostly in studies concerning better fitness and performance of the local plant material, as summarized by (Jones, 2013). Thus, the four main arguments of the LIB approach mostly correlate with morphological differences.

The research of restoration ecology has increased significantly in the recent years and the focus of many studies is mostly the choice of the seed sources (Bell & Hobbs, 2007; Breed et al., 2018; Bucharova, 2017; Bucharova et al., 2017; Bucharova et al., 2019; Durka et al., 2016; Harris et al., 2006; McKay et al., 2001; Stingemore & Krauss, 2013). This recently led to the establishment of seed transfer zones and regions for grassland species in Germany (ErMiV 2011, (Schröder & Prasse, 2013). These seed transfer zones are defined based on geology, biogeography, climate, and other biophysical criteria. The basic assumption here is that the criteria for delineation also influence the spatial genetic structure of plant species subject to the condition that the patterns of genetic differentiation between species are largely similar (Durka et al., 2016).

We here investigate intraspecific morphological variability of one of the most common herbaceous, insect pollinated and zoochorous plants from seed mixtures used for landscape restoration processes, the wild carrot, *Daucus carota* L. (Apiaceae). Seeds were collected from populations that were formerly restored with non-local seed material (in the following R = restored) and from nature conservation areas or from natural sites which have not been modified or re-sown during the last 60 years (in the following I = indigenous; Posselt 2000). In a common garden approach we analysed the morphological variation between samples from I and R sites. Since plants in natural habitats, even in nature reserves, are subject either to grazing or mowing at least once a year, a part of the grown individuals per study site was cut to simulate the natural conditions of grassland habitats.

We hypothesize, that individuals from I and R populations differ in their vegetative and generative morphology and that variation is stronger, if grazing or mowing is simulated. The results will show whether strict adherence to the local-is-best approach for *D. carota* can be recommended, hence non-local seed usage should be omitted.

Material and Methods

Plant species

D. carota is a biennial species with bristly hairy stems that reach heights up to 50 to 120 cm (Berger, Conert, & Hegi, 1975). *D. carota* forms a rosette in its first year and flowers usually in the second year from June to September (Düll & Kutzelnigg, 1992). The inflorescence is a flat and dense umbel with small white flowers. Mostly a black-purple flower can be found in the centre of the umbel. This so-called sham bloom will probably mimic a fly and thus might serve as an "invitation" to other flies for a visit. Outcrossing is enforced by a pre-male flowering stage (protandry). *D. carota* is obligate cross-pollinated with limited adaptations to species-

specific pollinators (Berger et al., 1975). Pollinators are flies, bees or beetles (Düll & Kutzelnigg, 1992). Especially *Andrena* spp. are frequent visitors to the flowers of wild carrot (Düll & Kutzelnigg, 1992). Some of these pollinators fly distances up to 2000 meters (Düll & Kutzelnigg, 1992). Additionally bees are among the pollinators and this species group can travel up to 10 kilometers. The seeds are adapted to epizoochoric dispersal of mammals by featuring bristly hairs that protrude from the ribbed seed surface (Berger et al., 1975; Rong et al., 2010).

Typical habitats of *D. carota* in Germany are meadows, thickets, and areas along railroads and roadsides with some kind of disturbance, while the species is also common in extensively managed grasslands (Düll & Kutzelnigg, 1992). The species' native distribution covers large parts of Europe, Eastern and Central Asia, and the Mediterranean region (Berger et al., 1975). According to Berger et al. (1975) ten subspecies of *D. carota* are recognized throughout the species' whole distribution range. In Germany, so far only *D. carota* subsp. *carota*, next to the garden cultivar *D. carota* subsp. *sativa*, has been reported (Düll & Kutzelnigg, 1992). Since subsp. *carota* is widespread throughout Europe, North Africa, East and Central Asia, the taxonomic affiliation does not provide any indication of the origin of the seeds of the restored sites.

Plant sampling

In autumn 2011 seeds of *D. carota* were sampled from 17 different populations and approximately 20 individuals per population in Central-Germany (Figure 1). The distance between sampled individuals within populations was at least two meters to optimize the coverage of site specific population diversity. Nine of the populations were indigenous (I), and eight were restored populations (R). The populations were not randomly spaced across the landscape. Road authorities provided information about the year of restoration for the R sites (Table 1) as well as the percentage of *D. carota* (0.1 %) seeds in the applied seed-mixtures. Although no information about the origin of the seed material was available, local seed providers as source of the seeds can be excluded. We cannot guarantee that the individuals from restored sites are identical to those introduced 10-20 years ago as gene flow from wild but also cultivated carrot all over the country from gardens cannot be excluded (Mandel, Ramsey, Iorizzo, & Simon, 2016; Shim & Jørgensen, 2000). Furthermore, admixture of pollen and propagules between sites cannot be omitted. Therefore we do not know, where the seeds originated from, and under which climatic and ecological conditions the seed material has been produced.

Indigenous sites were selected with support of the "Association of German wild plants and seeds producers e. V.". To minimize biases or crossbreeding with a different intraspecific genotype, a distance of at least nine kilometre to adjacent populations with non-local seed sources was kept (Posselt 2000; (Schröder & Prasse, 2013).

Common garden approach

Of each individual of each study site 60 seeds were sown in spring 2012. Germinated seedlings were cultivated in single pots with uniform nutrient-poor soil and regular watering and weeding. The common garden experiment allowed for taxonomic verification. We could not detect other than *D. carota* subsp. *carota* among our samples.

The randomly selected seedlings of each population were arranged without grouping. One third per study site grew up without treatment and another third was cut to 15 cm on 31.07.2013 to simulate grazing or mowing as natural conditions of grassland habitat. All main

shoots were cut, no matter if they were already in flower or not. The last third was harvested on 20.06.2013 to count and measure the vegetative morphological variation. The data collection took place in 2013 in and throughout the growing season.

We tested two models of influence on morphological variation: (1) the effect of origin (I, R) for 311 individuals (vegetative characters only, Table S1), and (2) treatment (mowed, not-mowed) and origin (I, R) for 305 and 288 individuals respectively (generative characters only, Figure 2, Table 2 and Table S2).

Examined parameters of vegetative morphological variation were (1) number and (2) size of the leaves, (3) length and (4) diameter of the root, and the weight of the leaves as (5) fresh and (6) dry matter, and of the root (7 & 8), respectively. They were quantified once, when one third of the plants were harvested.

The parameters of generative morphological variation were measured two times per week. They were: (9) day of first flowering, (10) day of maximum number of flowering umbels, (11) day of maximum number of fruiting umbels (12) number of flowering umbels, (13) number of fruiting umbels, (14) number of umbels with ripe fruits only and (15) the weight of ripe umbels, (16) day of death (after seed set, the plants turn brown and die off). Additionally the following derivatives of the former generative parameters were calculated: (17) duration from first flowering to highest amount of fruiting umbels, (18) number of simultaneously flowering and fruiting umbels, (19) and the date of this, (20) duration from first flowering to the first ripe umbel and (21) duration from first flowering to the end of the growing season.

Data analysis

All statistical analyses were carried out using the program STATISTICA (v. 10.0, Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) by using the raw data. Effects of the single factors *origin* ($k = 2$, restored vs. indigenous) and *mowing* ($k = 2$, mowed vs. not mowed) and the factor combinations were assessed with a multi-factorial analysis of variance (ANOVA). Subsequently, significance of differences between treatments was assessed with a Tukey Test (Table 2 and Figure 2 a-c).

Results

In total 904 individuals were examined with the ANOVA (Table 1). 311 individuals were examined only for vegetative characters (traits 1 – 8), 160 individuals from I and 151 from R sites (Table S1). All of the analysed vegetative characters showed no significant differences between sites.

305 individuals were not mowed and 288 were cut to simulate mowing. The first group consisted of 160 indigenous and 145 restored individuals and the second group of 146 indigenous and 142 restored individuals, respectively.

Only two of the 13 analysed generative fitness parameters (traits 9 – 21) featured significant effects between R and I populations (significant traits in Table 2 and Fig. 2 and some exemplary non-significant traits in supplements Table S2). Comparing the total number of flowers per individuals and the date of this (trait 10 and 12) we see in the dataset that the indigenous plants had the maximum number of flowering umbels earlier in the summer than the restored provenances (Table 2 and Figure 2a); the indigenous provenances had reached their highest amount on 11.09.2013. The restored provenances, however, had their highest amount of flowering umbels one week later on 18.09.2013. At the same time the indigenous plants also had fewer flowering umbels (on average 7.2 per individual, trait 12) than the restored provenances (on average 8 per individual, Table 2, Figure 2b). Nevertheless, at the end of the

growing season both provenances had surprisingly similar numbers of mature umbels (trait 14) and the overall difference of the provenances were not significant (Table 2 and Figure 2c). ANOVA showed that cutting always had a significant influence on all analysed generative fitness parameters, regardless of the origin of the samples. Thus, effects of mowing always mask origin-specific characteristics, which then disappear.

Discussion

Despite knowing that semi-natural, extensively used species rich grassland in Europe is threatened by land-use intensification, climate change and habitat destruction (Reid, 2005), only few studies investigating fitness parameters of common and widely distributed herbaceous plants exist (Dolan, Marr, & Schnabel, 2008; Miller et al., 2011; Ritchie & Krauss, 2012). Fitness analyses of arable weeds and meadow species are rare, although it is assumed that plants of local genotypes and origin generally have better fitness (Jones, 2013; Kawecki & Ebert, 2004; Keller & Kollmann, 1999; Leimu & Fischer, 2008; Linhart & Grant, 1996). In most grassland restoration studies the identity of the seed sources is an important issue (Durka et al., 2016).

In our analysis, in the herbaceous meadow species *D. carota*, only three of all tested generative and vegetative fitness parameters differed between individuals of R and I sites. Our results support earlier findings by Bucharova et al. (2017), who analysed biomass differences in a reciprocal transplant experiment of *D. carota* at four different sites in Germany and also discovered mostly insignificant vegetative fitness differences. However, our data support the hypothesis that fitness-related traits are generally less differentiated than phenological traits (Durka et al., 2016). The phenological differences between individuals at I and R sites in our analysis indicate genotypic integrity. It is well known that flowering time is often strongly differentiated along geographical gradients, even within perennial plants (e.g. (Kawakami et al., 2011; Montague, Barrett, & Eckert, 2008) and differences in phenology-related traits likely reflect plant adaptation to different latitudes, climate and seasonality, or different plant strategies in different environments (Durka et al., 2016). Although we could not guarantee that the genotypes from restored sites are identical to those introduced 10-20 years ago, we detected phenological differences, which potentially are indicative for non-local adaptation processes.

An earlier flowering of a common herbaceous species (trait 10) may influence the activity of pollinators and therefore influences the competition between flowering plants. Moreover early flowering plants support ecosystem services in form of nutrition for flower visiting insects. This was confirmed in previous studies by Ladizinsky (1985) and Ellstrand and Elam (1993) and is supported here. At the end of the growing season, however, both provenances had surprisingly similar numbers of mature umbels (trait 14) despite the fact that the indigenous provenance bloom earlier. The plants of restored provenances produced more umbels in total (trait 12) and thus had their maximum number of flowering umbels later (trait 10 and 12). But at the end of the vegetation period not all of their umbels ripened, because autumn began with its cold and moist days. If climate change leads to a longer period of hot and dry summer days, the character of longer seed ripening, however, may become beneficial in the future. Seed production is probably the most common aspect to evaluate fitness, but the establishment of seedlings is nature's proof and we have not checked this in this study. We analyzed only the measurable number of umbels with ripe fruits only (trait 14). Therefore, population recruitment and establishment in nature is limited by seedling survival rather than seed production. Additionally, it depends on the competitors in the field. In *Pulsatilla patens*, *Silene otites* and *Silene chlorantha* (Lauterbach et al., 2011; Lauterbach, Burkart, &

Gemeinholzer, 2012; Röder & Kiehl, 2006) the authors mentioned a negative effect of cover by herbaceous plants and litter on seedlings. Seedling emergence and survival sometimes differs between species of the same habitat (Jakobsson & Eriksson, 2000; Ryser, 1993).

In a previous study, we tested the population genetic structures between indigenous and restored populations of *D. carota* in the same sites as studied here (Reiker et al., 2015). There we detected negligible genetic differentiation between indigenous populations and populations restored with non-local seed material. No negative effects on allelic richness, selective sweeps, or reduced genetic diversity within populations were observed, with only one exception in a study site, where inbreeding effects were presumed. However, there is a controversial discussion on quantitative genetics and fitness correlation, e.g. Lammi, Siikamäki, and Mustajärvi (1999) could not detect any correlation between genetic diversity and reproductive fitness. These results are in contrast to the positive correlations between fitness and genetic diversity of *Gentianella germanica* (Fischer & Matthies, 1998), *Cochlearia bavarica* (Paschke, Abs, & Schmid, 2002) and *Succisa pratensis* (Vergeer, Rengelink, Copal, & Ouborg, 2003).

By testing several generative fitness parameters of *D. carota* we see an ambivalent outcome. The earlier genetic analysis (Reiker et al., 2015) did not support a regional provenance concept for restoration purposes, while slight differences in phenological parameters related to fitness pinpoint to 'mix and match-admixture provenancing' as a compromise strategy.

Acknowledgements

We are grateful for the financial support from the Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU), and the Heidehofstiftung. Sampling was conducted with support from the Association of German Wild Seeds and Wild Plants Producer Association (Markus Wieden), as well as the road authorities Frankfurt (Gerd Ledergerber), Schotten (Alexander Greb), and Herleshausen (Helmut Byczysko). For permits to collect plants in nature conservation areas we thank Jürgen Busse and Manfred Grossman. For support in the molecular laboratory, we thank the biotechnical assistants (Sabine Mutz and Helene Krufczik).

References

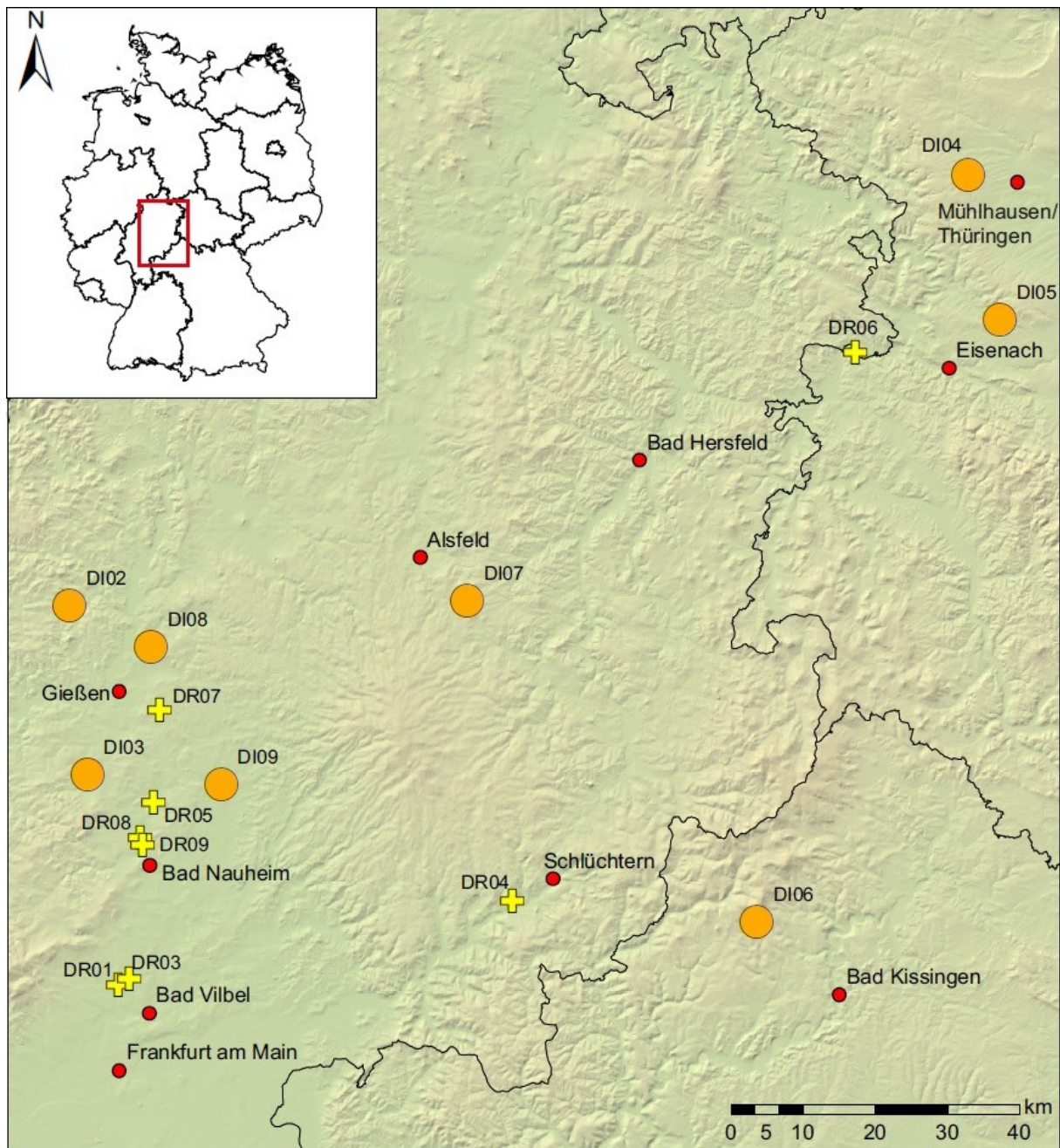
- Bell, D. T. and Hobbs, R. J. (2007): Jarrah Forest Ecosystem Restoration: A Foreword. – *Restoration Ecology* **15**: S1-S2. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-100X.2007.00286.x>
- Berger, H., Conert, H. J. and Hegi, G. (eds) (1975): *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Parey, Berlin, 910 pp.
- Bischoff, A., Steinger, T. and Müller-Schärer, H. (2010): The Importance of Plant Provenance and Genotypic Diversity of Seed Material Used for Ecological Restoration. – *Restoration Ecology* **18**(3): 338–348. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-100X.2008.00454.x>
- Breed, M. F., Harrison, P. A., Bischoff, A., Durruty, P., Gellie, N. J. C., Gonzales, E. K., Havens, K., Karmann, M., Kilkenny, F. F., Krauss, S. L., Lowe, A. J., Marques, P., Nevill, P. G., Vitt, P. L. and Bucharova, A. (2018): Priority Actions to Improve Provenance Decision-Making. – *BioScience* **68**(7): 510–516. <http://dx.doi.org/10.1093/biosci/biy050>
- Bucharova, A. (2017): Assisted migration within species range ignores biotic interactions and lacks evidence. – *Restor Ecol* **25**(1): 14–18. <http://dx.doi.org/10.1111/rec.12457>
- Bucharova, A., Bossdorf, O., Hölzel, N., Kollmann, J., Prasse, R. and Durka, W. (2019): Mix and match: regional admixture provenancing strikes a balance among different seed-sourcing strategies for

- ecological restoration. – *Conserv Genet* **20**(1): 7–17. <http://dx.doi.org/10.1007/s10592-018-1067-6>
- Bucharova, A., Michalski, S., Hermann, J.-M., Heveling, K., Durka, W., Hölzel, N., Kollmann, J. and Bossdorf, O. (2017): Genetic differentiation and regional adaptation among seed origins used for grassland restoration: lessons from a multispecies transplant experiment. – *J Appl Ecol* **54**(1): 127–136. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.12645>
- Burton, P. J. and Burton, C. M. (2002): Promoting genetic diversity in the production of large quantities of native plant seed. – *Ecological Restoration* **20-2**: 117–123.
- Dolan, R. W., Marr, D. L. and Schnabel, A. (2008): Capturing Genetic Variation during Ecological Restorations: An Example from Kankakee Sands in Indiana. – *Restoration Ecology* **16**(3): 386–396. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-100X.2007.00318.x>
- Düll, R. and Kutzelnigg, H. (1992): *Botanisch-ökologisches Exkursionstaschenbuch: Das Wichtigste zur Biologie bekannter heimischer Pflanzen*. Quelle & Meyer, Heidelberg, 546 pp.
- Durka, W., Michalski, S. G., Berendzen, K. W., Bossdorf, O., Bucharova, A., Hermann, J.-M., Hölzel, N. and Kollmann, J. (2016): Genetic differentiation within multiple common grassland plants supports seed transfer zones for ecological restoration. – *J Appl Ecol*: n/a-n/a. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.12636>
- East, E. M. (1940) The Distribution of Self-Sterility in the Flowering Plants. *Proceedings of the American Philosophical Society* **82**:449–518
- Ellstrand, N. C. and Elam, D. R. (1993): Population genetic consequence of small population size: Implication for PlantConservation. – *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **24**: 217–242.
- ErMiV (2011): Verordnung über das Inverkehrbringen von Saatgut von Erhaltungsmischungen (Erhaltungsmischungsverordnung). Bundesgesetzblatt, Teil I, Nr. 65, 2641–2646.
- Fischer, M. and Matthies, D. (1998): RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). – *Am. J. Bot.* **85**(6): 811–819. <http://dx.doi.org/10.2307/2446416>
- Harris, J. A., Hobbs, R. J., Higgs, E. and Aronson, J. (2006): Ecological Restoration and Global Climate Change. – *Restor Ecology* **14**(2): 170–176. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-100X.2006.00136.x>
- Hufford, K. M. and Mazer, S. J. (2003): Plant ecotypes: Genetic differentiation in the age of ecological restoration. – *Trends in ecology & evolution* **18**(3): 147–155. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00002-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00002-8)
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, N. and Vellend, M. (2008): Ecological consequences of genetic diversity. – *Ecology letters* **11**(6): 609–623. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>
- Jakobsson, A. and Eriksson, O. (2000): A comparative study of seed number, seed size, seedling size and recruitment in grassland plants. – *Oikos* **88**(3): 494–502. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.880304.x>
- Johnson, R., Stritch, L., Olwell, P., Lambert, S., Horning, M. E. and Cronn, R. (2010): What are the best seed sources for ecosystem restoration on BLM and USFS lands? – *Native Plants Journal* **11**(2): 117–131. <http://dx.doi.org/10.2979/NPJ.2010.11.2.117>
- Jones, T. A. (2013): When local isn't best. – *Evolutionary applications* **6**(7): 1109–1118. <http://dx.doi.org/10.1111/eva.12090>
- Kawakami, T., Morgan, T. J., Nippert, J. B., Ocheltree, T. W., Keith, R., Dhakal, P. and Ungerer, M. C. (2011): Natural selection drives clinal life history patterns in the perennial sunflower species, *Helianthus maximiliani*. – *Molecular ecology* **20**(11): 2318–2328. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05105.x>

- Kawecki, T. J. and Ebert, D. (2004): Conceptual issues in local adaptation. – *Ecol Letters* **7**(12): 1225–1241. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x>
- Keller, M. and Kollmann, J. (1999): Effects of seed provenance on germination of herbs for agricultural compensation sites. – *Agriculture, Ecosystems & Environment* **72**(1): 87–99. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8809\(98\)00167-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8809(98)00167-4)
- Kettenring, K. M., Mercer, K. L., Reinhardt Adams, C., Hines, J. and Wilsey, B. (2014): EDITOR'S CHOICE: Application of genetic diversity-ecosystem function research to ecological restoration. – *J Appl Ecol* **51**(2): 339–348. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.12202>
- Ladizinsky, G. (1985): The genetics of hard seed coat in the genus *Lens*. – *Euphytica* **34**(2): 539–543. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00022952>
- Lammi, A., Siikamäki, P. and Mustajärvi, K. (1999): Genetic Diversity, Population Size, and Fitness in Central and Peripheral Populations of a Rare Plant *Lychnis viscaria*. – *Conservation Biology* **13**(5): 1069–1078. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1739.1999.98278.x>
- Lauterbach, D., Burkart, M. and Gemeinholzer, B. (2012): Rapid genetic differentiation between ex situ and their in situ source populations: an example of the endangered *Silene otites* (Caryophyllaceae). – *Bot J Linn Soc* **168**: 64–75.
- Lauterbach, D., Ristow, M. and Gemeinholzer, B. (2011): Genetic population structure, fitness variation and the importance of population history in remnant populations of the endangered plant *Silene chlorantha* (Willd.) Ehrh. (Caryophyllaceae). – *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **13**(4): 667–777. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00418.x>
- Leimu, R. and Fischer, M. (2008): A meta-analysis of local adaptation in plants. – *PloS one* **3**(12): e4010. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004010>
- Linhart, Y. B. and Grant, M. C. (1996): Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. – *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **27**(1): 237–277. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.237>
- Mandel, J. R., Ramsey, A. J., Iorizzo, M. and Simon, P. W. (2016): Patterns of Gene Flow between Crop and Wild Carrot, *Daucus carota* (Apiaceae) in the United States. – *PloS one* **11**(9): e0161971. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0161971>
- McKay, J. K., Bishop, J. G., Lin, J. Z., Richards, J. H., Sala, A. and Mitchell-Olds, T. (2001): Local adaptation across a climatic gradient despite small effective population size in the rare sapphire rockcress. – *Proceedings. Biological sciences* **268**(1477): 1715–1721. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2001.1715>
- Miller, S. A., Bartow, A., Gisler, M., Ward, K., Young, A. S. and Kaye, T. N. (2011): Can an Ecoregion Serve as a Seed Transfer Zone?: Evidence from a Common Garden Study with Five Native Species. – *Restoration Ecology* **19**(201): 268–276. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-100X.2010.00702.x>
- Montague, J. L., Barrett, S. C. H. and Eckert, C. G. (2008): Re-establishment of clinal variation in flowering time among introduced populations of purple loosestrife (*Lythrum salicaria*, Lythraceae). – *Journal of Evolutionary Biology* **21**(1): 234–245. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01456.x>
- Montalvo, A. M., Williams, S. L., Rice, K. J., Buchmann, S. L., Cory, C., Handel, S. N., Nabhan, G. P., Primack, R. and Robichaux, R. H. (1997): Restoration biology: A population biology perspective. – *Restoration Ecology* **5**(4): 277–290. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1526-100X.1997.00542.x>
- Paschke, M., Abs, C. and Schmid, B. (2002): Effects of population size and pollen diversity on reproductive success and offspring size in the narrow endemic *Cochlearia bavarica* (Brassicaceae). – *American journal of botany* **89**(8): 1250–1259. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.89.8.1250>

- Posselt, U. K. (2000): Genetische Diversität bei Wildformen und Zuchtsorten von *Lolium perenne* L. *Schriftenreihe für Vegetationskunde* 32: 79–85.
- Reid, W. v. (2005): *Ecosystems and human well-being: Synthesis*; a report of the Millennium Ecosystem Assessment. Island Press, Washington, DC, 137 pp.
- Reiker, J., Schulz, B., Wissemann, V. and Gemeinholzer, B. (2015): Does origin always matter? Evaluating the influence of nonlocal seed provenances for ecological restoration purposes in a widespread and outcrossing plant species. – *Ecol Evol* 5(23): 5642–5651. <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.1817>
- Ritchie, A. L. and Krauss, S. L. (2012): A Genetic Assessment of Ecological Restoration Success in *Banksia attenuata*. – *Restoration Ecology* 20(4): 441–449. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-100X.2011.00791.x>
- Röder, D. and Kiehl, K. (2006): Population structure and population dynamic of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. in relation to vegetation characteristics. – *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 201(6): 499–507. <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2005.11.001>
- Rong, J., Janson, S., Umehara, M., Ono, M. and Vrieling, K. (2010): Historical and contemporary gene dispersal in wild carrot (*Daucus carota* ssp. *carota*) populations. – *Annals of botany* 106(2): 285–296. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcq108>
- Ryser, P. (1993): Influences of neighbouring plants on seedling establishment in limestone grassland. – *Journal of Vegetation Science* 4(2): 195–202. <http://dx.doi.org/10.2307/3236105>
- Sackville Hamilton, N. R. (2001): Is local provenance important in habitat creation?: A reply. – *J Appl Ecology* 38(6): 1374–1376. <http://dx.doi.org/10.1046/j.0021-8901.2001.00670.x>
- Schröder, R. and Prasse, R. (2013): Cultivation and Hybridization Alter the Germination Behavior of Native Plants Used in Revegetation and Restoration. – *Restor Ecol* 21(6): 793–800. <http://dx.doi.org/10.1111/rec.12018>
- Shim, S. I. and Jørgensen, R. B. (2000): Genetic structure in cultivated and wild carrots (*Daucus carota* L.) revealed by AFLP analysis. – *TAG Theoretical and Applied Genetics* 101(1-2): 227–233. <http://dx.doi.org/10.1007/s001220051473>
- Stingemore, J. A. and Krauss, S. L. (2013): Genetic Delineation of Local Provenance in *Persoonia longifolia*: Implications for Seed Sourcing for Ecological Restoration. – *Restoration Ecology* 21(1): 49–57. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-100X.2011.00861.x>
- Vergeer, P., Rengelink, R., Copal, A. and Ouborg, N. J. (2003): The interacting effects of genetic variation, habitat quality and population size on performance of *Succisa pratensis*. – *Journal of Ecology* 91(1): 18–26. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00736.x>

Figures:



Legend

- Daucus carota* (indigenous)
- Daucus carota* (restored)
- Cities
- German federal states

Figure 1: Map of sampled *Daucus carota* populations in the investigation area in Central Germany (Hesse, Thuringia and Bavaria). The red box in the top-left map shows the area in Germany. Indigenous sites (I) of the species are depicted in the map as orange circles and the restored sites (R) are pictured as yellow crosses. Labels correspond to those in Table 1. Map was prepared with ArcGIS Desktop (ArcGIS Desktop 10.2.2., Esri).

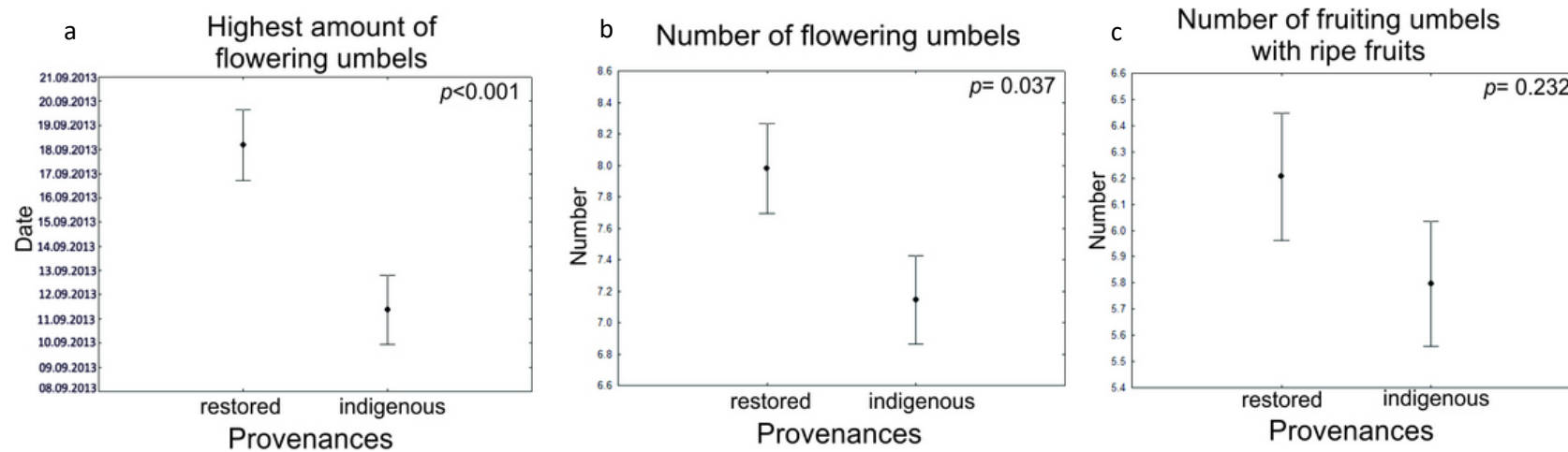


Figure 2 (a – c): ANOVA of three generative fitness parameters of *Daucus carota*: (a) comparative date of the highest amount of flowering umbels (trait 10, significant), (b) number of flowering umbels (trait 12, significant), (c) number of fruiting umbels with ripe fruits (trait 14, not significant). The points show the mean of the various fitness parameters of the different provenances (restored and indigenous) and the \pm standard deviation; p -values for comparisons between restored and indigenous provenances are from a Tukey HSD test using the residuals of the ANOVA for the factor origin.

Table 1: Surveyed *Daucus carota* populations. Abbreviations: ID = identification Number, DI = indigenous populations, DR = restored populations, location in accordance to the nearest village or town, normal = number of non-mowed individuals and cut = number of mowed individuals, both of them (normal and cut) are for the elevation of generative fitness, vegetative = examined parameters of vegetative fitness, coordinates north (N) and east (E), management = Type of maintenance.

		<i>Daucus carota</i>					
ID	Location	normal	cut	vegetative	N	E	management / year of restoration
DI01	Pfungstadt	19	18	18	49°50'02.0"	8°34'56.5"	extensiv
DI02	Kirchvers	20	10	17	50°41'26.4"	8°34'45.1"	extensiv
DI03	Niederkleen	20	19	19	50°28'50.8"	8°36'59.2"	sheep
DI04	Eichsfeld	17	17	17	51°13'14.6"	10°21'30.1"	sheep
DI05	Berka v. d. H.	17	17	19	51°02'22.5"	10°24'57.2"	sheep
DI06	Schwarzer Berg	18	17	18	50°17'34.5"	9°55'13.7"	extensiv
DI07	Lauterbach	19	19	19	50°41'46.6"	9°21'34.8"	sheep
DI08	Daubringen	13	13	15	50°38'24.9"	8°44'20.6"	intensiv
DI09	Hungen	17	16	18	50°28'03.7"	8°52'39.6"	sheep
DR01	Erlenbach 1a	20	20	20	50°13'08.5"	8°40'45.6"	2004
DR03	Erlenbach 2a	15	14	17	50°13'34.6"	8°42'05.5"	2004
DR04	Steinau	14	14	14	50°19'24.1"	9°26'45.6"	1994
DR05	Griedel	20	20	20	50°26'50.3"	8°44'42.9"	1996
DR06	Herleshausen	20	19	20	51°00'08.1"	10°07'49.5"	2003
DR07	Fernwald	16	16	20	50°33'40.7"	8°45'27.9"	2003
DR08	Bad Nauheim	20	19	20	50°24'09.7"	8°43'15.1"	1996
DR09	Bad Nauheim	20	20	20	50°23'33.0"	8°43'32.4"	1996
<i>Total I</i>		160	146	160			
<i>Total R</i>		145	142	151			
<i>Total</i>		305	288	311			

Table 2: Effects of mowing (k = 2, mowing or not), origin (k = 2, indigenous or restored populations), the interaction of mowing and origin (M x O). Abbreviation: df = degrees of freedom, MQ = sum of mean squares, F = variance ratio, *p* = error probability, significant *p*-values < 0.05 are written in bold. Traits are indicated by numbers in parentheses.

<i>Daucus carota</i>	date of highest amount of umbels (10)				number of flowering umbels (12)				number of fruiting umbels (14)			
	df	MQ	F	<i>p</i>	df	MQ	F	<i>p</i>	df	MQ	F	<i>p</i>
Intercept	1	1010676000000.0	1634439000.0	<0.001	1	33505.3	1417.5	<0.001	1	20375.9	1240.1	<0.001
Mowing (M)	1	15176.9	24.5	<0.001	1	672.9	28.5	<0.001	1	419.6	25.5	<0.001
Origin (O)	1	6823.7	11.0	<0.001	1	103.0	4.4	0.037	1	23.5	1.4	0.231793
M x O	1	851.5	1.4	0.241	1	79.6	3.4	0.067	1	38.7	2.4	0.125661
Error	607	618.4			607	23.6			593	16.4		

Supplements

Table S1 (four non-significant vegetative traits): origin (k = 2, indigenous or restored populations), the interaction of mowing and origin was neglected here. Abbreviation: df = degrees of freedom, MQ = sum of mean squares, F = variance ratio, *p* = error probability, significant *p*-values < 0.05 are written in bold. Traits are indicated by numbers in parentheses.

	length of the root (3)				diameter of the root (4)				weight of the leaves (fresh, 5)				weight of the roots (fresh,7)			
	df	MQ	F	<i>p</i>	df	MQ	F	<i>p</i>	df	MQ	F	<i>p</i>	df	MQ	F	<i>p</i>
Intercept	1	1346.995	6248.198	<0.001	1	3527.655	2770.244	<0.001	1	456.1158	879.9536	<0.001	1	2391.982	253.3268	<0.001
Origin	1	0.447	2.072	0.151484	1	0.060	0.047	0.827952	1	0.465	0.898	0.344	1	7.824	0.828	0.363
	2				2				2				2			
	1	0.216			1	1.273			1	0.518			1	9.442		
Error	9				9				9	3			9			

Table S2 (four non-significant generative traits): origin (k = 2, indigenous or restored populations), the interaction of mowing and origin was neglected here. Abbreviation: df = degrees of freedom, MQ = sum of mean squares, F = variance ratio, *p* = error probability, significant *p*-values < 0.05 are written in bold. Traits are indicated by numbers in parentheses.

	number of fruiting umbels (13)				weight of ripe umbels (15)			
	df	MQ	F	<i>p</i>	df	MQ	F	<i>p</i>
Intercept	1	15881.01	720.7	<0.001	1	1605.49	377.2	<0.001
Origin	1	0.01	0.0	0.988	1	1.79	0.4	0.517
Error	350	22.03			350	4.26		

	duration from first flowering to highest amount of fruiting umbels (17)				number of simultaneously flowering or fruiting umbels (18)			
	df	MQ	F	<i>p</i>	df	MQ	F	<i>p</i>
Intercept	1	4437498.28	3748.8	<0.001	1	25317.31	818.1	<0.001
Origin	1	216.85	0.2	0.669	1	7.46	0.2	0.624
Error	342	1183.71			350	30.95		

Kapitel 3: The use of non-local *Leucanthemum vulgare* seeds in the course of restoration measures can no longer be detected several years after their application

Birgit Gemeinholzer¹, Jutta Reiker¹, Christina M. Müller¹, Volker Wissemann¹

¹ Institute of Botany, Justus-Liebig-University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 38, D-35392 Giessen, Germany

e-mail address of the corresponding author: Birgit.Gemeinholzer@bot1.bio.uni-giessen.de

ORCID

Birgit Gemeinholzer 0000-0002-9145-9284

Jutta Reiker

Christina M. Müller 0000-0003-4632-3166

Volker Wissemann 0000-0003-0345-2603

Acknowledgements

We are grateful for the financial support from the Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU), and the Heidehofstiftung. Sampling was conducted with support from the Association of German Wild Seeds and Wild Plants Producer Association (Markus Wieden), as well as the road authorities Frankfurt (Gerd Ledergerber), Schotten (Alexander Greb), and Herleshausen (Helmut Byczysko). For permits to collect plants in nature conservation areas we thank Thomas Keller (NSG “Schwarze Berge”), Norbert Mitter (NSG “Schwarze Berge”), Jürgen Busse (NSG “Oberes Verstal”, Kirchvers), and Manfred Grossman (Hainich National Park). For support in the molecular laboratory, we thank the bio-technical assistants (Sabine Mutz and Helene Krufczik), the students (Tatjana Lapin and Hannah Nebelung). We would also like to thank Benjamin Schulz and the members of the Systematic Botany group in Gießen.

Abstract

Ecological restoration along roadside verges and on compensatory sites requires large-scale reintroductions of plants in form of seeds or seedlings; however, the genetic basis of seed or seedling sourcing is a controversial issue. Formerly, non-local seed sourcing of naturally occurring herbaceous species was common practice. Lately local provenancing got wide attention, and additional strategies are being recommended. All of these, however, raise the costs for restoration efforts.

Here we test whether the earlier introduction of non-local seeds of *Leucanthemum vulgare* agg. in the course of ecological restoration can still be detected several years after the measure. The results are used to provide conservation recommendations for this widespread herbaceous insect-pollinated species.

We analyzed the population genetic pattern (AFLP) of the ox-eye daisy in Central Germany on sites formerly restored with non-local seed sources (R) and compared these to the ones of indigenous populations (I). All populations of *L. vulgare* agg. were genetically diverse and did not clearly distinguish between R and I sites. Furthermore, no clear evidence of distinct local genetic patterns was observed. Based on our results, we argue for the use of non-native seeds in the course of restoration measures for ox-eye daisies due to cost savings, but support the demand for a broader population genetic monitoring in order to put the entire system of seed provenance on a solid empirical basis.

Keywords: non-local seed sources, ecological restoration, local provenancing, *Leucanthemum vulgare*, population genetic pattern, population genetic monitoring

Declarations

Funding: We are grateful for the financial support from the Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU, 20011/122), and the Heidehofstiftung (57190.01.1/4.11).

Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures): There are no conflicts of interest to declare related to this study.

Ethics approval (include appropriate approvals or waivers): not applicable

Consent for publication (include appropriate statements): All authors are willing to sign the consent form

Availability of data and material (data transparency): All data will be submitted to GFBio.org and there will be open access available

Code availability (software application or custom code): not applicable

Authors' contributions: BG was in charge of project development and writing the manuscript, JR conducted the study, CMM calculated the statistic and created all Figures and Tables and as well as VW, helped to write the manuscript

Introduction

Ecological restoration projects aim at assisting the recovery of altered or damaged ecosystems (Nevill et al. 2016). Along roadside verges and on compensatory sites, this requires large-scale reintroductions of plants in form of seeds or seedlings, e.g. in Germany more than 21,000 t of herbaceous perennial seeds were sown in the year 2015, with constantly rising demands at regional, national and global level (Guerrant and Kaye 2007; Reiker et al. 2015; Mainz and Wieden 2019; Elzenga et al. 2019). The genetic basis of seed or seedling sourcing for restoration, however, is a controversial issue concerning (i) costs, (ii) seed source availability and (iii) genetic constituency of the seed sources, while the last point – if knowledge about it is available - affects both preceding ones. For many years non-local seed sourcing of naturally occurring herbaceous species was the main strategy for restoration purposes along roadside verges and on compensatory sites. This was mainly due to significantly lower prices and former unavailability of large quantities of local seeds (Burton & Burton, 2002). However, during the last decade, awareness of the importance of the genetic constituency of the restored population increased and local provenancing as seed-sourcing practice got wide attention (e.g. revised in Williams et al. 2014; Durka et al. 2016; Mainz and Wieden 2019). Dependent on the magnitude and spatial scale of local seed sourcing, this however is also arguable as it might result in populations with restricted genetic diversity and limited adaptive potential (Sackville Hamilton 2001; Millar, et al. 2008). This led to the recommendation of alternative seed or seedling procurement strategies such as composite provenancing by using provisional seed zones (Bower et al. 2014), or seed transfer zones (Durka et al. 2016), admixture provenancing, climate-adjusted provenancing, or predictive sourcing for climate change (Broadhurst et al. 2008; Havens et al. 2015; Prober et al. 2015; revised in Williams et al. 2014 and Breed et al. 2018). All of these various measures aim to maintain the genetic variation for plant fitness in the short term and for the adaptation potential in the long term (Leimu et al. 2006; Helm and Aavik 2018).

In Germany, the usage of relaxed local' provenances with pre-defined seed transfer zones has become mandatory for restoration project from 2020 onward as part of the Nature Protection and Landscape Conservation act (Schumacher & Werk, 2010), §40 Abs. 4 BNatSchG 2010). This will decrease the non-local genotype introduction into the landscape; however, will also lead to ten-fold higher prices for the usage of indigenous seeds (Mainz and Wieden 2018).

In this study, we compare the genetic diversity and structure of populations originating from former non-local seed mixtures, with indigenous populations from conservation areas. We here investigate whether the population genetic pattern of the formerly non-local seed use of *Leucanthemum vulgare* agg. in the course of restoration projects at compensation sites still differs from that of the indigenous population in the region. In a previous study, we examined the population genetic patterns of *Daucus*

carota L. on indigenous and restored sites with non-local seed sources more than 8 years after restoration measures (Reiker et al. 2015). We found no population genetic differences between indigenous and restored sites and concluded that there were no obvious objections to the use of *D. carota*'s 10 times cheaper, non-local seeds for restoration projects (Reiker et al. 2015). In the present study, we investigate whether this recommendation also applies to *L. vulgare* agg., another common and widespread herbaceous plant species that is widely used in seed mixtures for restoration purposes in Germany. We perform genome size measurements to analyze the degree of ploidy of different R and I populations and use AFLP (Vos et al. 1995) to identify population genetic patterns. The following hypothesis is thus tested: The earlier introduction of non-local genotypes in ecological restoration projects can no longer be detected several years after application and therefore the use of non-local seeds in restoration projects can be recommended for this widespread, herbaceous, insect-pollinated species.

Materials and Methods

2.1 Study species

Here we investigate the population genetic pattern of the ox-eye daisy, *Leucanthemum vulgare* agg. (Asteraceae), which comprises three species with three different ploidy levels in Central Europe: the diploid *L. vulgare* (Vaill.) Lam., the tetraploid *L. ircutianum* DC., and the hexaploid *L. adustum* (W. D. J. Koch) Grelli (Oberprieler et al., 2011; Wagenitz et al., 1987). Due to highly variable morphological characters, the three species are often treated as *L. vulgare* agg. (see (Heywood, 1976; Marchi, 1982). Oberprieler et al. (2011) examined the central European *L. vulgare* agg. by molecular, morphological, and cytological methods and concluded that the infrageneric taxonomy can only unsatisfactorily be resolved, presumably as consequence of reticulate evolution. Most of the AFLP markers in their analysis (Oberprieler et al., 2011) were shared among all three members of the *L. vulgare* agg.. Thus, despite of the different ploidy levels we use the name *L. vulgare* agg.. The ox-eye daisy was already mentioned in the herbal books of the botanical renaissance of the 16th and 17th century, either as a common and widespread wild species (e.g. in Bauhin Pinax Theatri Botanici 1623) or as an ornamental plant (e.g. in Besler Hortus 2003 Eystettensis 1613). Krausch (2003) reported on several taxa from *L. vulgare* agg. that were either described and depicted from all over Europe between the 16th and 19th century and cultivated in botanical gardens (Berlin, Leipzig). He also mentioned breeding experiments by English, French and German plant breeders. These taxa, e.g. as garden refugees, may have contributed and still contribute to the heterogeneity of the species, making taxonomic treatment difficult.

The ox-eye daisies are perennial herbs with upright, simple or branched stems, up to 60 cm high. The plants flower from May to October (Georgia, 1942; Howarth & Williams, 1968). *L. vulgare* agg. exhibits

a predominant cross-pollinated breeding system which is promoted by proteandrous flowering (Georgia, 1942) although self-pollination may also occur (Grime, Hodgson, & Hunt, 1996; Knuth, 1908; Villard, 1971). More than 100 different flower visiting species of Coleoptera, Hymenoptera, Diptera and Lepidoptera are known to visit the ox-eye daisies (Clements, Cole, King, & McClay, 2004; Georgia, 1942) with flight distances up to 3000 meters, e.g. for the western honey bee (*Apis mellifera*) (Greenleaf, Williams, Winfree, & Kremen, 2007)). *L. vulgare* agg. reaches fruit maturity in the first year. Achene dispersal is predominantly epi- and endozoochorous (Georgia, 1942; Salisbury, 1961);(Olson et al., 1997) or autochorous, and Mitchi (2000) mentioned considerable spread by humans, e.g. by hay transports.

2.2 Study region and sampling

The study region is in Central Germany (Central and South Hesse, W-Thuringia, NW Bavaria) within an area of approximately 200 x 200 km². Road authorities provided information about the sites that had previously been restored with non-local seed material. These were either compensatory sites or road verges. However, since the latter are chronically disturbed environments, we only sampled the compensatory sites. We examined seven restored compensatory sites (R) per species, which were restored between 1994 and 2009 and had different sizes between 0.4 to 1.6 ha (Table 1, Figure 1). Prior to restoration all sites were arable land (corn, rapeseeds, and cereals are the most common crops in the region) typically ploughed once annually. The contribution of indigenous seeds via the soil seed bank or dissemination at the study sites cannot be excluded, but was most likely lower than the amount introduced via seed mixtures. The original seed mixtures comprised 0.3 % *L. vulgare* agg. (stable mixture since the late 1980s, according to the FLL Bonn; Research Society for Landscape Development and Landscaping, personal communications). The origin of the seeds for the restoration is unknown and can no longer be traced today. At the time of restoration, however, seeds were often produced in Eastern or Southern Europe, while indigenous seed sources were not available in such large quantities at this time.

For comparison, local genotypic diversity was investigated on seven indigenous sites (I) in the same region (Table 1, Figure 1). I sites were selected with the support of the "Association of German wild plants and seeds producers' e.V.". All I sites have not been altered or re-sown during the last 60 years (Prasse et al., 2010). Permits have been obtained from the local nature conservation authorities. A distance of at least 9 km between I and R sites was kept as well as a minimum distance of 200 m to any other adjacent population of horticultural relatives (*L. vulgare* agg.) to avoid hybridization (Posselt, 2000; Prasse et al., 2010), however, the possibility of hybridization between wild and horticultural plants cannot be completely excluded. Within the populations, the minimum distance between the examined individuals was two meters in order to best represent the genetic diversity of the site-

specific populations. In the field, we took leaf samples from 13 individuals per I- or R-site respectively, which were immediately dried and stored in silica gel until further processing.

2.3 Genome size estimates

For each I- and R site, the genome sizes of three randomly selected individuals of *L. vulgare* agg. were analysed. Pre-tests revealed silica dried leaf material to be suitable for 1C value measurements of the flow cytometric analyzer Cy Flow (Partec GmbH, Germany). *Vicia faba* L. (Bennett & Smith, 1976) served as reference (1C value ~13.33, <http://data.kew.org/cvalues>). The analysis was conducted following the manufacturers' instructions. To determine the nuclear DNA content of each sample, the following formula, proposed by Wang et al (2015), was used: standard 2C value (pg) = (sample peak mean / standard peak mean) * nuclear DNA content of the reference standard (pg).

2.4 AFLP analysis

We aimed to analyze 13 individuals per site, but due to laboratory constraints, sometimes-lower results were obtained (Table 1). DNA was extracted with the DNeasy Plant mini Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturers' recommendations. AFLP analyzes were carried out according to the protocol of Oberprieler et al. (2011) who have already performed AFLP analyzes in the *L. vulgare* agg. An initial primer screening with six different primer combinations and two individuals per different I- and R-sites was performed. The primers of the final analysis also correspond to those of Oberprieler et al. (2011): E35 / M62, E35 / M48 and E37 / M61. The selected primer combinations proved to be variable and informative (Table S1 in the Appendix) and provided clear, reproducible bands which were sufficiently polymorphic to show variation within and among populations. Concerning the laboratory protocols, we followed the recommendations published in Oberprieler et al. (2011). The samples were sent to LGC (Cologne/Germany) for fragment visualization. The data matrix was established using GENOGRAPHER 2.1.4 (Benham, Jeung, Jasieniuk, Kanazin, & Blake, 1999). Each AFLP fragment was scored using the "thumbnail" option, which allows for the comparison of signals per locus over all samples. If possible, peaks of low intensity were additionally scored by eye and included into the analysis. Standard lanes, carrying identical samples on each plate were added as quality check. For five samples, the AFLP analysis for each primer combination and each species was repeated twice per PAA gel and the phenotypic error rate was calculated as number of phenotypic differences related to the total number of phenotypic comparisons and subsequently averaged over the three combinations (Pompanon et al. 2005; Bonin et al 2004). Although we carefully analyzed the data twice and the AFLP gel images were very good and thorough, the final overall error rate was relatively high (12 %). This is due to the low number of repetitions due to plate restrictions. Genetic diversity estimates were analysed with AFLPsurv 1.0 (Vekemans, 2002) which calculates percentage of polymorphic loci (PLP) and genetic diversity (H_e) after Lynch and Milligan (1994), for allele frequency estimation the default

option in AFLPsurv was used, Bayesian method with non-uniform prior distribution of allele frequencies (Zhivotovsky 1999; Vekemans 2002). H_e \emptyset after rarefaction was calculated due to the unequal sample sizes of the different populations by multiple recalculations of H_e with the smallest population size.

Genetic variation within and among populations was evaluated using Analysis of Molecular Variance (AMOVA) in ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010), with 10,000 permutations for significance tests. Patterns of genetic population structure were visualized with a principal coordinates analysis (PCoA) using the R package ADEGENET v1.4-2 (Jombart, 2008). Pairwise F_{ST} was also calculated with GenAlEx. To further explore the genetic affiliation of individuals to genetic clusters, STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al., 2000) was applied, by using the admixture model with 100,000 Markov Chain Monte Carlo replicates, a burn-in period of 50,000, and ten repeats per run for each chosen cluster number (i.e. $K = 1-14$), PLOIDY = 2 and RECESSIVEALLELES = 1. For all other settings, the default options were used. To identify the most likely modal K distribution, ΔK (Evanno et al., 2005) was determined using STRUCTURE HARVESTER (Earl & von Holdt, 2012). To verify the most probable cluster membership coefficient among the ten runs of STRUCTURE and STRUCTURE HARVESTER we used CLUMPP vs. 1.1.2. (Jakobsson and Rosenberg 2007) Corresponding graphs were constructed with DISTRUCT (Rosenberg, 2004).

Results

L. vulgare agg. individuals from 12 of the 14 populations revealed 1C values of 20.0 pg +/- 3.59 pg (Table 1), while two indigenous populations (I04 and I05) resulted in mean genome values of 11.5 pg +/- 0.2 pg, potentially indicative of different ploidy levels.

The *L. vulgare* agg. data set, derived from three AFLP primer combinations with 173 successfully analyzed individuals, resulted in a total of 263 unambiguously scorable loci. The percentage of polymorphic loci (PLP) across all taxa showed a mean value of 84.0 % (73.8 – 90.1 %, Table 1). The average PLP of the indigenous populations (84.6 %) was not significantly different to the restored populations (83.4 %, none significant paired T-test). The arithmetic mean genetic diversity of all investigated *L. vulgare* agg. populations was $H_e = 0.271$ with genetic diversities non significantly varying between $H_e = 0.220$ and 0.298. The mean genetic diversity of the indigenous populations $H_e = 0.281$ was slightly but non-significantly higher than the one of the restored populations $H_e = 0.261$ (Table 3). Two of the 14 *L. vulgare* populations had less individuals, but even after a rarefaction the

L. vulgare agg. featured very low population genetic differentiation between the indigenous and restored provenances. Only 1.56 % of genetic variance explained the provenance-specific divergence (AMOVA Table 4), while 9 % of the genetic variation was explained by among population deviation. The percentage of within population variation was 89.34 % with a moderate $F_{ST} = 0.106$ ($p <$

0.001). The values of the genetic variations slightly differed if calculated without the potential diploid populations (Table S2).

The AMOVA results were substantiated by the PCoA (Figure 2), which depicted one undifferentiated cloud for all analyzed *L. vulgare* agg. samples with no obvious provenance or population specific genotypic differentiations. For *L. vulgare* agg. the STRUCTURE analysis resulted in a distinct modal maximum of $\Delta K = 2$ (Evanno et al., 2005) with genotypic clusters being neither indicative for provenance nor population affiliation (Figure 3), however, the minimum ΔK value in STRUCTURE is $\Delta K = 2$ while the data is better represented by $K = 1$.

Discussion

This research was carried out to analyze whether the earlier use of non-local seeds in restoration projects is still detectable today and differs from the population genetic pattern of the ox-eye daisy in the region. Genome size measurements of most of the populations studied, irrespective of their indigenous or restored origin, suggest that the most common ox-eye daisies in the region are the tetraploid *L. ircutianum* ($2n = 36$). Only two indigenous *L. vulgare* agg. populations from the most northwestern part of the study area in the Hainich region in Thuringia (I04, I05) featured 1C-values that are indicative of the diploid *L. vulgare* ($2n = 18$). Both species are known to frequently occur in this region of Central Germany (Oberprieler et al., 2011; Scholz & Uhlemann, 2001a, 2001b). Our analysis support earlier findings by Oberprieler et al. (2011) who already noted that most of the AFLP markers studied are shared among the different species within the *L. vulgare* agg. with only a few markers being unique to the respective species with different ploidy levels. While the genetic diversity of one of the potential *L. vulgare* populations within the *L. vulgare* agg. ($H_{eiI04} = 0.282$) is similar to the average genetic diversity of all indigenous populations ($\emptyset H_{ei} = 0.281$) mainly belonging to *L. ircutianum*, is the *L. vulgare* population I05 genetically depleted ($H_{eiI05} = 0.249$, Table 1). However, a reduced genetic diversity was also found at a restored site with potentially tetraploid *L. ircutianum* individuals ($H_{eiR01} = 0.220$). The population is on a compensatory site surrounded by intensively farmed agricultural land on very productive soils. These most likely form an isolation barrier that prevents gene flow from the environment, which could explain the genetic impoverishment of the population (Villard 1971; Wagenitz et al. 1987; Grime et al. 1996). On average were genetic diversities in populations on I-sites ($\emptyset H_{ei} = 0.281$) slightly higher than the ones on R-sites ($\emptyset H_{eR} = 0.261$), which even became more prominent after rarefaction. However, no information about the initial genetic diversity in the region was available and we are unaware if the genetic diversity in the non-local seed mixtures was significantly different from the ones of the indigenous populations.

Throughout the investigation area, there were no distinct pattern differences between *L. vulgare* agg. populations of indigenous and formerly restored sites (Fig. 2 and 3). This supports earlier findings in

Daucus carota (Reiker et al., 2015), another common insect pollinated plant species frequently present in seed mixtures for Central European restoration projects. Reiker et al. (2015) also conducted population genetic analyses in the same investigation area of Hessian, Thuringia and NW-Bavaria with the same study design. In *L. vulgare* agg. ($F_{ST} = 0.106$, $p < 0.001$) as well as in *D. carota* ($F_{ST} = 0.034$, $p < 0.01$, (Reiker et al., 2015) moderate to negligible patterns of genetic differentiation between populations of indigenous and restored sites were retrieved. Even though *L. vulgare* agg. is known to be self-compatible (e.g. (Andersson, 2008; Knuth, 1898-1905; Villard, 1971) showed that cross-pollinated flower heads had a much higher fruit set (\emptyset 57%) than heads subject to self-pollination (\emptyset 2.5%). This may explain why the here found outcrossing rates are high, similar to the ones found in *D. carota* (Reiker et al., 2015). However, the genetic structuring for *L. vulgare* agg. in the investigation area is distinctly lower than typical for common perennial outcrossing plant species ($F_{ST} = 0.22$, (Nybom et al., 2004), $F_{ST} = 0.20 - 0.17$, (Reisch & Bernhardt-Römermann, 2014). The lower result might be due to the regional focus of our investigation (Reisch & Bernhardt-Römermann, 2014) but could also be the result of the human induced introduction of non-local seed sources in the region. In *L. vulgare* agg. most of the molecular variance (\emptyset 89.3%, 73.8 - 90.1) was found within the 14 populations, irrespective of whether only indigenous populations or sites restored with non-local seed material were analyzed. The values are high compared to other AFLP based population genetic investigations in central European perennial Asteraceae, e.g. in *Senecio vulgaris* \emptyset 81.9 % (Haldimann, Steinger, & Müller-Scharer, 2003), or *Lactuca serriola* 78.0 % (Lebeda et al., 2009), and higher than the ones found by Oberprieler et al. (2011) who screened the central European *Leucanthemum* species from the northwestern Alps and the Franconian Jura (78.0 %). The lower within population divergence retrieved by Oberprieler et al. (2011) might be due to the larger investigation area of their analysis and the fact that they included the hexaploid alpine *L. adustum* into their investigation, which was not present in our analysis. We performed the AMOVA with several alternative groupings (*L. vulgare* agg., *L. vulgare*, *L. ircutianum* of indigenous and/or restored sites, Table 4) but the genetic differentiations of the *L. vulgare* populations did not distinctly differ from the overall pattern. Based on these results, similar to *D. carota* (Reiker et al. 2015), there are no obvious objections against the current restoration practice for *L. vulgare* agg. using the less expensive non-local seed material.

Provided, that the prices for non-local ox-eye daisy seeds are significantly lower than for the indigenous ones and the species itself and not genotypic diversities within species are important for most ecosystem functions we would recommend the introduction of species' non-local genotypes. Potential genetic benefits associated with population admixture are increased genetic variation and the formation of novel trait combinations due to segregation and recombination, which could result in

increased individual fitness (heterosis) and population growth rates (e.g. (Hufford & Mazer, 2003; Verhoeven et al., 2004).

Consequences for restoration practices

In the German Nature Projection and Landscape Conservation act (Schumacher & Werk, 2010), §40 Abs. 4 BNatSchG 2010) seed transfer zones were defined, based on climate, geological substrate and soil types (Meynen, Schmithuesen, & Gellert, 1962). Within each seed transfer zone, the mixing of seeds from several source populations is recommended to increase genetic variation (Prasse et al., 2010); ErMiV 2011; (Durka et al., 2016). Durka et al. (2016) screened the population genetic differentiation of seven common grassland species in eight regions of the 22 seed transfer zones throughout Germany and revealed significant differentiation in most of the investigated species. As consequence they postulated genetic structuring across Germany in common grassland plants to be more common than formerly assumed (Durka et al., 2016). However, their data only allows for a recommendation in support of the eight seed transfer zones while in our analysis on smaller scales within the investigation area in Hessian, Thuringia, and NW-Bavaria the indigenous populations of both species featured negligible population genetic differentiation within a range of 40.000 km². The investigation area represents on average 2.5 times the size of a seed transfer zone in Germany (357.376 km² in total and divided into 22 seed transfer zones) and therefore, we would recommend to use the envisaged 22 seed transfer zones and support the demand for a population genetic monitoring of these zones. However, this would require a much more in-depth analysis as already proposed by Durka et al (2016) who claimed that ideally, a population genetic monitoring on a grid based scheme of a large amount of the 150 grassland species used for restoration purposes in Germany would be needed to put the entire seed provenancing system on a solid empirical basis.

References

- Andersson S (2008) Pollinator and nonpollinator selection on ray morphology in *Leucanthemum vulgare* (oxeye daisy, Asteraceae). *American journal of botany* 95:1072–1078. doi: 10.3732/ajb.0800087
- Bauhin C (2003) *Pinax Theatri botanici von 1623*. Pages 103–112. In: Krausch H-D (ed) *Kaiserkron und Päonien rot ...: Entdeckung und Einführung unserer Gartenblumen*. Dölling und Galitz Verlag, München und Hamburg
- Benham J, Jeung JU, Jasieniuk M, Kanazin V, Blake T (1999) Genographer: a graphical tool for automated fluorescent AFLP and microsatellite analysis. *Journal of Agricultural Genomics* 4:399
- Bennett MD, Smith JB (1976) Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 274:227–274. doi: 10.1098/rstb.1976.0044

- Berger H, Conert HJ, Hegi G (eds) (1975) *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, 2. Aufl. [unveränd. Text-Nachdr.]. Parey, Berlin
- Besler, Basilius (2003) *Hortus Eystettensis von 1613*. Pages 103–113. In: Krausch H-D (ed) *Kaiserkrone und Päonien rot ...: Entdeckung und Einführung unserer Gartenblumen*. Dölling und Galitz Verlag, München und Hamburg
- Bischoff A, Steinger T, Müller-Schärer H (2010) The Importance of Plant Provenance and Genotypic Diversity of Seed Material Used for Ecological Restoration. *Restoration Ecology* 18:338–348. doi: 10.1111/j.1526-100X.2008.00454.x
- Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol Ecol* 13:3261–3273. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02346.x
- Breed MF, Stead MG, Ottewill KM, Gardner MG, Lowe AJ (2013) Which provenance and where?: Seed sourcing strategies for revegetation in a changing environment. *Conservation Genetics* 14:1–10. doi: 10.1007/s10592-012-0425-z
- Broadhurst LM, Lowe A, Coates DJ, Cunningham SA, McDonald M, Veski PA, Yates C (2008) Seed supply for broadscale restoration: maximizing evolutionary potential. *Evolutionary applications* 1:587–597. doi: 10.1111/j.1752-4571.2008.00045.x
- Burton PJ, Burton CM (2002) Promoting genetic diversity in the production of large quantities of native plant seed. *Ecological Restoration* 20:117–123. doi: 10.3368/er.20.2.117
- Choi YD (2004) Theories for ecological restoration in changing environment: Toward 'futuristic' restoration. *Ecological Research* 19:75–81. doi: 10.1111/j.1440-1703.2003.00594_19_1.x
- Clements DR, Cole DE, King J, McClay A (2004) The biology of Canadian weeds. 128. *Leucanthemum vulgare* Lam. *Canadian Journal of Plant Science* 84:343–363. doi: 10.4141/P02-112
- Deutscher Bundestag (2005): *Kleine Anfrage: Bereitstellung von gebietsheimischem Wildkräutersaatgut im Konflikt zwischen Bestimmungen des Saatgutverkehrsgesetzes und des Bundesnaturschutzgesetzes von 23.02.2005*. – Drucksache des Deutschen Bundestages und Bundesrates 15. Wahlperiode Nr. 4960.
- Doede DL (2005) Genetic variation in Broadleaf Lupine (*Lupinus latifolius*) on the Mt Hood National Forest and implications for seed collection and deployment. *Native Plants Journal* 6:36–48. doi: 10.1353/npj.2005.0018
- Düll R, Kutzelnigg H (1992) *Botanisch-ökologisches Exkursionstaschenbuch: Das Wichtigste zur Biologie bekannter heimischer Pflanzen*, 4., überarb. und erw. Aufl. Quelle and Meyer, Heidelberg
- Duminil J, Hardy OJ, Petit RJ (2009) Plant traits correlated with generation time directly affect inbreeding depression and mating system and indirectly genetic structure. *BMC evolutionary biology* 9:177. doi: 10.1186/1471-2148-9-177

Durka W, Michalski SG, Berendzen KW, Bossdorf O, Bucharova A, Hermann J-M, Hölzel N, Kollmann J (2016) Genetic differentiation within multiple common grassland plants supports seed transfer zones for ecological restoration. *Journal of Applied Ecology*:n/a-n/a. doi: 10.1111/1365-2664.12636

Earl DA, von Holdt BM von (2012) STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

East EM (1940) The Distribution of Self-Sterility in the Flowering Plants. *Proceedings of the American Philosophical Society* 82:449–518

Edmunds S (1999) Heterosis and Outbreeding Depression in Interpopulation Crosses Spanning a Wide Range of Divergence. *Evolution* 53:1757. doi: 10.2307/2640438

Edmunds S (2007) Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular ecology* 16:463–475. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03148.x

Ehrenfeld JG (2000) Defining the Limits of Restoration: The Need for Realistic Goals. *Restoration Ecology* 8:2–9. doi: 10.1046/j.1526-100x.2000.80002.x

Ellstrand NC (2014) Is gene flow the most important evolutionary force in plants? *American journal of botany* 101:737–753. doi: 10.3732/ajb.1400024

Ellstrand NC, Schierenbeck KA (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:7043–7050. doi: 10.1073/pnas.97.13.7043

ErMiV (2011) Regulation about the placing on the market of seed of conservation mixtures. *Bundesgesetzblatt I* S. 2641.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology* 14:2611–2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* 10:564–567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x

Fischer MA, Adler W, Oswald K (2005) *Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol: Bestimmungsbuch für alle in der Republik Österreich, in der Autonomen Provinz Bozen, 2., verb. u. erw. Aufl. der "Exkursionsflora von Österreich". OÖ Landesmuseum, Linz*

Frankham R, Ballou JD, Eldridge MDB, Lacy RC, Ralls K, Dudash MR, Fenster CB (2011) Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology* 25:465–475. doi: 10.1111/j.1523-1739.2011.01662.x

Georgia AE (1942) *A manual of weeds*, Macmillan, New York

- Goto S, Iijima H, Ogawa H, Ohya K (2011) Outbreeding Depression Caused by Intraspecific Hybridization Between Local and Nonlocal Genotypes in *Abies sachalinensis*. *Restoration Ecology* 19:243–250. doi: 10.1111/j.1526-100X.2009.00568.x
- Greenleaf SS, Williams NM, Winfree R, Kremen C (2007) Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia* 153:589–596. doi: 10.1007/s00442-007-0752-9
- Grime JP, Hodgson JG, Hunt R (1996) *Comparative plant ecology: A functional approach to common British species*, Repr. Chapman and Hall, London
- Haldimann P, Steinger T, Muller-Scharer H (2003) Low genetic differentiation among seasonal cohorts in *Senecio vulgaris* as revealed by amplified fragment length polymorphism analysis. *Molecular Ecology* 12:2541–2551. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01915.x
- Hänsel R, Greiner S, Abel G (eds) (1994) *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis: Drogen: P - Z*. Springer, Berlin
- Heywood VH (1976) *Leucanthemum* Mill. In: Tutin, T. G. (eds) *Flora Europae* 4, Cambridge University Press:174–177
- Howarth SE, Williams JT (1968) *Chrysanthemum leucanthemum* L. *The Journal of Ecology* 56:585. doi: 10.2307/2258252
- Hu X-S, Li B (2003) On migration load of seeds and pollen grains in a local population. *Heredity* 90:162–168. doi: 10.1038/sj.hdy.6800212
- Hufford KM, Mazer SJ (2003) Plant ecotypes: Genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology and Evolution* 18:147–155. doi: 10.1016/S0169-5347(03)00002-8
- Hughes AR, Inouye BD, Johnson MTJ, Underwood N, Vellend M (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters* 11:609–623. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* (Oxford, England) 23:1801–1806. doi: 10.1093/bioinformatics/btm233
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* (Oxford, England) 23:1801–1806. doi: 10.1093/bioinformatics/btm233
- Jackson ST, Hobbs RJ (2009) Ecological restoration in the light of ecological history. *Science* (New York, N.Y.) 325:567–569. doi: 10.1126/science.1172977
- Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* (Oxford, England) 24:1403–1405. doi: 10.1093/bioinformatics/btn129
- Jones TA (2013) When local isn't best. *Evolutionary applications* 6:1109–1118. doi: 10.1111/eva.12090

Kaye TN, Pendergrass KL, Finley K, Kauffman JB (2001) THE EFFECT OF FIRE ON THE POPULATION VIABILITY OF AN ENDANGERED PRAIRIE PLANT. *Ecological Applications* 11:1366–1380. doi: 10.1890/1051-0761(2001)011[1366:TEOFOT]2.0.CO;2

Keller SR, Taylor DR (2010) Genomic admixture increases fitness during a biological invasion. *Journal of Evolutionary Biology* 23:1720–1731. doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.02037.x

Kettenring KM, Mercer KL, Reinhardt Adams C, Hines J, Wilsey B (2014) Application of genetic diversity-ecosystem function research to ecological restoration. *Journal of Applied Ecology* 51:339–348. doi: 10.1111/1365-2664.12202

Knuth P (1898-1905) *Handbuch der Blütenbiologie*. W. Engelmann, Leipzig

Knuth P (1908) *Handbook of flower pollination*, Volume II

Kramer AT, Havens K (2009) Plant conservation genetics in a changing world. *Trends in plant science* 14:599–607. doi: 10.1016/j.tplants.2009.08.005

Kumar S, Kumari S, Gupta RC (2012) Cytological investigations of some polypetalous plants from District Sirmour of Himachal Pradesh in the Western Himalayas, India. *Chromosome Botany* 7:87–96. doi: 10.3199/iscb.7.87

Lebeda A, Kitner M, Dziechciarková M, Doležalová I, Křístková E, Lindhout P (2009) An insight into the genetic polymorphism among European populations of *Lactuca serriola* assessed by AFLP. *Biochemical Systematics and Ecology* 37:597–608. doi: 10.1016/j.bse.2009.10.010

Leimu R, Fischer M (2008) A meta-analysis of local adaptation in plants. *PloS one* 3:e4010. doi: 10.1371/journal.pone.0004010

Marchi P (1982) *Leucanthemum* Mill. - *Margerita* (9341). Pignatti, S. (ed) *Flora d'Italia*, Edagricola Bologna:89–98

McKay JK, Christian CE, Harrison S, Rice KJ (2005) “How Local Is Local?”—A Review of Practical and Conceptual Issues in the Genetics of Restoration. *Restoration Ecology* 13:432–440. doi: 10.1111/j.1526-100X.2005.00058.x

Meynen E, Schmithuesen J, Gellert J (1962) *Handbuch der naturraeumlichen Gliederung Deutschlands*. Bundesanstalt fuer Landeskunde, Remagen [etc.]

Michaelson MJ, Price HJ, Ellison JR, Johnston JS (1991) Comparison of Plant DNA Contents Determined by Feulgen Microspectrophotometry and Laser Flow Cytometry. *American journal of botany* 78:183–188. doi: 10.2307/2445241

Miller SA, Bartow A, Gisler M, Ward K, Young AS, Kaye TN (2011) Can an Ecoregion Serve as a Seed Transfer Zone?: Evidence from a Common Garden Study with Five Native Species. *Restoration Ecology* 19:268–276. doi: 10.1111/j.1526-100X.2010.00702.x

Montalvo AM, Williams SL, Rice KJ, Buchmann SL, Cory C, Handel SN, Nabhan GP, Primack R, Robichaux RH (1997) Restoration biology: A population biology perspective. *Restoration Ecology* 5:277–290. doi: 10.1046/j.1526-100X.1997.00542.x

Mullarkey AA, Byers DL, Anderson RC (2013) Inbreeding depression and partitioning of genetic load in the invasive biennial *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). *American journal of botany* 100:509–518. doi: 10.3732/ajb.1200403

Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3:93–114. doi: 10.1078/1433-8319-00006

Nybom H, Esselink GD, Werlemark G, Vosman B (2004) Microsatellite DNA marker inheritance indicates preferential pairing between two highly homologous genomes in polyploid and hemisexual dog-roses, *Rosa* L. Sect. *Caninae* DC. *Heredity* 92:139–150. doi: 10.1038/sj.hdy.6800332

Oberprieler C, Eder C, Meister J, Vogt R (2011) AFLP fingerprinting suggests an allopolyploid origin of two members of the *Leucanthemum vulgare* aggregate (Compositae, Anthemideae) in central Europe. *Nordic Journal of Botany* 29:370–377. doi: 10.1111/j.1756-1051.2011.01025.x

Olson BE, Roseann T, Wallander, Peter K, Fay (1997) Intensive Cattle Grazing of Oxeye Daisy (*Chrysanthemum leucanthemum*). *Weed Technology* 11:176–181

Peakall R, Smouse PE (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539

Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* 6:847–859. doi: 10.1038/nrg1707

Posselt UK (2000) Genetische Diversität bei Wildformen und Zuchtsorten von *Lolium perenne* L. *Schriftreihe für Vegetationskunde* 32:79–85

Prasse R, Kunzmann D, Schröder R. (2010) Entwicklung und praktische Umsetzung naturschutzfachlicher Mindestanforderungen an einen Herkunftsnachweis für gebietseigenes Wildpflanzensaatgut krautiger Pflanzen. unpublished Manuskript DBU-project

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959

Rader R, Edwards W, Westcott DA, Cunningham SA, Howlett BG (2011) Pollen transport differs among bees and flies in a human-modified landscape. *Diversity and Distributions* 17:519–529. doi: 10.1111/j.1472-4642.2011.00757.x

Reiker J, Schulz B, Wissemann V, Gemeinholzer B (2015) Does origin always matter? Evaluating the influence of nonlocal seed provenances for ecological restoration purposes in a widespread and outcrossing plant species. *Ecology and Evolution* 5:5642–5651. doi: 10.1002/ece3.1817

Reisch C, Bernhardt-Römermann M (2014) The impact of study design and life history traits on genetic variation of plants determined with AFLPs. *Plant Ecology* 215:1493–1511. doi: 10.1007/s11258-014-0409-9

Rice KJ, Emery NC (2003) Managing microevolution: restoration in the face of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1:469–478

Rosenberg NA (2004) distruct: A program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137–138. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x

Sackville Hamilton NR (2001) Is local provenance important in habitat creation?: A reply. *Journal of Applied Ecology* 38:1374–1376. doi: 10.1046/j.0021-8901.2001.00670.x

Salisbury EJ (1961) *Weeds and aliens*, Collins, London

Scholz C, Uhlemann Ingo (2001a) *Leucanthemum ircutianum* DC. in Brandenburg und Sachsen. *Berichte der Arbeitsgemeinschaft sächsischer Botaniker neue Folge*:79–84

Scholz C, Uhlemann Ingo (2001b) *Leucanthemum ircutianum* DC. und *Leucanthemum vulgare* LAM. in Sachsen-Anhalt. *Mitteilungen zur floristischen Kartierung in Sachsen-Anhalt* 6:43–48

Schumacher A, Werk K (2010) Die Ausbringung gebietsfremder Pflanzen nach § 40 Abs. 4 BNatSchG. *Natur und Recht* 32:848–853. doi: 10.1007/s10357-010-1985-7

Sebald O, Nebel M, Philippi G, Demuth S, Kleinsteuber A, Gottschlich G, Böhling N, Baumann H (eds) (1992) *Die Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs: Im Rahmen d. Artenschutzprogrammes Baden-Württemberg*. Ulmer, Stuttgart

Sgro CM, Lowe AJ, Hoffmann AA (2011) Building evolutionary resilience for conserving biodiversity under climate change. *Evolutionary applications* 4:326–337. doi: 10.1111/j.1752-4571.2010.00157.x

Stingemore JA, Krauss SL (2013) Genetic delineation of local provenance in *Persoonia longifolia*: Implications for seed sourcing for Ecological Restoration. *Restoration Ecology* 21:49–57. doi: 10.1111/j.1526-100X.2011.00861.x

Tóth K (2014) Soil seed banks in loess grasslands and their role in grassland recovery. *Applied Ecology and Environmental Research* 12:537–547. doi: 10.15666/aer/1202_537547

Tutin TG (1968) *Pimpinella* L. In: Tutin, T. G.; Heywood, V. H.; Burges, N. A.; Moore, D. M.; Valentine, D. H.; Walters, S. M.; Webb, D. A.

van Kleunen M, Rockle M, Stift M (2015) Admixture between native and invasive populations may increase invasiveness of *Mimulus guttatus*. *Proceedings. Biological sciences* 282. doi: 10.1098/rspb.2015.1487

Vander Mijnsbrugge K, Bischoff A, Smith B (2010) A question of origin: Where and how to collect seed for ecological restoration. *Basic and Applied Ecology* 11:300–311. doi: 10.1016/j.baae.2009.09.002

Vekemans X (2002) AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium

- Verhoeven KJF, Macel M, Wolfe LM, Biere A (2010) Population admixture, biological invasions and the balance between local adaptation and inbreeding depression. *Proceedings. Biological sciences* 278:2–8. doi: 10.1098/rspb.2010.1272
- Verhoeven KJF, Vanhala TK, Biere A, Nevo E, van Damme JMM (2004) The genetic basis of adaptive population differentiation: A quantitative trait locus analysis of fitness traits in two wild barley populations from contrasting habitats. *Evolution* 58:270–283. doi: 10.1111/j.0014-3820.2004.tb01644.x
- Villard M (1971) Contribution a l'etude cytotaxinomique et cytogenetique du genre *Leucanthemum* Adans. en Briq. et Cav.: Systematics: Angiospermae, Compositae: *Leucanthemum*. Berner Schweizer Botanische Gesellschaft:96–188
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407–4414. doi: 10.1093/nar/23.21.4407
- Wagenitz G, Conert HJ, Hegi G (eds) (1987) *Illustrierte Flora von Mitteleuropa, 2., überarb. und erw. Aufl.* Parey, Berlin
- Whitlock MC (2015) Modern Approaches to Local Adaptation. *The American naturalist* 186:S1-S4. doi: 10.1086/682933
- Wilkinson DM (2001) Is local provenance important in habitat creation? *Journal of Applied Ecology* 38:1371–1373. doi: 10.1046/j.0021-8901.2001.00669.x
- Willemstein SC (1987) *An evolutionary basis for pollination ecolog.* Leiden University Press
- Zavodna M, Arens P, van Dijk PJ, Partomihardjo T, Vosman B, van Damme JMM (2005) Pollinating fig wasps: genetic consequences of island recolonization. *Journal of Evolutionary Biology* 18:1234–1243. doi: 10.1111/j.1420-9101.2005.00937.x
- Williams AV, Nevill PG, Krauss SL (2014) Next generation restoration genetics: applications and opportunities. *Trends Plant Sci* 19:529–537
- Zhivotovsky L.A., 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, 8, 907-913

Table 1: Sample sites of *Leucanthemum vulgare* agg. populations. Abbreviations: Population Code: I = indigenous populations, R = restored populations; location in accordance to the nearest village or town; Nature conservation numbers in accordance to the conservation policy of the European Union; the Council of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora Council Directive 92/43 / EWG. He \emptyset after Lynch and Milligan (1994), He \emptyset after rarefaction and Difference between He and He \emptyset rarefaction.

Population Code	Location	Latitude (N)	Longitude (E)	Nature conservation number or date of restoration	Molecular analysis: no. of individuals	PLP	H _e	H _e ∅ after rarefaction	Difference	Genome size measurement: no. of individuals	Genome size (pg)	Average genome size (pg)
I01	Biebertal	50.641687	8.556461	5317-305 (FFH)	13	87.5	0.278	0.273	0.005	3	20.58 – 21.72	21.12
I02	Kirchvers	50.690680	8.579207	5317-301 (NSG)	7	90.1	0.293	0.317	-0.024	3	20.84 – 22.88	21.77
I03	Niederkleen	50.480773	8.616436	5517-301 (FFH)	13	88.2	0.297	0.309	-0.012	3	19.94 – 21.90	20.95
I04	Eichsfeld	51.220721	10.358348	4728-301 (FFH)	13	86.3	0.282	0.289	-0.007	3	10.16 – 12.14	11.37
I05	Berka vor dem Hainich	51.039571	10.415881	4828-301 (NP)	13	79.8	0.249	0.258	-0.009	3	11.54 – 11.66	11.60
I06	Weinberg bei Steinau	50.327097	9.450231	5622-302 (FFH)	13	86.7	0.298	0.304	-0.006	3	21.08 – 22.12	21.53
I07	Hungen	50.467687	8.877661	378409 (VSG)	13	73.8	0.268	0.282	-0.014	3	21.12 – 21.58	21.37
R01	Friedberg 1	50.344786	8.735547	2009	13	74.1	0.220	0.225	-0.005	3	20.50 – 22.12	21.39
R02	Friedberg 2	50.335239	8.733971	2009	13	87.1	0.270	0.269	0.001	3	21.48 – 22.48	21.85
R03	Bad Nauheim	50.392491	8.725655	1996	11	85.2	0.268	0.280	-0.012	3	21.16 – 21.64	21.47
R04	Ober Erlenbach 1a	50.219039	8.679331	2004	13	84.8	0.255	0.266	-0.011	3	21.10 – 21.50	21.34
R05	Ober Erlenbach 2a	50.226271	8.701537	2004	13	82.5	0.267	0.284	-0.017	3	21.28 – 21.44	21.37
R06	Herleshausen 1	50.995496	10.153041	2004	13	85.6	0.268	0.276	-0.008	3	20.86 – 21.34	21.05
R07	Steinau an der Straße	50.323347	9.446011	1994	12	84.8	0.277	0.281	-0.004	3	20.88 – 21.60	21.13
					Average all	84.0	0.271	0.280		Average all		19.86
										(without I04;I05)		21.36
					Average I	84.6	0.281	0.290		Average I		18.53
										(without I04;I05)		21.28
					Average R	83.4	0.261	0.269		Average R		21.37

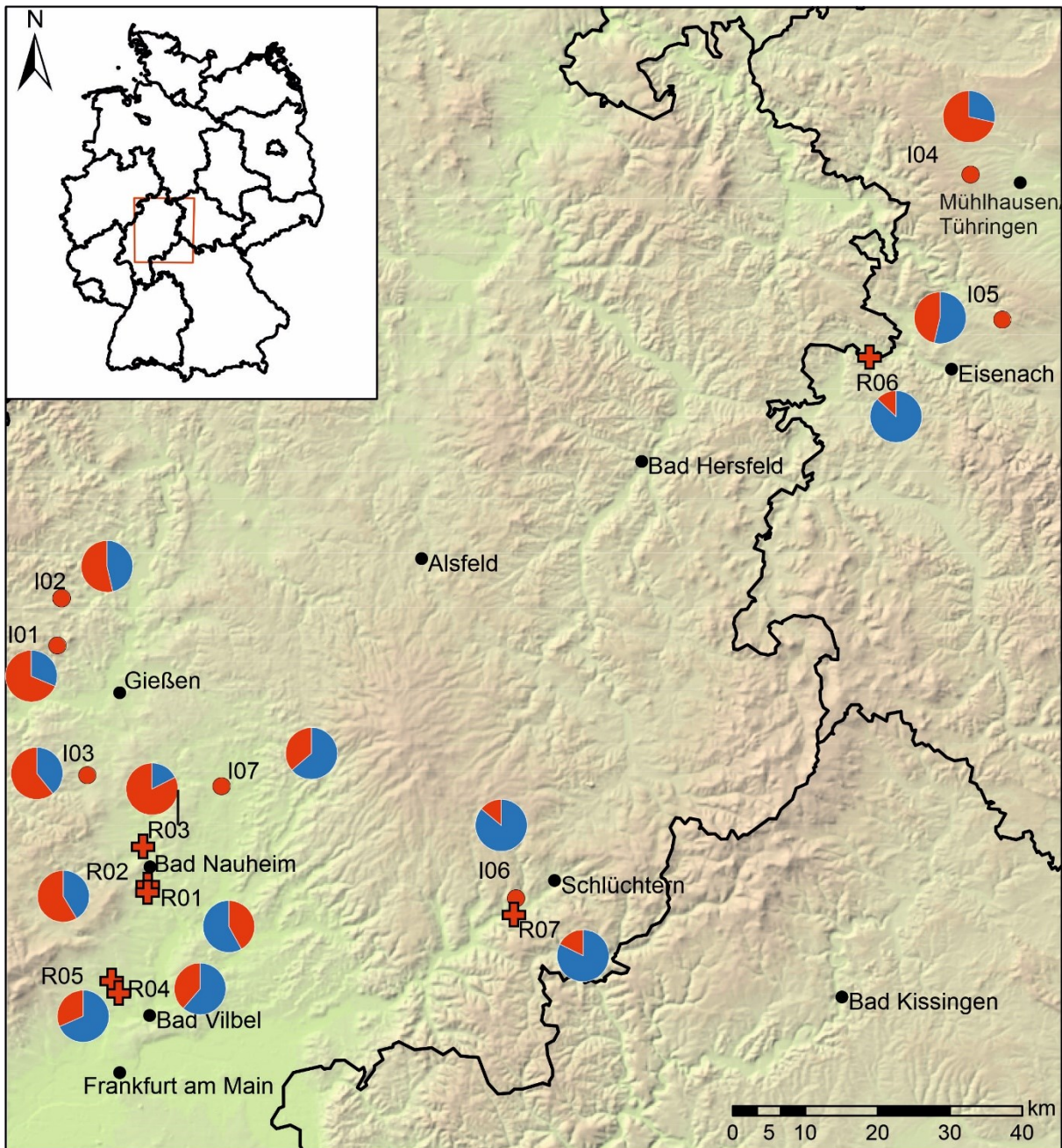
Table 2: Analysis of molecular variance (AMOVA) for populations of *Leucanthemum vulgare* agg. with two different groupings (restored and indigenous). Statistics include degrees of freedom (Df), AMOVA sums of squares (SS), variance components (VC), percentage of variation, differentiation values (F_{CT} , F_{SC} , F_{ST}) and their high significance level ($p < 0.001$).

Sites	Source of variation	Df	SS	VC	Percentage variation	F-Statistics ($p < 0.001$)
all	among groups (I, R)	1	154.716	0.725	1.565	F_{CT} 0.016
	among populations	12	1101.920	4.207	9.087	F_{SC} 0.092
	within populations	159	6401.998	41.361	89.347	F_{ST} 0.107
	total	172	7658.634	46.292	100	
indigenous	among populations	6	603.017	4.501	8.890	
	within populations	78	3597.736	46.125	91.110	F_{ST} 0.089
	total	84	4200.753	50.625	100	
restored	among populations	6	534.990	3.621	7.658	
	within populations	81	3536.829	43.665	92.342	F_{ST} 0.077
	total	87	4071.818	47.286	100	

Table 5: Pairwise F_{ST} of the different provenances of *Leucanthemum vulgare* agg.

Species	Overall F_{ST}	Range of pairwise F_{ST} values
<i>Leucanthemum vulgare</i>	Indigenous (all)	0.013 - 0.166
	indigenous (without I04,I05)	0.013 - 0.083
	restored	0.003 - 0.176
	all	0.003 - 0.176
	all (without I04,I05)	0.003 - 0.176

Figure 1: Map depicting the sampling sites in the study region in Central Germany (Hesse, Thuringia and Bavaria). I01-I07 are the sampled indigenous sites, R01-R07 are the sampled restored sites (see also Table 1). Map was prepared with ArcGIS Desktop (ArcGIS Desktop 10.2.2., Esri)



Legend

- *Leucanthemum vulgare* (indigenous)
- + *Leucanthemum vulgare* (restored)
- German federal states
- Cities

Figure 2: Principal Coordinates Analyses (PCoA) summarizing the AFLP marker results of *Leucanthemum vulgare* agg. individuals. Each circle represents one individual. Individuals from restored sites (R) are depicted in red, and from indigenous sites (I) are depicted in blue. Both axes explain 2.82 % und 2.69 % of the data respectively.

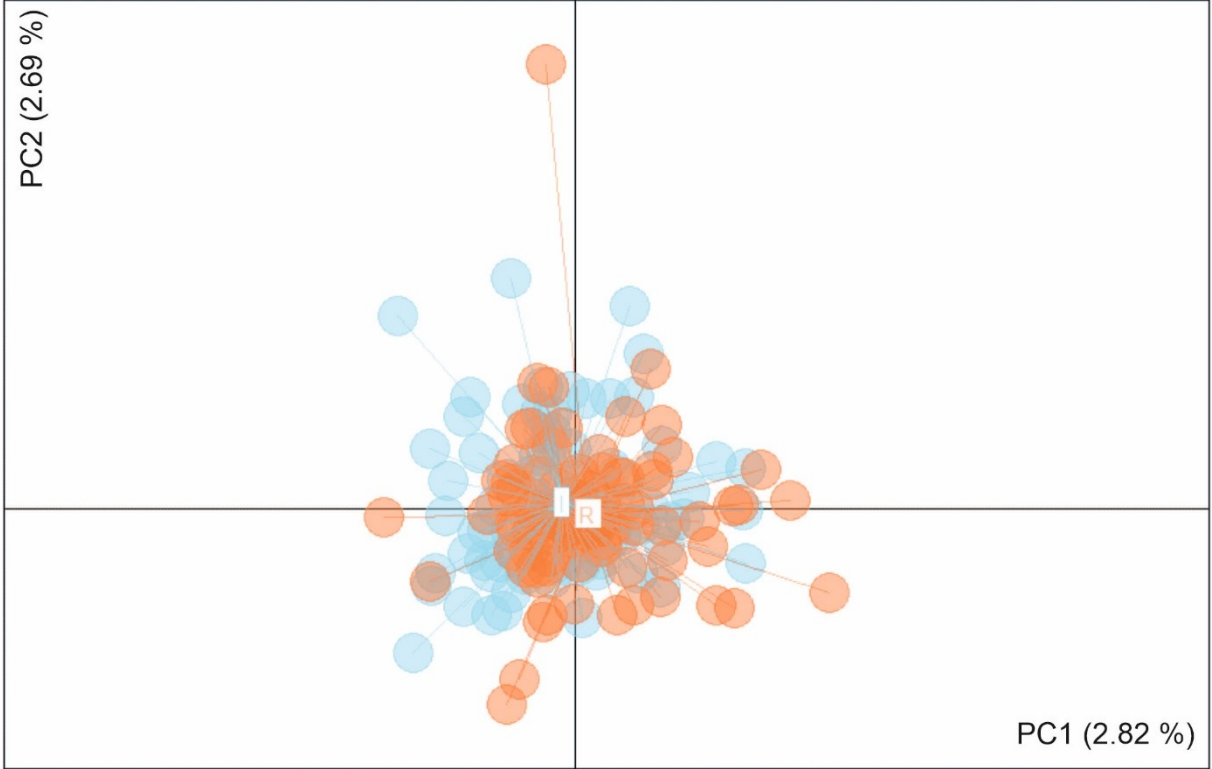
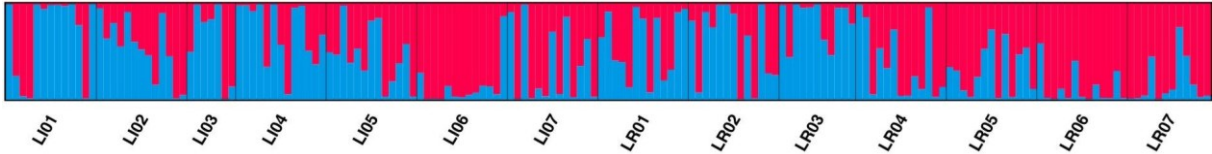


Figure 3: AFLP results evaluated in a STRUCTURE analysis for the surveyed populations of *Leucanthemum vulgare* agg.. $\Delta K = 2$ according to Evanno et al. 2005.



Kapitel 4: Genotypic and phenotypic distinctness of restored and indigenous populations of Pimpinella saxifraga L. eight or more years after restoration

Abstract

- The recovery of altered or damaged ecosystems demands large-scale reintroductions of herbaceous perennial seeds. In the past, ecological restoration in Germany was carried out with non-local seeds of naturally occurring herbaceous species. We here analysed whether the genetic pattern of the introduced non-local seeds (R = restored) of *Pimpinella saxifraga* from previous restoration projects are still detectable several years after application and whether the phenotype differs from the one of the regional gene pool (I = indigenous) of the species.
- We collected seeds and leaf material from individuals of R and I-sites, respectively. We estimated genome sizes, used AFLP markers and conducted a common garden experiment to test for genetic, morphological and phenotypic differences. A cutting experiment was conducted to investigate, whether the treatments had different effects on indigenous and restored populations, respectively.
- At all investigated sites we only found *P. saxifraga* individuals with comparatively similar genome sizes.
- The former use of non-local genotypes of *P. saxifraga* can be detected up to more than 8 years after the establishment of the populations. A Principle Coordinate Analysis depicted two large and quite distinct molecular clusters separating indigenous and restored individuals along the first axes. None of the vegetative, but two of the reproductive fitness parameters differed between individuals of the R- and I-sites respectively. In the common garden experiment, cutting always had a significant influence on all analysed vegetative and reproductive fitness parameters, regardless of the origin of the samples. Thus, the effects of mowing always mask origin-specific characteristics, which than disappear.
- This genotypic coexistence reduces the availability of niches for the local genotype and may eventually lead to genotypic competition or introgression. We therefore recommend not to use the

non-local genotypes of the species in the region. Instead, we recommend using the genetically diverse local genotypes of *P. saxifraga* for restoration purposes.

Ecological restoration, non-local seeds, population genetics, gene flow, common garden experiment

Birgit Gemeinholzer*¹, Jutta Reiker*¹, Christina M. Müller¹, Volker Wissemann¹

(*Shared co-first authorship)

¹ Institute of Botany, Justus-Liebig-University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 38, D-35392 Giessen, Germany

Introduction

Anthropogenic influences seriously impair the biological diversity of the earth (e.g. Hautier et al. 2015). To minimize human impact, ecological restoration aims at assisting the recovery of altered or damaged ecosystems and their biodiversity (Nevill et al. 2016). This requires large-scale reintroduction of plants, e.g. in Germany in 2015 > 21,000 t of perennial seeds, with constantly increasing demand at regional, national and global level (Mainz & Wieden 2019; Guerrant & Kaye 2007; Elzenga et al. 2019). In the past, the non-local seed sourcing of naturally occurring herbaceous species was the main strategy for ecological restoration in Germany. The prices for non-local seeds were significantly lower and large quantities of local seeds were unavailable (Burton & Burton 2002; Kettenring et al. 2014). It is only in recent decades that awareness has been raised of the potential consequences of using non-local seed mixtures on the fitness and genetic diversity of indigenous populations (Broadhurst et al. 2008; Sgrò et al. 2011; Breed et al. 2013, Aavik et al 2014; Aavik & Helm 2018; Mainz & Wieden 2019). Risks are associated with introgression and hybridization between non-local and indigenous provenances, which may lead to homogenization, coexistence or extinction of regional, potential locally adapted, and/or non-local gene pools (Jones 2013; Hughes et al. 2008). On the other hand, locally depleted gene pools could benefit from the increase in local diversity through

genetic mixing between indigenous and non-local genotypes, as a high level of genetic diversity could be beneficial for possible adaptations to future environmental changes (Rice & Emery 2003; Knop et al. 2006; Aviron et al. 2009; Verhoeven et al. 2010; Sgrò et al. 2011; Breed et al. 2013).

Aavik et al. (2012) investigated population genetic admixture between old and restored populations of the grassland plant *Lychnis flos-cuculi* L. (Caryophyllaceae) three to eight years after restoration and discovered only limited gene flow and little genetic admixture between sown and natural populations, not indicative for rather restricted populations' functional connectivity. In contrast, Reiker et al. (2015) were able to show that the use of non-local seed sources of *Daucus carota* L. (Apiaceae) after more than 10 years of cultivation with non-local seed sources did not result in genetic differences and differentiations between populations on restored and indigenous sites. Shi et al. (2018) investigated the costs and benefits of admixture in non-local and indigenous *Lythrum salicaria* L. genotypes through cross-breeding and reciprocal transplant experiments. They found limited evidence of local adaptation and concluded that in this case admixture can enhance plant performance, which can be particularly beneficial in stressful environments.

In a comparative approach, we here test whether the genetic makeup of the former non-local seed source use of *Pimpinella saxifraga* L. (Apiaceae) in restoration projects at sites in Central Germany several years after application (restoration between 1994 and 2004) differs from the species' regional gene pool. In a comparative approach, we compare genetic diversity and differentiation by using amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). The molecular method was chosen because of its high polymorphism rate and reproducibility, ease of genotyping and analysis, and low cost (Mattersdorfer et al. 2012; Westberg et al. 2013). We measured the genome sizes of two randomly selected individuals per site to estimate the ploidy level. Phenological and morphological differences were analyzed in a common garden experiment in which we cultivated plants from all sites. In addition, we simulated mowing to investigate, whether the treatments had different effects on indigenous and restored populations.

The work was carried out to clarify whether the non-local seed use of *P. saxifraga* in Central German populations on restored sites is still detectable several years after restoration and whether it differs from the regional gene pool. We wanted to know, (i) whether and possibly which population genetic differences between indigenous and restored populations are detectable, (ii) whether there are fitness differences between individuals from indigenous and restored sites, and (iii) whether the use of the tenfold cheaper non-local seeds of *P. saxifraga* can be recommended for ecological restoration.

Material and Methods

Study species

P. saxifraga is a wintergreen perennial herbaceous Apiaceae, which forms vegetative rosettes in the first year. From the second year onwards, the flowers develop in a compound umbel. The small hermaphroditic flowers have white petals, stamens are protandrous (Knuth 1898-1905).-Pollinators are beetles, flies, syrphid flies, wasps, and bees with medium length proboscis (Willemstein 1987). *P. saxifraga* is predominantly outcrossing but according to Knuth (1908), East (1940) and Berger et al. (1975) self-pollination is also possible-Flowering is from July to September. *P. saxifraga* mainly grows on sunny, moderately dry, nutrient-poor, calcareous soils in grasslands and on dwarf shrub heath (Hänsel et al. 1994) in lowlands and sub-montane regions across Europe, Central Asia and the Caucasus (Berger et al. 1975). The species is morphologically variable. Up to 10 subspecies have been defined in its native distribution range, however, none with high confidence levels; thus, the species is sometimes described as *P. saxifraga* agg. Chromosome numbers vary between $2n = 18, 20, 36$ or 40 (<http://ccdb.tau.ac.il/> 19.06.2018), however in Germany *P. saxifraga* is only reported as $2n = 18$ (Kumar et al. 2012). Morphological and taxonomical investigations in the common garden experiment confirmed only the presence of *P. saxifraga* s. str. in our analysis.

Study region and sampling

The investigation was conducted in Central Germany (Central and South Hesse, W-Thuringia, NW Bavaria) within an area of ~200 x 200 km². Populations were selected on one hand on sites which have not been altered during the last 60 years (Prasse et al. 2010, indigenous sites, I-sites) and on the other hand on sites which were formerly restored (restored sites, R-sites) with non-local seed sources. R-sites were created as part of compensatory measures that were restored between 1994 and 2009 (information from road site authorities, Table 1, Figure 1). Populations are not evenly distributed throughout the investigation area. The original seed mixtures for restoration contained 0.1 % *P. saxifraga* seeds (stable mixture since the late 1980s, according to the FLL Bonn; Research Society for Landscape Development and Landscaping, personal communications). The exact source location of seed provenances for restoration is unknown, however, at times of restoration seeds were commonly produced in Eastern or Southern Europe while indigenous seed sources in these large quantities were unavailable at that time. The exact origin of the seeds or seedlings of the former restoration projects are no longer traceable today.

I-sites were selected on the basis of their regional proximity to the restored sites, but with a minimum distance of 9 km between the indigenous and restored sites. Sites were chosen with information from the "Association of German wild plants and seeds producers e.V." and with permission from the local nature conservation authorities (Table 1, Figure 1). The I-sites are mostly maintained under the Habitats Directive of Natura 2000 or they are protected nature reserve areas (Table 1) and it is documented that they have not been modified or re-sown during the last 60 years (Prasse et al. 2010).

In autumn 2011 we sampled seven populations per I- and R-site respectively. Leaf material of 13 individuals per population were sampled for genome size measurements and molecular analyses. The samples were immediately dried and stored in silica gel until further processing (Table 2). The minimum distance between sampled individuals was two meters to best represent site-specific populations' genetic diversities. For the common garden experiment, we sampled seeds of at least 15 individuals per site.

Genome size estimates

Genome sizes were measured because cytotype differences may be indicative of the different subspecies of *P. saxifraga*. Pre-tests revealed silica dried leaf material to be suitable for 1C value estimates. Genome sizes of two randomly selected individuals per site were analysed. We used the DAPI Counterstaining Protocol (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's recommendation and analysed the samples on a flow cytometer (Cy Flow Partec GmbH, Germany). *Lactuca sativa* L. (Michaelson et al. 1991, <http://data.kew.org/cvalues>) served as reference (Table 2). According to Wang et al. (2015) the following formula was used to determine the nuclear DNA content for each sample: Standard 2C-value (pg) = (Sample peak mean/Standard peak mean) * nuclear DNA content of the reference Standard (pg).

Molecular analysis

In the laboratory, ~1cm² of the silica dried leaf material was homogenised with a mill (Retsch MM 301). Total genomic DNA was extracted (DNeasy Plant mini Kit, Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol. The obtained DNA quality, quantity and purity was checked on 1.5 % TAE-agarose gel and measured for each individual via NanoDrop1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). 10 µl genomic DNA (30 ng/µl) was double-digested in a final volume of 25 µl (0.25 µl *EcoRI* (10 U/µl; Thermo Fisher Scientific), 0.15 µl *MseI* (10 U/µl; Thermo Fisher Scientific), 2.5 µl 10x buffer (Thermo Fisher Scientific) and 12.1 µl purified H₂O at 37 °C for 3 h. Reaction was terminated by 65 °C for 10 min. Ligation was carried out with 0.5 µl T4-ligase (10 U/µl; Thermo Fisher Scientific), double stranded adapters 0.5 µl *EcoRI* (5 pmol/µl; Metabion), 0.5 µl *MseI* (50 pmol/µl; Metabion), 1.2 µl ATP (10 mM; Thermo Fisher Scientific), 0.5 µl 10x ligation buffer (Thermo Fisher Scientific) at 20 °C for 16 h. Two consecutive PCR amplifications were performed using primers with one (+1) and three (+3) selective nucleotides at their 3' ends, the *EcoRI* +3 forward primer of the second PCR being fluorescence labelled. For the first pre-selective PCR, 1.5 µl of restriction ligation product was used as template in a

total volume of 7 μl containing 0.2 μl primers (50 ng/ μl ; Metabion), 0.7 μl 10x buffer (Qiagen), 0.14 μl dNTPs (10 mM; Thermo Fisher Scientific), 0.04 μl Taq polymerase (1000 U/ μl ; Qiagen) and 4.2 μl ddH₂O. PCR conditions for the pre-selective amplification comprised an initial step of 94°C for 2min followed by 30 cycles at 94 °C for 20 sec, at 56 °C for 30 sec, at 72 °C for 2 min, and a final extension step at 72 °C for 30 min. Samples were sent to LGC (Cologne/Germany) for fragment visualization. An initial primer screening with six different primer combinations and two individuals per different I- and R-sites was conducted and for the final analyses, the following primer combinations were used: E35/M48, E35/M51, and E35/M62 (Table S1). These primers proved to be variable and informative, provided clear and reproducible bands and were sufficiently polymorphic to show variation within and among populations.

A data matrix was established using GENOGRAPHER 2.1.4 (Benham et al. 1999). Each AFLP fragment was scored using the “thumbnail” option, which allows for the comparison of signals per locus over all samples. If possible, peaks of low intensity were additionally scored by eye and included into the analysis. Standard lanes, carrying identical samples on each plate were added as quality check. For 10 samples, the AFLP analysis for each primer combination was repeated and the error rate was calculated as number of differences related to the total number of comparisons and subsequently averaged over the three combinations (Pompanon et al. 2005). Although we carefully analyzed the data twice from two independent researchers and the AFLP gel images were very good and thorough, the final overall error rate was relatively high (12 %). This is due to the low number of repetitions due to plate restrictions.

Genetic diversity estimates were analysed by using AFLPsurv 1.0 (Vekemans 2002) by applying the default options (Table 3). Genetic variation within and among populations was evaluated using Analysis of Molecular Variance (AMOVA) in ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010), with 10,000 permutations (Table 4). Patterns of genetic population structure were visualized with a Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the R package ADEGENET v1.4-2 (Jombart 2008). Pairwise F_{ST} was calculated with Gen ALEx 6.5 (Peakall & Smouse 2012, Table 5). To further explore the genetic affiliation

of individuals to genetic clusters we applied the Bayesian clustering approach implemented in STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard et al. 2000, Figure 3). Genetic clusters were detected by applying default settings, the admixture model, with 100,000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) replicates, with a burn-in period of 50,000 and twenty repeats per run for each chosen cluster number (i.e. $K = 1-14$), Ploidy = 2, and Recessive alleles = 1. To identify the most likely K modal distribution, delta K (Evanno et al. 2005) was determined by using STRUCTURE HARVESTER (Earl & von Holdt 2012). To verify the most probable cluster membership coefficient among the twenty runs of STRUCTURE and STRUCTURE HARVESTER we used CLUMPP v.1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007). Corresponding graphs were constructed with DISTRUCT (see Figure 1, Rosenberg 2004).

Morphological analyses

In spring 2012, 60 seeds were sown and cultivated in a common garden experiment at the Universities nursery in Giessen (Germany). The germinated seedlings from 13 of the 14 examined populations were planted in single pots with uniform nutrient-poor soil. Mice destroyed our experiment for PR06 and reduced the number of samples in PR05. The randomly selected plants of each population were arranged without grouping and cultivated with regular irrigation and weed control. One third per study site grew up without treatment and another third was cut to 15 cm on 31.07.2013 to simulate grazing or mowing as natural conditions of grassland habitats. All main shoots were cut down, no matter if they already were in flower or not. The last third was harvested on 20.06.2013 to count and measure the vegetative morphological variation. This allowed for testing two models of influence on morphological and phenological variation: (1) the effect of origin (I, R) and (2) the combination of treatment (mowed, un-mowed) and origin (I, R).

Investigated parameters of vegetative-morphological variation were (1) the number of leaves, (2) the size of the longest leaves by measuring length and width, (3) length and (4) diameter of the root, and the weight of the leaves as (5) fresh and (6) dry matter, and of the root (7 & 8), respectively. The data collections of reproductive morphological variation were measured two times per week in

2013 throughout the season. They were: (9) day of first flowering, (10) day of maximum number of flowering umbels, (11) day of maximum number of fruiting umbels (12) number of flowering umbels, (13) number of fruiting umbels, (14) number of umbels with ripe fruits only and (15) the weight of ripe umbels, (16) day of death (after seed set, the plants turn brown and die off). Additionally the following derivatives of the former reproductive parameters were calculated: (17) duration from first flowering to highest amount of fruiting umbels, (18) number of simultaneously flowering and fruiting umbels, (19) and the date of this, (20) duration from first flowering to the first ripe umbel and (21) duration from first flowering to the end of the growing season (all significant traits in Table 6, Fig 4).

Data analysis

STATISTICA (v. 10.0, Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) was used to calculate effects of the single factors “origin” (k = 2, indigenous and restored) and “treatment” (k = 2, mowed vs. un-mowed) based on raw data. The factor combinations were assessed with a multi-factorial analysis of variance (ANOVA). Subsequently, the significance of the differences between the treatments was assessed using a Tukey Test (Table 6).

For all other statistical analyses we used R 3.5.1 (R Core Team 2013) and the R packages “nlme” (Pinheiro et al. 2020) and “lme4” (Douglas et al. 2015) based on the raw data (Figure 4). Figures were generated with R “ggplot2” (Wickham 2016).

Results

Genome sizes

All 28 analysed *P saxifraga* individuals revealed on average comparable 1C values of 3.50 pg +/- 0.18 pg on indigenous sites and of 3.47 pg +/- 0.36 pg on restored sites (Table 2).

Genetic diversity and differentiation

The AFLP dataset with three different primer combinations and 182 analyzed individuals resulted in 162 unambiguously scorable loci, ranging from 50 to 450 base pairs. The mean genetic diversity of the indigenous *P. saxifraga* populations was $H_e = 0.356$ with genetic diversities ranging

from $H_e = 0.347$ (PI04) to $H_e = 0.363$ (PI01, Table 3). The mean genetic diversity of the restored *P. saxifraga* populations was $H_e = 0.373$ with genetic diversities ranging from $H_e = 0.342$ (PR01) to $H_e = 0.395$ (PR05, Table 3).

Principle Coordinate Analysis (PCoA) depicted two large and quite distinct clusters that separated indigenous and restored individuals along the first axes (Figure 2). Notably, only very few individuals reflect intermediate genotypic patterns. Overall, the first three principal coordinates accounted for 10.17 %, 3.84 % and 3.08 % of genetic variation, respectively.

The STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) analysis resulted in a distinct modal maximum of ΔK at $K = 2$ (Evanno et al. 2005) and a saturation value of mean log-likelihood at $K = 2$. The STRUCTURE analysis clearly confirmed the PCoA results (Figure 2) and depicted two large and distinct clusters that separated I- and R-site individuals (Figure 1). Only faint signatures of introgression from I to R could be detected (e.g. in PR01, PR04, Figure 3), while R to I introgressions seem to be more common (e.g. in PI02, PI03, PI06, PI07).

Analysis of molecular variance (AMOVA) resulted in a global F_{ST} of 0.182 (Table 4), indicative for great genetic differentiation between all sites. Separately, the variation within the respective indigenous and restored sites is negligible ($F_{ST(I)}$ of 0.040 and $F_{ST(R)}$ of 0.038, both $P < 0.001$, respectively). The highest percentage of genetic variation was consistently highest within populations. The hierarchical AMOVA (Table 5) showed that the range of pairwise F_{ST} values between all sites are very high and vary from 0.003 - 0.229, whereas it is low within I- and R-sites (0.011 - 0.086 (I), and 0.003 - 0.095 (R)), respectively.

Morphology

In total 387 individuals were examined with the ANOVA. 196 individuals were un-mowed to test the effect of origin and 191 were cut to simulate mowing, which is the typical management treatment on the restored sites (Table 1). 111 individuals from I- and 85 individuals from R-sites were un-mowed, 109 individuals from I- and 82 individuals from R-sites were mowed individuals (Table 1). In total 226 plants were harvested (100 from R-sites and 116 from I-sites) to analyse the vegetative

and reproductive fitness parameters. For the un-mowed individuals, the analyses of vegetative characters (traits 1-8) did not reveal any significant differences between populations of the R- and I-sites, respectively. However, of the 13 reproductive fitness parameters analysed, we found two significant site-specific differences. Comparing the duration from the first flowering to the maximum number of flowering umbels (trait 9 and 10, Figure 4a) the individuals of the R-sites reached the maximum number of umbels earlier in summer, on average after 22.9 days, while the individuals of the I-sites reached this maximum after an average of 26.5 days. At the same time, the plants of the R-sites had fewer flowering and fruit bearing umbels (characteristics 12 and 13, Figure 4b), on average 12.5 umbels per individual, than those of the I-sites with an average of 16.6 umbels per individual. ANOVA showed that cutting always had a significant influence on all analysed vegetative and reproductive fitness parameters, regardless of the origin of the samples. Thus, effects of mowing always mask origin-specific characteristics, which then disappear (Table 6).

Discussion

Until more than 8 years after the compensation measures, we can still detect population genetic patterns indicating the previous use of non-local genotypes of *P. saxifraga*. At all investigated sites in Central Germany we found only *P. saxifraga* individuals with comparatively similar genome sizes (Table 3), which on average are slightly lower than earlier cited (1C value of 3.82 pg, Temsch et al. 2010). Deviation from previous results, however, are within potential reading inaccuracies of the available CyFlow device. Our analysis is limited to the estimation of the genome size of only two individuals per population, so it might be possible that additional cytotypes occur in the respective populations.

Morphological identification of the plants in the common garden experiment supported the assignment of all individuals to *P. saxifraga* subsp. *saxifraga* L. None of the vegetative fitness parameters differed between individuals of the R- and I-sites. Our results support earlier findings by Reiker et al. (2020 in press) in *Daucus carota* and Bucharova et al. (2017) in a transplant experiment

with seven different herbaceous plant species, who also discovered mostly insignificant vegetative fitness differences in populations from R- and I-sites.

In *P. saxifraga*, only two of the analyzed reproductive fitness parameter differed significantly between individuals of the different origins. One of the site-specific significant traits relates to phenology (number of days from first flowering to the maximum of flowering, Figure 4). The plants from the R-sites reached their maximum flowering umbels on average after 22.9 days, which was significantly earlier than the plants from the I-sites (on average after 26.5 days). The earlier maximum flowering of plants that formerly came from non-local seed sources could still reflect in our common-garden experiment an adaptation of plants to former different environments, climate, latitudes and seasonality (Durka et al. 2016). Flowering time is known to differ strongly along geographical gradients (e.g. Montague et al. 2008; Kawakami et al. 2011) and may be indicative for the R-sites individuals' non-local origin. Nevertheless, the exact origin of the seeds is no longer traceable today.

Plants from I-sites had a 1.3 times higher number of either flowering or fruit-bearing umbels at the maximum of flowering or fruiting with an average of 16.6 umbels, while plants from R-sites had an average of only 12.5 umbels (Figure 4). Our results are in line with the results of the transplant experiment by Bucharova et al. (2017), who discovered that *Centaurea cyanus* L. and *Lychnis flos-cuculi* L. plants of indigenous origins generally had an average reproductive performance 1.3 times and 1.4 times higher than the non-native plants, respectively. The values are not significant if the number of flowering and fruit-bearing umbels at the time of maximum flowering or fruit-bearing umbels respectively are analyzed independently. Overall, we found no difference in the weight of mature umbels at the end of the growing season; both provenances had surprisingly similar numbers of mature umbels, indicating an overall similar reproductive success.

Our mowing experiment was conducted to simulate management on the restored sites, which are all compensatory sites that are being mowed once a year. However, it was not possible to simulate the management strategies on the indigenous sites with different intervals of sheep grazing and intensive as well as extensive mowing. The mowing experiment was conducted because management

practices can have a major impact on grassland species, e.g. Reisch and Poschlod (2009, 2011) discovered a shift towards an earlier flowering of *Scabiosa columbaria* L. on mown sites compared to grazed sites. However, this could not be confirmed by our common garden experiment for *P. saxifraga*.

Despite the use of non-local seed sources for restoration purposes and up to 10 years after the first initial seed sowing, it was still possible to detect specific genetic patterns for the *P. saxifraga* individuals on R- and I-sites without significant mixing (Figure 2). Both genetic patterns are comparatively diverse ($\emptyset H_e = 0,365$) with higher genetic diversities than typical for perennials ($H_e = 0.16 \pm 0.10$), common plant species ($H_e = 0.20 - 0.10$), or Dicotyledoneae ($H_e = 0.16 \pm 0.08$, Reisch & Bernhardt-Römermann 2014). The populations of non-local origin (R-sites) featured on average higher population genetic diversities ($\emptyset H_{eR} = 0.373$) than the indigenous ones ($\emptyset H_{eI} = 0.356$, Table 3), and thus are not genetically depleted. This may be due to the effect that for seed production often seeds from different populations are mixed to increase genetic variation (Bucharova et al. 2019).

Sympatric cryptic lineages and genotypic coexistence in the region is an indicator of strong gene flow barriers, as result of either reproductive isolation and/or limited dispersal capacity of the species. *P. saxifraga* is self-compatible (East 1940), which according to theory fosters low outcrossing rates (Nybom & Bartish 2000; Duminil et al. 2009). The percentage variation among groups (I, R) was decisive for the great differentiation ($F_{ST} = 0.182 P < 0.001$) of *P. saxifraga* in the region, while both genetic signatures separately feature patterns of negligible population genetic differentiation ($F_{ST(I)} = 0.040 P < 0.001$, $F_{ST(R)} = 0.038 P < 0.001$). The great to very great pairwise F_{ST} values between *P. saxifraga* populations of different origins indicate that the effects of random genetic drift are not outweighed by gene flow and result in unpredictable and strong genetic isolation among provenances.

The STRUCTURE analysis (Figure 3) revealed very few indications of potential recombination between genotypes from I- and R-sites, with slightly lower crossing barriers in the indigenous populations, where very few individuals (PI02, PI03, PI04, PI06, PI07) reflect some genetic pattern typical for the R-sites but not vice versa. Only two individuals in PI02 feature genotypes, which are potentially indicative for introgression via seed dispersal or potentially originated from the initial seed bank prior to restoration. The smooth seed surfaces in *P. saxifraga* lack specialised dispersal structures,

indicative for a primarily barochorous dispersal in the near vicinity of the mother plant (Knuth 1908), while Tóth (2014) claimed that *P. saxifraga* only sporadically produce viable seed banks. Thus, the origin of the genetic R-site pattern in the individuals of the I-site remains unknown. Pollinators potentially responsible for recombination events in the populations PI03, PI04, PI06, PI07 are beetles, flies, syrphid flies, wasps, and bees with medium lengths proboscis (Willemstein 1987; Rader et al. 2011), all with a foraging distance rarely wider than 1 km (Kwak et al. 1998; Peterson et al. 2008). We did not sample all populations in the regions, thus, potential stepping stone populations might have provided bridging functions between genotypes of similar provenances. In a previous study in *Daucus carota* L. (Reiker et al. 2015) we analyzed the population genetic diversity of the same R- and I-sites and detected a negligible population differentiation in our study region. However, the contradictory patterns between both species of the same sites can be explained by the different breeding systems of the respective species, as *D. carota* is an obligate outcrossing species.

General recommendations

The fact that the non-local genotypes of *P. saxifraga* flourish on the restored sites up to more than 10 years after population establishment is indicative for the genotypes persistence capacity even being of non-local origin. However, the genetic distinctiveness reduces the availability of niches for the local genotype and may eventually lead to genotypic competition or introgression. A subsequent loss of genetic incompatibilities between both genotypes may affect the gene flow-drift equilibrium over time, which can result in adverse intrinsic genetic diversity resulting in phenomena like heterosis, as shown for F1 populations of *Mimulus guttatus* DC (van Kleunen et al. 2015), *Silene vulgaris* (Moench) Garcke (Keller & Taylor 2010), and *Alliaria petiolata* (M.Bieb.) Cavara & Grande (Mullarkey et al. 2013). The onset of an introgression of non-local genotypic diversity into the local gene pool is already evident. Potential genetic benefits associated with population admixture are increased genetic variation and the formation of novel trait combinations due to segregation and recombination, which could result in increased individual fitness and population growth rates (e.g. Hufford & Mazer 2003;

Verhoeven et al. 2004; Bucharova et al. 2019). However, considering restoration objectives and goals, as well as the efficient use of resources concerning costs and seed availability (Ehrenfeld 2000; Kaye et al. 2001; Wilkinson 2001; Doede 2005; Miller et al. 2011), for *P. saxifraga* we recommend refraining from introducing the non-local genotypes of the species in the region in order to avoid genotypic competition. Instead, we recommend using the genetically diverse local individuals for restoration purposes.

Acknowledgements

We are grateful for the financial support from the Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU), and the Heidehofstiftung. Sampling was conducted with support from the Association of German Wild Seeds and Wild Plants Producer Association (Markus Wieden), as well as the road authorities Frankfurt (Gerd Ledergerber), Schotten (Alexander Greb), and Herleshausen (Helmut Byczysko). For permits to collect plants in nature conservation areas we thank Thomas Keller (NSG “Schwarze Berge”), Norbert Mitter (NSG “Schwarze Berge”), Jürgen Busse (NSG “Oberes Verstal”, Kirchvers), and Manfred Grossman (Hainich National Park). We would like to thank A. Theresa Rühl and André Fichtner for their statistical support. For the support in the molecular laboratory and morphological work, we thank the biotechnical assistants (Sabine Mutz and Helene Krufczik), the students (Tatjana Lapin and Hannah Nebelung) and the members of the Systematic Botany Group in Giessen, especially Annalena Mehl.

References

- Aavik, T., Edwards P.J., Holderegger R., Graf R., Billeter R. (2012) Genetic consequences of using seed mixtures in restoration: A case study of a wetland plant *Lychnis flos-cuculi*. *Biological Conservation*, **145**, 195–204.
- Aavik, .T, Bosshard, .D, Edwards, P.J., Holderegger, R. (2014): Genetic and fitness consequences of using wildflower seed mixtures in ecological restoration. *Agrarforschung Schweiz* **5(1)**, 20-27.

- Aavik, T., Helm, A. (2018) Restoration of plant species and genetic diversity depends on landscape-scale dispersal. *Restoration Ecology* **26(S2)**, 92–102.
- Aviron, S., Nitsch, H., Jeanneret, P., Buholzer, S., Luka, H., Pfiffner, L., Pozzi, S., Schüpbach, B., Walter, T., Herzog, F. (2009) Ecological cross compliance promotes farmland biodiversity in Switzerland. *Frontiers in Ecology and the Environment* **7**, 247–252.
- Benham, J., Jeung, J.U., Jasieniuk, M., Kanazin, V., Blake, T. (1999) Genographer: a graphical tool for automated fluorescent AFLP and microsatellite analysis. *Journal of Agricultural Genomics* **4**, 399.
- Berger, H., Conert, H.J., Hegi, G. (eds) (1975) *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, 2. Aufl. Parey, Berlin.
- Breed, M.F., Stead, M.G., Ottewell, K.M., Gardner, M.G., Lowe, A.J. (2013) Which provenance and where: Seed sourcing strategies for revegetation in a changing environment. *Conservation Genetics* **14**, 1–10. doi: 10.1007/s10592-012-0425-z.
- Broadhurst, L.M., Lowe, A., Coates, D.J., Cunningham, S.A., McDonald, M., Vesk, P.A., Yates, C. (2008) Seed supply for broadscale restoration: maximizing evolutionary potential. *Evolutionary Applications*, **1**, 587–597.
- Bucharova, A., Bossdorf, O., Hölzel, N., Kollmann, J., Prasse, R., Durka, W. (2019) Mix and match: regional admixture provenancing strikes a balance among different seed-sourcing strategies for ecological restoration. *Conservation Genetics* **20**, 7–17. doi: 10.1007/s10592-018-1067-6.
- Bucharova, A., Michalski, S., Hermann, J-M., Heveling, K., Durka, W., Hölzel, N., Kollmann, J., Bossdorf, O. (2017) Genetic differentiation and regional adaptation among seed origins used for grassland restoration: lessons from a multispecies transplant experiment. *Journal of Applied Ecology* **54**, 127–136. doi: 10.1111/1365-2664.12645.
- Burton, P.J., Burton, C.M. (2002) Promoting genetic diversity in the production of large quantities of native plant seed. *Ecological Restoration* **20**, 117–123. doi: 10.3368/er.20.2.117.
- Doede, D.L. (2005) Genetic variation in Broadleaf Lupine (*Lupinus latifolius*) on the Mt Hood National Forest and implications for seed collection and deployment. *Native Plants Journal* **6**, 36–48. doi: 10.1353/npj.2005.0018.

- Douglas Bates, Martin Maechler, Ben Bolker, Steve Walker (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, **67(1)**, 1-48. Doi: 10.18637/jss.v067.i01.
- Duminil, J., Hardy, O.J., Petit, R.J. (2009) Plant traits correlated with generation time directly affect inbreeding depression and mating system and indirectly genetic structure. *BMC Evolutionary Biology* **9**, 177. doi: 10.1186/1471-2148-9-177.
- Durka, W., Michalski, S.G., Berendzen, K.W., Bossdorf, O., Bucharova, A., Hermann, J-M., Hölzel, N., Kollmann, J. (2016) Genetic differentiation within multiple common grassland plants supports seed transfer zones for ecological restoration. *Journal of Applied Ecology* **54**, 116-126. doi: 10.1111/1365-2664.12636.
- Earl, D.A., von Holdt, B.M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- East, E.M. (1940) The distribution of self-sterility in the flowering plants. *Proceedings of the American Philosophical Society* **82**:449–518.
- Ehrenfeld, J.G. (2000) Defining the Limits of Restoration: The Need for Realistic Goals. *Restoration Ecology* **8**, 2–9. doi: 10.1046/j.1526-100x.2000.80002.x.
- Elzenga, J.T.M., Bekker, R.M., Pritchard, H.W. (2019) Maximising the use of native seeds in restoration projects. *Plant Biology* **21**, 377–379. doi: 10.1111/plb.12984.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611–2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564–567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- Guerrant, E.O., Kaye, T.N. (2007) Reintroduction of rare and endangered plants: Common factors, questions and approaches. *Australian Journal of Botany* **55(3)**, 362-370.

- Hänsel, R., Greiner, S., Abe, I. G. (eds) (1994) Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis: Drogen: P - Z. Springer, Berlin.
- Hautier, Y., Tilman, D., Forest, I., Seabloom, E.W., Borer, E., Reich, P.B. (2015): Anthropogenic environmental changes affect ecosystem stability via biodiversity. *Science* **348(6232)**, 336-340.
- Hughes, A.R., Inouye, B.D., Johnson, M.T.J., Underwood, N., Vellend, M. (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters* **11**, 609–623. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x.
- Hufford, K.M., Mazer, S.J. (2003) Plant ecotypes: Genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology and Evolution* **18**, 147–155. doi: 10.1016/S0169-5347(03)00002-8.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N.A. (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics (Oxford, England)* **23**, 1801–1806. doi: 10.1093/bioinformatics/btm233.
- Jombart, T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics (Oxford, England)* **24**:1403–1405. doi: 10.1093/bioinformatics/btn129.
- Jones, T.A. (2013) When local isn't best. *Evolutionary Applications* **6**, 1109–1118. doi: 10.1111/eva.12090.
- Kawakami, T., Morgan, T.J., Nippert, J.B., Ocheltree, T.W., Keith, R., Dhakal, P., Ungerer, M.C. (2011) Natural selection drives clinal life history patterns in the perennial sunflower species, *Helianthus maximiliani*. *Molecular Ecology* **20**, 2318–2328. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05105.x.
- Kaye, T.N., Pendergrass, K.L., Finley, K., Kauffman, J.B. (2001) The effect of fire on the population viability of an endangered prairie plant. *Ecological Applications* **11**, 1366–1380. doi: 10.1890/1051-0761(2001)011[1366:TEOFOT]2.0.CO;2.
- Keller, S.R., Taylor, D.R. (2010) Genomic admixture increases fitness during a biological invasion. *Journal of Evolutionary Biology* **23**, 1720–1731. doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.02037.x.

- Kettenring, K.M., Mercer, K.L., Reinhardt, A.C., Hines, J., Wilsey, B. (2014) Application of genetic diversity-ecosystem function research to ecological restoration. *Journal of Applied Ecology* **51**, 339–348. doi: 10.1111/1365-2664.12202.
- Knop, E.V.A., Kleijn, D., Herzog, F., Schmid, B. (2006) Effectiveness of the Swiss agri-environment scheme in promoting biodiversity. *Journal of Applied Ecology* **43**, 120–127.
- Knuth, P. (1898-1905) *Handbuch der Blütenbiologie*. W. Engelmann, Leipzig.
- Knuth, P. (1908) *Handbook of flower pollination*, Volume II.
- Kumar, S., Kumari, S., Gupta, R.C. (2012) Cytological investigations of some polypetalous plants from District Sirmour of Himachal Pradesh in the Western Himalayas, India. *Chromosome Botany* **7**, 87–96. doi: 10.3199/iscb.7.87.
- Kwak, M.M., Velterop, O., van Andel, J. (1998) Pollen and gene flow in fragmented habitats. *Applied Vegetation Science* **1**, 37–54. doi: 10.2307/1479084.
- Lynch, M., Milligan, B.G. (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3(2)**, 91–99.
- Mainz, A.K., Wieden, M. (2019) Ten years of native seed certification in Germany – a summary *Plant Biology* **21(3)**, 383–388. doi.org/10.1111/plb.12866.
- Mattersdorfer, K., Koblmüller, S., Sefc, K.M. (2012) AFLP genome scans suggest divergent selection on colour patterning in allopatric colour morphs of a cichlid fish. *Mol. Ecol.* **21**, 3531–3544. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05634.x.
- Michaelson, M.J., Price, H.J., Ellison, J.R., Johnston, J.S. (1991) Comparison of Plant DNA Contents Determined by Feulgen Micro-spectrophotometry and laser flow cytometry. *American Journal of Botany* **78**, 183–188. doi: 10.2307/2445241.
- Miller, S.A., Bartow, A., Gisler, M., Ward, K., Young, A.S., Kaye, T.N. (2011) Can an Ecoregion Serve as a Seed Transfer Zone?: Evidence from a Common Garden Study with Five Native Species. *Restoration Ecology* **19**, 268–276. doi: 10.1111/j.1526-100X.2010.00702.x.

- Montague, J.L., Barrett, S.C.H., Eckert, C.G. (2008) Re-establishment of clinal variation in flowering time among introduced populations of purple loosestrife (*Lythrum salicaria*, Lythraceae). *Journal of Evolutionary Biology* **21**, 234–245. doi: 10.1111/j.1420-9101.2007.01456.x.
- Mullarkey, A.A., Byers, D.L., Anderson, R.C. (2013) Inbreeding depression and partitioning of genetic load in the invasive biennial *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **100**, 509–518. doi: 10.3732/ajb.1200403.
- Nevill, P.G., Tomlinson, S., Elliott, C.P., Espeland, E.K., Dixon, K.W., Merritt, D.J. (2016) Seed production areas for the global restoration challenge. *Ecology and Evolution* **6**, 7490–7497. doi: 10.1002/ece3.2455.
- Nybom, H., Bartish, I.V. (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **3**, 93–114. doi: 10.1078/1433-8319-00006.
- Peakall, R., Smouse, P.E. (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics (Oxford, England)* **28**, 2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Peterson, A., Bartish, I.V., Peterson, J. (2008) Effects of population size on genetic diversity, fitness and pollinator community composition in fragmented populations of *Anthericum liliago* L. *Plant Ecology* **198**, 101–110. doi: 10.1007/s11258-007-9388-4.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D. (R-Core Team), (2020) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-145- <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., Taberlet, P. (2005) Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 847-846. doi: 10.1038/nrg1707.
- Prasse, R., Kunzmann, D., Schröder, R. (2010) Entwicklung und praktische Umsetzung naturschutzfachlicher Mindestanforderungen an einen Herkunftsnachweis für gebietseigenes Wildpflanzensaatgut krautiger Pflanzen. www.dbu.de › OPAC › DBU-Abschlussbericht-AZ-23931.

- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959.
- Rader, R., Edwards, W., Westcott, D.A., Cunningham, S.A., Howlett, B.G. (2011) Pollen transport differs among bees and flies in a human-modified landscape. *Diversity and Distributions* **17**, 519–529. doi: 10.1111/j.1472-4642.2011.00757.x.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. doi: DOI<https://www.R-project.org/>.
- Reiker, J., Schulz, B., Wissemann, V., Gemeinholzer, B. (2015) Does origin always matter? Evaluating the influence of nonlocal seed provenances for ecological restoration purposes in a widespread and outcrossing plant species. *Ecol. Evol.* **5**, 5642–5651. doi: 10.1002/ece3.1817.
- Reiker, J., Rühl, A.T., Wissemann, V., Gemeinholzer, B. (2020) Intraspecific phenotypic variability of the herbaceous species *Daucus carota* L. (Apiaceae) used for restoration purposes. *Acta Botanica-Hungarica*.
- Reisch, C., Poschlod, P. (2009) Land use affects flowering time: seasonal and genetic differentiation in the grassland plant *Scabiosa columbaria*. *Evolutionary Ecology* **23**, 753–764.
- Reisch, C., Poschlod, P. (2011) Morphology and phenology of *Scabiosa columbaria* from mown and grazed habitats – Results of a simulation experiment. *Flora* **206**, 887–891.
- Reisch, C., Bernhardt-Römermann, M. (2014) The impact of study design and life history traits on genetic variation of plants determined with AFLPs. *Plant Ecology* **215**, 1493–1511. doi: 10.1007/s11258-014-0409-9.
- Rice, K.J., Emery, N.C. (2003) Managing microevolution: restoration in the face of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment* **1**, 469–478.
- Rosenberg, N.A. (2004) distruct: A program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* **4**, 137–138. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x.

- Sgro, C.M., Lowe, A.J., Hoffmann, A.A. (2011) Building evolutionary resilience for conserving biodiversity under climate change. *Evolutionary Applications* 4, 326–337. doi: 10.1111/j.1752-4571.2010.00157.x.
- Shi, J., Joshi, J., Tielbörger, K., Verhoeven, K.J.F., Macel, M. (2018) Costs and benefits of admixture between foreign genotypes and local populations in the field. *Ecol. Evol.* 8: 3675– 3684. doi:10.1002/ece3.3946.
- Temsch EM, Temsch W, Ehrendorfer-Schratt L, Greilhuber J (2010) Heavy Metal Pollution, Selection, and Genome Size: The species of the Žerjav study revisited with flow cytometry. *Journal of Botany* 1–11. doi: 10.1155/2010/596542.
- Tóth, K. (2014) Soil seed bank in loess grasslands and their role in grassland recovery. *Applied Ecology and Environmental Research* 12, 537–547. doi: 10.15666/aeer/1202_537547.
- van Kleunen, M., Rockle, M., Stift, M. (2015) Admixture between native and invasive populations may increase invasiveness of *Mimulus guttatus*. *Proceedings Biol. Sci.* 282. doi: 10.1098/rspb.2015.1487.
- Vekemans, X. (2002) AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Verhoeven, K.J.F., Macel, M., Wolfe, L.M., Biere, A. (2010) Population admixture, biological invasions and the balance between local adaptation and inbreeding depression. *Proceedings Biol. Sci.* 278, 2–8. doi: 10.1098/rspb.2010.1272.
- Verhoeven, K.J.F., Vanhala, T.K., Biere, A., Nevo, E., van Damme, J.M.M. (2004) The genetic basis of adaptive population differentiation: A quantitative trait locus analysis of fitness traits in two wild barley populations from contrasting habitats. *Evolution* 58, 270–283. doi: 10.1111/j.0014-3820.2004.tb01644.x.
- Wang, J., Liu, J., & Kang, M. (2015) Quantitative testing of the methodology for genome size estimation in plants using flow cytometry: a case study of the *Primulina* genus. *Frontiers in Plant Science*, 6, 354. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00354>.

- Westberg, E., Ohali, S., Shevelevich, A., Fine, P., and Barazni, O. (2013) Environmental effects on molecular and phenotypic variation in populations of *Eruca sativa* across a steep climatic gradient. *Ecol. Evol.* **3**, 2471–2484.
- Wickham, H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Wilkinson, D.M. (2001) Is local provenance important in habitat creation? *Journal of Applied Ecology* **38**, 1371–1373. doi: 10.1046/j.0021-8901.2001.00669.x.
- Willemstein, S.C. (1987) *An evolutionary basis for pollination ecology*. Leiden University Press
- Zhivotovsky, L.A. (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* **8**, 907–913. doi: 10.1046/j.1365-294x.1999.00620.x.

Table 1: Site-specific information of the investigated *Pimpinella saxifrage* populations. Abbreviations: Location in accordance to the nearest village or town; normal = number of un-mowed individuals for the elevation of reproductive Fitness, cut = number of mowed individuals; Management = Type of maintenance.

Popu- lation Code	Location	Latitude (N)	Longitude (E)	Protected area no. (status) or date of restoration	Management	molecular analysis	genome size measurement	morphological and phenological analysis	
						No. individuals	No. individuals	No. individuals un-mowed	No. individuals mowed
PI01	Biebertal	50.641687	8.556461	5317305 (FFH)	extensive mowing	13	2	16	15
PI02	Kirchvers	50.690680	8.579207	5317301 (NSG)	extensive mowing	13	2	16	16
PI03	Niederkleen	50.480773	8.616436	5517301 (FFH)	sheep grazing	13	2	16	16
PI04	Eichsfeld	51.220721	10.358348	4728301 (FFH)	sheep grazing	13	2	16	15
PI05	Berka v. d. Hainich	51.039571	10.415881	4828301 (NP)	sheep grazing	13	2	16	16
PI06	Schwarzer Berg	50.292924	9.920461	5526371 (FFH)	extensive mowing	13	2	15	15
PI07	Lauterbach	50.696284	9.359665	5322305 (FFH)	sheep grazing	13	2	16	16
PR01	Ober Erlenbach 1a	50.219039	8.679331	2004	mowing once per year	13	2	15	15
PR02	Ober Erlenbach 1b	50.218477	8.681457	2004	mowing once per year	13	2	17	16
PR03	Ober Erlenbach 2a	50.226271	8.701537	2004	mowing once per year	13	2	16	16
PR04	Ober Erlenbach 2b	50.226831	8.698567	2004	mowing once per year	13	2	17	16
PR05	Herleshausen 1	50.995496	10.153041	2004	mowing once per year	13	2	7	7
PR06	Herleshausen 2	51.002248	10.130403	2003	mowing once per year	13	2	No data	No data
PR07	Fernwald	50.561315	8.757745	2003	mowing once per year	13	2	13	12
					Total I	91	14	111	109
					Total R	91	14	85	82
					Total I+R	182	28	196	191

Table 2: Genome sizes estimates of *Pimpinella saxifraga* (n = 2) from indigenous and restored sites

Individuals from I-sites				Individuals from R-sites			
	(genome size in pg)				(genome size in pg)		
Population code	Individual 1	Individual 2	mean value	Population code	Individual 1	Individual 2	mean value
PI01	3.38	3.45	3.42	PR01	3.01	3.2	3.11
PI02	3.20	3.39	3.30	PR02	3.10	3.82	3.46
PI03	3.50	3.62	3.56	PR03	3.75	3.90	3.83
PI04	3.31	3.82	3.57	PR04	3.60	3.80	3.70
PI05	3.55	3.60	3.58	PR05	3.30	3.56	3.43
PI06	3.54	3.64	3.59	PR06	3.20	3.60	3.40
PI07	3.44	3.85	3.65	PR07	3.30	3.48	3.39
Mean I			3.52	Mean R			3.47

Table 3: Population specific genetic diversities of *Pimpinella saxifraga* from indigenous and restored sites with calculated percentages of polymorphic loci (PLP) and genetic diversities (H_e) after Lynch & Milligan (1994), calculated with a Bayesian method with non-uniform prior distribution of allele frequencies (Zhivotovsky 1999; Vekemans 2002). Paired T-tests of the indigenous and restored sites of both species were not significant.

<i>Pimpinella saxifraga</i> from indigenous sites				<i>Pimpinella saxifraga</i> from restored sites			
Population code	N	PLP	H_e	Population code	N	PLP	H_e
PI01	13	96.9	0.363	PR01	13	89.5	0.342
PI02	13	88.9	0.358	PR02	13	93.2	0.364
PI03	13	91.4	0.352	PR03	13	93.8	0.377
PI04	13	90.7	0.347	PR04	13	91.4	0.379
PI05	13	91.4	0.361	PR05	13	96.3	0.395
PI06	13	92.6	0.359	PR06	13	95.1	0.372
PI07	13	91.4	0.355	PR07	13	95.1	0.379
Ø H_eI	13	91.9	0.356	Ø H_eR	13	93.5	0.373

Table 4: Analysis of molecular variance (AMOVA) for populations of restored and indigenous *Pimpinella saxifraga*. Statistics include degrees of freedom (Df), AMOVA sums of squares (SS), variance components (VC), percentage of variation, differentiation values (F_{CT} , F_{SC} , F_{ST}) and the significance level ($P < 0.001$).

	Source of variation	Df	SS	VC	Percentage variation	F-Statistics ($P < 0.001$)
All sites	among groups (I,R)	1	459.735	4.945	14.253	F_{CT} 0.143
	among populations	12	536.654	1.374	3.961	F_{SC} 0.046
	within populations	168	4356.770	28.375	81.786	F_{ST} 0.182
	total	181	5353.159	34.695	100	
Indigenous sites only	among populations	6	335.747	1.511	3.996	
	within populations	84	3050.077	36.310	96.004	$F_{ST(I)}$ 0.040
	total	90	3385.824	37.822	100	
Restored sites only	among populations	6	306.495	1.336	3.811	
	within populations	84	2832.077	33.715	96.189	$F_{ST(R)}$ 0.038
	total	90	3138.571	35.051	100	

Table 5: Pairwise F_{ST} values for the different provenances of *Pimpinella saxifraga*.

Species	Source of variation	Range of pairwise F_{ST} values
<i>Pimpinella saxifraga</i>	Indigenous (I)	0.011 - 0.086
	Restored (R)	0.003 - 0.095
	All (I+R)	0.003 - 0.219

Table 6: The effects of treatment (T: mowed, un-mowed) and origin (O: from indigenous (I) or restored (R) sites) or the combination of treatment and origin (O x T)

<i>Pimpinella saxifraga</i>	Duration from flowering to maximum umbels				Number of flowering and fruiting umbels				Number of fruiting umbels with ripe fruits			
	df	MQ	F	<i>P</i>	Df	MQ	F	<i>P</i>	df	MQ	F	<i>P</i>
all	1	81039.4	790.8	<0.001	1	18640.4	410.2	<0.001	1	11799.6	376.2	<0.001
Treatment (T)	1	642.0	6.3	0.013	1	3039.2	66.9	<0.001	1	2664.2	84.9	<0.001
Origin (O)	1	449.6	4.4	0.037	1	421.2	9.3	0.003	1	157.0	5.0	0.026
T x O	1	15.3	0.1	0.700	1.000	68.5	1.5	0.221	1	33.8	1.1	0.300
Error	299	102.5			315	45.4			305	31.4		

Abbreviation: df = degrees of freedom, F = variance ratio, *P*= error probability, significant *P*-values < 0.05 are written in bold.

Figures

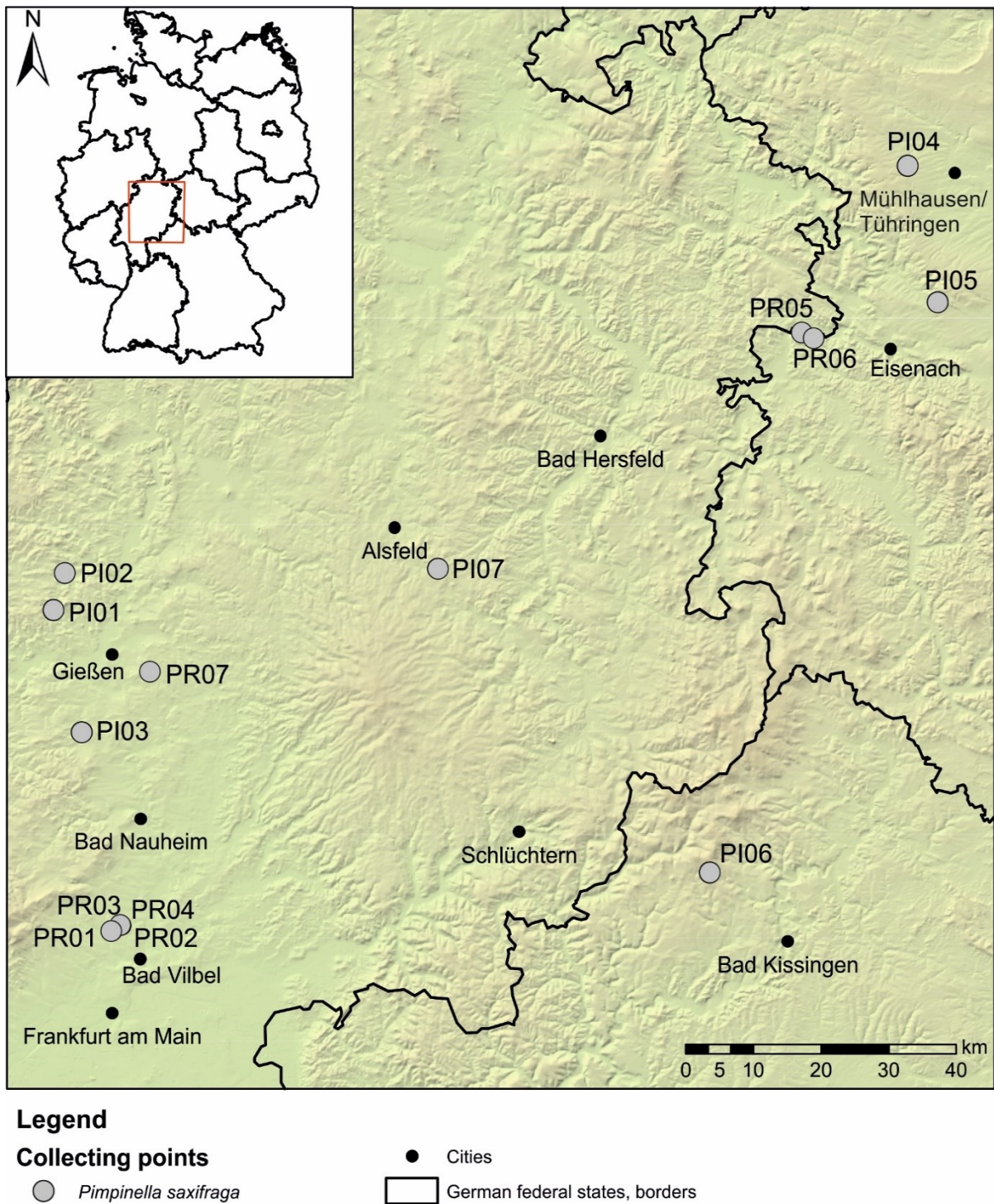


Figure 1: Map depicting the sampling sites in the study region in Central Germany (Hesse, Thuringia and Bavaria). PI01-PI07 are the sampled indigenous sites, PR01-PR07 are the sampled restored sites (see also Table 1). Map was prepared with ArcGIS Desktop (ArcGIS Desktop 10.2.2., Esri)

Figure 2: Principal Coordinates Analyses (PCoA) summarizing the AFLP marker results of *Pimpinella saxifraga* individuals. Each circle represents one individual. Individuals from restored sites (R) are depicted in red, and from indigenous sites (I) are depicted in blue.

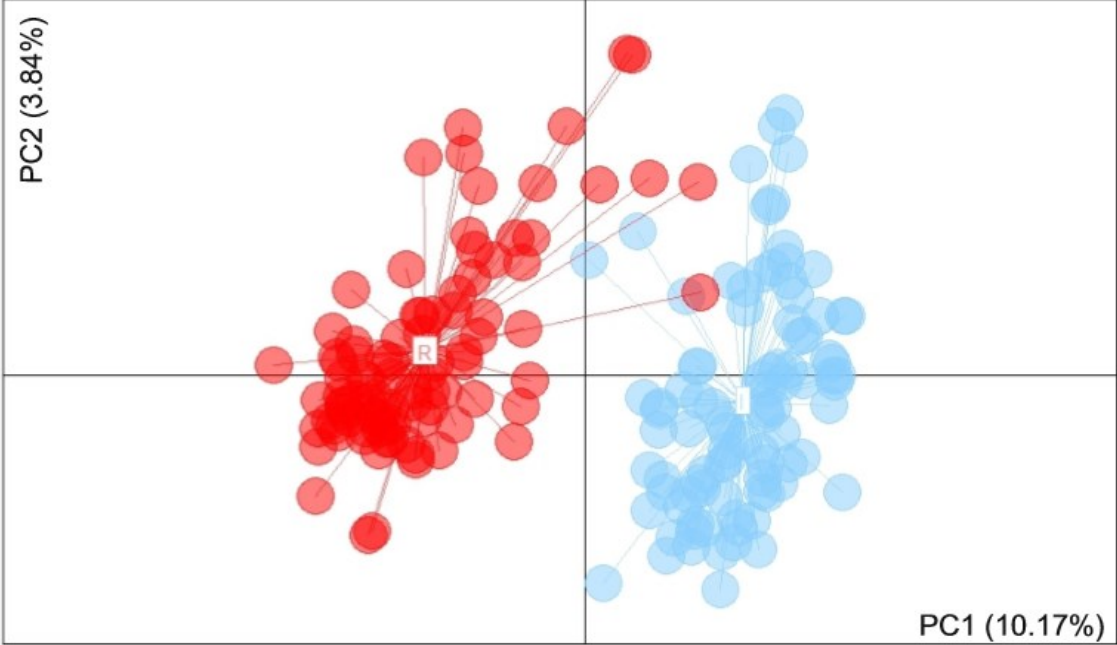
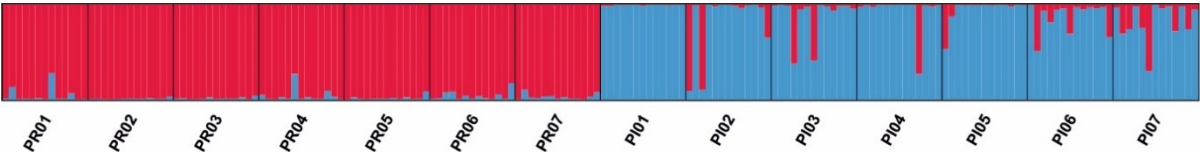


Figure 3: AFLP results evaluated in a STRUCTURE analysis for the surveyed populations of *Pimpinella saxifraga*



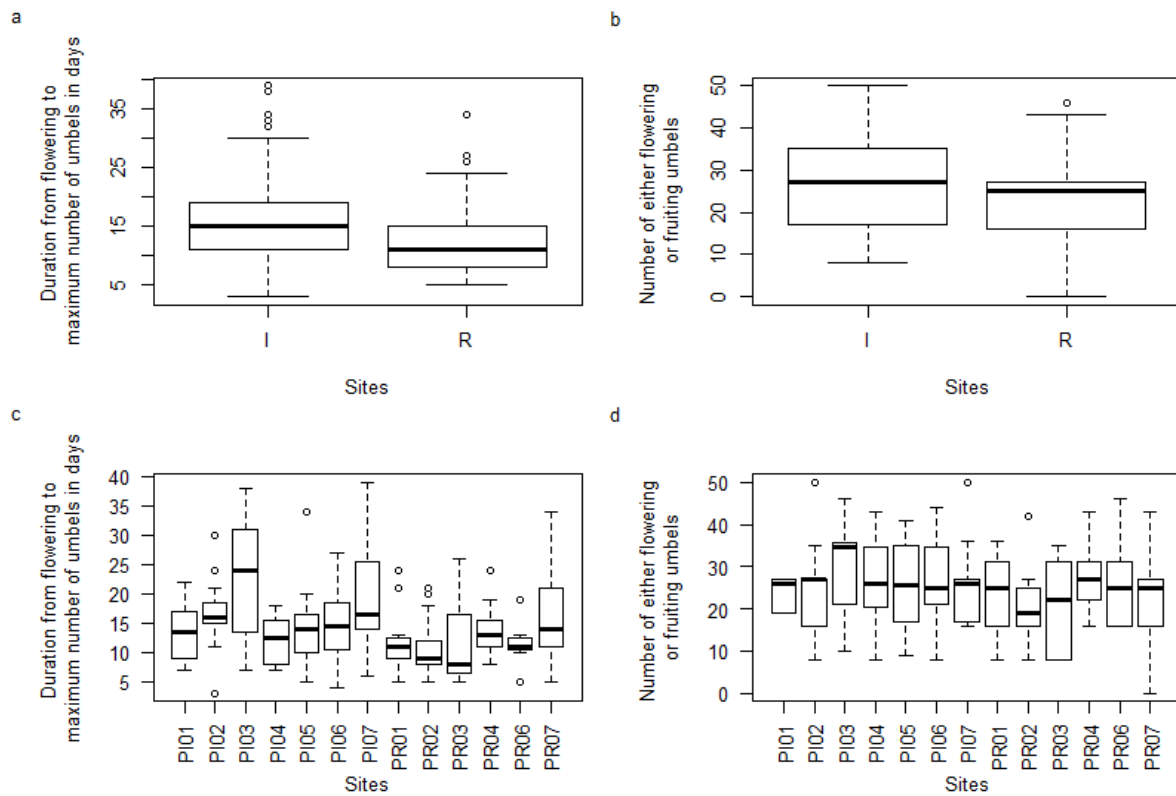


Figure 4: Summarized results of two significant reproductive fitness parameters of *Pimpinella saxifraga* on restored (R) and indigenous (I) sites. a) mean values of trait 9 (day of first flowering) and trait 10 (day of maximum number of flowering umbels) combined; b) mean values of trait 12 (number of flowering umbels) and trait 13 (number of fruiting umbels) combined; c) site specific values of trait 9 and 10 combined; d) site specific values of trait 12 and 13 combined. The bars indicate the mean fitness parameter \pm SE. *P*-values for comparisons between R and I sites are from a ANOVA using the residuals of linear mixed-effect models for the factor origin.

Kleinprojekte: Vielfalt bewahren!

Vielfalt bewahren? – Der Einfluss gebietsfremden Saatguts auf heimische Pflanzenpopulationen am Beispiel von *Daucus carota* L.

JUTTA REIKER, VOLKER WISSEMAN, BIRGIT GEMEINHOLZER

Schlagwörter: gebietsfremde krautige Pflanzen, Renaturierung, Genotypen, lokale innerartliche genetische Diversität, Mikrosatelliten, Daucus carota, Apiaceae.

1 Einleitung:

Der Erhalt der biologischen und genetischen Vielfalt ist eines der wichtigsten Ziele des Naturschutzes (NATIONALE STRATEGIE ZUR BIOLOGISCHEN VIELFALT S. 29, 2007). Hierbei ist es von zentraler Bedeutung, die Leistung und Funktionsfähigkeit des Naturhaushaltes zu bewahren. Hierfür kann sowohl eine große biologische Artenvielfalt, als auch eine hohe genetische Diversität innerhalb der Arten von Vorteil sein (ORTNER 2005). 1992 wurde für diesen Schutzgedanken in Rio de Janeiro die internationale Konvention zum Erhalt der biologischen und genetischen Vielfalt verabschiedet (CBD, Gesetz zu dem Übereinkommen vom 05. Juni 1992 über die biologische Vielfalt). Trotz der Nationalen Strategie zur Biologischen Vielfalt und der Rio- Konvention ist es momentan in Deutschland jedoch üblich, bei Renaturierungsmaßnahmen, z.B. nach Straßenbauvorhaben bei denen Erdreich bewegt wurde, die nachfolgende Ansaat krautiger heimischer Arten mit kostengünstigem gebietsfremdem Saatgut durchzuführen. Potentiell kann als Folge der Massenansaat von gebietsfremden Genotypen die eigentliche, regionale genetische Diversität der krautigen Arten durch Genfluss stark verändert werden (SEITZ ET AL. 2007). Dies kann einerseits erfolgen, indem Samen der einen Population jeweils in das andere Gebiet einwandern. Gelingt dort die Etablierung und Reproduktion kann dies zu einer Verdrängung führen aufgrund der Konkurrenz um limitierte Ressourcen. Andererseits kann es zur Kreuzung (Hybridisierung) zwischen heimischen und gebietsfremden Individuen kommen. Die Folgen hiervon sind vielfältig und ungeklärt. So kann es sowohl zur Erhöhung der genetischen Diversität in der Region aufgrund einer Durchmischung und Erweiterung des Genpools kommen, als auch zu einer Reduktion genetischer Diversität aufgrund von Inzuchteffekten oder Auskreuzungsdepressionen. Dies ist insbesondere dann von großer Bedeutung, wenn bereits eine genetische Verarmung erfolgt ist, z. B. durch zu starke Fragmentierung von Populationen einzelner Arten und daraus resultierenden Inzuchteffekten. Ein evolutionär ähnlicher Effekt ist die Auskreuzungsdepression, bei der die lokale Anpasstheit einer Population durch zu starke Einkreuzungen gebietsfremder Herkünfte verloren geht. Untersuchungen an Ackerwildkräutern wie *Agrostemma githago*, *Papaver rhoeas* und *Silene alba* (KELLER ET AL. 2000), sowie bei *Medicago sativa* (MULLER ET AL. 2003) zeigten, dass sich Auskreuzungsdepressionen in einer verminderten generativen Fitness äußerten. In Untersuchungen an *Medicago sativa* (LADIZINSKY, 1985; ELLSTRAND & ELAM, 1993) sowie an *Beta vulgaris* (BARTSCH & ELLSTRAND, 1999) konnte nachgewiesen werden, dass Kulturformen eine deutlich geringere genetische Variabilität aufweisen als Wildformen der gleichen Art. Diese Reduzierung der genetischen Vielfalt wurde dabei dadurch erklärt, dass Gärtnereibetriebe in der Regel, meist aus Gründen der Automatisierung, bestimmte Phänotypen bevorzugen und selektieren (z.B. Saatguternte zu dem Zeitpunkt, an dem die meisten Samen reif sind – früher bzw. später reifende Genotypen werden vernachlässigt). Jedoch sind Untersuchungen über mögliche Langzeitkonsequenzen bei krautigen Arten bislang nicht erforscht.

Mit Inkrafttreten des Bundesnaturschutzgesetzes vom 01.03.2010 wird von naturschutzfachlicher Seite die Forderung erhoben, für Straßenbegrünungsmaßnahmen autochthones, d.h. gebietsheimisches Saat- und Pflanzgut einzusetzen (BNatSchG § 40 Abs. 4). Das Bundesgesetz befindet sich jedoch zurzeit in einer Übergangsphase, wodurch das Ausbringen von gebietsfremden Pflanzen *de facto* erst ab dem 01.03.2020 genehmigungspflichtig wird. Ausnahmegenehmigungen sind bereits im Rahmen des Gesetzes vorgesehen. Die ökonomischen bzw. naturschutzrechtlichen Kriterien für diese

Ausnahmeregelungen und für welches Artenspektrum sie ausgesprochen werden sind bislang jedoch noch unklar, da Untersuchungen zum Einfluss von Straßenbegleitbegrünungsmaßnahmen auf die heimische krautige Flora bisher noch nie durchgeführt wurden. Dieses Projekt soll deshalb bisher fehlende wissenschaftliche Erkenntnisse liefern.

Das Ziel dieses Projektes ist es, zu analysieren, ob gebietsfremdes Saatgut bei krautigen Arten zur Renaturierung empfohlen werden kann, bzw. ob und mit welchem Einfluss auf die natürliche Vegetation und Diversität heimischer Arten gerechnet werden kann. Hierbei soll die genetische Diversität zwischen drei gebietsfremden älteren (ca. 15 Jahre alten) und drei jüngeren (ca. 5 Jahre alten) angesäten Populationen von renaturierten Flächen mit der von sechs heimischen Populationen, meist aus Schutzgebieten, verglichen werden. Die genetische Diversität wurde mittels Mikrosatelliten analysiert, um festzustellen, (1) ob genetische Diversität der verschiedenen Populationen und Herkünfte nach bekannten Zeiträumen immer noch existiert, bzw. (2) ob bestimmte Genotypen erfolgreicher sind und in den jeweils anderen Standort einwandern, bzw. eine Durchmischung der Genotypen erfolgt. Diese Analyse wird exemplarisch an *Daucus carota* L., der Wilden Möhre, durchgeführt.

2 Material und Methoden:

Mit Hilfe der Straßenbauämter Frankfurt, Schotten und Gelnhausen wurden sechs Standorte in der Region Mittelhessen ausgewählt, von denen bekannt ist, zu welchem Zeitpunkt dort gebietsfremdes Saatgut ausgebracht wurde. Die genaue regionale Herkunft des Saatguts ist nicht bekannt, jedoch kann alleine aus Kostengründen und der täglichen Praxis davon ausgegangen werden, dass das Saatgut aus gebietsfremden Herkünften stammt. Daraus folgt, dass ebenso über das Ernteverfahren des Saatguts bzw. die Diversität der Ursprungspopulationen nichts bekannt ist. Die Populationen aus dem gebietsfremdem Saatgut können in drei ältere (Standorte 8, 9, 10, Ansaatzzeitraum zwischen 1996-1998, d.h. 13-15 jährige Kultivierungsdauer,) und drei jüngere Standorte (Standorte 3, 4, 5, Ansaatzzeitraum zwischen 2003 bis 2007, d.h. 4-8 jährige Kultivierungsdauer,) gegliedert werden.

Die Auswahl der sechs Standorte der gebietsheimischen Populationen erfolgte in Kooperation und mit Genehmigung der jeweiligen zuständigen Naturschutzbehörde. Die Blattmaterialentnahme aller Standorte in Mittelhessen erfolgte im Herbst 2011 (siehe Tab. 2 und Abb. 1).

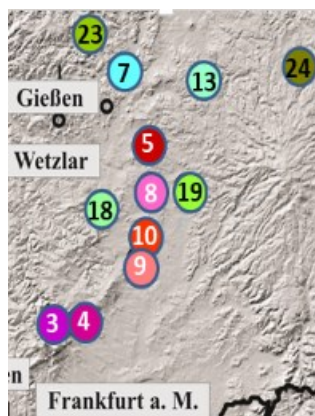


Abb. 1: Alle Standorte von *Daucus carota* Mittelhessen, rote Farbtöne = renaturierte Flächen mit gebietsfremdem Saatgut, blau grüne Farbtöne = autochthone Flächen.

Für die molekularen Analysen wurden am Standort Blattproben von *Daucus carota* von jeweils 20 Individuen pro Population entnommen und in Silicagel getrocknet. Die DNA-Isolation der Blattmaterialproben wurde mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Mikrosatelliten-PCR erfolgte mit drei verschiedenen Primerpaarkombinationen (*forward/reverse*) aus Cavagnaro et al. 2011 (siehe Tab. 1, Primer GSSR 3, 16, 65). Die Ausgangs-DNA wurde 1/10 verdünnt. Pro PCR-Ansatz wurden 0,5 µl DNA mit ca. 3 bis 10 ng/µl verwendet. Die Einzelreaktionsvolumen für die PCR waren wie folgt: 5 µl H₂O ultrarein, 1,5 µl 10 x DreamTaq-Puffer (Fermentas), 0,5 µl *forward* Primer (5pmol/µl), 0,5 µl *reverse* Primer (5pmol/µl), 1,5 µl dNTPs (2mM),

0,25 µl BSA (ng/µl), 2,5 µl Betain Monohydrat (5 M), 0,5 µl DMSO (10%) und 0,25 µl Dream Taq-Polymerase (5 units/µl, Fermentas). Die PCR erfolgte mit dem Mastercycler (epgradient-S Eppendorf) und umfasste 35 Zyklen. Die DNA wird im ersten Schritt bei 95 °C für 2 Minuten denaturiert, in den darauf folgenden Zyklen jeweils 30 Sekunden bei 95 °C. Anschließend hybridisieren die Primer bei 54 °C bis 57 °C für 30 Sekunden. Die PCR-Produkte werden bei 72 °C 45 Sekunden lang synthetisiert. Zum Schluss erfolgte eine finale Elongation für 15 Minuten bei 72 °C. Die Fragmentanalyse der Proben erfolgte extern (LGC Forensics IfB).

Tab. 1: Verwendete Mikrosatelliten-Primer aus Cavagnaro et al. 2011

Locus	Motiv		Primer Sequenz (5'-3')	Annealing Temp.
GSSR-03	(AG)6tgga(GGAG)3	F	TTCTTCTTCATCTCTCCACAAGG	54°C
		R	TAAAACAGTCACACATCTCTC	
GSSR-16	(TG)9tacgc(ATGT)3	F	ATGCAAACGACAATATCCACAG	57°C
		R	GCCAGCCACTTCCTAGAT	
GSSR-65	(TG)8	F	ACTGCAAAACAGAAACCCAGA	57°C
		R	TAGGTCATGGCGATTGATGTAG	

Die erstellten Rohdaten der Mikrosatelliten wurden mit dem Programm GeneMarker® V1.90 der Firma SoftGenetics (SoftGenetica, LLC. PA, USA) bearbeitet. Dabei wurden die Längen der DNA-Fragmente anhand des internen Längenmarkers ROX 500 standardisiert. Es wurden Fragmente im Bereich von 100 bis 500 Basenpaaren ausgewertet und manuell eine Datenmatrix der Allele/Merkmale erstellt (0/1-Matrix). Es erfolgte eine Neighbor-Joining (NJ)-Analyse mit dem Programm PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) für Microsoft Windows™. Die Darstellung des phylogenetischen Netzwerk-Rekonstruktion erfolgte mit TreeView (Win32) 1.6.6, Copyright © Roderic D.M., Page, 2001. Mit der 0/1-Matrix wurde die Allellhäufigkeit per Bayessche Methode (nicht-einheitlichen Verteilung, ZHIVOTOVSKY 1999) berechnet. Von dieser Allellhäufigkeit wurde der Anteil von polymorphen Loci und die genetische Diversität (Hj), sowie deren Varianz (varHj) nach Lynch & Milligan (1994) mit der Software AFLPsurv, Version 1.0 (VEKEMANS 2002) berechnet (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Standorte von *Daucus carota* (Mittelhessen) und Mikrosatelliten Ergebnisse.

Nr.:	Standort	Status+Nr.:	Ansaat Jahr	Koordinaten	P%	Hj	varHj
3	Eschbach		2007	50°22',8°68'	20,5	0.06281	0.000144
4	Eschbach		2007	50°23',8°70'	16,7	0.06356	0.000138
5	Fernwald		2003	50°57',8°76'	20,5	0.06366	0.000118
8	Griedel		1996	50°45',8°75'	21,8	0.05551	0.000164
9	Bad Nauheim		1998	50°39',8°73'	17,9	0.05278	0.000160
10	Bad Nauheim		1998	50°40',8°72'	15,4	0.04697	0.000166
7	Daubringen	FFH- 5318-303	Natur	50°64',8°74'	21,8	0.06304	0.000173
13	Reiskirchen	Heuwiese	Natur	50°58',8°83'	24,4	0.06472	0.000116
18	Niederkleen	FFH-5517-301	Natur	50°48',8°62'	23,1	0.06350	0.000133
19	Hungen	Heuwiese	Natur	50°47',8°88'	24,4	0.06324	0.000181
23	Oberes Verstal	NSG 318895 IV	Natur	50°69',8°58'	19,2	0.06459	0.000117
24	Lauterbach	FFH-5322-305	Natur	50°68',9°38'	25,6	0.06744	0.000165

Nr. = Nummer der besammelten Standorte; Status+Nr. = Schutzgebiet; Ansaat Jahr = Ansaat der renaturierten Flächen oder heimische Standorte; Koordinaten = Nord-Ost, P% = Prozent der polymorphen Loci; Hj= Nei's genetische Diversität; varHj = Varianz (Hj).

3 Ergebnisse und Diskussion:

Es konnten sechs heimische und sechs gebietsfremde Populationen mit drei Mikrosatellitenprimern analysiert werden, die in 78 polymorphe Loci resultieren. Die Populationsdiversität der heimischen Vertreter (Standorte 7, 13, 18, 19, 23, 24 siehe Hj in Tab. 2) ist meistens größer, als diejenigen der nicht-heimischen Standorte (3, 4, 5, 8, 9, 10). Bei den nicht heimischen Standorten fallen besonders die älteren renaturierten Flächen (Standorte 8, 9, 10) mit einem geringen Hj-Wert auf.

Da generell davon ausgegangen werden kann, dass nicht-heimische Genotypen meist nur von einem Standort stammen und häufig zu nur einem bestimmten Reifezeitpunkt der Samen und innerhalb eines Jahres gesammelt wurden, entspricht dieses Ergebnis den Erkenntnissen, die zur Aufsammlung von Wildpflanzensaatgut gewonnen werden konnten (PRASSE ET AL 2010). Die große genetische Diversität der heimischen Populationen entspricht aufgrund des weiten Verbreitungsgebietes der Untersuchungspflanze, der guten Bestäuberaktivität, die an den Doppeldolden beobachtet werden können, sowie mit einer wahrscheinlich im Boden gut vertretenen Samenbank, den Erwartungen. Wird die genetische Diversität in Form einer Baumtopologie dargestellt (Abb. 2), ist zu erkennen, dass trotz eines relativ großen Untersuchungsgebietes, die Bestäubungs- bzw. Ausbreitungsaktivitäten zwischen den Populationen weit überschreitet wird und keine Clusterbildung einheimischer Genotypen zu detektieren ist, die potentielle Populationsstrukturen widerspiegeln könnten. Die über das gesamte Untersuchungsgebiet beobachtbare genetische Diversität entspricht einem Muster einer funktionierenden „Metapopulationsdynamik“.

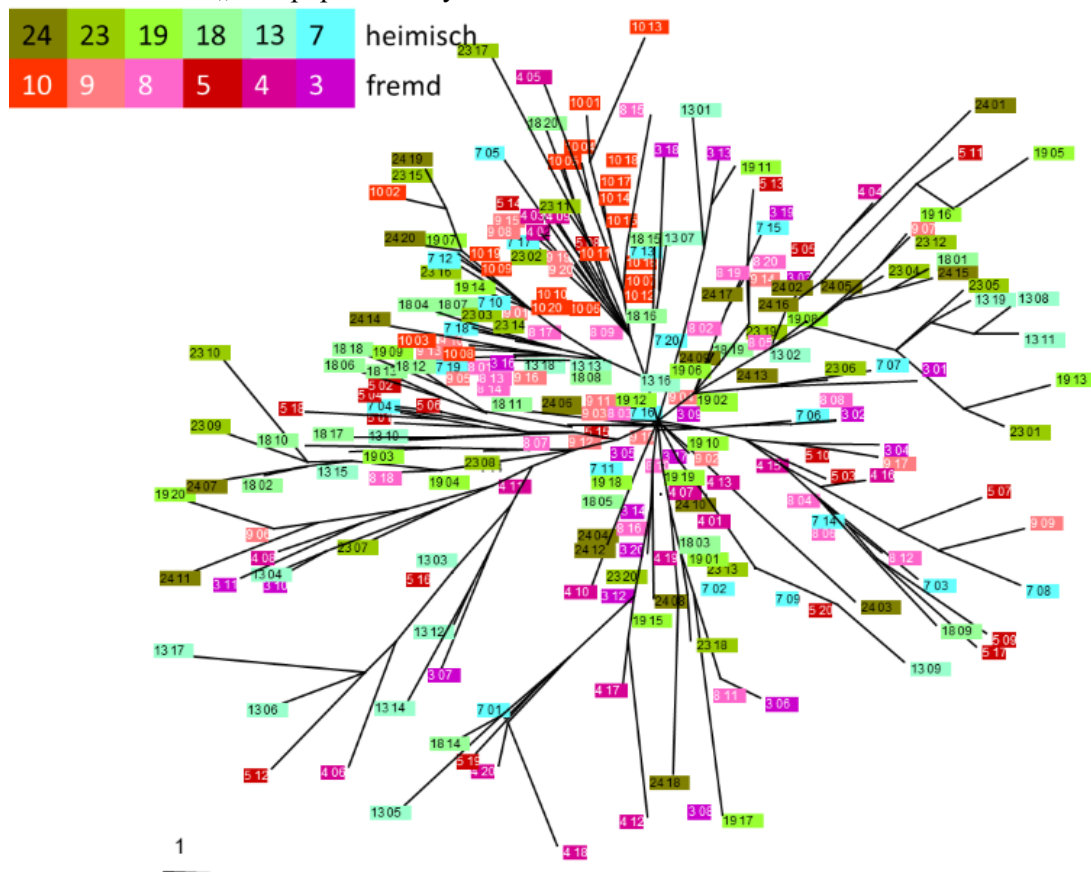


Abb. 2: TreeView Darstellung der Standorte 3, 4, 5 (fremd 2003 bis 2007), 8, 9, 10 (fremd 1996 bis 1998), 7, 13, 18, 19, 23, 24 (heimisch). Farbcode siehe Legende oben links

Betrachtet man die Individuen der angesäten Standorte so ist zu erkennen, dass deren genetische Diversität tendenziell geringer ist. Besonders deutlich zeigt nur der Standort 10 eine relativ starke Clusterbildung. Dies könnte bedeuten, dass die Ursprungspopulation dieser angesäten Fläche genetisch relativ homogen war. Aufgrund der Standortpersistenz seit der Aussaat auf den renaturierten Flächen scheint jedoch eine beginnende Durchmischung von heimischen und fremden Genotypen zu erfolgen.

Leider ist derzeit eine Aussage über die Ausbreitungsbewegung – von den heimischen Genotypen in die angepflanzten Gebiete bzw. *vice versa* – noch nicht möglich.

Betrachtet man die Populationen 3, 4 und 5 (jüngere renaturierte Flächen aus dem Jahre 2003 bis 2007), ist ersichtlich, dass diese sich noch relativ stark von den heimischen Genotypen unterscheiden, da sie sich zum größeren Teil auf der unteren Hälfte der Abbildung wiederfinden. Die jüngeren renaturierten Flächen sind genetisch divers (siehe H_j Werte Tab. 2.) Ihre genetische Diversität ist hoch im Vergleich zu den heimischen Populationen. Betrachtet man hingegen die Individuen der älteren renaturierten Flächen der Standorte 8, 9 und 10 aus dem Jahre 1996 bis 1998, so ist ersichtlich, dass diese geringere Astlängen haben und anhand ihres Diversitätsmusters (Abb. 2) besonders stark an die heimischen Populationen annähern. Diese Standorte weisen jedoch durchwegs eine geringere genetische Diversität auf (siehe H_j Werte Tab. 2), als die heimischen Populationen.

Die hier gezeigte Darstellung und Ermittlung der genetischen Diversität zeigt zum jetzigen Zeitpunkt nur ein deutliches Muster der genetischen Durchmischung zwischen angesäten und heimischen Standorten. Dabei ist jedoch unklar, ob die Genotypen von den heimischen Standorten in die angesäten Flächen eingewandert sind, bzw. eine Auskreuzung von den renaturierten Flächen in die Naturstandorte erfolgt ist. Je länger zeitlich betrachtet die Renaturierung einer Fläche zurück liegt, desto ähnlicher ist die genetische Diversität dieses Standortes mit denjenigen der heimischen Individuen. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Nachkommen aus nicht-heimischen Herkünften sich an den ausgesäten Flächen aufgrund anderer ökologischer Bedingungen nicht langfristig etablieren konnten und freie Nischen von einheimischen Genotypen besetzt wurden, oder es erfolgte eine Einkreuzung mit beobachtbarer Erhöhung der genetischen Diversität sowohl auf den renaturierten Flächen, als auch in den Naturschutzgebieten. Laufende Untersuchungen werden die „Wanderbewegungen“ zwischen den Populationen zum Fokus haben sowie die jeweilige Fitness des Wuchs- und Blühverhaltens von Individuen der jeweiligen Herkünfte, was für die ökologische Lebensgemeinschaft (Insekten) von Bedeutung sein kann. Erst diese Ergebnisse lassen eine endgültige naturschutzfachliche Empfehlung zu. Zum jetzigen Zeitpunkt wäre zu empfehlen, bei Renaturierungsmaßnahmen vorwiegend Saatgut aus heimischen Herkünften zu verwenden, da eine Durchmischung des Genpools mit Sicherheit erfolgt. Allerdings können wir ohne Auswertung der Fitnessuntersuchungen (erfolgt Ende Herbst 2013) noch nicht belegen, ob dies zum Nachteil von *Daucus carota* im Untersuchungsgebiet ist – also eine genetische Verarmung zu Inzuchteffekten bzw. Auskreuzungsdepressionen geführt hat. Die Einbringung fremden Saatguts könnte u.U. auch eine höhere genetische Diversität mit potentiell größeren Möglichkeiten zur Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen bedeuten. Weitere Untersuchungen, die sich auf ein größeres Untersuchungsgebiet und eine größere Anzahl an Mikrosatellitenprimern beziehen, laufen derzeit an, um unsere ersten Ergebnisse zu unterstützen.

Danksagung:

Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung des Projektes bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) sowie der Heidehofstiftung. Desweiteren danken wir den Ämtern für Straßenbau Frankfurt, Schotten und Gelnhausen für die Bereitstellung der Daten über renaturierten Flächen. Für die Betreuung und Besammlung der heimischen Flächen im Naturschutzgebiet „*Obers Verstal*“ danken wir dem Regierungspräsidium Gießen. Zudem bedanken wir uns für die Beratung über die Wahl der heimischen Flächen beim Verband des Deutscher Wildsamens- und Wildpflanzenproduzenten e. V. Für die Unterstützung der Herstellung der molekularen Daten bedanken wir uns bei den Biologisch-technischen Assistentinnen der AG Spezielle Botanik, Gießen.

5. Literatur:

BARTSCH, D. & ELLSTRAND, N. C. (1999): Genetic Evidence for the Origin of Californian Wild Beets (genus *Beta*). *Theoretical and Applied Genetics* 99: 1120-1130.

BUNDESNATURSCHUTZGESETZ, GESETZ ÜBER NATURSCHUTZ UND LANDSCHAFTSPFLEGE
(BNATSCHG) VOM 29.07.2009 (BGBl. I S. 2542), in Kraft getreten am 01.03.2010

CAVAGNARO, P.F., CHUNG, S.-M., MANIN, S., YILDIZ, M., ALI, A., ALESSANDRO, M.S., IORIZZO, M.,
SENALIK, D.A., SIMON, P. W. (2011): Microsatellite isolation and marker development in carrot
- genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability
across Apiaceae. *BMC Genomics* 2011, 12:386

CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY – CBD, UNITED NATIONS 1992

DEUTSCHER BUNDESTAG (2007): Unterrichtung durch die Bundesregierung: Nationale Strategie zur
Biologischen Vielfalt.– Drucksache des Deutschen Bundestages und Bundesrates 16.
Wahlperiode Nr. 7082.

ELLSTRAND, N. & ELAM, D. (1993): Population Genetic Consequences of Small Population Size -
Implications for Plant Conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.

GENEMARKER® V1.90 DER FIRMA SOFTGENETICS (SOFTGENETICA, LLC. PA, USA)

HUSON, D. H. & BRYANT, D. (2006): Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies,
Mol. Biol. Evol., 23(2):254-267. (Splits-Trew4.0)

KELLER, M., KOLLMANN, J. UND EDWARDS, P. J. (2000): Genetic introgression from distant
provenances reduces fitness in local weed populations. *Journal of Applied Ecology* 37: 647 -
659.

KUNZMANN D., PRASSE R. UND SCHRÖDER, R. (2010): Entwicklung und praktische Umsetzung
naturschutzfachlicher Mindestanforderungen an einen Herkunftsnachweis für gebietseigenes
Wildpflanzensaatgut krautiger Pflanzen, Abschlussbericht zum Forschungsprojekt (DBU),
Hannover.

LYNCH M., MILLIGAN B.G. (1994): Analysis of population genetic structure with RAPD markers.
Molecular Ecology, 3, 91–99.

MULLER, M. H., PROSPERI, J. M., SANTONI, S. UND RONFORT, J. (2003): Inferences from mitochondrial
DNA patterns on the domestication history of alfalfa (*Medicago sativa*). *Molecular Ecology* 12:
2187-2199.

ORTNER, D. (2005): Zur naturschutzrechtliche Verpflichtung der Verwendung autochthonen Saat- und
Pflanzguts bei der Straßenbegleitbegrünung, NuR 2: 91- 99.

SEITZ, B., JÜRGENS, A. UND KOWARIK, I. (2007): Erhaltung genetischer Vielfalt: Kriterien für die
Zertifizierung regionalen Saat- und Pflanzguts. Literatur-Studie; BfN-Skripten 208.

VEKEMANS X. (2002): AFLP-SURV version 1.0. Laboratoire de Genetique et Ecologie Vegetale,
Universite Libre de Bruxelles, Belgium.

ZHIVOTOVSKY L.A. (1999): Estimating population structure in diploids with multilocus dominant
DNA markers. *Molecular Ecology*, 8, 907–913.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Wissemann für die wirklich schöne und lehrreiche Zeit in seiner Arbeitsgruppe. Die vielen gemeinsamen Jahre, auch und insbesondere in meiner Studienzeit, waren gute Jahre voller wohlwollender Unterstützung in einer Arbeitsgruppe, die einem ein familiäres Gefühl gab. Natürlich möchte ich mich auch sehr herzlich und liebevoll bei allen weiteren Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Spezielle Botanik, aber auch den weiteren Mitarbeitern des gesamten Institutes für Botanik bedanken. Vielen lieben Dank Prof. Dr. Birgit Gemeinholzer, Dr. Christina M. Müller, Annalena Kurzweil, André Fichtner, Dr. Jens Föllner, Dr. Stefanie J. Jung, Elke Magel, Helene Krufczik, Sabine Mutz, Dr. Christiane Ritz, Dr. Stephanie Holzhauer, Dr. Alexandra Kellner, Dr. Andreas Opitz und Dr. Sebastian Stille. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Thomas Groß, Dr. Theresa Rühl und Dr. Benjamin Schulz. Dabei geht mein Dank insbesondere an jene Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter, die mit mir viele gemeinsame Jahre verbracht haben wie Jens, Christina, Alexandra, Annalena, Andreas, Stefanie, Sabine und Birgit. Es war wirklich schön diese Kolleginnen und Kollegen jeden Wochentag zu sehen, mit ihnen gemeinsam zu arbeiten und vorallem mit ihnen gemeinsam kreativ zu sein. Sie haben mir immer das Gefühl gegeben Teil einer wichtigen Gruppe zu sein. Ein Teil von einem großen Ganzen. Sie haben mich an vielen Lebensscheidelpunkten erlebt und unterstützt. Mein besonderer Dank gilt auch Birgit Gemeinholzer für ihre Geduld und für ihre Überarbeitung der vielen Texte und Ausarbeitungen. Auch möchte ich Danke sagen an Christina für die Berechnungen der vielen Daten, ohne sie wären viele dieser Aussagen in dieser Doktorarbeit gar nicht möglich gewesen. Weiterhin bedanke ich mich bei Annalena für das gemeinsame Messen, Wiegen und Verarbeiten des vielen Pflanzenmaterials und natürlich für das Korrekturlesen meiner Forschungsarbeiten. Auch bei Sabine bedanke ich mich für die vielen Stunden im Labor bei der Suche nach den richtigen Mikrosatelliten. Natürlich möchte ich mich auch bei Dietmar Haffer bedanken. Ohne ihn wäre doch die Forschung an meinen Pflanzen kaum möglich gewesen, denn dafür müssen diese erst einmal im Botanischen Garten angepflanzt werden und wachsen und gedeihen.

Last but not least danke ich meiner Partnerin Jessica Adrian für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und vor allem für ihre nie enden wollende Geduld. Auch meiner Tochter Enya danke ich für ihre tollen Schläfchen am Ende der Ausarbeitung, in der ich meine Arbeit fertigstellen konnte.

Versicherung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Ort, Datum

Jutta Reiker