

Philipps



Universität
Marburg

Schlussbericht zum Projekt: Übertragbares Managementkonzept für *Arnica montana*

Teilvorhaben 2: Etablierung, Standardisierung und Qualitätskontrolle des genetischen Monitoring-Systems für *Arnica montana*

Zuwendungsempfänger: Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Arbeitsgruppe Naturschutzbiologie

Förderkennzeichen: 16LC1316B

Laufzeit des Vorhabens: 01.08.2014 – 31.12.2020

Verfasser: Dr. Sascha Liepelt

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Aufgabenstellung und Voraussetzungen..... | 3 |
| 2. Planung und Ablauf des Vorhabens | 3 |
| 3. Ausgangssituation und Zusammenarbeit mit anderen Stellen | 4 |
| 4. Projektergebnisse..... | 5 |
| 4.1 Gefährdungsanalyse | 5 |
| <i>Habitatqualität</i> | 5 |
| <i>Untersuchung der genetischen Vielfalt und Struktur</i> | 5 |
| <i>Untersuchung von klonalen Strukturen</i> | 9 |
| <i>Bewertung der genetischen Rückgangsursachen</i> | 10 |
| 4.2 Nutzungsexperiment | 10 |
| 4.3 Mykorrhiza..... | 11 |
| 4.4 Übertragbares genetisches Monitoringsystem | 11 |
| <i>Etablierung von Mikrosatelliten-Markern zur genetischen Untersuchung von A. montana</i> | 11 |
| <i>Etablierung von PCR-Multiplexen</i> | 11 |
| <i>Charakterisierung der Allele</i> | 12 |
| <i>Standardisierung der Genotypisierung</i> | 13 |
| 4.5 Kreuzungsexperiment | 14 |
| 5. Verwertungsplan | 17 |
| 5.1 Tagungsbeiträge – Vorträge | 18 |
| 5.2 Tagungsbeiträge - Poster..... | 18 |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 19 |

1. Aufgabenstellung und Voraussetzungen

Das Gesamtprojekt wurde im Rahmen des Bundesprogramms „Biologische Vielfalt“ als Forschungs- und Umsetzungsprojekt gefördert. Hierbei wurden die Teilprojekte der Forschungspartner durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung und der Umsetzungspartner durch das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit und das Bundesamt für Naturschutz gefördert.

Das übergeordnete Ziel des Gesamtprojektes war die Erarbeitung eines übertragbaren Managementkonzeptes in Form eines Praxisleitfadens für Akteur*innen im Naturschutzmanagement zur Erhaltung und Wiederansiedlung der Verantwortungsart *Arnica montana*, deren Bestände bundesweit massiv zurückgehen.

Mit Hilfe ökologischer und populationsgenetischer Untersuchungen sollten an hessischen *A. montana*-Populationen zum einen die Prozesse erforscht werden, die für die starken Bestandseinbrüche und das Erlöschen zahlreicher Populationen verantwortlich sind. Zum anderen sollten Maßnahmen identifiziert und evaluiert werden (u.a. geeignete Pflegemaßnahmen, ex situ-Maßnahmen), die für eine kurzfristige Stützung der *Arnica*-Bestände sowie für deren langfristige Regeneration geeignet und umsetzbar sind.

Die AG Naturschutzbiologie war als Forschungspartner am Projekt beteiligt. Wir haben in enger Verzahnung und Abstimmung gemeinsam mit dem anderen Forschungspartner, der AG Biodiversität der Hochschule Geisenheim geforscht. Für die durchgeführten Experimente wurden wir vom Umsetzungspartner, dem Botanischen Garten der Universität Marburg, unterstützt.

Die AG Naturschutzbiologie wurde in der Projektlaufzeit finanziell mit Sach-, Reise- und Personalmitteln unterstützt. Hiervon wurden ein biologisch-technischer Assistent sowie studentische Hilfskräfte finanziert. Sachmittel wurden für Verbrauchsmittel und Sequenzier-Dienstleistungen verwendet. Die Reisemittel wurden für die Probennahme, Projekt- und Kooperationstreffen sowie Tagungsbesuche eingesetzt.

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Planung des Projektes basierte auf den Projektzielen. Als Forschungspartner standen die nachfolgenden Forschungsziele im Vordergrund:

1.) Gefährdungsanalyse

Erforschung der ökologischen und genetischen Ursachen des Rückgangs von *A. montana* im Tiefland

2.) Nutzungsexperiment

Erprobung von verschiedenen Pflegemaßnahmen zur Habitatverbesserung

3.) Mykorrhiza

Einfluss von Bodennährstoffen auf die mit *A. montana* assoziierten Mykorrhizen

4.) Übertragbares genetisches Monitoring-System

Grundlage für die Erforschung der genetischen Rückgangsursachen sowie für ein bundesweit übertragbares genetisches Monitoring

5.) Kreuzungsexperiment

Kontrollierte Kreuzungen zum Einfluss genetischer Faktoren bei der Auswahl von Spenderpopulationen für populationsstützende Maßnahmen

Die AG Naturschutzbiologie war aktiv an den Zielen 1, 4 und 5 beteiligt. Im Projektablauf stand für uns zunächst die Entwicklung bzw. Optimierung der genetischen Marker am Anfang. Dies war die Voraussetzung für die Erforschung der genetischen Rückgangsursachen, für den Aufbau des genetischen Monitoringsystems und für die Auswahl der Populationen für das Kreuzungsexperiment. Nachfolgend wurden in enger Zusammenarbeit mit der AG Biodiversität der Hochschule Geisenheim die populationsgenetischen Untersuchungen durchgeführt. Auf Grundlage der so erhobenen Daten wurden sowohl das genetische Monitoringsystem etabliert als auch das Kreuzungsexperiment konzipiert und anschließend in enger Zusammenarbeit mit der AG Biodiversität und dem Botanischen Garten Marburg durchgeführt.

3. Ausgangssituation und Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Arnica montana hat ihren Verbreitungsschwerpunkt in Mitteleuropa. Deutschland kommt wegen der Lage im Zentrum des Verbreitungsgebiets eine besondere Verantwortung für die Erhaltung der Art zu. Die Art ist in ihrem Verbreitungsgebiet stark im Rückgang begriffen, so waren z.B. in Hessen nach einer Bestandsaufnahme in 2009 in den vorangegangenen zwei Jahrzehnten rund 30 % der bis dahin bekannten Bestände erloschen.

Als Gefährdungsursachen wurden nicht geeignete Nutzungsvarianten und Eutrophierung ihrer Lebensräume (überwiegend Borstgrasrasen und mageres Grünland), ein Mangel an sexueller Reproduktion durch ein Fehlen von Offenbodenstellen für die Keimung als auch evolutionäre Prozesse wie Inzuchteffekte durch die anhaltende Verringerung der Populationsgröße und die starke Fragmentierung der Bestände diskutiert, wobei allerdings wissenschaftliche Untersuchungen weitestgehend fehlten. Belastbare Informationen fehlten insbesondere auch zu geeigneten Maßnahmen, mit denen sich *Arnica montana*-Bestände erfolgreich nachhaltig sichern lassen.

Die genetische Struktur von *A. montana* war zu Projektbeginn weitgehend unerforscht, da es nur wenige regionale Untersuchungen gab (Kahmen & Poschlod, 2000; Luijten et al., 1996, 2000; Pop et al., 2008).

Für *A. montana* standen zu Projektbeginn noch keine Mikrosatelliten-Marker zur Verfügung, wie sie als kodominante genetische Marker zur Ermittlung von Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb von Populationen und zur Ermittlung der genetischen Struktur von Populationen standardmäßig Anwendung finden (Guichoux et al., 2011). Bisherige populationsgenetische Untersuchungen an *A. montana* waren mit anderen Markersystemen wie Isoenzymen (Kahmen & Poschlod, 2000; Luijten et al., 1996, 2000) oder RAPD (Pop et al., 2008) durchgeführt worden, die entweder nicht variabel genug oder nicht zwischen Laboratorien und Geräten übertragbar sind. Zudem ist eine Ermittlung von Verwandtschaftsverhältnissen mit diesen Markern nur eingeschränkt möglich.

In einem vom BfN geförderten Vorhaben „Integration von Ex-situ- und In-situ-Maßnahmen zur Erhaltung gefährdeter Blütenpflanzen in Deutschland“ wurden zum Zeitpunkt unserer Projektbeantragung bereits Mikrosatelliten-Marker für *A. montana* entwickelt. Dies geschah in der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Borsch an der Freien Universität Berlin (AG Borsch), mit der im Zuge des Projektantrages bereits Kontakt aufgenommen wurde. So wurden die dort entwickelten Marker für den Einsatz in unserem Projekt bereits vorab zur Verfügung gestellt. Zudem ergaben sich Möglichkeiten zum Austausch von Datensätzen, die zu einer Übertragbarkeit der Datensätze führen sollte. Dabei ergänzten sich die beiden Vorhaben optimal, da im Berliner Projekt eher großräumige

Strukturen untersucht wurden, während in unserem Vorhaben die kleinräumige Diversität und der Zustand der einzelnen Bestände im Vordergrund standen.

4. Projektergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse unseres Teilvorhabens aufgeführt. Durch die enge Zusammenarbeit mit den Projektpartnern ergeben sich zahlreiche Überschneidungen sowie gemeinsame Auswertungen, so dass hier auch Ergebnisse mehrerer Partner präsentiert werden.

4.1 Gefährdungsanalyse

Habitatqualität

Die Ergebnisse dieses Teils sind im Endbericht des Projektpartners der Hochschule Geisenheim (AG Biodiversität) detailliert ausgeführt und werden hier kurz zusammengefasst.

Es wurden 32 Flächen mit kleinen und großen Arnikabeständen sowie erloschene Bestände im Hinblick auf abiotische und biotische Standortfaktoren verglichen. Hier zeigte sich, dass auf Flächen mit erloschenen Beständen vermehrt Arten des Wirtschaftsgrünlandes wuchsen, die höhere Stickstoffgehalte und pH-Werte des Bodens anzeigten, was durch Bodenanalysen bestätigt wurde.

Versuche im Gewächshaus zur Keimung und Etablierung von *A. montana* zeigten, dass zur Keimung ein direkter Bodenkontakt notwendig ist und dass eine dichte Begleitvegetation die Etablierung der jungen Pflanzen erheblich erschwert (Hollmann et al., 2020).

Untersuchung der genetischen Vielfalt und Struktur

Gemeinsam mit der Hochschule Geisenheim konnte ein großer Teil der Bestände im hessischen Tiefland genetisch untersucht und in Hinsicht auf ihre räumlich-genetische Struktur, genetische Vielfalt, genetische Differenzierung sowie sexuelle vs. vegetative Reproduktion bewertet werden. Hierfür wurden insgesamt 861 Pflanzen in 39 Beständen an 14 Mikrosatelliten-Markern untersucht. Ein Teil der Daten (194 Pflanzen) wurde im Rahmen einer Masterarbeit in der AG Naturschutzbiologie erhoben (Rokitte, 2017).

Die populationsgenetische Analyse zeigte eine deutliche räumlich-genetische Populationsstruktur und eine erhebliche genetische Differenzierung zwischen den Beständen von *A. montana*. Die Populationsstruktur wurde mittels Bayes'scher Clusteranalyse durch die Software STRUCTURE Version 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) ermittelt. Die wahrscheinlichste Anzahl genetischer Gruppen wurde anhand der STRUCTURE-Ergebnisse durch die Methode von Evanno et al. (2005) ermittelt und ergab zwei geographisch konsistente Haupt-Gruppen (Abb. 1). Mit der verwendeten Methode würden sich die Populationen noch feiner einteilen lassen, was durch die hohe genetische Differenzierung zwischen den Beständen von $D_{est} = 0,26$ berechnet nach Jost (Jost, 2008) mit Hilfe der Software GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) untermauert wurde. Man kann also davon ausgehen, dass zwischen einzelnen Vorkommen von *A. montana* ein sehr geringer genetischer Austausch herrscht. Diese Tatsache verschärft die Problematik der Art im Untersuchungsgebiet, da unter diesen Voraussetzungen genetisch verarmte Bestände auch bei nachfolgend optimaler Habitatpflege nur sehr langsam neue genetische Vielfalt entwickeln würden.

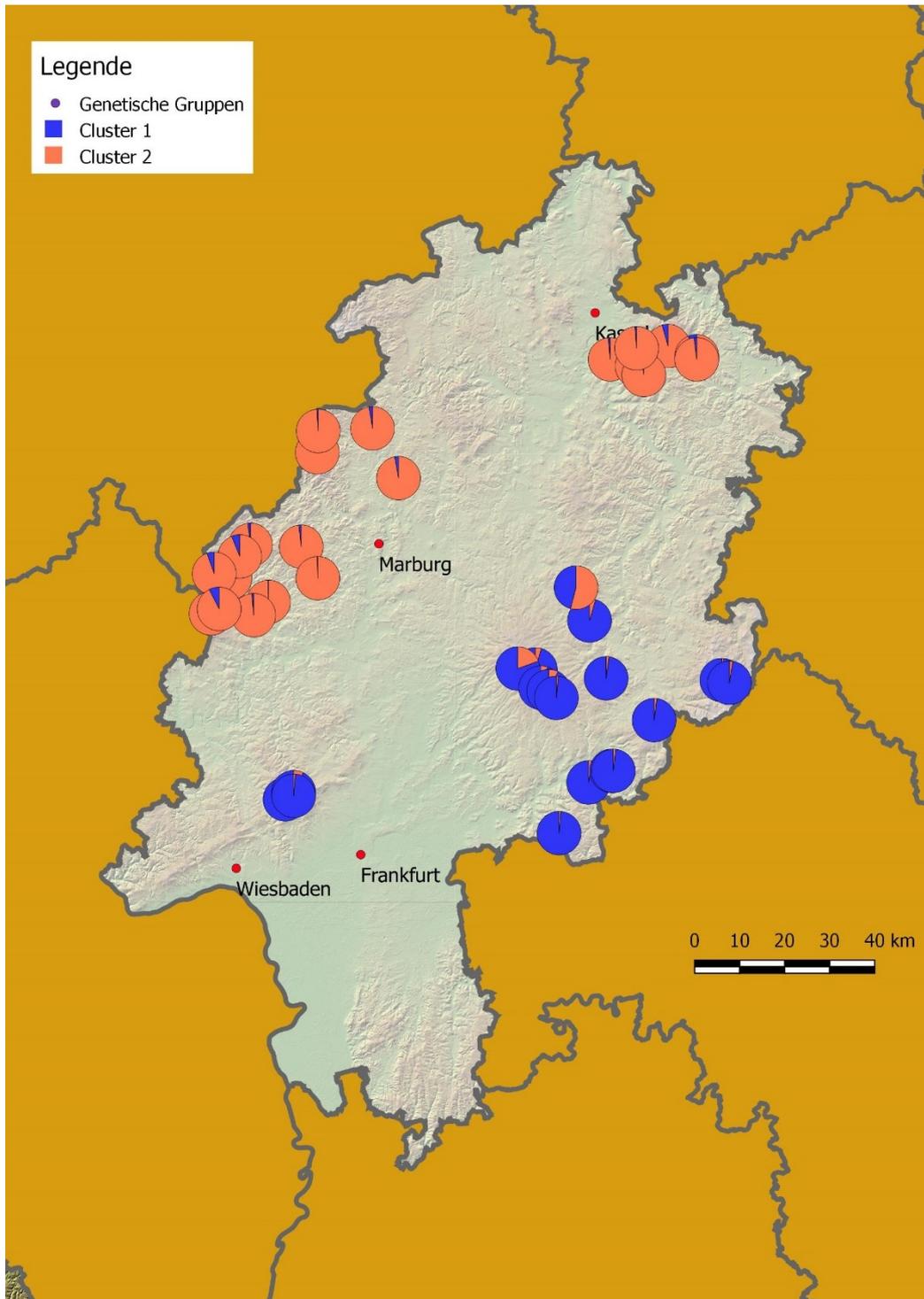


Abbildung 1 - Karte des Projektgebiets mit Darstellung der genetisch untersuchten Bestände von *A. montana*. Die Kreisdiagramme zeigen die mittlere Zuordnungswahrscheinlichkeit der Individuen zu einer der beiden genetischen Gruppen.

Die Ergebnisse zur genetischen Vielfalt sowie zur klonalen Diversität zeigten starke Schwankungen zwischen den Beständen. Das Maß der klonalen Vielfalt gibt Aufschluss über das Verhältnis von sexueller gegenüber vegetativer Reproduktion. Eine niedrige klonale Diversität bedeutet also, dass klonale Fortpflanzung überwiegt. Um dies zu untersuchen, waren, wo möglich, eng wachsende sog. Patches von *A. montana* untersucht worden, wo auf wenigen Quadratmetern zahlreiche Rosetten dicht an dicht wachsen. Hier wurden auf der Fläche von einem Quadratmeter im Raster von 10 * 10 cm Proben genommen (kleines Grid). Hieraus wurden je Bestand 10 Proben gleichmäßig über dieses

Raster verteilt genetisch untersucht, um zu ermitteln, welche Rosetten genetisch identisch und somit Bestandteil eines Klons waren. Die verwendeten Marker sind durch ihre hohe Variabilität dafür hervorragend geeignet. Für die Ermittlung der genetischen Vielfalt in den Beständen wurden zusätzlich sog. große Grids beprobt. Die so beprobten Pflanzen wurden in einem Raster von mindestens 1 m ausgewählt und es wurden nach Möglichkeit mindestens 15 Pflanzen je Bestand untersucht. Auf dieser Skala wurden wesentlich seltener Klone gefunden, die dann für die Analyse der Diversität aber mit nur je einem Exemplar im Datensatz verblieben, um die Häufigkeiten der Allele nicht zu verzerren. Die Bestände waren sehr unterschiedlich aufgebaut, so dass teilweise kein großes Grid beprobt werden konnte, weil *A. montana* dort nur geklumpt auf sehr kleinen Restflächen vorkam.

Es zeigte sich, dass die genetische Vielfalt in den Beständen im hessischen Tiefland stark schwankt. Die mittlere erwartete Heterozygotie in 18 Beständen, in denen genügend genetisch unterschiedliche Individuen ($N \geq 15$) beprobt werden konnten, lag bei $uHe = 0,50$ und schwankte zwischen 0,37 in Rosenthal und 0,63 in Bieber und Wasserkuppe 2 (Tab. 1). Auffällig war zudem, dass selbst in Beständen mit geringer Diversität keine Anzeichen für Inzucht bestanden, da der Inzuchtkoeffizient F zwischen 0,05 und $-0,19$ schwankte (Mittelwert $-0,04$). Das liegt vermutlich im Selbstinkompatibilitätssystem von *A. montana* begründet, das bei Selbstbestäubung zu einem sehr geringen Samenansatz führt (Luijten et al., 1996, eigene Beobachtungen). Noch dramatischer jedoch stellte sich die klonale Vielfalt dar. Zahlreiche der sehr kleinen Bestände bestehen demnach nur noch aus einem bis wenigen Klonen (Tab. 1), was mangels nicht verwandter Paarungspartner zu einer sehr begrenzten sexuellen Fortpflanzung führt. Auch die erneute Ausbreitung in der Fläche, selbst bei idealer Pflege, ist durch die geringen möglichen Distanzen bei der klonalen Fortpflanzung so nur extrem langsam möglich. Solche Bestände benötigen also unbedingt eine Anreicherung mit genetischem Material aus geeigneten Spender-Beständen. Nach der Bereinigung für die Klone, verblieben von 861 beprobten Pflanzen nur 578 einzigartige Genotypen im Gesamtdatensatz. Dies verdeutlicht noch einmal die Bedeutung der vegetativen Fortpflanzung bei *A. montana* und den Handlungsbedarf für populationsstützende Maßnahmen.

Tabelle 1 - Populationsgenetische Kenngrößen von 39 hessischen Beständen von *A. montana*. Dargestellt sind die Anzahl unterschiedlicher Genotypen je Bestand (Geneten), beobachtete Heterozygotie (Ho), für die Stichprobengröße korrigierte erwartete Heterozygotie (uHe), Inzuchtkoeffizient (F), klonale Diversität im kleinen Grid (R) sowie der jeweils höchste ermittelte Wert für die Rosettenzahl aus den Jahren 2009 – 2016 (max. Rosetten).

| Population Neu | Geneten | Ho | uHe | F | R | max. Rosetten |
|-----------------------|---------|------|------|-------|------|---------------|
| Alertshausen | 24 | 0,47 | 0,46 | -0,04 | 0,00 | 4350 |
| Ballersbach | 7 | - | - | - | 0,33 | 173 |
| Bermuthshain_West | 4 | - | - | - | 0,33 | 156 |
| Bermuthshain_Ost | 22 | 0,56 | 0,58 | 0,00 | 0,33 | 6498 |
| Bieber | 18 | 0,62 | 0,63 | -0,02 | 0,00 | 382 |
| Bottenhorn | 2 | - | - | - | 0,11 | 250 |
| Breugesshain | 10 | - | - | - | 0,00 | 2000 |
| Donsbach | 40 | 0,52 | 0,49 | -0,06 | 1,00 | 7996 |
| Eschenstruth | 7 | - | - | - | 0,22 | 146 |
| Flammersbach | 3 | - | - | - | 0,22 | 486 |
| Fleisbach | 37 | 0,54 | 0,52 | -0,06 | 0,89 | 8875 |
| Frohnhausen | 32 | 0,49 | 0,46 | -0,08 | 0,80 | 1294 |
| Giesel | 1 | - | - | - | 0,00 | 260 |
| Günsterode | 29 | 0,51 | 0,48 | -0,07 | 0,78 | 1615 |
| Gusternshain | 13 | - | - | - | 0,11 | 1031 |
| Haine | 8 | - | - | - | 0,22 | 589 |
| Hatzfeld | 11 | - | - | - | 0,67 | 485 |
| Hausen1 | 27 | 0,40 | 0,37 | -0,07 | 0,33 | 10000 |
| Hausen2 | 16 | 0,42 | 0,40 | -0,06 | 0,22 | 7500 |
| Hohenroth | 34 | 0,58 | 0,59 | 0,00 | 0,67 | 3508 |
| Ilbeshausen/Aehlkopf | 20 | 0,50 | 0,52 | 0,03 | 0,22 | 765 |
| Lauterbach/Birkich | 18 | 0,56 | 0,54 | -0,04 | 0,78 | 1100 |
| Manderbach | 1 | - | - | - | 0,00 | 250 |
| Oberems1 | 1 | - | - | - | 0,00 | 160 |
| Oberkalbach | 3 | - | - | - | 0,22 | 120 |
| Ober-Moos | 19 | 0,54 | 0,48 | -0,16 | 0,33 | 990 |
| Oberreifenberg | 8 | - | - | - | 0,00 | 1122 |
| Oberweidbach | 2 | - | - | - | 0,00 | 660 |
| Quentel | 4 | - | - | - | 0,11 | 500 |
| Rommerode | 1 | - | - | - | 0,00 | 60 |
| Rosenthal | 15 | 0,45 | 0,39 | -0,19 | 0,00 | 89 |
| Schmitten-Arnoldshain | 21 | 0,46 | 0,49 | 0,01 | - | - |
| Seidenroth | 25 | 0,58 | 0,59 | 0,00 | 0,78 | 2157 |
| Udenhausen | 11 | - | - | - | 0,44 | 826 |
| Wasserkuppe1 | 10 | - | - | - | 0,22 | 314 |
| Wasserkuppe2 | 34 | 0,59 | 0,63 | 0,05 | 0,44 | 10000 |
| Weiperz1 | 1 | - | - | - | 0,00 | 375 |
| Weiperz2 | 4 | - | - | - | 0,11 | 609 |
| Wollrode | 35 | 0,39 | 0,40 | 0,01 | 0,78 | 2010 |

Untersuchung von klonalen Strukturen

Die Abhängigkeit der klonalen Diversität R (Arnaud-Haond et al., 2007) der kleinen Grids von der Anzahl der Rosetten in den Beständen als Maß für den Populationszustand wurde mittels eines verallgemeinernden, linearen Modells (GLM mit Gamma-Linkfunktion) getestet, da die Modellvoraussetzungen für ein lineares Modell nicht vorlagen. Die Modellvoraussetzungen für das GLM wurden mittels diagnostischer Plots überprüft.

Zudem wurde die klonale Diversität R des kleinen Gridsamplings auf Korrelation mit jener des großen Samplings geprüft mithilfe einer Spearman-Rang-Korrelation aufgrund fehlender Normalverteilung der Daten. Die Anzahl der zu testenden Bestände reduzierte sich hierbei von 39 auf 28, da für 11 Bestände das große Sampling mangels vorhandener Pflanzen nicht möglich war.

Die GLM-Analyse ergab einen hoch signifikanten, positiven Einfluss der Bestandsgröße als Anzahl der Rosetten auf die klonale Diversität der kleinen Grids (Koeffizient: -0.5970 ± 0.1768 , $p=0,00177$, erklärte Devianz=21,79%, Abb. 2), d.h. mit zunehmender Bestandsgröße nahm die Anzahl an Genotypen im kleinen Grid zu. Die Korrelationsanalyse zwischen der klonalen Diversität R der kleinen Grids und des großen Samplings der Bestände ergab keinen signifikanten Zusammenhang ($r_s=0.3573$, $p=0.062$, Abb. 3). So waren auch in Beständen mit kleinen Grids, die ausschließlich aus einem oder wenigen Geneten bestanden, im großen Sampling wenige bis keine Klone zu identifizieren.

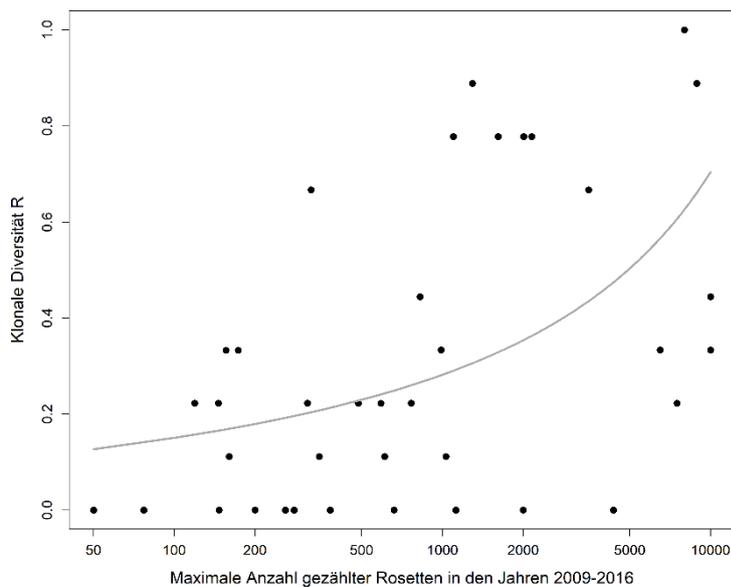


Abbildung 2 - Zusammenhang von klonaler Diversität R und maximaler Anzahl gezählter Rosetten im Zeitraum 2009-2016. Zu beachten ist die logarithmische Skalierung der X-Achse.

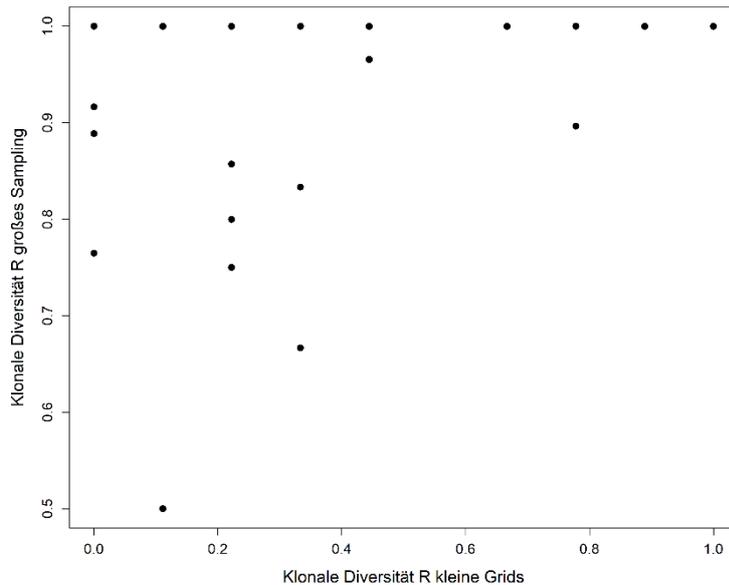


Abbildung 3 - Zusammenhang von klonaler Diversität der kleinen Grids und klonaler Diversität der großen Grids.

Die Ergebnisse zu den genetischen Rückgangsursachen werden derzeit für eine Publikation in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift vorbereitet (Mosner et al., 2021). Außerdem sind sie in allgemeinverständlicher Form Teil des bereits erschienenen Praxisleitfadens „Wilde Arnika“ (Titze et al., 2020).

Bewertung der genetischen Rückgangsursachen

Als Fazit der Untersuchung der genetischen Rückgangsursachen kann man zusammenfassend festhalten, dass die Bestände von *A. montana* im hessischen Tiefland zu einem großen Teil von genetischer Erosion bedroht sind, da es kaum genetischen Austausch gibt und viele Bestände nur noch als überwiegend klonale Flecken persistieren und somit keine sinnvoll messbare genetische Vielfalt mehr enthalten. Insgesamt ist auf den ersten Blick noch viel genetische Vielfalt vorhanden, jedoch werden viele der stark reduzierten Bestände aus eigener Kraft nicht in der Lage sein, wieder vitale Populationen aufzubauen. Das Aussterberisiko dieser Bestände ist als hoch einzuschätzen. Neben einer konsistenten Habitatpflege, die die Standortbedingungen für *A. montana* verbessert, ist also zwingend die Einbringung von genetischem Material aus geeigneten Spenderpopulationen notwendig. Die gute Nachricht ist, dass es im Tiefland auch noch gesunde, genetisch vielfältige Bestände gibt, die als Spender geeignet sein dürften.

Mit der genetischen Bestandsaufnahme besteht die Möglichkeit, in Zukunft ein regelmäßiges genetisches Monitoring durchzuführen und nach erfolgten Stützungsmaßnahmen, eine Erfolgskontrolle durchzuführen.

4.2 Nutzungsexperiment

Die Ergebnisse dieses Teils sind im Endbericht des Projektpartners der Hochschule Geisenheim (AG Biodiversität) detailliert ausgeführt und werden hier kurz zusammengefasst.

Auf vier Versuchsflächen im hessischen Lahn-Dill-Kreis wurden experimentelle Behandlungen der vorhandenen Vegetation vorgenommen und deren Einfluss auf die Etablierung und das Überleben eingebrachter Pflanzen von *A. montana* über fünf Jahre untersucht. Hierbei wurden sowohl

Jungpflanzen zu Beginn des Experiments als auch jährlich Samen eingebracht. Es zeigte sich, dass die Bodenbehandlung ein entscheidender Faktor für Etablierung und Überleben darstellt, d.h. die Schaffung von offenen Bodenstellen ist eine wichtige Voraussetzung, damit sowohl etablierte Pflanzen überleben als auch für neue Etablierung über Samen. Weiterhin zeigte sich ein positiver Effekt durch die Entnahme von Biomasse durch Nutzung in Form von sowohl Mahd als auch Beweidung.

4.3 Mykorrhiza

Die Ergebnisse dieses Teils sind im Endbericht des Projektpartners der Hochschule Geisenheim (AG Biodiversität) detailliert ausgeführt und werden hier kurz zusammengefasst.

In einem Gewächshausexperiment wurde das Wachstum von *A. montana* Pflanzen untersucht, um den Einfluss von Mykorrhizierung, Samenherkunft, Wasserverfügbarkeit und Nährstoffverfügbarkeit zu prüfen. Es zeigte sich, dass mit Mykorrhiza-Pilzen inokulierte Pflanzen ein höheres Trockengewicht und eine größere Blattfläche aufwiesen als nicht-inokulierte. Die Mykorrhizierungsrate bei Samen aus höher gelegenen Beständen war geringer als bei Samen aus Tieflagen. Die Wasserverfügbarkeit zeigte einen negativen Effekt auf die Mykorrhizierungsrate, so dass Pflanzen mit weniger verfügbarem Wasser eine höhere Mykorrhizierungsrate aufwiesen. Lediglich die Behandlung mit Dünger hatte im Experiment keinen Einfluß auf das Wachstum der Pflanzen.

Eine Freilanduntersuchung konnte die unterschiedlichen Mykorrhizierungsraten zwischen Hoch- und Tieflagen jedoch nicht bestätigen.

4.4 Übertragbares genetisches Monitoringsystem

Etablierung von Mikrosatelliten-Markern zur genetischen Untersuchung von A. montana

Zu Projektbeginn waren noch keine Mikrosatelliten-Marker für *A. montana* verfügbar. Es bestand jedoch Kenntnis über dahingehende bereits laufende Bestrebungen seitens AG Borsch im Rahmen des vom BfN geförderten Projektes „Integration von Ex-situ- und In-situ-Maßnahmen zur Erhaltung gefährdeter Blütenpflanzen in Deutschland“. Im Vorfeld waren wir bereits miteinander in Kontakt getreten und erhielten zu Projektbeginn von dort die nötigen Informationen, um die zu diesem Zeitpunkt noch nicht veröffentlichten Marker vorab schon nutzen zu können. Es wurden also zunächst alle 14 verfügbaren Mikrosatelliten-Marker (Duwe et al., 2015) an einem ausgewählten Set von 24 Proben verteilt über das Untersuchungsgebiet getestet und für den Einsatz in unserem Labor optimiert. Hierbei wurde gleichzeitig die DNA-Extraktion aus getrocknetem Blattmaterial nach dem bei uns etablierten Extraktionsprotokoll für pflanzliche DNA erfolgreich getestet. Alle Marker ließen sich verwenden und zeigten informative Variation (s. Tabelle 2). Die so entstandenen Protokolle und Erkenntnisse wurden der AG Biodiversität zur Verwendung in deren Genetik-Labor übermittelt.

Etablierung von PCR-Multiplexen

Um eine effiziente, kostengünstige und ressourcenschonende Untersuchung großer Probenzahlen zu ermöglichen wurden zunächst sogenannte PCR-Multiplexe entwickelt. Hierbei werden mehrere Marker gleichzeitig in einer Reaktion untersucht, was etwa 70% der Pipettierschritte, Chemikalien und des DNA-Materials einspart. Da Mikrosatelliten üblicherweise mit Hilfe einer Kapillarelektrophorese von fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten analysiert werden und die im Verbund zur Verfügung stehenden Geräte dafür drei verschiedene Farbkanäle zuließen, wurden aufgrund der zu erwartenden Fragmentlängen vier Multiplexe erstellt, von denen zwei jeweils vier unterschiedliche Marker

beinhalteten und zwei jeweils drei Marker (s. Tabelle 2). Bei Letzteren erhielt jeder Marker eine andere Farbmarkierung, während bei den 4er-Multiplexen je zwei der vier Marker zwar gleich markiert waren, sich aber in der Fragmentlänge ausreichend unterschieden, um Überlappungen zu vermeiden. Die Multiplexe wurden so optimiert, dass die Fluoreszenzsignale aller Marker in der Elektrophorese gut auswertbar waren. Auch diese Optimierungen wurden an die AG Biodiversität übermittelt.

Tabelle 2 - Liste der verfügbaren Mikrosatelliten-Marker nach Duwe et al. (2015) für A. montana, deren Eigenschaften, Variation untersucht an N=15-24 Individuen sowie deren Zuordnung zu den vier etablierten Multiplexen.

| Primer | Repeat-Typ | Motiv | kleinstes Allel | größtes Allel | Anzahl Allele | N | Multiplex |
|---------------|-------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------|------------------|
| Arm01 | 4 | (CATA) _n | 127 | 155 | 6 | 24 | 1 |
| Arm02 | 4 | (TACA) _n | 182 | 246 | 8 | 24 | 3 |
| Arm03 | 4 | (TACA) _n | 159 | 167 | 2 | 21 | 3 |
| Arm04 | 4 | (CATA) _n | 207 | 235 | 7 | 24 | 1 |
| Arm05 | 4 | (AACA) _n | 173 | 193 | 4 | 24 | 1 |
| Arm06 | 4 | (ACAT) _n | 186 | 242 | 4 | 24 | 2 |
| Arm07 | 4 | (TATG) _n | 219 | 223 | 2 | 21 | 4 |
| Arm08 | 4 | (TGTA) _n | 127 | 171 | 6 | 24 | 4 |
| Arm09 | 4 | (TATG) _n | 224 | 240 | 3 | 23 | 1 |
| Arm10 | 4 | (CATA) _n | 127 | 199 | 7 | 23 | 2 |
| Arm11 | 2 | (GT) _n | 152 | 154 | 2 | 24 | 2 |
| Armo01 | 2 | (AG) _n | 134 | 158 | 6 | 15 | 3 |
| Armo02 | 2 | (AT) _n | 164 | 206 | 4 | 24 | 4 |
| Armo03 | 6 | (ACCTGG) _n | 203 | 209 | 2 | 24 | 3 |

Durch einen Gerätewechsel im Jahr 2017 bedingt wurden die Multiplexe später noch einmal angepasst. Da so eine Anpassung in jedem Labor neu geschehen muss, verzichte ich hier auf weitere detaillierte Angaben dazu.

Charakterisierung der Allele

Als Voraussetzung für eine Standardisierung des genetischen Monitoringsystems war es notwendig, die Variation der Marker molekular zu charakterisieren, damit eine eindeutige Nomenklatur angelegt werden konnte. Hierfür wurde zunächst eine Auswahl von Individuen im Untersuchungsgebiet getroffen und parallel mit dem BGBM und dem Labor der Hochschule Geisenheim mit allen Mikrosatelliten-Markern untersucht, um für möglichst viele unterschiedliche Längen-Varianten der Mikrosatelliten (Allele) jeweils Ergebnisse aus verschiedenen Laboren vorliegen zu haben. Anhand der in Marburg untersuchten Bestände wurde von den hierbei beobachteten Allelen ein möglichst großer Teil durch DNA-Sequenzierung auf ihre molekulare Struktur hin untersucht (Abb. 4). Hierbei stellten seltene Allele eine besondere technische Herausforderung dar, da diese oft nur in heterozygoten Genotypen, also in Verbindung mit einem anderen Allel, vorkamen. Um diese Allele zu sequenzieren, waren besondere Auftrennungs- und Aufreinigungsschritte notwendig und auch oft mehrere Versuche, bis die Analyse gelang.

Fluoreszenzsignale sichtbar und man kann diese Mischprobe gelegentlich auf dem Sequenziergerät laufen lassen, um zu sehen, ob sich die dort ermittelten Fragmentlängen beispielsweise durch Alterung von Bauteilen über die Zeit verändern. Lässt man die allelische Leiter auf einem anderen Gerät laufen, erkennt man am Muster der Signale die charakterisierten Allele wieder und kann so Abweichungen zwischen Geräten genau charakterisieren. Anhand dieser allelischen Leitern und mit Hilfe ausgetauschter Einzel-Proben konnten die Datensätze der beiden Forschungspartner erfolgreich miteinander verschnitten werden und die in 4.1 genannten Erkenntnisse zur Populationsstruktur und –qualität gewonnen werden. Im Jahr 2020 konnten auch die in der Zwischenzeit publizierten Daten der AG Borsch (Duwe et al., 2017) und weitere Daten vom zwischenzeitlich in Marburg neu angeschafften Sequenziergerät mit Hilfe von Referenzproben und allelischen Leitern mit dem hessischen Datensatz verschnitten werden, so dass die in Hessen beobachtete genetische Struktur in das geographische Muster Gesamt-Deutschlands eingeordnet werden konnte (Abb. 5). Diese so erstellte Karte konnte in den Praxisleitfaden übernommen werden (Titze et al., 2020).

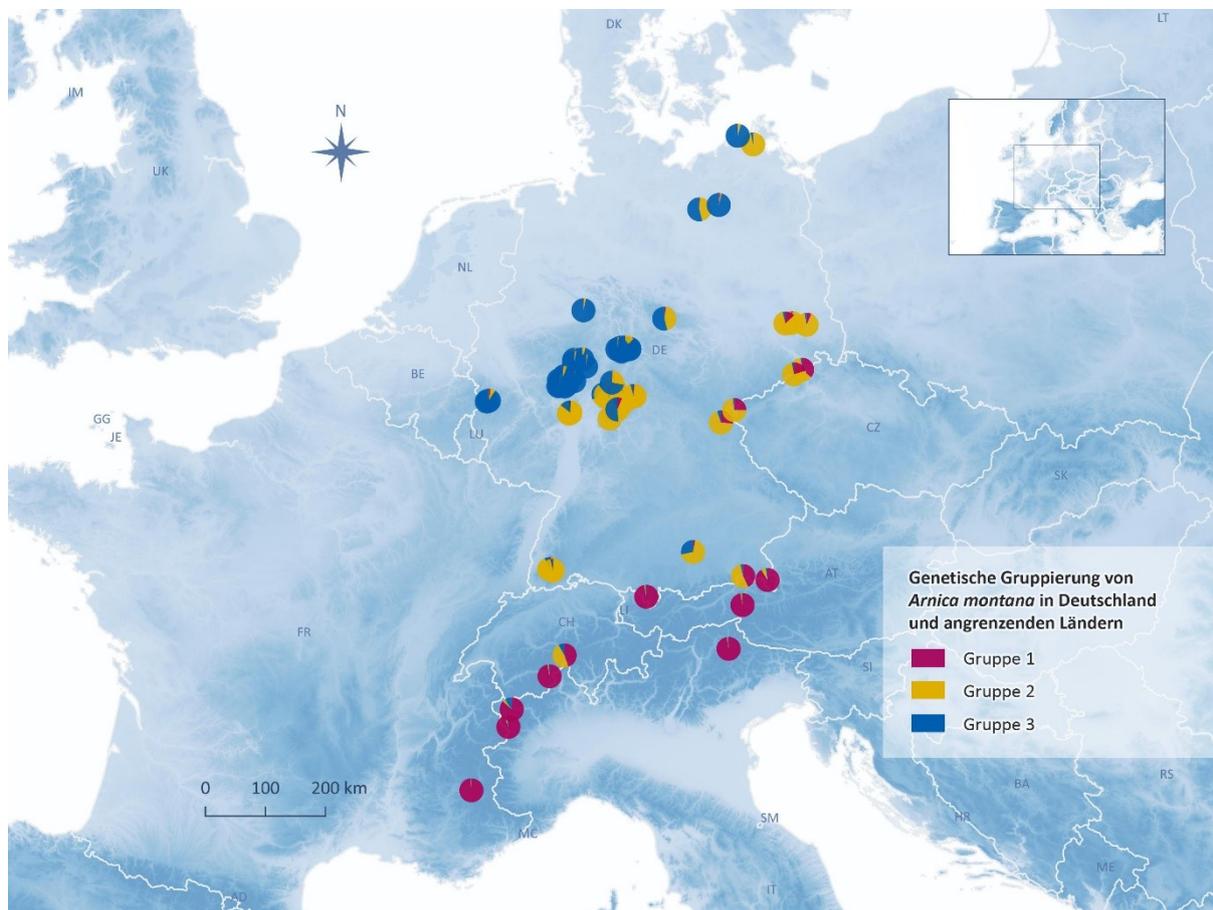


Abbildung 5 - Verschneidung genetischer Daten aus den Laboren in Geisenheim, Marburg und Berlin. In der Karte ist die Zugehörigkeit von *A. montana* Beständen aus Deutschland, Österreich, Italien, Frankreich und der Schweiz zu drei genetischen Clustern nach einer gemeinsamen STRUCTURE-Analyse dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die genetischen Cluster eine recht hohe geographische Kohärenz zeigen und dass die Populationen aus Hessen sich konsistent in das großräumige Muster aus Duwe et al. (2017) einfügen.

4.5 Kreuzungsexperiment

Aufgrund der Tatsache, dass viele Arnika-Bestände im Rückgang begriffen sind und viele auch schon seit längerem geringe Rosettenzahlen aufwiesen, war davon auszugehen, dass populationsstützende Maßnahmen ergriffen werden müssen. Insbesondere genetisch verarmte Bestände werden eine

Anreicherung mit Pflanzen aus anderen Beständen benötigen. Hierbei spielt die Auswahl der Spenderbestände eine entscheidende Rolle. Ein mögliches Risiko bei derartigen Maßnahmen ist die sogenannte Auszuchtdepression, die Fitnessnachteile für Individuen gemischter Abstammung bewirkt. Dieses Phänomen kann auftreten, wenn die gemischten Bestände genetisch zu unterschiedlich sind und manifestiert sich üblicherweise erst ab der zweiten Folgegeneration (F2). In der ersten Generation kann sogar vorübergehend eine erhöhte Fitness auftreten (Heterosis-Effekt). Um erste Anhaltspunkte zu Risiken und Chancen solcher populationsstützenden Maßnahmen zu erhalten, wurden mehrere Kreuzungsexperimente in enger Kooperation aller Projektpartner durchgeführt. Der Umfang des ersten Experimentes war leider deutlich kleiner als geplant, da aufgrund des geringen Anteils überlebender und blühender Arnika-Rosetten, die in 2016 für diesen Zweck angezogen worden waren, kaum Material für die Kreuzungen zur Verfügung stand. *A. montana* blüht erst ab dem zweiten Jahr und die Kultivierung in Töpfen ist schwierig, für ein solches Experiment jedoch nötig, damit blühfähige Pflanzen in ähnlichem Entwicklungsstadium für die Kreuzung überhaupt verpaart werden können. Insgesamt konnten 14 Kreuzungen in fünf Kategorien durchgeführt werden. Bei den Kategorien handelte es sich um Selbstungen (1), Kreuzungen innerhalb eines Bestandes (2), Kreuzungen zwischen Beständen einer genetischen Gruppe in Hessen (3), Kreuzungen zwischen genetischen Gruppen in Hessen (4) sowie Kreuzungen zwischen hessischen Beständen und einem Bestand aus den Alpen (5).

Die Kreuzungen wurden in Bestäubungskäfigen durch speziell angezogene Hummeln durchgeführt (Abb. 6). Aus diesen Kreuzungen konnten ca. 750 reife Samen geerntet werden, woraus im Jahr 2018 die Nachkommen angezogen wurden. Im Rahmen einer Masterarbeit wurden diese mit Hilfe der genetischen Marker überprüft und auf verschiedene Fitnessmerkmale untersucht (Aberle, 2020). Hier zeigten sich Fitnessnachteile bei den Nachkommen aus Selbstungen, die sich durch eine Inzuchtdepression erklären lassen. Für die anderen Kategorien konnte teilweise mangels ausreichend großer Stichprobe kein klarer Trend festgestellt werden.

Im Jahr 2018 wurde daraufhin ein weiteres, umfangreicheres Kreuzungsexperiment durchgeführt. Hierbei wurden Erkenntnisse aus dem Verlauf der Kreuzungen in 2017 berücksichtigt. Insgesamt wurden 60 Kreuzungen in vier Kategorien nach dem in Tabelle 3 dargestellten Plan durchgeführt. Bei den Kategorien handelt es sich um Selbstungen (1), um Kreuzungen innerhalb eines Bestandes (2), um Kreuzungen zwischen Beständen einer genetischen Gruppe in Hessen (3) und um Kreuzungen zwischen den beiden genetischen Gruppen in Hessen (4). Ziel war es verschiedene Level von Auszucht zu vergleichen und deren Auswirkungen auf die daraus entstehenden Nachkommenschaften zu untersuchen.

Tabelle 3: Übersicht über die im Jahr 2018 durchgeführten kontrollierten Kreuzungen. Jede Bestandskombination wurde, wenn möglich, in dreifacher Replikation durchgeführt.

| Kategorie | Typ | Anzahl Kreuzungen | Bestände/Kombinationen |
|-----------|-------------------------|-------------------|------------------------|
| 1 | Selbstung | 12 | 4 |
| 2 | Innerhalb Bestand | 13 | 5 |
| 3 | Innerhalb genet. Gruppe | 17 | 6 |
| 4 | Zwischen genet. Gruppen | 18 | 6 |

Es wurden insgesamt 13089 Samen geerntet und deren Zustand bewertet. In 45 Kreuzungen wurden 2332 lebensfähige Samen gewonnen. Bei 15 Kreuzungen wurden keine lebensfähigen Samen festgestellt, was zum Teil an einem frühen Absterben von Kreuzungspartnern lag. Insgesamt waren die Bedingungen für die Pflanzen durch die starke langanhaltende Hitze im Sommer 2018 sehr schwierig, so dass sie das Umsetzen in die Kreuzungskäfige zum Teil schlecht vertrugen. Es zeigte sich, dass Kreuzungen der Kategorie 1 anteilig deutlich weniger lebensfähige Samen hervorbrachten als die anderen Kategorien (Abb. 7), was durch das postulierte Selbstinkompatibilitätssystem von *Arnica* zu erwarten war.



Abbildung 6: Kontrollierte Kreuzung von A. montana Pflanzen. Mit Gaze bespannte Bestäubungskäfige (links), in dem die zu kreuzenden Pflanzen mit Hilfe von Hummeln bestäubt wurden (rechts). Die Pflanzen wurden vor Öffnung der Blüten eingehaust, um Fehlbestäubungen zu verhindern.

Die gewonnenen lebensfähigen Samen wurden in 2019 ausgesät und die Nachkommenschaften wurden auf Fitnessparameter untersucht wie z.B. Keimungsrate, Biomasse und Überlebensrate. Eine stichprobenartige genetische Untersuchung wird in 2021 im Rahmen einer weiteren Masterarbeit durchgeführt werden, um die tatsächliche Abstammung der Nachkommen zu verifizieren und um Prozesse wie Apomixis sichtbar machen zu können. Anschließend werden die Fitnessparameter entsprechend statistisch ausgewertet werden.

Samenansatz Kreuzung Arnica 2018

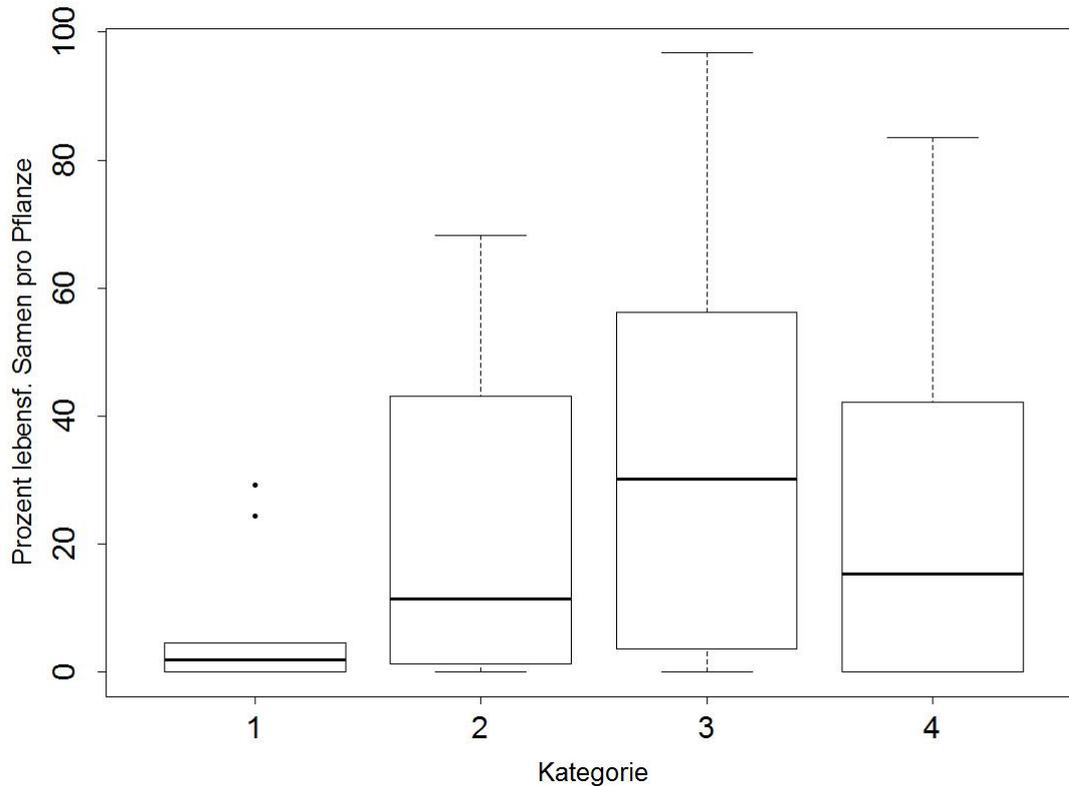


Abbildung 7: Als Boxplot dargestellter prozentualer Anteil lebensfähiger Samen je Kreuzungskategorie aus der Kreuzung von 2017.

In 2020 wurden Kreuzungen zur F2-Generation mit den überlebenden, blühenden F1-Nachkommen durchgeführt, um so eventuelle Auszuchtdepression feststellen zu können. Die Anzucht und Untersuchung der F2-Generation wird voraussichtlich in 2022 stattfinden. Die Erkenntnisse aus diesen Experimenten sollen nach abschließender Auswertung in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht werden sowie zur Beratung in der praktischen Durchführung populationsstützender Maßnahmen herangezogen werden.

5. Verwertungsplan

Die Ergebnisse zu den genetischen Rückgangsursachen werden derzeit für eine Publikation in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift vorbereitet (Mosner et al., 2021). Außerdem sind sie in allgemeinverständlicher Form Teil des bereits erschienenen Praxisleitfadens „Wilde Arnika“ (Titze et al., 2020).

Die im Projekt erzeugten genotypischen Datensätze werden im Zuge der Veröffentlichung der Publikation in entsprechenden Repositorien frei zugänglich gemacht werden. Die Informationen zur Allelcharakterisierung sowie allelische Leitern und Referenzproben sollen auf diesem Wege ebenfalls frei zugänglich gemacht werden. Hier stehen wir zur Zeit in Verhandlungen mit der AG Borsch, um dies technisch umzusetzen.

Die Ergebnisse der Kreuzungsexperimente sollen nach Abschluss der Auswertungen zur F2 ebenfalls in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift publiziert werden.

Die Forschungsarbeiten haben bereits zur Einwerbung eines Folgeprojektes mit der Hochschule Geisenheim geführt, in dem genetische und chemische Eigenschaften von *A. montana* im gesamten Verbreitungsgebiet mit Bezug zur Umwelt untersucht werden: „Signatures of local adaptation in secondary metabolite profiles and candidate genes of *Arnica montana* along environmental gradients“ 2019-2022.

Im Zuge dessen werden in Zusammenarbeit mit der AG Borsch zur Zeit genomische Ressourcen für *A. montana* erzeugt, auf denen weitere Projekte aufbauen sollen.

5.1 Tagungsbeiträge – Vorträge

Lauströer V (2017) Genetische und klonale Diversität sowie Populationsstruktur von *Arnica montana* in Hessen. Fachtagung – ArnikaHessen Projekttagung zu Forschung und Praxis von Schutzkonzepten für *Arnica montana*. 02.-03.03.2017, Geisenheim.

5.2 Tagungsbeiträge - Poster

Rokitte K, Lauströer V, Mosner E, Leyer I, Liepelt S (2015) Analysis of genetic diversity and structure of lowland populations of the endangered plant *Arnica montana* L. 45. Jahrestagung der Gesellschaft für Ökologie, 31. August – 4. September 2015, Göttingen.

Lauströer V, Rokitte K, Mosner E, Leyer I, Liepelt S (2016) Genetic and clonal diversity in *Arnica montana* – a means to stop the species' decline? 29th Conference of the Plant Population Biology Section of the Ecological Society of Germany, Austria and Switzerland, 5. – 7. Mai 2016, Třeboň, Tschechische Republik.

Liepelt S, Leyer I, Rokitte K, Lauströer V (2017) Vegetative Reproduktion in *Arnica montana* L.: Fluch und Segen zugleich. Fachsymposium "Schutz bedrohter Pflanzenarten in Mitteleuropa: Genetische Grundlagen und Naturschutzpraxis", 23.-25.2. 2017, Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin.

Liepelt S, Leyer I, Hepting C, Weise J, Hollmann V, Jeske L, Meyen M, Mosner E, Eulenstein E, Titze A (2018) Übertragbares Managementkonzept für *Arnica montana*: Von forschungsbasierter Identifikation der Rückgangsursachen über Umsetzung populationsstützender Maßnahmen bis zu eigenverantwortlicher lokaler Habitatpflege. 6. Nationales IPBES-Forum, 21.-22.2.2018, Bonn.

Liepelt S, Leyer I, Hepting C, Weise J, Hollmann V, Jeske L, Meyen M, Mosner E, Eulenstein E, Titze A (2018) Übertragbares Managementkonzept für *Arnica montana*: Von forschungsbasierter Identifikation der Rückgangsursachen über Umsetzung populationsstützender Maßnahmen bis zu eigenverantwortlicher lokaler Habitatpflege. 3. Hessische Landesnaturschutztagung, 24.10.2018, Gießen.

Aberle I, Leyer I, Hollmann V, Liepelt S (2019) Relevance of inbreeding and outbreeding effects for selection of donor populations in restoration ecology of *Arnica montana* L. (Asteraceae). 49. Jahrestagung der Gesellschaft für Ökologie, 9.-13.9.2019, Münster.

6. Literaturverzeichnis

- Aberle, I. (2020). *Untersuchung des potentiellen Einflusses von In- und Auszuchteffekten auf populationsstützende Maßnahmen bei Arnica montana L.* [Masterarbeit]. Philipps-Universität Marburg.
- Arnaud-Haond, S., Duarte, C. M., Alberto, F., & Serrão, E. A. (2007). Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, *16*(24), 5115–5139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03535.x>
- Duwe, V. K., Ismail, S. A., Buser, A., Sossai, E., Borsch, T., & Muller, L. A. H. (2015). Fourteen Polymorphic Microsatellite Markers for the Threatened *Arnica montana* (Asteraceae). *Applications in Plant Sciences*, *3*(1), 1400091. <https://doi.org/10.3732/apps.1400091>
- Duwe, V. K., Muller, L. A. H., Borsch, T., & Ismail, S. A. (2017). Pervasive genetic differentiation among Central European populations of the threatened *Arnica montana* L. and genetic erosion at lower elevations. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *27*(Supplement C), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2017.02.003>
- 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.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Leger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., & Petit, R. J. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, *11*(4), 591–611. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>
- Hollmann, V., Donath, T. W., Grammel, F., Himmighofen, T., Zerahn, U., & Leyer, I. (2020). From nutrients to competition processes: Habitat specific threats to *Arnica montana* L. populations in Hesse, Germany. *PLOS ONE*, *15*(5), e0233709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233709>
- Jost, L. (2008). GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, *17*(18), 4015–4026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>
- Kahmen, S., & Poschlod, P. (2000). Population size, plant performance, and genetic variation in the rare plant *Arnica montana* L. in the Rhön, Germany. *Basic and Applied Ecology*, *1*(1), 43–51. <https://doi.org/10.1078/1439-1791-00007>
- Luijten, S. H., Dierick, A., Gerard, J., Oostermeijer, B., Raijmann, L. E. L., & Den Nijs, H. C. M. (2000). Population Size, Genetic Variation, and Reproductive Success in a Rapidly Declining, Self-Incompatible Perennial (*Arnica montana*) in The Netherlands. *Conservation Biology*, *14*(6), 1776–1787. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2000.99345.x>
- Luijten, S. H., Oostermeijer, J. G. B., Leeuwen, N. C., & Nijs, H. C. M. (1996). Reproductive success and clonal genetic structure of the rare *Arnica montana* (Compositae) in The Netherlands. *Plant Systematics and Evolution*, *201*(1), 15–30. <https://doi.org/10.1007/BF00989049>
- Mosner, E., Hollmann, V., Capria, L., Leyer, I., & Liepelt, S. (2021). Regional population genetic patterns of *Arnica montana* as baseline for restoration measures. *I. Vorb.*
- Peakall, R., & Smouse, P. (2012). GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>

- Pop, M. R., Sand, C., & Barbu, C. H. (2008). Genetic distance determination in some genotypes of *Arnica montana* L., by RAPD technique. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 65(1), 201–203.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945.
- Rokitte, K. (2017). *Genetic diversity and structure of nine populations of Arnica montana L. in Hesse, Germany* [Masterarbeit]. Philipps-Universität Marburg.
- Titze, A., Hepting, C., Hollmann, V., Jeske, L., Leyer, I., Liepelt, S., Peters, A., & Weise, J. (2020). *Wilde Arnika—Ein Leitfaden für die Praxis*. Botanischer Garten der Philipps-Universität Marburg.